

聚苯乙烯和聚乙烯醇作粘结剂的新型碳糊电极 用于构建电化学免疫传感器的研究

胡舜钦^{1,2}, 刘志国^{1,2}, 沈国励²

(1. 湖南工业大学 绿色包装与生物纳米技术应用重点实验室, 湖南 株洲 412007;
2. 湖南大学 化学化工学院 化学/生物传感与计量学国家重点实验室, 湖南 长沙 410082)

摘要: 利用掺杂聚乙烯醇的聚苯乙烯作粘结剂, 制备成新型碳糊电极, 该电极具有制作简单、导电性能良好和改进的表面吸附性能, 可用于构建基于表面吸附固定生物组分的电化学免疫传感器。用转铁蛋白-转铁蛋白抗体作模式分析物, 辣根过氧化物酶 (HRP) 作为酶标, 建议的免疫传感器测定人转铁蛋白的线性关系是 $0.50 \sim 70.0 \mu\text{g/mL}$ (相关系数为 0.983), 免疫传感器在使用后可通过简单的打磨抛光更新, 表现出良好的重复使用性。

关键词: 电化学免疫传感器; 聚苯乙烯/聚乙烯醇; 粘结剂; 碳糊电极

中图分类号: O646.1

文献标识码: A

文章编号: 1673-9833(2008)01-0099-05

Study on Electrochemical Immunosensor Construction Based on New Carbon Paste Electrode Using Polyvinyl Alcohol-Doped Polystyrene as Adhesive

Hu Shunqin^{1,2}, Liu Zhiguo^{1,2}, Shen Guoli²

(1. key Laboratory of Green Packaging and Application Bio-Nanotechnology, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China; 2. State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract A new strategy to constructing amperometric immunosensor for transferrin assay based on improved carbon paste electrode (CPE) as sensing platform has been described. The CPE is prepared by employing polyvinyl alcohol-doped polystyrene as the novel adhesive. The obtained CPE has good conductivity and better surface -adsorption capability. A sequential competitive immunoassay format was performed on the surface of CPE by using transferrin and transferrin antibody as a model system. The assay comprised first loading of the transferrin antibody on surface of CPE, then blocked in BSA solution followed by a competitive incubation in the buffer containing the transferrin (analyte) and transferrin labeled with horseradish peroxidase (SjAg-HRP) and finally the amperometric detection. The feasibility of regenerating surface of CPE for consecutive assays is demonstrated by a simple polish after each determination. The dynamic concentration range for transferrin assay is $0.50 \sim 70.0 \mu\text{g/mL}$.

Key words: electrochemical immunosensor; polyvinyl alcohol-doped polystyrene; adhesive; carbon paste electrode

0 引言

电化学免疫传感器具有操作简单、测定灵敏度较高及价格低廉等优点^[1], 可广泛应用于生物、医学、环境等分析领域中。在电化学免疫传感分析中, 免疫材料在电极体或表面的有效固定、非特异免疫反应的消除及免疫电极的可重复使用性等是需要解决的关键问

题^[2]。为此, 前人围绕电极材料及电极上生物活性物质的固定作了大量的探索工作, 采用异丁烯酸盐、环氧树脂、硅溶胶、有刚性的聚合物、石蜡等作为粘结剂^[3-6]的碳糊电极 (CPE), 以及使用聚苯乙烯 (PS) 作为生物活性物质的固定载体等相继出现。最近, 基于碳和聚苯乙烯的印刷电极的制作及用于构建生物传感

收稿日期: 2007-08-12

基金项目: 湖南省教育厅青年课题基金资助项目 (05B075)

作者简介: 胡舜钦 (1967-), 男, 湖南桃江人, 湖南工业大学副教授, 博士, 主要从事分析化学方面的教学与科研工作。

器的研究已见诸报道^[7-9],文献指出,为了增强其稳定性,采用的最适宜的PS质量分数为40%,但这样制成的电极具有相当高的阻抗,会影响所构建的免疫传感器的检测灵敏度。本研究考虑到表面活性剂(如聚乙烯醇,PA)有提高膨胀聚苯乙烯的性能的作用,我们的试验中,在PS中加入一定量的PA,用PS/PA混合物作为碳糊电极粘结剂用于制备新型CPE,并藉此构建了基于表面吸附固定生物组分的可更新的电化学免疫传感器。当再次测定时,可采用抛光技术对该免疫电极表面进行更新,以获取新的电极表面来吸附固定抗体,用于下一次的分析测定。研究结果表明,采用该方法制备的电化学免疫传感器的优点是:与用聚甲基丙烯酸酯、有机硅溶胶-凝胶、环氧树脂作为粘结剂相比较,其具有制备过程简单,电极的背景电流低;同以石蜡作为粘结剂相比较,所制备的CPE表现出较好的物理和化学稳定性,较强的表面吸附能力;同以纯PS作为粘结剂相比较,PA可以使PS和碳颗粒能更有效地混合在一起,避免了碳颗粒聚集体和PS聚集体的形成,有效地改善了电极的导电性,提高了免疫传感器的检测灵敏度。以人转铁蛋白为模式分析物,研究了建议的CPE用于构建可更新电化学免疫传感器的可行性。用辣根过氧化物酶(HRP)标记转铁蛋白,将转铁蛋白抗体吸附固定到传感器表面,采用竞争性免疫分析和计时安培电流检测技术,对人转铁蛋白含量进行了检测。

1 实验部分

1.1 试剂与溶液

人转铁蛋白、转铁蛋白抗血清、辣根过氧化物酶($C_{\text{HRP}}=3.0\mu\text{g}/\text{mg}$, $C_{\text{RZ}}=250\mu\text{g}/\text{mg}$)、牛血清白蛋白(BSA)和平均直径为 $15\mu\text{m}$ 的石墨粉购自上海生物试剂公司。人转铁蛋白按文献^[10]中的方法进行纯化。PS(质量分数为98%) and PA(质量分数为95%)购自长沙化学试剂公司。PS/PA混和物的配比比例为95:5。其他所用试剂和溶剂均为分析纯,实验溶液用二次蒸馏水配制。

含浓度为 $0.5\text{mmol}/\text{L}$ 的二茂铁甲酸及浓度为 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 的氯化钾的、pH值为7.4的磷酸缓冲溶液,用于电极的循环伏安测定。含浓度为 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 的氯化钾及浓度为 $5\times 10^{-4}\text{mol}/\text{L}$ 的邻苯二酚的、pH值为5.7的三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液(BR),用作免疫测定时的电解质溶液。配置含浓度为 $4\times 10^{-2}\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 的、pH值为5.7的BR缓冲溶液置于干燥和避光的条件下备用。配置含质量分数为1%BSA的、浓度为 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 、pH值为7.5的三羟甲基氨基甲烷(tris)-HCl缓冲溶液为封闭液;pH值为7.5的浓度为 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 的tris-HCl- $0.1\text{mol}/\text{L}$ KCl缓冲溶液为洗涤液。转铁蛋白抗体、转铁

蛋白和HRP标记的转铁蛋白溶液,用pH值为7.5的浓度为 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 的tris-HCl缓冲溶液稀释相应的储存液来制备。

1.2 仪器

循环伏安及计时安培实验在273型电化学系统(EG&GP Princeton Applied Research, Princeton, NJ, USA)上进行。采用三电极系统,免疫电极作为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂片为对电极,检测池体积为40 mL。当进行计时安培电流检测时,放入搅拌磁子,并用磁力搅拌器控制搅拌速度。用CSS501型恒温水浴槽控制培养温度。

1.3 HRP标记转铁蛋白的制备

取5 mg HRP溶解在0.5 mL浓度为 $0.2\text{mol}/\text{L}$ 、pH值为5.6的HAc-NaAc缓冲溶液中,将所得液体与0.25 mL浓度为 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 的 NaIO_4 溶液混和,在 4°C 下反应30 min后加入0.5 mL体积分数为2.5%的乙二醇水溶液,于室温下再反应30 min;然后用碳酸钠缓冲溶液调节pH值至9.0,加入5 mg转铁蛋白,于 4°C 下偶联反应过夜。在所得液体中慢慢加入0.1 mL质量浓度为 $5\text{mg}/\text{mL}$ 的 NaBH_4 水溶液,并在 4°C 下反应2 h;将反应混合物置于浓度为 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 的pH值为7.4的磷酸缓冲溶液中,在 4°C 下透析过夜。将透析后的液体过Sepharese G-25凝胶柱,即可得到纯化的HRP标记转铁蛋白。

1.4 基于PS/PA或石蜡作粘结剂的CPE的制备

室温下将石墨粉分散在含PS/PA的苯溶液中,石墨粉与PS/PA的最佳质量比为3:2。于 80°C 下,将苯从混和物中蒸发出来,形成具有导电性的碳糊;然后,将得到的碳糊压入自制的聚四氟乙烯(Teflon)管中,获得的碳糊直径约为6 mm,长度约为1 cm。并在碳糊中放入铜丝作为电极连线,在室温下干燥0.5 h,即做成了一碳糊电极(CPE)。该CPE表面分别在0.5、0.1、0.05 μm 金相砂纸上打磨抛光。基于石蜡的CPE的制备过程与文献^[2]所描述的大致相同。石墨糊是由石墨粉与石蜡油按3:2的比率混合而成的。然后再按上面所述的方法将石墨糊装入Teflon管中。

1.5 免疫电极的构建

将基于PS/PA的CPE或基于石蜡的CPE在金相砂纸上打磨抛光后,浸入一装有1 mL转铁蛋白抗血清溶液(其质量浓度为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$)的试剂瓶中,浸泡20 min,使电极表面吸附抗体达到饱和;将抗体修饰过的电极再转移到5 mL的质量分数为1%的BSA溶液中,以封闭未结合的抗体的活性位点,封闭过程大约需10 min。

1.6 免疫电极表面的更新

更新CPE的操作为,旋转Teflon上的螺母,挤出0.1 mm厚的糊层,然后分别在0.5、0.1、0.05 μm 金相砂纸上打磨抛光,形成一个光滑、发亮的电极表面,用以吸附固定抗体。将所得电极在二次水中清洗电极表

面后备用。

1.7 免疫传感器的构建及测量过程

取2 mL质量浓度为 $5\mu\text{g/mL}$ HRP标记的转铁蛋白, 并加入不同体积的pH值为7.5、质量浓度为 $2\mu\text{g/mL}$ 的转铁蛋白溶液、浓度为 0.1 mol/L 的tris-HCl缓冲溶液, 将免疫电极表面浸入其中, 在 32°C 下培育30 min; 并在测量前将培育好的免疫电极用缓冲溶液进行清洗, 然后与电化学系统相连, 构成三电极系统的电化学免疫传感器。

在体积为40 mL的电解池中进行计时安培法的测量, 工作电位为 -190 mV (相对于SCE)。在基线电流稳定后, 加入 0.8 mL 浓度为 $4 \times 10^{-2}\text{ mol/L}$ 的 H_2O_2 , 此时会有很明显的电流增加。当电流值稳定后, 记录该电流的最大增加值, 此值即为表征抗体和抗原之间的反应的电流响应信号。

2 结果与讨论

2.1 电化学循环伏安法和阻抗测量

电极的电化学特性可通过循环伏安法来检测与表征。循环伏安法可用于表征电极的背景电流和峰电流, 以及二茂铁甲酸(II/III)在电极上发生的电化学反应的氧化还原峰电位的变化情况。图1为扫描速度 80 mV/s 时, 基于PS/PA的CPE和基于石蜡的CPE在含二茂铁甲酸的电解质溶液中CV的性能比较。

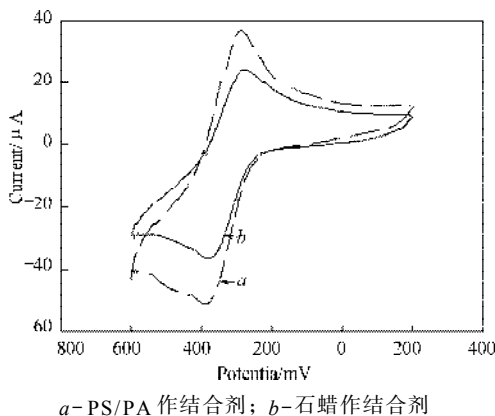


图1 二茂铁甲酸在碳糊电极上的循环伏安图
Fig. 1 Cyclic voltammogram of ferrocene carboxylic acid at CPEs

从图1中我们可发现, 这2种CPE都有很好的导电性能及很高的电子转移速率, 均能满足电化学分析要求(在 0.5 mL 二茂铁的碳酸溶液中, 基于PS/PA的CPE和基于石蜡的CPE的 ΔE_p 分别为 93 mV 和 95 mV)。B. J. Seddon等^[9]曾报道了基于纯PS的印刷电极传感器, 当碳和粘结剂PS的比率接近3:2时, 二茂铁甲酸的水溶液在该电极上没有出现氧化还原的峰电流响应。我们用基于PS的CPE证实了他们的结论是正确的。基于PS/PA的CPE和基于石蜡的CPE的电极阻抗分别

为 $34\ \Omega/\text{cm}$ 和 $52\ \Omega/\text{cm}$, 这些数值相对于基于PS印刷电极(O. Bagel等^[8]报道为 $1\text{ k}\Omega/\text{cm}$, B. J. Seddon等报道为略小于 $1\text{ k}\Omega/\text{cm}$)来说已经是相当低的了。我们的实验结果是基于PS的CPE电阻约为 $800\sim 900\ \Omega/\text{cm}$ 。此外, 与基于石蜡的CPE相比, 当在基于PS/PA的CPE上发生二茂铁甲酸(II/III)电化学反应时, 有一个更大的峰电流, 这表明后者有着更高的灵敏度。CPE性能的改进可能是由于在PS/PA中, 石墨颗粒能被更好地分散。另外, PA的加入也提高了水对CPE的润湿度, 良好的润湿度可以保证电极表面与溶液中电活性物质有更好的接触。

对苯二酚(HQ)对HRP来说是一种理想的电子传递介质^[11]。图2显示了在不同的实验步骤下, HQ在基于PS/PA的CPE免疫传感器上所表现出的电化学性能。图3为在同样的操作条件下, HQ在基于石蜡的CPE免疫传感器上所表现出的电化学性能。

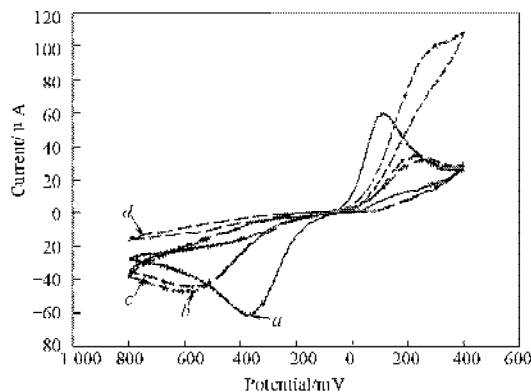


图2 氢醌在PS/PA碳糊电极上的循环伏安图
Fig. 2 Cyclic voltammogram of HQ at PS/PA-based CPE

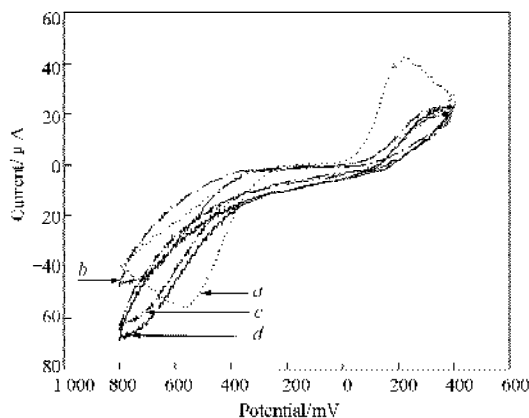


图3 氢醌在石蜡碳糊电极上的循环伏安图
Fig. 3 Cyclic voltammogram of HQ at paraffin-based CPE

作为免疫传感器,与基于石蜡的CPE相比,基于PS/PA的CPE免疫传感器的优势,在于它在检测通过免疫反应而固定在电极上的HRP催化产生的电活性物质时,仍具有很好的灵敏度;而基于石蜡CPE的免疫传感器,在表面吸附了蛋白质后其导电性会大大降低。石蜡是一种憎水物质,会阻碍电极与溶液中的电活性物质相互接触。在基于石蜡的CPE表面吸附了一层蛋白质绝缘层后,多孔的碳表面便会完全覆盖,从而导致免疫传感器对溶液中的一些电活性物质失去响应(见图3中的曲线a~c)。另一方面,虽然PS类似于石蜡有憎水性,但在CPE制作中,添加PA可增加电极表面湿润度,并可防止出现因吸附蛋白质完全封闭碳表面而引起的导电性降低问题(见图2中曲线a~c);且PS本身可作为吸附固定蛋白质抗体的一个良好的平台,对抗体具有良好的吸附能力,可固定相当多的抗体量,提高了免疫传感器的检测灵敏度。

2.2 计时安培法测量

免疫分析检测可采用计时安培电流检测技术进行。在酶反应为最大反应速率下,酶催化反应的氧化产物的还原响应电流与酶的活性成正比,也即与通过免疫反应而固定在免疫传感器上的HRP标记的转铁蛋白的量成正比。

电极吸附固定抗体时间,将影响通过免疫反应而固定在免疫传感器上的HRP标记的转铁蛋白的量。把免疫电极表面浸入质量浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 转铁蛋白抗血清溶液中,经过不同的浸入时间,表面吸附固定抗体后,电极表面剩余的活性位点用质量分数为1%的BSA缓冲液封闭10 min,以降低HRP标记的转铁蛋白的非特异性吸附。实验证明,所选用的封闭活性位点的缓冲液的浓度和时间,能有效地消除非特异性吸附。当电极吸附抗体时间从0增加到15 min时,响应电流也随之增加,之后便慢慢地停止增加,此时电极表面固定抗体已达到饱和(见图4,测试酶标的浓度为5 $\mu\text{g/mL}$)。即在免疫传感器上固定抗体的最佳吸附时间为15 min。

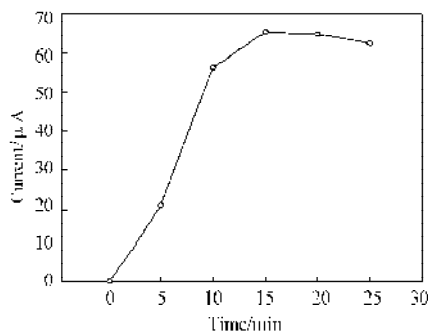


图4 转铁蛋白抗体在PS/PA碳糊电极上吸附固定时间的优化

Fig. 4 Effect of adsorption time of transferrin antiserum on the chronoamperometric current

图5所示为 H_2O_2 的浓度增加时的计时安培电流曲线,即免疫传感器对连续加入100 L浓度为 $4 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ H_2O_2 的计时安培反应。传感器表面首先吸附固定转铁蛋白抗体,然后用5 g/mL酶标培育。电流随 H_2O_2 浓度的增加而增加,且呈现很好的信噪比(背景电流为1.1 μA)。当 H_2O_2 的加入量为0.8 mL(浓度为 $4 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$)时,电流已达到饱和值。0.8 mL(浓度为 $4 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$)的 H_2O_2 为在此分析条件下最合适的加入量。

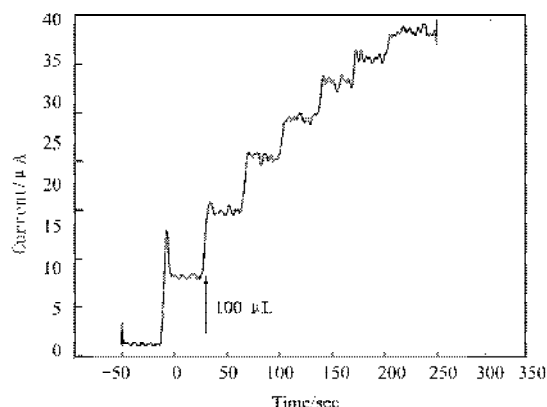


图5 H_2O_2 浓度增加时的传感器的计时安培电流曲线

Fig. 5 A immunosensor current-time responses curve for successive additions of H_2O_2

2.3 标准校正曲线和检测下限

图6是在最佳实验条件下获得的标准校正曲线。图6里的小插图是进行对转铁蛋白浓度进行对数转换后与电流的线性关系。电流与 $\log C$ 在转铁蛋白质量浓度为0.50~70.0 $\mu\text{g/mL}$ 间呈线性关系,线性回归方程为 $I=137.10-27.2\log C$,线性相关系数为0.9828。检测下限为0.35 $\mu\text{g/mL}$ 。此时分析物-转铁蛋白的浓度产生的电流响应信号为空白响应信号的标准偏差的3倍。采用同样的PS/PA免疫传感器在线性范围内做4次平行实验,测得相对标准偏差为3.5%。实际样品检测的实验证明,将这种免疫传感器用于检测人血清样品中的人体转铁蛋白是可行的。分析中使用的人体血清样品是由湖南医科大学提供的,与ELISA法的结果比较见表1。研究表明,在可检测的浓度范围内用这种方法检测转铁蛋白可以满足临床需要。

表1 人体血清样品中转铁蛋白测定

Table 1 Transferrin determination in human serum samples

样品	转铁蛋白量 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	建议方法	ELISA 方法
1#	2.74 ± 0.15^a	2.84
2#	4.04 ± 0.10^a	4.00
3#	8.43 ± 0.22^a	8.77

^a 平均值 \pm 4次测量的标准差,样品稀释100倍。

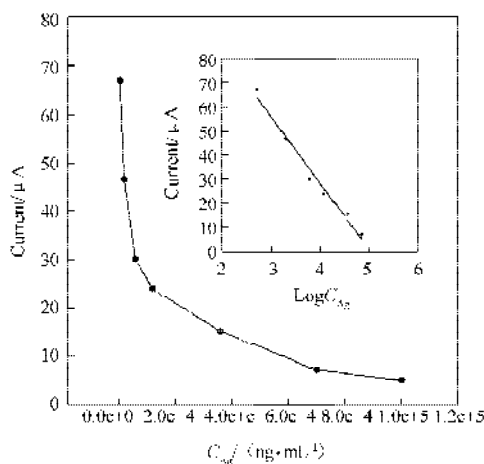


图6 建议免疫传感方法对测定转铁蛋白的校正曲线

3 结论

通过将聚乙烯醇添加到聚苯乙烯中, 改善了聚苯乙烯作结合剂所制备的碳糊电极(CPE)的性能。经电化学循环伏安法和阻抗测量等研究表明, 聚乙烯醇的存在, 有利于石墨粉在PS胶中能得到良好的分散, 可增加所制CPE的表面润湿度, 从而增强电极表面的吸附性能, 提高免疫传感器的检测灵敏度。本研究还利用计时安培测量技术进行竞争免疫分析检测, 分析中采用HRP作为标记, 用人转铁蛋白-转铁蛋白抗体作模式分析物。建议的免疫传感器可用于人转铁蛋白的灵敏检测, 并且该免疫传感器在使用后可通过简单的打磨抛光得到更新, 表现出良好的可再利用性。所建议的方法还具有制备简单、价格低廉等优点, 具有实用性。

参考文献:

- [1] Dijkstra M, Kamp B, Hoogvliet J C, et al. Development of an Electrochemical Immunosensor for Direct Detection of Interferon- γ at the Attomolar Level[J]. Analytical Chemistry, 2001, 73(5): 901-907.
- [2] Lee K S, Kim T H, Shim M C, et al. disposable liposome

immunosensor for theophylline combining an immunochromatographic membrane and a thick-film electrode[J]. Analytical Chimica Acta, 1999, 380(1): 17-26.

- [3] Wang J, Pamidi P V A, Rogers K R. Sol-gel derived thick-film amperometric immunosensors[J]. Analytical Chemistry, 1998, 70(6): 1171-1175.
- [4] Bordes A L, Limoges B, Brossier P. Simultaneous homogeneous immunoassay of phenytoin and Phenobarbital using a Nafion-loaded carbon paste electrode and two redox cationic labels[J]. Analytica Chimica Acta, 1997, 356(2-3): 195-200.
- [5] Murielle D, Chantal D, Benoit L. An Immunomagnetic Electrochemical Sensor Based on a Perfluorosulfonate-Coated Screen-Printed Electrode for the Determination of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid[J]. Analytical Chemistry, 1999, 71(13): 2571-2577.
- [6] Chen S W, Huang K. Electrochemical Studies of Nitrophenyl Moieties Immobilized on Gold Nanoclusters[J]. Langmuir, 2000, 16(4): 2014-2018.
- [7] Etter P P, Michael G W, Niessner R. Detection of bound nitroaromatic residues in soil by immunoassay[J]. Fresenius J. Anal. Chem., 1998, 360(7/8): 781-783.
- [8] Bagel O, limoges B, Schöllhom B, et al. Subfemtomolar Determination of Alkaline Phosphatase at a Disposable Screen-Printed Electrode Modified with a Perfluorosulfonated Ionomer film[J]. Analytical Chemistry, 1997, 69(22): 4688-4694.
- [9] Seddon B J, Osborne M D, Lagger G, et al. Micro-glassy carbon inks for thick-film electrodes[J]. Electrochimica Acta., 1997, 42(12): 1883-1894.
- [10] Prusak-Sochaczewski E, Luonm J H T. Detection of human transferrin by the piezoelectric crystal[J]. Analytical Letters, 1990, 23(2): 183-188.
- [11] Storhoff J, Elghanian R, Mucic R C, et al. One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base imperfections Using Gold Nanoparticles Probes[J]. J. Am. Chem. Soc., 1998, 120(7): 1959-1964.

(责任编辑: 廖友媛)