

DOI: 10.13208/j.electrochem.140443

Artical ID:1006-3471(2015)01-0039-06

Cite this: *J. Electrochem.* 2015, 21(1): 39-44

Http://electrochem.xmu.edu.cn

酶聚合体电流信号放大多通道电化学免疫传感体系及蛋白肿瘤标志物检测

邓王平^{1a}, 窦艳枝^{1a}, 苏 静¹, 郝 林², 宋世平^{1*}, 樊春海¹

(1. 中国科学院上海应用物理研究所物理生物学研究室, 上海 201800;

2. 徐州医学院附属徐州临床学院, 江苏 徐州 221009)

摘要: 本文构建了一种基于酶聚合体信号放大的多通道电化学免疫传感体系, 并用于肝癌肿瘤标记物甲胎蛋白 (AFP) 的定量检测. 该传感体系由固定了抗 AFP 鼠单克隆抗体的多通道丝网印刷电极组成, 可捕获肿瘤标记物抗原 AFP, 进而与抗 AFP 免多抗特异性结合形成夹心免疫复合物, 然后利用辣根过氧化物酶聚合体偶联的羊抗兔二抗 (IgG-polyHRP) 与三明治夹心免疫复合物结合, 实现电流信号放大. 该体系结合多通道丝网印刷电极及自主研发的多通道电化学检测仪, 可同时满足多通道电流信号的检测. 在最优化条件下, 该传感体系检测 AFP 浓度的动态范围为 $64 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最低检测下限为 $56 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 具有检测灵敏度高、特异性强、操作简便以及仪器便携等优点.

关键词: 多通道丝网印刷电极; 电化学免疫传感体系; 甲胎蛋白

中图分类号: O657

文献标识码: A

原发性肝癌 (Primary Hepatocellular Carcinoma, HCC) 是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁着人类的健康. 监测患者血清中的肿瘤标记物是目前临床上广泛应用的早期发现恶性肿瘤的重要手段^[1-2], 并在肿瘤普查、诊断、治疗效果的监测, 及对预后进行评估中起着至关重要的作用^[3-4]. 甲胎蛋白 (α -fetoprotein, AFP) 是当前临床上 HCC 最敏感且最特异的血液标记物, 已被美国食品药品监督管理局批准为 HCC 辅助诊断指标. 目前检测 AFP 的方法多是免疫测定技术, 尽管这些技术发展比较快, 也得到了比较广泛的应用, 但仍存在着一定的限制性. 经典方法如 ELISA、放射免疫和荧光免疫法等, 存在灵敏度不高、操作时间长、辐射及光污染严重等缺点^[5-6]. 近年发展起来的化学发光免疫检测技术、电化学发光免疫检测技术以及蛋白芯片技术虽进一步推动了临床检测技术的发展应用, 但其需要特殊检验设备, 试剂多为进口, 费用昂贵^[6-7]. 因此, 发展新型简便且灵敏的免疫分析技术对于肿瘤标志物的检测有着至关重要的意义.

电化学免疫传感器利用抗原和抗体间的高度特异性结合, 将免疫分析法和电化学传感体系相结合, 具有灵敏度高、分析速度快、操作简便等特点^[8-9], 且电化学检测设备相对来说装置轻便、廉价、能耗低, 且易于微型化和集成化, 符合床边检测的要求, 已逐渐应用于临床诊断、环境保护、食品分析等领域, 成为非常有潜力的检测技术之一^[10-13]. 利用电化学免疫传感器检测肿瘤标记物的研究虽已有报道, 但大都是基于圆盘电极体系, 灵敏度不够高, 线性范围窄, 放大信号的方法比较繁琐, 重复性不好, 且很难实现多通道同时检测, 难以满足实际临床检测需求^[14]. 近年来, 电极丝网印刷技术的发展为开发实用性电化学免疫传感器提供了便利.

本文以多通道丝网印刷电极为传感基底, 采用简单的物理吸附抗体的组装方法, 构建了一种基于单抗-多抗夹心法原理、以辣根过氧化物酶聚合体标记的羊抗兔 IgG (IgG-polyHRP) 进行信号放大的实用型多通道电化学免疫传感体系, 并用于

收稿日期: 2014-09-10, 修订日期: 2014-11-09 a, 同等贡献者, * 通讯作者, Tel: (86-21)39194607, E-mail: songshiping@sinap.ac.cn

国家自然科学基金项目 (No. 91127037, No. 91123037, No. 21373260) 资助

原发性肝癌的血液肿瘤标记物 AFP 的检测.

1 实 验

1.1 试剂与仪器

AFP 标准品、兔多抗 AFP 抗体 (AFP poly-antibody, AFP pAb), polyHRP-IgG (Fitzgerald), 鼠单抗 AFP 抗体 (AFP mono-antibody, AFP mAb, USbio), 辣根过氧化物酶标羊抗兔 IgG (IgG-HRP)、牛血清白蛋白 (BSA) 及酪蛋白 (Casein, Sigma). $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.4) 缓冲储备液及 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBST 电极洗液, 4°C 冰箱保存. 其他试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水.

16 通道电化学测试仪 (自主研发); 16 通道丝网印刷电极阵列 (自主设计), 每个通道由一个三电极体系 (碳糊工作电极, 碳糊辅助电极, Ag/AgCl 参比电极) 组成; 恒温培养箱 (SHLLAB).

1.2 酶联免疫电化学传感体系构建

将捕获探针抗体 AFP mAb 滴加于印刷电极表面, 4°C 物理吸附组装 16 h, 超纯水彻底冲洗, 氮气吹干. 将封闭液滴加于三电极表面及中间区域, 室温封闭 1 h.

将待检测目标蛋白 AFP 抗原用 1% BSA 的 PBS 溶液稀释成不同浓度, 滴加 $5 \mu\text{L}$ 于组装抗体的电极, 室温反应 1 h. 电极洗液清洗, 氮气吹干. 再将信号探针抗体 AFP pAb (溶于含 1% BSA 和 1% Casein 的 PBS 溶液), 在抗原反应后滴加于电极上, 室温反应 1 小时, 电极洗液清洗, 氮气吹干. 最后在电极上滴加 $5 \mu\text{L}$ IgG-polyHRP (浓度为 1

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 溶于含 1% BSA 和 1% Casein 的 PBS 溶液), 室温反应 30 min, 用电极洗液清洗即可.

1.3 AFP 抗原的电化学检测

采用循环伏安法 (Cyclic Voltammetry, CV) 及稳态时间电流曲线法 (Amperometric $I-T$) 在 HRP 的催化底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺水溶液 (K-Blue 水溶 TMB, 已含有双氧水) 中测试该电极. 通过 CV 法确定 $I-T$ 测试的调控电位为 -100 mV , 50 s 检测时其电流已趋于稳定, 记录 50 s 的电流值.

2 结果与讨论

2.1 基于单抗-多抗夹心构型的电极体系检测原理

基于单抗-多抗经典免疫夹心技术的电化学免疫传感体系的 AFP 检测原理如图 1 所示. 将捕获探针 AFP mAb 通过物理吸附组装在印刷电极上, 并封闭非特异结合位点, AFP mAb 捕获 AFP 抗原后与信号探针抗体 AFP pAb 结合, 而后通过与羊抗兔 IgG-polyHRP 结合形成三明治夹心免疫复合物, 从而引入了多聚 HRP 酶, 对底物 TMB 产生电催化还原电流, 用 16 通道电化学仪检测电流信号从而实现 AFP 的定量检测.

2.2 捕获探针组装方法及组装密度

捕获探针组装方式及密度对免疫检测至关重要, 组装量不够则不能进行有效地检测, 效率较高的组装方式可保证捕获探针的组装密度及蛋白活性, 提高检测灵敏度^[15]. 电极室温化学偶联共价组

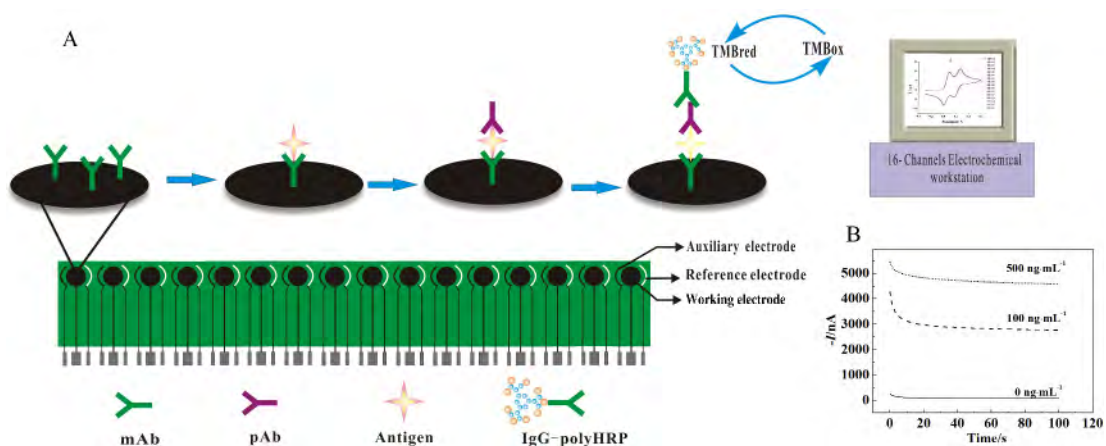


图 1 A. 双抗体夹心电化学免疫传感体系的 AFP 抗原检测示意图; B. 不同浓度 AFP 在 TMB 底物溶液中的 $I-t$ 曲线, 调控电位: -100 mV

Fig. 1 A. Scheme of sandwich electrochemical immunosensor system for detection of AFP antigen; B. The $I-t$ curves of AFP with different concentrations in TMB substrate solution Potential: -100 mV

装 2 h 或 4 °C 物理吸附 16 h 组装不同浓度的 AFP mAb,再和羊抗鼠 IgG-HRP 特异性结合的检测结果如图 2 所示. 随着捕获探针浓度增大, 组装到电极上的抗体量增加, 电流信号值增大. 但组装同浓度的捕获探针, 物理吸附电流信号比化学偶联电流信号更高,可能是由于化学偶联引起了部分蛋白活性的丧失, 导致其捕获效率不如物理吸附, 故后续实验中均采用物理吸附在印刷电极上组装捕获探针 AFP mAb. 捕获探针浓度超过 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后吸附已达到饱和, 选取此浓度为后续实验的组装浓度.

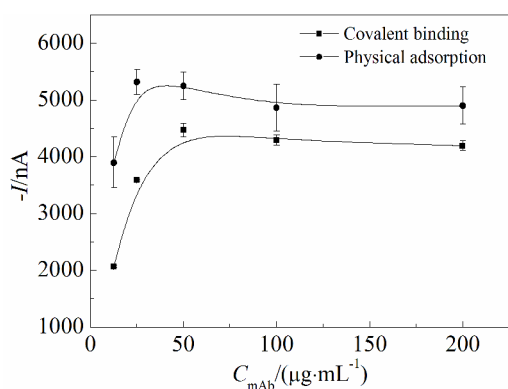


图 2 化学偶联或物理吸附组装不同浓度捕获探针对接电流信号的影响 测试电位: -100 mV

Fig. 2 Optimization of the assembly and concentration of capture probes (AFP mAb) Potential: -100 mV

2.3 封闭条件

对蛋白的高灵敏度检测, 减小非特异性吸附至关重要, 即可降低背景电流, 有效提高检测灵敏度, 因此对该夹心体系中封闭剂需做一定的筛选, 以提高信噪比. 将 1% BSA 或 1% Casein 分别封闭已组装捕获抗体的印刷电极, 再检测不同浓度的 AFP 抗原, 电流信号如图 3 所示. 其中, 1% Casein 封闭液的空白信号较低, 而其阳性电流信号却很高, 该封闭剂不仅封闭了非特异的结合位点, 又不影响抗原抗体结合活性, 其信噪比较高, 故更适用.

2.4 信号探针 AFP pAb 浓度

信号探针浓度对免疫检测灵敏度及动态范围有一定影响, 对于目标蛋白的检测, 信号探针抗体需要有足够浓度, 但信号探针浓度过高, 容易引起非特异性吸附, 降低信噪比, 不利于低浓度抗原的检测. 当电极组装 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 AFP mAb 时用 1% Casein 封闭, 采用不同浓度的信号探针 AFP

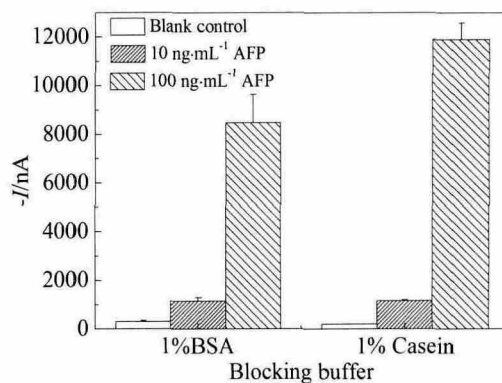


图 3 不同封闭液封闭电极后对检测 AFP 的响应电流信号的影响 测试电位: -100 mV

Fig. 3 Effect of the different blocking buffers on the response current for detection of AFP Potential: -100 mV

pAb与抗原结合, 用羊抗鼠 IgG-HRP 检测电流信号, 结果如图 4. 随着信号探针浓度增加, 其电流信号不断增大, 而背景信号也随之增加, 在信号探针浓度达到 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 其信噪比最好.

2.5 单抗-多抗电化学免疫传感电极体系对靶蛋白 AFP 的检测

单抗-多抗电化学免疫传感电极体系在优化条件下, 利用多聚酶标二抗信号放大的 AFP 浓度-电流信号曲线如图 5 所示. 在 16 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ~ 250 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度区间, 酶联免疫电化学传感体系的电流信号随靶 AFP 浓度的增加而增加, 16 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的电流信号与空白电流信号仍可区分. AFP 浓度的对数-电流信号曲线在此浓度范围内有

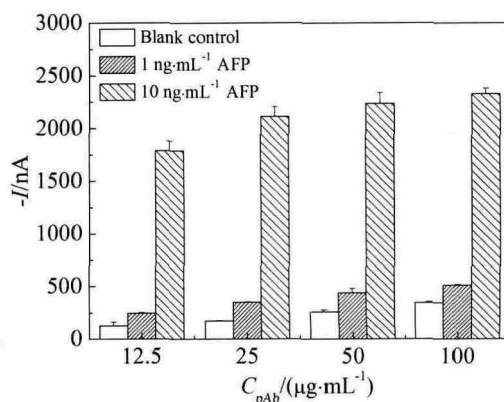


图 4 不同信号探针浓度对检测 AFP 响应电流信号的影响 测试电位: -100 mV

Fig. 4 Effect of the concentration of signal probe on the response current for detection of AFP Potential: -100 mV

两个检测线性区间，低浓度区 $64 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 1000 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，线性回归方程为 $y = 282.894x - 216.763$, $R = 0.979$ ，高浓度区 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，线性回归方程为 $y = 1406.093x - 3541.822$, $R = 0.997$ 。以空白信号 $+3\text{SD}$ 判定检测限为 $56 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

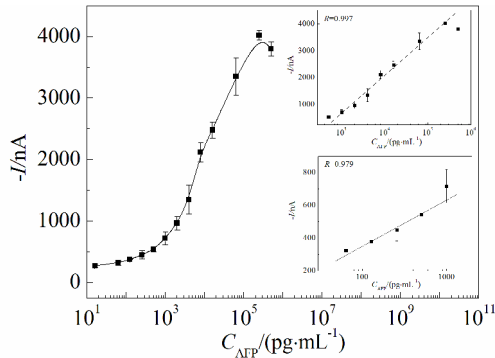


图 5 响应电流随 AFP 浓度变化的剂量效应曲线(插图为电流随 AFP 浓度对数变化的标准曲线, 电位: -100 mV)

Fig. 5 The dose-response curve of the response current to AFP ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) at a series of concentrations (Insets are the calibration curves of the response current to logarithmic concentration of AFP, potential: -100 mV)

为考察多聚酶标二抗的信号放大效果，作者分别比较了采用同样浓度的普通 HRP 酶标二抗 ($\text{Ab}_2\text{-HRP}$) 或多聚 HRP 酶标二抗 ($\text{Ab}_2\text{-PolyHRP}$) 检测不同浓度 AFP 的电流信号，电流信号随 AFP 变化的结果如图 6 所示。采用 $\text{Ab}_2\text{-PolyHRP}$ 检测较低浓度 AFP 的电流信号明显高于 $\text{Ab}_2\text{-HRP}$ 的电流信号，这是由于同样浓度的抗原或二抗, $\text{Ab}_2\text{-PolyHRP}$ 结合的酶量远远多于 $\text{Ab}_2\text{-HRP}$, 因此催化 TMB 的电流信号就越高。但由于多聚酶的尺寸比较大, 当抗原浓度较高时, 由于位阻效应, 结合的 $\text{Ab}_2\text{-PolyHRP}$ 已经饱和, 信号基本稳定。

2.6 特异性

电化学免疫传感体系检测蛋白的特异性至关重要，在复杂的实际体系若靶蛋白检测特异性不好, 会引起假阳性反应, 从而产生误判。本文选取血红蛋白 (Hb) 以及 5 种肿瘤标记物—癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异抗原 (PSA)、人绒毛膜促性腺激素 (HCG)、糖类抗原 125 (CA125) 和糖类抗原 19-9 (CA19-9) (浓度均为 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 考察免疫传

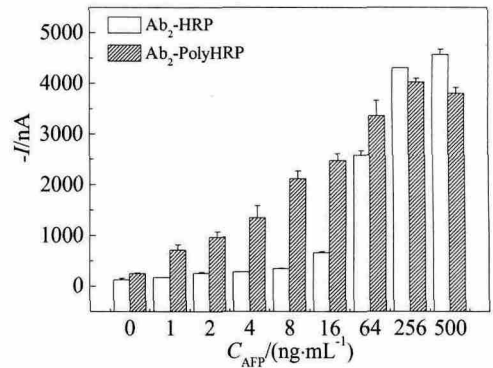


图 6 $\text{Ab}_2\text{-HRP}$ 与 $\text{Ab}_2\text{-PolyHRP}$ 检测不同浓度靶蛋白 AFP 的电流信号对比图

Fig. 6 Comparison of the response current to AFP between $\text{Ab}_2\text{-HRP}$ and $\text{Ab}_2\text{-polyHRP}$

感器的抗干扰能力，结果如图 7 所示。 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 AFP 的检测信号可达 4000 nA 以上，而其他几种蛋白电流信号小于 100 nA，说明该免疫传感电极体系具有良好的选择性和抗干扰能力。

2.7 相关性

为测试该电化学免疫传感体系对实际样品的分析能力，对 15 个临床血清样品进行了检测, 将使用该免疫传感器和标准的酶联免疫分析方法的检测结果进行比较，如图 8 所示。其回归方程为 $y = 17.2 + 0.9373x$ ($R^2 = 0.9888$) (x : ELISA; y : 免疫传感体系)，说明两种不同的分析方法对实际血清样本分析有较好的相关性，该免疫传感体系有望初步运用于临床 AFP 的检测。

3 结 论

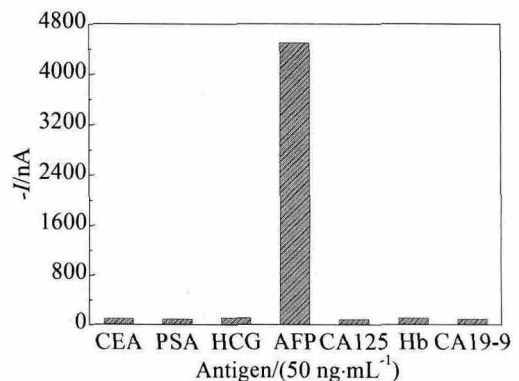


图 7 电化学免疫传感电极体系的特异性分析 测试电位: -100 mV

Fig. 7 Specificity of the electrochemical immunosensor system Potential: -100 mV

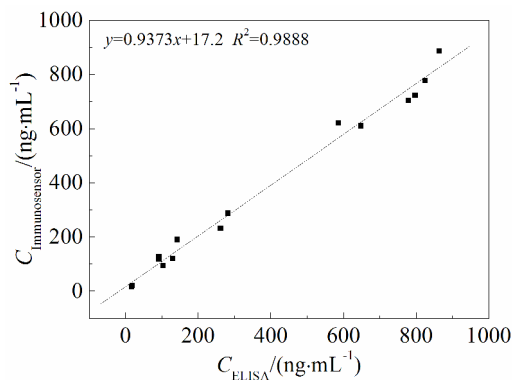


图 8 电化学免疫传感电极体系和 ELISA 检测分析 15 个 AFP 血清样本的相关性

Fig. 8 Correlation between conventional ELISA and immunosensor by detection of AFP in 15 patients samples

传感器界面调控及信号放大是两种提高传感器检测性能的主要途径,本研究构建了一种基于辣根过氧化物酶聚合体信号放大的实用型多通道电化学免疫传感电极体系,并用于 AFP 的定量检测.采用物理吸附的方法将捕获探针抗体固定在印刷电极芯片上,用更简单的方法得到了比共价偶联更好的抗体组装效率及抗体活性.靶蛋白和信号探针多克隆抗体分别反应后,引入了 Poly-HRP 信号放大技术,将标记有羊抗兔 IgG 的超分子多聚 HRP 酶复合物作为信号放大的载体,有效提高了免疫反应电流信号.与目前的纳米材料放大技术、PCR 扩增技术和滚环扩增技术等相比,缩减了操作程序,节省了实验材料,大幅降低了时间和物料成本.利用该多通道电化学仪检测辣根过氧化物酶催化底物的氧化还原电流实现了多样品检测.在优化条件下,该传感电极体系对 AFP 的检测限达到 $56 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,同时有两个线性范围,低浓度区间为 $64 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 1000 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,高浓度区间为 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,且检测特异性好,能对临床实际样品进行准确定量检测.相比常规的检测技术,如酶联免疫吸附技术(ELISA)和放射免疫分析、电化学发光免疫等,该传感器具有灵敏度高、线性范围宽等特点,不仅可以用于微量 AFP 含量的测定,还可以满足较高浓度检测的需要.同时,该电化学传感体系设备简单,成本低廉,能耗低,易于微型化和集成化,具有较好的实用性,非常适合我国广大欠发达地区及中小型医疗机构对肿瘤标志物定量检测的需求.因此,该传感电极体

系有望发展成为一种高灵敏的实用诊断技术平台,具有较大的临床应用潜力,并具备拓展至其他肿瘤标志物检测的应用前景,可为疾病诊断提供一个更新的检测途径.

参考文献(References):

- [1] Yang L, Parkin D M, Ferlay J, et al. Estimates of cancer incidence in China for 2000 and projections for 2005[J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2005, 14 (1): 243-250.
- [2] Lin J H, Ju H X. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 20(8): 1461-1470.
- [3] Hayes D F, Bast R C, Desch C E, et al. Tumor marker utility grading system: A framework to evaluate clinical utility of tumor markers[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1996, 88(20): 1456-1466.
- [4] Du D, Zou Z X, Yongsoon S, et al. Sensitive immunosensor for cancer biomarker based on dual signal amplification strategy of graphene sheets and multienzyme functionalized carbon nanospheres[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(7): 2989-2995.
- [5] Kemp H A, Simpson J S A, Woodhead J S. Automated two-site immunoradiometric assay of human alpha-fetoprotein in maternal serum[J]. *Clinical Chemistry*, 1981, 27 (8): 1388-1391.
- [6] Tothill I E. Biosensors for cancer markers diagnosis[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, 20(1): 55-62.
- [7] Huang C H, Chen Y Y, Wang C X, et al. Detection of alpha-fetoprotein through biological signal amplification by biosensor based on imaging ellipsometry[J]. *Thin Solid Films*, 2011, 519(9): 2763-2767.
- [8] Wang G L, Xu J J, Chen H Y, et al. Label-free photoelectrochemical immunoassay for α -fetoprotein detection based on TiO_2/CdS hybrid[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 25: 791-796.
- [9] Zhao L F, Li S G, He J, et al. Enzyme-free electrochemical immunosensor configured with Au-Pd nanocrystals and N-doped graphene sheets for sensitive detection of AFP[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 49: 222-225.
- [10] Zhou H K, Gan N, Li T H, et al. The sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor for α -fetoprotein based on enrichment by Fe_3O_4 -Au magnetic nano probes and signal amplification by CdS-Au composite nanoparticles labeled anti-AFP[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 746: 107-113.

- [11] Liang G D, Liu S F, Zou G Z. Ultrasensitive immunoassay based on anodic near-infrared electrochemiluminescence from dual-stabilizer-capped CdTe nanocrystals[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(24): 10654-10659.
- [12] Hu M, Yan J, He Y, et al. Ultrasensitive, multiplexed detection of cancer biomarkers directly in serum by using a quantum dot-based microfluidic protein chip[J]. *ACS Nano*, 2009, 4(1): 488-494.
- [13] Yang Z J, Liu H, Zong C. Automated support-resolution strategy for a one-way chemiluminescent multiplex immunoassay[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(13): 5484-5489.
- [14] Giannetto M, Mori L, Mori G, et al. New amperometric immunosensor with response enhanced by PAMAM-dendrimers linked via self assembled monolayers for determination of alpha-fetoprotein in human serum[J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2011, 159(1): 185-192.
- [15] Wilson M S. Electrochemical immunosensors for the simultaneous detection of two tumor markers[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(5): 1496-1502.

A Multi-Channel Electrochemical Immunosensing System with PolyHRP-Based Signal Amplification for the Detection of Tumor Markers

DENG Wang-ping^{1a}, DOU Yan-zhi^{1a}, SU Jing¹, HAO Lin², SONG Shi-ping^{1*}, FAN Chun-hai¹
(1. Division of Physical Biology, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China; 2. Xuzhou Clinical Institute, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221009, Jiangsu, China)

Abstract: We have developed a multi-channel electrochemical immunosensing system for the detection of α -fetoprotein (AFP). The sensing system consisted of carbon screen-printed electrode (SPCE) arrays and polyHRP-based signal amplification probes. AFP antigens could bind to both capture antibodies immobilized on electrode arrays and detection antibodies (anti-AFP IgG developed in rabbit). The anti-rabbit IgG conjugated to poly-horseradish peroxidase were used as a signaling probe to bind to the immuno-complex. The current signals were harvested by a home-made multi-channel electrochemical detector. AFP could be detected in the concentration ranges of $64 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The detection limit was as low as $56 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The proposed immunosensing system provided a high sensitive, specific, simple and practical method for AFP detection.

Key words: multi-channel carbon screen-printed electrode; electrochemical immunosensing system; α -fetoprotein