

学校编码: 10384

分类号____密级____

学 号: 200520071150976

UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

聚苯乙烯微珠的抗体分子固定化研究
及其在人血清中的免疫分析

Immobilization of Antibody on Polystyrene Microbeads
and Application for Immunoassay in Human Serum

任志敏

指导教师姓名: 周雷激 副教授

专业名称: 分析化学

论文提交日期: 2010年07月

论文答辩时间: 2010年07月

学位授予日期: 2010年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010年07月

Thesis for Master of Analytical Chemistry

**Immobilization of antibody on Polystyrene Microbeads
and Application for Immunoassay in Human Serum**

By

Zhimin Ren

Supervised by

Leiji Zhou

Associate Professor

College of Chemistry&Chemical Engineering

Xiamen University

July, 2010

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

液相芯片是一种多功能新型生物芯片平台，与传统的固相芯片相比，液相芯片具有灵活性好、检测通量高、反应分析时间短、操作方便等明显的优势，广泛应用于核酸杂交分析、免疫学或者基于免疫学原理进行的分析、高通量药物筛选等研究。在液相芯片中，其核心元件功能化微珠承担着分子识别和信号表达的重要任务，微珠表面生物探针分子的固定化效果直接影响芯片的灵敏度、检测限等，因此，研究微珠表面生物分子的固定化方法十分重要。

本论文基于构建液相芯片敏感元件并用于血清中肿瘤标志蛋白检测的目的，重点研究了液相芯片敏感元件聚苯乙烯微珠的活化及表面抗体分子固定化的方法，优化了分析条件，并用于血清样品的检测。研究工作主要有以下四部分：

论文第一章阐述了液相芯片的基本原理和用于液相芯片敏感元件的生物分子固定化技术。详细介绍了固相载体表面不同官能团的各种活化方法和生物分子在固相载体表面的基于物理吸附、化学共价交联和亲和交联法的固定化方法，比较了不同活化和固定化方法的优缺点和适用条件。另外，阐述了液相芯片中普遍存在的由非特异性吸附引起的高背景的原因，以及针对这一问题提出的改进方法。

第二章研究以羧基聚苯乙烯微珠为载体的抗体微珠敏感元件的制备方法。利用己二酸二酰肼对羧基聚苯乙烯微珠进行活化，使微珠表面连接上活泼的自由酰肼基团。利用己二酸二酰肼的还原性，发展了铁(III)-邻二氮菲分光光度法测定固相表面酰肼基团含量的方法，获得了微珠表面酰肼活化的效率，测得为72%。利用微珠表面的酰肼活化基团，固定用高碘酸钠在温和条件下氧化的小鼠单克隆抗体，制备了基于糖基固定化的抗体微珠敏感元件。实验中优化了抗体固定化的条件，并利用流式细胞仪和分光光度法对微珠表面的抗体结合量、固定化抗体的活性及其在不同保存缓冲液中的稳定性等性能进行了详细的表征。

第三章利用实验室制备的糖基固定化抗体微珠、运用双抗夹心法检测了肝癌病人血清中的甲胎蛋白，建立了液相芯片基于糖基固定化抗体微珠测定血清中肿瘤标志物的模型。研究考察了非特异性吸附引起的高背景的抑制方法，通过考察蛋白质封闭剂和聚合物封闭剂对血清复杂样品的封闭效果，确定了聚合物作为封闭剂的优化条件。检测了肝癌病人血清中的甲胎蛋白，同时与常规物理吸附法制备的抗体微珠测定病人血清中甲胎蛋白进行了对照。

第四章考察了聚苯乙烯微珠基于生物素-亲和素方法的固定化小鼠单克隆抗体及其免疫测定。利用生物素与亲和素的高特异性结合原理，在亲和素标记的聚苯乙烯微珠表面固定了生物素化的鼠抗 AFP 单克隆抗体。由于抗体中保护蛋白 BSA 严重影响抗体固定化效果，实验通过超滤离心的方法去除掉抗体中的 BSA，使抗体的固定化效果得到明显改善。利用荧光显微镜和流式细胞仪对微珠抗体的固定化效果进行了表征，进一步运用双抗夹心法检测了肝癌病人血清中的甲胎蛋白，考察了生物素-亲和素固定化抗体微珠的性能。

关键词：聚苯乙烯微珠；液相芯片；抗体固定化；甲胎蛋白

Abstract

Liquid chip is a versatile biochip platform. Compared to conventional solid chip, it has some advantages such as good flexibility, high throughput, short response time and easy operation, and so is widely used in nucleic acid hybridization analysis, immunological analysis and high throughput drug screening. Functional microbeads which were core components of liquid chip undertake the important tasks such as molecular recognition and signal expression. The immobilized probe molecules on microbead surface directly affected the chip's sensitivity and detection limit. Therefore, the immobilization methods of biological molecules are particularly important.

This paper, which was for the purpose of preparing core components of liquid chip and detected tumor marker proteins in the human serum, studied the activation and antibody immobilization methods of the microbeads. The study contained the following four parts:

In the first chapter, we introduced the basic principles of liquid chip and biomolecules immobilization methods. It elaborated various activation methods of the solid phase surface with different functional groups and biomolecules immobilization methods based on physical adsorption, chemical covalent and affinity cross-linking. Moreover, the advantages, disadvantages and application conditions of different activation and immobilization methods were compared. In addition, this study described the sources of nonspecific adsorption which led to high background in liquid chip and brought the suppressing method.

In the second chapter, we prepared antibody polystyrene microbeads. In this chapter carboxyl polystyrene microbeads were activated by adipic dihydrazide and the surface had free hydrazide. Based on the reducibility of dihydrazide, an iron (III)-phenanthroline spectrophotometric method was developed which was used to detect activation efficiency. By using this method, we detected the activation efficiency of 72%. Then we immobilized oxidated monoclonal antibody and prepared oriented immobilized antibody microbeads. We optimized experimental conditions for antibody immobilization, and characterized the binding capacity of antibody, the

activity of immobilized antibody and the stability of antibody microbeads in different buffer by flow cytometry and spectrophotometry.

In the third chapter, a model were developed which can detect AFP in cancer patients serum using sandwich method and oriented immobilized antibody microbeads prepared by our lab. In the test, polymer was chosen as a blocking agent by comparing protein and polymer blocking agents and the blocking conditions were optimized. Then, we detected AFP in cancer patients' serum and compared with physical adsorption.

In the fourth chapter, we studied mouse monoclonal antibody immobilization on polystyrene microbeads based on biotin-avidin system and immunoassay. Using the principle of high binding activity between biotin and avidin, biotinylated mouse anti AFP monoclonal antibodies were immobilized on the affinity-labeled polystyrene microbeads. Because of the interference of BSA, this study removed the BSA from antibodies via ultra-filtration and improved the immobilization. Antibody immobilization was characterized by fluorescent microscopy and flow cytometry. Further, we detected AFP in cancer patients' serum using sandwich method and studied performances of antibody microbeads

Keywords : polystyrene microbead; liquid chip; antibody immobilization; alpha-fetoprotein

目录

摘要	I
Abstract	III
第 1 章 绪论	1
1.1 生物芯片	1
1.1.1 固相芯片	1
1.1.2 液相芯片	2
1.2 液相芯片中生物分子的固定化技术	3
1.2.1 微珠表面官能团的活化方法	3
1.2.2 生物分子在微球表面的固定化方法	7
1.3 液相芯片中非特异性吸附的抑制	15
1.3.1 非特异性吸附的产生	15
1.3.2 非特异性吸附的抑制	16
1.4 本论文的研究设想	17
1.5 参考文献	17
第 2 章 羧基聚苯乙烯微珠的酰肼活化及抗体固定化	25
2.1 引言	25
2.2 实验部分	25
2.2.1 实验仪器与试剂	25
2.2.2 实验方法	27
2.3 结果与讨论	29
2.3.1 酰肼活化效率的测定	29
2.3.2 过碘酸雪夫氏反应 (PAS 反应) 表征抗体氧化程度	34
2.3.3 糖基固定化抗体微珠的定性表征	35
2.3.4 pH 值对抗体固定化的影响	36

2.3.5 荧光二抗与一抗反应时间的优化.....	37
2.3.6 考马斯亮蓝法测定抗体结合量.....	38
2.3.7 抗体微珠的稳定性.....	39
2.3.8 抗体微珠性能表征.....	41
2.4 本章小结.....	42
2.5 参考文献.....	42
第 3 章 糖基固定化抗体微珠检测血清样品中甲胎蛋白.....	44
3.1 引言.....	44
3.2 实验部分.....	45
3.2.1 实验仪器与试剂.....	45
3.2.2 实验方法.....	46
3.3 结果与讨论.....	48
3.3.1 封闭条件优化.....	48
3.3.2 BSA 对糖基固定化抗体的影响.....	50
3.3.3 糖基固定化微珠定性测定血清中甲胎蛋白.....	52
3.3.4 不同方法定性测定血清中甲胎蛋白.....	52
3.3.5 糖基固定化微珠定量检测血清中甲胎蛋白.....	55
3.4 本章小结.....	56
3.5 参考文献.....	56
第 4 章 亲和素化聚苯乙烯微珠的抗体固定化.....	58
4.1 引言.....	58
4.2 实验部分.....	58
4.2.1 实验仪器与试剂.....	58
4.2.2 实验方法.....	60
4.3 结果与讨论.....	62
4.3.1 生物素化抗体用量的优化.....	62

4.3.2 BSA 对亲和素生物素系统抗体固定化的影响	62
4.3.3 生物素亲和素固定化抗体微珠检测血清中 AFP	64
4.4 本章小结	66
4.5 参考文献	66
第 5 章 总结及展望	68
攻读硕士期间发表与交流论文	70
致谢	71

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abstract (In Chinese)	I
Abstract (In English)	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Biochip	1
1.1.1 Solid chip	1
1.1.2 Liquid chip	2
1.2 The immobilization methods of biomolecules in the liquid chip	3
1.2.1 Activation methods of functional microbeads.....	3
1.2.2 Immobilization methods of biomolecules on microbead.....	7
1.3 Suppression of nonspecific adsorption	15
1.3.1 The sources of nonspecific adsorption	15
1.3.2 The suppression of nonspecific adsorption	16
1.4 Objectives and contents of the paper	17
1.5 References	17
Chapter 2 The hydrazide activation and antibody immobilization of Carboxyl polystyrene microbead	25
2.1 Introduction	25
2.2 Experimental Section	25
2.2.1 Instruments and Reagents	25
2.2.2 Experimental Methods.....	27
2.3 Results and Discussion	29
2.3.1 Determination of hydrazide activation efficiency.....	29

2.3.2	Characterization of oxidized antibody by PAS reaction	34
2.3.3	Characterization of oriented immobilized antibody microbead qualitatively	35
2.3.4	Effect of pH on antibody immobilization	36
2.3.5	Optimization of reaction time between primary antibody and second antibody	37
2.3.6	Determination of binding capacity of antibody by Coomassie brilliant blue	38
2.3.7	Stability of antibody microbead	39
2.3.8	Performance of antibody microbead	41
2.4	Conclusion	42
2.5	References	42
 Chapter 3 Determination of AFP in serum samples by oriented immobilized antibody microbead		44
3.1	Introduction	44
3.2	Experimental Section	45
3.2.1	Instruments and Reagents	45
3.2.2	Experimental Methods	46
3.3	Results and Discussion	48
3.3.1	Optimization of blocking condition	48
3.3.2	Effect of BSA on oriented immobilization antibody	50
3.3.3	Determination of AFP qualitatively by oriented immobilized antibody microbead	52
3.3.4	Determination of AFP qualitatively by different methods	52
3.3.5	Quantitative determination of AFP by oriented immobilized antibody microbead	55
3.4	Conclusion	56

3.5	References	56
Chapter 4	The antibody immobilization of SuperAvidin polystyrene microbead	58
4.1	Introduction	58
4.2	Experimental Section	58
4.2.1	Instruments and Reagents	58
4.2.2	Experimental Methods	60
4.3	Results and Discussion	62
4.3.1	Optimization of the amount of biotinylated antibody	62
4.3.2	Effect of BSA on the immobilization in Biotin-Avidin system....	62
4.3.3	Determination of AFP qualitatively by Biotin-Avidin immobilized antibody microbead	64
4.4	Conclusion	66
4.5	References	66
Chapter 5	Conclusions and Outlook	68
	Publications	70
	Acknowledgements	71

第1章 绪论

1.1 生物芯片

21 世纪是生命科学的世纪,随着人类基因组计划的完成和蛋白质组学的启动,科学家们获得了数量巨大的基因序列和蛋白质信息^[1]。研究众多的基因和蛋白质信息在生命过程中所承担的功能成了全世界生命科学工作者共同的课题,为此,建立新型平台以实现大量的基因和蛋白信息进行高效、快速的检测分析就显得尤为重要。在这种背景下,生物芯片技术应运而生并蓬勃发展。生物芯片(biochip)涉及了分子生物学、半导体微电子学、医学、化学、光学、信息学等学科,是一个综合性和交叉性很强的研究项目。它是以某种特定的支持物为载体,其表面高密度地固定大量的探针分子(核酸探针、多肽分子、细胞、组织片段等),从而实现一次实验同时检测多种生物成分的目的^[2]。生物芯片具有高通量、高灵敏度和特异性的特点,为“后基因组计划”时期基因功能的研究、蛋白组学的研究、现代医学科学及医学诊断学的发展提供了强有力的工具^[3]。生物芯片按照固定探针的不同,可以分为基因芯片、蛋白质芯片、细胞芯片和组织芯片,按照反应体系状态的不同,又可以分为固相芯片和液相芯片。

1.1.1 固相芯片

固相芯片即传统的生物芯片,通过采用光导原位合成或微量点样等方法,将大量生物大分子比如核酸片段、抗原、抗体、细胞等生物样品有序地固定化于固相载体(如玻片、硅片、聚丙烯酰胺凝胶、尼龙膜等载体)的表面,组成密集的二维分子阵列,然后与已标记的待测生物样品中的靶分子杂交,通过特定的仪器比如激光共聚焦扫描仪或电荷偶联摄影像机(CCD)对杂交信号的强度进行快速、并行、高效地扫描、检测和收集,最后经计算机分析数据结果,并建立生物学模型。

固相生物芯片可以应用于基因表达检测、药物研究、生物信息学、疾病治疗等方面。经过科学家的不断研究,基因芯片技术已经取得了长足的发展,得到人们的瞩目,但仍然存在许多实际的问题,如操作步骤复杂、技术成本昂贵、检测灵敏度较低,重复性差、分析范围较狭窄等问题^[4]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库