

石墨活性膜 IgG 免疫传感器的研制

侯巍 杨述红

孙长青

(空军长春医院检验科*, 长春 130021) (吉林大学化学系)

孙荣武

(白求恩医科大学第三临床学院中心实验室)

提 要

用电化学聚合和戊二醛交联的方法, 将羊抗人 IgG 抗体固定在石墨电极表面, 研制成固态活性膜直接 IgG 免疫传感器, 对人血清 IgG 进行了测定. 并对免疫传感器的测定、再生、保存条件、精密度、测定范围和选择性及与 IgG 免疫扩散测定法的相关性进行了研究. 结果表明, 石墨活性膜 IgG 免疫传感器具有操作简单、快速、测定准确度和精密度高的特点, 为今后免疫传感器的研制提供了一种新的方法.

关键词 IgG, 免疫传感器, 电极, 活性膜

目前, 生物传感器正以它简便快速、准确灵敏的优点引起人们的关注^[1], 免疫传感器是生物传感器的一个组成部分, 它是把免疫学原理同生物传感技术有机结合起来的一种新的免疫检测技术. 我们利用电化学聚合和戊二醛交联的方法, 将羊抗人 IgG 抗体固定在光谱纯石墨电极表面, 研制成石墨活性膜 IgG 免疫传感器. 用该传感器对人血清 IgG 进行测定, 并对其实验条件进行了观察.

方法的原理是: 固定在石墨电极表面上的 IgG 抗体与溶液中的 IgG 相互作用, 所引起的电极电位变化(ΔE), 在一定范围内与溶液中的 IgG 含量成正比.

1 材料和方法

1.1 石墨活性膜 IgG 传感器的制备

1.1.1 电化学聚合 在 0.12mol 的间苯二胺硫酸溶液中, 以 $\phi 6\text{mm}$ 光谱纯石墨电极为指示电极, Pt 电极为对照电极, 用 883 型极谱仪 (上海分析仪器厂) 2.5V 电池电压下聚合 20min. 取出石墨电极, 将其用蒸馏水冲洗干净后, 避光干燥保存.

1.1.2 活化 将石墨电极在室温下 (20°C) 置 3% 戊二醛溶液中浸泡 24h.

1.1.3 交联 将石墨电极从戊二醛溶液中取出, 用蒸馏水冲洗后, 置羊抗人 IgG 血清中 (上海生物制品所), 4°C 浸泡 24h, 然后再置 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 中 4°C 24h, 即制成 IgG 传感器的指示电极. 同时另取一支活化后的石墨电极, 直接浸泡于 1% BSA 中 4°C 48h 做为对照电极. 将上述二种电极取出冲洗后, 置 pH8.1 的 0.067mol/L 磷酸盐缓冲液中 4°C 过夜.

1.2 测定方法

1.2.1 空白电位测定 将指示电极和对照电极插入 3.0ml pH8.1 的 0.067mol/L 磷酸盐缓冲液中, 恒温电磁搅拌下 (79HW-1 型恒温电磁搅拌器) 观察电极电位变化. 电位测量用 PHS-10A 型数字式 pH/mV 离子计. 连续更换缓冲液, 直至电位变化稳定在 $\pm 0.1\text{mV}$. 此时的电位值为空白电位 E_1 .

1.2.2 样品电位测定 将 100 μl 人血清加入到上述反应池中, 60s 时记下样品测定电位值 E_2 . 计算反应前后的电位变化值 ΔE ($\Delta E = E_2 - E_1$), 便可从以同样方法测定后绘制的 ΔE -IgG 标准曲线中求出人血清 IgG 的含量.

* 长春市自由大路 22 号.

收稿日期: 1992-01-23

修回日期: 1992-05-25

1. 3 IgG 免疫传感器的再生

IgG 免疫传感器经一次测定后, 需使其表面的抗体解离后才能再次使用. 我们将使用后的传感器置于 pH2.8 的甘氨酸-HCl 缓冲液中, 经 5min 作用后, 便可使其恢复到正常状态. 每支传感器可反复应用 20 次以上.

1. 4 传感器的贮存

石墨活性膜 IgG 免疫传感器不用时, 须在含有叠氮钠的 pH8.1 0.067mol/L 磷酸盐缓冲液中 4℃ 保存. 未使用的传感器可存放三个月.

2 结 果

2. 1 pH 和反应时间对测定的影响

2. 1. 1 我们采用 10 种不同 pH 值的磷酸盐缓冲液, 观察了其对传感器测定 IgG 时的影响. 结果在 pH8.1—8.5 之间传感器对 IgG 最为敏感, ΔE 值最高, 所以将 pH8.1 的磷酸盐缓冲液作为 IgG 免疫传感器的测定液和贮存液.

2. 1. 2 取一份 IgG 标准液, 对不同时间传感器测定的 ΔE 变化进行了观察. 测定时 ΔE 在最初 60s 内迅速从零变至 4.4mV, 随着时间的延长, ΔE 增加逐渐减慢, 10min 增加 0.8mV. 这种缓慢的变化, 可能与少部分未反应完全的 IgG 或其它蛋白质的非特异性吸附及电位的漂移有关. 为消除上述影响, 我们采用 60s 时的 ΔE 值速率法测定 IgG 的含量.

2. 2 精密度、测定范围及灵敏度

在反应池中分别加入 100 μ l 含量为 0.463, 0.925, 1.85, 3.7, 7.4, 14.8, 29.7, 37.1g/L 的人血清 IgG 标准液. 其测定的 ΔE 精密度见表 1. IgG 在 0.463—29.7g/L 范围内与 ΔE 线性良好. 因反应池中 3.0ml 的缓冲液已将标本进行了 31 倍稀释, 故本方法的最高检测灵敏度为 14mg/L (14 μ g/ml).

表 1 IgG 免疫传感器测定不同浓度 IgG 的精密度

IgG (g/L)	次数	平均 ΔE	SD	RCV (%)	平均 RCV (%)
0.463	10	0.12	0.0085	7.1	
0.925	10	0.25	0.0089	3.5	
1.85	10	0.50	0.017	3.4	
3.7	10	0.98	0.064	6.2	
7.4	10	2.0	0.092	4.8	
14.8	10	4.1	0.095	2.3	
29.7	10	8.12	0.035	4.4	
					4.53

2. 3 测定的特异性和与扩散法测 IgG 的相关性

在 IgG 含量为高、中、低三种不同浓度的 4 份人血清中, 加入已知量的 IgG, 用本法进行测定. 结果见表 2. 同时也分别对兔和绵羊血清进行了对照测定. 实验表明, 兔和绵羊血清对本试验无任何干扰反应. 上述测定的标本, 也与 IgG 的免疫扩散测定法相对照. 经统计处理, 传感器法与免疫扩散法间 $P > 0.1$, $r = 1.02$.

表 2 IgG 免疫传感器测定 IgG 的标准回收率 (IgG/ (g/L))

IgG 量	测定次数	加入 IgG 量	实含 IgG 量	测定平均值	回收率 (%)
1.85	5	7.4	9.3	9.1	98.3
3.7	5	7.4	11.1	10.8	97.3
7.4	5	7.4	14.8	15.4	104.0
14.8	5	7.4	22.4	20.9	94.1
兔血清	2	7.4	7.4	7.5	100.8
羊血清	2	7.4	7.4	7.4	99.7

以上结果证明, 传感器在 IgG 的测定中有较好的特异性, 与免疫扩散法也有良好的相关性.

3 讨 论

目前, 免疫传感器的研制可分为直接和间接测定两种方法. 直接测定法具有样品用量小,

不使用其它试剂,简单、快速、灵敏的优点.但也存在非特异性吸附和电位漂移的缺点.国内外已研制的几种免疫传感器^[2-6],在电极的制作上都采用液膜电极,用Ag/AgCl或甘汞电极做对照电极,用终点电位法进行测定,但不易克服上述缺点.我们用电化聚合和戊二醛交联的方法,将羊抗人IgG抗体固定在石墨电极表面,研制成固态活性膜直接IgG免疫传感器,并成功地应用该传感器对人血清IgG含量进行测定.同时还对传感器的测定、再生、保存条件、精密度、测定范围和选择性及与扩散法的相关性进行观察.在解决非特异性吸附和电位漂移的问题上,我们用速率测定法和使用与指示电极有相同膜的对照电极进行测定,使其达到了测定精密度和准确度的要求.实验结果表明,石墨活性膜IgG免疫传感器具有操作简单、快速、测定准确度和灵敏度高的特点,为

今后免疫传感器的研制提供了一种新的方法.

参 考 文 献

- 1 张先恩.生物传感技术原理与应用.长春:吉林科学技术出版社,1991:2-3
- 2 Solsky R L, Rechnitz G A. Antibody-selective membrane electrode. *Science*, 1979; **204**: 1309
- 3 Aizawa M, Morioka A, Suzuki S *et al.* Amperometric determination of human chorionic gonadotropin by membrane-bound antibody. *Anal Biochem*, 1979; **94**: 22
- 4 Aizawa M, Morioka A, Suzuki S *et al.* An enzyme immunosensor for the electrochemical determination of the tumor antigen α -fetoprotein. *Anal chim Acta*, 1980; **115**: 61
- 5 Dian L B, Garry A, Rechnitz. Monoclonal antibody biosensor for antigen monitoring. *Anal Letters*, 1987; **20** (11): 1781
- 6 苏殿杰, 张黎亚, 王志玲. 聚苯乙烯活性膜免疫电极的研究. *生物化学与生物物理进展*, 1985; (6): 33

PCR-特异探针杂交检测肿瘤组织 Ki-ras 基因点突变

范慕贞 许开明 曹淑兰 吴 翠

(中日友好临床医学所生化室, 北京 100029)

提 要

用福尔马林固定-石蜡包埋的人肿瘤组织切片,经脱蜡处理直接用PCR (polymerase chain reaction) 技术扩增Ki-ras 癌基因序列中包括12,13位密码子的DNA片段,并分别以5种含特异突变点的寡核苷酸探针代替3'端引物,经PCR扩增的产物作为点突变的阳性对照.用上述五种探针进行选择性地杂交,检测了人肺癌及结肠直肠癌组织的Ki-ras 基因12及13位点突变.为了封闭杂交时的非特异结合,采用野生型冷探针与标记的含突变点的探针同时进行杂交的方法,有效地消除了杂交过程中可能产生的假阳性,而不影响真阳性反应的出现.因而增加了检测的可靠性.

关键词 PCR, DNA 杂交, Ki-ras, 点突变

人类肿瘤中最常见的与转化活性有关的基因有ras 家族癌基因(c-Ha-ras, c-Ki-ras 及 c-N-ras 基因).其蛋白产物定位于细胞膜内表

面,能与GTP结合,具有GTP酶活性,有生