

Fabrication of Enzyme Immunosensor for Detection of Type-O FMDV-Ag Based on Poly(Thionine) Modified Screen-Printed Carbon Electrode*

DING Jianying^{1,2}, HAN Jianzhong^{2*}, GU Chunhai¹, FENG Zhimei¹

(1. College of Biotechnology and food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu Jiangsu 215500, China;)
(2. Zhejiang Gongshang University, Food Safety Key Lab of Zhejiang Province, Hangzhou 310035, China)

Abstract: A disposable electrochemical immunosensor for detection of FMDV based on the poly (thionine) modified screen-printed electrode coated with Chitosan-silica sol-gel doped with HRP-anti-FMDV has been developed in the experiment. Then the immunosensor was characterized by cyclic voltammetry (CV). According to the decrease percentage of response current, type-O FMDV-Ag could be detected. Under the optimum conditions, type-O FMDV-Ag can be rapidly detected by sigmoidal curve method and form a linear calibration between 77 to 388 ng/mL with an associated detection limit of 32 ng/mL (S/N = 3). The immunosensor had acceptable specificity, reproducibility (RSD = 5.6%), stability (the amperometric response was 89.5% of the initial response after 10 d) and accuracy (95% of the results obtained by the immunosensor were in agreement with those obtained by AGP). Therefore, the immunosensor could be hopefully used to rapidly detect type-O FMDV-Ag.

Key words: electromical immunsensor; rapid detection of FMDV-Ag (antigen of foot and mouth disease virus); screen-printed carbon electrode; polymerization of thionine

EEACC: 7230J

doi: 10.3969/j.issn.1004-1699.2010.12.001

基于聚硫堇的一次性 O 型口蹄疫抗原酶免疫传感器的研制*

丁建英^{1,2}, 韩剑众^{2*}, 顾春海¹, 冯志梅¹

(1. 常熟理工学院生物与食品工程学院, 江苏 常熟 215500;)
(2. 浙江工商大学食品质量与安全重点实验室, 杭州 310035)

摘要:将 O 型口蹄疫酶标抗体掺杂于有机-无机溶胶凝胶中,并修饰于聚硫堇的丝网印刷碳电极表面,从而制备一次性口蹄疫病毒抗原(FMDV-Ag)酶免疫传感器。试验中采用直接免疫分析法检测口蹄疫病毒抗原。根据免疫反应前后还原峰电流下降的百分率 K 值的大小实现对抗原的检测。在优化条件下,免疫传感器检测抗原的线性范围为 77 ~ 388 ng/mL,最低检出限为 32 ng/mL。免疫电极具有较好的特异性、重现性(RSD = 5.6%)、稳定性(10 d 后电流响应为初始值的 89.5%)和准确性(与 AGP 符合率为 95%)。因此,该免疫传感器有望用于 O 型口蹄疫抗原的快速检测。

关键词:电化学免疫传感器;O 型口蹄疫抗原快速检测;丝网印刷碳电极;聚硫堇

中图分类号:TP212.3

文献标识码:A

文章编号:1004-1699(2010)12-1673-06

口蹄疫(FMD)是由口蹄疫病毒(FMDV)引起的偶蹄动物的一种急性、烈性、高度接触性传染病,对人类也有一定的感染性。国际兽医局(OIE)将其列为 A 类传染病首位^[1],我国将其列一类传染病。FMDV 有 7 个血清型,且每一种血清型都有自身的

抗原性和流行病学特性不同的毒株谱系^[2]。O 型 FMDV 是提交国际参考实验室阳性临床病理标本中是最常见的 FMDV。近年来,在一些欧洲和亚洲国家相继发生流行,由于其传播途径多,传染性强,严重影响了畜牧业的发展和动物及动物产品的国际贸

项目来源:浙江省“重中之重”项目子项目资助(ZZ05-07)

收稿日期:2010-05-27 修改日期:2010-08-24

易。由于其传播速度极快,因此对口蹄疫的疫情监测关系到能否及时作出反应,而病原的快速确诊,是对疫情监测的主要技术保证,对防止口蹄疫的暴发有极为重要的意义。

目前已建立了许多口蹄疫的检测方法,主要有血清学诊断技术(包括补体结合实验、中和实验、凝集实验、免疫扩散、沉淀实验、免疫荧光技术、放射免疫试验和免疫电泳技术等),生物学试验(包括动物实验、鸡胚接种和细胞培养),分子生物学诊断技术(包括核酸杂交、等电聚焦电泳、聚合酶链式反应及核酸序列分析等)。在这些方法中得到普遍承认、采用并且广泛应用的有:补体结合实验、间接血凝试验、琼脂扩散实验、中和试验^[3]。这些检测方法各有优点,但其中有些方法检测时间长,有些方法对仪器设备、实验室设施和技术人员有较高要求。电化学免疫传感技术作为一种多学科交叉的高新检测技术,其中电化学酶免疫传感器是将酶电极的化学放大作用与免疫传感器的特异性、灵敏性相结合,检测研究效果优于普通的免疫传感器,具有更加敏感、快速、简便、经济、所用仪器设备相对简单等优点,成为环境^[4-5]、医学^[6-8]、动物医学^[9-10]和食品安全^[11-14]等领域快速检测技术的研究前沿,但对口蹄疫病毒抗原的检测,国内外尚未见报导。

硫堇(Thionine, TH)是一种吩噻嗪类染料,硫堇电聚合后比表面积大,不易流失,同时具有的电化学可逆性、稳定性及快速的电子传导能力^[15]。壳聚糖与二氧化硅形成的溶胶凝胶克服了单纯使用壳聚糖的溶胀性和无机凝胶的易脆性的缺点^[16-17],能较好用于蛋白质分子的固定并保持其活性。

本研究首先在丝网印刷电极表面电聚合硫堇,用壳聚糖-二氧化硅溶胶-凝胶将酶标记的O型口蹄疫抗体(HRP-anti-FMDV-O)固定于聚硫堇修饰电极表面,利用壳聚糖的氨基吸附酶标抗体的作用,将酶标抗体固定于电极,并保持了酶标抗体的酶催化活性和抗体的免疫活性,用聚硫堇作为酶与电极之间良好的电子传递体,首次构建了用于O型口蹄疫抗原检测的一次性酶免疫传感器。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI660C 电化学工作站(上海辰华仪器公司)、丝网印刷碳电极(浙江工商大学食品质量与安全重点实验室提供)、FA2004 电子分析天平(上海越平科学仪器有限公司)、超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、海尔冰箱(海尔集团公司)、78-1 型磁力加

热搅拌器(上海南汇电讯器材厂)、HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)、PHS-3E pH 计(上海雷磁精密仪器有限公司)、调速混匀器(太仓市科教器材厂)、移液器(大龙医疗设备(上海)有限公司)。

O型口蹄疫标准阳性抗原、O型口蹄疫标准阳性血清(中国农业科学院兰州兽医研究所)、猪瘟病毒抗原(中牧实业股份有限公司江西生物药厂)、A型口蹄疫抗原(中农威特生物科技股份有限公司)、硫堇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)、30% H_2O_2 (分析纯,中外合资上海远大过氧化物有限公司)、辣根过氧化物酶(上海伯奥生物有限公司)、醋酸缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 4.5):称取无水乙酸钠配制成 0.1 mol/L 乙酸钠溶液,然后用冰醋酸校 pH 4.5。所有实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 免疫电极的制备

称取 0.1 g 壳聚糖溶于 10 mL 1% 的乙酸溶液即制得质量浓度为 1% 的壳聚糖贮备溶液,将 150 μ L TEOS、90 μ L 乙醇,取壳聚糖溶液 100 μ L,混合超声 30 min 制备壳聚糖二氧化硅溶胶凝胶。取 5 μ L 酶标抗体与 5 μ L 壳聚糖二氧化硅溶胶凝胶混合,从中取 5 μ L 混合液涂于硫堇聚合膜修饰的电极上(电聚合硫堇的方法参考文献^[15]),然后放入干燥器中干燥,备用。

1.3 免疫电极对抗原的检测

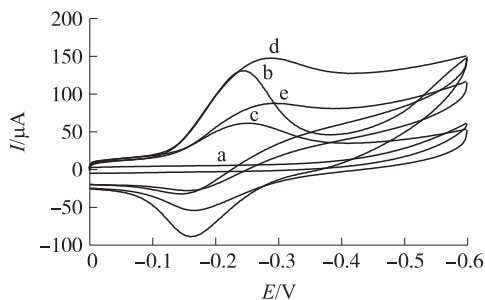
将免疫电极置于 O 型口蹄疫抗原溶液中 37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min,然后用二次蒸馏水清洗后待测。测定方法为利用循环伏安法表征电极在自组装过程中不同阶段的电化学特性。采用三电极系统,免疫电极为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝为对电极,于 5 mL pH 6 的磷酸缓冲溶液(PBS, 0.1 mol/L)中,在 0 ~ -0.6 V 电位范围内进行循环伏安扫描,扫速为 0.1 V/s。并用循环伏安法检测免疫电极在结合抗原前后在同浓度的过氧化氢中还原峰电流的变化,用还原峰电流的变化率 K 值($K = (I_1 - I_2)/I_1 \times 100\%$, I_1 、 I_2 分别为免疫电极在结合抗原前后在含过氧化氢 PBS 液中的还原峰电流)的大小对阴阳性抗原进行判断。

2 结果与讨论

2.1 修饰电极的电化学表征

2.1.1 用循环伏安法研究了电极在修饰过程中的电化学特性 用不同的修饰电极为工作电极,于 0.1 mol/L PBS (pH 6) 溶液中,在 0.0 ~ -0.6 V 电位范围内进行循环伏安扫描,所得 CV 曲线如图 1 所示。由图 1(a)可见,丝网印刷碳电极在 PBS 溶液中无氧化还原峰。当在 SPCE 上聚合了硫堇(Thi)

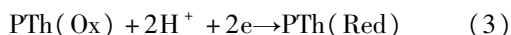
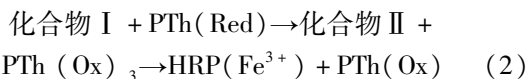
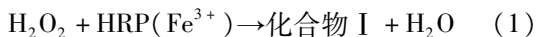
后, 出现一对明显的氧化还原峰, 峰电位为 $E_{pa} = -0.16 \text{ V}$, $E_{pc} = -0.25 \text{ V}$, $i_{pa}/i_{pc} = 1$ (图 1(b))。说明 Thi 成功聚合在电极表面, 形成了良好的导电膜, 并能发生较好的可逆反应。在滴加了有机无机溶胶凝胶酶标抗体混合物后, 氧化还原峰电流均减小(图 1c), 这是因为溶胶凝胶酶标抗体复合物阻断了电子在电极和溶液之间的传递, 使峰电流减小, 在溶液中加入过氧化氢后还原峰电流迅速增大, 氧化峰电流减小(图 1d), 显示出明显的电催化特征, 说明酶标抗体上的 HRP 对 H_2O_2 有明显的电催化还原作用, PTh 是该反应体系的有效电子转移介质。



a. 裸电极; b. 聚硫堇电极; c. 免疫电极 (SPCE/PTh-anti-FMDV-es-SiO₂; 0.1 mol/L Phosphate buffer, pH 6.0); d. 免疫电极在含 2 mmol/L H₂O₂ 的 PBS 液中; e. d 在抗原中浸泡后

图 1 不同修饰电极在 PBS 液中的 CV 图

电极催化反应^[18]如下所示:



PTh(Ox) 在电极表面还原为 PTh(Red) 从而形成催化电流。

图 1 中的 e 为免疫电极在阳性抗原溶液中浸泡 40 min 后, 对同等浓度过氧化氢的响应, 可见峰电流明显降低, 表示电极表面有抗原抗体复合物的形成, 这是该免疫电极用于检测阳性抗原的基础。

2.1.2 免疫电极的电化学行为 峰电流与扫速的关系: 免疫修饰电极在 pH 6.0 PBS 中不同扫速时的循环伏安图。从图 2 中可以看出, 在 $-0.16 \sim -0.25 \text{ V}$ 电位范围内出现一对氧化还原峰。随着扫描速度的不断增加, 峰电流值也不断地增加, 当扫描速度达到 0.2 V/s 时, 仍能得到对称性良好的循环伏安图, 表明免疫电极表现出较好的可逆性。且在 $10 \sim 200 \text{ mV/s}$ 范围内, 峰电流与扫速的平方根($v^{1/2}$)成线性关系, 这表明修饰电极在 PBS 中的电化学反应是扩散控制的, 本研究选择 0.05 V/s 的扫速进行循环伏安测定。

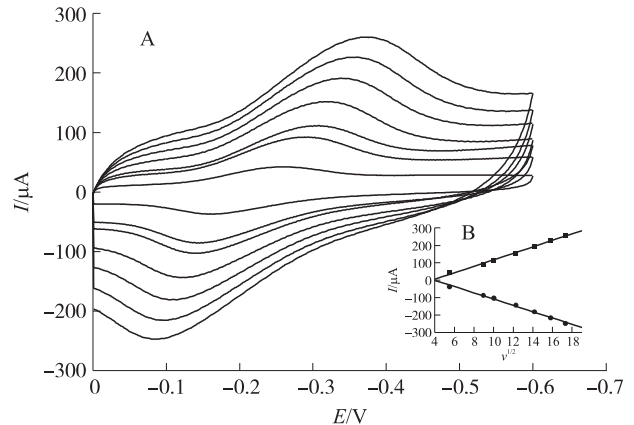


图 2 免疫电极在 PBS 液中不同扫速的 CV 图(A)及峰电流与扫速的关系图(B)

2.1.3 免疫电极对过氧化氢的催化

传感器由于利用了抗体上标记的 HRP 对过氧化氢的催化, 从而对口蹄疫抗原进行检测, 所以传感器对过氧化氢的响应要充分的灵敏。本实验研究了传感器在 PBS 溶液中对过氧化氢的计时电流响应, 如图 3 所示, 当向溶液中加入不同浓度过氧化氢时使测试底液中过氧化氢浓度逐次增加时, 计时电流也逐渐增加在 $1.5 \sim 3 \text{ mmol/L}$ 的范围内响应较为灵敏。所以本实验选用 2 mmol/L 的过氧化氢浓度。

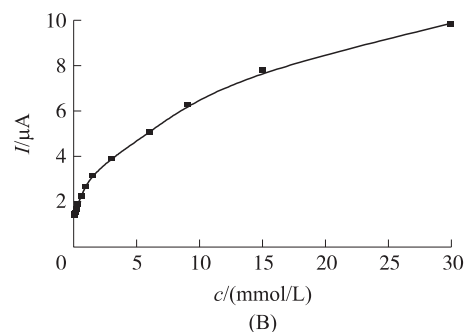
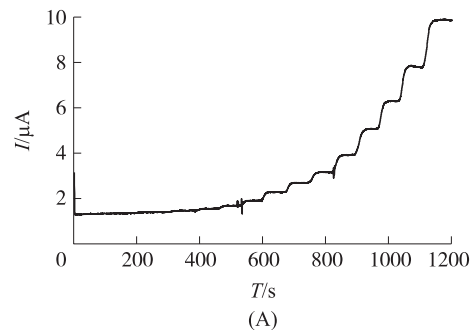


图 3 免疫电极在连续加入不同浓度 H_2O_2 时的电流-时间曲线(A)过氧化氢浓度与电流的关系(B)

2.2 免疫传感器的影响因素

2.2.1 孵育时间的选择

孵育时间是影响免疫反应的一个重要因素, 实验中将免疫传感器置于口蹄疫抗原中培育。每隔 10 min, 以 2 mmol/L 的 H_2O_2 的 PBS 为底液, 免疫电

极为工作电极,进行循环伏安扫描。作还原峰电流和培育时间之间的关系图,如图4所示。由下图可以看出:培育40 min后,峰电流基本不再改变,说明此时抗原已经基本反应完全。所以选择40 min为最佳温育时间。

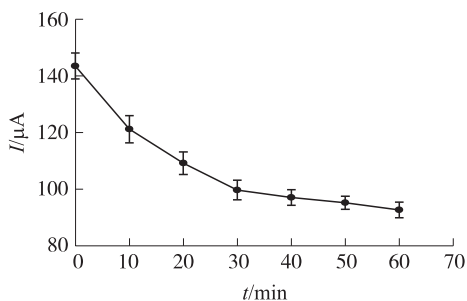


图4 孵育时间与峰电流关系

2.2.2 pH值的影响

在 H_2O_2 浓度为2 mmol/L的PBS中,传感器的电流响应随缓冲溶液pH值的变化而变化,如图5所示在pH=7时响应电流最大,当pH>7时,电流响应逐渐下降。这与HRP在中性和偏碱性酶活最大是一致的。考虑到聚硫堇的稳定性^[15],本实验采用pH6的磷酸缓冲液作为测试底液。

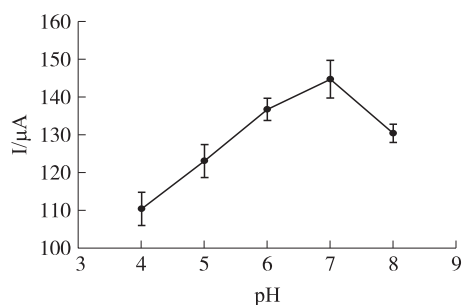


图5 免疫电极在2 mmol/L H_2O_2 的PBS中的还原峰电流与pH值的关系

2.2.3 温度的影响

检测体系的温度对免疫传感器的性能产生影响,温度为15~60℃的实验表明,随着温度的升高,修饰电极对2 mmol/L的 H_2O_2 的响应增大,如图6所示,当温度达到50℃时,由于酶部分失活而使灵敏度下降。本实验的研究温度是室温25℃。

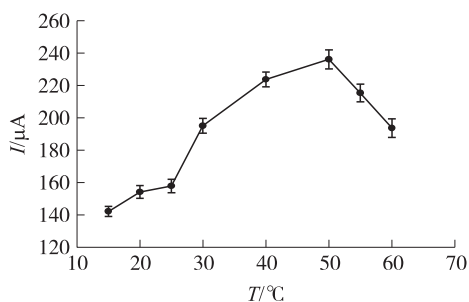


图6 温度对免疫电极还原峰电流的影响

2.3 免疫传感器对口蹄疫抗原的响应

在上述优化的条件下用该免疫传感器对不同浓度的O型口蹄疫抗原进行电化学免疫检测,用CV法检测免疫反应前后还原峰电流的降低率K值,图7中显示在浓度77~388 ng/mL之间,K值与抗原浓度呈良好的线性关系,线性方程为 $K = -1.6994 + 0.09218c$,相关系数R为0.9902,检出限为32 ng/mL(S/N=3)。

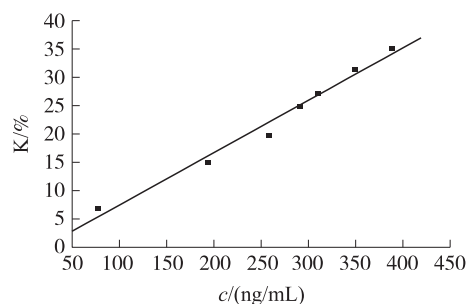


图7 免疫电极还原峰电流变化率与O型FMDV-Ag浓度的标准曲线

2.4 免疫传感器选择性

选择性是衡量免疫电极性能好坏的一个重要指标。试验中选取O型口蹄疫病毒阳性抗原(O型FMDV-Ag)、阴性抗原(FMDV-Ag 阴性)、猪瘟病毒抗原(HCV-Ag)和口蹄疫A型抗原(A型FMDV-Ag)等进行特异性试验,其结果如图8所示。从图中可以看出,免疫电极检测O型口蹄疫病毒抗原(O型FMDV-Ag)时催化电流的降低比率达到 $35.63\% \pm 1.36\%$,而检测阴性抗原的催化电流降低比率K为 $4.57\% \pm 0.45\%$ 、猪瘟病毒抗原(HCV-Ag)的催化电流降低比率K为 $6.24\% \pm 0.47\%$ 、检测口蹄疫A型抗原(A型FMDV-Ag)的催化电流降低比率K为 $6.3\% \pm 0.44\%$ 。与检测O型口蹄疫病毒阳性抗原相比,免疫电极检测其他病毒抗原的催化电流降低比率要小得多。

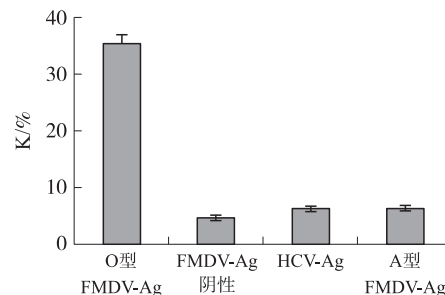


图8 免疫电极特异性(n=5)

2.5 免疫电极的重复性与稳定性

该传感器在优化条件下对阳性抗原重复测定5次还原峰电流变化率K值见表1,相对标准偏差为5.6%。同一批制备的免疫电极测定阳性抗原标准

偏差为 6.8%。实验后, 修饰电极保存在 4 ℃ 的磷酸缓冲溶液的上方, 保持其表面 HRP 及免疫物质的活性, 10 d 后电流响应为初始值的 89.5%。所以该传感器重复性及稳定性均较好。

表 1 免疫传感器测定阳性抗原的相对偏差

次数	K/%	K/% 平均值	相对偏差/%
5	35.21、36.34、36.82、33.31、32.28	34.79	5.6

在实际样品定性检测时, 我们可以根据免疫电极的峰电流降低率来定性判定口蹄疫病毒阴阳性。综合考虑各种因素, 试验初步设定当峰电流降低率 $\geq 30\%$ 时, 判定为口蹄疫抗原阳性; 当峰电流降低率 $< 20\%$ 时, 判定为口蹄疫抗原阴性; 当峰电流降低率介于 $20\% \sim 30\%$ 时为可疑样品。即

$$\begin{cases} K \geq 30\% & \text{阳性} \\ 20\% \leq K < 30\% & \text{可疑样品} \\ K < 20\% & \text{阴性} \end{cases}$$

2.6 免疫电极对抗原样品的检测

为了进一步证明 O 型口蹄疫病毒抗原(O 型 FMDV-Ag) 阴阳性判定标准的可行性, 试验采用免疫电极检测 20 份样品, 并与琼脂糖扩散 (AGP) 试验比较, 部分结果见表 2。

表 2 免疫电极准确性测定的结果 ($n = 20$)

Sample	Method		
	Immunosensor	AGP	
	K/%	Results	Results
2	35.73	+	+
4	4.89	-	-
6	37.41	+	+
8	28.88	可疑	+
10	4.55	-	-
12	32.39	+	+
14	4.25	-	-
16	4.39	-	-
18	38.56	+	+
20	4.18	-	-

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性(+ positive; - negative)

在琼脂糖扩散试验检测为阴性的 10 例中, 免疫电极检测出 10 例为阴性, 符合率为 100% (10/10)。在琼脂糖扩散试验检测为阳性的 10 例中, 免疫电极检测出 9 例为阳性, 1 例为可疑, 符合率为 90% (9/10), 对阴阳性抗原的判断总符合率为 95% (19/20), 两法基本相符。表明该免疫电极具有较好的准确性和区分效果,

可初步用于 O 型口蹄疫病毒抗原(O 型 FMDV-Ag) 阳性的快速检测。

3 结论

本实验在丝网印刷碳电极表面电聚合硫堇, 将口蹄疫酶标抗体掺杂于壳聚糖-二氧化硅溶胶-凝胶中并修饰于聚硫堇电极表面, 从而制备了一次性口蹄疫抗原酶免疫传感器, 实验中采用循环伏安法对免疫传感器进行了表征, 并用计时电流法证实了免疫传感器对过氧化氢的催化性能。用直接法检测抗原, 将免疫传感器在标准阳性抗原液中孵育 40 min, 采用循环伏安法检测免疫传感器免疫反应前后还原峰电流的变化, 根据结合抗原前后还原峰电流的下降率 K 值的大小来实现对 O 型口蹄疫抗原的检测。在优化条件下, 免疫传感器检测抗原的线性范围为 77 ~ 388 ng/mL, 最低检出限为 32 ng/mL。该免疫传感器具有良好的特异性、重现性 ($RSD = 5.6\%$)、稳定性 (10 d 后电流响应值为初始值的 89.5%) 及准确性 (与 AGP 符合率为 95%), 因此, 该免疫传感器有望用于 O 型口蹄疫抗原的检测。

参考文献:

- [1] 江鹏斐, 赵启祖, 谢庆阁. 口蹄疫研究进展[J]. 中国农业科学, 1999, 32(6): 93-100.
- [2] Mahy B W J. Introduction and History of Foot-And-Mouth Disease Virus[J]. CTMI, 2005, 288: 1-8.
- [3] 董志强, 张志, 李晓成. 口蹄疫检测技术研究进展[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(3): 48-50.
- [4] Jens Tschmelak, Guenther Proll, Guenter Gauglitz. Immunosensor for Estrone with an Equal Limit of Detection as Common Analytical Methods[J]. Anal Bioanal Chem, 2004, 378: 744-745.
- [5] 蔡强, 余若祯, 何苗. 检测 2,4-D 的一次性安培型免疫传感器[J]. 环境科学, 2005, 26(6): 169-172.
- [6] Mya R M M, Saxena K, Roy A, et al. Design and Development of an Immunosensor for the Detection of Malaria in Field Conditions [J]. Parasitol Res, 2003, 89: 371-374.
- [7] Khiena Brainina, Alisa Kozitsina, Jakov Beikin. Electrochemical Immunosensor for Forest-Spring Encephalitis Based on Protein A labeled with Colloidal[J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 376: 481-485.
- [8] 钟桐生, 刘国东, 黄梅生. 基于溶胶-凝胶技术可更新的安培分析免疫传感器用于人血清中补体 3 的测定[J]. 分析科学学报, 2002, 18(1): 6-10.
- [9] 赵广英, 吴淑春. 基于四通道丝网印刷碳电极的禽流感 (H5N1) 抗体电化学免疫传感器的研制[J]. 传感技术学报, 2008, 21(8): 1295-1300.
- [10] 张昱, 王永录. 生物传感器在兽医临床检测中的应用[J]. 中国人兽共患病杂志, 2009, 25(2): 183-187.
- [11] 干宁, 王峰, 王鲁雁. 基于纳米磁珠修饰印刷电极的牛奶中三聚氰胺检测安培免疫传感器[J]. 传感技术学报, 2009,

- 22(4):456-460.
- [12] 武海,杨维春,马洁. 电化学免疫传感器测定牛奶中的青霉素[J]. 化学通报,2008,5:394-397.
- [13] 李孝君,李兰,马洁,等. 电化学免疫法测定猪肉组织中青霉素[J]. 化学传感器,2009,29(1):25-30.
- [14] 肖红玉,柴春彦,刘国艳,等. 检测克伦特罗的免疫生物传感器反应体系的确定[J]. 上海交通大学学报,2006,24(3):290-292.
- [15] 孔泳,穆绍林. 硫基的电化学聚合及聚硫基的性质[J]. 物理化学学报,2001,17(4):295-299.
- [16] 谭学才,王健伟,徐健君. 固载葡萄糖氧化酶的壳聚糖-二氧化硅杂化膜的制备及表征[J]. 中山大学学报(自然科学版),2004,43(4):50-53.
- [17] 谭学才,翟海云,李荫. 基于溶胶-凝胶壳聚糖/SiO₂杂化材料的安培型葡萄糖生物传感器[J]. 高等学校化学学报,2004,24(9):1645-1647.
- [18] Xiao Y, Ju H X, Chen H Y. A Reagentless Hydrogen Peroxide Sensor Based on Incorporation of Horseradish Peroxidase in Poly(Thionine) Film on a Monolayermodified Electrode [J]. Anal Chim Acta, 1999, 391(3):299-306.



丁建英(1967-),女,硕士,职称讲师,主要研究方向为食品安全快速检测,dingjianying123@tom.com;



韩剑众(1963-),男,浙江宁波人,博士,教授,博士生导师,主要研究方向为肉品品质与安全控制研究。杭州,浙江工商大学食品质量与安全系,Hanjz99@gmail.com。