

# 免疫分析与细胞检测新原理与新方法研究<sup>\*</sup>

严 枫<sup>1</sup> 鞠焜先<sup>2\*\*</sup>

(1. 江苏省肿瘤医院 南京 210009; 2. 南京大学生命分析化学教育部重点实验室, 南京 210093)

**摘 要** 将分析化学与临床诊断相结合, 发展临床检测新原理、新方法已成为人类健康的前沿领域之一。其中免疫分析, 特别是多标志物同时免疫检测新方法的发展, 以及细胞检测已成为人们关注的课题。本文综述了近 3 年来这方面的研究进展, 并简要介绍了免分离、准无试剂和全无试剂安培免疫分析, 空间分辨多通道安培芯片, 底物区带分辨、通道分辨和通道-底物区带二维分辨化学发光免疫分析等多种免疫分析新概念, 细胞检测与表面增殖监测、细胞毒效应研究与药敏检测新方法, 对其在肿瘤临床诊断中的应用也作了总结。

**关键词** 免疫分析 分子诊断 细胞传感 细胞 肿瘤标志物

中图分类号: O657; Q503 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2007)12-1852-09

## Novel Concepts and Approach of Immunoassay and Cellular Analysis

Yan Feng<sup>1</sup> Ju Huangxian<sup>2\*\*</sup>

(1. Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, China; 2. Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, Ministry of Education, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract** The development of novel concepts and approach for clinic detection by combining analytical chemistry with clinic diagnosis has become one of research frontiers for human health. In this filed, immunoassay, especially the development of multianalyte immunoassay methods and cellular detection have attracted considerable attention. This review focuses on the research progress in these areas in recent three years. The new concepts in immunoassay, including separation-free, quasi-reagentless and reagentless amperometric immunoassay, multichannel amperometric immunochips based on separated immunoreaction areas, flow-through multianalyte chemiluminescent immunosensing systems based on substrate zone resolution, channel resolution and channel-substrate zone two-dimensional resolution, new approach in cytosensing for electrochemically detecting cell concentration and amount on electrode surface, monitoring interfacial adhesion, proliferation and apoptosis of cells, studying exogenous effect and viability of living cells, and anti-tumor drug sensitivity test, are simply summarized. their applications in clinic diagnosis of cancer disease are also discussed.

**Key words** immunoassay; molecular diagnosis; cytosensing; cells; tumor marker

## 1 引言

早在 11 世纪宋真宗时代, 人们已经知道吸入天花脓泡的结痂可以预防天花。1798 年英国 Edward Jenner 发表了开创新纪元的牛痘疫苗的报告, 这被认为是免疫学的起源。近百年来, 免疫学和生物化

学的成就使一直追求“特效试剂”的分析化学家们看到了新的希望。1959 年 Yalow 和 Berson 将标记技术与免疫化学结合起来, 以放射性元素对免疫试剂进行标记, 用于检测血清中的胰岛素, 开创了放射标记免疫分析技术检测痕量物质的新纪元, 对临床检验和科学研究产生了重要影响。上世纪 70 年代末

收稿: 2007 年 8 月

\* 国家杰出青年科学基金项目 (No. 20325518)、国家自然科学基金创新研究群体项目 (No. 20521503) 和重点项目 (No. 20535010)、江苏省社会发展项目 (BS2006006, BS2006074) 资助

\*\* 通讯联系人 e-mail: hxju@nju.edu.cn

和 80 年代初,基于抗原-抗体特异性反应与高灵敏度的标记免疫分析方法得到迅速发展,应用放射免疫分析原理,以酶、荧光染料、发光剂等非放射性示踪物替代放射性元素标记抗原或抗体,出现了一些新的标记免疫分析技术。根据所标记探针与相应检测方式的不同,可分为酶联免疫吸收分析、荧光免疫分析、化学发光免疫分析、电化学免疫分析、胶体金标记免疫分析等。这些新的标记免疫技术克服了放射免疫分析对操作人员的健康危害,因此逐渐取代了传统的放射免疫分析,成为免疫分析的主流。近年来,随着生物传感器技术的发展,免疫分析在临床诊断、环境监测、食品安全、药物分析与微生物检验等领域得到了广泛的应用。

免疫分析在临床检验中的应用之一是肿瘤疾病的诊治。恶性肿瘤是当前严重威胁人类健康和生命的一类疾病,它是具有分裂潜能的细胞受致癌因素作用后发生恶性转化和克隆性增生所形成的新生物。电化学、材料科学与细胞、分子生物学技术相互交叉、结合,可实现肿瘤细胞在新型仿生界面的固定与增殖,对肿瘤细胞进行分析和表征,为深入了解肿瘤细胞结构与功能关系和外源分子对肿瘤细胞功能的影响提供了新途径,也为疾病的诊治,抗癌、抗衰老药物的设计,提供了新的实验方法与依据。本文就近 3 年来在肿瘤标志物的免疫分析与肿瘤细胞检测方面的研究进展作一总结。

## 2 免疫分析方法

免疫分析方法包括可见性免疫反应的分析方法与标记免疫分析<sup>[1]</sup>。后者根据免疫反应方式的不同可分为异相免疫分析和均相免疫分析两大类。异相免疫分析是通过物理方法将抗原-抗体复合物与未结合的抗原、抗体分离,检测与复合物相结合的标记物。一般来说,多数检测方法均采用异相免疫分析方式,主要通过竞争法或夹心法来实现测定。竞争法是用未标记分析物(抗原)部分饱和抗体,未标记抗原与标记抗原竞争固定于固相载体的抗体所提供的结合点。竞争法可进一步分为平衡饱和法与非平衡分析法或分步饱和法两种。竞争免疫分析法的灵敏度取决于抗体对抗原的亲合力,其最低检出浓度可达每毫升含  $10^7$  个待测分子<sup>[2]</sup>。竞争法可以测定大分子如蛋白质,也可以测定小分子如药物、激素等。夹心法则是将抗体吸附于固相载体,加入含有抗原的待测样品与抗体结合,再加入特异性标记抗体形成抗体-抗原-酶标记抗体复合物,然后加入底

物,再终止反应,并测定结果。夹心法使用了相对于抗原过量的抗体,这将使其比一般的竞争免疫分析法快,此时,扩散过程的作用比抗体的亲和力更重要。夹心法的检测限比竞争法更低,常用于测定大分子分析物。

均相免疫分析法不必对自由抗原和结合抗原进行分离。几乎所有的均相免疫分析均用竞争法检测,可以用平衡饱和法,也可以用分步饱和法。均相免疫分析成本低,样品处理简单,节约时间。从临床应用的观点,这可能是最适用的一种方法。这种方法特别适宜于测定低分子量( $< 2500$ )的分子,如治疗药物,它们在生物基体中的浓度范围为  $\mu\text{g/ml}$  至  $\text{ng/ml}$  级。在均相免疫分析中所要克服的最大困难是须在结合标记抗原的存在下检测自由标记抗原<sup>[3]</sup>。

## 3 安培免疫分析新概念与新方法

电化学免疫分析将免疫技术与电化学检测相结合,包括直接和间接方法<sup>[4]</sup>。通过测定免疫反应前后界面电容、电位、电导、电流<sup>[5]</sup>等的变化可以直接测定抗原抗体间的结合,用于直接电化学免疫分析。电位型、电容型免疫传感器是无标记的,基于双电层因分子识别作用引起的变化进行检测。由于免疫试剂的非电化学活性,电流型免疫分析主要是间接电化学免疫分析法。抗原抗体的结合反应是通过标记有电活性物质或酶的免疫结合物而间接表现出来的。其中,利用电活性标记的电化学免疫分析体系可以通过均相或异相免疫分析方式进行测定,此时抗原或抗体所产生的信号一般与指示剂的量相等,限制了方法的灵敏度。由于酶具有高效的催化能力,利用酶作标记物,可放大测定信号,所以被广泛应用于常规的电化学免疫分析。近年来利用生物传感技术发展的安培免疫分析新概念包括以下几个方面。

### 3.1 免分离安培免疫分析

通常酶标法检测包括几个洗涤步骤,将免疫反应混合物与结合在包被板上的结合物分离,再注入检测试剂,进行光学或电化学检测。有时还需将包被板上的结合物洗脱下来进行检测。例如,用电子传递媒介体修饰金电极,测定洗脱下来的包被孔夹心免疫反应后带入的癌胚抗原抗体上标记的辣根过氧化物酶的酶活性,检测 CEA<sup>[6]</sup>。利用生物传感技术将抗原固定在电极表面,再将电极放到含酶标抗体与样品的混合溶液中温育,通过免疫反应将酶标抗

体结合到电极表面,而后将电极放到检测溶液中,利用抗体上标记的 HRP 对底物  $H_2O_2$  还原的电催化信号测定待测抗原的含量。这一方法可避免分离结合物和洗涤包被板的步骤,已用于多种肿瘤标志物的免疫检测。

我们课题组构建了一种测定胰腺癌患者血清中 CA 19-9 含量的安培免疫传感器<sup>[7]</sup>,用二氧化钛溶胶-凝胶固定抗原分子,样品中待测 CA 19-9 与传感器表面固定化 CA 19-9 竞争结合溶液中一定量的 HRP 标记 CA 19-9 抗体,导致了 HRP 催化  $H_2O_2$  还原电流的降低,用于测定样品中 CA 19-9 的含量,检测限为 2.68 U/ml。用金胶纳米粒子修饰 CA 125 抗原,将其滴涂在电极表面并用醋酸纤维素薄膜固定,在含有酶标抗体和 CA 125 抗原的混合溶液中温育后,安培响应随温育液中 CA 125 抗原浓度的增加而减少,检测 CA 125 的线性上限为 30 U/ml,检测限为 1.73 U/ml<sup>[8]</sup>。用金胶纳米粒子改性壳聚糖和  $SiO_2$  凝胶,分别固定人绒毛膜促性腺激素(hCG),竞争免疫反应后在检测液中检测电催化信号测定 hCG,检测限分别为 0.26 和 1.4 mIU/ml<sup>[9,10]</sup>。

### 3.2 准无试剂安培免疫分析

通常 HRP 电催化底物  $H_2O_2$  的还原需电子传递媒介体如邻苯二酚的存在,它与  $H_2O_2$  一起被加在检测溶液中<sup>[7-10]</sup>。将电子传递媒介体与待测抗原或相应酶标抗体一起固定在电极表面,可避免在检测溶液中加入电子传递媒介体,检测溶液中只含  $H_2O_2$ 。利用这一原理,将 HRP 标记 CEA 抗体和电子传递媒介体硫堇同时共价交联在电极表面,免疫反应结合 CEA 后,酶与媒介体作用受到空间阻碍,信号降低,设计出了检测 CEA 的免分离准无试剂免疫传感器<sup>[11]</sup>。而后,作者<sup>[12]</sup>用硝酸氧化处理的碳纳米纤维共价键合 CA 125 抗原和硫堇,竞争免疫反应后被固定的酶标抗体能够有效地催化过氧化氢氧化硫堇的反应,该传感器检测 CA 125 的线性范围为 2.0—75 U/ml,检测限为 1.8 U/ml。

### 3.3 全无试剂安培免疫分析

HRP 在一定的固定化介质中在电极表面可显示出直接电化学行为,这一行为已广泛用于  $H_2O_2$  等分子的测定。同样,我们<sup>[13]</sup>在  $TiO_2$  凝胶中观察到免疫结合物中 HRP 的直接电化学行为,它与抗原-抗体结合物的生成有关,通过测定免疫反应前后 HRP 的直接电化学信号的变化测定样品含量,原创性地提出了全无试剂安培免疫分析的概念。这一方法既

不需要通常酶标法检测中需在检测液中加入显色剂和氧化剂过氧化氢,也不需要其它试剂,已用于肿瘤患者血清中 CA 125<sup>[14]</sup>和 hCG<sup>[15]</sup>的免疫分析。用二氧化钛凝胶固定金胶纳米粒子修饰 HRP 标记 hCG 抗体,在免疫反应后 HRP 直接电子传递信号降低,研制了可检测 0.3 mIU/ml hCG 的无试剂免疫传感器。随后,我们构建了一种有机修饰的  $SiO_2$  凝胶,分别固定 HRP 标记 CEA<sup>[16]</sup>和 hCG<sup>[17]</sup>抗体,HRP 的直接电子传递速率达  $5.94 \pm 0.40 s^{-1}$ <sup>[16]</sup>,免疫反应后 HRP 直接电子传递信号降低,研制成检测 CEA 和 hCG 的无试剂免疫传感器,检测范围为 0.5—120 ng/ml 和 0.5—50 mIU/ml,检测限分别为 0.4 ng/ml 和 0.3 mIU/ml。

### 3.4 安培免疫芯片

将免疫试剂固定在丝网印刷三电极系统中的工作电极表面,利用竞争或夹心免疫反应模式可制备价格低廉、方便实用的安培免疫芯片。该免疫芯片性能优异、可一次性使用,具有很好的商业化前景。例如,将 HRP 标记甲胎蛋白(AFP)抗体用壳聚糖膜包埋在印刷碳电极表面制得的甲胎蛋白安培免疫芯片,在样品中温育免疫反应后,由于 AFP 与 HRP-AFP 抗体的结合使 HRP 活性中心被部分屏蔽,导致 HRP 对  $H_2O_2$  氧化硫堇反应的催化电流降低,检测甲胎蛋白的检测限为 0.74 ng/ml<sup>[18]</sup>。用金胶纳米粒子掺杂的壳聚糖膜在印刷碳电极表面包埋 CEA,利用竞争免疫检测模式,结合流动注射方法,免疫反应结合 HRP-CEA 后与邻苯二酚- $H_2O_2$  体系作用产生催化信号,检测 CEA 的检测限为 0.22 ng/ml,检测示意图如图 1 所示<sup>[19]</sup>。

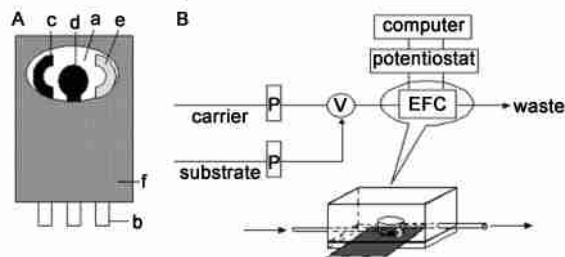


图 1 (A) 丝网印刷三电极系统, (B) 流动电化学免疫检测装置<sup>[19]</sup>

Fig. 1 Schematic diagrams of (A) three-electrode SPCE system and (B) flow system. (a) nylon sheet, (b) silver ink, (c) graphite auxiliary electrode, (d) graphite working electrode, (e) Ag/AgCl reference electrode, (f) insulating dielectric. P: peristaltic pump, V: eight-port rotary injection valve, EFC: electrochemical flow-through cell<sup>[19]</sup>

### 3.5 空间分辨多通道安培芯片

空间分辨模式是在免疫反应器的不同区域固定不同组分相应的免疫试剂,使不同组分的免疫反应在反应器的不同空间位置发生,然后以阵列检测器进行检测,以实现多组分的同时光学和电化学检测。最常见电化学免疫传感阵列是基于安培检测法的多组分电化学免疫传感器<sup>[20-25]</sup>。此类免疫传感阵列通常共用一个参比电极和一个对电极,而多个工作电极形成阵列,在不同的工作电极上测定不同的组分<sup>[20-22]</sup>。为避免邻近工作电极之间由交叉作用引起的相互干扰,需控制各工作电极间的距离。Kong 研究组在电沉积聚吡咯<sup>[24]</sup>和  $\gamma$ -氧化铝溶胶-凝胶<sup>[25]</sup>修饰的八电极阵列上固定抗体,以  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  为电化学探针,同时测定了肝纤维化标志物。

在肿瘤疾病诊断中,长期以来,人们致力于寻找“理想”的肿瘤标志物来进行恶性肿瘤的早期检出。所谓“理想”的 TM 一般应具有 100% 的特异性和敏感性,其水平与肿瘤大小、分期及预后有关,并能进行预测和疗效监测。但时至今日,尚未见可以适合这些条件的“理想”TM,多种指标的联合检测为这一目标的实现提供了新途径,正受到人们的普遍关注<sup>[26]</sup>。多组分免疫分析法为多种指标的联合检测奠定了基础。用醋酸纤维膜将电子传递媒介体硫

堇与 CA 19-9 和 CA 125 分别固定在印刷电极的两个工作电极表面,竞争免疫反应结合 HRP-CA 19-9 和 HRP-CA 125 后,用双恒电位仪进行准无试剂安培免疫分析,测定催化过氧化氢还原的电流信号,可同时检测 CA 19-9 和 CA 125<sup>[27]</sup>,检测限分别为 0.2 和 0.4 U/ml。进一步在印刷电极的 4 个工作电极表面用甲苯胺蓝接枝的壳聚糖膜分别固定 CEA, AFP, CA 125 和 hCG 4 种肿瘤标志物,竞争免疫反应结合相应的 HRP 标记抗体,用四通道恒电位仪可同时检测 4 种不同肿瘤标志物(图 2)<sup>[28]</sup>。

## 4 化学发光免疫分析新概念与新方法

化学发光免疫技术是将发光体系与免疫反应相结合,检测抗原或抗体的方法,既具有免疫反应的特异性,更兼有发光反应的高敏感性。在常规的临床测试中,化学发光标记物(吖啶酯、吖啶磺酰胺)和过氧化物酶、碱性磷酸酶标记物的化学发光反应测定(分别基于鲁米诺、吖啶磺酰胺的发光反应)广泛应用于免疫分析和核酸探针分析。近期工作主要是将流动注射免疫分析方法和化学发光检测技术相结合,发展化学发光免疫分析新方法<sup>[29]</sup>,其中的关键是免疫亲和反应室的研制。

### 4.1 免疫亲和反应室

将抗原固定在不同载体表面或凝胶介质中,填充在玻璃柱或检测池表面,可制得免疫亲和反应室。这些载体包括溴化氰活化的琼脂糖凝胶<sup>[30-32]</sup>、壳聚糖膜<sup>[33]</sup>、玻璃微珠<sup>[34]</sup>、醛基活化的 UltraBind<sup>TM</sup>膜<sup>[35,36]</sup>和磁珠等。

### 4.2 流动注射化学发光免疫分析

将流动注射化学发光检测与免疫亲和反应室相结合,采用非竞争免疫反应模式,待测样品和 HRP 酶标抗体混合温育后,将混合液通过固定有抗原的免疫反应室,基于分离免疫反应混合物中结合的和未结合的辣根过氧化物酶标记抗体,测定酶催化化学发光强度进行免疫检测。温育反应中结合酶标抗体和待测抗原形成的免疫复合物流出柱外,而未结合的酶标抗体则被固定化的抗原捕获滞留在柱内,通过柱后增强化学发光检测流出的免疫复合物内酶标抗体的量,成功地检测了人血清甲胎蛋白的含量<sup>[30]</sup>,线性范围为 2.0—75 ng/ml。而通过检测被捕获滞留在柱内的未结合的酶标抗体这一操作更简便的方法,可快速检测人血清中癌胚抗原的含量<sup>[32]</sup>,从进样到化学发光信号检出仅需要 5 min,加上 25 min 的离线温育免疫反应时间,测定一个样品需要

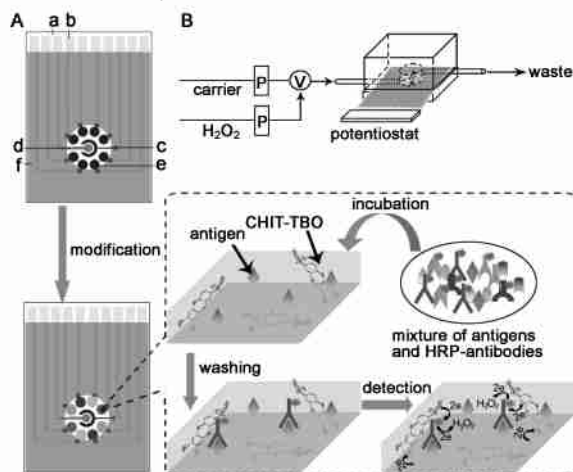


图 2 (A) 电化学免疫传感器阵列, (B) 自动化多分析物电化学免疫检测系统<sup>[28]</sup>

Fig. 2 Schematic diagrams of (A) immunosensors array and (B) automated multianalyte electrochemical immunoassay system. (a) nylon sheet, (b) silver ink, (c) graphite auxiliary electrode, (d) Ag/AgCl reference electrode, (e) graphite working electrode, (f) insulating dielectric. P: peristaltic pump, V: injection valve<sup>[28]</sup>

30 min。将 CA 19-9 抗原固定于交联壳聚糖膜上嵌入到流通池中,同样采用非竞争酶免疫分析模式可检测血清中 CA 19-9 水平<sup>[33]</sup>,检测下限为 1.0 ng/ml。

我们<sup>[34]</sup>以玻璃微珠为载体固定 AFP,提出了 AFP 的流动注射化学发光免疫分析技术。样品与 HRP 标记抗体离线温育后,缓慢通过免疫亲和柱,未与样品中抗原结合的酶标抗体被免疫传感器捕获,催化对碘苯酚-鲁米诺-过氧化氢化学发光体系,化学发光程度与 AFP 浓度成反比,线性范围为 5.0—100 ng/ml,检测限为 2.7 ng/ml。

4.3 底物区带分辨化学发光免疫分析

利用不同酶标记不同抗体,与免疫亲和室中相应的固定化抗原竞争免疫反应或固定化抗体夹心免疫反应后,依次通入不同酶的底物,其间用缓冲液相隔,形成底物-缓冲液-底物区带,分别进行不同抗原

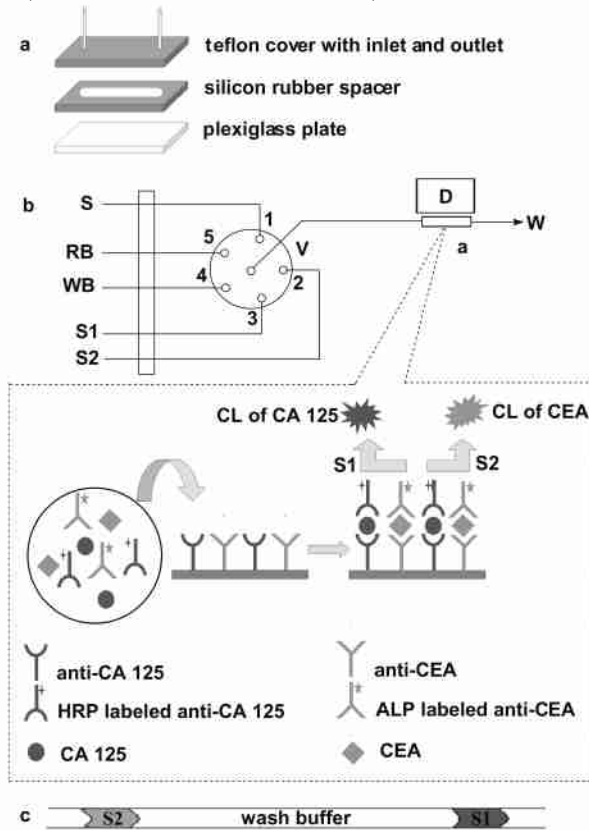


图 3 基于底物区带分辨的多分析物化学发光流动免疫检测系统<sup>[35]</sup>

Fig. 3 Scheme of the flow-through multianalyte immunosensing system based on substrate zone-resolved technique. (a) flow device, (b) flow-through analysis system and reactions occurred in the flow cell, (c) substrate zones in the flow path. S: sample, RB: regeneration buffer, WB: wash buffer, S1: HRP substrate, S2: ALP substrate, V: multiposition valve, P: peristaltic pump, D: detector, W: waste<sup>[35]</sup>

的顺序检测,可实现多组分免疫分析法<sup>[35]</sup>。例如,将 CA 125 和 CEA 两种捕获抗体同时固定于醛基活化的 UltraBind™ 膜上,制成免疫亲和柱;将样品、HRP-CA 125 抗体与碱性磷酸酶 (ALP)-CEA 抗体注入亲和柱进行在线温育,然后依次通入 HRP 与 ALP 的化学发光底物区带,可实现两种肿瘤标志物的顺序检测(图 3)<sup>[35]</sup>。CA 125 与 CEA 的检测线性范围分别为 5.0—100 U/ml 与 1.0—120 ng/ml。整个分析流程包括温育、冲洗、检测与再生共需 35 min。

4.4 通道分辨化学发光免疫分析

在不同通道(免疫亲和柱)内固定不同的抗原,分别通入相应的酶标抗体和样品,温育后注入化学发光底物,在光门的辅助下分别在不同通道内可得到不同酶标抗体对应的发光信号,用于相应抗原的多组分顺序免疫检测。

4.5 通道-底物区带二维分辨化学发光免疫分析

将底物区带分辨与通道分辨结合起来,在不同通道内分别固定两种不同的抗原,分别通入相应的

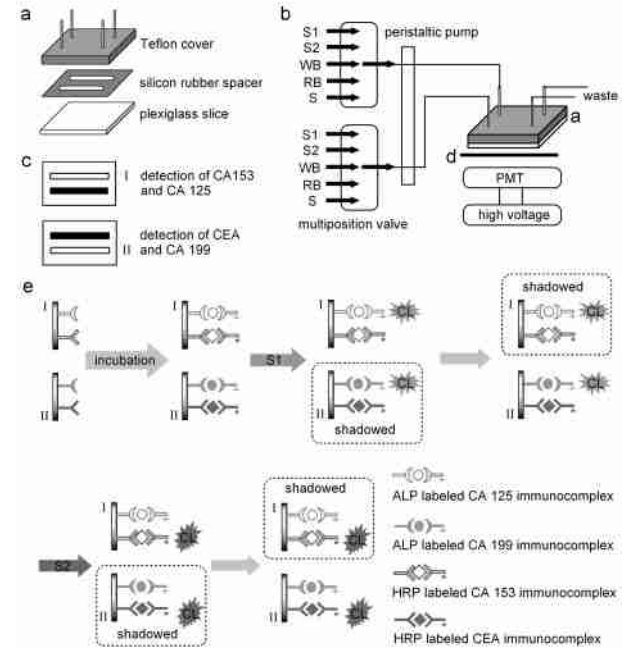


图 4 肿瘤标志物组的通道-底物区带二维分辨多分析物化学发光流动免疫检测系统<sup>[36]</sup>

Fig. 4 Scheme of the channel and substrate zone two-dimensional resolution system for multiplex immunoassay of tumor markers panel. (a) flow cell, (b) flow-through system, (c) transect of flow cell for immunoassay, (d) optical shutter and (e) near-simultaneous multianalyte immunoassay procedure. S1: ALP substrate, S2: HRP substrate, WB: wash buffer, RB: regeneration buffer, S: mixture of sample and tracer antibodies<sup>[36]</sup>

两种酶标记的抗体和样品,免疫反应后,依次通入不同酶的底物,在不同通道内可依次得到不同酶标抗体的信号,分别进行不同抗原的顺序检测。如果是 2 个酶及其底物区带在 2 个通道中,可检测  $2 \times 2 = 4$  个抗原,类似地,可分别得到  $2 \times 3 = 6$ ,  $2 \times 4 = 8$ ,  $3 \times 3 = 9$  个抗原等。例如,在流通池的两个通道中各置一片固定两种抗体的 UltraBind™ 膜,通道 1 中固定 CA 125 和 CA 153 抗体,通道 2 中固定 CA 199 和 CEA 抗体。将样品、ALP 标记的 CA 125 和 CA 199 抗体、HRP 标记的 CA 153 和 CEA 抗体通入流通池并在线温育后,在通道 1 中形成 ALP 标记的 CA 125 免疫夹心复合物和 HRP 标记的 CA 153 免疫夹心复合物,在通道 2 中形成 ALP 标记的 CA 199 免疫夹心复合物和 HRP 标记的 CEA 免疫夹心复合物。然后依次通入 ALP 与 HRP 的化学发光底物区带,并在移动式光门的辅助下实现 4 种肿瘤标志物的顺序检测。检测完成后通入再生缓冲液实现免疫反应器的再生。全分析流程共需 37 min(图 4)<sup>[36]</sup>。

## 5 细胞毒效应研究与药敏检测新方法

细胞电化学是基于电化学原理、实验方法与细胞、分子生物学技术的相互结合,对细胞进行分析和表征,研究或模拟研究细胞荷电粒子或电活性粒子能量传递的运动规律,揭示细胞结构-功能关系和外源分子对细胞功能影响的一个新研究领域。细胞作为电化学活体在电极上能给出明显的电化学伏安响应。与正常细胞相比,肿瘤细胞的介电行为、界面阻抗、电泳速度等电化学行为发生明显的改变。因此,肿瘤细胞特殊的电化学行为可用于肿瘤及癌症活体组织离体及在体的临床诊断。

利用金胶纳米粒子来构筑生物分子的直接电子传递界面并保持其生物活性的研究已被广泛报道<sup>[37]</sup>,具有广阔的应用前景。在纳米金胶修饰碳糊电极上 AsPC-1 胰腺癌细胞显示出明显的不可逆电化学伏安响应,色-质联用、高效液相色谱和电化学方法证明该响应源于细胞质中鸟嘌呤的跨膜氧化,该氧化峰可用于肿瘤活体组织离体或在体的细胞毒效应研究<sup>[38]</sup>。抗肿瘤药物阿霉素的细胞毒效应使鸟嘌呤氧化峰峰电流减弱,电解质的 pH、温度、盐浓度对细胞生长的影响与细胞培养液的条件一致。

在多壁碳纳米管修饰玻碳电极上,白血病 K562 细胞也显示一个鸟嘌呤氧化的阳极峰。通过向细胞培养液中加入 5-Flu 和其它几种抗肿瘤药物,如长春新碱,阿霉素,丝裂霉素 C 等,K562 细胞电化学响应

的信号减弱,细胞毒性曲线所显示的结果和采用 MTT 分析法得到的结果表现出良好的一致性,由此发展了一种电化学检测抗肿瘤药物药敏性质的新手段<sup>[39]</sup>。将 K562 细胞与金胶纳米粒子混合后修饰到电极表面,并以醋酸纤维素膜固定,金胶纳米粒子保持了细胞活性,并加速其电子转移速率,使得修饰电极在 +0.830 V 得到典型的鸟嘌呤阳极峰。该电化学响应可反映细胞的增殖行为与抗肿瘤药物甲氨蝶呤的抗肿瘤活性,由此可设计肿瘤细胞的药敏传感器<sup>[40]</sup>。

## 6 细胞表面蛋白与核苷载体的定量检测

利用金胶-壳聚糖膜具有的很好的生物兼容性与亲水性将 K562/阿霉素细胞固定在玻碳电极表面,通过有效的表面免疫反应,发展了一种原位检测白血病细胞 K562/ADM 表面 P-糖蛋白和溶液中细胞浓度的电化学免疫分析新方法(图 5)<sup>[41]</sup>。在优化条件下,电化学响应与细胞浓度的对数在  $5.0 \times 10^4$  —  $1.0 \times 10^7$  cell/ml 的范围成线性关系,检出限为  $1.0 \times 10^4$  cell/ml。所得结果和采用流式细胞仪分析结果一致。

我们<sup>[42]</sup>用潘生丁为荧光标记物与细胞膜上核苷载体结合,通过测定细胞膜上潘生丁的量建立了细胞膜上核苷载体测定的荧光分析新方法。线性范围为  $1.0 \times 10^{-12}$  —  $5.0 \times 10^{-11}$  mol/L,检出限为  $2.8 \times 10^{-13}$  mol/L (0.14 pg/ml),单个胰腺肿瘤细胞膜上结合平衡型核苷载体的量为  $1.75 (\pm 0.14) \times 10^5$  个,潘生丁在胰腺肿瘤细胞膜上的结合常数为  $4.7 (\pm 0.53) \times 10^{10}$  L/mol。方法简单方便,灵敏度高,克服了目前用放射标记分析法存在的放射污染问题。

## 7 细胞电化学检测与表面增殖监测

在电极表面固定细胞后进行电化学阻抗测定,电子传递电阻  $R_{ct}$  显著增加,即细胞阻碍了电极与氧化还原物种间的电子传递。所以通过检测电子传递阻抗可对电极表面固定的细胞进行定量。我们课题组<sup>[43-47]</sup>构建了多种高亲水的仿生膜界面,提出了细胞界面吸附、增殖与凋亡过程监测的新方法并设计了细胞定量的传感器件。

N,N'-二甲基-β-羟乙氧乙基丙磺酸铵两性离子膜的仿生界面能保持 K562 细胞的活性和完整结构达 5 天,实现了 K562 白血病细胞的表面吸附与增殖<sup>[43]</sup>。结合电化学阻抗图谱、扫描电镜图像、血小

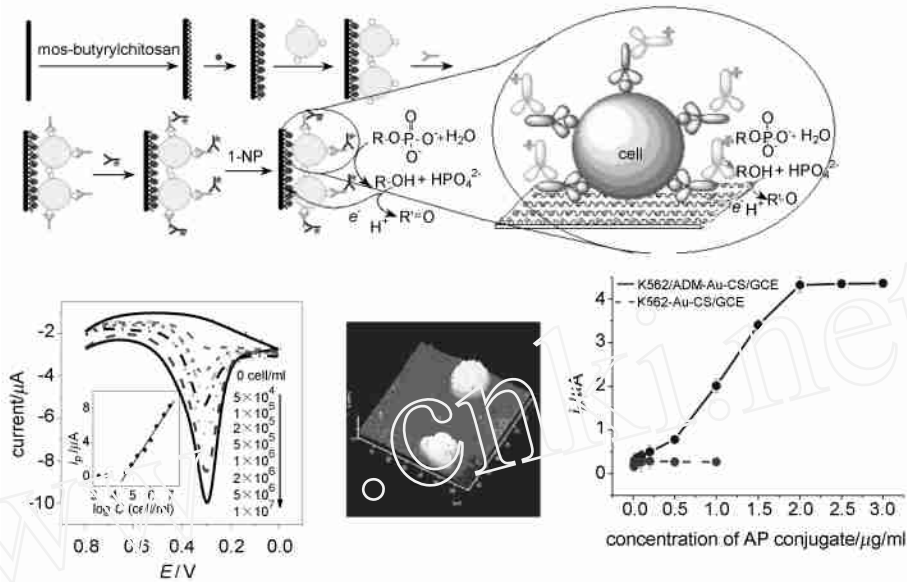


图 5 细胞膜表面 P 糖蛋白电化学酶联免疫检测过程、DPV 曲线、电极界面 AFM 图像和 AP 标记抗体浓度对响应的影响<sup>[41]</sup>  
 Fig. 5 Detection of P-glycoprotein on cell surface by electrochemical enzyme-linked immunoassay, DPV curves of 1-NP at AP-p-gr-K562/ADM-Au-chitosan/GCE with different cell concentrations in pH 7.4 PBS, AFM image of K562/ADM-Au-chitosan, and effect of concentration of AP conjugated antibody in incubation solution on DPV peak currents of K562/ADM- and K562-Au-chitosan/GCE<sup>[41]</sup>

板黏附实验表征、流式细胞分析、台盼兰染色观测以及 MTT(3-(4,5-二甲基噻唑)-2,5-二苯基四氮唑溴盐, 噻唑兰)测定等多种手段,建立了细胞在仿生膜界面吸附、增殖与凋亡过程监测的电化学方法。在洁净的玻璃碳电极表面修饰 YDH-560 型环氧硅烷单层,将 P-gp 鼠抗人单克隆抗体(p170)修饰到玻璃碳电极上,借助 p170 抗体和 K562A 细胞表面上过度表达的 P-gp 之间的免疫反应可实现 K562A 细胞的固定,并制备了 K562A 细胞电化学免疫传感器,交流阻抗与细胞浓度的对数在  $5.0 \times 10^4$ — $1.0 \times 10^7$  cells/ml 范围呈良好的线性关系<sup>[44]</sup>。用金胶-壳聚糖纳米杂化物凝胶构建了生物感生界面,修饰电极后,交流阻抗与细胞浓度、细胞在电极表面增殖时间及其凋亡有关,用于细胞数检测,具有  $1.34 \times 10^4$ — $1.34 \times 10^8$  cells/ml 的宽线性范围<sup>[45]</sup>。结合壳聚糖的生物亲和性和碳纳米纤维的优良导电性,用一步可控电沉积可形成坚固的 CNF-CS 纳米复合物膜,该膜为电极表面 K562 细胞的固定和电化学传感提供了一个生物相容性的界面,其原理如图 6 所示<sup>[46]</sup>。CNF 的存在促进了 K562 细胞的电化学行为,固定的细胞数的对数在细胞浓度为  $5.0 \times 10^3$ — $5.0 \times 10^7$  cells/ml 范围与交流阻抗呈良好的线性关系,其检测限为  $1.0 \times 10^3$  cells/ml。基于 CNF-CS 膜构建的 K562 细胞传感器表现出很好的重复性、准确性、精确性和检测的高灵敏性。

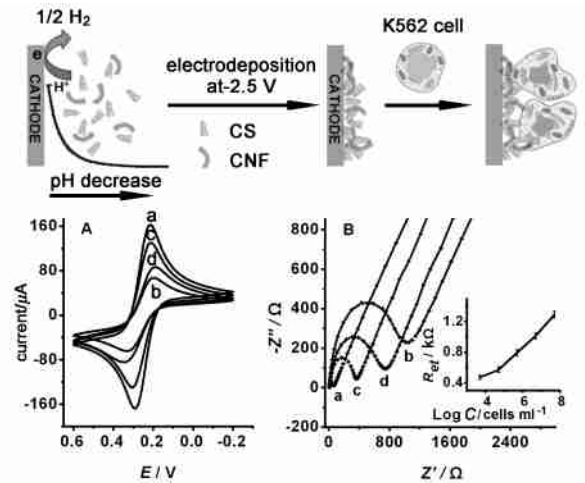


图 6 碳纳米纤维-壳聚糖纳米复合膜与 K562 细胞阻抗传感器的形成以及电化学探针的循环伏安图与阻抗图<sup>[46]</sup>

Fig. 6 Formation of CNF-CS film and impedance sensor for K562 cells, cyclic voltammograms of  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  in 1.0 mol/L KCl at different electrodes and the Nyquist diagrams of Faradaic impedance spectra as well as calibration curve<sup>[46]</sup>

用电化学聚合可制备聚苯胺修饰丝网印刷电极,并构建一次性使用的细胞阻抗传感器<sup>[47]</sup>。聚苯胺促进了丝网印刷电极表面的电子传递,并可有效固定细胞。电极表面黏附的细胞增加了氧化还原探针的电子传递阻抗,基于此可检测 K562 白血病细胞

的线性范围为  $10^4$ — $10^7$  细胞/ml,此方法也可监测细胞在聚苯胺修饰丝网印刷电极上的生长行为,细胞在 60 h 内保持活性,与光学显微镜和 MTT 分析结果相符。

## 8 细胞的分子生物学检测与临床应用

我们<sup>[48]</sup>利用荧光定量 PCR,提出了可检出低至 3 个细胞的分析方法,并用于临床研究,监测了肿瘤组织外科切除前后循环系统中肿瘤细胞的变化情况。通过随访提出了这些变化与癌转移的关系。

## 9 结语

毋庸置疑,免疫分析与细胞检测已成为生命分析化学的重要研究领域。尽管免疫分析已有上百年的历史,标记免疫分析的提出也已有半个世纪,随着社会的发展,纳米与传感技术的进步以及人类健康对分子诊断的要求,新的免疫分析原理与方法将得到不断发展。为适应联合诊断的需要,多分析物同时检测的多通道免疫分析方法与分辨技术将得到进一步完善,高通量的快速免疫分析方法将备受关注。在细胞检测方面将注重单细胞组分与表面受体的定量检测,发展其在临床诊断和蛋白质磷酸化、蛋白质糖基化等信号传导研究中的应用。利用纳米技术、微流控技术发展免疫与细胞分析新方法将成为新的研究热点。同时,在检测灵敏度的提高和自动化检测仪器的研制方面也将取得重大突破。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 鞠焜先(Ju H X), 邱宗荫(Qiu Z Y), 丁世家(Ding S J)等. 生物分析化学(A analytical Biochemistry). 北京: 科学出版社(Beijing: Science Press), 2007. 126—263
- [ 2 ] Hayashi Y, Matsuda R, Maitani T, Imai K, Nishimura W, Ito K, Maeda M. Anal. Chem., 2004, 76: 1295—1301
- [ 3 ] 焦奎(Jiao K), 张书圣(Zhang S S), 张敏(Zhang M). 分析化学(Chinese J. Anal. Chem.), 1995, 23: 1211—1214
- [ 4 ] 鞠焜先(Ju H X). 电分析化学与生物传感技术(Electroanalytical Chemistry and Biosensing Technology). 北京: 科学出版社(Beijing: Science Press), 2006. 382—385
- [ 5 ] Sadiq O A, van Ermon J M. Chem. Tech., 1997, 27: 38—43
- [ 6 ] Dai Z, Chen J, Yan F, Ju H X. Cancer Detect. Prev., 2005, 29: 233—240
- [ 7 ] Du D, Yan F, Liu S L, Ju H X. J. Immunol. Methods, 2003, 283: 67—75
- [ 8 ] Wu L N, Chen J, Du D, Ju H X. Electrochim. Acta, 2006, 51: 1208—1214
- [ 9 ] Chen J, Yan F, Wu J, Ju H X. Electroanalysis, 2006, 18: 670—676
- [ 10 ] Chen J, Yan F, Tan F, Ju H X. Electroanalysis, 2006, 18: 1696—1702
- [ 11 ] Dai Z, Yan F, Yu H, Hu X Y, Ju H X. J. Immunol. Methods, 2004, 287: 13—20
- [ 12 ] Wu L N, Feng F, Ju H X. J. Immunol. Methods, 2007, 322: 12—19
- [ 13 ] Dai Z, Yan F, Chen J, Ju H X. Anal. Chem., 2003, 75: 5429—5434
- [ 14 ] Chen J, Yan F, Dai Z, Ju H X. Biosens. Bioelectron., 2005, 21: 330—336
- [ 15 ] Chen J, Tang J H, Yan F, Ju H X. Biomaterials, 2006, 27: 2313—2321
- [ 16 ] Tan F, Yan F, Ju H X. Electrochem. Commun., 2006, 8: 1835—1839
- [ 17 ] Tan F, Yan F, Ju H X. Biosens. Bioelectron., 2007, 22: 2945—2951
- [ 18 ] Yu H, Yan F, Dai Z, Ju H X. Anal. Biochem., 2004, 331: 98—105
- [ 19 ] Wu J, Tang J H, Dai Z, Yan F, Ju H X, El Murr N. Biosens. Bioelectron., 2006, 22: 102—108
- [ 20 ] Wilson M S, Nie W Y. Anal. Chem., 2006, 78: 2507—2513
- [ 21 ] Wilson M S, Nie W Y. Anal. Chem., 2006, 78: 6478—6483
- [ 22 ] Wilson M S. Anal. Chem., 2005, 77: 1496—1502
- [ 23 ] Kojima K, Hiratsuka A. Anal. Chem., 2003, 75: 1116—1122
- [ 24 ] Shi M H, Peng Y Y, Zhou J, Kong J L. Biosens. Bioelectron., 2006, 21: 2210—2216
- [ 25 ] Jiang D C, Tang J, Liu B H, Kong J L. Anal. Chem., 2003, 75: 4578—4584
- [ 26 ] Wu J, Fu Z F, Yan F, Ju H X. Trends Anal. Chem., 2007, 26: 679—688
- [ 27 ] Wu J, Zhang Z J, Fu Z F, Ju H X. Biosens. Bioelectron., 2007, 23: 114—120
- [ 28 ] Wu J, Yan F, Tang J H, Zhai C, Ju H X. Clin. Chem., 2007, 53: 1495—1502
- [ 29 ] Lin J H, Ju H X. Biosens. Bioelectron., 2005, 20: 1461—1470
- [ 30 ] Lin J H, Yan F, Ju H X. Clin. Chim. Acta, 2004, 341: 109—115
- [ 31 ] Lin J H, Yan F, Ju H X. Appl. Biochem. Biotech., 2004, 117: 93—102
- [ 32 ] Yan F, Zhou J N, Lin J H, Ju H X, Hu X Y. J. Immunol. Methods, 2005, 305: 120—127
- [ 33 ] Lin J H, Yan F, Hu X Y, Ju H X. J. Immunol. Methods, 2004, 291: 165—174
- [ 34 ] Fu Z F, Hao C, Fei X Q, Ju H X. J. Immunol. Methods, 2006, 312: 61—67
- [ 35 ] Fu Z F, Liu H, Ju H X. Anal. Chem., 2006, 78: 6999—7005
- [ 36 ] Fu Z F, Yang Z J, Tang J H, Liu H, Yan F, Ju H X. Anal. Chem., 2007, 79: 7376—7382
- [ 37 ] Jia J B, Wang B Q, Wu A G, Cheng G J, Li Z, Dong S J. Anal. Chem., 2002, 74: 2217—2223
- [ 38 ] Du D, Liu S L, Chen J, Ju H X, Lian H Z, Li J X. Biomaterials, 2005, 26: 6487—6495

- [39] Chen J, Du D, Yan F, Ju H X, Lian H Z. *Chem. Eur. J.*, 2005, 11: 1467—1472
- [40] Yan F, Chen J, Ju H X. *Electrochem. Commun.*, 2007, 9: 293—298
- [41] Du D, Ju H X, Zhang X J, Chen J, Cai J, Chen H Y. *Biochemistry*, 2005, 44: 11539—11545
- [42] Zhu G H, Ju H X, Zheng H. *Clin. Chim. Acta*, 2004, 348: 101—106
- [43] Du D, Cai J, Ju H X, Yan F, Chen J, Jiang X Q, Chen H Y. *Langmuir*, 2005, 21: 8394—8399
- [44] Hao C, Yan F, Ding L, Xue Y D, Ju H X. *Electrochem. Commun.*, 2007, 9: 1359—1364
- [45] Ding L, Hao C, Xue Y D, Ju H X. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 1341—1346
- [46] Hao C, Ding L, Zhang X J, Ju H X. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 4442—4447
- [47] Ding L, Du D, Wu J, Ju H X. *Electrochem. Commun.*, 2007, 9: 953—958
- [48] Liu Z A, Jiang M, Zhao J H, Ju H X. *Clin. Cancer Res.*, 2007, 13: 2992—2997

## 《化学进展》近期目次预告

点击化学——释义与目标 (M. G. Finn, Hartmuth C. Kolb, Valery V. Fokin, K. Barry Sharpless) (吴云东译)

离子液体与绿色化学:为了今天还是为了未来(寇元 何玲)

金纳米晶制备和表面修饰中的分子配体(宋香宁 纪小会 李军 杨文胜)

纳米 TiO<sub>2</sub> 固相光催化降解固体废弃塑料(法文君 咎菱 龚楚清 钟家怪)

有序介孔二氧化硅/聚苯胺复合物(曾春梅 韩书华 闫欣 于小娟 车红卫 赵效洪)

有机功能化的介孔氧化硅的制备和表征(张一平 周春晖 王学杰 杨彤 徐羽展)

新型多孔碳材料碳化物骨架碳(戴春岭 王先友 黄庆华 李俊)

一维金属氧化物的制备及其修饰(朱宝林 李凯荣 张守民 吴世华 黄唯平)

生物矿化中的无定形碳酸钙(徐旭荣 蔡安华 刘睿 潘海华 唐睿康)

微通道反应器在合成反应中的应用(穆金霞 殷学锋)

有机催化不对称 Mannich 反应(马晶军 李宁 吴秋华 周欣 臧晓欢 王春)

缺电子联吡啶环蕃的研究(席海涛 孙小强 孟启 潘毅 胡宏纹)

Caspase 抑制剂的结构及合成(张雁钦 郑松志 陶兰 安胜姬)

自组装方法制备有序微孔薄膜(王赓胤 冒银道 王德艳 胡效亚)

磺化嵌段型共聚物在质子交换膜燃料电池中的应用(冯少广 谢晓峰 尚玉明 靳豪 徐景明 周其凤)

海藻酸钠和壳聚糖聚电解质微胶囊的研究与生物医学应用(刘袖洞 于炜婷 王为 雄鹰 马小军 袁权)

液晶弹性体刺激形变研究(徐婉娴 尹若元 林里 俞燕蕾)

糖芯片研究(薛彦峰 王秀奎 侯信 姚康德)

表面等离子体波共振技术在气体检测方面的应用(郭文婷 李秀丽 韦天新)

载体对包埋酶微环境影响分析(许松伟 张杰 杨占平 曹建华 马晓龙 姜忠义)

药用微胶囊的制备(乔吉超 胡小玲 管萍 赵亚梅 田威)