

用于丙型肝炎病毒抗原测定的 SiO₂ 载体的制备及其性质分析

谢立¹, 官月平², 戈莹², 时洪波¹

1 首都医科大学附属北京佑安医院, 北京 100069

2 北京科技大学, 北京 100083

摘要: 为了优化将抗体偶联在二氧化硅试管表面上以便进行丙型肝炎抗原检测的分析系统, 本研究通过氨基硅烷的活化作用, 在玻璃表面形成活化的氨基, 以戊二醛作为化学交联试剂, 在已硅化的玻璃表面固定丙肝单克隆抗体, 并进行丙肝抗原 (HCAg) 的测定。结果显示, 通过条件优化实验, 发现以 10% (V/V) 的氨基硅烷水溶液处理玻璃试管 3 h 后, 再用 3% (V/V) 的戊二醛水溶液交联丙肝单克隆抗体 2 h, 可以得到固定效果较好, 非特异性较低的玻璃载体, 对 HCAg 可测至 1 μg/L。可见, 用该方法制备的玻璃载体可为进一步建立新的 HCAg 磁性免疫检测系统提供理论和实验依据。

关键词: 丙肝病毒抗原, 丙肝单克隆抗体, 共价交联, 氨基硅烷, 戊二醛, SiO₂ 载体

Preparation and properties of SiO₂ tubes immobilized antibody for HCAg detection

Li Xie¹, Yueping Guan², Ying Ge², and Hongbo Shi¹

1 Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

2 University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

Abstract: In order to optimize the fabrication of SiO₂ tubes immobilized with antibody for hepatitis C virus antigen (HCAg) detection, we formed the activated amino on the surface of SiO₂ tubes by using the activation of aminosilane. Then we immobilized the hepatitis C virus (HCV) monoclonal antibody on the surface of SiO₂ tubes by using glutaraldehyde as a chemical cross-linker, followed by detecting HCAg. Sequence tests showed that when the SiO₂ tubes were treated in 10% (V/V) aminosilane solution and 3% (V/V) glutaraldehyde solution for 3 hours and 2 hours, respectively, the HCV monoclonal antibody had high immobilization efficiency and low nonspecificity, and the HCAg was detected to 1 ng/mL. This experiment can provide principle and experimental data for establishment of HCAg magnetic immunoassay system.

Keywords: hepatitis C virus antigen, HCV monoclonal antibody, covalent immobilization, aminosilane, glutaraldehyde, SiO₂ tubes

Received: November 30, 2009; **Accepted:** February 24, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA03Z315), Capital Medical Developing Scientific and Research Fund (No. 2007-3080).

Corresponding author: Li Xie. Tel: +86-10-83997427; Fax: +86-10-63053484; E-mail: XL811CN@163.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA03Z315), 首都医学发展科研基金 (No. 2007-3080) 资助。

丙型肝炎病毒抗原 (HCAg) 是丙型肝炎病毒 (HCV) 早期感染的特异性抗原, 是诊断 HCV 早期感染的有效指标^[1]。目前国内还没有 HCAg 的临床检测试剂^[2]。在前期的研究工作中已用酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 对 HCAg 进行了初步检测^[3], 在该方法中丙肝抗体 (抗-HCV) 通过简单的物理吸附固定在聚苯乙烯酶标板上。有人认为聚苯乙烯酶标板吸附抗原的效果优于吸附抗体的效果; 经过 ELISA 实验过程中多次洗涤, 聚苯乙烯酶标板吸附的蛋白质不断解吸附而使其浓度愈来愈低; 而且适用于某种抗原-抗体系统的聚苯乙烯酶标板, 对另一抗原-抗体系统未必是最合适的^[4]。

为此, 本研究室正在进一步研究建立新的 HCAg 磁性免疫检测系统, 而固相载体的选择和修饰方法是建立这种新的检测系统的基础。本研究旨在探讨玻璃载体表面修饰方法对抗-HCV 偶联效率和免疫活性的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

纯化 HCV 基因工程表达 NS3 抗原 (HCAg-NS3) (原中国预防医学科学院病毒学研究所), 戊二醛、硼氢化钠 NaBH_4 、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗小鼠 IgG (Sigma 公司), 牛血清白蛋白 BSA (Roche 公司), HRP 标记丙肝 NS3 单克隆抗体 (McAb) (本研究室), 其余试剂 (国产, 分析纯), 酶标仪 Model 680 (BIO-RAD 公司), 紫外分光光度计 UV-2550 (日本岛津)。

1.2 抗-HCV McAb 的制备

按常规方法制备抗-HCV McAb^[5], 用饱和硫酸铵法进行纯化。

1.2.1 SiO_2 载体的硅烷化

市售普通玻璃试管用铬酸洗液浸泡过夜, Milli-Q 水清洗, 加入氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 水溶液 (pH 5~6), 80°C 振荡反应, 水清洗后再用无水乙醇清洗。

1.2.2 SiO_2 载体的醛基化

在已硅烷化的玻璃试管中加入 3% (V/V) 的戊二醛水溶液, 室温振荡反应, 用水清洗。

1.2.3 SiO_2 载体与抗-HCV McAb 的偶联

在已醛基化的玻璃试管中加入不同浓度的抗-HCV McAb 溶液, 37°C 振荡反应 2 h, 水洗 4~5 次后, 加入浓度为 2 g/L 的 BSA 封闭液, 4°C 反应过夜, 用水清洗。

1.2.4 抗-HCV McAb 偶联效率的吸光度测定

以稀释抗-HCV McAb 的缓冲液 1×PBS 为空白, 在 280 nm 波长处分别测定抗-HCV McAb 与玻璃偶联前、后的吸光度值 OD 值。

1.2.5 抗-HCV McAb 偶联效率的免疫测定

在已偶联抗-HCV McAb 的玻璃试管中加入工作浓度的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG, 37°C 反应 30 min, 0.02 mol/L PBST 洗 4~5 次, TMB 底物显色, 以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 在 450 nm 波长处测定吸光度值。以未偶联抗-HCV McAb 的玻璃试管为阴性对照。

1.2.6 HCAg 的测定

在已偶联抗-HCV McAb 的玻璃试管中加入不同浓度的 HCAg, 以 10% BSA 溶液为阴性对照, 37°C 反应 1 h, 0.02 mol/L PBST 充分洗涤后, 加入工作浓度为 1:2000 的 HRP 标记抗-HCV McAb, 37°C 反应 30 min, 0.02 mol/L PBST 洗 4~5 次, TMB 底物显色, 以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 在 450 nm 波长处测定吸光度值。加入 HCAg 试管的 OD 值与阴性对照管 OD 值之比大于等于 2.1 时判定为阳性反应。

1.2.7 统计学方法

全部数据均经 SPSS13.0 统计软件分析, 差异的显著性用多元回归分析的 *F* 检验和相关系数的显著性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

用于偶联玻璃试管的抗-HCV McAb 纯化后蛋白浓度为 9.66 g/L, 间接 ELISA 法测定效价为 1:30 万。

2.1 SiO_2 载体制备方法对抗-HCV McAb 偶联效率的影响

玻璃醛基化及蛋白质固定过程包括表面氨基化、醛基化、蛋白质的偶联及还原等步骤 (图 1), 本研究主要讨论醛基化的优化过程。

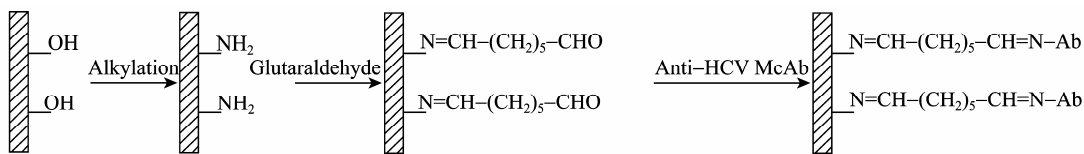


图 1 抗-HCV McAb 固定到玻璃上的化学过程

Fig. 1 Chemical process of anti-HCV McAb immobilized onto glass.

2.2 氨基硅烷浓度和反应时间的影响

抗-HCV McAb 的偶联效率受氨基硅烷的浓度和反应时间双因素影响，多元回归分析得到 $F=34.92, P<0.05$ ，故总体上认为氨基硅烷的浓度和反应时间对抗-HCV McAb 的偶联效率有统计学意义。从表中可以看出，10% (V/V) 氨基硅烷水溶液处理 3 h 有最佳的效果 (表 1)。

2.3 醛基化时间的选择

用不同醛基化时间处理的玻璃试管进行抗-HCV McAb 偶联效率的免疫测定，结果显示差异有统计学意义 ($r=0.912, P<0.01$)，醛基化时间为 2~3 h，抗-HCV McAb 有较高的偶联效率 (图 2)。

2.4 不同浓度抗-HCV McAb 的偶联效率测定

表 2 数据显示，差异有统计学意义 ($r=0.945, P<0.01$)，抗-HCV McAb 浓度增加，偶联效率提高，在后续研究实验中，选择抗-HCV McAb 浓度为 8 mg/L 作为与玻璃偶联的浓度。

2.5 抗-HCV McAb 不同偶联时间的偶联效率测定

从表 3 可知，差异的统计学意义不明显 ($r=0.676, P>0.05$)，在抗-HCV McAb 浓度为 8 mg/L 时，随着抗-HCV McAb 偶联时间增加，偶联效率提高不明显，所以选择 3 h 为抗-HCV McAb 的最佳偶联时间。

表 1 氨基硅烷浓度和反应时间对抗-HCV McAb 偶联量的影响

Table 1 Effect of aminosilane concentration and treatment time on anti-HCV McAb assay

Amino silane (%)	OD values in different treatment time							
	1 h		2 h		3 h		4 h	
	HCV McAb	-	HCV McAb	-	HCV McAb	-	HCV McAb	-
5	0.330	0.101	0.540	0.101	0.750	0.123	0.805	0.103
10	0.370	0.051	0.580	0.093	1.021	0.107	1.035	0.133
15	0.457	0.135	0.589	0.180	1.100	0.221	1.136	0.310

Note: the concentration of HCV McAb in the table was 10 mg/L, as described previously^[3].

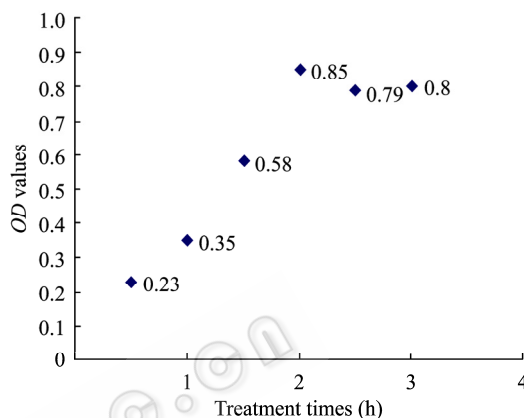


图 2 醛基化时间对抗-HCV McAb 偶联效率的影响

Fig. 2 Anti-HCV McAb immobilization efficiency with different glutaraldehyde treatment time. The concentration of HCV McAb in the fig was 10 mg/L, as described previously^[3]. The immobilization time in the fig was overnight, as described previously^[3].

表 2 抗-HCV McAb 浓度对偶联效率的影响

Table 2 Effect of anti-HCV McAb concentration on immobilization efficiency

Anti-HCV McAb (mg/L)	Rate of immobilization (%)
2	16.8
4	17.1
6	20.3
8	27.9
10	28.5

Rate of immobilization(%)=(Before immobilization(Concentration)–After immobilization (Concentration))/Before immobilization (Concentration) × 100%

表 3 抗-HCV McAb 偶联时间对偶联效率的影响

Table 3 Effect of immobilization time on immobilization efficiency

Immobilization time (h)	Rate of immobilization (%)
1	18.35
2	27.30
3	32.00
16	34.10

2.6 HCAg 的测定

在 HCAg 测定实验中, HRP 标记的抗-HCV McAb 与玻璃试管上偶联的抗-HCV McAb 分别识别不同的 HCAg 抗原表位, 形成有效的夹心模式检测 HCAg, 测定结果显示可检测 HCAg 至 1 $\mu\text{g/L}$ 。

3 讨论

固相载体的质量直接关系到检测结果, 有多种不同的方法用于抗体在固相载体表面的固定^[6]。目前, 大多数用于临床诊断的生物标志物的检测方法主要为酶免疫测定、放射免疫测定、荧光免疫分析等, 在这些传统方法中, 蛋白质通过疏水性物理作用微弱地吸附于固相表面, 固定得不牢固, 且容易影响蛋白质的结构和活性。

在蛋白质固定过程中, 固相支持物的选择和处理是很重要的一步, 它不但要对蛋白质有较高的固定能力, 而且还要保证固定在其表面的蛋白质保持活性^[7]。玻璃具有廉价、表面光滑不渗透、背景低等优点, 目前大多数蛋白芯片均以此作为固相载体^[8], 通过化学交联法制得的固相蛋白质吸附容量大, 蛋白质分子之间相互制约, 吸附牢固, 能够耐受多次洗涤, 具有较高的反应活性^[9]。本研究实验中使用的化学交联剂是戊二醛, 它是目前最常用的同型双官能团化合物, 其两端的醛基可与硅烷化的玻璃和蛋白质的游离氨基形成 Schiff 碱, 从而完成蛋白质在玻璃表面的固定。但是戊二醛本身能使蛋白质中毒, 所以根据费嘉等^[10]的报道选择 3% (V/V) 的戊二醛水溶液进行反应。

Kusnezow 等^[11]通过对丙基三甲氧基硅烷和多聚赖氨酸等修饰的玻璃片进行比较, 结果显示前者最好, 但是在玻璃硅烷化过程中发现, 氨基硅烷的浓度和反应时间对非特异反应有较大影响, 可能是高浓度的氨基硅烷较长时间反应后吸附或固定到玻璃表面上所致。

为了减少测定过程中的非特异性结合, 蛋白质固定后还应进行封闭, 一般选用末端具有一个或多个羧基的封闭剂, 在本研究实验中选用浓度为 2% 的 BSA 有较好的封闭效果。

总之, 本研究中用于在玻璃上固定抗体的反应条件温和, 可在 4 $^{\circ}\text{C}$ ~40 $^{\circ}\text{C}$ 及 pH 6.0~8.0 内进行, 操作简单, 价格便宜; 由于本研究应用化学交联剂固定抗体, 即抗体以共价键方式固定在载体表面, 而前期研究工作中用 ELISA 方法测定 HCAg 时, 抗体以物理吸附方式固定在载体表面, 所以前者有较大的固相蛋白参与后续反应, 因而对 HCAg 检测有更高的灵敏度 (ELISA 法的灵敏度大于 2 $\mu\text{g/L}$), 为进一步用超顺磁性纳米微球进行高灵敏度、高特异性的 HCV 患者血清中痕量 HCAg 检测提供了理论和实验依据。

REFERENCES

- [1] Laperche S, Le Marrec N, Simon N, *et al.* A new HCV core antigen assay based on disassociation of immune complexes: an alternative to molecular biology in the diagnosis of early HCV infection. *Transfusion*, 2003, **43**(7): 958-962.
- [2] Zheng HJ. The prospect on the technique of test for blood donor infected with hepatitis C virus during the infectious window period. *Chin J Hepatol*, 2002, **14**(2): 159-160.
郑怀竟. 献血者丙型肝炎病毒“窗口期”感染的筛查技术展望. *中华肝脏病杂志*, 2002, **14**(2): 159-160.
- [3] Xie L, Huang DZ, Chen HL, *et al.* The clinical application and analysis of hepatitis C virus NS3 antigen detection by ELISA in human serum. *Chin J Microbiol Immunol*, 2009, **29**(1): 88-92.
谢立, 黄德庄, 陈海伦, 等. 血清中丙型肝炎 NS3 抗原 ELISA 检测方法的建立和初步应用. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2009, **29**(1): 88-92.
- [4] Jiang CG, Tao YX. *Enzyme Immunoassay*. Beijing: People's Medical Publishing House, 1984: 103-108.
蒋成淦编著, 陶义训审阅. 酶免疫测定法. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 103-108.
- [5] Xie L, Chen WR, Zhang MC, *et al.* Establishment and identification of monoclonal antibody of hepatitis C virus. *Tianjin Medical J*, 2005, **33**(8): 492-494.
谢立, 陈万荣, 张明程, 等. 丙型肝炎病毒单克隆抗体的制备及其鉴定. *天津医药*, 2005, **33**(8): 492-494.
- [6] Guillaume B, Bunes A, Schmidt C, *et al.* Systematic comparison of surface coatings for protein microarrays. *Proteomics*, 2005, **5**(18): 4705-4712.

[7] Panicker RC, Huang X, Yao SQ. Recent advances in peptide-based microarray technologies. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2004, 7(6): 547-556.

[8] Kusnezow W, Hoheisel JD. Solid supports for microarray immunoassays. *J Mol Recognit*, 2003, 16(4): 165-176.

[9] Wilson DS, Nock S. Functional protein microarrays. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 6(1): 81-85.

[10] Fei J, Ma WL, Wu QH, *et al.* Comparison of two different surface modifications for the preparation of prote in microarray. *Life Sci Res*, 2005, 9(4): 341-345.

费嘉, 马文丽, 吴清华, 等. 介质表面修饰对蛋白质芯片固定率和反应性的影响. *生命科学研究*, 2005, 9(4): 341-345.

[11] Kusnezow W, Jacob A, Walijew A, *et al.* Antibody microarrays: an evaluation of production parameters. *Proteomics*, 2003, 3(3): 254-264.

2010 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	第三届生物资源与环境调控学术研讨会	中国微生物学会农业微生物专业委员会	5~6 月	120	安徽合肥	李峰 010-82109561
2	曲霉和曲霉病研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	5 月 15~16 日	150	天津	刘伟 010-83573056
3	第八届中日病毒学会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	7 月 4~7 日	100	黑龙江哈尔滨	张凤民 0451-86669576 钟照华 0451-86685122
4	第八届全国微生物学青年学者学术研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会	7 月 21~24 日	150	云南昆明	李文均 0871-5033335
5	第三届全国农业微生物研究及产业化研讨会	中国微生物学会农业专业委员会	8 月	120	新疆阿拉尔	张利莉 agmicrob@mail.hzau.edu.cn
6	第二届微生物资源学术研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	8 月	150	黑龙江大庆	阮志勇 13301101231
7	第十一届全国土壤微生物学术讨论会暨第四届全国微生物肥料生产技术研讨会	中国微生物学会农业微生物专业委员会	9~10 月	150	湖南长沙	李俊 010-68975891
8	合成生物学学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	9~10 月	80	上海	朱春宝 021-62896804
9	2010 年全国微生物毒素与创伤感染学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	9 月 17~20 日	250	重庆	梁华平 023-68757404
10	第 11 届中日韩国际酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	10 月	150	四川成都	金城 010-64807425
11	病原进化与致病机制国际研讨会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	10 月 22~25 日	150	江苏镇江	倪斌
12	第十三次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	10 月	500	江苏南京	蒋建东 025-84395326
13	2010 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	10 月	500	安徽	王旭 010-64807200
14	首届全国芽胞杆菌研究及产业化研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	10 月	140	湖北武汉	翁锦周 bacillus@mail.hzau.edu.cn
15	第三届全国微生物基因组学学术研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	11 月	150	福建厦门	邵宗泽 micgeno@mail.hzau.edu.cn
16	第一届中国临床微生物学大会	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	11 月	500	贵州遵义	李宣霖 13976609892