

功能聚间苯二胺膜用于免疫传感器分析

陈瑞川* 卢方 李东辉 张长弓

万 桢

(厦门大学抗癌研究中心 厦门 361005)

(厦门大学化学系 厦门)

摘 要 以电化学聚合法在石墨电极上获得聚间苯二胺膜(MPD),并建立了快速、灵敏的膜质量检验方法:辣根过氧化物酶(HRP)标记MPD膜-邻苯二胺(OPD)反应法,对聚合、活化等条件作了研究;进一步制成了检测乙肝表面抗原(HBsAg)和检测鼠免疫蛋白(MIgG)的免疫电极,对血清样品作了检测。结果表明:2.5 V 电池电压下,于含 0.12 mol/L MPD 的 1.2 mol/L H₂SO₄ 中聚合 20 min,再以 30 g/L 浓度的戊二醛活化 4 h,所得 HRP 标记电极及免疫电极重现性好;检测 HBsAg 和 MIgG 的线性范围分别为 0.1~3.2 mg/L 及 0.1~10 mg/L。

关键词 免疫传感器,化学修饰电极,聚间苯二胺

功能聚合物电极已有应用于生物传感器的报道^[1,2],但聚合时需在特定介质体系中进行,故不适合于免疫电极制备。本文参照电聚合苯胺膜电极的原理^[3],建立了电聚合间苯二胺(MPD)膜电极的方法,再以戊二醛将抗体交联于聚合膜的游离氨基上制成免疫电极;另设计了辣根过氧化物酶(HRP)交联标记聚MPD膜-邻苯二胺(OPD)底物反应体系,通过比色测定 HRP 与其底物 OPD 反应的产物量来快速比较、检验电聚合膜制备、活化条件及质量;并以所建方法分别制备了测定乙肝表面抗原(HBsAg)和检测鼠免疫蛋白(MIgG)的免疫电极,对血清样品作了检测、分析。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

MPD 及 OPD(Sigma 公司),25%戊二醛(Merk 公司),HRP(上海生物化学研究所),羊抗 HBsAg 抗体(HBsAb)、兔抗 MIgG 抗体及 MIgG 参照文献[4]制备;其余均为国产分析纯。酶标读数仪(MINIREADER 型)为美国 Dynatech 公司产品,PXS-125 型离子活度计为上海第二分析仪器厂生产,恒电位仪自制。

1.2 PMPD 膜电极的制备及 HRP 交联电极-OPD 体系的建立

以表面经抛光的光谱纯石墨电极为工作电极、铂为对电极,首先控制在 H₂SO₄ 溶液中电聚合 MPD。确定最佳电池电压、电聚合时间和最佳 MPD 及 H₂SO₄ 浓度。聚合,所得的膜电极以蒸馏水洗净、晾干后 4℃ 存放,以不同浓度的戊二醛溶液活化。活化后以蒸馏水洗净,4℃ 存放或直接进行交联固定化。

将经戊二醛活化的膜电极置于 1.2 g/L HRP 或 1.5 g/L HBsAb 或兔抗 MIgG 抗体中于 4℃ 搅拌交联 20~24 h,以 0.2 mol/L、pH 2.8 的甘氨酸-盐酸缓冲液洗涤,再将电极置于含 10 g/L 牛血清白蛋白的 0.1 mol/L、pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)中封闭 24 h,以 PBS 洗涤、晾干后 4℃ 存放备用。于 24 孔塑料板中每孔加入 0.5 mL OPD 底物溶液,将交联了 HRP 的电极置入,准确反应 2 min 后取出电极,立即于孔内加入 0.25 mL 1 mol/L H₂SO₄,然后吸出 200 μL 于 96 孔塑料板孔中,于酶标读数仪上读取 490 nm 的吸光值(A_{490 nm}),以吸光值表示 HRP

的交联量和活性,进而判断 PMPD 膜的质量并进行上述最佳条件的选择. 免疫电极用于前于 0.1 mol/L、pH 8.0 的 PBS 中浸泡平衡 2~4 h. 与饱和甘汞电极同时插入 PBS 中,测定 8 min 时的电位值 E_1 ,将 PBS 更换为含 HBsAg 或 MIgG 的血清(血清均以 PBS 稀释 10 倍)后,再测定电位值 E_2 , E_2 与 E_1 之差(ΔE)即为测定结果. 实验均重复 3 次,取平均值.

2 结果与讨论

2.1 电聚合 PMPD 膜的条件

从图 1A 可见,以 2.5 V 电池电压和 20 min 的聚合时间即可获得最佳 HRP 交联量及活

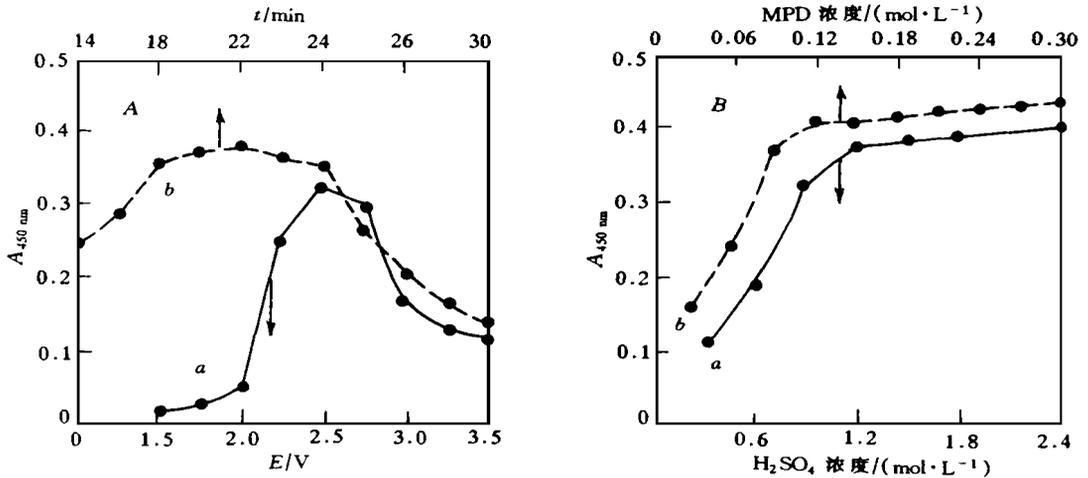


图 1 聚合条件对 PMPD 膜质量的影响

性. 在上述条件下,分别于不同浓度的 H_2SO_4 和 PDA 中聚合,HRP 的交联量和活性随二者浓度提高而上升,至 H_2SO_4 浓度为 1.2 mol/L 及 PDA 为 0.12 mol/L 之后,交联量及活性呈饱和(图 1B),所得的 PMPD 膜均匀致密,与石墨电极结合牢固. 大于此浓度时膜粗糙而疏松.

2.2 HRP 交联电极的重现性和重复使用性

图 2 显示以 30 g/L 浓度的戊二醛活化 4 h, 所得效果最好,浓度过高或过低、活化时间过短或过长均不利于 HRP 的高交联和保持最高活性.

按上述条件,制备 5 个批次的 HRP 标记 PMPD 膜电极,于系列相同浓度的 OPD 底物溶液中连续反应及测定 10 次,结果见表 1;显示批内相对标准偏差(RSD)为 3.50%~6.57%,批间 RSD 为 2.93%~9.64%,总 RSD 为 5.63%. 其中,第 2 批号电极连续检测 40 次,最后 1 次的吸光值为第 1 次的 58%,电极的半衰期大于 40 次,具有较好的重现性和重复使用性.

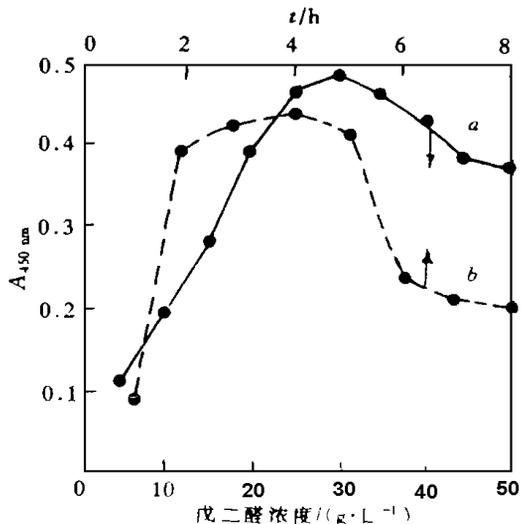


图 2 戊二醛浓度(a)和活化时间(b)

对 HRP 交联的影响

表 1 5 个批号 HRP 标记电极连续检测结果

电极批号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	RSD/ %
No. 1	0.60	0.59	0.55	0.64	0.60	0.59	0.59	0.57	0.60	0.53	5.16
No. 2	0.57	0.56	0.59	0.55	0.57	0.60	0.58	0.53	0.57	0.56	3.50
No. 3	0.53	0.55	0.54	0.50	0.54	0.58	0.54	0.52	0.59	0.54	4.84
No. 4	0.56	0.57	0.56	0.60	0.55	0.50	0.56	0.57	0.56	0.55	4.45
No. 5	0.50	0.53	0.53	0.54	0.61	0.58	0.49	0.54	0.55	0.52	6.57
RSD/ %	7.49	3.99	4.16	9.64	5.31	7.02	7.18	4.22	3.61	2.93	5.63

2.3 免疫电极的性能

图 3 为抗 HBsAg 免疫电极和抗 MIgG 免疫电极分别检测以 PBS 稀释的 HBsAg 阳性血清和小鼠血清以及 HBsAg 阴性人血清时的时间-电位响应曲线。显示随时间延长, 抗原-抗体形成免疫复合物而产生正移电位; 抗 HBsAg 免疫电极与 HBsAg 反应的一级反应阶段(线性阶段)为 8 min, 抗 MIgG 免疫电极与 MIgG 反应的一级反应阶段为 6 min。以抗 HBsAg 免疫电极检测 HBsAg 阴性人血清的响应曲线显示负移电位(曲线 c), 用抗 MIgG 免疫电极对不含 MIgG 的人血清、兔血清、羊血清及马血清检测后所得的响应曲线与曲线 c 相似, 均呈负移电位(结果未显示), 据此可方便地鉴别 HBsAg 及 MIgG 阳性和阴性血清样品。就此特点而言, 本文所制备的免疫电极在性质上可能与文献报道的分离式膜免疫电极^[5,6]不同。

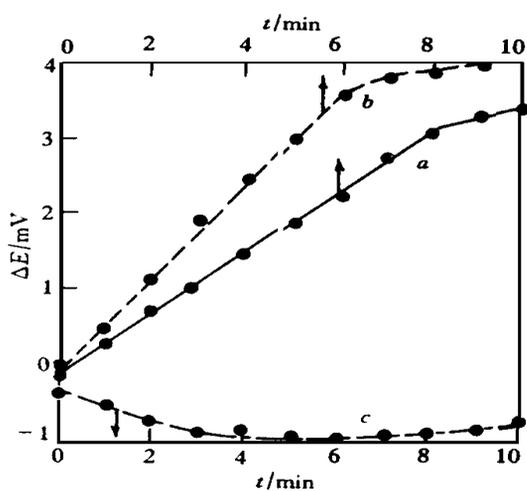


图 3 免疫电极的时间-电位曲线

- a. 抗 HBsAg 电极-HBsAg 阳性血清;
- b. 抗 MIgG 电极-小鼠血清;
- c. 抗 HBsAg 电极-HBsAg 阴性血清

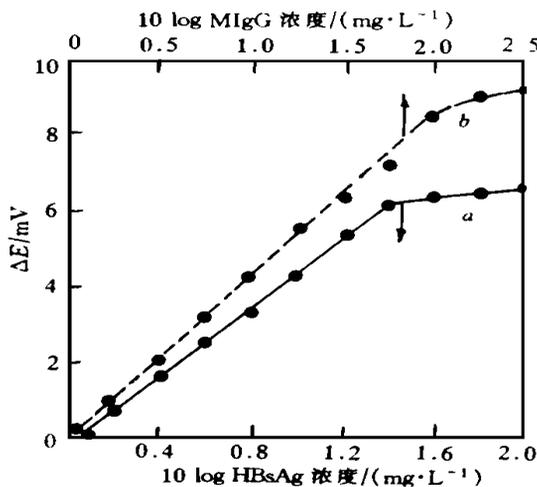


图 4 免疫电极的检测线性范围

- a. 抗 HBsAg 电极-HBsAg 标准血清;
- b. 抗 MIgG 电极-MIgG 标准血清

用 PBS 稀释 10 倍的 HBsAg 阴性人血清将标准 HBsAg 疫苗和 MIgG 配制成系列浓度的 HBsAg 及 MIgG 标准样品, 分别以抗 HBsAg 和抗 MIgG 免疫电极检测, 结果(图 4)显示抗 HBsAg 免疫电极检测 HBsAg 血清的线性范围为 0.1~3.2 mg/L, 抗 MIgG 免疫电极则为 0.1~10 mg/L。

以抗 HBsAg 免疫电极和抗 MIgG 免疫电极分别逐日对同浓度的 HBsAg 血清样品及 MIgG 血清样品进行检测, 每次检测后即以 0.2 mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液洗脱结合的 HBsAg 和 MIgG 后置 4 h, 备第 2 d 检测, 连续检测 10 d, 结果见表 2。抗 HBsAg 免疫电极检测 HBsAg 血清样品的日间 RSD 为 4.57%, 抗 MIgG 免疫电极检测 MIgG 血清样品的日间 RSD

为 5.13%, 均具较好的重现性.

表 2 两种免疫电极日间检测结果

免疫电极	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	RSD/%
抗 HBsAg	4.8	4.7	5.1	4.8	4.5	5.0	4.6	4.8	4.4	4.6	4.57
抗 MIgG	6.5	6.0	6.4	6.7	6.5	7.0	6.3	6.9	6.5	6.0	5.13

综上所述显示: 由于将功能 PMPD 膜制备与抗体交联固定化步骤分开, 使两步骤可在各自最佳介质体系及条件中进行, 从而避免了选择特定介质体系制备活性膜的限制性^[1,2], 使该法易于推广; 以此方法制备的 PMPD 膜性质稳定, 交联的抗体结合牢固, 使所制备的免疫电极具有较好的稳定性和重现性.

参 考 文 献

- 1 Skladal P. *Electroanalysis*, 1997, **9**(10): 737
- 2 Li Z, Wang H D, Dong S J *et al.* *Anal Sci*, 1997, **13**(suppl): 305
- 3 李根喜, 方惠群, 陈洪渊等. *分析化学*, 1994, **22**(2): 138
- 4 陈瑞川, 卢方, 卢玉英等. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1991, **30**(4): 433
- 5 Kurochkin V E, Raevskii K K, Terovskii V B. *J Anal Chem*, 1993, **48**(4): 479
- 6 Babkina S S, Medyantseva E P, Budnikov H C *et al.* *Anal Chem*, 1996, **68**(21): 3827

Application of Functional Electropolymerized *m*-Phenylene Diamine Membrane in Immunosensor Analysis

Chen Ruichuan^{*}, Lu Fang, Li Donghui, Zhang Changgong

(*Biochemistry Laboratory of Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005*)

Wan Zhen

(*Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen*)

Abstract An electropolymerization method of *m*-phenylene diamine membrane, polyphenylene diamine(PMPD) on the surface of graphite electrode is described. To identify the quality of the membrane, a rapid and sensitive method has been established based on the reaction of a horse-radish peroxidase(HRP) labeled PMPD with orthophenylene diamine. An anti-HBsAg and an anti-MIgG immunoelectrodes were prepared for detecting hepatitis B surface antigen(HBsAg) and mouse immunoglobulin G(MIgG). The optimum membrane preparation conditions are polymerization: 0.12 mol/L MPD solution in 1.2 mol/L H₂SO₄ for 20 min under 2.5 V, activation: with 3% glutaraldehyde for 4 h. The prepared HRP labeled electrode and immunoelectrodes possessed good repetition. Calibration graphs were linear for HBsAg in ranges from 0.1 ~ 3.2 μg/mL and 0.1 ~ 20 μg/mL for MIgG/mL.

Keywords immunosensor, chemically modified electrode, poly-*m*-phenylene diamine