

石墨烯修饰的电化学免疫传感器在肿瘤标志物检测中的应用*

曾 莉 综述,刁奇志 审校(重庆医科大学附属永川医院检验科 402160)

【关键词】 石墨烯; 电化学免疫传感器; 肿瘤标志物

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.09.056 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)09-1314-02

肿瘤标志物是指在肿瘤的发生和增殖过程中,由肿瘤细胞本身所产生的或者是由机体对肿瘤细胞反应而产生的,反映肿瘤存在和生长的一类物质。其在肿瘤普查、诊断、判断预后、评价疗效和高危人群随访观察等方面都具有较大的实用价值。目前检测方法主要有放射免疫分析法、免疫放射分析法、酶标记免疫分析法、化学免疫发光分析法、时间分辨荧光免疫分析法、蛋白芯片检测法,这些方法存在灵敏度低、特异度低、放射性损害、反应条件严格、操作繁琐、分析困难等不足,限制其在临床的进一步应用。发展高灵敏的免疫分析技术对于肿瘤标志物的检测有至关重要的意义。电化学免疫传感器利用抗原和抗体间的高度特异性结合,将免疫分析法和电化学传感器相结合,具有灵敏度高,分析速度快,操作简便、价格低廉及选择性好等优点,被广泛应用于临床诊断领域。其中石墨烯由于其独特的二维结构、优良的电化学性能、制备方法多样化、成本低廉、适合于规模化制备、可用于固定抗体等优点,为电化学免疫传感器性能的提高提供了一种全新方法。本文简单介绍了石墨烯的特点、制备方法,重点综述了近年来石墨烯修饰的电化学免疫传感器在肿瘤标志物检测的研究及应用,并对目前存在的问题及发展前景进行展望。

1 石墨烯特点及制备

1.1 石墨烯 自 2004 年 Man 大学的 Geim 等首次用机械剥离法获得了单层石墨烯后,其独特的结构和电化学性能就一直备受瞩目。石墨烯是由碳原子以 sp² 杂化紧密连接包裹的六角晶体结构构成的单原子层,是现今已知的最薄的二维材料^[1-2]。石墨烯大的比表面积(理论表面积 2 630 m²/g)和极强的电导能力(64 ms/cm)可以保证对待测物的高效吸附及负载,提高基于石墨烯修饰的电化学免疫传感器的灵敏度及信噪比。此外,石墨烯还具有大的电位窗口、低电荷传递电阻、快速电子传递速率等独特的电化学性质,可作为电极的理想材料并广泛应用于电化学传感器新领域^[3-4]。

1.2 石墨烯的制备 石墨烯类材料包括石墨烯、氧化石墨烯和还原氧化石墨烯等。现今制备石墨烯的方法层出不穷:氧化石墨还原法、外延生长法、电化学方法、电弧法、有机合成法、金属表面生长法、氧化减薄石墨片法、肼还原石墨烯法、乙氧钠裂解法和切割碳纳米管法等^[5]。在生物医学领域研究较多的通常为功能化的石墨烯、氧化石墨烯。因为其表面带有羟基、羧基等功能化基团,可改善石墨烯的分散性、水溶性及稳定性等,并可以通过酰化反应、酯化反应等其他基团或生物分子修饰到氧化石墨烯表面^[6]。目前主要利用 Hummers 法制得氧化石墨后,将氧化石墨经高温或者超声处理,在其层间产生巨大能量而剥落形成氧化石墨薄片。由于超声作用剥离程度高,而

且处理过程无化学变化,能基本维持氧化石墨稀表面结构,成为氧化石墨剥离的主要方法。

2 石墨烯修饰的免疫传感器在肿瘤标志物检测中的应用

肿瘤标志物主要用于恶性肿瘤辅助诊断、病情和预后判断、疗效监测和靶向定位治疗。电化学免疫传感器与传统免疫测试相比,集免疫反应、信号产生、信号检测一体化,具有结构紧凑、使用方便、灵敏度高、成本低、能微型化等特点,有利于对免疫反应进行动力学分析,尤其在临床肿瘤标志物诊断领域,其作用越来越受到重视,成为目前较活跃的研究领域^[7-8]。

石墨烯纳米材料的应用进一步提高了免疫传感器的灵敏度。Wu 等^[9]将掺杂氮的石墨烯修饰到玻碳电极上固定鳞状上皮细胞抗原一抗,通过夹心免疫法实现对鳞状上皮细胞癌抗原的检测。由于石墨烯是一种零带隙材料,原子掺杂可以调控其能带结构,提高电催化性能,由该方法修饰的传感器检出限低至 15.30 ng/mL,线性范围 0.05~18.00 ng/mL。

2.1 检测癌胚抗原(CEA) CEA 可作为结肠癌肿瘤标记物及恶性肿瘤的辅助诊断。Li 等^[10]团队构建了一种检测 CEA 的无标记电化学免疫传感器。石墨烯与 Nafion 溶液超声混匀后滴涂至玻碳电极,浸入含 2.5 mmol/L 的铁氰化钾/亚铁氰化钾磷酸盐缓冲液中,通过电化学阻抗法初步探索免疫传感器的性能,其具有高灵敏度(0.17 ng/mL),特异性好,干扰物质如乙肝核心抗原、葡萄糖氧化酶、抗坏血酸等对电化学检测过程无影响,可视为用于临床诊断十分有前途的替代工具。

氧化石墨烯含有大量含氧官能团,功能化后可与纳米粒子、聚合物、有机金属化合物等多种功能材料联合修饰制备电极。例如 Zhong 等^[11]课题组制备了纳米金包裹的石墨烯复合材料修饰到电极上,与辣根过氧化物酶-anti-CEA 交联后,研制出的免疫传感器检测 CEA 的线性范围为 0.05~350.00 ng/mL,与传统的辣根过氧化物酶-抗 CEA 和纳米金标记的辣根过氧化物酶-抗 CEA 相比,其灵敏度提高了 100 倍,检测限可达到 0.01 ng/mL。结果充分表明,功能化的石墨烯大的表面积和良好的电子传输效率在提高抗体固定量的同时也增强了酶活性中心电子的传输速率,从而增强了电极响应信号,提高了免疫传感器灵敏度。与标准的化学发光酶联免疫分析方法共同检测 54 例血清标本,检测相符率高,对于肿瘤的早期诊断,提高肿瘤治愈率和预后具有重要应用价值。

2.2 检测甲胎蛋白 由于还原氧化石墨烯具有:(1)含大量缺陷和化学官能团,促进电荷转移,具有高电化学活性;(2)其表面丰富的化学基团易于功能化,有助于提高传感器性能;(3)化学性能和电子特性高度可调;(4)相比绝缘石墨烯,还原氧化石墨烯能高效传输电荷;(5)通过共价法或非共价法被官能化来

* 基金项目:重庆市卫生局面上项目(2011-2-269);重庆市永川区科学技术委员会项目(YJYB2012BE5026)。

增强传感器的灵敏度、特异性、负载能力、生物相容性等优点,所以多数基于石墨烯的电化学免疫传感器选用还原氧化石墨烯修饰电极^[12]。Xiao 等^[13]将非共价改性法制得的还原氧化石墨烯与茚四甲酸在碱性条件下一锅法同时合成后,成功制备了茚四甲酸/石墨烯修饰的固态电化学发光免疫传感器。该方法获得的还原氧化石墨烯既能保留石墨烯的结构和电子性质,又能有效提高石墨烯的化学性质。表现出较吸附衍生物茚复合物约 21 倍以上的发光量子效率,对甲胎蛋白检测的灵敏度高达 0.20 pg/mL,与传统检测方法相比,具有广泛的应用前景。氧化石墨烯也可以通过化学、电化学、热还原等技术转化成还原氧化石墨烯,提高其导电性与传感性能。Qi 等^[14]在氧化石墨烯还原过程中注入一氧化碳气体,利用一锅法得到了还原氧化石墨烯,自主合成了以钯还原氧化石墨烯修饰电极的免疫传感器。试验结果表明,其能有效促进电荷转移,提高传感器检测甲胎蛋白的灵敏度至 5.00 pg/mL。

2.3 检测其他肿瘤标志物

2.3.1 糖类抗原 125(CA125)为目前惟一被推荐作为卵巢癌标志物的肿瘤标志物,在卵巢癌患诊断、疗效评价及监测复发中地位明确^[15]。Taleat 等^[16]课题组在聚茴酸修饰的石墨烯丝网印刷电极共价结合 CA125 抗体,在夹心结构的基础上进行免疫测定。其最终检测范围为 5~25 U/mL,灵敏度低至 2 U/mL。

2.3.2 CA15-3是乳腺癌最重要的特异性标志物。Li 等^[17]首先报道了制备灵敏检测糖类抗原的无标记新型电化学免疫传感器方法。与以往传统免疫传感器不同,高导电性的氮掺杂石墨烯片修饰电极的设计,无需标记并显著增加了电子传输。最低检测限为 0.012 U/mL,线性范围 0.1~20.0 U/mL。

2.3.3 人绒毛膜促性腺激素(HCG)在几乎所有绒毛膜上皮细胞癌、70% 的非精原细胞性睾丸癌可见。Li^[18]利用石墨烯和多孔纳米金箔能双重放大电化学效应的优点,以对苯二酚为还原指示剂,多孔纳米金箔固定 HCG,得到了较宽的线性范围 0.5~40.00 ng/mL 和较高的灵敏度 0.034 ng/mL。

2.3.4 前列腺特异性抗原可作为前列腺癌的特异性标记物。Chen 等^[19]新研发了一种无标记检测前列腺特异性抗原的三维电化学免疫方法。利用高导电性的石墨烯纳米金复合物修饰电极后,该免疫传感器的电子转移和灵敏度明显升高至 0.59 ng/mL,电流变化的最高水平与对应的浓度之比为 5 μA/(ng/mL)。该三维免疫传感器的制备为免疫传感器新方法的研究提供了一种很好的借鉴。

2.4 多种标志物联合检测测量单一肿瘤标志物往往具有有限的诊断价值^[20]。同时检测多种分析物可以缩短分析时间,减少检测成本,提高测试效率,具有更重要的临床应用价值。Wu 等^[21]发明了一种在还原氧化石墨烯/四乙炔五胺修饰的玻碳电极上同时检测 CEA 和鳞状细胞抗原的电化学免疫法。在夹心免疫基础上,分别在中性红峰值电位 0.62 V 及硫磺峰值电位 0.17 V 下研究抗原浓度与峰值电流变化的关系,得到 CEA 和鳞状细胞抗原最低检测限分别为 0.013 ng/mL 和 0.010 ng/mL,重复性好(相对标准偏差分别为 3.3%、4.8%)。该免疫传感器开发的策略为肿瘤标志物多项目联合检测提供了一种有前途的方法。

3 展 望

石墨烯修饰的电化学免疫传感器为肿瘤标志物检测的研

究提供了一种全新的方法,但是如何大规模制备结构完整、尺寸和层数可控的高质量石墨烯仍然是当前需要重点攻关的课题。鉴于目前关于石墨烯修饰的电化学免疫传感器的研究大多仍停留在基础研究阶段,如何实现由基础研究转向高通量、微型化、商业化方向发展仍需努力。伴随着新的化学修饰方法、掺杂的石墨烯的制备和分子水平功能修饰等技术的不断研究与引进,石墨烯修饰的电化学免疫传感器在肿瘤标志物检测等生物医学领域将具有更广阔的前景。

参考文献

- [1] Wu S, He Q, Tan C, et al. Graphene-based electrochemical sensors[J]. *Small*, 2013, 9(8): 1160-1172.
- [2] Karthika P, Rajalakshmi N, Dhathathreyan KS. Phosphorus-Doped exfoliated graphene for supercapacitor electrodes[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2013, 13(3): 1746-1751.
- [3] Chen D, Feng H, Li J. Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications[J]. *Chem Rev*, 2012, 112(11): 6027-6053.
- [4] Yan M, Zang D, Ge S, et al. A disposable electrochemical immunosensor based on carbon screen-printed electrodes for the detection of prostate specific antigen[J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 38(1): 355-361.
- [5] Chang J, Zhou G, Christensen ER, et al. Graphene-based sensors for detection of heavy metals in water: a review[J]. *Analy Bioanal Chem*, 2014, 406(16): 3957-3975.
- [6] Muzyka K. Current trends in the development of the electrochemiluminescent immunosensors[J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 54(13): 393-407.
- [7] Lee BS, Lee YU, Kim HS, et al. Fully integrated lab-on-a-disc for simultaneous analysis of biochemistry and immunoassay from whole blood[J]. *Lab Chip*, 2011, 11(1): 70-78.
- [8] Xie Y, Chen A, Du D, et al. Graphene-based immunosensor for electrochemical quantification of phosphorylated p53(S15)[J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 699(1): 44-48.
- [9] Wu D, Fan H, Li Y, et al. Ultrasensitive electrochemical immunoassay for squamous cell carcinoma antigen using dumbbell-like Pt-Fe3O4 nanoparticles as signal amplification[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 46(1): 91-96.
- [10] Li Y, Yang WK, Fan MQ, et al. A sensitive label-free amperometric CEA immunosensor based on Graphene-Nafion nanocomposite film as an enhanced sensing platform[J]. *Anal Sci*, 2011, 27(7): 727-731.
- [11] Zhong Z, Wu W, Wang D, et al. Nanogold-enwrapped grapheme nanocomposites as trace labels for sensitivity enhancement of electrochemical immunosensors in clinical immunoassays: Carcinoembryonic antigen as a model[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25(10): 2379-2383.
- [12] Liu Y, Dong X, Chen P. Biological and chemical sensors based on graphene materials[J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(6): 2283-2307.

证和组合、合理使用检验报告、如何正确解读检验数据、检验方法及质量保证等^[21]。应该加强对医院管理者、医护人员关于检验医学与临床科室沟通协作重要意义的宣传,明确及时、有效和正确沟通的临床重要价值,从医院管理的层面自上而下推动这项工作,最终达到相互理解、相互支持的目的,从而更好、更有效率地为患者服务^[22]。另外也要加强检验人员的临床医学知识学习,甚至设置专门的检验医师岗位,积极参加临床查房、会诊、服务等工作。事实证明,惟有充分调动临床科室、检验科室和医院管理层的积极性和主动性,才能将这项工作开展好。例如定期开展临床科室和检验科室的交流座谈会,各自提出疑虑,然后达到解决问题的目的。同时还应该积极关注医疗行业的最新研究动态,将各个科室的最新变化及时有效地进行相互沟通,这样才能更加有效避免问题发生。所以,加强检验医学与临床科室沟通协作意义重大,应该引起高度重视。

参考文献

- [1] 李黎. 用沟通架起检验与临床间信任的桥梁[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(16): 1341.
- [2] 袁春利, 管恩森. 检验与临床科室关联性浅析[J]. 中国中医药咨讯, 2012, 4(5): 146.
- [3] 冯迎迎. 如何加强医学检验与临床科的相互对话与沟通[J]. 中国中医药咨讯, 2011, 3(10): 89.
- [4] 李明, 魏红霞. 浅谈检验科与临床科室的有效协作在诊疗工作中的意义[J]. 基层医学论坛, 2010, 14(25): 780.
- [5] 马晓慧. 探讨医学检验和临床医学的协调关系[J]. 中外医疗, 2012, 31(7): 118.
- [6] 柴森, 苏丽菊, 孙权业, 等. 论临床科与检验科室沟通的重要性[J]. 中外医疗, 2011, 30(11): 153.
- [7] 杨立, 葛金莲, 马秀敏, 等. 主动开展临床培训与沟通促进检验质量[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(17): 2348.
- [8] 门自起, 陈宏安, 张红, 等. 加强检验科与临床沟通的必要性[J]. 中国疗养医学, 2011, 20(7): 666-667.

- [9] 王颖, 贾英峰. 浅议检验人员与医护人员的沟通协调[J]. 基层医学论坛, 2011, 15(11): 328.
- [10] 王洁, 吕元. 临床沟通与检验分析前质量保证[J]. 检验医学, 2011, 26(7): 489-491.
- [11] 薛铭. 浅谈检验科与临床科的沟通[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(13): 237-238.
- [12] 张伟莉. 关于加强检验科与临床之间沟通的探讨[J]. 疾病监测与控制, 2012, 6(8): 496.
- [13] 周琼仙. 实施检验医学与临床医学的有效沟通 提高临床检验质量[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(19): 2415-2416.
- [14] 罗燕萍, 杨继勇. 浅谈微生物检验科室加强与临床科室的交流与沟通[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(4): 375-376.
- [15] 王成河. 加强与临床医护沟通做好临床检验全面质量管理[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(3): 365-366.
- [16] 任建平. 如何搭建检验与临床沟通的桥梁[J]. 实用检验医师杂志, 2012, 4(1): 57-59.
- [17] 俞瑞卿. 检验人员与临床医生沟通存在的问题[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(8): 1041-1042.
- [18] 刘冰, 陈宇林, 陈华根. 基层医院加强检验与临床沟通的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(12): 1528-1530.
- [19] 魏源华, 顾万建, 李岷, 等. 检验科在临床沟通中可采取的措施[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(3): 59-61.
- [20] 徐艳, 侯毅, 黄成瑜. 浅析如何加强检验科与临床科室沟通[J]. 医学理论与实践, 2013, 26(7): 977-978.
- [21] 司晓枫, 庞洁, 王一雯. 加强检验科与临床的沟通, 更有效发挥检验科的作用[J]. 甘肃医药, 2011, 30(7): 432-435.
- [22] 许静, 潘贞贞. 提高检验质量必须加强检验与临床沟通[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(13): 1642-1643.

(收稿日期: 2014-11-28 修回日期: 2015-01-22)

(上接第 1315 页)

- [13] Xiao FN, Wang M, Wang FB, et al. Graphene-Ruthenium (II) complex composites for sensitive ECL immunosensors[J]. Small, 2014, 10(4): 706-716.
- [14] Qi T, Liao J, Li Y, et al. Label-free alpha fetoprotein immunosensor established by the facile synthesis of a palladium-graphene nanocomposite[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 61(17): 245-250.
- [15] 蒙秀坚, 陈秀勤, 李军, 等. 不同类型肿瘤患者血清 CA125 检测结果分析[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(6): 729-731.
- [16] Taleat Z, Ravalli A, Mazloum-Ardakani MA. CA125 immunosensor based on Poly-Anthranilic acid modified Screen-Printed electrodes[J]. Electroanalysis, 2013, 25(1): 269-277.
- [17] Li H, He J, Li S, et al. Electrochemical immunosensor with N-doped graphene-modified electrode for label-free detection of the breast cancer biomarker CA 15-3[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 43(6): 25-29.

- [18] Li R, Wu D, Li H, et al. Label-free amperometric immunosensor for the detection of human serum chorionic gonadotropin based on nanoporous Gold and graphene[J]. Anal Biochem, 2011, 414(2): 196-201.
- [19] Chen X, Jia X, Han J, et al. Electrochemical immunosensor for simultaneous detection of multiplex cancer biomarkers based on graphene nanocomposites[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 50(4): 356-361.
- [20] Li H, Cao Z, Zhang Y, et al. Simultaneous detection of two lung cancer biomarkers using dual-color fluorescence quantum dots[J]. Analyst, 2011, 136(7): 1399-1405.
- [21] Wu D, Guo A, Guo Z, et al. Simultaneous electrochemical detection of cervical cancer markers using reduced graphene oxide-tetraethylene pentamine as electrode materials and distinguishable redox probes as labels[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 54(23): 634-639.

(收稿日期: 2014-11-28 修回日期: 2015-01-18)