

## Amperometric Immunosensor for Anti-IgG Antibody Based on a Glassy Carbon Electrode Modified with Multiwall Carbon Nanotubes\*

ZHANG Dong-dong<sup>1</sup>, QI Hong-lan<sup>1\*</sup>, LI Xiao-rong<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science of Shanxi Province,  
School of Chemistry and Materials Science, Shanxi Normal University, Xi'an 710062, China;  
2. Medical Department, Shanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shanxi 712046, China

**Abstract**: A highly sensitive amperometric immunosensor for anti-IgG antibody based on a glassy carbon electrode modified with multiwall carbon nanotubes (MWNT) was developed. A MWNT layer formed on a glass carbon electrode was utilized as a sensing platform for the immobilization of IgG antigen and a competitive immunoreaction occurred while analyte anti-IgG antibody and horseradish peroxidase (HRP)-labeled anti-IgG antibody competed for the surface-immobilized IgG antigen binding sites. The catalytic reduction current at +0.030 V (vs. SCE), which was produced in the reaction of hydroquinone with hydrogen peroxide in the presence of HRP, was linear over a range from 0.30 to 10  $\mu\text{g/mL}$  anti-IgG antibody with a detection limit of 0.11  $\mu\text{g/mL}$ .

**Key words**: amperometric immunosensor; multiwall carbon nanotubes; anti-IgG antibody; horseradish peroxidase

EEACC:7230J

## 碳纳米管组装电化学免疫传感器测定 IgG 抗体的研究\*

张东东<sup>1</sup>, 漆红兰<sup>1\*</sup>, 李小蓉<sup>2</sup>

1. 陕西省生命分析化学重点实验室, 陕西师范大学化学与材料科学学院, 西安 710062;  
2. 陕西中医学院药理学系, 陕西 咸阳 712046

**摘要**: 应用吸附法将 IgG 抗原固定于多壁碳纳米管修饰的玻碳电极表面, 制备用于 IgG 抗体检测的电化学免疫传感器。以辣根过氧化物酶为标记物, 对苯二酚为底物, 利用辣根过氧化物酶标记 IgG 抗体与待测 IgG 抗体竞争电极表面固定的 IgG 抗原, 建立了免疫竞争法检测 IgG 抗体的高灵敏度电化学分析方法。碳纳米管的大比表面积和电化学催化作用, 提高了分子识别物质的固定量和电化学检测的灵敏度。工作电位为 +0.030 V (vs. SCE) 时, 响应电流与 IgG 抗体浓度在 0.30 ~ 10  $\mu\text{g/mL}$  范围内呈良好的线性关系, 检出限为 0.11  $\mu\text{g/mL}$ 。

**关键词**: 电化学免疫; 碳纳米管; IgG; 辣根过氧化物酶

中图分类号: TP212.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-1699(2008)05-0719-05

生物识别分子的固定化影响免疫传感器的灵敏度和稳定性, 是构建性能优良免疫传感器的关键<sup>[1]</sup>。近年来, 利用纳米粒子的大比表面积和对电活性物质的催化特性, 基于纳米粒子组装的电化学免疫传感器已引起了人们的广泛关注。国内湖南大学的俞汝勤研究小组、南京大学的鞠煌先研究小组、

西南大学的袁若等利用金纳米粒子<sup>[2-10]</sup>、TiO<sub>2</sub> 纳米粒子<sup>[11]</sup> 修饰电极, 制备了一系列性能优良的电化学免疫传感器。碳纳米管因其良好的电化学性能和大比表面积, 在电化学生物传感器的研制中得到广泛的研究。利用碳纳米管修饰电极研制电化学免疫传感器也得到人们的关注<sup>[12-14]</sup>。Rusling 等人将单

基金项目: 国家自然科学基金资助 National Science Foundations of China(90607016)

收稿日期: 2007-08-11 修改日期: 2007-12-15

壁碳纳米管定向组装在石墨电极上,吸附法固定生物素抗体于单壁碳纳米管修饰电极上,建立了直接法检测辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)标记的生物素和竞争法检测生物素的电化学酶联免疫分析<sup>[13]</sup>。同时该研究小组在碳纳米管修饰电极上共价固定人血清白蛋白抗体,建立了竞争法测定人血清白蛋白的电化学酶联免疫分析<sup>[14]</sup>。电化学酶联免疫分析法(Electrochemical Enzyme-linked Immunoassay, EIA)是将酶催化反应的放大作用和抗原抗体亲和反应的高专一性、特异性结合的免疫分析方法,具有很高的灵敏度。其中辣根过氧化物酶,对底物的要求便宜、无毒、易于制备、稳定性和溶解性好,在电化学免疫分析中得到广泛应用<sup>[15]</sup>。

本文应用吸附法将 IgG 抗原固定于多壁碳纳米管修饰的玻碳电极表面,以辣根过氧化物酶为标记酶,对苯二酚为电化学检测底物,研制了测定 IgG 抗体的碳纳米管修饰电极,用于 IgG 抗体含量的测定。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

BAS 100 B/W 电化学工作站(Bioanalytical System, INC, USA)。三电极系统:玻碳电极(GCE,  $\phi = 3 \text{ mm}$ )或碳纳米管修饰的玻碳电极(MWNT/GCE)为工作电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,铂电极为对极。扫描电子显微镜(SEM, Quanta200, Philips-FEI 公司)。

对苯二酚(HQ, 西安化学试剂厂)溶液当天配制,使用时用 0.10 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH = 7.0)稀释;30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液,购自西安化学试剂厂;人 IgG 和多克隆羊抗人 IgG 抗体购自 Sigma 公司;HRP、HRP 标记多克隆羊抗人 IgG 抗体溶液购自华美生物有限公司;其他试剂均为分析纯。

5.0 mg/mL HRP 溶液:称取 HRP 5.0 mg,用 0.10 mol/L PBS (pH = 7.0) 溶解并定容至 1.0 mL,使用时用 0.10 mol/L PBS (pH = 7.0) 逐级稀释,4 °C 冰箱保存。1.0 mg/mL 人 IgG 和多克隆羊抗人 IgG 抗体用 0.10 mol/L PBS (pH = 7.0) 配制,置于冰箱中 4 °C 保存。使用时用 0.10 mol/L PBS (pH = 7.0) 逐级稀释。

HRP 标记多克隆羊抗人 IgG 抗体溶液(1:1 000):使用时用 0.10 mol/L PBS (pH = 7.0) 稀释。1.5% BSA 封闭液用 0.10 mol/L PBS (pH = 7.0) 配制。

### 1.2 免疫传感器的制备

MWNT 的处理和 MWNT/GCE 电极的制备同

文献<sup>[16]</sup>。将制备的 MWNT/GCE 修饰电极浸入 0.050 mg/mL 人 IgG 溶液中 15 min,室温下吸附法固定 IgG,0.10 mol/L PBS (pH = 7.0) 冲洗电极表面,冲洗掉未吸附的 IgG,得到 IgG 修饰的碳纳米管电极(IgG/MWNT/GCE),4 °C 放于冰箱中备用。

### 1.3 免疫分析方法

采用竞争酶联免疫法进行待测抗体的测定。首先将 IgG/MWNT/GCE 浸入 1.5% BSA 溶液中饱和 10 min,减少抗体在电极上的非特异性吸附;0.10 mol/L PBS 冲洗电极后,将 IgG/MWNT/GCE 浸入含不同浓度的待测 IgG 抗体和稀释度为 10:10<sup>6</sup> HRP 标记抗体的混合溶液中,37 °C 免疫反应 15 min。然后用 0.10 mol/L PBS 冲洗电极表面,冲洗掉吸附的 IgG 抗体和 HRP 标记 IgG 抗体。免疫反应后的电极在含 1.5 × 10<sup>-3</sup> mol/L 对苯二酚和 2.0 × 10<sup>-3</sup> mol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 0.10 mol/L PBS (pH = 7.0) 溶液中进行电化学测量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 碳纳米管组装电化学免疫传感器测定 IgG 抗体

利用物理吸附法将人 IgG 固定在 MWNT/GCE 电极表面, MWNT/GCE 吸附 IgG 前后的 SEM 如图 1 所示。从图 1(a) 可以看出电极表面管状、不规则排布的 MWNT;吸附固定 IgG 后,有白色絮状物质覆盖在管状的 MWNT 表面(图 1b),说明 IgG 吸附固定在 MWNT/GCE 电极表面。

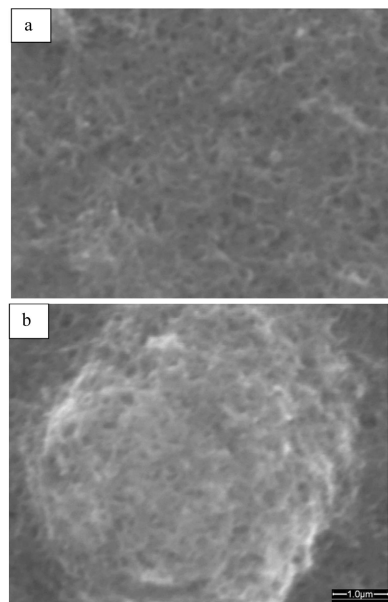


图 1 MWNT/GCE 吸附 IgG 前后的 SEM

(a) 吸附前, (b) 吸附后

SEM of MWNT/GCE surface (a) and IgG/MWNT/GCE surface (b)

图 2 为 IgG/MWNT/GCE, IgG/MWNT/GCE 与 HRP 标记抗体免疫反应后的电极及 IgG/MWNT/GCE 与待测 IgG 抗体和 HRP 标记抗体竞争免疫反应后的电极,在  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L 对苯二酚和  $2.0 \times 10^{-3}$  mol/L 过氧化氢底液中的循环伏安图。从图 2 可以看出, IgG/MWNT/GCE 在 98 和 82 mV 分别出现了一对 HQ 的氧化还原峰(曲线 a)。IgG/MWNT/GCE 与 HRP 标记的 IgG 抗体 ( $7:10^6$ ) 免疫反应后,由于 HRP 能够在  $H_2O_2$  存在下催化 HQ 氧化,使还原峰电流增加而氧化峰电流降低,表现出电化学催化行为(曲线 b)。加入待测 IgG 抗体 ( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ),还原电流减少(曲线 c),这时由于待测 IgG 抗体和 HRP 标记抗体竞争固定在电极上的 IgG 抗原,使电极上 HRP 标记抗体的量减少,从而使还原电流减少。从内插图可以看出, IgG/MWNT/GCE 在底液中有一较小的背景响应电流,电流为  $1.3 \mu\text{A}$ (曲线 a)。IgG/MWNT/GCE 与 HRP 标记的 IgG 抗体免疫反应后,还原电流增加为  $5.2 \mu\text{A}$ (曲线 b),为免疫反应后电极上的 HRP 对底物产生的催化电流。加入待测 IgG 抗体,还原电流减少为  $3.2 \mu\text{A}$ (曲线 c)。还原电流与待测溶液中 IgG 抗体的浓度成反比,基于此可以进行待测 IgG 抗体的定量测定。

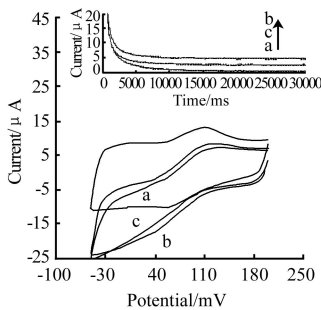


图 2 免疫反应前后不同电极的循环伏安图(内插图:免疫反应前后不同电极的计时电流图)

Cyclic voltammery profiles in  $0.10 \text{ mol/L}$  PBS ( $\text{pH} = 7.0$ ) containing  $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  HQ and  $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$   $H_2O_2$  (Insert: Chronoamperometric profiles at a potential of  $+0.030 \text{ V}$ )

- (a) at IgG/MWNT/GCE blocked by 1.5 % BSA
- (b) at IgG/MWNT/GCE blocked by 1.5 % BSA incubated with  $7:10^6$  HRP-Anti-IgG
- (c) at IgG/MWNT/GCE blocked by 1.5 % BSA incubated with  $7:10^6$  HRP-Anti-IgG and  $1.0 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$  Anti-IgG

2.2.1 实验条件的选择

基于 HRP 催化过氧化氢氧化对苯二酚的催化

行为,建立测定抗体的分析方法。实验中首先考察碳纳米管用量、过氧化氢浓度、对苯二酚浓度和电位对 HRP 催化过氧化氢氧化对苯二酚的催化电流的影响。结果表明,当碳纳米管用量为  $20 \mu\text{L}$ ,过氧化氢浓度为  $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ,对苯二酚的浓度为  $1.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ,响应电流最大。在  $-0.10 \sim +0.40 \text{ V}$  之间考察了电位对响应电流的影响,结果见图 3。从图 3 可以看出,工作电位在  $+0.30 \sim +0.15 \text{ V}$  范围内变化时,随着电位的负移,响应电流几乎保持不变;当工作电位在  $+0.15 \sim +0.030 \text{ V}$  范围内变化时,响应电流随工作电位的负移显著增加;继续降低工作电位,响应电流基本保持稳定。实验中选择碳纳米管用量为  $20 \mu\text{L}$ ,过氧化氢浓度为  $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ,对苯二酚的浓度为  $1.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ,工作电位为  $+0.030 \text{ V}$ 。

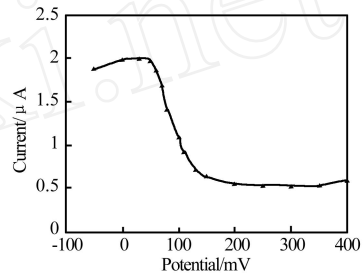


图 3 工作电位对催化电流的影响

Effect of applied potentials on the catalytic currents in  $0.10 \text{ mol/L}$  PBS ( $\text{pH} = 7.0$ ) containing  $1.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  HQ and  $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$   $H_2O_2$  in the presence of  $1.0 \times 10^{-8} \text{ g/mL}$  HRP

**吸附时间的选择** 固定酶标抗体的稀释度为  $7:10^6$ ,考察抗原在电极上的吸附时间对响应电流的影响,结果表明还原电流随着吸附时间的增加,迅速增加,15 min 达到最大,此后随着吸附时间的继续增加,电流几乎不发生较大的变化。这表明吸附 15 min 后,电极上 IgG 吸附达到饱和。实验中我们选择 IgG 的吸附时间为 15 min。

**免疫反应时间的选择** 实验中我们考察了竞争免疫反应时间对电化学响应的影响。实验结果表明,还原电流随着免疫反应时间的增加,迅速减小,竞争免疫反应 15 min 后,随着免疫反应时间的增加,电流达到稳定。说明 15 min 后,抗体和 HRP 标记抗体的竞争反应达到平衡。实验中选择竞争免疫反应时间为 15 min。

**HRP 标记抗体浓度的选择** 由于免疫传感器是基于待测 IgG 抗体和 HRP 标记 IgG 抗体竞争吸附在电极上的一一定量的 IgG 抗原,根据电极上 HRP

标记抗体量的变化进行待测 IgG 抗体的测定,因而免疫混合液中 HRP 标记抗体的浓度直接影响响应电流。实验中考察 HRP 标记抗体的量对电化学响应的影响,结果表明当 HRP 标记抗体的稀释比为  $10:10^6$  时,响应电流达到稳定(图 4)。实验中选择 HRP 标记抗体的稀释比为  $10:10^6$ 。

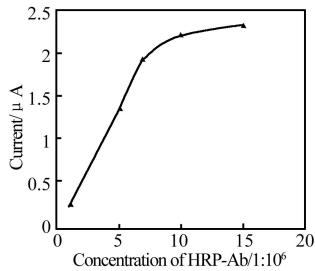


图 4 HRP 标记抗体浓度对响应电流的影响

Effect of HRP-Anti-IgG concentrations on the current responses at IgG/MWNT/GCE blocked by 1.5% BSA incubated with HRP-Anti-IgG and  $3.0 \times 10^{-6}$  g/mL Anti-IgG

The determined conditions are 0.10 mol/L PBS (pH = 7.0) containing  $1.5 \times 10^{-3}$  mol/L HQ and  $2.0 \times 10^{-3}$  mol/L  $H_2O_2$  at a potential of +0.030 V

### 2.2.2 传感器的响应

在以上优化的实验条件下,利用竞争免疫法进行待测 IgG 抗体的电化学免疫测定。待测 IgG 抗体浓度在  $0.10 \sim 25 \mu\text{g/mL}$  之间变化时,响应电流与待测 IgG 抗体浓度的关系曲线如图 5。从图 5 可以看出,响应电流与待测 IgG 抗体的浓度在  $0.30 \sim 10 \mu\text{g/mL}$  内呈良好的线性关系,线性方程为  $I(\mu\text{A}) = 6.32 - 1.03 \lg C(\text{ng/mL})$ ,相关系数为 0.9961。检出限为  $0.11 \mu\text{g/mL}$ 。实验用与待测 IgG 抗体等物质的量的鸡蛋卵清白蛋白作空白对照试验,结果表明,鸡蛋卵清白蛋白的非特异性吸附所引起的电

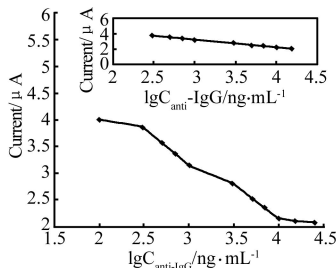


图 5 抗体浓度与响应电流的关系曲线图

Dependence of current response on the concentration of anti-IgG antibody IgG/MWNT/GCE blocked by 1.5% BSA incubated with  $10:10^6$  HRP-Anti-IgG and  $3.0 \times 10^{-6}$  g/mL Anti-IgG

The determined conditions are same as Fig. 4

流响应仅为 IgG 抗体响应的 5.1%。表明传感器的特异性较好。

对浓度为  $5.0 \times 10^{-7}$  g/mL 的 IgG 抗体做 11 次重复测定,得到响应值的相对标准偏差为 2.6%。分别制作 5 支免疫传感器,对  $1.0 \times 10^{-6}$  g/mL IgG 抗体测定的相对标准偏差为 3.2%。表明传感器的重复性较好。为进一步进行血清样品中 IgG 抗原的测定提供了分析模型,进一步的实验将固定抗 IgG 抗体,进行 IgG 含量的测定。

### 参考文献:

- [1] Mehrvar M, Abdi M, Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors [J], Anal. Sci., 2004, 20(8): 1113-1126.
- [2] 赵广英,邢丰峰,基于琼脂糖和纳米金的电流型免疫传感器快速检测副溶血性弧菌[J],传感技术学报,2007, 20(8): 1697-1700.
- [3] 刘丽,沈广宇,沈国励,等. 基于酪胺电聚合膜和纳米金自组装界面的甲状腺激素压电免疫传感器的研究[J],传感技术学报, 2007, 20(2): 254-257.
- [4] Wu Z S, Li J S, Luo M H, et al. A Novel Capacitive Immunosensor Based on Gold Colloid Monolayers Associated with a Sol-Gel Matrix [J], Anal. Chim. Acta, 2005, 528(2): 235-242.
- [5] 袁若,卓颖,柴雅琴,等. 基于纳米金/硫基层层自组装的新型流型酶-癌胚抗原免疫传感器[J]. 中国科学 B 辑, 2006, 36(5): 425-432.
- [6] Tang D P, Yuan R, Chai Y Q, et al. Preparation and Application on a Kind of Immobilization Method of Anti-Diphtheria for Potentiometric Immunosensor Modified Colloidal Au and Polyvinyl Butyral as Matrixes [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2005, 104(2): 199-206.
- [7] Fu Y Z, Yuan R, Tang D P, et al. Study on the Immobilization of Anti-IgG on Au-Colloid Modified Gold Electrode Via Potentiometric Immunosensor, Cyclic Voltammetry, and Electrochemical Impedance Techniques [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 40(1): 61-66.
- [8] Yuan R, Zhang L Y, Li Q F, et al. A Label-Free Amperometric Immunosensor Based on Multi-Layer Assembly of Polymerized O-Phenylenediamine and Gold Nanoparticles for Determination of Japanese B [J], Anal. Chim. Acta, 2005, 531(1): 1-5.
- [9] Tang D P, Yuan R, Chai Y Q, et al. Study on Electrochemical Behavior of a Diphtheria Immunosensor Based on Silica/Silver/Gold Nanoparticles and Polyvinyl Butyral as Matrixes [J]. Electrochemistry Communications, 2005, 7(2): 177-182.
- [10] Tang D P, Yuan R, Chai Y Q, et al. Novel Potentiometric Immunosensor for Determination of Diphtheria Antigen Based on Compound Nanoparticles and Bilayer Two-Dimensional Sol-Gel as Matrixes [J]. Anal. Bioanal. Chem, 2005, 381(3):

- 674-680.
- [11] Du D, Yan F, Liu S L, et al. Immunological Assay for Carbohydrate Antigen 19-9 Using an Electrochemical Immunosensor and Antigen Immobilization in Titania Sol-Gel Matrix [J]. J. Immunol. Methods, 2003, 283(1-2): 67-75.
- [12] Okuno J, Maehashi K, Kerman K, et al. Label-Free Immunosensor for Prostate-Specific Antigen Based on Single-Walled Carbon Nanotube Array-Modified Microelectrodes[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 22(9-10): 2377-2381.
- [13] O'Connor M, Kim S N, Killard A J, et al. Mediated Amperometric Immunosensing Using Single Walled Carbon Nanotube Forests[J]. Analyst, 2004, 129(12): 1176-1180.
- [14] Yu X, Kim S N, F Papadimitrakopoulos, et al. Protein Immunosensor Using Single-Wall Carbon Nanotube Forests with Electrochemical Detection of Enzyme Labels[J]. Mol Biosyst, 2005, 24(1): 70-78.
- [15] Lin J H, Ju H J, Electrochemical and Chemiluminescent Immunosensors for Tumor Markers[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2005, 20(8): 1461-1470.
- [16] Qi H L, Zhang C X, Simultaneous Determination of Hydroquinone and Catechol at a Glassy Carbon Electrode Modified with Multiwall Carbon Nanotubes[J]. Electroanalysis, 2005, 17(10): 832-837.



张东东(1982-),男,博士研究生,现就读于陕西师范大学化学与材料科学学院生命分析重点实验室,主要从事电化学分析和电化学生物传感器的研究工作。ddzh821010@stu.snnu.edu.cn



漆红兰(1978-),女,博士,陕西师范大学化学与材料科学学院讲师,主要从事电化学分析、电化学生物传感器和电化学发光分析法的研究。honglanqi@snnu.edu.cn

WWW.CNKI.NET