

# 压电免疫传感器检测牛奶中 C 型葡萄球菌肠毒素的初探

高志贤<sup>1</sup> 陶桂全<sup>1</sup> 张超<sup>2</sup> 冯冠平<sup>2</sup> 黎高翔<sup>3</sup>

葡萄球菌肠毒素 (staphylococcus enterotoxin, 简称 SE) 是引起食物中毒的主要原因之一, 最容易受污染的食品是肉色拉和奶制品。对于 SE 的检测, 目前大多数实验室依靠血清学方法诊断, 用压电免疫传感器检测食品中的 SE, 国内外未见文献报道。

压电免疫传感器是把一种高灵敏度的压电质量传感与特异的免疫反应结合在一起的新型的免疫分析方法, 这一方法不需要任何免疫标记和分离步骤, 且仪器简单、操作方便, 成为生物传感器领域研究的热点之一。

本实验就压电免疫传感器的研制及其检测牛奶中葡萄球菌肠毒素作一介绍。

## 1 原理

压电理论是由 Curies 于 1880 年提出的, 1959 年 Sauerbrey<sup>[1]</sup> 提出质量和频率的平恒方程:

$$\Delta F = -KF^2 \Delta M A$$

式中:  $\Delta F$ —晶体吸附外来物质后振动频率的变化

(Hz)

K—为常数

A—被吸附物所覆盖的面积

F—压电晶体的基本频率 (由晶体性质和切割方向所决定, 单位: MHz)

$\Delta M$ —为被吸附物质的质量

由方程得知,  $\Delta F$  与  $\Delta M$  之间成负相关关系。设法让晶体选择性地吸附外源性物质, 能制成压电传感器。据此原理, 先将生物分子识别系统物质—抗原或抗体均匀地涂在晶体表面, 得到一个基础的频率  $F_1$ , 然后将涂布有分子识别物质的晶体放到被测的气体或液体中, 使其与被测物质发生反应形成复合物, 对吸附了

被测物质后的压电晶体再进行振动频率测定, 得到另一频率变化  $F_2$ , 从它们之间的变化  $\Delta F = F_2 - F_1$ , 可得到被测物质的量。这就是压电免疫生物传感器设计的原理。

## 2 材料与方法

### 试剂

戊二醛 天津天泰精细化学品有限公司分装。

聚乙烯亚胺 Aldrich 公司产品

$\gamma$ -氨基丙基三乙氧基甲硅烷 Aldrich 公司产品。

甘氨酸 Sigma 公司产品。

蛋白 A Sigma 公司产品。

C 型葡萄球菌肠毒素及其抗体 解放军军事医学科学院提供。

肉毒毒素 A 解放军军事医学科学院提供。

### 仪器

压电石英晶体的传感元件 AT 方向切割, 3.58MHz 被覆金电极, 电极直径为 5.5mm、10MHz 被覆金电极, 电极直径为 8.5mm, 北京压电晶体研究所

频率计 (GFC-8010)

扫描电镜 (CS-930)

### 方法

固化方法研究 蛋白质在晶体电极上的固化有物理和化学方法, 其中以化学方法固化效果较好。用以下几种固化方法进行比较, 选出最适宜的化学固化方法。

聚乙烯亚胺 (PEI) 固化法<sup>[2]</sup> 室温下, 用含有 4% (V/V) 聚乙烯亚胺 (PEI) 甲醇液 5mL 涂在晶体的电极上, 干燥后用甲醇冲洗晶体, 然后浸入浓度为 0.4mol/L 戊二醛 (pH7) 溶液中 30min, 然后用 5 $\mu$ L 5mg/mL 抗体液涂在晶体的两侧, 未发生反应的水合醛类用 0.5mol/L 的甘氨酸 (在 20mmol/L PBS 中, pH7) 封闭, 随后用 PBS 和蒸馏水冲洗, 空气中干燥。

1 军事医学科学院卫生学环境医学研究所 (300050)

2 清华大学精密仪器系 (100084)

3 中国科学院微生物研究所 (100080)

硅烷 (APTES) 固化法<sup>[7]</sup> 把晶体浸入 35mmol/L 的  $\gamma$ -氨丙基三乙氧基甲硅烷 (APTES) 的丙酮溶液中 1h, 在 70°C 条件下真空干燥, 用丙酮洗几次, 在 0.6mol/L 的戊二醛 (pH7) 中孵育 1h, 然后用蒸馏水洗, 再用 5 $\mu$ L 5mg/mL 抗体液涂在晶体的两侧, 干燥 30~45min, 晶体用 PBS 和蒸馏水冲洗之后, 空气干燥。

蛋白 A—金固化法<sup>[7]</sup> PZ 晶体浸入 1.2mol/L NaOH 中 30~45min, 然后用蒸馏水冲洗并放入 1.2mol/L HCL 10~20min, 接着用蒸馏水和乙醇冲洗, 干燥, 晶体用蒸馏水洗, 5 $\mu$ L 的蛋白 A 溶液 (2mg/mL, pH 7), 涂在晶体电极的两侧, 干燥之后, 5 $\mu$ L 5mg/mL 抗体液涂在晶体的两侧, 干燥, 用 PBS 和蒸馏水洗, 然后干燥。

#### 传感器的制作

把固化好的石英晶体片, 联接设计好的 3~10MHz 振荡电路 (图略), 用计频器测定频率即可测定抗原。

#### 测定

将未处理的晶体片连接在振荡电路, 将待测的晶体首先放入 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的干燥瓶中干燥, 待频率恒定后测量, 用此法依次测定。测得的始频 F<sub>0</sub>, 包被抗体后的石英晶体在频率计上测出振荡的频率为 F<sub>1</sub>, 然后在室温下将包被的抗体的石英晶体浸入含有 2mL 葡萄球菌肠毒素 (PBS pH 7) 中搅拌 30min, 然后用 PBS 和蒸馏水冲洗后并干燥, 然后测定的频率为 F<sub>2</sub>。

### 3 结果与讨论

3.1 为了研究固化蛋白的合适浓度, 选用 SE 抗体作试样进行试验, 配制不同浓度的 SE 抗体, 用上述蛋白 A 金固化法固定石英晶体电极上, 从石英晶体的频率变化可以看到, 当浓度大于 5mg/mL 时, SE 抗体固定量趋于饱和, 5mg/mL 是比较合适的浓度, 见图。

3.2 利用 APTES 法、PEI 法和蛋白 A 金固化法固化抗体、以及和抗原反应情况的比较, 见表 1。

由实验结果可知, 在晶体片上固化 APTES、PEI 或蛋白 A, 方法是可行的, 但蛋白 A 金固化法固化抗体更好一些。

3.3 在扫描电镜下, APTES 法、PEI 法与蛋白 A

法比较, 前两者的几何定位没有后者规则, 且后者是和抗体的 Fc 段结合, 从理论讲, 对抗体的活性无影响, 因此, 蛋白 A 法优越于前两个方法。

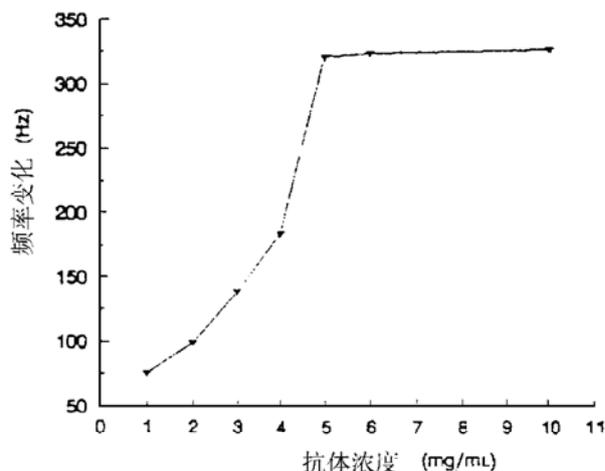


图 SE 抗体固定量饱和曲线

表 1 不同的固化过程对压电晶体灵敏度的影响

固化方法	$\Delta F_1 \pm S$	$\Delta F_2 \pm S$
PEI 法	290 $\pm$ 20.01	68 $\pm$ 10.07
APTES 法	278 $\pm$ 24.07	65 $\pm$ 9.74
蛋白 A 法	303 $\pm$ 18.26	72 $\pm$ 8.49

$\Delta F_1$  固化抗体频率变化量,  $\Delta F_2$  抗体、抗原反应后频率变化量; S 代表标准差; 每种方法做 12 次实验)

3.4 干燥剂的选择试验 为了节省测定时间, 我们对干燥瓶中的干燥剂进行了选择, 情况见表 2。

表 2 干燥剂的选择

干燥剂	频率稳定时间 (分)	有效期 (次)
变色硅胶	60	10
氧化钙	70	12
五氧化二磷	20	60

从表 2 可知, 干燥剂应选择五氧化二磷。

3.5 一致性实验 见表 3。

从表 3 可知: 蛋白 A 固化过程一致性较好。

3.6 为了检验 SE 是否和肉毒毒素 A 有交叉反应,用 8 片固化有 SE 抗体的晶体片,分别和 SE 浓度为 0.5mg/mL、肉毒毒素 A 浓度为 0.5mg/mL)反应,结果见表 4。

表 3 固化过程的一致性情况

固化物质	$\Delta F$ ( $n=6$ )	SD
蛋白 A	124	7.61
PEI	118	8.21
ATPES	104	10.02

经 SAS 软件的统计学处理,前四片  $P < 0.05$ ,说明有免疫性反应。后 4 片  $> 0.05$ ,说明无免疫学反应。因此可知,本传感器的特异性好。

3.7 牛奶中 SE 的检测 选用 8 片固化有 SE 抗体的晶体片,分为两组,一组插入含有 SE (50ng/mL)牛奶中,进行反应,另一组插入不含有 SE 牛奶中,结果见表 5。经统计学处理,前 4 片测定的频率  $P < 0.05$ ,即频率有变化,后 4 片测定的频率  $P > 0.05$ ,即无统计学差异。说明晶体片的 SE 抗体只和 SE 发生反应,与其它蛋白无反应现象,表明了此传感器测定牛奶中 SE 是可行的。

表 4 SE 的特异性反应试验

频率 (Hz)	晶体片编号 (测 SE)				晶体片编号 (测肉毒毒素 A)			
	1	2	3	4	5	6	7	8
固化后频率	3582845	3581362	3583091	3580817	5581409	3581643	3581661	3580414
反应后频率	3582741	3581264	3582980	3580710	3581399	3581641	3581665	3580410

表 5 牛奶中 SE 的检测

频率 (Hz)	晶体片编号 (测 SE)				晶体片编号			
	1	2	3	4	5	6	7	8
固化后频率	3582145	3580369	3581072	3581481	3580109	3581443	3580361	3580314
反应后频率	3582101	3580227	3581030	3581443	3580112	3581445	3580365	3580340

3.8 晶体片的洗脱 8mol/L 的尿素是蛋白质变性和复性剂,<sup>[5]</sup>浸入 8mol/L 的尿素后,抗体变性,使抗原从抗体的结合端脱落,用去离子水冲洗后,抗体又恢复原来的特性。因此,固化有

抗体的晶体片测定抗原后,浸入 8mol/L 的尿素溶液中,20min 后取出,然后,用去离子水冲洗,干燥后,测定其频率,结果见表 6。

表 6 固化过抗体的晶体片洗脱试验

频率 (Hz)	晶体片编号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
固化抗体频率	3580946	3579080	3580774	3578797	3578908	3579736	3582011	3580946
洗脱后的频率	3580936	3580083	3580776	3578801	3578899	3579744	3582010	3580937

经 SAS 软件的统计学处理, $P > 0.05$ ,即无显著性统计学差异,因此,用此方法洗脱可行性好。

再用 1.2mol/L 氢氧化钠和 1.2mol/L 的盐酸处理,晶体片就可以重新利用。

3.9 晶体片洗涤 先用丙酮冲洗晶体片,然后

表 7 晶片再利用试验

频率 (Hz)	晶 体 编 号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
始 频	3580549	3580137	3580574	3580767	3580574	3581554	3581574	3579904
固化后频率	3580376	3580002	3580284	3580510	3580428	3581332	3581435	3579795
处理后频率	3580552	3580132	3580566	3580772	3580563	3581550	3581562	3579889

始频和用酸碱处理的频率进行统计学处理,  $P > 0.05$ , 即无显著性差异, 因此, 上面的处理方法是可行的。

#### 4 小结

从以上可知: 目前, 本实验的传感部分; 抗体固化、洗脱、洗涤的方法都是可行的; 检测时特异性好, 快速、简便, 应用于食品中 SE 的检测有广阔的应用前景。

#### 5 参考文献

1 Sauerbrey G Z. Use of a quartz vibrator for weighing thin layers on a microbalance. *Z Physik*,

1959, 155: 206

- 2 Guilbault G G, Hock B, Schmid R. A piezoelectric immunobiosensor for atrazine in drinking water. *Biosens Bioelectron*, 1992, 7: 411
- 3 Suri C R, Raje M, Mishra G C. Determination of immunoglobulin M concentration by piezoelectric crystal immunobiosensor coated with protamine. *Biosens Bioelectron*, 1994, 9: 325
- 4 Muramatsu H, Dick J M, Tamiya E. Piezoelectric crystal biosensor modified with protein A for determination of immunoglobulins. *Anal Chem*, 1987, 59: 2760
- 5 沈同, 王镜岩. 生物化学 (上册), 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1993: 163~165