



食品科学

Food Science

ISSN 1002-6630, CN 11-2206/TS

《食品科学》网络首发论文

题目： 基于纳米材料的电化学免疫传感器及其在蛋白质检测中的研究进展
作者： 杨倩雯，曾海娟，刘晓风，王金斌，唐雪明
网络首发日期： 2020-12-08
引用格式： 杨倩雯，曾海娟，刘晓风，王金斌，唐雪明. 基于纳米材料的电化学免疫传感器及其在蛋白质检测中的研究进展. 食品科学.
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20201207.1159.022.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

基于纳米材料的电化学免疫传感器及其在蛋白质检测中的研究进展

杨倩雯^{1,2}, 曾海娟¹, 刘晓风², 王金斌^{1,2*}, 唐雪明^{1*}

(1 上海市农业科学院 生物技术研究所, 上海 201106;

2 兰州理工大学 生命科学与工程学院, 兰州 730050)

摘要: 电化学免疫传感器是将传感技术与免疫分析相结合的一种快速定性或定量检测待测物的方法。近年来, 随着纳米材料的迅速发展, 电化学免疫传感器更灵敏、更轻便、特异性更强, 在蛋白质检测的领域具有更广阔的应用前景。本文重点介绍了电化学免疫传感器构建原理, 并对基于新型纳米材料的免疫传感器的研究进展及其在蛋白质检测中的应用进行综述, 同时展望该领域的发展方向。

关键词: 免疫传感器; 新型纳米材料; 蛋白质; 检测

The electrochemical immunosensor and its application in the detection of proteins

YANG Qianwen^{1,2}, ZENG Haijuan¹, LIU Xiaofeng², WANG Jinbin^{1,2*}, TANG Xueming^{1*}

(1 The Biotechnology Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai, 201106, China;

2 School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou, 730050, China)

Abstract: Electrochemical biosensors is a rapid qualitative or quantitative detection method that combines sensing technology with immunoassay. In recent years, with the fast development of nanomaterials, electrochemical immunosensors had a broad application prospect in the field of protein detection with more sensitive, portable and specific. This article focuses on the construction principle and the research progress of immunosensor based on new nanomaterials, and its application in protein detection were also reviewed.

Keywords: Immunosensor; novel nanomaterial; protein; detection

中图分类号: TQ15

文献标志码: A

DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20200729-375

基于以蛋白质为靶标的检测方法广泛的应用在疾病诊断、药物研究、食品安全及环境因子的检测和分析。蛋白质的常规检测方法大体分为两种: 一种是定氮后, 依据含氮量推算蛋白质含量, 如凯氏定氮法, 杜马斯定氮法; 另一种是以蛋白质的物理化学性质为基础, 采用相关仪器设备进行检测, 如分光光度, 甲醛滴

基金项目: 上海市自然科学基金项目 (19ZR1436800); 上海市青年科技英才扬帆计划项目 (20YF1443000); 上海市农业科学院卓越团队计划 (B-07) 项目;

作者简介: 杨倩雯 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向为免疫学快速检测新技术, Email: ym663267@163.com

*通讯作者: 唐雪明 (1970-), 男, 研究员, 博士, 研究方向为生物安全评价及快速检测技术, Email: xueming70@foxmail.com

王金斌 (1982-), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为农产品安全检测技术, Email: wangjinbin2013@126.com

定法。然而常规检测技术普遍存在成本高、耗时长、灵敏度低、需专业技术人员操作等缺陷,迫使研究者不断探索新的基于蛋白质的低成本、高灵敏、操作简单的检测新方法,来弥补常规检测技术的不足。

目前为止,已有大量研究报道了蛋白质的检测,同时不乏出现一些操作快速简单的检测方法如毛细管电泳法,近红外光谱法,共振瑞利散射法、生物传感器法等。其中免疫传感器是目前检测蛋白质最重要且应用最广的生物传感方法。与常规检测方法相比,免疫传感器具有高灵敏度、特异性高、耗时短、造价低、易携带、操作简单等多重优点^[1]。免疫传感器通过两个途径以提高检测物质的灵敏性:一是联合电化学分析技术,如循环伏安法、差分脉冲法、脉冲伏安法等^[2];二是选用良好的电极修饰材料,通过增加峰电流而提高传感器的灵敏度。

随着纳米材料在免疫传感器中的不断发展,研究者的重点集中于纳米材料的选择、复合纳米材料的制备以及如何实现新型纳米材料的信号放大,纳米材料在免疫传感器的引用为其检测灵敏度带来很大的突破,并带来更大的应用前景。本文意在总结免疫传感器原理及目前纳米材料在免疫传感器中应用展,汇总免疫传感器在蛋白检测中的应用,并对目前免疫传感器的不足及未来发展方向展开讨论。以期为蛋白的快速检测提供技术参考。

1 电化学免疫传感器概述

电化学免疫传感器是一种连续,可逆的感受生物量和化学量的装置。电化学免疫传感器是免疫技术结合了各种电化学分析方法的免疫分析法,综合了电化学分析技术的高灵敏性和免疫分析技术的高选择性和特异性。其原理是将抗原(抗体)固定在基底电极表面,利用抗体-抗原间的相互作用发生免疫反应,使电极及缓冲液的电性发生变化,从而转变为可检测信号如电流、电势及阻抗来确定目标检测物的浓度^[3],并以此划分为电流型^[4]、阻抗型^[5]和电位型^[6]免疫传感器。

1.1 电流型免疫传感器

电流型免疫传感器是免疫技术与电化学检测相结合的标记型免疫分析,它是将生物识别元件通过单一抗体或双抗体夹心式的方式发生免疫反应并修饰在传感器表面,清洗去除表面的非特异性吸附,最终测定免疫反应引起的电流变化。最早利用构建的电流型免疫传感器是用于检测人绒毛膜促性腺激素(HCG)^[7]。

随着研究的不断推进,利用电化学方法检测肿瘤标志物的研究日益增多,电流型免疫传感器也因此取得很大的进步。至今,电流型免疫传感器的标记物分为生物酶,如碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶、葡萄糖氧化酶、尿素水解酶等和电活性物质,如二茂铁、对氨基酚及其衍生物、金属离子、聚苯胺等。简单来说,电流型免疫传感器就是将生物识别元件标记在抗体(抗原)上,然后以电流的变化值进行检测。王曼丽等人利用 Pt-Pd 双金属纳米材料修饰石墨烯作为载体,固载已标记的抗体分子,构建高特异性,高灵敏的电流型免疫传感器^[8]。Liu 等采用有机框架材料(COF-LZU1)作为基底,构建了一种超灵敏的夹心式免疫传感器,用于检测 CRP 蛋白^[9]。因电流型免疫传感器具有高选择性、高灵敏度等优点,现广泛用于医学、食品、环境检测及一些小分子物质的检测中。

1.2 阻抗型免疫传感器

阻抗分析方法能够分析电极表面物质的反应特性^[10],抗原-抗体发生反应后会降低电极表面的电子转移速率,阻抗增加,通过测定反应前后的阻抗变化,来判断被检测物的浓度。阻抗谱包含一段半圆和一段直线,分别出现在高频区和低频区,电子转移速率控制半圆部分,扩散影响着直线部分。阻抗型免疫传感器能够灵敏的表征电极表面的变化,应用前景广阔。Cordeiro 等研制了首个无标记电化学阻抗免疫传感器,使用 SPEs 检测婴儿抗利什曼原虫抗体,成功研制出一种灵敏,快速,简便的免疫传感器,用于利什曼病的诊断^[11]。游凯豪等人构建了非标记阻抗型免疫传感器用于检测转基因蛋白 Cry1AC,最低检测限达到 0.8ng/mL^[12]。

1.3 电位型免疫传感器

电位型免疫传感器具有高灵敏度、高选择性,可以直接或间接检测抗原(抗体),做到实时快速检测。常用的气敏电极为 CO₂、NH₃、O₂ 等,离子选择电极为氟离子电极、三甲基苯胺阳离子电极和电离子电极等。不同蛋白质的等电点不同,在免疫反应发生前后电极表面的电极极性和密度都会随之发生变化,最终使得电位发生变化,电位型免疫传感器便是基于反应前后电位变化进行免疫分析。Silva 以金纳米颗粒聚合物(AuNPs-PIM)实现信号放大,构建了无标记的电位型免疫传感器用于鼠伤寒沙门氏菌的高灵敏检测^[13],在此基础上,同时报道了一种新的基于纸张的无标签电位免疫传感器用于检测鼠伤寒沙门氏菌,以纸为基础的条形电极与滤纸垫集成,设计了一种简单经济的方法控制通过聚合物膜的离子通

量，电化学阻抗谱用来评估修饰步骤及分析检测结果^[14]。

2 纳米材料在免疫传感器中的应用

纳米材料具有一系列优异的光学特性，其在免疫传感器中的应用，大大提高了传感器的性能，而功能化的纳米复合材料不但能加速信号传导，同时还能放大识别信号^[15-17]。目前，免疫传感器技术已逐步成熟，主要有3种机制被用来提高免疫传感器的灵敏度。(1)利用新型纳米材料的大比表面积和电子转移能力，尽可能增大修饰电极的比表面积并提高电子转移率；(2)利用生物相容性使纳米材料与蛋白相结合，通过作为受体分子和酶标抗体的纳米载体来放大免疫反应；(3)利用新型纳米材料本身特性作为生物探针实现放大信号的作用，例如碳纳米材料，有机框架材料，金属纳米粒子及其复合物。图1为纳米材料电化学传感器构建技术原理。目前，广泛用于免疫传感器具有代表性的纳米材料有富勒烯、碳纳米管、石墨烯、类石墨烯材料、半导体量子点、金属有机框架材料等。随着研究的不断推进，越来越多的新材料被用于电化学免疫传感器的构建中。

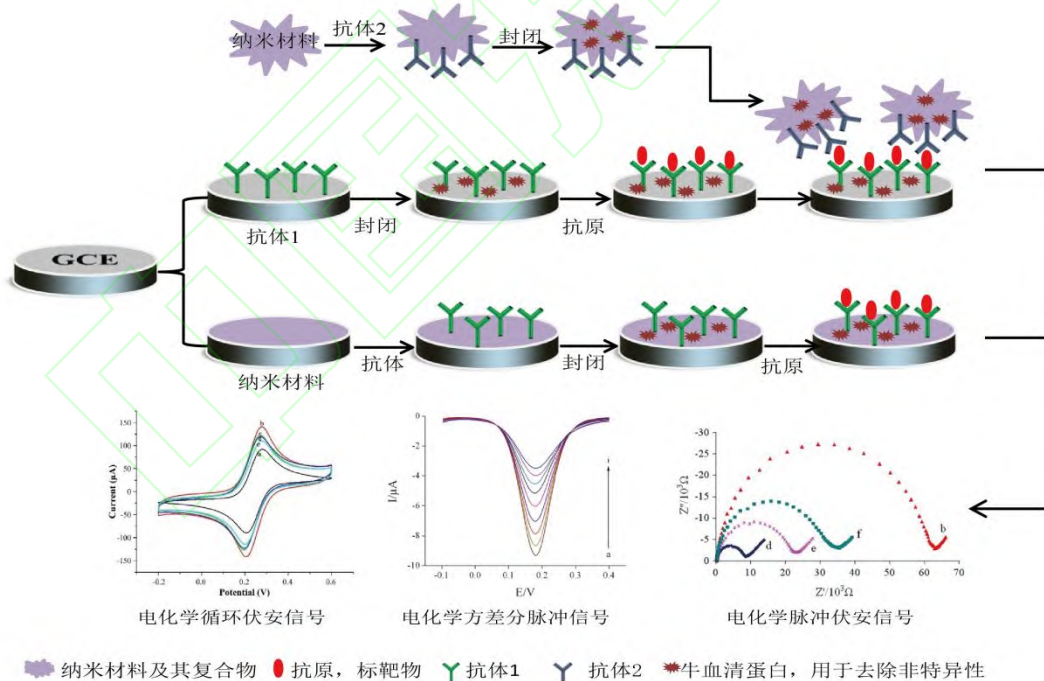


图1 纳米材料电化学传感器构建技术原理

2.1 碳纳米材料

2.1.1 富勒烯 (C₆₀)

富勒烯 (C₆₀) 是一种碳单质球形纳米材料，其高度对称的结构使其具有独特的光电性能，生物相容性优异，自被发现以来便受到广泛关注。在电化学领域，

将 C₆₀ 及其复合物用于电化学传感器的构建, 其大比表面积和超导性增强了电信号, 大大提高了传感器的灵敏度, 成为目前新型纳米材料的研究热点。Demirbakan^[18]等用 C₆₀ 修饰电极, 并将 anti-HSP70 通过 EDC/NHS 偶联在 C₆₀ 层上, 采用循环伏安法和电化学阻抗法对过程进行表征并测定 HSP70, 所得传感器的检测范围为 0.8 pg-12.8 pg/mL。Anusha^[19]等提出了 C₆₀ 和铜镍双金属纳米粒复合修饰电极构建传感器, 用于检测血液中维生素 D 的浓度, 实验结果显示检测限为 0.0025 μmol/L。

2.1.2 碳纳米管

碳纳米管是一种由石墨烯片层卷构形成的一维纳米材料, 依据结构分为单壁碳纳米管 (SWCNT) 和多壁碳纳米管。碳纳米管化学性质稳定, 具有较大的比表面积, 优良的导电性和较好的生物相容性, 同时, 其独特的结构使其易于被功能化。功能化的碳纳米管, 在其原有的特性上具有更佳的光电性能, 增强了对物质的吸附能力^[20], 可连接特定的基团对某种物质进行特异性吸附。Gulati^[21]等利用垂直排列的多壁碳纳米管 (VA-MWNT) 构建了免疫传感器用于耐药白血病细胞的检测, 使用阿霉素对白血病 K562 细胞进行检测, 检测限为 10 cells/mL, 该方法具有良好的稳定性、重现性和快速检测等优点。Rizwan^[22]制备了由金纳米颗粒及单壁碳纳米管 (SWCNTs) 等组成的复合材料, 构建了高灵敏的免疫传感器用于临床肿瘤标志物癌胚抗原 (CEA) 的检测。在电化学分析中, 碳纳米管作为一种电极材料, 大大提高了检测的灵敏度和特异性, 成为电化学传感器研究的热点。

2.1.3 石墨烯

石墨烯 (Graphene, GN) 是目前应用十分广泛的一种二维碳纳米材料, 具有良好的导电导热性能, 比表面积大。因其独特的结构, 使得石墨烯化学性质稳定且易于功能化。在电化学传感领域中, 石墨烯因其优异的导电性能, 大大提高了传感器的灵敏度, 同时, 功能化的石墨烯为特异性识别提供了条件。Ren^[23]等基于氧化石墨烯和 AuNPs 修饰电极, 构建了一种高灵敏的免疫传感器, 用差分脉冲法在 pH 为 7.4 的缓冲液中检测三聚氰胺, 在最优条件下, 检出限达到 2.66×10^{-7} μmol/L。Fan^[24]等合成氧化石墨烯/硫氨酸/AuNPs 纳米复合材料, 涂覆于电极表面, 用于 CA125 抗体固定和检测信号的放大, 检测限为 0.01 U/mL, 结果表明, 这种免疫传感器检测的血清样品与传统 ELISA 方法检测的结果一致,

相对误差小于 8.05%，且具有良好的重复性、稳定性和准确性。由于石墨烯简洁，快速，低成本的制备方法，已经成为构建免疫传感器的首选纳米材料之一。

2.2 类石墨烯材料

类石墨烯材料，是一类厚度为几纳米的二维纳米材料，其原子的不同排列方式导致了性质的不同，致使它们广泛应用于诸多领域。类石墨烯材料主要包括氮化硼（BN），过渡金属氧化物及过渡金属硫化物（TMD），其中，应用较多的有二硫化钼（MoS₂）、二硫化钨（WS₂）等。

2.2.1 MoS₂

MoS₂ 作为一种典型的过渡金属硫化物，具有独特的物理和化学性质，纳米二硫化钼性质稳定，拥有较大的比表面积，吸附性能强，在电化学领域拥有很大潜力。而合成方法的不同，将导致传感器性能的不同，MoS₂ 的合成分为自上而下（液相超声法、锂离子插层法和微机械剥离法等）和自下而上（化学气相沉积法 CVD 和水热法）。纯 MoS₂ 导电性差，常与其它导电材料合成复合纳米材料，以增强其导电性^[25]。常用于组合的纳米材料包括碳纳米管、AuNPs 及磁性纳米粒子等。Zhu^[26]等利用 MoS₂-Ti-AuNPs 纳米复合材料构建了生物传感器，用以检测 microRNA-21，AuNPs 的加入增强了其导电性。Cao^[27]等人制备了 AuNPs/MoS₂/GN 纳米复合材料，实现了信号放大作用，高灵敏检测了 DNA。

2.2.2 WS₂

WS₂ 是一种形状类似三明治的层状材料，由于原子排列方式和层间堆垛方式的不同，WS₂ 具有不同的结构，有一定还原性。由于较高的表面效应和比表面积，使其广泛应用于各个领域，是近年来热门研究的新型纳米材料之一。Kong^[28]等以 AuNPs/WS₂NA 修饰电极，银纳米粒子/片状锌金属-有机骨架（Ag/ZnMOF）纳米酶为载体，构建了一种超灵敏光电生物传感器，用于检测博来霉素（BLM），检测限为 0.18 nmol/L。Zhang^[29]等基于 SWCNTs 纳米复合二维层状硫化钨纳米片构建了高灵敏的电化学传感器，用于检测维生素 B₂，将含有氧化石墨烯（GO）的 SWCNTs 分散液滴涂于电极表面，用 WS₂ 改善其结构的致密性和平稳性，成功的用于 VB₂ 药物样品的检测中，检测限为 0.7 nmol/L。

2.3 荧光纳米材料

2.3.1 量子点

量子点（Quantum Dots, QDs）是近期发现的能够产生荧光的纳米级半导体

颗粒。目前研究较多且具有巨大应用前景的量子点为 CdX (X=S、Se、Te)。由于量子点独特的光吸收特性,如量子表面效应、尺寸效应、量子隧道效应及介电限域效应等,使得量子点具有稳定性好、荧光寿命长、荧光强度高、可多次激发等优势。这些优势成功引起研究者的关注,将其作为荧光标记探针应用于各领域,成为最具潜力和应用价值的新型纳米材料。电致发光(ECL)则是利用量子点优异的光电性能,将光与电化学分析相结合,形成一种十分灵敏的检测方法。QIU^[30]等在电极表面加载聚苯胺,以 CdS 量子点为发光信号源,并利用 AuNPs 固定 MCF-7 肿瘤细胞,实现了肿瘤细胞的检测。Cadkova^[31]等将 CdSe/ZnS 量子点与抗体偶联,构建一种无酶量子点磁免疫传感器,实现了对人血清附睾蛋白 4(HE4)的高灵敏检测,检测限达到 12 pmol/L。

2.3.2 荧光碳点

碳点(Carbon Dots, CDs)是一种零维的半导体纳米材料,尺寸一般小于 10 nm。CDs 具有独特的光学性质、易于功能化、良好的生物相容性、稳定性、低毒性等优点。同时,制备碳点的原料种类丰富,价格低廉,逐步成为研究者的焦点,在传感器的应用中具有很好的应用前景。基于 CDs 构建的电化学发光传感器逐步受到关注,以其独特的光电特性,构建荧光探针应用于各种分析物的高灵敏检测,包括金属离子^[32],生物分子^[33]及杀菌剂^[34]等。随着对碳点的研究,更多的方法被用来提高分析的特异性和灵敏度,比如在碳点表面偶联具有特异性识别作用的适配体及分子印迹聚合物,而碳点也逐步被广泛应用于蛋白质的研究中,实现了对特定蛋白的标记和高灵敏分析。

2.3.3 金属有机框架材料

金属有机框架材料(Metal-organic frameworks, MOFs)是有机配体和金属离子或团簇发生配位而构建形成的新型多孔材料,结合了无机材料与有机材料的优点。其独特的结构决定了 MOFs 具有大比表面积、热稳定性和化学稳定性良好、孔径结构可调、吸附性能良好等特性,因而倍受关注。通过改性 MOF 制备出复合材料,使其更有效的检测生物分子、阴离子、阳离子、有机化合物等不同物质,成为构建灵敏传感器的最佳候选材料^[35]。由于 MOFs 的巨大空体积限制了其导电性,大多属绝缘材料,本不适合用于传感器,但选择合适的材料与框架结合适当修饰,使得 MOFs 具有独特的光电特性成为传感器的重要敏感材料。MOF 纳

米复合材料现已被用于多种重要分析物的传感检测,用于合成 MOF 纳米复合材料进行光电化学检测的材料主要包括碳基材料、金属/金属氧化物纳米颗粒、量子点、酶和杂多酸^[36]。

Li^[37]等人用石墨烯和 HKUST-1 制备复合材料检测对苯二酚(HQ)和邻苯二酚(CT)等污染物,超声分散 Cu-MOF 和氧化石墨烯,并滴于电极表面室温干燥,结果表明 Cu-MOF-GN 复合材料在 HQ 检测中表现出良好的性能。He^[38]等人利用 AuNPs 将 MOF-CoFeO₄ 磁性纳米粒子功能化,合成 MOF-CoFeO₄@AuNPs 夹心型免疫传感器,用以检测 N 端脑前列钠肽。何晓静团队基于金属有机骨架材料(MOFs)固载碲化镉量子点(CdTe QDs)合成 CdTe@NOFs/CdTeQDs 复合物,构建电致发光(ECL)免疫传感器,用以检测心肌钙蛋白 I(cTnI)^[39]。

除了上述几种常见纳米材料,应用于电化学传感器研究中的纳米粒子还有贵金属纳米粒子(如金、银、钯、铂等)、纳米金属氧化物及纳米复合材料。贵金属纳米材料在具有纳米材料特性的同时还具有金属自身的物化性质,成为纳米材料研究领域中的热点,吸引许多学者在其制备,性能及应用方面不断探索研究并取得一定成就。如银纳米材料能够快速促进电催化,加速电子转移速率,实现待测物的灵敏检测^[40]。Wang^[41]等人构建了一种以金纳米颗粒(AuNPs),硫堇(THi),羧化多壁碳纳米管(CMWCNTs)复合材料为底物的免疫传感器用于检测 IL-6。随着对其光学性能的不断研究,一种新型荧光贵金属纳米簇被发现,我们可以在可见光到近红外光区范围内调谐这种荧光^[42],因其优良的光学性质,广泛应用于各个领域^[43]。

3 电化学免疫传感器在蛋白质检测中的应用

随着研究者的不断努力,越来越多便捷快速的检测方法出现并应用于蛋白质的检测中,如表 1,每种检测方法都有一定的弊端,电化学传感器与其余检测方法相比,攻克了高成本,低灵敏度,易受干扰等弊端,广泛应用于各个领域的蛋白质检测中。

表 1 常用蛋白质检测方法
Tab.1 Common protein detection methods

检测方法	特点	弊端
凯氏定氮法	准确,简单	操作复杂,耗时,成本高
紫外吸收法	简便,快速,不受低浓度的盐类干扰	存在误差,适用小
双缩脲比色法	简单,快速	准确度,灵敏度低,易受干扰

(NH₂-CO-NH-CO-NH₂)

考马斯亮蓝(Bradford)

简便, 稳定性好, 重现性好, 与蛋白质含量的线性关系差, 具有偏差

电泳法

快速, 简单, 自动化程度高

受核酸, 多糖等干扰

电化学免疫传感器

快速, 简便, 高灵敏, 高稳定性, 低成本

检测流通量小

3.1 用于食品分析

3.1.1 食品过敏原检测

食品过敏原是能够引起宿主对食物产生不良反应的一类物质, 主要来源于海鲜、大豆、牛奶、蛋品等食物中的蛋白质^[44]。PCR 和免疫学分析方法是检测食物中过敏原的主要方法。随着检测技术的不断发展, 传感技术逐渐应用于食品中过敏原的检测。Yang^[45]等用氧化锌-量子点复合材料修饰电极构建了伴刀豆蛋白标记的传感器, 用于检测过敏原鸡卵类粘蛋白。Eissa^[46]等将石墨烯修饰于电极表面, 羧基活化后连接卵白蛋白抗体构建卵白蛋白免疫传感器, 对蛋糕提取物中的卵蛋白进行检测, 此外该作者用同类免疫传感器对牛奶中的过敏原 β-乳球蛋白进行检测^[47], 其检出限和检测范围都达到了令人满意的结果。Montiel^[48]等将磁性微球羧基化后修饰于电极表面并连接花生蛋白 Arah1 抗体, 然后逐层固定花生蛋白 Arah1、标记抗体和标记辣根过氧化物酶, 得到双重信号放大的免疫传感器。Kong^[49]等将纳米粒子和壳聚糖混合液修饰于电极表面形成氨基薄膜, 固载 AuNPs 得到发光型免疫传感器, 进而得到卵转铁蛋白浓度与发光强度的线性关系。

3.1.2 牛奶蛋白检测

酪蛋白是牛奶营养的主要成分, 对于酪蛋白的测定是判断乳品中是否掺假的重要指标。随着电化学传感器在牛奶检测中的应用, 克服了传统检测方法成本高、耗时长、需专业人员操作等弊端。免疫传感器的应用能够有效, 高灵敏的检测牛奶中的酪蛋白。Cao^[50]等人基于 AuNPs (I-Arginine) / 多壁碳纳米管 (P-1-Arg/MWCNTs) 构建了免疫传感器, 用以检测酪蛋白, 并对金纳米粒子的吸附时间、电解质 pH 和孵育时间进行了优化, 最终检测限达到 5×10^{-8} g/mL。

3.1.3 农作物中转基因蛋白检测

目前, 针对转基因蛋白的检测并没有许多高效灵敏的检测方法, 电化学免疫传感器在转基因蛋白检测中的应用, 逐渐成为研究者的热点。Zhu^[51]等人基于量

子点(QD)构建了荧光酶联免疫传感器,用以检测转基因 MON810 玉米的 Cry1Ab 蛋白。游凯豪课题组构建了非标记阻抗型电化学免疫传感器,对转基因作物及产品 中 Cry1Ac 蛋白含量进行了检测,最低检测限达到 0.8 ng/mL^[52]。Gao^[53]等将鲁米诺作为信号探针构建了电致化学发光免疫传感器,对转基因蛋白 Cry1Ab 进行了定量检测,且该传感器成功用于实际转基因作物的检测中。由于转基因作物的种植与安全受到公众的高度重视,电化学传感器检测转基因作物的方法仍需更多 深入的研究以普及到实际应用。

3.2 医疗检测

近年来,大量免疫传感器用于蛋白检测的报道相继出现。如表 2。

表 2 电化学传感器用于蛋白质检测

Tab.2 Electrochemical sensors are used for protein detection

目标分析物	纳米材料	检出限	文献
C 反应蛋白 (CRP)	二氧化钛纳米管和铂纳米复合	0.011 ng/mL	[54]
核基质蛋白(NMP22)	AuNPs-PtNPs-MOFs	1.7 pg/mL	[55]
胰蛋白酶原-2	AuNPs	0.65 ng/mL	[56]
酪蛋白	纳米金颗粒/聚精氨酸-多壁碳 纳米管	5×10^{-8} g/mL	[57]
甲胎蛋白	免疫纳米磁珠	3.6 ng/mL	[58]

在临床诊断中,许多蛋白被用作一些疾病的识别,通过对高特异性的标记蛋白进行检测而确诊疾病。Tau 蛋白是一种微管相关蛋白,聚集于神经性疾病的细胞内。国外对于应用传感器检测 tau-381 蛋白质的研究也相对较少,Esteves-Villanueva^[59]课题组同样构建了生物传感器来检测折叠的 tau 蛋白。Derkus^[60]团队利用纳米免疫传感器检测了 0.15 nmol/L tau 蛋白。Dai^[61]等构建了一种一次性的生物传感器,用于检测人体血清中的 tau 蛋白。Xu^[62]等人合成了纳米盒金属-有机骨架(HNM)复合材料,并应用于免疫传感器中,利用 SiO₂ 标记抗 lag3 抗体,对淋巴细胞活化基因 3 (lag 3) 蛋白进行超敏定量检测,检测下限为 1.1 pg/mL。Gao^[63]等人通过水热法合成 Zn:SnO₂/SnS₂ 纳米复合材料,构建了无标记光电化学免疫传感器用以检测淀粉样蛋白(Aβ),Zn 的加入,显著提高了电流值,最终检测限低至 0.05 pg/mL (S/N=3)。

近年来蛋白质的检测方法主要还是依赖于免疫学方法,但都难以适用于所

有蛋白质检测的条件,特别在于快速准确的鉴定低浓度蛋白质,因此,免疫传感器的应用弥补了这一缺点。电化学免疫传感器结合了抗原抗体的特异性反应和新型纳米材料的优质特性,能够做到高选择性、高灵敏性、快速、简便的检测,在蛋白质检测中具有广泛的应用前景。

4 总结与展望

基于纳米材料的不断研究,越来越多的新型材料用于免疫传感器的构建中,极大的提高了检测的灵敏度。荧光纳米材料以其特有的光学性质广泛应用于蛋白质的快速检测中,其中磁性荧光纳米材料合成技术成熟但在蛋白质检测中应用较少,未来仍有巨大的发展空间。更多基于新型有机,无机纳米材料构建的免疫传感器正逐步用于蛋白质的检测中,选用合适的修饰材料后,如何用最简便的方式极大地实现信号放大,成为了目前研究的一个挑战,随着技术的不断发展,未来在蛋白质检测的领域仍需优化几点:(1)提高电极的品质和灵敏度,在此基础上研究新型传感器,使其便于携带。(2)进一步开发导电性好、生物相容性好、环保的新型纳米材料。(3)进一步挖掘电化学免疫传感器的信号放大策略,简化探针构建过程,实现超灵敏检测。(4)发展微型化的多电极模式,以此提高检测通量。

参考文献

- [1]. FARKA Z, JURIK T, KOVAR D, et al. Nanoparticle-Based Immunochemical Biosensors and Assays: Recent Advances and Challenges[J]. *Chem Rev*, 2017, 117(15):9973-10042. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00037.
- [2]. 甘翠芬, 何祖宇, 孙子洪, 等. 新型碳纳米材料在电化学免疫传感器的应用[J]. *广东化工*, 2014, 41(15):109-110. DOI: 10.3969/j.issn.1007-1865.2014.15.053.
- [3]. 杨娇, 李迎春. 无标记的电化学免疫传感器检测早期肝癌血清标志物(英文)[J/OL]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2020, 10(20):1-8. DOI: doi.org/10.13880/j.cnki.65-1174/n.2020.22.030.
- [4]. MONTIEL VRV, POYEDANO E, BENEDE S, et al. Disposable Amperometric Immunosensor for the Detection of Adulteration in Milk through Single or Multiplexed Determination of Bovine, Ovine, or Caprine Immunoglobulins G[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(17):11266-11274. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b02336.
- [5]. IONESCU R E, JAFFREZIC-RENAULT N, BOUFFIER L, et al. Impedimetric immunosensor for the specific label free detection of ciprofloxacin antibiotic[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2008, 23(4):549-555. DOI: 10.1016/j.bios.2007.07.014.
- [6]. SILVA NFD, MAGALHAES JMCS, BARROSO MF, et al. In situ formation of gold nanoparticles in polymer inclusion membrane: Application as platform in a label-free potentiometric immunosensor for *Salmonella typhimurium* detection[J]. *Talanta*, 2019, 194:134-142. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.10.024.
- [7]. AIZAWA M, MORIOKA A, SUZUKI S, et al. Enzyme immunosenser: III. Amperometric determination of human choriionic gonadotropin by membrane-bound antibody[J]. *Analytical Biochemistry*, 1979, 94(1):22-28. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90784-X.
- [8]. 王曼丽, 康敏, 刘杨, 周海. 基于Pt-Pd双金属纳米材料修饰石墨烯的适体传感器研究[J].

- 广东化工, 2020, 47(17):37-38.
- [9]. LIU T Z, HU R, LIU Y, et al. Amperometric immunosensor based on covalent organic frameworks and Pt/Ru/C nanoparticles for the quantification of C-reactive protein[J]. *Microchimica Acta*, 2020, 187(6):322-327. DOI: 10.1007/s00604-020-04286-8.
- [10]. 陈慧连, 陈伟锐. 电化学免疫传感器的发展概述[J]. *广州化工*, 2013, 41(11):64-66. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9677.2013.11.022.
- [11]. CORDEIRO T A R, GONCALVES M V C, FRANCO D L, et al. Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis[J]. *Talanta*, 2019, 195:327-332. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.11.087.
- [12]. 游凯豪, 史强, 江东健, 何庆华. 转基因蛋白 Cry1AC 的非标记阻抗型电化学免疫传感器的构建[J]. *南昌大学学报(理科版)*, 2018, 42(03):226-230. DOI: 10.13764/j.cnki.ncdl.2018.03.005.
- [13]. SILVA N F D, MAGALHAES M C S, BARROSO M F, et al. In situ formation of gold nanoparticles in polymer inclusion membrane: Application as platform in a label-free potentiometric immunosensor for *Salmonella typhimurium* detection[J]. *Talanta*, 2019, 194:134-142. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.10.024.
- [14]. SILVA N F D, ALMEIA C M R, MAGALHAES J C S, et al. Development of a disposable paper-based potentiometric immunosensor for real-time detection of a foodborne pathogen[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 141. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111317.
- [15]. ZHU C, YANG G, LI H, et al. Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Nanomaterials and Nanostructures[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(1):230-249. DOI: 10.1021/ac5039863.
- [16]. ZHU C Z, DU D, LIN Y H. Graphene and graphene-like 2D materials for optical biosensing and bioimaging: a review[J]. *2d Materials*, 2015, 2(3):032004. DOI: 10.1088/2053-1583/2/3/032004.
- [17]. QIN X L, XU A G, WANG L C, et al. In situ microliter-droplet anodic stripping voltammetry of copper stained on the gold label after galvanic replacement reaction enlargement for ultrasensitive immunoassay of proteins[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 79(15):914-921. DOI: 10.1016/j.bios.2016.01.024.
- [18]. DEMIRBAKAN B, SEZGINTÜRK M K. A novel immunosensor based on fullerene C60 for electrochemical analysis of heat shock protein 70[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2016, 783(15): 201-207. DOI: 10.1016/j.jelechem.2016.11.020.
- [19]. ANUSHA T, BHAVANI K S, KUMAR J V S, et al. Designing and fabrication of electrochemical nanosensor employing fullerene-C60 and bimetallic nanoparticles composite film for the detection of vitamin D3 in blood samples[J]. *Diamond and Related Materials*, 2020, 104(4): 107761. DOI: 10.1016/j.diamond.2020.107761.
- [20]. 李鹏莉, 于树玲, 石家华. 聚多巴胺改性碳纳米管对 Pb^{2+} 的吸附性能[J]. *河南大学学报(自然科学版)*, 2014, 44(4): 416-420. DOI: 1003-4978(2014)04-0416-05.
- [21]. GULATI P, KAUR P, RAJAM M V, et al. Vertically aligned multi-walled carbon nanotubes based flexible immunosensor for extreme low level detection of multidrug resistant leukemia cells[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 301(12): 127047. DOI: 10.1016/j.snb.2019.127047.
- [22]. RIZWAN M, ELMA S, LIM S A, et al. AuNPs/CNOs/SWCNTs/chitosan-nanocomposite modified electrochemical sensor for the label-free detection of carcinoembryonic antigen[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 107(6):211-217. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.037>.
- [23]. REN Q X, SHEN X Y, SUN Y Y, et al. A highly sensitive competitive immunosensor based on branched polyethyleneimine functionalized reduced graphene oxide and gold nanoparticles modified electrode for detection of melamine[J]. *Food chemistry*, 2020, 304(30): 125397. DOI: [org/10.1016/j.foodchem.2019.125397](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125397).
- [24]. FAN Y, SHI S Y, MA J S, et al. A paper-based electrochemical immunosensor with reduced graphene oxide/thionine/gold nanoparticles nanocomposites modification for the detection of cancer antigen 125[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 135(6): 1-7. DOI: 10.1016/j.bios.2019.03.063.
- [25]. SUNHA A, DHANJAI, TAN B, et al. MoS₂ Nanostructures for Electrochemical Sensing of Multidisciplinary Targets: A Review[J]. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 102(5):

- 75-90. DOI: doi.org/10.1016/j.trac.2018.01.008.
- [26]. ZHU D, LIU W, ZHAO D X, et al. Label-free electrochemical sensing platform for microRNA-21 detection using thionine and gold nanoparticles co-functionalized MoS₂ nanosheet[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(41):35597-35603. DOI: 10.1021/acsami.7b11385.
- [27]. CAO, X Y. Ultra-sensitive electrochemical DNA biosensor based on signal amplification using gold nanoparticles modified with molybdenum disulfide, graphene and horseradish peroxidase[J]. *Microchimica Acta*, 2014, 181(9-10):1133-1141. DOI: 10.1007/s00604-014-1301-y.
- [28]. KONG W S, GUO X X, JING M, et al. Highly sensitive photoelectrochemical detection of bleomycin based on Au/WS₂ nanorod array as signal matrix and Ag/ZnMOF nanozyme as multifunctional amplifier[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 150(15): 111875. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111875.
- [29]. ZHANG Z X, XU J K, WEN Y P, et al. A highly-sensitive VB₂ electrochemical sensor based on one-step co-electrodeposited molecularly imprinted WS₂-PEDOT film supported on graphene oxide-SWCNTs nanocomposite[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2018, 92(11): 77-87. DOI: 10.1016/j.msec.2018.06.029.
- [30]. QIU Y Y, WEN Q Q, ZHANG L, et al. Label-free and dynamic evaluation of cell-surface epidermal growth factor receptor expression via an electrochemiluminescence cytosensor[J]. *Talanta*, 2016, 150(4):286-295. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.12.019.
- [31]. CADKOVA M, KOVAROVA A, DVORAKOVA V, et al. Electrochemical quantum dots-based magneto-immunoassay for detection of HE4 protein on metal film-modified screen-printed carbon electrodes[J]. *Talanta*, 2018, 182(15):111-115. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.01.054.
- [32]. SRINIVASAN V, JHONSI M A, KATHIRAVAN A, et al. Fuel waste to fluorescent carbon dots and its multifarious applications[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 282(3): 972-983. DOI: 10.1016/j.snb.2018.11.144.
- [33]. WANG Y, JIANG K, ZHU J, et al. A FRET-based carbon dot-MnO₂ nanosheet architecture for glutathione sensing in human whole blood samples[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(64):12748-12751. DOI: 10.1039/c5cc04905a.
- [34]. ZHANG Y, ZHAO J, SUN X, et al. Fluorescent carbon dots for probing the effect of thiram on the membrane of fungal cell and its quantitative detection in aqueous solution[J]. *Sensors Actuators B Chem*, 2018, 273(11): 1833-1842. DOI: doi.org/10.1016/j.snb.2018.07.024.
- [35]. AMINI A, KAZEMI S, SAFARIFARD V. Metal-organic framework-based nanocomposites for sensing applications - A Review. *Polyhedron*, 2019, 177(1):114260. DOI: 10.1016/j.poly.2019.114260.
- [36]. KEMPAHANUMAKKAGARI S, VELLINGIRI K, DEEP A, et al. Metal-organic framework composites as electrocatalysts for electrochemical sensing applications[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2018, 357(15):105-129. DOI: 10.1016/j.ccr.2017.11.028.
- [37]. LI J, XIA J F, ZHANG F F, et al. An electrochemical sensor based on copper-based metal-organic frameworks-graphene composites for determination of dihydroxybenzene isomers in water[J]. *Talanta*, 2018, 181(5): 80-86. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.01.002.
- [38]. HE Y, WANG Y, YANG X, et al. Metal organic frameworks combining CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles as highly efficient SERS sensing platform for ultrasensitive detection of N-terminal pro-brain natriuretic peptide[J]. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2016, 8(12): 7683-7690. DOI: 10.1021/acsami.6b01112.
- [39]. 何晓静, 蒋伟, 周雪, 等. 基于金属有机骨架材料固载的碲化镉量子点作为信号探针测定心肌肌钙蛋白的电致化学发光免疫传感器[J]. *化学传感器*, 2017, 37(1):60-65. DOI: 10.3969/j.issn.1008-2298.2017.01.010.
- [40]. CHEN J, KONG L, SUN, X, et al. Ultrasensitive photoelectrochemical immunosensor of cardiac troponin I detection based on dual inhibition effect of Ag@Cu₂O core-shell submicron-particles on CdS QDs sensitized TiO₂, nanosheets[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 117(15): 340. DOI: 10.1016/j.bios.2018.05.037.
- [41]. WANG Z H, YANG S N, WANG Y Y, et al. A novel oriented immunosensor based on AuNPs-thionine-CMWNTs and staphylococcal protein A for interleukin-6 analysis in complicated biological samples[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1140(12): 145-152. DOI: doi.org/10.1016/j.aca.2020.10.025.

- [42]. KOKLIOTI M A , TAGMATARCHIS N . Hybrids of Metal Nanoclusters and Graphene - Based Materials: Preparation, Properties and Applications[J]. *Chemnanomat*, 2016, 2(12): 1065-1072. DOI: 10.1002/cnma.201600287.
- [43]. FARZIN L, SHAMSIPUR M, SAMANDARI L, et al. Biosensing strategies based on organic-scaffolded metal nanoclusters for ultrasensitive detection of tumor markers[J]. *Talanta*, 2020, 214(7): 120886. DOI: doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120886.
- [44]. VASILESCU A, NUNES G, HAYAT A, et al. Electrochemical Affinity Biosensors Based on Disposable Screen-Printed Electrodes for Detection of Food Allergens[J]. *Sensors-Basel*, 2016, 16(11):1863. DOI: 10.3390/s16111863.
- [45]. YANG C, GU B X, XU C X, et al. Self-assembled ZnO quantum dot bioconjugates for direct electrochemical determination of allergen[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2011, 660(1):97-100. DOI: 10.1016/j.jelechem.2011.06.011.
- [46]. EISSA S, L'HOCINE L, SIAJ M, et al. A graphene-based label-free voltammetric immunosensor for sensitive detection of the egg allergen ovalbumin[J]. *Analyst*, 2013, 138(15):4378. DOI: 10.1039/c3an36883a.
- [47]. EISSA S, TLILI C, L'HOCINE L, et al. Electrochemical immunosensor for the milk allergen β -lactoglobulin based on electrografting of organic film on graphene modified screen-printed carbon electrodes[J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 38(1): 308-313. DOI: 10.1016/j.bios.2012.06.008.
- [48]. MONTIEL V R, CAMPUZANO S, PELLICANÒ A, et al. Sensitive and selective magnetoimmunosensing platform for determination of the food allergen Ara h 1[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 880(23):52-59. DOI: 10.1016/j.aca.2015.04.041.
- [49]. KONG W J, ZHOU H, OUYANG H, et al. A disposable label-free electrochemiluminescent immunosensor for transferrin detection based on a luminol-reduced gold nanoparticle-modified screen-printed carbon electrode[J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(9):2959. DOI: 10.1039/c3ay42272k.
- [50]. CAO Q, ZHAO H, YANG Y, et al. Electrochemical immunosensor for casein based on gold nanoparticles and poly(l-Arginine)/multi-walled carbon nanotubes composite film functionalized interface[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 26(8):3469-3474. DOI: 10.1016/j.bios.2011.01.027.
- [51]. ZHU X L, CHEN L L, SHEN P, et al. High Sensitive Detection of Cry1Ab Protein Using a Quantum Dot-Based Fluorescence-Linked Immunosorbent Assay[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(6):2184-2189. DOI: 10.1021/jf104140t.
- [52]. 游凯豪, 史强, 江东健, 等. 转基因蛋白 Cry1AC 的非标记阻抗型电化学免疫传感器的构建[J]. *南昌大学学报(理科版)*, 2018, 042(003):226-230. DOI: 10.3969/j.issn.1006-0464.2018.03.005.
- [53]. GAO H F, WEN L K, WU Y H, et al. An ultrasensitive label-free electrochemiluminescent immunosensor for measuring Cry1Ab level and genetically modified crops content[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 97(15):122. DOI: 10.1016/j.bios.2017.04.033.
- [54]. ZHOU R., FANG C, YAN J L, et al. A C-reactive protein immunosensor based on platinum nanowire / titania nanotube composite sensitized electrochemiluminescence[J]. *Talanta*, 2019, 205(1): 120135. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120135.
- [55]. ZHAO S., ZHANG Y C., DING S T, et al. A highly sensitive label-free electrochemical immunosensor based on AuNPs-PtNPs-MOFs for nuclear matrix protein 22 analysis in urine sample[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2019, 834(2): 33-42. DOI: 10.1016/j.jelechem.2018.12.044.
- [56]. 高彬彬, 杨宾, 李晓琼. 基于金纳米颗粒修饰丝网印刷电极的胰蛋白酶原-2 电化学免疫传感器[J]. *生命科学仪器*, 2019, 17(02):26-31. DOI: 10.11967/2019170404.
- [57]. CAO Q, ZHAO H, YANG Y M, et al. Electrochemical immunosensor for casein based on gold nanoparticles and poly (l-Arginine)/multi-walled carbon nanotubes composite film functionalized interface[J]. *Biosensors and Bioelectron-Ics*, 2011, 26(8):3469-3474. DOI: 10.1016/j.bios.2011.01.027.
- [58]. ZHAO L F, LI S J, HE J, et al. Enzyme-free electrochemical immunosensor configured with Au-Pd nanocrystals and N-doped graphene sheets for sensitive detection of AFP[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 49(Complete):222-225. DOI: 10.1016/j.bios.2013.05.016.
- [59]. ESTEVES-VILLANUEVA J O, TRZECIAKIEWICZ H, MARTIC S. A protein-based

- electrochemical biosensor for detection of tau protein, a neurodegenerative disease biomarker[J]. *Analyst*, 2014, 139(11):2823. DOI: 10.1039/c4an00204k.
- [60]. DERKUS B, BOZKURT P A, TULU M, et al. Simultaneous Quantification of Myelin Basic Protein and Tau Proteins in Cerebrospinal Fluid and Serum of Multiple Sclerosis Patients Using Nanoimmunosensor[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 89(15): 781-788. DOI: 10.1016/j.bios.2016.10.019.
- [61]. DAI Y, ALIREZA M, LIU C C. A Single-Use, In Vitro Biosensor for the Detection of T-Tau Protein, A Biomarker of Neuro-Degenerative Disorders, in PBS and Human Serum Using Differential Pulse Voltammetry (DPV)[J]. *Biosensors*, 2017, 7(4):1-10. DOI: 10.3390/bios7010010.
- [62]. XU W, QIN Z, HAO Y T, et al. A signal-decreased electrochemical immunosensor for the sensitive detection of LAG-3 protein based on a hollow nanobox-MOFs/AuPt alloy[J]. *Biosensors and Bioelectronic*, 2018, 113(15):148-156. DOI: 10.1016/j.bios.2018.05.010.
- [63]. GAO N, ZHANG Y, GAO K, et al. Ultrasensitive label-free photoelectrochemical immunosensor for the detection of amyloid β -protein based on Zn:SnO₂ /SnS₂ -Au nanocomposites[J], *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 2019, 308(1): 127576. DOI: 10.1016/j.snb.2019.127576.