

• 研究论文 •

倏逝波光纤免疫传感器探头的修饰及表征

龙 峰* 施汉昌 何 苗 朱安娜 盛建武

(清华大学环境科学与工程系 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室 北京 100084)

摘要 光纤探头上修饰生物识别分子是倏逝波光纤免疫传感器实现目标物检测的关键步骤. 以微囊藻毒素-LR (microcystin-LR, MC-LR)为例, 采用先将小分子半抗原 MC-LR 与经戊二醛活化的惰性蛋白(OVA)反应生成复合物 MC-LR-OVA, 然后将该复合物通过双功能试剂连接到硅烷化后的光纤探头表面, 并采用 XPS 和倏逝波全光纤免疫传感器对其修饰效果进行表征. 结果表明, 修饰后探头表面化学元素组成随不同修饰步骤发生了显著的变化, MC-LR-OVA 被共价键合到探头表面上. 探头对 MC-LR 抗体表现出强烈的特异性响应, 而对其它抗体蛋白的非特异性吸附很弱, 并且具有良好的再生性能. 因此, 该修饰方案适用于环境小分子污染物的检测.

关键词 光纤免疫传感器; 表面修饰; 探头; 倏逝波; 微囊藻毒素-LR

Surface Modification and Characterization of the Probe Based on Evanescent Wave Fiber-optic Immunosensor

LONG, Feng* SHI, Han-Chang HE, Miao ZHU, An-Na SHENG, Jian-Wu

(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract The modification of the surface of the fiber optic probe by bio-recognizing molecules is essential for detecting interest target by evanescent wave fiber optic immunosensor. In this study, microcystin-LR (MC-LR) was chosen as the example substance. Hapten-carrier conjugates MC-LR-Ovalbumin were synthesized by mixing MC-LR and ovalbumin (OVA) activated by glutaraldehyde, and then the conjugates were immobilized onto the silane layer on the probe with a heterobifunctional crosslinker. The probe modified was evaluated by XPS and an evanescent wave all-fiber immunosensor. The results showed that surface chemical compositions of the probe obviously changed at different modification steps, MC-LR-OVA was covalently bound with the probe surface, strong binding of antibody of MC-LR and low non-specific adsorption to other antibody was monitored, and good performance of regeneration was achieved. As a result, this modification method can be used for preparation of probe for the detection of low molecule pollutants.

Keywords fiber-optic immunosensor; surface modification; probe; evanescent wave; microcystin-LR

倏逝波光纤免疫传感器利用光波在光纤内, 以全反射方式传输时在探头所处的介质中产生倏逝波, 该倏逝波可以激发探头表面连接的抗体或抗原分子上标记的荧光物质, 同时结合免疫反应原理, 实现待测目标物质的定量检测^[1,2]. 倏逝波光纤免疫传感器将倏逝波原理、

荧光免疫分析原理及光纤检测优势结合于一体, 可实现目标物的灵敏、准确、快速和经济检测, 因此在环境监测、医学临床、食品卫生等领域得到了广泛的研究和应用^[3~7].

修饰好生物识别分子的光纤探头是光纤免疫传感

* E-mail: longf04@mails.thu.edu.cn

Received May 28, 2007; revised August 9, 2007; accepted November 19, 2007.

国家高技术研究发展计划(863)青年基金(No. 2002AA649160)资助项目.

器的核心部件, 研究制备出生物识别分子活性高、载量大、均匀性和一致性好、非特异性吸附弱、具有良好再生性能的生物识别元件, 是改善和提高免疫传感器检测性能之关键所在. 在环境检测中, 目标物一般为小分子污染物(分子量 <1000), 直接将小分子物质固定在识别元件表面非常困难, 目前常用的方法是固定抗体法^[3,8-10]. 而具有良好的再生性能是免疫传感器优于其它免疫分析方法(如 ELISA)的一大特点^[11], 当采用固定抗体法时, 由于再生条件常常比较苛刻, 使得再生后抗体活性下降, 进而影响传感器的稳定性和再现性.

本研究采用小分子污染物微囊藻毒素-LR (MC-LR) 与活化的惰性蛋白(OVA)反应生成的复合物修饰到光纤探头的方法制备具有生物识别功能的探头, 利用 XPS 表征修饰前后探头表面元素组成变化, 并使用倏逝波全光纤免疫传感器对修饰后探头的非特异性吸附性、反应活性及再生性能进行了研究.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

所有试剂均为分析纯以上. 3-巯基丙基三甲氧基硅烷(MTS, Fluka, 瑞士); *N*-琥珀酰亚胺基-4-马来酰亚胺-丁酸酯 [*N*-(4-Maleimidobutyryloxy)succinimide, GMBS, Fluka]; Cy5.5 (Amersham, 瑞典); Cy5.5 标记的兔抗大鼠 IgG (Chemicon, 美国); OVA (Sigma, 美国); Microcystin-LR (MC-LR, Alexis, 产品号 ALX-350-012); 二甲亚砜(DMSO)、浓硫酸、无水乙醇、 H_2O_2 (北京市化学试剂公司); $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液(PBS) ($\text{pH}=7.4$); $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的碳酸钠缓冲溶液($\text{pH}=9$).

$600\text{ }\mu\text{m}$ 石英光纤($\text{NA}=0.22$, 南京春辉), X 射线光电子能谱仪(XPS, PHI Quantera SXM), 超声波清洗仪 (Branson200, 旭阳公司); 倏逝波全光纤免疫传感器(自主研发).

1.2 探头修饰

生物识别元件的修饰是倏逝波荧光免疫传感器研制的关键步骤. 为制备性能良好的光纤探头, 先将待测小分子半抗原 MC-LR(其结构如图 1 所示, M.W. 995.2) 与经戊二醛活化的惰性蛋白分子 OVA 反应制成 MC-LR-OVA 复合物, 将洁净的光纤探头用硅烷化试剂活化, 然后用双功能试剂将复合物连接到光纤探头表面, 修饰路线如图 2 所示.

1.2.1 MC-LR-OVA 的制备

要制备 MC-LR-OVA 复合物, 先要使 MC-LR 获得一个自由的氨基, 以形成 $H_2N\text{-etMC-LR}$ ^[12]. 为此, 将物

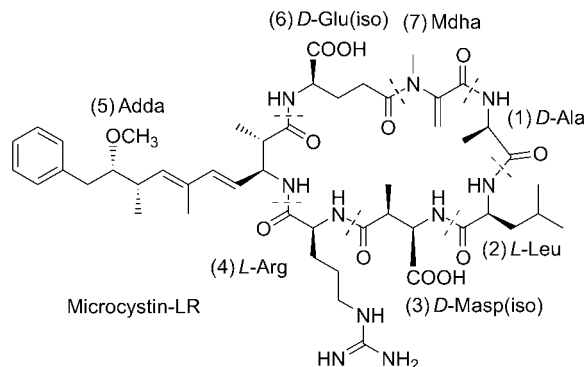


图 1 MC-LR 的分子式

Figure 1 Structural formula of MC-LR

质的量比为 $3000:1$ 的 β -巯基乙胺和 MC-LR 加入 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{pH}=9$ 的碳酸钠缓冲溶液中, 混合物在 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 1 h , 产物用 Bond Elute C_{18} 固相萃取柱纯化. 将惰性蛋白 OVA 与过量的戊二醛反应 $[n(\text{蛋白}):n(\text{戊二醛})=1:500\sim1000]$, 以保证蛋白分子仅与戊二醛的一个醛基结合, 另一个醛基游离; 然后用 Sephadex G-25 层析柱去除多余的戊二醛, 制成活性蛋白(蛋白-戊二醛复合物). 再将约含 0.5 mg MC-LR 的 $H_2N\text{-etMC-LR}$ 加入 3 mL 活性蛋白(约含 3 mg OVA)中, 充分混合后, 室温下反应 24 h . 产物用 Sephadex G-25 色谱柱纯化, 以去除游离的 MC-LR, 并用 MALDI-TOF 进行质谱鉴定.

1.2.2 光纤探头的制备与修饰

由于激发光产生的倏逝波能量较弱, 同时荧光耦合回光纤的效率也很低, 因此有必要采取措施提高倏逝波免疫传感器检测的荧光信号值. 研究者们^[13,14]从理论和实验证明, 采用组合锥型探头可以有效提高检测的荧光信号值. 为得到合适组合锥型探头, 将 11 cm 长的石英光纤去除约 6.5 cm 的涂覆层, 然后将其放入 30% HF 酸中腐蚀适当时间, 以得到所需锥角度的组合型探头, 锥型部分的长度约为 0.5 cm .

配制 piranha 溶液 $[V(\text{浓 } H_2SO_4):V(H_2O_2)]=3:1]$, 将探头浸入其中 30 min ; 然后放入超声波清洗仪中洗涤, 并用超纯水进行充分清洗, 直到清洗液的 pH 值为中性, 最后在室温下用氮气吹干, 保存于真空干燥箱中备用.

为进行免疫分析, 须将抗体或抗原固定到探头表面上^[8,9]. 本研究中先将探头硅烷化, 将洁净的探头放入含 2% MTS 甲苯溶液中反应 2 h . 用甲苯溶液清洗 3 次, 然后放入 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GMBS 乙醇溶液中, 反应 1 h 后用乙醇冲洗 3 次, 再用 PBS 冲洗干净. 最后将硅烷化好的探头放入 $0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ OVA-MC-LR 中反应 2 h , 用 PBS 冲洗后, 放入 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 牛血清白蛋白(BSA)中 30 min 以封闭非特异性吸附位点, 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用.

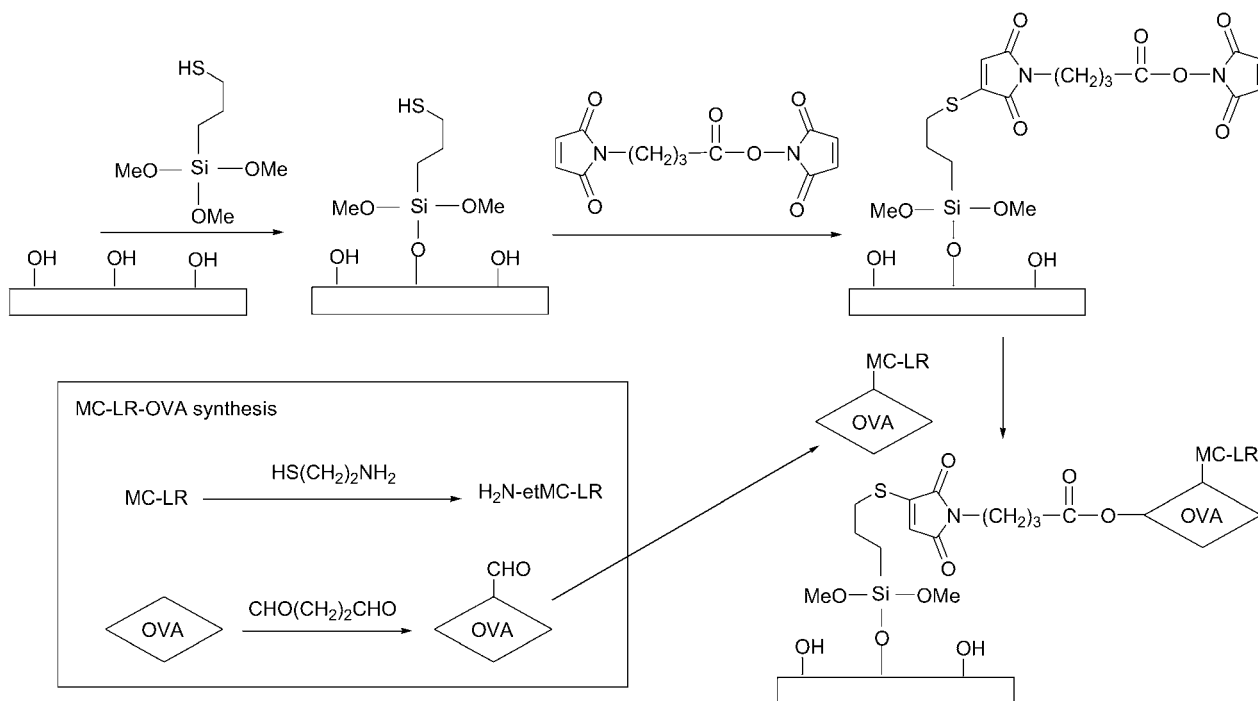


图2 探头表面活化与偶联复合物 MC-LR-OVA 示意图

Figure 2 Schematic of surface activation of probe and MC-LR-OVA immobilization

1.3 探头修饰的表征

1.3.1 X 射线光电子能谱仪

X 射线光电子能谱仪可用于分析固相表面的化学组成, 并得到特定元素的化合态. 本研究中, 不同修饰步骤在石英光纤探头表面分别引入了巯基、氨基等活性基团, 通过检测探头修饰前后表面硫、氮等元素含量的变化, 可以直观地表征修饰前后探头表面活性基团变化情况. XPS 的具体实验条件如下: 仪器型号 PHI Quantera SXM, 采用单色器, 选用 Al 阳极靶, X 射线束 $9\ \mu\text{m}\sim 1.5\ \text{mm}^2$, 能量分辨率 0.5 eV, 灵敏度 $3\times 10^6\ \text{CPS}$, 角度为 45° , 分析室真空度 $6.7\times 10^{-8}\ \text{Pa}$. 吸附碳为 284.8 eV.

1.3.2 倏逝波全光纤免疫传感器(EWAI)

XPS 图谱能很好地显示各步修饰过程的结果, 但对探头上修饰的生物识别分子反应活性、非特异性吸附、再生性等特性如何却无能为力, 而这些特性对目标物检测而言至关重要. 因此, 本研究利用自制的倏逝波全光纤免疫传感器来验证修饰后光纤探头的性能.

自制倏逝波全光纤免疫传感器如图 3 所示.

倏逝波全光纤免疫传感器检测机理如下: 激发光通过激光到光纤耦合器进入单多模光纤耦合器中的单模光纤, 然后经单多模光纤耦合器的多模光纤传输, 进入光纤探头, 在探头表面产生倏逝波, 以激发连接在探头表面上的标记在抗体或抗原上的荧光分子. 由于倏逝波

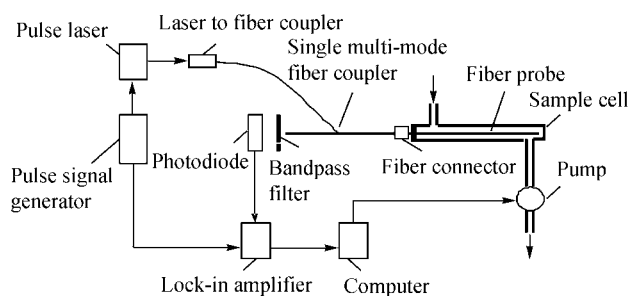


图3 倏逝波全光纤免疫传感器结构示意图

Figure 3 Schematic of evanescent wave all-fiber immunosensor

场的渗入深度只有数十纳米至几百纳米, 所以倏逝波免疫传感器只能探测到位于倏逝波场范围内的荧光分子发出的荧光, 而溶液本体中游离的荧光分子对检测结果几乎没有贡献^[14]. 部分荧光耦合回探头, 通过连接器进入单多模光纤耦合器的多模光纤, 在其另一端射出. 荧光滤光片滤除反射的或迷失的激发光, 而使大部分荧光透过, 采集的荧光信号经转换分析, 即可以得到探头表面上的物质信息.

为考察修饰后探头的非特异性吸附性能, 将修饰好的探头置于反应池中, 打开激光, 然后将 $30\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cy5.5 标记大鼠 IgG 输入样品池, 测定其响应信号. 同时, 为考察修饰后探头的特异性反应性能, 将浓度为 0.6, 0.3, 0.15, 0.06, 0.03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标记 Cy5.5 荧光分子的 MC-LR 抗体 8C10 分别输入样品池, 测定其响应信号.

为考察探头的再生性能, 将浓度为 $0.15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标记抗体以 $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 输入反应池, 时间为 2 min, 再继续反应 6 min 后, 用 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胃蛋白酶溶液($\text{pH}=1.9$)以同样流速输入样品池, 冲洗 4 min, 然后用乙氰、丙酸和水(体积比 50:1:50)混合液冲洗 20 s, 最后用 PBST 冲洗 2 min. 为彻底将结合的抗体从探头表面去除, 重复 1 次上述过程.

2 结果与讨论

2.1 复合物 MC-LR-OVA 的鉴定

活化后的 OVA 及其与 $\text{H}_2\text{N-etMC-LR}$ 反应后的产物 MC-LR-OVA 由 MALDI-TOF 进行测定. 从测定结果可知, 活化 OVA (OVA-戊二醛)平均半离子峰为 30107; 复合物 MC-LR-OVA 平均半离子峰为 31173, 而 OVA 的平均半离子峰为 28041. 由此说明 MC-LR 被成功偶联到惰性蛋白分子 OVA 上, 且因 2-巯基乙胺与 MC-LR 反应后, 生成的 $\text{H}_2\text{N-etMC-LR}$ 的分子量约为 1072^[12], 故每个 OVA 分子平均偶联上的 MC-LR 数量约为 2.

2.2 X 射线光电子能谱分析

光纤探头经腐蚀清洗、硅烷化、连接双功能试剂及修饰 MC-LR-OVA 等步骤后的 XPS 图谱数据见表 1.

从表 1 中可以看出石英光纤探头在经 HF 酸腐蚀及各步清洗后, 表面除了 Si、O 和吸附的 C 元素外, 基本上没有其它元素. 当探头经硅烷化试剂 MTS 硅烷化 2 h 后, 由于 MTS 分子上带有巯基, 从 XPS 图谱上可以清楚地看到硫元素的存在, 其比例为 1.24%, 说明硅烷化试剂已与光纤探头表面的羟基结合. 暴露的巯基可与双功能试剂 GMBS 的马来酰亚胺双键反应, 将双功能试剂键合到探头表面上. 而 GMBS 的琥珀酰酐则可与蛋白分子表面的氨基反应, 从而将蛋白固定于光纤表面. 由于 GMBS 本身含两个氮原子, 因此在结合了双功能试剂的探头表面 XPS 图谱上可见氮元素的存在. 为使光纤探头具有生物识别功能, 需要在其表面连接生物识别分子

(如抗体或抗原). 本研究是将 MC-LR-OVA 复合物通过双功能试剂连接到探头表面, 以得到具有生物识别功能的探头. 从表 1 中可以看出, 由于有蛋白质的存在, 探头表面的氮元素的含量显著增加, 由 0.45% 提高到 2.22%, 这充分证明 MC-LR-OVA 已很好地修饰到光纤探头表面.

2.3 倏逝波全光纤免疫传感器

2.3.1 反应活性与非特异吸附性

当把 Cy5.5 标记的大鼠 IgG 和不同浓度 Cy5.5 标记的 MC-LR 抗体溶液分别输入样品池时, 得到的曲线如图 4 所示.

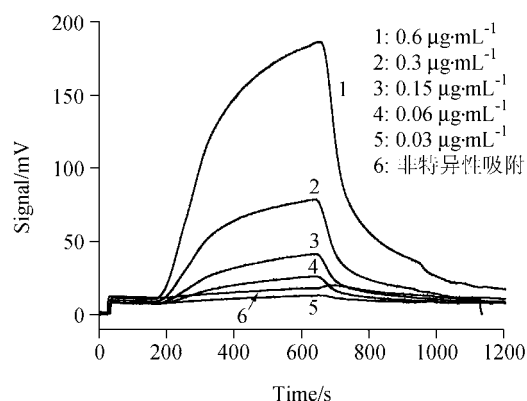


图 4 特异性反应与非特异性吸附响应曲线

Figure 4 Response of specific reaction and non-specific adsorption

从图 4 可以看出, 随着标记 MC-LR 抗体浓度的提高, 所检测的荧光信号逐渐增强. 荧光信号值与检测范围内的标记抗体浓度具有很好的线性关系. 虽然 Cy5.5 标记的大鼠 IgG 的浓度比浓度最高的 MC-LR 抗体还高数十倍, 但其检测信号很低. 这是由于虽然标记的大鼠 IgG 浓度较高, 但其并不能通过特异性反应与探头表面的生物分子结合, 而只能通过非特异性吸附吸附到光纤探头表面上, 而倏逝波仅能激发位于其渗入深度的荧光分子发出荧光, 溶液本体中的游离荧光分子对检测信号

表 1 探头修饰的 XPS 结果

Table 1 XPS results of the probe modified

探头修饰步骤	原子百分数与结合能	C _{1s}	O _{1s}	Si _{2p}	S _{2p}	N _{1s}
腐蚀清洗后	Atom/%	15.72	58.04	26.24	0	0
	B.E./eV	284.71	530.75	101.56	NA ^a	NA ^a
硅烷化	Atom/%	17.02	55.73	26.01	1.24	0
	B.E./eV	284.82	530.87	101.62	167.75	NA ^a
双功能试剂	Atom/%	26.17	49.59	23.27	0.52	0.45
	B.E./eV	284.70	530.80	101.60	167.78	398.70
包被抗原	Atom/%	51.73	30.07	15.79	0.19	2.22
	B.E./eV	284.67	530.78	101.53	167.70	398.82

^a NA: No absorption was detected.

几乎不会产生影响^[14],从而证实本研究修饰的探头经BSA封闭后其非特异性吸附很弱.另一方面,当标记MC-LR抗体浓度低至 $0.03\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,仍然有明显的响应信号,表面研究中的修饰方法修饰的探头具有很好的反应活性,复合物中MC-LR分子暴露充分,能与其抗体的亲合位点很好结合.

2.3.2 探头的再生性能

再生性能是决定探头修饰方法好坏的重要指标,使用具备良好再生性能的探头在检测过程中可以有效减少因使用不同探头而造成差异性.图5为探头进行为期一周上百次检测后的再生性能曲线.

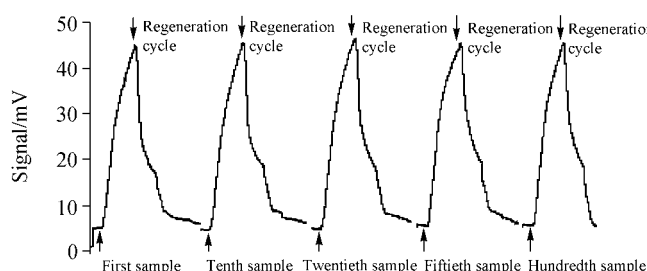


图5 探头重复使用时的再生性能曲线

Figure 5 Representation of the EWA response curves for immunoreaction at different regeneration cycles

从图5可以看出,将复合物MC-LR-OVA连接到探头表面,虽然再生条件比较激烈,但在连续使用一周,进行上百次检测后,探头仍然保持了良好的反应活性,使用同样浓度的标记抗体,检测信号没有明显下降.这表明本研究的修饰方法与固定抗体法相比具有明显的优势,后者在再生过程中常常由于抗体性质受到影响,而使得检测信号逐渐下降,重复使用最多不超过20次^[15],限制了其在实际检测中的应用.因此,本研究采用的探头修饰方案将适用于环境小分子污染物的检测.

3 结论

采用先将小分子污染物MC-LR与活化后的惰性蛋白OVA结合制备成MC-LR-OVA,然后将该复合物通过双功能试剂连接到硅烷化后的光纤探头表面上,修饰前后的探头采用XPS进行表征,结果表明,修饰后探头表面化学元素组成随不同修饰步骤发生了显著的变化,

复合物被成功修饰到光纤探头.

利用自行研发的倏逝波全光纤免疫传感器进一步验证了探头的修饰效果.结果表明,光纤探头对MC-LR表现出强烈的特异性响应,对其它抗体蛋白的非特异性吸附很弱,并且具有良好的再生性能.因此,本研究的修饰方案适用于倏逝波光纤免疫传感器探头的制备,在小分子污染物检测领域具有很好的应用前景.

References

- 1 Rabbany, S. Y.; Donner, B.-L.; Ligler, F.-S. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **1994**, 22(5~6), 307.
- 2 Slovacek, R.-E.; Furlong, S.-C.; Love, W.-F. *Sens. Actuators. B* **1993**, 11(1~3), 307.
- 3 Jung, C.-C.; Saaski, E.-W.; McCrae, D.-A.; Lingerfelt, B.-M.; Anderson, G.-P. *IEEE Sensors J.* **2003**, 3(4), 352.
- 4 Van Bergen, S.-K.; Bakaltcheva, I.-B.; Lundgren, J.-S.; Shriver-Lake, L.-C. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 704.
- 5 Lim, D.-V. *Proc. IEEE* **2003**, 91(6), 902.
- 6 González-Martínez, M.-A.; Puchades, R.; Maquieira, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 387, 205.
- 7 Tschmelak, J.; Proll, G.; Gauglitz, G. *Talanta* **2005**, 65, 313.
- 8 Bhatia, S.-K.; Shriver-Lake, L.-C.; Prior, K.-J.; Georger, J.-H.; Calvert, J.-M.; Bredehorst, R.; Ligler, F.-S. *Anal. Biochem.* **1989**, 178, 408.
- 9 Shriver-Lake, L.-C.; Donner, B.; Edelstein, R.; Breslin, K.; Bhatia, S.-K.; Ligler, F.-S. *Biosens. Bioelectron.* **1997**, 12(11), 1101.
- 10 Li, X.-L.; Yuan, R.; Chai, Y.-Q.; Zhu, Q.; Zhang, L.-Y.; Wang, N. *Acta Chim. Sinica* **2006**, 64, 325 (in Chinese). (黎雪莲, 袁若, 柴雅琴, 朱强, 张凌燕, 王娜, 化学学报, **2006**, 64, 325.)
- 11 Mauriz, E.; Calle, A.; Manclús, J.-J.; Montoya, A.; Hildebrandt, A.; Barceló, D.; Lechuga, L.-M. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22(7), 1410.
- 12 Sheng, J.-W.; He, M.; Shi, H.-C.; Qian, Y. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 572, 309.
- 13 Nath, N.; Anand, S. *Opt. Eng.* **1998**, 37(1), 220.
- 14 Golden, J.-P.; Shriver-Lake, L.-C.; Anderson, G.-P. *Opt. Eng.* **1992**, 31(7), 1458.
- 15 Shriver-Lake, L.-C.; Breslin, K.-A.; Charles, P.-T.; Conrad, D.-W.; Golden, J.-P.; Ligler, F.-S. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2431.

(A0705283 QIN, X. Q.; DONG, H. Z.)