

Study of Gold Nanorod Probe Based Cotton Thread Immunochromatographic Assay Device

Xun Mao^{1*}, Lili Meng²

¹College of Science, Central South University of Forestry and Technology, Changsha Hunan

²College of Chemistry and Materials Science, Northwest University, Xi'an Shaanxi

Email: *mao_xun@yahoo.com

Received: Aug. 2nd, 2019; accepted: Aug. 20th, 2019; published: Aug. 27th, 2019

Abstract

Gold nanorods have been widely used in biological analysis due to their variable aspect ratio, large specific surface area and excellent optical properties. As we known, gold nanoparticle is the most commonly used probe in traditional immunochromatographic assay technology, while the application of gold nanorods in immunochromatographic analysis has rarely been reported. In this paper, gold nanorods modified with monoclonal antibody were used to construct a novel reporter probe, and applied in cotton thread immunochromatographic assay device successfully. The method has realized rapid, sensitive and quantitative detection of human ferritin (a lung cancer biomarker). Under optimal conditions, the linear range is 5 - 5000 ng/mL, and other proteins have little interference.

Keywords

Gold Nanorods, Immunochromatographic Assay, Human Ferritin

基于金纳米棒探针的棉线免疫层析分析装置的研究

毛 勋^{1*}, 孟利利²

¹中南林业科技大学理学院, 湖南 长沙

²西北大学化学与材料科学学院, 陕西 西安

Email: *mao_xun@yahoo.com

收稿日期: 2019年8月2日; 录用日期: 2019年8月20日; 发布日期: 2019年8月27日

*通讯作者。

摘要

金纳米棒由于其可变长径比, 大比表面积和优良的光学特性已被广泛应用于生物分析领域。我们知道纳米金粒子是传统免疫层析分析技术中最为常用的一种探针, 而金纳米棒在免疫层析分析技术中的应用报道鲜见报道。本文利用金纳米棒修饰单克隆检测抗体, 构建新型信号探针, 并成功应用于棉线为载体的免疫层析分析装置中, 实现了肺癌标志物-人铁蛋白的快速, 灵敏和定量检测。最优实验条件下线性范围为5~5000 ng/mL, 其他蛋白质干扰很小。

关键词

金纳米棒, 免疫层析分析, 人铁蛋白

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肺癌是常见的恶性肿瘤, 属于最难治的实体瘤之一。据 2016 年发表的中国癌症统计数据[1]和卫生部公布的第三次全国居民死亡原因调查结果显示, 过去 30 年间, 肺癌死亡率在我国持续上升, 肺癌已成为我国最主要的恶性肿瘤死亡原因之一。由于肺癌患者的早期症状往往不显著, 大多数患者发现时已进入中晚期[2] [3] [4]。因此肺癌早期诊断及确诊就显得尤为重要。影像学资料分析是评估肺癌的常规手段, 但其不足之处在于诊断费用大, 特异性较差(64%)。而生物标志物的使用则可以有效解决这一难题[5] [6] [7]。人铁蛋白是常用的一种肺癌生物标志物, 其浓度变化能够反映肺癌的存在, 发展阶段以及特性。

近年来, 免疫分析工作者们开发了许多方法来检测上述肺癌肿瘤生物标志物, 包括电化学, 荧光, 电化学发光, 酶联免疫分析等检测手段。Sunil Kumar Arya 等人 2011 年在 Chemical Review 杂志上发表了一篇综述论文, 对近些年来检测肺癌标志物的生物传感器性能进行了比较[8]。虽然传统的生物传感器技术能够提供比较高的检测灵敏度, 但总还有这样或那样的不足, 比如说有的方法需要复杂的操作步骤, 较长的分析时间, 有的需要特别昂贵的检测设备。而一个共同的缺陷是都需要经过专门培训的人员来操作。基于此, 开发高灵敏性、高特异性、高准确率和高稳定性的可现场检测的免疫层析分析技术, 实现肺癌早期准确诊断是非常必要的。近年来我们课题组尝试采用棉线作为载体构建新型免疫层析分析装置, 实现了多种蛋白质生物标志物(人绒毛膜促性腺激素, C-反应蛋白, 癌胚抗原等)的快速检测[9]-[14]。

纳米金粒子是免疫层析分析技术中最为常用的探针, 而金纳米棒在免疫层析分析中的应用鲜见报道。本文利用金纳米棒修饰单克隆检测抗体, 形成新型信号探针, 成功应用于棉线免疫层析分析装置中, 实现了人铁蛋白的快速, 灵敏和可视化定量检测。

2. 实验材料及仪器

2.1. 实验试剂及材料

棉线(100%丝光)从西安棉线店购买。人类铁蛋白抗原、检测抗体(dAb)、捕获抗体(cAb)、癌胚抗原

(CEA)、和鳞状细胞癌抗原(SCCA)购买于上海领潮生物科技有限公司。人类血清和人类免疫球蛋白G(H-IgG)购买于北京鼎国生物科技有限公司。3-mercaptopropionic acid(MPA)购买于上海阿拉丁化学有限公司。溴化十六烷基三甲铵(CTAB)是购自天津光复精细化工研究所,NHS和EDC购买于上海生工生物工程公司。所有其他化学试剂均为分析纯试剂。所有缓冲溶液用超纯水配制。

2.2. 仪器

电子分析天平(德国赛多利斯公司, QUINTIX224-1CN); pH计(德国赛多利斯公司, PB-10/C); 恒温干燥箱(中国上海一恒科技有限公司, DHG-9005); 台式高速离心机(中国上海一恒科技有限公司, BLF-15K); 佳能扫描仪(网购); 高纯水蒸馏器(中国常州国华电器有限公司, SYZ-B); 灭菌釜(中国上海博讯工业贸易有限公司, YXQ-LS-50SII)。

3. 实验内容

3.1. 金纳米棒探针(GNRs-dAb)的制备

GNRs是通过种子生长法合成的。获得的GNRs 10000转离心30分钟分离纯化两次。1毫升金纳米棒溶液中加入一百毫升375 μM MPA反应2h形成自组装膜,然后在7800转离心20分钟。去掉上层清液,MPA-GNRs沉积物分散在1毫升去离子水中。接下来,3.3 μL 40 mg/mL EDC和2.5 μL 30 mg/mL NHS加入MPA-GNRs溶液中室温反应2h活化MPA上的羧基。调节pH=8.2,然后8 mL 2.5 mg/mL单克隆检测抗体滴加到上述溶液中室温孵化5h,6800转离心10 min弃掉上层清液。GNRs-dAb沉淀重新分散在200 μL PBST中(0.25% Tween-20)。把获得的金纳米棒探针溶液储存在4 $^{\circ}\text{C}$ 下,以供将来使用。

3.2. 构建基于金纳米棒探针的棉线免疫装置检测人铁蛋白

棉线用2 M氯化钠煮30分钟,然后分别在0.01%过氧化氢和0.01 M盐酸溶液中浸泡5分钟,用大量的超纯水清洗。最后,棉线在恒温干燥箱中37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥然后存储待进一步使用。检测区固定1 μL 1.2 mg/mL人类铁蛋白的捕获抗体(每次0.25 μL ,每一步后在37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥10分钟),然后在干燥箱37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥1h。在一个干净的塑料垫以并行方式宽约2.5厘米处贴上双面胶带。棉线粘在双面胶带上,在棉线的中间位置修饰捕获抗体,棉线的中间区域就是检测区。在棉线的一端放置一个吸水垫(2 \times 1厘米)作为毛细泵吸液体。样品垫放在棉线的另一端。进行实验时,25 μL 用缓冲液(0.01 M PBS含0.25% Tween-20)分散的含有一定浓度的人铁蛋白抗原的样品溶液添加到样品垫上,样品溶液沿着棉线向吸水垫流动。20分钟内,检测区就可以肉眼可见一条紫色条带。定量分析时,紫色的条带使用扫描仪得到高分辨率的图片再结合“ImageJ”软件分析得到定量结果。在复杂生物基质中检测人铁蛋白,如人类血清,金纳米棒探针离心后的沉淀GNRs-dAb分散在12.5 μL 血清和12.5 μL 缓冲液(PBST)的混合物中。其他的步骤与上述步骤类似。

4. 实验结果与讨论

4.1. 基于金纳米棒探针在棉线免疫层析分析装置上检测人铁蛋白

基于金纳米棒探针在棉线免疫层析分析装置上检测人铁蛋白的原理是基于棉线上的夹心免疫反应。实验中使用的棉线直径约为600 μm 。在图1中可以看到棉线粘在两个平行放置的双面胶带上,棉线的一端放置了滤纸作为吸水垫用以吸收液体,另一端黏贴了玻璃纤维膜作为样品垫。位于棉线的中间区域的检测区修饰了人铁蛋白捕获抗体。

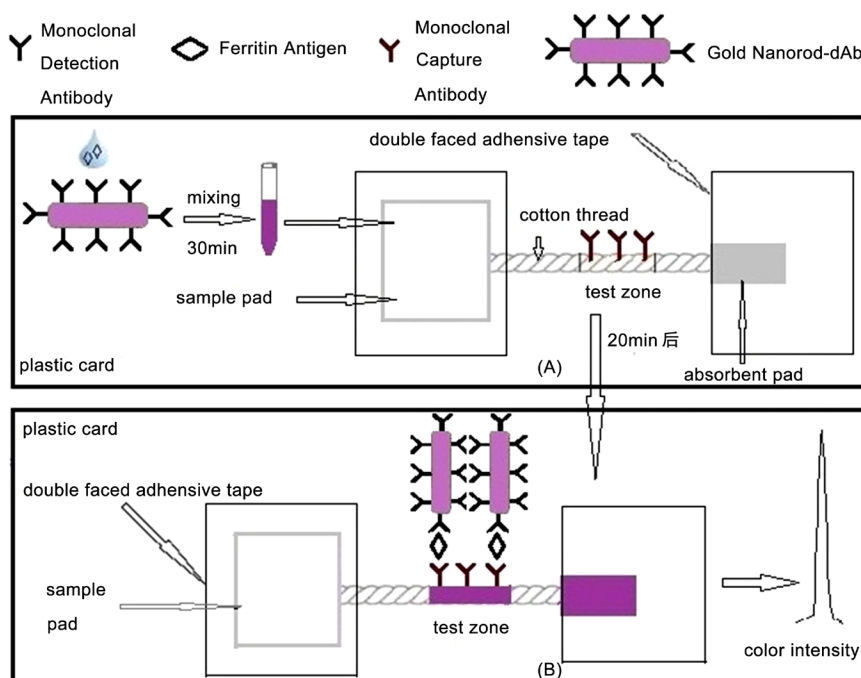


Figure 1. The principle of the gold nanorods (GNRs) based on cotton thread immunoassay device for determination of Human ferritin

图 1. 基于金纳米棒探针在棉线免疫层析分析装置上检测人铁蛋白的示意图

检测时,一定浓度的人铁蛋白溶液与修饰在金纳米棒表面的检测抗体在离心管中室温混合后再滴加到样品垫上,形成的 GNRs-dAb-Ag 复合物的混合溶液由于毛细管作用会沿着棉线流动,流经棉线的检测区时将被预先固定在检测区域的捕获抗体捕获,形成一个夹心免疫复合物 GNRs-dAb-Ag-cAb。因此,由于 GNRs 的聚集,在检测区将出现一个可视化的紫色条带(图 1(B))。产生的条带的颜色强度随着铁蛋白抗原的浓度不同而变化。使用扫描仪和图片处理软件可以进行定量分析。

图 2 显示的是金纳米颗粒作为信号探针图 2(A)和金纳米棒作为信号探针图 2(B)在棉线免疫层析分析装置上检测 0 和 5000 ng/mL 的人铁蛋白得到的结果对比图。如图 2 所示,在 5000 ng/mL 人铁蛋白存在下,金纳米棒作为信号探针时,棉线上检测区出现明显的紫色的条带,没有铁蛋白时观察不到紫色条带。而金纳米粒子作为信号探针时,不管样品溶液中是否含有人铁蛋白,棉线上检测区几乎看不到紫色的条带。相应的金纳米棒作为探针时紫色条带却很明显,这是因为金纳米棒比金纳米粒子光学性能更为优异。通过电镜表征得知,纳米金粒子尺寸为 15 nm 左右,纳米金棒长约 35 nm,直径约 12 nm。(电镜表征图略)

4.2. 实验条件优化

4.2.1. 检测区捕获抗体固定次数的影响

装置的响应性能和检测区捕获抗体的滴加次数紧密相关。如图 3 所示,黑色柱子表示的是背景信号值(样品溶液中不含有铁蛋白),灰色柱子表示的是相应的响应信号值(样品溶液中含有人铁蛋白)。当我们在检测区滴加了不同次数浓度为 1.2 mg/mL ferritin 捕获抗体(滴加次数分别为 1, 2, 3, 4),结果表明,随着捕获抗体重复次数增多,背景(黑条)和相应的响应信号(灰条)也增强。当捕获抗体的重复滴加次数为四次时,信噪比(S/N)达到最大。如果滴加次数大于四次时,由于背景信号的增大信噪比 S/N 将减小。因此选择捕获抗体的最佳滴加次数为四次。

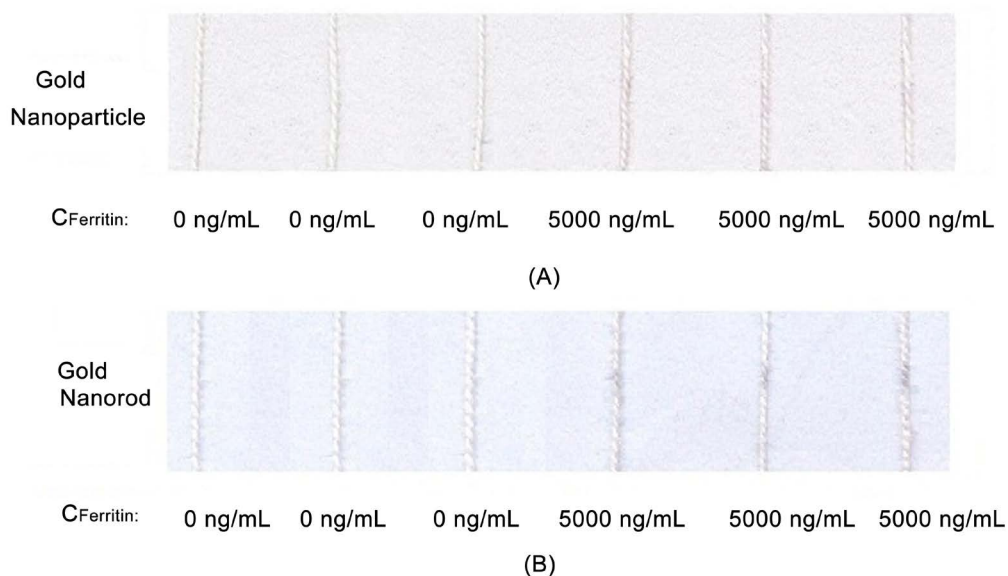


Figure 2. Comparison images in the presence of 0 and 5000 ng/mL human ferritin based on gold nanoparticle and gold nanorod as probes

图 2. 金纳米粒子和金纳米棒作为探针检测 0 和 5000 ng/mL 人铁蛋白对比图

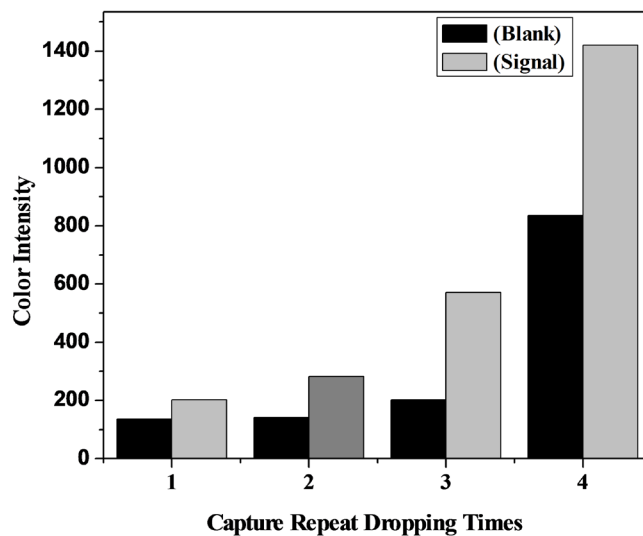


Figure 3. Dropping times of captured antibodies in the detection area

图 3. 检测区捕获抗体的滴加次数

4.2.2. 金纳米棒探针用量的影响

纳米棒金探针的用量在改善装置的灵敏度方面起着很大的作用。使用更多的金纳米棒探针将提高免疫反应效率, 产生更多免疫复合物并增强检测区条带的颜色强度。然而, 过量的金纳米棒探针将导致装置的响应信号和背景信号都增强, 这是因为探针在棉线上存在非特异性吸附。另一方面, 少量的金纳米棒探针将会减弱金纳米棒、人铁蛋白抗原和捕获抗体之间的结合效率, 这将导致更低的响应信号。如图 4 所示, 金纳米棒探针用量从 75 μL 增加到 150 μL 时, 当体积达到 125 μL 时装置的响应信号(样品溶液中有人铁蛋白)比较强, 而相应的背景信号(样品溶液中无人铁蛋白)比较低。因此确定金纳米棒探针的最优体积为 125 μL 。

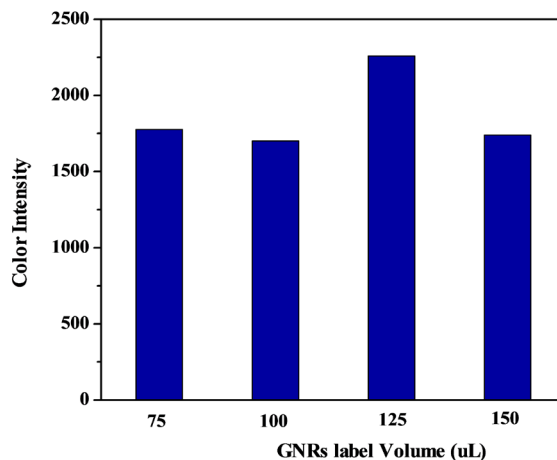


Figure 4. Effect of the amount of gold nanorod probe
图 4. 金纳米棒探针用量的影响

4.2.3. 其他蛋白质的影响

特异性是免疫传感器性能的一个重要参数。如图 5 展示了样品溶液为缓冲液(空白)、5000 ng/mL 鳞状细胞癌抗原(SCCA)、癌胚抗原(CEA)、人类免疫球蛋白(IgG)和人铁蛋白(ferritin)时得到的响应信号值对比图 5(A)和相应的棉线检测区扫描图 5(B)。我们从图 5(A)可以看到, 在 5000 ng/mL 铁蛋白存在下, 装置的响应信号非常强, 而在缓冲液(空白)、5000 ng/mL SCCA、CEA 或人类免疫球蛋白存在时的响应信号都非常小, 可以忽略。此外, 检测人铁蛋白时, 从扫描图片上也可以直接用眼睛观察到棉线的检测区出现的紫色条带(图 5(B)), 这些结果显示了基于金纳米棒探针的棉线免疫分析装置具有优良的选择性。

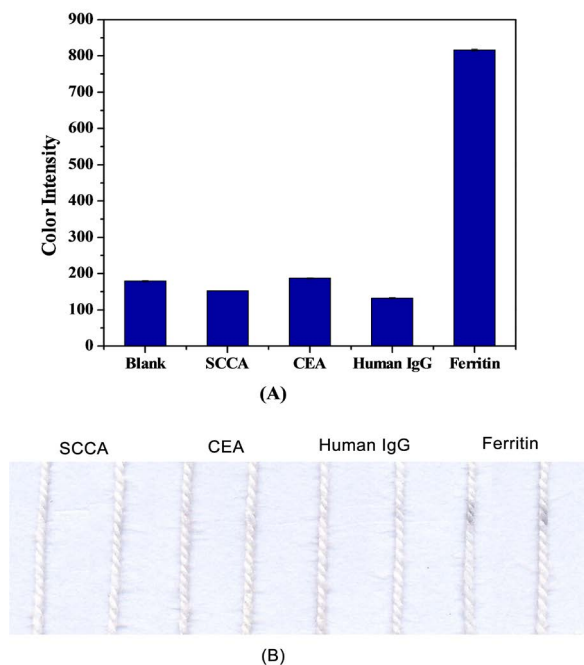


Figure 5. Responses (A) and (B) Typical photo images of the GNRs based cotton thread immunoassay device with sample solution containing PBST (Blank), 5000 ng/mL SCCA, CEA, human IgG and ferritin

图 5. 缓冲液(空白)、5000 ng/mL SCCA、CEA、人 IgG 和人铁蛋白存在时的响应信号值对比图(A)和相应的棉线检测区扫描图片(B)

4.2.4. 工作曲线

如图 6(B) (曲线 a→f)所示, 用扫描仪和“ImageJ”软件扫描棉线检测区颜色条带时, 得到的颜色强度峰面积随铁蛋白浓度的增加增加。以峰面积与人铁蛋白浓度的对数值作图得到工作曲线, 从图 6(A)可以看出信号值与人铁蛋白浓度在 5 ~ 5000 ng/mL 范围内呈良好线性关系⁷。检测限为 5 ng/mL ($S/N \geq 3$)。为了测试该装置的实用性, 我们还尝试检测人血清中的人铁蛋白(图略)。我们发现如果样品溶液只用人血清分散, 装置的灵敏度会降低, 因此用人类血清和 PBST(1:1)的混合溶液来稀释人铁蛋白标准溶液。结果表明, 采用金纳米棒探针在人血清中检测铁蛋白, 结果良好, 得到了类似于图 6 的工作曲线。

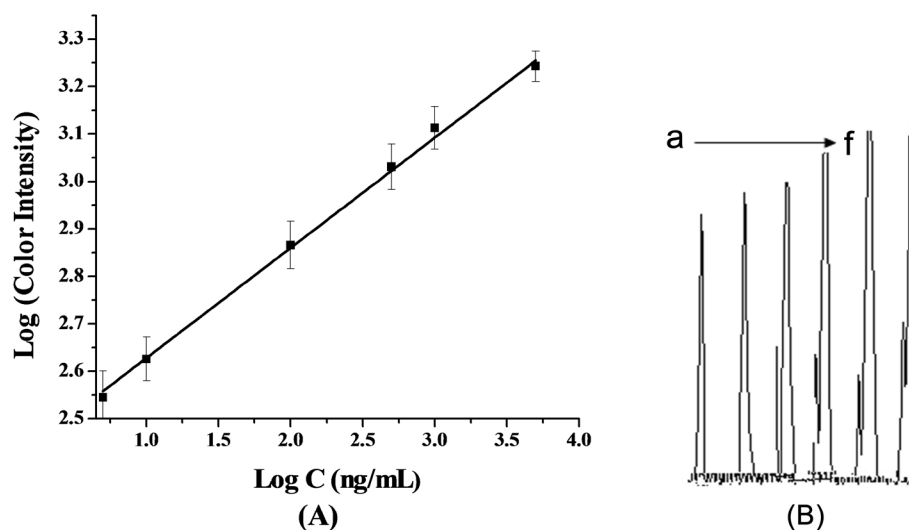


Figure 6. The resulting calibration curve (A) of the cotton thread immunoassay device employing gold nanorods in the presence of different concentration of human ferritin and corresponding peaks (B) under optimal conditions. From a to f: 5, 50, 100, 500, 1000 and 5000 ng/mL

图 6. 缓冲液中检测人铁蛋白的工作曲线(A)和检测区颜色条带的强度峰对比图(B)。人铁蛋白浓度从 a 到 f 依次为: 5、50、100、500、1000 和 5000 ng/mL

5. 结论

我们成功构建了基于金纳米棒探针的棉线免疫层析分析装置, 并用于检测人铁蛋白, 检测限可以达到 5 ng/mL。通常在金纳米棒上固定抗体是通过物理吸附来得以实现的, 但这种物理吸附结合的方式效率并不是很高。而在本研究中采用 MPA 使金纳米棒功能化, MPA 含有巯基和羧基, 巯基可以用来与金纳米棒结合, 而羧基可以使用 EDC-NHS 活化, 单克隆检测抗体与 GNRs 之间通过 MPA 共价结合在金纳米棒表面, 这样的结合方式明显提高了抗体固定效率, 也使得基于金纳米棒探针的棉线免疫层析分析装置性能更好。另外, 研究还发现, 在相同实验条件下, 基于 MPA 功能化的金纳米棒探针的棉线免疫层析分析装置比基于金纳米粒子探针的棉线免疫层析分析装置灵敏度高, 而且前者检出限远远低于后者。这应该是我们使用的金纳米棒具有更优异的光学性能所致。除此之外, 我们合成了不同长径比的金纳米棒, 有各种各样的颜色, 如蓝色的、紫色、棕色和绿色等等。因此, 以后的工作将采用不同颜色的金纳米棒同时检测多种肺癌相关的蛋白质生物标志物。

基金项目

国家自然科学基金青年项目, 项目编号: 21205094; 陕西省青年百人计划项目, 项目编号: PR12011; 中南林业科技大学人才引进项目, 项目编号: 2017YJ037。

参考文献

- [1] Chen, W.Q., Zheng, R.S., Baade, P.D., Zhang, S., Zeng, H.M., Bray, F., Jemal, A., Yu, X.Q. and He, J. (2016) Cancer Statistics in China. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **66**, 115-132. <https://doi.org/10.3322/caac.21338>
- [2] 2011 年中国卫生统计提要[EB/OL]. <https://wenku.baidu.com/view/2d96c01ffad6195f312ba661.html>
- [3] Carney, D.N. (2002) Lung Cancer-Time to Move on from Chemotherapy. *New England Journal of Medicine*, **346**, 126-128. <https://doi.org/10.1056/NEJM200201103460211>
- [4] NCCN (2011) Clinical Practice Guidelines in Oncology. <http://www.nccn.org>
- [5] 施春雷, 韩宝惠. 肿瘤标志物在肺癌诊断中的应用[C]//中国抗癌学会肺癌专业委员会. 第十二届全国肺癌学术大会论文集. 2016: 290-292.
- [6] Zamay, T.N., Zamay, G.S., Kolovskaya, O.S., Zukov, R.A., Petrova, M.M., Gargaun, A., Berezovski, M.V. and Kichkailo, A.S. (2017) Current and Prospective Protein Biomarkers of Lung Cancer. *Cancer*, **9**, 155. <https://doi.org/10.3390/cancers9110155>
- [7] Sung, H.J. and Cho, J.Y. (2008) Biomarkers for the Lung Cancer Diagnosis and Their Advances in Proteomics. *BMB Reports*, **41**, 615-625. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2008.41.9.615>
- [8] Sunil, K.A. and Shekhar, B. (2011) Lung Cancer and Its Early Detection Using Biomarker-Based Biosensors. *Chemical Reviews*, **111**, 6783-6809. <https://doi.org/10.1021/cr100420s>
- [9] Du, T.E., Wang, Y.Y., Zhang, Y., Tian, Z., Zhang, T. and Mao, X. (2015) A Novel Adenosine-Based Molecular Beacon Probe for Room Temperature Nucleic Acid Rapid Detection in Cotton Thread Device. *Analytica Chimica Acta*, **861**, 69-73. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.12.044>
- [10] Mao, X., Du, T.E., Wang, Y.Y. and Meng, L.L. (2015) Disposable Dry-Reagent Cotton Thread-Based Point-of-Care Diagnosis Devices for Protein and Nucleic Acid Test. *Biosensors and Bioelectronics*, **65**, 390-396. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.053>
- [11] Zhou, G., Mao, X. and David, J. (2012) Immunochromatographic Assay on Thread. *Analytical Chemistry*, **84**, 7736-7743. <https://doi.org/10.1021/ac301082d>
- [12] Liu, Y., Song, T.T., Jia, X.B., Meng, L.L. and Mao, X. (2017) Gold Nanoparticles Decorated Carbon Nanotube Probe Based Immunochromatographic Assay on Cotton Thread. *Sensors and Actuators B Chemical*, **251**, 1112-1118. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.04.144>
- [13] Jia, X.B., Song, T.T., Liu, Y., Meng, L.L. and Mao, X. (2017) An Immunochromatographic Assay for Carcinoembryonic Antigen on Cotton Thread Using a Composite of Carbon Nanotubes and Gold Nanoparticles as Reporters. *Analytica Chimica Acta*, **969**, 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.040>
- [14] Meng, L.L., Song, T.T. and Mao, X. (2017) Novel Immunochromatographic Assay on Cotton Thread Based on Carbon Nanotubes Reporter Probe. *Talanta*, **167**, 379-384. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.023>

Hans 汉斯

知网检索的两种方式:

1. 打开知网首页: <http://cnki.net/>, 点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”, 跳转至: <http://scholar.cnki.net/new>, 搜索框内直接输入文章标题, 即可查询; 或点击“高级检索”, 下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2163-1557, 即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/>顶部“旧版入口”进入知网旧版: <http://www.cnki.net/old/>, 左侧选择“国际文献总库”进入, 搜索框直接输入文章标题, 即可查询。

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: aac@hanspub.org