

采用电聚合方法固定抗体的 IgG 检测微传感器*

边超 许媛媛 孙红光 陈绍凤 夏善红**

中国科学院电子学研究所 传感技术联合国家重点实验室北方基地, 北京 100080

摘要 采用微电子机械系统 MEMS 工艺制备微电极芯片, 并利用电化学聚合方法将抗体(羊抗人 IgG)与吡咯共同聚合在工作电极敏感表面, 用于人免疫球蛋白 IgG 的安培酶免疫检测. 该传感器以硅作为基底, 铂作为电极, 工作电极敏感面积 2 mm^2 . SU-8 胶形成的微反应池结构使该传感器试剂用量仅为 μL 量级. 该传感器工作电压 -0.3 V , 线性范围 $5\text{--}655\text{ ng/mL}$, 响应时间 3 min , 具有制备简便、响应快、试剂用量少、检测浓度低、微型化、便于集成等优点.

关键词 MEMS 安培酶免疫传感器 电聚合 聚吡咯 IgG

自 20 世纪 90 年代以来基于电化学原理的安培酶免疫检测得到了迅速发展, 应用领域包括食品工业、环境监测与处理、生物学技术及临床诊断等. 这种传感器利用抗原抗体之间的亲和作用以及酶的催化放大作用, 通过检测与待测物浓度相关的电流信号实现生物分子的检测与识别, 相对于传统的光谱免疫检测具有响应快、灵敏度高、成本低、体积小、操作简便等优点.

然而目前处于研究阶段的安培酶免疫传感器一般采用碳棒、铂丝、玻碳等^[1-4]作为工作电极, 不易于器件的微型化、集成化. 此外反应多在器皿中进行, 对试剂的需求量大, 多为 mL 量级. 基于 MEMS 工艺在硅衬底上制备微传感器是实现器件微型化、实现微量检测、批量生产的有效途径, 将是生化微传感器的发展方向之一. 虽然目前已有少数科研单位采用 MEMS 工艺制备微电极进行生物分子的检测, 但是其研究对象只局限于利用酶的直接催化作用的葡萄糖、胆固醇等生物小分子^[5-7], 并未涉及生物大分子的免疫检测. 文中采用 MEMS 工艺在硅基底上制备微电极芯片, 进行免疫检测. 传感器敏感面积 2 mm^2 , 试剂用量仅为 μL 量级. 实现了免疫检测的微型化、微量化.

对于生物传感器, 生物敏感膜的固定化是关键的一环. 目前文献报道常用包埋或戊二醛交联等方法进行敏感膜的固定, 但是这些方法可控性较差、生物分子的活性不易保持. 尤其是对于日益微型化的生物传感器, 这些方法更加难以保证敏感膜的重复性及一致性. 目前一些文章报道采用电聚合方法将酶和高分子物质(如吡咯、吲哚、噻吩等)同时聚合在电极之上, 实现酶分子的固定^[8-10]. 这种方法具有操作简便、易控的优点, 能够严格控制固定的敏感区域, 适合微电极及微量试剂的固定, 有利于微电子技术与生物技术更好的结合. 同时采用电聚合法可以有效地缩短生物敏感膜固定的时间. 例如: 采用传统的戊二醛交联法, 首先需要将戊二醛固定在固相载体上, 然后再将生物敏感分子固定在戊二醛上, 每个步骤都需要在特定的温度下温育数小时甚至过夜, 十分耗时. 然而采用电化学聚合法只需要短短几分钟即可实现生物分子的固定, 大大提高了传感器的制备效率. 此外由于电化学聚合的薄膜呈松散的结构, 生物分子在膜内具有比较自由的微环境, 能够更好地保持生物分子的活性. 虽然采用电聚合法进行酶传感器的研究已经取得了一定的进展, 但是极少有文献报道将这种方法用于安培

2005-03-18 收稿, 2005-09-29 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 90307014)

** 联系人, E-mail: shxia@mail.ie.ac.cn

免疫传感器的研究. 本文尝试采用电聚合的方法将抗体与吡咯同时聚合在工作电极敏感表面, 实现抗体的固定并进行人免疫球蛋白 IgG 的安培免疫检测.

1 实验

1.1 主要试剂与仪器

羊抗人 IgG, HRP 标羊抗人 IgG, 人 IgG 购自北京欣经科生物技术有限公司. 牛血清蛋白、磷酸盐缓冲片 (pH7.4, 0.01 mol/L) Sigma 公司生产. 吡咯 Fluka 公司. H_2O_2 , Na_2SO_4 , KNO_3 等由北京化学试剂公司生产. 所有试剂均为分析纯. 试剂由去离子水配制.

MEC-12B 型多功能微机电化学分析仪产自江苏江分电分析有限公司, 用于电极表面修饰及计时电流检测.

1.2 电极芯片制备

用于电化学检测的工作电极材料多为贵金属材料 (如 Pt, Au, Ag) 和各种碳电极 (碳、石墨、玻碳电极等). 针对 MEMS 的平面薄膜制备工艺, 本文采用双电极结构, 选用惰性金属材料铂同时作为工作电极、对电极. 工作电极敏感部分为圆形, 面积 2 mm^2 . 对电极为环形, 将工作电极环绕在其中. 芯片实物图见图 1.

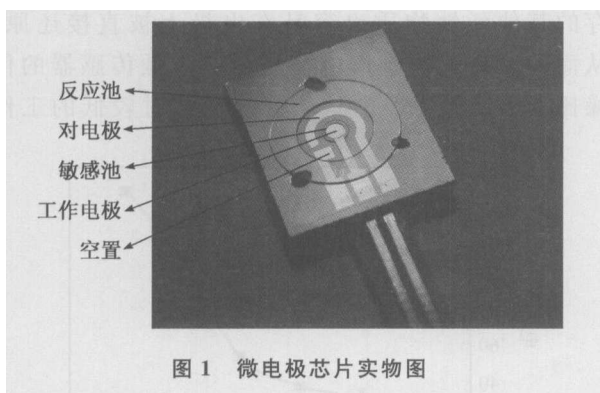


图 1 微电极芯片实物图

该传感器设计有微型圆形敏感池和圆形反应池. 敏感池将工作电极的敏感部位限定在其中, 反应池作为整个电化学系统的反应室, 使得检测不需另加反应器皿, 同时试剂用量也比常规检测大大减少, 仅为 μL 量级, 常规用量为 mL 量级.

芯片具体制备工艺见图 2. 首先在硅片上依次

生长氧化硅、氮化硅作为绝缘层. 然后甩胶、光刻、溅射 Pt 并剥离形成工作电极和对电极. 之后以 SU-8 作为结构材料, 采用两次曝光一次显影的方法制备反应池和敏感池. 第一层 SU-8 高 $50\ \mu\text{m}$, 曝光之后不显影, 继续甩胶得到第二层高 $100\ \mu\text{m}$ 的 SU-8 结构, 然后进行第二次曝光, 显影后得到高度分别为 50 和 $150\ \mu\text{m}$ 的敏感池和反应池.

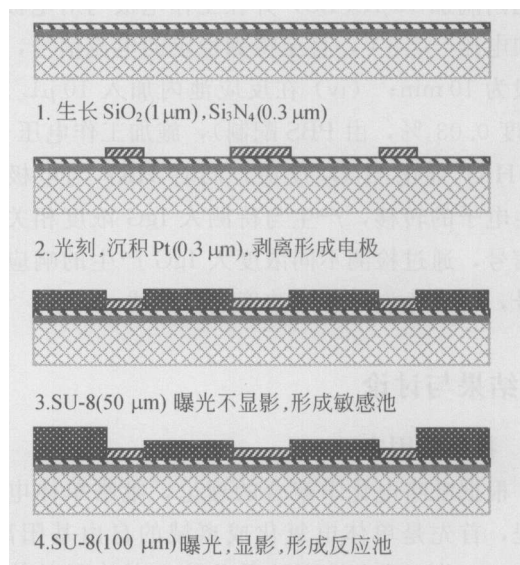


图 2 微电极芯片制备工艺流程图

1.3 电极表面预处理及抗体固定

(i) 用氧等离子体轰击电极芯片表面; (ii) 在 H_2SO_4 (1 mol/L) 中进行循环伏安扫描, 电压范围 -0.2 — $+1.5\ \text{V}$, 扫描速度 $50\ \text{mV/s}$, 直至得到重复的、稳定的曲线; (iii) 在工作电极敏感表面采用恒流法聚合抗体及吡咯, 电流密度 $0.25\ \text{mA/cm}^2$, 抗体浓度 $250\ \mu\text{g/mL}$, 吡咯单体浓度 $0.1\ \text{mol/L}$, 电解质 Na_2SO_4 $0.01\ \text{mol/L}$, 溶液由 pH7.0 的磷酸盐缓冲液配置, 试剂用量 $10\ \mu\text{L}$, 聚合时间 $4\ \text{min}$, 聚合后用磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4, $0.01\ \text{mol/L}$) 清洗电极表面; (iv) 在敏感池内滴加 $1\ \mu\text{L}$ 牛血清蛋白 1% (由 PBS 配置), 用于减少非特异性结合的几率, 于 $4\ ^\circ\text{C}$ 静置 $2\ \text{h}$ 后用 PBS 清洗; (v) 在反应池内滴加 $10\ \mu\text{L}$ PBS, 于 $4\ ^\circ\text{C}$ 保存待用.

1.4 检测步骤

免疫检测采用夹心法, 抗体与酶标抗体 (辣根过氧化物酶 HRP 标羊抗人 IgG) 对人 IgG 进行特异

性识别, 通过检测 HRP 对底物 H_2O_2 催化产生的电流信号实现检测. 检测步骤如下: (i) 在敏感池内滴加 $1\mu L$ 标准浓度人 IgG 溶液, 于 $4^\circ C$ 温育 1h, 使固定抗体对人 IgG 进行特异性识别, 然后用 PBS 清洗; (ii) 滴加 $1\mu L$ 酶标抗体 HRP 标羊抗人 IgG 于敏感池, 酶标抗体与固定的人 IgG 进行特异性结合, 反应于 $4^\circ C$ 静置 1h 后用 PBS 清洗; (iii) 在反应池内滴加 $10\mu L$ PBS, 并在工作电极与对电极之间施加电压 $-0.3V$, 直至得到稳定的电流信号, 时间一般为 10 min; (iv) 在反应池内加入 $10\mu L H_2O_2$ (浓度 0.03%, 由 PBS 配制), 施加工作电压 $-0.3V$, HRP 催化 H_2O_2 反应, 同时 HRP 与电极之间发生电子的转移, 产生与待测人 IgG 浓度相关的电流信号, 通过检测不同浓度人 IgG 产生的响应电流信号, 得到免疫传感的浓度响应曲线.

2 结果与讨论

2.1 抗体的固定

根据吡咯电化学聚合的理论, 吡咯单体电聚合过程, 首先是单体电氧化成离域的自由基阳离子, 其在 α 一位上有很高的自旋密度. 其次是单体自由基通过 α 一位的自由基耦连形成二聚体, 然后放出 2 个质子, 产生中性二聚体, 接着二聚体氧化为二聚体自由基, 与其他单体自由基或二聚体自由基、低聚物自由基反应, 使聚合物链增长, 耦联/电氧化过程如此重复下去, 聚合过程如图 3 所示.

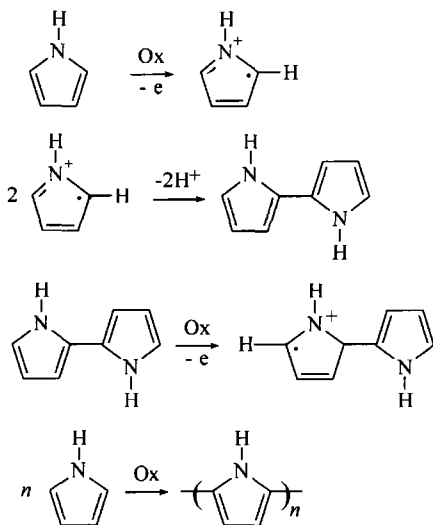
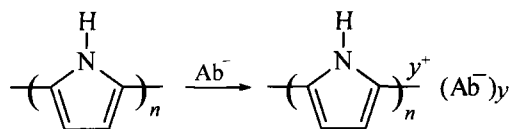


图 3 吡咯电聚合过程

在电聚合的过程中, 由于氧化形成的自由基阳离子 Py^+ 或 PPy^+ 存在静电相互作用和氢键作用, 电解液中的阴离子将作为平衡离子嵌入聚吡咯链中, 以中和聚合物骨架上的正电荷. 掺杂态的 PPy 的链结构可表示为 $C_4H_3NX_z$, 其中 X^- 为掺杂的对离子, z 为掺杂度. 掺杂度一般在 0.25—0.33 之间, 即每三个或四个吡咯环上带有一个阴离子. 利用这一原理可以使待固定的抗体或抗原作为平衡离子掺入聚吡咯膜内. 由于 IgG 抗体等电点为 6.8, 在 pH 7.0 的溶液中带负电. 因此在 pH 7.0 的溶液中聚合吡咯时, 溶液中的 IgG 可掺入聚吡咯膜内, 从而固定在电极上, 反应如下式, 其中 $y = nz$.



2.2 工作电压对传感器响应的影响

图 4 为人 IgG 浓度相同的情况下工作电压的变化对传感器响应电流的影响. 由图可知, 在 -0.2 — $-0.7V$ 的电压范围内, 随着工作电压向负的方向逐渐增大, 响应电流也逐渐增大. 在理论上随着工作电位负值的增加, 传感器的灵敏度也该随之增大. 但是在过高的电位下, 溶液中共存的其他活性物质也容易在电极上被直接还原, 从而增大系统的噪声电流信号, 降低传感器的信噪比, 限制传感器的检测限. 在相对较低的工作

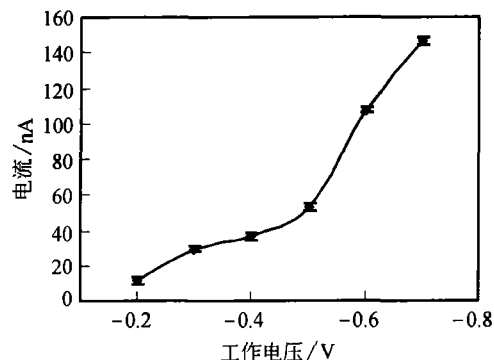


图 4 工作电压对传感器响应的影响

人 IgG 5 ng/mL. 底液为含 0.03% H_2O_2 , 0.05 mol/L KNO_3 的 PBS (0.05 mol/L), pH 7.4

电位下, 系统的背景电流噪声较弱, 能有效的抑制溶液中电活性物质带来的干扰. 此外在较高的工作电位下(-0.6—-0.7 V), 底液中的 H_2O_2 将在对电极上直接发生反应. 因此本实验选择 -0.3 V 作为工作电压.

2.3 底液 pH 值及温度对传感器响应的影响

对于酶免疫传感器, 其最终产生的响应信号是通过标记在抗体上的酶对其底物的催化作用而形成的. 因此在待检测的免疫试剂浓度相同的情况下, 酶的催化活性及稳定性将对免疫传感器的响应产生影响. 底液的 pH 值及温度的变化会影响酶的催化活性及稳定性, 从而影响传感器的响应, 因此需要对底液的 pH 值及温度进行优化.

图 5 为其他实验参数相同的情况下传感器的响应电流与反应底液 pH 值的关系曲线. 底液为含 H_2O_2 0.03%、 KNO_3 0.05 mol/L, 不同 pH 值的磷酸盐缓冲液, 反应在室温下进行. 由图可知, 当 pH 值为 7.0 时, 传感器的响应电流最大, 说明在此 pH 值下, 酶的活性较高, 这一结果与文献报道 HRP 酶活性适宜的 pH 范围相一致^[11].

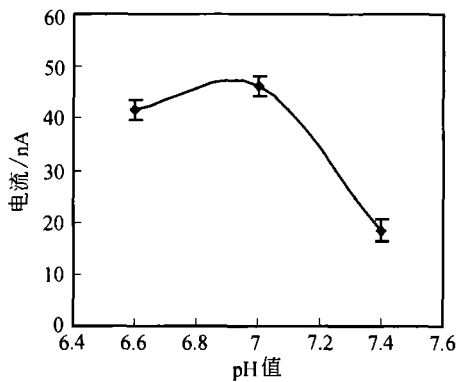


图 5 传感器响应与 pH 值的关系曲线

人 IgG5 ng/mL, 底液为含 H_2O_2 0.03%, KNO_3 0.05 mol/L 的 PBS(0.05 mol/L), 25℃

图 6 为底液温度不同时传感器的响应电流变化曲线. 根据图示结果, 在 4—37℃ 的温度范围内, 传感器的响应在 20℃ 时达到最大值. 说明 HRP 酶在 20℃ 具有较高的活性, 这一结果符合文献报道^[12]. 为了检测方便, 选择在室温条件下进行检测, 温度约为 25℃.

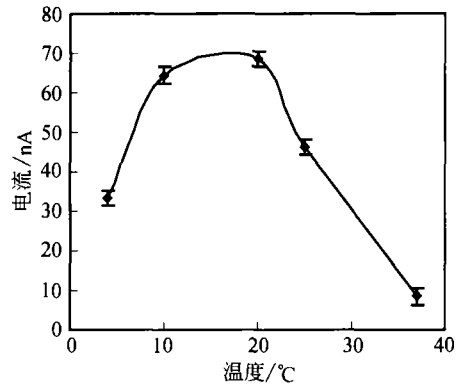


图 6 传感器响应与反应温度关系曲线

注: 人 IgG5 ng/mL, 底液为含 H_2O_2 0.03%、 KNO_3 0.05 mol/L 的 PBS(0.05 mol/L)pH7.0.

2.4 传感器的时间响应曲线

图 7 为传感器的响应电流随时间变化的计时电流曲线. 图中由下至上待测液中人 IgG 的浓度由 5 ng/mL 增至 1155 ng/mL. 检测时间 10 min. 根据图示结果, 响应电流信号在大约 3 min 即可达到稳定值的 95%, 比传统酶联免疫反应响应时间 1—2h 大为缩短, 比文献[4, 13]报道的安培酶免疫传感器响应 5—30 min 也有所改善. 此外, 随着人 IgG 的浓度的增加, 响应电流达到稳定值的时间略有增加, 这与一般酶生物传感器的性质是一致的.

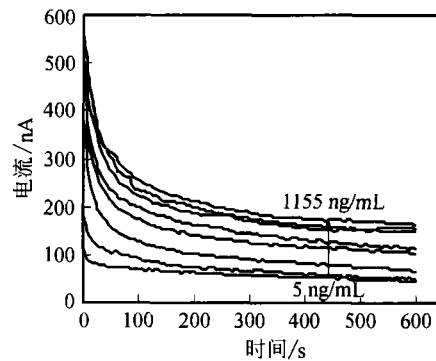


图 7 不同人 IgG 浓度下传感器的响应曲线

由下至上人 IgG 浓度分别为 5, 55, 155, 355, 455, 655, 840, 1155 ng/mL. 底液为含 H_2O_2 0.03%, KNO_3 0.05 mol/L 的 PBS(pH7.0, 0.05 mol/L)

2.5 传感器的线性范围及检测限

对不同浓度的人 IgG 样品进行检测, 得到样品浓度(5—1155 ng/mL)与响应电流关系曲线如图 8 所示. 实验表明, 该传感器的响应在 5—655 ng/mL

浓度范围内呈线性, 检测灵敏度 $0.16 \text{ nA} \cdot \text{mL} \cdot \text{ng}^{-1}$, 线性相关度 0.9955. 在 655—1155 ng/mL 浓度范围内传感器响应近似达到饱和. 该性能优于文献[13, 14]报道的结果.

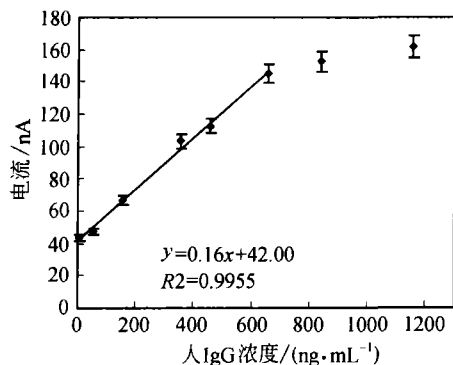


图8 安培酶免疫传感器浓度曲线

底液: 含 H_2O_2 0.03%, KNO_3 0.05% mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH7.0, 0.05 mol/L)

2.6 传感器的一致性及其寿命

将传感器对浓度为 840 ng/mL 人 IgG 进行 5 次重复性测量, 响应电流为 $(147.61 \pm 6.86) \text{ nA}$, 相对偏差 4.65%. 对不同批次的传感器的一致性进行测量, 由 3 批制备的传感器对浓度为 5 ng/mL 人 IgG 进行测量, 响应电流为 $(45.32 \pm 1.85) \text{ nA}$, 相对偏差 4.08%. 与文献报道安培酶免疫传感器的一致性相当, 说明该传感器具有较好的一致性.

对传感器进行寿命测试, 将两周后传感器的响应值与两周前同一批次制备得到传感器的响应值进行比较, 衰减相对偏差 5.67%. 一个月后传感器衰减相对偏差 7.72%, 达到或优于文献报道结果, 说明该传感器具有较好的稳定性.

3 结论

本文采用 MEMS 工艺在硅基底上制备微型安培酶免疫传感器, 用于人 IgG 的检测. 抗体利用电化学方法固定, 采用一步法将其与吡咯同时聚合在敏感电极表面. 该传感器检测线性范围 5—655 ng/mL , 响应时间 3 min, 一致性及稳定性较好. 具有制备简便、响应快、试剂用量少、检测浓度低、微型化、便于集成等优点. 基于此检测原理, 该传感器能够对其他生物分子进行免疫检测, 有待进一步的研究.

参考文献

- Li J, Xiao L T, Zeng G M, et al. A renewable amperometric immunosensor for phytohormone-indole acetic acid assay. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 494(1/2): 177—185
- Santandreu M, Sold S, Fabregas E, et al. Development of electrochemical immunosensing systems with renewable surfaces. *Biosensors & Bioelectronics*, 1998, 13(1): 7—17
- Darain F, Park S, Shim Y B. Disposable amperometric immunosensor system for rabbit IgG using a conducting polymer modified screen-printed electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, 18(5/6): 773—780
- Fernández-Sánchez C, González-García M B, Costa-García A. AC voltammetric carbon paste-based enzyme immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2000, 14(12): 917—924
- Zhu J Z, Zhu Z Q, Lai Z S, et al. Mass transfer in amperometric biosensors based on nanocomposite thin films of redox polymers and oxidoreductases. *Sensors*, 2002, 2 (3): 79—90
- Gué A M, Tap H, Gros P, et al. A miniaturised silicon based enzymatic biosensor: Towards a generic structure and technology for multi-analytes assays. *Sensors and Actuators B*, 2002, 82(2/3): 227—232
- Perdomo J, Sundermeier C, Hinkers H, et al. Containment sensors for the determination of L-lactate and glucose. *Biosensors and Bioelectronics*, 1999, 14(1): 27—32
- Xu J J, Zhang X Q, Yu Z H, et al. A stable glucose biosensor prepared by co-immobilizing glucose oxidase into poly (*p*-chlorophenol) at a platinum electrode. *Fresenius J Anal Chem*, 2001, 369(6): 486—490
- Miao Y Q, Chen J R, Wu X H. Using electropolymerized non-conducting polymers to develop enzyme amperometric biosensors. *TRENDS in Biotechnology*, 2004, 22(5): 227—231
- Luo X L, Xu J J, Du Y, et al. A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. *Analytical Biochemistry*, 2004, 334 (2): 284—289
- Miao Y Q, Tan S N. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of peroxidase in chitosan matrix crosslinked with glutaraldehyde. *Analyst*, 2000, 125(9): 1591—1594
- Zhong T S, Liu G D. Silica sol-gel amperometric immunosensor for schistosoma japonicum antibody assay. *Analytical Sciences March*, 2004, 20(3): 537—541
- Campanella L, Attioli R, Colapicchioni C, et al. New amperometric and potentiometric immunosensors for anti-human immunoglobulin G determinations. *Sensors and Actuators B*, 1999, 55(1): 23—32
- Wilson M S, Rauh R D. Novel amperometric immunosensors based on iridium oxide matrices. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 19(7): 693—699