基于纳米银的比色阵列传感器的构建及在蛋白质检测中的应用

潘泓硕1 徐嘉谊1 陈信允1 姜 靓2 徐香玉2*

(济宁医学院¹临床医学院;²基础医学院 济宁 272067)

摘 要 蛋白质的快速高效检测和鉴定在医学诊断、不同疾病的治疗和蛋白质组学中具有巨大的前景。 目前的检测手段大多存在一些问题,如操作繁琐、效率低等,因此开发一个理想的蛋白质检测方法尤为重要。 以纳米银(AgNPs)为传感元件的阵列传感器在蛋白质检测方面具有操作便捷、准确率高、可视化等优点。本 文合成两种不同颜色和形状的 AgNPs:黄色球形和蓝色三角形,以此构建一个简单的比色阵列传感器,用于蛋 白质的区分检测。该传感器可以准确地识别和区分不同种类的蛋白质,准确率为 100%。在成功识别出不同 类型的蛋白质的基础上,进一步评估了该阵列传感器应用于区分正常和变性蛋白质的能力,准确率为 96.0%。此外,该阵列传感器对于未知样本的识别也具有高的准确率。

关键词 纳米银 比色阵列传感器 蛋白质检测

Construction of Colorimetric Sensor Array Based on Silver Nanoparticles and Its Application in Protein Detection

Pan Hongshuo¹, Xu Jiayi¹, Chen Xinyun¹, Jiang Liang², Xu Xiangyu^{2*}

(¹ College of clinical medicine, ² College of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining, 272067)

Abstract Efficient and rapid detection and characterization of proteins can aid in medical diagnosis, treatment of different diseases, and proteomics. However, the current assays often have issues such as low efficiency and complicated operation. Therefore, the need for an ideal protein detection method is vital. Sensor array that use silver nanoparticles (AgNPs) as the sensing element have become popular due to their easy operation, high accuracy, and visualization in protein detection. In this paper, two AgNPs with different colors and shapes: yellow spheres and blue triangles, were synthesized to construct a simple colorimetric sensor array for protein discrimination detection. This sensor was successfully used to accurately identify and distinguish various types of proteins with an accuracy rate of 100%. Additionally, the sensor array was evaluated for its ability to differentiate between normal and denatured proteins, achieving an accuracy rate of 96.0%. Furthermore, the sensor array can also accurately recognize and detect unknown samples.

Keywords Silver nanoparticles, Colorimetric sensor array, Protein detection

蛋白质是生物体内具有重要生理功能的大分子,是构成细胞的基本有机物,生物体内各种化学反应都离不开蛋白质的参与^[1]。蛋白质的状态稳定是维持细胞正常生理功能和保护生物体健康的关键^[2]。蛋白质稳态是指细胞利用一系列质量控制机制来维持自身蛋白质组的稳定性和功能性,通过协调蛋白质翻译、折叠、运输和降解深度整合的细胞网络来达到平衡状态。当蛋白质由于

某种病因而发生分子水平的异常变化时,可引起 蛋白质错误折叠以及多肽链降解或者聚集,导致 组织细胞损伤进而发生疾病^[3]。

在疾病发生的过程中,与疾病相关的遗传信息的变化往往会导致蛋白质的构象的变化。生物系统中的蛋白质变化可以为疾病的诊断提供新的思路^[4]。检测与疾病有关的生物大分子的传统方法,如酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫印迹

^{*}联系人,徐香玉 女,博士,副教授,主要从事纳米材料的合成研究,E-mail: xuxiangyu1212@163.com

济宁医学院国家自然科学基金培育基金项目(JYP2018KJ03,JYP2018KJ17)、济宁医学院校级本科教学改革研究项目(yb202219)和 济宁医学院大学生创新训练计划项目(cx2023053z,cx2023060z)资助

(Western Blot)等,通常依赖于特定的相互作用, 如酶或抗体-抗原,从而限制了分析物的范围。质 谱法是蛋白质鉴定的有力工具,但是该技术依赖 于复杂、昂贵的仪器,操作难度大。因此,开发一 种高通量、操作便捷的蛋白质鉴定方法在医学诊 断和蛋白质组学领域中具有重要意义。临床上往 往通过一些特定的蛋白质或者蛋白质结构的变化 用于疾病的诊断。比如阿尔茨海默症患者体内的 淀粉样蛋白常常发生不同程度的聚集^[5,6]。但 是,由于蛋白质结构的多样性和复杂性,传统的检 测方法存在着一定的缺陷。

阵列传感技术提供了一个可以参考的方法, 其已经应用于各种重要蛋白质的检测和疾病的诊 断。阵列传感器不是对单一生物大分子的专一性 识别,而是对多种生物大分子的广泛识别,这对疾 病的诊断和发病机制的研究提供了重要的参 考^[7]。蛋白质阵列比基因表达更可靠,因为它可 以用于许多疾病的早期临床检测、发生和发展预 测。然而,蛋白质阵列的开发仍然存在一些重大 的技术挑战^[8,9]。随着技术的发展,基于阵列技 术的光学传感器脱颖而出。光学阵列传感器为各 种分析物的高通量检测和识别提供了强大的工 具,其主要包括比色阵列传感器和荧光阵列传感 器。近年来,比色阵列传感器由于其简单、低成 本、快速和可视化等优点,在蛋白质传感方面备受 关注^[10]。有文献报道了一种近红外(NIR)比率 型纳米粒子阵列传感器用于蛋白质分析,实现11 种常见蛋白质的定性和定量区分^[11]。Rotello 课 题组长期致力于利用金纳米粒子(AuNPs)创建多 个差分阵列传感器用于检测各种生物样品[12]。

纳米颗粒由于其特殊的物理化学性质,在光 学、化学、生物以及医学领域发挥着重要的作 用^[13-15]。等离子体纳米颗粒(一般包括 AuNPs 和 银纳米粒子(AgNPs))由于具有强的局域表面等离 子体共振(LSPR)效应,是用于视觉分析的最有前 途的比色探针。基于纳米颗粒的比色传感器阵列 已被广泛用于检测和区分各种分析物,包括蛋白 质、金属离子和细菌。AgNPs 作为一种流行的比色 探针,由于其较高的消光系数和较低的成本以及独 特的小尺寸效应和表面效应,比 AuNPs 更受欢迎, 这使其成为比色传感器阵列中有前途的视觉读出 探针。蛋白质和 AgNPs 之间的非特异性相互作用 导致颜色和紫外吸光度发生变化,表明可以对蛋白 质实现高灵敏度的比色检测。

Ihsan 等^[16]利用合成的 AgNPs 实现了对 Zn²⁺ 的选择性检测; Noghabi 等^[17] 通过一种简单而绿 色的方法用壳聚糖处理银离子成功制备了 AgNPs,其可对 H,O,进行检测;Nguyen 等^[18]利用 AgNPs和石墨烯量子点组成的纳米复合材料 (AgNPs/GQDs)检测人体尿液中的葡萄糖浓度; Hajizadeh 等^[19]利用 AgNPs 测定水样中的氰化物 浓度;Han 等^[20]利用无标记的 AgNPs 作为颜色指 示剂、Ca²⁺作为交联剂,实现了对半胱氨酸的定量 测定; Jabeen 等^[21]利用 2,4-二硝基苯肼二硫代氨 基甲酸酯改性 AgNPs,将其用于奥美拉唑的比色 检测: Ivrigh 等^[22]利用未修饰的 AgNPs 测定小麦 粉和水稻水样中的杀菌剂丙硫菌唑。可见, AgNPs 因其独特的光学性能和较低的成本,在生 物大分子、生物小分子、重金属离子、药物分子等 物质的检测方面发挥巨大作用。AgNPs 除了可以 与生物大分子进行广泛的非特异性识别外,还可 以通过改变所使用的稳定剂和对其表面进行化学 修饰来实现对特定物质的高灵敏度特异性识别。 但是,AgNPs 识别分析物的作用原理通常为其较 强的 LSPR 效应,与分析物的作用方式较为单一, 产生交叉响应的能力较弱;且 AgNPs 虽然在成本 上相对 AuNPs 较低,但其进行化学修饰后稳定性 会有所下降,易被氧化。

本实验用化学还原方法合成不同颜色、不同 性质的 AgNPs,并对其进行形貌表征和粒径分析, 最后将 AgNPs 作为比色探针,开发了一种简单的 传感器阵列,与 AgNPs 相互作用的蛋白质导致与 表面电荷或氢键有关的构象变化或表面特征变 化,从而可用于识别不同种类的蛋白质,准确率为 100%。在成功识别出不同类型的蛋白质的基础 上,进一步评估该阵列传感器应用于区分正常和 变性蛋白质的能力。该阵列传感器与 90℃ 处理 下的蛋白质进行吸光度测试,利用线性判别分析 处理数据,该阵列识别正常和变性蛋白质的准确 率为 96.0%。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UV-2501 PC 紫外分光光度计(日本岛津公司);德国 Zeiss 扫描电子显微镜(SEM);BioTek Cytation5 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);E-201-9 pH 复合电极(美国奥豪斯公司);超 纯水机(西安优普仪器设备有限公司);H1850 高 速台式离心机(广州沪瑞明仪器有限公司)。

二水合柠檬酸三钠($Na_{3}C_{6}H_{5}O_{7} \cdot 2H_{2}O_{7}GR$, 国药集团化学试剂有限公司);硝酸银($AgNO_{3}$, AR)、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris, AR)、乙二胺四乙 酸二钠(EDTA-2Na, AR)、硼氢化钠($NaBH_{4}$, AR), 阿法埃莎化学有限公司;聚乙烯吡咯烷酮(PVP, AR,天津科密欧化学试剂有限公司);氯化钠 (AR)、过氧化氢($H_{2}O_{2}$, 30%)、盐酸(HCl, 36.5%) 及血红蛋白、β-乳球蛋白、细胞色素 C,溶菌酶、胰 蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶均购自阿拉丁试剂 有限公司。实验用水为超纯水(18.25MΩ · cm)。

1.2 实验步骤/方法

1.2.1 两种纳米材料的合成和表征

(1)利用化学还原法合成黄色球形纳米银 (sAgNPs),具体操作为^[15,23]:将 12.5mL 2.0mmol/L的AgNO₃溶液与1.0mL 4.0mmol/L 的Na₃C₆H₅O₇·2H₂O溶液在烧杯中混合,快速磁 力搅拌5min,加入25mL 0.02g/mL的PVP溶液, 搅拌10min,然后加入1.0mL10mmol/L的NaBH₄ 溶液,避光搅拌5min 后置于40℃水浴中继续反 应5min,冷却离心,得到较纯净的黄色 sAgNPs 溶液。

(2)蓝色三角形纳米银(tAgNPs)的合成。将 25mL 0.1mmol/L AgNO₃ 溶液、1.5mL 30mmol/L Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O 溶液、1.5mL 0.7mmol/L PVP 溶液,60µL 30% H₂O₂ 依次加入到 50mL 烧杯中, 再加入 210µL 100mmol/L 的 NaBH₄ 溶液,避光, 27℃水浴加热搅拌反应 30min,冷却离心,得到较 纯净的蓝色 tAgNPs 溶液。

(3) AgNPs 的表征。使用紫外-可见分光光度计对 AgNPs 进行光谱分析;测量速度为1200nm/min,测定波长范围为 200~900 nm;使用扫描电子显微镜观察 AgNPs 的形貌结构以及测量其粒径分布。

1.2.2 比色阵列传感器的构建

将合成的 sAgNPs 溶液稀释三倍(浓度为 200μmol/L)备用,tAgNPs 使用合成的原液(浓度 为 89μmol/L),将这两种不同颜色、不同形状的 AgNPs 作为比色探针制备传感器阵列。以 sAgNPs 材料作为比色探针的传感器的构建方法: 向 96 孔板中加入 100μL 200μmol/L 的黄色球形 纳米银溶液,用于后期蛋白质的检测。向 96 孔板 中加入 100μL 浓度为 200μmol/L 的 sAgNPs 溶液 和 100μL 待测蛋白质溶液的溶剂(分别为水和 Tris-HCl缓冲溶液),重复6次,作为空白。向96 孔板中加入200µL水、200µL Tris-HCl缓冲溶液, 作为背景。以tAgNPs作为比色探针的传感器的 构建方法同上。

1.2.3 蛋白质溶液的配制

称取一定质量的 β-Lac、Cyt、Pep、Pap、Lys、 Hb、Try 蛋白质,加入 10.0mL 水,配制浓度为 10.0µmol/L蛋白质-水溶液。取 1.0mL 稀释至 5.0mL,浓度为 2.0µmol/L。称取一定质量的蛋 白质,加入 10.0mL Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.40),配制浓度为 10.0µmol/L蛋白质-Tris-HCl 溶 液。取 1.0mL 稀释至 5.0mL,浓度为 2.0µmol/L。 表1为7种蛋白质的基本信息。

表1 7种蛋白质基本信息

Tab. 1	Basic	information	of	7	proteins
--------	-------	-------------	----	---	----------

名称	缩写	等电点	$M_{\rm w} [\times 10^3] / ({\rm g/mol})$
β-乳球蛋白	β -Lac	5.1~5.3	18.0
细胞色素 C	Cyt	9.8~10.1	12.3
胃蛋白酶	Pep	1.0	35.0
木瓜蛋白酶	Pap	8.8	23.0
溶菌酶	Lys	11.0~11.2	14.3
血红蛋白	Hb	7.0	64.5
胰蛋白酶	Try	10.5	23.8

1.2.4 正常蛋白质的检测

取 100μL sAgNPs 和 tAgNPs 溶液加入到 96 孔板中,再加入 100μL 7 种不同种类的正常蛋白 质,每个样本重复 6 次,孵育 5min 后用酶标仪检 测添加蛋白质前后传感元件的紫外吸光度变化。

1.2.5 变性蛋白的制备

将蛋白质-水溶液和蛋白质-Tris-HCl溶液各 5.0mL在90℃下加热10min,然后立即置于冰水 中10min,这样的加热和冷却循环重复进行3次, 以产生部分变性的蛋白质样品,用于传感器实验。 1.2.6 正常蛋白质和变性蛋白质的检测

取 100μL sAgNPs 和 tAgNPs 溶液加入到 96 孔板中,再加入不同种类的正常蛋白质和变性蛋 白质 100μL,每个样本重复 6 次,孵育 5min 后用 酶标仪检测添加蛋白质前后传感元件的紫外吸光 度变化。

2 结果与讨论

2.1 不同颜色、形状纳米银的合成和表征

图 1(A)是 sAgNPs 溶液的紫外可见吸收光 谱图,图中 400nm 处为 sAgNPs 的特征吸收峰,与 文献报道的结果相一致^[16]。另外,还利用 SEM 对 AgNPs 进行了形貌表征,由图 1(B)可见所合成的 AgNPs 的形状为球形。图 2(A)是 tAgNPs 溶液的紫外可见吸收光谱图,其在 330、470 和



699 nm 处有三个吸收峰,属于 tAgNPs 的特征吸收峰。利用 SEM 对其进行形貌表征,可知其形状为三角形(图 2(B))。



图 1 (A) sAgNPs 的紫外吸收光谱图,插入图为 sAgNPs 溶液照片,(B) sAgNPs 的 SEM 图像 Fig. 1 (A) UV absorption spectra of spherical AgNPs, inset is spherical AgNPs solution; (B) SEM image of spherical AgNPs





2.2 阵列传感器用于蛋白质的检测

为了研究构建的比色阵列传感器是否能够用 于生物大分子的检测以实现对疾病的诊断。选择 了7种具有不同等电点(从1.0到11.2)、分子量 (从12.3kDa 到64.5kDa)的常见蛋白质用于区分 检测。加入蛋白质后,每个传感元件产生了不同 的颜色变化(图3)和吸光度响应(图4)。Tris-HCl 缓冲溶液会使 sAgNPs 材料的特征吸收峰发 生红移,原因可能是其使 sAgNPs 发生团聚,导致 其粒径增大。Tris-HCl缓冲溶液使 tAgNPs 材料 699nm 处的面内偶极共振吸收峰消失,原因可能 是 Tris-HCl 缓冲溶液使 tAgNPs 发生团聚,不再具 有明显的三角形特征。由于 Tris-HCl 缓冲溶液条 件下的 AgNPs 的性质发生改变,因此对蛋白质的 响应模式也会发生一定程度的改变。由此本实验 共设计7个传感元件,分别是 sAgNPs-H₂O-400nm、sAgNPs-Tris-440nm、tAgNPs-H,O-330nm、 tAgNPs-H₂O-470nm tAgNPs-H₂O-680nm tAgNPsTris-350nm、tAgNPs-Tris-450nm。每个传感元件对 7种蛋白质都表现出不同的紫外吸光度变化。这 可能是由于蛋白质的分子量、结构和等电点不同 造成的,说明不同的蛋白质与阵列传感器的相互 作用能力不同,其吸光度的改变可能由于电荷/溶 剂环境的改变造成。





为了实现模型的可视化并将其用于未知样本的检测,线性判别分析(LDA)被用于评估区分所 有蛋白质类型。LDA 是一种有监督的模式识别 技术,能够最大限度地提高类间方差与类内方差 的比值。利用 LDA 算法将训练矩阵(7 个传感器 元件×7个蛋白质×6个重复)转换为典型分数。 在 LDA 图(图 5)中,每个因子(Score)代表对整 体分类的贡献程度。第一个判别因子(Score 1) 在类别中提供了比较好的区分,占总方差的 33.7%, 而 Score 2 具有第二高的方差贡献率。7 种蛋白质被归类成为7个不同的组。所有蛋白质 都被清晰地分类,没有任何错误分类,区分准确率 为100%。42个已知样本通过具有交叉验证的折 刀分类矩阵显示 100% 的准确度,并且传感器系 统成功地区分了7种蛋白质。为了验证阵列传感 器的区分未知样本能力,随机选择的28种未知蛋 白质进行了测试,准确率为96.4%,此结果验证 了阵列传感器具有区分不同的蛋白质的能力。该 阵列传感器在蛋白质检测方面具有巨大的潜力和 优异的性能。





Fig. 4 Absorbance response pattern diagram of sensor array for protein detection





Fig. 5 LDA diagram of sensor array for protein detection

2.3 阵列传感器用于正常/变性蛋白质的 检测

在成功识别出 7 种蛋白质后,进一步评估该 阵列传感器应用于区分正常和变性蛋白质的能 力。热量可以诱发蛋白质的构象转变,在 50℃和 100℃之间蛋白质的构象被急剧破坏。在本实验 中,阵列传感器用于识别未处理的(室温)和热处 理(90℃)的蛋白质。选择正常和热处理β-Lac、 Cyt、Pep、Pap、Lys、Hb、Try等7种蛋白作为待测 样本。每个传感元件对不同的蛋白质和不同处理 后的蛋白质的构象在不同的温度下会发生不同程度 的变化,从而导致其独特的响应模式。通过具有 交叉验证的折刀分类矩阵显示96.0%的准确度。 未知样本的识别准确率为98.2%。因此,该传感 器阵列可以识别正常蛋白质和变性蛋白质,构建 的阵列传感器具有出色的辨别能力。



图 6 阵列传感器对正常/变性蛋白的检测 LDA 图 Fig. 6 LDA diagram for detection of normal/denatured proteins by sensor array

3 结语

本文将合成的不同形状、不同性质的 AgNPs 作为传感元件,构建了一个用于蛋白质识别的简 单传感器阵列。通过检测两种溶剂条件下两种不 同形状的 AgNPs 与蛋白质发生相互作用后在特 征吸收峰处的吸光度变化,每种蛋白质都有自己 的比色反应模式,可以与其他蛋白质区分开来,从 而实现对不同种类蛋白质的区分检测。进一步研 究表明,该阵列传感器能够较准确地识别出正常 蛋白质和变性蛋白质。该阵列传感器为蛋白质的 快速检测提供了一个新的工具,可为阵列传感器 应用于疾病的检测提供参考。

参考文献

- [1] Xi H, He W, Liu Q Y, et al. ACS Sustain. Chem. Eng., 2018, 6(8): 10751~10757.
- [2] Wang X H, Zhao X T, Zheng K, et al. Langmuir, 2019, 35 (16): 5599~5607.
- [3] 吴思,张红,柯莎. 生物化学与生物物理进展,2022,49 (01):159~170.
- [4] Yan P, Zheng X W, Liu S, et al. ACS Sensors, 2023, 8

 $(1): 133 \sim 140.$

- [5] Ghasemi F, Hormozi-Nezhad M R, Mahmoudi M. Nanoscale, 2018, 10(14): 6361~6368.
- [6] Aliyan A, Cook N P, Marti A A. Chem. Rev., 2019, 119
 (23): 11819~11856.
- [7] Beatty M, Selinger A, Li Y Q, et al. J. Am. Chem. Soc., 2019, 141(42): 16763~16771.
- [8] Jiang Y, Shi M, Liu Y, et al. Angew. Chem. Int. Ed., 2017, 56: 11916~11920.
- [9] Rong X, Xiang L, Li Y, et al. Front. Aging Neurosci., 2020, 12: 248.
- [10] Yan P, Ding Z, Li X, et al. Anal. Chem., 2019, 91: 12134~12137.
- [11] Slagboom J, Kool J, Harrison R A. Brit. J. Haematol., 2017, 177(6): 947~959.
- [12] Miranda O R, Creran B, Rotello V M. Curr. Opin. Chem.
 Biol., 2010, 14(6): 728~736.
- [13] Zhang B X, Zhang J L, Duan R, et al. Nano Energy, 2020, 78: 105340.
- [14] Gurpreet S, Manish K, Manmohan S, et al. J. Am. Ceram.

Soc., 2021, 104(10): 1237~1246.

- [15] Huo D, Chen B, Li M, et al. Nanotechnology, 2021, 32: 145302.
- [16] Ihsan M, Niaz A, Rahim A, et al. RSC Adv., 2015, 5: 91158~91165.
- [17] Noghabi M P, Parizadeh M R, Ghayour-Mobarhan M, et al.J. Mol. Struct., 2017, 1146: 499~503.
- [18] Nguyen N D, Nguyen T V, Chu A D, et al. Arab. J. Chem., 2018, 11: 1134~1143.
- [19] Hajizadeh S, Farhadi K, Forough M, et al. Anal. Methods, 2011, 3: 2599.
- [20] Han C, Xu K, Liu Q, et al. Sens. Actuat. B, 2014, 202: 574~582.
- [21] Jabeena S, Shaha M R, Raufa A, et al. Curr. Anal. Chem., 2017, 13: 532~539.
- [22] Ivrigh Z J, Fahimi-Kashani N, Hormozi-Nezhad M R. Spectrochim. Acta A, 2017, 187; 143~148.
- [23] Ravindran A, Singh A, Raichur A M, et al. Colloids Surf.B, 2010, 76: 32~37.

- (上接第383页)
- [21] 刘仲林,赵晓春. 科学技术与辩证法, 2005, 22(6): 105~109.
- [22] Sheng Y H, Zhao J J. J. Central South Univ., 2021, 28: 3639~3641.
- [23] Mazzocchi F. Sci. Soc., 2019, 20(6): e47682.
- [24] Brassler M, Dettmers J. Interdisciplinary Journal of Problem-Based Learning, 2017, 11 (2). DOI: 10.7771/ 1541-5015.1686.
- [25] Marshall A G, Neikirk K, Hinton A J. et al. Pathog. Disease, 2022, 1: 80.
- [26] 赵士发,李春晓.研究生教育研究,2020,01:27~32.
- [27] Robinson C D. Educat. Psychol. Rev., 2022, 34: 2061 ~2094.
- [28] Hu J Y, Liu Y X, Zheng Q J, et al. J. Soc. Comput., 2023, 4(1): 30~45.
- [29] 谢彩霞, 刘则渊. 科学技术与辩证法, 2006, 1: 99~102.