

石墨相氮化碳光诱导活化辣根过氧化物酶 及其比色免疫分析应用

张 岚 李小琴 王光丽*

(江南大学 合成与生物胶体教育部重点实验室 化学与材料工程学院, 无锡 214122)

摘 要 基于石墨相氮化碳($\text{g-C}_3\text{N}_4$)在可见光($\lambda \geq 400 \text{ nm}$)照射下可激活辣根过氧化物酶(HRP),使 HRP 能够催化氧化特征底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),设计了一种新型夹心型免疫传感器,用于高灵敏检测甲胎蛋白(AFP)。此夹心型免疫传感器利用附着于微孔板上的一抗(Ab_1)捕获目标物 AFP,然后与 HRP 和二抗(Ab_2)共同标记的金纳米颗粒($\text{Ab}_2\text{-AuNPs-HRP}$)反应,并结合酰胺放大技术(TSA),增大表面固定的 HRP 的量,实现信号放大。加入 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 后,在可见光照射下,HRP 的活性被激发,TMB 被氧化后的信号(即 652 nm 处的吸光度)与 AFP 的浓度在 0.5 pg/mL ~ 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈线性关系,检出限(LOD, $S/N=3$)为 0.17 pg/mL。本研究构建的新型免疫传感器具有灵敏度高、选择性好、使用方便等优点,在实际样品测定中具有潜在的应用价值。

关键词 石墨相氮化碳;辣根过氧化物酶;活化;免疫分析

1 引言

天然酶具有活性高、选择性和特异性好等优势,在生物分析中应用广泛。辣根过氧化物酶(HRP)是一种含亚铁血红素的蛋白质,具有性质稳定、比活性高、分子量小、容易制备等优点,在催化和分析检测等领域具有重要应用。通常利用 H_2O_2 以及浓 H_2SO_4 进行 HRP 活性的调控,由于使用了腐蚀性的化学试剂,因此操作不便,且对环境有污染。最近,利用纳米材料调控天然酶活性的研究备受关注。Fruk 等^[1]发现紫外光照射的 CdS 量子点可引发 HRP 的催化活性,氧化其荧光底物(中性红);Kamda 等^[2,3]发现在紫外光或可见光激发下,铁掺杂的钛酸盐及铂掺杂的赤铁矿固体薄膜可激发并调控 HRP 的活性。最近,本研究组^[4,5]发现邻苯二酚类化合物(如邻苯二酚、多巴)与二氧化钛纳米粒子结合后,在可见光激发下,也可活化 HRP,氧化其特征底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)。研究发现,在光照下,纳米材料可产生多种活性成分,如超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)、空穴(h^+)和羟基自由基($\cdot\text{OH}$)等,进而活化天然酶 HRP,使其在无 H_2O_2 存在条件下也表现出较高的催化活性。利用光照后的纳米材料调控 HRP 催化活性的体系,可方便地通过调控光照的有无实时调控酶活性。光激发纳米材料为调控天然酶活性提供了一种简单方便、无需加入破坏性化学试剂的新途径。但是,已报道的可调控 HRP 活性的纳米材料仍十分有限,部分纳米材料本身有毒性,而且有的材料需在紫外光下激发,但紫外光本身会导致 HRP 失活。因此,能够较好调控 HRP 活性的纳米材料,尤其是对纳米材料活化 HRP 体系的生物传感应用研究仍需进一步探索。

石墨相氮化碳($\text{g-C}_3\text{N}_4$)是一种生物相容性好、毒性低的无金属半导体材料,具有优异的荧光、光电转换、光催化等性质^[6-8]。AFP 是一种重要的临床肿瘤标志物,广泛应用于肝细胞肝癌和卵黄囊肿瘤的诊断,在胎儿缺陷和肿瘤(尤其是肝脏肿瘤)的临床诊断中具有重要作用^[9]。本研究发现,在可见光照射下,所合成的 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片可活化 HRP 催化氧化底物 TMB,产生较强的特征吸收信号。以甲胎蛋白(AFP)为模型物,在光照条件下,将 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片活化 HRP 与酰胺放大技术(TSA)结合,建立了一种比色检测 AFP 的方法。研究结果表明,本方法具有简单方便、检测线性范围宽、灵敏度高等优点。

2020-02-10 收稿;2020-03-23 接受

本文系国家自然科学基金项目(Nos. 21575052, 21676123)资助

* E-mail: glwang@jiangnan.edu.cn

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Hitachi S-4800 扫描电子显微镜(日本 Hitachi 公司); D8 型 X 射线衍射仪(德国布鲁克公司); FT-IR 6700 光谱仪(美国 Thermo Fisher 公司); 拉曼光谱仪(英国 Renishaw 公司); TU-1901 分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); 荧光分光光度计(美国 Varian 公司); CELS5001350 氙灯光源(北京中教金源科技有限公司); 酶标仪(美国 SpectraMax M5 公司); CHI 800C 型电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)。

癌胚抗原(CEA)、前列腺抗原(PSA)和甲胎蛋白(AFP)购自北京久峰润达生物技术公司; 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和 HRP 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 叔丁醇(TBA)、异丙醇(IPA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、碘化钾(KI)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、鼠来源 AFP 抗体对(一抗 Ab₁、二抗 Ab₂)、*N*-羟基丁二酰亚胺(NHS)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)、牛血清白蛋白(BSA)、*N*-2-羟乙基哌嗪-*N'*-(2-乙磺酸)、酪胺、吐温-20、色氨酸(Trp)、丙氨酸(Ala)和入血清白蛋白(HSA)均购自国药集团化学试剂有限公司。血清样本来源于江南大学附属医院。

2.2 g-C₃N₄ 纳米片的合成

参照文献[10]的方法,称取 10.0 g 三聚氰胺(C₃N₆H₆)置于陶瓷坩埚中,在马弗炉中,以 3℃/min 加热至 550℃,保持 2 h,得到黄色的固体产物。研磨后,称取 40 mg 粉末于 40 mL 水中,超声 10 h,悬浮液以 5000 r/min 离心 15 min,得到 g-C₃N₄ 纳米片。

2.3 g-C₃N₄ 光诱导活化 HRP 性质的探究

2.3.1 g-C₃N₄ 光诱导活化 HRP 取 50 μL 200 μg/mL g-C₃N₄ 和一定浓度的 HRP 于 200 μL HAc-NaAc 缓冲溶液(0.4 mol/L, pH 3.0)中,超声 10 min,使 g-C₃N₄ 分散。加入 500 μmol/L TMB,用水稀释至 1.0 mL,溶液混合均匀后,放置于氙灯(λ ≥ 400 nm)下照射 15 min,测定 652 nm 处的吸光度。

2.3.2 g-C₃N₄ 光诱导活化 HRP 体系的催化动力学研究 在 30℃ 下,将 50 μL 200 μg/mL g-C₃N₄ 和 100 μg/mL HRP 加入 200 μL HAc-NaAc 缓冲溶液(0.4 mol/L, pH 3.0)中,再加入不同浓度的 TMB 溶液,用水稀释至 1.0 mL,混合均匀,以 TMB 为底物,基于米氏方程计算反应动力学参数。在可见光照射下,每隔 1 min 测量 652 nm 处的吸光度,研究反应的动力学性质。

2.4 基于光诱导 g-C₃N₄ 活化 HRP 免疫检测 AFP

2.4.1 HRP/AuNPs/Ab₂ 复合物的合成 参照文献[11]的方法,采用柠檬酸三钠还原 HAuCl₄ 合成金纳米粒子(AuNPs)。将 AFP 二抗(Ab₂)和 HRP 共同固定在 AuNPs 上,获得 HRP/AuNPs/Ab₂ 复合物,合成步骤参照文献[12]: (1)用 0.1 mol/L Na₂CO₃ 调节 AuNPs 溶液至 pH 8~9; (2)取 40 μL 100 μg/mL Ab₂ 和 160 μL 100 μg/mL HRP 加入到 1.0 mL AuNPs(Ab₂ 和 HRP 的浓度为最佳比例)中,混合溶液在 4℃ 下孵育 12 h; (3)将混合溶液以 12000 r/min 离心 20 min,移除过量的 Ab₂ 和 HRP,HRP/AuNPs/Ab₂ 复合物超声后,重新分散在 1.0 mL PBS 缓冲溶液(pH=7.4,含 1.0% (w/w) BSA)中,于 4℃ 避光储存。

2.4.2 HRP/酪胺复合物的合成 参照文献[12]的方法合成 HRP/酪胺复合物: 将 600 μL 1.0 mg/mL HRP 加入 1.5 mL HEPES 缓冲溶液(50 mmol/L, pH 9.3)中,室温超声 5 min; 将混合物用 3.0 mol/L HCl 调节至 pH 7.3,将 15 mg NHS 和 20 mg EDC 加入到上述溶液中,室温搅拌 45 min; 将 600 μL 5.0 mg/mL 酪胺溶液逐滴滴加到上述溶液,得到的混合溶液在室温下搅拌 12 h; 将混合溶液离心 10 min,用蒸馏水洗涤两次,得到 HRP/酪胺复合物; 将其超声分散到 500 μL PBS 缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 7.4)中,于 4℃ 避光储存。

2.4.3 比色法检测 AFP 具体步骤如下: (1)20 μL 0.1 mg/mL AFP 一抗(Ab₁)加入到 96 微孔板中,在 4℃ 条件下过夜,用洗涤液洗涤未吸附在微孔板上的 Ab₁,室温下加入 20 μL 封闭液,静置 2 h,封闭非特异性吸附位点,再用洗涤液洗涤; (2)20 μL 不同浓度的 AFP 抗原加入微孔板中,室温下孵育 1 h 后洗涤; (3)20 μL HRP/AuNPs/Ab₂ 复合物加入到上述溶液中,室温下孵育 1 h 后,洗涤; (4)室温下,依次将 H₂O₂ (5 μL, 2 mmol/L) 和酪胺/HRP 复合物 (10 μL) 加入微孔板中,放置 1 h 后,洗涤;

(5)将 20 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 、100 μL 醋酸缓冲溶液(0.4 mol/L, pH 3.0)和 20 μL 500 $\mu\text{mol/L}$ TMB 加入微孔板中,置于氙灯($\lambda \geq 400$ nm)下照射 15 min,测定 652 nm 处的吸光度数值。

3 结果与讨论

3.1 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 的表征

由图 1A 可知, $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 具有石墨烯类似结构和不规则折叠状片层结构,尺寸约为 1.5 ~ 2.5 μm 。所合成的 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 有两个明显的吸收峰,在(002)方向上,27.7°处的强峰为 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 结构中石墨层间堆积吸收峰;在(100)方向上,13.02°处的弱衍射峰为周期性的平面结构衍射峰^[13]。与大块 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 相比^[10],27.5°处的衍射峰强移动到 27.7°,表明纳米层状结构合成成功;13.02°处的峰变弱,表明石墨层的平面尺寸变小(图 1B)。如红外光谱(FT-IR)(图 1C)所示,在 3000 和 3600 cm^{-1} 处的宽吸收峰为 N—H 和 O—H 的伸缩振动峰,1000 和 1800 cm^{-1} 处的吸收峰为 CN 杂环的伸缩振动峰,811 cm^{-1} 处的吸收峰为三嗪环振动峰。由于 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 表面富含 —OH、—NH 等亲水基团,使其具有良好的水溶性。图 1D 为 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 的紫外-可见吸收光谱,在测试条件下,由于浓度较小,可见光区吸收不明显。在 785 nm 激发光下, $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 在 702 和 1231 cm^{-1} 有典型的拉曼峰(图 1E)。量子局限效应使得导带和价带向相反的方向移动^[14],导致荧光发射峰由大块 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 的 449 nm^[15] 蓝移至 440 nm(图 1F)。所制备的 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 具有荧光性质,说明其具有光诱导电子激发/转移特性,具有光活性。

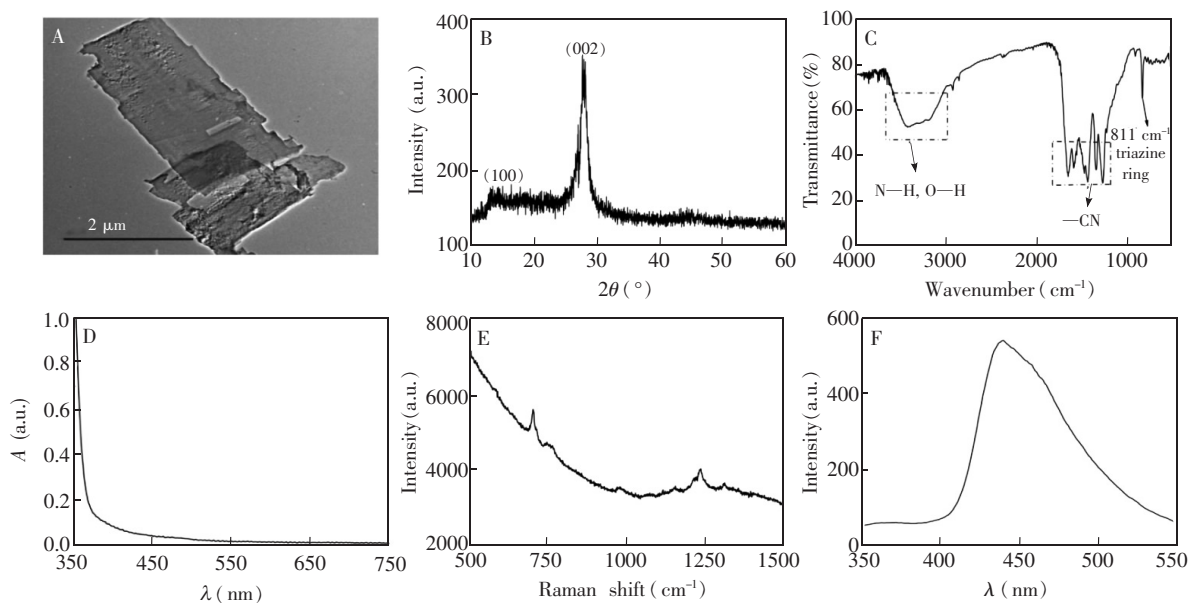


图 1 石墨相氮化碳($\text{g-C}_3\text{N}_4$)的(A)透射电镜图、(B)X 射线衍射图、(C)红外光谱图、(D)紫外-可见吸收光谱、(E)拉曼光谱和(F)光致发光光谱图

Fig. 1 (A) Transmission electron microscopic (TEM) image, (B) X-ray diffraction (XRD) pattern, (C) Fourier transform infrared (FT-IR) spectrum, (D) UV-Vis absorption spectrum, (E) Raman spectrum and (F) photoluminescence (PL) spectrum of $\text{g-C}_3\text{N}_4$

3.2 可见光照射 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 活化 HRP 及其机理

在没有 H_2O_2 的条件下, $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 经可见光照射可活化 HRP。如图 2 所示,通过对比实验发现,不光照的 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 或光照条件下的 HRP,均不能明显地氧化 TMB;而光照下的 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 对 TMB 的氧化效果也较弱;只有光照条件下 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 和 HRP 的混合物才能催化氧化 TMB,使溶液变成蓝色。研究发现,纳米材料可产生多种活性中间体^[4,5](如 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 h^+ 等)活化 HRP。据此推断,在可见光照射下, $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 通过产生某些活性中间体活化 HRP,使其表现出催化氧化 TMB 的效果。

为进一步阐明光照条件下 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 活化 HRP 的机制,本研究引入了活性中间体的捕获剂,探究各种

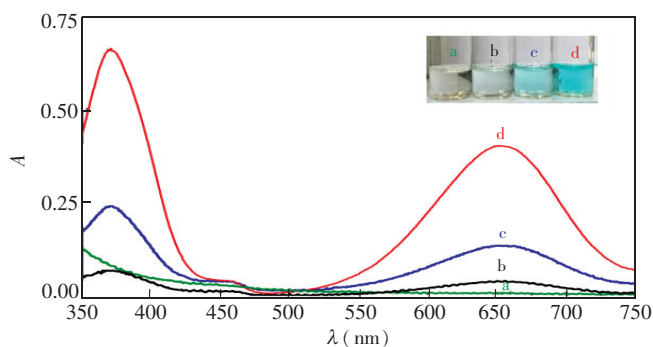


图2 在不同条件下,TMB 被催化氧化后的紫外-可见吸收光谱图: (a) $\text{g-C}_3\text{N}_4$; (b) 辣根过氧化物酶 (HRP)+光照; (c) $\text{g-C}_3\text{N}_4$ +光照和 (d) $\text{g-C}_3\text{N}_4$ +HRP+光照,插图是对应溶液的颜色照片

Fig. 2 UV-Vis absorption spectra of tetramethylbenzidine (TMB) after catalytic oxidation under different conditions: (a) $\text{g-C}_3\text{N}_4$; (b) horseradish peroxidase (HRP)+visible light; (c) $\text{g-C}_3\text{N}_4$ +visible light and (d) $\text{g-C}_3\text{N}_4$ +HRP+visible light. Inset is corresponding picture of the solution

活性物质对体系催化氧化活性的影响。例如,叔丁醇 (TBA) 和异丙醇 (IPA) 可捕获 $\cdot\text{OH}$ ^[16], 乙二胺四乙酸 (EDTA) 和 KI 可捕获 h^+ ^[17], 超氧化物歧化酶 (SOD) 可捕获 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ^[18], 过氧化氢酶 (CAT) 可催化分解 H_2O_2 生成水和氧气。如图 3A 所示,与不含捕获剂相比,加入 KI 和 SOD 清除剂后,催化反应被抑制,可

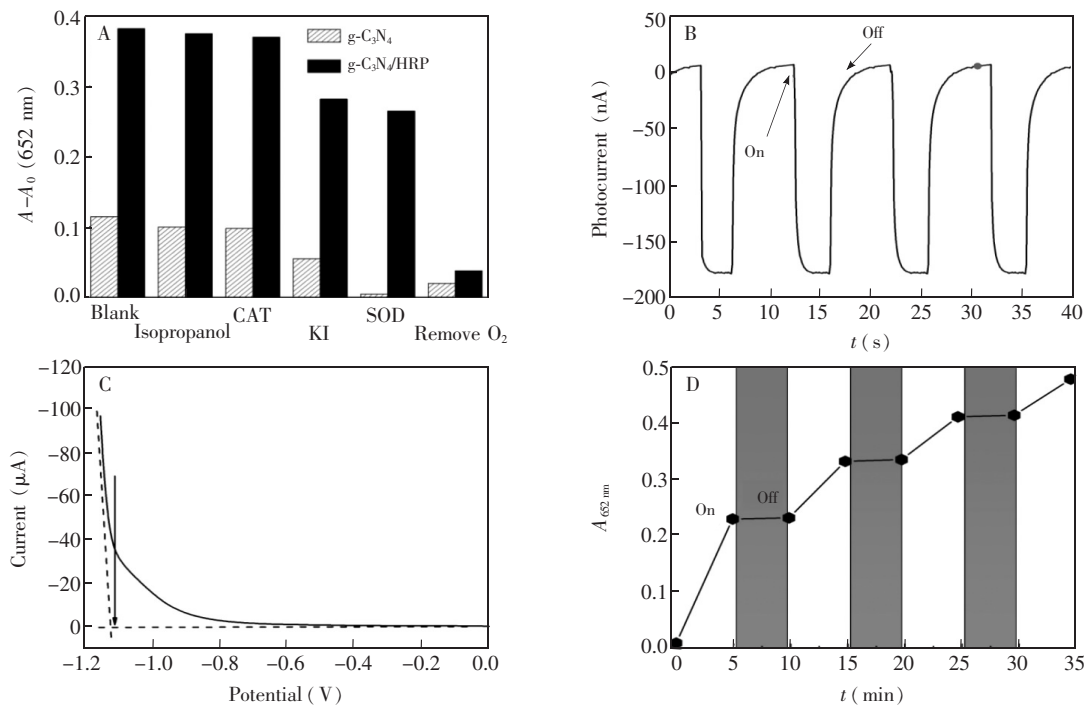


图3 (A) 不同清除剂对 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ /HRP 催化氧化 TMB 的影响; (B) $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 修饰的 ITO 电极在可见光 ($\lambda \geq 400 \text{ nm}$) 照射下的光电流; (C) $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 的阴极线性扫描曲线 (实验条件: 外加电压 0 V (相对于饱和 Ag/AgCl), 除氧的 0.1 mol/L Na_2SO_4 溶液中, 扫描速率为 5 mV/s); (D) 光切换 (每隔 5 min) 条件下 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ /HRP 体系的性能

Fig. 3 (A) Effect of different scavengers on oxidation of TMB by illuminated $\text{g-C}_3\text{N}_4$ /HRP; (B) Photocurrent-time performances of $\text{g-C}_3\text{N}_4$ modified indium tin oxide (ITO) electrode under visible light irradiation ($\lambda \geq 400 \text{ nm}$); (C) Cathodic linear potential scan for determining the conduction band edge of $\text{g-C}_3\text{N}_4$ specimens at 5 mV/s and (D) Photoswitching behaviors of catalytic oxidation of TMB by $\text{g-C}_3\text{N}_4$ /HRP under visible light irradiation recorded every 5 min

知 h^+ 和 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 是主要的活性成分。由光电化学实验结果可知, $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 具有光诱导电子转移特性, 在可见光开/关循环照射下, 可产生光电流(图 3B)。通过线性扫描测得 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 的导带电位为 -1.13 V (相对于饱和 Ag/AgCl , 图 3C), 此电位比氧气的还原电位 ($-0.046\text{ V vs NHE}^{[19]}$) 更负。因此, 可见光照射 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 半导体, 使得光生电子由价带跃迁至导带, 导带上的电子还原溶解氧, 产生 $\text{O}_2^{\cdot -}$, 进而活化 HRP; 而价带产生的 h^+ 可直接氧化 HRP, 将其转化为活化状态, 进而氧化底物 TMB^[2]。

通过光照的有无可控 $\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{HRP}$ 的催化活性。如图 3D 所示, 在光照条件下, oxTMB 的吸光度明显增加; 在无光照时, 吸光度变化较小。停止光照后, 酶催化反应在很大程度上被抑制, 这可能是活性中间体 ($\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 h^+) 在酸性环境中寿命短^[2] 所致。相对于常规 HRP 体系通过加入浓 H_2SO_4 引起酶的变性以终止酶催化反应, 本研究体系通过打开或关闭可见光源即可方便地调控 HRP 的活性。

考察了 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 活化 HRP 的实验中, 光照时间和 HRP 的浓度对催化效果的影响。如图 4A 所示, $\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{HRP}$ 起始反应速率较快, 随着光照时间延长, 反应趋于平衡; 如图 4B 所示, 固定 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 的量, $\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{HRP}$ 催化氧化 TMB 的效果随着 HRP 量的增加而增强, 表明体系的氧化能力与 HRP 的量有直接关系。

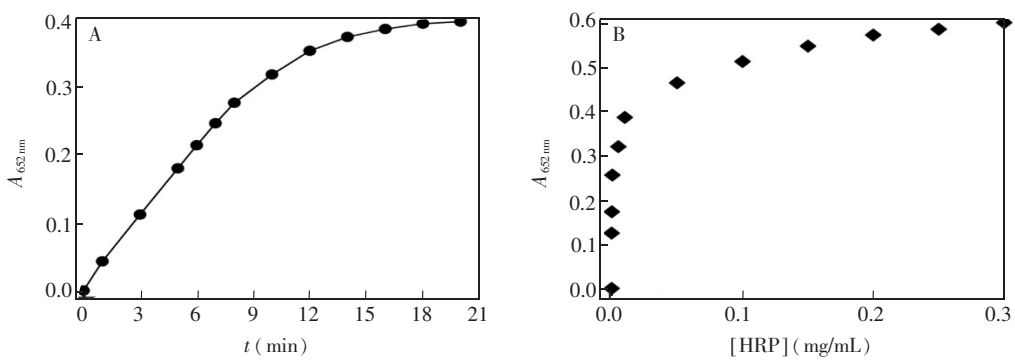


图 4 (A) 在可见光下, $\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{HRP}$ 催化氧化 TMB 的时间变化图, $[\text{g-C}_3\text{N}_4] = 10\text{ }\mu\text{g/mL}$, $[\text{HRP}] = 0.01\text{ mg/mL}$, 0.4 mol/L 醋酸缓冲液 ($\text{pH } 3.0$); (B) 在可见光下, HRP 浓度对 oxTMB 催化氧化的影响

Fig. 4 (A) Oxidation of TMB by $\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{HRP}$ under visible light irradiation with increasing time, $[\text{g-C}_3\text{N}_4] = 10\text{ }\mu\text{g/mL}$, $[\text{HRP}] = 0.01\text{ mg/mL}$, $\text{pH} = 3$; (B) Effect of concentration of HRP on catalytic oxidation of oxTMB under visible light

反应体系的 pH 值和反应温度都会影响 $\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{HRP}$ 的催化活性。由图 5 可知, $\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{HRP}$ 催化体系的最优 pH 值和温度分别为 $\text{pH } 3.0$ 和 30°C 。而常规 HRP 催化体系(以 H_2O_2 为活性激发物质)的最优 pH 值和温度分别为 $\text{pH } 3.0$ 和 40°C 。

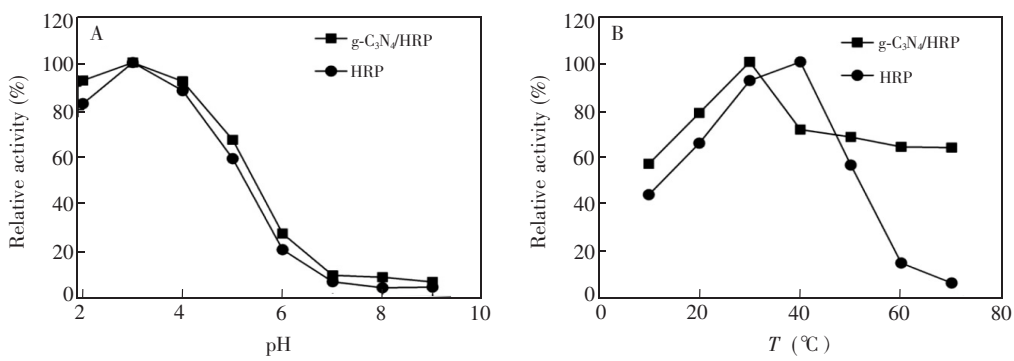


图 5 (A) pH 值和 (B) 温度对 $\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{HRP}$ 及 HRP 催化活性的影响

Fig. 5 Dependence of relative catalytic activity of $\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{HRP}$ and HRP with (A) pH and (B) temperature using $5\text{ mmol/L H}_2\text{O}_2$ as an oxidant

进一步探究了 $g-C_3N_4$ /HRP 体系的催化动力学特征。动力学参数由米氏方程的双倒数曲线 $v = V_{\max}[S]/K_m + [S]$ 获得(其中, v 代表催化反应的初始速率, $v_{\max}$ 代表最大反应速率, $[S]$ 和 K_m 分别代表底物浓度和米氏常数)。如图 6 所示, 计算得 $g-C_3N_4$ /HRP 体系的 $K_m = 100 \mu\text{mol/L}$, 比 HRP 的 K_m ($434.0 \mu\text{mol/L}$ [20]) 小, 表明 $g-C_3N_4$ /HRP 对底物 TMB 的亲合力比 HRP(以 H_2O_2 为活性激发物质)高。

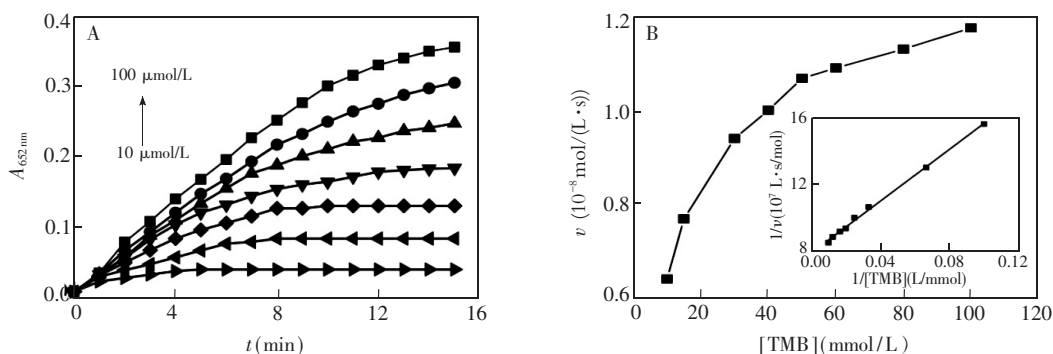


图 6 (A) $g-C_3N_4$ /HRP 催化氧化体系中, TMB 被氧化后的吸光度; (B) $g-C_3N_4$ /HRP 在可见光照射下 ($\lambda \geq 400 \text{ nm}$) 的光诱导模拟酶的 Michaelis-Menten 曲线, 插图是 Lineweaver-Burk 曲线

Fig. 6 (A) Absorbance of oxTMB at 652 nm versus time by $g-C_3N_4$ /HRP with different concentrations of TMB; (B) Steady-state kinetic assay of $g-C_3N_4$ /HRP as photoactivated nanoenzyme illuminated under visible light irradiation ($\lambda \geq 400 \text{ nm}$). Inset is Lineweaver-Burk plot of double reciprocal of Michaelis-Menten equation

3.3 基于 $g-C_3N_4$ 活化 HRP 的免疫分析方法检测 AFP

基于光照条件下 $g-C_3N_4$ 可活化 HRP, 并利用 TSA 技术 [21] 增大表面所固定的信号分子 HRP 的量, 实现了 AFP 的检测, 原理如图 7 所示, 此夹心型免疫传感器利用附着于 96 孔板的一抗 (Ab_1) 捕获目标物 AFP, 然后添加表面固定了二抗 (Ab_2) 与 HRP 的金纳米粒子 (即 Ab_2 -AuNPs-HRP 复合物), 并通过酪胺和 HRP 的结合作用继续捕获合成的 HRP-酪胺重复单元 [21], 实现信号放大。在可见光照射下, 加入的 $g-C_3N_4$ 激发 HRP 活性, 催化氧化特征底物 TMB 产生检测信号。通过实验可验证由 TSA 技术形成的 HRP-酪胺重复单元可放大检测信号。如图 8 所示, 无 TSA 时, 检测信号低; 有 TSA 时, 检测信号增强。两者存在明显差别, 说明形成的 HRP-酪胺重复单元可放大检测信号。

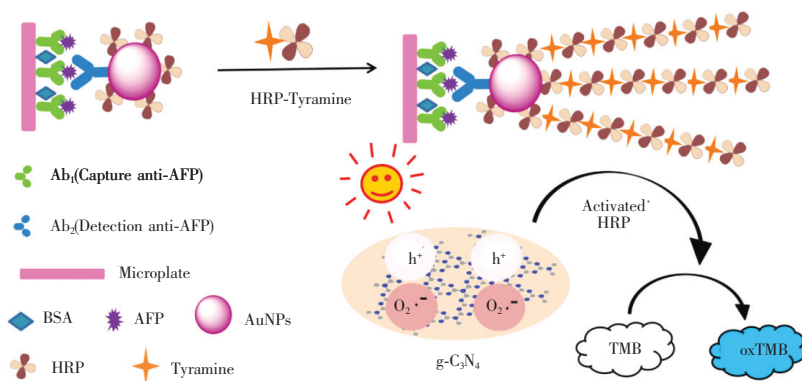


图 7 基于 $g-C_3N_4$ 活化 HRP 的免疫分析方法检测甲胎蛋白

Fig. 7 Schematic diagram of immunoassay for alpha-fetoprotein (AFP) based on signal amplification strategy BSA, bovine serum albumin; Ab_1 , primary antibody against AFP; Ab_2 , secondary antibody against AFP; AuNPs, gold nanoparticles

在最佳实验条件下, 对所建立的新型免疫传感器检测 AFP 的性能进行了研究。由图 9 可知, 体系的吸光度值与目标物 AFP 浓度的对数之间存在线性关系, 线性范围为 $0.5 \text{ pg/mL} \sim 0.1 \mu\text{g/mL}$, 线性方程为 $y = 0.071x (\text{ng/mL}) + 0.277$, $R^2 = 0.995$, 检出限为 0.17 pg/mL ($S/N = 3$)。与报道的 AFP 检测方法

(表 1)对比可知,本方法的检出限较低,具有较高的灵敏度。

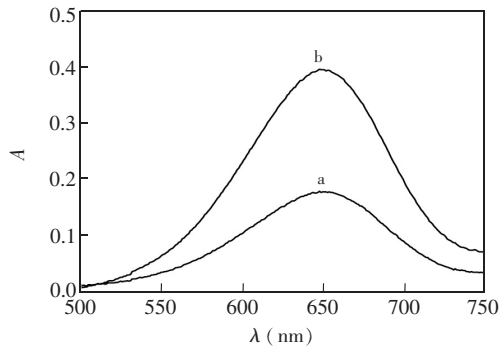


图 8 免疫分析的检测信号在(a)无 TSA 及(b)有 TSA 时的情况
Fig. 8 UV-vis absorption spectra of detection system in the absence (a) and presence (b) of tyramide signal amplification (TSA) strategy

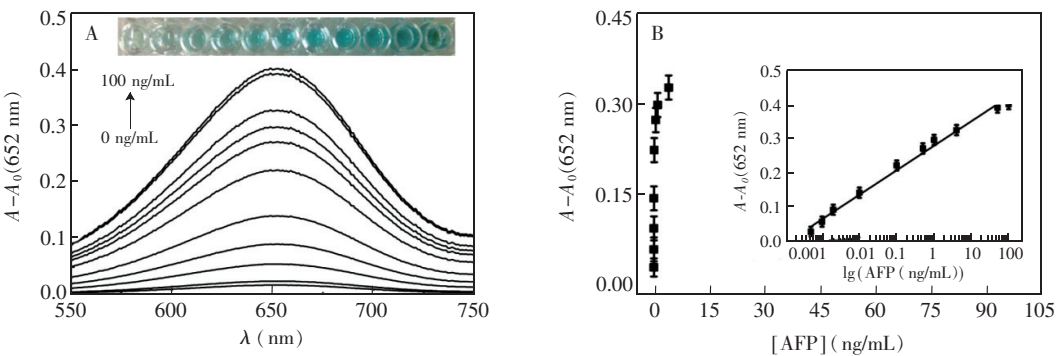


图 9 (A)基于 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 活化 HRP 检测 AFP 的紫外-可见吸收光谱图,插图是对应溶液颜色的照片;
(B)溶液吸收值的变化与 AFP 浓度之间的关系,插图为线性关系图

Fig. 9 (A) UV-Vis absorption spectra of immunoassay system in the presence of different concentrations of AFP. Inset is the corresponding photograph of the solution; (B) Relationship between the absorbance change of oxTMB at 652 nm of reaction solution and concentration of AFP. Inset is linear calibration plot for AFP detection

表 1 不同检测 AFP 方法的比较
Table 1 Comparison of different methods for detection of AFP

检测方法 Detection method	材料 Material	检出限 Detection limit (ng/mL)	线性范围 Linear range (ng/mL)	参考文献 Reference
电化学法 Electrochemistry	CdTe NCs	5.0×10^{-3}	0.01 ~ 80	[22]
电化学法 Electrochemistry	CNSs	2.0×10^{-2}	0.05 ~ 6.0	[23]
荧光法 Fluorescence	R6G	1.6×10^{-3}	5.0×10^{-3} ~ 1.0	[24]
荧光法 Fluorescence	Silver plasmonic	Not given	1.0×10^{-3} ~ 10.0	[25]
比色法 Colorimetry	AuNPs	1.0×10^{-3}	Not given	[26]
比色法 Colorimetry	$g\text{-C}_3\text{N}_4/\text{HRP}$	1.7×10^{-4}	5.0×10^{-4} ~ 1.0×10^2	This work

选择了一些阳离子(如 K^+ 、 Na^+ 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+})及与 AFP 性质相似的干扰物质(如人血清白蛋白(HSA)、色氨酸(Trp)、丙氨酸(Ala)、免疫球蛋白(人 IgG、鼠 IgG)、癌胚抗原(CEA)、前列腺抗原(PSA)),考察了本方法的选择性。如图 10 所示,在相同的测定条件下,干扰物只产生较小的吸光度变化,表明本方法具有较好的选择性。

3.4 人血清中 AFP 的检测

将本方法应用于人血清样品中 AFP 的检测,结果如表 2 所示。测得人血清样品中 AFP 的含量为

1.58 ng/mL,不同水平 AFP 的加标回收率为 94.3% ~ 101.3%,表明本方法可用于实际血清样品中 AFP 的检测。

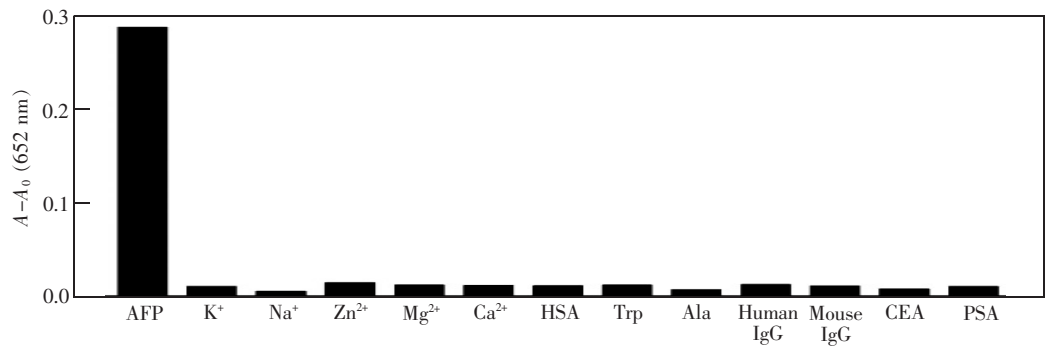


图 10 检测 AFP 的选择性: AFP(1.0 ng/mL),干扰物质: K⁺、Na⁺、Zn²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺(0.1 mmol/L)及其它干扰物质(10.0 ng/mL)

Fig. 10 Selectivity of immunoassay to AFP (1.0 ng/mL) in the presence of different interferents. Concentration: K⁺, Na⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, 0.1 mmol/L; other interferents: 10 ng/mL

表 2 比色法测定人血清样品中的 AFP(*n*=5)

Table 2 Determination results of AFP in human serum sample by this method (*n*=5)

序号 No.	加入量值 Added (ng/mL)	测得值 Found (ng/mL)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%, <i>n</i> =5)
1	2.00	3.55± 0.09	98.1	2.5
2	4.00	5.60± 0.12	101.3	2.1
3	6.00	7.49± 0.21	94.3	2.8
4	8.00	9.51± 0.32	95.6	3.4
5	10.00	11.52± 0.35	96.2	3.0

4 结 论

在可见光照射下,g-C₃N₄ 纳米片可活化 HRP,使 HRP 在没有 H₂O₂ 存在时催化氧化 TMB。基于此原理,结合 TSA 技术,本研究建立了比色法检测 AFP 的新型免疫分析方法,实现了 AFP 的超灵敏检测。

References

1 Fruk L, Rajendran V, Spengler M, Niemeyer C. *ChemBioChem*, **2007**, 8(18): 2195–2198

2 Kamada K, Nakamura T, Tsukahara S. *Chem. Mater.*, **2011**, 23(11): 2968–2972

3 Kamada K, Moriyasu A, Soh N. *J. Phys. Chem. C*, **2012**, 116(39): 20694–20699

4 Wang G L, Li X Q, Cao G X, Yuan F, Dong Y M, Li Z J. *Chem. Commun.*, **2017**, 53(81): 11165–11168

5 Li P, Cao G X, Liu Q Y, Guo Y Y, Dong Y M, Li Z J. *Sens. Actuators B*, **2018**, 262: 110–117

6 Zhang X L, Zheng C, Guo S S, Li J, Yang H H, Chen G N. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(7): 3426–3434

7 Akhundi A, Habibi A, Yangjeh A. *Mater. Chem. Phys.*, **2016**, 174: 59–69

8 Wang X, Maeda K, Thomas A, Takanabe K, Xin G, Carlsson J M, Domen K, Antonietti M. *Nat. Mater.*, **2009**, 8: 76–80

9 CHANG Bin-Xia, XIN Shao-Jie. *World Chinese Journal of Digestology*, **2010**, 18(6): 576–580
常彬霞, 辛绍杰. *世界华人消化杂志*, **2010**, 18(6): 576–580

10 Zhang X, Xie X, Wang H, Zhang J J, Pan B C, Xie Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135(1): 18–21

11 Hu X L, Wu X M, Fang X, Wang G L, Li Z J. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, 77: 666–672

12 Hou L, Tang Y, Xu M D, Gao Z Q, Tang D P. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(16): 8352–8358

13 Rong M, Lin L, Song X H, Zhao T T, Zhong Y X, Yan J W, Wang Y R, Chen X. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(2): 1288–1296

- 14 Zhang S W, Li J X, Zeng M Y, Xu J Z, Wang X K, Hu W P. *Nanoscale*, **2014**, 6(8): 4157–4162
- 15 Gao J T, Wang Y, Zhou S J, Lin W, Kong Y. *ChemCatChem*, **2017**, 9(9): 1708–1715
- 16 Wang G L, Xu X F, Wu X M, Cao G X, Dong Y M, Li Z J. *J. Phys. Chem. C*, **2014**, 118(48): 28109–28117
- 17 Cao J, Xu B Y, Luo B D, Lin H L, Chen S F. *Appl. Surf. Sci.*, **2011**, 257(16): 7083–7089
- 18 Wang G L, Xu X F, Qiu L, Dong Y M, Li Z J, Zhang C. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2014**, 6(9): 6434–6442
- 19 Kamegawa T, Seto H, Matsuura S, Yamashita H. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2012**, 4(12): 6635–6639
- 20 Wang X, Mao W, Zhang J. *J. Colloid Interface Sci.*, **2015**, 448: 17–23
- 21 Zaidi A U, Enomoto H, Milbrandt J, Roth K A. *J. Histochem. Cytochem.*, **2000**, 48(10): 1369–1375
- 22 Liang G D, Liu S F, Zou G Z, Zhang X L. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(24): 10645–10649
- 23 Du D, Zou Z X, Shin Y S, Wang J, Wu H, Engelhard M H, Liu J, Aksay I A, Lin Y H. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(7): 2989–2995
- 24 Zhang J, Wang S, Liu K P, Wei Y, Wang X, Duan Y X. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(5): 2959–2965
- 25 Tawa K, Kondo F, Sasakawa C, Nagae K, Nakamura Y, Nozaki A, Kaya T. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(7): 3871–3876
- 26 Peng M P, Ma W, Long Y T. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(12): 5891–5896

Photoswitching Enzymatic Activity of Horseradish Peroxidase by Graphite Phase Carbonitride for Colorimetric Immunoassay

ZHANG Lan, LI Xiao-Qin, WANG Guang-Li*

(Key Laboratory of Synthetic and Biological Colloids, Ministry of Education,
School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract The g-C₃N₄ was found to active the activity of horseradish peroxidase (HRP) for catalyzing the oxidation of the typical substrate of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) under visible light irradiation. Based on this, a novel sandwich-type immunosensor colorimetric strategy was developed for the highly sensitive detection of α -fetoprotein (AFP). In this assay, the capture antibodies (Ab₁) attached to the 96-well plates was used to capture the target of AFP, and then reacted with the detection antibody (Ab₂) and HRP co-immobilized gold nanoparticles (AuNPs) (i. e., the bioconjugates of the Ab₂-AuNPs-HRP), which was assisted by the formation of the tyramide-HRP repeats to amplify the signal. The addition of the g-C₃N₄ activated the HRP under visible light for oxidizing TMB, producing the absorption signal at 652 nm (for oxidized TMB) that correlated to the concentrations of AFP in the range from 0.5 pg/mL to 0.1 μ g/mL. A limit of detection (LOD) of 0.17 pg/mL was obtained ($S/N=3$). The developed immunoassay could be facilely operated with wide detection range and high sensitivity, showing great promise for real sample detection.

Keywords Graphite-phase carbon nitride; Horseradish peroxidase; Activation; Immunoassay

(Received 10 February 2020; accepted 23 March 2020)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21575052, 21676123).