

8:590

7 苏永选, 周振, 杨芑原, 王小如, 黄本立. 分析仪器, 1997, (3): 13

8 Su Y X, Yang P Y, Chen D Y, Zhang Z G, Wang X R, Huang B L. J Anal At Spectrom, 1997, (8):

817

9 苏永选, 杨芑原, 谢永明, 李福民, 谷胜, 王小如, 黄本立. 厦门大学学报(自然版), 1998, (2)

: 1

收稿日期: 1997-12-05

**Comparison of characteristics of microsecond-pulse glow discharge and direct current glow discharge as ion sources for time-of-flight mass spectrometry**, Su Yongxuan, Yang Pengyuan, Zhou Zhen, Li Fumin, Wang Xiaoru, Huang Benli (Department of Chemistry, Laboratory of Analytical Science, Xiamen University, Xiamen, 361005)

The characteristics of microsecond-pulse glow discharge ( $\mu$ s-pulse CD) and direct current glow discharge (dc-GD) as ion sources of time-of-flight mass spectrometry (TOFMS) are compared. The voltage-current characteristics of two discharge modes and the effects of discharge parameters of dc-GD on the intensity of mass signals are discussed. The mass spectra obtained with dc-GD and  $\mu$ s-pulse GD are given. Experimental results show that  $\mu$ s-pulse GD is more suitable for TOFMS than dc-Gd and has promising future in the fields of direct solid analysis and surface depth analysis.

## 聚间苯二胺膜乙肝免疫电极的研制

陈瑞川 卢方 李东辉

万 桢

(厦门大学抗癌研究中心, 厦门, 361005)

(厦门大学化学系, 厦门, 361005)

**摘 要** 以电化学聚合法在石墨电极上获得可作为免疫电极膜材料的聚间苯二胺膜, 应用戊二醛交联法, 将抗乙型肝炎表面抗体 (HBsAb) 共价交联于膜上, 制成免疫电极。测定乙肝表面抗原 (HBsAg) 的响应时间仅需 8min, 最佳测定液 pH 为 8.0, 电极线性范围 0.125~0.32 $\mu$ g/mL HBsAg。不同批电极间相对标准偏差为 3.31%, 具有较好的重现性和选择性。4 $^{\circ}$ C 下可保存半年以上, 同一电极可重复使用 15 次以上。临床检测 60 例血清样品, 并以酶联免疫吸附检测法 (ELISA) 结果为对照, 显示免疫电极测定法的敏感性为 86.1%, 特异性为 100%。

**关键词** 乙肝表面抗原 免疫电极 间苯二胺

应用于传感器的生物活性膜多采用固定化包埋技术, 将生物活性材料交联或包埋在化学膜材料上<sup>[1,2]</sup>。常用作免疫电极的化学膜材料有醋酸乙烯膜<sup>[3]</sup>、聚氯乙烯膜<sup>[4]</sup>、聚苯乙烯膜<sup>[5]</sup>等。生物活性材料大多依赖物理吸附结合在膜上, 免疫电极制备方法复杂, 难以重复使用。

本文采用电化学聚合方法, 在抛光的石墨电极表面获得结合牢固的聚间苯二胺 (PDA) 膜。该膜本身具有电导性, 并存在游离氨基, 可用戊二醛活化后再与抗乙型肝炎表

面抗原 (HBsAg) 的抗体 (HBsAb) 共价交联。抗体结合牢固, 制成的免疫电极可重复使用。由于电化学聚合法制备 PDA 膜的方法简便, 制备条件容易控制, 制成的免疫电极重现性好, 因此 PDA 膜可望成为一种新型免疫电极膜材料。

### 一、实验部分

#### 1. 电化学聚合 PDA 膜的制备

以抛光的光谱纯石墨电极为研究电极, 铂

电极为对电极, 电池电压控制在 2.5V, 在 0.12mol/L PDA (上海白鹤化工厂) 的 1.2mol/L 硫酸溶液中电聚合 20min。取出电极, 双蒸水洗净, 凉干后 4℃ 下避光干燥保存。

## 2. HBsAb 免疫电极的制备

经上述方法制备的电极, 15℃ 下在 3% 的戊二醛 (进口分装) 溶液中浸泡活化 4h。取出电极, 用双蒸水洗净, 置于 HBsAb 溶液 (本单位免疫学研究室提供, 14.0mg/L, 滴度 1:128) 中, 4℃ 交联 24h。最后置于 1% 的牛血清白蛋白 (上海华美生物工程公司) 中, 4℃ 下封闭 24h, 用磷酸盐缓冲液 (0.1mol/L, pH7.2) 洗净, 室温下凉干, 4℃ 干燥避光保存备用。

## 3. 实验装置

实验装置主要由免疫电极系统和电信号处理测量系统组成, 包括 PXS-215 型离子活度计, 免疫电极, 饱和甘汞电极, 测量池, 恒温磁力搅拌器。

图 1 是实验装置示意图。

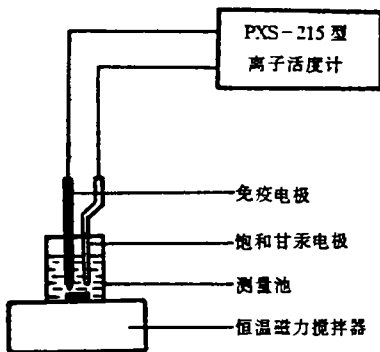


图 1 实验装置示意图

## 4. 实验方法

使用前, 先将免疫电极放在 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH8.0) 中浸泡 3~4h, 使之平衡。在测量池中加入该 PBS, 测定其电位值, 作为基数。再测定 HBsAg 阳性或阴性待测血清样品 (血清均以该 PBS 稀释 10 倍) 的电位值, 得两电位值之差 ( $\Delta E$ ), 从而得出

待测样品的 HBsAg 含量。实验均重复 3 次, 取平均值。

## 二、结果与讨论

### 1. 动力学响应曲线

图 2 所示为乙肝免疫电极对 HBsAg 的动力学响应曲线。样品为 HBsAg 阳性血清及 HBsAg 阴性血清。

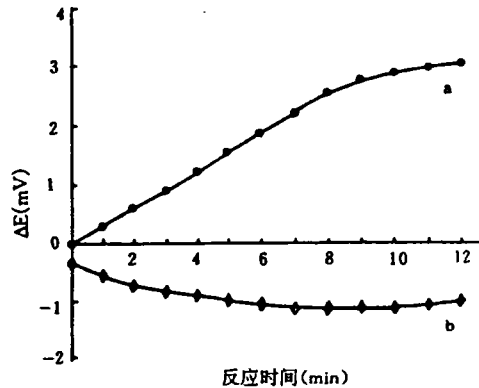


图 2 免疫电极时间-电位曲线

a. HBsAg 阳性血清  
b. HBsAg 阴性血清

由图可见, 阳性血清样品的反应曲线 a 在测定时间范围内可分为两个阶段。第一阶段为一级响应阶段, 随着时间的延长, 样品中的 HBsAg 迅速与电极膜上的 HBsAb 结合, 形成免疫复合物, 使电极表面电荷重新分布, 电位正移, 呈线性上升。第二阶段为混合响应阶段, 至 8min 左右, 抗原-抗体结合速率明显下降, 电极电位变化值呈非线性上升。故本文后继实验均采用反应 8min 时的电极电位值。阴性血清样品响应曲线 b 显示的电极电位变化 ( $\Delta E$ ) 为负值。据此可方便地识别出 HBsAg 阳性或阴性的待测血清样品。

### 2. pH 对免疫电极响应的影响

以不同 pH 值的 PBS 稀释血清样品, 再添加 HBsAg 标准疫苗, 检测电极电位变化值。测定液 pH 值为 8.0~8.5 时, 电极电位变化

值 ( $\Delta E$ ) 最大。故选择 pH 为 8.0 的 PBS 作为血清稀释液。pH 对电极响应的影响见图 3。

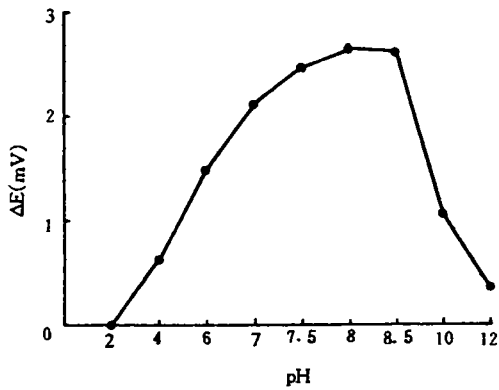


图 3 pH 对电极响应的影响

### 3. 抗原浓度响应曲线

用 PBS 将阴性血清稀释 10 倍后, 添加 HBsAg 标准疫苗, 配制成系列浓度的 HBsAg 样品, 检测结果见图 4。HBsAg 抗原浓度在 0.125~3.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内线性良好, 响应曲线的线性方程为:  $y = 4.23x + 0.55$ , 斜率为 4.23。据此方程可对 HBsAg 进行定量检测。

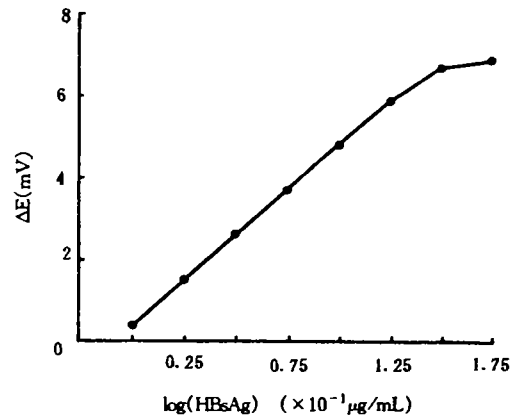


图 4 电位 - HBsAg 浓度响应曲线

### 4. 重现性

用不同时间制备的不同批号的免疫电极, 对同一浓度的 HBsAg 血清样品进行检测, 然后将电极置于 0.2mol/L、pH2.8 的甘氨酸-盐酸缓冲液中浸泡 5min, 洗脱结合的 HBsAg, 凉干后, 4 $^{\circ}\text{C}$  干燥保存 6 个月, 再进行同样的检测, 每个样品重复检测 3 次, 取平均值, 结果见表 1。

表 1 免疫电极的重现性试验

	不同批号电极检测结果 (mV)						$\Delta E \pm \text{SD}$	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6		
首次检测	4.70	4.93	4.60	4.97	4.83	5.00	4.84 + 0.16	3.31
末次检测*	4.57	4.43	4.77	4.40	4.53	4.63	4.56 + 0.14	3.07

\* 末次检测在 6 个月后进行。

批间  $\Delta E$  的相对标准偏差 (RSD) 在 3.31%~3.07% 之间。4 $^{\circ}\text{C}$  保存 6 个月后, 免疫电极尚具有原始 HBsAg 活性的 94.2%, 表明本法制备的免疫电极重现性较好, 交联固定的抗体稳定性较高。

### 5. 重复性和选择性

以同一电极对同一浓度的 HBsAg 血清样品进行检测, 每检测一个样品后即于甘氨酸-盐酸缓冲液中洗脱结合的 HBsAg, 再进行检测, 反复检测 40 次, 结果见图 5。由图可见, 在连续检测 20 次后, 电极仍有 95% 左右的抗体活性, 此后活性衰减速度加快, 至 40 次后抗体活性为原活性的 40% 左右。

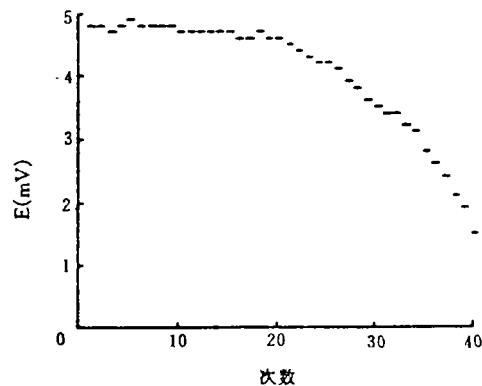


图 5 免疫电极重复试验

以免疫电极对含乙肝 e 抗原 (HBeAg)、甲肝疫苗及丙肝抗原的血清样品进行检测, 其

响应动力学曲线与 HBsAg 阴性血清一致, 表明免疫电极有较好的重复性及选择性。

### 6. 临床样品检测

按实验方法对 60 份临床采集的血清样品

进行检测, 判断标准为,  $\Delta E \geq 0$  为阳性,  $\Delta E < 0$  则为阴性; 另以酶联免疫吸附法 (ELISA, 厦门新创公司产品) 进行双盲平行检测, 结果见表 2。

表 2 部分血清样品双盲试验结果

样品号	1	2	3	4	5	56	57	58	59	60
本法 ( $\Delta mV$ )	1.5	1.8	-0.6	-0.2	2.1	-0.8	-0.9	0.7	0.5	-0.1
ELISA 法*	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+

\* + 为阴性血清, - 为阳性血清。

ELISA 检测为阳性的 36 例中, 免疫电极法检测 31 例为阳性, 另 5 例为阴性, 敏感性为 86.1% (31/36); ELISA 检测为阴性的 24 例, 免疫电极法检测也为阴性, 其特异性为 100% (24/24), 两法基本相符。结果见表 3。

表 3 ELISA 法与免疫电极法结果比较

检测方法	阳性	阴性	总计
ELISA 法	36	24	60
免疫电极法*	31	24+5*	60

\* ELISA 法检测为阳性的 36 例样品中有 5 例免疫电极法检测为阴性。

### 7. 结论

电聚合 PDA 膜易于制备, 适合批量生产, 适于作免疫电极膜材料。本法检测 HBsAg, 操作简便、快速, 8min 即可得出结果, 且特异性高。批间电极检测的  $\Delta E$  及绝对电位值差异均较小 (批间电极检测绝对电位值的 RSD < 4.51%, 数据未列出)。此外, 电极可重复

使用, 降低了检测成本。

由于本工作采用的是普通离子计, 检测低浓度 HBsAg, 灵敏度尚不够高。另外所用的 HBsAb 是粗制抗体, 因此检测 HBsAg 的低限仅为  $0.125 \mu\text{g/mL}$ 。若对电信号检测及处理系统作改进, 提高检测灵敏度, 并采用亲和纯化抗体, 可望进一步提高检测灵敏度。

### 参考文献

- 1 李凡超等. 分析化学, 1994, 22 (1) : 55
- 2 孙裕生等. 分析仪器, 1997, (2) : 12
- 3 山本直登等. 国外医学免疫学分册, 1982, 5 (2) : 92
- 4 Solsky R L et al. Anal Chim Acta, 1981, 123 (2) : 135
- 5 苏殿杰等. 生物化学与生物物理进展, 1985, (6) : 73

收稿日期: 1997-06-29

Preparation of polymeric m-phenylene diamine membrane hepatitis B immunoelectrode. Chen Ruichuan, Lu Fang, Li Donghui (Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen, 361005), Wan Zhen (Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen, 361005)

A new type of hepatitis B immunoelectrode was prepared for detecting hepatitis B surface antigen (HBsAg). The hepatitis B surface antibody (HBsAb) was cross-linked to polymeric m-phenylene diamine (PDA) membrane which was formed by electropolymerizing PDA onto the surface of graphite electrode. The experimental results showed that the response time of the electrode was 8 minutes and the rectilinear range was  $0.125 \sim 3.20 \mu\text{g/mL}$ . The RSD was 3.31% between different lots of electrodes. The optimal pH was 8.0. The immunoelectrode has good selectivity and repeatability and can be used for over 15 times. It is stable for over half a year when stored at  $4^\circ\text{C}$ . Sixty serum samples were tested clinically with the new electrode and ELISA method for comparison. The results demonstrate that the sensitivity and specificity of the new electrode are 86.1% and 100%, respectively, suggesting a promising prospect for real applications.