

信号增强型电化学免疫传感器用于 NT-proBNP 高灵敏检测的研究*

苏会岚

(成都医学院公共卫生系,成都 610500)

[摘要] 目的 构建用于人 N 末端前钠尿肽(NT-proBNP)高灵敏检测的电化学传感器。方法 采用自组装方法将牛血清清蛋白-碳纳米管复合物(BSA-MWNTs)固载在洁净的玻璃碳电极表面,结合共价交联固定化技术和亲和素-生物素信号放大技术,制得 NT-proBNP 高灵敏免疫传感器,优化实验条件,采用电化学方法对电极的响应特性进行研究。结果 在最优实验条件下,该传感器对 NT-proBNP 响应的线性范围为 1~30 ng/mL 和 30~150 ng/mL,检出限为 0.03 ng/mL。结论 该方法可实现对 NT-proBNP 的超灵敏检测。

[关键词] 电化学;免疫传感器;NT-proBNP;牛血清清蛋白;碳纳米管

[中图分类号] R446.61

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)26-3684-04

Research on the signal enhanced electrochemical immunosensor for the detection of NT-proBNP*

Su Huilan

(Department of Public Health, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China)

[Abstract] **Objective** To construct an electrochemical immunosensor for detection NT-proBNP with high sensitivity. **Methods** The proposed immunosensor was prepared by the follows; firstly, the hybrid material BSA-MWNTs was self-assembled onto the surface of cleaned glass carbon electrode; subsequently, streptavidin was covalently linked to the modified electrode; then, biotin labeled antibody could be absorbed to the electrode by the reaction between streptavidin and biotin. The effects of experimental parameters have been investigated. **Results** Under the optimal experiment conditions, the prepared immunosensor displayed a wide liner relationship between 1-30 ng/mL and 30-150.0 ng/mL with a detection limit of 0.03 ng/mL. **Conclusion** The NT-proBNP immunosensor can be utilized for the detection of NT-proBNP with low concentration.

[Key words] electrochemistry; immuno-sensor; NT-proBNP; bovine serum albumin; carbon nanotube

N 末端前钠尿肽(amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP),是从其氨基酸前体蛋白(pro-BNP)中的羧基端裂解而来,含 76 个氨基酸的非活性多肽。研究证实,NT-proBNP 能反映心脏功能损伤及损伤程度,目前已被作为心衰的一个特异性的疾病标志物在临床上广泛应用^[1-3]。由于 NT-proBNP 在血清中含量低,因此,建立一种高灵敏的 NT-proBNP 检测方法在心血管疾病的早期临床诊断中起着重要作用。NT-proBNP 的常规检测方法主要有放射免疫分析、发光免疫分析、酶联免疫吸附试验,具有一定的灵敏度和特异性,但操作繁琐、耗时。而基于免疫技术与电化学检测相结合的免疫传感器技术可实现免疫分子的定量分析,且灵敏度高、分析速度快^[4]。本研究通过将牛血清清蛋白-碳纳米管复合物(BSA-MWNTs)用于构建生物分子固载界面,通过共价键和固定化技术及生物素-亲和素信号放大技术,研制了一种 NT-proBNP 的电化学免疫传感器,优化实验条件,并研究其响应性能。

1 材料与方 法

1.1 仪器 CHI660 电化学工作站(上海辰华仪器公司),BRANSONIC200 超声清洗仪(德国 BRANSONULTRASHALL 公司),MP230 酸度计(瑞士 Mettler-toledo 公司),AB204-S 电子天平(瑞士 Mettler-toledo 公司),格力冰柜,玻碳

电极,微量进样器,烧杯若干,50mL 容量瓶,玻璃棒,洗瓶等。

1.2 试剂 NT-proBNP、bio-anti-NT-proBNP、牛血清清蛋白(BSA)、链霉亲和素(SA)、多壁碳纳米管(MWNTs)、EDC、NHS、0.3 μm 的 Al₂O₃ 粉末,实验室用水均为二次去离子水,铁氰化钾,亚铁氰化钾,pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 的 PBS 缓冲液等。

1.3 NT-proBNP 免疫传感器的制备

1.3.1 测试底液[K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ 溶液] 用电子天平称取 0.0823 g 的铁氰化钾和 0.1056 g 的亚铁氰化钾于小烧杯中,加入 pH=5.0 的 PBS 缓冲溶液溶解,倒入 50 mL 容量瓶中,配成两者各 5 mmol/L 的混合溶液,备用。

1.3.2 BSA-MWNTs 复合物的制备 MWNTs 使用前用浓硝酸:浓硫酸(3:1)80℃处理 5 h,水洗后真空干燥。取 1 mL 0.25% BSA 溶液于小烧杯中,向其中加入 1 mg 碳纳米管,振荡,超声半小时得到分散良好的 BSA-MWNTs 的复合物。

1.3.3 EDC 和 NHS 交联剂的制备 在电子天平上称取 0.06 g 的 NHS 和 0.08 g 的 EDC 于 50 mL 的烧杯中,加入 4 mL 蒸馏水,用玻璃板搅拌使之完全溶解,即得 EDC 和 NHS 各约 10 mmol/L 的交联剂(此交联剂不可久置)。

1.3.4 MWNTs 传感器的制备 首先,在 1.0、0.3 μm 的 Al₂O₃ 糊中将玻碳电极(GCE)表面抛光,用蒸馏水超声清洗数

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81401757)。 作者简介:苏会岚(1986-),讲师,博士,主要从事疾病标志物的快速检测方法的研究。

次,最后室温晾干。其次,将 10 μL BSA-MWNTs 复合物滴涂于经预处理的电极表面,室温晾干,再将其浸泡在 EDC/NHS 溶液中,2 h 之后将电极于 4 °C 下与链霉亲和素(sa)反应 5 h,再与生物素标记的 anti-NT-proBNP (bio-anti-NT-proBNP) 反应 2 h。最后在 0.25% BSA 中封闭 1 h,制得 NT-proBNP 传感器。将电极置于 4 °C 的冰箱中保存待用。电极制备过程示意图,见图 1。

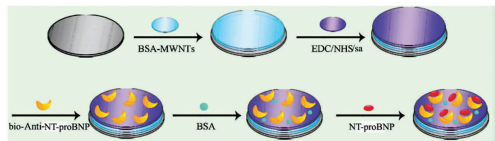
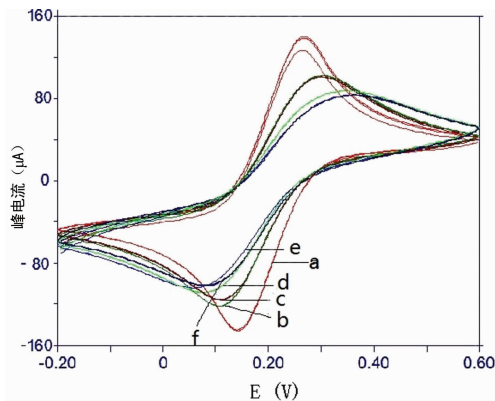


图 1 免疫传感器的修饰过程示意图

1.4 检测方法 利用循环伏安法(CV)对电极的制备过程进行表征,检测过程中饱和甘汞电极为参比电极,Pt 电极为对电极,玻碳电极为工作电极,电极表征在 5 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ + 5 mmol/L $K_4Fe(CN)_6$ + 0.1 mmol/L KCl + 0.1 mmol/L PBS(pH=7.0) 的溶液中进行;循环伏安法电位区间为 -0.2~0.6 V,扫描速率为 50 mV/s。

2 结果

2.1 不同修饰电极的电化学表征 用循环伏安法研究电极在制备过程中的电化学特性,其结果见图 2。图中曲线 a 为裸电极的循环伏安表征图,可以观察到一对氧化还原峰。曲线 b 为 BSA-MWNTs 复合纳米材料修饰的玻碳电极的表征图,从图中可以看到,氧化还原峰电流均有降低,说明该复合纳米材料成功的固载在电极表面。由于亲和素、生物素、anti-NT-proBNP、BSA 等生物分子都具有电化学惰性,因此曲线 c、d、e、f 的氧化还原峰电流均有不同程度的降低,响应电流降低的幅度和生物分子的大小有一定相关性。综上可证实:该免疫传感器得以成功构建。



a: GCE; b: BSA-MWNTs/GCE; c: sa-EDC/NHS-BSA-MWNTs-GCE; d: bio-anti-NT-proBNP/EDC/NHS-BSA-MWNTs-GCE; e: BSA/bio-anti-NT-proBNP/EDC/NHS-BSA-MWNTs-GCE; f: NT-proBNP/BSA/bio-anti-NT-proBNP/EDC/NHS-BSA-MWNTs-GCE。

图 2 电极修饰过程的循环伏安图

2.2 实验条件的优化

2.2.1 测试底液 pH 的选择 测试底液 pH 会影响电极电子传递效率及敏感膜的稳定性,不适宜的 pH 还会影响生物分子的活性,导致蛋白质间的亲和力降低,从而影响免疫分子的结合效率及免疫复合物的稳定。本研究分别用 pH 值为 5.0、

5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 的 PBS 缓冲液配制的 $K_4Fe(CN)_6$ / $K_3Fe(CN)_6$ 为测试底液,用循环伏安法测试不同 pH 值下免疫电极的循环伏安曲线,从图中得出不同 pH 值下的峰电流值(图 3),其中当 pH 为 7.0 时,氧化还原峰电流均达到最大值。故本文选择 pH 7.0 的 PBS 作为测试底液。

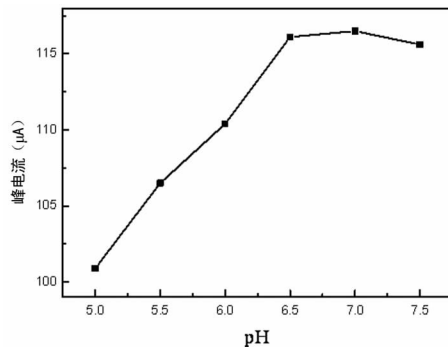


图 3 pH 对峰电流的影响

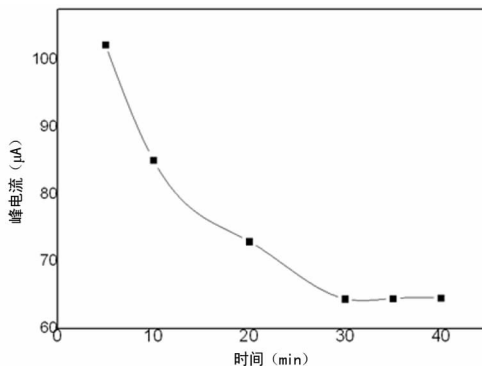


图 4 孵育时间对峰电流的影响

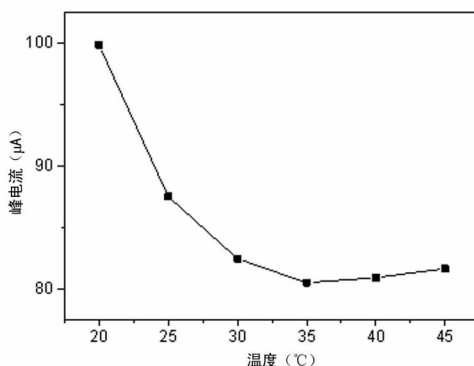


图 5 孵育温度对峰电流的影响

2.2.2 NT-proBNP 孵育时间的选择 免疫反应完成的程度与反应时间有关,将修饰有抗体的免疫电极放入 50 ng/mL 抗原溶液中,反应不同时间(5、10、20、30、35、40 min),用循环伏安法测定其响应峰电流的变化,其结果见图 4。结果表明,反应 30 min 时,响应电流趋于稳定,表明免疫反应已经完成。故实验过程中选择的最佳孵育时间为 30 min。

2.2.3 NT-proBNP 孵育温度的选择 温度是影响免疫反应的一个重要因素,本实验在 20~45 °C 范围内考察了温度与反应信号的关系,抗原的孵育时间均为 30 min。结果表明随着温度从 20~45 °C 升高,响应峰电流减小,说明抗原和抗体反应的程度逐渐增加。在温度较低时(20~30 °C),生物分子的活

性较低,免疫反应效率低,且不利于电极的稳定性。随着温度逐渐升高,免疫反应效率不断提高,但温度过高也会引起蛋白质变性而失活,减少使用寿命。因此,本研究选择孵育温度为 35 ℃,见图 5。

2.2.4 免疫传感器的响应特性 在最优实验条件下,分别测定了该免疫传感器对不同浓度(1、3、5、8、10、20、30、50、80、100、150 ng/mL)NT-proBNP 的响应,见图 6。当溶液中的抗原和电极表面的抗体特异性结合后,生成的免疫复合物为高电阻物质,阻碍了修饰电极表面的电子传输,致使响应电流下降。NT-proBNP 浓度越高,敏感膜上生成的免疫复合物越多,响应电流下降就越明显。结果显示:NT-proBNP 线性范围为 1~30 ng/mL 和 30~150 ng/mL,斜率分别为 1.462 88 和 197 57,检出限为 0.03 ng/mL(性噪比 3:1)。

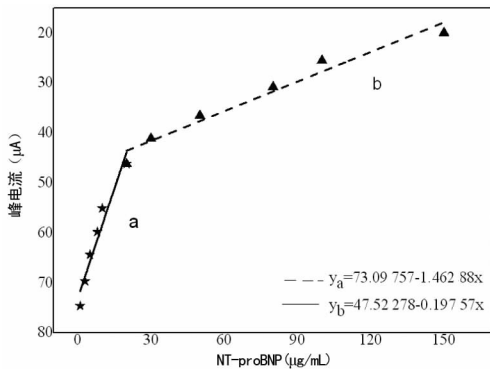


图 6 NT-proBNP 抗原浓度与峰电流的线性关系

2.2.5 免疫传感器的选择性研究 为了考察该传感器的选择性,实验同时制备 6 支相同的免疫传感器,将传感器于 30 ng/mL 的 BSA、CEA、PSA、HRP 和 10 ng/mL 的 NT-proBNP 混合溶液孵育 30 min,传感器电极编号 1、2、3、4、5、6 的响应电流(I)与干扰物质存在时的响应电流(I₁)之间的差值ΔI 分别为 0.021、0.014、0.019、0.031、0.028、0.030 μA,说明该传感器选择性良好。

2.2.6 免疫传感器的重现性研究 本研究还通过同时制备 6 支相同的传感器来考察该传感器的重现性。通过将这 6 支免疫传感器在相同条件下孵育相同浓度抗原后行电化学检测,电极编号 1、2、3、4、5、6 响应电流分别为 55.421、55.312、55.425、55.586、55.313、55.521 μA,相对标准偏差为 10.98%,表明该传感器重现性良好。

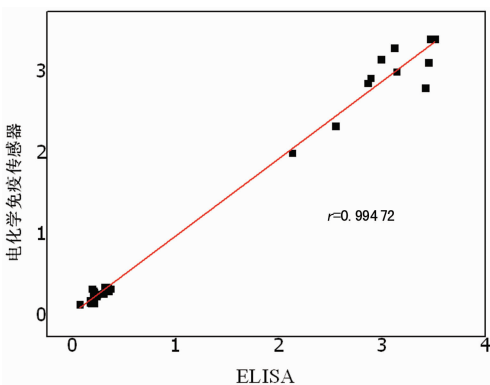


图 7 NT-proBNP 电化学免疫传感器与 ELISA 法血清样本检测结果相关性分析

2.2.7 临床应用 使用本研究提出的高灵敏 NT-proBNP 电化学免疫传感器检测了 40 例临床血清标本,同时采用 ELISA 法进行平行试验,两种方法的线性相关性为 0.994 72(图 7)。

3 讨论

电化学免疫传感器是将抗原抗体间的特异性识别作用与电化学分析方法结合,通过免疫反应前后电化学信号的变化而实现对目标分子的检测。与临床上现有的化学发光法相比,电化学免疫传感器具有检测速度快、响应稳定、操作简便、成本低等优势,在疾病标志物高灵敏检测方面得到广泛应用^[5-9]。

生物分子的固定化是免疫传感器制备过程中的关键技术之一,是否能有效保证生物分子的活性关系到检测结果可靠性。本实验中采用 BSA 分散的 MWNTs 作为固定化基质,应用 BSA 的良好生物相容性^[10-11],结合生物素和生物素的固定系统,可有效保证电极表面固定化抗体的生物活性,这一结论通过对传感器制备过程的表征得以证实。由于 NT-proBNP 在健康人血清中含量低,免疫传感器的灵敏度是能否准确检出 NT-proBNP 的关键。MWNTs 具有良好的导电性能及大的比表面积,有效提高电极比表面积的同时可增强电极表面的电子传输能力^[12-13]。本研究中将 MWNTs 掺杂到 BSA 中,可有效提高电极表面的电子传输效率,增强电流响应信号。同时,本研究还将生物素-亲和素系统引入修饰电极中,可有效提高抗体的固载量,提供更多的免疫结合位点^[14-15],增强免疫传感器的检测灵敏度。

为了使传感器的性能最佳,研究中对实验条件进行了优化,实验结果表明,测试底液 pH7.0、孵育温度 35 ℃、孵育时间 30 min 为传感器的最佳工作条件。在最优实验条件下,该免疫传感器对 NT-proBNP 响应良好,线性范围为 1~30 ng/mL 和 30~150 ng/mL,检出限为 0.03 ng/mL(S/n=3:1),表现出线性范围宽、灵敏度高的特点。健康人血清中的 NT-proBNP 含量通常为 0.1 ng/mL,心衰时可升高到 2~3 ng/mL,该传感器的线性范围宽和灵敏度高,可以满足实际血清样品检测需求。另外,本研究对免疫传感器的选择性和重现性的研究表明,该免疫传感器抗干扰能力和重现性能优良,可用于实际检测。同时,将该免疫传感器与 ELISA 进行临床实际样品的检测对比,二者检测结果的线性相关性好,说明免疫传感器能准确检出血清样本中的 NT-proBNP。而普通 ELISA 的检测时间长,该免疫传感器在检测时间上有明显优势,更适于临床快速检测。

综上所述,本研究提出的电化学免疫传感器具有良好的响应性能,具有线性范围宽、灵敏度高、操作简单、成本低等优点,可实现 NT-proBNP 的高灵敏检测,对心血管疾病患者的早期诊断提供了新的技术支撑。

参考文献

- [1] Emdin M, Passino C, Prontera C, et al. Comparison of brain natriuretic peptide(BNP) and amino-terminal ProBNP for early diagnosis of heart failure[J]. Clin Chem, 2007,53(7):1289-1297.
- [2] Kim JY, Lee EY, Jee JH, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) in Type 2 diabetes with left ventricular dysfunction[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007,

77 Suppl 1;S238-242.

- [3] 易维京. 心衰标志物 NT-proBNP 高效免疫传感器检测的关键技术研究[Z],2011.
- [4] Liang W, Li Y, Zhang B, et al. A novel microfluidic immunoassay system based on electrochemical immunosensors: an application for the detection of NT-proBNP in whole blood[J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 31(1):480-485.
- [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] Zhuo Y, Yi WJ, Lian WB, et al. Ultrasensitive electrochemical strategy for NT-proBNP detection with Gold nanochains and horseradish peroxidase complex amplification[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(5):2188-2193.
- [7] Yu S, Zou G, Wei Q. Ultrasensitive electrochemical immunosensor for quantitative detection of tumor specific growth factor by using Ag@CeO₂ nanocomposite as labels, *Talanta*[Z], 2016:11-17.
- [8] Zhang H, Ma L, Li P, et al. A novel electrochemical immunosensor based on nonenzymatic Ag@Au-Fe₃O₄ nanoelectrocatalyst for protein biomarker detection[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 85:343-350.
- [9] 逮岭松, 刘蓓, 马霄, 等. 电化学免疫传感器超灵敏检测髓过氧化物酶的研究[J]. *重庆医学*, 2015, 44(36):5109-5111.
- [10] Zhang A, Xiang H, Zhang X, et al. A novel sandwich elec-

trochemiluminescence immunosensor for ultrasensitive detection of carbohydrate antigen 19-9 based on immobilizing luminol on Ag@BSA core/shell microspheres[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 75:206-212.

- [11] Li Y, Zhang Z, Zhang Y, et al. Nitidine chloride-assisted bio-functionalization of reduced graphene oxide by bovine serum albumin for impedimetric immunosensing[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 79:536-542.
- [12] Gustavo A, Ailis T. Ultrasensitive and real-time detection of proteins in blood using a potentiometric carbon-nanotubeaptasensor[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 41:366-371.
- [13] Abdulazeez T. Synthesis and utilization of carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors[J]. *Materials Research Bulletin*, 2016, 73:308-350.
- [14] Chen Y, Zou M, Qi C, et al. Immunosensor based on magnetic relaxation switch and biotin-streptavidin system for the detection of Kanamycin in milk[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 39(1):112-117.
- [15] Hu CM, Dou WC, Zhao GY. Enzyme immunosensor based on Gold nanoparticles electroposition and Streptavidin-biotin system for detection of *S. pullorum* / *S. gallinarum* [J]. *Electrochim Acta*, 2014, 117:239-245.

(收稿日期:2016-03-11 修回日期:2016-05-26)

(上接第 3683 页)

for an Ultimate Combination Therapy to Control Diabetes with Sitagliptin-1): A multicenter, randomized, open-label, non-inferiority trial[J]. *J Diabetes Investig*, 2015, 6(2):182-191.

- [17] 陈小平, 齐昆青, 程团结, 等. 维格列汀与阿卡波糖对 2 型糖尿病患者降血糖的临床疗效比较[J]. *河南医学研究*, 2013, 22(2):208-210.
- [18] 潘长玉, 姬秋和, 杨文英, 等. 2 型糖尿病患者维格列汀与阿卡波糖单药治疗的比较研究-24 周多中心、随机、双盲、双模拟、阳性对照试验[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2009, 25(4):386-390.
- [19] Pan C, Yang W, Barona JP, et al. Comparison of vildagliptin and acarbose monotherapy in patients with type 2 diabetes: a 24-week, double-blind, randomized trial[J]. *Diabetic Medicine*, 2008, 25(4):435-441.
- [20] Iwamoto Y, Kashiwagi A, Yamada N, et al. Efficacy and safety of vildagliptin and voglibose in Japanese patients with type 2 diabetes: a 12-week, randomized, double-blind, active-controlled study[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2010, 12(8):700-708.
- [21] 吕春风, 于珮, 周赛君, 等. 沙格列汀联合二甲双胍对新诊断 2 型糖尿病患者的疗效及安全性[J]. *中华糖尿病杂*

志, 2013, 5(12):759-762.

- [22] Kawamori R, Inagaki N, Araki E, et al. Linagliptin monotherapy provides superior glycaemic control versus placebo or voglibose with comparable safety in Japanese patients with type 2 diabetes: a randomized, placebo and active comparator-controlled, double-blind study[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2012, 14(4):348-357.
- [23] Seino Y, Fujita T, Hiroi S, et al. Efficacy and safety of alogliptin in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, dose-ranging comparison with placebo, followed by a long-term extension study [J]. *Curr Med Res Opin*, 2011, 27(9):1781-1792.
- [24] Karasik A, Aschner P, Katzef H, et al. Sitagliptin, a DPP-4 inhibitor for the treatment of patients with type 2 diabetes: a review of recent clinical trials[J]. *Curr Med Res Opin*, 2008, 24(2):489-496.
- [25] Mccarty MF, Dinicolantonio JJ. Acarbose, lente carbohydrate, and prebiotics promote metabolic health and longevity by stimulating intestinal production of GLP-1[J]. *Open heart*, 2015, 2(1):e000205.

(收稿日期:2016-02-21 修回日期:2016-04-06)