

## 电化学免疫传感器超灵敏检测髓过氧化物酶的研究\*

逯岭松<sup>1</sup>, 刘蓓<sup>2</sup>, 马霄<sup>1</sup>, 虞成<sup>1</sup>, 吴舜<sup>1</sup>, 冷建杭<sup>1△</sup>

(1. 浙江省杭州市第一人民医院中心实验室 310006; 2. 浙江大学医学院附属妇产科医院生殖遗传科, 浙江杭州 310006)

**[摘要]** **目的** 本研究拟建立一种电化学免疫传感器用于超灵敏检测人血清中髓过氧化物酶(MPO)水平的方法。**方法** 通过石墨化多孔碳-金复合纳米材料(AuNPs@GMCs)将 MPO 抗体固定到玻碳电极表面, 研制出一种新型 MPO 电化学免疫传感器, 探讨了实验条件对传感器性能的影响, 并与酶联免疫吸附试验(ELISA)进行方法学比较。**结果** 在最优条件下该传感器对 MPO 反应灵敏, 其线性范围为 2.000~300.000 ng/mL, 相关系数为 0.999, 检出限为 0.5 ng/mL, 与 ELISA 法检测结果的相关系数为 0.983。**结论** 该电化学免疫传感器可实现对 MPO 的超灵敏检测。

**[关键词]** 髓过氧化物酶; 电化学免疫传感器; 石墨化多孔碳; 纳米金

**[中图分类号]** R446.61

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)36-5109-03

## Study on the electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of myeloperoxidase\*

Lu Lingsong<sup>1</sup>, Liu Bei<sup>2</sup>, Ma Xiao<sup>1</sup>, Yu Cheng<sup>1</sup>, Wu Shun<sup>1</sup>, Leng Jianhang<sup>1△</sup>

(1. Central Laboratory, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310006, China; 2. Department of Reproductive Genetics, Affiliated Women's Hospital of School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310006, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct an electrochemical immunosensor for ultrasensitive determination of myeloperoxidase (MPO). **Methods** The electrochemical immunosensor for MPO was prepared by modifying the electrode using Au-graphitized mesoporous carbon nanoparticles (AuNPs@GMCs) hybrid and immobilizing MPO antibodies onto the glass carbon electrode surface. The effect of experimental parameters on the immunosensor and results comparison with ELISA were investigated. **Results** The immunosensor was sensitive to MPO with a linear relationship between 2.000 and 300.000 ng/mL and a correlation coefficient of 0.999; the detection limit was 0.5 ng/mL. The correlation coefficient of two methods was 0.983. **Conclusion** The immunosensor can be used for ultrasensitive detection of MPO.

**[Key words]** myelo peroxidase; electrochemical immunosensor; graphitized mesoporous carbon nanoparticles; Au nanoparticles

髓过氧化物酶(MPO)是由活化中性粒细胞、单核细胞及组织巨噬细胞颗粒释放的一种含血红素的过氧化物酶<sup>[1]</sup>。大量研究发现, 血清 MPO 能在未发生心肌坏死的情况下预测不良心脏事件的危险性以及在随后的 1~6 个月内发生严重心血管疾病的危险性, 是心血管疾病风险的独立预测因子<sup>[2-3]</sup>。因此, MPO 的检测在心血管疾病的早期临床诊断中起着重要的作用。目前, MPO 的常规检测方法, 如放射免疫分析法和酶联免疫吸附试验(ELISA), 具有一定的灵敏度和特异性, 但是操作繁琐、耗时, 需要精密的仪器和专业人员。针对以上不足, 本研究通过将 MPO 抗体固定在石墨化多孔碳-金纳米粒子(AuNPs@GMCs)复合材料修饰的玻碳电极表面, 研制了一种 MPO 电化学免疫传感器, 并对传感器的性能进行评价, 现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 试剂** MPO 抗原、MPO 抗体、牛血清清蛋白(BSA, 96%~99%)、壳聚糖(CS)、氯金酸、石墨化多孔碳(GMCs, 球体直径 330 nm, 孔径 137 埃)购买于美国 Sigma 公司。人髓过氧化物酶 ELISA 试剂盒购买于上海沪峰生物科技有限公司。1,6-己二硫醇[HS(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>SH, 97%]购买于上海生工生物有限公司。实验所用缓冲液均为含 5 mmol/L [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup>和 0.1 mol/L KCl 的 0.1 mol/L PBS 溶液(pH 7.0), 实验用水为双蒸水, 其他试剂均为分析纯。

**1.2 仪器** CHI 6043D 电化学工作站, 玻碳电极(GC, 工作电

极), 铂丝(对电极), Ag/AgCl 电极(参比电极), LIBROR AEL-200 电子天平, BRANSON B3200S-T 恒温超声仪, BIORAD 全自动酶免分析仪。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 纳米金(AuNPs)的制备** 采用经典柠檬酸钠还原法制备 AuNPs 溶液, 并用透射电子显微镜对其进行表征。

**1.3.2 GMCs 包裹的纳米金悬液(AuNPs@GMCs)的制备** 将适量 GMCs 置于含 2 mmol/L HS(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>SH 的乙醇溶液中, 室温 24 h 以上, 使其表面富含巯基(-SH)。用乙醇和双蒸水反复清洗预处理后的 GMCs 并用氮气干燥, 然后将富含-SH 的 GMCs 粉末置于 AuNPs 溶液中 10 h, 使其通过-SH 吸附 AuNPs。随后用吸管尽可能多地吸掉上清液, 去除未结合的 AuNPs, 使用双蒸水清洗, 氮气下干燥后即制得 AuNPs@GMCs 粉末。将壳聚糖粉末置于 1.0% (v/v) 的醋酸溶液中, 室温超声 30 min 后制得 0.5 mg/mL 的壳聚糖溶液。然后将 AuNPs@GMCs 粉末加入到 0.5 mg/mL 的壳聚糖溶液中超声后得到 2.0 mg/mL 黑色 AuNPs@GMCs 悬液。

**1.3.3 MPO 免疫传感器的制作** 玻碳电极经 0.3 μm、0.05 μm 铝粉抛光至镜面以充分去除电极表面的杂质, 依次置于双蒸水、乙醇、双蒸水中超声清洗 5 min, 晾干待用。将 5 μL 的 AuNPs@GMCs 悬液滴涂于预处理的玻碳电极表面, 室温晾干, 置于 MPO 溶液中于 4 °C 过夜。最后在室温下将电极浸入 2.5 g/L 的 BSA 溶液中 1 h, 以封闭电极上的非特异性吸附位

点,制成 MPO 电化学免疫传感器,4 °C 下保存备用。该传感器的制作流程如图 1 所示。

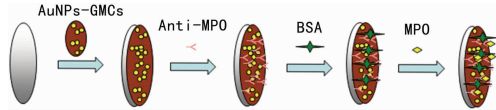


图 1 MPO 电化学免疫传感器的制作流程

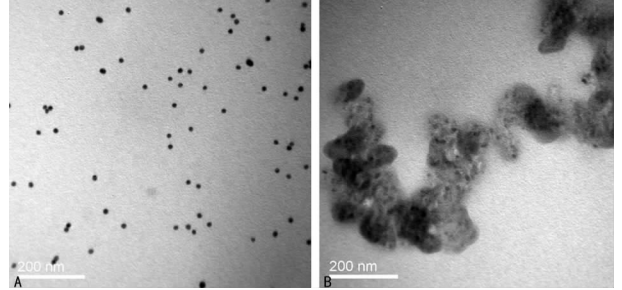
**1.4 检测方法** 在三电极体系下,将制备好的免疫传感器置于含 5 mmol/L  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  和 0.1 mol/L KCl 的 0.1 mol/L PBS 溶液 (pH 7.0) 中,记录电极稳定时的空白电流值  $I_0$ 。按照一定的比例稀释 MPO 标准品,配成不同浓度的 MPO 标准溶液,将修饰电极置于不同浓度的 MPO 标准溶液中 37 °C 反应 20 min 后,再在工作溶液中进行差分脉冲伏安测试,记录稳定后的电流值  $I_1$ 。根据不同浓度的 MPO 所对应的电流差值  $\Delta I (\Delta I = I_0 - I_1)$  绘制标准曲线。

**1.5 酶联免疫吸附试验 (ELISA)** 采用商品化人 MPO ELISA 试剂盒严格按照试剂盒说明书操作步骤对 25 例血清样品 (来自杭州市第一人民医院) 进行检测。

## 2 结果

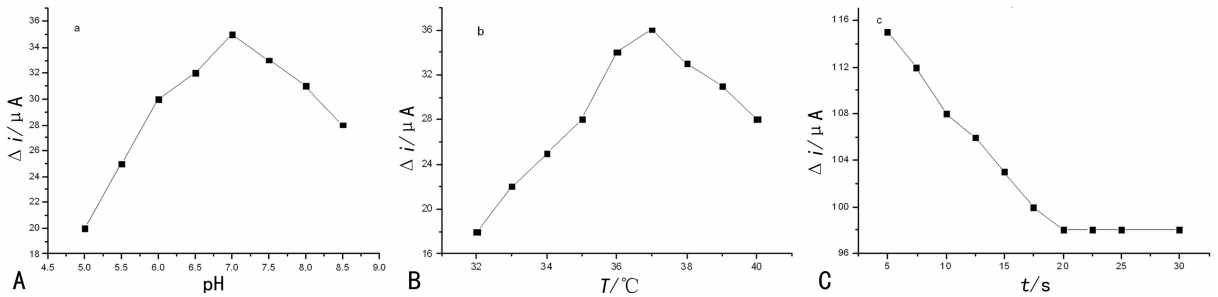
**2.1 AuNPs@GMCs 复合纳米材料的表征** 通过透射电子显微镜对 AuNPs@GMCs 进行表征,结果如图 2 所示。GMCs 呈三维有序球形多孔结构,AuNPs 分散较好,平均直径为 20 nm,均匀吸附在 GMCs 上。

**2.2 实验条件优化** 本实验分别对检测溶液的 pH、免疫反应温度和时间进行了优化。从图 3 可以看出,当工作溶液的 pH 达到 7.0、孵育温度为 37 °C、孵育 20 min 时,传感器的性能达到最佳状态。



A: AuNPs; B: AuNPs@GMCs 复合纳米材料。

图 2 透射电镜图像



A: 工作溶液 pH; B: 孵育温度; C: 孵育时间对传感器电流响应的影响。

图 3 实验条件

**2.3 标准曲线** 配置 300.000、100.000、50.000、25.000、12.500、6.250、3.125、2.000 ng/mL 8 个不同浓度的 MPO 标准溶液,使用制备好的传感器对其进行检测,分别记录电流变化值  $\Delta I$ ,绘制标准曲线 (图 4)。结果表明,MPO 浓度在 2.000~300.000 ng/mL 范围内与  $\Delta I$  成良好的线性关系,线性方程为:  $Y = 12.980 + 0.234X$ ,线性相关系数  $r = 0.999$ 。将传感器在空白溶液中连续扫描 10 次,根据 3 倍空白标准差与斜率的比值得出其检出限为 0.5 ng/mL。

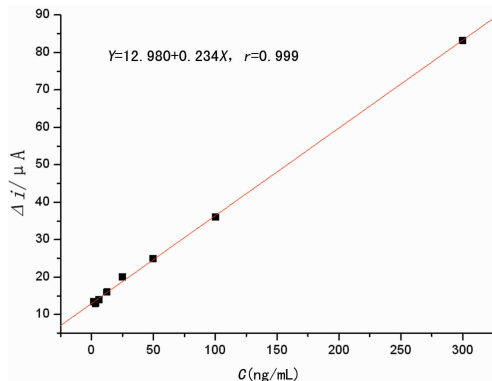


图 4 MPO 浓度与峰电流的线性关系

**2.4 临床应用** 使用本实验制备好的 MPO 电化学免疫传感器检测了 25 例临床血清标本,同时采用标准 ELISA 法进行平行试验。图 5 为两种方法检测结果的相关性分析,由图可知,两种方法检测结果的相关系数为 0.983 ( $y = 2.711 + 0.977x$ 。

$x$ : ELISA;  $y$ : 免疫传感器)。

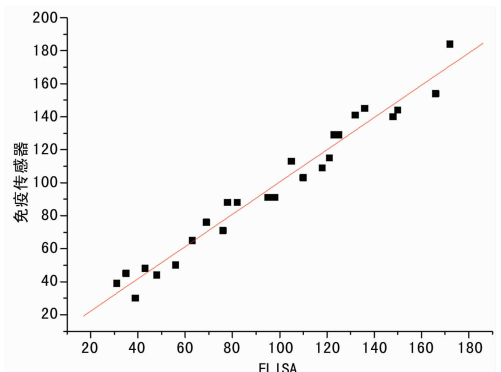


图 5 电化学免疫传感器与 ELISA 法血清样本检测结果相关性分析

## 3 讨论

电化学免疫传感器将电化学检测技术和抗原抗体特异性反应原理结合在一起,通过将生物反应信号转化为电化学信号,可实现对靶物质的定量检测。与传统的免疫分析技术比较,电化学免疫传感器不仅具有免疫反应的高特异性,而且结合了电化学检测技术的高灵敏度。由于电化学免疫传感器具有便携、成本低、操作方便、反应时间短等优势,使其备受关注并在疾病标志物检测领域得到广泛应用<sup>[4-5]</sup>。目前,将电化学免疫传感器应用于 MPO 检测的报道尚不多见<sup>[6-9]</sup>。

制备免疫传感器的关键问题:(1)如何保持抗体在电极表

面的活性? 因为这不仅关系到检测结果的可靠性,还会影响传感器的再生能力。MPO 抗体作为一种蛋白质,只有在具有良好生物相容性的环境中才能最大地保持其生物活性。由于 AuNPs 具有较大的比表面积、良好的生物相容性及较高的表面自由能,使其不仅能够牢固地吸附抗体、增大抗体的负载量,而且能够保持抗体的活性<sup>[10-12]</sup>。(2)如何放大检测信号,提高电流响应? 这将直接影响传感器的检测灵敏度。GMCs 具有较强的电子传导能力、石墨样结构及有效的吸附和去吸附能力等优点<sup>[13-15]</sup>,能够极大地放大电流信号,提高免疫传感器的检测灵敏度。

本实验采用 AuNPs@GMCs 复合纳米材料修饰电极,一方面可以保持 MPO 抗体的活性,另一方面可以促进电子传递,极大地提高电流响应,增加检测灵敏度。为了使传感器发挥最佳性能,本实验对检测条件进行了优化。从图 3 可知,当工作溶液的 pH 为 7.0 时,免疫传感器在 37 °C 环境下和抗原溶液一起孵育 20 min 时,传感器的电流响应最大。在最优实验条件下,该电化学免疫传感器对 MPO 响应良好,表现出较宽的检测范围。MPO 浓度在 2.000~300.000 ng/mL 范围内与  $\Delta I$  呈现良好的线性关系,线性相关系数达到 0.999,且该传感器检出限较低,可以达到 0.500 ng/mL,说明该传感器的灵敏度较高。另外,本实验使用制备好的 MPO 电化学免疫传感器检测了 25 例临床血清标本,并与标准 ELISA 进行相关性分析。由图 5 可知,2 种方法检测结果的相关系数为 0.983,结果令人满意。

综上所述,本实验制备的电化学免疫传感器具有良好的性能,在检测 MPO 方面表现出较宽的线性范围和较低的检出限,可实现 MPO 的超灵敏检测,对心血管疾病患者的早期诊断具有重要的意义。

## 参考文献

- [1] Kataoka Y, Shao M, Wolski K, et al. Myeloperoxidase levels predict accelerated progression of coronary atherosclerosis in diabetic patients: insights from intravascular ultrasound[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 232(2): 377-383.
- [2] Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(17): 1595-1604.
- [3] Frossard M, Fuchs I, Leitner JM, et al. Platelet function predicts myocardial damage in patients with acute myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2004, 110(11): 1392-1397.
- [4] Sharma MK, Narayanan J, Upadhyay S, et al. Electrochemical immunosensor based on bismuth nanocomposite film and cadmium ions functionalized titanium phosphates for the detection of anthrax protective antigen toxin[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74: 299-304.
- [5] 毛燕群. 快速灵敏检测 HCV 核心抗原的免疫新方法及其性能分析[J]. *重庆医学*, 2012, 41(7): 701-703.
- [6] Liu B, Lu L, Li Q, et al. Disposable electrochemical immunosensor for myeloperoxidase based on the Indium Tin oxide electrode modified with a Ionic liquid composite film composed of Gold nanoparticles, poly(o-phenylene diamine) and Carbon nanotubes[J]. *Microchim Acta*, 2011, 173(3/4): 513-520.
- [7] Lu L, Liu B, Li S, et al. Improved electrochemical immunosensor for myeloperoxidase in human serum based on nanogold/Cerium dioxide-BMIMPF<sub>6</sub>/L-Cysteine composite film[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 86(2): 339-344.
- [8] Barallat J, Olivé-Monllau R, Gonzalo-Ruiz J, et al. Chronoamperometric magneto immunosensor for myeloperoxidase detection in human plasma based on a magnetic Switch produced by 3D laser sintering[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(19): 9049-9056.
- [9] Herrasti Z, Martínez F, Baldrich E. Carbon nanotube wiring for signal amplification of electrochemical magneto immunosensors: application to myeloperoxidase detection[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(22): 5487-5493.
- [10] Zhao CF, Jiang ZQ, Cai XH, et al. Ultrasensitive and reliable dopamine sensor based on polythionine/AuNPs composites[J]. *J Electroanalytic Chem*, 2015, 748: 16-22.
- [11] Xu Q, Gu SX, Jin LY, et al. Graphene/polyaniline/gold nanoparticles nanocomposite for the direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensing[J]. *Sensors Actuators B Chem*, 2014, 190(1): 562-569.
- [12] Zhang Y, Dai WJ, Liu F, et al. Ultrasensitive electrochemiluminescent immunosensor based on dual signal amplification strategy of gold nanoparticles-dotted graphene composites and CdTe quantum dots coated silica nanoparticles[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(14): 4921-4929.
- [13] Walcarius A. Electrocatalysis, sensors and biosensors in analytical chemistry based on ordered mesoporous and macroporous carbon-modified electrodes [J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2012, 38(9): 79-97.
- [14] Ma C, Liang M, Wang L, et al. MultisHRP-DNA-coated CMWNTs as signal labels for an ultrasensitive hepatitis C virus core antigen electrochemical immunosensor[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 47: 467-474.
- [15] Neimark A, Lin Y, Ravikovitch PI, et al. Quenched solid density functional theory and pore size analysis of microporous carbons[J]. *Carbon*, 2009, 47(7): 1617-1628.

(收稿日期: 2015-06-05 修回日期: 2015-08-21)

(上接第 5108 页)

- [13] Koutourousiou M, Grotenhuis A, Kontogeorgos G, et al. Treatment of Rathke's cleft cysts: Experience at a single centre[J]. *J Clin Neurosci*, 2009, 16(7): 900-903.
- [14] Mendelson ZS, Husain Q, Kanumuri VV, et al. Endoscopic transsphenoidal surgery of Rathke's cleft cyst[J]. *J*

*Clin Neurosci*, 2015, 22(1): 149-154.

- [15] Knappe UJ, Engelbach M, Konz K, et al. Ultrasound-assisted microsurgery for cushing's disease[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2009, 119(4): 191-200.

(收稿日期: 2015-06-25 修回日期: 2015-08-29)