

固定 HCG 抗体膜的跨膜电位

吕鸣祥* 方道斌 张 杰

陈昆明

(天津大学应用化学系, 天津 300072)

(天津医学院)

关键词: 人绒毛膜促性腺素 (HCG) 跨膜电位 免疫化学反应

高分子膜作为一项新兴技术, 在很多领域得到日益广泛的应用。近十几年, 随着生物工程和生物传感器的迅速发展, 高分子生物功能膜的研究倍受重视。高分子生物功能膜是采用固定化技术, 将具有分子识别功能的材料 (如酶、抗原、抗体等) 固定在高分子膜上而制得的。在固定化膜表面发生的生物化学反应, 可以引起膜的荷电状态的变化, 从而导致跨膜电位的变化^[1,2]。

有关固定化膜的报导较多, 但主要限于固定化的方法及其应用方面的研究, 而有关高分子生物功能膜的电化学性能却报导甚少。本文主要讨论了固定 HCG 抗体的醋酸纤维素膜的跨膜电位随被膜隔开的两液相电解质浓度的变化, 以及膜表面发生免疫化学反应后, 其跨膜电位及膜的荷电状态的改变。

1 实验部分

1.1 材料

HCG 由北京生物制品检定所提供, 其比活性为 $5000\text{IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。HCG 多克隆抗体由天津医学院制备。作为膜基质的二醋酸纤维素的结合酸为 53.5~55.5%, 游离酸 < 0.01%。溶剂与试剂均为分析纯, 溶液由二次去离子水配制。

1.2 醋酸纤维素生物功能膜的制备

将二醋酸纤维素溶于二氯甲烷与无水乙醇混合溶剂中, 然后加入己二胺与戊二醛充分反应。洗去过量的己二胺后, 将膜浸入 1% 的戊二醛溶液中, 放置过夜。膜再经去离子水充分洗涤后, 冲制成直径 6.5 毫米的圆片, 浸入含 HCG 抗体的 pH 8.0 的磷酸盐缓冲溶液中, 于 4℃ 下放置 24 小时, 便制得固定 HCG 抗体膜。

1.3 跨膜电位与免疫响应膜电位的测定

将耦联 HCG 抗体的膜, 用 O 型环安装在 Teflon 小管的一端, 管内注入 NaCl 溶液 (c_2),

并将小管插入盛 NaCl 溶液 (c_1) 的玻璃电解池内。膜两侧各安置一支饱和甘汞电极。测试装置如图 1 所示。

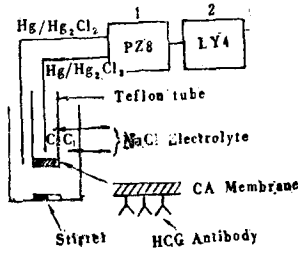


图 1 膜电位测量装置示意图
Fig. 1 Schematic representation of the measurement of membrane potential
1) Digital voltmeter (PZ8)
2) Digital printer (LY4)

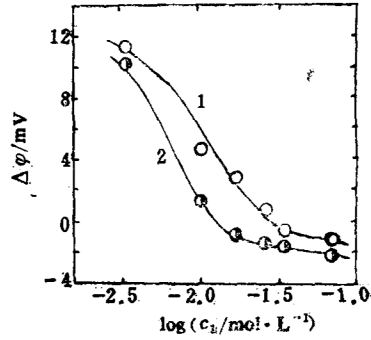


图 2 在 $c_1/c_2 = 2.0$ 时, 跨膜电位与 NaCl 浓度的关系
Fig. 2 Transmembrane potential dependence of NaCl concentration at $c_1/c_2 = 2.0$
1) antibody-binding membrane and
2) antigen-antibody complex membrane

安装 HCG 抗体膜的 Teflon 管, 在含有 $0.1 \mu\text{g}$ HCG 的 1 ml pH8.0 的磷酸盐缓冲溶液中, 30°C 反应 30 分钟。然后在 $c_1/c_2 = 2.0$ 的 NaCl 溶液中, 测定膜表面发生抗原与抗体络合的免疫化学反应后, 跨膜电位随电解质浓度的变化。

为减小电解质浓度的变化对膜电位的影响, 取 $c_1/c_2 = 8.0$, 测定 HCG 抗体膜与不同浓度的 HCG 发生免疫化学反应所引起的膜电位的变化。HCG 的浓度分别为 $0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

2.1 膜电位与电解质浓度的关系及免疫反应引起膜荷电状态的变化

在 $c_1/c_2 = 2.0$, 而且两液相 NaCl 浓度均很稀的情况下, 以膜电位 $\Delta\phi$ 对 $\log c_1$ 作图, 结果如图 2。从图可见, 固定 HCG 抗体膜及形成抗原与抗体络合物后的膜, $\Delta\phi$ 随 $\log c_1$ 的变化, 均呈倒 S 形曲线, 而且经过免疫化学反应后, 膜电位向负方向移动。

当 1-1 价电解质被具有固定电荷密度的膜隔开时, 膜电位 $\Delta\phi$ 可由下式表示^[3]:

$$\Delta\phi = \left(\frac{RT}{F} \right) \left\{ \ln \frac{c_1}{c_2} - \ln \frac{-\theta + \sqrt{\theta^2 + 4c_1^2}}{-\theta + \sqrt{\theta^2 + 4c_2^2}} + (1-2t) \ln \frac{(1-2t)\theta + \sqrt{\theta^2 + 4c_1^2}}{(1+2t)\theta + \sqrt{\theta^2 + 4c_2^2}} \right\} \quad (1)$$

式中 θ 为膜电荷密度, t 为离子迁移数, c_1 和 c_2 为被膜隔开的两液相电解质的浓度。方程式(1)中第 1 项和第 2 项是由膜的表面电位即道南 (Donnan) 电位所决定的; 第 3 项则是由于离子在膜相内的扩散电位所决定的。如果膜相的电荷是均匀分布的话, 则当 $c_1 = c_2$ 时, $\Delta\phi = 0$ 。当 c_1/c_2 为一定值时, $\Delta\phi$ 的变化依赖于膜相的固定电荷密度和离子的迁移数。从方程式(1)可知, 当电解质浓度较高时, 膜电位主要取决于离子在膜相内的扩散电位; 当电解质浓度很低时, 膜电位主要取决于膜的道南电位。所以膜电位与电解质浓度的关系曲线呈现

出 S 形变化。

将方程式(1)中的函数项展开为幂级数,略去高次项;由于两液相 NaCl 浓度均很低,故又可忽略扩散电位对 $\Delta\varphi$ 的影响。于是方程式(1)可简化为

$$(F/RT)\Delta\varphi = \theta/2c_1 - \theta/2c_2 \quad (2)$$

若以 $(F/RT)\Delta\varphi$ 对 $1/c_2$ 作图,则固定 HCG 抗体膜在与 HCG 发生免疫化学反应前后,得到两条斜率不同的直线,如图 3 所示。从直线的斜率可求得耦联 HCG 抗体膜发生免疫化学反应前的电荷密度 $\theta_1 = -0.266 \text{ C} \cdot \text{cm}^{-3}$; 抗体膜发生免疫化学反应形成抗原抗体络合物后,膜的电荷密度 $\theta_2 = -0.144 \text{ C} \cdot \text{cm}^{-3}$ 。可见经免疫化学反应后膜的负电性减小。已知 HCG 和 HCG 抗体的等电点分别为 2.95 和 6.3~7.3^[4],所以这两种蛋白质在 pH8.0 的缓冲溶液中均应显示负电性。故实验测得膜表面形成抗原抗体络合物后负电性的减小,不能简单地用蛋白质所带的有效电荷来解释。山本直登^[5,6]在耦联了 HCG 抗体的钛电极上观察到,当电极表面发生 HCG 与 HCG 抗体的免疫化学反应后,电极电位向正方向移动。从电极与溶液界面双电层结构的变化来解释免疫反应引起电极电位的正移,他认为这是由于抗原与抗体的络合导致了蛋白质的极化,使 HCG 抗体的正电荷密度得以提高。在固定 HCG 抗体的醋酸纤维素膜上,发生免疫化学反应而使膜的荷电状态向正电荷密度增高方向移动,应当与钛电极有类似的情况,也可以认为是由于蛋白质的极化作用所引起的。

2.2 跨膜电位与 HCG 浓度的关系

在 $c_1/c_2 = 2.0$ 的情况下, HCG 抗体膜的跨膜电位随 HCG 浓度的变化,如图 4 所示。从图可见,免疫化学反应前后膜电位之差,随 HCG 浓度的增高而增大。这是由于随 HCG 浓度的增高,膜表面形成的抗原抗体络合物量也增加,使膜的正电荷密度提高,所以免疫化学反应前后膜电位之差,随 HCG 浓度的提高,逐渐向正方向移动。由于 c_1 和 c_2 的浓度很低,膜相中离子的扩散电位很小,膜电位主要由道南电位决定。

若以 $\Delta\varphi$ 对 $\log\text{HCG}$ 作图,在 HCG 浓度为 $0.01 \sim 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 即 $50 \sim 2500 \text{ mIU}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内,可得到一条直线。以此直线作为标准曲线,通过跨膜电位的测定,可以快速而简便地检测孕妇血清或尿液中 HCG 的浓度,这就是所谓的测定 HCG 的膜电位免疫传感器。

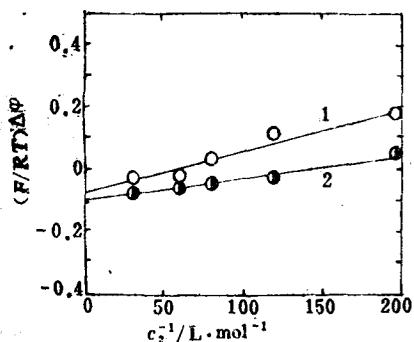


图 3 在 NaCl 浓度 $c_1/c_2 = 2.0$ 时, $(F/RT)\Delta\varphi$ 相对于 $1/c_2$ 的图
Fig. 3 Plots of $(F/RT)\Delta\varphi$ against $1/c_2$ for NaCl concentration at $c_1/c_2 = 2.0$
1)antibody-binding membrane and
2)antigen-antibody complex membrane

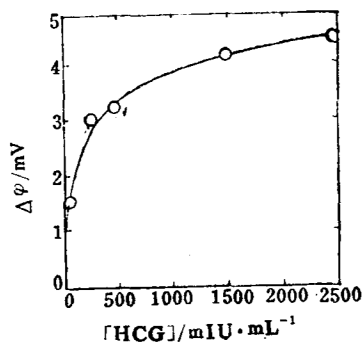


图 4 固定 HCG 抗体膜对 HCG 浓度的电位响应
Fig. 4 Potential response of HCG antibody-binding membrane to HCG concentration

3 结论

3.1 隔开两 NaCl 溶液的固定 HCG 抗体膜, 其跨膜电位随两液相 NaCl 溶液浓度的变化而改变。当 $c_1/c_2 = 2.0$ 时, 跨膜电位随 NaCl 溶液浓度的增大而向负方向移动。

3.2 当固定 HCG 抗体膜表面发生抗原抗体络合的免疫化学反应后, 膜的负电荷密度下降, 可以认为是由于抗原与抗体的络合过程, 使蛋白质分子产生极化, 造成抗体正电性增高的结果。

参 考 文 献

- 1 Hgo T T. *Electrochemical Sensors in Immunological Analysis*, New York, Plenum Press, 1987, 47
- 2 Aizawa M, Suzuki S. *J. Solid-Phase Biochem.*, 1979, 4, 25
- 3 Aizawa M. *Kagaku*, 1981, 36, 533
- 4 Yamamoto, N., Tsubomura, H., *Kagaku no Ryoiki*, 1980, 54, 101
- 5 Yamamoto N, Nagasawa Y, Sawai M, Sudo T, et al. *J. Immunol. Methods*, 1978, 22, 309
- 6 Yamamoto N. *Kobunshi Kako*, 1984, 33, 269

THE TRANSMEMBRANE POTENTIAL OF HCG ANTIBODY-BINDING MEMBRANE

Lu Mingxiang* Fang Daobin Zhang Jie

(Department of Applied Chemistry, Tianjin University, Tianjin 300072)

Chen Kunming

(Tianjin Medical College)

ABSTRACT

In this paper the antibody of HCG was immobilized on the cellulose acetate membrane. The membrane potentials varied with the electrolyte concentrations of the two aqueous phases. The charge density of the membrane phase was lowered as the immunochemical reaction of HCG with HCG antibody proceeded on the membrane surface. When $c_1/c_2 = 8.0$, the antibody-bound membrane potentials shifted to positive values with the increase of HCG concentrations. The membrane immunosensor for the measurement HCG in the solution was constructed according to the change of the membrane potential. A linearity between $\Delta\psi$ and \lg HCG can be obtained in the concentration range of 50—2500 mIU·ml⁻¹ HCG.

Keywords: Human chorionic gonadotropin(HCG), Transmembrane potential, Immunochemical reaction