

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00258

基于酪胺信号放大的新型免疫传感器

刘梦琴^{*1} 蒋健晖² 冯泳兰¹ 黄勇² 沈国励² 俞汝勤²

¹ (衡阳师范学院化学与材料科学系功能金属有机材料湖南省重点实验室, 衡阳 421008)

² (湖南大学化学化工学院化学生物传感与计量学国家重点实验室, 长沙 410082)

摘要 将酪胺应用于酶联免疫分析,建立了一种新的高灵敏伏安型免疫传感器。利用纳米金的静电吸附和己二硫醇、巯基乙胺的自组装,将羊抗人 IgG 抗体固定到金电极表面上,以辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG 抗体为酶标抗体,以生物素化酪胺为酶底物,利用催化酪胺沉积反应,在传感界面沉积大量生物素,使原始信号得到几何级数的放大。结果表明,通过生物素化酪胺催化放大后,制得的免疫传感器对 H₂O₂ 的催化能力增大近 20 倍,检测 hIgG 在 1.5 μg/L ~ 22 mg/L 范围内有良好的线性关系,检出限为 0.1 μg/L。用于实际试样的回收率的测定,结果良好。

关键词 电化学酶联免疫传感器; 信号放大; 酪胺氧化沉积; 生物素; 纳米金

1 引言

酶联免疫分析法是将酶催化反应的放大作用和抗原抗体亲和反应的专一性、特异性相结合,以酶标记的抗原或抗体为主要试剂的免疫测试方法,具有很高的灵敏度和选择性^[1~4]。近年来,关于信号放大酶联免疫传感器的研究多采用安培型或伏安型免疫传感器^[5~7]。本研究将酪胺应用于酶联免疫分析,建立了一种新的高灵敏伏安型免疫传感器。酪胺,又名对羟基苯乙胺,是一类含氮低分子的生物胺,对动植物和微生物有重要的生理作用,具有易发生氧化的特性^[8,9]。酪胺信号放大的主要原理是将酪胺盐 (Tyramine) 交联上生物素,利用辣根过氧化物酶 (HRP) 在 H₂O₂ 存在下催化酪胺盐,形成共价键结合位点,将大量的生物素沉积在要放大的信号位点上。当滴加亲和素化的 HRP (Avidin-HRP) 复合物时,因在信号上存在许多生物素,大量 HRP 沉积在信号周围,使原始信号得到几何级的放大。生物素为小分子化合物,分子量 244。亲和素与生物素有极高的亲和力,结合牢固,而且特异性高,每个亲和素可结合 4 个生物素,用小分子生物素与 HRP 酶标记的亲和素发生特异性反应,可减小抗原抗体反应的空间位阻,使反应明显放大。

近年来,利用纳米粒子的高比表面积和对电活性物质的催化特性,将纳米粒子引入电化学免疫传感器的研究已引起了人们的关注^[10,11]。金纳米粒子有着很好的电子传导和化学稳定等特性,可以强烈地吸附蛋白质抗体。纳米金还能降低一些物质在电极上发生反应的氧化还原的电位,并催化这些物质在电极上的电化学氧化还原反应,广泛应用于分析和化学传感领域^[12~14]。

本研究利用纳米金的静电作用和己二硫醇、巯基乙胺的自组装,将羊抗人 IgG 抗体固定到金电极表面上,以辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG 抗体为酶标抗体,将生物素化酪胺、亲和素化的 HRP 酶信号放大引入反应体系,用夹心法进行 hIgG 抗原测定,灵敏度明显提高。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CHI760B 电化学工作站 (美国 CHI 公司); 三电极工作体系:工作电极为金电极 (d = 1 mm),对电极为铂电极,参比电极为饱和甘汞电极 (SCE); pH S-3C 型精密酸度计 (上海雷磁仪器厂); 78-1 型磁力加热搅拌器 (山东鄞城华鲁电热仪器有限公司)。用超高速离心机 (Beckman) 浓缩胶体金溶液。

2009-06-22 收稿; 2009-10-08 接受

本文系国家自然科学基金项目 (No. 20205005)、新世纪优秀人才支持计划基金 (No. NCET-04-0768)、湖南省重点学科建设项目和湖南省教育厅科研计划项目 (No. 07C162) 资助

* E-mail: liumengqin2004@yahoo.com.cn

hIgG 抗原、羊抗人 IgG 抗体、HRP 标记羊抗人 IgG 抗体、HRP 标记的亲合素(北京中杉金桥生物技术公司);牛血清白蛋白(BSA,中国医药公司北京采购供应站);血浆蛋白成分参考血清(上海生物制品研究所);生物素-N-羟基丁二酸亚胺酯(BNHS)、酪胺、己二硫醇、巯基乙胺(Sigma公司);N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、对苯二酚(西安化学试剂厂);戊二醛(上海化学试剂公司);氯金酸(上海生化试剂厂)。0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.40),所有水溶液均以二次蒸馏水配制。

2.2 胶体纳米金的制备

所有用于纳米金制备的玻璃仪器及聚四氟乙烯搅拌棒均用新制王水清洗,再用水冲洗后烘干备用。参照文献[15]制备胶体金:在 500 mL 三口烧瓶中加入 250 mL 水,再加入 2.5 mL 1% HAuCl₄,在电炉上加热至沸腾后,快速加入 4.4 mL 1% 柠檬酸钠。溶液在 2~3 min 内其颜色由淡黄色蓝色酒红色逐渐变化,然后继续保持沸 10~15 min,移走热源,在室温下继续搅拌至冷却,定容至 200 mL,置 4℃ 冰箱冷藏备用。用该法制得的纳米金颗粒的直径约为 13 nm。

吸附固定抗体时,可将纳米金胶体溶液先在室温下用 30000 r/min 转速浓缩 30 min。将上层的微显紫罗兰红的液体弃去,便得到了浓缩后的纳米金胶体溶液。

2.3 免疫传感器的制备

2.3.1 金电极的预处理

先用直径 1 mm 金电极粗研磨材料(刚玉泥或金刚砂,粒度约 0.3~1.0 μm)研磨打平,再用细研磨材料(粒度约 0.05 μm)抛光,使金电极表面光滑平整。再分别用无水乙醇和二次蒸馏水超声洗涤 3 次,约需 15 min。于 0.5 mol/L H₂SO₄ 中金电极在 -0.3~+1.0 V 之间进行循环伏安法扫描 5 圈。洁净的金电极保存于浓 H₂SO₄ (pH 7.40 PBS) 中,使用前用二次蒸馏水冲洗干净。

2.3.2 金电极的修饰与固定

在洁净的金电极上滴加 2.5 mmol/L 己二硫醇 20 μL,室温培育 1 h。在自组装好己二硫醇的电极上滴加已浓缩的纳米金 50 μL,置于 4℃ 的冰箱中培育 3 h,电极表面略呈红色,再在室温下用 10 mmol/L 巯基乙胺自组装 1 h。用 2.5% 戊二醛活化胺基,将羊抗人 IgG 固定到传感界面上,于 37℃ 水浴中培育 1 h。用酪胺和牛血清白蛋白(BSA)封闭后,在电极上滴加 hIgG,于 37℃ 的水浴中培育 1 h。用夹心法将 HRP 酶标记羊抗人 IgG 固定到电极上,于 37℃ 水浴中培育 1 h。免疫电极制备过程的每步修饰后,均将电极置于 PBS 溶液(pH 7.40)中清洗 3 次。

2.3.3 生物素化酪胺(B-T)的催化放大

生物素化酪胺(B-T)的制备参见文献[16]。A液:10 mg BNHS 溶于 0.5 mL 已去水的 DMF 中;B液:1.37 mg 酪胺溶于 0.5 mL 已去水的 DMF 中;把 B 液倒入 A 液中,遮光、搅拌反应 5 h 后,将 B-T 复合物置于 4℃ 冰箱中保存(可保存 8 个月)。移取 0.5 mL B-T 复合物于 0.5 mL 0.0075% H₂O₂ (含 PBS) + BSA 中,制得 5 mmol/L B-T 复合物的 H₂O₂ 溶液(C液)。在电极上滴加 C 液 50 μL,室温培育 1 h。利用生物素与亲和素的特异性反应,在室温下,将亲和素化 HRP 酶结合到电极上。

2.4 测定方法

以对苯二酚(*p*-PDP)作媒介体,H₂O₂为底物,用循环伏安法测定 HRP 酶催化 H₂O₂ 的电流变化值。

3 结果与讨论

3.1 循环伏安实验

通过己二硫醇的自组装,先将纳米金吸附到电极表面上,利用巯基乙胺的自组装与戊二醛交联法固定抗体,再加入 HRP 酶标抗体,以夹心法进行酶联免疫反应测定。基于 HRP 酶催化 H₂O₂ 氧化酪胺,将生物素化酪胺沉积到电极上,再利用亲和素化 HRP 酶与生物素的结合,进行催化放大反应。

免疫电极制备过程的每步修饰后,均将电极置于 5 mmol/L K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ (1:1, V/V) 溶液中,在 -0.2~+0.6 V 之间进行循环伏安法扫描,扫速为 100 mV/s。

由图 1 可见,裸金电极有一对明显的可逆氧化还原峰,用己二硫醇修饰后,氧化还原电流迅速减少,表明己二硫醇自组装单层形成,阻止了电活性探针的电化学反应。稳定 Au-S 键,有利于纳米金的吸附。

由图 2 可见,电极表面固定抗体、抗原及酶标抗体后,电流强度逐渐降低。这是由于蛋白质修饰到电极表面后,对电子传递起阻碍作用,从而导致 K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ 在电极上的氧化还原电流随着

蛋白质修饰层数的增加而减小。

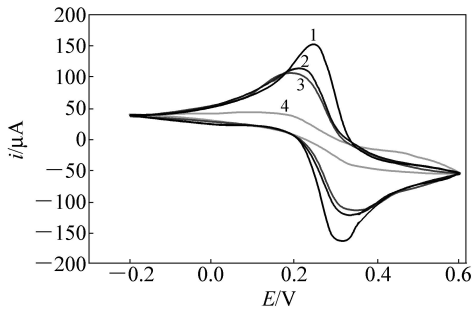


图 1 修饰金电极的循环伏安图

Fig 1 Cyclic voltammograms of modified gold electrode
Cyclic voltammogram solution: 5 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ / $K_4Fe(CN)_6$ (1 1, V/V). Potential scanning range: - 0.2 ~ +0.6 V; Scanning rate: 100 mV/s; 1. Bare gold electrode; 2. Cysteine film; 3. Gold nanoparticles modified electrode; 4. 1,6-Hexanedithiol modified electrode.

3.2 催化信号放大

以对苯二酚 (*p*-PDP) 为媒介体, H_2O_2 为底物, 用循环伏安法测定催化信号放大前后 (加入 B-T 前后) HRP 酶催化 H_2O_2 的电流变化值 (i_p), 见图 3。图 3 表明, 催化放大前 (未加 B-T, 夹心法酶联免疫反应), 在 20 mL 2 mmol/L 对苯二酚 / PBS (pH 7.40) 溶液中, 加入 160 μ L 0.1 mol/L H_2O_2 后, 电流值较小, $i_p = 2.2 \times 10^{-6}$ A。催化放大后 (加入了 B-T, 酪胺催化沉积放大反应), 电流值增大, $i_p = 36 \mu$ A。

由此可见, 通过生物素化酪胺催化放大后, 制得的免疫传感器对 H_2O_2 的催化能力增大近 20 倍, 与文献 [17] 报道的酶催化沉积质量放大的压电免疫传感器比较, 其催化放大能力增大了近 10 倍。

3.3 免疫传感器对 H_2O_2 的响应

制得的免疫传感器对不同浓度的 H_2O_2 响应电流变化见图 4。图 4 表明, 当向 20 mL 2 mmol/L 对苯二酚 / PBS (pH 7.40) 溶液中加入适量 0.1 mol/L H_2O_2 时, 响应电流先增大, 而当加入 H_2O_2 的体积小于 200 μ L 时, 响应电流反而减少。当加入 160 μ L 0.1 mol/L H_2O_2 时, 响应电流达到最大。因此, H_2O_2 最佳用量为 160 μ L。

3.4 B-T 浓度的影响

用 0.0075% H_2O_2 / PBS (pH 7.40) + 0.3% BSA 配制不同浓度的 B-T, 在室温下培养 1 h, 用循环伏安法研究催化放大后的电流变化, 寻求最佳 B-T 用量 (图 5)。图 5 表明, 当 B-T 浓度为 5 mmol/L 时, 催化电流值最大, 故取 50 μ L 5 mmol/L B-T 进行培养。

3.5 免疫传感器的响应特性

在优化的实验条件下测得的 hIgG 抗原的校正曲线。电流响应与 hIgG 抗原在 1.5 μ g/L ~ 22 mg/L 范围内呈线性关系。线性回归方程为: $i_p (\mu A) = 2.8859c (mg/L) + 17.152$, 相关系数为 0.9872, 根据 3 规则计算出检出限为 0.1 μ g/L。

3.6 非特异性免疫反应

为了研究 Au/Hexanedithiol/Nanogold/Cysteine 设计的传感器界面在 anti-hIgG, hIgG 和 anti-hIgG-

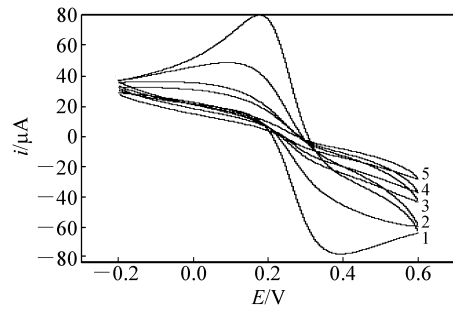


图 2 酶联免疫反应的循环伏安图

Fig 2 Cyclic voltammograms of enzyme-linked immunoreaction
Cyclic voltammogram solution: 5 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ / $K_4Fe(CN)_6$ (1 1, V/V); Potential scanning range: - 0.2 ~ +0.6 V; Scanning rate: 100 mV/s; 1. Biotin tyramine (B-T) specific reaction; 2. Goat-Antihuman IgG-embedded electrode; 3. Antibody-antigen reaction; 4. Immobilization of enzyme-labeled antibody by sandwich method; 5. Tyramine-catalyzed depositing enlargement.

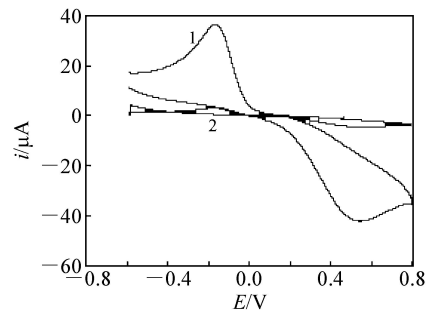


图 3 催化放大反应的循环伏安图

Fig 3 Cyclic voltammograms of signal amplification
1. Add B-T; 2. Without B-T; Substrate solution: 2 mmol/L *p*-paradioxybenzene (*p*-PDP) / PBS (pH 7.40) and 0.1 mol/L H_2O_2 ; IgG: 5 mg/L. Potential scanning range: - 0.6 ~ +0.8 V; Scanning rate: 100 mV/s.

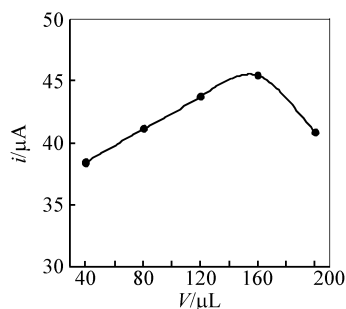
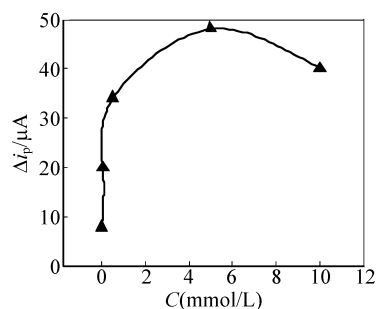
图 4 免疫传感器对 H₂O₂ 的响应Fig 4 Effect of H₂O₂ on response current0.1 mol/L H₂O₂, 5 mg/L IgG

图 5 B-T浓度对免疫传感器的影响

Fig 5 Effect of B-T concentration on response current

Concentration of human IgG: 5 mg/L.

HRP之间的非特异性反应对传感器电流响应的影响,本研究设计了以下两组实验:实验 1,先在 Au/Hexanedithiol/Nanogold/Cysteine设计的传感器界面上固定抗体 anti-h IgG,之后不加待测抗原 h IgG,直接加 anti-h IgG-HRP,其它步骤与本实验检测 h IgG的方法相同。实验发现,传感器的电流响应的最大值为 2~5 μA。实验 2,在 Au/Hexanedithiol/Nanogold/Cysteine设计的传感器界面上不固定抗体 anti-h IgG,直接加待测抗原 h IgG,然后再加 anti-h IgG-HRP,其它步骤与本实验检测 h IgG的方法相同。实验发现,传感器的电流响应最大值为 2~5 μA。以上两组实验测得电流响应的最大值仅约为前述特异性免疫反应检出限电流响应值的 30%。由此说明,在 Au/Hexanedithiol/Nanogold/Cysteine设计的传感器界面没有发生明显的非特异性免疫反应。

3.7 标准加入的回收率

将不同浓度的 h IgG加入到实际血清中(血浆蛋白成分参考血清),记录电流响应变化值(见表 1),得到的回收率为 94.8%~111.5%,结果令人满意。

表 1 回收率实验

Table 1 Recovery of the human IgG immunosensor

样品 Sample No	加入量 Added (mg/L)	测定值 Found (mg/L)	回收率 Recovery (%)
1	20.12	19.07	94.8
2	1.65	1.84	111.5
3	0.28	0.30	107.1

References

- Alvarez M J B, Bobes C F, Abedul M T F, Garcia A C. *Anal Chim. Acta*, **2001**, 442(1): 55~62
- Warsinke A, Benkert A, Sehell F W. *Fresenius J. Anal Chem.*, **2000**, 366(3): 622~634
- L I Bo (李波), SH I Hai-Yan (施海燕), WANG Ming-Hua (王鸣华). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2008**, 36(1): 34~38
- JIAO Kui (焦奎), YAO Hong (姚虹), XU Jing (徐静). *Science in China Series B: Chemistry* (中国科学 B 辑: 化学), **2004**, 34(1): 81~88
- Patolsky F, Kate E, Bardea A, Willner I. *Langmuir*, **1999**, 15(1): 3703~3706
- Patolsky F, Zayats M, Katz E, Willner I. *Anal. Chem.*, **1999**, 71(15): 3171~3180
- Yoon H C, Ko J S, Yang H, Kim Y T. *Analyst*, **2002**, 127(8): 1082~1087
- Amagãñ Ònal. *Food Chem.*, **2007**, 103(4): 1475~1478
- J N Gen-Di (金根娣), PENG Sheng-Wei (彭生微), HU Xiao-Ya (胡效亚). *Chinese J. Appl Chem.* (应用化学), **2008**, 25(12): 4041~4043
- Curulli A, Valentini F, Orlanducci S, Terranova M L, Paoletti C, Palleschi G. *Sensor Actuat B-Chem.*, **2004**, 100(1): 65~71
- Liang R P, Qiu J D, Cai P X. *Anal Chim. Acta*, **2005**, 534(2): 223~229
- Wu Z S, Li J S, Luo M H, Shen G L, Yu R Q. *Anal Chim. Acta*, **2005**, 528(2): 235~242
- ZHANG Yu-Mei (张玉梅), ZHANG Wen-Yan (张雯艳), ZHU Guo-Yi (朱果逸). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2008**, 36(4): 478~482
- Andrew T T, Chad A M, Robert L L. *Science*, **2000**, 289(5485): 1757~1760

- 15 Brown K R, Natan M J. *Langmuir*, **1998**, 14 (4): 726 ~ 730
- 16 Mark N B, Thomas D H. *Immunol Methods*, **1989**, 125 (2): 279 ~ 285
- 17 FU Ting(符婷), WANG Hua(王桦), SHEN Guo-Li(沈国励), YU Ru-Qin(俞汝勤). *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报), **2006**, 27 (6): 1032 ~ 1035

A Novel Electrochemical Enzyme-linked Immunosensor Based on Tyramine Signal Amplification

LU Meng-Qin¹, JIANG Jian-Hui², FENG Yun-Lan¹, HUANG Yong², SHEN Guo-Li², YU Ru-Qin²

¹ (Department of Chemistry and Materials Science, Hengyang Normal University, Key Laboratory of Functional Organometallic Materials of Hengyang Normal University, College of Hunan Province, Hengyang 421008)

² (State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, Chemistry and Chemical Engineering College, Hunan University, Changsha 410082)

Abstract A novel and highly sensitive voltammetric enzyme-linked immunosensor was developed based on tyramine oxidation deposition. It was shown that gold nano-particles (colloid Au) could be used as a platform to immobilize antibodies by adsorption. By a sandwich immunosensor format with goat-anti-human IgG labeled Horseradish peroxidase (HRP) as the second antibody and catalytic amplification by biotin-tyramine, the immunosensor's catalytic ability to hydrogen peroxide increased nearly 20 times, the sensor exhibited a linear response to human IgG in the concentration range from 1.5 $\mu\text{g/L}$ - 22 mg/L, and the detection limit was 0.1 $\mu\text{g/L}$, the regression equation could be expressed as $i_p (\mu\text{A}) = 2.8859c (\text{mg/L}) + 17.152$ with a correlation coefficient of 0.9872. The immunosensor can be used to quantitatively determine hIgG in the sample of human serum.

Keywords Electrochemical enzyme-linked immunosensor; Signal amplification; Tyramine oxidation deposition; Biotin; Gold nanoparticles

(Received 22 June 2009; accepted 8 October 2009)

《色谱在药物分析中的应用》

该书着重介绍色谱技术在药物分析中的应用。全书共六章,前两章综合论述药品质量的分析现状与进展,以及有关色谱的基础知识;以后逐章论述色谱技术在中药、化学药、抗生素和生化药品中的应用。内容涉及药品的前处理方法、手性药物拆分、体内药物分析以及联用技术等。该书列举了药物质量控制及相关科研中的许多典型实例。

该书适合于从事色谱金属研究人员和药物分析人员使用,也可供高等院校与药物、分析等相关专业师生参考。

该书由田颂九、胡昌勤、马双成等编著,化学工业出版社出版,定价 39.00 元。