

• 研究论文 •

## 新型有机-无机氧化还原复合膜层层组装的无试剂高灵敏电流型 前列腺特异性抗原免疫传感器研究

刘中原 袁若\* 柴雅琴 卓颖 洪成林  
(发光与实时分析教育部重点实验室(西南大学) 西南大学化学化工学院 重庆 400715)

**摘要** 以前列腺特异性抗原(PSA)和前列腺特异性抗体(anti-PSA)为生物模型分子,采用电沉积技术和共价键合作用,研制了新型高灵敏电流型免疫传感器.利用具有良好导电性和热稳定性的新型有机材料[茚四甲酸二酐(PTCDA)衍生物,简称为 PTC-NH<sub>2</sub>]膜具有的多孔结构,该膜可与电沉积制得的冰晶状普鲁士蓝(PB)颗粒进行层层组装镶嵌,形成多层稳定的有机-无机氧化还原复合膜以增加 PB 的固定量和稳定性,从而提高电极的电流响应信号;同时,通过复合膜表面丰富的氨基吸附大量纳米金以增加抗体的固定量,从而提高免疫传感器的灵敏度.利用扫描电子显微镜(SEM)和 X 射线光电子能谱仪(XPS)对 PTC-NH<sub>2</sub>膜的形貌和结构进行表征,通过循环伏安法考察了电极修饰过程的电化学特性,详细研究了该免疫传感器的性能.该免疫电极对前列腺特异性抗原检测的线性范围为 0.5~16.0 ng/mL,相关系数为 0.985,检测限为 0.02 ng/mL.实验结果表明,利用该方法制备的免疫传感器具有灵敏度高、稳定性和选择性好等优点.

**关键词** 电流型免疫传感器;前列腺特异性抗原(PSA);纳米金;普鲁士蓝(PB);有机-无机氧化还原复合膜

## Highly Sensitive Reagentless Amperometric Immunosensor based on Layer-by-layer Assembly of Redox-active Organic-inorganic Composite Film for Determining Prostate Specific Antigen

Liu, Zhongyuan Yuan, Ruo\* Chai, Yaqin Zhuo, Ying Hong, Chenglin  
(Education Ministry Key Laboratory on Luminescence and Real-time Analysis, College of Chemistry and Chemical  
Engineering, Southwest University, Chongqing 400715)

**Abstract** A new highly sensitive amperometric immunosensor for the detection of prostate specific antigen (PSA) has been constructed by means of covalent bonding to immobilize prostate specific antibody (anti-PSA) on multilayer organic-inorganic redox-active composite film/gold nanoparticle (nano-Au) modified glassy carbon electrode surface. The morphologies of the composite films were studied by means of scanning electron microscopy (SEM), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis was used to characterize the chemical composition in the PTC-NH<sub>2</sub> compound. The preparation procedure of the immunosensor was further investigated by cyclic voltammetry (CV). In addition, the performance and influencing factors of the resulting immunosensor were studied in detail. Under optimal conditions, the resulting immunosensor displayed a high sensitivity for the detection of PSA, and responded to the PSA concentration in the range from 0.5 to 16 ng/mL ( $R=0.985$ ) with a detection limit of 0.02 ng/mL. Moreover, the immunosensor exhibited high sensitivity, long-term stability and good selectivity.

**Keywords** amperometric immunosensor; prostate specific antigen (PSA); gold nanoparticle; Prussian blue;

\* E-mail: yuanruo@swu.edu.cn; Tel.: 023-68252277; Fax: 023-68254000.

Received January 9, 2008; revised May 19, 2008; accepted November 27, 2008.

国家自然科学基金(No. 20675064)、重庆市自然科学基金(No. CSTC-2005BB4100)资助项目.

## organic-inorganic redox-active composite film

前列腺特异抗原(prostate specific antigen, PSA)是一种由前列腺管上皮细胞产生和分泌的前列腺特异性标志物,在正常男性血清中含量极微(0~4 ng/mL),在前列腺肿瘤、增生时其水平升高,并对早期前列腺癌的诊断具有敏感性和特异性<sup>[1,2]</sup>.因此,对血清 PSA 的检测在临床前列腺肿瘤诊断上具有重要价值.目前检测 PSA 通常采用酶联免疫法、放射免疫检测法和化学发光免疫分析法等<sup>[3,4]</sup>.这些方法灵敏、可靠,但操作较为复杂,检验周期较长.因此,寻找和建立一种灵敏、特异、简单且快速的方法测定 PSA 在临床实验诊断中具有重要的实用价值.

电化学免疫传感器是将电化学分析方法与免疫学技术相结合而发展出来的一种生物传感器<sup>[5]</sup>.其中,电流型免疫传感器因其制备方法简单、响应迅速、易于进行免疫抗体/抗原的测定且检测灵敏度高等特点成为当前研究热点之一<sup>[6,7]</sup>.然而,目前的电流型免疫传感器大多需要酶标抗原或者抗体,通过竞争法或夹心法实现对目标分子的检测.这样制备的免疫传感器虽然灵敏度高,但是电极制作过程相对繁琐且成本高<sup>[8,9]</sup>.因此,开发性能更为优越的无试剂电流型免疫传感器及建立简单快速的检测方法实现对抗原或抗体的检测具有重要的理论意义和实际应用价值.最近,我们分别采用联吡啶钴和天青一作为电子媒介体并结合辣根过氧化物酶的化学放大作用,研制了性能优越的电流型免疫传感器<sup>[10,11]</sup>.本文采用电沉积技术和共价键合作用,将 anti-PSA 固定在纳米金/多层有机-无机氧化还原复合膜修饰的玻碳电极表面,从而制得新型高灵敏高稳定的电流型免疫传感器.

普鲁士蓝(PB)具有良好的氧化还原活性、高度的化学稳定性和易于制备等优点,是制备无试剂型免疫传感器的理想电极材料<sup>[12]</sup>.然而,如何将电活性物质 PB 牢固地固定到电极表面,从而增强电极的稳定性和灵敏度是电极制备的关键技术之一.近年来,有报道通过在沉积有 PB 的电极表面引入一层溶胶-凝胶膜(如壳聚糖、明胶等)来提高 PB 的稳定性<sup>[13]</sup>,但凝胶膜一般存在电子传递能力差、在水中易溶胀且与基体电极结合不牢固等缺点而不能有效防止 PB 的渗漏.

本文首先利用有机材料花四甲酸二酐(PTCDA,分子式见图 1)与乙二胺之间的氨解作用合成了一种新的有机化合物(PTCDA 衍生物,简称为 PTC-NH<sub>2</sub>).因具有与 PTCDA 相同的骨架结构,PTC-NH<sub>2</sub>膜具有多孔结构且导电性和热稳定性好<sup>[14,15]</sup>,表面带有丰富的氨基可

以将纳米金共价固定于多孔膜表面.实验发现,通过电沉积制得的冰晶状 PB 颗粒可以成功地镶嵌在 PTC-NH<sub>2</sub>膜的孔洞形成结构均一、稳定性好的有机-无机氧化还原复合膜.通过 PB 膜与 PTC-NH<sub>2</sub>的层层组装镶嵌,可以增加 PB 的固定量,从而制得稳定性更高的氧化还原复合膜.然后,通过复合膜表面丰富的氨基吸附带负电的纳米金颗粒,从而形成具有比表面积大、吸附力强、生物相容性好等优点的纳米金单层<sup>[16]</sup>.最后通过纳米金单层吸附固定 anti-PSA 分子.与传统制备免疫传感器的方法相比,该方法有效提高了 PB 的固定量和稳定性,并通过增加对纳米金的吸附进而增加了抗体的固定量,从而制得高灵敏、高稳定的免疫传感器.本文对该免疫传感器的性能进行了详细的研究,并应用该免疫传感器对 PSA 进行定量检测.实验结果表明,该免疫传感器选择性好、灵敏度高、响应迅速且抗干扰能力强,具有实际应用价值.

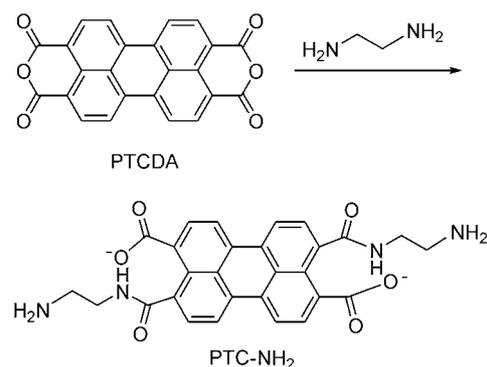


图 1 PTC-NH<sub>2</sub>的合成过程示意图

Figure 1 The schematic diagram of the procedure of the synthesis of PTC-NH<sub>2</sub>

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

CHI600B 型电化学工作站(上海辰华仪器公司), AB204-S 电子天平(瑞士 Metter Toledo 公司), MP230 酸度计(瑞士 Metter Toledo 公司), BRANSONIC200 超声清洗机(德国 BRANSON ULTRASCHALL 公司), CS 501-SP 型超级数显恒温器(重庆四达实验仪器厂制造), X 射线光电子能谱仪(ESCALAB 250, 英国 V. G 公司), 透射电子显微镜(TEM)(TECNAI 10, 荷兰 PHILIPS 公司), 扫描电子显微镜(SEM)(1000B, 美国 AMRAY 公司). 采用三电极系统: Ag/AgCl(饱和 KCl)电极为参比电极, 铂丝电极为对电极, 修饰有抗体的玻碳电极为工作

电极.

前列腺特异性抗原及抗体(PSA, anti-PSA)(美国 ABBOMAX 公司), 牛血清白蛋白(BSA 96%~99%)、氯金酸、柠檬酸三钠(美国 Sigma 公司), 茈四甲酸二酐(PTCDA)(辽宁联港染料化工有限公司),  $K_3Fe(CN)_6$ 、 $FeCl_3$ (四川化学试剂公司提供), 其他试剂均为分析纯试剂, 实验用水均为二次去离子水. 纳米金溶胶采用柠檬酸钠还原法参照文献[17]制备, 制得的纳米金平均粒径为 16 nm.

## 1.2 PTC-NH<sub>2</sub> 的制备

本实验以如下步骤制得 PTC-NH<sub>2</sub>: 将 1 g PTCDA 溶于 5 mL 丙酮中, 加入 10 mL 乙二胺并于室温下搅拌反应 40 min, 离心分离. 所得产物经乙醇、二次去离子水洗涤后, 室温干燥, 即得红色粉末状 PTC-NH<sub>2</sub>. 合成过程见图 1.

## 1.3 免疫传感器的制备

免疫传感器的制备过程见图 2. 玻碳电极(GCE  $\phi=4$  mm)经 0.3, 0.05  $\mu\text{m}$  的  $Al_2O_3$  悬糊抛光后用蒸馏水冲洗干净, 再分别在蒸馏水、乙醇、蒸馏水中超声洗涤, 清洗后的电极置于室温下晾干.

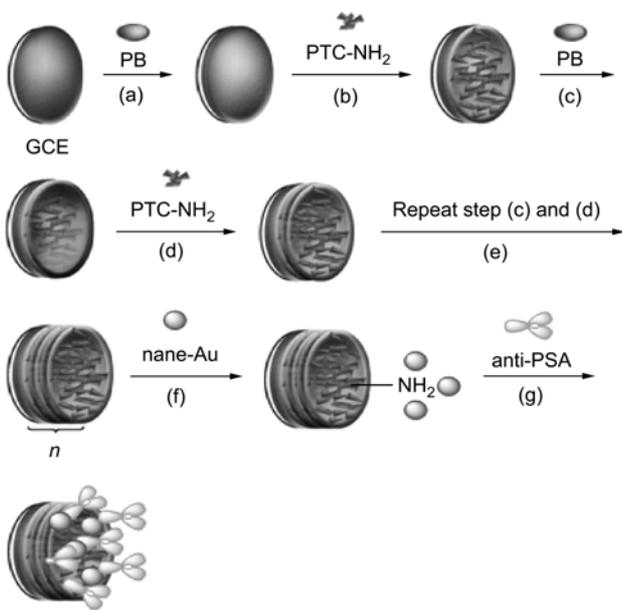


图 2 免疫传感器的组装过程

Figure 2 Preparation process of the immunosensor

将处理好的电极放入新制的 2.5 mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$  + 2.5 mmol/L  $FeCl_3$  + 0.1 mol/L KCl (用盐酸调节溶液的 pH=1.0~1.5) 溶液中于 +0.4 V 电沉积 60 s 后, 取出晾干; 然后取 5  $\mu\text{L}$  PTC-NH<sub>2</sub> 的乙醇溶液滴涂于电极表面, 于室温下晾干成膜. 重复沉积 PB 和滴涂 PTC-NH<sub>2</sub>, 使 PB 和 PTC-NH<sub>2</sub> 层层镶嵌到电极表面. 随后将电极浸入

1 mL 纳米金溶胶中约 4 h. 当电极表面修饰了纳米金单层后, 将该电极置于 anti-PSA 溶液中在 4  $^{\circ}\text{C}$  浸泡过夜. 最后用牛血清白蛋白(BSA, 0.25%)封闭电极上的非特异性吸附位点. 制备好的电极悬于缓冲液上方, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  的冰箱中保存备用.

## 1.4 实验方法

利用循环伏安法表征电极在修饰过程中不同阶段的电化学特性. 采用三电极系统, 免疫传感器为工作电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝为对电极, 于 pH 5.5 的磷酸缓冲溶液(PBS, 含 0.1 mol KCl 作为支持电解质)中在 -0.2~0.5 V 电位范围内进行循环伏安扫描, 电位扫描速度为 50 mV/s, 温度控制在 25  $^{\circ}\text{C}$ .

在传感器表面发生常规免疫反应后, 生成的免疫复合物阻碍电子传递到电极表面, 使传感器响应电流信号降低. 该信号变化(降低)的大小  $\Delta I$  与发生在电极表面免疫反应进行的程度有关,  $\Delta I$  值越大, 表明与电极表面固定的抗体结合的抗原的量越多. 以制备好的免疫电极测定的初始还原峰电流记为  $I_0$ ; 当免疫反应完成后, 以测定的还原峰电流记为  $I$ ; 则峰电流变化  $\Delta I = I - I_0$ . 本文以此为依据对 PSA 进行定量检测.

## 2 结果与讨论

### 2.1 X 射线光电子能谱(XPS)表征

利用 X 射线光电子能谱(XPS)对化合物 PTC-NH<sub>2</sub> 的化学组成进行分析. 图 3 中 a, b 分别为 PTCDA 和 PTC-NH<sub>2</sub> 的 XPS 全扫描谱. 如图 3a 所示, 在 PTCDA 的 XPS 全扫描谱中出现了两个强峰, 谱峰大概位于 285 和 532 eV, 分别代表 C1s 和 O1s 的电子状态, 这与文献报道一致<sup>[18]</sup>. 而在 PTC-NH<sub>2</sub> 的 XPS 全扫描谱中, 除出现了两个分别代表 C1s 和 O1s 电子能态的的谱峰外, 在大概

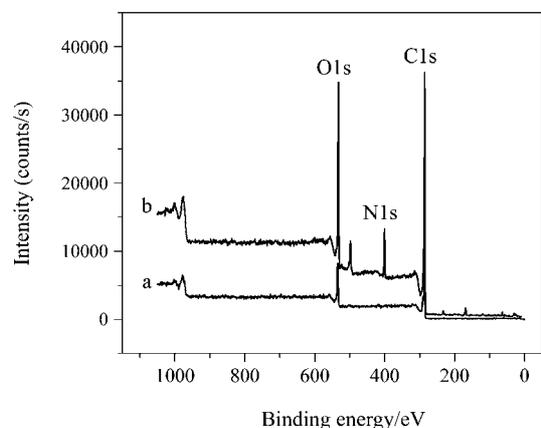


图 3 PTCDA (a)和 PTC-NH<sub>2</sub> (b) 的 XPS 全扫描谱

Figure 3 The XPS whole scanning spectrum of PTCDA (a) and PTC-NH<sub>2</sub> (b)

400 eV 处出现了一个代表 N1s 电子状态的谱峰(图 3b), 这表明化合物 PTC-NH<sub>2</sub> 被成功合成.

## 2.2 扫描电子显微镜(SEM)表征

采用扫描电子显微镜对复合膜形貌进行观察, 结果见图 4 所示. 从图 4 中可以看出, 沉积了单层 PB 后, 电极表面分散了许多冰晶状 PB 颗粒, 这和文献报道一致<sup>[19]</sup>(图 4a). 当滴涂了 PTC-NH<sub>2</sub> 后, 冰晶状 PB 颗粒与 PTC-NH<sub>2</sub> 膜的孔洞成功地镶嵌在一起形成了一层相对紧密且多孔的有机-无机复合膜(图 4b). 当在这层复合膜上再次沉积 PB 后, 可以看到许多 PB 颗粒分散在复合

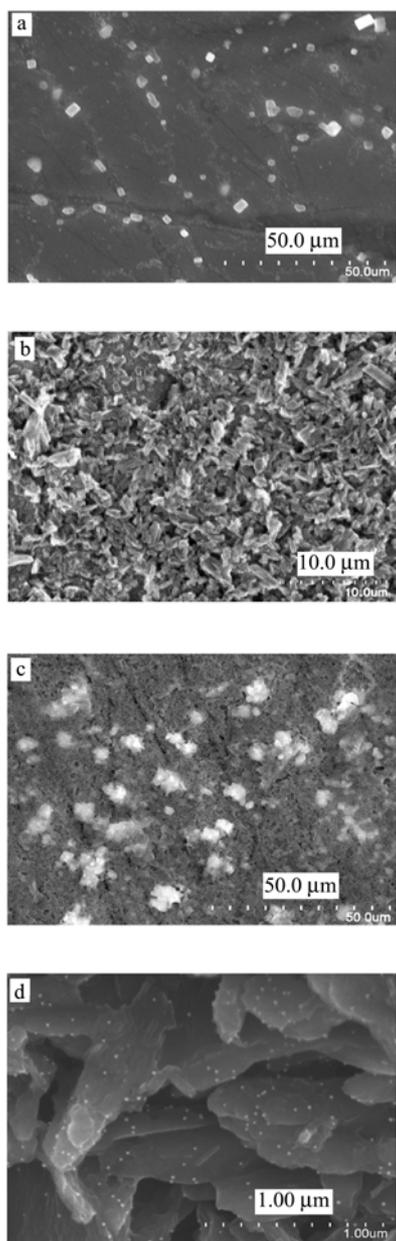


图 4 PB (a), PTC-NH<sub>2</sub>/PB (b), PB/PTC-NH<sub>2</sub>/PB (c), and nano-Au/PTC-NH<sub>2</sub>/PB/(PTC-NH<sub>2</sub>/PB)<sub>2</sub> (d)扫描电子显微镜照片  
Figure 4 SEM images of PB (a), PTC-NH<sub>2</sub>/PB (b), PB/PTC-NH<sub>2</sub>/PB (c), and nano-Au/PTC-NH<sub>2</sub>/PB/(PTC-NH<sub>2</sub>/PB)<sub>2</sub> (d)

膜表面, 且与复合膜上的孔洞镶嵌在一起, 这说明 PB 被成功地沉积到了复合膜表面(图 4c). 当在外层为 PTC-NH<sub>2</sub> 的复合膜表面修饰了纳米金后, 大量纳米金颗粒均匀地分散在膜表面, 形成纳米金单层, 这说明纳米金被复合膜表面丰富的氨基成功吸附到电极表面(图 4d).

## 2.3 电极制备过程的电化学特性

利用循环伏安法研究了电极在制备过程中的电化学特性. 图 5 为不同电极在 PBS (pH 5.5)溶液中的循环伏安图谱. 由于体系中缺少氧化还原活性物质, 在 -0.2~0.5 V 扫描范围内, 裸碳电极在 PBS 溶液中没有明显的氧化还原峰(图 5a). 反复沉积 PB 和滴涂 PTC-NH<sub>2</sub>, 电极的峰电流随 PTC-NH<sub>2</sub>/PB 复合膜层数增加逐渐增高, 同时电极的稳定性也增强. 实验发现, 当复合膜层数达到 3 层后峰电流值无显著增加. 图 5b 为电极修饰了 {(PTC-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>/(PB)<sub>3</sub>} 后, 修饰电极在 PBS (pH 5.5)溶液中的循环伏安图, 可以观察到一对可逆的氧化还原峰, 说明沉积到电极上的 PB 可以有效地传递电子. 当再次滴涂 PTC-NH<sub>2</sub> 并利用它丰富的氨基将纳米金颗粒吸附到电极上后, 电极的氧化还原峰电流有所降低, 这是由于虽然纳米金能促进电子传输, 但 PTC-NH<sub>2</sub> 对电子传输有所阻碍, 因此峰电流降低(图 5c). 此时利用形成的纳米金单层吸附带正电荷的抗体分子, 并用 BSA 封闭电极上的非特异性吸附位点, 电极的氧化还原峰电流再次降低(图 5d, 5e), 这是由于蛋白质分子吸附到电极上, 从而阻碍了电子的传递. 最后, 将修饰好的电极与 2 ng/mL 的 PSA 溶液反应后, 所得到的曲线如

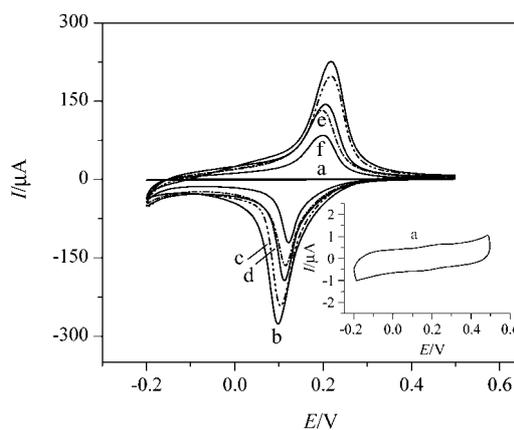


图 5 不同修饰电极的循环伏安图

Figure 5 CVs of the different electrodes in PBS buffer (pH 5.5) bare GCE (a); PB/(PTC-NH<sub>2</sub>/PB)<sub>2</sub> (b); nano-Au/PTC-NH<sub>2</sub>/PB/(PTC-NH<sub>2</sub>/PB)<sub>2</sub> (c); anti-CEA/nano-Au/PTC-NH<sub>2</sub>/PB/(PTC-NH<sub>2</sub>/PB)<sub>2</sub> (d); BSA/anti-CEA/nano-Au/PTC-NH<sub>2</sub>/PB/(PTC-NH<sub>2</sub>/PB)<sub>2</sub> (e); modified electrode and (f) the electrode (e) after incubated in the solution containing 2 ng/mL PSA. All potentials are given vs. SCE. The inset shows the CV of the bare GCE in PBS buffer (pH 5.5).

图 5f 所示. 由于抗原抗体间特异性反应生成的免疫复合物进一步阻碍了电子传递, 导致峰电流进一步降低<sup>[20]</sup>.

图 6 是该免疫传感器在不同扫描速率下的循环伏安曲线. 从图中可以看出, 随着扫描速率的不断增大, 峰电流值逐渐增大, 且峰电流值与扫描速率的平方根成正比, 说明电极氧化还原反应受扩散控制. 此外, 免疫电极在扫描达到 300 mV/s 时 CV 曲线十分稳定, 说明该电极修饰膜具有良好的稳定性且电活性物质 PB 可以有效地传递电子.

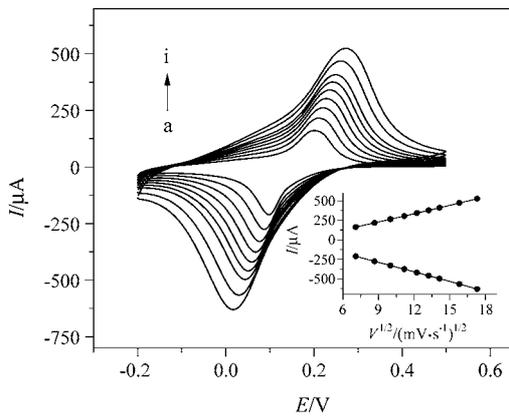


图 6 免疫传感器在不同扫描速率下的循环伏安图

Figure 6 CVs of the modified electrodes at different scan rates from a to i: 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300 mV/s in PBS buffer (pH 5.5) under room temperature. The inset shows the dependence of the redox peak currents on the square root of scan rates. All potentials are given vs. SCE

## 2.4 实验条件优化

### 2.4.1 {PB/PTC-NH<sub>2</sub>}<sub>n</sub> 复合膜层数的选择

图 7 为不同层数 {PTC-NH<sub>2</sub>/PB}<sub>n</sub> 复合膜修饰电极的 CV 图. 由图可知: 随着复合膜层数的增加, 电极的氧化还原峰电流逐渐增大. 但当 PTC-NH<sub>2</sub>/PB 层数多于 3 层时, 电极的响应电流信号无显著增强(图 7d). 因此, 本实验选择组装 3 层 PTC-NH<sub>2</sub>/PB 复合膜.

### 2.4.2 缓冲溶液 pH 值的影响

本文考察了测试缓冲溶液不同 pH 值对电极响应的影响. 由图 8 可知, 当 pH 值从 4.0 增加到 5.5 时, 电极响应电流随之增加; 当 pH 值从 5.5 增加到 7.0 时, 电流值反而降低, 这是由于在中性或弱碱性溶液中, PB 易溶解导致其氧化还原峰电流降低<sup>[21]</sup>. 结果表明, 当 pH=5.5 时电极响应电流值最大. 因此, 本实验选择测试缓冲溶液的 pH 值为 5.5.

### 2.4.3 温度的影响

温度是影响免疫反应的一个重要因素. 如图 9 所示, 随着测试温度的逐渐增加, 响应电流值也逐渐增大. 当温度增至 35 °C 时响应电流达到最大值, 之后电流响应

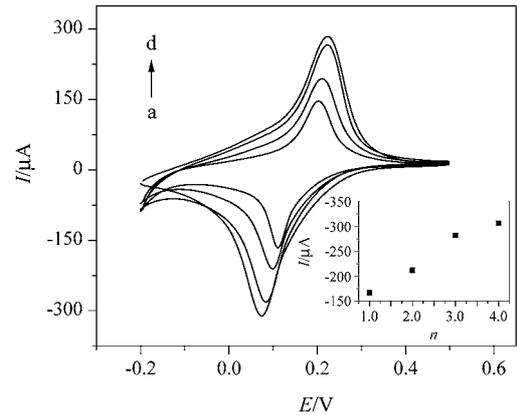


图 7 多层 {PTC-NH<sub>2</sub>/PB}<sub>n</sub> 复合膜修饰电极的循环伏安图

Figure 7 Cyclic voltammograms of the {PTC-NH<sub>2</sub>/PB}<sub>n</sub> multi-layered electrode

(a)  $n=1$ , (b)  $n=2$ , (c)  $n=3$ , (d)  $n=4$ . The inset shows the dependence of peak currents on the each layer numbers ( $n$  denotes the number of {PTC-NH<sub>2</sub>/PB}<sub>n</sub> layers). All curves were registered in PBS buffer (pH 5.5). Potential scan rate was 50 mV/s

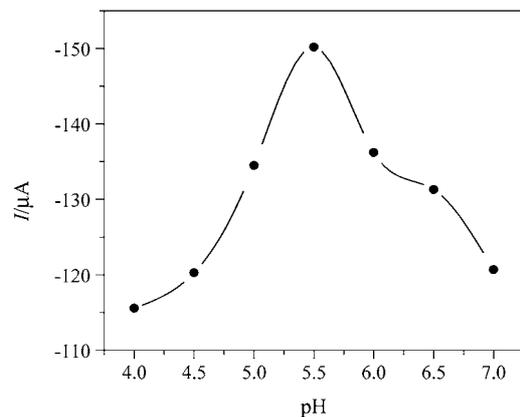


图 8 缓冲溶液不同 pH 值对电极响应的影响

Figure 8 Influence of pH of the working buffer on the sensor response. All potentials are given vs. SCE

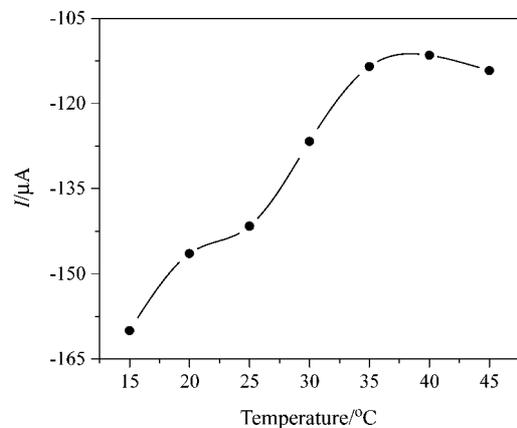


图 9 温度对免疫反应的影响

Figure 9 Effect of the temperature on the immunoreaction. All potentials are given vs. SCE

值开始降低. 这是由于当接近人体环境温度时, 最适合免疫反应的充分进行. 然而, 当温度过高时, 易导致蛋白质失活. 基于以上考虑, 本实验选择 25 °C 作为测试温度.

#### 2.4.4 孵育时间的影响

在 25 °C 条件下, 将免疫电极与 8 ng/mL PSA 抗原标准溶液依次孵育不同时间, 然后在 pH 值为 5.5 的 PBS 溶液中进行循环伏安检测. 如图 10 所示, 免疫电极响应电流值随着孵育时间的增加而逐渐增大, 30 min 后出现平台, 说明免疫反应达到饱和. 因此, 本文选择孵育时间为 30 min.

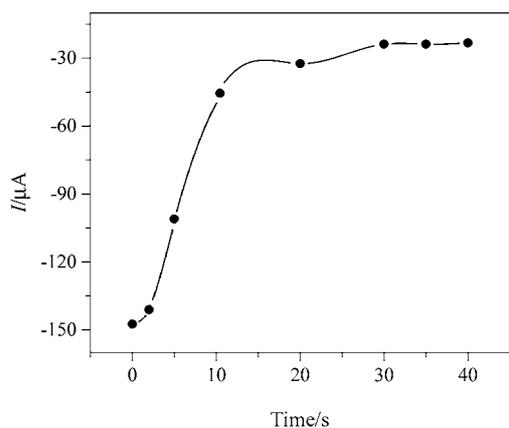


图 10 孵育时间的影响

**Figure 10** Effect of incubation time on the response signals. All potentials are given vs. SCE

## 2.5 免疫传感器的响应性能

### 2.5.1 免疫传感器对 PSA 抗原的响应

在最优的实验条件下, 将免疫传感器放在含有不同浓度 PSA 抗原的标准溶液中孵育, 30 min 后取出并在 pH 为 5.5 的 PBS 溶液中进行循环伏安检测. 图 11 为该电极的响应曲线, 其响应电流变化( $\Delta I$ )随抗原浓度的增加而逐渐增大. 在 0.5~16 ng/mL 范围内, 该免疫传感器呈良好的线性响应. 其还原峰电流变化值和浓度的线性响应方程为:  $y = 10.528x + 6.878$ , 相关系数为 0.985. 该免疫传感器在空白溶液中连续扫描 15 次, 其还原峰电流值的标准偏差为 0.071, 故该免疫传感器的检测限为 0.02 ng/mL.

### 2.5.2 免疫传感器的抗干扰性

免疫传感器的抗干扰性是衡量免疫传感器实用性的重要指标之一. 将制备好的电极分别与(i)含有 8 ng/mL PSA 抗原的标准溶液; (ii)含有 8 ng/mL PSA 抗原以及干扰物质的溶液; (iii)只含有干扰物质的溶液各孵育 30 min, 取出用循环伏安检测并分别记录响应电流值. 加入的干扰物质有: 乙肝表面抗原(10 ng/mL)、甲胎

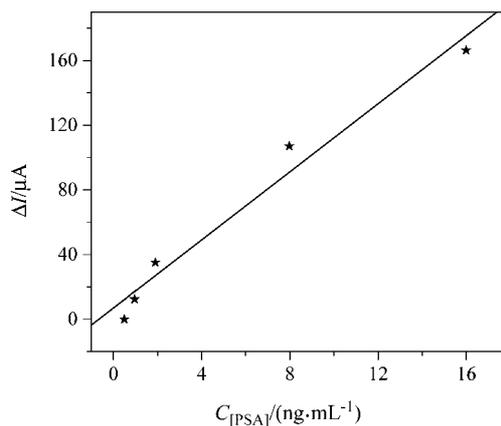


图 11 免疫传感器的响应曲线

**Figure 11** Calibration plots of the changes of cathodic peak current response vs. concentration of PSA with the immunosensor under optimal conditions

蛋白抗原(10 ng/mL)、癌胚抗原(10 ng/mL)、乙肝核心抗原(10 ng/mL)、L-半胱氨酸(50 nmol/mL)、L-谷氨酸(50 nmol/mL)、抗坏血酸(10 ng/mL)以及牛血清白蛋白(10 mg/mL). 结果发现, 在(iii)溶液中孵育的电极在孵育前后响应电流基本保持不变; 而在(i), (ii)溶液中孵育的电极在孵育前后响应电流变化值( $\Delta I$ )分别为 106.27 和 104.43  $\mu\text{A}$ , 相对测量误差为 1.73%, 重复上述操作 10 次, 得到相对平均测量误差为 1.68%. 以上实验结果表明, 制备的免疫传感器抗干扰力强, 对 PSA 具有良好的选择性.

### 2.5.3 免疫传感器的稳定性

免疫传感器的稳定性是影响其应用和发展的关键因素. 将免疫电极置于 pH 为 5.5 的 PBS 溶液中连续扫描 50 圈, 其还原峰电流响应值的标准偏差  $\text{RSD} < 3.3\%$ . 在不用时, 将电极悬置于缓冲溶液上方, 4 °C 冰箱中保存, 每隔 3~5 d 对其在相同测试液中进行测定, 经过 15 d, 电极响应信号基本保持不变; 30 d 后电极的响应电流开始有所下降, 达到初始值的 92.3%; 到 60 d 时电极的响应电流为初始值的 87.6%. 实验结果表明, 该免疫传感器具有优异的稳定性. 这主要是由于修饰过程中形成的 PTC-NH<sub>2</sub>/PB 复合膜可以有效地防止 PB 的泄露, 且纳米金具有强吸附效应, 能将 anti-PSA 牢牢地固定在电极表面, 并保持其良好的生物活性.

## 2.6 免疫传感器回收率的测定

利用 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 缓冲溶液将标准 PSA 抗原稀释, 配制成含不同浓度 PSA 抗原的待测样品. 再将免疫传感器置于样品溶液中孵育, 30 min 后取出用 CV 检测并分别记录响应电流值, 结果列于表 1. 如表 1 所示, 该免疫电极的回收率为 96.0%~105.0%, 表明

该免疫传感器可用于人体血清中 PSA 的临床初步检测.

表 1 免疫传感器的回收率测试结果

Table 1 Recovery of prepared immunosensor

Sample number	Standard value/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	Determined value/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	Recovery/%
1	2.0	2.1	105.0
2	5.0	4.8	96.0
3	8.0	7.8	97.5
4	10.0	10.3	103.0

## 2.7 免疫传感器用于人体血清的检测

将该免疫传感器用于对 20 个人体血清样品中 PSA 含量的测定, 并与 ELISA 法的测定结果进行比较, 部分实验结果列于表 2. 从表 2 可知, 该免疫传感器测定结果与 ELISA 法测定结果的相对误差为 -6.60% ~ +6.25%, 表明二者具有较好的相关性, 该免疫传感器可用于临床上对 PSA 的初步检测.

表 2 不同方法对血清样品的检测结果

Table 2 Experimental results of different methods obtained in serum samples

Detection methods		Number of the serum samples							
		1	2	5	8	12	15	18	20
Immunosensor	Current response, $\Delta I/\mu\text{A}$	53.72	35.33	28.54	17.41	21.16	40.53	47.25	27.65
	Concentration detection/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	4.45	2.70	2.06	1.00	1.36	3.20	3.83	1.97
ELISAs/(ng·mL <sup>-1</sup> )		4.60	2.55	2.13	1.04	1.28	3.12	3.93	2.10
Relative error/%		-3.26	+5.88	-3.29	-3.85	+6.25	+2.56	-2.54	-6.60

## References

- Frank, H. W.; Carol, D. C.; Jody, A. B. *Clin. Chim. Acta* **2002**, 326, 81.
- William, A. S. *Eur. Urol. (Supplements)* **2002**, 1, 17.
- Zhang, B.; Fu, W.-L.; Mao, Q.-G.; Zhang, X.; Chen, M.; Jiang, T.-L.; Yu, F. *Chin. J. Lab. Med.* **2003**, 26, 420 (in Chinese).  
(张波, 府伟灵, 毛琼国, 张雪, 陈鸣, 蒋天伦, 俞凡, 中华检验医学杂志, **2003**, 26, 420.)
- Ilkka, H.; VeliMatti, M. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2001**, 38, 441.
- Jie, M.; Ming, C.-Y.; Jing, D.; Cheng, L. S.; Na, L.-H.; Jun, F.; Xiang, C.-Y. *Electrochem. Commun.* **1999**, 1, 425.
- Li, X.-L.; Yuan, R.; Chai, Y.-Q.; Zhang, L.-Y.; Zhuo, Y.; Zhang, Y. *J. Biotechnol.* **2006**, 123, 356.
- Ionescu, R. E.; Gondran, C.; Gheber, L. A.; Cosnier, S.; Marks, R. S. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 6808.
- Zhuo, Y.; Yuan, R.; Chai, Y.-Q.; Zhang, Y.; Li, X.-L.; Wang, N.; Zhu, Q. *Sensor. Actuators B* **2006**, 114, 631.
- Maunaert, E.; Daenens, P. *Analysis* **1994**, 119, 2221.
- Zhuo, Y.; Yuan, R.; Chai, Y.-Q.; Sun, A.-L.; Zhang, Y.; Yang, J.-Z. *Biomaterials* **2006**, 27, 5420.
- Li, N.; Yuan, R.; Chai, Y.-Q.; Chen, S.-H.; An, H.-Z.; Li, W.-J. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 8443.
- Xian, Y.-Z.; Hua, Y.; Liu, F.; Xian, Y.; Feng, L.-J.; Jin, L.-T. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2827.
- Xue, M.-H.; Xu, Q.; Zhou, M.; Zhu, J.-J. *Electrochem. Commun.* **2006**, 8, 1468.
- Gustafsson, J. B.; Moons, E.; Widstrand, S. M.; Johansson, L. S. O. *Surf. Sci.* **2006**, 600, 4758.
- Forrest, S. R. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1793.
- Li, X.-L.; Yuan, R.; Chai, Y.-Q.; Zhu, Q.; Zhang, L.-Y.; Wang, N. *Acta Chim. Sinica* **2006**, 64, 325 (in Chinese).  
(黎雪莲, 袁若, 柴雅琴, 朱强, 张凌燕, 王娜, 化学学报, **2006**, 64, 325.)
- Frens, G. *Nat. Phys. Sci.* **1973**, 241, 20.
- Ou, G.-P.; Song, Z.; Gui, W.-M.; Zhang, F.-J. *Spectrosc. Spect. Anal.* **2006**, 26, 753 (in Chinese).  
(欧谷平, 宋珍, 桂文明, 张福甲, 光谱学与光谱分析, **2006**, 26, 753.)
- Cheng, K.-C.; Kai, J.-J.; Chen, F.-R. *Electrochim. Acta* **2007**, 52, 6554.
- Chai, R.; Yuan, R.; Chai, Y.-Q.; Li, X.-L.; Cao, S.-R.;

Zhang, L.-Y.; Chen, S.-H. *J. Southwest Univ. (Nat. Sci. Ed.)* **2007**, *29*, 53 (in Chinese).  
(柴荣, 袁若, 柴雅琴, 黎雪莲, 曹淑瑞, 张凌燕, 陈时红,

西南大学学报(自然科学版), **2007**, *29*, 53.)  
21 Mattos, I. L.; Gorton, L.; Laurell, T.; Malinauskas, A.; Karyakin, A. A. *Talanta* **2000**, *52*, 791.

(A0801091 Chen, J.; Fan, Y.)