

· 技术与方法 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.14.021

# 基于 Au/Rh-HNP 复合纳米材料的 CEA 免疫传感技术的构建及验证\*

陈亚<sup>1</sup>,孟凡飞<sup>2</sup>,刘飞<sup>2</sup>

(陆军军医大学第二附属医院:1.药理基地;2.检验科,重庆 400037)

**[摘要]** **目的** 构建基于金铑空心纳米球(Au/Rh-HNP)的肿瘤标志物癌胚抗原(CEA)的传感检测技术并验证。**方法** 自制具有信号放大作用的 Au/Rh-HNP 材料,结合肿瘤标志物 CEA 二抗构成 Au/Rh-HNP@Ab2 复合物,以此为基础,构建夹心法 CEA 免疫传感技术,用于检测血清中 CEA 水平。**结果** 自制的 Au/Rh-HNP 呈空心球状,直径范围为 80~200 nm。运用循环伏安法、电化学阻抗谱法表征该电化学免疫传感器具备良好的电化学特性,检测灵敏度达 0.01 mg/dL,线性回归方程为  $Y=0.0087X+0.019$ ,具有较好的特异性。**结论** 成功构建了以 Au/Rh-HNP 为基础的免疫传感器,可用于 CEA 的检测。

**[关键词]** 免疫传感器;金铑空心纳米球;癌胚抗原;纳米材料

**[中图分类号]** R446.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)14-2198-04

## Construction and verification of CEA immunosensor technology based on Au/Rh HNP composite nanomaterials\*

CHEN Ya<sup>1</sup>, MENG Fanfei<sup>2</sup>, LIU Fei<sup>2</sup>

(1. Pharmacological Base; 2. Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct a tumor marker CEA sensing detection technology based on gold rhodium hollow nanospheres (Au/Rh HNP) signal amplification, and to conduct the verification. **Methods** The self-made Au/Rh HNP nanomaterials with signal amplification effect were prepared and combined with the tumor marker CEA secondary antibody to form Au/Rh-HNP@Ab2 compound. On this basis, the sandwich CEA immunosensor technology was constructed to detect the serum CEA level. **Results** The self-made Au/Rh HNP was hollow spherical, with a diameter of 80–200 nm. The cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy were used to characterize the electrochemical immunosensor with good electrochemical characteristics, its detection sensitivity was 0.01 mg/dL, and the linear regression equation was  $Y=0.0087X+0.019$ , with good specificity. **Conclusion** An immune sensor based on Au/Rh-HNP was successfully constructed, which can be used to detect CEA.

**[Key words]** immunosensor; gold rhodium hollow nanospheres; carcinoembryonic antigen; nanomaterials

新型纳米材料应用在生物传感器中能够增强电子传导和响应界面,可显著放大信号,同时还可作为载体起到支撑和吸附的作用<sup>[1-3]</sup>。癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)是目前最常用的肿瘤标志物之一,作为诊断肠癌及评价其预后的重要指标,在腺癌及大细胞癌患者中升高明显<sup>[4-5]</sup>。本研究以自制金铑空心纳米球(gold-rhodium hollow nanospheres, Au/Rh-HNP)为信号放大催化剂,构建新型纳米材料免疫传感器,研制肿瘤标志物 CEA 检测的新技术,为 CEA 检测提供可选方案。

### 1 材料与方

#### 1.1 材料与仪器

CEA 一抗、CEA 二抗、CEA 标准品均购自郑州博赛生物技术股份有限公司,牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)、人血清白蛋白(human serum albumin,HAS)、聚乙烯吡咯烷酮(poly-vinyl pyrrolidone,PVP)购自美国 Sigma 公司,氧化铝( $Al_2O_3$ )粉末、1%氯金酸( $HAuCl_4$ )溶液、氯化铑( $RhCl_3$ )、铁氰化钾、硫堇(Thi)购自美国 Sigma-Aldrich 公司,Au/Rh-HNP 为实验室自制。Z36HK 低温高速离心机购自德国 Hermil 有限公司,Chi650d 电化学工作站购自上海辰华仪器有限公司,玻碳电极(glass carbon electrode,GCE)购自天津艾达恒晟科技发展有限公司,S-4800 电子扫描电镜购自日本日立公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 构建原理

传感器构建过程见图1。首先在麂皮上对直径为4 mm GCE依次用0.3  $\mu\text{m}$ 和50 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ 颗粒反复打磨,抛光电极表面;随后在双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)、无水乙醇中超声1 min。裸电极抛光表面沉积纳米金,简要过程如下:将抛光电极放入100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{HAuCl}_4$ 溶液中,采用循环伏安(cyclic voltammetry, CV)法,设置静息电位上下电位均为-0.2 V,电沉积30~45 s沉积纳米金颗粒,从而在电极表面固化形成纳米金颗粒层。在ddH<sub>2</sub>O中晃洗干净电极,吸干水滴;在电极表面滴加20  $\mu\text{L}$  CEA一抗(浓度1  $\mu\text{mol/L}$ ),4  $^\circ\text{C}$ 孵育过夜或者室温3 h固定CEA一抗。在ddH<sub>2</sub>O中晃洗干净电极,吸干水滴;在电极表面滴加15  $\mu\text{L}$  CEA抗原,室温孵育1 h。在ddH<sub>2</sub>O中晃洗干净电极,吸干水滴;加入20  $\mu\text{L}$  CEA二抗(浓度1  $\mu\text{mol/L}$ ),室温孵育3 h。在ddH<sub>2</sub>O中晃洗干净电极备用。

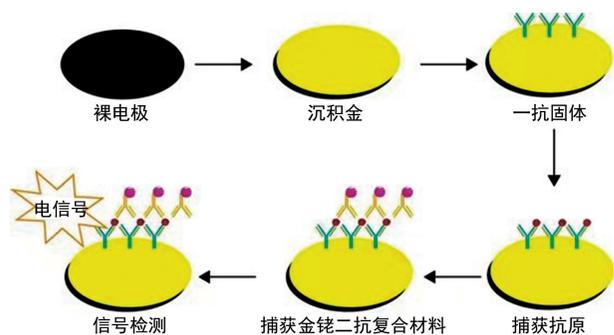


图1 Au/Rh-HNP CEA传感器的构建原理

### 1.2.2 制备 Au/Rh-HNP

参照文献[6]自制 Au/Rh-HNP,将六水合氯化钴( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg)和PVP(40 000 Mw, 60 mg)溶解在50 mL ddH<sub>2</sub>O(18.2 M)中,超声10 min,并用氮气( $\text{N}_2$ )吹扫10 min。然后,将1.0 mL 1%  $\text{RhCl}_3$ 和0.2 mL 1%  $\text{HAuCl}_4$ 溶液合并单独的烧瓶中。然后搅拌,逐滴添加新制备的硼氢化钠( $\text{NaBH}_4$ )溶液(5 mg溶于10 mL  $\text{H}_2\text{O}$ 中)。添加所有 $\text{NaBH}_4$ 后,将所得混合物逐滴添加到 $\text{CoCl}_2$ /PVP混合物中,搅拌20 min。最后,通过离心法收集沉积物,并用 $\text{H}_2\text{O}$ 和乙醇冲洗数次。将沉淀物重新悬浮在2 mL  $\text{H}_2\text{O}$ 中,并在4  $^\circ\text{C}$ 条件下储存备用。

### 1.2.3 制备 CEA 二抗 Au/Rh-HNP 复合物

将酶标液、保护剂加入烧杯,搅拌;再加入100  $\mu\text{L}$  硫堇,搅拌,离心,洗涤3次,加入ddH<sub>2</sub>O。再加入600  $\mu\text{L}$  Au/Rh-HNP,加入CEA二抗,低温搅拌,再加入过氧化物酶,搅拌。

### 1.2.4 制备 CEA 一抗复合物电极

将准备好的裸电极置于1%  $\text{HAuCl}_4$ 溶液中,CV法沉积15 s,再置于铁氰化钾溶液中。CEA一抗材料溶液加到修饰后的电极上,放置8 h。置于铁氰化钾溶液中,CV法及电化学阻抗谱(electrochemical im-

pedance spectroscopy, EIS)法对加抗体修饰后的GCE进行表征,加BSA于电极上封闭未与抗体结合的镀金表面,置于铁氰化钾溶液中。

### 1.2.5 CEA 抗原的检测

将CEA标准品分别制成20.0、5.0、1.0、0.5、0.1 mg/dL 5个浓度,加于复合电极上,于37  $^\circ\text{C}$ 静置15 min,然后加入CEA抗体Au/Rh-HNP复合物,洗涤,再加入3%过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ ),检测电极信号的变化。

### 1.2.6 特异性实验

按CEA抗原检测方法,被检物中0.5 mg/dL HSA、0.5 mg/dL BSA作为干扰物。

### 1.2.7 电化学检测方法

电化学检测在包含三电极的常规电化学池中进行,分别采用了CV、EIS和差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)进行检测。CV法和EIS法在含有0.1 mol氯化钾(KCl)的5 mmol  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液中进行;DPV在2 mL 0.1 mol磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)中进行,加入适量 $\text{H}_2\text{O}_2$ 作为催化底物,电压为-0.6~0 V,扫描速率为50 mV/s。

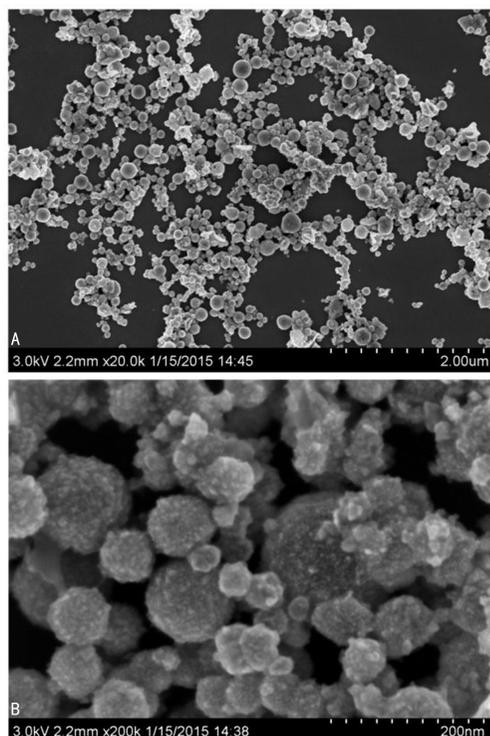
### 1.3 统计学处理

采用SPSS19.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 制备的 Au/Rh-HNP 表征

该金铑纳米材料均呈圆球形,具有中间亮度较低、四周亮度较高的典型空心结构。Au/Rh-HNP分布较均匀,直径范围为80~200 nm,见图2。

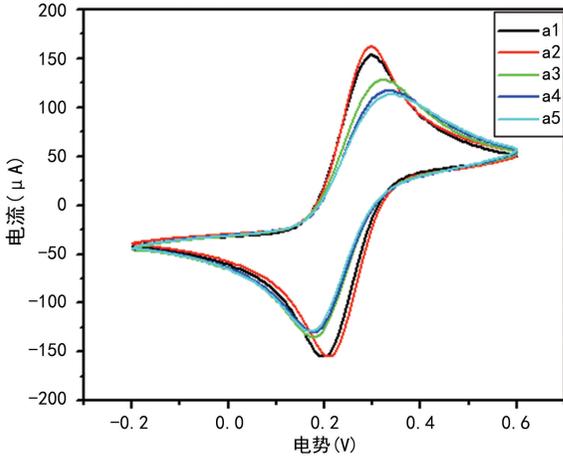


A: bar=2.00  $\mu\text{m}$ ; B: bar=200 nm.

图2 纳米材料 Au/Rh-HNP 扫描电镜图

### 2.2 修饰电极的 CV 法表征

a1 曲线氧化峰电流 > 120  $\mu\text{A}$ 、氧化峰还原峰电流差值 < 0.12 V; a2 较 a1 电流增大; a3 固化一抗后电阻增大; a4 在相同电压下较各自对应电极曲线 a3 电流减小; a5 捕获二抗后电阻继续增加, 电子的传导能力最小, 见图 3。

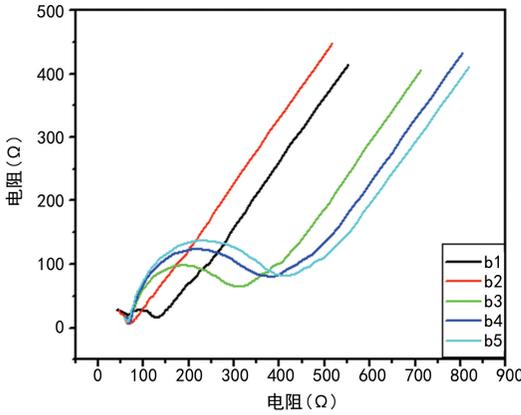


a1~a5 分别表示电极裸电极、表面沉积金后、固化一抗、捕获 CEA 抗原后、加入 Au/Rh-HNP 捕获二抗后的 CV 法表征。

图 3 CEA 免疫传感修饰过程 CV 法表征图

### 2.3 修饰电极的 EIS 法表征

b1 电阻 < 200  $\Omega$ ; b2 较 b1 电阻减小; b3 捕获 CEA 抗原对应电极曲线 b2 电阻增大; b4 较 b3 电阻增大; 曲线 b5 表示捕获二抗后(未加  $\text{H}_2\text{O}_2$ )电阻是最大的, 见图 4。



b1~b5 分别表示电极裸电极、表面沉积金后、固化一抗、捕获 CEA 抗原后、加入 Au/Rh-HNP 捕获二抗后的 EIS 法表征。

图 4 CEA 免疫传感修饰过程 EIS 法表征图

### 2.4 催化剂体积与电极电流的影响

在相同电压下电流增大, 催化前与催化后形成鲜明的对比; 当 20、25、30  $\mu\text{L}$  时电流没有明显变化, 见图 5。

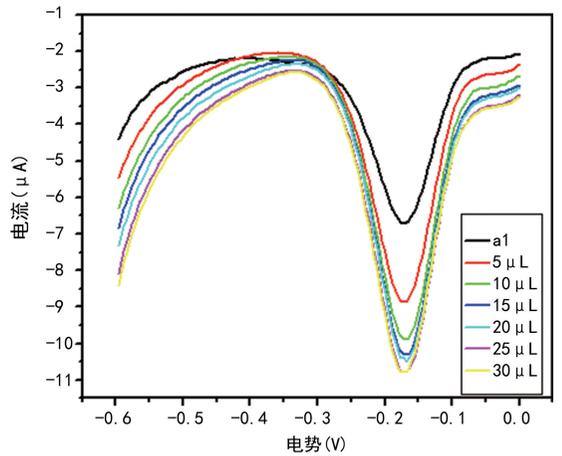
### 2.5 CEA 检测结果

检测范围为 0.1~20 mg/dL, 回归方程为:  $Y = 0.0087X + 0.019$ , 见图 6。

### 2.6 特异性实验

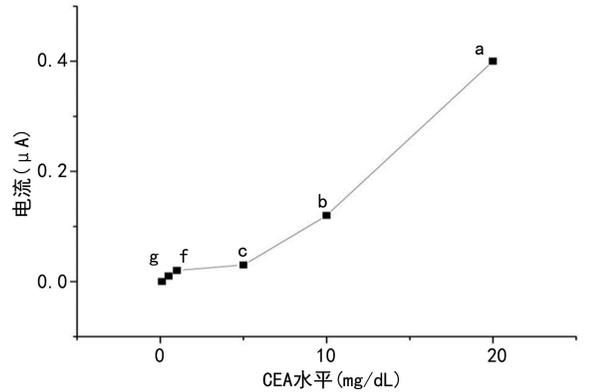
AFP 和 BSA 加入后能检测到的电流很小, 而

CEA 抗原检测的电流变化明显, 见图 7。



曲线 a1 表示未催化时, 其他曲线分别表示依次加入 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  5、10、15、20、25、30  $\mu\text{L}$  条件下的电流变化。

图 5 电极  $\text{H}_2\text{O}_2$  催化图



a、b、c、f、g 分别检测为 20.0、5.0、1.0、0.5、0.1 mg/dL。

图 6 实验组与对照组催化前后电流变化值

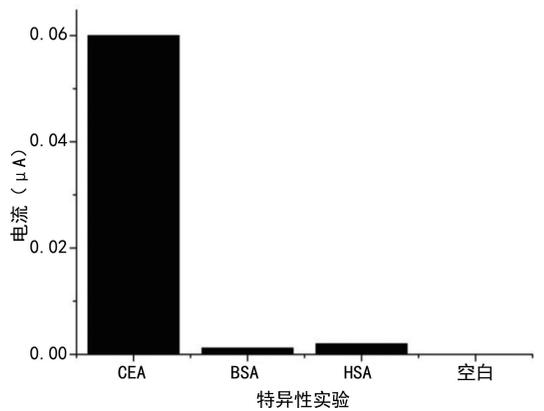


图 7 检测特异性实验

## 3 讨论

CEA 是临床上使用最广泛的肿瘤标志物之一<sup>[7]</sup>, 与众多肿瘤的发生、发展密切相关, 主要功能是在肿瘤细胞和基质胶原间起黏附作用, 在肿瘤的生长和转移过程中扮演重要的角色<sup>[8]</sup>。健康人血清中 CEA 水平很低, 但在不同癌症中如乳腺癌、结直肠癌和肺癌中可以观察到 CEA 水平不同程度的升高<sup>[9-10]</sup>。另外, 术前和术后定期检查 CEA 水平为预测肿瘤所处阶段、进展和复发提供了有用的信息<sup>[11]</sup>。CEA 的检测

方法较多,常用的检测方法如酶联免疫吸附试验(ELISA),操作步骤多,干扰因素也较多,通常由于光学背景过高而灵敏度不够;放射免疫法(RIA)由于使用放射性元素对检测人员和环境有危害;化学发光法准确度较高,但检测时间较长,成本较高。因此,这些方法都存在一定缺陷,开发更加灵敏、特异的 CEA 检测方法对于肿瘤的早期诊断和筛查具有重要的意义。

以金和铑为材料,制备相应纳米颗粒用于检测不同生物标志物已有较多报道,自制的 Au/Rh-HNP 无色、呈圆球形,是一种中间亮度较低、四周亮度较高的典型空心结构,这种结构可极大地扩大微球的表面积,可结合更多的信号分子,由于金与蛋白分子间有很强的亲和力<sup>[12]</sup>,因此标记和固化蛋白分子很容易实现。本研究自制的 Au/Rh-HNP 分布均匀,直径范围为 80~200 nm,不易聚合沉淀,因此它可能成为有潜力的蛋白分子标记载体,从而构建更方便的检测方法<sup>[13-14]</sup>。从实验结果看,CV 法表征 a1 曲线氧化峰电流 > 120  $\mu$ A、氧化峰还原峰电流差值 < 0.12 V,表明电极达到抛光要求;a2 较 a1 电流增大,是由于电极表面沉积金后导电能力增强,电子的传递速度加快;a3 固化一抗后电阻增大,电子的传导能力较沉积金及裸电极时减小,因此在相同电压下较各自对应电极曲线 a2 电流减小,同时也小于 a1 的电流;a4 由于捕获抗原后电阻较前增大,电子的传导能力较前裸电极、表面沉积金及固化一抗时减小,因此在相同电压下较各自对应电极曲线 a3 电流减小;a5 捕获 CEA 抗原后电阻继续增加,电子的传导能力最小,表明电极各步的修饰是成功的。EIS 法表征 b1 电阻 < 200  $\Omega$ ,表明达到抛光要求;b2 较 b1 电阻减小,表明已沉积上金层;b3 捕获 CEA 抗原对应电极曲线 b2 电阻增大,表明已固化了一抗;b4 较 b3 电阻增大;曲线 b5 表示捕获二抗后(未加  $H_2O_2$ )电阻是最大的,表明电极各步修饰是成功的。由于 Au/Rh-HNP 具有催化  $H_2O_2$  的功能,在整个催化过程中电子转移到巯基上,因而在相同电压下电流增大,催化前与催化后形成鲜明的对比,说明抗原抗体已经牢固地结合。

在 CEA 电极检测中,该免疫传感器检测 CEA 的灵敏度已达到 0.1 mg/dL,检测范围为 0.1~20.0 mg/dL,表明该传感器对不同水平的 CEA 溶液有良好的响应,与 CEA 水平间有良好的线性关系。为验证传感器的特异性,选择 5 mg/dL AFP、5 mg/dL BSA 作为干扰物,从结果可以看出,AFP 和 BSA 加入后能检测到的电流信号很弱,而同水平 CEA 抗原检测的电流信号变化明显,表明 CEA 抗体的结合是特异性结合。

生物传感器用于生物标志物的检测具有广泛的应用前景<sup>[15]</sup>,传感器与不同的生物材料或不同的生物

标志物结合,可以构建多种不同的检测器。本研究自制的 Au/Rh-HNP 具有良好的生物兼容性和吸附力,可有效放大检测信号,同时该纳米颗粒还具有  $H_2O_2$  的催化特性,因此具备建立不同检测方法和检测不同生物标志物的潜力。本研究利用该纳米颗粒与金电极结合建立了基于抗体-抗原-抗体夹心法快速、简便、定量检测 CEA 的方法,并获得了初步的成功,为进一步开发利用这种新型纳米材料奠定了基础。但本实验仍存在一定不足之处:没有用临床真实标本对实验方案进行验证,其灵敏度还有待提高,其他干扰性疾病标志物的检测并没有完全囊括在本实验中。

## 参考文献

- [1] 刘晨阳,马建中,张跃宏. 胶原蛋白基纳米复合材料的性能及界面研究进展[J]. 复合材料学报, 2021,38(6):1691-1702.
- [2] 王思远,张悦,张国军,等. 基于纳米材料的电化学免疫传感器在传染性病原体即时检测中的应用[J]. 化学通报,2022,85(8):918-926.
- [3] LIANG H Z, QILENG A, SHEN H, et al. Hand-held platform for sensitive rosiglitazone detection; immunosensor based on a time-based read-out device[J]. Anal Chem, 2022, 94(10): 4294-4302.
- [4] 黎杨杨,林裕锋,陈冬玲. 结肠癌联合检测 SAA、CRP 和 CEA 的意义分析[J]. 中国医药科学, 2020,10(16):191-193.
- [5] 王艳敏,朱艳菊. 粪便脱落细胞 DNA 与血 CEA 和 CA19-9 在结肠癌术后复发检测中的价值分析[J]. 中国肛肠病杂志,2022,42(1):1-3.
- [6] LIU F, XIANG G M, ZHANG L Q, et al. A novel label free long non-coding RNA electrochemical biosensor based on green L-cysteine electrodeposition and Au-Rh hollow nanospheres as tags[J]. Rsc Adv, 2015, 64(5): 51990-51999.
- [7] 魏博. CEA、CA724、CA199 肿瘤标志物在胃癌诊断中的应用价值[J]. 临床医学研究与实践, 2021,6(9):116-118.
- [8] AGUNG K, RONALD L, MAPPINCARA M, et al. The relationship between triple tumor marker (CEA, CA19-9, and CA125) and colorectal cancer metastases at makassar, indonesia [J]. Int J Med Rev Case Rep. 2020, 4(6): 56-62.

(下转第 2205 页)