

基于碳纳米管的脂质体电化学 发光免疫传感器检测人免疫球蛋白 G

李玲 王海燕* 孙东艳 龚武 王伦*

(安徽师范大学化学与材料科学学院, 安徽省生物传感省级重点实验室, 芜湖 241000)

摘 要 将人免疫球蛋白 G (hIgG) 抗体固定在多壁碳纳米管修饰的玻碳电极表面, 制备了一种电化学发光 (ECL) 免疫传感器。以 hIgG 抗体标记的联吡啶钌脂质体为标记物, 采用三明治型检测方式, 成功建立了 hIgG 的 ECL 免疫检测技术。电化学发光强度与 hIgG 的浓度在 0.01 ~ 0.8 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性关系; 线性回归方程为 $y = 618.7x (\mu\text{g/L}) - 23.9 (n=6, r=0.995)$; 检出限为 0.004 $\mu\text{g/L}$ 。用于人血清中 hIgG 的检测, 结果令人满意。

关键词 电化学发光; 碳纳米管; 脂质体; 免疫传感器; 人免疫球蛋白 G

1 引言

电化学发光免疫分析是以电化学发光试剂为标记物, 利用抗原与抗体之间的特异性免疫反应, 对抗体或抗原进行电化学发光检测的一种免疫分析方法。因其具有无放射性、灵敏度高、线性范围宽、操作简便、易标记、可实现在线活体分析等优点而备受关注, 在免疫分析研究中发挥着越来越重要的作用^[1]。

脂质体是一种生物模拟膜, 已经应用于很多领域^[2~4]。它在形成过程中能包裹水及其中的溶质分子, 且其表面还可以连接抗原或抗体等生物大分子。脂质体裂解, 释放出的标记物量与抗原抗体的量成正比, 据此建立了脂质体免疫分析方法。本方法不仅保持了传统免疫分析高度专一性和高效性的优点, 且由于其包封或吸附了大量的信号物质, 故能极大地增强响应信号^[5~7]。因此, 脂质可作为标记物的载体用于构建灵敏的免疫传感器。

碳纳米管常用于传感器的构建, 其尺寸小, 比表面积大, 表面原子配位不足, 导电性能好, 因而具有很高的反应活性, 能促进电子传递^[8,9]。常作为电化学反应中的电子传递媒介体, 在电化学^[10]和生物传感器^[11,12]领域广泛应用。

本研究基于多壁碳纳米管构建了用于检测人免疫球蛋白 G (hIgG) 的电化学发光免疫传感器。利用抗体-抗原的特异性反应, 使固定在玻碳电极上的抗体与 hIgG 及抗体标记的联吡啶钌脂质体形成三明治型结构, 再以 Triton X-100 为破乳剂打开脂质体, 通过电化学发光检测释放出的联吡啶钌^[13], 从而实现对人血清中 hIgG 的免疫分析。利用此免疫传感器对人血清中 hIgG 的含量进行检测, 结果令人满意。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CHI760 电化学工作站 (上海辰华仪器公司); IFFM-E 型流动注射化学发光分析仪 (西安瑞迈分析仪器有限公司); 三电极体系: 玻碳电极为工作电极, Ag/AgCl 为参比电极, 铂丝为对电极。

联吡啶钌 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Aldrich 公司); 聚乙烯亚胺 (PE, Aladdin 公司); 牛血清白蛋白 (BSA, 长沙欧迈生物科技有限公司); 戊二醛, 人免疫球蛋白 G (hIgG), 羊抗人 hIgG, 大豆卵磷脂, 胆固醇 (合肥博美生物科技有限责任公司); 脑磷脂 (美国 Sigma 公司); 透析袋 (截留分子量 8000 ~ 14000, 北京索莱宝生物科技有限公司); 2-(二丁基氨基)乙醇 (DBAE, Tokyo Kasei 公司); 多壁碳纳米管 (MWCNTs, 纯度 >95%, 直径 20 ~ 40 nm, 长度 5 ~ 15 μm , 深圳市纳米港有限公司); 其它试剂均为分析

2009-12-17 收稿; 2010-03-15 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20705002) 及教育部留学回国人员科研启动基金资助项目

* E-mail: hywang@mail.ahnu.edu.cn; wanglun@mail.ahnu.edu.cn

纯,实验所用水为二次亚沸蒸馏水。

2.2 实验方法

2.2.1 免疫传感器的制备 将 MWCNTs 于浓 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$ (3:1, V/V) 混合溶液中,超声 6 h 后,以水离心清洗至中性。再将处理过的 MWCNTs 超声分散于 1% 聚乙烯亚胺(PEI)中,即得 MWCNTs-PEI 分散液^[14]。

玻碳电极依次用 0.3 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 粉末抛光,超声清洗,氮气吹干。滴加 10 μL MWCNTs-PEI 溶液,晾干后滴加 10 μL 2.5% 戊二醛进行孵化,清洗后与 10 μL 100 mg/L hIgG 抗体孵化过夜^[15],最后用 10 μL 1% BSA 孵化 1 h,以封闭电极表面过量的活性位点,即制得 hIgG 免疫传感器。

2.2.2 抗体标记脂质体的制备 根据文献[16],以一定比例称取大豆卵磷脂、脑磷脂和胆固醇,加入适量氯仿溶解,在 25 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴中,减压旋转蒸发除去有机溶剂。然后加入 $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ 及磷酸盐缓冲溶液(PBS) 60 $^\circ\text{C}$ 常压旋转溶胀。利用超声及挤压处理使其大小均一,渗析除去游离 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 。然后加入 2% 戊二醛,室温孵化 2 h,再次渗析除去过量的戊二醛,再加入 hIgG 抗体进行孵化,即制得抗体标记脂质体。

2.2.3 免疫反应及电化学发光检测 制得的免疫传感器先与不同浓度的 hIgG 室温孵化 40 min,然后用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4) 和水充分清洗,以除去非特异性吸附的 hIgG,再滴加 10 μL 抗体-脂质体于传感器上,室温孵化 40 min 后,再用上述 PBS 和水充分清洗,除去非特异吸附的脂质体,形成三明治型免疫复合体。最后滴 10 μL 1% Triton X-100 作为破乳剂打开脂质体,释放出 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$,再在含有 20 mmol/L DBAE 的 0.1 mol/L PBS(pH 7.5)^[17] 中进行电化学发光检测。每次测定后,传感器在甘氨酸-HCl(pH 2.8) 中浸泡 5 min,再生处理后进行下一次的测定^[18]。

3 结果与讨论

3.1 电极修饰过程的表征

采用电化学阻抗和循环伏安法对该电化学发光免疫传感器组装过程进行了表征。如图 1 所示,当玻碳电极表面修饰了 MWCNTs-PEI 后,电极阻抗减小,同时相应的循环伏安曲线中峰电流增大。这是由于碳纳米管具有良好的导电性和较大的比表面积,可促进电子的传递。随着进一步的组装,电极的阻抗值逐渐增大,峰电流也逐渐减小。这是因为所组装的物质(抗体等)的绝缘性阻碍了电子传递,从而使阻抗依次增大,也说明电极每一步组装成功。

3.2 实验条件的优化

3.2.1 免疫反应时间对 ECL 的影响 考察了抗原的免疫反应时间对 ECL 强度的影响。结果表明,当 hIgG 的孵化时间从 10 min 延长到 40 min, ECL 强度逐渐增加,当孵化时间大于 40 min 后, ECL 强度基本保持不变,说明当孵化时间为 40 min 时,抗原与电极表面抗体之间的特异性结合基本完成。因此 hIgG 的孵化时间选择 40 min。

3.2.2 测量参数对 ECL 的影响

考察了扫描速度及检测液的 pH 值和 DBAE 浓度对 ECL 信号的影响。当扫速从 10 mV/s 逐渐增加到 100 mV/s 时, ECL 强度迅速增大;当扫速增大到 150 mV/s 时, ECL 信号仅略有增加,然后随着扫速增大而减小,故本实验扫描速度选择 100 mV/s。当 DBAE 的浓度为 20 mmol/L, pH 7.5, ECL 强度达到最大,所以选择含有 20 mmol/L DBAE 的 PBS(pH 7.5) 作为检测液。

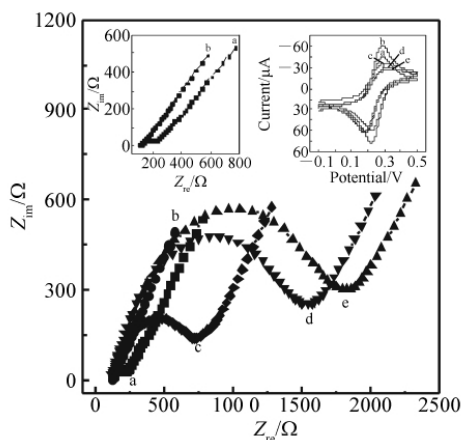


图 1 经过不同修饰的玻碳电极在含有 5 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的 10 mmol/L PBS 中的电化学阻抗图 (A) 和循环伏安曲线(插图 B)

Fig. 1 Nyquist plots (A) and cyclic voltammograms (inset B)

a. 裸玻碳电极 (Bare GCE); b. MWCNTs-PEI 修饰电极 (MWCNTs-polymetheleneamine, PEI) /GCE; c. 与戊二醛孵化后的电极 (GA/MWCNTs-PEI/GCE); d. 修饰有 hIgG 抗体的电极 (Ab/GA/MWCNTs-PEI/GCE); e. BSA 钝化后的电极 (Blocked with 1% BSA)。

3.3 hIgG 的检测

3.3.1 线性范围及检出限 在最佳实验条件下,对不同浓度的 hIgG 进行了检测。如图 2 所示,ECL 强度随 hIgG 浓度的增加而增大,hIgG 浓度在 0.01 ~ 0.8 $\mu\text{g/L}$ 范围内,与其呈良好的线性关系。线性回归方程为 $y = -23.9 + 618.7x$ ($\mu\text{g/L}$, $n = 6$)。相关系数 $r = 0.995$ 。检出限为 0.004 $\mu\text{g/L}$,比文献 [19] (检出限为 5.0 pmol/L,约 0.8 $\mu\text{g/L}$) 低两个数量级,说明本方法具有更高的灵敏度。

3.3.2 实际血样中 hIgG 的检测 取正常人血清用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 稀释 (约 2.5×10^7 倍) 至检测线性范围内后,按上述方法测定其中 hIgG 的含量,测量结果均在正常人血清中 hIgG 含量的范围内 (8 ~ 14 g/L)。另外用标准加入法测定回收率 (表 1)。结果表明,本方法可用于实际样品的检测。

表 1 人血清中 hIgG 检测结果
Table 1 Determination results of hIgG in human serum using proposed immunosensor

血清 Serum Sample	检出量 hIgG content (g/L)	hIgG 加入量 hIgG added (g/L)	hIgG 测得量 hIgG found (g/L)	回收率 Recovery (%)
1	9.0	7.5	15.8	95.8
2	10.5	7.5	18.5	102.0
3	8.2	7.5	15.2	96.8

3.4 小结

本研究构建了一种简单灵敏的电化学发光免疫传感器。采用夹心型模式对 hIgG 进行了检测。此传感器利用多壁碳纳米管大的比表面积和良好的导电性,结合脂质体放大信号的优点,极大地提高了灵敏度。此免疫传感器检出限低,稳定性好,可望用于其它生化物质的检测。

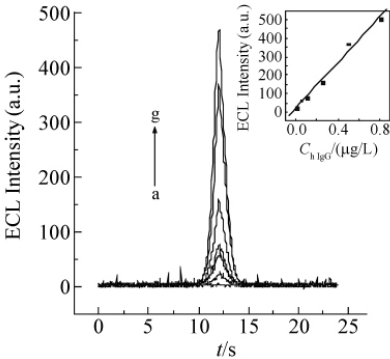


图 2 不同浓度 hIgG 与 ECL 强度的关系图
Fig. 2 ECL response obtained from the immunosensor and (inset) calibration curve for hIgG determination. (a) 0, (b) 0.01, (c) 0.05, (d) 0.1, (e) 0.25, (f) 0.5, (g) 0.8 $\mu\text{g/L}$ hIgG
电位 (Potential): 0 ~ 1.2 V vs. Ag/AgCl; 扫速 (Scan rate): 100 mV/s; PMT: 800 V.

References

1 Tian D Y, Duan C F, Wang W, Li N, Zhang H, Cui H, Lu Y Y. *Talanta*, **2009**, 78(2): 399 ~ 404
2 Nicolas R, Hoyle N R, Ecert B. *Clin. Chem.*, **1996**, 42(9): 1576 ~ 1578
3 LI Ting(李庭), ZENG Guang-Ming(曾光明), TANG Lin(汤琳), GAO Hui(高慧), LI Jian-Bing(李建兵). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(1): 122 ~ 126
4 JIANG Hua(姜华), GAO Yuan(高原), YANG Jing-Ming(杨景明). *Contemporary Medicine* (当代医学), **2009**, 15(28): 12 ~ 13
5 Lital A, Anup K S, Willner I. *Anal. Chem.*, **2001**, 73(1): 91 ~ 102
6 Viswanathan S, Wu L C, Huang M R, Ho J A. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(4): 1115 ~ 1121
7 Ho J A, Hung C H. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(16): 6405 ~ 6409
8 Odom T W, Huang J L, Kim P, Lieber C M. *Nature*, **1998**, 391(6662): 62 ~ 64
9 Ago H, Kugler T, Cacialli F, Salaneck W R, Shaffer M S P, Windle A H. *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103(38): 8116 ~ 8121
10 Wang J, Tangkuaram T, Loyprasert S, Alvarez V T, Veerasai W, Kanatharana P, Thavarungkul P. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 581(1): 1 ~ 6
11 Timur S, Anik U, Odaci D, Gorton L. *Electrochem. Comm.*, **2007**, 9(7): 1810 ~ 1815
12 ZHANG Xu-Zhi(张旭志), ZHAO Chang-Zhi(赵常志), JIAO Kui(焦奎), LI Shuang-De(李双德). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(2): 197 ~ 200
13 LI Hai-Juan(李海娟), HAN Shuang(韩双), HU Lian-Zhe(胡连哲), XU Guo-Bao(徐国宝). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(11): 1557 ~ 1565
14 Jie G F, Zhang J J, Wang D C, Cheng C, Chen H Y, Zhu J J. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(11): 4033 ~ 4039

- 15 Liu Y, Wang H X, Huang J Y, Yang J, Liu B H, Yang P Y. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 650(1): 77 ~ 82
- 16 Zheng Y, Jiang J H, Yu R Q. *Talanta*, **2008**, 77(2): 809 ~ 814
- 17 Liu X Q, Shi L H, Niu W X, Li H J, Xu G B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46(3): 421 ~ 424
- 18 Tang D P, Ren J J. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(21): 8064 ~ 8070
- 19 Zhong Z Y, Li M X, Xiang D B, Dai N, Qing Y, Wang D, Tang D P. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 24(7): 2246 ~ 2249

Electrochemiluminescence Immunosensor Based on Carbon Nanotubes and Liposomes for Detection of Human Immunoglobulin G

LI Ling, WANG Hai-Yan*, SUN Dong-Yan, GONG Wu, WANG Lun*

(Anhui Key Laboratory of Chemo-biosensing, College of Chemistry and Materials Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000)

Abstract A simple and sensitive electrochemiluminescence (ECL) immunosensor was fabricated by immobilizing goat-anti-human immunoglobulin G (hIgG) antibody on a multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) modified glassy carbon electrode. The hIgG antigen and antibody-tagged liposome can be sequentially bound on the immunosensor through antigen-antibody specific interaction, forming a sandwich-type immunocomplex. The ECL intensity of the immunosensor increased linearly with the hIgG concentration from 0.01 to 0.8 $\mu\text{g/L}$ with a detection limit of 0.004 $\mu\text{g/L}$ ($S/N=3$). The immunosensor mentioned above was successfully applied for the detection of hIgG in human serum.

Keywords Electrochemiluminescence; Carbon nanotubes; Liposome; Immunosensor; Human immunoglobulin G

(Received 17 December 2009; accepted 15 March 2010)

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

《分析测试学报》

国内刊号: CN 44-1318/TH

国际标准刊号: ISSN 1004-4957

国际刊名化代码 CODEN: FCEXES

邮发代号: 46-104

国外代号: BM 6013

广告经营许可证: 440000100186

《分析测试学报》是由中国分析测试协会、中国广州分析测试中心共同主办的全国性学术刊物,中文核心期刊。刊登质谱学、光谱学、色谱学、波谱学、电化学、电子显微学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术的研究成果,介绍新仪器装置及在生物、医药、化学化工、商检、食品检验等方面实用性强的实验技术。适合科研院所、高等院校、检测机构、医药、卫生以及厂矿企业分析测试工作和管理人员阅读。

经过多年的发展,本刊已成为国内知名的化学类核心期刊。2006年,影响因子在全国分析学科刊物排名中列第1名,被引频次每年递增约30%,稿源丰富,基金论文比超过70%。近几年,本刊刊发的论文被CA(美国化学文摘)收录率达94%,2006年引文频次在CA千种表中国部分中列第38名,并被国际上其它知名的数据库如日本科技文献速报、俄罗斯文摘、英国分析文摘(AA)、《质谱公报》等收录。在《中文核心期刊要目总览》2008年版的化学类期刊列第10位;进入由全国8000种期刊遴选出的500种科技期刊组成的“中国科技期刊精品数据库”;中国学术期刊综合评价数据库(CA-JCED)统计刊源;中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊);《中国科学引文数据库》来源期刊;中国期刊全文数据库(CJFD)收录期刊;《中国核心期刊(遴选)数据库》收录;《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊;《中国期刊网》全文收录期刊;《中国学术期刊文摘(中、英文版)》收录为源期刊等。

本刊为月刊,国内外公开发行人。大16开,单价:12.00元/册,全年144元。请在全国各地邮局订阅。未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。补订办法:请从邮局汇款至广州市先烈中路100号《分析测试学报》编辑部,邮编:510070,写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数(全年或某期),电话:(020)87684776或37656606,http://www.fxcsxb.com(可在线投稿),E-mail:fxcsxb@china.com。