

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01556

基于磁性碳纳米管修饰印刷电极的 无酶型 HIV p24 安培免疫传感器

干宁^{*1} 罗乃兴¹ 李天华¹ 郑磊² 倪敏君³

¹(宁波大学新型功能材料及其制备科学国家重点实验室基地 材化学院, 宁波 315211)

²(南方医科大学检验科, 广州 410003)

³(宁波出入境检验检疫局保健中心, 宁波 315200)

摘 要 在多壁碳纳米管 (MWNTs) 表面固定 Fe₃O₄ (核) / Au (壳) 纳米微粒 (GMP) ,使其具有超顺磁性 ,包被 p24 抗体 (anti p24) ,制得检测探针 (MWNTs-GMP/anti p24) ;在磁场作用下将此探针吸附于 *N,N'*-双 (2-羟基苯亚甲基) 邻苯二胺合铜 (CuRb) 修饰的碳基丝网印刷电极 (SPCE|CuRb) 表面 ,制得了免疫传感电极 (SPCE|CuRb/MWNTs-GMP/anti p24) 。当此电极在含 p24 样本中于室温下温育 15 min 后 ,随 p24 浓度的增加在电极表面生成的免疫复合物增加 ,导致 CuRb 对 H₂O₂ 的催化还原电流下降。在含 5 mmol/L H₂O₂ 的 PBS (pH 7.0) 中和 -300 mV 下 ,催化还原电流降低值 ΔI 与 p24 浓度在 0.6 ~ 160 $\mu\text{g/L}$ 呈线性关系 ;检出限为 0.32 $\mu\text{g/L}$ (3 σ) 。将其用于实际样品检测 ,结果与标准 EILSA 方法一致。由于 MWNTs-GMP/anti p24 具有超顺磁性 ,并可以显著提高电极比表面积及 anti p24 负载量 ,而 CuRb 代替易失活的 HRP 酶 ,使得该传感器灵敏度和稳定性俱佳 ,电极表面可更新 ,可用于艾滋病病人血清中 p24 筛测。

关键词 *N,N'*-双 (2-羟基苯亚甲基) 邻苯二胺合铜 ; 丝网印刷电极 ; 碳纳米管 ; Fe₃O₄ (核) / Au (壳) ; HIV 衣壳蛋白 p24 ; 无酶型安培免疫传感器

1 引 言

HIV 衣壳蛋白 p24 (简称 p24) 在艾滋病感染早期诊断中起着不可替代的作用^[1]。其检测方法包括酶联免疫分析 (ELISA) 、放射免疫分析 (RIA) 、免疫荧光分析 (IFA)^[2-3] 等。其中 ELISA 法最常用 ,但灵敏度不高 ,“窗口期”长 ,假阳性率高。后两种方法灵敏可靠 ,但所需仪器昂贵 ,操作复杂 ,不适宜于基层医疗部门作 p24 现场筛查。安培免疫传感器具有极高的灵敏度和特异性 ,适合于构建痕量 p24 的快速检测技术 ,有望缩短艾滋病“窗口期”并降低检测成本^[4-5]。但目前该类传感器在临床上应用还存在一些不足 : 一是通常采用酶标抗体结合在电极表面 ,通过酶催化反应 (如 HRP 酶对 H₂O₂ 催化) 引起测试体系电信号变化进行测定。由于酶昂贵且固定于电极表面易失活 ,导致电极使用寿命降低 ; 二是当电极上的抗原 / 抗体发生结合后生成物很难除去 ,其表面无法更新 ,测定数次后需要重新修饰 ,费时繁琐 ; 三是常见的电极材料 (如金、玻碳等) 价格昂贵 ,制备成本高。*N,N'*-双 (2-羟基苯亚甲基) 邻苯二胺合铜^[5] (CuRb) 具有催化 H₂O₂ 的特性 ,可替代 HRP 酶。碳纳米管和纳米金常被用于固定抗原 / 抗体分子而制备生物探针 ,进而将其修饰到电极表面 ,可获得高灵敏度、检出时间显著缩短的安培免疫传感器^[7-9]。闵丽根等^[10] 采用纳米金、多壁碳纳米管等合成了纳米复合物 ,用其固定癌胚抗原 (CEA) 抗体制得了灵敏度和稳定性俱佳的 CEA 传感器 ,但该类传感器仍无法实现更新。Fe₃O₄ / Au 组装型金磁纳米微粒 (简称 GMP) 兼具 Fe₃O₄ 的超顺磁性和胶体金的生物相容性 ,可用于抗体固定并易于实现磁性分离 ,近年来在生化分析中应用日渐广泛^[11,12]。如合成 MWNTs / GMP 复合粒子 (MWNTs-GMP) 并包被 p24 抗体 (anti p24) ,由此制备的“磁性碳纳米管探针”可方便地在外磁场作用下在电极表面吸附解吸 ,获得的免疫传感器可再生 ,由此可大大简化检测探针在电极上修饰过程。丝网印刷碳电极 (SPCEs) 可批量生产 ,具有成本低、电极面积可控等突出优点 ,非常适合于构建廉价的一次性安培免疫传感器^[13]。

本研究采用 CuRb 修饰 ,在 SPCEs 电极上构建了 H₂O₂ 传感器 (SPCE | CuRb) ,并合成了 MWNTs-

2010-03-03 收稿 ; 2010-06-09 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20805024) ,浙江省自然科学基金 (Nos. Y20805024 ,2008C50012) ,广东省科技计划项目 (No. 2008A050200006) 和宁波大学王宽诚基金资助项目

* E-mail: ganning@nbu.edu.cn

GMP 用以包被 p24 抗体; 通过外加磁场将 MWNTs-GMP/anti p24 探针吸引到 SPCE | CuRb 表面, 制备了电极表面可更新的磁控 HIVp24 无酶型一次性安培免疫传感器, 并用于 HIV 患者血清检测。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CHI-660B 电化学分析工作站(上海辰华公司); 三电极集成的 SPCEs(西班牙 DropSens 公司, 工作电极为修饰电极, 参比电极为 Ag/AgCl 电极, 对电极为碳电极); Hitachi S-3400N 型能谱扫描电镜(日本 Hitachi 公司); S2 RANGER X 射线荧光光谱仪(德国 Bruker 公司); NdFeB 稀土强磁铁(杭州强磁铁器材有限公司, 磁场感应强度为 0.1 ~ 1.0 mT)。

1 mg/L 的鼠抗人 HIV p24 抗原及其单克隆抗体(anti p24)试剂盒(美国 Epitomics 公司); 牛血清蛋白(BSA, 美国 Sigma 公司); CuRb 参照文献[6]制备; $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 微粒(5 mg/L, 粒径 (50 ± 1.2) nm); 吸附抗体量: 25 mg 人 IgG/mL(陕西北美基因股份有限公司, 浓度为 5×10^7 个/mL); 羧基化多壁碳纳米管 MWNTs(深圳纳米港公司, 纯度大于 90%); Nafion 溶液(上海河森电气公司); HIVp24 抗体阳性灭活血样 4 份, 阴性血样 6 份(南方医科大学南方医院检验科)。实验用水为超纯水(美国 Millipore 公司), 其它试剂均为分析纯。

2.2 SPCE|CuRb/MWNTs-GMP/anti p24 免疫电极的制备和表征

MWNTs-GMP/anti p24: 将羧基化 MWNTs 浸入到 0.36 mol/L 乙二胺溶液(pH = 7.0 的 PBS, 含 50 mmol/L 碳二亚胺作偶合剂)中胺基化。将胺化的 MWNTs 浸入 5 g/L GMP 溶液(pH 6.5 室温)中反应 2.5 h, 即得 5 mg/L MWNTs-GMP 溶液。按照 GMP 说明书的抗原包被步骤和包被量, 在 5 mL pH 7.0, 0.02 mol/L Tris-HCl 中加入 5 μL 5 mg/L MWNTs-GMP 与 100 μL 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ anti p24, 25 $^\circ\text{C}$ 下振荡反应 20 min, 磁性分离弃上清液。再加入 5 mL PBS 和 5 μL 牛血清蛋白 BSA(1000 U/mL)。25 $^\circ\text{C}$ 下搅拌 1 h, 以封闭未包被 anti p24 的 GMP 表面, 磁性分离弃上清液。重复操作 3 次, 即得最终产物, 制备过程如图 1。

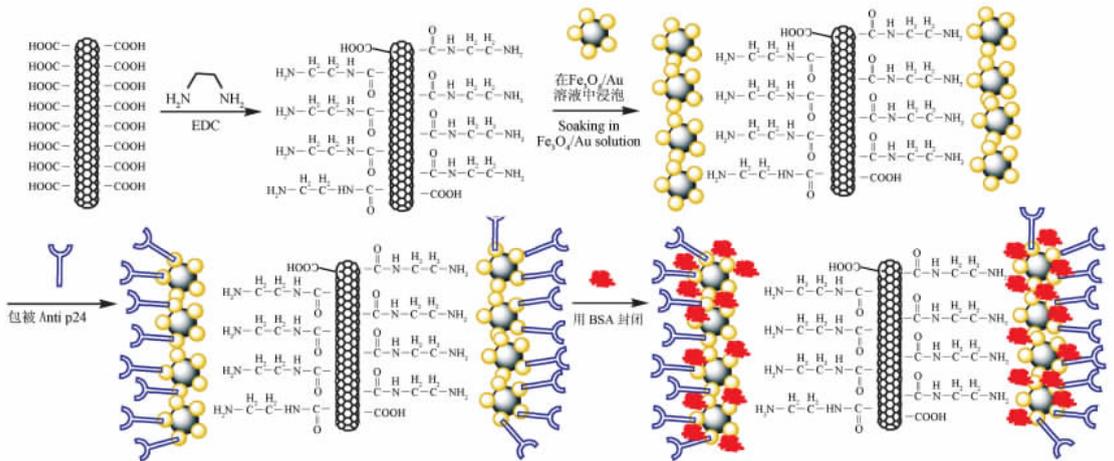


图 1 MWNTs-GMP/anti p24 制备过程

Fig. 1 Preparation procedure of MWNTs-gold magnetic nanoparticles (GMP) / anti p24

免疫电极: 在 SPCE 电极(3.0 cm \times 2.0 cm \times 2 mm) 反应腔中滴加 10 μL 0.1 mol/L CuRb + 10 μL 4% (w/V) 的 Nafion 成膜, 得到 SPCE|CuRb 电极。待电极表面干燥后, 在反应腔中加入 20 mL 200 mg/L MWNTs-GMP/anti p24, 并置于外加磁场 1 min ($B = 0.3$ mT, H 方向和电极表面垂直) 自然晾干 5 min 即得, 其制备过程如图 2。

2.3 测定过程和再生

参照文献[13]的方法, 分别测定在 5 mL 除氧的 pH 7.0 的 0.1 mol/L PBS 溶液和含 1 mmol/L H_2O_2 的相同底液中, 免疫传感器在 -300 mV 电解 120 s 时的安培响应 I_0 和 I_H 。将免疫传感器在含待测 p24 的溶液于室温下温育 15 min, 在同样条件下测定含 1 mmol/L H_2O_2 的 pH 7.0 PBS 溶液中的安培响应 I 。

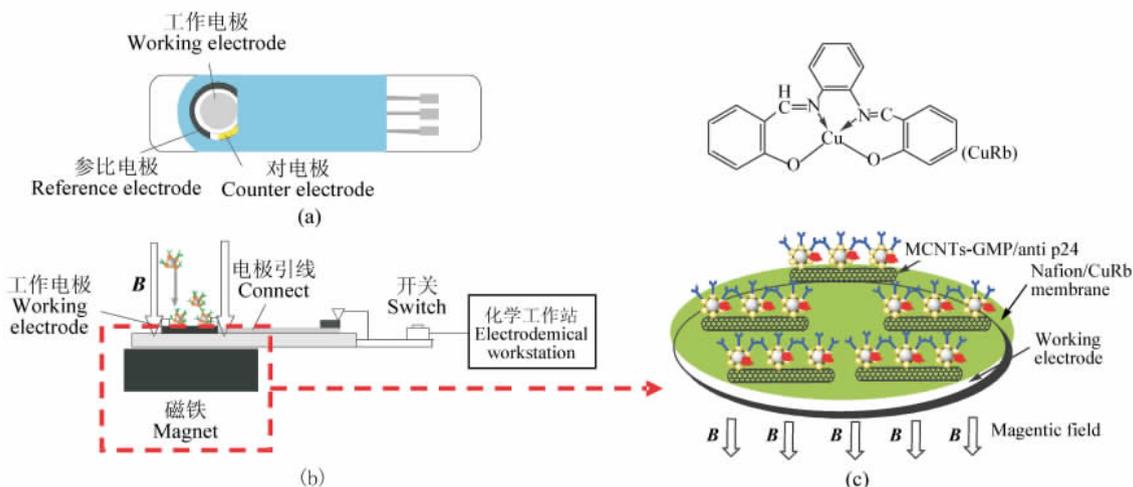


图 2 MCNTs-GMP/anti p24 免疫电极的平面 (a), 纵面图 (b) 及其电极表面组成 (c)

Fig. 2 Planar and vertical view of immunosensor (a) and composition of its surface (b)

$CR(\%) = (I_H - I) / (I_H - I_0) + 100\%$, 表达了传感器温育后安培响应的降低百分率, 其与溶液中待测 p24 浓度在一定范围内成正比。分析完成后, 取出电极下部的磁铁, 用 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 冲洗 10 次, 脱去表面的探针, 使电极再生。

2.4 实际样品测定

按照文献 [14] 的方法, 取 3 ~ 5 mL 静脉血, 室温放置 1 ~ 2 h, 待血液凝固、血块收缩后, 置入 10 mL 离心管, 磁力搅拌 15 min, 吸出上层 2 μ L 血清至含 25 μ L PBS 的 SPCE 反应腔中, 采用 2.4 节的方法进行定量分析。ELISA 测定参照试剂盒说明书进行。

3 结果与讨论

3.1 MWNTs-GMP 和 SPCE|CuRb/MWNTs-GMP/anti p24 的表征

采用扫描电镜 (SEM) 分别对不同电极表面进行了表征。实验发现, SPCE|CuRb/MWNTs-GMP 表面有很多长条状的碳纳米管, 直径为 10 ~ 20 nm; 组装的 GMP 分布在 MWNTs 四周, 粒径约为 50 nm (图 3a)。在磁场下 SPCE|CuRb/MWNTs-GMP/anti p24 修饰电极表面 (见图 3b)。GMP 在电极表面分布较均匀, 直径增大到 200 ~ 300 nm。常温下 MWNTs-GMP/anti p24 的饱和磁化强度为 5.2 A \cdot m²/kg, 剩磁和矫顽力均为 0, 其在外加磁场前后的沉降见图 3c, 说明其具有良好的超顺磁性。采用红外光谱表征了传感器表面 (图 3d-2) 和羧基化碳纳米管 (图 3d-1) 相比, 电极在 3385, 3384 和 1632 cm⁻¹ 左右出现了明显的 N—H 振动吸收峰, 这是由含酰胺键的 MWNTs-GMP 引起的。采用 X 射线荧光光谱对传感器表面进行表征, 出现了 Fe-K β 和 L α 峰 (31.09 $^\circ$, 35.21 $^\circ$), Cu-K α (42.51 $^\circ$), S-K α 峰 (112.34 $^\circ$)。由于 anti p24 抗体富含甲硫氨酸^[21], 说明 CuRb, Fe₃O₄ 和 anti p24 均被修饰到免疫电极表面。

电化学交流阻抗是研究电极表面与溶液间电子传递关系的有效方法^[9]。图 4 为不同电极在 K₃Fe(CN)₆ 溶液中的交流阻抗图谱, 高频区的半圆直径表示电子传递阻抗 (R_{ct})。图 4a 显示, SPCE|CuRb 阻抗约为 21.7 k Ω 。而 SPCE|CuRb/MWNTs-GMP 阻抗 (图 4b) 约为 11.4 k Ω 。这可能因为 MWNTs-GMP 微粒增加了电极导电比表面积, 提高了 FeCN 电子传递速率, 因此降低了其电子传递阻抗。免疫传感器的 R_{ct} 上升为 22.8 k Ω (图 4c), 这是由于 anti p24 本身是一层绝缘性蛋白质, 阻碍了 Fe(CN)₆³⁻ 与电极界面间电子传递。将此传感器在 100 μ g/L p24 溶液中温育 15 min 后, R_{ct} 进一步增加到 29.8 k Ω (图 4d), 这说明 p24 和 anti p24 形成的免疫复合物, 进一步阻碍了 K₃Fe(CN)₆ 在电极表面的电子传递。

3.2 SPCE|CuRb 和 SPCE|CuRb/MWNTs-GMP 电极的伏安行为及对 H₂O₂ 催化

SPCE|CuRb 修饰电极在扫速 100 mV/s 下 pH 7.0 PBS 中的循环伏安 (CV) 图显示出一对稳定的氧化还原峰 (图 5a)。当在底液中加入 1 mmol/L H₂O₂ 后, 还原峰增大而氧化峰减小, 说明 SPCE|CuRb 对

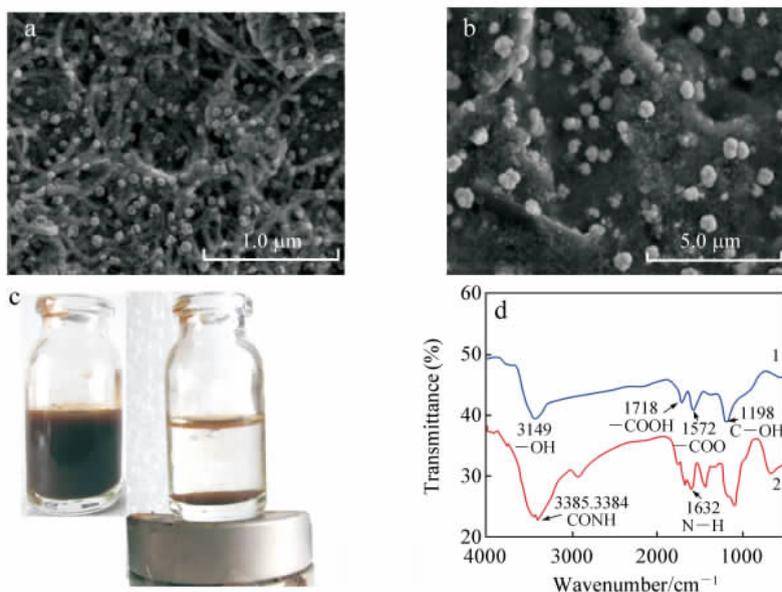


图 3 SPCE|CuRb/MWNTs-GMP (a) ,SPCE|CuRb/MWNTs-GMP/anti p24 (b) 电极的表面形貌扫描电镜图 ,MWNTs-GMP/anti p24 在外加磁场前后沉淀 (c) ,B 电极表面的红外光谱图 (d)
 Fig.3 Scan electron microscope images of SPCE|CuRb/MWNTs-GMP (a) , SPCE|CuRb/MWNTs-GMP/anti p24 (b) , precipitate of MWNTs-GMP/anti p24 by adding magnetic field (c) , FT-IR spectrum of B (d) . SPCE: Screen printed carbon electrode; CuRb: *N,N'*-bis(2-hydroxy-methylene)-*o*-phenylenediamine copper.

H₂O₂ 还原产生催化 (图 5b) 。 SPCE|CuRb/MWNTs-GMP 的氧化还原电流较 SPCE|CuRb 大幅度提高 (图 5c) ; 而此电极对 H₂O₂ 还原也可产生催化 , 且催化电流增长绝对值显著高于 SPCE|CuRb (图 5d) 。 这是因为: MWNTs 和 GMP 均具有好的导电性 , 当两者形成复合微粒后 , 导电性更佳。 该电极氧化还原峰电流均随扫速 (50 ~ 300 mV/s) 增加而线性增大 , 表现出明显的表面控制过程。 通过测定不同扫速时的峰电位差 , 利用 Laviron 方程可计算出该过程平均电子传递速率常数为 (2.71 ± 0.31) /s^[9]; CuRb 表面覆盖度为 (1.03 ± 0.22) × 10⁻¹⁰ mol/cm² , 此数值相当于电极表面覆盖的为单分子层^[15]。 反应电子数 $n = 1.72 \approx 2$, 表明电极表面发生 Cu(II)/Cu(0) 的电子转移。

3.3 SPCE|CuRb/MWNTs-GMP/anti p24 免疫传感器的伏安行为及对 p24 检测

免疫传感器在 PBS 底液中的 CV 图 (图 6b) 与未包被 anti p24 探针的 SPCE|CuRb/MWNTs-GMP (图 6a) 相比 , 氧化峰和还原峰电位间距 ($\Delta E_p = 84$ mV) 基本不变 , 但是峰电流均减少。 推测是 anti p24 为绝缘性蛋白质 , 可阻碍 CuRb 与电极间的电子传递。 当在底液中加入 1 mmol/L H₂O₂ 后 , 此传感器还原峰增大而氧化峰减小 (图 6c) , 说明其对 H₂O₂ 具有良好的还原催化。 将电极在 0.2% BSA 中温育后 , 对 H₂O₂ 的催化电流 I_0 无明显减少 (图 6d) , 表明其非特异性吸附很小。 将此电极在 100 μg/L p24 溶液中温育 15 min 后 , 电流明显减小 (图 6e) , 电流减少值 ΔI_0 和 p24 的加入量成正比 , 可用于定量分析。 将此传感器放入 pH 4.0 ~ 8.0 的 PBS 缓冲液中进行循环扫描 , 电极的氧化还原峰电势随 pH 的增加不移动 , 推测是由于 CuRb 中无得失 H⁺ 的基团。 检测机理

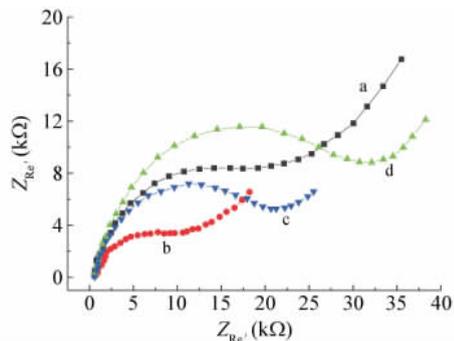


图 4 不同修饰电极的的交流阻抗图 (EIS)
 Fig.4 AC impedance spectrum of SPCE|CuRb (a) , SPCE|CuRb/MWNTs-GMP (b) , SPCE|CuRb/MWNTs-GMP/anti p24 (c) and the electrode of (c) incubated in 100 μg/L p24 (d) in 5 mmol/L Fe(CN)₆^{3-/4-} + 0.5 mol/L KCl solution. The frequency range was from 0.1 to 1 × 10⁵ Hz

推断如图 7: Cu(II)L 在电极上被还原为 Cu(0) L, 溶液中的 H_2O_2 通过扩散达到电极溶液界面, 将 Cu(0) L 氧化成 Cu(II)L, 而自身被还原成 H_2O 。当 p24 和 anti p24 发生免疫结合后, 免疫生成物使得 H_2O_2 达到电极表面的传质受阻, 催化电流下降。

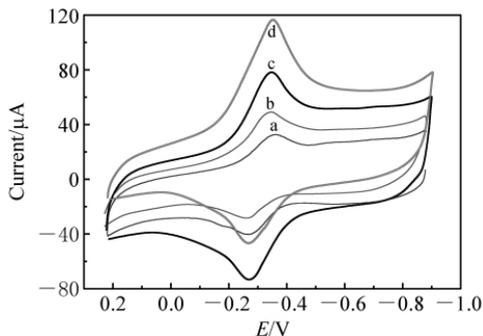


图 5 SPCE | CuRb 电极 (a) 及其加入 1 mmol/L H_2O_2 后 (b); SPCE | CuRb/MWNTs-GMP 电极 (c) 及其加入 1 mmol/L H_2O_2 后 (d) 在 0.02 mol/L PBS (pH = 7.0) 底液中的循环伏安图

Fig. 5 Cyclic voltammogram of SPCE | CuRb not add (a) and added 1 mmol/L H_2O_2 (b); SPCE | CuRb/MWNTs not add (c) and added 1 mmol/L H_2O_2 (c) in 0.02 mol/L PBS (pH = 7.0)

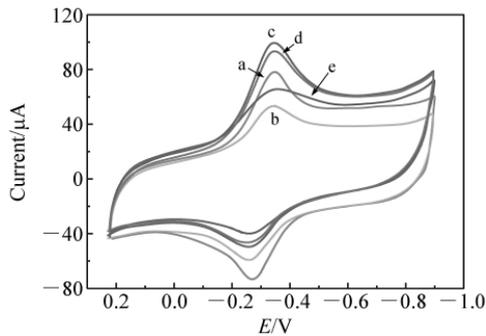


图 6 免疫传感器测定 p24 的循环伏安图

Fig. 6 Cyclic voltammograms of (a) SPCE | CuRb/MWNTs-GMP, (b) immunosensor; (c) immunosensor in 1 mmol/L H_2O_2 , and (d) immunosensor incubated with 0.2% BSA; (e) immunosensor incubated with 100 $\mu\text{g/L}$ p24 at 100 mV/s in pH 7.0 PBS containing 1 mmol/L H_2O_2

3.4 免疫分析条件优化

SPCE | CuRb 电流响应随着 Nafion 膜中 CuRb 浓度增加而增大。当 CuRb 浓度大于 1 mmol/L 时, 峰电流基本不变。因此选择 1 mmol/L CuRb 固定在电极表面。测定了 H_2O_2 在传感器上的安培响应, 发现其响应迅速, 电流达到稳态所需时间仅为 2 s, 显著高于纳米金修饰电极^[7]; 响应电流与 H_2O_2 浓度在 0.5 ~ 5.0 mmol/L 范围内呈线性关系, 浓度再提高电流改变不大, 所以 H_2O_2 浓度采用 5.0 mmol/L。

免疫反应受到溶液 pH 值、温育时间、SPCE 表面磁场强度、MCNTs-GMP/anti p24 探针浓度等影响。研究表明, 峰电流在 pH 3.5 ~ 7.0 逐渐增大, pH 大于 7.0 后开始减小, 因此最佳 pH 值选择为 7.0。在室温下, 催化电流的下降值随时间延长而增加, 当达到 15 min 后趋于稳定值, 说明此时电极表面免疫反应已进行完全, 这较一般的 ELISA 温育时间 50 ~ 60 min 明显缩短。这是由于本方法基于一次性免疫分析, 较 ELISA 法减少了二抗加入步骤; 同时, SPCE 电极内反应腔仅 40 μL , 空间狭小, p24 抗原/抗体碰撞几率增加, 故而温育时间较短。考察了富集电位对 H_2O_2 安培测定的影响, 随着电位的负移动, 电流大幅度增大。当电位达到 -300 mV 时, 电流达到一个平台, 因此选择 -300 mV 作为检测电位。随着外加磁场增大, 传感器对抗原检测后的电流减少值 ΔI_0 不断增加。这是因为磁性越强, MWNTs-GMP/anti p24 探针在电极表面富集量越多, 与 p24 发生免疫结合量增多, ΔI_0 也越大; 当磁场达到 0.3 mT 后, 电流响应趋于稳定, 表明此时探针在电极表面已达到饱和。在反应腔中分别加入 20 μL 的 50, 100, 200, 300 和 400 mg/L MCNTs-GMP/anti p24 探针, 考察了传感器对 100 $\mu\text{g/L}$ p24 的检测信号。研究发现, 探针浓度越大, ΔI_0 越大; 探针浓度大于 200 $\mu\text{g/L}$ 后, ΔI_0 不再变化。这是因为探针在电极表面已经饱和。

综上所述, 传感器的最佳制备和分析条件为: 在电极反应腔中加入 20 μL 200 $\mu\text{g/L}$ anti MCNTs-GMP/anti p24 探针, 用 0.3 T 磁场强度的永磁铁吸附 1 min, 晾干, 加入适量 p24 样品, 室温下温育 15 min, 再加入 5 mmol/L H_2O_2 , 电解电位 -300 mV。

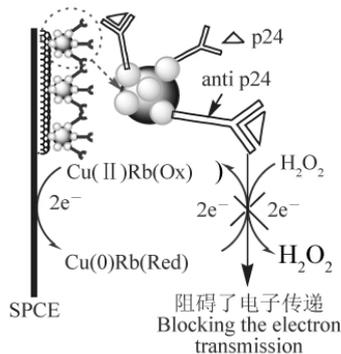


图 7 免疫传感器对 p24 检测原理示意图

Fig. 7 Procedure of immunosensor for p24

3.5 电极表面磁场撤除后对免疫传感器测定 p24 影响

当电极表面的磁场撤去后,传感器的电流响应几乎没有变化,对 100 $\mu\text{g/L}$ p24 测定结果重现性很好 ($\text{RSD} < 3\%$)。推测原因是: anti p24 蛋白上的酪氨酸^[2]和 SPCE 石墨工作电极可实现 $\pi-\pi$ 吸附,故而 anti p24-GMP 通过重力和物理吸附作用修饰在 SPCE 表面而不易流失。

3.6 免疫传感器对 p24 的安培检测

由于示差脉冲伏安法(DPV)比循环伏安法(CV)具有更高的灵敏度,所以采用了 DPV 方法对样品进行了检测。在优化的测定条件下,获得的 p24 测定 DPV 曲线和校正曲线显示,检测线性范围为 0.6 ~ 160 $\mu\text{g/L}$, $r = 0.9986$ 。采用 3 倍标准偏差法(3σ)获得的检出限分别为 0.32 $\mu\text{g/L}$ 。

3.7 免疫传感器的精确性、储存稳定性和电极表面再生性

取不同时间、不同批间制备的免疫传感器,对 30 和 40 $\mu\text{g/L}$ p24 重复测定 4 次,获得的组内相对标准偏差为 2.8% 和 3.4%,说明其具有良好精密度。将传感器在 4°C 储存于 pH 6.5 的 PBS 中放置 45 d 后,信号变化 $< 5\%$,说明其具有较好的稳定性。利用同一根电极在外加磁场作用下,重复吸附 MWNTs-GMP/anti p24 探针 3 次,对 100 和 25 $\mu\text{g/L}$ p24 样品测定结果分别为 99.3 和 24.2 $\mu\text{g/L}$; $\text{RSD}(n=3)$ 分别为 2.2% 和 2.4%,这说明该传感电极具有较好制备重复性,可以再生使用。

3.8 抗干扰性

人血清中主要干扰物对传感器检测 p24 的影响实验表明:当 p24 浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 时,10 倍浓度的 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Mn^{2+} ; 50 倍的多巴胺、L-半胱氨酸; 100 倍的 Fe^{3+} 、尿酸、抗坏血酸、葡萄糖; 200 倍的 BSA、核黄素; 800 倍的 Na^+ 、 Ca^{2+} 对检测无影响。本传感器能有效抵抗人血清中主要干扰。

3.9 免疫传感器对人血清中 p24 检测应用

应用本法测定了人血清中 p24 含量(测试用 0.1 mol/L pH 6.5 PBS 稀释 1 ~ 20 倍)。在 4 个样品中检测到 p24 信号(表 1),结果与 ELISA 方法一致,加标回收率为 95% ~ 110%。向未检出 p24 的人血清(阴性样品)萃取液中分别加入系列浓度的标准 p24 标准品,使其 p24 浓度分别为 20 和 35 $\mu\text{g/L}$,采用本法测得 p24 的平均值(3 次)分别为 22 和 33.2 $\mu\text{g/L}$ 。表明此传感器适合于人血清中 p24 的测定。

表 1 艾滋病病人血清中 p24 检测结果($n=7$)

Table 1 Detection results of p24 in serums of AIDs patients ($n=7$)

样品 Sample	This method ($\mu\text{g/L}$)	ELISA ($\mu\text{g/L}$)	This method RSD (%)	加入量 Added ($\mu\text{g/L}$)	测定值 Found ($\mu\text{g/L}$)	加标回收率 Recovery (%)
1	5.2	5.4	3.1	5.0	10.1	98
2	2.2	2.1	4.2	2.0	4.4	110
3	3.2	3.0	2.6	3.0	6.1	96.7
4	2.4	2.1	2.5	2.0	4.3	95

4 结 论

本研究制备的无酶型磁性纳米修饰 HIV p24 安培免疫传感器具有以下优点: (1) 采用 MWNTs-GMP 复合微粒固定抗体制作探针,可通过外加磁场在平面电极表面吸附解吸,简化了传感器制备过程,实现了电极表面更新且对 p24 的灵敏度很高; (2) 采用 CuRb 代替 HRP 酶催化 H_2O_2 来实现电极表面免疫换能,测定中无需加入电子媒介体,由此构筑的传感电极较酶标抗体修饰电极活性保持时间更长; (3) 采用廉价的 SPCE 电极作为传感器基底,大大降低了使用成本,并具有进样量少(μL 级别)、室温反应时间短(15min)等优点。该传感器集磁性分离、富集和测定于一体,对 p24 测定结果与 ELISA 方法具有很好的吻合性,适合于艾滋病血清中 HIV p24 的早期快速筛查。

References

- Priscila V C, Patricia T C, Assuero F G, Leila M B A, Paula U A. *Peptides*, **2005**, 26(2): 243 ~ 249
- Perez-Filgueir D M, Brayfield B P, Phiri S, Borca M V, Wood C, Morris T J. *J. Virological Methods*, **2004**, 121(2): 201 ~ 208

- 3 Stewart T G , Fiona K , Nichola O'L , Alan J R , Marisa C K , John S B , Juraj P , Peter G , Colin J C. *Anal. Biochem.* , **2008** , 382(4) : 9 ~ 15
- 4 Kagan K , Khaled A. Mahmoud , Heinz-Bernhard K. *Chem. Commun.* , **2007** , 43: 3829 ~ 3831
- 5 GAN Ning(干宁) , LI Tian-Hua(李天华) , LEI Jian-Ping(雷建平) , WANG Lu-Yan(王鲁燕) , YANG Xin(杨欣) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2008** , 36(9) : 1167 ~ 1171
- 6 LI Shen-Xin(李慎新) , LI Jian-Zhang(李建章) , XIE Jia-Qing(谢家庆) , CHEN Yong(陈勇) , MENG Xiang-Guang(孟祥光) , HU Chang-Wei(胡常伟) , ZENG Xian-Cheng(曾宪诚) . *Acta Chimica Sinica*(化学学报) , **2004** , 62(6) : 567 ~ 572
- 7 He X L , Yuan R , Cai Y Q. *Biochem. Biophys. Methods* , **2008** , (70) : 823 ~ 829
- 8 Yu Y , Cimen A , Lan Y C , Rybczynski J , Wang D Z. *Nano Letters* , **2009** , 4(1) : 27 ~ 33
- 9 Xu Q , Mao C , Liu N N , Zhu J J , Sheng J. *Biosens. Bioelectron.* , **2006** , 22(3) : 768 ~ 774
- 10 MIN Li-Geng(闵丽根) , YUAN Ruo(袁若) , CAI Ya-Qing(柴雅琴) , CHENG Shi-Hong(陈时洪) , XU Yang(许阳) , FU Ping(付萍) . *Acta Chimica Sinica* (化学学报) , **2008** , 66(14) : 1676 ~ 1680
- 11 WANG Xian-Xiang(王显祥) , HUANG Shuo(黄硕) , SHAN Zhi(单志) , YANG Wan-Shen(杨婉身) . *Chin. Science Bulletin*(科学通报) , **2009** , 54(4) : 430 ~ 435
- 12 GAO Hui-Ling(高会玲) , LI Jian-Ping(李建平) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2008** , 36(12) : 1614 ~ 1618
- 13 Wu J , Tang J H , Dai Z , Yan F , Ju H X , Murr E N. *Biosens. Bioelectron.* , **2006** , 22(1) : 102 ~ 108
- 14 China Centra for Disease Control and Prevention(中国疾病预防控制中心) . *National AIDS Testing Specification*(全国艾滋病检测技术规范) (2004 Ed) , **2004**: 1 ~ 7
- 15 Debra R R. *Chem. Rev.* , **1990** , 90: 867 ~ 878

A Non-enzyme Amperometric Immunosensor for Rapid Determination of Human Immunodeficiency Virus p24 Based on Magnetism Controlled Carbon Nanotubes Modified Printed Electrode

GAN Ning*¹ , LUO Nai-Xin¹ , LI Tian-Hua¹ , ZHENG Lei² , NI Min-Jun³

¹(The State Key Laboratory Base of Novel Functional Materials and Preparation Science , Faculty of Material Science and Chemical Engineering of Ningbo University , Ningbo 315211)

²(Nanfang Medical Hospital , Guangzhou 410003)

³(The Technical Center of Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau , Ningbo 315200)

Abstract A magnetism controlled and non-enzyme amperometric immunosensor was fabricated for the determination of human immunodeficiency virus p24 (HIV p24) . First , Fe₃O₄/Au composite nanoparticles (GMP) were modified on multiwalled carbon nanotubes (MWNTs-GMP) . Then , antibody of p24(anti p24) was coated on it to prepare MWNTs-GMP/anti p24 biomarker. Finally , the marker was absorbed on the surface of *N,N'*-Bis (2-hydroxy-methylene) -*o*-phenylenediamine copper (CuRb) modified screen-printed carbon electrodes (SPCEs) through external magnetic field in which CuRb can be employed as an electron transfer mediator and catalyst for detection of H₂O₂. After the immunosensor is incubated with p24 sample at room temperature for 15 min , the electron transfer access of CuRb to H₂O₂ is partly inhibited , which leads to a linear decrease of the catalytic efficiency to H₂O₂ at 300 mV in pH 7.0 PBS. Under optimal conditions , the linear range of p24 is from 0.6 to 160 μg/L and the detection limit is 0.32 μg/L at 3 times noise. The immunosensor was employed to determine p24 in acquired immune deficiency syndrome (AIDs) patients' serum samples and the results were consistent to the tradition ELISA method which was suitable for screen determination of trace p24 in serums of AIDs' patients.

Keywords *N,N'*-Bis (2-hydroxy-methylene) -*o*-phenylenediamine copper; Screen printed carbon electrode; Gold magnetic particles/carbon nanotube composite particles; Human immunodeficiency virus capsid protein 24; Magnetic non-enzyme immunosensor