

# 基于放大鲁米诺电致化学发光构建的夹心型超灵敏免疫传感器

周国清\*

(重庆电子工程职业学院建筑与材料学院, 重庆 401331)

**摘要:**本文以金铂纳米合金(Au-PtNPs)修饰的玻碳电极作为一抗(Ab1)甲胎蛋白抗体(anti-AFP)的固载界面,葡萄糖氧化酶(GOD)负载纳米金修饰的还原态石墨烯(AuNPs@rGr-GOD)来标记二抗,构建超灵敏的基于放大鲁米诺(Luminol)电致化学发光(ECL)的免疫传感器。在含适量葡萄糖的 Luminol 检测底液中,构建的免疫传感器可有效放大 ECL 信号。实验结果表明,制备的免疫传感器对甲胎蛋白(AFP)的检测在 0.001~200 ng/mL 范围内呈现良好的线性响应,其检测限低至 0.3 pg/mL。该传感器可用于实际血清样本的检测。

**关键词:**电致化学发光;鲁米诺;石墨烯;葡萄糖氧化酶;甲胎蛋白

**中图分类号:**O657.1      **文献标志码:**A

电致化学发光(ECL)免疫分析具有灵敏度高、选择性好、线性范围宽、反应可控性好、时空可控性好、仪器简单、分析速度快、节约试剂、可进行原位发光分析等优点,已经成为分析化学工作者十分感兴趣的研究领域之一<sup>[1-3]</sup>。Luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ECL 体系由于其氧化电位低、成本低廉、高的发光效率等优点<sup>[4]</sup>而引起大家的关注。然而,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作为 ECL 的高效共反应试剂,在常温条件下既不稳定也不可能被标记,而且 Luminol 本身在中性条件下的 ECL 性能也不佳。但是,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是很多酶催化底物的产物,如葡萄糖氧化酶(GOD)催化葡萄糖可实时高效产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[5]</sup>,而且底物葡萄糖在实验室条件下很稳定。基于此,选用纳米材料负载相应的酶标记二抗构建一个原位产生共反应试剂 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>以有效放大 Luminol 的 ECL 信号,可提高免疫传感器的灵敏度。石墨烯纳米材料自被 Novoselov<sup>[6]</sup>发现后,由于其拥有相当大的比表面积。成为基体载体的理想材料<sup>[7]</sup>。金属纳米材料由于良好的导电性能、生物相容性、大的比表面积以及催化性能等而被广泛应用于免疫传感器的构建<sup>[8]</sup>。

本文以金铂纳米合金修饰的玻碳电极作为一抗(Ab1)甲胎蛋白抗体(anti-AFP)的固载界面,由于金铂纳米合金大比表面积以及良好的生物相容性,在固定大量的一抗的同时还能很好的保持抗体蛋白的生物活性。利用抗原-抗体的特异性反应,结合夹心免疫模式,使固定在玻碳电极上的 Ab1 与 Ag 及 GOD 负载纳米金修饰的还原态石墨烯标记 Ab2(AuNPs@rGr-GOD-Ab2)形成夹心型结构,从而构建超灵敏的基于放大 Luminol 的 ECL 的免疫传感器。实验结果表明,制备的免疫传感器对甲胎蛋白(AFP)的检测在 0.001~200 ng/mL 范围内呈现良好的线性响应,其检测限低至 0.3 pg/mL。将该传感器用于实际血清样本的检测,结果比较满意。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

CHI610A 型电化学工作站(上海辰华仪器公司);MPI-A 型电致化学发光分析仪(西安瑞迈电子科学

收稿日期:2012-11-16      修回日期:2012-12-25

\* 通讯作者:周国清:男,硕士,副教授,主要从事电分析化学研究。

技术有限公司);pHS-4C型酸度计(成都方舟科技开发公司);AB204-S电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);KQ218超声波清洗器(江苏昆山超声仪器公司)。所有实验都是由三电极系统测定:Ag/AgCl电极为参比电极,Pt电极为对电极,修饰的玻碳电极( $\Phi=4$  mm)为工作电极。

氧化石墨烯购买于中国南京先锋有限公司;Luminol(98%),葡萄糖氧化酶(GOD)均购自美国Sigma试剂公司;甲胎蛋白抗体(anti-AFP)和抗原(AFP)均购自郑州博赛生物工程有限责任公司;氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ ),氯铂酸( $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ ),牛血清白蛋白(BSA,96%~99%)均购自上海国药集团有限公司;聚乙烯亚胺(PEI,50%)购于瑞士Fluka公司。磷酸盐缓冲溶液(PBS)用0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,0.1 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和0.1 mol/L KCl制备。5 mmol/L铁氰酸根溶液( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ,pH=7.4)是用pH为7.4的PBS溶解铁氰化钾和亚铁氰化钾而制得。其余试剂均为分析纯,且未经过进一步处理。实验用水均为去离子水。制备好的溶液均置于4℃下保存备用。

### 1.2 AuNPs@rGr的制备

参照文献[9]制备还原态的石墨烯(rGr),由于其还原剂是聚乙烯亚胺(PEI),使得到的rGr表面有丰富的氨基。取1 mL制得的rGr溶液,在超声条件下加入0.5 mL 1%的 $\text{HAuCl}_4$ 并继续超声20 min,然后缓慢滴加1.0 mL  $\text{NaBH}_4$ (0.1 mol/L),继续超声30 min,使其充分反应。最后离心得到黑色固体,用1.0 mL PBS超声分散得到均一的AuNPs@rGr溶液。

### 1.3 GOD负载AuNPs@rGr-GOD-Ab2的制备

取1.0 mL AFP抗体加入上述AuNPs@rGr溶液中,冰浴搅拌孵育结合6 h后,将1 mg的GOD加入,进一步孵育结合4 h,通过离心操作收集AuNPs@rGr-GOD-Ab2生物耦合物,并将其分散于0.1 mol/L PBS(pH=7.4),在4℃保存备用。

### 1.4 免疫传感器的构建

修饰前,先将玻碳电极(GCE, $\Phi=4$  mm)用0.3、0.05  $\mu\text{m}$ 的 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 糊打磨抛光,去离子水冲洗干净后,然后分别在去离子水、乙醇、去离子水中各超声洗涤3 min,并于室温下晾干备用。

将玻碳电极置于1%的 $\text{HAuCl}_4$ 和1%的 $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ 混合溶液(体积比1:1)中,然后通过恒电位沉积的方法(条件:沉积电位为-0.2 V,沉积时间为30 s)在玻碳电极表面沉积一层金铂合金纳米颗粒(DpAu-PtNPs/GCE)。用水冲洗并于室温下晾干后,修饰电极在4℃下浸泡于AFP抗体(Ab1)溶液中过夜,然后用1% BSA封闭纳米颗粒上多余的位点(BSA/Ab1/DpAu-PtNPs/GCE)。得到目标免疫传感器,4℃下储存备用。其制备示意图如图1。

### 1.5 免疫反应及电化学发光检测

将制备的免疫传感器(BSA/Ab1/DpAu-PtNPs/GCE)浸在100  $\mu\text{L}$ 含有AFP的样品中,在室温下孵育20 min,通过抗原与抗体的特异地结合作用在电极表面形成抗体-抗原复合物(Ag/BSA/Ab1/DpAu-PtNPs/GCE)。接着,将20  $\mu\text{L}$ 制备的AuNPs@rGr-GOD-Ab2生物耦合物滴在电极上,室温下孵育20 min,得到AuNPs@rGr-GOD-Ab2/Ag/BSA/Ab1/DpAu-PtNPs修饰的GCE,每一步孵育结束都用PBS洗涤以避免物理吸附作用。最后,在0.2~0.8 V的电位范围内,记录ECL信号(检测底液:3 mL pH为7.4的PBS中含有 $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L Luminol以及一定量葡萄糖),抗原浓度越大,通过免疫反应结合上去的二抗生物耦合物就越多,即GOD的量就越大,催化葡萄糖的效率就越高,产生的共反应试剂 $\text{H}_2\text{O}_2$ 就越多,Luminol的ECL信号就越大,从而实现对抗原的定量检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 免疫传感器组装过程的表征

采用循环伏安法(CV)对该电致化学发光免疫传感器组装过程进行了表征,以修饰有不同物质的玻碳电

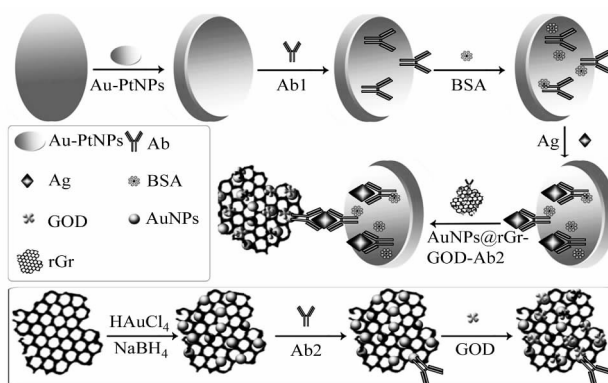


图1 免疫传感器制备过程示意图  
Fig. 1 Schematic illustration of the stepwise immunosensor fabrication process

极为工作电极,于 5 mmol/L 的铁氰化钾溶液中,在  $-0.2 \sim 0.6$  V 的电位范围内和扫速为 100 mV/s 的条件下进行 CV 表征。由图 2 可以观察到,裸电极(曲线 a)在测试底液中有一对对称的  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  的可逆氧化还原峰;在修饰了一层纳米金铂合金纳米颗粒后电极(曲线 b)响应电流有明显的增强,这是因为金属纳米颗粒导电性能好,能提高电子的传递速率;然而当吸附 AFP 抗体(曲线 c)、用 BSA 封闭电极表面的非特性吸附位点(曲线 d)、抗原和抗体发生特异性免疫反应形成免疫复合物(曲线 e),峰电流依次下降,这是因为蛋白质分子阻碍了电子传输,说明电极每一步组装成功。

Ag/BSA/Ab1/DpAu-PtNPs/GCE 结合 AuNPs@rGr-GOD-Ab2 生物耦合物前后的 ECL 表征如图 3 所示,结合 AuNPs@rGr-GOD-Ab2 生物耦合物后 ECL 信号(曲线 b)大大增强,说明二抗生物耦合物成功的结合到了电极表面。

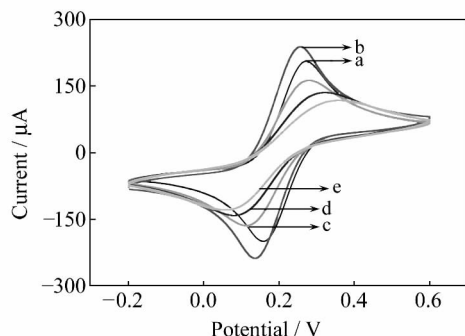


图 2 免疫传感器组装过程的循环伏安图  
Fig. 2 Cyclic voltammograms for bare GCE (a), DpAu-PtNPs/GCE (b), Ab<sub>1</sub>/DpAu-PtNPs/GCE (c), BSA/Ab<sub>1</sub>/DpAu-PtNPs/GCE (d), and Ag/BSA/Ab<sub>1</sub>/DpAu-PtNPs/GCE (e)

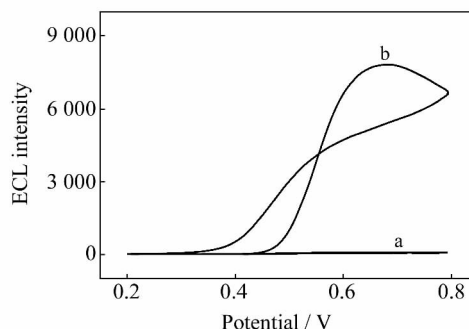


图 3 Ag/BSA/Ab<sub>1</sub>/DpAu-PtNPs/GCE 孵育 AuNPs@rGr-GOD-Ab2 生物耦合物前后的 ECL 图  
Fig. 3 The ECL response of Ag/BSA/Ab<sub>1</sub>/DpAu-PtNPs modified GCE before (a) and after (b) incubated with AuNPs@rGr-GOD-Ab2

## 2.2 实验条件的优化

抗体与抗原的反应时间采用 CV 方法进行优化。实验结果表明,当 AFP 孵育时间从 5 min 延长至 20 min,电流响应逐渐减小,超过 20 min,电流基本趋于不变,因此抗原抗体反应时间选择 20 min。

实验还考察了葡萄糖浓度对 ECL 的影响,当其浓度达到 0.05 mol/L 时,ECL 信号达到最大,可能的原因是修饰在二抗上的葡萄糖氧化酶的量是一定的,当葡萄糖浓度达到 0.05 mol/L 时就已达到了二抗上葡萄糖氧化酶催化的最大值。因此随后的实验中葡萄糖的浓度均为 0.05 mol/L。

## 2.3 免疫传感器的性能

**2.3.1 免疫传感器测定 AFP 抗原浓度的标准曲线** 在优化实验条件下检测,ECL 免疫传感器随 AFP 抗原浓度变化的 ECL 响应电位-发光强度见图 4,可见 ECL 强度随抗原浓度增大而增加。以 ECL 强度( $I_{\text{ECL}}$ )对 AFP 抗原浓度( $c_{\text{AFP}}$ )的对数作图,可得线性方程为: $I_{\text{ECL}} = 1823.6 \lg c_{\text{AFP}} + 6196.3$ ,线性相关系数为 0.998。方法线性范围是 0.001~200 ng/mL,检测限( $S/N=3$ )为 0.3 pg/mL。

**2.3.2 免疫传感器稳定性及重现性** 将修饰的电极在测试底液中连续扫描了 15 圈,ECL 响应信号的相对标准偏差在 5% 以内。将制备好的免疫电极于 4 °C 悬置于缓冲溶液上方,每隔 10 d 对同一只电极在相同测试液中进行测试,10 d 后,

免疫传感器 ECL 响应信号为最初值的 91.3%,经过 30 d 后,免疫传感器 ECL 响应信号为最初值的 82.6%。说明该传感器的稳定性比较好。通过使用同一支传感器在同一底液中进行 5 次检测,实验表明,免疫传感器对 10 ng/mL AFP 标准溶液进行测试后发现相对标准偏差为 4.97%。

**2.3.3 免疫传感器选择性** 将目标传感器分别孵育 10 ng/mL CEA、10 ng/mL BSA、1 ng/mL AFP 以及 1 ng/mL AFP 与 10 ng/mL CEA 的混合抗原的溶液、分别记录 ECL 响应值。实验结果表明其他非目

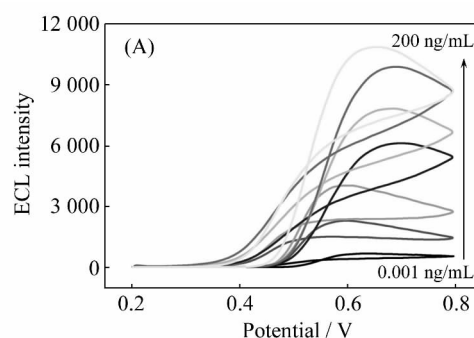


图 4 ECL 免疫传感器对 AFP 抗原浓度的响应  
Fig. 4 ECL responses of the proposed immunosensor to different concentrations of AFP  
 $c_{\text{AFP}}$ (ng/mL): 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 200.

标蛋白对目标蛋白的检测几乎无干扰,表明该传感器具有良好的选择性。

**2.3.4 实际应用** 为了评估所构建的免疫传感器在临床诊断的可行性,采用标准加入法做了回收率实验。即用合理稀释过的人体血清溶液配制了不同浓度的 AFP 抗原溶液,检测结果显示回收率为 89%~115%,在可接受的范围内。因此该免疫传感器在临床诊断中具有一定的实际应用价值。

### 3 结论

本文以金铂纳米合金修饰的玻碳电极作为一抗甲胎蛋白抗体(anti-AFP)的固载界面,葡萄糖氧化酶负载纳米金修饰的还原态石墨烯标记的二抗构建了基于 Luminol 电致化学发光(ECL)的免疫传感器。采用葡萄糖氧化酶实时高效催化葡萄糖原位产生过氧化氢作为 Luminol 电致化学发光共反应试剂以放大电致化学发光信号,同时利用石墨烯以及金属纳米材料大的比表面积、良好的导电性能和生物相容性固定大量的蛋白质分子并保持其良好的生物活性,极大地提高传感器的灵敏度与稳定性等性能。

#### 参考文献:

- [1] Richter M M. Chem Rev[J],2004,**104**(6):3003.
- [2] Divsar F, Ju H X. Chem Commun[J],2011,**47**(35):9879.
- [3] LI Ling(李玲), WANG Hai-yan(王海燕), (SUN Dong-yan(孙东艳), GONG Wu(龚武), WANG Lun(王伦). Chinese J Anal Chem(分析化学)[J],2010,**38**(9):1329.
- [4] Xu S J, Liu Y, Wang T H, Li J H. Anal Chem[J],2010,**82**(22):9566.
- [5] Haghghi B, Bozorgzadeh S. Anal Chim Acta[J],2011,**697**(1-2):90.
- [6] Novoselov K S, Geim A K, Morozov S V, Jiang D, Zhang Y, Dubonos S V, Grigorieva I V, Firsov A A. Science[J],2004,**306**(5696):666.
- [7] Fang M, Wang K G, Lu H B, Yang Y L, Nutt S. J Mater Chem[J],2009,**19**(38):7098.
- [8] YUAN Hong(原弘), CAI Ru-xiu(蔡汝秀). Journal of Wuhan University(Natural Science Edition)(武汉大学学报(理学版))[J],2003,**49**(2):162.
- [9] Cao L Y, Liu Y L, Zhang B H, Lu L H. ACS Appl Mater Interfaces[J],2010,**2**(8):2339.

## An Ultrasensitive Sandwich-Type Immunoassay Based on an Amplified Luminol Electrochemiluminescence

ZHOU Guo-qing\*

(School of Architecture and Materials, Chongqing College of Electronic Engineering,  
Chongqing 401331)

**Abstract:** An ultrasensitive luminol electrochemiluminescence(ECL) immunosensor was developed using gold-platinum alloy nanoparticles (Au-PtNPs) as platform and glucose oxidase (GOD) supported on AuNPs decorated reduced graphene (AuNPs@rGr-GOD) as labels. Then in an ECL detector cell containing luminol and an appropriate concentration of glucose, a dramatically amplified luminol ECL signal was obtained. The experimental results demonstrated that the proposed immunosensor exhibited sensitive and stable response for the detection of  $\alpha$ -1-fetoprotein(AFP), ranging from 0.001 to 200 ng/mL with a limit of detection down to 0.3 pg/mL(S/N=3).

**Keywords:** Electrochemiluminescence; Luminol; Graphene; Glucose oxidase; fetoprotein