技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)03-0382-03

尿胰蛋白酶原 -2 电流型免疫生物传感器的研究

郑 军[1],马 霄[1],刘成桂[2]

(1. 重庆医科大学检验系、临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆 400016;2. 四川省医学科学院附属医院检验科,简阳 641400)

【摘 要】目的:研制一种检测尿胰蛋白酶原 -2 (Urinary Trypsinogen-2,TSG-Ⅱ)的新型电流型免疫生物传感器。方法:将 Nafion 吸附到玻碳电极表面,并通过静电吸附和共价键合作用将硫堇和纳米金进行层层自组装,然后通过形成的纳米金单层吸附 TSG-Ⅱ抗体,最后用辣根过氧化物酶封闭电极上的非特异吸附位点。结果:该免疫生物传感器对 TSG-Ⅱ的响应特性良好,其线性检测范围为 6.0 ~ 100 μg/L;检出限为 3.5 μg/L。结论:该电流型免疫生物传感器具有灵敏度高、特异性好等优点,为建立一种检测 TSG-Ⅱ新方法奠定了基础。

【关键词】尿胰蛋白酶原 -2;免疫生物传感器;纳米金;硫堇;壳聚糖

【中国图书分类法分类号】TP212 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-08

Amperometie immunoassay biosensor for urinary trypsinogen-2

ZHENG Jun, et al

(*Key Laboratory of Medical Diagnostics of Ministry of Education, Department of Medicine; Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To develop a novel amperometic immunosensor for the determination of Urinary Trypsinogen-2 (TSG-Ⅱ). *Methods*: the immunosensor was developed by modifying Nafion film on the glassy carbon electrode (GCE), then thionine and colloidal gold were immobilized by static electricity and covalent bonding self-assembly. And then the antibody of Urinary TSG-Ⅱ was absorbed on the surface of nano-gold monolayer. Finally, Horseradish peroxidase (HRP) blocked the non-specific adsorption site on the electrode. *Result*: Experiment results showed that the good linear relations between peak current and concentration of TSG-Ⅱ were established in the range of 6.0-100 μg/L. The detection limit was 3.5 μg/L. *Conclusion*: The amperometie immunoassay biosensor has high sensitivity and good specificity and it has laid the foundation to establish a new method for detection of TSG-Ⅱ.

【Key words】TSG-Ⅱ; Immunosensor; Colloidal gold; Thionine; Chitosan

急性胰腺炎(Acute pancreatitis, AP)是胰腺及其周围组织被胰腺分泌的消化酶自身消化的化学性炎症,是一种临床上常见的严重急腹症,特别是急性重症胰腺炎,病情重、进展快,死亡率可高达 40%,因此早期诊断显得尤为重要。目前,AP 的诊断目前尚无金指标,临床上一直以来都将血、尿淀粉酶(Amylase, AMY)作为急诊急腹症怀疑 AP 时的筛查指标,但临床实践表明,血、尿 AMY 的敏感度和特异度均不太理想,不能满足临床诊断需要。近年来的研究表明,TSG-Ⅱ是急腹症中 AP 筛查较理想的指标[1~5]。尤其适用于 AP 的早期诊断[6]。

TSG-Ⅱ检测方法主要是免疫层析法,但免疫层析法检测不够准确。近年来,采用纳米技术的电化学免疫生物传感器得到很快的发展。本研究采用了免疫生物传感器技术和纳米金技术,层层自组装技术,成功制备了 TSG-Ⅱ电流型免疫生物传感器。本传感器具有灵敏度高、特异性好等优点。

1 仪器与试剂

1.1 主要的仪器

μAUTOLAB Ⅲ电化学工作站(荷兰 ECOCHEMIE 公司);LIBROR AEL-200 电子天平(日本岛津公司);BRANSON B3200S-T 超声清洗仪(上海必能信超声公司)。

1.2 主要的试剂

TSG-Ⅱ单克隆抗体和 TSG-Ⅱ标准品(上海蓝基生物公司);壳聚糖(上海生工生物工程有限公司);5%(V/V)Nafion、

作者介绍:郑 军(1969-),男,实验师,
研究方向:即时检验与生物传感器。

基金项目:重庆市科技攻关项目(编号:CSTC2009AC5145)。

硫堇、牛血清白蛋白（BSA，96%～99%）、氯金酸（美国 Sigma 公司）；辣根过氧化物酶（上海生物工程技术服务公司）；AMS 和脂肪酶标准品都是上海晶天生物科技有限公司的 ELISA 试剂盒所配；柠檬酸三钠、醋酸钠、醋酸均为分析纯试剂；实验用水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 免疫生物传感器的制备

2.1.1 纳米金壳聚糖分散液（Nano-Au/Chit）的制备 取 2 ml 的 1%（w/w）的柠檬酸三钠溶液加入到 50 ml 的 0.01%（w/w）的氯金酸中均匀加热直至溶液变为酒红色[7]，制备纳米金溶胶，壳聚糖由 5 mmol/L 的醋酸分散至 1%（w/w），将上述纳米金溶胶与壳聚糖室温下搅拌 2 h，在 4℃下放置 12 h，制备纳米金壳聚糖分散液。

2.1.2 Nafion/ 硫堇/纳米金壳聚糖分散液修饰玻碳电极的制备 玻碳电极经 0.3 μm Al_2O_3 粉抛光成镜面后用蒸馏水冲洗干净，分别在蒸馏水、无水乙醇、蒸馏水中超声洗涤 15 min，取出在室温下晾干待用。将 5% Nafion 溶液用无水乙醇稀释到 1%（V/V），吸取 5 μl 滴加到预处理后的电极表面，室温下晾干成膜，然后电极在 3 mmol/L 硫堇缓冲溶液中 CV 法扫描处理，扫速为 50 mV/s，扫描电压为 -0.5～0.15 V，持续扫描至得到稳定的 CV 图，取出用水清洗干净并在室温下晾干，再浸入 0.5 ml 已制备的纳米金壳聚糖分散液中约 4 h。然后重复相同的步骤依次吸附硫堇和纳米金，到氧化峰和还原峰电流不再升高为止，提示修饰到电极的硫堇和纳米金已达到饱和状态。

2.1.3 TSG-Ⅱ免疫生物传感器的制备 将上述电极置于 TSG-Ⅱ抗体溶液中 4℃下浸泡 12 h，最后在 0.25%（m/V）HRP 溶液中浸泡约 1 h，以封闭电极上的非特异吸附位点，制成 TSG-Ⅱ电流型免疫生物传感器。制备好的传感器悬于 HAc-NaAc 缓冲液上方，在 4℃下保存备用。

2.1.4 免疫生物传感器对 TSG-Ⅱ的检测 将所制备的免疫生物传感器和待测样本于 35℃下反应 10 min 后，再在 20 ml 含有 15 mmol/L H_2O_2 的 HAc-NaAc 缓冲液（pH=6.0）中进行 CV 测试，其响应电流随标本 TSG-Ⅱ浓度的增加而不断减小。

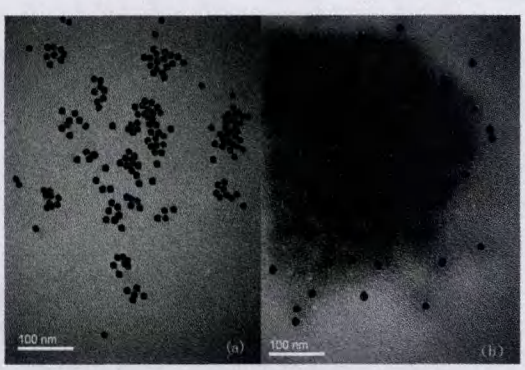


图 1 Nano-Au/Chit 的 TEM 图

2.2 结果

2.2.1 Nano-Au/Chit 的透射电镜图

图 1 为 Nano-Au/Chit 的透射电镜图，可见纳米金颗粒在壳聚糖溶液中分散的非常均匀。

2.2.2 免疫生物传感器自组装过程中的电化学特性 用 CV 法研究了电极在自组装过程中的电化学特性。由图 2 曲线 1 可见，由于体系中缺少电子介体，Nafion 修饰的裸玻碳电极在 0.1 mol/L HAc-NaAc 缓冲液中只有平坦的 CV 图，反复吸附硫堇分子和纳米金颗粒后，电极的峰电流随着吸附层数的增加而逐渐升高。当反复吸附 3 次硫堇和纳米金后，电流达到稳定。图 2 曲线 2 是当电极修饰了一次硫堇和纳米金后的 CV 图。图 2 曲线 3 是电极修饰 3 层硫堇和纳米金后的 CV 图。图 2 曲线 4 是纳米金修饰的电极吸附 TSG-Ⅱ抗体后的 CV 图。图 2 曲线 5 是 HRP 封闭电极上非特异吸附位点后的 CV 图。

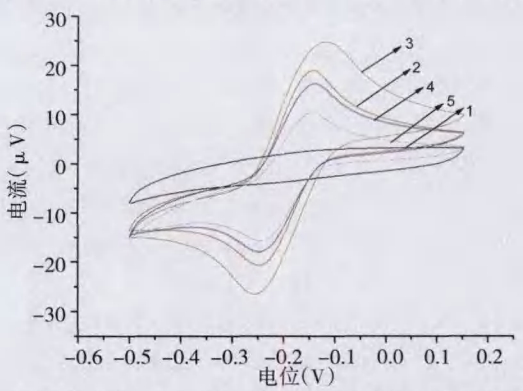
图 3 为 TSG-Ⅱ免疫生物传感器在不同扫描速度下的循环伏安图。随着扫描速度从 50～500 m V/s 变化，氧化峰和还原峰电流变化呈线性增加，其线性回归方程分别 Ipa=0.094 2x+9.984，r=0.995 1 和 Ipc=-0.081x-13.72，r=-0.991 0。

2.2.3 HRP 的电化学催化特性

图 4 为免疫生物传感器在加入 H_2O_2 前后的 CV 图，由图 4 可见，在加入 H_2O_2 之前，CV 图呈现出对称的氧化还原峰（图 3 曲线 1），加入 15 mmol/L H_2O_2 后，还原峰电流增加，氧化峰电流减低（图 4 曲线 2），还原峰电位由 -0.25 V 负移到 -0.28 V。图 4 中曲线 3 是该免疫生物传感器与 100 μg/L 的 TSG-Ⅱ标准品发生免疫反应后，在 15 mmol/L H_2O_2 的 HAc-NaAc 缓冲液中得到的 CV 图。

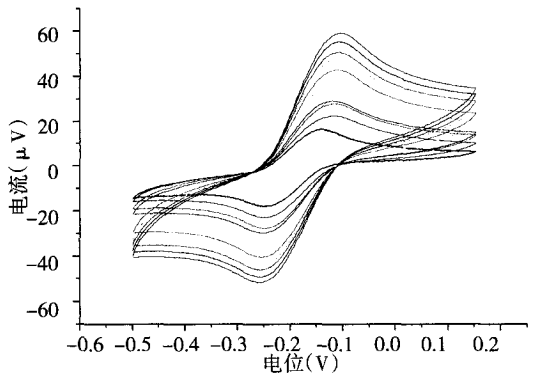
2.2.3 TSG-Ⅱ免疫生物传感器检测校准曲线的制作

在最佳条件下，免疫生物传感器在不同浓度 TSG-Ⅱ标准品中反应 12 min 后，再在 20 mL 含有 15 mmol/L H_2O_2（pH=6.0）缓冲液中进行 CV 检测，每个浓度重复测量 3 次。结果表明，响应电流随 TSG-Ⅱ浓度的增加而不断减小，其浓度在 6.0～100 μg/L 范围内有较好的线性响应，其还原峰电流和 TSG-Ⅱ



注：1. 玻碳电极修饰 Nafion 后；2. 修饰 1 层硫堇和纳米金；3. 修饰 3 层硫堇和纳米金；4. 修饰了 TSG-Ⅱ抗体；5. HRP 封闭非特异位点。扫速为 50 mV/s

图 2 不同修饰电极的循环伏安曲线



测量条件: 置于 0.1 mol/L 的醋酸缓冲液(pH=6.0);扫描电压: -0.5~0.15V;扫描速度从内向外依次为:50、100、150、200、250、300、350、400、450、500 mv/s;温度:37℃

图 3 免疫电极在不同扫描速度下的循环伏安曲线

浓度的线性回归方程为:Y=-0.041 43x-7.665 4,r=-0.992 9。将该传感器在空白溶液中连续扫描 10 次,其还原峰的电流平均值为 -6.7319 μA;标准偏差为 0.022;其检出限为 3.5 μg/L。

3 讨 论

由图 2 可知,曲线 2 呈现一对可逆的氧化还原峰,说明 Nafion 吸附的硫堇可以有效的传递电子。当修饰了 3 层纳米金后,电极的氧化峰还原峰电流进一步增大,说明纳米金能有效地放大响应电流信号。而当纳米金修饰的电极吸附 TSG-Ⅱ抗体后,它的氧化峰还原峰电流有所下降,这是因为抗原抗体反应的免疫复合物吸附到了电极上从而阻碍了电子的传递。

由图 3 可知,随着扫描速度的增加,响应电流值也随之增加,且峰电流和扫描速度的平方根呈正比,说明该传感器表面氧化还原受扩散控制,电极修饰膜具有优异的稳定性。

由图 4 可知,当加入 H_2O_2 之后,还原峰电流增加,氧化峰电流减低,还原峰电位发生负移,说明 HRP 成功的吸附到电极表面,而且保持了其催化活性。当加入 TSG-Ⅱ标准品发生免疫反应后,还原峰电流明显降低,说明固定在电极表面的 TSG-Ⅱ抗体与 TSG-Ⅱ标准品发生了免疫反应,生成的抗原抗体复合物从空间上改变了 HRP 的活性中心,影响了 HRP 与介体之间的电子传递,从而使 HRP 的催化效能降低。

我们考察了加入不同浓度 H_2O_2 时电极的响应电流,H_2O_2 浓度在 1.5 ~ 15 mmol/L 之间电极的氧化峰电流随 H_2O_2 浓度的增加而增大,超过 15 mmol/L 时,峰电流趋于稳定,说明在此范围内固定在电极上的 HRP 有很好的催化作用,因此本实验选择的 H_2O_2 浓度为 15 mmol/L。

pH 影响抗体和酶的活性和稳定性。在 pH 为 4.0 ~ 7.0 范围内考察了其对响应电流的影响。当 HAc-NaAc 缓冲溶液 pH 为 6.0 时,传感器的响应电流最大。因此,采用 0.1 mol/L HAc-NaAc(pH=6.0)作为测定工作液。温度同样对免疫反应速率有很大影响,在低于最适温度时,随温度升高反应速度

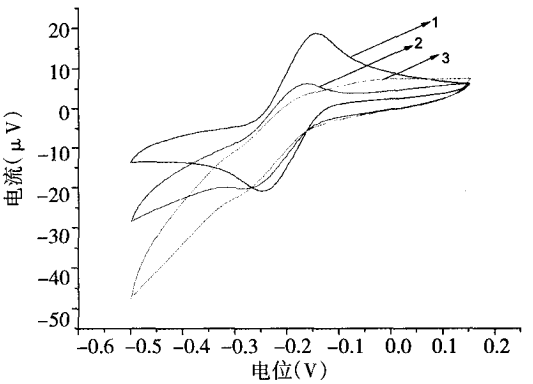


图 4 加入 H_2O_2 前后的循环伏安图

加快;而温度继续升高时反应速率反而减慢,甚至发生蛋白的变性失活。用该传感器在不同温度条件下测定,实验结果表明:当温度在 45℃ 时,抗原抗体反应达到平衡的时间最短且响应电流最大,但为防止蛋白失活,我们选择实验温度为 35℃。

抗原抗体孵育时间对传感器有一定的影响,在最优的实验条件下,观察抗原抗体孵育时间和响应电流的变化规律。在 CV 测试前,将传感器与 50 μg/L TSG-Ⅱ的标准品依次反应 2、4、8、12、16 和 20 min, 然后在含 15 mmol/L H_2O_2 的 HAc-NaAc 缓冲液(pH=6.0)中进行 CV 检测。实验结果表明,在 2 ~ 12 min 内响应电流逐渐降低,12 min 之后电流基本趋于稳定,说明抗原抗体结合基本达到饱和。因此,抗原抗体孵育时间选择为 12 min。

我们考察了 TSG-Ⅱ免疫生物传感器检测方法的特异性,将 AMS 和 LPS 分别加入到含有 50 μg/L 的 TSG-Ⅱ标准溶液中,观察加入前后响应电流的变化,结果表明,两者响应电流基本无变化,说明该传感器特异性较好。

将电极在 0.1 mol/L HAc-NaAc (pH=6.0)缓冲液中连续循环扫描 50 圈后,其电流响应信号仍能保持初始信号的 93.3%。将传感器于 4℃下冰箱中放置 2 周,对相同浓度的 TSG-Ⅱ标准溶液进行检测,响应值变化量没有超过初始信号的 7.1%。同时制备 5 支电极,分别在 TSG-Ⅱ浓度为 50 μg/L 条件下进行测定,5 支电极响应电流的相对标准偏差为 4.1%。故电极具有良好的稳定性与重现性。

本实验首先将 Nafion 吸附到玻碳电极表面,并通过静电吸附和共价键合作用将 Thi 和 Nano-Au/Chit 层层自组装到 Nafion 修饰的电极表面,然后通过 Nano-Au/Chit 膜的单层吸附 TSG-Ⅱ抗体,并引入 HRP 封闭电极上的非特异吸附位点,研制了一种性能良好的 TSG-Ⅱ免疫生物传感器。该传感器固定酶的方法简单、易行,具有较高的稳定性,较低的检出限,具有较好的临床实用价值。

参 考 文 献

[1] Chen Y T, Chen C C, Wang S S, et al Rapid urinary trypsinogen-2 test strip in the diagnosis of acute pancreatitis[J]. Pancreas, 2005, 30(3):

技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)03-0385-04

人表皮光老化相关蛋白的蛋白质组分析与鉴定

李文静,李 惠,黄 欣,陈爱军,龙 亭
(重庆医科大学附属第一医院皮肤科 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:以老年人正常皮肤为研究对象,分析曝光部位及非曝光部位的表皮差异蛋白,筛选出表皮细胞中与皮肤光化相关的蛋白。方法:从分离所得的不同部位老年人表皮中提取蛋白质,并进行 2-DE 分离,PDQUEST 软件分析凝胶上差异蛋白点,进一步采用 MALDI-TOF 质谱分析及数据库查询,鉴定差异表达蛋白;并在蛋白质水平进行 Western-blotting 验证差异候选蛋白。结果:通过分析比较两组表皮双向电泳图谱,确定了 15 个差异蛋白点,经 MALDI-TOF 分析及数据库查询,成功鉴定了其中 5 个差异表达蛋白,发现热休克蛋白 B1(Heat shock protein B1,HSPB1)、膜联蛋白 A2(Annexin A2,ANXA2)、角蛋白 80(Keratin, type Ⅱ cytoskeletal 80,K2C80)、丝裂原激活的蛋白激酶 3(Mitogen- activated protein kinase 3,MK03)在老年人曝光部位的表皮中高表达,而谷胱甘肽 S 转移酶 A2(Glutathione S-transferase A2,GSTA2)在非曝光部位表皮中高表达。结论:老年人正常皮肤曝光部位和非曝光部位的表皮存在差异蛋白,经分析和鉴定的 5 种蛋白质与皮肤的光老化有密切的关系,为进一步研究表皮细胞在光老化过程中的作用及分子机制奠定基础。

【关键词】光老化;表皮;蛋白质组
【中国图书分类法分类号】R758.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-10-27

Analysis and identification of human epidermal proteins associated with photoaging

LI Wen-jing, et al
(*Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: This study is to analyze the differential proteins expressed in the normal elderly exposed epidermis and the non-exposed epidermis. *Methods*: The proteins were extracted from the exposed and non-exposed elderly separated epidermis, and were submitted to two-dimensional gel electrophoresis. Then their electrophoretic patterns were analyzed by the PDQUEST software and identified by MALDI-TOF MS. The following steps were database query and probation using Western-blotting. *Results*: By comparison the two groups of two-dimensional electrophoresis patterns, 15 differential protein spots were determined, in which 5 differential protein spots were successfully identified by MALDI-TOF analysis and database queries, and 4 proteins, Heat shock protein B1 (HSPB1), Annexin A2 (ANXA2), Keratin, type Ⅱ cytoskeletal 80 (K2C80), Mitogen- activated protein kinase 3 (MK03), were highly expressed in exposed group while Glutathione S-transferase A2 (GSTA2) was highly expressed in non-exposed group. *Conclusion*: The changes in expression of 5 identified proteins may have a close relationship with photoaging, that helps revealing molecular mechanism of epidermal cells in photoaging.

【Key words】Photoaging; Epidermis; Proteome

作者介绍:李文静(1983-),女,硕士,
研究方向:皮肤老化。
通讯作者:陈爱军,男,副教授,E-mail:cajhx@yahoo.com.cn。
基金项目:中华医学会-欧莱雅中国人健康皮肤/毛发研究项目(编号:S 2008050627);重庆医科大学优秀博士生学位论文科研资助;重庆医科大学校级课题资助(编号:0200101008)。

245-247.
[2] Hwang S J, Chung J P, Kim Y G, et al. Usefulness of urinary trypsinogen-2 dipstick test for diagnosis of acute pancreatitis[J]. Korean J Gastroenterol, 2004, 43(6): 364.
[3] Sankaralingam S, Wesen C, Barawi M, et al Use of the urinary trypsinogen-2 dip stick test in early diagnosis of pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography[J]. Surgical Endoscopy, 2007, 21(8): 1312-1315.
[4] 周铁成,杨小云,秦 庆,等. 尿胰蛋白酶原-2 对诊断急性胰腺炎的临床应用[J]. 现代检验医学杂志,2009,24(2):119-121.
[5] 赵福兵,杨晓玲. 尿胰蛋白酶原-2 快速检测在急性胰腺炎诊断中的临床应用[J]. 现代医药卫生,2007,23(20):3106-3106.
[6] Jordanov P M D, Grigorov G M D, Todorova S M D, et al. Application of an express urinary trypsinogen-2 test for the diagnosis of Acute pancreatitis [J]. Point of care: the journal of near-patient testing & technology, 2009, 8(1): 21-24.
[7] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspension[J]. Nature Phy Sci, 1973, 241: 20-22.

(责任编辑:冉明会)