

# 压电免疫传感器的设计及应用

周康源 王君 陈昕 叶为全 刘胜

(中国科学技术大学 合肥 230027)

鲍继鹏

(解放军 105 医院检验科 合肥 230031)

2000 年 1 月 31 日收到

**摘要** 压电免疫传感器作为一种新型生物传感器, 是利用压电元件的质量敏感性质, 结合生物免疫识别特性而形成的一种自动化分析检测传感器, 它可对多种抗原或抗体进行快速的定量测定, 并可用于反应动力学的研究。具有高特异性、高灵敏度、响应快、小型简便等特点。本文利用石英晶体产生体波厚度剪切振动模式, 由双通道系统进行频率变化的测定。采用氨基硅烷膜固定抗体来定量检测溶液中人体免疫球蛋白 IgG 的含量。

**关键词** 压电免疫传感器, 体波, 抗体, 人体免疫球蛋白

## The design and application of piezoimmunosensor

Zhou Kangyuan Wang Jun Chen Xin Ye Weiquan Liu Sheng

(University of Science and Technology of China, Hefei 230027)

Bao Jipeng

(105 Hospital of PLA Hefei 230031)

**Abstract** Piezoimmunosensor is a new type of biosensor that utilizes the mass-sensing characteristics of the piezoelectric material, connected to the biological immunosensing element. It forms a kind of automatic analytical sensor and is developed for a rapid quantitative analysis of multi-antigens, antibodies and also for the study of reaction kinetics. It provides properties of high specificity, sensitivity, rapid response, minitype and simplicity. In this paper, a quartz crystal is used to produce bulk wave oscillating in the thickness-shear mode, utilizing the dual-channel to detect the relevant frequency shift. When we immobilize antibody with aminosilane film for the quantitative measurement of human immunoglobulin IgG.

**Key words** Piezoimmunosensor, Bulk wave, Antibody, Human immunoglobulin

## 1 原理

### 1.1 传感器的体波振动模式<sup>[1]</sup>

本论文中压电免疫传感器采用石英晶片的

厚度切变振动模式。这种晶片的厚度切变模式常用的切型有 AT 型和 BT 型两种, 其中用得最多的是 AT 型。切型用 IRE 符号表示为

$(yxl)\phi$ , 当  $\phi = 35^\circ$  时为 AT 切型, 当  $\phi = -49^\circ$  时为 BT 切型。对于厚度切变模式的石英晶片, 当晶片的长度和宽度远大于厚度时, 其频率为

$$f_n = \frac{n}{2t} \sqrt{\frac{c'}{\rho}} \quad n = 1, 3, 5, \dots \quad (1)$$

频率常数为

$$K_n = \frac{\pi}{2} \sqrt{\frac{c'}{\rho}} \quad n = 1, 3, 5, \dots \quad (2)$$

其中  $t$  为晶片的厚度,  $\rho$  为石英晶体的密度,  $c'$  为 AT(BT) 切型下的弹性刚度常数,  $n$  为谐波次数。

### 1.2 质量敏感理论

从公式 (1) (2) 出发, 可以推导出质量敏感公式, 具体步骤如下 (对基频情况)。设  $A$  表示晶片两面的电极的面积,  $m$  表示电极之间的晶体质量, 则晶片的厚度可以表示为  $t = m/\rho A$ , 晶片的频率可以改写为

$$f = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{c'}{\rho}} = K/t = \frac{K\rho A}{m}$$

则

$$\frac{\Delta f}{\Delta m} = -\frac{K\rho A}{m^2} = -\frac{f^2}{K\rho A}$$

$$\Delta f = -\Delta m \cdot \frac{f}{K\rho A}$$

其中  $\Delta m$  表示晶体的质量改变, 当有外界质量吸附时, 会引起等效的频率改变。设吸附的质量为  $\Delta m_s = \Delta m$ , 代入石英晶体的常数 ( $K = 1660\text{kHz}\cdot\text{mm}, \rho = 2.65\text{g}/\text{cm}^3$ ), 可以得到

$$\Delta f = -2.26 \times 10^{-6} (\Delta m_s) f^2 / A \quad (3)$$

其中:  $\Delta f$  为频率的改变;  $\Delta m_s$  为表面质量的改变 (以  $g$  为单位);  $f$  为工作频率 (以  $\text{Hz}$  为单位), 面积  $A$  以  $\text{cm}^2$  为单位, 负号表示质量的增加导致频率下降。

1959 年, Sauerbrey 推证出公式 (3) 的频应用声学

率-质量关系 [2], 该公式成为了压电传感器的理论基础。压电传感器通过测量频率的改变, 可以检测到石英晶体表面附着的微小质量, 其灵敏度可达  $1\mu\text{g}/\text{Hz}$  (即  $1\text{Hz}$  的频率改变能检测到的质量变化在  $\mu\text{g}$  数量级) [3,4]。

### 1.3 免疫反应原理 [5,6]

抗原 (antigen, Ag) 是能够刺激机体免疫系统产生抗体或致敏淋巴细胞 (免疫原性产生免疫应答), 并与抗体或致敏淋巴细胞发生特异性结合的物质 (反应原性产生免疫反应)。抗原具有异物性, 即化学结构与宿主成分不同的外来物质 (如病原微生物、细菌、病毒等) 或从未与免疫细胞接触过的自体物质 (如甲状腺球蛋白)。抗原的决定簇 (即一些功能化学集团) 可与抗体的高度可变区特异性结合, 具有极强的空间结构互补性。

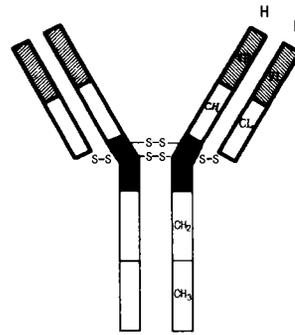


图 1 抗体结构

抗体 (antibody, Ab) 是作为机体防御疾病和感染的一类免疫球蛋白分子, 分为五种类型:  $\text{IgG}$ 、 $\text{IgA}$ 、 $\text{IgM}$ 、 $\text{IgD}$ 、 $\text{IgE}$ , 虽然在化学结构上有差别但它们都具有基本的 Y 型结构单元, 如图 1 所示, 包含四条多肽链的对称性结构。两条重链 (H 链) 由二硫键 (-S-S-) 连接起来呈 “Y” 字形。H 链 N 端的  $1/4$  或  $1/5$  部分为可变区 (VH), C 端的  $3/4$  或  $4/5$  为恒定区 (CH); L 链同样可分为可变区 (VL) 和恒定区 (CL)。抗原结合点由 VH 和 VL 组成, 在可变区特定位置的氨基酸残基具有更大

的变异性称为高变区，是与抗原特异性结合的部位。恒定区具有吸附、结合补体的功能。

免疫反应具有阶段性，可分为特异性反应和非特异性反应两个阶段。特异性阶段，反应在数秒钟内完成，但不出现可见反应现象，将抗原或抗体固定于传感器电极表面形成敏感膜，利用抗原与抗体特异性结合后产生的微小质量变化，即可通过压电免疫传感器进行快速、灵敏的检测。单克隆抗体的使用，可进一步提高灵敏度与特异性。而非特异性反应阶段，过程缓慢，需数分钟、数小时乃至数日，出现沉淀、凝集、溶血等可见反应现象，通常的免疫学检测方法，大都基于这一阶段的可见反应现象而设计，因此检测费时、复杂。

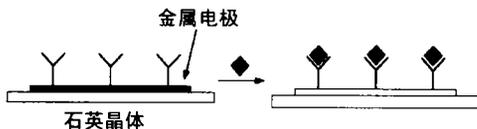


图2 抗原-抗体结合示意图

#### 1.4 检测系统原理

由前可知，压电免疫检测系统主要是检测传感器表面由于特异性免疫反应可引起质量改变而发生的频率变化。检测频率的方式有很多，但考虑到本系统对频率准确性的要求，我们采用双通道系统进行差频检测，即可对由于环境、温度等变化带来的频率漂移进行补偿，又可去除非吸附性干扰。所谓非吸附干扰指：由于在检测溶液中除了待检测的物质以外，还可能存在着其他的物质。这些物质由于各种原因，比如：沉积，吸附等，使检测传感器的质量发生改变，带来很大的误差。

双通道原理如下：设计两个固有特性相近的传感器（即压电片的各种参数相同，谐振电路及有关电路相同），它们之间唯一的区别是压电片表面被覆材料的方法，见图3。检测通道中传感器探头表面固定特异性抗原或抗体。参考通道表面固定非特异性的抗原或抗体，但分子尺寸、重量、结构相似，与被测物不发生特异性结合却可产生类似的非特异性吸

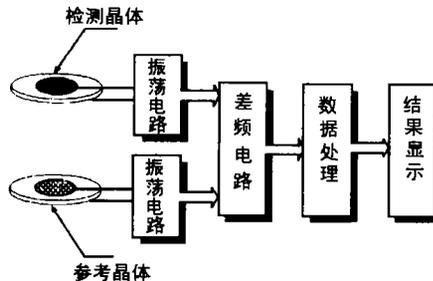


图3 压电免疫双通道差频检测系统原理示意图

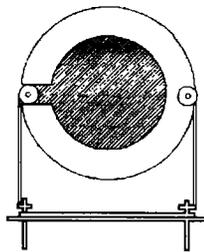


图4 石英晶体的架装形式

附。检测之前，先测两通道的差频  $\Delta f_1$ ，该差频反映两通道间固有的微小差异。反应后，检测得到差频  $\Delta f_2$ 。将两差频相减，得到  $\Delta f = \Delta f_2 - \Delta f_1$ ， $\Delta f$  真正反映了因质量的吸附而引起的频率改变，可有效地去除干扰。

## 2 实验

### 2.1 石英晶体振荡器

#### 2.1.1 石英晶体

圆形 AT- 切割石英晶体，直径 10mm，厚度 0.5mm，基频分别为 4.233668MHz。电极采用真空镀金，圆形的电极布置在晶片的中心部分并有引出面，引出面到片子的边缘有接触点。用导电胶粘结的方法在这一点上架装，见图4。

#### 2.1.2 振荡及检测电路

振荡电路由 CMOS 器件和石英晶体构成，石英晶体作为反馈元件，因此具有极高的频率稳定度。当电路振荡频率接近晶体的固有谐振频率时，电路维持振荡条件。后端的差频及检测电路由一片 80C32 单片机完成。

## 2.2 抗体固定化及抗原的检测

采用硫酸和水的混合液清洗晶体金电极表面,经 3-氨基丙基三乙氧基硅烷等浸泡, PBS 冲洗。8.5mg/ml 羊抗人 IgG 抗体 5 $\mu$ l 固定于表面作为敏感层; 12.7mg/ml 羊抗鼠 IgG 抗体 5 $\mu$ l 作为参考通道的阻断层。

于检测、参考通道分别加入不同浓度的正常人 IgG 抗原液,测定频率的改变值。加入 10mM NaOH 洗脱被覆抗原,绘制频率改变-质量曲线。

## 3 实验结果及讨论

### 3.1 抗体固定化

抗原或抗体如何固定于换能器的表面以制成选择性敏感膜,对于压电免疫传感器的敏感检测,重复使用至关重要。通常采用硅烷化膜 (silane layer)、聚合物膜 (聚乙烯膜 polyethyleneimine layer 或聚丙烯酰胺膜 polyacrylamide gel layer) 以及 A 蛋白膜 (protein A layer) 等三种方式固定抗原或抗体。抗原或抗体可与膜上的结构功能团形成具方向性的共价键,这种强化学键作用使换能器与生物受体紧密结合不易分离,这对于传感器的重复使用极为关键。本论文采用三氨基丙基三乙氧基硅烷固定羊抗人 IgG 抗体,硅烷化的膜表面光滑、传导性好、稳定,硅烷的氧半族直接键合在传感器电极表面。实验中表面被覆抗体的饱和和质量为 5  $\mu$ g(162ng/mm<sup>2</sup>)。膜的使用寿命、重复性和膜的“附着”效率(即单位面积对敏感物质的吸附量或结合量)等因素成为敏感膜设计的关键。

### 3.2 抗原的定量检测

根据公式  $\Delta f = -2.26 \times 10^{-6} (\Delta m_s) f^2 / A$ , 我们推导出频率改变与质量之间的理论关系,如图 5 所示,频率的降低值与质量的增加成线性关系。在 0-4 $\mu$ g 范围内实验值与理论值基本吻合,超过 4 $\mu$ g 时由于抗原与固定抗体的结合趋向饱和,频率改变趋于恒定。在实际应用中我们可以根据已知浓度的标准抗原溶液绘制

标准曲线,测定频率的改变来推算出被测液中 IgG 的含量。

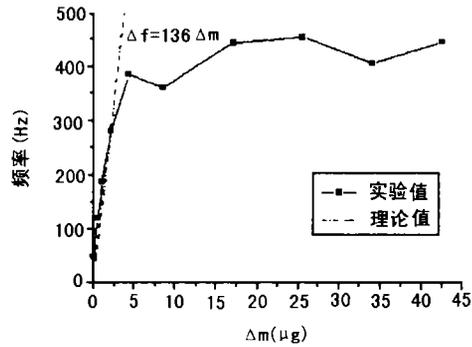


图 5 抗原的定量检测

### 3.3 最佳测定时间

由于体波的检测灵敏度及频率稳定度较低无法实现实时检测。我们在不同的时间测定浓度为 1 $\mu$ g/ml 的 IgG 溶液,绘制出频率-时间曲线,如图 6 所示最适合的检测时间为 15 分钟。

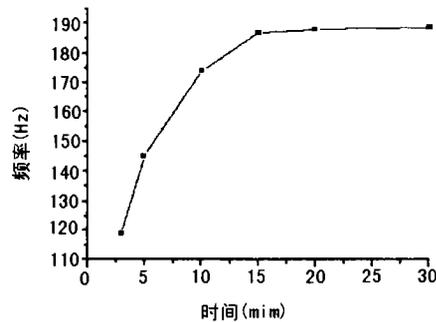


图 6 频率-时间关系

### 3.4 传感器的重复使用

采用硫酸可将金电极表面固定的所有物质洗脱掉,包括固定的抗体、戊二醛及硅烷膜,如图 7 所示。由图 7 可知经冲洗后晶体的振荡频率可恢复至基频,因此可于晶体表面固定不同的抗体或抗原,从而定量测定不同的抗原、抗体浓度。

### 3.5 临床意义

IgG 是血清免疫球蛋白的主要成分,占

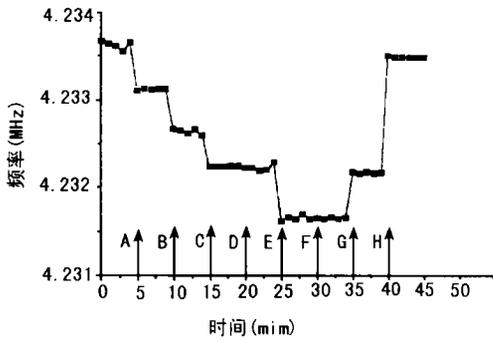


图 7 冲洗过程示意图

加入 A: 硅烷 B: 戊二醛  
 C: 抗体 (羊抗人 IgG 抗体) D: PBS 缓冲液  
 E: 抗原 (人 IgG) F: PBS 缓冲液  
 G: 氢氧化钠 H: 硫酸

统先天性发育不全所致，常见的有抗体缺陷病（如低丙球蛋白血症）；对继发性免疫缺陷，造成的原因很复杂，除人类免疫缺陷病毒（HIV）所致的 AIDS 外，更常见的有营养不良，肿瘤和感染，化疗及预防移植排斥目的而使用的药物也常引起免疫抑止，因而引起继发免疫缺陷。

本文章中 IgG 检测灵敏度达  $1\mu\text{g}$ ，克服了酶联免疫分析法（ELISA）、放射免疫分析法（RIA）、荧光免疫分析法（FIA）等免疫检测方法费时、昂贵、标记及操作复杂等优点，具有广阔的发展前景及临床使用价值，可应用在激素、癌抗原、细胞因子的痕量检测，对于疾病的早期诊断具有一定的临床意义。

### 参 考 文 献

- 1 秦自楷等. 压电石英晶体. 北京: 国防工业出版社, 1980. 68-112, 129-133, 240-253.
- 2 Sauerbrey G. *Z.Phys.*, 1959, **155**: 206-222.
- 3 Ward M D, Buttry D A. *Science*, 1990, **249**: 1000-1007.
- 4 Wang Z, et al. *Electronics Letters*, 1990, 26: 1511-1513.
- 5 杨廷彬. 临床免疫学及检验. 吉林: 吉林科学技术出版社, 1991. 10-11, 17-23.
- 6 龙振洲. 医学免疫学. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 9-16.

全部免疫球蛋白的 75%，大多数抗细菌，抗外毒素，抗病毒和抗真菌性抗体均属于 IgG，且是唯一能通过胎盘的抗体，对防止新生儿感染起很大作用。正常成人血清中含量为  $12.0 \pm 2.6 \text{mg/ml}$ 。

IgG 的测定是检查体液免疫功能最常用的方法，当 IgG 的水平明显降低（通常小于  $1 \text{mg/ml}$ ）可考虑体液免疫缺陷病。免疫缺陷病分为原发性和继发性两大类，前者是免疫系

## 泡沫铝吸声板高新技术成果转化通过专家认定

吉林工业大学和上海众汇泡沫铝材有限公司联合开发的新型泡沫铝吸声板高新技术成果转化认定会于 2000 年 5 月 31 日在上海举行，上海市南汇县科委主持了认定会。

泡沫铝吸声板采用加压渗流法工艺制成厚度为 6、8、10、20、50、100 (mm) 板材，每块规格  $250 \times 250$ 、 $500 \times 500$ 、 $500 \times 1000$ 、 $1000 \times 1500$  ( $\text{mm}^2$ ) 不等，有各种颜色可供选择。泡沫铝吸声板具有高空隙率、高通孔率、吸声、屏蔽、不燃、耐温、防潮、质轻、抗老化、防眩、无污染等特点，是一种新型无纤维环保型吸声板材，平均吸声系数大于 0.5。

可广泛应用于建筑声学 and 噪声控制工程中，例如影剧院、体育馆、游泳馆、演播厅、录音室、高级宾馆等顶棚和墙面的吸声，也可用于室外道路声屏障、地下工程的吸声降噪等。泡沫铝吸声板的制造工艺、设备、检测手段等均已成熟完善，已具备年产  $20000 \text{m}^2$  的生产能力，价格仅为国外同类产品的 1/3。经科技检索和专家认定，该项成果属国内领先，达到了 90 年代初国际同类产品的先进水平。会议建议通过高新技术成果转化认定，投入批量生产。

(中国船舶工业第九设计研究院 吕玉恒)