

基于二元混合自组装包裹纳米颗粒的微传感器抗体固定方法

薛茜男^{1,2} 边超¹ 佟建华¹ 孙楫舟¹ 张虹¹ 夏善红^{*1}

¹(中国科学院电子学研究所传感技术联合国家重点实验室北方基地,北京 100190)

²(中国科学院研究生院,北京 100080)

摘要 采用二元混合自组装膜修饰纳米金颗粒,在经自组装单分子层修饰的金电极上阵列式排布,并通过共价键固定抗体形成生物敏感膜。采用原子力显微镜、扫描电镜和阻抗谱分别对电极表面的修饰过程进行了表征。纳米粒子在微电极表面均匀分布,没有明显的团聚,并且可实现抗体有效固定。基于标准互补金属氧化物半导体(Complementary metal oxide semiconductor, CMOS)工艺和微加工技术,利用该抗体固定化方法,制备了糖化血红蛋白免疫微传感器,可同时检测血液中的糖化血红蛋白和血红蛋白含量,其对糖化血红蛋白和血红蛋白的检测范围分别为 14~170 μg/L 和 167~570 μg/L。

关键词 纳米金; 互补金属氧化物半导体; 微加工; 糖化血红蛋白; 集成芯片

1 引言

目前,便携式生物传感器的研究已成为热点,但很多免疫传感器还是基于酶标或者抗原抗体标记等方法,繁琐、耗时且造价较高^[1,2]。一些研究者应用离子敏场效应晶体管(Ion sensitive field-effect transistor, ISFET)在较宽范围内实现快速免标记的免疫检测。ISFET以基于标准互补金属氧化物半导体(Complementary metal oxide semiconductor, CMOS)工艺制备,为生物传感器微型化及批量生产提供了一种新思路。基于 ISFET 的微型免疫传感器,可实现快速无标记检测。

在免疫传感器制备过程中,固定抗体是非常关键的步骤。随着传感器从厘米尺度减小到毫米尺度,免疫传感器的敏感表面面积也变得很小,可以固定在敏感表面的生物分子量也随之减少^[3]。如何在微型传感器敏感表面上高效固定生物分子,并且有效控制其表面特性,成为了微型免疫传感器的研究难点。

纳米粒子的引入对于增强表面信号是一个非常有益的手段^[4]。纳米粒子具有较高的比表面积,使得微型传感器表面的生物分子固定量呈指数倍增长。自组装单分子层与生物大分子以分子键结合,性能稳定,生物相容性强并能抑制干扰信号。然而单一成分的自组装分子层容易造成较大的空间位阻,阻碍生物大分子的固定效率。二元混合自组装膜的二维空间结构能够降低电极表面固定化抗体的空间位阻,使抗体具有良好的空间分布,有助于抗体的固定,及保持抗体的免疫活性^[5]。

本研究在纳米金颗粒表面修饰包裹二元混合自组装膜,再将修饰过的纳米金颗粒固定到经自组装单层膜修饰的电极表面,共价键固定抗体形成生物敏感膜。本方法利用了纳米颗粒比表面积大的特点,增加了抗体的固定量;同时,纳米颗粒引入了特定的功能团,有利于生物分子的稳定结合,并能减少非特异性的结合,降低噪声干扰。此外,修饰的自组装膜使纳米颗粒在液相中均匀分散,将纳米颗粒固化到电极表面后,也能保持均匀分散,有效抑制了纳米颗粒的团聚。采用此抗体固定化方法制备了检测糖化血红蛋白的微传感器。本微传感器由采用标准 CMOS 工艺加工的场效应传感集成芯片和采用微加工技术制备的栅电极试条组成^[6,7],可实现糖化血红蛋白和血红蛋白的同时检测。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Gamry Reference 600 电化学分析仪(美国 Gamry 公司); S-4800 扫描电镜(FE-SEM,日本 Hitachi

2010-08-10 收稿; 2010-11-01 接受

本文系国家 973 计划项目(No. 2009CB320300)和国家 863 计划项目(No. 2006AA04Z366)资助

* E-mail: shxia@mail.ie.ac.cn

公司); Nanoscope IV 原子力显微镜 (美国 Veeco 公司) 轻敲工作模式。

糖化血红蛋白抗体、血红蛋白抗体(北京怡成生物技术有限公司); 糖化血红蛋白质控品(美国 Fitzgerald 公司); 巯基乙胺、16-巯基十六酸 ($\text{HSC}_{15}\text{H}_{30}\text{CO}_2\text{H}$), 3-巯基丙酸 ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 1,2-二氯乙烷 (EDC), *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 纳米金溶胶 (8~12 nm in diameter), 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 均购自美国 Sigma 公司; SU8 2100 胶(美国 MicroChem 公司)。其它试剂均为分析纯, 购自北京化学试剂公司。

2.2 免疫微传感器制备

微型免疫传感器包括 ISFET 集成芯片和一次性微型延长栅电极阵列(图1)。微型延长栅电极阵列在柔性材料上由 MEMS 工艺制备, 分为糖化血红蛋白和血红蛋白两个通道, 每个通道都有金敏感电极和金钝化电极, 两个通道共用一个铂参比电极。两个金敏感电极分别固定糖化血红蛋白抗体和血红蛋白抗体, 两个金钝化电极固定有惰性蛋白。金电极的圆形敏感面及参比电极的有效部位由 SU8 胶形成的三维微结构测量池所限定。测量池使得测试试剂用量仅为 10 μL 。ISFET 集成芯片基于 CMOS 标准工艺, 集成两组 ISFET/参比场效应晶体管 (Reference field-effect transistor, REFET) 敏感器件和信号处理电路。ISFET 和 REFET 分别与延长栅电极阵列的敏感电极和钝化电极连接, 电极表面的电荷变化影响场效应晶体管 (Field-effect transistor, FET) 的阈值电压, 敏感电极和钝化电极的响应以差分电压的形式输出。

2.3 生物分子固定化

2.3.1 自组装单层膜修饰金电极

将电极浸泡于 10 mmol/L 巯基乙胺的乙醇溶液中 12 h, 巯基乙胺的巯基可以与金电极表面形成强烈的共价键, 在金电极表面形成自组装单层膜。

2.3.2 二元混合自组装膜包裹纳米金

在纳米金溶胶溶液中加入 10 mol/L 16-巯基十六酸, 3-巯基丙酸 1:1 混合液, 搅拌, 过夜, 反复离心清洗, 溶于去离子水制成包裹有混合硫醇的纳米状颗粒悬液。

2.3.3 纳米金的固定

将 2.3 μL EDC 与 50 μL 10 g/L NHS 振荡混合均匀后, 加入 8 mL 纳米球状颗粒悬液中, 搅拌 15 min, 活化纳米金表面的羧基。将组装有巯基乙胺的金电极清洗吹干后, 在纳米球状颗粒悬液中浸泡 2 h。活化的羧基与巯基乙胺的氨基结合, 包裹有混合硫醇的纳米球状颗粒组装到金电极表面, 形成纳米颗粒阵列。

2.3.4 生物分子固定

在 4 个金电极敏感表面各滴加 EDC-NHS 混合溶液 0.5 μL 。静置 15 min 后, 在两个敏感电极表面分别滴加 1.3 g/L 糖化血红蛋白抗体、10 g/L 血红蛋白抗体; 在另两个钝化电极表面滴加 10 g/L 牛血清蛋白。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 密闭湿润的环境下静置 3 h。通过 EDC 和 NHS 表面活性剂的活化, 电极表面的羧基形成活性基团与抗体或惰性蛋白表面的氨基稳定结合, 使得生物大分子稳定固定于微型电极表面。最后在每个金电极的敏感表面滴加 10 g/L 牛血清蛋白, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 密闭湿润的环境下静置 1 h, 以封闭电极表面剩余的活性位点, 防止测试溶液中其它蛋白的非特异性吸附给测试结果带来的偏差。以抗体的固定为例, 金电极敏感表面的修饰过程见图 2。

3 结果与讨论

3.1 扫描电镜 (SEM) 表征表面形貌

采用 SEM 观测微型电极表面形貌。从图 3 可见, 金电极表面修饰纳米颗粒并固定抗体后, 可明显

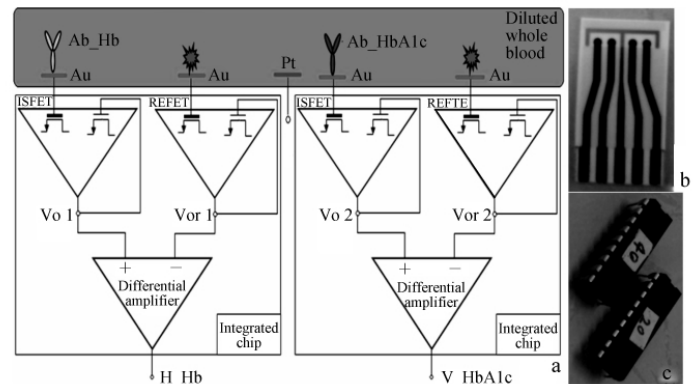


图1 (a) 微型糖化血红蛋白传感器检测原理图; (b), 微型延长栅电极阵列; (c), 基于 ISFET/REFET 的 CMOS 集成芯片
Fig.1 (a), Schematic graph of hemoglobin-A1c micro-sensor design; (b), Photo of micro extended gate electrode array chip; (c), Photo of integrated chip based on ion sensitive field-effect transistor/reference field-effect transistor (ISFET/REFET)

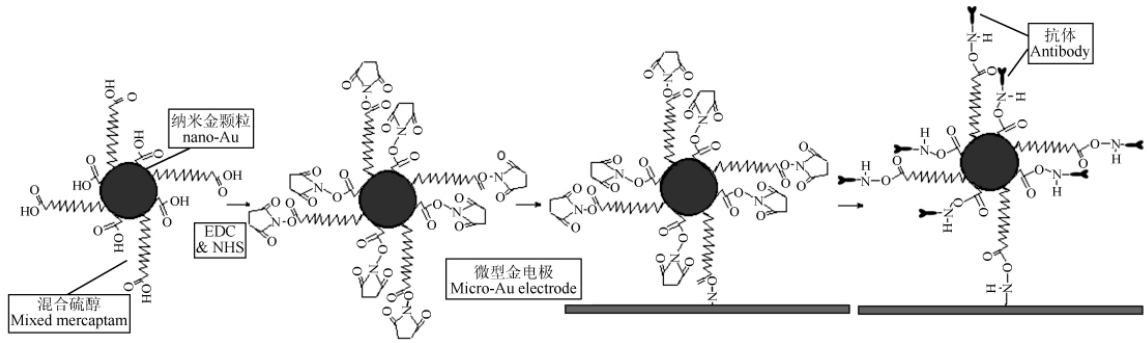


图 2 微型金电极表面修饰过程

Fig. 2 Scheme of antibody immobilization progress

看到纳米颗粒。文献[8]报道,纳米金颗粒通常易在电极表面团聚,且不容易分散均匀。SEM观测结果表明,此种抗体固定化方法应用于微型电极修饰,可将纳米颗粒均匀分布,颗粒尺寸相对一致,约为10~20 nm,未观察到明显的团聚现象,有利于抗体的固定。

3.2 原子力显微镜(AFM)表征抗体固定过程

AFM的轻敲模式是常用的表面分析方法,对固定化生物膜表面形貌及密度的分析尤其重要,近年来,用AFM轻敲模式法对固定化生物膜表面分子的尺寸分析报导^[9]逐渐增多。AFM进行表面分子尺寸分析时,粒子的高度反映了真实值^[10],而粒子在水平方向的宽度与针尖放大效应有关。图4a为金电极表面组装有自组装单分子层的AFM图,Z轴方向平均高度 R_z 约为1.814 nm;在修饰过混合自组装膜包裹的纳米颗粒后,均匀、连续地分布着颗粒状纳米结构(图4b), R_z 约为5.393 nm。紧密堆积的表面粒子在Z方向上高度可近似认为紧密堆积的粒子的半径,其尺度与SEM表征表面形貌尺寸吻合,证明本方法可将纳米颗粒成功修饰于电极表面,呈连续密闭分布,且分散均匀。

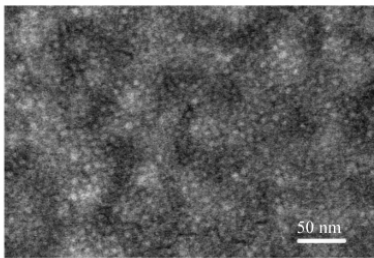


图 3 抗体-纳米颗粒阵列-金微型电极表面 SEM 图

Fig. 3 Scanning electron microscopy (SEM) images of antibodies-nano particles-SAM-Au

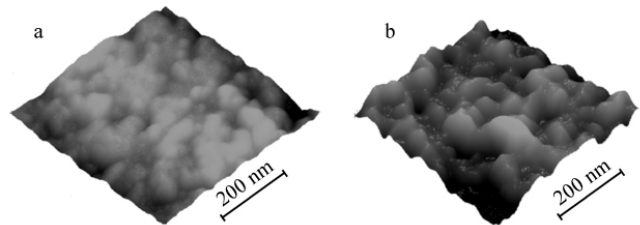


图 4 原子力显微镜(AFM)表征抗体固定过程:(a)自组装分子层修饰金电极;(b)修饰有纳米颗粒阵列的金电极表面

Fig. 4 Atomic force microscopy (AFM) characterize the process of antibody immobilization: (a) SAM-Au; (b) nano particles-SAM-Au

3.3 阻抗谱表征抗体固定过程

采用电化学交流阻抗谱对电极表面的修饰过程进行表征,其中交流阻抗谱图曲线半圆的直径为电子传递的阻抗 R_{et} 。图5显示了不同修饰电极在含有5 mol/L $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 的PBS溶液中的交流阻抗谱图,其半圆越小,电子传递效果越强。如图5B所示,裸金电极的阻抗谱(曲线a)近似呈直线,显示出较好的导电性。在其表面组装有纳米颗粒阵列后(曲线b),表面阻抗 R_{et} 增大。这是因为纳米金颗粒包裹有绝缘性的自组装膜。抗体固定在微传感器表面后(曲线c),表面阻抗 R_{et} 又略有降低。这是因为糖化血红蛋白抗体在测试溶液中携带有一定电荷量。此结果表明,电极表面的修饰达到了预期的结果,抗体成功固定在微型电极的表面。

3.4 微型传感器浓度响应曲线

糖化血红蛋白水平是检测糖尿病的重要指标,以糖化血红蛋白(Hemoglobin-A1c, HbA1c)占总血红蛋白(Hemoglobin)含量的百分比表示,被美国糖尿病协会列为糖尿病检测的金指标^[11]。考察传感器对不同浓度糖化血红蛋白传感器的响应电位,测试在稀释的糖化血红蛋白质控品中进行。其中含有

糖化血红蛋白、血红蛋白、牛血清蛋白、 PO_4^{3-} 、 Na^+ 等物质。结果表明,随着糖化血红蛋白浓度的增加,传感器的响应电位相对空白溶液的变化量成比例变化。如图 6 所示,糖化血红蛋白的线性范围为 13.75 ~ 170.5 $\mu\text{g/L}$,相关系数为 0.972,响应灵敏度为 17.4 $\text{mV}/(\log C_{\text{HbA1c}})$ 。正常人体中血红蛋白浓度约为 110 ~ 160 g/L ,糖化血红蛋白与血红蛋白比大于 7%,即诊断为糖尿病,最高为 15%。为了适应人体糖化血红蛋白水平,并基于微传感器对糖化血红蛋白检测范围,测试其对 167 ~ 570 $\mu\text{g/L}$ 血红蛋白的响应,其响应灵敏度为 30.0 $\text{mV}/(\log C_{\text{Hb}})$,相关系数为 0.953。此微型传感器性能满足临床测试需求,并且响应不受杂质离子的影响,可以实现对糖化血红蛋白和血红蛋白的同时检测。

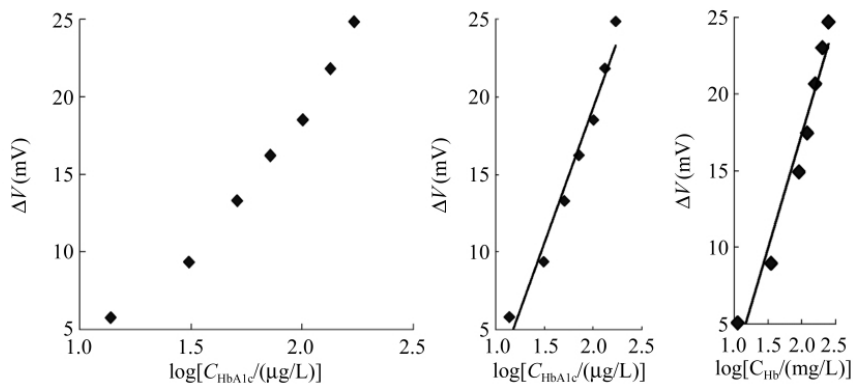


图 6 微传感器对糖化血红蛋白(HbA1c)及血红蛋白(Hb)浓度响应曲线

Fig. 6 Response of immunosensor to concentration of HbA1c

为考察传感器的临床应用前景,对糖化血红蛋白水平为 8.4% 的实际血样进行了测试。通常血样进行测试时需先加入细胞裂解液,裂解红细胞内的血红蛋白/糖化血红蛋白。为适应微型传感器的检测范围,先将实际血样用裂解液稀释 10 倍,再依次用 PBS 配制 0.1% 牛血清蛋白溶液和去离子水,将其稀释 30000 倍后进行测试。3 片微传感器对同一血样测试结果分别为 8.51%、8.69% 和 8.43%; RSD 为 1.56%; 回收率为 $97.03\% \pm 2.74\%$ 。

References

- Hildebrandt A, Ribas J, Bragos R, Marty J L, Tresanchez M, Lacorte S. *Talanta*, **2008**, 75(5): 1208 ~ 1213
- Trivedi U B, Lakshminarayana D, Kothari I L, Patel P B, Panchal C J. *Sensors and Actuators B*, **2009**, 136(1): 45 ~ 51
- Wan K, Chovelon J M, Jaffrezic-Renault N. *Talanta*, **2000**, 52(4): 663 ~ 670
- Wu B Y, Hou S H, Yin F, Zhao Z X, Wang Y Y, Wang X S, Chen Q. *Biosensors & Bioelectronics*, **2007**, 22(12): 2854 ~ 2860
- Fryxell G E, Rieke P C, Wood L L, Engelhard M H, Williford R E, Graff G L, Campbell A A, Wiacek R J, Lee L, Halverson A. *Langmuir*, **1996**, 12(21): 5064 ~ 5075
- BIAN Chao, XUE Qian-Nan, SUN Ji-Zhou, ZHANG Hong, XIA Shan-Hong (边超, 薛茜男, 孙楫舟, 张虹, 夏善红). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2010**, 38(3): 332 ~ 336
- Qu L, Xia S, Bian C, Sun J, Han J. *Biosensors & Bioelectronics*, **2009**, 24(12): 3419 ~ 3424

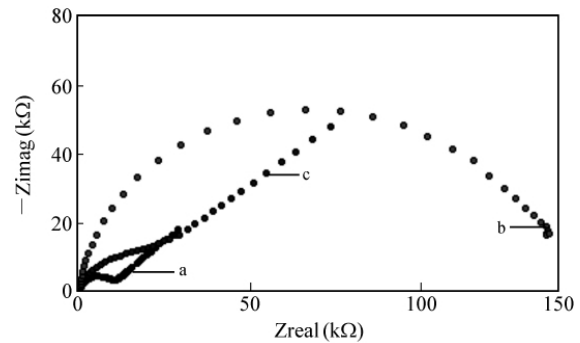


图 5 阻抗谱检测微型电极表面图谱: (a), 自组装分子层修饰金电极; (b), 修饰有纳米颗粒阵列的金电极表面; (c), 抗体固定后的金电极表面

Fig. 5 Electrochemical impedance spectroscopy: (a), SAM-Au; (b), nano particles-SAM-Au; (c), antibodies-nano particles-SAM-Au.

- 8 Li Y, Shi G. *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109(50): 23787 ~ 23793
- 9 CHEN Guang-Zhang, LIN Jing, YAN Yong-Gui, WANG Jun (陈光章, 林 晶, 阎永贵, 王 军). *Corrosion Science and Protection Technology* (腐蚀科学与防护技术), **2006**, 18(6): 426 ~ 428
- 10 LI Yang-Mei, JIANG Xiu-Ming, CHEN Zhi-Chun, FU Shui-Yu, LIN Xian-Fu(李扬眉, 江秀明, 陈志春, 傅水玉, 林贤福). *Acta Phys.-Chim. Sin.* (物理化学学报), **2004**, 20(2): 216 ~ 220
- 11 Tanaka Y, Gleason C E, Tran P O, Harmon J S, Robertson R P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1999**, 96(19): 10857 ~ 10862

Micro Biosensor Antibody Immobilization Method Based on Mixed Self-assembly-monolayers Wrapped Nano-particle

XUE Qian-Nan^{1, 2}, BIAN Chao¹, TONG Jian-Hua¹, SUN Ji-Zhou¹, ZHANG Hong¹, XIA Shan-Hong^{* 1}

¹(State Key Laboratory of Transducer Technology Institute of Electronics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190)

²(Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract Nano-gold particles that wrapped by mixed self-assembly monolayers (SAM) were immobilized on the SAM-modified Au micro electrode surface by amide linkage to form nano-particles array. Subsequently, a sensitive bio-film on the micro immunosensor surface was formed with covalent immobilization of antibodies on the nano-particles. Micro electrode surface modification process was characterized by atomic force microscopy, scanning electron microscope, and electrochemical impedance spectroscopy. The results indicated that the nano-particles distributed uniformly without apparent aggregation and the antibodies can be effectively immobilized on the microelectrode surface. Using this antibody immobilization method, hemoglobin-A1c (HbA1c) micro-sensors were prepared. Based on complementary metal-oxide-semiconductor (CMOS) standard process and micro-electronic-mechanical system (MEMS) technology, the immunosensor can detect hemoglobin-A1c and hemoglobin simultaneously with the range of 166. 7 - 570 $\mu\text{g/L}$ hemoglobin and 13. 75 - 170. 5 $\mu\text{g/L}$ HbA1c.

Keywords Nano-gold; Metal-oxide semiconductor; Micro-electronic mechanical system; Hemoglobin-A1c; Integrated chip

(Received 10 August 2010; accepted 1 November 2010)

沃特世为您提供猪肉中“瘦肉精”残留检测方案

近日来,“瘦肉精”事件的发生使人们再次将注意力集中到动物体内的 β -受体激动剂的检测。常说的“瘦肉精”是一类动物用药,例如莱克多巴胺(Ractopamine)及克伦特罗(Clenbuterol)等。沃特世作为色谱分析行业的领导者,再一次展现了本公司集成样品前处理 SPE 产品、色谱产品、质谱产品于一体的技术优势,在第一时间推出了包含前处理在内的解决方案。

使用沃特世混合型强阳离子交换 OASIS[®] MCX SPE 固相萃取柱结合 ACQUITY UPLC[®]/Xevo[®] TQ 超高效液相色谱串联四级杆质谱联用仪,可以在 5 分钟内轻松、快速、准确的检测到极低含量的“瘦肉精”类物质。例如在猪肉基质中的克伦特罗可以达到低于 5ppt 的检出限。并且在 0.05ppb 基质浓度下 6 针重复进样 RSD 为 2.65%。对于猪尿液当中的克伦特罗甚至可以达到 1ppt 的检出限。沃特世 UPLC/Xevo TQ 免费附带的 Quanpedia 方法库已经自带了超过 28 种常见 β -受体激动剂的 MRM 条件,用户无需再对这些化合物进行质谱参数的调谐即可轻松获取分析方法。

详细信息可登录 www.waters.com 网站查询。