论著

文章编号:1000-5404(2010)06-0572-04

基于多壁碳纳米管-壳聚糖-硫堇纳米复合物修饰甲胎蛋白免疫传感器的研究

李 艳[1],程 平[1],龚俊华[1],郑峻松[1],王 猛[2],徐泽刚[2] (400038 重庆,第三军医大学:医学检验系临床检验学教研室[1],学员旅7队[2])

[摘要] **目的** 采用多壁碳纳米管-壳聚糖-硫堇(MWCNT-CS-THi)纳米复合物及半胱氨酸盐酸盐共修饰于玻碳电极表面固载抗体制得高灵敏甲胎蛋白免疫传感器。**方法** 先在玻碳电极表面滴涂一层MWCNT-CS-THi纳米复合物,随后利用壳聚糖和硫堇分子中大量的正电荷氨基固定纳米金(GNPs)并吸附半胱氨酸盐酸盐(CH),最后用戊二醛(GA)交联甲胎蛋白特异性抗体制得电流型免疫传感器。**结果** 在最佳实验条件下,该传感器响应的峰电流值与甲胎蛋白抗原(AFP)浓度在0.1~200.0 ng/ml的范围内保持良好的线性关系,检测下限为0.07 ng/ml。**结论** 成功建立了甲胎蛋白免疫传感器,该方法制备简单,线性范围宽,检测下线低。

[关键词] 多壁碳纳米管-壳聚糖-硫堇纳米复合物;半胱氨酸盐酸盐;免疫传感器;甲胎蛋白

[中图法分类号] R312;R318.08;R446.6 **[文献标志码]** A

An immunosensor for α-fetoprotein based on multi-wall carbon nanotube-chitosan-Thionine nanocomposite

Li Yan[1], Cheng Ping[1], Gong Junhua[1], Zheng Junsong[1], Wang Meng[2], Xu Zegang[2] ([1]Department of Clinical Laboratory Science, College of Medical Laboratory, [2]7th Student Team, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To design a new immunosensor for the detection of α-fetoprotein (AFP) antigen based on multi-wall carbon nanotube-chitosan-Thionine (MWCNT-CS-THi) nanocomposite with cysteine hydrochloride (CH) and gold nanoparticles (GNPs) modified glassy carbon electrode (GCE). **Methods** Firstly, MWCNT-CS-THi composite was dropped onto the surface of the GCE. Subsequently, GNPs were adsorbed onto the nanocomposites surface through positive charge of thionine and chitosan for immobilizing CH. Finally, glutaraldehyde (GA) cross-linking method was employed to immobilize AFP antibodies on the electrode surface. Thus, the finished immunosensor was constructed. The experimental condition was optimized through changing pH of the system and incubation time. The stability, specificity and repetitiveness of the system were evaluated. **Results** The optimal pH value was 6.5, and incubation time was 20 min. Under optimal conditions, the proposed immunosensor displayed a broader linear response to AFP, with a working range from 0.1 to 200.0 ng/ml and a detection limit of 0.07 ng/ml. Sound stability, specificity and repetitiveness were obtained in our immunosensor for AFP detection. **Conclusion** Our self-made immunosensor is easy to produce, and has high sensitivity, wide detection range and low detection limit.

[Key words] multi-wall carbon nanotube-chitosan-Thionine; cysteine hydrochloride; immunosensor; α-fetoprotein

Corresponding author: Zheng Junsong, Tel: 86-23-68752310, E-mail: zhengalpha@yahoo.cn

甲胎蛋白(α-fetoprotein, AFP)是临床用于肝癌诊断、监测和预后的重要指标。目前,临床上常用于AFP检测的方法主要有ELISA、放射免疫法等。但ELISA法用于定量准确性差,放射免疫法检测时间长,花费高,试剂保存时间短,具有放射性等缺点。电流型免疫传感器分析技术是将免疫学技术与电化学检测技术相结合,通过测定免疫反应前后界面电流、电位、电导、电容等的变化从而测定抗原抗体间的反应,该方法具有较高的特异性和灵敏度,已成为近年来的研究热点之一[1-3]。本实验研究了多壁碳纳米管-壳聚糖-硫堇纳

[通信作者] 郑峻松,电话:(023)68752310,E-mail: zhengalpha@yahoo.cn

米复合物、纳米金以及半胱氨酸盐酸盐共修饰于玻碳电极表面固定甲胎蛋白抗体(anti-AFP)的免疫传感器,实验发现该传感器具有制作过程简单、灵敏度高、检测限低、稳定性好以及线性范围宽等特点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 甲胎蛋白抗体(anti-AFP)(3.2 mg/ml)购自天津天健生物制药有限公司,甲胎蛋白抗原(AFP)标准品、癌胚抗原(CEA)标准品均购自上海实业科华生物技术有限公司,多壁碳纳米管(MWCNT)购自中国科学院成都有机化学有限公司,壳聚糖(脱乙酰度大于90%)、柠檬酸三钠、小牛血清白蛋白(BSA)均购自上海生物工程有限公司,戊二醛(GA)购自成都克隆试剂公司,氯金酸购自国药集团化学试剂有限公司,铁氰化钾、氯化亚铁等其他试剂均为分析纯试剂,实验用水为二次蒸馏水。纳米金溶液按照文献[4]采用柠檬酸还原法制备,所得溶液呈亮红色,其平均粒径约为16 nm。

1.1.2 主要仪器 MEC-12B多功能微机电化学分析仪为江苏江分电分析仪器有限公司产品,TU-1901紫外分光光度计为北京普析通用仪器有限责任公司产品,AX120电子分析天平为日本岛津产品,KQ-50超声波清洗仪为昆山超声仪器有限公司产品,PHS-3C pH计为上海精科公司产品,HJ-3数显恒温磁力搅拌器为国华电器有限公司,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝为对电极。

1.2 方法

1.2.1 MWCNT-Thi-CS的制备 按照文献[5]并进行一定的改进得到纳米复合物。首先,取10 mg MWCNT在400 ℃下氧化30 min以去除原子态的碳,然后将MWCNT放入6 ml 6 mol/L的盐酸溶液中超声4 h,再用去离子水反复洗涤直至中性,烘干,得到羧基化的MWNT[6]。称取10 mg壳聚糖粉末溶入5 ml 10%的醋酸溶液中,室温下磁力搅拌3 h,待充分溶解后用浓NaOH调节壳聚糖溶液的pH值为4.0~5.0,制得0.2%的壳聚糖醋酸溶液。最后加入一定量的Thi和MWNCT超声分散10 min形成纳米复合物。

1.2.2 免疫传感器的制备 玻碳电极(GCE,直径4 mm)经0.3,0.05 μm Al_2O_3悬浊液抛光成镜面后,依次用蒸馏水、无水乙醇、蒸馏水超声5 min,清洗后将电极置于室温下晾干。在0.5 mol/L硫酸溶液中用循环伏安法扫描处理,扫描速度为50 mV/s,电压范围为-0.3~+1.5 V,持续扫描直到得到稳定的循环伏安图之后用二次蒸馏水洗净,待用。用微量注射器吸取10 μl MWCNT-Thi-CS的纳米复合物滴加于预处理的玻碳电极表面,于室温下晾干。随后依次浸入已制得的纳米金溶液中约4 h,1 mmol/L半胱氨酸盐酸盐乙醇溶液中24 h,用乙醇和二次蒸馏水冲洗若干次,晾干。然后将电极置于0.1%戊二醛溶液中2 h,取出洗净后,放入anti-AFP溶液4 ℃下浸泡过夜。最后,将上步制好的电极浸入0.3% BSA溶液中4 h以封闭非特异性结合位点,然后用PBS(pH=6.5)和水洗涤,晾干,即得免疫电极,置于4℃的冰箱中保存待用。

1.2.3 壳聚糖、多壁碳纳米管、硫堇、MWCNT-Thi-CS纳米复合物的紫外可见光谱表征 用紫外分光光度计对壳聚糖、多壁碳纳米管、硫堇、MWCNT-Thi-CS纳米复合物进行表征。

1.2.4 电极修饰过程的电化学表征 将制备好的免疫传感器作为工作电极,以0.1 mol/L的PBS缓冲液为底液,采用三电极体系,-0.6~+0.3 V范围内,以50mV/s速度进行循环伏安扫描,研究电极制备过程的循环伏安特征。

1.2.5 实验条件的优化 pH的优化:用循环伏安法测试在pH 4.0~8.0范围内电极的循环伏安响应。孵育时间的优化:将制备好的免疫电极放入含30 ng/ml的AFP抗原中循环伏安法测定其响应电流的变化。

1.2.6 免疫传感器的响应特性 线性范围的测定:在最优条件下,采用循环伏安法测定了免疫电极对AFP的校正曲线。

免疫传感器的稳定性测定:将传感器于pH=6.5的PBS溶液中连续扫描100圈,实验后将该传感器置于4 ℃下放置3周,测定其电流响应值。

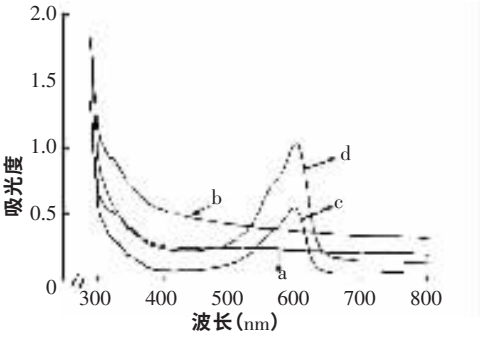
免疫传感器的选择性测定:将传感器置于含有50 ng/ml的AFP及癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原(PSA)的混合液中室温孵育20 min,测定其响应电流并与传感器在只含有50 ng/ml的AFP溶液中室温孵育20 min后的响应电流值进行比较。

免疫传感器的重现性测定:将制备好的电极放入50 ng/ml AFP溶液中孵育,在相同条件下重复测定5次,比较5次峰电流值的相对标准偏差。

2 结果

2.1 壳聚糖、多壁碳纳米管、硫堇、MWCNT-Thi-CS纳米复合物的紫外可见光谱表征

由图1可见,壳聚糖(曲线a)和多壁碳纳米管(曲线b)在紫外区无特征吸收峰,硫堇(曲线c)在600 nm处有最大吸收峰,MWNCT-Thi-CS纳米复合物(曲线d)在紫外区的605 nm有最大吸收峰,硫堇的特征吸收峰红移5 nm,表明MWNCT-Thi-CS纳米复合物成功制备。

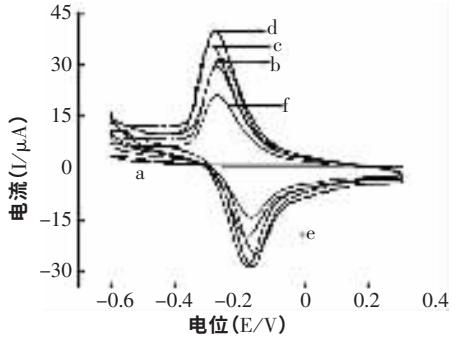


a: CS; b: MWNCT; c: Thi; d: MWNCT-CS-Thi

图1 壳聚糖、多壁碳纳米管、硫堇、MWCNT-Thi-CS纳米复合物的紫外可见光谱分析

2.2 电极修饰过程的电化学表征

用循环伏安法研究了电极在自组装过程中的电化学特性。图2中曲线a为裸GCE电极的CV图。当滴加MWNCT-Thi-CS/GCE于玻碳电极表面后,在E = −0.2 V附近出现一对硫堇的特征氧化还原峰(曲线b)。曲线c为MWNCT-Thi-CS复合物修饰的电极吸附纳米金后的循环伏安图,峰电流明显增加,这是由于纳米金能有效促进电子的传输。曲线d是GNPs/MWNCT-Thi-CS修饰的电极与半胱氨酸盐酸盐作用后的循环伏安图,图中峰电流再次增加,这是由于末端带有NH_2自组装膜能有效促进电子转移[7]。曲线e是结合anti-AFP后的CV图,由于大分子抗体是非导电性物质,所以峰电流降低。曲线f是BSA封闭后的循环伏安图,由于BSA与电极表面残留的活性位点结合,阻碍了电子的传递,与e比较氧化还原峰电流明显降低。



a: GCE; b: MWNCT-Thi-CS/GCE; c: GNPs/MWNCT-Thi-CS/GCE; d:CNS/GNPs/MWNCT-Thi-CS/GCE; e: anti-AFP/CNS/GNPs/MWNCT-Thi-CS/GCE;f:BSA/anti-AFP/CNS/GNPs/MWNCT-Thi-CS/GCE

图2 电极制备过程循环伏安表征

2.3 实验条件的优化

pH值的优化:当pH < 6.5时,峰电流随pH值的增大而增大;pH > 6.5时,峰电流随pH值的增大而减小。因此,本实验选定的PBS测试溶液的pH值为6.5。孵育时间的优化:实验发现,反应20 min时,抗原-抗体反应已达平衡,故实验过程中选择20 min为抗原和抗体的反应时间。

2.4 免疫传感器的响应特性

从图3中可以看出,AFP的浓度在0.1~200.0 ng/ml的范围内与单位面积峰电流保持良好的线性关系,线性方程为:I(μA) = −0.0951[AFP](ng/ml) + 20.49,相关系数为0.995 3,检测下限为0.07 ng/ml。

传感器于pH值为6.5的PBS溶液中连续扫描100圈,其电流响应下降8.7%,放置3周后扫描,其响应信号下降9.6%,说明该传感器有较好的稳定性。传感器在含有50 ng/ml的AFP、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原(PSA)的混合液中的电流响应值与在只含有50 ng/ml AFP溶液中孵育得到的电流响应值基本相同,说明该传感器具有良好的选择性。电极在相同条件下重复测定5次,5次峰电流值分别为:16.5、17.1、16.9、18.1、17.5,相对标准偏差为5.4%,说明传感器重现性良好。

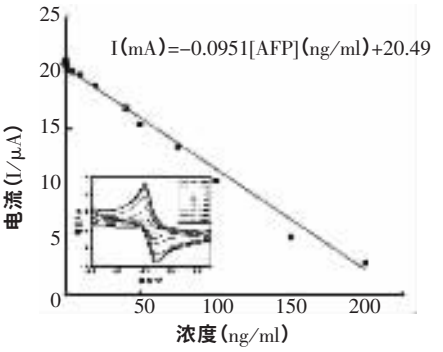


图3 传感器的响应峰电流与AFP浓度的关系曲线 (插图传感器:分别在不同浓度AFP溶液中孵育后的循环伏安检测曲线)

3 讨论

近年来,采用电化学免疫传感器检测甲胎蛋白的报道日益增多,电化学免疫传感器就是把免疫反应的专一性与电化学检测的灵敏性相结合,该方法设备简单、价格低廉、分析速度快、灵敏度高等特点,在临床检验上有广阔的应用前景。

由于抗原-抗体生物分子的非电化学活性,电流型免疫传感器主要采用间接电化学免疫分析法测定免疫蛋白分子的含量。通常,抗原抗体的结合反应是通过在抗原或抗体分子上标记电活性物质或酶,通过固定化的抗原(抗体)与溶液中抗原(抗体)发生免疫反应,引起电活性物质或者酶催化反应的底物反应的电流信号的变化来间接测定待测样本中的抗原(抗体)的浓度。

在1991年日本NEC公司基础研究实验室的专家Iijima[8]在高分辨透射电子显微镜下检验 电弧设备中产生的球状碳分子时,意外发现了由管状的同轴纳米管组成的碳分子,这就是现在被称作的"Carbon nanotube",即碳纳米管。碳纳米管具有良好的导电性能,而且具有促进生物分子电子传递的作用而广泛用于生物传感器的研制[9]。壳聚糖是甲壳素(chitin)脱去部分乙酰基后的产物,它具有良好的生物相容性,且不易溶于水,成膜性、吸附性较好,已在传感器的制备中广泛用做成膜材料[10]。硫堇染料含有两个氨基,是一种良好的电子媒介体。本实验成功制备了多壁碳纳米管-壳聚糖-硫堇纳米复合物,该纳米复合物不仅兼有3种材料的优点,而且电子媒介体与碳纳米管相互作用使得传感器具有传导性好、电化学信号高和生物活性强等特点,因此使得电流响应值显著增强且峰形得到了较大改善,同时稳定性得到提高。半胱氨酸盐酸盐形成自组装膜后末端带有NH_2,其性能与纳米金的相似,均具有促进电子转移的作用,同时还有放大电流相

应信号的作用。

本研究结果表明该免疫传感器,制作简单,检测时间短,有良好的稳定性和重现性,AFP的检测浓度范围为0.1~200.0 ng/ml,检测下限为0.07 ng/ml。与传统的检测方法相比该方法的检测时间大大缩短,检测成本低廉,而且避免了放射性物质对人体和环境的损害和污染。本实验以AFP作为研究模型,研究了该方法对AFP的检测,同时它也可应用于其他免疫物质的测定,可满足临床诊断的需要。

参考文献:

[1] 黎雪莲, 袁若, 柴雅琴, 等. 基于多层酶/纳米金固定甲胎蛋白免疫传感器的研究[J]. 化学学报, 2006, 64(4): 325-330.
[2] 屈玲, 邓勇, 府伟灵. 压电石英晶体生物传感器的血浆凝血因子检测系统的效能研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(18): 1661-1663.
[3] 李建平, 高会玲, 熊志刚. 磁性纳米金共价固定癌胚抗原单克隆抗体的电流型免疫传感器[J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(11): 2149-2154.
[4] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions [J]. Nature Phys Sci (London), 1973, 241(105): 20-22.
[5] Yang M, Yang Y, Yang H, *et al*. Layer-by-layer self-assembled multilayer films of carbon nanotubes and platinum nanoparticles with polyelectrolyte for the fabrication of biosensors[J]. Biomaterials, 2006, 27(2): 246-255.
[6] 李秋锦, 赵元黎, 苏楠, 等. 多壁碳纳米管吸附鸟嘌呤的研究[J]. 传感器与微系统, 2008, 27(7): 28-30.
[7] Solanki P R, Arya S K, Nishimura Y, *et al*. Cholesterol biosensor based on amino-undecanethiol self-assembled monolayer using surface plasmon resonance technique[J]. Langmuir, 2007, 23(13): 7398-7403.
[8] Iijima S. Carbon nanotubes[J]. Nature, 1991, 354: 56-58.
[9] Chen S, Yuan R, Chai Y, *et al*. Amperometric third-generation hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of hemoglobin on multiwall carbon nanotubes and gold colloidal nanoparticles[J]. Biosens Bioelectron, 2007, 22(7): 1268-1274.
[10] 吴子刚, 林鸿波, 封伟. 碳纳米管/壳聚糖复合材料[J]. 化学进展, 2006, 18(9): 1200-1207.

(**收稿**:2009-09-09;**修回**:2009-10-15)
(编辑 张 维)

(上接567页)

2.2 不良反应

药物治疗组4例出现头昏、嗜睡、行走不稳,均发生于老年患者,在减低卡马西平剂量后好转;rTMS组所有患者在治疗过程中未出现严重的不良事件,仅3例出现一过性头痛,发生在刺激强度较高时,调整刺激强度后,症状自然缓解。

3 讨论

rTMS是一种无创的电生理技术,可使大脑皮层局部或远处神经元兴奋性改变。高频刺激(>1 Hz)能易化神经元,瞬时提高运动皮质的兴奋性;低频刺激(≤1 Hz)则能抑制大脑皮质的兴奋性[3]。国外研究报道,rTMS可以有效缓解中枢及外周的慢性疼痛性疾病如三叉神经痛及卒中后疼痛综合征[4,5]。

本研究显示:PHN患者经rTMS辅助药物治疗3周后,疗效明显高于单纯药物治疗;且其显效快,第1周末即取得了较好的效果,终末疗效也比药物组高;患者使用得理多药量也明显减少,基本没有任何不良反应;随访3个月后,rTMS组疗效稳定、用药剂量基本不变,而药物组症状时有反复,部分患者又接受rTMS治疗。而对药物治疗无效的患者行rTMS治疗后,其疼痛症状也有所缓解。我们认为可能机制在于:低频rTMS刺激患者带状疱疹疼痛部位的神经根,可以抑制损伤的外周传入纤维的异位放电,减少神经元的交互混传,抑制交感神经对损伤神经元的兴奋作用,从神经传导的这个根本机制上治疗PHN;5 Hz高频rTMS刺激患者左侧DLPFC,改善其脑血流和代谢,促进5-HT递质的传递,而DLPFC与影响情绪的网络中的其他部位具有紧密的连接,从而能减轻边缘系统对疼痛的情绪反应[6],缓解PHN患者的焦虑、紧张情绪,改善睡眠,减少痛觉超敏反应及自发性疼痛[7]。我们还发现rTMS治疗需要足够刺激量才能起到确切而持久的疗效。

总之,经颅磁刺激治疗可以有效缓解带状疱疹后神经痛,并具有无创伤、无痛苦、无副作用的特点,值得进一步推广。

参考文献:

[1] Sampathkumar P, Drage L A, Martin D P. Herpes zoster (shingles) and postherpetic neuralgia[J]. Mayo Clin Proc, 2009, 84(3): 274-280.
[2] O'Connor A B. Neuropathic pain: quality-of-life impact, costs and cost effectiveness of therapy[J]. Pharmacoeconomics, 2009, 27(2): 95-112.
[3] Kim Y H, Min S J, Ko M H, *et al*. Facilitating visuospatial attention for the contralateral hemifield by repetitive TMS on the posterior parietal cortex[J]. Neurosci Lett, 2005, 382(3): 280-285.
[4] Lefaucheur J P. Use of repetitive transcranial magnetic stimulation in pain relief[J]. Expert Rev Neurother, 2008, 8(5): 799-808.
[5] Khedr E M, Kotb H, Kamel N F, *et al*. Longlasting antalgic effects of daily sessions of repetitive transcranial magnetic stimulation in central and peripheral neuropathic pain[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005, 76(6): 833-838.
[6] Lam R W, Chan P, Wilkins-Ho M, *et al*. Repetitive transcranial magnetic stimulation for treatment-resistant depression: a systematic review and metaanalysis[J]. Can J Psychiatry, 2008, 53(9):621-631.
[7] Schrijvers D, de Bruijn E R, Maas Y, *et al*. Action monitoring in major depressive disorder with psychomotor retardation [J]. Cortex, 2008, 44(5): 569-579.

(**收稿**:2009-10-12;**修回**:2009-11-26)
(编辑 王小寒)