

氨基化溶胶-凝胶免疫电极检测乳腺癌抗原^{*}

梁汝萍, 邱建 丁李 红, 蔡沛祥
(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘要: 利用氨基化溶胶-凝胶 (Sol-gel) 的材料优势, 结合交联固定技术, 实现了乳腺癌抗体在电极表面的固定化, 研制成用于检测乳腺癌抗原的非标记型 Sol-gel/GA/抗体膜免疫电极。用红外光谱法和循环伏安法对电极的修饰过程进行表征。该法更好地保持了被固定抗体的活性, 增强了免疫电极的稳定性, 可用于生物环境中乳腺癌抗原的检测。

关键词: 氨基化溶胶-凝胶; 乳腺癌; 免疫电极

中图分类号: O657.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 05-0127-02

乳腺癌抗原 (CA15-3) 是医学界新发现的乳腺癌标志物, 血清中 CA15-3 的含量检测可作为临床诊断、淋巴结转移状况和术后跟踪等的一个重要依据^[1,2]。

免疫传感器的性能主要决定于生物分子的固定化方法, 常用的固定化方法有物理吸附和共价连接^[3], 但是物理吸附的稳定性较差, 被吸附的物质容易脱附而返回溶液中; 而共价连接往往导致蛋白质结构变异、生物活性降低, 从而影响传感器的稳定性和使用寿命。溶胶-凝胶 (sol-gel) 技术的发展, 为生物分子的固定化开拓了新途径^[4,5], 尤其是有机修饰前体^[6]的提出, 为功能团的引入和多种生物分子的键连固化开辟了更为广阔的新天地。以 N β -氨乙基- γ -氨丙基三甲氧基硅烷 (AEAPTMS) 和正硅酸甲酯 (TMOS) 为前体制备新型氨基化溶胶-凝胶材料, 滴涂于 Pt 盘电极表面, 然后结合交联技术, 通过双功能试剂戊二醛将乳腺癌抗体 (Ab) 固定于功能膜上, 制备成用于检测 CA15-3 的免疫电极。

1 实验部分

将 90 μ L AEAPTMS、30 μ L TMOS、400 μ L 水和 20 μ L 0.1 mol/L HCl 混匀, 室温下超声振荡 2 h, 使其形成均匀澄清的溶胶, 然后室温放置 3 d。将 3 μ L 上述溶胶储备液滴涂于按文献 [5] 预处理过的铂盘电极表面, 4 $^{\circ}$ C 干态放置 12 h 后, 浸入 $\varphi=2.5\%$ 戊二醛中 1 h, 取出用 PBS 充分清洗, 室温晾干, 再浸入 300 ng/mL CA15-3 抗体标准溶液中, 4 $^{\circ}$ C 干态放置 2~3 h, 清洗后置于 $\varphi=0.2\%$ BSA 中

1 h 以封闭未反应完全的醛基, 即制成 sol-gel/GA/Ab 膜免疫电极。将样品滴于制备的免疫电极表面室温培育 3 min, 用含 $\varphi=0.1\%$ BSA 的 PBS 充分清洗表面, 所得电极为指示电极, Ag/AgCl (饱和 KCl) 电极为参比电极, 一起置于 PBS 中组成测量电池, 记录稳定的电位值。伏安测量采用三电极系统: 制备的免疫电极为工作电极, Ag/AgCl (饱和 KCl) 电极为参比电极, 铂丝电极为对电极, 以循环伏安法 (CV) 研究免疫电极修饰过程的电化学特性。

2 结果与讨论

2.1 免疫电极修饰过程的红外光谱表征 将免疫电极制备过程中先后得到的 sol-gel 膜、sol-gel/GA 膜和 sol-gel/GA/Ab 膜进行红外光谱分析, 结果如图 1 所示。940 cm^{-1} 处出现的吸收峰对应于硅醇中 Si-OH 基 Si-O 键的伸缩振动 ν_{SO} , 1 036 cm^{-1} 处出现的吸收峰对应于 Si-O-Si 键的不对称伸缩振动。图 1 (a) 中于 3 500~3 300 cm^{-1} 处出现两个吸收峰, 于 1 672 cm^{-1} 处出现一个吸收峰; 图 1 (b) 中以上三处吸收峰消失, 于 2 720 cm^{-1} 左右和 1 730 cm^{-1} 处出现了 2 个新的吸收峰, 对应于醛基的特征吸收。而图 1 (c) 中醛基的特征吸收峰消失, 3 500~3 300 cm^{-1} 出现了一 NH_2 的特征吸收。表明 CA15-3 抗体通过双功能试剂戊二醛组装到了 sol-gel 上。

2.2 免疫电极的电化学行为 采用循环伏安法 (CV) 对免疫电极逐层组装过程的电化学行为进行了研究。由图 2 (a) 可见, 在 -0.4~+1.0 V 扫描范围内, sol-gel 修饰电极在 PBS 中于 0.7 V 左右出

^{*} 收稿日期: 2004-04-19

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (011105)

作者简介: 梁汝萍 (1974 年生), 女, 博士研究生; 梁汝萍, 邱建丁, 李红工作单位为萍乡高等专科学校化工系; 通

讯联系人: 蔡沛祥; E-mail: caipx@21cn.com

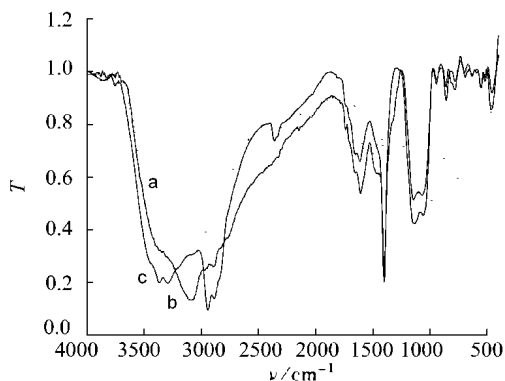


图 1 CA15-3 抗体固定化过程的 IR 光谱

Fig. 1 IR spectra of anti-CA15-3 antibody immobilized on sol-gel films by glutaraldehyde cross-linking method
(a) sol-gel, (b) sol-gel/GA and (c) sol-gel/GA/Ab

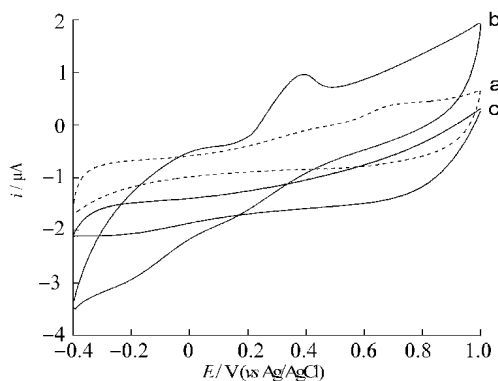


图 2 免疫电极逐层组装过程的 CV 曲线

Fig. 2 Cyclic voltammograms of electrodes
(a) sol-gel, (b) sol-gel/GA and (c) sol-gel/GA/Ab
in PBS with a scan rate of 100 mV/s

现氨基的氧化峰; 当 sol-gel 与戊二醛结合后, sol-gel/GA 修饰电极上的氧化峰消失, 于 0.38 V 和 0.16 V 左右出现一对醛基的氧化还原峰, 如图 2 (b) 所示, 表明通过醛基与氨基的反应, 戊二醛被连接到了功能化 sol-gel 膜上; 当 sol-gel/GA 膜与 CA15-3 抗体反应后, 醛基的氧化还原峰电流随抗体浓度的增加和反应时间的延长逐渐降低, 甚至消失, 如图 2 (c) 所示, 表明随着 CA15-3 抗体与醛基之间反应的进行, 戊二醛的醛基逐渐被反应完全而失去了电活性。由此也进一步证实了 CA15-3 抗体在氨基化 sol-gel 膜上的交联组装过程。

2.3 免疫电极对 CA15-3 的电位响应特性 修饰前体中氨基的引入, 为抗体在氨基化 sol-gel 膜上的交联固定提供了条件。Ab 通过双功能试剂戊二醛以手臂的形式与 sol-gel 连接起来, 一方面提高了 Ab 的固定化效率; 另一方面使 Ab 的活动范围大为增加, 有利于与抗原反应充分、缩短组装和培育时间; 此外, 该链接加大了 Ab 与基体电极间的距离, 消除了基体位阻带来的不稳定、失活和变性等不利因素的影响, 有效地保持了固定化抗体的生物活性, 改善了免疫电极的性能, 使制备的免疫电极具有良好的稳定性、重现性和特异性。

随抗体与抗原特异性反应的进行, 形成的抗体/抗原免疫复合物使膜电位发生变化 (ΔE), 免疫电极对 CA15-3 的电位响应在 8 ~ 240 V/mL 范围内呈良好的线性关系。与文献工作^[1,2] 相比, 本免疫电极制备简单、培育时间短、电位响应快, 而且对同一浓度的 CA15-3 测定所获得的电位响应更大。进一步改善工艺后, 有望用于血清中 CA15-3 的快速检测。

参考文献:

- [1] 彭图治, 祝方猛. 糖蛋白抗原抗体蚕丝素膜免疫传感器[J]. 分析测试学报, 2001, 20(2): 17-20.
- [2] 苏殿桀, 张黎亚, 王志玲. 聚苯乙炔活性膜免疫电极的研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 1985, 12(6): 72-74.
- [3] TAYLOR R F. Protein immobilization: fundamental and application[M]. New York: Marcel Dekker, 1991: 1-9.
- [4] WANG J, PAMIDI P V A. Sol-gel-derived thick film amperometric immunosensors[J]. Anal Chem, 1998, 70(6): 1171-1175.
- [5] 梁汝萍, 邱建丁, 蔡沛祥, 等. 溶胶-凝胶-HBsAb 膜免疫传感器的研制与应用[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(5): 793-797.
- [6] GRABAR K C, GRIFFITH FREEMAN R, NATAN M J, et al. Preparation and characterization of Au colloid monolayers[J]. Anal Chem, 1995, 67(4): 735-743.

The Amino functionalized Sol-gel CA15-3 Immuno-electrode

LIANG Ru ping, QIU Jian ding, LI Hong, CAI Pei xiang

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Sol-gel and cross-link techniques were utilized successfully to immobilize CA15-3 antibody (Ab) on the surface of platinum disk electrode. Infrared spectrophotometry (IR) and cyclic voltammetry (CV) were employed to investigate the characteristics of the immuno-electrode. The activity of the immobilized CA15-3 antibody is maintained better by this method, which profit the improvement of the stability of the immuno-electrode. This method can be used to determine CA15-3 in serum.

Key words: amino functional sol-gel; breast cancer; immuno-electrode