



# 免标记型免疫传感器的构建及其对毛织品微痕迹的检测

王钟元<sup>1</sup>, 宋珊珊<sup>1</sup>, 翟雨洁<sup>1</sup>, 杨海亮<sup>2</sup>, 王 秉<sup>1</sup>

(1. 浙江理工大学材料科学与工程学院, 杭州 310018; 2. 中国丝绸博物馆, 杭州 310002)

**摘 要:** 为检测毛织品微痕迹, 设计了一种针对羊毛角蛋白的免标记型免疫传感器。通过层层自组装技术构建免疫传感器, 用 3-巯基丙酸(MPA)在电极表面形成单分子层, 活化羧基端后与抗体结合, 利用免疫反应检测羊毛角蛋白。选用 5 种抗原分析了免疫传感器的特异性, 利用不同浓度的羊毛角蛋白溶液分析了免疫传感器的敏感性。结果显示: 免疫传感器对于羊毛角蛋白具有选择性, 并且在检测羊毛角蛋白时表现出了优异的灵敏度。免疫传感器的线性检测范围为 0.10~100.00  $\mu\text{g/mL}$ , 最低检测限可以达到 11.53 ng/mL。研究表明, 该免疫传感器可以用于毛织品微痕迹的鉴定分析和定量计算, 并且对其具有极高的检测灵敏性。毛织品的电化学免疫检测体系的建立, 为毛织品的超灵敏检测提供了一种新的思路, 拓展了毛织品文物的分析方法。

**关键词:** 毛织品; 微痕迹; 电化学; 免疫传感器; 超灵敏检测

**中图分类号:** TP212.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-3851 (2021) 07-0478-05

## The development of a label-free immunosensor and its detection of micro traces of wool textiles

WANG Zhongyuan<sup>1</sup>, SONG Shanshan<sup>1</sup>, ZHAI Yujie<sup>1</sup>, YANG Hailiang<sup>2</sup>, WANG Bing<sup>1</sup>

(1. School of Materials Science & Engineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. China National Silk Museum, Hangzhou 310002, China)

**Abstract:** In order to detect micro traces of wool textiles, the author designed a label-free immunosensor for wool keratin. An immunosensor was constructed by layer-by-layer self-assembly technique. 3-mercaptopropionic acid (MPA) was used to form a monomolecular layer on the electrode surface. After activating the carboxyl terminal, it was bound to the antibody. The wool keratin was detected by immunoreaction. Five antigens were selected to analyze the specificity of the immunosensor, and different concentrations of wool keratin solutions were employed to analyze the sensitivity of the immunosensor. The results showed that the immunosensor was selective for wool keratin and showed excellent sensitivity when detecting wool keratin. The linear detection range of the immunosensor was 0.10~100.00  $\mu\text{g/mL}$ , and the limit of detection (LOD) was up to 11.53 ng/mL. The results confirm that the proposed immunosensor can be used for identification and quantitative calculation of micro traces of wool textiles, and has extremely high sensitivity for micro traces. The establishment of electrochemical immunoassay system for wool textiles provides a new idea for the ultra-sensitive detection of micro traces of wool textiles, and expands the analysis methods of wool textile cultural relics.

**Key words:** wool textile; micro trace; electrochemical; immunosensor; ultra-sensitive detection

收稿日期: 2021-01-07 网络出版日期: 2021-03-03

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1520302); 国家自然科学基金项目(51603188); 浙江省文物保护科技项目(2020012)

作者简介: 王钟元(1996—), 男, 浙江杭州人, 硕士研究生, 主要从事纺织品文物考古方面的研究。

通信作者: 王 秉, E-mail: wbing388@163.com

## 0 引 言

不同时期的毛织品能够反映当时的社会、经济乃至政治面貌<sup>[1]</sup>, 因此研究分析毛织品文物具有重大意义。毛织品由羊毛纺织而成, 其组成成分会受到各类环境因素比如气温、水分及酸碱程度等因素的影响, 从而发生老化分解, 随着时间的推移, 大分子蛋白降解为肽链, 毛织物文物最终成为碎片乃至微痕迹。

纺织品的常规检测手段有显微镜法和光谱法等。显微镜法通过光学显微镜和扫描电子显微镜对纺织品纤维的横纵向结构进行观察分析来判断纤维品种<sup>[2-4]</sup>, 而出土文物大多观察不到纤维纹理。光谱分析法通常采用红外光谱和拉曼光谱, 通过特征峰的具体位置、形状和强度来分析其蛋白组成的各种信息<sup>[5-9]</sup>。由于出土文物大多已降解, 且其中含有杂质, 容易对光谱分析造成较大干扰, 故而光谱法也难以检测毛织品文物。综上所述, 想要分析毛织品文物样品, 必须有合适的、精确的、灵敏的检测方法。电化学检测方法是近年来兴起的检测方法<sup>[10-11]</sup>, 通过信号放大可以检测出微量的待测样品<sup>[12]</sup>, 操作简便, 适用于超微量检测<sup>[13]</sup>。本课题组在前期的研究中将自主研发的丝绸免疫技术<sup>[14]</sup>和电化学技术相结合, 开发出了针对丝绸文物的电化学检测方法<sup>[15]</sup>。

本文将电化学免疫传感器应用于毛织品微痕迹的检测分析中, 采用金电极构建电化学免疫传感器, 首先利用金硫键使巯基丙酸与电极表面结合, 随后将其端羧基活化, 以使得多克隆抗体共价固定在电极表面, 通过抗原抗体结合时的微小的电流变化来测定目标毛织品的羊毛蛋白, 无需使用标记物, 具有快速简便、灵敏度高、特异性强等特点, 为传统方法无法检测毛织品文物的难题提供了一个可行的解决方案, 因此在毛织品考古领域具有较好的应用前景。

## 1 实 验

### 1.1 实验试剂与仪器

#### 1.1.1 试 剂

鸡卵清蛋白(OVA)、牛胶原蛋白、人血清蛋白(HSA)、牛血清蛋白(BSA)、3-巯基丙酸(3-MPA)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 2-吗啉乙磺酸(MES), 购自阿拉丁化工有限公司; 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、氯化钠( $\text{NaCl}$ )、磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、氯化钾(KCl)、碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )、碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )和柠檬酸三钠( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 购自

杭州高晶精细化工有限公司; 纳米级氧化铝( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )、铁氰化钾( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ )、亚铁氰化钾( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), 购自麦克林生化科技有限公司; 盐酸( $\text{HCl}$ )、浓硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), 购自科密欧化学试剂有限公司; TMB 显色剂, 购自华安生物技术有限公司; 无水乙醇( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), 购自企业家科技有限公司。

#### 1.1.2 设备仪器

85-2 型恒温磁力搅拌机, 常州普天仪器制造有限公司; DNP-9022 型恒温培养箱, 上海精宏实验设备; FD-IA-50 型真空冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; BSA224S 型电子分析天平, 科学仪器有限公司; MILLI-Q® IQ7003/7005 型纯水仪, 密理博公司; KQ-250DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; QL-861 型旋涡混合器海门市其林贝尔仪器制造有限公司; DHG-9240 A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验仪器设备有限公司; CHI660E 型电化学工作站, 上海辰华仪器有限公司。

#### 1.1.3 抗体制备

通过对比羊毛角蛋白和其他动物毛角蛋白的氨基酸序列, 得到羊毛角蛋白的特征序列为“KKYEEEEIALR”。通过肽段合成器制得“KKYEEEEIALRC”肽段, 在该肽段一端偶联匙孔血蓝蛋白(KLH)得到免疫原。用生理盐水溶解 500  $\mu\text{g}$  免疫原, 将所得溶液按照 1:1 体积比与完全弗式佐剂混合, 并混入适量抗生素, 震荡使其乳化完全。取 2 只实验用白兔(大约 15 周龄), 实验前保留其少量血液留作对照。初次免疫时把第一步所得乳液皮下注射和后大腿肌注射给兔子, 每只样品兔用 100  $\mu\text{L}$  乳液注射。分别在 2、4、6 周时对兔进行加强免疫, 此时改用不完全弗氏佐剂, 其他条件与初次免疫相同。自第 4、6 周的免疫完成后, 等待 10 d, 抽取兔耳血, 评价其血清效价是否合格。当评估结果合格后, 获取所需血液, 在室温下静置, 使其缓慢凝固。然后在 37  $^{\circ}\text{C}$  下恒温处理 1.5 h, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻, 待血块收缩完全, 即可得到抗血清。将抗血清在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下以 12000 r/min 的转速离心 10.0 min, 分装离心所得上清液, 在 -20  $^{\circ}\text{C}$  下保存, 留待取用。血清的纯化采用免疫亲和层析技术。将纯化后的抗体保存在 -20  $^{\circ}\text{C}$  的条件下, 留待取用。

#### 1.1.4 毛织品角蛋白制备

将毛织品剪碎溶解在含有 2%  $\text{NaOH}$ 、0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  的角蛋白提取液中, 溶比 1:50, 温度 60  $^{\circ}\text{C}$ , 搅拌 5.0 h。溶解后在常温下冷却过滤, 用去离子水进行透析析去钠离子等杂质, 间隔 5.0 h 更换去离

子水,持续 3 d。将所得角蛋白溶液冷冻干燥 3 d 得到角蛋白,研磨成粉,密封保存,留待取用。

1.1.5 电解液制备

称取氯化钾 15.31 g、氯化钠 16.00 g、磷酸二氢钾 0.54 g、磷酸氢二钠 2.84 g、铁氰化钾(5 mmol/L) 3.29 g、亚铁氰化钾(5 mmol/L) 4.22 g,加到一个洁净的 2000 mL 的烧杯中,用 2000 mL 去离子水溶解配置成溶液,用洁净的玻璃棒搅拌直至固体完全溶解,用保鲜膜盖在烧杯口,保存留待取用。

1.1.6 3-巯基丙酸溶液(MPA)的配置

用量筒量 25 mL 去离子水倒入烧杯,用移液枪量取 545  $\mu$ L 的 3-巯基丙酸溶液加入烧杯,用玻璃棒搅拌均匀,倒入试管反复摇晃,使其混合均匀,贴上标签纸,保存留待取用。

1.1.7 电化学免疫传感器的构建

在麂皮上用 20 nm 氧化铝悬浮浆打磨金电极,然后先用无水乙醇超声清洗 10.0 min,再用去离子水超声波清洗 10.0 min。将金电极浸没在 0.5 mol/L 的稀硫酸中用循环伏安法活化。扫描速率设为 0.2 V/s,扫描范围设为-0.4~1.6 V,循环周期选择 40 个,用去离子水清洁电极,将金电极在 0.5 mol/L 的 MPA 溶液中过夜孵育共 12.0 h,使电极表面结合成金硫键,形成单分子层。清洗电极,浸没在 0.10、0.05 mol/L 和 0.03 mol/L 的 MES/EDC/NHS 溶液中孵育 5.0 h,活化 MPA 的羧基端。滴加 10  $\mu$ L 多克隆抗体到金电极表面,并在 37  $^{\circ}$ C 恒温烘箱中孵育 1.0 h,在此过程中,多克隆抗体上的氨基与之前被活化的 MPA 端羧基结合,将抗体固定在电极表面。清洗电化学免疫传感器,滴

加 BSA 到电极表面,对抗体进行封闭,在 37  $^{\circ}$ C 下孵育 0.5 h。图 1 为电化学免疫传感器的构建过程。

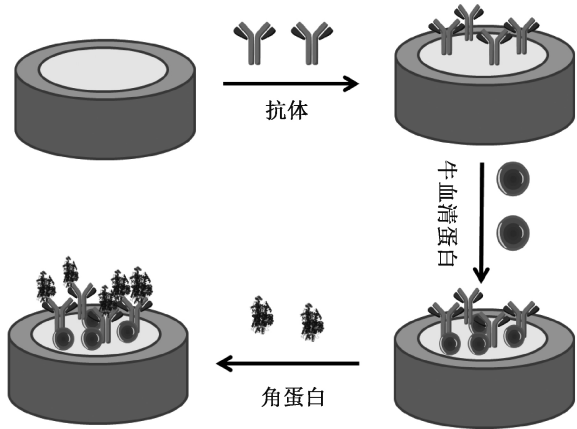


图 1 电化学免疫传感器的构建过程示意

2 结果与讨论

2.1 电极活化曲线分析

在构建电化学免疫传感器之前,必须要确保免疫传感器表面的高清洁度,故每个金电极都需要 10.0 min 的持续打磨抛光和 3 次去离子水清洗,并在 0.5 mol/L 稀硫酸中对金电极进行活化,用循环伏安法(CV)表征电极的活化过程如图 2 所示。图 2 表明,在循环扫描 2 个周期后,电极在 0.8 V 处的还原峰为 112.2  $\mu$ A,在扫描 20 个周期时,峰值增加到 120.3  $\mu$ A,在后续分别扫描了 30、40 个周期时,峰值均升至 129.3  $\mu$ A;金电极的还原峰随着循环次数增加,先增大后不变,当循环次数达到 30 圈以后,电流峰值不再上升,说明电极已经打磨干净,此时其表面已经被完全活化。

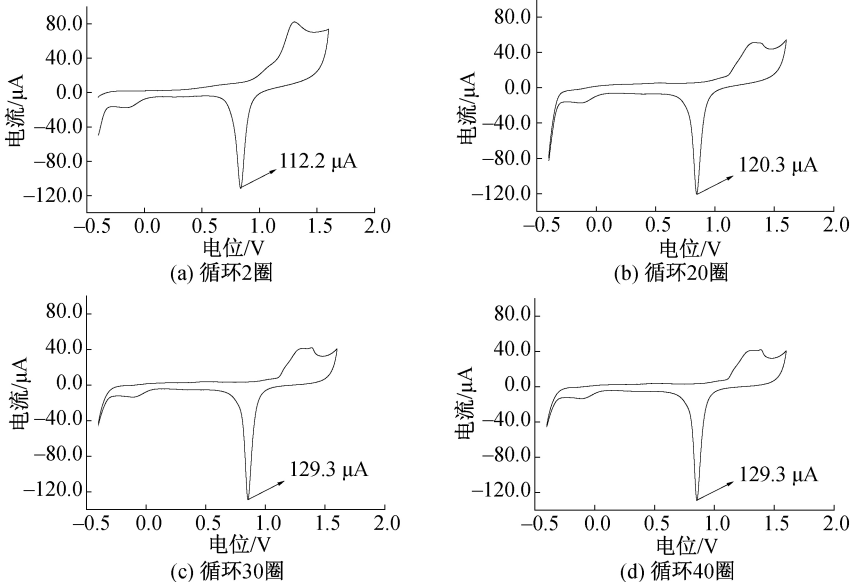


图 2 金电极在 0.5 mol/L 硫酸中电极循环伏安曲线

2.2 裸金电极 CV 曲线分析

免疫传感器表面的清洁度通过循环伏安法确定。一般认为,循环伏安法测试时,如氧化还原峰之间的差值低于 100 mV,则可认为金电极的金片表面已经打磨干净。因此为进一步确保金电极表面的洁净度,使用循环伏安法对裸的金电极进行测试,分析测试环境为 5 mmol/L 的铁氰酸根和 0.1 mol/L 的 KCl 的溶液。循环伏安法测试结果如图 3 所示,活化后的电极氧化峰和还原峰的电压分别为 0.268 V 和 0.173 V,两个峰相差 95 mV。故而,此次实验中,金电极已经打磨成功,其表面清洁度应已达标,可以进行下一步实验。

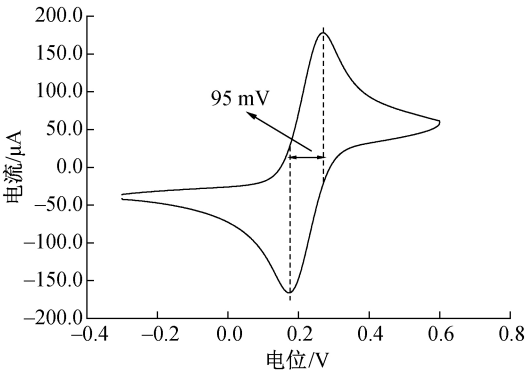


图 3 金电极在 5 mmol/L [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 溶液中的循环伏安曲线

2.3 电化学免疫传感器的 DPV 曲线分析

电化学免疫传感器的构建情况通过 DPV 来检测。图 4 是用 DPV 测试分析金电极层层自组装的负载情况,由上到下曲线分别为电化学免疫传感器的 DPV 分析测试中裸电极、依次加入 MPA 和抗体的测试结果曲线。图 4 表明,裸电极的峰电流值为 101.9 μA,加入 MPA 后,峰值电流降低为 63.7 μA,说明 MPA 负载成功。对比第二和第三条曲线,能

够得出结论:滴加抗体能使金电极的峰电流值下降,且电流下降说明了此时抗体已经负载成功。

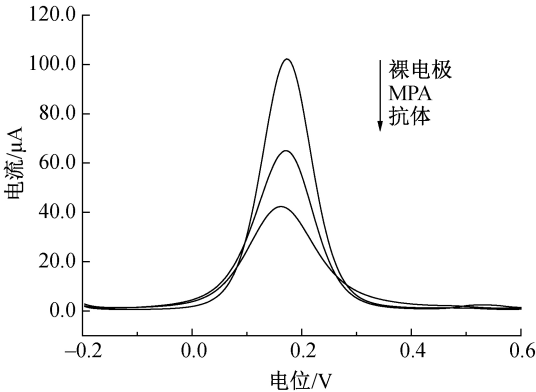


图 4 免疫传感器自组装过程的 DPV 示意图

2.4 毛织品微痕迹的检测

将角蛋白溶液稀释至 0.01、0.10、1.00、10.00 μg/mL 和 100.00 μg/mL。图 5(a)为加了不同浓度角蛋白溶液后的 DPV 响应值,由图可见,样品浓度越高,DPV 峰值越低。此结果说明,在免疫传感器表面抗体与抗原结合越多,金电极表面的电子传输效率受抑制越多;同时也说明所构建的电化学免疫传感器可根据角蛋白的浓度产生对应的数值变化。此外,通过将 DPV 电流峰值与角蛋白浓度对数值建立关联,结果如图 5(b)所示,图 5(b)显示二者呈线性关系,做出回归方程为  $y = -1.915 \log C + 33.171$  ( $R^2 = 0.9964$ ) ( $y$  为 DPV 峰值,  $\log C$  为羊毛角蛋白溶液的对数浓度),线性范围 0.10 ~ 100.00 μg/mL。将特异性实验中 cut-off 线所在的电流峰作为  $y$  值,即选用空白对照的电流峰值加上三倍的标准偏差下的电流值 36.9 μA,代入方程,算得所构建的电化学免疫传感器的最低检出限 LOD=11.527 ng/mL。

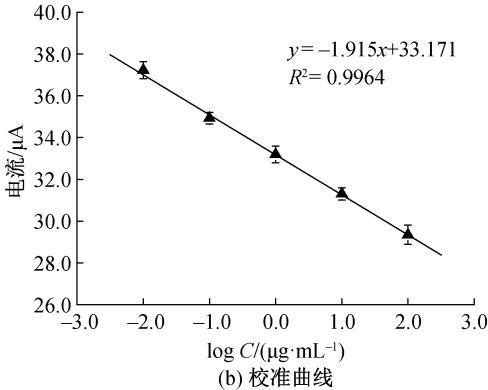
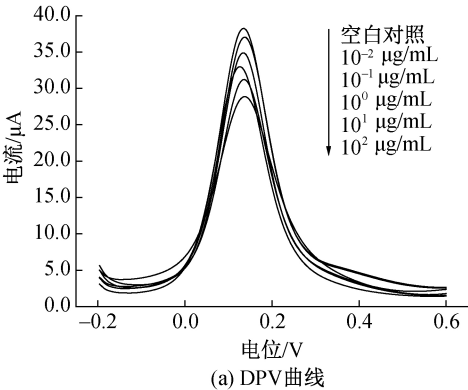


图 5 免疫传感器对不同浓度羊毛角蛋白的测试曲线

本实验的特异性通过人血清蛋白 HSA、牛血清蛋白 BSA、鸡卵清蛋白 OVA、牛胶原蛋白来测试,空白对照选用 CB9.6,结果如图 6 所示。定义  $\Delta I$  等于负载样品前 DPV 的电流峰值减去负载后电流的差值,检出限定义为空白对照的  $\Delta I$  均值加上其标准偏差的 3 倍,在图 6 中用虚线表示。从图 6 可以看到,除了羊毛角蛋白,其余结果均为阴性,说明电化学传感器检测羊毛具有优良的特异性。

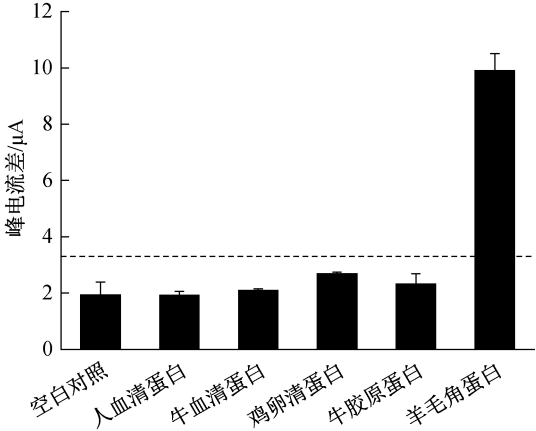


图 6 电化学免疫传感器的特异性

3 结 论

本文为检测毛织品微痕迹,开发了一种针对羊毛角蛋白的电化学检测方法,通过自组装,构建免标记型免疫传感器,分析不同浓度下的毛织品羊毛角蛋白,实现了对毛织品超微量角蛋白的检测。主要结论如下:

- a) 电化学免疫传感器对毛织品检测线性范围为 0.10~100.00 μg/mL,线性拟合度较好,不仅可以实现毛织品微痕迹的定性检测,也可用于定量计算。
- b) 免疫传感器对于毛织品的检测具有良好的特异性,可以鉴定纺织品文物的物种来源属于羊毛。
- c) 电化学测试方法最低检测限为 11.53 ng/mL,可以实现降解严重的毛织品文物检测。

参考文献:

[1] Wang B, Gu J, You Q, et al. Preparation of artificial antibodies and development of an antibody-based indirect ELISA for the detection of ancient wool[J]. Analytical Methods, 2018(10): 1480-1487.

[2] 王宏博,高雅琴. 应用光学显微镜鉴别裘皮毛纤维可行性研究[J]. 特产研究, 2008, 30(2): 17-21.

[3] 段涛,胡雅洁,麦热依·吉力哈依达尔,等. 应用光学显

微镜对几种不同毛纤维形态结构的比较研究[J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(5): 122-126.

[4] 曹小红,武玉明,邢声远. 扫描电子显微镜与光学投影显微镜在纤维鉴别中的应用比较[J]. 中国纤检, 2005(12): 12-15.

[5] 吴俭俭,孙国君,谢维斌,等. 红外光谱与拉曼光谱技术在纤维定性分析中的应用[J]. 丝绸, 2013, 50(7): 27-33.

[6] 侯秀良,王善元. 采用激光显微拉曼光谱仪研究山羊绒、羊毛纤维的结构[J]. 毛纺科技, 2004, 32(1): 38-41.

[7] 罗曦芸,杜一平,沈美华,等. 红外光谱在纤维质文物材料鉴别中的应用研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(1): 60-64.

[8] 孙晓宇,武宁宁,龚葵. 拉曼光谱在纺织检测中的应用及其发展前景[J]. 现代科学仪器, 2013(4): 84-87.

[9] 吴俭俭,孙国君,戴连奎,等. 纺织纤维拉曼光谱定性分析法[J]. 纺织学报, 2011, 32(6): 28-33.

[10] Zhu F J, Zhao G Y, Dou W C. Electrochemical sandwich immunoassay for Escherichia coli O157: H7 based on the use of magnetic nanoparticles and graphene functionalized with electrocatalytically active Au@Pt core/shell nanoparticles [J]. Microchimica Acta, 2018, 185(10): 1-11.

[11] Tuteja S K, Duffield T, Neethirajan S. Liquid exfoliation of 2D MoS2 nanosheets and their utilization as a label-free electrochemical immunoassay for subclinical ketosis[J]. Nanoscale, 2017, 9(30): 10886-10896.

[12] Warsinke A, Benkert A, Scheller F W. Electrochemical immunoassays [J]. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 2000, 366(6/7): 622-634.

[13] Shen H, Wang C, Ren C, et al. A streptavidin-functionalized tin disulfide nanoflake-based ultrasensitive electrochemical immunosensor for the detection of tumor markers[J]. New Journal of Chemistry, 2020, 44(15): 6010-6014.

[14] You Q, Li Q, Zheng H, et al. Discerning silk produced by bombyx mori from those produced by wild species using an enzyme-linked immunosorbent assay combined with conventional methods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(35): 7805-7812.

[15] Li J, Zheng H, He Y, et al. Ultrasensitive electrochemical immunosensor reveals the existence of silk products on the maritime silk road [J]. ACS Sensors, 2019, 4(12): 3203-3209.

(责任编辑:唐志荣)