

基于多肽均相裂解电化学发光法检测 前列腺特异性抗原

李哲建^{1*}, 张静², 樊雪梅¹, 王书民¹, 曹宝月¹, 周春生¹

(1. 商洛学院 化学工程与现代材料学院, 陕西 商洛 726000; 2. 西北化工研究院, 陕西 西安 710062)

摘要: 以前列腺特异性抗原(PSA)为目标分析物, 多肽(CHSSKLQK)为分子识别物质, 钌联吡啶衍生物作为信号物质, 建立了基于金纳米粒子(AuNPs)均相电化学发光法检测PSA的新方法。利用多肽末端上的巯基将肽自组装在AuNPs上, 当PSA加入含有多肽结合的金纳米粒子悬液中时, PSA选择性地切断信号物质标记的多肽。被切断的信号物质多肽片段离开AuNPs表面, 离心分离后检测到的电化学发光强度与PSA质量浓度的对数在 $5.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-9}$ g/mL范围内呈良好的线性关系, 检出限为 2.0×10^{-12} g/mL。用于血清样品的测定, 该法的测定结果与化学发光免疫分析法基本一致, 具有灵敏度高、重现性好等优点, 为高灵敏检测蛋白酶提供了新思路。

关键词: 电化学发光; 金纳米粒子; 酶解反应; 前列腺特异性抗原; 多肽均相裂解

中图分类号: O657.1; O433 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2018)09-1061-05

Electrochemiluminescent Detection of Prostate Specific Antigen Based on Homogeneous Polypeptide Cleavage

LI Zhe-jian^{1*}, ZHANG Jing², FAN Xue-mei¹, WANG Shu-min¹, CAO Bao-yue¹, ZHOU Chun-sheng¹

(1. College of Chemical Engineering and Modern Materials, Shangluo University, Shangluo 726000, China;

2. The Northwest Research Institute of Chemical Industry, Xi'an 710062, China)

Abstract: A novel peptide-based electrochemiluminescent (ECL) method for the determination of prostate-specific antigen(PSA) was developed based on the target-induced cleavage of homogeneous specific polypeptide with gold nanoparticles(AuNPs) to overcome drawbacks from probes directly immobilized on electrodes. A specific peptide CHSSKLQK was employed as a molecular recognition element, and ruthenium(II) complexes(Ru1) were used as ECL emitting species. A site-specific enzymatic-cleavage-reaction-based biosensor using Ru1/peptide-conjugated gold nanoparticle complexes(AuNPs-peptide-Ru1) was developed. When PSA was added into the solution containing AuNPs-peptide-Ru1, PSA specifically recognized and cleaved the sequence of the peptides attached to the AuNPs. As a result, Ru1 were separated from the AuNPs and resulted in the increase of ECL intensity in the presence of co-reactant tripropylamine. Results showed that the increased ECL intensity was directly linear to the logarithm of PSA concentration in range of $5.0 \times 10^{-12} - 1.0 \times 10^{-9}$ g/mL with a detection limit of 2.0×10^{-12} g/mL. The method was applied in the detection of clinical serum samples, and the results were consistent with those obtained by CL method. With the advantages of high sensitivity and good reproducibility, this method provides a promising strategy for the sensitive detection on protease.

Key words: electrochemiluminescence; Au nanoparticle; enzymatic cleavage reaction; prostate specific antigen(PSA); homogeneous polypeptide cleavage

前列腺特异性抗原(PSA)是一种在正常的前列腺细胞和前列腺癌细胞中分泌的蛋白酶, 是诊断前列腺癌和乳腺癌的最广泛使用的蛋白之一^[1-2]。检测PSA的方法有酶联免疫吸附实验^[3]、比色免疫分析法^[4]、荧光免疫分析法^[5]、表面增强拉曼散射免疫分析法^[6]、电化学免疫分析法^[7]、化学发光法^[8]

收稿日期: 2018-03-13; 修回日期: 2018-04-26

基金项目: 国家自然科学基金(21703134); 陕西省自然科学基金面上项目(2018JM2040); 商洛市科技局项目(SK2015-37)
* 通讯作者: 李哲建, 博士, 副教授, 研究方向: 生物电化学发光分析, E-mail: zhejian2621@163.com

及电化学发光分析法^[9]。上述方法大多基于抗原与抗体之间的免疫反应,能够高灵敏和选择性地检测 PSA,但存在检测步骤复杂、成本高、耗时较长,稳定性差,抗原结合活性位点暴露,以及蛋白质抗体易变性等问题。在酶联免疫吸附实验中,必须使用夹心法测量疾病标志物的浓度,所以在每个特定位点应至少结合两个抗体,而重复洗涤步骤可能使抗体流失并降低检测效率。因此,寻找新的识别分子,开发更稳定、更快速和更简单的检测 PSA 的生物传感系统很有必要。

多肽作为抗体的替代物,具有易合成、成本低、稳定、不易失活、适于极端条件以及无毒副作用等优点^[10-11]。近年来,已有利用蛋白酶催化裂解某种序列特异性多肽的传感器报道。Zhao 等^[12]建立了检测 PSA 的电化学方法,利用二茂铁标记的螺旋肽作为分子识别物质,通过检测 PSA 酶切掉二茂铁的电化学信号来测定 PSA。Wang 等^[13]利用基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 的酶催化切割多肽反应构建了检测 MMP-2 的荧光生物传感器,检出限达 32 pmol/L。进一步研制具有高选择性和高灵敏度的新型蛋白酶检测方法对于蛋白酶相关疾病的诊断和治疗药物的开发具有重要意义。

电化学发光法 (ECL) 是化学发光和电化学相结合的产物,具有仪器简单、分析灵敏度高、易控制和检测速度快等优点^[14]。基于酶催化切割探针生物分析系统并利用金纳米粒子 (AuNPs) 离心分离的均相检测 PSA 的电化学发光分析法尚未见报道。在文献^[12,15]基础上,本文设计了一个基于生物切割电化学发光多肽探针与 AuNPs 离心分离的均相检测 PSA 的电化学发光生物传感器(如图 1)。

以多肽 (CHSSKLQK) 为分子识别物质,钌联吡啶衍生物 (Ru1) 为信号物质, AuNPs 为载体,建立了多肽纳米金粒子电化学发光法检测 PSA 的新方法。钌联吡啶衍生物通过酰胺化反应标记在肽的 K 端作为电化学发光探针 (peptide-Ru1); 电化学发光探针利用末端 C 上的巯基自组装在 AuNPs 上,构成 AuNPs 电化学发光探针,由于 PSA 能特异性催化裂解该肽,使信号物质从 AuNPs 上脱离;离心分离后,通过对溶液中的信号物质进行电化学发光检测,可实现对目标物 PSA 的高灵敏检测。本文对 ECL 生物传感器性能进行了研究,并对实验条件进行了优化。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

钌联吡啶衍生物 [Ru(bpy)₂(mcbpy-O-Su-ester)(PF₆)₂, 缩写为 Ru1]、前列腺特异性抗原 (PSA)、氯金酸、柠檬酸钠均购自 Sigma 公司。多肽 (氨基酸序列: CHSSKLQK, MW = 929.48), 纯度大于 95%, 购自上海楚肽生物科技有限公司。凝血酶购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。牛血清白蛋白、胰蛋白酶, 购自西安沃尔森生物科技有限公司。三正丙胺 (TPA) 购于国药集团化学试剂公司。所有试剂均为分析纯, 实验用水为二次去离子水。

电化学发光测量在 MPI-E 型电化学发光仪 (西安瑞迈电子公司) 上进行。三电极体系: 以裸玻碳电极作为工作电极, 铂丝电极作为对电极, Ag/AgCl (饱和氯化钾) 作为参比电极。用 UV-2450 紫外可见分光光度计 (日本 Shimadzu 公司) 记录紫外可见光吸收光谱图。JEM-2100 透射电子显微镜 (TEM, 日本 JEOL 公司)。

1.2 AuNPs 的合成

参考文献^[9]合成 AuNPs。将 100 mL 0.01% 的氯金酸溶液加热搅拌, 沸腾后迅速加入 4 mL 1% 的柠檬酸三钠溶液, 溶液颜色由淡黄色变为紫红色, 最终变为金纳米特有的红色, 继续加热和搅拌约 15 min, 直至溶液颜色变为透明的橙红色后, 停止加热, 在室温下冷却后, 将该溶液装入棕色瓶置于 4 °C 保存备用。

1.3 AuNPs 复合物的合成

取 0.4 mg 多肽 (CHSSKLQK, 0.000 43 mmol) 溶于 1 mL 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中,

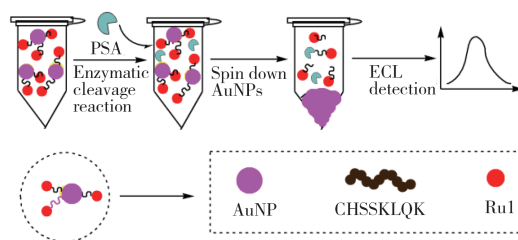


图 1 电化学发光生物传感器测定 PSA 的原理图
Fig. 1 Principle scheme of the fabrication of ECL biosensors

加入 200 μL 5 mg/mL 纳米金混合后, 置于恒温摇床上缓慢振荡反应 4 h, 使肽的末端 C 通过金硫键结合到金纳米粒子表面。待反应完全后, 用 10 mmol/L 的 PBS 清洗未反应的肽, 离心分离完全后, 将得到的 AuNPs-peptide 悬浮于 1 mL 10 mmol/L PBS 中, 将 150 mL 3.5 mg/100 μL Ru1 的 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液, 加至搅拌的 1 mL 0.25 mg/mL 寡肽溶液中, 室温、避光下置于恒温摇床上反应 12 h。Ru1 通过酰化反应共价结合到肽的另一端 K 端。同理, 用 10 mmol/L PBS 清洗未反应的 Ru1, 通过离心分离器进行分离。将得到的 AuNPs-peptide-Ru1 重新悬浮于 0.1% BSA 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 2 h 以对 AuNPs 表面未共价多肽的活性位点进行封闭。对反应得到的 AuNPs 电化学发光探针(AuNPs-peptide-Ru1)进行冲洗, 离心分离后, 将探针加至 600 μL 10 mmol/L 的 PBS 缓冲液中在 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。在参与反应的 AuNPs 不损失的前提下, 根据 AuNPs 的加入量, 计算得电化学发光探针的质量浓度为 1.6 mg/mL。

1.4 PSA 的电化学发光检测

取 10 μL 金纳米粒子电化学发光探针(1.6 mg/mL)加至 90 μL 不同浓度的 PSA 溶液或血清溶液中, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 40 min, 将反应后的混合液离心分离 5 min。切割的电化学发光信号物质在共反应剂 TPA 存在下进行电化学发光均相检测。取 100 μL 100 mmol/L 的 TPA(含 0.10 mol/L PBS)溶液, 与 100 μL 的 AuNPs-peptide-Ru1 反应后的清液混合后, 将裸玻碳电极浸入混合液中, 以扫速 50 mV/s 进行电化学发光检测。根据电化学发光强度的变化($\Delta I = I_s - I_0$)定量检测 PSA, 其中 I_0 为空白信号值, I_s 为电化学发光探针与 PSA 反应后的信号值。

2 结果与讨论

2.1 AuNPs 的 TEM 分析

将 AuNPs 胶体溶液超声分散 5 min 后, 再滴在碳膜覆盖的铜网上, 待溶液挥发至干, 然后在操作电压 200 kV 时采用透射电子显微镜(TEM)进行观察。实验结果显示合成的 AuNPs 为纳米级, 形状为圆球状, 表面较光滑, 平均粒径约为 10 nm。

2.2 AuNPs-peptide-Ru1 的电化学发光性能

利用电化学线性扫描技术对 AuNPs-peptide-Ru1 和 Ru1 的电化学发光性能进行研究(图 2)。由图 2 可知, AuNPs-peptide-Ru1 和 Ru1 均产生较强的电化学发光信号, 其发光峰电位分别为 +1.21 V 和 +1.18 V, 发生了微弱的偏移。表明两者的电化学发光行为相似, 所制备的 AuNPs-peptide-Ru1 达到了预期性能, 可用作电化学发光探针。

2.3 实验条件的优化

考察了 PSA 与 AuNPs-peptide-Ru1 的反应时间对电化学发光强度变化值 ΔI 的影响。结果显示, 当反应时间由 5 min 增至 20 min 时, ΔI 值急剧增加。反应时间在 20~40 min 范围内, ΔI 值增加缓慢, 40 min 后 ΔI 达到最大且保持平稳。表明 40 min 足以使该体系达到平衡。因此, 本实验的 PSA 识别裂解 AuNPs-peptide-Ru1 的反应时间为 40 min。

由于 PSA 是具有生物活性的丝氨酸蛋白酶, 切割温度的大小会影响其生物活性, 因此实验考察了反应温度对电化学发光强度变化值 ΔI 的影响。结果表明, 反应温度由 5 $^{\circ}\text{C}$ 增至 20 $^{\circ}\text{C}$ 时, ΔI 值急剧增加; 在 20~30 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, ΔI 值增加缓慢, 30 $^{\circ}\text{C}$ 时 ΔI 值达到最大。当温度高于 35 $^{\circ}\text{C}$ 时, ΔI 值反而降低, 表明温度高于 35 $^{\circ}\text{C}$ 时 PSA 的生物活性受到破坏。因此, 选择本实验的反应温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

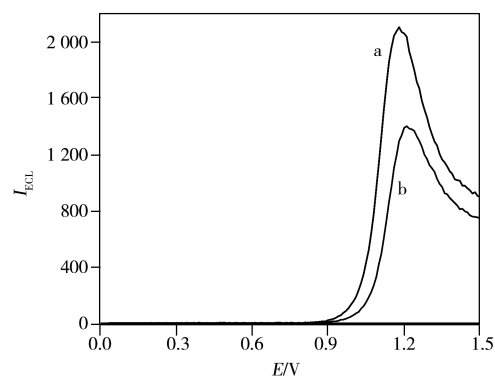


图 2 Ru1 (a) 和 AuNPs-peptide-Ru1 (b) 的电化学发光曲线

Fig. 2 ECL intensity-potential profiles of Ru1 (a) and AuNPs-peptide-Ru1 (b) concentration of Ru1 and AuNPs-peptide-Ru1 were 1.5×10^{-7} mol/L and 1.6 mg/mL, respectively; buffer: 10 mmol/L PBS (pH 7.4) containing 0.10 mol/L TPA; scan rate: 100 mV/s

2.4 传感器的分析性能

在优化条件下,考察了 AuNPs-peptide-RuI 对不同浓度 PSA 的检测性能。图 3 为 AuNPs-peptide-RuI 与不同浓度 PSA 反应前后的溶液在裸玻碳电极上恒电位积分 30 s 后的电化学发光强度曲线。由图可知,电化学发光强度随 PSA 浓度的增大而增强,且 ΔI 值与 PSA 质量浓度在 $5.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-9}$ g/mL 范围内呈良好的线性关系,回归方程为 $\Delta I = 1.635 \times 10^6 + 1.377 \times 10^5 \lg c$ (g/mL), 相关系数 $r = 0.9923$, 检出限 ($S/N = 3$) 为 2.0×10^{-12} g/mL。该检出限低于文献^[16-17]报道的检出限 (10 ng/mL 和 38 pg/mL)。用 PSA 作为标志物诊断前列腺癌的临界值 (大于该值为异常值) 为 4.0 ng/mL (更多的接近 2.5 ng/mL), 这说明该分析方法有望用于早期前列腺癌的诊断。

2.5 传感器的选择性

PSA 和凝血酶、胰蛋白酶、MMP-2、MMP-7 均属于蛋白酶,因此将它们作为干扰物对传感器的特异性进行了考察。相同实验条件下,该传感器对 1.0×10^{-10} g/mL PSA 和 1.0 ng/mL 的其它蛋白酶的电化学发光响应见图 4。由图 4 可知,相对于其他蛋白酶,该传感器检测 PSA 的响应信号最高。说明 PSA 能够特异性地切割选用特定序列的多肽 CHSKLQK, 所构建的传感方法具有良好的选择性。

2.6 实际样品分析

为评估该传感分析方法的应用潜能,从西安市友谊医学检验所采集 6 份患者的血样。采集的血样经离心后取上清液,用 10 mmol/L 的 PBS 进行稀释。用本文设计合成的 AuNPs-peptide-RuI 测定血样中 PSA 的浓度,同时与临床采用的化学发光免疫分析法 (CL) 测定结果进行对比。由表 1 可知,本文构建的生物传感分析方法的测定结果与临床 CL 法结果一致,表明本文建立的基于酶切割多肽的电化学发光传感器准确性良好,具有一定的应用价值。

3 结论

本文建立了一种基于酶切割多肽探针和 AuNPs 离心分离均相检测 PSA 的电化学发光分析新方法。该法通过在 AuNPs 界面上酶催化切割多肽反应与电子传导实现了 PSA 的高灵敏检测,减少了复杂的电极修饰过程并克服了生物传感器重现性差的缺点。而且,通过简单的固液分离合成 AuNPs 电化学发光探针,为金纳米探针的合成提供了参考。该法相比于传统的免疫分析方法更简单、成本更低,改进后可用于检测其他具有酶切割活性的蛋白质。

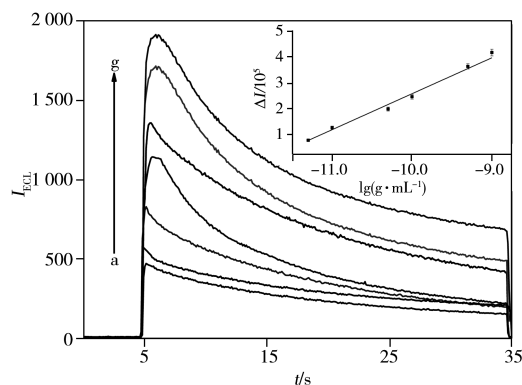


图3 AuNPs-peptide-RuI 与不同浓度 PSA 反应的电化学发光强度曲线

Fig. 3 ECL intensities vs potential profiles of AuNPs-peptide-RuI after reaction with different concentrations of PSA in 0.10 mol/L PBS (pH 7.4) containing 50 mmol/L TPA concentration of PSA (a-g): 0, 5.0, 10, 50, 100, 500, 1 000 pg/mL; insert: calibration curve of PSA

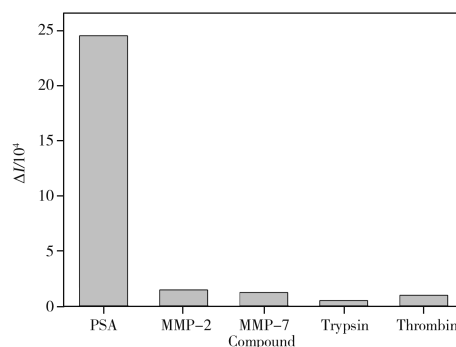


图4 传感器的选择性

Fig. 4 Selectivity of the biosensor

1.0×10^{-10} g/mL PSA and 1.0 ng/mL other proteases (MMP-2, MMP-7, trypsin and thrombin)

表1 血样中 PSA 的分析结果

Table 1 Analytical results of PSA in clinical serum samples

Sample number	CL method (ng/mL) *	This method ($n = 3, P = 0.9$, ng/mL)	Relative error (%)
1	3.30	3.40 ± 0.36	3.0
2	3.53	3.55 ± 0.80	0.6
6	7.36	7.48 ± 1.00	1.6
4	11.73	11.71 ± 1.53	-0.2
5	13.83	13.07 ± 1.77	-5.4
6	58.92	58.56 ± 6.78	-0.6

* the CL results provided by Xi'an Friendship Medical Inspection (数据来源于西安市友谊医学检验所)

参考文献:

- [1] Diamandis E P. *Clin. Chem.*, **2000**, 46: 896 – 900.
- [2] Barton A C, Davis F, Higson S P J. *Anal. Chem.*, **2008**, 80: 6198 – 6205.
- [3] Acevedo B, Perera Y, Ruiz M, Rojas G, Benítez J, Ayala M, Gavilondo J. *Clin. Chim. Acta*, **2002**, 317: 55 – 63.
- [4] Cao C, Li X, Lee J, Sim S J. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 24: 1292 – 1297.
- [5] Yu F, Persson B, Lofås S, Knoll W. *Anal. Chem.*, **2004**, 76: 6765 – 6770.
- [6] Feng Z, Zhou J, Chen D, Wang S M, Wang X J, Xie S S. *Chin. J. Lumin.* (封昭, 周骏, 陈栋, 王少敏, 王小军, 谢树森. 发光学报), **2015**, 36(9): 1064 – 1070.
- [7] Liu X L, Yuan R, Chai Y Q. *J. Instrum. Anal.* (刘新露, 袁若, 柴雅琴. 分析测试学报), **2013**, 32(9): 1081 – 1085.
- [8] Shi G, Tang B J, Wang X, Zhao L X, Lin J M. *Chin. J. Anal. Chem.* (石根, 唐宝军, 王栩, 赵利霞, 林金明. 分析化学), **2007**, 35(11): 1541 – 1547.
- [9] Zhang J, Qi H L, Li Z J, Zhang N, Gao Q, Zhang C X. *Anal. Chem.*, **2015**, 87: 6510 – 6515.
- [10] Yu H, Raymond J W, McMahon T M. *Biosens. Bioelectron.*, **2000**, 14: 829 – 840.
- [11] Miao W J, Bard A J. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(23): 7109 – 7113.
- [12] Zhao N, He Y, Mao X, Sun Y, Zhang X, Li C, Lin Y, Liu G. *Electrochem. Commun.*, **2010**, 12: 471 – 474.
- [13] Wang Z, Li X H, Feng D, Li L H, Shi W, Ma H M. *Anal. Chem.*, **2014**, 86: 7719 – 7725.
- [14] Liu X, Dong M, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Anal. Chem.*, **2016**, 88: 8720 – 8727.
- [15] Choi J H, Kim H S, Choi J, Hong J W, Kim Y, Oh B. *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, 49: 415 – 419.
- [16] Suaifan G A R Y, Esseghaier C, Ng A, Zourob M. *Analyst*, **2013**, 138: 3735 – 3739.
- [17] Qi H, Wang C, Qiu X, Gao Q, Zhang C. *Talanta*, **2012**, 100: 162 – 167.