

超支化聚合物作为放大信号的纳米磁性微球电化学免疫分析法

丁风丽^{1 2} 程琼*^{1 2} 李俊峰² 姜非恩²

¹(常州大学石油化工学院,常州 213164) ²(嘉兴学院生物与化学工程学院,嘉兴 314001)

摘要 提出了一种基于超支化聚合物(HBP) 固化酶标二抗作为放大信号和纳米磁球相结合的超灵敏的免疫分析新方法。首先羧基纳米磁性微球共价键合乙肝抗体(HBsAb) 形成免疫磁性微球,然后与待测乙肝表面抗原(HBsAg) 发生特异性结合,加入 HBP 标记的酶标二抗(HBPS) 与结合的抗原结合发生夹心反应。在外加磁场的帮助下,抗体抗原免疫复合物易从样品溶液中分离,在含有邻氨基苯酚和 H₂O₂ 的底液中,快速生成具有电活性的化合物 3-氨基吩呢嗪,用示差脉冲伏安法(DPV) 测定响应电流,电流强度(*I*) 与乙肝表面抗原浓度(*c*) 在 0.05 ~ 10.0 μg/L 范围内呈线性关系,线性回归方程为 $I(\mu A) = 0.140 + 16.80 c(\mu g/L)$, 相关系数 $r = 0.9995$ 检出限达 0.008 μg/L,并用于实际样品的测定。

关键词 超支化聚合物; 纳米磁性微球; 乙肝表面抗原; 免疫分析

1 引言

电化学免疫分析法是将电化学检测同免疫技术相结合的一种分析方法,它既具有电化学检测的高灵敏度,又具有免疫分析的高特异性和专一性。

纳米磁性微球具有超顺磁性,较好的分散性、稳定性和生物相容性。利用其结合的抗原或抗体进行免疫分析,特异性高、分离迅速、重现性好。目前,纳米磁性微球已广泛应用于免疫分析,如酶、蛋白质、基因的固定,免疫传感器等^[1~5]。程琼^[6]等将乙肝抗体固化在磁球表面,成功捕获溶液中的乙肝表面抗原(HBsAg),利用标记有辣根过氧化物酶的乙肝二抗进行检测,检出限达到 0.06 μg/L。车宏莉等^[7]将日本血吸虫抗原共价吸附到磁性颗粒表面,通过荧光强度的变化实现间接测定。Varshney 等^[8]采用生物素-亲和素法,用纳米磁球标记抗体,成功检测食物中的大肠杆菌。

超支化聚合物是一种具有三维立体构造高度支化的聚合物,它溶解性高、粘度低、化学反应活性强,并且拥有大量可功能化的末端官能团^[9]。Ge 等^[10]利用超支化聚合物修饰脂肪酶,大大提高了固化的稳定性和反应活性。Shen 等^[11]通过对比实验发现,采用超支化聚合物修饰的方法具有较好的灵敏度和选择性。2011 年 Shen 等^[12]再次运用超支化聚合物结合蛋白 A,提高抗体的固定效率。

本研究应用夹心法原理如图 1 所示,将抗乙肝表面抗原的抗体和酶标二抗分别用纳米磁球和超支化聚合物进行固定化,运用示差脉冲法进行检测。其中纳米磁球能够保持抗体较高的免疫活性和较大的抗体固定量、较快的分离速度;超支化聚合物作为固定化的基质,能够很好地保持酶的天然活性^[10]、体系反应的稳定性和抗体的活性。与普通酶标二抗对比,放大酶标二抗法显示了明显的放大效果。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CHI440A 电化学分析仪(上海辰华仪器公司); PPMS-9 物理特性测试仪(美国 Quantum Design 公司); S2570 扫描电镜(日本日立公司); 400-MR 核磁共振仪(美国瓦里安公司); NEXUS470 傅里叶变换红外光谱仪(美国热电尼高力公司); MS-3 漩涡混合器(德国 IKA 公司); VS-15000 CFN 高速冷冻离心机(Vision Scientific 公司); NikonE-200 荧光显微镜(日本尼康公司); BIO-RAD680 酶标仪(美国伯乐有限公司)。

纯化的 HBsAb 单克隆抗体溶液、纯化的 HRP 酶标记的 HBsAb 多克隆抗体溶液和乙肝表面抗原

2011-12-23 收稿; 2012-04-22 接受

本文系浙江省自然科学基金(No. Y405468)、浙江省科技计划(No. 2007F70008) 嘉兴市科技计划项目(No. 2008AY2017) 资助

* E-mail: qcheng_102@163.com

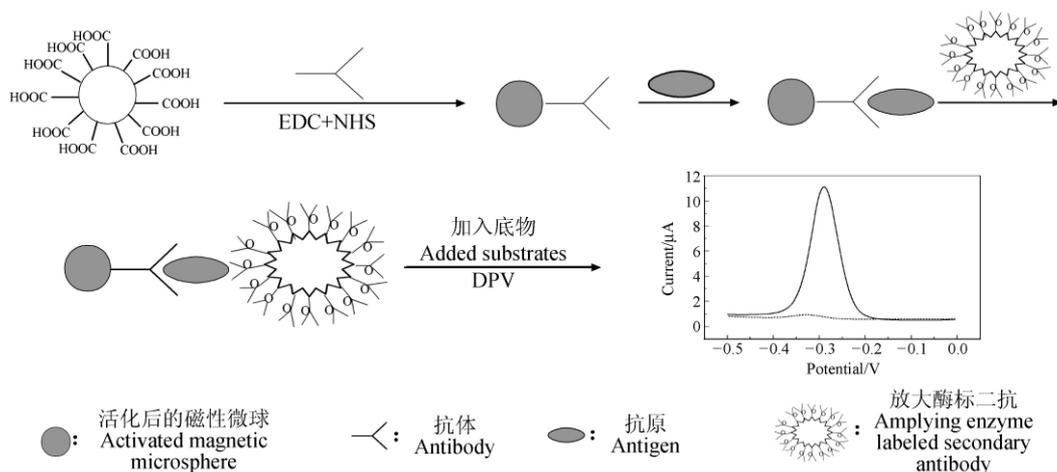


图 1 免疫反应示意图

Fig. 1 Schematic diagram of immunoanalysis

HBsAg 溶液(杭州埃夫朗生物制品公司); 盐酸-1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、牛血清白蛋白(BSA)均购自 Sigma 公司。其它试剂均为国产分析纯。实验用水为二次重蒸水。

2.2 超顺磁性纳米磁性微球的制备^[13]

用化学沉降法^[13]制备 Fe_3O_4 磁性超细颗粒磁流体, 颗粒大小经透射电镜证实为 8~10 nm。将 3 mL 磁流体, 7 g 聚乙二醇, 60 mL 乙醇和 15 mL 水加入三颈烧瓶中, 超声分散 10 min, 在氮气保护下, 加入 20 mL 苯乙烯, 2 mL 丙烯酸, 0.18 mL 二乙烯基苯和 3 g 过氧化苯甲酰。温度控制在 75 °C, 在一定转速下, 聚合反应 10 h, 用水和乙醇反复浸洗, 磁性分离, 得到棕黄色的羧基磁性微球。

2.3 超支化聚合物(HBP)的制备

超支化聚合物参照文献[10]合成: 将 0.25 g 对苯二胺, 0.52 g 均苯三甲酸, 2 mL 吡啶和 20 mL *N*-甲基吡咯烷酮(NMP)放进一个带有磁力搅拌器、氮气入口和回流冷凝器的烧瓶中; 反应开始后, 逐滴加入 4 mL 磷酸三苯酯和 5 mL NMP 的混合液。反应温度为 80 °C, 在氮气的气流中搅拌 3 h; 将溶液倒入 100 mL 甲醇中析出产品。粗产品的纯化需要通过从 NMP 溶液转移到甲醇中 3 次来完成。该纯化产品再用甲醇洗涤 3 次, 100 °C 真空干燥。

2.4 放大酶标二抗的制备

称取 1 mg 制备的 HBP, 加入 1 mL 水, 振荡混合, 移取混合液放入小试管中, 按照 $V(\text{EDC}): V(\text{NHS}): V(\text{HBP}) = 1: 1: 2$ 进行活化, EDC 浓度为 0.05 mol/L, NHS 浓度为 0.1 mol/L, 振荡反应 1 h 后, 离心分离, 洗涤 3 次; 加入 50 μL 新配的乙肝酶标抗体溶液(稀释比 1: 1000)和 0.9 mL PBS 缓冲液, 振荡反应 2 h, 离心分离 3 次; 用 1% BSA 溶液振荡封闭 2 h, 防止游离抗原和抗体的非特异性吸附, 离心分离 3 次, 定容至 100 μL , 备用。

2.5 乙肝抗体的固定、免疫磁性微球捕获抗原和酶标二抗

称取 20 mg 羧基磁性微球, 加入 1 mL 无水乙醇混合, 磁分离; 磁球加入新配制的 0.05 mol/L EDC 和 0.1 mol/L NHS 溶液各 500 μL , 室温下振荡反应 1 h, 磁分离, 磁球用缓冲液清洗, 加入 50 μL 新配的乙肝抗体溶液(稀释比为 1: 1000)和 0.9 mL PBS 缓冲液, 振荡反应 2 h, 磁分离 3 次, 用 1% BSA 缓冲液振荡封闭 2 h。

封闭后的免疫磁性微球, 磁分离去除 BSA 溶液, 加入 50 μL HBsAg 抗原, 振荡反应 10 min, 磁分离; 加入 50 μL 放大酶标二抗溶液, 振荡反应 10 min, 磁分离。

2.6 电化学检测

在反应后的磁性微球中, 加入新配制的 0.1 mL 0.01 mol/L 邻氨基酚, 0.5 mL 4.0 mmol/L H_2O_2 和 0.5 mL 0.1 mol/L 缓冲液($\text{pH} = 7.4$), 在 37 °C 恒温水浴中反应 15 min, 将反应液立即转移到 Teflon 反

应池,其中铂丝电极为对电极,Ag/AgCl电极为参比电极,镀有金膜的石英晶片为工作电极。用DPV检测其电流值,扫描速率为100 mV/s,扫描范围为-0.50~0 V。

3 结果与讨论

3.1 磁性微球颗粒大小和无剩磁性质的表征

本实验制备出粒径为8~10 nm的 Fe_3O_4 超细颗粒。以 Fe_3O_4 为磁核,采用分散聚合法^[14],用苯乙烯、二乙烯基苯和丙烯酸作为原料,过氧化苯甲酰作为引发剂,在其表面进行共聚反应,得到表面连有羧基的磁性微球,其粒径为90~100 nm。图2为所制备的纳米磁性微球的扫描电镜照片。

取磁性微球粉末用物理特性测试仪测得饱和磁距为0.126 emu/g,剩磁小于0.1%,图3是纳米磁性微球的磁化曲线图。该纳米磁性微球无剩磁和磁滞现象,表现为超顺磁性,便于其与底液分离后重新分散。

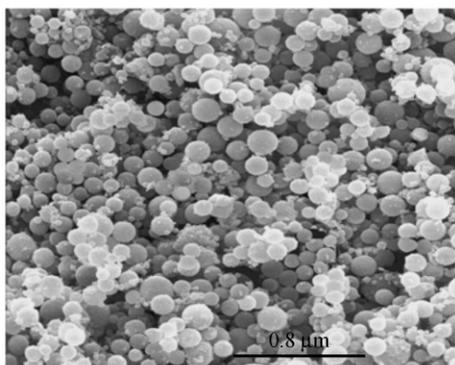


图2 磁性微球的扫描电镜图

Fig. 2 SEM image of magnetic microspheres

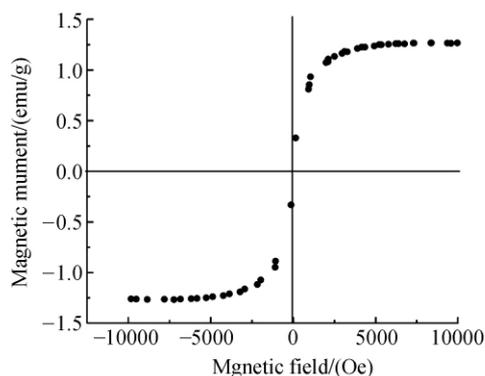


图3 磁性微球的磁化曲线图

Fig. 3 Magnetization curves of magnetic microspheres

3.2 超支化聚合物的核磁共振氢谱和红外光谱表征

由合成的HBP的核磁共振氢谱(图4)可观察到,在化学位移9.8~10.2 ppm处为羧基的特征质子吸收峰,8.611 ppm处为均苯三甲酸芳环上的氢质子吸收峰,6.508 ppm处为对苯二胺芳环上的质子吸收峰。

红外光谱:在3400~2005 cm^{-1} ,及1709,1630,1512,1402,1304,1244,818和513 cm^{-1} 有广泛吸收峰。其中1709和1630 cm^{-1} 分别为羧酸上的羰基吸收峰和酰胺结构的特征峰。

3.3 超支化聚合物的信号放大效果

为了证明超支化聚合物对免疫分析信号具有放大效果,进行了对比实验。在纳米磁球表面固定抗体形成免疫磁球,捕获抗原和酶标二抗,最后加入底物进行检测。图5表明,代表放大酶标二抗的1组电流值为8.98 μA ,而代表普通酶标二抗的2组电流值为1.97 μA 。此结果充分说明超支化聚合物对信号具有明显的放大效果。

3.4 酶催化反应中溶液pH值的优化

为了考察溶液pH值对响应电流的影响,配制了不同pH值的溶液。如表1所示,在不同的介质

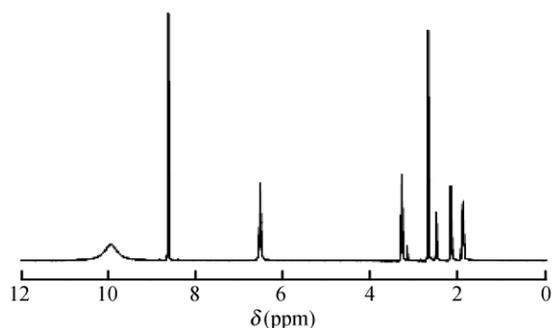


图4 超支化聚合物的核磁共振氢谱

Fig. 4 ^1H NMR spectrum of hyperbranched polymer

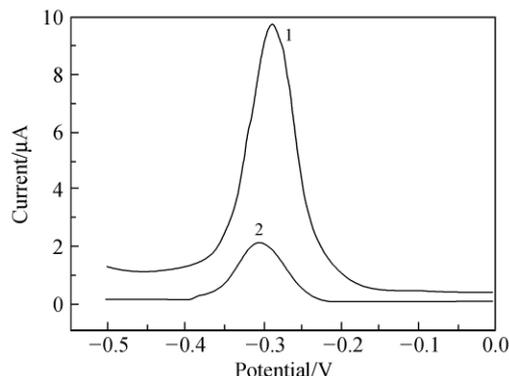


图5 超支化聚合物信号放大效果图(HBsAg抗原浓度为0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$): 1: 放大酶标二抗 2: 普通酶标二抗

Fig. 5 Signal amplification effect of hyperbranched polymer of 1: hyperbranched polymer-based enzyme-labeling secondary antibody 2: Ordinary enzyme-labeling secondary antibody

中, 抗原抗体的活性受到影响, 导致其结合受到阻碍, pH 值过高或过低还会影响酶蛋白的构象, 甚至导致变性失活, 从而使检测的电化学信号下降。本研究以磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 作为反应底液。

3.5 抗体固定时间的优化

抗体固定时间的长短直接影响交联上抗体数量及电化学检测信号的强弱。将 4.0 mg/L 荧光标记抗体加入到大颗粒的微球中, 取不同反应时间段的微球, 磁分离, 除去未结合的荧光标记物, 将微球置于荧光显微镜下观察。实验表明: 反应 2 h 后, 出现强荧光小球; 再延长反应时间, 荧光强度不再增强, 说明抗体已通过化学键合联结到磁性微球表面, 并且结合达到饱和。本实验中抗体固定化时间选择为 2 h。

3.6 HBP 与 EDC、NHS 体积比的选择

EDC 与 NHS 按体积比 1: 1 混合, 活化 HBP。实验发现 HBP 与其体积比对电流变化有影响, 当 $V(\text{HBP}): V(\text{EDC}): V(\text{NHS}) > 2: 1: 1$ 时, 电流变化值减小, 说明 HBP 上的羧基活化不完全。当 $V(\text{HBP}): V(\text{EDC}): V(\text{NHS}) < 2: 1: 1$ 时, 电流变化不大, 表明羧基活化已经完全。本实验中三者的体积比选择为 2: 1: 1。

3.7 线性关系、检出限和重现性

配制系列浓度的 HBsAg 溶液, 在免疫磁性微球中加入 50 μL 抗原溶液反应后再磁分离; 加入 50 μL 放大酶标二抗溶液反应, 磁分离后加入底物, 用示差脉冲伏安法测定其响应电流。实验表明, 本方法测得的 HBsAg 的浓度范围在 0.05 ~ 10 $\mu\text{g/L}$ 内, 响应电流 (扣除空白值) 与抗原浓度呈线性关系, 直线回归方程分别为 $I(\mu\text{A}) = 16.80c(\mu\text{g/L}) + 0.140$, 相关系数 $r = 0.9995$, 检出限为 0.008 $\mu\text{g/L}$ (3σ)。取浓度为 0.6 $\mu\text{g/L}$ 的 6 份抗原溶液分别进行测定, 所得电流值分别为 10.67, 9.88, 9.92, 10.39, 10.25 和 10.64 μA , $\text{RSD} = 2.90\%$, 说明本方法具有良好的重现性。

3.8 干扰实验

在包被有乙肝抗体的磁性微球中分别加入浓度均为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 的 HBsAg 溶液、甲胎蛋白抗原溶液、癌胚抗原溶液各 50 μL , 按本方法进行测定, 相对误差均小于 2.3%, 说明免疫反应有专一性, 异种抗原的存在对测定无明显影响。

3.9 实际样品的测定

由嘉兴第一医院检验科提供血清阳性乙肝样品, 按稀释比为 1: 100, 1: 1000 和 1: 2000 进行稀释, 测定结果见表 2。由表 2 可见, 在临床样品检验中, 本方法的灵敏度明显高于酶联免疫吸附法。

表 1 pH 值对免疫反应电流的影响 (抗原浓度为 0.4 $\mu\text{g/L}$)
Table 1 Influence of pH value on current response of immune reaction (Antigen concentration 0.4 $\mu\text{g/L}$)

pH	4	5	6	7	8	9	10
$i(\mu\text{A})$	6.18	6.71	6.95	7.25	6.85	6.70	5.82

表 2 实际样品的检测结果

Table 2 Analysis results for real sample

血清样品 Serum samples	稀释比 Dilution ratio	酶联免疫吸附法 ELISA ($\mu\text{g/L}$)	本方法 This method ($\mu\text{g/L}$)
阳性 Positive	1: 100	0.26	0.29
	1: 1000	-	0.018
	1: 2000	-	0.007

4 结 论

本研究将超支化聚合物结合的酶标二抗和纳米磁性微球键合的抗体与抗原形成免疫复合物, 采用示差脉冲法测定 HBsAg。本方法不仅简便快速, 特异性好, 而且检出限远低于临床的 ELISA 方法。所合成的纳米磁性微球, 与抗体结合强度高, 反应时间短, 磁分离性能好; 合成的超支聚合物, 比表面积大, 生物相容性好, 末端大量的羧基官能团大大提高了抗体的固定量。采用电化学方法进行免疫分析, 极大地提高了检测的灵敏度, 在临床免疫分析方面显示了良好的应用前景。

References

- Zhang Y, Wang H, Yan B N, Zhang Y W, Li J S, Shen G L, Yu R Q. *Journal of Immunological Methods*, **2008**, 332(1-2): 103-111
- Wang J, Xu D, Erdem A, Polsky R, Salazar M A. *Talanta*, **2002**, 56(5): 931-938
- Kima G, Rand A G, Letcher S V. *Biosensors and Bioelectronics*, **2003**, 18(1): 91-99
- Liu Z M, Yang H F, Li Y F, Liu Y L, Shen G L, Yu R Q. *Sensors and Actuators B*, **2006**, 113(2): 956-962

- 5 CHENG Gui-Fang, HUANG Cui-Hua, ZHAO Jie, TAN Xue-Lian, HE Pin-Gang, FANG Yu-Zhi. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2009**, 37(2): 169–173
程圭芳, 黄翠华, 赵洁, 谭雪莲, 何品刚, 方禹之. *分析化学*, **2009**, 37(2): 169–173
- 6 CHENG Qiong, PENG Tu-Zhi, LIU Ai-Li. *Acta Chimica Sinica*, **2004**, 62(24): 2447–2450
程琼, 彭图治, 刘爱丽. *化学学报*, **2004**, 62(24): 2447–2450
- 7 CHE Hong-Li, WANG Shi-Ping, WU Zheng-Ming, CHEN Yuan, WU Zhao-Yang, SHEN Guo-Li. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2008**, 36(11): 1455–1459
车宏莉, 汪世平, 吴争鸣, 陈媛, 吴朝阳, 沈国励. *分析化学*, **2008**, 36(11): 1455–1459
- 8 Varshney M, Li Y B. *Biosensors and Bioelectronics*, **2007**, 22(11): 2408–2414
- 9 SU Jin-Jin, LI Sheng-Biao, ZHAO Li-Feng, HOU Xue-Li, YIN Xiao-Ping, BAI Yi-Qiong, LONG Guang-Dou, HUANG Wei. *New Chemical Materials*, **2008**, 36(9): 3–5
苏津津, 李盛彪, 赵丽凤, 侯雪丽, 尹小平, 白一穷, 龙光斗, 黄维. *化工新型材料*, **2008**, 36(9): 3–5
- 10 Ge J, Yan M, Lu D N, Zhang M L, Liu Z. *Biochemical Engineering Journal*, **2007**, 36(2): 93–99
- 11 Shen G Y, Liu M H, Cai X W, Lu J L. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 630(1): 75–81
- 12 Shen G Y, Cai C B, Wang K, Lu J L. *Anal. Biochem.*, **2011**, 409(1): 22–27
- 13 QIU Guang-Ming, SUN Zong-Hua. *Chinese J. Chem. Reagent*, **1993**, 15(4): 234–237
邱广明, 孙宗华. *化学试剂*, **1993**, 15(4): 234–237
- 14 Zeng H M, Lai Q Y, Liu X Q, Wen D, Ji X Y. *Journal of Applied Polymer Science*, **2007**, 106(5): 3474–3480

Magnetic Nanospheres-based Electrochemical Immunoassay Amplified by Hyperbranched Polymer

DING Feng-Li^{1,2}, CHENG Qiong^{*1,2}, LI Jun-Feng², JIANG Fei-En²

¹(College of Petroleum and Chemical Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

²(College of Biological, Chemical Sciences and Engineering, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China)

Abstract A novel ultra-sensitive immunoassay for Hepatitis B surface antigen (HBsAg) was proposed. Magnetic nanosphere functionalized with carboxyl group was activated with 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride/*N*-hydroxy-succinimide (EDC/NHS), and then Hepatitis B surface antibody (HBsAb) was covalently immobilized on the surface. Hepatitis B secondary antibody labeled with horseradish peroxidase (HRP) was covalently linked to the hyperbranched polymer (HBP). The antibody could capture the HBsAg when the antibody-modified magnetic nanosphere was incubated with HBsAg. Then the HBP conjugate was added, and a sandwich immunocomplex formed on the surface of magnetic nanospheres. The nanosphere with sandwich complex was separated magnetically from sample solution, and then incubated in the buffer solution containing 2-amino hydroxy benzene and hydrogen peroxide. The HRP could catalyze the reaction between 2-amino hydroxy benzene and hydrogen peroxide to produce electroactive product 2-hydroxy-3-amino phenoxazine. When using differential pulse voltammetry, the peak current was linear with the concentration of HBsAg in the range of 0.05 to 10 $\mu\text{g/L}$ under the optimum conditions. The detection limit was found to be 0.008 $\mu\text{g/L}$, and the linear regression equation was $I(\mu\text{A}) = 0.140 + 16.80C(\mu\text{g/L})$ with $r = 0.9995$. This method was applied to analyze real samples.

Keywords Hyperbranched polymer; Magnetic nanosphere; Hepatitis B surface antigen; Immunoassay

(Received 23 December 2011; accepted 22 April 2012)