

磁珠载体-电化学免疫分析研究进展

康怀彬, 马红燕, 李芳, 陈俊亮, 张瑞华, 邹良亮

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南洛阳 471003)

摘要: 磁珠不仅拥有巨大的比表面积和高效的分散能力, 而且在其表面可以形成牢固的免疫复合物; 同时利用磁珠的超顺磁性可以快速的将其分离, 样品前处理简单, 不需要预浓缩、净化等复杂工序就可以实现对目标物的快速检测。此外, 电化学分析技术具有超高的灵敏度, 因此将磁珠与电化学免疫分析技术相结合, 利用两者的优点则给人们提供了一种新的检测思路。目前, 该领域研究活跃, 并取得了重要研究进展, 开发出了灵敏度高、检测速度快、简便易用的微型电化学免疫检测系统, 可以用于食品检测、环境评估和临床诊断等领域。本文介绍了以磁珠为固相载体的电化学免疫分析技术的最新研究进展, 特别是从磁电极免疫分析、基于旋转圆盘电极的免疫分析、酶标记免疫磁珠分析和纳米粒子标记免疫磁珠分析四个方面进行具体论述, 并对该领域的发展前景做了展望。

关键词: 磁珠; 电化学免疫分析; 酶标记; 纳米粒子标记

文章编号: 1673-9078(2016)9-314-323

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.9.045

Research Progress on Magnetic Microbead-based Electrochemical Immunoassays

KANG Huai-bin, MA Hong-yan, LI Fang, CHEN Jun-liang, ZHANG Rui-hua, ZOU Liang-liang

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: Magnetic microbeads, which possess a huge specific surface area and high dispersion capability, can capture biomolecules and form stable immune complexes that can be rapidly separated as a result of the superparamagnetism of the magnetic microbeads. The sample pretreatment is simple, and the target compounds can be rapidly detected without complex pretreatment steps such as pre-concentration or purification. Moreover, because the electrochemical analysis technique is ultrasensitive, its coupling with magnetic microbeads provides a novel detection system. In recent years, active research programs have been undertaken in this field and important progress has been achieved. Miniaturized electrochemical immunoassay systems with high sensitivity, rapid detection, and simple operation have been developed and can be used in food analysis, environmental evaluation, clinical diagnostics, etc. In this review, the most recent research progresses in electrochemical immunoassay technology using magnetic microbeads as a solid phase are summarized, especially in terms of immunoassays using magnetic electrodes, immunoassays in a droplet using a rotating disk electrode, and magnetic-microbead-based immunoassays using enzyme labels and nanoparticle tags. Additionally, the future work in this field is discussed.

Key words: magnetic microbead; electrochemical immunoassay; enzyme label; nanoparticle tag

免疫分析是基于抗体和抗原间的特异性结合而建立起来的, 在临床诊断、环境分析和食品检测领域已成为一种非常重要的分析方法。通常来讲, 抗体和抗原反应的亲和常数可高达 10^{11} L/M, 因此免疫检测具有非常高的选择性和灵敏度。由于具有高特异性和非常低的检测限, 免疫检测在很多领域已是一种被广泛认可的分析方法。自20世纪60年代以来, 利用放射性同位素技术的免疫分析方法已被大量采用^[1]。然而,

收稿日期: 2015-10-31

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31501563); 洛阳市畜牧局项目(2518)

作者简介: 康怀彬(1963-), 男, 教授, 研究方向: 食品安全检测及质量控制

放射性同位素在处理 and 处置过程中还存在很多问题, 因此利用非同位素技术的免疫检测在最近几年获得了快速发展, 并广泛应用于日常分析和检测。

电化学免疫分析也是一种非同位素技术, 是该领域的最新发展。电化学免疫分析将电化学检测与免疫技术相结合, 以抗原或抗体作为分子识别单元, 利用酶或纳米粒子等的信号放大作用, 把化学物质的浓度信号转变成相应的电信号, 并通过伏安检测器实现对目标物的定量分析。电化学检测赋予了免疫分析许多优点, 例如它相对简单、快速以及检测费用低, 并且能够适用于不透光介质。此外, 电化学免疫检测系统很容易实现小型化, 并且所需功率低, 检测所需样品量小^[2]。磁珠作为良好的固相载体, 拥有巨大的比表

面积、生物相容性高,特别适合于生物分子的固定,并且在外加磁场的作用下可迅速实现分离。因此,在电化学免疫分析中引入磁珠作为免疫反应与分离的固相载体,是目前最新的研究策略之一。本文综述了以磁珠为固相载体的电化学免疫分析最新研究进展,重点介绍了以磁珠为载体,利用酶标记和纳米粒子标记为技术手段的高灵敏电化学检测技术,并对该技术领域的发展前景作了展望。

1 超顺磁磁珠

磁珠不仅拥有巨大的表面积,而且具有良好的物理、化学稳定性,并且毒性低、生物相容性高,因此特别适合应用于生物分子,如DNA、酶及抗体的固定。

表1 常见商业磁珠及它们的物理参数

Table 1 Examples of commercially available magnetic microbeads and their physical parameters

产品名称	直径/ μm	密度/ (g/cm^3)	磁化强度/ $(\text{emu}/\text{cm}^3 \text{于} 1\text{kOe})$	材料构成
Albmin-M	2	1.2	10.3	磁核: 30% Fe_3O_4 , 壳层: 白蛋白
MPG [®]	5	2.5	4	磁核: 15%氧化铁, 壳层: 硼硅玻璃
nanomag [®] -D	0.13, 0.25	4	172	磁核: 75~80% Fe_3O_4 , 壳层: 葡聚糖
PLA-M	2	1.3	13.7	磁核: 30% Fe_3O_4 , 壳层: 聚乳酸
Micromer [®] -M	12	1.2	3	磁核: 3% Fe_3O_4 , 壳层: 聚苯乙烯
BioMag [®] Plus	1.0, 1.6		150~200	Fe_3O_4 颗粒
Dynabeads M-280	2.8 \pm 0.2	1.3	12	磁核: 12% $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, 壳层: 聚苯乙烯

为了防止磁聚合,通常需要在这些磁珠的表面涂上特定的壳层,如聚苯乙烯、二氧化硅、葡聚糖及白蛋白均可作为良好的壳层材料。大部分商业磁珠的粒径大于 $1 \mu\text{m}$,这样有利于克服溶剂的粘滞阻力,便于磁珠快速的从分散体系中回收。商业磁珠种类多样,其表面通常用不同的官能团进行修饰,从而实现对不同的目标分子进行固定。其中,常用磁珠其表面一般采用链霉亲和素进行修饰,对生物素标记的分子具有良好的亲和性,其离解常数大约在 10^{-14}M 。该类磁珠还能够适应较宽的 pH 及温度范围,在较广泛的有机试剂或变性试剂条件下都可以保持抗生物素蛋白-生物素复合物的稳定性。此外,在对其它配体进行广泛化学修饰时,抗生物素蛋白与生物素的结合活性几乎不受影响。

由于磁珠具有众多优点,目前在生物电化学分析领域已被广泛应用,如用于酶-生物传感器^[3-5]和 DNA 杂交传感器^[6-14]的构建。将磁珠与电化学检测技术相结合具有突出的优点,不仅可以降低分析过程中的基质干扰,而且能够分析纯化效果较差的浑浊样品,甚至在检测纳克级的目标物时也能保证灵敏度不降低。在电化学传感器方面,将葡萄糖氧化酶和酪氨酸酶与磁珠固定在一起,可分别实现对葡萄糖^[4]和多酚类化

此外,磁珠还具有优越的分散性能,轻轻震荡就可以均匀分散于溶液中,有利于生物分子与磁珠表面进行接触并固定,反应时间短。在外加磁场的作用下,磁珠可以迅速从大量样品中分离并聚积,有助于简便、快速、高灵敏分析系统的开发和构建。此外,利用磁珠作为可移动固相载体,还可以实现检测系统的小型化,这样不仅可以减少实验中的试剂使用量及废弃物的产生,而且可以在较短的分析时间内获得更低的检测限。

目前市场上销售的磁珠种类多样,它们在粒径、密度、磁化率和材料组成上具有较大差异,其中常见磁珠如表 1 所示。

合物^[3]的检测。此外, Katz 和 Willner^[5]研究了功能磁性微粒在电极表面的轮转对生物电化学催化的加强作用,结果表明:在可溶性葡萄糖氧化酶存在的情况下,通过功能化二茂铁磁性粒子在电极表面的转换,可以显著加强葡萄糖生物电化学氧化作用。在 DNA 分析方面,Joseph Wang 研究团队报道了利用磁珠结合电化学的检测技术,通过检测鸟嘌呤氧化^[6]、胶体金标记^[7]及酶标记^[8,9]来检测 DNA 杂交。Fojta 等人^[11]则利用四氧化钨聚合物作为氧化还原活性标记,实现了多条目标 DNA 序列的同步分析。

另外,磁珠在生物化学分析领域的其它方面也得到了广泛关注和应用^[15-29]。从最近报道的文献来看,基于磁珠的酶联免疫分析结合荧光检测已经应用于检测 *B. globigii* 孢子和人工模拟 *B. globigii* 孢子,该模拟孢子通过聚苯乙烯微粒模拟 *B. globigii* 孢子表面抗原^[15,16]。Kim 等人^[17]报道利用磁珠免疫分析结合激光诱导荧光光谱测定法检测非正常肌蛋白,该方法对于荧光标记抗体的检测也非常有用。另外, Kwon 等人^[23]还研发了基于磁珠的免疫荧光自动检测系统。在该检测系统中有二种抗体同时连接于同一抗原,其中一个抗体用生物素标记,另一个抗体通过可逆键与一荧光电子标签连接。将经抗体修饰的磁珠和光敏卟啉配合

物混合均匀，并与检测样品一起孵化。在有抗原存在的情况下，分子配合物便会形成，其可逆化学键与光敏基团非常接近。该研究开发的方法可以对同一样品中的肉毒杆菌毒素和卵清蛋白进行同步高灵敏检测。元文宝等人^[24]建立了针对 H9 亚型禽流感的型特异性电化学发光免疫的高通量快速检测方法，用钌联吡啶标记 H9 亚型 AIV (avian influenza virus, AIV) 的单克隆抗体，用生物素标记 H9 亚型 AIV 的多克隆抗体，待测抗原与钌标单抗作用 1 h 后，将此抗原-抗体复合物与通过生物素-链霉亲和素系统固定在磁微粒表面的多克隆抗体反应，最后加入反应底物三丙胺后即可在电化学分析系统进行发光检测。该方法能够特异性地检测 H9 亚型 AIV，不与其他亚型流感病毒 (H1、H3、H4、H5 和 H6 亚型) 和其他类型的禽源病毒 (新城疫病毒、传染性支气管炎病毒和传染性法氏囊病病毒) 反应，3 h 内即可完成检测，与鸡胚病毒分离法的符合率为 86.4%。LEE 等人^[26]利用滚环扩增 (rolling circle amplification, RCA) 和磁珠增强化学反应信号，开发了一种稳定性好、灵敏度高的荧光光衍射生物传感器。在该检测体系中，基于核酸适配体的夹心分析法可以特异性捕获和检测血小板生长因子的 B-链。Wang 等人^[28]开发了一种基于磁性纳米颗粒的多通道光谱比色免疫测定法，可用于肿瘤标志物的检测，其检测限为 0.02 ng/mL，该方法特异性高，简单、容易操作。

2 免疫磁珠-电化学分析技术

2.1 酶标记免疫磁珠分析法

酶是一类应用最为广泛的生物标记物质，它们于 1971 年第一次取代放射性同位素用于免疫分析^[30]。目前，有研究者利用酶标产物在电极上的氧化或还原反应，或根据进一步的酶放大反应而产生电活性产物，将电化学检测技术与酶联免疫分析方法相结合，来提高方法的检测灵敏度和检测限。其中，应用最为广泛的就是伏安分析法，该法通过在工作电极和参比电极间施加一定的电势能，然后通过测量电极上电流的变化，获取相应化学反应的变化信息，从而计算出被测目标物的浓度变化。

目前，经抗体修饰的磁性粒子已广泛用于电化学免疫磁珠检测技术中。不管是双抗体夹心酶联免疫测定还是竞争酶联免疫吸附测定均可利用分散于溶液体系的磁珠-抗体复合物来完成。在伏安检测步骤，通过外加磁场将磁珠聚积于电极表面，或者将其重新分散于微量体积的溶液，并通过检测器获得电极上的电流

变化，完成对目标物的定量分析。Kuramitz 等人^[2]利用链霉亲和素修饰的磁珠偶联生物素化抗体及捕获抗原，然后再在抗原上结合 β -半乳糖苷酶标二抗构成夹心免疫分析系统。电化学分析时， β -半乳糖苷酶将对氨基苯半乳糖苷转变成对氨基酚，同时利用旋转圆盘电极监测对氨基酚的电流响应，实现对卵清蛋白的检测。

2.2 磁电极免疫分析法

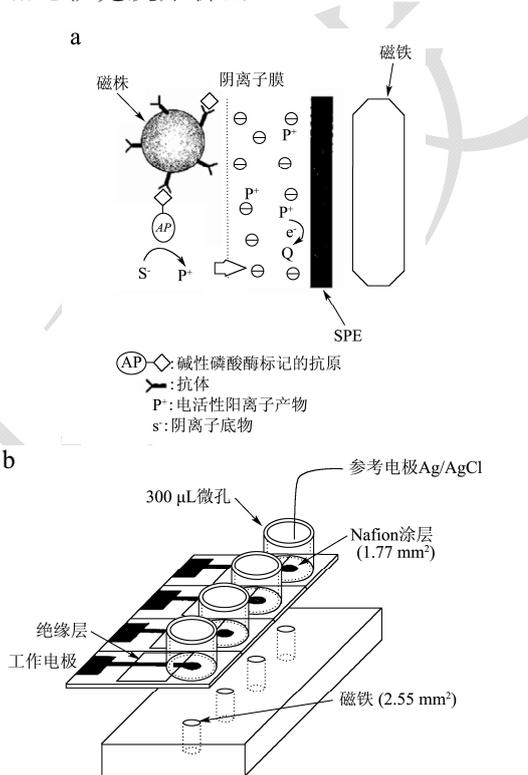


图 1 磁珠-电化学免疫分析关键步骤示意图 (a) 和电化学检测中微孔反应池与对应磁铁排列设计示意图 (b)

Fig.1 (a) Schematic representation of the key step of the magnetic electrochemical immunoassay, (b) Schematic design of the multi-electrochemical microwells aligned over the magnet holding block

注：详见参考文献^[31]。

随着研究的深入，有研究者以磁性粒子为载体，通过磁性电极建立了操作更加简便的高灵敏度磁性酶联免疫检测法^[31-37]。目前，常用的磁电极主要有丝网印刷电极 (Screen-printed electrodes, SPE)^[31-33,37,38]和碳电极^[34-36]，它们通过在电极表面的一侧匹配上一块磁铁而构成。此外，还可通过在电极局部表面固定具有免疫活性的磁珠，来构建免疫传感器探头。为了避免固相表面抗体的固定及活性界面基质 (如电极表面) 的重新构建等繁琐步骤，可以利用商品化免疫磁珠和一次性或可重复使用的电极来构建磁性电极免疫

分析系统。在外加磁场作用下,免疫复合物发生积聚并快速增加电极表面酶-示踪物的浓度,因此通过酶促反应的放大作用可以获得高灵敏电化学反应信号。

Dequaire 等人^[31]报道了一款一次性免疫磁性电化学传感器,该传感器主要是由磁性粒子固相材料和 Nafion-膜丝网印刷磁电极而构成。2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)是一种广泛使用的除草剂,其竞争性酶联免疫分析可通过碱性磷酸酶标记的 2,4-D 与有限量的抗-2,4-D 抗体修饰磁珠的竞争结合而进行(图 1a)。该检测体系中,免疫反应是在 300 μ L 聚苯乙烯圆柱状微孔中进行,同时在微孔的下方则对应着相应的磁铁,其具体构造如图 1b 所示,其中 Nafion-膜丝网印刷磁电极置于微孔的底部。因此,免疫传感探头可利用外加磁场在 Nafion-膜丝网印刷电极表面轻易构建。碱性磷酸酶阴离子底物-[(4-羟基苯基)氨基]羧基二茂钴六氟磷酸盐通过酶促反应转变成阳离子酚衍生物(P^+),并聚积于丝网印刷电极多聚阳离子 Nafion-膜上,紧邻电极表面,导致响应信号大大增加。2,4-D 的方法检测限为 0.01 μ g/L。Centi 等人^[32]也报道了利用磁性丝网印刷电极通过竞争酶联免疫吸附测定多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCB)的方法。PCB (Aroclor 1248)混合标样的方法检测限为 0.4 ng/mL。此外,该研究团队还利用功能适配体磁珠和碱性磷酸酶标记的适配体开发了一种双抗体夹心酶联免疫分析法^[33],其中磁性微粒的应用是方法的关键步骤。该方法已成功用于复杂基质如血清和血浆中凝血酶的分析,并且灵敏度高、特异性强,开启了磁电极-双抗体夹心酶联免疫分析在医疗诊断及医学研究领域的大门。在杀虫剂生物标记物-三氯吡啶酚(Trichloropyridinol, TCP)检测方面,有研究者利用辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)标记的抗原,建立了基于磁珠的竞争免疫分析方法,可用于检测环境水样中的 TCP^[34]。在该检测体系中,电化学检测信号的增强是通过两个途径实现的:其一是酶-磁珠复合物在外加磁场作用下的趋磁性聚积,二是酶促反应产物持续不断的在磁玻碳电极表面的积聚。在最优工作条件下,该免疫传感器可以检测浓度低至 5 ng/L 的 TCP,比 TCP 商品化快速检测试剂盒的检测限低 50 倍。同理,Zacco 等人^[35,36]利用 HRP 标记抗原也构建了竞争免疫磁珠分析法。免疫反应后,酶-磁珠复合物在磁性石墨-环氧复合材料上聚积,从而形成电化学免疫传感的换能器,并通过相应 HRP 和电化学生物中介物(对苯二酚)的底物实现对电化学信号检测。抗阿特拉津(atrazine)特异性抗体可与 3 种不同类型的磁珠进行偶联,并通过甲苯磺酰基团(MB-tosyl)、

羧基和 protein A (MB-protein A)进行活化。结果表明:抗体与 3 种不同磁珠偶联时都可获得出色的检测限。然而,当使用甲苯磺酰基团和 protein A 进行活化时,所获得的电化学信号更高、更强,这可能是由于在此条件下抗体的耦合效率更高。该法已成功用于橙汁中农药残留及牛奶中抗生素残留的检测,并具有较高的灵敏度。当抗体使用甲苯磺酰基团进行修饰时,阿特拉津(atrazine)的方法检测限为 6 ng/L (0.027 nM)。此外,Sarkar 等人^[37]还尝试使用电化学免疫磁珠分析法检测人类血液中前列腺癌的特征标志物-前列腺特异性抗原。最近 Zhu^[39]等人研究制备了癌胚抗原抗体修饰的磁性纳米颗粒以及 HRP 标记的 MUC-1 适配体,并且借助抗体与适配体对乳腺癌细胞的双重识别,提高了检测特异性,而 HRP 所提供的酶催化放大信号也保证了很好的检测灵敏性。此外,在磁场控制下,负载着识别元件和靶标物质的磁性纳米颗粒靠近电极则完成检测,而将磁场反转方向后,磁性纳米颗粒离开电极则完成电极的再生利用。运用该检测体系,可实现大范围癌细胞的检测(100~1 \times 10⁶个细胞/毫升),整个检测循环仅需要 2 分钟,有效降低了成本,并为批量检测提供了条件。

2.3 基于旋转圆盘电极的免疫分析

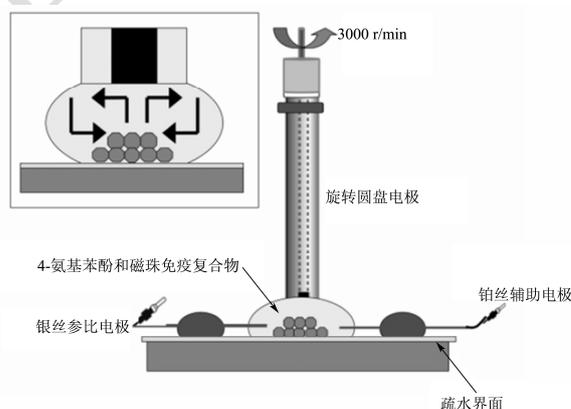


图 2 旋转圆盘电极检测装置

Fig.2 Setup for rotating disk electrode (RDE) detection in a microdrop

注:插图显示了旋转圆盘电极表面的流体流动方向。详见参考文献^[41]。

早在 1942 年,Levich 根据流体动力学原理首次提出 RDE 理论,引起了化学界的广泛关注^[40]。旋转圆盘电极(Rotating disk electrode, RDE)是将电极理论与流体动力学相结合的产物,因此也可将其称为流体动力学电极。流经电极的流体主要来自两个方面:一是受离心力的作用,从水平方向流经电极表面溶液;同时,新的溶液从垂直方向流向电极表面,如图

2 所示。根据电极旋转速率, 利用极限扩散电流的变化可以确定电极反应机制及速率常数。对于含有分散粒子的溶液体系, 同样可以使用 RDE 来对目标物进行分析检测, 因为该体系中流经电极的极限电流与反应物的浓度也成正比关系。然而, 常规 RDE 腔体需要相对较大的样品体积, 一般在 10~125 mL, 因此它不能够应用于电化学微量分析。

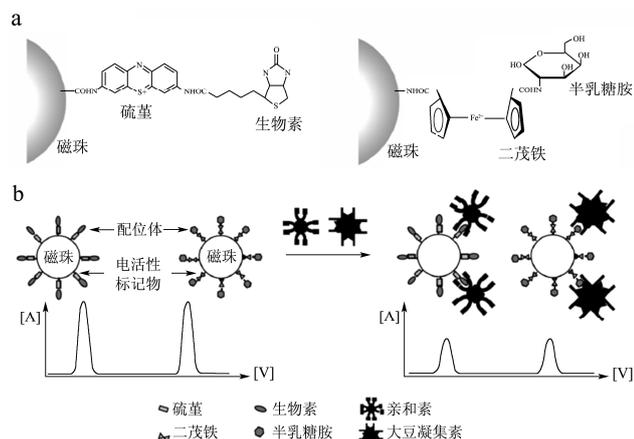


图3 生物素/硫堇修饰磁珠和半乳糖胺/二茂铁修饰磁珠化学结构示意图(a)和基于蛋白质偶联电活性磁珠的抗生物素蛋白和大豆凝集素同步检测原理示意图(b)^[27]

Fig.3 (a) Chemical structures of biotin/thionine-modified magnetic microbeads (ABEMMb) and galactosamine/ferrocene-modified magnetic microbeads (SBEMMb), (b) Schematic diagram of the principle for avidin and soybean agglutinin synchronous detection using the protein-binding electroactive magnetic microbeads^[27]

目前, Heineman研究团队已经将RDE用于磁微粒酶联免疫电化学检测^[41-47]。RDE在酶联免疫检测中具有双重作用, 首先它可以对样品溶液进行高效搅拌混匀, 减少酶和底物的孵育时间, 降低酶促底物的非酶水解; 同时其自身还可以作为电化学检测装置。由于电极自身的快速旋转, RDE可以促进反应物向电极表面的对流传质过程。Wijayawardhana等人^[42]通过研究将RDE常规大体积反应槽转变为微量型反应池。由于存在高的表面张力, 在电化学检测时微滴处于疏水界面和RDE之间, 同时将参考电极和辅助电极置于微滴中间即可构成化学电池组(图2)。据此, RDE检测池的体积可以进一步缩小到40 μL。随着检测池容积的减小, 溶质的扩散距离也随之减小, 因此酶和底物的孵育时间可以缩短至约20 s(常规需要30~60 min), 检测速度得到显著提高。此外, 微量RDE检测模式还有一个显著优点-可以大大提高酶促反应产物的浓度, 方法检测限更低, 灵敏度显著提高。目前, 双抗体夹心酶联免疫磁珠 RDE 分析方法已经在免疫球蛋白

G(Immunoglobulin G, IgG)^[42,43], 卵清蛋白^[44], 噬菌体MS2及大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[45]活体检测方面得到了研究及应用。Kuramitz研究团队^[27]利用基于磁珠的蛋白质特异性结合, 并联合RDE分析, 实现了抗生物素蛋白和大豆凝集素的同步检测, 其工作原理如图3所示。

蛋白质偶联的电活性磁珠以夹心方式进行连接, 即电活性物质分别与磁珠和配位体相连接, 其中配位体用于在后续检测中对目标蛋白进行特异性结合。用于抗生物素蛋白偶联和大豆凝集素偶联的电活性磁珠分别是由硫堇/生物素和二茂铁/半乳糖胺在超顺磁珠表面通过化学修饰而构成, 如图3a所示。电化学分析时, 功能磁珠的伏安反应通过磁嵌入碳糊旋转圆盘电极进行监控。由于ABEMMb和SBEMMb与各自目标蛋白质的特异性结合, 导致电活性磁珠数量减少, 因此通过电极监测到的电流强度也随之降低, 据此便可实现对抗生物素蛋白和大豆凝集素的同步检测, 其工作原理如图3b所示。抗生物素蛋白和大豆凝集素的检测限分别为 4×10^{-10} 和 2×10^{-10} M。

2.4 纳米粒子标记-免疫磁珠分析技术

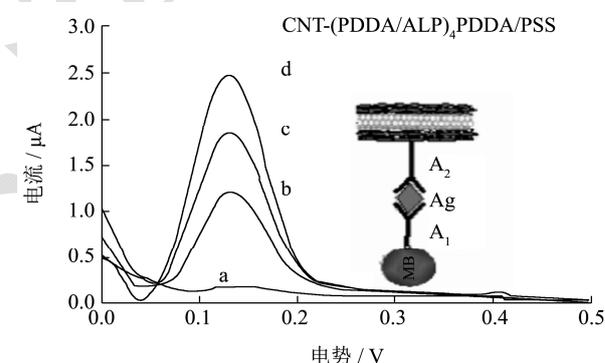


图4 不同 IgG 浓度时所得方波伏安图
Fig.4 Square-wave voltammograms with different concentrations of IgG

注: 其中 a~d 分别代表 IgG 浓度为 0、50、100 和 150 fg/mL, 检测中所用纳米粒子标记物为 CNT-(PDDA/ALP)₄。插图为磁珠-夹心免疫分析示意图, 其中 A₁、Ag 和 A₂ 分别为—抗、靶标物 (IgG) 和二抗。CNT: 碳纳米管, PDDA: 聚(二烯丙基二甲基氯化铵), ALP: 碱性磷酸酶, PSS: 聚(4-苯乙烯磺酸钠), 详见参考文献^[54]。

免疫分析技术的发展主要依赖于酶标记技术的进步。然而近些年, 研究者更加关注纳米粒子标记技术在电化学免疫分析中的应用, 如使用胶体金和半导体量子点来代替普通酶标记, 这大大促进了电化学免疫分析技术的进步^[48-50]。在新型生物测定方法开发中, 这些纳米粒子可以作为多功能标记物用于多种生物靶

标分子的检测。对基于纳米粒子的电化学检测方法而言,绝大部分通常都依赖于高灵敏电化学剥离伏安法对酸性溶液中的金属离子标记物的精确检测。Wang^[51]对纳米粒子-电化学分析法在检测蛋白质方面的最近工作进行了回顾和总结。最近,由Wang领导的研究团队对血浆中磷酸化乙酰胆碱酯酶的量子点标记-电化学免疫磁珠测定方法进行了研究和报道^[52]。该方法通过直接检测血浆中有机磷-乙酰胆碱酯酶复合物含量,可对有机磷化合物,如杀虫剂、化学神经毒剂等对生物体的暴露量进行有效监测。该免疫分析法的显著特点是将高效磁分离与方波伏安法进行有效结合,实现对镉量子点标记物的检测。在酸性溶液中,镉元素从量子点标记物上溶解出来,并通过电化学方波伏安法对其进行定量分析,结果显示在较宽的浓度范围内,即人血浆中有机磷-乙酰胆碱酯酶复合物在0.3~300 ng/mL时方法具有良好的线性关系,其检测限为0.15 ng/mL。

目前,大部分电化学免疫分析方法都是针对单一目标物的检测而开发的。然而在临床诊断、药品筛查及生物防御等研究领域却需要对多目标物进行同时分析,因此开发多靶标电化学免疫分析方法已成为该技术领域的研究热点,引起了研究者的极大关注。无机纳米晶体金属离子的电化学特性使其成为理想的多通道生物分子编码材料。由Wang领导的研究团队将不同的半导体标记物连接到不同的抗体上,研究开发了一种电化学-双抗体夹心酶联免疫分析方法,可以同时不同的目标蛋白进行检测^[53]。该方法采用4种纳米粒子(硫化镉、硫化锌、硫化铜和硫化铅)对双抗夹心免疫分析中偶联的4种蛋白质信号进行区分,随后用溶出伏安法对酸性溶液中释放出的相应金属离子进行测定,可以同时得到4个特征明显、容易辨别的伏安峰,其面积和位置分别代表相应目标抗原的含量水平和种类。

尽管碳纳米管(carbon nanotubes, CNT)对伏安法没有信号响应,它们却可以用作信号放大物的载体,与多种能够产生信号的分子进行连接耦合。Munge等人^[54]在CNT模版上通过静电吸引层层组装多层酶分子,并据此开发了一种高灵敏度电化学免疫分析方法,可以检测fg/mL浓度水平的蛋白质。在分析过程中,CNT在目标物识别和信号转换方面发挥了双重放大作用,即一方面可以作为大量酶标物的载体参与夹心酶联免疫反应,另外还可使酶促反应产物- α -萘酚积聚到电极表面。图4为用电化学-夹心酶联免疫法检测超痕量IgG所得的方波伏安图,当IgG的浓度在50、100及150 fg/mL时,所得伏安峰峰形均较好,呈典型

高斯分布。根据蛋白(IgG)浓度在50 fg/mL时的信号响应值(图4曲线b)可知:该方法的检测限非常低,大约为10 fg/mL(根据信噪比 ≥ 3),也就是50 μ L样品中含2000个IgG蛋白分子。

纳米粒子标记物及纳米粒子-生物分子多层复合物的构建及使用极大提高了电化学检测的信号强度,这也为超灵敏电化学检测方法的开发提供了技术基础。有研究者将这些先进的纳米材料与磁性粒子相结合,开发了新型电化学检测方法^[55-58]。如Selvaraju等人^[55]利用抗体修饰的磁珠和纳米金催化结合抗体开发了一种电化学-双抗夹心免疫分析法,可用于检测鼠IgG,其具体检测原理如图5所示。其中图5a为二茂铁基聚合物(Ferrocenyl-tethered dendrimer, Fc-D)修饰电极的制备示意图,Fc-D通过共价键与树状聚合胺和羧酸盐自组装单分子膜连接,并固定于氧化铟锡电极上。图5b展示了免疫传感复合物的构成,其中靶蛋白(鼠IgG)与抗体修饰磁珠和纳米金催化结合抗体以夹心方式结合。在外加磁场作用下,免疫传感复合物被吸引至Fc-D修饰氧化铟锡电极上。通过免疫复合物中纳米金的催化作用,对硝基苯酚被还原为对氨基苯酚。接着再经过二茂铁电子重排作用,对氨基苯酚被氧化为对醌亚胺,同时对醌亚胺又可被 NaBH_4 还原为对氨基苯酚,如图5c所示。这种氧化还原循环显著增强了阳极电流。因此,该方法的检测限非常低,利用微分脉冲伏安法最低可检出100 ag/mL的IgG。此外, Selvaraju等人^[12]还利用相同的检测原理设计并开发了DNA杂交传感检测器。Tang等人^[56]以硫堇掺杂的金磁纳米微球为标记物,并利用HRP作为增强子,设计了一种新的电化学信号放大方案,研究结果表明该方案可用于癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen, CEA)的检测。在该免疫检测系统构建中,首先是在碳素纤维微电极上有序连接上抗-CEA/protein A/纳米金(如图6a所示),然后再根据夹心式免疫分析原理,利用HRP标记的生物纳米微球,通过监测 H_2O_2 的还原反应便可实现对CEA的检测(如图6c所示)。该方法检测效率高,在最优条件下的线性范围为0.01~160 ng/mL CEA。Cunningham等人^[58]开发了一种纸基分析平台,通过对磁珠上偶联的银纳米粒子标签的电化学定量分析,可实现对皮摩尔浓度水平蓖麻毒素的快速检测,整个分析过程(包括夹心免疫复合物的形成)仅需9.5 min。吴小丽等人^[59]利用磁分离和生物素亲和素技术,形成亲和素化磁珠-生物素化抗体-抗原-钉标抗体的免疫夹心复合物,初步建立了体外免疫诊断试剂的制备方法,并利用喷射式流动注射电化学发光体系对制备出的禽流感病毒H9免疫

复合物进行检测。黄郑隽^[60]等人以磁珠为一抗固定载体, CdTe 量子点作为二抗标记物, 通过碳二亚胺交联法制备甲胎蛋白一抗固化的免疫磁珠和甲胎蛋白二抗固化的 CdTe 量子点, 通过夹心免疫分析模式和电化学溶出伏安法建立了新型高灵敏电化学免疫传感器, 操作便捷、检测结果稳定。

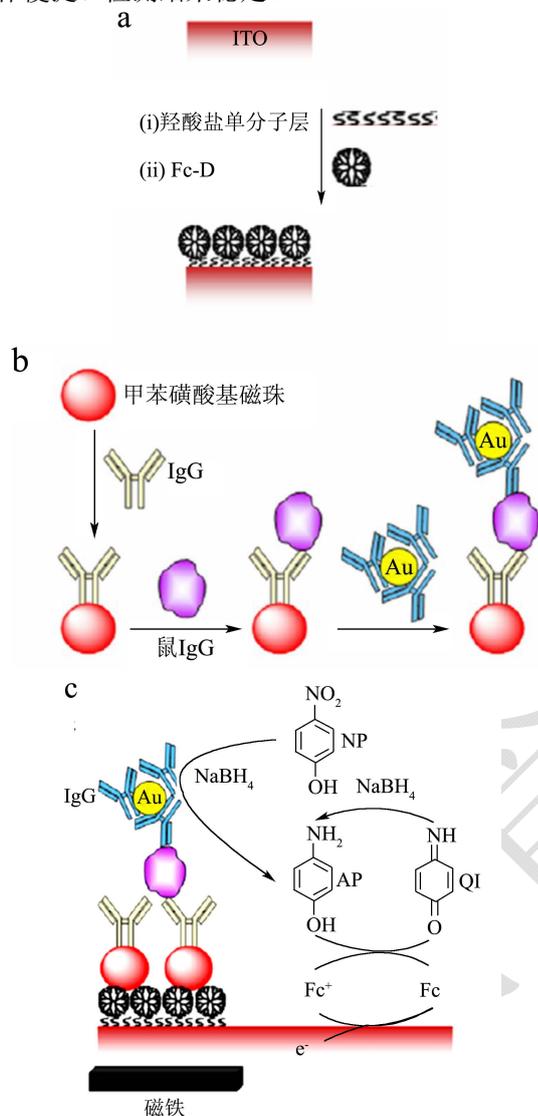


图5 二茂铁基聚合物 (Fc-D) 修饰电极的制备 (a)、免疫传感复合物的制备 (b) 和 Fc-D 修饰氧化铟锡电极对免疫传感复合物的吸附及鼠 IgG 电化学检测示意图 (c)

Fig.5 (a) Preparation of a ferrocenyl-tethered dendrimer (Fc-D)-modified electrode, (b) preparation of an immunosensing complex, and (c) the attraction of the immunosensing complex to a Fc-D-modified indium tin oxide (ITO) electrode, and the electrochemical detection of mouse IgG

注: NP 代表对硝基苯酚, AP 代表对氨基苯酚, QI 代表对醌亚胺), 详见参考文献^[55]。

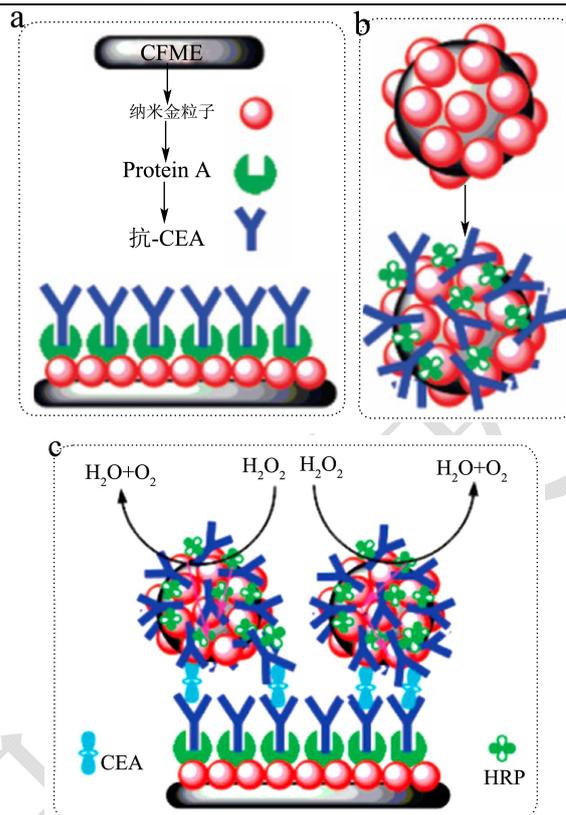


图6 (a) 免疫传感层的构建, (b) 纳米球 (上) 和生物大分子修饰纳米球 (下), (c) 夹心式电化学检测癌胚抗原示意图

Fig.6 (a) Preparation of an immunosensing layer, (b) a nanosphere (top) and a bionanosphere (bottom), and (c) schematic view of sandwich-type electrochemical detection of carcinoembryonic antigen (CEA)

注: HRP代表辣根过氧化物酶, CFME代表碳素纤维微电极), 详见参考文献^[56]。

3 结论及展望

本文介绍了电化学-免疫磁珠检测技术的研究进展, 目前的研究主要集中于利用磁珠的超顺磁性、结合免疫分析的高特异性和电化学检测的高灵敏度, 开发快速、简便的检测系统, 为对生物、食品和环境样品的现场、快速检测提供了可能。然而, 电化学-免疫磁珠检测技术仍处于发展阶段, 在实际应用中仍然存在一些不足, 例如仪器体积过大、实际样品中存在的基质干扰、小分子物质的检测精密密度不够等。因此, 未来的研究将主要集中在以下几个方面: (1) 加强检测样本前处理技术研究, 减少非特异性吸附, 提高检测的灵敏度和稳定性; (2) 在高通量研究方面, 完善多通道、多组分电化学-免疫磁珠检测技术, 提高检测效率; (3) 利用新的、灵敏度更高、操作更加简便的电化学检测技术配合新的功能磁性粒子以及适配子分析技术促进检测系统的进一步小型化和自动化,

降低仪器成本,这也是未来电化学-免疫检测技术的研究热点。随着科学技术的发展及科研工作者的不懈努力,电化学-免疫磁珠检测技术将会得到更快速的发展和更广泛的应用。

参考文献

- [1] Yalow R S, Berson S A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man [J]. The Journal of Clinical Investigation, 1960, 39: 1157-1175
- [2] Kuramitz H, Halsall H B, Heineman W R. Magnetic microbead-based enzyme immunoassay for ovalbumin using hydrodynamic voltammetry and fluorometric detection [J]. Analytical Methods, 2012, 4(6): 1783-1789
- [3] Wang S, Tan Y, Zhao D, et al. Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles-chitosan nanocomposite [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2008, 23(12): 1781-1787
- [4] Varlan A R, Suls J, Jacobs P, et al. A new technique of enzyme entrapment for planar biosensors [J]. Biosensors and Bioelectronics, 1995, 10(8): xv-xix
- [5] Katz E, Willner I. Enhancement of bioelectrocatalytic processes by the rotation of mediator-functionalized magnetic particles on electrode surfaces: comparison with a rotating disk Electrode [J]. Electroanalysis, 2005, 17(18): 1616-1626
- [6] Wang J, Kawde A N, Erdem A, et al. Magnetic bead-based label-free electrochemical detection of DNA hybridization [J]. The Analyst, 2001, 126(11): 2020-2024
- [7] Wang J, Xu D, Kawde A N, et al. Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization [J]. Analytical Chemistry, 2001, 73(22): 5576-5581
- [8] Wang J, Kawde A-N, Musameh M, et al. Dual enzyme electrochemical coding for detecting DNA hybridization [J]. The Analyst, 2002, 127(10): 1279-1282
- [9] Wang J, Xu D, Erdem A, et al. Genomagnetic electrochemical assays of DNA hybridization [J]. Talanta, 2002, 56(5): 931-938
- [10] Pumera M, Castaneda M T, Pividori M I, et al. Magnetically triggered direct electrochemical detection of DNA hybridization using Au67 quantum dot as electrical tracer [J]. Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids, 2005, 21(21): 9625-9629
- [11] Fojta M, Kostecka P, Trefulka M R, et al. "Multicolor" electrochemical labeling of DNA hybridization probes with osmium tetroxide complexes [J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(3): 1022-1029
- [12] Selvaraju T, Das J, Jo K, et al. Nanocatalyst-based assay using DNA-conjugated Au nanoparticles for electrochemical DNA detection [J]. Langmuir, 2008, 24(17): 9883-9888
- [13] Erdem A, Ozkan Ariksoysal D, Karadeniz H, et al. Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology [J]. Electrochemistry Communications, 2005, 7(8): 815-820
- [14] Zhu X, Han K, Li G. Magnetic nanoparticles applied in electrochemical detection of controllable DNA hybridization [J]. Analytical Chemistry, 2006, 78(7): 2447-2449
- [15] Farrell S, Halsall H B, Heineman W R. Immunoassay for *B. globigii* spores as a model for detecting *B. anthracis* spores in finished water [J]. The Analyst, 2005, 130(4): 489-497
- [16] Farrell S, Halsall H B, Heineman W R. *Bacillus globigii* bugbeads: a model simulant of a bacterial spore [J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(2): 549-555
- [17] Kim J I, Wang C, Kuizon S, et al. Simple and specific detection of abnormal prion protein by a magnetic bead-based immunoassay coupled with laser-induced fluorescence spectrofluorometry [J]. Journal of Neuroimmunology, 2005, 158(1-2): 112-119
- [18] Fan A, Lau C, Lu J. Magnetic bead-based chemiluminescent metal immunoassay with a colloidal gold label [J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(10): 3238-3242
- [19] Zaytseva N V, Montagna R A, Baeumner A J. Microfluidic biosensor for the serotype-specific detection of dengue virus RNA [J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(23): 7520-7527
- [20] Komori K, Takada K, Hatozaki O, et al. Electrochemiluminescence of Ru (II) complexes immobilized on a magnetic microbead surface: Distribution of magnetic microbeads on the electrode surface and effect of azide ion [J]. Langmuir, 2007, 23(11): 6446-6452
- [21] Meyer M H F, Stehr M, Bhujji S, et al. Magnetic biosensor for the detection of *Yersinia pesos* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 68(2): 218-224
- [22] Fredj H B, Helali S, Esseghaier C, et al. Labeled magnetic nanoparticles assembly on polypyrrole film for biosensor applications [J]. Talanta, 2008, 75(3): 740-747
- [23] Kwon Y, Hara C A, Knize M G, et al. Magnetic bead based immunoassay for autonomous detection of toxins [J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(22): 8416-8423
- [24] 元文宝,李芳,李华楠,等.H9 亚型 AIV 型特异性电化学发光免疫检测方法的建立[J].中国农业科学,2015,48(15):3064-

- 3070
QI Wen-bao, LI Fang, LI Hua-nan, et al. Electrochemical luminescence immunoassay for the detection of H9 subtype avian influenza virus [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(15): 3064-3070
- [25] Sugawara K, Yugami A, Kuramitz H. Electrochemical monitoring of binding between wheat germ agglutinin and cellohexose-modified magnetic microbeads [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395(3): 767-772
- [26] Lee J, Icoz K, Roberts A, et al. Diffractometric detection of proteins using microbead-based rolling circle amplification [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(1): 197-202
- [27] Kuramitz H, Mawatari Y, Ikeuchi M, et al. Multiplexed assay for proteins based on sequestration electrochemistry using the protein binding electroactive magnetic microbeads [J]. *Analytical Sciences*, 2012, 28(1): 77-81
- [28] Wang J, Cao Y, Xu Y, et al. Colorimetric multiplexed immunoassay for sequential detection of tumor markers [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 25(2): 532-536.
- [29] Liu Z, Zhang L, Yang H, et al. Magnetic microbead-based enzyme-linked immunoassay for detection of *Schistosoma japonicum* antibody in human serum [J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, 404(2): 127-134.
- [30] Van Weemen B K, Schuurs A H W M. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates [J]. *FEBS Letters*, 1971, 15(3): 232-236
- [31] Dequaire M, Degrand C, Limoges B. 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
- [32] Centi S, Laschi S, Fránek M, et al. A disposable immunomagnetic electrochemical sensor based on functionalised magnetic beads and carbon-based screen-printed electrodes (SPCEs) for the detection of polychlorinated biphenyls (PCBs) [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 538(1-2): 205-212
- [33] Centi S, Tombelli S, Minunni M, et al. Aptamer-based detection of plasma proteins by an electrochemical assay coupled to magnetic beads [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(4): 1466-1473
- [34] Liu G, Timchalk C, Lin Y. Bioelectrochemical magnetic immunosensing of trichloropyridinol: A potential insecticide biomarker [J]. *Electroanalysis*, 2006, 18(16): 1605-1613
- [35] Zacco E, Pividori M I, Alegret S, et al. Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues [J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(6): 1780-1788
- [36] Zacco E, Adrian J, Galve R, et al. Electrochemical magnetoimmunosensing of antibiotic residues in milk [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2007, 22(9-10): 2184-2191
- [37] Sarkar P, Ghosh D, Bhattacharyay D, et al. Electrochemical immunoassay for free prostate specific antigen (f-PSA) using magnetic beads [J]. *Electroanalysis*, 2008, 20(13): 1414-1420
- [38] 齐丽,刘亮,张旭,等.基于丝网印刷技术的电化学酶联免疫吸附[J].*济南大学学报(自然科学版)*,2015,29(1):6-11
QI Li, LIU Liang, ZHANG Xu, et al. Electrochemical ELISA based on screen printing technology [J]. *Journal of University of Jinan (Sci. & Tech.)*, 2015, 29(1): 6-11
- [39] Zhu X, Feng C, Ye Z, et al. Fabrication of magneto-controlled moveable architecture to develop reusable electrochemical biosensors [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 1694
- [40] Jahn D, Vielstich W. Rates of electrode processes by the rotating disk method [J]. *Journal of the Electrochemical Society*, 1962, 109(9): 849-852
- [41] Thomas J H, Ronkainen-Matsuno N J, Farrell S, et al. Microdrop analysis of a bead-based immunoassay [J]. *Microchemical Journal*, 2003, 74(3): 267-276
- [42] Wijayawardhana C A, Halsall H B, Heineman W R. Micro volume rotating disk electrode (RDE) amperometric detection for a bead-based immunoassay [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 399(1-2): 3-11
- [43] Wijayawardhana C A, Purushothama S, Cousino M A, et al. Rotating disk electrode amperometric detection for a bead-based immunoassay [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1999, 468(1): 2-8
- [44] Purushothama S, Kradtap S, Wijayawardhana C A, et al. Small volume bead assay for ovalbumin with electrochemical detection [J]. *The Analyst*, 2001, 126(3): 337-341
- [45] Thomas J H, Kim S K, Hesketh P J, et al. Bead-based electrochemical immunoassay for bacteriophage MS2 [J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(10): 2700-2707
- [46] Boyacı İ, Aguilar Z, Hossain M, et al. Amperometric determination of live *Escherichia coli* using antibody-coated paramagnetic beads [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 382(5): 1234-1241
- [47] Kuramitz H, Dziewatkoski M, Barnett B, et al. Application of an automated fluidic system using electrochemical bead-based immunoassay to detect the bacteriophage MS2

- and ovalbumin [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 561(1-2): 69-77
- [48] 杜华丽,符雪文,温永平等.基于石墨烯和金纳米笼修饰的无标记型微囊藻毒素免疫传感器的研制[J].*分析化学*,2014,42(5):660-665
DU Hua-li, FU Xue-wen, WEN Yong-ping, et al. A label-free immunosensor for microcystins-LR based on graphene and gold nanocage [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(5): 660-665
- [49] 刘雪平,张一芳,吴会旺,等.基于纳米金固定半抗原的电化学免疫传感器灵敏检测克伦特罗[J].*分析化学*,2012,40(8): 1147-1152
LIU Xue-ping, ZHANG Yi-fang, WU Hui-Wang, et al. Sensitive electrochemical immunosensor for determination of clenbuterol using gold colloid-mediated hapten immobilization [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 40(8): 1147-1152
- [50] 张新爱,申建忠,张帆,等.碳纳米管/纳米金复合膜电化学免疫传感器用于微囊藻毒素的检测研究[J].*分析化学*,2014,42(9):1301-1306
ZHANG Xin-ai, SHEN Jian-zhong, ZHANG Fan, et al. Electrochemical immunosensor for determination of microcystins based on carbon nanotubes/Au nanoparticles composite film [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(9): 1301-1306
- [51] Wang J. Nanoparticle-based electrochemical bioassays of proteins [J]. *Electroanalysis*, 2007, 19(7-8): 769-776
- [52] Wang H, Wang J, Timchalk C, et al. Magnetic electrochemical immunoassays with quantum dot labels for detection of phosphorylated acetylcholinesterase in plasma [J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(22): 8477-8484
- [53] Liu G, Wang J, Kim J, et al. Electrochemical coding for multiplexed immunoassays of proteins [J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(23): 7126-7130
- [54] Munge B, Liu G, Collins G, et al. Multiple enzyme layers on carbon nanotubes for electrochemical detection down to 80 DNA copies [J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(14): 4662-4666
- [55] Selvaraju T, Das J, Han S W, et al. Ultrasensitive electrochemical immunosensing using magnetic beads and gold nanocatalysts [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2008, 23(7): 932-938
- [56] Tang D, Yuan R, Chai Y. Ultrasensitive electrochemical immunosensor for clinical immunoassay using thionine-doped magnetic gold nanospheres as labels and horseradish peroxidase as enhancer [J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(5): 1582-1588
- [57] Ambrosi A, Castaneda M T, Killard A J, et al. Double-codified gold nanolabels for enhanced immunoanalysis [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(14): 5232-5240
- [58] Cunningham J C, Scida K, Kogan M R, et al. Paper diagnostic device for quantitative electrochemical detection of ricin at picomolar levels [J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(18): 3707-3715
- [59] 吴小丽,石鑫,王捷,等.喷射式流动注射电化学发光免疫检测禽流感H9亚型[J].*分析试验室*,2012,31(8):1-5
WU Xiao-li, SHI Xin, WANG Jie, et al. The detection of avian influenza virus H9 with jet flow injection electrochemiluminescence [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2012, 31(8): 1-5
- [60] 黄郑隽,彭花萍,黄辉洪,等.基于CdTe量子点和磁性纳米材料构建的夹心型电化学免疫传感器[J].*福建医科大学学报*,2014,48(2):71-74
HUANG Zheng-jun, PENG Hua-ping, HUANG Hui-hong, et al. Electrochemical immunosensor based on CdTe quantum dots and magnetic nanoparticles [J]. *Journal of Fujian Medical University*, 2014, 48(2): 71-74