

对巯基苯胺在拉曼免疫检测中的应用

蒋芸, 崔颜, 顾仁敖*

苏州大学化学系, 江苏 苏州 215006

摘要 文章以对巯基苯胺(PATP)作为标记分子, 研究其在金电极上的吸附。发现对巯基苯胺分子是采用苯环直立于电极表面的吸附方式吸附于电极表面的。用于免疫检测时, 对巯基苯胺分子先通过直立吸附的方法达到满单层吸附, 然后通过胺基与抗体分子的羧基相连, 形成一种复层结构, 再与基底结合, 得到固相抗体-抗原-标记抗体“三明治”结构。借助抗体上标记金纳米粒子的 SERS 信号达到单组分生物免疫检测的目的。

关键词 表面增强拉曼光谱(SERS); 对巯基苯胺; 金纳米粒子; 免疫检测

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2006)07-1260-04

引言

标记免疫检测原理是以固相抗体(通过物理吸附或化学吸附固定于固相载体的抗体)特异性的捕获样品中的待测抗原。由于抗原一般含有多个活性位, 所以抗原又可反过来继续选择性结合标记抗体(带有可识别标记的抗体, 如酶标抗体等), 形成夹心复合物。通过对该夹心复合物标记信号的检测可对待测抗原进行定性或定量分析。标记免疫分析将多种标记示踪技术的高度灵敏性和医学免疫抗原抗体反应的高度特异性相结合, 具有良好的微量分析效果。利用 SERS 进行标记免疫检测主要就是采取这种夹心的检测模式。通过对夹心复合物内标记抗体的 SERS 标记分子信号检测就可进行待测抗原检测分析^[1,2]。

传统的拉曼散射光谱信号较弱, 作为信息读出手段往往缺乏高灵敏性。表面增强拉曼光谱(SERS)可使信号增强 6~10 个数级, 如今 SERS 已被大量应用于生物医学研究各方面^[3-7]。同时, 随着纳米粒子合成技术的发展, 纳米粒子用于生物分子标记已成为研究热点。Porter 等^[1]将纳米粒子标记与 SERS 相结合成功地应用于多组分标记免疫检测。

本文根据对巯基苯胺(PATP)分子结构的特点, 研究了在金电极上的吸附方式, 推断其可以作为一种新的免疫检测标记物。进一步尝试将其作为标记分子, 与金溶胶结合, 制得了具有强 SERS 信号的标记金溶胶, 并与山羊抗小鼠 IgG 结合, 获得了 SERS 标记免疫金溶胶。另一方面把抗体固定

在用有机分子修饰的光滑银玻璃基底上制备固相抗体, 成功得到了固相抗体-抗原-标记抗体“三明治”结构, 借助抗体上标记金纳米粒子所带的 SERS 信号达到免疫检测的目的。

1 实验

1.1 对巯基苯胺(PATP)在金电极上的吸附

金电极的粗糙: 机械抛光后用三次水超声清洗, 在 0.5 mol·L⁻¹的 H₂SO₄ 中进行电化学清洗, 用三次水超声清洗, 接着在 0.1 mol·L⁻¹ KCl 溶液中进行电化学氧化还原(ORC)粗糙。首先控制初始电极电位在 -0.6 V, 然后将电位正向扫描至 0.55 V, 在此电位下保持 3~5 s, 接着让电位慢慢回到 -0.6 V, 所获得电极表面为一层均匀的暗色具有 SERS 效应的表面。粗糙过的金电极作为工作电极浸入 1 mmol 的对巯基苯胺的乙醇溶液 1 h 左右, 用高纯氮气吹干, 便可进行拉曼检测, 结果见图 1(a), 图 1(b)。

1.2 对巯基苯胺(PATP)在免疫检测中的应用

金溶胶的制备: 100 mL 1.0 × 10⁻⁴ g·mL⁻¹氯金酸水溶液在剧烈搅拌下加热至沸腾, 迅速加入 0.65 mL 1.0 × 10⁻² g·mL⁻¹的柠檬酸钠水溶液, 保持沸腾 15 min 后自然冷却搅拌至室温^[8]。所得金溶胶透射电镜照片显示平均粒径为 40~50 nm。

标记金溶胶的制备: 在以上合成的 1 mL 金溶胶中加入 1 μL 1.0 × 10⁻³ mol·L⁻¹ PATP 的乙醇溶液, 常温下充分反应, 高速离心(12 000 g·min⁻¹) 5 min, 得到上层清液和底

收稿日期: 2005-05-28, 修订日期: 2005-08-28

基金项目: 国家自然科学基金(20273045, 20373046, 20573076), 厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室开放课题和高等学校博士学科专项科研基金资助项目

作者简介: 蒋芸, 女, 1979年生, 苏州大学化学系研究生 *通讯联系人

部为红褐色的金溶胶粒子聚集层。吸去上层清液后,加入 1 mL $2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 pH 9 硼砂缓冲溶液使聚沉在底部的金溶胶粒子恢复至分散状态。进行拉曼检测,见图 2。

标记金溶胶对抗体的标记:在上述标记溶胶中加入 10 μL $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的羊抗小鼠 IgG,在室温下“孵育”1 h。然后高速离心($12\,000 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$) 5 min,同样得到上层清液和底部红褐色的金溶胶粒子聚集层。吸去上层清液后,加入 1 mL $2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 9 的硼砂缓冲溶液使金纳米粒子恢复至分散状态,再高速离心($12\,000 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$) 5 min,吸去上层清液后,加入 0.5 mL $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲溶液,该缓冲溶液中还含有 0.1% Tween 80,用以减少免疫检测中的非特异性吸附。最终得到的 SERS 标记免疫金溶胶仍为红褐色。如此制得 SERS 标记免疫金溶胶。

“三明治”结构的组装:基底材料由 Full Moon BioSystems 公司提供。在石英玻璃上真空镀上 Ni-Cr 层,进而沉积上薄层银,最后修饰上特殊的高分子用来结合抗体上的羧基基团。这样的处理可以保证抗体在基底表面的直立排列,使之更好的去捕捉待测抗原。

将羊抗小鼠 IgG 用磷酸缓冲溶液 1 \times PBS (含 0.05% BSA, pH 7.4) 稀释到 $200 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,滴加到基底上作为拉曼光谱采集点。将滴加好抗体的芯片放在 65%~75% 湿度的环境里,恒湿保存 12 h。取出后室温自然干燥 30 min。然后放在 5% 的小牛血清 (BSA) 溶液中振荡 30 min。取出后用三次水冲洗,氮气吹干。放在抗原的缓冲溶液中振荡 2~4 h。用 TBS/0.1% Tween 冲洗三次,每次 5 min。再用 TBS 冲洗两次,每次 5 min。再用三次水冲洗,氮气吹干。泡入标记免疫金溶胶溶液,振荡 2 h。用 TBS/0.1% Tween 冲洗三次,每次 5 min。用 TBS 冲洗两次,每次 5 min。用三次水冲洗,氮气吹干。进行拉曼检测,见图 3。

电化学实验在 CHI660A 电化学工作站上进行,采用传统的三电极体系,其中辅助电极为铂丝,参比电极为饱和甘汞电极。

拉曼光谱试验采用美国 Nicolet 公司的 FT-Raman 型拉曼光谱仪。使用液氮冷却的 Ge 检测器,激光光源为 Nd/VO₄,能产生 1 064 nm 的近红外光。试验中所用的激光入射功率约为 300 mW。分辨率为 4 cm^{-1} ,若无具体说明,扫描次数均为 64 次。

2 结果与讨论

2.1 对巯基苯胺 (PATP) 在金电极上的吸附

对巯基苯胺的固体样品和 SERS 谱图示于图 1。从图中可以看出,对巯基苯胺是通过巯基与金形成强的化学键吸附于电极表面,使得与 -SH 和 -CS 有关的振动谱峰发生相应的变化^[9],如 SERS 谱图中 -SH 伸缩振动的消失, -CS 伸缩振动相应的谱峰从 $1\,086 \text{ cm}^{-1}$ 位移至 $1\,078 \text{ cm}^{-1}$,并且与 $1\,592 \text{ cm}^{-1}$ 的谱峰比起来,相对强度发生了变化。这说明了对巯基苯胺分子是通过苯环直立于电极表面的方式吸附于电极表面的。SERS 谱图中与苯环相关的振动并没有发生明显的位移,如:位于 $1\,587 \text{ cm}^{-1}$ 的环伸缩振动, $1\,177 \text{ cm}^{-1}$ 的

-CH 弯曲振动 (ν_{CH}), $1\,003 \text{ cm}^{-1}$ 的环伸缩振动, 639 cm^{-1} 的环伸缩振动等,基本与固体谱图中相应的谱峰位置一致 (仪器的分辨率为 4 cm^{-1})。 465 cm^{-1} 的被归属于环弯曲模式的峰在 SERS 谱图中完全消失,与之相应地在 390 cm^{-1} 处出现了一个较强的峰。由于这个谱峰是对巯基苯胺吸附于溶胶粒子后才得到很大增强的,因此,与 C-S 键的振动密切相关,可能来自 ν_{CS} 振动^[10]。这说明了对巯基苯胺分子中的苯环与金基底之间不存在相互作用,也就说明了对巯基苯胺分子中的苯环的取向完全垂直于电极表面。

对比图 1(b) 和图 2,主要的谱峰无论是在出峰位置还是相对强度,都没有发生明显的变化,可以认为在金纳米粒子表面对巯基苯胺分子也是通过苯环直立方式吸附于金纳米粒子表面的。采用这种直立吸附的方法可以在溶胶表面最大量地吸附标记分子,得到很好的 SERS 增强信号。

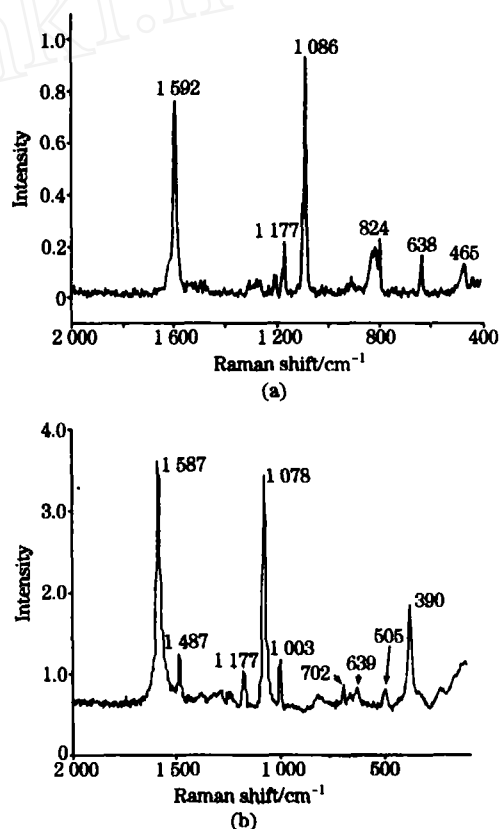


Fig 1 FT Raman spectra of PATP

(a): Solid sample; (b): Absorbed on a rough gold electrode

2.2 对巯基苯胺作为标记的免疫检测

根据我们的实验结果,控制在 50 nm 粒径左右的金溶胶,是一个比较好的 SERS 基底。对球型金粒子,当其粒径为 50~60 nm 时, SERS 增强因子最大。这与 Zeman 等人的计算相符^[11]。

对于抗体抗原来说,两者的结合是特异性的。前面制备得到的固相抗体特异性的捕获体系中的待测抗原,由于含有多个活性位,所以抗原又可反过来继续选择性结合标记抗体 (对巯基苯胺标记免疫溶胶),形成夹心复合物,通过对标记物信号的检测就可对待测抗原进行分析。

在银玻璃基底的“固相抗体-待测抗原-标记免疫金溶胶”夹心复合物的 FT-Raman 光谱图(见图 3)上,可以很清晰的得到对巯基苯胺的信号。加入抗原的(a),在 1 590 和 1 085 cm^{-1} 处出现了很强的特征峰,有充分的理由认为是对巯基苯胺的信号。而没有加入抗原的(b),由于固相抗体和免疫溶胶之间没有抗原的连接,并没有出现明显的标记物的信号。

我们之所以要选择对巯基苯胺这种标记物,是因为推测

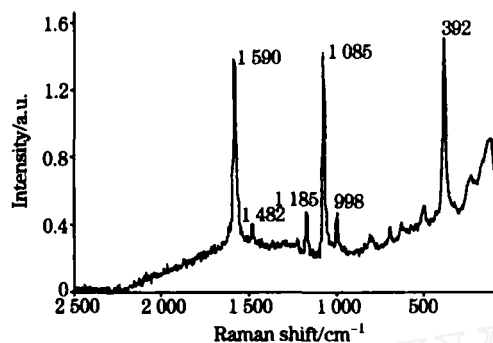


Fig 2 SER spectra of PATP on 50 nm gold sol

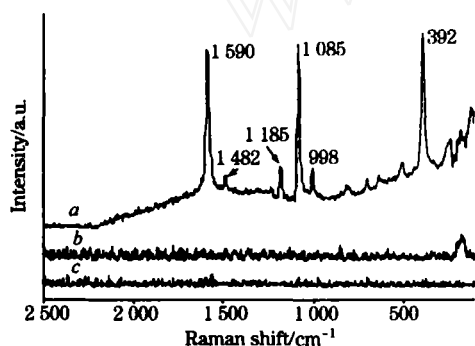


Fig 3 SER spectroscopy

- a: The “sandwich” construction labeled by PATP;
 b: The “sandwich” construction without antigen;
 c: Empty slide

它和抗体在金溶胶颗粒上的连接方式很特别,和常用的苯硫酚有所区别。苯硫酚(TP)是单官能团的标记分子,它和金溶胶颗粒直接以 Au—S 连接,对于抗体来说,不可能再和苯硫酚有强化学键的结合,因此在金溶胶表面形成的是一个苯硫酚和抗体混合的单层包裹层。对巯基苯胺分子和苯硫酚相比,官能团增加了,巯基可以和金溶胶结合,胺基则可以和抗体分子相连,而且新增加的胺基和苯环相连,加大了共振效应,拉曼信号较强。这样的结构,可以在溶胶表面最大程度的增加标记分子的数量,然后在标记分子上去连接抗体,无形中又增加了抗体的数量。进一步保证了最后“三明治”结构的稳定性。这与 Porter 等^[12]新提出的标记方式比较类似。我们推测金溶胶表面首先形成标记分子的包裹层,然后再包裹一层抗体分子,形成复合包裹层。虽然抗体分子和对巯基苯胺相比,体积相对较大,可能会形成抗体包裹。但是在苯硫酚的实验中,我们已经证实抗体的包被对标记物 SERS 信号不产生影响。从图 2,图 3 的比较中也可以看出,三明治结构的谱峰无论是在位置还是各峰的相对强度,都没有发生明显的改变,这说明抗体抗原的加入,对标记分子在金溶胶上的吸附趋向没有明显的影响。

3 结束语

我们以对巯基苯胺作为标记物,制得“三明治”结构,并可以借助标记金纳米粒子所带的 SERS 信号进行单一抗体的免疫检测。FT-SERS 光谱为研究免疫识别提供了一个新的、有效的手段。由于生物检测的复杂性,实际体系中需要在多个组分中检测出某个甚至某些组分,这就涉及到运用多个标记物进行混合多组分体系的检测。对巯基苯胺是苯硫酚的一个衍生物,因此它的拉曼特征谱峰和苯硫酚有很大部分是重叠的,区分性不理想。如何寻找另一类的标记分子,使得标记物的拉曼谱峰有明显的区分,从而可以同时进行多组分的分析,这是我们下一步要研究的课题。

参 考 文 献

- [1] Ni J, Lipert R J, Dawson G B, et al. Anal. Chem. , 1999 , 71 : 4903.
- [2] QIU Li-qun, GU Ren-ao (仇立群, 顾仁敖). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(5) : 547.
- [3] Michota A, Bukowska J. J. Raman Spectrosc. , 2003 , 34 : 21.
- [4] Sokolow K, Byramova N E, Mochalova L V, et al. Appl. Spectrosc. , 1993 , 47 : 535.
- [5] Morjani H, Rjou, J F, Nabiev, I R, et al. Manfait Cancer Res. , 1993 , 53 : 4784.
- [6] Nabiev I R, Morjani H, Manfait M. Eur. Biophys. J. , 1991 , 19 : 311.
- [7] Picorel R, Holt R E, Cotton T M, et al. J. Biol. Chem. , 1988 , 263 : 4374.
- [8] ZHU Zi-hua, ZHU Tao, LIU Zhong-fan (朱梓华, 朱涛, 刘忠范). Acta Phys. Chim. Sin. (物理化学学报), 1999, 15(11) : 996.
- [9] LI Xiao-wei, ZHENG Jun-wei, ZHOU Yao-guo, et al (李晓伟, 郑军伟, 周耀国, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2003, 31(11) : 1333.
- [10] Osawa M, Matsuda N, Yoshii K, et al. J. Phys. Chem. B, 1994, 98 : 12702.
- [11] Zeman E J, Schatz G C. J. Phys. Chem. , 1978, 91 : 634.
- [12] Grubisha D S, Lipert R J, Park H Y, et al. Anal. Chem. , 2003 , 75 : 5936.

Application of *p*-Aminothiophenol as a SERS Reporter in Immunoassay

JIANG Yun, CUI Yan, GU Ren-ao *

Department of Chemistry and Chemical Engineering, Suzhou University, Suzhou 215006, China

Abstract The adsorption of *p*-aminothiophenol (PATP) molecule on the gold electrode was investigated. The result suggests that PATP was adsorbed perpendicularly onto the substrate. By immobilizing goat anti-mouse IgG on a glass slide modified by special organic molecules, the antibody/antigen/reporter-labeled immunogold nanoparticle sandwich assay was built for surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) measurements. The *p*-aminothiophenol (PATP) was used as SERS-reporter molecule. Thus the authors can identify the single type biospecific species by SERS signal of the reporter molecules which are coimmobilized with antibody molecules in gold colloids.

Keywords Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS); *p*-aminothiophenol (PATP); Gold nanoparticle; Immunoassay

(Received May 28, 2005; accepted Aug. 28, 2005)

* Corresponding author