

# 新型乙肝压电免疫传感器的研制

譙康全, 吴永强

(四川理工学院材料与化学工程学院, 四川 自贡 643000)

**摘要:**通过自组装半胱胺在压电石英金电极上,用缩合剂(EDC和NHS)将羧基化碳纳米管和乙肝表面抗体连接到半胱胺膜,构建乙肝表面抗原的一种新的生物压电免疫传感器。传感器的灵敏度为  $17.268 \text{ Hz}/(\mu\text{g/mL})$ , 线性范围为  $0.05 \mu\text{g/mL} - 15 \mu\text{g/mL}$ , 并能实时检测。

**关键词:**压电免疫传感器;碳纳米管;乙肝表面抗原

**中图分类号:** R446.62 TP212

**文献标识码:** A

## 引言

中国是乙肝的多发地区,乙肝病毒(HBV)感染者约1.2亿人,占全世界患者的一半,乙肝病毒的病原体具有一定的传染性,还可导致患者出现肝硬化,甚至肝癌,因此,HBV标记物的早期、准确、定量检测非常重要。近年来,随着检测技术的不断发展,乙肝血清标记物的检测也在不断改进。目前常用的检测技术有:酶联免疫测定<sup>[1]</sup>、荧光免疫测定<sup>[2]</sup>、电化学免疫测定<sup>[3]</sup>、聚合酶链反应(PCR)技术<sup>[4]</sup>、基因芯片技术<sup>[5]</sup>和压电检测<sup>[6]</sup>等。

碳纳米管良好的导电性、催化活性和大的比表面积,并具有降低过电位能力和对生物物质的吸附能力强等特点<sup>[7]</sup>,现已广泛用于各种生物传感器,如DNA传感器<sup>[8-9]</sup>、酶传感器<sup>[10-11]</sup>和免疫传感器<sup>[12-13]</sup>等。

本文利用碳纳米管比表面积大、吸附能力强的特性,在石英金电极表面自组装一层半胱胺,再通过缩合剂(EDC和NHS)交联羧基化碳纳米管和乙肝抗体并连接到半胱胺膜上,研制成一种新的乙肝表面抗原压电免疫传感器。

## 1 实验部分

### 1.1 实验试剂

乙肝表面抗原抗体(HBsAb)(上海科华生物工程公司);乙肝表面抗原抗原(HBsAg)(上海科华生物工程公司);多壁碳纳米管(MWCNTs)(中科院成都有机所);1

-乙基-3-(3-甲基氨丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)(上海延长生化科技发展有限公司);N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(上海延长生化科技发展有限公司); $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (广东汕头金砂化工厂); $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (中国成都化学试剂厂); $\text{NaCl}$ (成都金山化学试剂有限公司);半胱胺(济南汇博应用化学研究所有限公司); $\text{HNO}_3$ (重庆川东化工有限公司); $\text{NaOH}$ (天津市福晨化学试剂厂); $\text{H}_2\text{O}_2$ (国际集团化学试剂有限公司); $\text{H}_2\text{SO}_4$ (成都金山化学试剂有限公司);无水乙醇(广州化学试剂厂);实验所用均为去离子水,药品均为分析纯。

### 1.2 实验仪器

压电检测器[压电谐振电路(自制);压电石英晶体(AT-切,10 MHz,镀金,晶片直径8 mm,电极直径6 mm);数据采集卡(自制);计算机];超声波清洗器(熊猫集团南京电子计量有限公司);微量移液器(上海求精生化试剂仪器有限公司);pHS-3C型精密酸度计(上海大普仪器有限公司);氮气干燥室(自制)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 石英金电极的前处理

石英金电极在Piranha溶液(98%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ :30%  $\text{H}_2\text{O}_2 = 3:1, v:v$ )中浸泡清洗3 min,丙酮浸泡清洗3 min,去离子水清洗3 min,重复3次。将处理后的石英金电极在氮气干燥室下干燥备用。

#### 1.3.2 羧基化的多壁碳纳米管的制备

参考文献 [14] 制备羧基化碳纳米管, 干燥后备用。使用前用 5.0 mmol/L EDC 和 8.0 mmol/L NHS 活化 1 h。

### 1.3.3 传感器体系的建立

将预处理后的石英金电极于 1 mmol/L 半胱胺溶液中浸泡 16 h, 使晶体表面自组装形成一层半胱胺膜, 取出用磷酸缓冲液 (pH = 7.4) 洗净, 然后滴加 20  $\mu$ L 用 EDC 和 NHS 活化后的羧基化碳纳米管于金电极表面上, 放置 30 min, 使羧基化碳纳米管与半胱胺膜充分作用, 然后用磷酸缓冲液 (pH = 7.4) 洗去未固定的羧基化碳纳米管, 随后在电极上滴加 20  $\mu$ L 3 mg/mL 乙肝表面抗体, 置于有饱和水蒸气的环境反应 70 min, 使抗体固定于电极上 (图 1)。

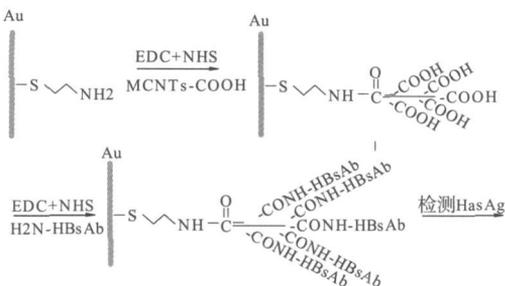


图 1 检测系统单元示意图

### 1.3.4 检测方法

在金电极上表面滴加 15  $\mu$ L 7.5  $\mu$ g/mL 乙肝表面抗原, 采用压电测定频率变化值, 直至频率变化值趋于稳定 (频率变化值  $\Delta F < 1$  Hz/min), 记录下频率变化值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 羧基化碳纳米管浓度的选择

实验考察了不同浓度的羧基化碳纳米管对传感器性能的影响, 结果如图 2 所示。当羧基化碳纳米管的浓度在 2 mg/mL - 5 mg/mL 时, 频率变化值随着浓度的增加而逐渐增大; 当浓度大于 5 mg/mL 时, 频率变化值随着浓度的增加反而逐渐减小, 可见, 羧基化碳纳米管的浓度为 5 mg/mL 时, 乙肝表面抗原检测频率变化达到峰值。说明碳纳米管浓度过大时形成位阻, 一定程度上阻碍了抗体与抗原的反应, 不利于免疫反应的进行。

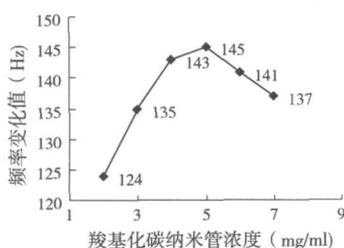


图 2 羧基化碳纳米管浓度的选择

### 2.2 抗体浓度的选择

实验考察抗体探针浓度对自身固定量的影响, 检测结果可知 (图 3), 当 HBsAb 探针浓度为 3 mg/mL 时, 频率变化最大为 145 Hz, 故实验中选用抗体探针浓度为 3 mg/mL。

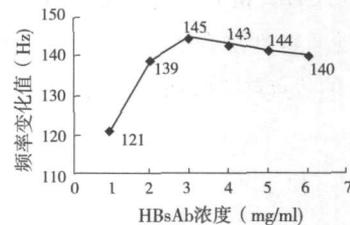


图 3 HBsAb 浓度的选择

### 2.3 溶液 pH 值的选择

在不同的 pH 值条件下固定的抗体在相同浓度下发生免疫反应, 在传感器上得到不同的响应值, 如图 4 所示。结果表明, 在 pH 值 7.4 条件下的抗体, 能获得最大的活性, 其反应结合抗原频率变化值最大, 即反应活性最高。

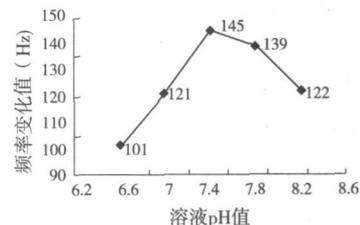


图 4 H 溶液 pH 值的选择

### 2.4 传感器的再生

每次实验结束之后, 可将石英金电极依次在 1.2 mol/L NaOH、1.2 mol/L HCl、丙酮和去离子水中浸泡清洗 3 min, 重复 3 次, 可得到更新的晶体。

### 2.5 固定时间的选择

活化后的羧基化碳纳米管与石英金电极发生交联, 在 17 min - 35 min 时, 频率变化值趋于稳定, 超过 35 min 后频率波动较大, 表明羧基化碳纳米管在 17 min 已在金电极表面吸附饱和, 超过 35 min 时, 因自身结构的关系反而造成不稳定吸附。抗体在电极上的固定化在 70 min 时频率变化值达到峰值, 并达到稳定。免疫反应频率变化的峰值出现在 58 min, 并达到稳定, 即单个样品检测时间约为 1 h。

### 2.6 传感器的稳定稳定时间

将制备好的传感器放入 4°C 的冰箱保存, 1 周内探针活性保持大于 95%, 2 周内大于 85%。传感器在 1 月内能正常使用。

## 2.7 碳纳米管在传感器中的作用

在上述优化的实验条件下,测定一系列不同浓度(c)的抗原,得到频率变化值 $\Delta F$ ,绘制 $\Delta F-c$ 校正曲线(图5)。结果表明,抗原溶液在 $0.05 \mu\text{g/mL}$ – $15 \mu\text{g/mL}$ 与传感器的响应频率变化值成线性关系,回归方程为 $y = 17.268x + 8.6976$  相关系数为 $0.9954$ 。在低浓度下,抗体和抗原受非特性结合的影响,会偏离直线;在高浓度下,可结合的位点趋于饱和也会偏离直线。

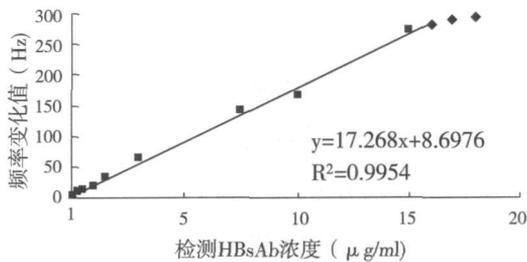


图5 H免疫反应响应频率值与抗原浓度的校准曲线

在同等实验条件下,比较进行羧基化碳纳米管修饰与不进行羧基化碳纳米管修饰的2种传感器的灵敏度,图6为用2种传感器检测浓度为 $7.5 \mu\text{g/mL}$ 的样品的实时响应图。由图6可以看出,未修饰羧基化碳纳米管的传感器的响应峰值为 $113 \text{ Hz}$ 而修饰羧基化碳纳米管的传感器的响应峰值为 $145 \text{ Hz}$ 。这是因为碳纳米管有大的比表面积和生物亲和性,固定的抗体量大且抗体活性高,使得与抗体反应的抗原的量,从而显著提高了检测灵敏度。

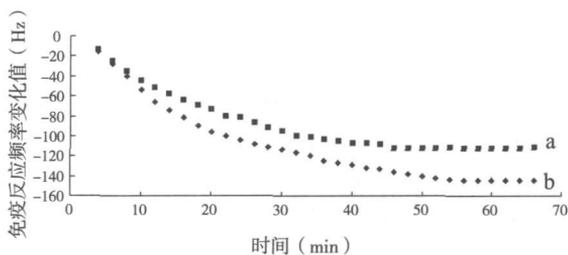


图6 加入碳纳米管(b)与未加入碳纳米管(a)实时检测HbsAg的频率变化值比较

## 3 结论

半胱胺自组装到石英金电极的表面用于固定羧基化碳纳米管,从而构建了半胱胺-羧基化碳纳米管生物压电传感器,用于乙肝表面抗原的检测,具有重要的实际意义。经过优化的生物压电传感器检测乙肝表面抗原是切实可行的,与未加碳纳米管的传感器比较,半胱胺-羧基化碳纳米管压电传感器检测范围更广、灵敏度更高,能够实现实时检测,具有临床应用价值。

## 参考文献:

- [1] 岳化葵. 酶联免疫吸附法与定量聚合酶链反应对乙肝两对半测定的比较分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2008, 7(11): 73
- [2] 沈嘉玲. 时间分辨荧光免疫技术在检测乙型肝炎标志物中的应用[J]. 检测诊断, 2010, 12(1): 72-73
- [3] 王锐, 戴小锋, 白燕, 等. 基于巯基自组装膜的乙肝电化学免疫传感器[J]. 暨南大学学报: 自然科学版, 2009, 30(5): 543-547.
- [4] 鲁军. 荧光定量PCR检测乙肝病毒DNA的临床意义[J]. 医学检验, 2005, 5(33): 78
- [5] 石龙, 赵丽英, 刘海燕. 客观评价乙肝病毒基因检测在临床诊断中的意义[J]. 中华现代临床医学杂志, 2005, 3(4): 347.
- [6] 缪璐, 刘仲明, 张水华. 用于乙肝表面抗原及其抗体同步检测压电免疫传感器阵列的研制[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(11): 1283-1284, 1314
- [7] Baughman Ray H, Zakhidov Anvar A, deHeer Walt A. Carbon nanotubes: the route toward applications[J]. Science, 2002, 297(5582): 787-792
- [8] Ma Haiyan, Zhang Liping, Pan Yan, et al. A Novel Electrochemical DNA Biosensor Fabricated with Layer-by-Layer Covalent Attachment of Multiwalled Carbon Nanotubes and Gold Nanoparticles[J]. Electroanalysis, 2008, 20(11): 1220-1226
- [9] Zhang Weijiang, Yang Taohuang, Daning, et al. Electrochemical sensing of DNA immobilization and hybridization based on carbon nanotubes/nano zinc oxide/chitosan composite film[J]. Chinese Chemical Letters, 2008, 19(5): 589-591.
- [10] Shobha DR, Jeykumar, Srinan, Arayanan S. Fabrication of bi-enzyme nanobiocomposite electrode using functionalized carbon nanotubes for biosensing applications[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2008, 23(11): 1686-1693
- [11] Liu Ying, Lei Jianping, Ju Huaxian. Amperometric sensor for hydrogen peroxide based on electric wire composed of horseradish peroxidase and toluidine blue-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite[J]. Talanta, 2008, 74(4): 965-970
- [12] Cui Rongjing, Huang Haiping, Yin Zhengzhi, et al. Horseradish peroxidase functionalized gold nanoparticle label for amplified immunoanalysis based on gold nanoparticles/carbon nanotubes hybrids modified biosensor[J]. Bio

sensors and Biotechnology 2008, 23(11): 1666-1673

2377-2381.

- [13] Okuno Jun, Maehashi Kenzo, Kaman Kagan, et al Label free immunosensor for prostate-specific antigen based on single-walled carbon nanotube array-modified microelectrodes [J]. Biosensors and Biotechnology, 2007, 22 (9-10):

- [14] 邱军, 王国建, 屈泽华, 等. 氧化处理方法与多壁碳纳米管表面羧基含量的关系 [J]. 新型炭材料, 2006, 21(3): 269-272

## Study on a New HBV Piezoelectric Immunosensor

QIAO Kang-quan, WU Yong-qiang

(School of Material and Chemical Engineering, Sichuan University of Sciences & Engineering, Zigong 643000, China)

**Abstract** Cysteine was immobilized on the gold electrode's surface of 10 MHz quartz AT-cut crystal by self-assembled. The anti-HBsAg antibody and cysteine film were linked with the carbonylic carbon nanotubes and concentration agent (EDC and NHS). A new piezoelectric immunosensor for HBsAg was constructed. The results showed that the sensitivity was  $17.268 \text{ Hz}/(\mu\text{g/ml})$  and the linear range was  $0.05 \mu\text{g/ml}$  to  $15 \mu\text{g/ml}$ .

**Key words** piezoelectric immunosensor; carbon nanotubes; HBsAg

(上接第 571 页)

## Study on Fluorescence Spectra of Four Quinolones

WANG Ying

(School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

**Abstract** Quinolones are widely used in cure infectious diseases. The fluorescence spectra of the four quinolones have been studied in this paper. Geometric configurations of the four quinolones have been optimized by DFT methods B3LYP/6-31g of quantum chemistry. There is no imaginary frequency in vibrational analysis. Their fluorescence spectra have also been calculated by CIS/6-31g. The results of calculation are essentially consistent with experimental values.

**Key words** Quinolones; quantum chemistry; fluorescence spectra