

刘爱平, 申文浩, 王小红, 等. 免疫学检测中抗体固定化方法的研究现状[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 714-720.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.034

免疫学检测中抗体固定化方法的研究现状

刘爱平¹, 申文浩¹, 王小红², 李 诚¹

(1. 四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 华中农业大学食品学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 免疫学检测技术, 因具有快速、灵敏、成本低等优点, 被广泛应用于食品安全、环境监测等领域。抗体是免疫学检测的核心试剂, 免疫学检测中常需要对抗体进行固定, 高效固定抗体对提高检测灵敏度具有重要意义。本文对抗体固定化各类方法的特点及其在免疫学检测中的应用进行综述, 并对抗体定向固定化技术发展趋势进行了展望。

关键词: 抗体; 定向固定; 生物素-亲和素; 亲和肽配基; DNA 引导固定法

中图分类号: Q599 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)03-0714-07

A review on antibody immobilization in immunoassays

LIU Ai-ping¹, SHEN Wen-hao¹, WANG Xiao-hong², LI Cheng¹

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China; 2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Immunological assays are widely applied in food safety and environmental monitoring because they are rapid, sensitive and of low price. Antibody, the core reagent in immunological assays, usually needs to be immobilized to capture antigen. It is of great significance to improve detection sensitivity through effective immobilization of antibody. This review seeks to overview the characteristics and application of each kind of immobilization methods in immunological assays, and the developing trends of oriented-immobilization technique were prospected.

Key words: antibody; oriented-immobilization; avidin-biotin; affinity peptide ligand; DNA-directed immobilization

免疫学检测技术, 因具有快速、灵敏、成本低、适合大批量检测等优点, 被广泛应用于食品安全、环境监测、疾病诊断等领域^[1-3]。抗体 (Immunoglobulin, Ig) 是建立免疫学检测技术的核心, 抗体按重链抗原性差异可分为 IgM、IgG、IgA、IgD 和 IgE, 其中 IgG 最常用。IgG 是含 2 对多肽链的糖蛋白, 链间有二硫键

连接, 包括 F(ab')₂ 和 Fc 片段; F(ab')₂ 包含 2 个 Fab 片段 (图 1)。在免疫学检测中, 常固定抗体到固相载体以检测样品中的目标物。研究者多采用直接吸附的方式将抗体固定到固相载体^[4-6], 抗体在载体上的结合可能具有不同的空间取向, 而无规则取向由于空间位阻作用, 使部分固定化抗体失活或变性, 失去抗原结合活性^[7-9]。只有当其抗原决定簇 (Fab) 端远离固相表面时, 才能最大程度地保持免疫活性, 从而更灵敏地捕捉样品中的抗原分子^[10]。为尽量减少由于抗体固载化引起的蛋白质构象变化, 保证固定化过程中抗体的抗原结合位点远离固相表面, 使之在后续的免疫检测中高效捕获抗原分子, 提高免疫分析灵敏度, 抗体的定向固定化成为研究的必要。

收稿日期: 2016-08-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31271876); 中央高校基本科研业务费专项 (2013PY103_52209-814012)

作者简介: 刘爱平 (1986-), 男, 湖北荆州人, 博士, 讲师, 主要从事食品微生物与免疫学检测研究, (E-mail) aipliu@outlook.com

通讯作者: 李 诚, (E-mail) lichenglcp@163.com

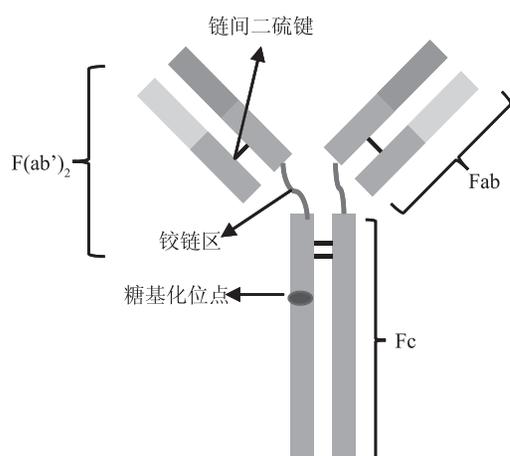


图1 抗体结构示意图

Fig.1 The schematic diagram of antibody structure

抗体定向固定技术就是将抗体分子中不影响抗体活性及抗原结合能力的基团连接到固相载体或将特定基团活化,有时还需要标记特殊活性基团,使之与化学修饰的载体表面特异结合。在此,本文将着重讨论常用的抗体定向固定化方法。表1列举了常用的抗体固定化方法,并比较其优缺点。

1 抗体非定向固定化方法

1.1 直接吸附法

抗体非定向固定主要采用直接吸附法,利用抗体与固定介质之间的疏水作用、静电力或范德华力等固定抗体。如夹心酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测中,研究者常用pH为9.6的碳酸盐缓冲液稀释抗体,然后添

表1 非定向固定和定向固定抗体方法的比较

Table 1 Comparison of non-orientated and orientated immobilization of antibody

| | 固定化方法 | 固定化原理 | 优点 | 缺点 | 参考文献 |
|-------|-------------|-----------------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------|
| 非定向固定 | 直接吸附法 | 疏水作用、静电力或范德华力等物理吸附作用为主 | 操作简单 | 受到离子强度、pH、温度等影响,重现性较差,抗体失活、变性 | [11]、[12] |
| | 生物素-亲和素法 | 生物素和亲和素间的亲和作用 | 提高抗原结合能力 | 需预先包被,对抗体生物素化 | [13]、[14] |
| | DNA 引导固定 | 寡核苷酸链的互补 | 提高抗原结合能力 | 需预先包被,偶联寡核苷酸链至抗体 | [15] |
| | 基于糖基化位点的固定 | 氧化糖基化位点后,与酰肼基或者氨基偶联 | 提高抗原结合能力 | 抗体氧化步骤繁琐、易影响抗体结构 | [16] |
| 定向固定 | 基于 Fc 片段的固定 | Fc 片段与蛋白 A/G、亲和肽配基、抗 Fc 片段抗体的亲和作用 | 提高抗原结合能力,不需修饰抗体 | 需预先包被,蛋白 A/G 只结合特定类型抗体 | [17] |
| | PStag 法 | PStag 与聚苯乙烯的亲合作用 | 提高抗原结合能力,制备简单 | 只针对特定吸附介质 | [18]、[9] |
| | 基于半胱氨酸的固定 | 巯基的反应性 | 提高抗原结合能力 | 可能要对抗体进行突变或酶切等处理 | [19]、[20] |

加到酶标板实现抗体固定化^[4-6]。直接吸附法固定抗体时,以物理吸附作用为主,固定介质与抗体之间的作用力容易受到离子强度、pH、温度等影响。同时,抗体任意部位都可能与固相介质接触(图2A),由于空间位阻作用导致抗体失活或变性、抗原结合位点被屏蔽,影响抗原结合。

1.2 生物素-亲和素法

生物素广泛分布于动植物组织中,常从卵黄和肝组织中提取,其分子量约244 000。亲和素是一种由4个相同亚基组成的糖蛋白,分子量约66 000,目前使用的主要是从链霉菌中提取的链亲和素。每个

亲和素能结合4个分子的生物素,二者之间的亲和力极强,亲和常数约 $10^{-15} \sim 10^{-13} \text{ L/mol}$ ^[21],因此二者的结合特异性高、稳定性好,被广泛应用于免疫化学、生物医药等领域。

Ouerghi 等^[22]将抗人 IgG 抗体采用生物素-亲和素法固定到金电极表面,对抗原的检测线性范围可达到10~80 ng/ml,最低检测限可达10 pg/ml。Cho 等^[23]采用定点亲和素化方式修饰酶解后抗体片段 F(ab')₂,并利用亲和素-生物素方法固定抗体片段,其检测抗原的灵敏度比直接吸附法包被完整抗体分子检测方式高20倍。Dutra 等^[24]采用生物素-亲和

素法将人心肌钙蛋白 t 抗体固定化到表面等离子共振仪芯片上表面,其检测心肌钙蛋白 t 的检测限可达 0.01 ng/ml。刘儒平等^[13]利用生物素与亲和素的高特异性结合原理,在亲和素标记的聚苯乙烯微珠表面固定生物素化抗体,通过构建生物素-亲和素放大系统的表面等离子共振传感器检测大肠杆菌,该方法可实现对低浓度抗原的检测,提高传感器的灵敏度。李超辉等^[14]以生物素-链霉亲和素系统为介导,将克隆特罗单克隆抗体与纳米磁珠偶联制备免疫磁珠,建立特异性快速富集猪肉中盐酸克伦特罗的方法。生物素-亲和素法(图 2B)使抗体具有高度的定向性,不仅能带来更高的抗原抗体结合强度,而且能够使解离常数保持在天然的水平。该方法需预先包被亲和素,需要对抗体进行生物素化,由于生物素化位点可能靠近抗体的抗原结合位点,导致抗体活性损失。但该方法制备技术相对简单,是商业化夹心 ELISA 常采用的抗体固定方法。

1.3 DNA 引导固定法

DNA 引导固定 (DNA-directed immobilization, DDI) (图 2C) 是将 DNA 连接的蛋白质通过全匹配的 DNA 双链杂交固定到有核苷酸单链修饰的表面。该法使得蛋白质与固相介质保持一定距离,减少直

接接触引起的活性损害^[25]。Wacker 等^[26]比较了 DDI 法、直接吸附法和生物素-亲和素法固定抗兔 IgG 抗体到玻璃介质的抗体芯片上检测 IgG 的研究,结果表明 DDI 方法最经济,检测效果最佳。Boozer 等^[27]比较了表面等离子共振检测 hCG 时,DDI 法和生物素-亲和素法固定抗 hCG 的多克隆抗体检测 hCG 的灵敏度,前者比后者高约 50 倍。Jung 等^[28]也采用蛋白 G 与 DDI 法相结合的方式定向固定抗体,该方法的效果明显优于用化学键偶联蛋白 G。同时,研究结果表明,DNA 引导固定法具有更好的再生性能。Schroeder 等^[29]采用 DDI 法固定抗体于微流控设备,构建了抗原的多重免疫检测。沙莎等^[15]将抗转基因 *Bt Cry1Ac* 蛋白的抗体的羧基进行活化,然后固定到含氨基化的 DNA 双链芯片表面,结果表明构建的抗体芯片分布均匀、特异性良好,应用特制的芯片扫描仪进行检测时,其灵敏度达到 0.01~0.05 ng/L。DDI 法固定抗体时,需要将抗体与 DNA 双链偶联,由于偶联位点可能靠近抗体的抗原结合位点,导致抗体活性损失。但从研究报道结果可知,该法固定抗体对抗原的检测灵敏度好,通过杂交双链的解离可成功实现芯片的再生,解决传统抗体固定方法中芯片不可再生的问题。

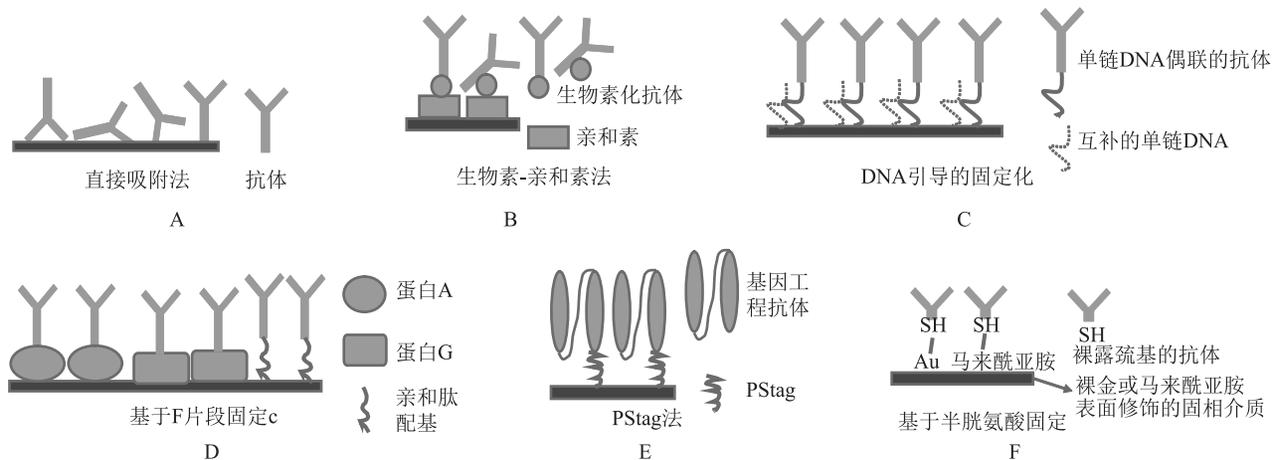


图 2 抗体固定化方法示意图

Fig.2 The schematic diagram of approaches to antibody immobilization

2 抗体定向固定化方法

2.1 化学方法

基于糖基化位点的定向固定是抗体定向固定化的常用化学方法。糖基化位点广泛存在于酶、抗体

等蛋白质中,可将其作为支点改造或修饰蛋白质。基于糖基化位点的抗体定向固定最初应用于亲和色谱法免疫吸附,研究者通过使用过量的高碘酸钠氧化抗体糖基化位点将其固定化^[30-31],该方法一直沿用至今。Batalla 等^[32]将抗体糖基化位点氧化,偶

联到氨基表面化修饰的凝胶上,通过体系优化使得非特异性吸附降到最低。Puertas 等^[33]在构建检测人体绒毛膜促性腺激素的胶体金试纸条时,将检测抗体通过糖基化位点固定到纳米磁珠上,其检测效果要优于使用非定向固定化的检测抗体。任志敏等^[34]利用酰肼与醛基可以生成稳定腙键的原理在酰肼活化的微珠表面固定了高碘酸钠温和氧化的抗体。李莎^[35]利用糖基固定化方法,将抗体 Fc 端的糖基基团氧化为醛基,与固相表面的酰肼基或者氨基偶联,实现抗体的定向固定化。糖基化位点处于抗体的 Fc 片段,基于抗体 Fc 端糖基氧化等反应固定抗体时,偶联位点远离抗原决定簇,空间位阻小,可以和较多的抗原结合。但是由于存在抗体氧化步骤,过程较繁琐,且可能对抗体结构造成破坏而导致部分活性损失。

2.2 生物方法

2.2.1 基于 Fc 片段的定向固定化 采用生物学策略,基于 Fc 片段对抗体进行定向固定化(图 2D)备受研究者青睐。

2.2.1.1 蛋白 A 或蛋白 G 法 蛋白 A 是从金黄色葡萄球菌中提取的蛋白质,它能够同多种哺乳动物抗体分子的 Fc 片段特异性结合,常被用来定向固定抗体分子。Johnson 等^[36]利用基因工程技术表达了 C 端含有组氨酸标签的蛋白 A,带标签的蛋白 A 可以通过聚组氨酸标签定向固定在预先被次氨基三乙酸修饰的载体表面,让抗体 Fc 端的活性位点远离固相载体,C 端组氨酸标签可以有效地保护蛋白 A 对抗体的高亲和力,提高抗体固定化效率。孟艳丽等^[37]也研究了通过蛋白 A 定向固定抗体分子用于椭圆光学生物传感器免疫检测的可能性。

蛋白 G 是一种源自链球菌 G 族的细胞壁蛋白,它也能与 IgG 的 Fc 区域特异性结合,与蛋白 A 相比对 IgG 具有更好的结合能力,故可采用预先包被蛋白 G 的方式定向固定抗体^[38]。Soh 等^[39]基于表面等离子共振法检测 2,4-二氯苯酚时,利用金原子亲和多肽和蛋白 G 将抗 2,4-二氯苯酚的抗体定向固定。Oh 等^[40]将蛋白 G 的游离氨基突变为巯基,利用金-硫键固定蛋白 G,从而定向固定抗体。为提高固定效率,Lee 等^[41]将蛋白 G 的 N 端突变使其含有多个巯基,使其定向固定于裸金表面,结果表明该法的抗体定向固定效率更高,检测抗原的灵敏性更好。采用蛋白 A 或蛋白 G 法固定抗体具有较高的特异

性和稳定性,是比较理想的定向固定化方式,但由于二次包被,被固定的抗体密度可能偏小^[17, 42]。

2.2.1.2 亲和肽配基法 肽配基是受体与药物等其他分子结合时的基团或纽带,与抗体的 Fc 片段具有亲和作用。Fassina 等^[43]合成了多肽链 TG19318 模拟蛋白 A 的结构,并用于亲和纯化、固定抗体。Jung 等^[44]测试了多个具有抗体结合能力的多肽在芯片表面捕获抗体的能力,发现 N 端含 PEG 的 13 个氨基酸短肽效果最佳,其对 IgG1 和兔 IgG 的结合常数可达 $10^{-7} \sim 10^{-6}$ L/mol。Yang 等^[45-46]筛选得到了可以结合人 IgG Fc 片段的六肽 HWRGWV,结果表明该配基与 IgG 的结合常数能达到 $10^{-6} \sim 10^{-5}$ L/mol,且对 IgG 有很好的选择性。朱俐燕等^[47]采用乳液聚合法制备甲基丙烯酸缩水甘油酯纳米球,将肽配基 HWRGWV 固定于纳米球上定向吸附抗体分子,并采用等温滴定微量热仪分析纳米球与 IgG 的相互作用热。结果表明,肽配基亲和载体对 IgG 的特异性吸附明显高于肽配基修饰前的载体。黄波^[48]研究了抗体亲和肽配基的理性设计和色谱表征,提出了以蛋白 A 亲和配基为原型的仿生亲和肽配基理性设计方法,然后采用粗粒化分子动力学模拟研究了蛋白 A-IgG 复合物解离的全过程,并基于以上分子机理设计筛选了蛋白 A 仿生亲和肽配基,经亲和色谱试验验证候选多肽的亲合性,获得了与 IgG 具有高亲和性的七肽 YFDWRWE。亲和肽配基法制备相对简单,特异性和亲和性均可经过筛选改进,优势明显,但亲和肽配基长度较小,自身的固定化问题不可忽视。

2.2.2 PStag 法 Kumada 等^[12]通过噬菌体筛选技术,获得了能与聚苯乙烯固相载体高特异性结合的短链肽段 PStag,该片段一般含 8~12 个氨基酸,既能起到化学间隔臂的作用,使与之相连的大分子远离聚苯乙烯固相载体表面,同时又不影响大分子性质(图 2E)。Kumada 等^[49]比较了单抗和 PStag 偶联的单抗在聚苯乙烯 ELISA 板上包被后检测抗原的效果,结果表明,PStag 偶联的单抗的抗原结合活性保留得更好。在重组抗体表达过程中,抗体常以包涵体的形式存在,需要进行复性操作,而 Kumada 等^[50]将大肠杆菌表达的包涵体形式单链抗体直接包被到聚苯乙烯固相载体,经过梯度浓度的尿素洗涤,同时实现了单链抗体在固相载体上的复性和纯化。Kogot 等^[18]通过 ELISA、圆二色光谱验证了

PStag 用于小肽固定的优势和可行性。Tang 等^[9] 将能结合 IgG Fc 片段的 ZZ protein 通过 PStag 实现其在聚苯乙烯固相载体上的固定化,间接定向固定 IgG。以该方式构建夹心 ELISA 检测抗原的灵敏度比直接吸附法包被 ZZ protein 高 10 倍。PStag 法前处理简单,随着重组抗体技术的发展,可将编码 PStag 的基因连接到基因工程抗体的 N 端或 C 端,直接外源表达获得^[51]。

2.2.3 基于半胱氨酸的定向固定化 分子生物学技术的发展为抗体定向固定,尤其是定点固定化提供了可能。其中,最常用的技术即通过定点突变引入独特的氨基酸,如半胱氨酸,定向固定抗体(图 2F)。Prisyazhnoy 等^[52] 基于该法将 Fab' 片段定向固定于马来酰亚胺修饰的琼脂糖表面,使得 Fab' 片段的抗原结合容量保持了约一半。Lu 等^[53] 比较了基于半胱氨酸法和直接吸附法固定抗体,结果表明前者比后者的检测活性高 3 倍。将抗体固定到裸金表面时,可利用半胱氨酸直接吸附,Brogan 等^[19]、Lee 等^[20] 通过金硫键将抗体 Fab' 片段固定到金表面。Zhang 等^[54] 以末端含半胱氨酸的多肽片段结合到马来酰亚胺修饰的金和硅表面,抗体通过与多肽片段的特异抗原抗体相互作用实现定向固定化。抗体引入半胱氨酸可能导致抗体活性的变化,该方法既可用于不含天然半胱氨酸的抗体,如小分子基因工程抗体,也可用于某些含半胱氨酸的抗体。若需要定向固定化的抗体自身含有半胱氨酸,那么需要确定该位点对抗体活性或稳定性无影响,然后再将原半胱氨酸位点突变为其他氨基酸,并在新位点引入用于定点固定化的半胱氨酸。

3 展望

抗体是建立免疫学检测的核心试剂,抗体的定向固定化对于提高免疫学检测的灵敏性和重复性具有重要意义^[55-56]。非定向固定化方法由于抗体分子的无规则取向造成固定化效率低、抗体失活,易影响抗体对抗原的高效捕获。定向固定化法能最大限度保证抗体的抗原结合位点的活性,以有效捕获抗原。因此,为了提高检测的灵敏度和重复性,抗体的定向固定化必将成为研究趋势。目前,关于抗体定向固定化的方法已有很多,且大多以抗体的 Fc 段为突破口^[57-59],如应用广泛的蛋白 A 或蛋白 G 法。通过生物亲和作用可以有效地通过 Fc 段固定抗体,并

且具有较高的生物活性,这可能是因为蛋白 A 或蛋白 G 分子承受了固相表面的微环境变化和共价联的化学变化,并且借助生物亲和作用可以实现抗体的定向固定,因而最大程度地保留了抗体特异性结合位点的生物活性和空间取向^[28,60]。但没有一种抗体定向固定化方法是普遍适用的,需结合固相载体和抗体自身性质进行选择。最佳的抗体定向固定化方法应当具有如下特征:(1)最少的结构改变;(2)温和的反应条件;(3)简便的实施方式。随着重组抗体技术的发展,必将会有更多新的定向固定化方法出现,如经过噬菌体筛选的可与特定固相载体高效结合的多肽或蛋白介导的重组抗体定向固定化以及能与抗体特异性结合的化学或生物性间隔臂等。

参考文献:

- [1] DOBOSZ P, MORAIS S, BONET E, et al. Massive immuno multiresidue screening of water pollutants[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(19):9817-9824.
- [2] YU S C, YU F, LI Y P, et al. Magnetic nanoparticles replacing microplate as immobile phase could greatly improve the sensitivity of chemiluminescence enzymatic immunoassay for deoxynivalenol[J]. *Food Control*, 2016, 60: 500-504.
- [3] ZAWORSKI P, VON HERRMANN K M, TAYLOR S, et al. SMN protein can be reliably measured in whole blood with an electrochemiluminescence (ECL) immunoassay: implications for clinical trials[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150640.
- [4] TU Z, CHEN Q, LI Y, et al. Identification and characterization of species-specific nanobodies for the detection of *Listeria monocytogenes* in milk[J]. *Anal Biochem*, 2016, 493: 1-7.
- [5] ZHU L, HE J, CAO X, et al. Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection of *Bacillus Cereus* in food[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:16092. DOI: 10.1038/srep16092
- [6] 李小宇,张春雨,郭东全,等. 双抗夹心 ELISA 检测转 *Bar* 基因抗除草剂大豆[J]. *食品科学*, 2016, 37(4): 222-225.
- [7] KUMADA Y, SASAKI E, KISHIMOTO M. Preparation of scFv-immobilized quartz crystal microbalance sensor by PS-tag-mediated solid-phase refolding[J]. *J Biosci Bioeng*, 2011, 111(4): 459-464.
- [8] NOBUYUKI T, MADOKA T, KAZUHIKO I. Significance of antibody orientation unraveled: well-oriented antibodies recorded high binding affinity[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(6): 1969-1976.
- [9] TANG J B, SUN X F, YANG H M, et al. Well-oriented ZZ-PS-tag with high Fc-binding onto polystyrene surface for controlled immobilization of capture antibodies[J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 776(9): 74-78.
- [10] KUMADA Y, OHIGASHI Y, EMORI Y, et al. Improved lectin

- ELISA for glycosylation analysis of biomarkers using PS-tag-fused single-chain Fv[J]. *J Immuno Methods*, 2012, 385(1): 15-22.
- [11] EVEN-DESRUMEAUX K, BATY D, CHAMES P. Strong and oriented immobilization of single domain antibodies from crude bacterial lysates for high-throughput compatible cost-effective antibody array generation[J]. *Mol Bio Syst*, 2010, 6: 2241-2248.
- [12] KUMADA Y, TOKUNAGA Y, IMANAKA H, et al. Screening and characterization of affinity peptide tags specific to polystyrene supports for the orientated immobilization of proteins[J]. *Biotechnol Progr*, 2006, 22(2): 401-405.
- [13] 刘儒平,王程,徐万帮,等. 基于生物素-亲和素放大的 SPR 传感器检测大肠杆菌研究[J]. *传感技术学报*, 2013, 26(6): 757-761.
- [14] 李超辉,熊勇华,郭亮,等. 纳米免疫磁珠富集猪肉中的盐酸克伦特罗[J]. *食品科学*, 2013, 34(14): 182-186.
- [15] 沙莎,殷赞,高晓莲,等. 基于核酸分子杂交的免疫芯片抗体固定新方法[J]. *分析化学*, 2013, 41(2): 199-204.
- [16] LIN P C, CHEN S H, WANG K Y, et al. Fabrication of oriented antibody-conjugated magnetic nanoprobe and their immunoaffinity application[J]. *Anal Chem*, 2009, 81(21): 8774-8782.
- [17] VIJAYENDRAN R A, LECKBAND D E. A quantitative assessment of heterogeneity for surface-immobilized proteins[J]. *Anal Chem*, 2001, 73(3): 471-480.
- [18] KOGOT J M, SARKES D A, VALADDO I, et al. Increased affinity and solubility of peptides used for direct peptide ELISA on polystyrene surfaces through fusion with a polystyrene-binding peptide tag[J]. *Biotechniques*, 2012, 52(2): 95-102.
- [19] BROGAN K L, WOLFE K N, JONES P A, et al. Direct oriented immobilization of F(ab') antibody fragments on gold[J]. *Anal Chim Acta*, 2003, 496(1): 73-80.
- [20] LEE W, OH B K, LEE W H, et al. Immobilization of antibody fragment for immunosensor application based on surface plasmon resonance[J]. *Surface B*, 2005, 40(3): 143-148.
- [21] WU S S, HUANG X, DU X Z. Glucose- and pH-responsive controlled release of cargo from protein-gated carbohydrate-functionalized mesoporous silica nanocontainers[J]. *Angew Chem Int Edit*, 2013, 52(21): 5580-5584.
- [22] OUERGI O, TOUHAMI A, JAFFREZIC-RENAULT N, et al. Impedimetric immunosensor using avidin - biotin for antibody immobilization[J]. *Bioelectrochemistry*, 2002, 56(1): 131-133.
- [23] CHO I H, PAEK E H, LEE H, et al. Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces[J]. *Anal Biochem*, 2007, 365(1): 14-23.
- [24] DUTRA R F, KUBOTA L T. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 376(1): 114-120.
- [25] 陈艺心,赵树铭. 蛋白质芯片构建技术的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(8): 989-991.
- [26] WACKER R, SCHRÖDER H, NIEMEYER C M. Performance of antibody microarrays fabricated by either DNA-directed immobilization, direct spotting, or streptavidin-biotin attachment; a comparative study[J]. *Anal Biochem*, 2004, 330(2): 281-287.
- [27] BOOZER C, LADD J, CHEN S, et al. DNA directed protein immobilization on mixed ssDNA/oligo (ethylene glycol) self-assembled monolayers for sensitive biosensors[J]. *Anal Chem*, 2004, 76(23): 6967-6972.
- [28] JUNG Y W, LEE J M, JUNG H G, et al. Self-directed and self-oriented immobilization of antibody by protein G-DNA conjugate[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(17): 6534-6541.
- [29] SCHROEDER H, ADLER M, GERIGK K, et al. User configurable microfluidic device for multiplexed immunoassays based on DNA-directed assembly[J]. *Anal Chem*, 2009, 81(3): 1275-1279.
- [30] HOFFMAN W L, O'SHANNESY D J. Site-specific immobilization of antibodies by their oligosaccharide moieties to new hydrazide derivatized solid supports[J]. *J Immunol Methods*, 1988, 112(1): 113-120.
- [31] O'SHANNESY D J, QUARLES R H. Specific conjugation reactions of the oligosaccharide moieties of immunoglobulins[J]. *J Appl Biochem*, 1985, 7(4/5): 347-355.
- [32] BATALLA P, FUENTES M, GRAZU V, et al. Oriented covalent immobilization of antibodies on physically inert and hydrophilic support surfaces through their glycosidic chains[J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9(2): 719-723.
- [33] PUERTAS S, MOROS M, FERNÁNDEZ-PACHECO R, et al. Designing novel nano-immunoassays: antibody orientation versus sensitivity[J]. *J Phys D Appl Phys*, 2010, 43(47): 474012.
- [34] 任志敏,聂熹,艾胜书. 保护蛋白对聚苯乙烯微珠表面抗体固定化的影响[J]. *长春工程学院学报(自然科学版)*, 2012, 13(4): 126-128.
- [35] 李莎. 基于聚苯乙烯微敏感元件的表面改性、抗体分子定向固定化及催化信号放大分析研究[D]. 厦门:厦门大学, 2013.
- [36] JOHNSON C P, JENSEN I E, PRAKASAM A, et al. Engineered protein A for the orientational control of immobilized proteins[J]. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14(5): 974-978.
- [37] 孟艳丽,王战会,靳刚. A 蛋白定向固定抗体用于椭圆光学生物传感器免疫检测[J]. *生物工程学报*, 2004, 20(1): 112-114.
- [38] PELUSO P, WILSON D S, DO D, et al. Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays[J]. *Anal Biochem*, 2003, 312(2): 113-124.
- [39] SOH N, TOKUDA T, WATANABE T, et al. A surface plasmon resonance immunosensor for detecting a dioxin precursor using a gold binding polypeptide[J]. *Talanta*, 2003, 60(4): 733-745.
- [40] OH B K, LEE W, KIM Y K, et al. Surface plasmon resonance immunosensor using self-assembled protein G for the detection of *Salmonella paratyphi*[J]. *J Biotechnol*, 2004, 111(1): 1-8.
- [41] LEE J M, PARK H K, JUNG Y, et al. Direct immobilization of protein G variants with various numbers of cysteine residues on a

- gold surface[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(7): 2680-2687.
- [42] NAKANISHI K, MUGURUMA H, KARUBE I. A novel method of immobilizing antibodies on a quartz crystal microbalance using plasma-polymerized films for immunosensors [J]. *Anal Chem*, 1996, 68(10): 1695-1700.
- [43] FASSINA G, VERDOLIVA A, PALOMBO G, et al. Immunoglobulin specificity of TG 19318: a novel synthetic ligand for antibody affinity purification [J]. *J Mol Recognit*, 1998, 11(16): 128-133.
- [44] JUNG Y, KANG H J, LEE J M, et al. Controlled antibody immobilization onto immunoanalytical platforms by synthetic peptide [J]. *Anal Biochem*, 2008, 374(1): 99-105.
- [45] YANG H O, GURGEL P V, CARBONELL R G J. Hexamer peptide affinity resins that bind the Fc region of human immunoglobulin G [J]. *Peptide Res*, 2006, 66(1): 120-137.
- [46] YANG H O, GURGEL P V, CARBONELL R G J. Purification of human immunoglobulin G via Fc-specific small peptide ligand affinity chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(6): 910-918.
- [47] 朱俐燕,白 姝,孙 彦,等. 肽配基纳米亲和载体定向固定化抗体[J]. *离子交换与吸附*, 2014, 30(3): 193-202.
- [48] 黄 波. 抗体亲和肽配基的理性设计和色谱表征[D]. 天津: 天津大学, 2011.
- [49] KUMADA Y, HAMASAKI K, SHIRITANI Y, et al. Efficient immobilization of a ligand antibody with high antigen-binding activity by use of a polystyrene-binding peptide and an intelligent microtiter plate [J]. *J Biotechnol*, 2009, 142(12): 135-141.
- [50] KUMADA Y, SHIRITANI Y, HAMASAKI K, et al. Novel solid-phase refolding method for preparation of scFv-immobilized polystyrene plates with high-antigen-binding activity [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398(3): 1295-1303.
- [51] KUMADA Y, HAMASAKI K, SHIRITANI Y, et al. Direct immobilization of functional single-chain variable fragment antibodies (scFvs) onto a polystyrene plate by genetic fusion of a polystyrene-binding peptide (PS-tag) [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(3): 759-765.
- [52] PRISYAZHNOY V S, FUSEK M, ALAKHOV Y B. Synthesis of high-capacity immunoaffinity sorbents with oriented immobilized immunoglobulins or their F ab' fragments for isolation of proteins [J]. *J Chromatogr B*, 1988, 424: 243-253.
- [53] LU B, XIE J, LU C, et al. Oriented immobilization of Fab' fragments on silica surfaces [J]. *Anal Chem*, 1995, 67(1): 83-87.
- [54] ZHANG X, TRETJAKOV A, HOVESTAEDT M, et al. Electrochemical functionalization of gold and silicon surfaces by a maleimide group as a biosensor for immunological application [J]. *Acta Biomater*, 2013, 9(3): 5838-5844.
- [55] MAKARAVICIUTE A, RAMANAVICIENE A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 50: 460-471.
- [56] 谭瑞芬,马雪梅. 生物传感器芯片抗体固定的方法研究现状 [J]. *北京生物医学工程*, 2014, 33(4): 434-438.
- [57] KANNO S, YANAGIDA Y, HARUYAMA T, et al. Assembling of engineered IgG-binding protein on gold surface for highly oriented antibody immobilization [J]. *J Biotechnol*, 2000, 76(2): 207-214.
- [58] DE JUAN-FRANCO E, CARUZ A, PEDRAJAS J R, et al. Site-directed antibody immobilization using a protein A-gold binding domain fusion protein for enhanced SPR immunosensing [J]. *Analyst*, 2013, 138(7): 2023-2031.
- [59] YUAN Y, HE H, LEE L J. Protein A-based antibody immobilization onto polymeric microdevices for enhanced sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102(3): 891-901.
- [60] 周稳稳,廉 洁,胡科家,等. 硅基芯片表面化学性质对蛋白质固定化的影响 [J]. *物理化学学报*, 2010, 26(10): 2821-2827.

(责任编辑:陈海霞)