

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.12.1533

• 技术方法 •

基于 AgI 模拟酶纳米材料构建阻抗型免疫传感器用于检测癌胚抗原

赵燕凌^{1,2}, 张 辉², 王效春², 谢鲜梅^{1*}

1. 太原理工大学化学化工学院, 太原 030024

2. 山西医科大学医学影像学系, 太原 030001

[摘要] **目的** 设计一种基于 AgI 模拟酶纳米材料的阻抗型免疫传感器, 对血清样品中的癌胚抗原(CEA)进行高灵敏检测。**方法** 合成一种壳聚糖修饰的碘化银(CS-AgI)纳米材料, 利用透射电镜(TEM)和傅里叶红外光谱(FTIR)法对合成的 CS-AgI 进行表征, 以 CS-AgI 为信号标记物修饰 CEA 抗体, 采用夹心式免疫分析法在金电极表面制备一种高效、灵敏的电化学免疫传感器, 采用电化学工作站定量分析检测所构建免疫传感器的电化学性能。**结果** 成功合成 CS-AgI 纳米颗粒, 颗粒呈球形, 粒径约为 100 nm。以 CS-AgI 纳米颗粒为信号标记物构建的免疫传感器在 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液中检测 CEA 时表现出良好的电化学性能, 其交流阻抗响应值与样品中的 CEA 浓度的对数呈线性增加趋势, 并在 CEA 浓度为 0.1~80 ng/mL 范围内展现出良好的线性关系($r=0.996$), 检测限达到 0.05 ng/mL。**结论** 基于 AgI 模拟酶纳米材料构建的阻抗型免疫传感器可以高灵敏检测 CEA, 同时具有较好的精确性、重现性和选择性, 为癌症的早期诊断和早期治疗提供了实验依据。

[关键词] 生物传感技术; 电化学免疫传感器; 电阻抗; 模拟酶; 纳米粒子; 壳聚糖; 碘化银; 癌胚抗原

[中图分类号] R 446.6-3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)12-1533-05

A novel impedimetric immunosensor based on AgI mimic enzyme nanomaterial for detecting carcinoembryonic antigen

ZHAO Yan-ling^{1,2}, ZHANG Hui², WANG Xiao-chun², XIE Xian-mei^{1*}

1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi, China

2. Department of Medical Imaging, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

[Abstract] **Objective** To design a novel impedimetric immunosensor based on AgI mimic enzyme nanomaterial for detecting carcinoembryonic antigen (CEA) in serum with high sensitivity. **Methods** A novel chitosan modified AgI (CS-AgI) nanomaterial was synthesized and was characterized by transmission electron microscope (TEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Then by utilizing CS-AgI labeled CEA antibody as tags, we prepared a novel impedimetric immunosensor on the gold electrode using the sandwich-type immunoassay. The electrochemical properties of the prepared impedimetric immunosensor were observed by electrochemical workstation and the concentration of CEA in sample was quantitatively analyzed. **Results** The synthesized CS-AgI nanoparticles were spherical in shape, with the particle size being 100 nm; the particles were employed to construct immunosensor as signal markers. The immunosensor had an excellent electrochemical performance in detection of CEA under PBS base solution of pH=7, and its AC impedance response increased with the increase of the logarithm of CEA concentration, exhibiting a good linear relationship in the range of 0.1 ng/mL to 80 ng/mL ($r=0.996$), with a detection limit of 0.05 ng/mL. **Conclusion** Based on AgI mimic enzyme nanomaterial, the impedance immunosensor prepared in this study shows a high sensitivity in detecting CEA; meanwhile, it has acceptable selectivity, repeatability and stability, providing an experimental evidence for early diagnosis and treatment of cancer.

[Key words] biosensing techniques; electrochemical immunosensor; electric impedance; mimic enzyme; nanoparticles; chitosan; silver iodide; carcinoembryonic antigen

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(12): 1533-1537]

近年来,癌症患者的医疗总支出已经导致经济资源的巨大流失。据统计,我国每年多达 1 500 亿

元用于对癌症的治疗(而不是预防上),每年死于癌症的人数超过 160 万,新发病例每年约 220 万人以

[收稿日期] 2016-10-06 **[接受日期]** 2016-12-07

[基金项目] 国家自然科学基金(50872086)。Supported by National Natural Science Foundation of China (50872086)。

[作者简介] 赵燕凌, 博士生。E-mail: yxyxxx@126.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 0351-6018534, E-mail: 1162110015@qq.com

上,癌症目前已是中国公共卫生的头号公敌^[1-2]。肿瘤标记物是肿瘤(癌)细胞本身存在或分泌的特异性物质,绝大多数存在于恶性肿瘤中,其中肿瘤表面抗原是研究进展较快的指标之一^[3-5]。癌胚抗原(CEA)是一个广谱性肿瘤标记物,能反映多种肿瘤的存在,对大肠癌、乳腺癌和肺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计均有良好的应用价值^[6]。因此,及时、准确地检测出血清中 CEA 的含量对肿瘤的预警及早期诊断具有重要意义。

免疫分析技术是以抗原-抗体的特异性结合为基础对肿瘤标记物进行定量检测的技术^[7-9]。该技术融合了传感技术的高灵敏性和免疫反应的高选择性,具有现场检测、选择性高、操作简便和价格低廉等优点,现已广泛应用于疾病分析和诊疗等领域。电化学免疫传感器是在免疫分析技术的基础上,以电信号作为信号放大技术所构建的,它具有易于微型化、灵敏度高、易于自动化控制等特点,是检测肿瘤标记物的有力工具。纳米材料因具有独特的性质,广泛应用于探索具有超高灵敏度、超高选择性的电化学免疫分析方法,其中模拟酶纳米材料是免疫分析方面研究的重要领域,对于提高分析方法的灵敏度与准确性至关重要^[10-12]。

本研究成功合成了碘化银(AgI)模拟酶纳米材料,并以其作为分子探针在电极表面构建夹心式免疫传感器。由于 AgI 的类过氧化酶活性可以催化四氯萘酚生成不溶物,使该不溶物沉积在电极表面,导致电极的电化学阻抗值增加,将其与肿瘤标记物建立对应关系,可用来检测 CEA 的浓度。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 多克隆鼠抗人 CEA 抗体(Ab, 3.0 mg/mL)和 CEA 购自 Sigma-Aldrich 公司;1-乙基-3,3-二甲基氨丙基碳化二亚胺(EDC)、壳聚糖(CS)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)均购自 Alfa 公司;牛血清白蛋白(BSA,纯度:96%)购自德国 Merck-Schuchardt 公司。其他试剂均为分析纯,实验用水均为二次蒸馏水。

CHI 660E 电化学工作站购自上海辰华仪器有限公司;工作电极金(Au)电极,对电极铂丝电极,参比电极 Ag/AgCl 均购自武汉高仕睿联有限公司;紫外可见分光光度计 UV-1800(1102 UV-vis)购自美析(中国)仪器有限公司;电子天平购自上海精密科学仪器

有限公司(FA2004);透射电子显微镜(TEM, H600)购自日本 Hitachi 公司;H2050R 高速台式冷冻离心机购自长沙湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 CS 修饰的 AgI(CS-AgI)纳米颗粒的制备与表征 CS-AgI 纳米颗粒参照 Chang 等^[13]的经典沉淀法合成获得。配制 0.1 mol/L 硝酸银(AgNO_3)水溶液、0.5% CS 水溶液和 0.15 mol/L 碘化钾(KI)水溶液,分别量取 AgNO_3 水溶液和 CS 水溶液各 20 mL,混合均匀,并在暗室中搅拌 30 min;随后逐滴加入 KI 水溶液,继续在暗室中搅拌 30 min,离心收集沉淀,二次蒸馏水清洗后超声清洗 3~5 min,再次离心;重复上述清洗工作 4~5 次,洗去多余离子,最终得到 CS-AgI 纳米颗粒。分别使用 TEM 和傅里叶红外光谱仪对合成的 CS-AgI 的形态和官能团进行表征。

1.3 Ab 和 CS-AgI 共轭复合物(Ab-CS-AgI)的制备 用传统的碳化二亚胺交联方法将 CS-AgI 纳米颗粒标记在 CEA 抗体上。取 2.2 mg NHS 和 3.0 mg EDC 溶解在 500 μL CS-AgI 纳米颗粒水溶液中,室温下持续搅拌 45 min;再加入 100 μL Ab,缓慢搅拌 12 h 使 Ab 和 CS-AgI 充分交联在一起。离心去除多余的 Ab 和试剂,将制备的 Ab-CS-AgI 纳米标记物分散在 1.0 mL 磷酸盐缓冲液(PBS; 0.1 mol/L, pH 7.4)中待用。

1.4 电化学免疫传感器分子探针的制备 Au 电极依次用 0.3 μm 和 0.05 μm 的氧化铝抛光粉打磨,再依次用丙酮、乙醇和水各超声清洗 5 min,在空气中自然晾干待用。在干净的 Au 电极表面滴涂 L-半胱氨酸(L-Cys),室温下孵育 4 h,使 L-Cys 通过金-硫(Au-S)键结合在电极表面;二次蒸馏水清洗后,把 L-Cys 功能化的 Au 电极浸泡在纳米金溶液中孵育 4 h,得到 Au/L-Cys/Au 电极,其中金纳米颗粒通过 Au-NH 键结合在电极表面。之后将 Au/L-Cys/Au 电极浸泡在 Ab 中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,制备得 Ab/Au/L-Cys/Au 电极;最后将获得的修饰电极浸入质量分数为 3.0% 的 BSA 溶液中孵育 60 min,消除电极的非特异性吸附并封闭剩余的活性位点。制备所得分子探针 Ab/Au/L-Cys/Au 电极保存在冰箱中待用。

1.5 电化学检测 所有的电化学检测均由上海辰华电化学工作站通过三电极系统采集得到。首先将上述制备的 Ab/Au/L-Cys/Au 电极在室温下分别置于不同浓度的 CEA (0.1、0.5、1、5、10、50、80 ng/mL)溶液中孵育 30 min,得到 CEA/Ab/Au/

L-Cys/Au 电极; 随后在 Ab-CS-AgI 溶液中孵育 30 min, 得到 Ab-CS-AgI/CEA/Ab/Au/L-Cys/Au 电极; 用二次蒸馏水清洗后, 采用交流阻抗法记录响应信号。进一步对上述电极进行催化反应, 在检测底液中加入过氧化氢(H_2O_2 , 5 mmol/L)和 4-氯-1-萘酚 (5 mmol/L), 将 Ab-CS-AgI/CEA/Ab/Au/L-Cys/Au 电极置于溶液中反应 10 min 后再记录交流阻抗值。交流阻抗实验(EIS)在 5.0 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ 溶液(含有 10 mmol/L KCl 作为支持电解质)中进行, 扫描电压频率变化范围 0.1 ~ 10 000 Hz。所有的电化学检测均在室温下进行, 测量 3 次取平均值。

2 结果和讨论

2.1 CS-AgI 纳米颗粒的表征

对制备所得 CS-AgI 纳米颗粒进行 TEM 及红外光谱分析, 由 TEM 图(图 1A)可见球形的 CS-AgI 纳米颗粒均匀分散在水溶液中, 直径约为 100 nm。通过红外光谱图(图 1B)可见, 在 3448 cm^{-1} 处有 1 个羟基的特征吸收峰, 同时在 1637 cm^{-1} 有 1 个酰胺基的特征吸收峰, 表明 CS 被成功修饰在 AgI 纳米材料的表面。

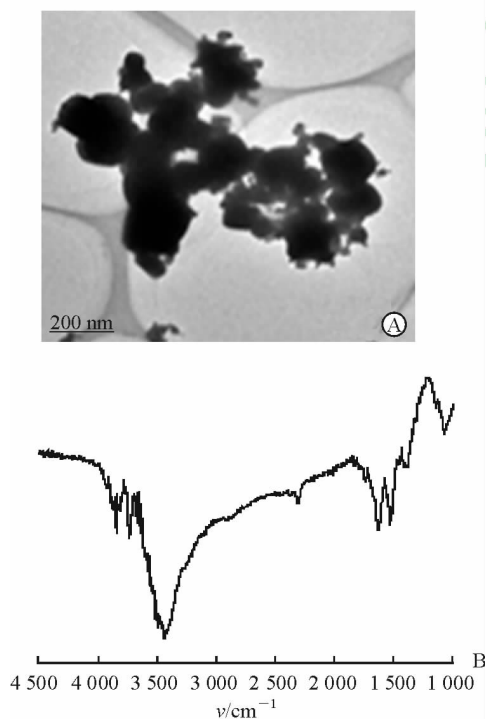


图 1 CS-AgI 纳米颗粒的透射电镜图(A)和红外光谱图(B)
Fig 1 TEM images (A) and infrared spectrogram (B) of CS-AgI nanoparticles

TEM: Transmission electron microscope; CS-AgI: Chitosan modified AgI

2.2 修饰电极的电化学特性

不同修饰电极的线性扫描循环伏安曲线如图 2A 所示。Au/L-Cys/Au (曲线 b) 电极的氧化还原峰值大于裸电极(曲线 a), 主要是由于纳米 Au 具有良好的导电性。当 Ab 和 CEA 分别依次固定在 Au/L-Cys/Au 电极表面后, Ab/Au/L-Cys/Au 电极(曲线 c) 和 CEA/Ab/Au/L-Cys/Au 电极(曲线 d) 的峰电流均逐渐下降, 其原因可能是抗原和抗体都是大分子蛋白质, 阻碍了电子的传递。然而, Ab-CS-AgI/CEA/Ab/Au/L-Cys/Au 电极(曲线 e) 显示出良好的电化学性能, 造成这种差异的原因可能是 CS-AgI 具有良好的导电性, 可以促进电子传递。

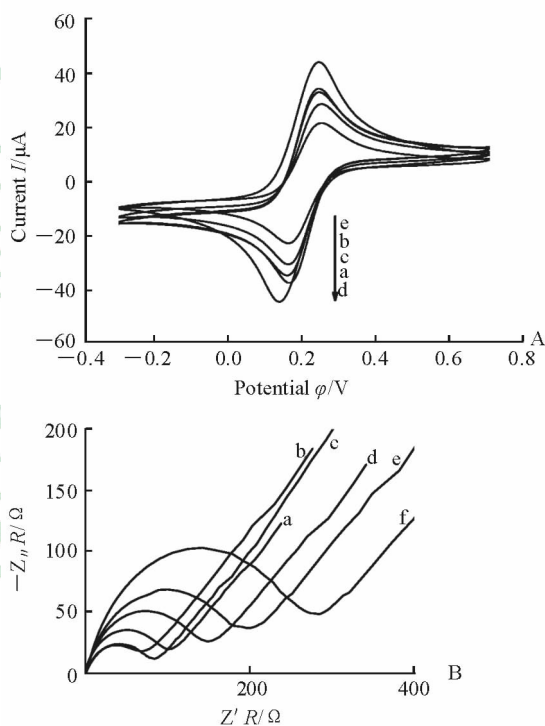


图 2 不同修饰电极的循环伏安曲线(A)和交流阻抗曲线(B)
Fig 2 The cyclic voltammety curve (A) and AC impedance curve (B) of different modified electrodes

a: Bare gold electrode; b: Au/L-Cys/Au; c: Ab/Au/L-Cys/Au; d: CEA/Ab/Au/L-Cys/Au; e: Ab-CS-AgI/CEA/Ab/Au/L-Cys/Au; f: Ab-CS-AgI/CEA/Ab/Au/L-Cys/Au catalyzed by 4-chloronaphthol

不同修饰电极的交流阻抗曲线(图 2B)与循环伏安曲线相对应, 随着对电极的每一步修饰, 电极的电化学阻抗发生了明显变化。同裸电极(曲线 a)相比, Au/L-Cys/Au 电极(曲线 b)的阻抗值减小, 而依次组装抗体抗原后的 Ab/Au/L-Cys/Au 电极(曲线 c) 和 CEA/Ab/Au/L-Cys/Au 电极(曲线 d) 的阻

抗增大;当捕获二抗固定到电极上后,Ab-CS-AgI/CEA/Ab/Au/L-Cys/Au 电极(曲线 e)的阻抗值减小,这是由于 CS-AgI 作为导电性物质促进了电子的传递所致。发生催化反应后,电极阻抗(曲线 f)进一步增加,其原因可能是 AgI 可以在 H₂O₂ 存在的条件下催化四氯萘酚并生成不溶物沉积在电极表面,阻碍电子的传递,导致阻抗增大。

2.3 阻抗型电化学免疫传感器制备过程中实验条件的优化 免疫传感器的性能受到 pH 的影响。考察 pH 5.5~8.5 的 5 mmol/L K₃Fe(CN)₆ 溶液中传感器的阻抗响应情况,在 pH 5.5~7.0 范围内,传感器的阻抗随 pH 增大而增大;而 pH 为 7.0~8.5 时,阻抗值逐渐减小(图 3A)。由于 pH 能影响 CS 的溶解性(pK_a≈6.3),当溶液 pH<pK_a 时,CS 易溶解,而 pH 较高又会破坏其膜的结构,因此本实验中检测底液 PBS 的 pH 为 7.0。

温度对生物蛋白质分子的活性也有重要影响,考虑到传感器在未来的实际应用,本实验选择在室温(25.0±0.5)℃下进行。抗原-抗体的孵育时间也影响传感器的性能,孵育时间在 10~30 min 内时,传感器的阻抗值随时间的增加而增大,这是由于随着时间的推移抗原与抗体的结合量逐渐增大,因而阻抗明显增加。抗原-抗体孵育时间在 30 min 之后传感器的阻抗响应值趋于平衡(图 3B),表明抗原和抗体的结合达到了饱和。因此选择抗原-抗体的孵育时间为 30 min。

2.4 CEA 的电化学阻抗谱测定 通过检测不同浓度的 CEA 来考察构建的阻抗型电化学免疫传感器的性能,结果(图 4)可见电化学免疫传感器的交流阻抗响应值与 CEA 浓度(C_{CEA})的对数呈线性正相关,C_{CEA} 在 0.1~80 ng/mL 范围内其对数值与阻抗差值 ΔR_{ct}(ΔR_{ct}=响应阻抗值-背景阻抗值)呈现出较好的线性关系,线性回归方程为 ΔR_{ct}=358.9+230.6 lg C_{CEA}(r=0.996),检测限为 0.05 ng/mL。实验结果表明该阻抗型免疫传感器具有较宽的线性测量范围和较低检测限。同时将该方法与传统的酶联免疫吸附分析(ELISA,检测限为 5 ng/mL)^[14]、放射免疫分析(RIA,检测限为 5 ng/mL)^[14]和化学发光法(ICA,检测限为 0.5 ng/mL)^[15]进行对比,可发现该阻抗型免疫传感器在进行 CEA 检测时具有较低检测限。

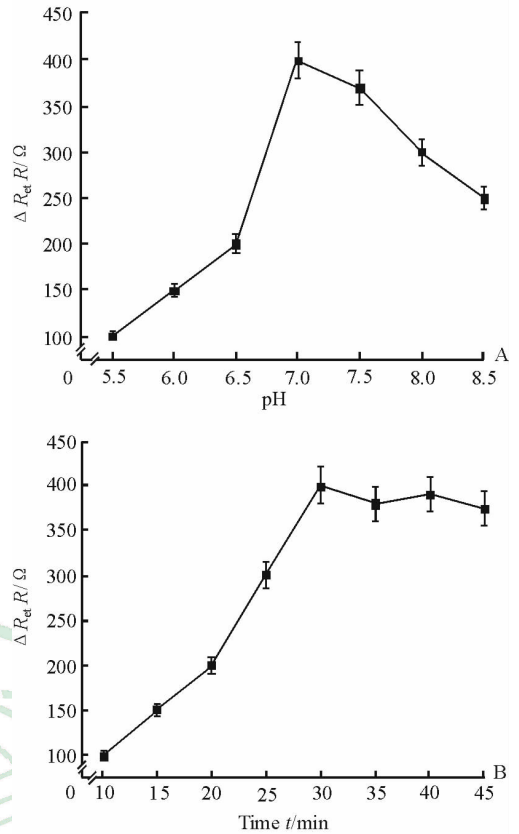


图 3 电化学免疫传感器制备过程中 pH(A)和孵育时间(B)优化结果

Fig 3 The optimization of pH (A) and incubating time (B) during the preparation of electrochemical immunosensor
ΔR_{ct}: The difference between response and background impedance values. n=3, $\bar{x} \pm s$

2.5 阻抗型电化学免疫传感器的重现性、稳定性和特异性 可靠性、重现性、稳定性和选择性对于电化学免疫传感器性能的评价非常重要。本实验分别用批间和批内两种方法考察电化学免疫传感器的重现性。分别取同一批次和不同批次制备的 4 根电极测定 0.5 ng/mL 的 CEA 标准样品,每个样品平行测定 5 次,结果可见批次内及批次间的相对标准偏差分别为 5.7%和 8.6%,表明构建的免疫传感器具有可重复性。此外,将制备的免疫传感器在 4℃ 的条件下保存 20 d 后再次检测,结果发现该传感器仍可以保留 95% 的电化学活性,表明构建的免疫传感器稳定性高。

免疫传感器构建的原理是利用抗原-抗体的结合实现其识别功能,结合方式的特异性赋予了免疫传感器独特的选择性。本实验以溶液中的小分子元素或人体中的其他蛋白质作为干扰成分,如 Mg²⁺、Cl⁻、葡萄糖(Glu)、甲胎蛋白(AFP)、前列腺特异抗原(PSA)、IgG 和 K⁺ 等,对构建的免疫传感器进行了特异性分析,结果发现只有 CEA 有响应。表明该免疫传感器

能够用于检测特定的免疫分析物, 选择性良好。

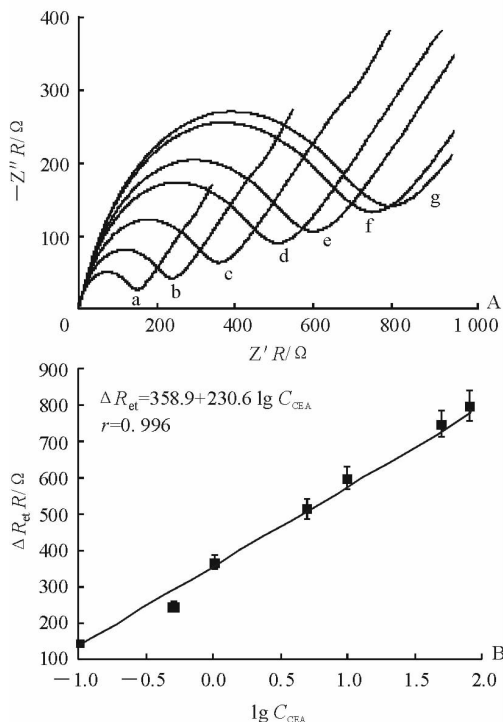


图 4 电化学免疫传感器对不同浓度 CEA 的阻抗曲线(A)和线性工作曲线(B)

Fig 4 Impedance curves (A) and linear working curve (B) of sensor referring to different concentrations of CEA

a-g: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, and 80 ng/mL CEA, respectively.

ΔR_{et} : The difference between response and background impedance values. CEA: Carcinoembryonic antigen. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

3 结论

本实验主要以 CS-AgI 标记的 CEA 抗体作为分子信标, 构建了一种可行的阻抗型免疫传感器, 用于检测 CEA。和常规的酶标记抗体相比, AgI 纳米颗粒表现出了优异的类过氧化物酶活性, 此外, 酶具有易改性、易失活的特点, 而纳米材料可以避免这些缺陷。为进一步开放该免疫传感器的应用, 我们未来将更加注重对其他目标蛋白和生物实际样品的分析。

[参考文献]

[1] CHEN W, ZHENG R, BAAD P, ZHANG S, ZENG H, BRAY F, et al. Cancer statistics in China 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66: 115-132.

[2] PAVLOU M, DIAMANDIS E. The search for new prostate cancer biomarkers continues [J]. Clin Chem 2009, 55: 1277-1279.

[3] ZHANG B, DING C. Displacement-type amperometric immunosensing platform for sensitive determination of tumour markers [J]. Biosens Bioelectron, 2016, 82:

112-118.

- [4] CHANG H, ZHANG H, LÜ J, ZHANG B, WEI W, GUO J. Pt NPs and DNzyme functionalized polymer nanospheres as triple signal amplification strategy for highly sensitive electrochemical immunosensor of tumour marker [J]. Biosens Bioelectron, 2016, 86: 156-163.
- [5] HONG W, LEE S, CHO Y. Dual-responsive immunosensor that combines colorimetric recognition and electrochemical response for ultrasensitive detection of cancer biomarkers [J]. Biosens Bioelectron, 2016, 86: 920-926.
- [6] 杨长成, 王文涓, 高峰. 癌胚抗原相关黏附分子 1 与肿瘤 [J]. 检验医学, 2014, 29: 877-883.
- [7] 刘红英, 朱俊杰. 金纳米簇信号放大的电化学免疫传感器 [J]. 分析化学, 2013, 41: 658-663.
- [8] 刘仪, 刘婷知, 胡蓉, 白茹燕, 张坤蕾, 郑丽, 等. 基于 Ag-Pt 纳米颗粒标记型 C-反应蛋白免疫传感器的研制 [J]. 云南大学学报, 2015, 37: 888-895.
- [9] 陈学梅, 谢爱娟, 孔泳, 杨艳伟, 丁小峰, 周民. 基于聚吡咯修饰膨胀石墨电极的甲胎蛋白电化学免疫传感器 [J]. 分析化学, 2013, 41: 1199-1203.
- [10] 王广凤, 朱艳红, 陈玲, 王伦. 功能性纳米材料在电化学免疫传感器中的应用 [J]. 分析化学, 2013, 41: 608-615.
- [11] 董秀秀, 王宇, 沈玉栋, 孙远明, 王弘, 雷红涛, 等. 基于新型纳米材料的电化学免疫传感器及其在食品安全检测中的应用进展 [J]. 中国食品学报, 2015, 15: 136-146.
- [12] LI M, WANG P, LI F, CHU Q, LI Y, DONG Y. An ultrasensitive sandwich-type electrochemical immunosensor based on the signal amplification strategy of mesoporous core-shell Pd@Pt nanoparticles/amino group functionalized graphene nanocomposite [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 87: 752-759.
- [13] CHANG H, LÜ J, ZHANG H, ZHANG B, WEI W, QIAO Y. Photoresponsive colorimetric immunoassay based on chitosan modified AgI/TiO₂ heterojunction for highly sensitive chloramphenicol detection [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 87: 579-586.
- [14] 陈灿峰, 郑定容, 周伟. ICA 和 RIA 及 ELISA 法测定 CEA 的比较 [J]. 实用医技杂志, 2008, 15: 1390-1391.
- [15] HOU J Y, LIU T C, LIN G F, LI Z X, ZOU L P, LI M, et al. Development of an immunomagnetic bead-based time-resolved fluorescence immunoassay for rapid determination of levels of carcinoembryonic antigen in human serum [J]. Anal Chim Acta, 2012, 734: 93-98.