

基于双重信号放大的电化学免疫法对 前列腺特异性抗原的检测

李雪¹, 艾永玲¹, 何群叶¹, 杨功俊^{2*}, 王菁^{1,2**}

(中国药科大学¹医药生物功能材料重点实验室;²药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

摘要 以谷胱甘肽修饰的 CdTe 量子点(GSH-CdTe QDs)与金纳米粒(AuNPs)形成复合材料(AuNPs@GSH-CdTe)为信号标记物,并在还原氧化石墨烯(rGO)和 AuNPs 双重信号放大的作用下,建立了一种高灵敏检测前列腺特异性抗原(PSA)的三明治免疫夹心式电化学方法。在 rGO/AuNPs 表面固定二抗蛋白(Ab₂),捕获目标物 PSA 和标记有一抗蛋白(Ab₁)的 AuNPs@GSH-CdTe 信号物,形成“三明治”免疫夹心结构。经 HNO₃ 溶解后,采用方波溶出伏安法(SWSV)测定酸解的 Cd²⁺ 的峰电流用于定量分析 PSA。其中 AuNPs 较大的比表面积以及较好的生物相容能力,达到了成功装载抗体以及放大信号的效果,同时具有较大表面积的 rGO 起到了协同放大的作用。所构建的免疫分析方法实现了对肿瘤标志物 PSA 的检测,其线性范围为 0.5~200 ng/mL,检测限为 5.0 pg/mL,并且该方法专属性、重复性以及稳定性好。此外,在实际样品的检测中,加标样回收率为 98.20%~106.2%,结果准确度良好,为检测 PSA 提供了准确可靠且灵敏度高的新方法。

关键词 方波溶出伏安法;GSH-CdTe 量子点;金纳米粒;还原氧化石墨烯;双重信号;前列腺特异性抗原

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)04-0433-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180408

引用本文 李雪,艾永玲,何群叶,等. 基于双重信号放大的电化学免疫法对前列腺特异性抗原的检测[J]. 中国药科大学学报,2018,49(4):433-440.

Cite this article as: LI Xue, AI Yongling, HE Qunye, *et al.* Detection of prostate specific antigen-based on dual signal amplified electrochemical immunoassay[J]. *J China Pharm Univ*, 2018, 49(4):433-440.

Detection of prostate specific antigen-based on dual signal amplified electrochemical immunoassay

LI Xue¹, AI Yongling¹, HE Qunye¹, YANG Gongjun^{2*}, WANG Jing^{1,2**}

¹Key Laboratory of Biomedical Functional Materials; ²Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract A sandwiched electrochemical immunoassay based on the AuNPs@GSH-CdTe as a signal label, which formed by GSH-CdTe QDs and AuNPs, with dual signal amplified by reduced graphene oxide and AuNPs was proposed for the sensitive detection of prostate specific antigen (PSA). Through a sandwich immunoreaction, the target PSA and AuNPs@GSH-CdTe labeled Ab₁ were captured to rGO/AuNPs-Ab₂ surface. After the HNO₃-dissolution step, square wave stripping voltammetry (SWSV) analysis of the captured CdTe QDs was used to quantify the concentration of PSA. In this system, AuNPs possessed large specific surface and good biocompatibility, which could effectively expand the amount of antigen and GSH-CdTe QDs loading and signals amplifying, while rGO played a synergistic amplification role due to its large specific surface. The proposed method showed good linearity ranging from 0.5 to 200 ng/mL with the detection limits of 5.0 pg/mL. It also showed excellent selectivity, good reproducibility, satisfactory stability. In addition, the method was successfully applied to the determination of real

收稿日期 2018-02-19 **通信作者** * Tel:025-84589700 E-mail: yanggongjun888@163.com

** Tel:18652949200 E-mail: wangjing@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 21775165);江苏省自然科学基金资助项目(No. BK20161455);中国药科大学药基地科研训练及科研能力提高项目资助(No. J1310032)

samples. The result was satisfactory and the recovery could fall in 98.20%–106.2%, which represented a novel approach for versatile detection of tumor markers.

Key words square wave stripping voltammetry; GSH-CdTe quantum dots; AuNPs; reduced graphene oxide; dual signal; prostate specific antigen

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21775165), the National Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20161455), and the College Students Innovation Project for the R&D of Novel Drugs of China Pharmaceutical University (No. J1310032)

肿瘤标志物在癌症早期诊断及预后预测具有重要的临床价值。前列腺癌是男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤,占全球癌症发病率第5位^[1]。其检测手段中,血清前列腺特异抗原(PSA)是最重要的早期检测指标^[2]。一般情况下,PSA正常值小于4 ng/mL,当前列腺癌发生时其质量浓度大于10 ng/mL^[3]。因此,及时并准确地检测PSA在前列腺癌的预测和诊断中至关重要。

在肿瘤标志物的不同分析方法中,电化学分析法因具有灵敏度高、操作简便等优点而倍受青睐^[4]。但由于免疫分析中抗原/抗体都是非电活性的,因此往往需要对其进行标记。量子点(QDs)因其独特的光学性质及良好的生物相容性而被广泛地应用于生物传感、免疫分析和生物成像等多个方面^[5-8]。除此之外,QDs还具备良好的电化学特性,利用QDs吸收转化光子和转移电子的能力,通过方波溶出伏安法(SWSV)可直接反映为电流响应信号^[9],因而QDs常被用作信号标记物。Liu等^[10]基于叶酸修饰的CdSe/ZnS QDs实现了对KB细胞的高灵敏检测。Chen等^[11]利用CdS QDs和适配体滚环扩增放大技术进行赭曲霉毒A的检测。利用QDs中金属元素并结合高灵敏的溶出伏安法,可实现对肿瘤标志物的电化学免疫分析。

为了进一步提高免疫传感的灵敏度,已有大量的研究工作致力于利用各种纳米材料来放大检测信号^[12-13]。还原氧化石墨烯(rGO)是石墨烯的一种重要衍生物,具有热学和化学稳定性、比表面积大、生物相容性好以及导电性强等优点^[14]。AuNPs同样有较大的比表面积,良好的电化学特性,此外其有较强的吸附能力,可用于装载含有-NH₂、-SH的物质^[15]。因而,两种材料在免疫分析方面得到广泛应用。

基于以上出发点,本研究采用水溶性量子点GSH-CdTe作为信号标记物,利用rGO和AuNPs自

身独特的优点,直接和间接地增加信号物的量,以此构建了双重信号放大的电化学免疫传感法。当免疫反应发生后,采用SWSV对酸解的Cd²⁺进行测定,其峰电流对应这个目标物的浓度,实现了对肿瘤标志物PSA的灵敏检测。

1 材料

1.1 试剂

Anti-PSA Ab₁(PSA抗体1,1.9 mg/mL)、Anti-PSA Ab₂(PSA抗体2,1.7 mg/mL)、PSA抗原(0.5 mg/mL)(上海领潮生物科技有限公司);碲粉(Te, 99.99%)、CdCl₂·2.5H₂O(≥99.0%)、还原型谷胱甘肽(GSH, 98%)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 98%)、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC, 98%)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);牛血清蛋白(BSA, Solarbio公司);氧化石墨烯分散液(0.5 mg/mL, 南京先锋纳米科技有限公司);氯金酸(国药集团化学试剂有限公司)。其他试剂均为分析纯并直接使用。整个实验用水均为超纯水(电阻系数≥18.2 MΩ·cm, Milli-Q, 美国Millipore公司),所用PBS缓冲液pH均为7.4,浓度为0.1 mol/L。

1.2 仪器

电化学工作站(CHI, 上海辰华仪器有限公司);UV-3600紫外可见吸收光谱仪,IRAffinity-1S红外光谱仪(日本岛津公司);2000型透射电子显微镜(TEM, 日本Jeol公司)。

2 方法

2.1 不同粒径AuNPs的制备

制备AuNPs之前所有的玻璃器皿在新鲜配制的王水(HNO₃-HCl, 1:3)中浸泡12 h,用超纯水洗净,烘干备用。

直径5 nm的AuNPs按照文献[6]方法制备并

稍做改进,具体步骤为:将 0.1 mol/L 冰浴后的 NaBH_4 溶液 0.6 mL 加入到 2.5×10^{-4} mol/L HAuCl_4 的水溶液 20 mL 中,随着搅拌,溶液迅速变成橙红色,为了保证 AuNPs 的生成,在持续冰浴条件下搅拌 3 h,直至溶液颜色变为酒红色。制备的 AuNPs 于 4 °C 下储存。

20 nm 粒径的 AuNPs 参照文献[16]方法制备。取 1% NaBH_4 水溶液 10 mL 快速加入到含 HAuCl_4 10 mg 的沸水 190 mL 中,剧烈搅拌并煮沸 30 min,然后待反应溶液自然冷却至室温,得到酒红色的 20 nm AuNPs 溶液,同样保存于 4 °C 备用。

2.2 GSH-CdTe QDs 的合成

将碲粉 125 mg 和 NaBH_4 200 mg 加入到装有超纯水 10 mL 的圆底烧瓶中, N_2 环境下磁力搅拌剧烈反应 10 min,然后密封,在冰浴中搅拌 30 min 得到 NaHTe 溶液。将 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 554.3 mg 和 GSH 水溶液 350 μL 加入到水 250 mL 中以形成 Cd 前驱溶液。然后用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 10,并向该溶液中通 N_2 30 min 除氧。最后将新鲜制备的 NaHTe 溶液在 N_2 环境下注入到 Cd 前驱溶液中,搅拌 20 min

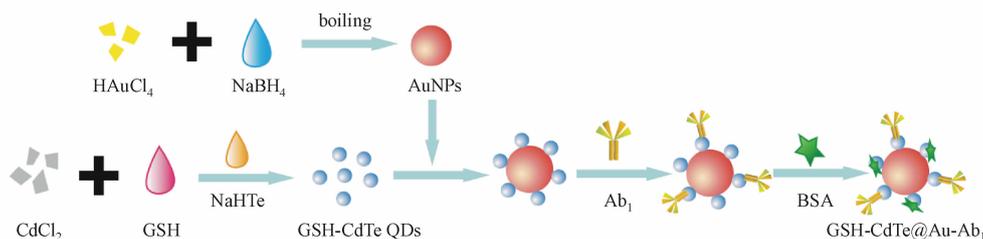


Figure 1 Synthesis process of AuNPs@GSH-CdTe-Ab₁
QDs; Quantum dots

2.4 rGO/AuNPs 及 rGO/AuNPs-Ab₂ 制备

首先,取 0.5 mg/mL GO 分散液 5 mL 至圆底烧瓶中,并向其中加入适量的 NaBH_4 ,在 80 °C 条件下持续搅拌并回流 5 h,所得产物 rGO 用超纯水洗涤数次。其次,将所得的 rGO 再次分散于水 4 mL 中。接着,在上述 rGO 的水溶液中加入 5 nm 的 AuNPs 溶液 5 mL,并室温下搅拌过夜,最终得到 rGO/AuNPs 复合材料^[19]。

取 rGO/AuNPs 复合材料溶液 300 μL 转移至 0.2 mL 离心管中,用 PBS 缓冲液清洗 2 次。再向离心管中加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSA Ab₂ 溶液 500 μL ,室温下混合振荡 2 h,用 PBS 缓冲溶液离心洗涤。随后再向离心管中加入 5% 的 BSA 100 μL ,继续室温

后,在 95 °C 通氮气条件下加热回流 3 h 得到 GSH-CdTe QDs。反应结束后用无水乙醇反复离心洗涤 3 次,最后分散于超纯水中并于 4 °C 下保存^[17]。

2.3 AuNPs@GSH-CdTe 复合物及信号标记物的制备

GSH-CdTe QDs 与 20 nm 的 AuNPs 按照质量浓度比 5:1 的比例混合,室温下搅拌过夜,反应物分别用无水乙醇和超纯水离心洗涤,得到 AuNPs@GSH-CdTe 复合物并分散在水溶液中^[18]。信号标记物的制备过程如图 1 所示,具体为: AuNPs@GSH-CdTe 500 μL 中加入 20 mg/mL EDC 溶液和 10 mg/mL NHS 溶液各 25 μL ,室温下振荡反应 1 h。在这里 EDC 和 NHS 的作用是活化 QDs 表面的羧基,用以更好地与抗体连接。接下来,再向混合液中加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSA Ab₁ 溶液 50 μL ,继续室温混合振荡 2 h。最后将 5% 的 BSA 溶液 50 μL 加入到上述溶液中继续振荡 1 h,用以封闭 QDs 表面的活性位点。最终反应物用 PBS 溶液离心洗涤 2 次,并重新分散在 PBS 溶液 500 μL 中,所制信号标记物 4 °C 下保存备用。

下混合振荡 1 h, PBS 离心洗涤,此处的 BSA 是用以封闭 rGO/AuNPs 复合材料上的活性位点,减少非特异性吸附。所制得的 rGO/AuNPs-Ab₂ 于 4 °C 下保存备用(图 2)。

2.5 基于纳米复合材料的电化学免疫检测

图 3 为“三明治”电化学免疫测定过程示意图。首先将不同浓度 PSA 抗原溶液 500 μL 加入到离心管中,与 rGO/AuNPs-Ab₂ 在 37 °C 下反应 40 min,反应完成后,离心洗涤 2 次。然后加入 AuNPs@GSH-CdTe-Ab₁ 信号标记物,37 °C 水浴振荡 1 h,根据形成“三明治”免疫结构形成前后相对分子质量的变化,使用 100 kD 的超滤膜将未与抗原结合的 AuNPs@GSH-CdTe-Ab₁ 标记物离心去

除,得到最终检测的“三明治”免疫夹心结构。

本工作采用三电极体系对体系进行检测:玻碳电极(GCE,直径3 mm)作为工作电极,饱和甘汞电极作为参比电极,铂电极作为辅助电极。GCE在使用前用金相砂纸进行打磨,再用粒径为0.05 μm 的 Al_2O_3 悬浊液在绒布上抛光,得到明亮的镜面。在浓度为0.5 mol/L铁氰化钾溶液中利用循环伏安法(CV)表征电极性能。

为了检测信号标记物中溶解出的 Cd^{2+} ,采用SWSV对其进行测定。测定时,首先,用0.1 mol/L

的硝酸溶液500 μL 溶解上述所得的免疫夹心结构中的 Cd^{2+} 。其次,将得到的硝酸溶液(含有溶解的 Cd^{2+})和900 μL 含有10 mg/L Hg^{2+} 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液(0.2 mol/L, pH 4.6)混合,并转移至电化学池中测定。最后SWSV测定,过程为:先在-1.2 V电位下电沉积120 s,沉积时磁力搅拌。然后电位从-1.0 V扫描至-0.3 V,电位扫描区间为 N_2 保护下进行。方波参数为:静置时间10 s,振幅为25 mV,电位增量为4 mV,频率15 Hz。

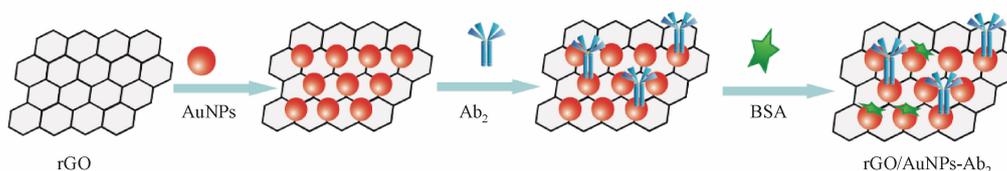


Figure 2 Synthesis process of rGO/AuNPs- Ab_2

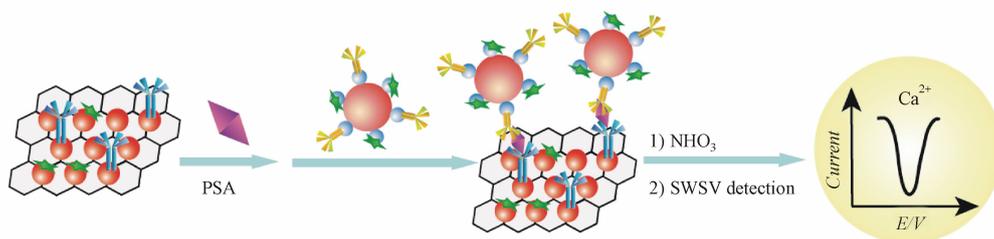


Figure 3 Principle of double signal enhancing strategy for PSA detection
PSA: Prostate specific antigen

3 结果与讨论

3.1 GSH-CdTe QDs 的表征

由水热法制备所得的GSH-CdTe QDs,利用透射电子显微镜(TEM)、紫外可见吸收光谱仪(UV-vis)以及红外光谱仪(IR)对其进行表征,如图4所示。从图4-A可以看出,GSH-CdTe QDs约在370 nm处出现一个UV-vis吸收峰,根据文献可计算出其粒径约为5.2 nm^[20],同时与粒径分布图集中显示的4~6 nm一致。TEM图也显示出,GSH-CdTe QDs具有良好的分散性,颗粒近似呈球状,粒径大小分布比较均匀,约为5 nm,这与UV-vis结果一致。IR谱图可以观察到N-H的伸缩振动峰在3425 cm^{-1} ,而GSH中S-H的伸缩振动峰在2534 cm^{-1} 处基本消失,由此可见,GSH与QDs之间形成了S-Cd键,此外,-COOH不对称伸缩振动峰由GSH中的1720 cm^{-1} 移至1606 cm^{-1} ,同时在

1380 cm^{-1} 处出现了 $-\text{COO}^-$ 的对称伸缩振动峰,说明保护剂GSH以负离子的形式存在。

3.2 AuNPs及其复合物材料的表征

图5为制备的单纯AuNPs和它的复合材料UV-vis表征图。从图中可以看到5和20 nm的AuNPs均在520 nm左右有吸收峰,此峰为AuNPs的特征吸收峰(图5-A曲线a,图5-B曲线a)。此外,AuNPs@GSH-CdTe的曲线(图5-A曲线b)较20 nm AuNPs而言,在380 nm处有明显地GSH-CdTe QDs吸收,且QDs的量远大于AuNPs。以此可以说明20 nm的AuNPs可作为很好的纳米载体,负载大量的信号物质QDs,达到信号放大的目的。对比5 nm AuNPs的吸收,rGO/AuNPs的UV-vis吸收(图5-B曲线b)除了AuNPs的特征峰外还在280 nm左右处有了rGO的特征吸收峰,同时rGO/AuNPs复合物的形成使得AuNPs的吸收有少许蓝移,证明复合物的成功制备。

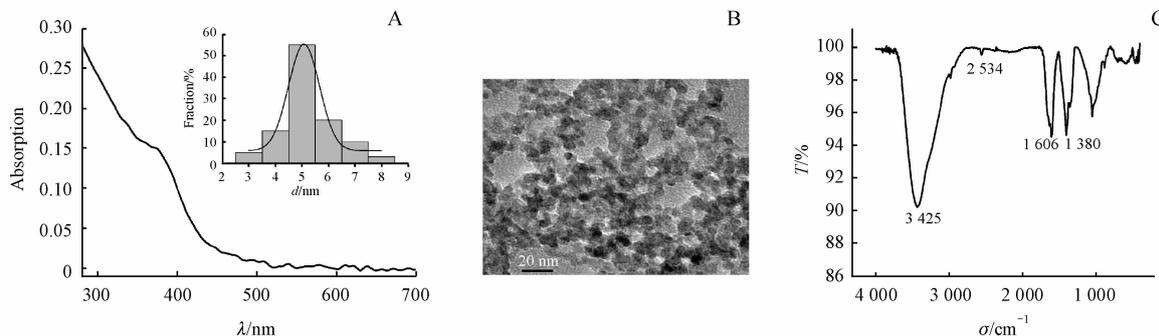


Figure 4 Characterization of ODs. A: UV-vis absorption spectra of GSH-CdTe QDs solution, inset: Corresponding size distribution of GSH-CdTe QDs; B: TEM image of GSH-CdTe QDs; C: FT-IR spectra of GSH-CdTe QDs

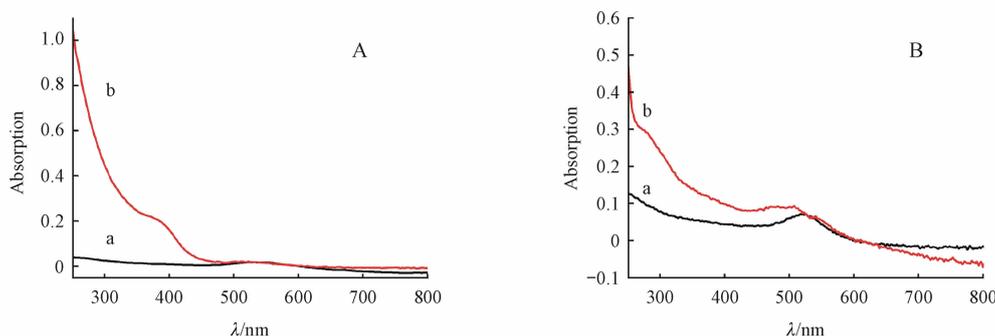


Figure 5 UV-vis absorption spectra of (A) 20 nm AuNPs (a) and AuNPs@GSH-CdTe (b); and (B) 5 nm AuNPs (a) and rGO/AuNPs (b)

3.3 rGO 和 rGO/AuNPs 复合物的 TEM 表征

为进一步证明 rGO/AuNPs 复合物的生成,利用 TEM 直观地对 rGO 和 rGO/AuNPs 复合物进行形貌表征,如图 6 所示。纯 rGO 呈表面褶皱的单层片状结构,形成 rGO/AuNPs 复合物后,明显看出,5 nm AuNPs 均匀地镶嵌在 rGO 表面,AuNPs 的存在能更加有利于生物分子的结合,同时也增大了 rGO 的生物结合面积,使得其表面能更加有效地放大交联 PSA Ab₂ 的数量。

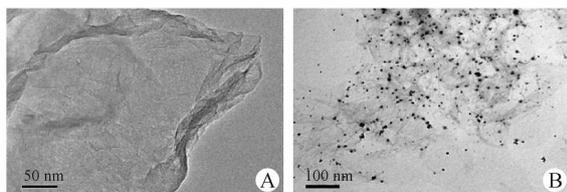


Figure 6 TEM image of (A) rGO and (B) rGO/AuNPs

3.4 双重信号放大免疫传感的实现

实验中,利用 AuNPs@GSH-CdTe 复合材料标记 PSA Ab₁,“三明治”免疫反应后,将 rGO/AuNPs 表面所反应结合到的 GSH-CdTe QDs 用 HNO₃ 溶解,采用 SWSV 来检测酸解的 Cd²⁺ 峰电流,从而达到定量检测抗原 PSA 的目的。因为 CdTe 的量正比于相应的抗原,故产生的电化学信号可以指示 PSA 的量。体

系中使用的 20 nm 的 AuNPs 具有较大的比表面积,能够负载更多的 CdTe 信号分子,可以直接地增加 Cd²⁺ 量,达到一重信号放大的作用。而 rGO/AuNPs 复合物不仅更适合抗体的组装,也能增加抗体的数量,从而间接地增加 Cd²⁺ 量,达到二重信号放大的效果。当体系中存在 50 ng/mL 的目标抗原 PSA 时,利用这些复合纳米材料,可以得到一个很显著的 Cd²⁺ 电化学信号(图 7 曲线 a)。然而,当体系中没有 PSA 存在时,AuNPs@GSH-CdTe-Ab₁ 信号标记物无法结合到 rGO/AuNPs 表面上,因此经过洗涤后酸解无 Cd²⁺ 的信号峰(曲线 b),这得以证明免疫传感的特异性,并为后续的定量分析提供了良好的背景信号。为了更明确 AuNPs 和 rGO 在信号放大方面所起作用,在相同的实验条件下(PSA 50 ng/mL)做了两个对照实验,当以单独的 QDs 作为信号标记物时,仅有较弱的信号产生(曲线 c),证明 GSH-CdTe QDs 的含量直接影响信号大小。同样,若 rGO 未参与反应体系时,AuNPs 所装载的抗体较少,导致后续免疫反应的量也减少,电化学信号减弱(曲线 d)。为了进一步确定采用三明治夹心结构的优势,仅用 AuNPs@GSH-CdTe 标记 Ab₁。检测过程中,使得目标抗原与 AuNPs@GSH-CdTe-Ab₁ 直接反应,即体系

中不存在二抗。反应结束后使用 50 kD 的超滤膜离心去除未结合抗原的信号标记物,最终产生的信号如图 7 曲线 e 所示。可以看出,相较于使用二抗载体来说,该结构的信号更弱,这可能是由于缺少二抗载体,抗原和信号分子直接结合,空间位阻减小,会发生一个信号分子与多个抗原结合的情况,从而使得检测到的 Cd^{2+} 电流较弱。因此,所构建的三明治免疫传感方法可以通过纳米复合材料得到有效的双重信号放大,实现对 PSA 的灵敏检测。

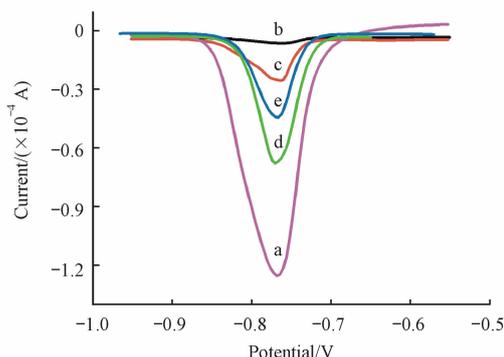


Figure 7 SWSVs of Cd^{2+} responding to different assembled mode a: AuNPs@GSH-CdTe-Ab₁-PSA-Ab₂-AuNPs/rGO; b: without PSA; c: GSH-CdTe-Ab₁-PSA-Ab₂-AuNPs/rGO; d: AuNPs@GSH-CdTe-Ab₁-PSA-Ab₂-AuNPs; e: GSH-CdTe-Ab₁-PSA. The concentration of PSA is all 50 ng/mL

3.5 实验条件的优化

为了高灵敏地检测肿瘤标志物 PSA,对实验条件进行了系统的优化,包括 AuNPs@GSH-CdTe-Ab₁ 的用量、BSA 的浓度和 PSA 的孵育时间。本实验用 Cd^{2+} 的溶出峰电流作为代表来考察各个因素

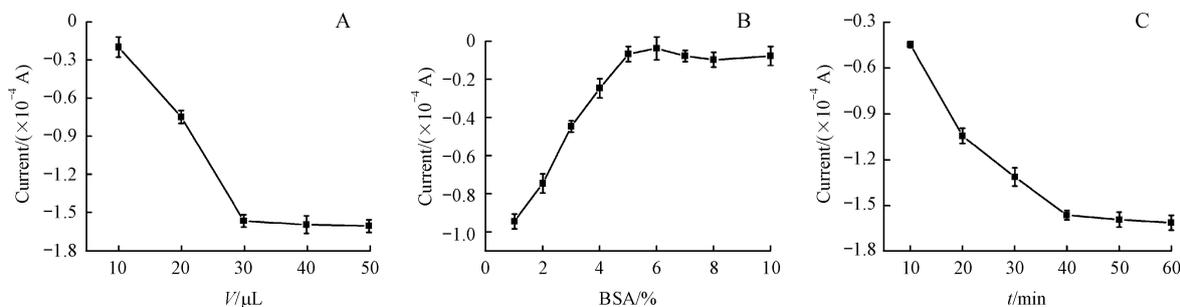


Figure 8 Optimization of experimental conditions ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: Volume of AuNPs@GSH-CdTe-Ab₁; B: Concentration of BSA; C: Incubation time of PSA

3.6 双重信号放大的免疫传感分析性能

在上述最佳实验条件下,目标抗原 PSA 的浓度与 Cd^{2+} 溶出峰电流大小直接相关。如图 9-A, Cd^{2+} 溶出峰具有很好的峰型,并且随着 PSA 浓度的增加而增大。从图 9-B 可以看出,PSA 质量浓度

的影响。

信号标记物的多少将决定最终的信号强弱,因而,首先考察了 AuNPs@GSH-CdTe-Ab₁ 的用量对其电化学信号的影响。图 8-A 为不同体积的 AuNPs@GSH-CdTe 标记抗体与 Cd^{2+} 溶出峰电流之间的关系图。结果表明,随着 AuNPs@GSH-CdTe-Ab₁ 加入量的增加,溶出峰电流也随之增大,当加入体积超过 30 μL 后, Cd^{2+} 的溶出峰电流基本平稳。为了反应更加充分,最终选择以 40 μL 为信号标记物的反应体积。

在免疫测定中,减小标记抗体的非特异性吸附是至关重要的,它往往制约了测定的检测限。所以在本实验中,利用 BSA 封闭活性位点,从而防止假阳性实验结果的产生。对 BSA 浓度的优化如图 8-B 所示。选取 1% ~ 10% 的 BSA 并没有目标抗体 PSA 参与的情况下进行考察。理论上,当不存在抗原时,免疫反应不能发生,无法形成“三明治”免疫夹心结构,从而没有信号产生。但从图 7-B 中观察到仅随着 BSA 浓度的增加,信号逐渐减弱,直至 BSA 浓度为 5% 时,信号基本消失。因而,5% 的 BSA 可以完全的封闭活性位点,达到最优实验效果。

在“三明治”免疫反应中,PSA 抗原的孵育时间也极大的影响了免疫测定的性能。从图 8-C 可以看出随着孵育时间的增加,响应信号也增加,40 min 后趋于平稳。考虑到更长时间的孵育并不能显著提高电流响应,反而会增加非特异性吸附,所以实验中选用的孵育时间为 40 min。

在 0.5 ~ 200 ng/mL PSA 范围内, $\lg c_{(\text{PSA})}$ 与溶出峰电流 (I) 呈良好的线性关系,线性回归方程为 $I = -0.5246 \lg c - 0.3939$,线性相关系数 (r) 为 0.997,检测限为 5.0 pg/mL。在相同条件下对 10 ng/mL 的 PSA 进行 5 次平行测定,得到相对标

准偏差(RSD)为 1.92%。以上可以证明该免疫传感方法能对 PSA 实现灵敏准确的测定。此外,与

其他现有检测 PSA 的方法比较,可以看出该方法具备更宽的线性范围或更低的检测限(表 1)。

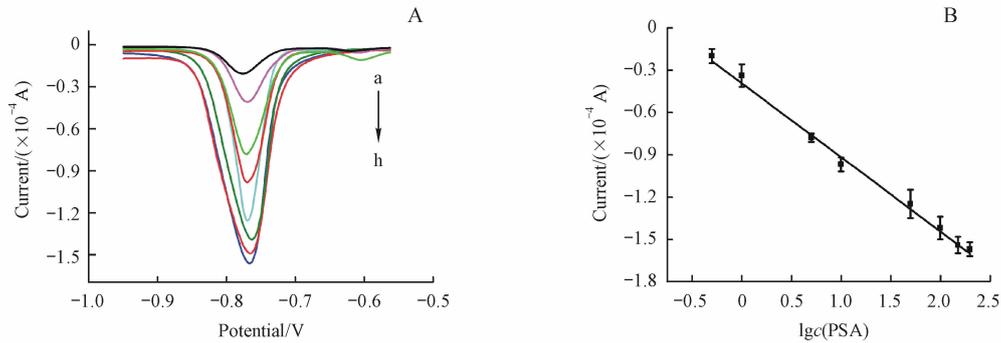


Figure 9 Determination of PSA concentration by constructed immunoassay

A: SWSVs of Cd^{2+} responding to the different concentration of PSA (from a-h: 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200 ng/mL); B: Linear relationship between the current intensity and logarithm of the PSA concentration in the range of 0.5–200 ng/mL ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Comparison of the present study and other reports for PSA detection

Method	Linear range/ (ng/mL)	LOD/ (ng/mL)	Ref.
Chemiluminescence	0.1-30	0.1	[21]
Electrochemiluminescence	0.01-8	0.008	[22]
Colorimetric Immunoassay	0.05-20	0.03	[23]
Electrochemistry	1-18	0.001	[24]
Fluorescence	1.56-25	0.001 56	[25]
Electrochemistry	0.5-200	0.005	This work

3.7 重复性、专属性和稳定性考察

考虑到该检测方法的实用性,对所构建的免疫传感方法进行了重复性、专属性和稳定性 3 个方面的考察。首先,重复性通过对 3 种检测浓度 5 个不同批次的“三明治”免疫结构进行组间实验。实验结果如表 2 所示,组间实验的 RSD 在 9% 以内,表明该免疫测定方法具有较好的重复性。

Table 2 Reproducibility of this immunoassay were evaluated by inter-assay relative standard deviation (RSD)

$c(\text{PSA}) /$ (ng/mL)	Current ($\times 10^{-4}$ A)					RSD /%
	1	2	3	4	5	
1	-0.402	-0.426	-0.386	-0.388	-0.414	4.2
10	-0.983	-0.998	-1.151	-0.982	-1.155	8.6
100	-1.396	-1.275	-1.249	-1.462	-1.213	8.0

其次,是专属性的考察,实际样品检测中往往成分比较复杂,为了排除其他物质对该方法的干扰,本实验选取甲胎蛋白(AFP)、组织多肽抗原(TPA)、癌胚抗原 125(CA125)、人血清蛋白(HAS)作为干扰物,以 50 ng/mL 为基准反应浓度。最终结果可由图 10 观察得到,单一的干扰物的电流响应值很小,并且各物质与 PSA 的混合物对检测的影响也可忽略,说明该方法专属性良好。

最后,将“三明治”免疫结构在 4 °C 下存放 1 个月,其电流响应值为原始数值的 89%,虽有少许降低,但也能看出该方法有较好的稳定性。

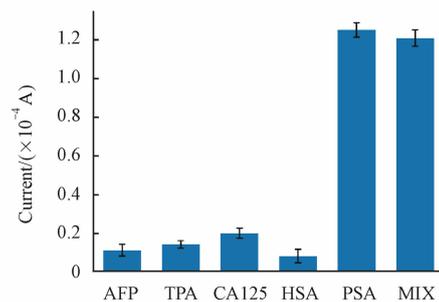


Figure 10 Selectivity of the PSA detection. The SWSVs of Cd^{2+} responding to the different proteins (the concentration of AFP, TPA, CA125, HAS and PSA were 50 ng/mL) and the mixture of AFP, TPA, CA125, HAS and PSA is also 50 ng/mL. Error bars show the standard deviations of measurements taken from at least three independent experiments

3.8 实际样品分析

为了进一步验证本方法的实用性,采用加样回收的方法对实际样品进行考察。将不同浓度的 PSA 加入到来自南京市鼓楼医院的一系列血清样品中,结果如表 3 所示,回收率在 98.20% ~ 106.2% 之间,RSD 均小于 5%,表明该方法可用于实际样品的测定。

Table 3 Determination of PSA added in human blood serum ($n = 5$) with the developed method

Serum sample	Added PSA /(ng/mL)	Found PSA /(ng/mL)	RSD /%	Recovery /%
1	1.000	0.982	3.2	98.20
2	10.00	9.970	3.9	99.70
3	50.00	51.53	2.5	103.1
4	100.0	106.2	4.1	106.2

4 结论

采用水热法合成了 GSH-CdTe QDs、AuNPs 和 rGO,并制备了相应的复合物,利用 AuNPs 比表面积大以及较好的生物相容性,达到了成功装载抗体以及放大信号的效果,同时具有较大表面积的 rGO 起到了协同放大的作用。因而在双重信号放大的作用下,本实验所构建的电化学免疫分析方法实现了对肿瘤标志物 PSA 的检测,具有较宽的线性范围,并且该方法专属性、重复性以及稳定性好,可作为准确检测肿瘤标志物 PSA 可行方法。

参考文献

- [1] Jie GF, Huang HP, Sun XL, *et al.* Electrochemiluminescence of CdSe quantum dots for immunosensing of human prealbumin [J]. *Biosens Bioelectron*, 2008, **23**(12): 1896–1899.
- [2] Ertürk G, Özen H, Tümer MA, *et al.* Microcontact imprinting based surface plasmon resonance (SPR) biosensor for real-time and ultrasensitive detection of prostate specific antigen (PSA) from clinical samples [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2016, **224**: 823–832.
- [3] Wei Q, Zhao YF, Xu CX, *et al.* Nanoporous gold film based immunosensor for label-free detection of cancer biomarker [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, **26**(8): 3714–3718.
- [4] Wang R, Wang AJ, Liu WD, *et al.* A novel label-free electrochemical immunosensor for ultra-sensitively detecting prostate specific antigen based on the enhanced catalytic currents of oxygen reduction catalyzed by core-shell Au@Pt nanocrystals [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, **102**: 276–281.
- [5] Xue B, Deng DW, Cao J, *et al.* Synthesis of violet-near-infrared-emitting quantum dots using *N*-acetyl-L-cysteine as ligand [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2010, **41**(5): 456–461.
- [6] Wang J, Shan Y, Xu JJ, *et al.* Gold nanoparticle enhanced electrochemiluminescence of CdS thin films for ultrasensitive thrombin detection [J]. *Anal Chem*, 2011, **83**(11): 4004–4011.
- [7] Lu HJ, Zhao W, Xu JJ, *et al.* Visual electrochemiluminescence ratiometry on bipolar electrode for bioanalysis [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, **102**: 624–630.
- [8] Song FJ, Ai YL, Zhong WY, *et al.* Detection of copper ions and glutathione based on off-on fluorescent graphene quantum dots [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2018, **49**(1): 87–92.
- [9] Cui RJ, Pan HC, Zhu JJ, *et al.* Versatile immunosensor using CdTe quantum dots as electrochemical and fluorescent labels [J]. *Anal Chem*, 2007, **79**: 8494–8501.
- [10] Liu Y, Zhu L, Kong JL, *et al.* A quantum dots-based electrochemical assay towards the sensitive detection of tumor cells [J]. *Electrochem Commun*, 2013, **33**: 59–62.
- [11] Tong P, Zhao WW, Zhang L, *et al.* Double-probe signal enhancing strategy for toxin aptasensing based on rolling circle amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, **33**(1): 146–151.
- [12] Kumar S, Ashish, Kumar S, *et al.* Effect of Brownian motion on reduced agglomeration of nanostructured metal oxide towards development of efficient cancer biosensor [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, **102**: 247–255.
- [13] Li JJ, Yan XX, Li XY, *et al.* A new electrochemical immunosensor for sensitive detection of prion based on Prussian blue analogue [J]. *Talanta*, 2018, **179**: 726–733.
- [14] Pang YH, Zhang Y, Li QY, *et al.* Synergetic accumulation and simultaneous determination of naphthol isomers on electrochemically reduced graphene oxide modified electrode [J]. *J Electroanal Chem*, 2016, **769**: 89–96.
- [15] Ma JC, Zhang WD. Gold nanoparticle-coated multiwall carbon nanotube-modified electrode for electrochemical determination of methyl parathion [J]. *Microchim Acta*, 2011, **175**(3/4): 309–314.
- [16] Zhao WW, Dong XY, Wang J, *et al.* Immunogold labeling-induced synergy effect for amplified photoelectrochemical immunoassay of prostate-specific antigen [J]. *Chem Commun*, 2012, **48**(43): 5253–5255.
- [17] Zhang LJ, Xu CL, Li BX. Simple and sensitive detection method for chromium(VI) in water using glutathione-capped CdTe quantum dots as fluorescent probes [J]. *Microchim Acta*, 2009, **166**(1/2): 61–68.
- [18] Rabbani MM, Nam DG, Kim DH, *et al.* Characterization of Au/CdTe nanocomposites prepared by electrostatic interaction [J]. *T Nonferr Metal Soc*, 2013, **23**(2): 426–432.
- [19] Tuz Johra F, Jung WG. Low temperature synthesis of RGO-Au nanocomposite with apparently reduced time and its application as a chemical sensor [J]. *Appl Surf Sci*, 2016, **362**: 169–175.
- [20] Yu WW, Qu LH, Guo WZ, *et al.* Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals [J]. *Chem Mater*, 2003, **15**: 2854–2860.
- [21] Liu RP, Wang C, Jiang Q, *et al.* Magnetic-particle-based, ultrasensitive chemiluminescence enzyme immunoassay for free prostate-specific antigen [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, **801**: 91–96.
- [22] Xu SJ, Liu Y, Wang TH, *et al.* Positive potential operation of a cathodic electrogenerated chemiluminescence immunosensor based on luminol and graphene for cancer biomarker detection [J]. *Anal Chem*, 2011, **83**: 3817–3823.
- [23] Gao ZQ, Xu MD, Tang DP, *et al.* Magnetic bead-based reverse colorimetric immunoassay strategy for sensing biomolecules [J]. *Anal Chem*, 2013, **85**: 6945–6954.
- [24] Lakkavarapu S, Pradeep Kumer B, Bondili JS, *et al.* Development of an electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles incorporated chitosan biopolymer nanocomposite film for the detection of prostate cancer using PSA as biomarker [J]. *Enzyme Microb Tech*, 2018, **112**: 43–51.
- [25] Xu J, Zhang QM, Xie HY, *et al.* High sensitive detection method for protein by combining the magnetic separation with cation exchange based signal amplification [J]. *Talanta*, 2017, **168**: 91–99.