

应用于酶联免疫吸附测定的玻璃表面改性研究

宋亚婷^{1,2} 陈景东^{1,2*}

(1.太原理工大学新型传感器与智能控制教育部重点实验室,太原 030024;

2.太原理工大学物理与光电工程学院,太原 030024)

摘 要 酶联免疫吸附测定(ELISA)已被广泛用于临床检测、生物、食品检测和环境监测等许多领域,以玻璃为材料微流控 ELISA 芯片和二氧化硅包覆的磁珠均需要进行表面处理,以提高对待测分子的吸附能力。利用 3-氨丙基三甲氧基硅烷和戊二醛作为交联剂对玻璃表面进行了改性处理。ELISA 产物的颜色和紫外-可见分光光度计的结果均表明,改性后的玻璃对生物分子的吸附能力得到很大提升,并且解决了改性-恢复-再改性的问题。最后通过 X 射线光电子能谱分析了玻璃改性前后的表面化学元素的变化。

关键词 玻璃,表面改性,共价交联,酶联免疫吸附测定

Surface modification of glass for ELISA

Song Yating^{1,2} Chen Jingdong^{1,2}

(1.Key Lab of Advanced Transducers and Intelligent Control System, Ministry of Education and Shanxi Province, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024; 2.College of Physics and Optoelectron, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024)

Abstract Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been used widely in clinical diagnosis, biotechnology, food inspection and environmental monitoring. Surface modification of glass is crucial to improve the adsorption ability of the target analytes in ELISA micro-fluidic chip based on glass and magnetic beads covered silicon dioxide. The glass surface was modified by using 3-aminopropyltrimethoxysilane and glutaraldehyde as crosslinking agents. The color of ELISA products and the results of UV spectrophotometer showed that the adsorption ability of the modified glass to the analytes was improved greatly, and the problem of modification-recovery-remodification was solved. Finally, the surface functional groups before and after glass modification were analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy.

Key words glass, surface modification, cross link, ELISA

酶联免疫吸附测定(ELISA)是继免疫荧光和放射免疫技术之后发展起来的一种免疫酶技术,抗原-抗体结合的特异性和酶的高催化作用为其提供了高度的特异性和敏感性^[1-2]。此项技术因具有快速、敏感、简便、易于标准化等优点,已被广泛用于临床检测^[3]、生物^[4]、食品检测^[5]和生物监测^[6]等许多领域。

微流控技术能够以更快的速度、更高的灵敏度、更低的成本和更有效的方式应用于肿瘤等疾病的检测,为疾病的早期诊断提供更加有力的依据,已经展现出巨大的价值和应用潜力^[7]。微流控芯片充分体现了当今分析设备微型化、集成化和便携化的发展

趋势。微流控芯片的制备材料主要包括硅^[8]、玻璃^[9]和聚合物材料^[10-12]等。玻璃具有表面平滑、强度高、光学特性优良等特点,因而广泛应用于需要光学检测的 ELISA 芯片中。

利用玻璃 ELISA 芯片检测待测分子的过程中,玻璃内表面捕获待测分子的能力对检测的灵敏性和准确度有着非常重要的作用。通常情况下,玻璃对生物分子的吸附不强,导致捕获效率太低,因此需要对玻璃表面进行生物改性。具有强磁响应、良好的生物相容性、可稳定分散于水的免疫磁珠也逐渐应用到 ELISA 实验中^[13-14]。而二氧化硅是免疫磁珠包面包覆的一种常见材料。玻璃表面改性的方法通

基金项目:国家自然科学基金(61501317);山西省自然科学基金(201701D221113);山西省高校科技创新研究项目(2016141)

作者简介:宋亚婷(1993-),女,硕士研究生,主要研究方向为光微流激光。

联系人:陈景东,博士,副教授。

常有氧等离子体表面处理、紫外光表面处理和共价交联等方法。氧等离子体表面处理是利用等离子体表面处理机使惰性气体或含氧气体产生等离子体,对载体表面进行一定的物理化学改性。氧等离子体表面处理后的表面会随着放置时间的延长逐渐恢复到处理前的性质^[15],紫外光表面处理也同样存在着同样的问题^[16]。共价交联方法是利用交联剂分子中的一部分基团与载体表面的各种官能团反应,另一部分基团可与有机高聚物发生反应,从而将两种性质差异很大的物质结合起来^[17-19]。因此,ELISA 检测生物分子的实验中载体表面通常需要改性,而且还面临着多次恢复和多次再改性的问题。

本研究主要利用共价交联方法对玻璃表面进行改性处理,并解决了改性-恢复-再改性的问题,以达到芯片多次使用的目的,进而利用 ELISA 实验检测了改性的效果,最后利用 X 射线光电子能谱对玻璃的表面进行测试,分析了其表面价态的变化。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

无水乙醇、丙酮、甲醇和戊二醛均来自上海国药公司;3-氨丙基三甲氧基硅烷,上海阿拉丁公司;浓盐酸,日本 TCI 公司;氢氟酸(HF),日本 TCI 公司;人白细胞介素 6(IL-6)酶联免疫分析试剂盒,江苏酶标生物科技有限公司。

数控超声波清洗器(KQ-100DA 型),昆山舒美;紫外分光光度计(UV-2600),日本岛津株式会社;X 射线光电子能谱仪(XPS, AXIS UltraDLD),日本岛津 Kratos 公司。

1.2 玻璃表面改性

玻璃表面改性采用 3-氨丙基三甲氧基硅烷和戊二醛作为交联剂,其基本步骤如下:依次用适量丙酮、酒精、去离子水分别洗涤玻璃 10min;再将玻璃放入 3-氨丙基三甲氧基硅烷甲醇溶液(5%)中浸泡 30min,之后用酒精冲洗 3 次;然后放入戊二醛水溶液(1%)中浸泡 20min,之后用去离子水冲洗 3 次,即得到表面改性玻璃。

1.3 ELISA 对改性效果的检测

利用离心管完成 ELISA 实验:取 5 支相同的离心管用去离子水清洗后,取其中一支作空白对照(记为 G1),第二支放入未改性的玻璃(记为 G2),第三支放入改性玻璃(记为 G3),按照 ELISA 试剂盒说明书的步骤进行 ELISA 实验;ELISA 实验完成后,将第三支离心管中的玻璃取出后放入第四支离心管

中,加入稀释的 HF(1%)刻蚀 5min,再利用去离子水洗涤 3 次(记为 G4),然后按照 ELISA 的步骤进行 ELISA 实验;第四支离心管中的玻璃完成 ELISA 实验后,将玻璃取出利用去离子水洗涤 3 次,再利用上述玻璃表面改性的方法对玻璃再次进行表面改性处理(记为 G5),然后放入第五支离心管再次进行 ELISA 实验。

为了进行定量分析,将 5 支离心管中的 ELISA 后的产物溶液利用紫外分光光度计进行吸收值测试。

1.4 XPS 检测

为了研究玻璃改性前后表面的变化,玻璃表面进行了 XPS 测试^[20-21]。

2 结果与讨论

ELISA 实验完成后的溶液呈黄色,可以根据溶液黄色深浅来判断 ELISA 产物的浓度,进而判断固相载体吸附 IL-6 分子的数量。实验中发现,G1 和 G2 经 ELISA 实验得到的溶液均略显黄色,且两者的差别不大。这表明空管对生物分子 IL-6 有一定的吸附作用;未改性处理的玻璃对 IL-6 的吸附作用不明显。G3 经 ELISA 实验得到的溶液的黄色深度明显高于未改性玻璃(G2),这表明改性玻璃捕获了更多的 IL-6,具有很好的捕获 IL-6 的能力。G4 经 ELISA 实验得到的溶液基本上没有黄颜色的出现,这表明经过 HF 酸处理后,改性玻璃基本恢复到未表面处理的初始状态,这就排除了对下一步实验的干扰;通过对比未改性玻璃和 HF 酸处理后的改性玻璃实验结果发现,HF 酸处理不仅消除了玻璃表面对 IL-6 的吸附作用,而且也基本消除了离心管表面对 IL-6 的吸附作用。将 HF 酸处理并进行 ELISA 实验后的玻璃片重新改性后(G5),再次进行 ELISA 实验又一次得到了明显的黄颜色溶液,这表明经过表面处理的玻璃再次具备了捕获了 IL-6 的能力。

综上所述,ELISA 实验后的溶液黄颜色深浅的结果表明,玻璃经改性后能够增强对 IL-6 的捕获能力;经 HF 酸处理后就失去了吸附 IL-6 分子的能力,恢复到原来的初始状态;但经再次改性后又获得了吸附 IL-6 的能力。因此,玻璃芯片具备多次使用的能力。

通过紫外分光光度计测试各组溶液的吸收度,对其吸收的 IL-6 分子数量进行了分析,5 支离心管中溶液的吸收度如图 1 所示。由图可见,空管中放

入未交联处理的玻璃的吸收度为 0.155, 其中空管 (G1) 的吸收度为 0.133, 这就表明未表面处理的玻璃的吸收度为 0.022, 对 IL-6 分子有一定的吸附能力。空管中放入表面处理的玻璃 (G3) 的吸收度达到 0.425, 其中表面处理的玻璃的吸收度为 0.292, 约是未表面处理的玻璃的吸收度的 13 倍, 这表明玻璃经表面处理后吸附 IL-6 分子的能力得到很大提升。空管和玻璃经过 HF 处理后 (G4) 得到 ELISA 产物的吸收度为 0.096, 这说明空管和玻璃经 HF 处理后 (G4) 对 IL-6 分子的吸附能力大为降低, 这使得玻璃又基本回复到原来的初始状态。再次进行表面改性的玻璃放入空管后 (G5) 的 ELISA 产物的吸收度为 0.418, 和空管中放入第一次表面处理的玻璃的吸收度基本一致, 这就说明 HF 处理后的玻璃经又一次表面处理再次获得了对 IL-6 分子的吸附能力, 同时也表明 HF 处理对玻璃再次表面处理的影响很小。

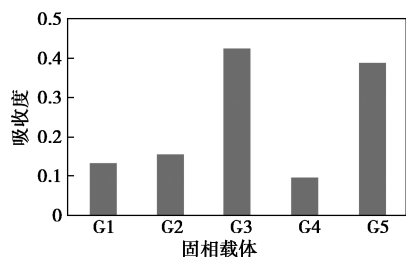


图 1 不同固相载体的 ELISA 产物吸收度

硅烷偶联剂能够增加玻璃的表面基团^[22], 玻璃表面改性前后 XPS 测试的结果如图 2 所示。由图可见, 与未改性的玻璃相比, 改性后的玻璃 N 元素和 C 元素明显增加, 其中 N 元素来至于 3-氨丙基三甲氧基硅烷, 位于 399.1eV 的 N 1s, 说明玻璃表面上交联了—NH₂; 位于 286.8eV 的 C 1s 和位于 531.6eV 的 O 1s 说明玻璃表面上交联了—CHO, 其变化过程如图 3 所示。正是由于改性后玻璃表面化学基团的变化, 导致了其吸附分子的能力明显提高。

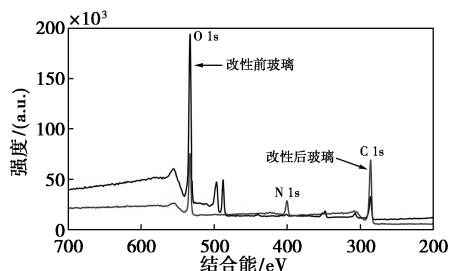


图 2 玻璃改性前后的 XPS 测试

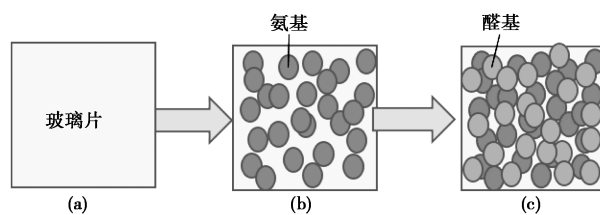


图 3 玻璃改性过程中化学成分的变化示意图

[(a) 未表面处理; (b) 3-氨丙基三甲氧基硅烷甲醇溶液处理; (c) 戊二醛水溶液处理]

3 结论

为了提高 ELISA 实验中玻璃载体对待测分子的吸附能力, 利用 3-氨丙基三甲氧基硅烷和戊二醛作为交联剂对玻璃表面进行了改性处理, ELISA 产物的颜色和紫外分光光度计的吸收度均显示: 改性后的玻璃对 IL-6 分子的吸附能力明显提高。这主要是因为表面处理使得玻璃表面交联了—NH₂ 和—CHO。本方法还使玻璃芯片具备了重复使用的能力。

参考文献

- [1] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G[J]. *Immunochemistry*, 1971, 8: 871-874.
- [2] Cheng C M, Martinez A W, Gong J, et al. Paper-based ELISA [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49: 4771-4774.
- [3] Bystryak S, Acharya C. Detection of HIV-1 p24 antigen in patients with varying degrees of viremia using an ELISA with a photochemical signal amplification system[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2016, 456: 128-136.
- [4] M Freitas W, Correr J, Cancino-Bernardi, et al. Impedimetric immunosensors for the detection of Cry1Ab protein from genetically modified maize seeds[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 237: 702-709.
- [5] 曹冬梅, 许杨, 涂迫, 等. 基于纳米抗体-碱性磷酸酶融合蛋白的一步酶联免疫吸附分析法检测黄曲霉毒素 B1[J]. *分析化学*, 2016, (7): 1085-1091.
- [6] Baldofski S, Hoffmann H, Lehmann A, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the anthropogenic marker isothiocholic acid in water[J]. *Journal of Environmental Management*, 2016, 182: 612-619.
- [7] 容晓晖, 顾长志, 刘雳宇. 微流体芯片中的癌症生物物理研究[J]. *物理*, 2014, 43(4): 220-226.
- [8] Van Lint Van Lintel H T G, Van de Pol F C M, Bouwstra S. A piezoelectric micropump based on micromachining of silicon [J]. *Sensors and Actuators*, 1988, 15: 153-167.

(下转第 215 页)