

用于免疫分析的聚苯乙烯微孔板功能化研究*

苏赛飞¹ 董相廷¹ 潘利华² 吴占伟¹

(1. 长春理工大学化工学院,长春 130022; 2. 中国科学院长春应用化学研究所,国家电化学光谱分析研究中心,长春 130022)

摘要 为满足固相时间分辨荧光免疫分析研究需要,将聚苯乙烯微孔板内表面固相功能化,研制一种在聚苯乙烯微孔板内表面形成耐受强酸、强碱、有机溶剂的尼龙 6 膜层,并在膜层表面烷基化得到活性基团与己二酸二酰肼进行“手臂”连接,用双功能团戊二醛活化。检测结果表明,经修饰的聚苯乙烯微孔板化学连接蛋白质结合率比物理吸附高出 5~10 倍,在-4℃环境中存放 6 个月活性降低小于 15%。灵敏度和稳定性显著提高。

关键词 聚苯乙烯微孔板 尼龙 6 固相功能化 烷基化

临床免疫分析是以物理吸附方式将抗体或抗原固定在聚苯乙烯微孔板中进行分析检测,由于在操作中多次冲洗聚苯乙烯微孔板使物理吸附的抗原或抗体易脱落和活性降低,致使其灵敏度、重复性及稳定性明显降低^[1]。

自 20 世纪 70 年代,人们开始研究将生物大分子化学共价结合于固相载体表面代替物理吸附的方法^[2],包括在聚苯乙烯表面修饰形成能与蛋白质化学连接的活性基团(氨基、羧基和硫氨基)、活性基团移植聚苯乙烯表面或活性生物大分子与聚苯乙烯共聚后涂层聚苯乙烯表面等,但由于聚苯乙烯表面的碳氢键非常稳定,许多结果不甚理想。因此,研制用以增加结合于固相的生物大分子数量的固相材料将成为提高超微量免疫分析灵敏度的关键技术之一^[3]。

尼龙 6 作为可游离出活性胺基基团的多胺,很早就引起人们的关注^[4~6]。笔者采用尼龙 6 作为固相材料,通过独特的溶解配方使之涂层于聚苯乙烯表面,应用化学方法对涂层的尼龙 6 膜功能化而形成与蛋白质化学连接的氨基基团,最终提高免疫分析灵敏度^[7]。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

γ 放射免疫计数器:GC-911 型,中国科学技术大学科技实业总公司;

电动转速器:45 r/min,自制;

放射性活度计:FJ-391A 型,北京核仪器厂;

聚苯乙烯微孔板:长春生物制品研究所;

间甲酚:上海慧世生化试剂有限公司;

硫酸二甲酯:上海凌峰化学试剂公司;

尼龙 6、己二酸二酰肼、乙酸、吡啶、丙酮、甲酰胺:北京化学试剂公司;

三氟化硼乙醚:国药集团化学试剂有限公司;
环氧氯丙烷:天津天太精细化学品有限公司;
乙肝表面抗原、抗体:吉林大学三院;
放射性碘化纳(NaI¹²⁵):长春生物制品研究所;
其它试剂均来自北京化学试剂公司;
实验所用试剂均为分析纯;
实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 缓冲溶液

$\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$ 缓冲溶液:pH = 9.6;
硼酸盐缓冲溶液:pH = 8.2, 0.1 mol/L;
磷酸盐缓冲溶液:pH = 7.5, 0.1 mol/L;
含小牛血清和氯化钠的磷酸盐缓冲溶液:pH 7.5, 含氯化钠 0.09 mol/L、小牛血清 0.1 mol/L。

1.2.2 固相白色不透明聚苯乙烯微孔板的制备

控制温度为 66℃,将尼龙 6、乙酸、间甲酚、吡啶按一定比例配制成溶液,将 4 滴新配制尼龙 6 溶液立刻滴加到预先用吡啶-丙酮溶液(0.1:2.9)浸泡 1 min 的聚苯乙烯微孔板中(实验环境温度为 21~25℃),放到转动器上转动 0.5 h, 干燥后的尼龙 6 膜聚苯乙烯微孔板再用吡啶与丙酮混合溶液浸泡 1 min, 再将 3 滴尼龙溶液滴加入微孔板中, 转动器上转动 0.5 h, 干燥后取下, 得到固相白色不透明聚苯乙烯尼龙 6 膜微孔板;然后用三乙基氧鎓四氟硼酸脂溶液或硫酸二甲酯溶液将尼龙膜层进行烷基化, 烷基化后的微孔板用己二酸二酰肼溶液进行“手臂”连接, 最终得到固相功能化聚苯乙烯微孔板(注:“手臂”为连接蛋白质与固相的中间体,易于

* 国家自然科学基金应用基础研究项目(30471606);长春应用化学研究所重大科研装备项目

收稿日期:2007-12-05

与固相表面活性基团和蛋白质反应)。

1.2.3 三乙基氧鎓四氟硼酸脂沉淀的制备

在持续搅拌下, 将 12.5 mL 的环氧氯丙烷的乙醚溶液加入到 40 mL 体积百分数为 5% 的三氟化硼乙醚溶液中, 30 min 加完, 加热回流 1 h, 室温再搅拌 3 h。得到的三乙基氧鎓四氟硼酸脂沉淀用抽滤的方法滤出, 用无水乙醚冲洗 3 次, 产率为 90% 以上。三乙基氧鎓四氟硼酸脂沉淀须在 24~48 h 内使用。

1.2.4 二乙基己二酰二胺四氟硼酸酯的制备^[4]

将 2 g 己二酰二胺加入到 32 mL 的三乙基氧鎓四氟硼酸脂的二氯甲烷的溶液中, 在室温下搅拌 2 h, 合成的二乙基己二酰二胺四氟硼酸酯 (Bisimide) 是透明的亮褐色的油状液体, 用二氯甲烷和乙醚冲洗, 分液分离。Bisimide 应放在被抽成真空的有浓硫酸的干燥器中。

1.2.5 尼龙膜的烷基化与“臂”接方法^[7]

(1) 将新制备好的三乙基氧鎓四氟硼酸脂和二氯甲烷配成质量百分数为 3% 的溶液, 加入 200 μL 该溶液于尼龙膜微孔板中, 静置 4 min, 倒掉; 再用二氯甲烷溶液浸泡 3 min, 倒掉, 加入二氯甲烷溶液冲洗一次, 最后用二氯六环冲洗 1 次, 烷基化完成。直接加入饱和的己二酸二酰肼的甲酰胺溶液, 放置 3 h 倒掉, 再用磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 次, 加入磷酸盐缓冲溶液后放置到 -4℃ 的冰箱中保存, “手臂”连接完成。

(2) 将硫酸二甲酯溶液加入到尼龙膜微孔板中 4 min, 倒掉后用甲醇溶液冲洗直到不产生白色沉淀, 直接加入饱和的己二酸二酰肼的甲酰胺溶液 (4%) 包被 3 h, 用 0.1 mol/L 的 NaCl 冲洗一次, 加入磷酸盐缓冲溶液, 放置到 -4℃ 的冰箱中保存, “手臂”连接完成。

1.2.6 功能化微孔板免疫结合量的测定

向己二酸二酰肼连接完成的聚苯乙烯微孔中加入 5% (体积百分数) 的戊二醛溶液浸泡 10 min, 用磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 次, 每孔加入 200 μL 的抗原

HBS 后放置一夜, 用含有 NaCl (0.1 mol/L) 和小牛血清的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 次, 加入 200 μL I¹²⁵-HBSAe 抗体, 等待 1 h, 用含小牛血清和氯化钠的磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 次, 用 γ 放射免疫计数器检测其免疫结合量。

2 结果与讨论

2.1 尼龙 6 膜制备条件

实验采用了吡啶-丙酮混合溶液预先活化聚苯乙烯表面, 用乙酸、间甲酚、吡啶溶解, 活化尼龙, 使两者之间发生疏水性相互作用, 同时吡啶兼有活化聚苯乙烯和温和的“侵蚀”作用, 在低速旋转作用下使尼龙 6 沿微孔表面形成多层薄膜, 直至完全封闭, 并快速在聚苯乙烯表面成膜。

实验最佳条件: 3 g 尼龙 6 溶解在 22 mL 乙酸、10 mL 间甲酚中, 按照每 10 mL 尼龙 6 溶液加入吡啶 0.7 mL, 配制成涂层溶液。聚苯乙烯微孔板预先用吡啶-丙酮溶液浸泡, 加入尼龙 6 溶液在室温 (21~25℃) 下旋转 0.5 h, 形成白色不透明聚苯乙烯微孔板。

2.2 尼龙膜聚苯乙烯微孔板功能化条件

实验采用 6 种不同的方法对微孔板 (8 孔) 进行功能化, 条件如下: 第 1 组为尼龙膜烷基化 + 1,6-己二胺 + 戊二醛 + 抗体 HBS; 第 2 组为尼龙膜烷基化 + 1,6-己二胺 + Bisimide + 抗体 HBS; 第 3 组为尼龙膜烷基化 + 己二酸二酰肼 + 戊二醛 + 抗体 HBS; 第 4 组为尼龙膜烷基化 + 己二酸二酰肼 + Bisimide + 抗体 HBS; 第 5 组为尼龙膜烷基化 + 戊二醛 + 1,6-己二胺 + 戊二醛 + 抗体 HBS; 第 6 组为尼龙膜烷基化 + 戊二醛 + 己二酸二酰肼 + 戊二醛 + 抗体 HBS。以上实验数据列于表 1。

分析表 1 的结果, 我国采用的 ELESA 的诊断标准为实验 P 与对照 N 之比为 2.1。实验中, 用功能化的板与物理吸附板作为对照进行比较可知, 每次实验的 P/N 的值都大于国家标准, 结合性非常高, 即本次实验的灵敏度比国家标准提高 5 倍以上;

表 1 不同功能化条件微孔板结合 I¹²⁵-HBSAe 的脉冲数 (I¹²⁵-HBSAe 总数为 29320)

分组	1	2	3	4	5	6	7	8	总数	RSD/%	平均数	免疫结合率/%
第 1 组	13 176	13 805	10 838	14 739	10 626	9 978	10 746	10 633	94 541	14.23	11 817	40.30
第 2 组	9 782	8 575	8 799	9 834	9 915	9 416	9 279	8 938	7 4538	5.10	9 317	31.78
第 3 组	10 760	9 627	10 335	9 467	9 680	9 718	10 670	11 298	81 555	6.13	10 194	34.77
第 4 组	7 665	7 360	7 562	7 862	8 085	8 408	8 500	7 883	6 3325	4.71	7 915	27.00
第 5 组	11 553	11 146	13 209	13 513	13 877	12 664	13 826	13 367	103 155	7.48	12 894	43.98
第 6 组	6 669	6 344	6 314	6 121	6 072	6 443	6 674	6 120	50 757	3.46	6 344	21.64
对照 1	1 095	979	970	1 003	849	1 259	877	961	7 993	12.0	999	3.41

同时国家规定判定均一性的标准为 RSD 不大于 10%。由于每次实验的 RSD 值都远小于国家标准的 10%, 用误差分析的方法可以得出, 实验中样品板的脉冲数的测定具有很高的均一性。根据免疫结合率和功能化微孔板颜色可知, 功能化的最好条件应为第 3 组实验, 如表 2 所示。

表 2 不同的“手臂”试剂对结合率和微孔板颜色的影响

“手臂”试剂	活化剂	最高免疫结合率/%	颜色
1,6-己二胺	戊二醛/戊二醛	43.98	棕红色
己二酸二酰肼	无/戊二醛	34.77	白色
1,6-己二胺	戊二醛/Bisimide	31.78	棕红色
己二酸二酰肼	戊二醛/ Bisimide	27.00	白色
1,6-己二胺	无 / 戊二醛	40.30	棕红色
己二酸二酰肼	戊二醛/戊二醛	21.64	略带浅黄色

2.3 第 3 组实验条件优化

(1) 不同的烷基化时间对免疫结合蛋白和化学偶联蛋白的影响列于表 3。

表 3 不同的烷基化时间对免疫结合蛋白和化学偶联蛋白的影响(I^{125} -HBSAe 放射总数为 20372)

标号	烷基化试剂	时间/min	免疫结合量/cpm	免疫结合率/%	化学偶联蛋白量/cpm	化学偶联蛋白结合率/%
1		2	7764	38.20	4644	22.80
2	硫酸二甲酯	3	9039	44.47	5106	25.06
3	甲酯	4	9267	45.59	5811	28.53
4		5	8841	43.49	4959	24.34
a		3	6612	32.46	4422	21.71
b	TOTFB	4	8361	41.04	3306	16.23
c		5	9696	47.60	4350	21.35
e	物理吸附		1629	8.00	360	1.76

注: 硫酸二甲酯为烷基化试剂, 己二酸二酰肼浓度为 3%。三乙基氧鎓四氟硼酸脂(TOTFB) 为烷基化试剂, 自身浓度为 3%, 己二酸二酰肼浓度为 3%。

以硫酸二甲酯和三乙基氧鎓四氟硼酸脂作为烷基化试剂制备胺基取代尼龙(功能化)聚苯乙烯微孔板, 对烷基化时间做了条件实验, 用磷酸盐缓冲溶液稀释的 I^{125} -HBSAe 包被功能化聚苯乙烯微孔板, 每孔 200 μ L, 放射性总数为 20 372 cpm, 微孔板包被 I^{125} -HBSAe 的量可根据 γ 计数器检测到的 I^{125} 放射数量来得到, 如表 3 所示。从表 3 可以看出, 用硫酸二甲酯烷基化的微孔板的免疫结合量要远大于三乙基氧鎓四氟硼酸酯烷基化的微孔板, 并且硫酸二甲酯作为烷基化试剂, 在烷基化时间为 4 min 时, 免疫结合量(最高值 9 267, 结合率为 45.59%) 和化学偶联蛋白(最高值 5811, 结合率为 28.53%) 的量达到了最高值, 根据大量的实验可以验证最优的烷基化时间为 4 min。

(2) 己二酸二酰肼试剂浓度对结合率的影响

尼龙 6 膜微孔板经过烷基化, 对“手臂”试剂己二酸二酰肼浓度做了条件实验, 其中最佳的“手臂”试剂浓度为 4% (饱和浓度), 实验结果见表 4。

表 4 不同浓度己二酸二酰肼试剂对结合率的影响

名称	浓度/%	免疫结合率/%	化学偶联蛋白结合率/%
己二酸二酰肼	2	45.15	25.20
己二酸二酰肼	3	46.23	30.11
己二酸二酰肼	4(饱和)	50.37	30.45
物理吸附	无	8.00	1.76

注: 烷基化试剂为硫酸二甲酯, 烷基化时间为 3 min。

(3) 尼龙膜功能化表征

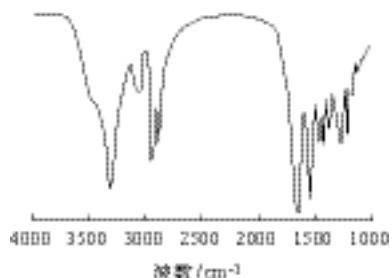


图 1 纯尼龙 6 粉末红外光谱

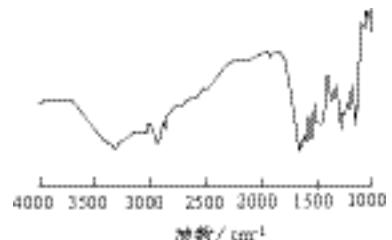


图 2 溶解涂层后的尼龙 6 膜红外光谱

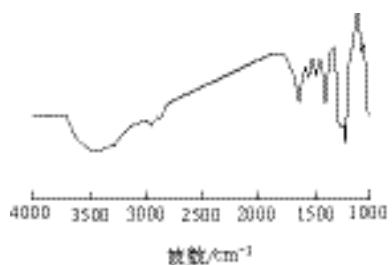


图 3 烷基化后的尼龙 6 膜红外光谱

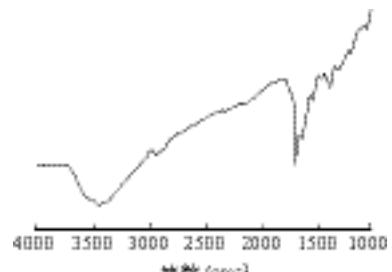


图 4 连接“手臂”后尼龙 6 膜红外光谱

如图1所示,纯尼龙6的红外特征峰(酰胺键)为3300、1639 cm⁻¹;图2显示溶解涂层的尼龙6膜的特征吸收峰位置没有变化,峰型变小;图3表明烷基化后的尼龙6膜的红外光谱在1390 cm⁻¹出现甲基的特征峰,3450、3308 cm⁻¹为—NH—的特征峰,证明尼龙6中酰胺键打开^[7],甲氧基团生成,烷基化完成;图4表明,“手臂”连接完成后,烷基化后生成的甲氧基团被“手臂”试剂中氨基取代,1393 cm⁻¹峰变小,甚至消失,取决于“手臂”试剂的多少,3438 cm⁻¹为—NH₂特征峰,综上所述,可以肯定尼龙6功能化完成。

2.4 功能化聚苯乙烯微孔板的稳定性

对优化的微孔板与对照组(物理吸附)在4℃存放50天间隔测量放射性I¹²⁵—HBS结合率的变化进行实验,结果证实本实验制作的微孔板相对稳定,50天后结合率仍达到38.54%,较最初结合率43.98%下降12.4%;而对照组(物理吸附)结合率降低到1.24%,较最初的2.29%下降了54.0%,因此本实验制作的微孔板有较高的稳定性。

3 结论

研究了一种能够将尼龙6牢固、均匀、稳定地移植于聚苯乙烯微孔板的内表面的配方和方法,并对尼龙6膜层进行化学修饰,使之裸露出容易与蛋白质共价连接的化学基团,用放射免疫分析方法进行检测,证实其与免疫蛋白连接具有高结合性(P与N的比值大于2.1,n>20)、高均一性(RSD<10%,n>20)和高稳定性。

该方法制备的功能化微孔板结合率均高出物理吸附5~10倍,与丹麦生产的Nunc Covalink—NH

微孔板相当,而价格仅为丹麦的1/4。该法制备的功能化微孔板不仅用于TRFIA方法研究,还可用于其他临床诊断和研究需求。具有使用简便、快捷、污染小、成本低的特点,因此有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Roderick N. Hobbs solid - phase immunoassay of serum antibodies to peptides covalent antigen binding to adsorbed phenylalanine - lysine copolymers [J]. J Immunol, 1989, 117:257 - 266.
- [2] Niveleau A, Sage D, Reynaud C, et al. Covalent linking of haptens proteins and nucleic acids to amodified polystyrene Support [J]. Elsevier Science Publishers B V, 1993, 159:177 - 187.
- [3] Larsson PerH, Johansson S G O, Anders Hult and svev Gothe2. Covalent binding of proteins to grafted plastic surfaces suitable for immunoassays [J]. Elsevier Science Publishers B V: Biomedical Division, 1987, 98:129 - 135.
- [4] Jan A verschoor, Nico M J, Vermenlen and Ieron Visser. Haptented nylon coated polystyreneplate as a solid phase for ELISA [J]. Journal of Immunological Methods, 1990, 127:43 - 49.
- [5] Morris D L, Ampbell J C, Hornby W E. A chemistry for the immobilization of enzymeson nylon [J]. Biochem J, 1975, 147:593 - 603.
- [6] Klaus Moeschel, Meryem Nonaimi, Christa Steinbrenner. A chemistry for the immobilization of enzymeson nylon [J]. Hans Bisswanger Biotechnology and Bioengineering , 2003, 82 (2):190 - 199.
- [7] Elli Smakula Hand , William Jenck. Immobilization of thermolysin to polyamide nonwoven materials [J]. Biochemistry, 1962, 84:3505 - 3514.
- [8] PerH larsson, JanHed S G O, Johansson, et al. Improved cell depletion inpanning technique using covalent binding of immunoglobulins tosurface modified polystyrene dishes [J]. Journal of Immunological Methods, 1989, 116:293 - 298.
- [9] 潘利华,马世盐,苏赛飞.固相白色不透明反射式样品池:中国,200520122784.1[P].2005-09-30.

STUDY ON POLYSTYRENE MICROPLATE FUNCTION FOR THE ANALYSIS OF IMMUNE

Su Saifei¹, Dong Xiangting¹, Pan Lihua², Wu Zhanwei¹

(1. Changchun School of Chemical and Environmental Engineering, Changchun 130022, China; 2. Changchun Institute of Applied Chemistry Chinese Academy of Sciences, National Analytical Research Center of Electrochemistry and Spectroscopy, Changchun 130022, China)

ABSTRACT In order to meet the need of solid - phase time - resolved fluorescence immunoassay research, chemical modification was used in polystyrene microplate inner surface. A special layer in polystyrene microplate which was tolerant of strong acid, strong alkali, organic solvent was researched, and active groups in the surface layer formed by alkylation were connected with adipic acid hydrazide as the“arm”, then the“arm” was activated by the glutaraldehyde - functional. Test results showed that the protein rate binded to the modified polystyrene microplate was 5 - 10 times higher than physical adsorption, the activation was decreased less than 15% when it was stored in 4℃ storage environment for six months. So the sensitivity and stability significantly increased.

KEYWORDS polystyrene microplate, nylon 6, solid functional, alkylation

欧盟地区医疗设备与耗材需求格局及趋势

虽然欧盟地区的医疗设备和耗材需求总值每年都有所增长,但因为价格的竞争对部分产品(特别是耗材)影响较

大,2004年加入欧盟的国家需求增长相对较缓慢。虽然整个欧盟地区的医疗设备和耗材有望持续增长,但多数政府仍压缩一定的医疗开支。
(林)