

2002-11-28

Detection and Analysis of SEC1 Immunological Reaction by AFM and Electrochemical Method

Sa-ying DONG

Hong-ren WANG

Recommended Citation

Sa-ying DONG, Hong-ren WANG. Detection and Analysis of SEC1 Immunological Reaction by AFM and Electrochemical Method[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2002 , 8(4): Article 11.

DOI: 10.61558/2993-074X.3305

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol8/iss4/11>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

文章编号:1006-3471(2002)04-0388-09

SEC1 酶免疫电极免疫反应的 AFM 和 电化学方法研究

董飒英*,王洪仁

(725 研究所青岛分部,山东 青岛,266071)

摘要: 将一种肠毒素抗体共价耦联于自组装的金电极表面,利用原子力显微镜识别抗原抗体在多种实验条件下的形貌并通过统计数据定量分析.用作控制实验的是非特异性牛血清白蛋白(BSA)抗原以及低浓度的 SEC1 抗原.另外,酸性溶液可以打破抗原与抗体之间的结合从而使得生物电极可以被重复使用.电化学实验支持了 AFM 的测试结果.

关键词: 原子力显微镜;自组装;电化学;特异性;解离剂

中图分类号: O 646

文献标识码: A

在生命科学领域,原子力显微镜的突出优点是可以在室温条件下直接观测生物分子及其相互作用,并能获得高分辨率的图像.到目前为止,许多生物大分子和生物学系统已在分子水平上由 AFM 成像.许多关键性过程,比如蛋白质吸附^[1,2]、免疫测试的探针识别^[3~5]、生物材料的结构细节^[6~8]、抗体抗原的定性定量分析^[9]、原位固-液界面的动力学观测^[3,10]等均已由 AFM 进行研究并确定了过程机理.

肠毒素 SEC1 是一种蛋白质,其抗原抗体之间的相互作用有着非常重要的军事意义和临床应用价值.国内外学者已用多种研究方法探讨这一反应过程^[11~13].原子力显微镜是研究这一特异性过程最为直接和敏感的工具之一,由此获得的信息使我们明显提高了对肠毒素的免疫复合物、非特异性吸附、敏感性和解离过程的直观理解.

本文利用 AFM 直接观测了抗原、抗体及其复合物的形貌,探讨了敏感探头的检测极限.为了确认肠毒素抗原抗体之间的特异性,利用牛血清白蛋白进行了非特异性吸附.在金电极表面,以抗原抗体复合物的量作为溶液中抗原浓度的函数,由 AFM 中的表面占有率和表面粗糙度加以表征,从而实现原子力显微镜的定量测试.测试过程依赖于生物分子高度和尺寸的变化,无需使用标记性指示剂.

生物电极的重现性并不理想,原因是每一次自组装过程所吸附的生物分子的量不同.解决这一问题的最好方法是用相同的抗体电极与不同浓度的抗原反应,由此有必要利用解离剂进

收稿日期:2002-04-06,修订日期:2002-06-24

* 通讯联系人, Tel: (86-532) 5843204; Fax: (86-532) 5826553; E-mail: dongsaying@sina.com.cn

基金项目:国防预研基金(JW960401)资助

行响应曲线的测定.

1 实验方法

1.1 化学试剂

SECI 抗原抗体由中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所提供. 半胱氨酸和牛血清白蛋白的抗原抗体购自 Sigma 化学公司, 葡萄糖氧化酶是日本 Toyobo 公司产品. 二茂铁衍生物购自美国 Aldrich 公司. 戊二醛是国内化学公司产品. 所有试剂均为分析纯. 不同浓度的抗原抗体溶液由磷酸缓冲溶液配制.

1.2 化学修饰电极

金电极用于所有实验测试. 每次实验前, 用 $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (7:3, v/v) 清洗金电极 30 min, 再用二次蒸馏水和乙醇洗净晾干, 于磷酸缓冲溶液中进行循环伏安扫描以确定金电极纯度. 将金电极置于 25 mmol/L 的半胱氨酸溶液中 (通 N_2 除氧), 室温下反应 20 h, 再耦联戊二醛 1 h, 蒸馏水清洗后, 放在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SECI 抗体溶液中, 30 min 后制成抗体电极. 金电极表面形成了一层抗体膜, 并且这一生物电极可由上述过程重复获得.

1.3 电化学测试

用上海辰华仪器公司生产的电化学工作站与计算机相连完成交流阻抗测试. 三电极系统由纯金电极 ($\varnothing 0.6$ mm, 工作电极)、铂丝辅助电极和饱和甘汞电极构成. 文中所有电极电位均相对于饱和甘汞电极, 阻抗频率范围是 1 kHz ~ 1 Hz. 生物电极用蒸馏水轻轻冲洗以除去游离的抗体. 免疫反应需要 30 min. 支持电解质溶液由磷酸缓冲溶液和 2 mmol/L 二茂铁衍生物组成, 二茂铁起氧化还原探针的作用.

1.4 AFM 实验

采用单晶硅片作为研究电极平台. 在单晶硅上真空溅射 100 nm 厚的金层, AFM 图像由 DI 公司生产的 Nanoscope IIIa 多模原子力扫描仪实现. 硅尖采用 Tapping 模式, 力常数是 20 ~ 100 N/m, 响应频率是 251.2 kHz.

以均方根表面粗糙度 (R_{rms}) 作为检测不同基底平面的均匀性指标, 由 Nanoscope IIIa 软件完成计算, 计算公式为:

$$R_{\text{rms}} = \left[\frac{\sum_{i=1}^N (Z_i - Z_{\text{ave}})^2}{N} \right]^{1/2}$$

其中 $Z_{\text{ave}} (= 1/N \sum_{i=1}^N Z_i)$ 是高度 Z 的平均值, N 是研究区域全部耦联的生物分子数目, Nanoscope 用户使用手册介绍了绘制和分析样品的表面高度的方法, 展示了在某一设定高度, 电极表面所拥有的高于这一高度的面积的百分比率. 由此可以定量地确定生物分子的表面占有率. 具体做法是, 将 2 μL 含不同生物分子的磷酸缓冲溶液滴于金电极表面, 溶剂挥发后, 生物层用二次水冲洗 3 次, 排除杂质盐沉积物和弱吸附的蛋白质. 样品成像前需彻底晾干, 测试均在室温下进行.

1.5 葡萄糖氧化酶(GOD)的 AFM 图像

通过 -COOH 基和蛋白质间的相互作用,使 GOD 经半胱氨酸直接吸附在电极表面. 然后比较 GOD 通过戊二醛与电极共价结合的结果. GOD 溶液的浓度是 0.9 mg/mL.

1.6 免疫反应的原子力显微镜图像

本文系统地调查了不同实验条件下 SEC1 抗原抗体之间的免疫反应,为研究非特异性吸附,监测了牛血清白蛋白(BSA)和肠毒素这两类免疫反应. 将 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA 和 SEC1 抗体分别沉积到修饰基底上,空气中晾干. 抗体基底被成像. 再将 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BSA 和 SEC1 抗原溶液分别与其对应的基底发生免疫反应. 进一步地,以 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA 抗原与 SEC1 抗体基底反应. 考察其特异性.

为了提高探测极限,将 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SEC1 抗原与基底抗体反应,并成像.

免疫反应后的基底用酸性解离试剂 ABG(0.1 mol/L, pH 2.4)处理,解离时间为 30 min 至 1 h. 基底上的 SEC1 抗原被排出,如此抗体电极可以重复使用.

以上实验过程均可由表面粗糙度和表面占有比例定量反映出来.

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖氧化酶(GOD)的 AFM 图像

在电化学生物传感器领域, GOD 有重要的商业应用价值,它可用于临床测试葡萄糖浓度,为探明电极表面 GOD 的吸附法结合和共价法结合,图 1 示出应用 AFM 的观测结果. 图 1a 是在 pH 7.0 的磷酸缓冲溶液中加入 GOD 按上述 AFM 实验方法经 30 min 后的图谱. 但在图 1b (吸附法)中 GOD 的高度和宽度明显大于图 1a (共价法),这表明吸附过程引起了 GOD 分子的

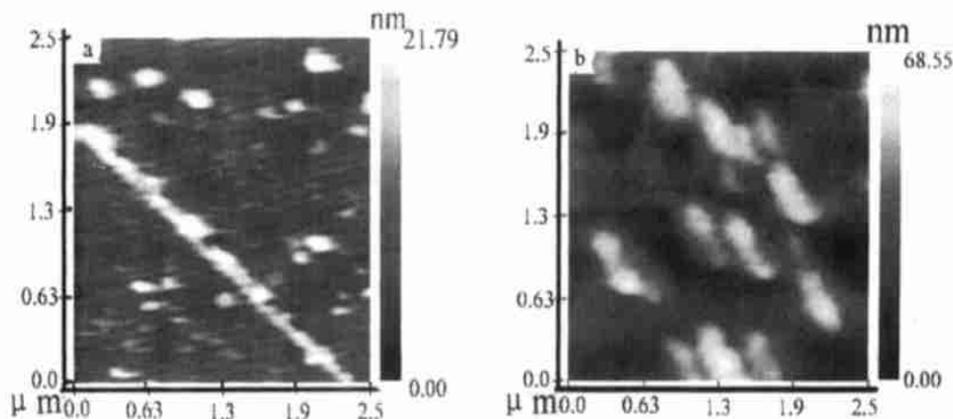


图 1 金电极表面 GOD 共价结合与吸附法的 AFM 图谱比较

- a) 共价结合,金电极经半胱氨酸修饰后,再由戊二醛耦联 GOD;
- b) 吸附,金电极经半胱氨酸修饰后直接耦联 GOD

Fig. 1 The AFM spectra of GOD's covalent linking and absorption at Au electrode surface

- a) covalent linking, b) absorption

聚合,有文献报道在 pH 7.0 的磷酸缓冲溶液中, GOD 有较大的负电荷,这会导致 GOD 的聚合或是在吸附过程中的相对变性,由此认为吸附法不适合于蛋白质的免疫分析,下面实验均采用共价结合法。

2.2 免疫反应的 AFM 图谱

在金基底上滴一滴浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BSA 抗体溶液完成抗体的修饰,30 min 后成像,抗体在电极表面的沉积是随机的。图 2 分别示出自组装抗体(图 2a)和免疫反应后(图 2b)免疫复合物的 AFM 图谱。如图所见,免疫反应明显增大了生物分子的高度和宽度,所以共价结合法使得蛋白质能够充分固定。从 AFM 图像上也可以清楚地看到每一个抗体分子以及每一个 BSA 抗体抗原复合物的分子。

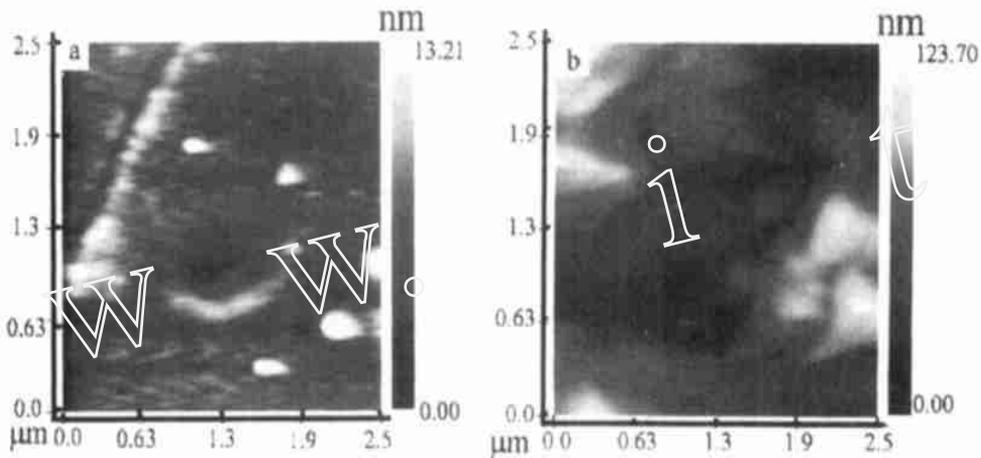


图 2 BSA 免疫反应过程的 AFM 图谱 a) 抗体电极;b) 免疫复合后

Fig. 2 AFM spectra of BSA immunoreaction a) antibody electrode, b) after immunoreaction

图 3 示出 SECI 抗原抗体结合过程的 AFM 图谱。作为比较,图 3a 是溶液中未加入蛋白质、在含有半胱氨酸和戊二醛的电极表面的 AFM 图谱,图像规则而均匀。与图 2 一样,从图 3b 和图 3c 中也很容易看到 SECI 抗体及其复合物分子,图 3c 中所出现的一些新的、大的亮点是由于 SECI 免疫反应的结果,其平均高度为 141 nm,远大于 SECI 抗体的 32 nm 的平均高度。由此,我们在表面定量分析中,设定抗体电极的表面高度为 32 nm,免疫复合物的表面高度为 80 nm(为避免聚合现象,不取 141 nm)。表面占有比率是指扫描区域内,电极表面所拥有的高于这一高度的面积百分比率。SECI 抗体抗原的免疫反应明显改变了电极表面的粗糙度和表面占有面积比例,AFM 定量分析结果如表 1 所示。

作为控制实验,图 3d 是 BSA 抗原与 SECI 抗体作用的结果。与图 3b 比较,其表面形貌并未发生显著变化,说明了 BSA 抗原和 SECI 抗体之间没有结合反应(相关数据见表 1)。同时由于测试的是免疫反应发生的情况,因此其表面高度也设定为 80 nm。按表 1 数据分析可知,表面粗糙度与单纯抗体电极接近,80 nm 以上分子占有率极低,由此可断定 BSA 与 SECI 均是特异性分子,只识别自身相应的抗原(抗体)。实验结果说明这一测试过程可以用于抗原特异性的探测。

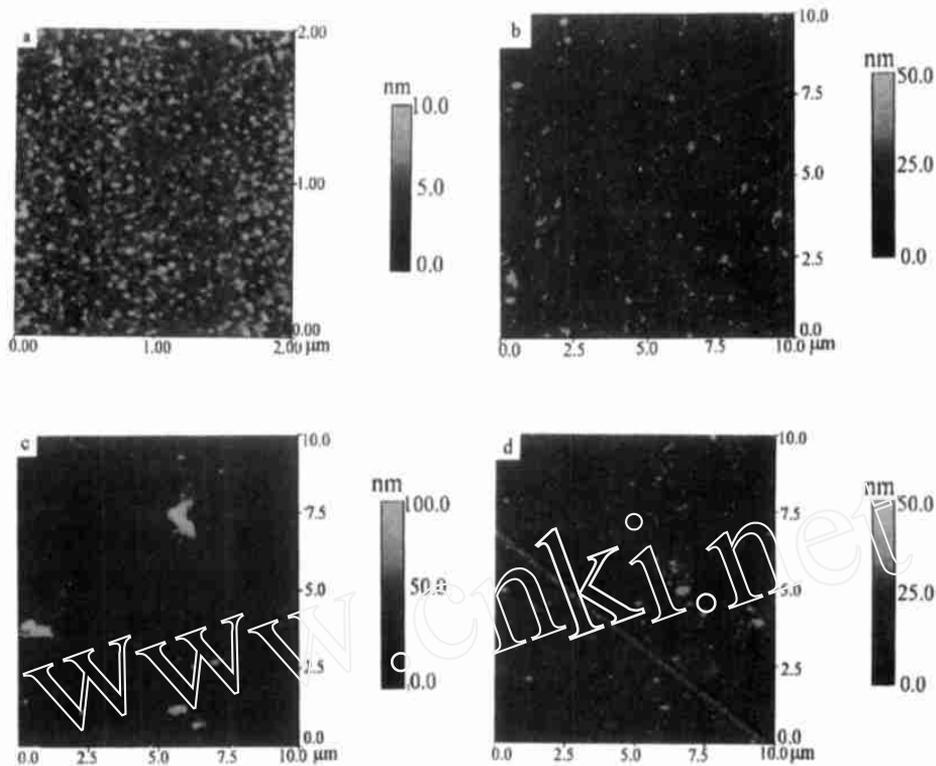


图 3 特异与非特异反应 a) 基底 ;b) SEC1 抗体 ;c) 免疫反应后 ;d) BSA 非特异性反应

Fig. 3 Specific and nonspecific reactions a) base ; b) SEC1antibody ; c) after immunoreaction ; d) after BSA nonspecific reaction

表 1 定量分析结果

Tab. 1 The quantity analysis of AFM

surface	surface roughness Rrms/ nm	bearing area ratio/ %
antibody	4.24	0.719
ab/ ag complex	18.58	0.517
bsa adsorption	4.02	0.012
low ag concentration	7.51	0.182
dissociated process	10.35	0.269
re-binding of ab/ ag	15.38	0.703

2.3 电极的探测极限和重现性

由于 AFM 也可用于免疫测试的定量分析 ,此处我们研究了抗体电极对 SEC1 抗原的探测

能力.在相同的抗体基底表面,分别滴加 $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SECI 抗原溶液,晾干后成像.目的是观测表面粗糙度和表面占有率随抗原浓度的变化情况.相应的 AFM 图谱分别如图 4a、4b 所示.该图谱于空气中用 Tapping 模式获得,扫描区域是 $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$.在图 4a 和图 4b 中复合物所设定高度均为 $80\ \text{nm}$.据图可知,随着 SECI 抗原浓度的提高,电极表面复合物的密度显示出增长趋势.表 1 数据说明,表面粗糙度和表面占有比例数值均随 SECI 抗原浓度的提高而进一步增大.由此证明,AFM 是一个有效和敏感的免疫分析手段.

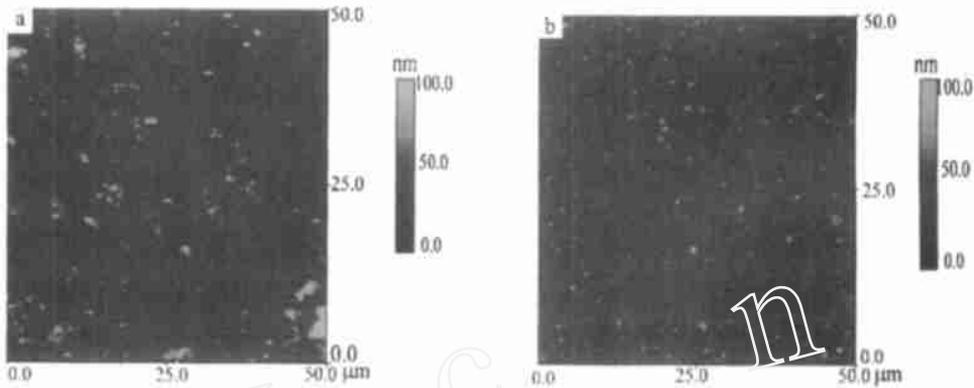


图 4 不同 SECI 抗原浓度的 AFM 图谱 a) $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ SECI; b) $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ SECI

Fig. 4 The AFM spectra of different concentrations SECI antigen

a) $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ SECI; b) $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ SECI

生物传感器的重现性对于临床应用是非常重要的.然而对每一次自组装过程,其电极表面的状况都是不同的,基底表面耦联蛋白质的数量也不同.图 5 显示了 SECI 抗原抗体复合物在基底表面被 ABG 解离的过程.图 5a 是免疫反应后的 AFM 图谱,图 5b 是使用解离剂后复合物数量降低的结果.其表面粗糙度和表面占有比例均小于图 5a.然而当解离后的基底再次与 SECI 抗原反应时,许多新的、大的亮点又出现了(图 5c).这些事实说明 ABG 有效地打破了抗原抗体复合对,将活性抗体分子留在电极表面,这些抗体可以再次与抗原结合.遗憾的是,ABG 不能打破所有的结合对,也不可避免地会少降低生物分子的活性,再结合的抗原抗体也不可能与原始复合物完全相同.这就是表 1 中数据的误差所在.若用尿素作解离剂也会出现相同的情况^[14],但这种偏差要远低于重新修饰抗体基底所带来的测试差异.

2.4 电化学测试

阻抗测试已被作为高度敏感的非标记电化学监测抗原抗体相互作用的直接方法^[15,16],电容免疫传感器是依据绝缘层的厚度和静电特性而给出电解电容的数值.电容值是通过交流阻抗谱(图 6)测定,它由一个半圆和一条直线构成,半圆直径代表了电荷转换电阻 R_{ct} ,总体测试电容 C_t 由相互连接的几个电容组成,可表述为: $1/C_t = 1/C_i + 1/C_{cys} + 1/C_{ab} + 1/C_{ag}$.其中 C_i , C_{cys} , C_{ab} , C_{ag} 分别是初始电容、半胱氨酸电容、抗体电容和抗原电容.图 6 中曲线 a 是交流阻抗的抗体基底,抗原与抗体的复合导致了电极对氧化还原探针绝缘性的提高,具体地讲就

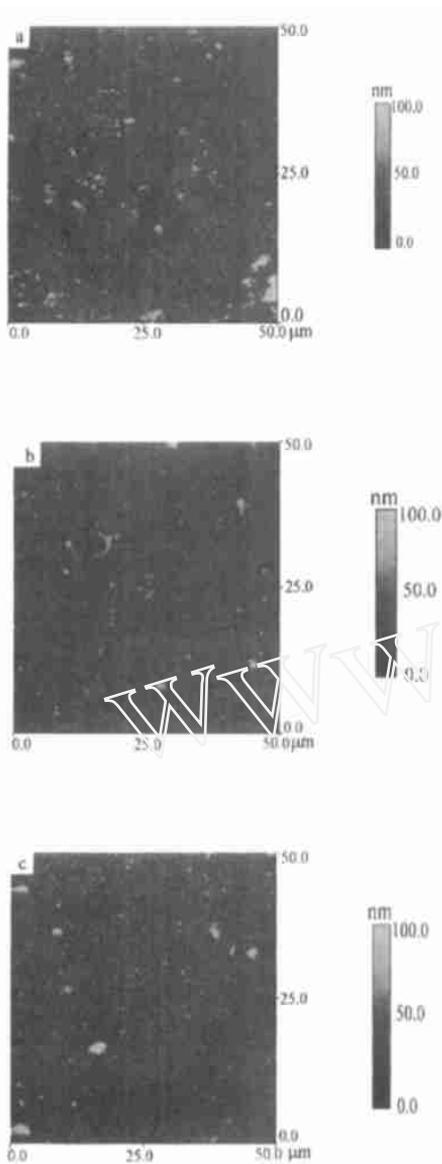


图 5 金电极上 SECI 复合物被 ABG 解离过程的 AFM 图谱 a) 免疫反应 ;b) 解离后 ;c) 再次免疫反应

Fig. 5 The AFM spectra of dissociated process a) after immunoreaction ; b) after dissociation ; c) the second immunoreaction

表 2 解离过程中的电容和电阻值

Tab. 2 The R_{ct} and C_t values during dissociated process

Electrode	R_{ct} /ohms	C_t /nF
antibody	130.88	80.51
ab/ag complex	140.65	51.50
dissociated process	131.37	78.24
re-binding of ab/ag	147.16	78.13
re-dissociation	129.27	109.70
ab/ag binding thirdly	136.77	101.32

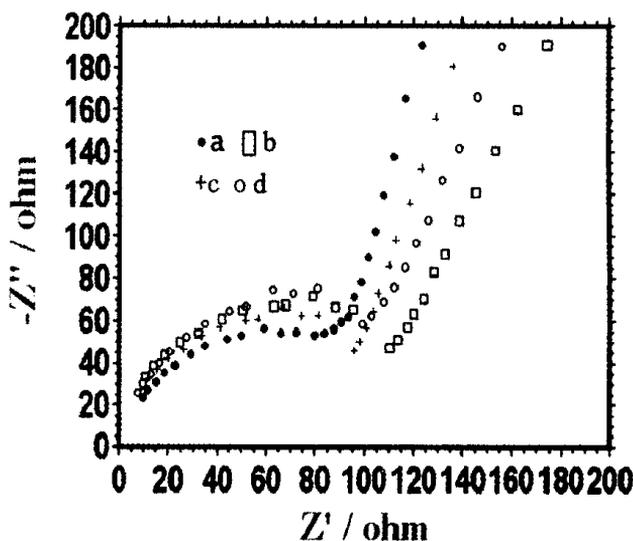


图 6 SECI 解离过程的电化学阻抗谱 a) 抗体电极 ;b) 免疫反应 ;c) 解离后 ;d) 再次复合

Fig. 6 The electrochemical impedance spectroscopy of dissociated process a) antibody electrode ; b) after immunoreaction ; c) after dissociation ; d) immuno-combination again

是 R_{ct} 增大和电极电容的降低(曲线 b). 解离过程引起了一个相反的变化, 也就是 ABG 的作用

使得 R_{ct} 降低和 C_t 值升高(曲线 c)。此外曲线 d 显示了解离后的抗体基底与 SEC1 抗原的重复反应, R_{ct} 和 C_t 的值又被恢复了。第 2 次重复解离过程时, 又获得了相同的曲线(图 6 未示出第 2 次解离曲线, 但对应的数据列于表 2), 说明 ABG 不仅打破了抗原抗体之间的结合, 而且也部分地损坏了抗体活性, 但损坏程度不大, 基底上的抗体仍然具备识别抗原的功能。表 2 示出与每一条曲线相应的 R_{ct} 和 C_t 数值, 免疫反应造成 29 nF 电容数值的降低, 酸性溶液解离后, 几乎获得了相同的抗体层, 所列电阻和电容数值都是 3 次实验的平均结果, 表 2 通过电容测试说明 ABG 的有效解离作用。

3 结 论

本文证明了 AFM 是一种迅速和方便的定性定量分析免疫反应的方法, AFM 可直接观测蛋白质形貌, 探讨 SEC1 抗原/ 抗体的免疫结合过程。AFM 有高度的敏感性。这一研究加强了我们对肠毒素 SEC1 这种生化战剂的理解。电化学测试简单有效地证明了 ABG 是一种优秀的解离试剂, 解离剂的使用将有助于提高生物电极的重现性, 从而使得生物传感器能够应用于临床诊断和环境监测。

Detection and Analysis of SEC1 Immunological Reaction by AFM and Electrochemical Method

DONG Sa-ying^{*}, WANG Hong-ren

(725 Research Institute Qingdao Branch, Qingdao 266071, China)

Abstract: The goals of this work were to demonstrate the ability of atomic force microscopy (AFM) to detect various immunological processes between antibodies and antigens. A sensor was designed by covalently linking the antibody of staphylococcal enterotoxin C1 (SEC1) on the self-assembled gold surface. This sensor permitted detection of antibody-antigen recognition events which were highly correlated with the topography under different conditions. The statistic data of AFM were analysed. As control experiments, nonspecific antigens and lower concentration SEC1 antigens were directly observed. In addition, an acidic solution was used to break the antigen-antibody pair and made the sensor reuse. Electrochemical evidence was provided to support the results obtained with AFM.

Key words: AFM, Self-assembled, Electrochemical method, Specific ability, Dissociation

References:

- [1] Chi Q, Zhang J, Dong S, et al. Direct observation of native and unfolded glucose oxidase structures by scan-

- ning tunneling microscopy[J]. J. Chem. Soc. Faraday. Trans. , 1994 ,90(14) : 2 057.
- [2] Cullen D C, Lowe C R. AFM studies of protein adsorption[J]. Journal of Colloid and Interface Science , 1994 , 166 :102.
- [3] Hinterdorfer P, Baumgartner W, Gruber H J ,et al. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy Proc. Natl. Acad. Sci USA , 1996 , 93 : 3 477.
- [4] Lee K S, Kim T H, Shin M C , et al. Disposable liposome immunosensor for theophylline combining an immunochromatographic membrane and a thick-film electrode[J]. Analytica Chimica Acta , 1999 , 380 : 17.
- [5] Chowdhury P B , Luckham P F. Probing recognition process between an antibody and an antigen using atomic force microscopy Colloids and Surfaces A[J]. Physicochem. Eng. Aspects , 1998 , 143 : 53.
- [6] Allen S, Davies J, Davies M C , et al. The influence of epitope availability on atomic-force microscope studies of antigen-antibody interactions[J]. Biochem.J. , 1999 , 341 : 173.
- [7] Willemssen O H, Snel M M E, Vander Werf K O ,et al. Simultaneous height and adhesion imaging of antibody-antigen interactions by atomic force microscopy[J]. Biophysical Journal , 1998 , 75 : 2 220.
- [8] Browning- Kelley M E, Wadu-Mesthrige K, Hari V , et al. Atomic force microscopic study of specific antigen/ antibody binding[J]. Langmuir , 1997 , 13 : 343.
- [9] Perrin A, Lanet V, Theretz A. Quantification of specific immunological reaction by atomic force microscopy [J]. Langmuir , 1997 , 13 :2 557.
- [10] Jones V W, Kenseth J R, Porter M D. Microminiaturized immunoassays using atomic force microscopy and compositionally patterned antigen arrays[J]. Anal. Chem. , 1998 , 70 : 1 233.
- [11] King K D, Anderson G P, Bullock K E, et al. Detecting staphylococcal enterotoxin B using an automated fiber optic biosensor[J]. Biosensor & Bioelectronics , 1999 , 14 : 163.
- [12] Yu H. Use of an immunomagnetic separation-fluorescent immunoassay (IMS-FIA) for rapid and high throughput analysis of environmental water samples[J]. Analytica Chimica Acta , 1998 , 376 : 77.
- [13] Kientz C E, Hulst A G, Wils E R J. Determination of staphylococcal enterotoxin B by on-line(micro) liquid chromatography-electrospray mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A , 1997 , 757 : 51.
- [14] Dong Sa-ying. Study on the electrochemistry and in situ FTIR reflection spectroscopy of enzyme immunoelectrode (in Chinese) [D]. Tianjin: Applied Chemistry Department of Tianjin University , 1994.
- [15] Liu M, Rechnitz G A. Capacitive immunosensing of polycyclic aromatic hydrocarbon and protein conjugates [J]. Analytical Letters , 1998 , 31(12) : 2 025.
- [16] Berggren C, Johansson G. Capacitance measurements of antibody-antigen interactions in a flow system[J]. Anal. Chem. , 1997 , 69 :3 651.