

紫外线辐照聚苯乙烯微孔板 用于酶免疫测定的研究与表征*

虞伟^{1,2)} 孙永康¹⁾ 廖建辉¹⁾ 张海黔¹⁾ 顾宁^{1)**} 武建国²⁾

(¹⁾东南大学国家教委分子与生物分子电子学开放实验室, 南京 210096;

²⁾南京军区南京总医院全军医学检验中心, 南京 210002)

摘要 以重组人钙调素 (rhCaM)、亲环素 (rhCyP)、心磷脂和双链 DNA (dsDNA) 为包被抗原, 建立了检测针对上述 4 种抗原自身抗体的间接 ELISA 方法, 并对聚苯乙烯微孔板 (PS) 紫外线 (UV) 辐照前后进行了对比研究. 结果发现: PS 板经 UV-辐照后, 可显著改善酶免疫分析的测定效果, 自身抗体的测定敏感度和重复性均有显著提高. 原子力学显微镜 (AFM) 表征结果则提供了改善酶免疫分析的直接证据, 抗原分子均匀平铺于 UV-辐照的 PS 基底表面, 而未经辐照的 PS 板则抗原分子的吸附率低, 且分布不均并有成团聚集现象. X 射线光电子能谱 (XPS) 分析表明, PS 板经 UV-辐照后, 基底表面发生了氧化并引入了含氧的活性基团, O/C 元素比较辐照前提高了 6.9 倍, 改善了对抗原生物分子的亲水和化学反应性能, 此亦即 UV-辐照 PS 板改善对抗原分子固定效果的主要原因.

关键词 聚苯乙烯微孔板, 紫外线, 酶免疫试验, 分子组装

学科分类号 Q814

酶免疫测定 (enzyme immunoassay, EIA) 是继放射免疫分析之后发展起来的一项固相免疫学测定方法, 它将酶促反应的高效率与免疫反应的高度专一性有机地结合起来, 可对生物物种体内各种微量生物分子 (抗原/或抗体) 进行定性或定量分析, 广泛应用于生物科学和医学实验诊断领域^[1]. 在临床检测的 EIA 方法中, 聚苯乙烯微孔板 (PS) 因为廉价、易用而成为最常用的固相载体之一, 但 PS 板因来源厂家和生产批次不同, 其用于酶免疫分析的测定敏感度和重复性有很大差异^[2], 为改善 PS 板对生物分子的吸附性能和酶免疫测定结果, 有必要对 PS 板基底加以修饰处理, 以期达到较为理想的效果. 本文通过紫外线 (UV) 对 PS 板作辐照处理, 并选择不易直接固定至载体表面的小分子半抗原为研究对象, 以检测血清样本中的相应抗体分子, 并对其测定结果进行考证. 用原子力学显微镜 (AFM) 作为主要表征手段观察不同抗原分子固定于 PS 基底表面的分布和形貌特征, 同时以 X 射线光电子能谱 (XPS) 检测了 PS 基底表面, 用以探索其固定生物分子的可能机制.

1 材料与方法

1.1 抗原制品与主要试剂

重组人钙调素 (rhCaM)、亲环素 (rhCyP)、心磷脂抗原 (CL)、多克隆兔抗人 CaM 血清均由

南京总医院全军医学检验中心自行研制; 小牛胸腺 dsDNA 与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG (购自华美公司, S_{ABC}); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗人 IgG (购自上海生物制品研究所); 自身抗体阳性血清均获自南京总医院临床确诊的自身免疫病患者、阴性血清获自健康献血员.

1.2 聚苯乙烯微孔板与紫外辐照处理

12 孔聚苯乙烯反应条板 (易拆条), 购自天津玻璃制品厂; 将其置于装有紫外灯 (UV-CJ8F 15W 型, 南京紫外电器厂) 的医用净化工作平台上, 固定紫外灯与微孔板基底的垂直距离为 10 cm, 选择不同的时间段于空气中对 PS 板作辐照处理, 完毕后置室温储存备用.

1.3 酶联免疫检测 (EIA)

取上述未处理与 UV-辐照后的 PS 板用于抗原分子的固定, 其中 rhCaM、rhCyP、dsDNA 以 pH 9.6 碳酸盐缓冲液作为包被液, 心磷脂抗原则以无水乙醇溶解, 分别将其稀释至一定浓度, 包被微孔板 (100 μ l/孔), 封闭后按常规方法^[3]操作检

* 国家自然科学基金 (69890220) 和教育部优秀青年教师科研教学奖励基金 (2000 年) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 025-3794960, E-mail: guning@seu.edu.cn

收稿日期: 2001-08-14, 接受日期: 2001-11-15

测血清中的相应抗体水平, 结果以吸光度 (A) 值高低表示.

1.4 PS板固定抗原后的AFM表征

样品制备按上述抗原分子包被方法进行, 再用双蒸水洗涤5次, 37℃烘干后用手术刀片截取底部用于AFM表征. AFM (Nanoscope IIIa型, 美国Digital Instruments) 运行采用共振模式, 所有检测均在室温大气环境下进行.

1.5 PS板表面的XPS分析

采用 ESCALAB MK2 型光电子能谱分析仪 (英国V. G 科学仪器公司). 以X射线源Mg作为阳极靶, 电压为12 kV, 电流为20 mA, 单色化后能量宽度小于0.2 eV. 光电子能谱以C—1s键的能谱峰 (285.0 eV) 校正.

2 结果

2.1 UV-辐照增加了自身抗体测定敏感度

微孔板经紫外线辐照后, 所测4种自身抗体的阳性吸光度值均较辐照前有了显著的提高, 80 min时吸光度为最大, 但随辐照时间的延长吸光度呈现下降趋势 (图1).

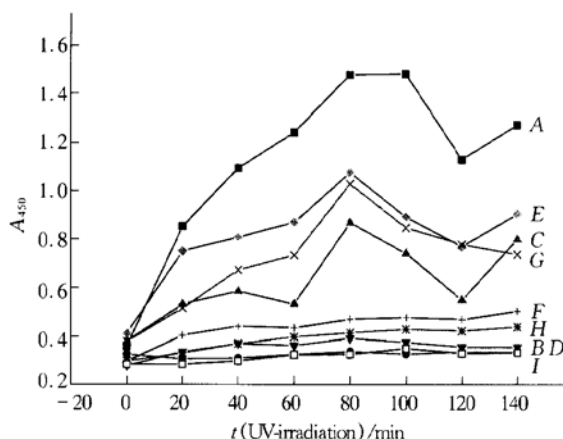


Fig. 1 Effect of UV irradiation on the binding of human serum to 4 antigens

A: CaM-antibody positive serum; B: CaM-antibody negative serum; C: CL-antibody positive serum; D: CL-antibody negative serum; E: CyP-antibody positive serum; F: CyP-antibody negative serum; G: dsDNA-antibody positive serum; H: dsDNA-antibody negative serum; I: reagent control. Antigen concentration was 2 mg/L.

2.2 不同抗原包被浓度与EIA检测结果

我们选择了rhCaM、兔抗CaM多克隆阳性血清和正常兔血清为研究体系, 以确定抗原分子的最

佳包被浓度. 发现UV辐照后阳性血清吸光度值随rhCaM包被浓度的增加而加大, 而未经处理的PS版, 其吸光度值基本维持在一个相对较低的范围内, 从图2可间接反应出包被抗原浓度为2 mg/L时, 其抗体结合能力已趋近饱和, 这与随后的AFM观察结果是一致的.

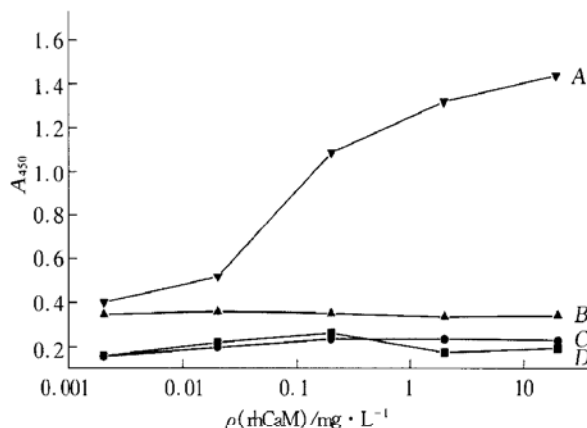


Fig. 2 Effect of UV irradiation and concentration of the coated antigen on binding of polyclonal positive rabbit serum to rhCaM

A: positive serum (UV-irradiation for 80 min); B: negative serum (UV-irradiation for 80 min); C: positive serum (No irradiation); D: negative serum (No irradiation).

2.3 UV处理PS板增加了测定结果的稳定性

分别选取3份不同吸光度值 (高、中、低) 的血清样本, 对UV处理的PS板立即进行重复性检测 ($n = 20$), 发现抗CyP与抗dsDNA抗体的批内平均变异系数 (CV) 分别为4.89%和7.65%, 较辐照前CV值 (分别为9.56%和14.35%) 明显降低.

2.4 PS板固定抗原分子的AFM表征结果

AFM表征结果显示, 辐照前微孔板基底表面抗原分子吸附的效率低, 且分布不均匀, 有的出现分子的聚集成团现象; 而UV辐照后抗原分子的吸附较为致密, 均一性有了显著的提高, 平铺于整个基底表面 (图3).

2.5 PS板表面XPS分析结果

经XPS分析证实, UV处理的PS基底表面发生了明显的氧化, 表面引入了含氧的活性基团, O/C元素比为10.9%, 较辐照前的比值 (1.58%) 增加了6.9倍 (图4), 图4中 C_{1s} 代表碳元素峰, O_{1s} 代表氧元素峰.

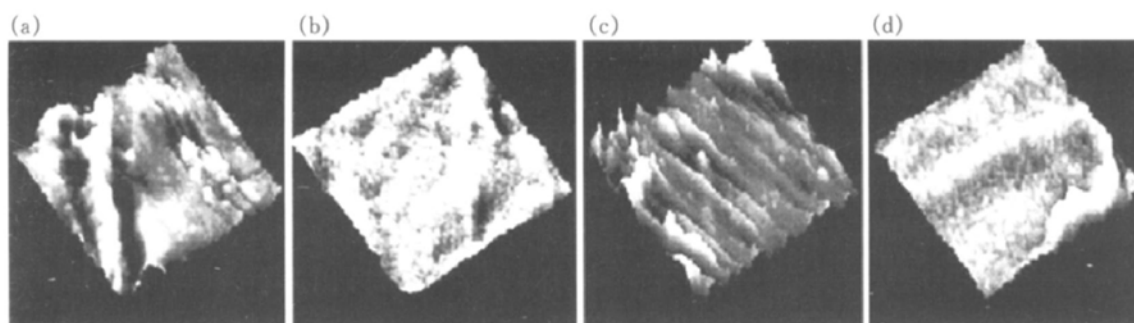


Fig. 3 AFM image of antigens which immobilized on the surface of unirradiated and irradiated PS plate
Antigen concentration was 2 mg/L. No irradiation: (a) cardiolipin ($1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$), (c) rhCyp ($0.5 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$); Irradiation: (b) cardiolipin ($1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$), (d) rhCyp ($0.5 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$).

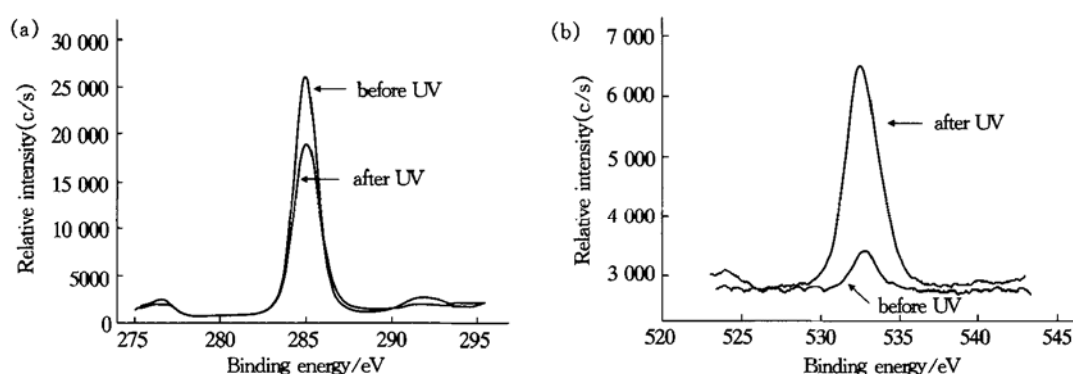


Fig. 4 Comparison of C_{1s} and O_{1s} peaks of polystyrene microtitre plate before and after irradiation

(a) C_{1s} ; (b) O_{1s} .

3 讨 论

传统的 EIA 技术中, 生物分子的固定主要基于被动的物理吸附, 但造成测定结果的不稳定和敏感度欠佳, 尚不能满足临床实验检测的要求. 以往的研究结果表明, PS 板经化学方法如: 戊二醛 (GA)、溴化氰和多聚赖氨酸 (PLL) 等修饰后, 可增加对生物分子的固定和测定敏感度, 但相对来说本底 (即非特异信号) 亦随之加强^[4-6]. 而物理方法主要是使其表面发生改性, 由于其本身具有无潜在的化学毒性和操作的可控性, 亦被国外许多实验室采用, 如紫外线 (UV)、 γ 射线 (^{60}Co) 和电子束辐照处理^[7-9]. 因此如何提高酶免疫测定的特异信号, 并有效降低背景噪音, 而成为我们首先需要解决的课题.

聚苯乙烯的紫外辐照是一个聚合物表面光氧化降解的过程, 同时还会产生热效应, 破坏聚苯乙烯结构^[9]. 我们在实验过程中也考虑到了这个问题, 严格控制 UV 照射的剂量和时间, 取得了较好的效果. 本文提供的 UV 处理聚苯乙烯微孔板适于各类抗原分子 (如小分子多肽、磷脂和 DNA 等) 的偶

联, 原子力显微镜 (AFM) 表征结果发现: 未经处理的微孔板表面吸附的生物分子分布是随机和不规则的, 而且有大块未结合生物分子的空白区域; 而 UV 辐照后则由于吸附过程的性质发生了变化, 被固定生物分子的数量和均一性有了很大的提高, 且分子层非常致密, 致使 EIA 检测的灵敏度和重复性有了显著的改善. 尽管 UV 辐照后阴性血清吸光度值亦有所增加, 但相对幅度较小, 特异信号与背景噪音之比反差明显, 被检血清作 1:10 稀释时, 阳性与阴性对照吸光度比达到最大. XPS 分析结果表明紫外线辐照后聚苯乙烯微孔板表面发生了氧化, 生成了某些含氧的活性基团如: 羟基 ($-\text{OH}$)、醛基 ($-\text{CHO}$) 和羧基 ($-\text{COOH}$) 等, 改善了对包被生物分子的亲水性与化学反应性能^[10]. 这使得辐照前后生物分子吸附到聚苯乙烯固相表面过程的性质由被动的物理吸附变成了化学偶联. 尽管呈现出分子间的多位点结合, 但固定后的抗原分子空间取向较被动吸附有了显著的一致性, 功能化保留程度亦有了明显的提高, 此亦即紫外辐照微孔板改善酶免疫分析结果的主要原因.

参 考 文 献

- 1 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 等. 酶免疫测定技术. 南京: 南京大学出版社, 1998. 2~ 10
Yang L G, Hu S C, Wei P H, *et al.* Enzyme Immunoassay. Nanjing: Nanjing University Press, 1998. 2~ 10
- 2 Rebeski D E, Winger E M, Shin Y-K, *et al.* Identification of unacceptable background caused by non-specific protein adsorption to the plastic surface of 96-well immunoassay plates using a standardized enzyme-linked immunosorbent assay procedure. *J Immunol Methods*, 1999, **226**: 85~ 92
- 3 武建国. 实用临床免疫学检验. 南京: 江苏科学技术出版社, 1990. 273~ 276
WU J G. Practical Technique of Clinical Immunology. Nanjing: Jiangsu Science Press, 1990. 273~ 276
- 4 Suter M. A modified ELISA technique for anti-hapten antibodies. *J Immunol Methods*, 1982, **53**: 103~ 108
- 5 Lehtonen O P, Viljanen M K. Antigen attachment in ELISA. *J Immunol Methods*, 1980, **34**: 61~ 70
- 6 Brennan D M, Danson M J, Hough D W. A comparison of ELISA screening methods for the production of monoclonal antibodies against soluble protein antigens. *J Immunol Methods*, 1986, **93**: 9~ 14
- 7 Boudet F, Theze J, Zouali M. UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *J Immunol Methods*, 1991, **142** (1): 73~ 82
- 8 Pipota J, Placek V, Vacek K, *et al.* The radiation refinement of polyethylene surface applied in immunoanalysis. *Radiat Phys Chem*, 1993, **42**: 949~ 955
- 9 Safrany A, Deelder A. Surface modification by electron irradiation for improved immunoassay. *Radiat Phys Chem*, 1999, **55**: 681~ 684
- 10 吴人洁. 高聚物的表面与界面. 北京: 科学出版社. 1998. 194~ 198
Wu R J. The Surface and Interface of High Polymer. Beijing: Science Press, 1998. 194~ 198

Study and Characterization of UV-irradiated Polystyrene Microtitre Plates for Use in an Enzyme Immunoassay^{*}

YU Wei^{1,2)}, SUN Yong-Kang¹⁾, LIAO Jian-Hui¹⁾, ZHANG Hai-Qian¹⁾, GU Ning^{1)**}, WU Jian-Guo²⁾

⁽¹⁾ National Laboratory of Molecular and Biomolecular Electronics, Southeast University, Nanjing 210096, China;

⁽²⁾ Center of Medical Science, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, China)

Abstract Using recombinant human calmodulin (rhCaM), cyclophilin (rhCyP), cardiolipin and double stranded DNA (dsDNA) as coating antigens, an indirect enzyme immunoassay (EIA) for autoantibodies against 4 antigens was developed. and investigated the pre- and post UV-irradiation of polystyrene (PS) microtitre plates as solid phase. It was found that, compared with non-treated PS, the irradiated PS plate could significantly improve the performance of assay result, and its detective sensitivity as well as reproducibility of 4 autoantibodies were significantly elevated. Surface characterizations were done by AFM, and AFM photo-pictures furnished the powerful direct evidence of improving EIA. Antigens were well distributed on the surface of UV-irradiated PS, whereas non-treated samples shown not uniform, the percent of molecules which adsorbed was very low and accumulative. XPS analysis revealed the bottom of the wells which irradiated were oxidated, and induced peroxide reactive groups. The ratio of oxygen and carbon (O/C) was 6.9-fold higher than that of non-treated PS, and increased the surface hydrophobicity as well as chemical reactivity. This is the main reason for improved performance of UV-irradiated EIA plates.

Key words polystyrene microtitre plates, ultraviolet light, enzyme immunoassay, molecular assembly

^{*} This work was supported by grants from the National Nature Sciences Foundation of China (69890220) and the Promotional Foundation of Ministry of Education of China for Excellent Young Teachers (2000).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-25-3794960, E-mail: guning@seu.edu.cn

Received: August 14, 2001 Accepted: November 15, 2001