

• 论 著 •

基于纳米金检测葡萄糖实验方法的探讨*

张志伦, 吴杰红, 刘 萍, 周良琼, 蒲晓允[△]

(第三军医大学新桥医院检验科, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨基于纳米金快速检测葡萄糖的新技术。方法 依赖酶包被金纳米粒子(GNPs)吸附固定葡萄糖氧化酶(GOD)和辣根过氧化物酶(HRP)。葡萄糖在 GOD 的催化下发生氧化反应生成 H_2O_2 , 生成的 H_2O_2 在 HRP 的催化作用下与 TBHBA 发生颜色反应, 检测产物的最大吸收峰。结果 反应体系在 530 nm 处有最大吸收峰, 吸光度值随葡萄糖浓度的增加而递增。结论 GNPs 吸附的酶分子能够用于血糖的检测, 并能增加试剂的稳定性。

关键词:方法; 纳米金; 葡萄糖测定; 干化学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.17.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)17-1923-01

Establishment of a method for the detection of glucose based on gold nanoparticles*

Zhang Zhilun, Wu Jiehong, Liu Ping, Zhou Liangqiong, Pu Xiaoyun[△]

(Department of Laboratory, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To establish a new method for rapid detection of glucose based on gold nanoparticles(GNPs). **Methods** Glucose oxidase(GOD) and horseradish peroxidase(HRP) were immobilized on GNPs. The oxidation of glucose was catalyzed by GOD to produce H_2O_2 . The produced H_2O_2 reacted with TBHBA, under the catalyzing of HRP. Then, the max absorption peak of production was detected. **Results** The max absorption peak of this reaction system was at 530 nm, and the optical density increased with the increase of the concentration of glucose. **Conclusion** GNPs could be able to absorb enzyme molecules for the detection of blood glucose and keep the biological activity.

Key words: methods; gold nanoparticles; detection of glucose; dry chemical

近年来,对纳米金的研究及应用一直十分活跃,小粒径的纳米金具有很好的催化及吸附性能^[1],以它为催化剂而建立起来的催化增强技术,极大地增强了检测信号,已用于蛋白质、核酸等分析^[2]。葡萄糖具有供给能量、补充血糖、强心利尿、促进解毒功能的作用,建立快速、简便的葡萄糖测定方法对医学化学具有十分重要的意义。目前,葡萄糖的检测方法主要有红外光谱法、高效液相色谱法、气质联用以及各式各样的酶传感器等。它们或成本高,或要求在沸腾状态下测定,操作不便,试剂稳定性差。本研究采用基于纳米金包被酶的原理,建立了用纳米金检测葡萄糖的方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取本院检验科临床检测血液标本。

1.2 仪器与试剂 采用北京捷伦酸度计,德国 Thermo 微量核酸蛋白检测仪 ND20,杭州惠邦设备有限公司的反渗透纯水机,海尔冰箱,DJ-大功率磁力搅拌器,10.0 nm 胶体金采用柠檬酸三钠改良法制备^[3]。葡萄糖氧化酶(GOD, 146 U/mg, Sigma);辣根过氧化物酶(HRP, 300 U/mg, Sigma);磷酸盐缓冲液;盐酸(北碚化学试剂厂);TBHBA(Sigma);HAuCl₄(国药集团化学试剂公司);1 mg/mL 的葡萄糖溶液;1%的柠檬酸三钠;4-氨基安替吡啉,10.0 nm 胶体金采用柠檬酸三钠改良法制备。所用试剂均为分析纯,实验用水为亚沸高纯水。

1.3 方法

1.3.1 包被 将 HRP 与 GOD 用 0.05 mol/L 的 NaCl 于 4℃ 透析过夜,除去多余的盐离子。取该溶液 10 mL,在搅拌下加入 1 000 U/L 的酶溶液 10 mL,过夜。

1.3.2 配制稳定剂 分别称取清蛋白 0.001 g 于两个烧杯中,作为酶的稳定剂。于 10℃ 离心 1 h,去除上清液,留取沉淀。

1.3.3 配制显色剂 将 4-AAP 配成 10 mmg/mL 的溶液。

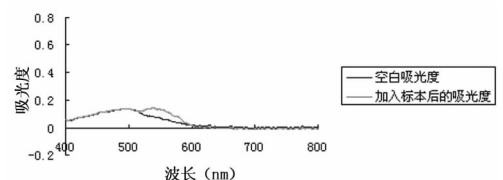
1.3.4 检测最大吸收率 采用德国 Thermo 微量核酸蛋白检

测仪 ND20 来测定加入血清的反应液的最大吸收峰。取 200 μ L 显色液与纳米金中混匀,分别加入葡萄糖浓度为 3、6、12、24 mmol 的血清 2 μ L,对照管中加入 2 μ L 蒸馏水与 200 μ L 的显色液,混匀,放入水浴箱中温育 10 min。用蒸馏水调零,用对照管调试剂空白。取 2 μ L 反应管中的液体于德国 Thermo 微量核酸蛋白检测仪 ND20 中测定最大吸收峰。

1.4 统计学处理 实验数据用百分率(%)及($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较用样本均数 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。两种方法的相关性采用直线相关分析。所有数据统计分析均运用 SPSS 统计软件处理。

2 结果

2.1 在波长 530 nm 时产生了最大吸收峰,表明氧化还原反应发生,催化 TBHBA 产生颜色变化,500 nm 处的吸收峰是由于纳米金本身性质造成的,见图 1。



浅色线代表加入标本的液体的吸光度曲线;深色线为试剂空白。加入标本的液体在 530 nm 左右产生了最大吸收峰。

图 1 反应体系和试剂空白的吸光度

2.2 吸光度与浓度的关系 随着血糖浓度的增高,吸光度值递增。表明纳米颗粒已固化了足够量的 GOD,结果见图 2。

2.3 最佳实验条件 实验分别考察了磷酸盐缓冲液的浓度、GOD 的浓度、鲁米诺浓度、过氧化物酶的浓度、胶体金用量、颗粒的大小、反应体系温度和反应时间等对纳米金催化体系 $\Delta A_{450\text{ nm}}$ 的影响,结果表明,此反应体系在磷(下转第 1926 页)

实验发现:破伤风梭菌 LAMP 法只扩增破伤风梭菌,不扩增其他创口感染常见菌,有良好的特异性。破伤风梭菌 LAMP 检测方法的最低检测限为 1×10^1 CFU/mL 左右,灵敏度较高。通过进一步优化和标准化实验条件,还可以对破伤风梭菌实现定量测定。结果表明,本实验设计的破伤风梭菌 LAMP 检测方法具有良好的特异性和较高的灵敏度,而且操作简便、快速,有望用于破伤风梭菌的临床现场检验。

参考文献

[1] Lee HC,Ko WC,Chuang YC. Tetanus of the elderly[J]. J Microbiol Immunol Infect. 2000,33(3):191-196.
[2] Sheffield JS,Ramin SM. Tetanus in pregnancy[J]. Am J Perinatol, 2004,21(4):173-182.
[3] Bagetta G,Corasaniti MT, Nisticó G, et al. Behavioural and neuropathological effects produced by tetanus toxin injected into the hippocampus of rats[J]. Neuropharmacology, 1990, 29(8):765-770.
[4] Langkamp DL, Hoshaw-Woodard S, Boye ME, et al. Delays in receipt of immunizations in low-birth-weight children: a nationally representative sample[J]. Arch Pediatr Adolesc Med, 2001, 155(2):167-172.
[5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12):63.
[6] Yano A, Ishimaru R, Hujikata R. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic

Escherichia coli by loop-mediated isothermal amplification [J]. J Microbiol Methods, 2007, 68(2):414-420.
[7] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loopprimers [J]. Mol Cell Probes, 2002, 16(3):223-229.
[8] Xiao B, Zhu YH, Zou QM. A simple and sensitive technique-Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)[J]. Chin J Lab Med, 2005, 28(6):761-763.
[9] Endo S, Komori T, Ricci G, et al. Detection of gp43 of Paracoccidioides brasiliensis by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method [J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 234(1):93-97.
[10] Thekisoe OM, Kubok N, Nambota A, et al. Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LMAP) for diagnosis of trypanosomiasis[J]. Acta Tropica, 2007, 102(3):182-189.
[11] Njiru ZK, Mikosza AS, Matovu E, et al. African trypanosomiasis: Sensitive and rapid detection of the sub-genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA [J]. Int J Parasitol, 2008, 38(5):589-599.
[12] Kayoko O, Keiko Y, Kosuke T, et al. Detection of Salmonella entericain Naturally Contaminated Liquid Eggs by Loop-Mediated Isothermal Amplification, and Characterization of Salmonella Isolates[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(11):6730-6735.

(收稿日期:2011-05-20)

(上接第 1923 页)

酸盐缓冲液的浓度为 0.1 mmol/L、GOD 的浓度为 1 000 U/L、过氧化物酶的浓度为 1 000 U/L、胶体金用量为 1.91 μ g/mL 时,体系 $\Delta A_{450\text{ nm}}$ 最大,此反应体系在 10 min 时达到平衡,故选取磷酸盐缓冲液的浓度为 0.1 mmol/L、GOD 的浓度为 1 000 U/L、过氧化物酶的浓度为 1 000 U/L、胶体金用量为 1.91 μ g/mL,在恒温水浴 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min。

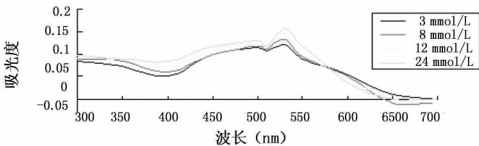


图 2 加入不同浓度葡萄糖后反应体系吸光度

3 讨 论

葡萄糖的检测方法主要有红外光谱法、高效液相色谱法、气质联用以及各式各样的酶传感器等^[5]。它们或成本高或要求在沸腾状态下测定,操作不便,试剂稳定性差。纳米金标记技术是现代四大免疫标记技术之一^[6-8]。纳米金粒子(GNPs)的组装技术及在生物检测中的应用日益引起人们的重视。本实验就是通过将酶通过简单的物理吸附包被于纳米金的表面,通过酶促反应催化酶的显色底物产生肉眼可见颜色变化,通过测定反应后的溶液的吸光度的变化来测定血液标本中血糖的含量,此反应如图 1 所示的吸光度变化。通过吸光度的变化便可以计算出血糖的浓度。此方法的准确性有待提高,因为反应体系中纳米金的颗粒大小不好控制,而且包被酶时无法确定包被上的酶量是多少。包被后的酶的稳定性大大提高,这是因为组装纳米金是有序的量子点阵列,具有特殊的物理化学性质,对于提高生物检测的灵敏度和稳定性具有重大的意义。胶体金颗粒标记蛋白质是通过异性电荷的吸引产生的结合,这种结合不影响蛋白质生物活性和免疫活性^[9-10]。胶体金标记酶检测血糖浓度能够大大提高酶试剂的稳定性,适用于医学快速检

验,具有重要的临床意义,而且纳米金对反应体系未产生明显干扰,反应过程颜色变化明显,利于观察。

参考文献

[1] Park SJ, Talon TA, Mirkin CA. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes[J]. Science, 2002, 295(5559):1503-1506.
[2] Jiang ZL, Liao XL, Deng AP, et al. Catalytic effect of nanogold on Cu(II)-N2H4 reaction and its application to resonance scattering immunoassay[J]. Anal Chem, 2008, 80(22):8681-8687.
[3] Hrapovic S, Liu Y, Male KB, et al. Electrochemical biosensing platforms using platinum nanoparticles and carbon nanotubes [J]. Anal Chem, 2004, 76(4):1083-1088.
[4] Moeremans M, Daneels G, van Dijk AV, et al. Sensitive visualization of antigen-antibody reactions in dot and blot immune overlay assays with immunogold and immunogold/silver staining[J]. J Immunol Methods, 1984, 74(2):353-360.
[5] 温桂清,梁爱惠,廖献就,等.检测痕量纳米金的纳米催化光度法[J].分析测试技术与仪器,2008,14(4):195-198.
[6] 王慧娟,薛晨阳,袁艳玲.金纳米颗粒制备及其光学特性研究[J].传感技术学报,2011,24(1):14-17.
[7] 夏宝宣,杜美利.纳米胶体金最佳标记条件的一种简易方法研究[J].标记免疫分析与临床,2010,17(1):36-38.
[8] 贺昕,熊晓东,梁敬博,等.免疫检测用纳米胶体金的制备及粒径控制[J].稀有金属,2005,29(4):471-474.
[9] 周继文,戎广亚.胶体金免疫层析法检测乙型肝炎病毒表面抗原[J].中华医学检验杂志,1998,21(1):30-32.
[10] 刘宏伟,仲伟强,王俊朝,等.胶体金快速斑点结合免疫分析[J].标记免疫分析与临床,2002,9(1):50-53.

(收稿日期:2011-05-25)