

· 临床研究 ·

基于碳纳米管-硫堇/茚四甲酸二酐衍生物膜/纳米金的新型癌胚抗原电流型免疫传感器的研究

胡 蓉, 杨联云, 刘 兵[△]

(重庆市合川区人民医院检验科 401520)

摘要:目的 探讨采用碳纳米管-硫堇(CNTs-Thi)/茚四甲酸二酐衍生物膜(PTC-NH₂)/纳米金(nano-Au)构建的新型的高灵敏癌胚抗原(CEA)免疫传感器的性能。方法 以氧化铟锡(ITO)电极为基底,在其表面首先电沉积一层纳米金,然后依次修饰 CNTs-Thi、PTC-NH₂、nano-Au,固载癌胚抗原特异性抗体(anti-CEA)制得新型高灵敏癌胚抗原(CEA)免疫传感器。通过循环伏安法考察电极修饰过程的电化学特性。结果 该免疫电极的峰电流响应与癌胚抗原的浓度在 1.0~75.0 ng/mL 的范围内保持良好的线性关系,相关系数为 0.991 5,检测下限为 0.5 ng/mL。结论 利用该方法制备的免疫传感器具有灵敏度高、线性范围宽、检测下限低等优点。

关键词: 纳米管;碳;癌胚抗原;免疫传感器;茚四甲酸二酐衍生物膜

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.27.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)27-2745-02

Study on the amperometric immunosensors for Carcinoembryonic Antigen based on CNTs-Thi/ PTC-NH₂/gold nanoparticle

Hu Rong, Yang Lianyun, Liu Bing[△]

(Clinical Laboratory, The People's Hospital of Hechuan, Chongqing 401520, China)

Abstract: Objective To explore the performance of a highly sensitive amperometric immunosensor for carcinoembryonic antigen(CEA) detection was made with carbon nanotubes-thionine (CNTs-Thi), perylenetetra-carboxylic dianhydride (PTC-NH₂) and gold nanoparticle (nano-Au). **Methods** Indium tin oxide(ITO) electrode was used as base, and on the surface carbon nanotubes-Thionine (CNTs-Thi) nanocomposite, 3, 4, 9, 10-perylenetetra-carboxylic dianhydride (PTC-NH₂), nano-Au and anti-CEA was used. The CEA immunosensor was made. And then electrochemical property during the electrode modification process was observed by cyclic voltammetry(CV). **Results** Under optimal conditions, the proposed immunosensor displayed a broader linear response to CEA, the working range was 1.0~75.0 ng/mL ($r=0.9915$) with a detection limit of 0.5 ng/mL. **Conclusion** The immunosensor made in this method exhibits high sensitivity, wider linear range, lower detection limit.

Key words: nanotubes; carbon; carcinoembryonic antigen; immunosensor; 3, 4, 9, 10-perylenetetra-carboxylic dianhydride

癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)是国际公认的肿瘤标志物之一,它的检测在临床肿瘤诊断上具有重要价值^[1-2]。目前检测 CEA 的常用免疫分析方法操作较为复杂,检验周期较长^[3-6]。电流型免疫传感器具有灵敏、特异、简单和快速的优点而备受关注^[7-8]。本研究首先在氧化铟锡(indium tin oxide, ITO)电极表面电沉积纳米金,然后依次修饰碳纳米管-硫堇(carbon nanotubes-thionin, CNTs-Thi)和茚四甲酸二酐衍生物膜(3, 4, 9, 10-perylenetetra-carboxylic dianhydride, PTC-NH₂),利用后者易成膜并带有许多氨基功能团的特性吸附带负电的纳米金(nano-Au),从而形成具有比表面积大、生物相容性好的纳米金单层固定抗体^[9-10],制备出性能良好的 CEA 免疫传感器。现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 CHI610A 型电化学工作站(上海辰华仪器公司),pHS-4C 型酸度计(成都方舟科技开发公司),AX120 电子分析天平(日本岛津产品),KQ-50 超声波清洗仪(昆山超声仪器有限公司)。CEA 和癌胚抗体(郑州博赛生物工程有限责任公司);ITO 半导体玻片(深圳元亨光电公司);CNTs(>95%,中国科学院成都有机化学研究所);THi、柠檬酸三钠、小牛血清清蛋白(bovine serum albumin, BSA)均购于 Sigma 公司(美国);氯金酸(国药集团化学试剂公司);纳米金溶液由氯金酸还原制得^[11];不同 pH 值 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)用 0.1 mol/L KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 及

0.1 mol/L KCl 配制;醋酸、丙酮、无水乙醇等其他试剂均为分析纯试剂,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 CNTs-Thi 的制备 改良文献^[7, 12]方法获得纳米复合物。首先取 10 mg CNTs 在 400 °C 下氧化 30 min 以去除原子态的碳,然后将 CNTs 放入混合酸溶液(浓硝酸和浓硫酸体积比为 1:3)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 CNTs。称取一定量的 Thi 和 CNTs 超声分散 10 min 形成 CNTs-Thi 纳米复合物。

1.3 ITO 电极的处理 将 ITO 玻璃切割成 25 mm×5 mm 的条状,依次用丙酮、无水乙醇、蒸馏水超声清洗 30 min 后晾干待用。

1.4 修饰电极的制备 将已处理的 ITO 电极(工作面积:5 mm×5 mm)置于 5 mL 质量浓度为 1% 的氯金酸溶液中,在电位为 -0.2 V 下电沉积 30 s。然后,取 10 μL CNTs-Thi 纳米复合物滴涂于 nano-Au/ITO 电极表面,于室温下晾干。称取一定量的 PTC-NH₂ 于适量的无水乙醇中超声溶解,取该溶液 15 μL 滴涂于 CNTs-Thi 修饰的电极表面,晾干形成稳定的导电膜,即得(PTC-NH₂/CNTs-Thi/nano-Au/ITO)修饰电极。将电极浸入 0.5 mL 的纳米金溶液中约 4 h 取出,将该电极置于 anti-CEA 溶液中,4 °C 下浸泡过夜。最后再将电极浸入 BSA(0.25%, pH 6.0)溶液中 1 h,以封闭电极表面的非特异性结合位点,取出,用双蒸水冲洗净,置于 4 °C 的冰箱中保存待用。制备过程见图 2 图 1。

[△] 通讯作者, Tel:13883666667; E-mail: dong721721@yahoo.com.cn.

1.5 检测方法 本研究采用循环伏安法进行电极制备过程的表征及对 CEA 的检测。整个实验在 0.1 mol/L PBS(pH 6.0) 中进行, 电位扫描区间为 $-0.7 \sim +0.3$ V, 扫描速率为 50 mV/s。

2 结 果

2.1 电极在修饰过程中的电化学表征 由封 3 图 2 可知, ITO 电极在 PBS 溶液中无明显氧化还原峰 a, 当电沉积纳米金后, 峰电流明显增大(峰 b)。将 CNTs-Thi 修饰于 nano-Au/ITO 电极表面后, 出现 THi 的特征氧化还原峰 c。当滴涂 PTC-NH₂ 到电极上后, 氧化还原峰电流降低(峰 d)。当利用形成的纳米金单层固定抗体分子, 并用蛋白质分子 BSA 封闭电极上的非特异性吸附位点后, 电极的氧化还原峰电流再次降低(峰 e)。最后, 将修饰好的电极与 20 ng/mL 的 CEA 溶液反应, 得到曲线(如峰 f)。

2.2 传感器的电流响应特性 传感器在混合溶液中的响应电流与在 50 ng/mL CEA 的溶液中孵育后得到的响应电流值基本相同, 甲胎蛋白(alpha-fetal protein, AFP)、前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)不会干扰传感器的测定。将传感器于 4 °C 湿润环境中放置 30 d, 其响应电流仍然保持初始电流的 92% 以上, 说明该传感器有良好的稳定性。缓冲溶液 pH 值为 6.0, 孵育时间为 20 min 时免疫电极的电流响应最佳。由封 3 图 3 可知, 传感器的响应峰电流值与 CEA 浓度在 1.0~75.0 ng/mL 范围内呈现良好的线性关系, 其线性回归方程为 $i = -0.1387c^{[CEA]} + 16.163$, 相关系数 $r = 0.9915$, 检测下限为 0.5 ng/mL。几种检测方法和 CEA 免疫电极值见表 1~2。

表 1 几种检测方法的比较

检测方法	线性范围	检测下限	参考文献
微芯片电泳	60.00 pg/mL~8.00 ng/mL	45.70 pg/mL	[6]
荧光免疫分析	1.25~80.00 ng/mL	0.63 ng/mL	[12]
电化学免疫传感器	2.50~80.00 ng/mL	0.90 ng/mL	[13]
电化学免疫传感器	1.00~75.00 ng/mL	0.50 ng/mL	—

—: 表示本研究方法。

表 2 CEA 免疫电极值比较

样品	标准值(ng/mL)	测定值(ng/mL)	回收率(%)
1	5.0	5.2	104.0
2	8.0	8.6	107.5
3	15.0	14.7	98.0
4	20.0	19.5	97.5
5	35.0	36.0	102.9
6	50.0	48.3	96.6
7	60.0	59.5	99.2

3 讨 论

电流型免疫传感器基于免疫反应和电化学信号检测, 具有良好的灵敏性和特异性。常规电化学免疫传感器是以玻碳电极、金电极等作为固载基底。该类电化学免疫传感器虽然灵敏度高, 但是电极制作成本高, 且由于再生性能的限制, 影响了它的进一步应用及研发^[11-13]。本研究应用新型 ITO 半导体玻片制作的一次性免疫传感器, 不仅大大降低了电极的制作成本, 而且从另外一个角度解决了电极的再生性。本研究, 将 nano-

Au、CNTs-Thi 纳米复合物和 PTC-NH₂ 固定到 ITO 电极表面, 成功构建了新型的一次性电流型 CEA 免疫传感器^[14-15]。本研究结果表明, PTC-NH₂ 膜具有良好的氧化还原活性和优异的稳定性, 且表面具有丰富的氨基, 提高了对纳米金的吸附量; 通过纳米金单层吸附固定抗体不仅可以增加抗体的结合量, 有效保持抗体的生物活性, 且增强了电流响应信号, 从而提高了免疫传感器的稳定性和灵敏度。本课题以 CEA 和 anti-CEA 为生物模型分子, 研究了该传感器对 CEA 的检测, 并将研究结果与类似的检测方法进行比较, 表明所研究的电化学传感器具有较宽的检测浓度范围和较低的下限, 更为重要的是, 该方法不仅适用于实验研究, 同时还可用于固定其他生物分子, 实现环境、医学、食品等其他基于免疫检测方面的应用研究。

参考文献:

- [1] Adam JK, Odhav B, Bhoola KD. Immune responses in cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2003, 99(1):113-132.
- [2] Lechne P, Lind P, Goldenberg DM. Can Postoperative surveillance with serial CEA immunoscintigraphy detect resectable rectal cancer recurrence and potentially improve tumor-free survival[J]. *J Am Coll Surg*, 2000, 191(5):511-518.
- [3] Cioffi M, Vietri MT, Gazzero P, et al. Serum anti-p53 antibodies in lung cancer: comparison with established tumor markers[J]. *Lung Cancer*, 2001, 33(2/3):163-169.
- [4] Kaiser T, Gudat P, Stock W, et al. Biotinylated steroid derivatives as ligands for biospecific interaction analysis with monoclonal antibodies using immunosensor devices[J]. *Anal Biochem*, 2000, 282(2):173-185.
- [5] Shen GY, Wang H, Deng T, et al. A novel piezoelectric immunosensor for detection of carcinoembryonic antigen[J]. *Talanta*, 2005, 67(1):217-220.
- [6] Ye FG, Shi M, Huang Y, et al. Noncompetitive immunoassay for carcinoembryonic antigen in human serum by microchip electrophoresis for cancer diagnosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(15/16):1058-1062.
- [7] 闵丽根, 袁若, 柴雅琴, 等. 基于纳米金与碳纳米管-纳米铂-壳聚糖纳米复合物固定癌胚抗原免疫传感器的研究[J]. *化学学报*, 2008, 66(14):1676-1680.
- [8] Yuan R, Zhuo Y, Chai YQ, et al. Determination of carcinoembryonic antigen using a novel amperometric enzyme-electrode based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and thionine[J]. *Sci China Ser B: Chem*, 2007, 50(1):97-104.
- [9] 刘中原, 袁若, 柴雅琴, 等. 新型有机-无机氧化还原复合膜层组装的无试剂高灵敏电流型前列腺特异性抗原免疫传感器研究[J]. *化学学报*, 2009, 67(7):637-644.
- [10] 李华刚, 袁若, 柴雅琴, 等. 普鲁士蓝和茚四甲酸二酞衍生物膜修饰的过氧化氢生物传感器[J]. *分析化学*, 2009, 37(6):806-810.
- [11] Slot JM, Geuze HJ. A new method of prepare gold probes for multiple labeling cytochemistry[J]. *Eur J Cell Biol*, 1985, 38(1):87-93.
- [12] Cao ZJ, Li H, Lau C. Cross-talk-free (下转第 2748 页)

(28.28%), 感染相关性 24 例(24.24%), 肾毒性药物 14 例(14.14%), 中毒 13 例(13.13%), 肾脏疾病 10 例(10.10%), 其他 10 例(10.1%)。

HA-ARF 组患者平均年龄明显高于 CA-ARF 组患者 ($P < 0.01$), 两组患者血肌酐峰值, 少尿发生比例差异有统计学意义 ($P < 0.05$), CA-ARF 组合并多器官功能衰竭的发生率比 HA-ARF 组明显减少 ($P < 0.01$), 见表 1。HA-ARF 组中有 46.15% 为外科患者, 多为 ICU 患者, CA-ARF 组中多为内科患者, 两者科室分布差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究显示, 两组患者均男性高于女性, 与国内文献报道相似^[1], HA-ARF 组发病年龄, 老年患者比例高于 CA-ARF 组。肾脏随年龄增加出现一系列生理和病理改变, 功能降低, 这使老年人的肾脏对各种肾损害因素如缺血、感染、肾毒性药物等更加敏感, 容易出现 HA-ARF^[2-3]。

CA-ARF 多为内科患者, 外科患者不足 1/3, 而 HA-ARF 外科患者为 46.15%, 多为 ICU 患者, 这与外科近年开展大量复杂手术及有创性诊治有关。感染、药物、手术等是 ARF 的主要原因^[4-5], 本研究显示, HA-ARF 感染发生率较 CA-ARF 高, 提示积极预防和控制院内感染可降低 HA-ARF 发病率; 肾毒性药物引起 CA-ARF 和 HA-ARF 组患者的发病率分别为 14.14%、27.69%, 与文献报道一致^[6-7], 提示无论院内或社区应慎重使用肾毒性药物及易过敏药物; 外科手术是 HA-ARF 另一重要原因, 因为许多患者有潜在的并发症, 如糖尿病、高血压、血管性疾病、心脏疾病等。有研究显示, 左室射血分数小于 35%, 心脏指数小于 1.7 L/(min·m²) 时, 会造成急性肾损伤^[8], 加上术中失血、体液丢失、术后感染及肾毒性药物的应用, 加强围术期处理尤为重要。

国外有研究报道, HA-ARF 的死亡率为 19.4% ~ 55%^[9-14]。HA-ARF 患者具备透析指征时应积极透析。本研究 HA-ARF 多采用连续性血液净化治疗, ARF 一旦并发多器官功能衰竭, 常规的血液透析有许多弊端, CRRT 十分合适, 因为其血流动力学稳定, 溶质清除全面, 且能较快改善组织氧代谢^[15]。有研究报道, 贝那普利对甘露醇所致急性肾损害有预防或减轻作用^[16]; 血必净注射液对急性胰腺炎相关性肾损伤具有预防和治疗作用^[17]。

总之, 积极控制感染并进行病因治疗, 合理用药, 及时纠正休克, 注意在围术期保护心脏等重要脏器的功能是 HA-ARF 防治的关键。

参考文献:

[1] 廖晓辉, 张玲, 钟玲, 等. 住院患者急性肾损伤的病因及预后分析[J]. 重庆医学, 2010, 39(10): 1250-1251.
[2] Silva FG. The aging kidney: a review-Part II [J]. Int Urol Nephrol, 2005, 37(2): 419-432.

[3] 李美花, 段法留, 王小丹, 等. 高龄老人医院获得性急性肾功能衰竭的分析[J]. 中国老年学杂志, 2005, 25(5): 500-502.
[4] 周春华. 医院获得性急性肾衰竭[J]. 北京医学, 2006, 28(4): 230-231.
[5] 王悦, 崔专, 范敏华. 住院患者中急性肾功能衰竭的流行病学和病因学分析[J]. 中国危重急救医学, 2005, 17(2): 117-120.
[6] Luyckx VA, Naicker S. Acute kidney injury associated with the use of traditional medicines[J]. Nat Clin Pract Nephrol, 2008, 4(12): 664-671.
[7] 陈楠, 张文, 陈晓农, 等. 81 例药物性急性肾衰竭临床分析[J]. 临床内科杂志, 2003, 20(4): 179-181.
[8] 刘笑芬, 孔耀中, 甘宁. 原发性肾病综合症并发急性肾衰竭临床病因与病理分析[J]. 临床医学, 2006, 26(1): 45-46.
[9] Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency[J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39(5): 930-936.
[10] Waikar SS, Curhan GC, Wald R, et al. Declining mortality in patients with acute renal failure, 1988 to 2002[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(4): 1143-1150.
[11] Hoste EA, Clermont G, Kersten A, et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis[J]. Crit Care, 2006, 10(3): 73.
[12] Liano F, Felipe C, Tenorio MT, et al. Long-term outcome of acute tubular necrosis: A contribution to its natural history[J]. Kidney International, 2007, 71(7): 679-686.
[13] VA/NIH Acute Renal Failure Trial Network, Palevsky PM, Zhang JH, et al. Intensity of renal support in critically ill patients with acute kidney injury[J]. N Engl J Med, 2008, 359(1): 7-20.
[14] Chertow GM, Soroko SH, Pagnini EP, et al. Mortality after acute renal failure: Models for prognostic stratification and risk adjustment[J]. Kidney Int, 2006, 70(6): 1120-1126.
[15] 张磊. 急性肾衰竭的死亡病例分析[J]. 重庆医学, 2009, 38(1): 131-132.
[16] 金泉华, 张洪梅. 贝那普利预防甘露醇所致急性肾损害的疗效[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(6): 965-967.
[17] 邢伯, 曾琦, 王日兴, 等. 血必净对急性胰腺炎相关性肾损伤的预防和治疗作用[J]. 中国急救医学, 2008, 28(8): 683-685.

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-04-01)

(上接第 2746 页)

simultaneous fluoroimmunoassay of two 1 biomarkers based on dual-color quantum dots Anal[J]. Anal Chim Acta, 2011, 698(1/2): 44-50.

[13] Yang MH, Yang Y, Yang HF, 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.

[14] 袁若, 卓颖, 柴雅琴, 等. 基于纳米金/硫基层层自组装的新型电流型酶-癌胚抗原免疫传感器[J]. 中国科学, 2006, 36(5): 425-432.
[15] 贺秀兰, 袁若, 柴雅琴, 等. 基于双层纳米金修饰的高灵敏度型乙肝表面抗原免疫传感器研究[J]. 分析实验室, 2006, 25(9): 1-5.

(收稿日期: 2011-05-20 修回日期: 2011-06-18)