

采用抗体包被金磁纳米微粒修饰电极的 HIV p24/gp36 安培联检芯片

干宁¹, 李榕生¹, 陈亚东^{1,2}, 杨欣¹, 李天华¹

(1. 宁波大学宁波市新型功能材料及其制备科学国家重点实验室培育基地, 315211, 浙江宁波;

2. 宁波职业技术学院华丰分院, 315200, 浙江宁波)

摘要: 研制了以聚碳酸酯为基底的双通道安培检测微流控免疫芯片, 在其中分别集成了修饰有 HIV 核心抗原 p24/gp36 的单克隆一级抗体的纳米金修饰电极, 并应用于人血清中 p24 和 gp36 抗原的同时分析. 检测原理是: 基于夹心免疫分析法, 在电压驱动下, 一次性加入含有 p24 和 gp36 样品及 HRP 酶标记的 p24 和 gp36 二级抗体溶液, 与电极表面的一级抗体生成夹心免疫复合物; 接着在体系中加入 H_2O_2 , 以方波溶出伏安法检测免疫复合物上 HRP 催化 H_2O_2 的还原电流. 在 pH 为 6.2 的磷酸缓冲液中, 对 HIV p24 和 gp36 的检测时间均少于 2 min, 线性范围为 0.5~400 $\mu\text{g}/\text{L}$, 检测限为 0.25 $\mu\text{g}/\text{L}$. 该芯片集成了加样、分离和检测系统, 检测时间短, 灵敏度明显高于传统的酶联免疫吸附分析法, 可应用于对艾滋病的早期诊断和大范围筛查.

关键词: 金磁纳米修饰电极; 方波溶出伏安法; 微流控芯片; HIV p24; HIV gp36

中图分类号: O657.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2009)07-0115-05

Micro Fluidic Amperometric Immunosensor Chip for HIV p24 and gp36 Antigens Based on Gold Magnetic Nanoensemble Electrode

GAN Ning¹, LI Rongsheng¹, CHEN Yadong^{1,2}, YANG Xin¹, LI Tianhua¹

(1. The State Key Laboratory Base of Novel Functional Materials and Preparation Science, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China; 2. Huafeng Faculty of Ningbo Vocational and Technical College, Ningbo, Zhejiang 315200, China)

Abstract: An electrochemical detection biosensor chip is developed for simulatively analyzing HIV p24 and gp36 antigens with gold nanoensemble electrode modified by the first monoclonal antibodies of p24 and gp36 antigens and microfluidic control system. The detection principle is based on double-sandwich immunoassay method. The first monoclonal antibodies of p24 and gp36 antigens are fixed on electrode surface, then when the serum containing p24 and gp36 antigens passes through the modified electrode, p24 and gp36 combine with the corresponding antibodies on its surface. Furthermore, the secondary p24 and gp36 antibodies marked by HRP are added to form a sandwich compound. Square wave stripping voltammetry is employed to determine the reduction current by catalyzing H_2O_2 . In pH 6.2 PBS, HIV p24 and gp36 can be detected within 2 minutes with a linear range on calibration curve from 0.5 to 400 $\mu\text{g}/\text{L}$ and a detection limit of 0.25 $\mu\text{g}/\text{L}$. This biosensor improves the detective sensitivity of p24 and gp36 to 1 $\text{A} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$, and is expected to be chosen for early diagnosis of AIDS and large-scale screening test.

Keywords: gold magnetic nanoensemble electrode; square wave stripping voltammetry; microfluidic control amperometric immunosensor chip; HIV p24; HIV gp36

I型艾滋病的确诊需同时获取 HIV 核心抗原 p24 和 gp36 的含量,而目前的检验方法多为单一抗原测定^[1-2]. 多抗原联检方法主要基于荧光阵列免疫芯片,如 Ravanshad 等^[3]报道了一种基于抗体片段的 4 种艾滋病诊断抗原同时测定的荧光微阵列芯片,然而该方法仪器昂贵,实验步骤复杂,难以推广. 为了及早诊断艾滋病,急需发展 HIV p24 和 gp36 同时免疫分析的方法. 近年来,电化学免疫分析(EIC)技术因样品量少、灵敏快捷、适合于现场分析等特点开始被用于疾病诊断^[4]. 然而,尽管单一抗原/抗体的 EIC 分析方法已较成熟,但同时进行多抗原测定的报道却很少,一些关键性问题亟待解决^[5],例如:常规电解池体积多在 mL 级,发生抗原/抗体免疫结合时,所需试剂量较多,温育时间较长;缺乏简单可靠的电极修饰技术来保持抗原/抗体分子在电极表面长期、稳定固定并维持活性. 为此,构筑基于纳米修饰电极的多道安培检测微流控芯片(CE-AD)便成为一种良好选择^[6]. 这是因为:①通过微加工技术易于在芯片上集成多个 μm 级直径的微电极探头,每一探头可检测一种抗原,而流动进样系统又可保持电极表面时刻更新,降低电流背景,适合多样品同时分析;②反应池为 nL 级,免疫分析所需的抗原/抗体量极少,并可大大减少温育时间,实现快速检测;③采用基于抗体包被的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ (金磁纳米微粒)修饰电极,可方便地吸附抗原分子并长期保持其活性,是降低成本并规模化生产生物芯片的最佳途径之一^[7]. 本文将 HIV p24 和 gp36 抗体包被 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 修饰电极作为传感探头,将其集成在微流控芯片中,基于多道电化学分析和夹心免疫分析原理,实现 HIV p24 和 gp36 抗原的同时检测.

1 实验部分

1.1 试剂准备

HIV p24/gp36 酶联免疫试剂盒(美国 DPC 公司),包括 0~1 000 $\mu\text{g/L}$ 的 p24 和 gp36 标准样品,酶标 p24 和 gp36 一级、二级抗体,以及免疫终止溶液;巯基丁二酸铜(简称 CuL,修饰在电极表面作为电子传递媒介体,以提高电子传递速度,提高检测灵敏度);质量分数为 5% 的牛血清蛋白(简称 BSA)和人血清蛋白(简称 HAS),均购自美国 Sigma 公司;含有 0.5 mol/L NaCl、pH 为 6.2 的 0.1 mol/L PBS 缓冲液,作为非特异性吸附蛋白的洗脱液; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$,

5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸),3-巯丙基三乙氧基硅烷, $\text{AuCl}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (均来自上海化学试剂公司);径迹蚀刻聚碳酸酯膜(简记为 PC,孔径为 50 nm,厚度为 0.5 mm,美国奥帕公司).

1.2 仪器

CHI660B 电化学工作站(美国 CH 公司);SK3300LH 型超声波清洗器(上海科导公司);JEM-2010 透射电镜(日本 JEM 公司);高电压电源供应器(美国科学仪器公司),电压输出范围为 0~3 500 V;RF 溅镀仪(上海诚真公司);SRCH-202 热压机(美国 San & Run 公司);镀铬及 AZ P1350 光阻剂的石英玻璃母模(上海精诚公司);BS10 带锯机(法国 Rexon 公司);GW-4 HP 1/8 钻孔机(宁波志韦机械厂).

1.3 抗体包被的金磁纳米微粒修饰电极和安培检测微流控免疫芯片制备

1.3.1 基于金磁纳米磁珠固定 p24/gp36 抗原-p24/gp36 抗体的 GNE 电极制备 采用文献[8]报道的化学镀技术,以甲醛等作为还原试剂,将商业化的径迹蚀刻 PC 的微孔洞(直径为 50 nm)中填入金,并在 0.1 mol/L 巯基丁二酸铜氯仿溶液中浸泡 1 h 后制成金纳米修饰电极(GNE),见图 1. 将镀好金的 PC 以胶带撕去其中一面的金后,便完成了整个金磁纳米微粒修饰电极的制作. 将 GNE 浸泡于 1 mg/L 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 胶磁珠(直径为 50~100 nm)溶液中 4 h,再分别浸入 500 $\mu\text{g/L}$ 的 p24 和 gp36 抗体溶液中 4 h,分别得到 p24 和 gp36 抗体固定的 GNE 电极,见图 1a. 夹心免疫分析过程如图 1b 所示.

1.3.2 微流控安培免疫传感芯片组装 先制作石英玻璃母模,然后构建传感芯片上的“十字交叉”微孔道和 4 个通道,其中 2 个作为参比通道,并在 PC 上喷溅 Au 电极(直径为 0.1 mm). 具体如下:在 6 cm×4 cm 的 PC 片上热压内径为 360 μm 、长为 3 cm 的线形贯通信道,在离信道一端 0.5 cm 处钻一直径为 3 mm 的孔作为参比电极和对电极的电极池. 取外径为 7 mm 的 PC 圆片,在圆心附近钻 4 个直径 0.5 mm 的小孔,将其盖在电极池上方(使小孔与电极池连通),并用环氧胶与芯片粘合. 将固定 p24/gp36 抗体的 GNE 用银胶粘合在 Au 电极头部,并将微型 Ag/AgCl 参比电极和 Pt 丝对电极通过小孔插入电极池后用环氧胶固定. 组装后的传感芯片如图 2 所示. 将传感芯片连在高压电源和双通道电分析仪上,即可进行 p24 和 gp36 抗原的同时检测.

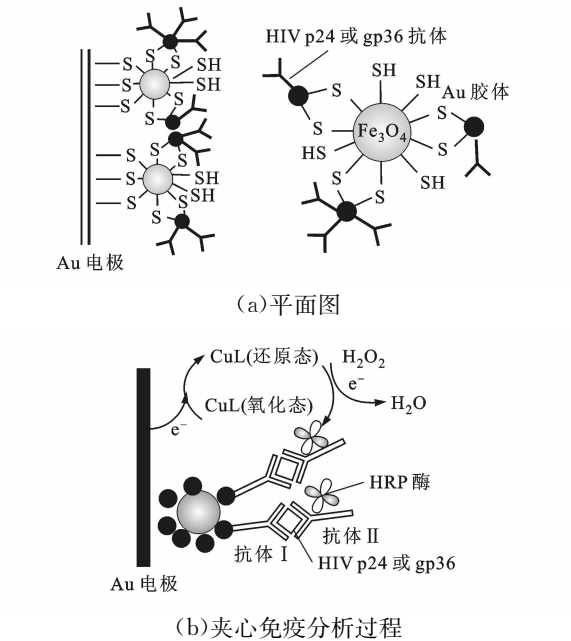
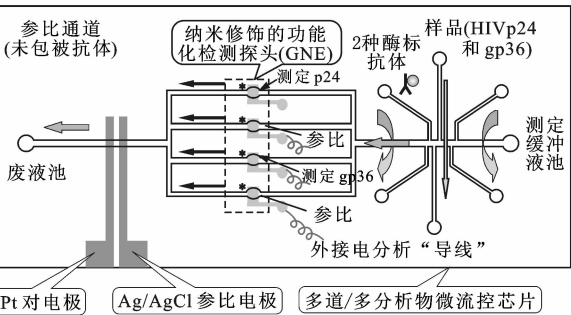
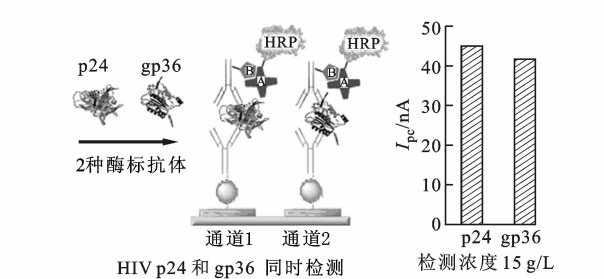


图 1 固定 p24 (或 gp36) 抗原-p24 (或 gp36) 抗体的 GNE 及其夹心免疫分析过程



1.4 测定过程

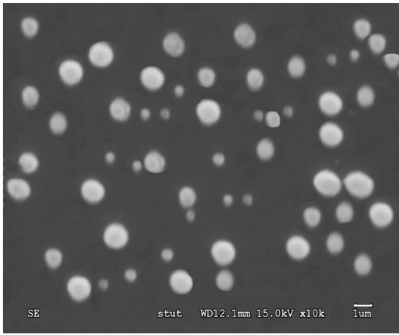
采用“十字交叉”的流动注入方式来进行样品导入,通过电渗流驱动样品在毛细管中流动, p24/gp36 由下游的相应抗体修饰电极检测(同时设置了相应的参比通道,在此通道中的电极探头只修饰金磁微粒,而无包被抗体,以获得抗体修饰电极的背景电流,并加以扣除). ①对 p24、gp36 及 HRP-p24 II 抗体、HRP-gp36 II 抗体样品溶液同时施加+150 V 的高电压(相对废液槽)30 s,使样品及其二级抗体同时往下从而在分离管道中累积溶液;②对 pH 为 6.2 的 PBS 缓冲液储液槽施加+300 V 的高电压(相对废液槽)300 s;③在通道中加入 H₂O₂,通过方波溶出伏安法,从 0.0 V 扫描至 0.9 V 检测免疫复合物上 HRP 催化 H₂O₂ 的还原电流 I_{pc} . I_{pc} 与抗原浓度成正比,如图 3 所示.



2 结果与讨论

2.1 包被抗体 GNE 的特性

用扫描电镜(SEM)观察制备好的包被 p24 抗体的 GNE,可看出电极表面存在很多亮点(见图 4a),这是因为金磁微粒有导电性,会在 SEM 中电子束的照射下形成亮点,每个亮点的尺寸大约是 50 nm,代表了微粒直径. 采用交流阻抗方法检测了电极表面逐次修饰 CuL、金磁纳米微粒、p24 抗体前后的阻抗谱(见图 4b),发现随着修饰物质的不断加入,半圆直径逐渐变大,阻抗不断增加,表明抗体被组装在电极表面. gp36 修饰电极也有类似现象.



(a)SEM 图

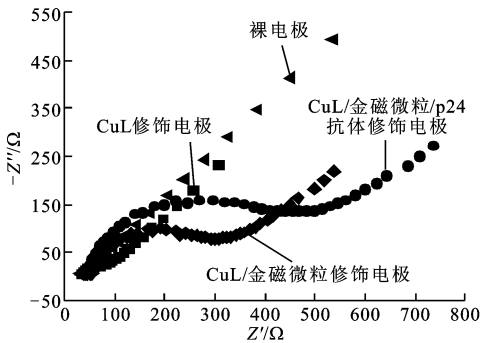
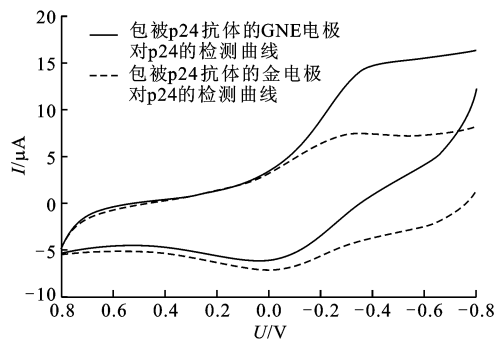


图 4 包被抗体 GNE 的 SEM 图和电极表面阻抗谱

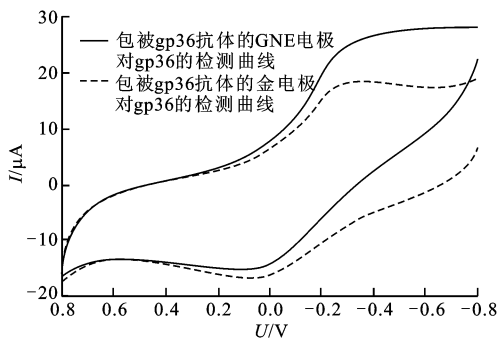
2.2 包被抗体 GNE 与普通金电极对 H₂O₂ 还原信号的传感比较

采用循环伏安法比较了包被抗体的 GNE 和相

同直径的普通金电极分别对 HIV p24 和 gp36 发生夹心免疫反应后,催化 1 mmol/L H_2O_2 的还原信号,结果见图 5. GNE 在 -0.35 V 处产生了明显的 H_2O_2 还原峰电流,比普通金电极的峰电流增加了 1 倍左右,这是因为 GNE 中的纳米导电颗粒大大增加了电极表面积^[5],显著加强了检测信号. 因此, GNE 非常适合微量样本的高灵敏度测试.



(a) p24 检测图



(b) gp36 检测图

图 5 采用 GNE 和普通金电极对 100 $\mu\text{g/L}$ 的 p24 和 gp36 发生夹心免疫反应的循环伏安检测信号

2.3 HIV p24/gp36 测定条件的优化

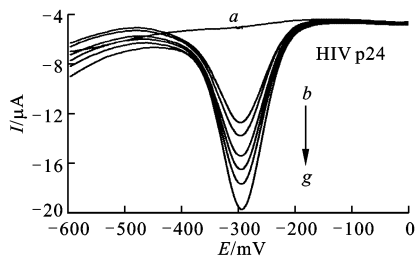
2.3.1 毛细管路上施加电压的影响 在理论上,毛细管两端施加的电压越高,则样品的电泳迁移速度越快,分析时间越短. 然而,若电泳迁移速度过快, p24 和 gp36 与其相应的酶标抗体就无法在微管路中实现分离. 为此,本实验探讨了电压对检测的影响. 研究表明,当施加的电压增加到 150 V 时,120 s 后可以检测到信号,而当电压达到 300 V 时,分析时间减少为 60 s,电流信号达到 150 V 时的 1.5 倍. 随着电压继续升高,电流信号开始下降. 本实验选择的最佳毛细管路施加电压为 300 V.

2.3.2 GNE 的 p24 I 和 gp36 I 抗体浓度及浸泡时间对检测信号的影响 GNE 表面包被的 p24 和 gp36 抗体量与其浸泡溶液的浓度和浸泡时间有关. 研究显示,电流信号随着抗体浓度的增加而增强,但

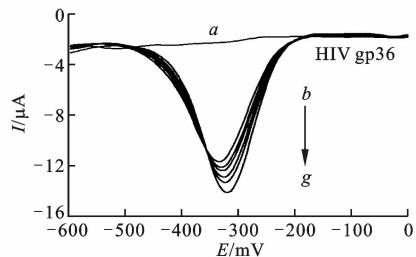
当 p24 I 和 gp36 I 抗体浓度在 3~9 $\mu\text{g/L}$ 范围内时,电流信号保持稳定. 因此,在考虑成本的条件下,选择 9 $\mu\text{g/L}$ 作为 p24 和 gp36 抗体的浸泡浓度. 研究发现,这 2 种抗体的浸泡时间以 12 h 为最佳.

2.4 HIV p24 和 gp36 测定的重现性、校正曲线和检测限

利用同一根电极测定浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 的 HIV p24 和 gp36 标样 7 次,组内相对标准偏差分别为 3.5% 和 4.5%,测定 10、30 $\mu\text{g/L}$ 样品的组间相对标准偏差分别为 3.7% 和 5.8%,表明芯片的测定准确性好. 该芯片无需对电极进行预处理,因此非常适合于临床免疫分析. 图 6 为不同浓度的 p24 和 gp36 样品在芯片上的方波溶出伏安图(SWSV). 检测信号随抗原浓度的增加而增强,并在 p24 和 gp36 浓度为 0.5~400 $\mu\text{g/L}$ 的范围内均成线性关系,检测下限均为 0.25 $\mu\text{g/L}$ (3σ),显著低于 ELISA 分析方法的检测下限^[1],约低 2 个数量级,表明集成了 GNE 的微流控芯片可以有效减小 p24 和 gp36 的窗口期.



(a) 不同浓度 p24 的 SWSV 图



(b) 不同浓度 gp36 的 SWSV 图

a~g 曲线对应的抗原质量浓度分别为 0、10、20、50、100、200 和 500 $\mu\text{g/L}$

图 6 不同浓度的 HIV p24 和 gp36 在芯片上的 SWSV 图

2.5 真实样品中的干扰影响和 GNE 表面再生

通过实验探讨了血液中常见干扰物的影响,结果表明:0.6 mol/L 尿素、9.0 mmol/L 葡萄糖、0.5 mol/L 抗坏血酸及 500 $\mu\text{g/L}$ 人血清蛋白(HAS)对 p24/gp36 检测几乎不造成任何影响,但是当 HAS 的浓度达到 1 000 $\mu\text{g/L}$ 后, p24/gp36 的电流信号将降低 10%~15%,会产生一定干扰. 因为实际检

测时血清采用缓冲溶液稀释,所以其含量很低,干扰不强.同一芯片可连续测定 50 个样品,继续测定会导致少量血清蛋白吸附在电极表面而造成电流减小,这时可以通过流速为 0.1 mL/min、pH 为 6.2 的 PBS 缓冲溶液冲刷电极表面 30 min 使其再生.以上结果表明,将本芯片系统应用于真实样品检测是可行性的.

2.6 临床应用

采用标准加入法和本芯片系统分别对 3 个血清样品进行测定,并和标准的酶联免疫吸附分析法(ELISA 法)的结果进行对照,二者相当吻合(见表 1),证明本文的方法可以用于临床血清 HIV p24 和 gp36 含量的同时测定.

表 1 血清样品中 HIV p24 和 gp36 同时检测的结果($n=7$)

样品 编号	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$				相对偏差/%	
	本文方法		ELISA 法			
	p24	gp36	p24	gp36	p24	gp36
1	7.32	8.32	7.013	8.12	1.2	2.1
2	6.44	7.22	6.221	7.37	2.1	1.5
3	7.98	6.34	7.533	6.53	1.5	1.6

3 结 论

研制了基于金磁纳米微粒修饰微电极的微流控安培免疫传感芯片,并用于 HIV p24 和 HIV gp36 的联合检测.与传统的 ELISA 法相比,本文方法的灵敏度高 1~2 个数量级,具有良好的检测准确性和特异性,可望为多物种的同时免疫检测提供新的技术,为艾滋病的快速筛查和早期诊断提供一个全新的平台.

参考文献:

[1] LUKACS Z, DIETRICH A, GANSCHOW R, et al. Simultaneous determination of HIV antibodies, hepatitis C antibodies, and hepatitis B antigens in dried blood spots: a feasibility study using a multi-analyte immunoassay [J]. Clin Chem Lab Med, 2005, 43(2): 141-145.

[2] SUSANNE P, HEDWIG D, FRANK L. A new combined HIV p24 antigen and anti-HIV-1/2/O screening assay [J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 304: 229-243.

[3] RAVANSHAD M, SABAHI F, MAHBOUDI F, et al. Evaluation of a new dot blot assay for confirmation of human immunodeficiency virus type 1 and 2 infections using recombinant p24, gp41, gp120 and gp36 antigens [J]. Journal of Saudi Medicine, 2006, 27(1): 31-36.

[4] TONISCH K, CIMALLA V, WILL F, et al. Nanowire-based electromechanical biomimetic sensor [J]. Physica: E, 2007, 37(13): 208-211.

[5] LIU Guodong, WANG Joseph, KIM J, et al. Electrochemical coding for multiplexed immunoassays of proteins [J]. Analytical Chemistry, 2004, 76(23): 7126-7130.

[6] QIN Jianhua, AARON R W. Maze exploration and learning in C elegans [J]. Lab on a Chip, 2007, 7(12): 186-192.

[7] YU Heng, CHEN Min, RICE P M. Dumbbell-like bifunctional Au-Fe₃O₄ nanoparticles [J]. Nano Letter, 2005, 5(2): 379-382.

[8] WILSON M S. Electrochemical immunosensors for the simultaneous detection of two tumor markers [J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(22): 1496-1502.

(编辑 葛赵青)

[本刊相关文献链接]

激光照射金纳米微粒靶向细胞对细胞膜通透性的影响. 2008, 42(12): 1560-1564.

铁掺杂纳米二氧化钛介孔材料的合成、结构与性能. 2008, 42(9): 1184-1188.

磁性交联核酸酶 P1 聚集体的制备及性质研究. 2008, 42(8): 1035-1039.

氧化锌/银双层膜负反馈阴极电极的制备及性能研究. 2007, 41(12): 1470-1473.

蒽甲醇修饰单壁碳纳米管的研究. 2007, 41(6): 746-749.