文章编号:1007 - 4252(2021)05 - 0005 - 416

膀胱癌标志物检测用胶体量子点电化学传感器研究

赵雨农[1],陶妍冰[1],黄　景[1],曾　沛[2],黄　清[1],梁华庚[2,*],刘　欢[1,*]

(1. 华中科技大学 光学与电子信息学院,武汉光电国家研究中心,武汉 430074; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院泌尿外科,武汉 430022)

摘要:融合免疫检测原理的电化学传感器可识别抗原抗体特异性结合反应并转换成电信号,从而实现液态样本中有关疾病标志物的现场快速检测。本研究基于化学修饰电极构建检测膀胱癌标志物细胞角蛋白 18(CK18)的电化学传感器,采用半导体胶体量子点对电极表面进行修饰,利用量子点显著的表面效应、尺寸效应及独特的量子效应,提高生物分子在工作电极表面的富集和信号转导。研究结果表明,硫化铅(PbS)胶体量子点与碳电极的界面稳定且电荷转移能力良好,在其表面进行抗体包被和封闭处理完成电极制备,结合可显著降低背景电流的差分脉冲伏安法(DPV)进行电化学性能测试,传感器对 CK18 抗原的检测时间约 30 s,检测下限达 58 fg mL^{-1},具有灵敏度高、使用便捷和无创检测的特点,展现出应用于膀胱癌等疾病早期筛查的潜力。

关键词:膀胱癌;细胞角蛋白 18;电化学传感器;化学修饰电极;胶体量子点

中图分类号:TB34　　**文献标志码**:A

Colloidal quantum dots-based electrochemical sensor for bladder cancer marker detection

ZHAO Yu-nong[1], TAO Yan-bing[1], HUANG Jing[1], ZENG Pei[2], HUANG Qing[1], LIANG Hua-geng[2,*], LIU Huan[1,*]

(1. School of Optical and Electronic Information, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China; 2. Department of Urology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: The electrochemical sensors incorporating immunoassay principles can recognize the specific binding reaction between antigen and antibody and then convert it into an electrical signal, thus enabling rapid on-site detection of relevant disease markers in liquid samples. In this work, an electrochemical sensor for the detection of the bladder cancer marker cytokeratin 18 (CK18) was constructed based on

收稿日期:2021-10-02;　**修订日期**:2021-10-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No. 61922032; No. 61861136004).

作者简介:赵雨农(1994-),男,博士研究生,主要研究方向为半导体生物传感器 (E-mail:zyn248@hust.edu.cn).

通信作者:刘　欢(1979-),女,博士,教授,主要研究方向为半导体传感器 (E-mail:huan@hust.edu.cn).

梁华庚(1980-),男,博士,副主任医师,主要研究方向为生物医用材料与器件 (E-mail:leonard19800318@hust.edu.cn).

the chemically modified electrode. The electrode surface was modified by semiconductor colloidal quantum dots (CQDs), and the significant surface effect, size effect and unique quantum effect of CQDs were utilized to improve the enrichment and signal transduction of biomolecules on the work electrode. The results showed that the interface of carbon electrode with lead sulfide (PbS) CQDs was stable with good charge transfer capability. The electrode surface was then coated with anti-cytokeratin 18 antibody and sealing agent to finish the electrode preparation. When measured with differential pulse voltammetry (DPV) mode, which could significantly reduce the background current for electrochemical performance testing, the sensor exhibited the sensing performance of CK18 antigen with the detection time of about 30 s, and the detection limit of 58 fg mL^{-1}, which possessed the characteristics of high sensitivity, easy-to-use, and non-invasive detection, indicating the potential of the application in the early screening of bladder cancer and other diseases.

Key words: Bladder cancer; Cytokeratin 18 protein; Electrochemical sensor; Chemically modified electrode; Colloidal quantum dot

0　引言

膀胱癌是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤[1],在世界范围内的恶性肿瘤发病率中膀胱癌的发病率排第 9 位。尽管其引起的死亡率已经稳定或逐渐减少,并且病例中~70%属于非肌层浸润性尿路上皮癌(NMI-TCCs),属于早期肿瘤,但其致病原因复杂、不清晰且复发率高[2-3]。膀胱癌的早期诊断方法主要包括经尿道的膀胱镜检查、尿液脱落细胞学检查、尿液肿瘤标志物的生化检查和临床医学影像学检查。其中,膀胱镜检查可以更好地了解肿瘤的形状、癌细胞的分级和恶性程度,是膀胱癌诊断的金标准,但是膀胱镜检查存在漏诊、高创伤性,且对于早期膀胱癌诊断有限等问题[4-5]。组织活检能够对膀胱癌细胞形态进行分析,具有较高的特异性和灵敏度,但步骤复杂且作为侵入性检查,病人痛苦程度较高。体外成像技术虽没有侵入性,但在癌症早期诊断中会出现较高的假阳性率,影响诊断。

液体活检作为一种非侵入性的检测手段,主要通过光学、电化学、磁学和免疫学等原理对体液或外分泌液中的生物标志物进行检测来反映肿瘤细胞的整体表达情况[6-8]。这种方法可兼顾准确性与效率,易于实现便携化,近年来已经被广泛应用于疾病诊断。尿液中肿瘤标志物的液体活检是极具潜力的检查方法,它仅需要采取尿液进行成分分析,完全无创伤,检测过程简便、快速、费用低廉;同时由于膀胱肿瘤直接接触尿液,可以在很早期的时候就有标志物分泌到尿液中[9-11]。由于体液中肿瘤分子水平的异常往往远远早于结构影像学的异常,且膀胱肿瘤直接接触尿液,肿瘤相关标志物可直接分泌到尿液中,因此尿液肿瘤标志物的异常要远早于影像学异常。但是目前膀胱癌缺乏特异的标志物和高灵敏的检测方法,在临床中开展较少。因此,膀胱癌早期诊断亟需创伤小、易开展、高特异、高灵敏的新技术新方法研究。

膀胱癌的生物标志物主要包括 DNA、mRNA、蛋白质和细胞等。其中核基质蛋白(nuclear matrix protein, NMP)和细胞角蛋白(cytokeratin, CKs)是尿路上皮病变的重要诊断和预后生物标志物[12],它们在正常细胞中也会代谢产生,肿瘤的发生会导致代谢产物含量发生变化[13]。这类生物标志物检测浓度一般在 μmol L^{-1} 或者 nmol L^{-1} 数量级,目前大量研究表明,NMP22、CK7、CK18、CK19、CK20 等细胞角蛋白的含量与膀胱癌密切相关[14-15]。

膀胱癌标志物的低浓度、精准检测可针对大规模人群实现快速筛查和早期诊断,根据检测结果进行合理的分级诊疗,快速辅助医生确诊患者,另一方面,单一标志物的结果不能作为诊断膀胱癌的唯一手段,可产生同一标志物的其他疾病对诊断结果存在一定干扰,可通过多种标志物联合检测的方法提升其与疾病的相关性,提高膀胱癌早期诊断、疗效观察和复发监测的水平。基于免疫检测的技术如电化学发光免疫检测、酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和免疫层析法是检测尿液中细胞角蛋白最常用的方法[16]。上述检测方法存在一定的局限性,如反应过程复杂、仪器成本

高,因此迫切需要发展一种针对如膀胱癌等疾病的更准确高效的定量检测手段。2019 年,深圳大学第三附属医院 Lei 等人利用铕螯合物微粒(Eu-CM)研制了一种新型时间分辨荧光免疫试纸条,改进了免疫荧光法,实现了细胞角蛋白 19(CK19)的定量检测[17]。

电学式生物传感器利用器件电学特性随癌症标志物抗原与抗体特异性结合反应造成的电荷转移发生改变的原理,将生物分子识别信息直接转导为传感器电信号实现一步法检测,具有更低的成本和更快的检测速度。2020 年,武汉大学 Yang 等人构建了一种基于二硫化钼纳米片的场效应晶体管传感器阵列,可同时检测人类尿液中核基质蛋白 22(NMP22)和细胞角蛋白 8(CK8),检测下限分别约为 0.027 aM 和 0.019 aM[18]。上述方法中需采用交联剂作为敏感材料与生物蛋白锚定的媒介,常用的交联剂包括 EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)、NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)、APTES(3-氨丙基三乙氧基硅烷)等,交联剂的使用不利于敏感材料与蛋白之间的电荷转移,降低了传感器的检测灵敏度,同时也增加了制备工艺的复杂度。现有研究中基于量子点的检测生物分子(如抗原抗体)的方法主要基于其荧光效应,即当量子点被激发光照射时,原子被激发至 S2 激发单重态的振动能级,不稳定的激发态分子迅速振动弛豫下降至此单重态下的最低振动能级,再经过内转换与振动弛豫过程回到 S1 激发单重态的最低能级并发射光子回到基态,量子点荧光传感即通过材料与待测物的某些作用,引起量子点荧光强度、荧光光谱位置与形状、激发态寿命或荧光偏振等光学特性发生改变,主要是基于供体-受体电子转移或能量转移的荧光猝灭过程,将抗原抗体特异性结合反应转换为光学信号,但其制备过程通常需要数小时甚至数天,原因在于其需要利用交联剂的媒介作用在液相环境下进行多步交联[19]。

提高疾病标志物生物蛋白在敏感材料上的高效富集和稳定粘附有利于提升标志物检测的灵敏度和特异性。胶体量子点(CQDs)是直径通常为 2~20 nm的零维半导体纳米颗粒[20],比表面积大并且具有大量悬挂键,吸附活性位点丰富,是可与蛋白分子通过配位键直接偶联的理想受体[21],可通过配体置换的方式使其与生物分子稳定结合[22]。受量子效应的作用,量子点的尺寸效应和表面效应较普通纳米材料更显著,并且具备独特的量子限域效应和量子隧穿效应[23],可通过外加电场作用调控量子点-蛋白界面上的电荷转移。此外,胶体量子点具有较好的溶液加工特性,兼容各类刚性或柔性衬底,传感器可制造性强。

本文针对膀胱癌标志物细胞角蛋白 18(CK18)检测,采用硫化铅胶体量子点为修饰材料,制备了平面化学修饰电极(chemically modified electrode, CME),基于胶体量子点表面配体置换策略构建了细胞角蛋白 CK18 抗体的胶体量子点电学标记,将 CK18 蛋白抗原抗体的特异性结合反应转导为传感器电学信号。研制的膀胱癌标志物检测用全固态电化学传感器具有快速(~30 s)、高灵敏(检测下限约 58 fg mL^{-1})的检测特点,有望在医院科室、POCT(即时检测)和社区体检等实际场景中取得应用。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

硫化铅胶体量子点合成所用到的原料有六甲基二硅硫烷、氧化铅、油酸和十八烯。离心洗涤和分散所用试剂包括甲苯、丙酮、正辛烷。采用铁氰化钾、亚铁氰化钾、氯化钾制备电化学基本性能测试缓冲液。其他材料包括磷酸盐缓冲液(PBS, 1×)(通用电气医疗集团)、牛血清蛋白(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、重组人 CK18 蛋白(0.5 mg mL^{-1})和抗 CK18 抗体(1 mg mL^{-1})(艾博抗上海贸易有限公司)。

电化学性能测试仪器为 CHI660D 型电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)。采用透射电子显微镜(TEM,荷兰 FEI 公司)、场发射扫描电子显微镜(FESEM,荷兰 FEI 公司)和傅立叶变换红外光谱仪(FTIR,美国 Thermo Scientific 公司)进行微观表征分析。

1.2 电极修饰与传感器制备

平面电化学三电极购自青岛 Poten 科技有限公司(Qingdao Poten Technology Co., Ltd., China),三电极尺寸为 32×12×0.3 mm^3(长度×宽度×高度),工作电极直径为 4 mm,其中工作电极(WE)和辅助电极(CE)材料为碳,参比电极(RE)材料为银/氯化

银,电极基底材料为聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)。

硫化铅量子点合成过程如下[21]:取 1.8 g 氧化铅、6 mL 油酸、20 mL 十八烯于三口烧瓶中高速搅拌,抽真空后将该前驱物温度升至 120 ℃。在手套箱中用移液枪取 280 μL 六甲基二硅硫烷溶解到抽过真空的 10 mL 十八烯中,制备硫的前驱物。在氮气环境下将硫的前驱物快速注入到铅的前驱物中,反应 30 s 后放入冷水浴中快速冷却。收集沉淀,用甲苯丙酮洗涤数次,再离心收集沉淀,真空烘干得到硫化铅量子点。最后将硫化铅量子点材料分散在正辛烷中得到一定浓度的量子点溶液。

采用层-层涂覆修饰工艺制备电化学传感器。首先采用滴涂工艺,将硫化铅量子点溶液滴到工作电极,即碳(C)电极上,室温(25 ℃)下自然干燥后重复上述步骤得到硫化铅量子点薄膜修饰的电化学电极(C/CQDs)。取 1 μL CK18 抗体(1 mg mL^{-1})滴加于上述量子点薄膜表面,在 37 ℃下进行 1 h 孵育处理,随后采用磷酸盐缓冲液对薄膜表面进行冲洗,去除表面剩余物质,完成抗体包被(C/CQDs/Antibody);进一步在电极表面滴涂牛血清蛋白(BSA)溶液(10 mg mL^{-1}),室温下进行 2 h 封闭处理,目的在于钝化量子点表面未与抗体锚定的非特异性结合位点。处理后,采用磷酸盐缓冲液对薄膜表面进行冲洗,得到最终的化学修饰电极(C/CQDs/Antibody/BSA)。

1.3　电化学性能测试表征

在平面三电极表面滴加一定量铁氰化钾/亚铁氰化钾/氯化钾($[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$/KCl)磷酸盐缓冲液作为氧化还原介体溶液,分别进行循环伏安(CV)、电化学阻抗谱(EIS)和差分脉冲伏安(DPV)测试,用于分析电极的电化学特性。研究传感器对 CK18 抗原检测性能时,在平面三电极表面滴加不同浓度的重组人 CK18 蛋白(抗原)溶液,进行 DPV 特性测试,读取峰值电流大小,分析传感器输出电流随抗原浓度的变化规律。

2　结果与讨论

2.1　电极的微观表征分析

采用透射电子显微镜(TEM)对硫化铅量子点微观形貌进行表征。如图 1 所示,硫化铅量子点均匀分布,呈现出单分散近球形粒子的形貌,估计其直径分布在 3~5 nm 之间。一般地,硫化铅材料的激子波尔半径约为 20 nm,说明本工作合成的硫化铅为量子点。根据图 1 插图中选区电子衍射(SAED)中三个清晰的衍射环进一步证明了其结晶度良好(晶面分别为(111)、(200)、(220))。硫化铅量子点较小的尺寸以及较大的比表面积有利于与生物蛋白的富集与结合。

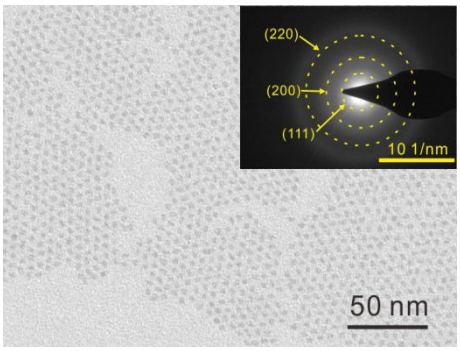

图 1　硫化铅胶体量子点的透射电镜图(插图为相对应的选区电子衍射)

Fig. 1 TEM image of PbS CQDs (The inset depicts selected area electron diffraction)

采用扫描电子显微镜(SEM)对牛血清蛋白封闭前后的电极表面薄膜形貌特征进行表征。牛血清蛋白封闭前,量子点薄膜表面的间隙和孔洞均匀分布(图 2(a))。牛血清蛋白封闭后,蛋白分子填充于上述间隙和孔洞中,蛋白颗粒均匀分布于量子点薄膜表面,表明封闭工艺提升了薄膜的均匀性和致密性(图 2(b))。由电极截面扫描电镜图可以发现(图 3),胶体量子点在碳电极表面形成致密连续的薄膜,薄膜层厚度约为 500 nm(图 3 插图),界面结合紧密,有助于固固界面的电荷转移。

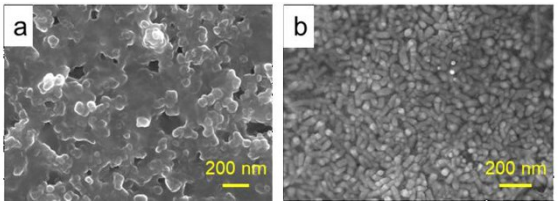

图 2　电极表面 CQDs/Antibody 薄膜在牛血清蛋白(a)封闭前和(b)封闭后的扫描电镜图

Fig. 2 SEM images of CQDs/Antibody film (a) before and (b) after BSA-blocking treatment

本文设计的电极修饰层中,量子点-蛋白界面

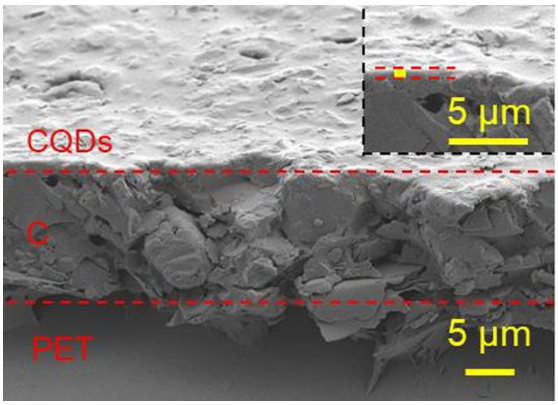

图 3 硫化铅胶体量子点薄膜横截面扫描电镜图

Fig. 3 The cross-sectional SEM image of PbS CQDs solid film

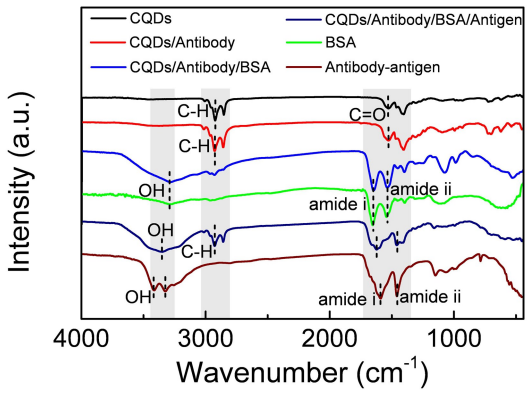

图 4 CQDs、CQDs/Antibody、CQDs/Antibody/BSA、CQDs/Antibody/BSA/Antigen 薄膜及牛血清蛋白、抗原-抗体复合物的红外光谱图

Fig. 4 The FTIR spectra of CQDs, CQDs/Antibody, CQDs/Antibody/BSA, CQDs/Antibody/BSA/Antigen, and BSA, Antibody-antigen complexes

是抗体蛋白电学标记的关键区域,影响后续的抗原分子识别和电学信号转导。硫化铅胶体量子点表面的长链油酸配体作为金属配位基团(Pb-O)及亲溶剂基团[23],使量子点以胶体形式稳定分散在溶剂中。胶体量子点表面长链配体通过配体置换工艺可被短链基团配体取代,从而赋予量子点特定的物化特性,实现基于溶液法的低成本、大规模器件制备。

为了分析量子点-CK18 抗体蛋白界面的结合情况,探究抗体蛋白包被和牛血清蛋白封闭处理的效果,采用傅立叶红外光谱仪测试了有关样品,如图 4 所示。

PbS 胶体量子点薄膜在波数 2,808~2,984 cm^{-1} 的位置存在明显的 C-H 伸缩振动峰,源自从合成阶段携带的表面油酸长链配体;而 CQDs/Antibody 薄膜在类似位置的 C-H 峰出现了一定程度的增强,同时上述两样品在波数 1,526 cm^{-1} 位置的羰基(C=O)峰存在明显差别,说明量子点与抗体蛋白交联后表面基团发生变化,量子点表面的油酸配体被抗体蛋白上的配体取代,后者可能与量子点具有更强的亲和力[21]。

牛血清蛋白封闭后,即在 CQDs/Antibody/BSA 薄膜对应的曲线上很难分辨出牛血清蛋白的酰胺 ii 带特征峰,但可清晰观察到波数 1,650 cm^{-1} 位置对应的酰胺 i 带特征峰,说明电极表面稳定存在有牛血清蛋白[24]。同时,对比 CQDs/Antibody/BSA/Antigen 薄膜和抗原-抗体复合物薄膜,观察到特征基本相似的特征峰,说明了抗原抗体特异性结合反应可在量子点薄膜上正常发生。傅立叶红外光谱分析结果表明,胶体量子点表面可通过配体置换工艺与生物大分子如 CK18 抗体蛋白直接交联。

在经典的胶体量子点生物分子荧光标记技术中,通常需要借助交联剂的媒介作用,在液相环境下进行多步交联过程,一般需要数小时甚至数天的时间完成[25]。本文基于简便的配体置换策略,在量子点薄膜表面进行蛋白孵育包被处理,成功构建了量子点-抗体蛋白界面,抗体蛋白替代原先存在于量子点表面的油酸配体,通过蛋白分子羧基上的 O 与硫化铅的 Pb 构成的配位键直接结合。该标记方法具有高效、低成本、适合规模化制备的优点[26]。

2.2 电化学特性分析

图 5 所示为基于硫化铅胶体量子点平面化学修饰电极的电化学传感器实物图。为探究电极在制备过程中电化学性能的变化规律,对裸电极(C)、C/CQDs、C/CQDs/Antibody、C/CQDs/Antibody/BSA 四种电极的电化学性能进行对比研究。

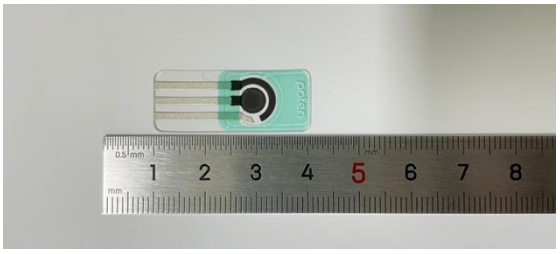

图 5 C/CQDs/Antibody/BSA 平面化学修饰电极实物图

Fig. 5 Optical image of theC/CQDs/Antibody/BSA electrode

循环伏安测试结果(图 6)表明,上述电极的 CV 曲线中均有明显、准可逆的氧化还原峰出现,表明该平面三电极体系具备优良的固液界面电荷转移能力。CV 曲线峰值电流强度随层-层修饰过程发生改变,表明了不同修饰层作用下电极导电能力的差异。与 C 电极 CV 曲线中的氧化峰电流(116.3 μA)相比,C/CQDs 电极的氧化峰电流降至 90.51 μA,表明硫化铅量子点薄膜修饰后电极的导电能力有所下降,原因在于硫化铅胶体量子点薄膜的导电性与碳相比较低。随着抗体蛋白包被和牛血清蛋白封闭处理,电极的氧化峰电流进一步降低,C/CQDs/Antibody 和 C/CQDs/Antibody/BSA 分别对应氧化峰电流 82.75 μA 和 80.49 μA,表明量子点薄膜表面的生物大分子对整个电极的导电能力有一定削弱,但仍具有较好的电荷转移能力,表明了量子点与抗体蛋白之间存在稳定的粘附作用。

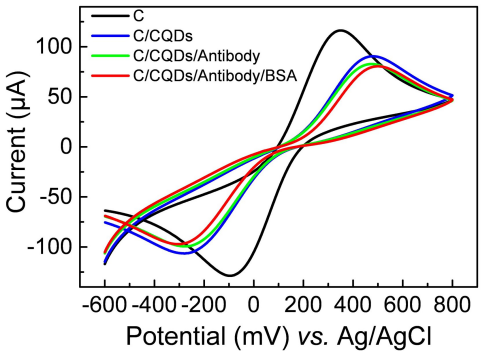

图 6　C、C/CQDs、C/CQDs/Antibody、C/CQDs/Antibody/BSA 电极的 CV 特性表征

Fig. 6 CV characterizations of C, C/CQDs, C/CQDs/Antibody, C/CQDs/Antibody/BSA electrodes

差分脉冲伏安测量模式可显著降低背景电流的影响,保证检测的高灵敏度和高分辨力,适于低浓度生物化学分子的检测。不同电极的 DPV 曲线(图 7)测试结果与 CV 曲线的规律一致,即随着碳电极表面相继修饰硫化铅胶体量子点、抗体蛋白和牛血清蛋白,电极峰值电流由 45.66 μA 逐渐下降至 35.14 μA、31.3 μA 和 29.79 μA。虽然电流随着修饰过程有所下降,但最终的电极(C/CQDs/Antibody/BSA)在 DPV 模式下仍具有较高的峰值电流,表明电荷从溶液到固体电极的界面电荷转移能力得到了较好的保持,可用于后续对生物分子检测性能的研究。

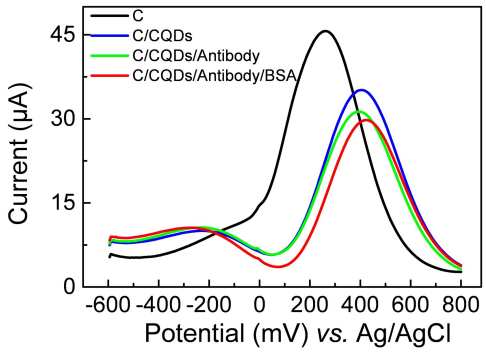

图 7　C、C/CQDs、C/CQDs/Antibody、C/CQDs/Antibody/BSA 电极的 DPV 特性表征

Fig. 7 DPV characterizations of C, C/CQDs, C/CQDs/Antibody, C/CQDs/Antibody/BSA electrodes

2.3　CK18 蛋白检测性能研究

在平面三电极表面依次加入重组人 CK18 蛋白(抗原)抗原溶液(浓度范围为 0~100 ng mL^{-1}),分别进行 DPV 信号测试,分析传感器输出电流随抗原浓度的变化规律。如图 8 所示,随着抗原浓度增加,DPV 曲线中峰值电流(I)逐渐增加。为确定抗原检测下限,研究了 DPV 峰值电流随抗原浓度的变化规律,分别提取不同浓度下 DPV 曲线中的峰值电流,如图 9 所示,以抗原浓度为 0 ng mL^{-1}时测试的 DPV 峰值电流为基线电流 I_0,定义不同浓度下 DPV 峰值电流值 I 与 I_0 的比值为传感器响应信号(Response),响应信号随着浓度增加呈现 S 形曲线响应(对数拟合关系)规律[27],反映了 CK18 抗原抗体间免疫反应的动力学过程。反应初期速率较慢;随着浓度升高,反应速率加快,最后逐渐达到饱和状态。选取1 pg mL^{-1}~1 ng mL^{-1}的浓度范围(图 9 插图)进行线性拟合(R^2 = 0.980),根据线性拟合分析,计算($3SD_{blank}$/slope)得出传感器对重组人 CK18 蛋白(抗原)的检测下限低至 58 fg mL^{-1}。

EIS 可为电化学体系等效电路模型提供定量电学参数,我们进一步比较了传感器在磷酸盐缓冲液和添加了不同浓度的重组 CK18 抗原溶液(0.001~100 ng mL^{-1})时的 EIS 曲线,如图 10 所示。插图所示为电化学电极体系等效电路模型,其中 Q(constant phase angle element, proportional to C_d)和 R_{ct}(charge transfer resistance)分别表示双电层电容和固液界面的电荷转移电阻。

将图 10 提取的各曲线的 R_{ct}值绘制于图 11。在

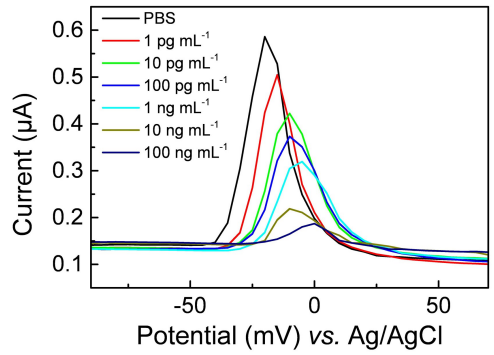

图 8 不同浓度待测抗原蛋白 DPV 电流-电压曲线

Fig. 8 The current-voltage curves with the increased antigen concentrations (0~100 ng mL^{-1})

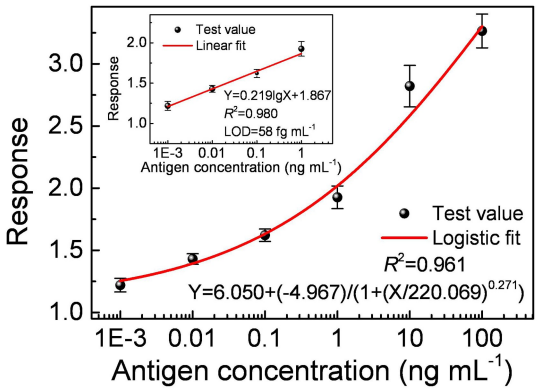

图 9 传感器响应随抗原蛋白浓度的变化规律

Fig. 9 Antigen concentration-dependent sensor response curve

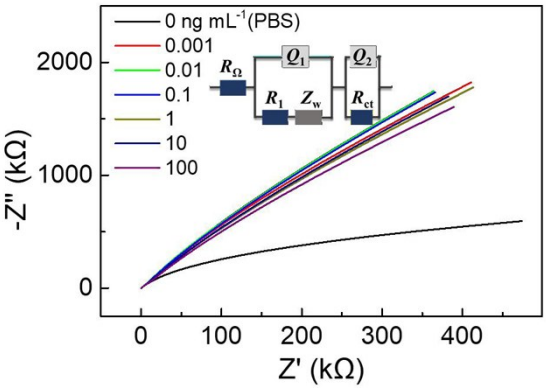

图 10 C/CQDs/Antibody/BSA 电极在磷酸盐缓冲液和不同浓度抗原溶液(1~100 ng mL^{-1})氛围中的 EIS 表征

Fig. 10 EIS characterizations of C/CQDs/Antibody/BSA electrodes in PBS and antigen solutions with different concentrations (1~100 ng mL^{-1})

研究的抗原蛋白浓度范围内,传感器响应数值的变化呈现 S 型曲线规律,反映了抗原抗体之间免疫反应的动力学过程。低浓度时反应速率较慢,R_{ct}略微升高;随着抗原浓度继续升高,抗原与电极表面的抗体不断结合,电极表面的蛋白分子构象发生变化,新的构象增加了对后续抗原的亲和性,促进特异性结合反应的进行,反应速率加快,R_{ct}下降,在 10 pg mL^{-1}左右出现最低值;当抗原浓度继续增加,反应趋于饱和状态,R_{ct}逐渐升高。

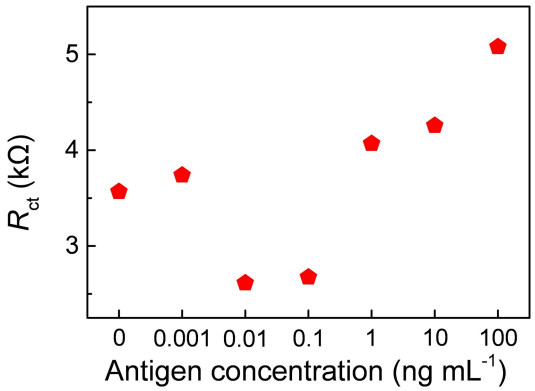

图 11 磷酸盐缓冲液和不同浓度(0.001~100 ng mL^{-1})抗原溶液氛围下的界面转移电阻

Fig. 11 The value ofR_{ct} in PBS and antigen solutions with different concentrations (0.001~100 ng mL^{-1})

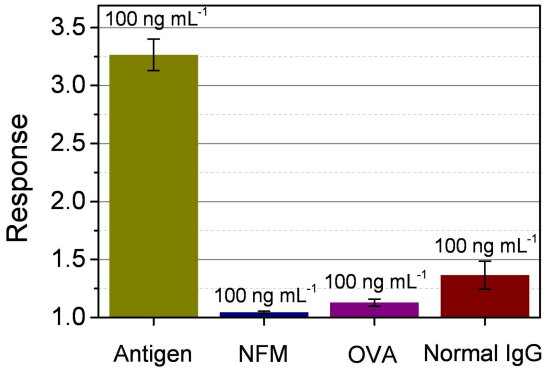

图 12 传感器的特异性评估

Fig. 12 The specificity against NFM, OVA, and normal IgG

由于实际生物样品如尿液、血液的成分往往非常复杂,传感器的特异性对于检测结果的准确性至关重要。选取脱脂奶粉(NFM)、卵清蛋白(OVA)、人正常免疫球蛋白(normal IgG)对量子点电化学传感器特异性进行评估。如图 12 所示,该传感器对其他 3 种蛋白的响应均小于 1.4。结果表明,基于硫化

铅量子点构建的抗体蛋白电学标记对于提高传感器的灵敏度和特异性起到了关键作用。如表 1 所示,通过与膀胱癌标志物检测文献对比,本工作展现了胶体量子点电化学传感器在膀胱癌标志物检测中具有快速响应时间、出色的检测下限和较宽的检测线性范围。本文设计和制备的全固态电化学传感器可将抗原和抗体蛋白特异性结合反应引起的生物信号高效转导为传感器电信号,具有对非特异性蛋白的抗干扰能力,在实际应用中有助于提高检测结果的准确性和可靠性。

表 1　膀胱癌症标志物检测性能对比

Table1　Parameters comparison of testing bladder cancer markers

标志物	响应时间	检测下限	线性范围	抗干扰能力	参考文献
CK19	–	1 ng mL^{-1}	1~100 ng mL^{-1}	4 种其他蛋白	[17]
CK8	–	1 ag mL^{-1}	0.001~100 fg mL^{-1}	–	[18]
NMP22	~1 min	0.33 pg mL^{-1}	0.001~20 ng mL^{-1}	4 种其他蛋白	[28]
NMP22	~1 min	0.1 pg mL^{-1}	1~500 pg mL^{-1}	–	[29]
NMP22	~1 min	3.3 pg mL^{-1}	0.01~18 ng mL^{-1}	4 种其他蛋白	[30]
CK18	~30 s	58 fg mL^{-1}	1~1000 pg mL^{-1}	3 种其他蛋白	本工作

CK18 抗体的高效标记是决定胶体量子点电化学免疫传感器灵敏度与特异性的关键影响因素。胶体量子点显著的表面效应和尺寸效应较普通纳米材料更显著,采用配体置换策略可与 CK18 抗体蛋白分子的羧基形成配位键构建电学标记,同时量子点具备独特的量子隧穿效应、库伦阻塞效应等量子效应。当 CK18 抗原与抗体发生特异性结合反应时,量子点“感知”上述反应引起电荷转移,通过修饰电极完成信号转导,将生物信号转导为可测到的电学信号,有效融合量子效应与免疫学原理,实现了对膀胱癌标志物的快速、精准检测。

3　结论

本文采用胶体半导体量子点作为电极修饰材料构建全固态电化学传感器,提出基于胶体量子点表面配体置换策略的生物蛋白电学标记方法,实现了膀胱癌标志物生物蛋白的特异性识别和高效信号转导。传感器对重组人 CK18 蛋白的检测下限约为 58 fg mL^{-1},具有灵敏度高、使用便捷和无创检测的特点,可为膀胱癌早期诊断、复发监测和治疗水平评估提供免疫学依据并且可作为快速、准确、便携的癌症标志物检测手段,有望广泛应用于疾病标志物诊断、流行病学调查和生理指标参数监控等。胶体量子点的物化特性可通过调控其尺寸、形貌、组分等实现针对性设计,以适配多种生物分子如蛋白质、多肽和 DNA 等。本工作发展的胶体量子点免疫分析技术在低成本、高通量临床诊断仪器开发及床旁检测(POCT)、居家检测等方面具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] Chu H Y, Wang M L, Zhang Z D. Bladder cancer epidemiology and genetic susceptibility [J]. Journal of Biomedical Research, 2013, 27(3): 170-178.

[2] Donato F, Boffetta P, Fazioli R, et al. Bladder cancer, tobacco smoking, coffee and alcohol drinking in Brescia, northern Italy [J]. European Journal of Epidemiology, 1997, 13(7): 795-800.

[3] Kaufman D S, Shipley W U, Feldman A S. Bladder cancer [J]. Lancet, 2009, 374(9685): 239-249.

[4] Casteleijn N F, Vriesema J L, Stomps S P, et al. The effect ofoffice based flexible and rigid cystoscopy on pain experience in female patients [J]. Investigative & Clinical Urology, 2017, 58(1): 48-53.

[5] Herr H W, Donat S M. A comparison of white-light cystoscopy and narrow-band imaging cystoscopy to detect bladder tumour recurrences [J]. Bju International, 2010, 102(9): 1111-1114.

[6] Matsumoto K, Irie A, Satoh T, et al. Occupational bladder cancer: From cohort study to biologic molecular marker [J]. Medical Science Monitor, 2005, 11(10): RA311-315.

[7] No authors listed. Bladder cancer: diagnosis and management of bladder cancer [J]. Bju International, 2017, 120

(6): 755-765.

[8] Eissa S, Swellam M, Amin A, et al. The clinical relevance of urine-based markers for diagnosis of bladder cancer [J]. Medical Oncology, 2011, 28(2): 513-518.

[9] Iris L, Marta D, Carolina R, et al. Liquid biopsy biomarkers in bladder cancer: A current need for patient diagnosis and monitoring [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(9): 2514.

[10] Schroeder G L, Lorenzo-Gomez M F, Hautmann S H, et al. A side by side comparison of cytology and biomarker for bladder cancer detection [J]. The Journal of Urology, 2004, 172(3): 1123-1126.

[11] Christoph F, Weikert S, Wolff I, et al. Urinary cytokeratin 20 mRNA expression has the potential to predict recurrence in superficial transitional cell carcinoma of the bladder [J]. Cancer Letters, 2007, 245(1-2): 121-126.

[12] Li Y P, Jia X P, Wang W, et al. Differential expression of cytokeratin 14 and 18 in bladder cancer tumorigenesis [J]. Experimental Biology & Medicine, 2018, 243(4): 344-349.

[13] Basta M T, Attallah A M, Se Dd Ek M N, et al. Cytokeratin shedding in urine: a biological marker for bladder cancer? [J]. British Journal of Urology, 2010, 61(2): 116-121.

[14] Şekeroğlu M R, Aydln S, Dülger H, et al. Diagnostic value of cytokeratin-18 as a tumor marker in bladder cancer [J]. Clinical Biochemistry, 2002, 35(4): 327-331.

[15] Bassily N H, Vallorosi C J, Güliz A, et al. Coordinate Expression of Cytokeratins 7 and 20 in Prostate Adenocarcinoma and Bladder Urothelial Carcinoma [J]. American Journal of Clinical Pathology, 2000, 113(3): 383-388.

[16] Liu Y H, Luo C L, Wu X H, et al. Research of the strip of immunocolloidal-gold with monoclonal antiCK20 antibody [J]. Immunological Journal, 2010, 106: 101-102.

[17] Lei Q F, Zhao L L, Ye S X, et al. Rapid and quantitative detection of urinary Cyfra21-1 using fluorescent nanosphere-based immunochromatographic test strip for diagnosis and prognostic monitoring of bladder cancer [J]. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2019, 47(1): 4266-4272.

[18] Yang Y J, Zeng B, Li Y X, et al. Construction of MoS_2 field effect transistor sensor array for the detection of bladder cancer biomarkers [J]. Science China-Chemistry, 2020, 63(7): 1-7.

[19] Medintz I, Uyeda H, Goldman E, Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing [J]. Nature Materials, 2005, 4: 435-446.

[20] Kagan C, Lifshitz E, Sargent E, Talapin D, et al. Building devices from colloidal quantum dots [J]. Science, 2016, 353(6302): aac5523.

[21] Liu H, Li M, Voznyy O, et al. Physically flexible, rapid-response gas sensor based on colloidal quantum dot solids [J]. Advanced Materials, 2014, 17(26): 2718-2724.

[22] Arquer F, Talapin D, Klimov V, et al. Semiconductor Quantum Dots: Technological Progress and Future Challenges [J]. Science, 2021, 373(6555): eaaz8541.

[23] 刘 欢,张宝晖,胡志响,等. 硫化铅胶体量子点表面配体工程研究进展 [J]. 科学通报, 2021, 66, doi: 10.1360/TB-2021-0481.

[24] Wang Q S, Ye F Y, Fang T T, et al. Bovine serum albumin-directed synthesis of biocompatible CdSe quantum dots and bacteria labeling [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2011, 355(1): 9-14.

[25] Medintz I, Uyeda H, Goldman E, et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing [J]. Nature Materials, 2005, 4: 435-446.

[26] 古瑞琴,付会兵,赵雨农,等. 面向重金属离子快速检测的化学修饰电极研究进展 [J]. 传感器与微系统, 2021, 40(9): 1-5.

[27] Dudley R A, Edwards P, Ekins R P, et al. Guidelines for immunoassay data processing [J]. Clinical Chemistry, 1985, 8: 1264-1271.

[28] Wu D, Wang Y G, Zhang Y, et al. Sensitive electrochemical immunosensor for detection of nuclear matrix protein-22 based on NH2-SAPO-34 supported Pd/Co nanoparticles [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24551.

[29] Lee M, Thomas J, Chang Y, et al. Electrochemical sensing of nuclear matrix protein 22 in urine with molecularly imprinted poly(ethylene-co-vinyl alcohol) coated zinc oxide nanorod arrays for clinical studies of bladder cancer diagnosis [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2016, 79: 789-795.

[30] Li N, Wang Y L, Li Y Y, et al. A label-free electrochemical immunosensor based on Au@Pd/Ag yolk-bimetallic shell nanoparticles and amination graphene for detection of nuclear matrix protein 22 [J]. Sensors & Actuators B: Chemical, 2014, 202: 67-73.