

# 乙型肝炎免疫电极的研制和应用

卢方 陈瑞川 万楨\*

(厦门大学癌症研究中心) (厦门大学化学系)

## 前 言

随着免疫学,医学的新进展,需要有准确,快速的免疫检测方法。因而免疫电极的研究和提出,引起人们的关注和重视<sup>[1-2]</sup>。Naoto Yamamoto<sup>[3]</sup>从1980年起对HCG免疫电极进行了研究,并申请了专利。应用免疫电极测定白朊、血型<sup>[4]</sup>和半抗原<sup>[5]</sup>等方面也获得了较好的结果。我们以光谱纯石墨为电极基底材料,采用电化学聚合方法形成聚间苯二胺膜,经用戊二醛活化后与抗-HBs抗体交联制成测定乙型肝炎抗原电极,并已应用于标准血清,乙型肝炎抗原的检测。

这一方法的原理是,将抗体或抗原固定在电极活性膜上,而膜上的抗体或抗原则与检测物中的配对物反应,结果引起膜电极电位的变化( $\Delta E$ )。根据这一电位的改变量,便能检测待测物中抗原或抗体的含量。

## 仪 器 与 试 剂

离子活度计PXS-215型(上海第二分析仪器厂),恒电位仪(自装), $\phi 6\text{mm}$ 光谱纯石墨电极作为免疫电极的基底材料。

HBs血液疫苗(卫生部北京生物制品研究所,批号8734-1),抗-HBs(阳性,阴性)检测试剂(上海医学化验所),HBs血清(阳性,阴性)本癌症研究中心临床免疫室提供。

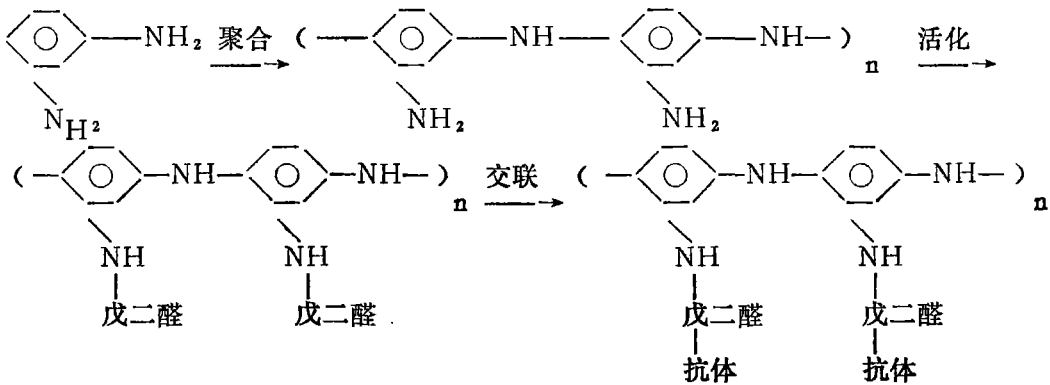
羊抗人HBs抗体,经饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析沉淀,透析,过EDTA柱,所得溶液的浓度为 $14.117\text{mg/ml}$ ,滴度128(对流扩散),小牛血清由本中心细胞室提供。

实验中所用化学试剂均为分析纯。

\* 通信联系人。

## 实验与讨论

**电极的制备** 以0.12M间苯二胺, 1.2M硫酸为底液, 以光谱纯石墨电极为研究电极, 铂电极为对电极, 在电池电压+2.5伏下聚合20分钟。取出, 用蒸馏水洗净。石墨电极上有均匀密致的黑色聚合膜形成。然后, 将聚合膜电极置于3%的戊二醛溶液中, 于室温(15℃)下活化4小时, 洗净。活化后的电极置抗-HBs抗体溶液中于4℃下交联24小时。最后用小牛血清于4℃进行封闭(24小时)。即制成乙型肝炎免疫电极, 其过程可示意如下:



**对照电极** 制备步骤同上, 未交联抗体, 直接用小牛血清进行封闭。

**实验方法** 实验前, 免疫电极与对照电极置于磷酸缓冲平衡盐水 (PH=8.5) 中浸泡4小时, 使之趋于平衡。测定免疫电极相应于对照电极的电位。加入待测样品, 再测定其电位值的变化。从而得出待测样品中抗原的含量。

**免疫反应时间~电位曲线** 我们实验了不同时间读数的免疫电极与抗原 (HBs 血液疫苗) 反应后的电位响应曲线。由图1可见, 免疫反应时间增加, 电位正移, 并达饱和值。这是由于反应后形成免疫复合物, 电荷重新分布的结果。时间愈长, 反应形成的复合物愈多, 电荷正移效应亦愈大, 直至复盖电极表面。而在测定阴性血清时, 电极电位为负值 (见图中负值电位曲线), 据此在临床诊断上可识别HBs血清的阳性或阴性, 并定量地进行分析。

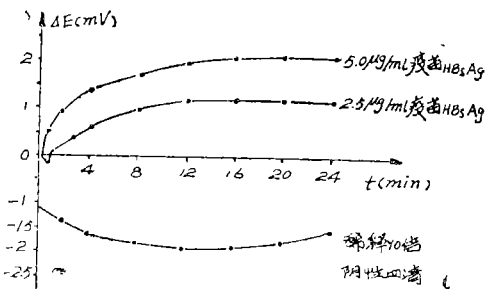


图1. 免疫反应时间~电位曲线

**搅拌的影响** 我们实验了不同搅拌速度对免疫反应的影响, 结果见表1, 实验中以选择中速档为宜。

**免疫电极对抗原浓度的响应曲线** 于磷酸缓冲平衡盐水中加入不同浓度的血液疫苗，配成系列，按实验方法顺序测定。绘制所得 $\Delta E \sim PC$ 抗原曲线见图 3。

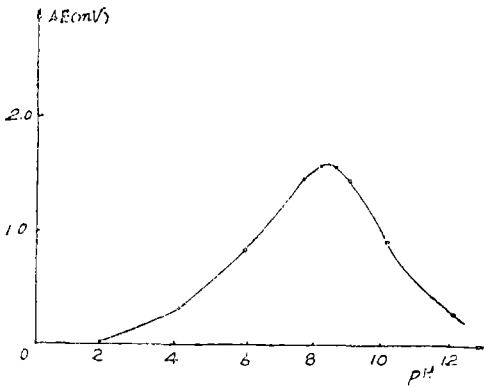


图2. 酸度对免疫反应的影响

**表1 搅速对免疫反应的影响**

搅速	静止	慢速	中速	快速
电位值变化 ( $\Delta E$ , mv)	0.8	1.2	1.6	1.7

抗原浓度在  $1 \sim 15 \mu\text{g/ml}$  范围线性关系良好，响应曲线的斜率为  $35 \text{ mV}$ 。

**电极的重现性及寿命** 测定后，电极经用  $0.2 \text{ M}$  甘氨酸—盐酸溶液 ( $\text{pH} = 2.8$ ) 浸泡 5 分钟进行洗脱后可重复使用。多次进行重复实验得到的响应曲线斜率基本不变。表明此免疫电极有较好的重现性和稳定性。

电极在  $4^\circ\text{C}$  保存两个月后进行测定。其检测结果几乎无变化。

电极在  $4^\circ\text{C}$  保存两个月后进行测定。其

检测结果几乎无变化。

### 样品的测定

按照实验方法对稀释后的阴性，阳性血清样品进行了测定。并将临床样品分析结果和反向血凝检测，试剂盒酶标检测进行对照。分析结果见表 2 和表 3。

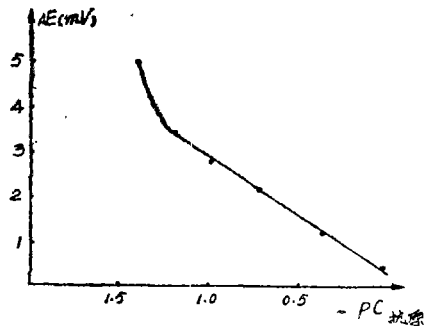


图3. 免疫电极的响应曲线

**表2 标准血清样品分析结果**

样品	测得值 ( $\Delta \text{mv}$ )	平均值 (mv)	相对标准 偏差 (%)	抗原含量 $\mu\text{g/ml}$	对照值 $\mu\text{g/ml}$
血清 (阴)	1.8, 1.8, 1.8, 1.8, 1.8, 1.8, 1.9, 1.9 1.9, 1.9, 1.9	1.84	8.6	3.60	4.00
(阳)	1.1, 1.1, 1.2, 1.2 1.2, 1.2, 1.2, 1.2 1.2, 1.2, 1.2	1.18	9.1	2.20	1.97

表3 临床样品分析结果

样 品 编 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
酶标试剂盒检测 +阳性, -阴性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
反向血凝检测 样品滴度	1:8	1:8	1:16	1:8	1:8	1:8	1:36	1:8	1:128 以上	1:128 以上	1:64	1:64	1:128 以上	1:8	1:4 以下	1:4 以下	1:4 以下
免疫传感器 $\Delta E$ (mV)	-0.5	0.2	0.7	0.5	-0.2	0	0.8	0.1	5.3	3.9	1.2	1.4	4.5	-0.3	-4.2	-0.2	-2.1

结果表明, 免疫电极对HBs血清样品的检测结果和传统方法比较基本吻合。但检测中影响因素较多, 有出现假阴性情况。免疫传感器作为一门新学科, 有待进一步探讨, 需提高电极检测的灵敏度和稳定性, 使能实际地、更有效地应用于临床, 生物学实验等领域。

## 参 考 文 献

- (1) M. Aizawa, Med. Philos, 5 (1986)
- (2) William R. Heinemen, H. Brian Haisall, Anal. Chem 57, 12 (1985)
- (3) Naoto Yamamoto et al, Clin. Chem., 26 (11), 1569-1572 (1980)
- (4) 于兆林, 自然杂志, 9 (8), 570-579 (1987)
- (5) Diana L. Bush et al, Analytical Letterl, 20 (11), 1781-1790 (1987)

(上接第54页)

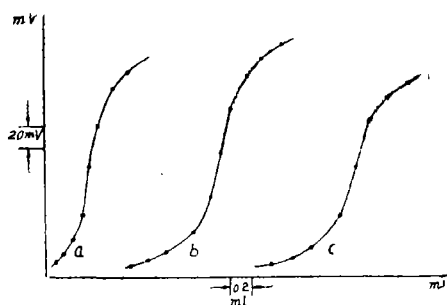


图1 a 40%乙醇-水 b 40%甲醇-水 c 40%丙酮-水

## 四、沉淀组成

计算各等当点时所耗用的 $Ag^+$ 和苯妥英钠的量, 发现两者的摩尔比恰为 1.01:1, 初步实验表明苯妥英银的组成应为 $C_{15}H_{11}NO_2Ag$ 。

## 参 考 文 献

1. 中国药典, 二部, P224, 1985
2. 姚守拙等, 药学报, 19, 6, 1984