

pH 和铜离子对微囊藻毒素-LR 荧光免疫检测的影响与消除

龙峰, 施汉昌, 朱安娜, 何苗

(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: 研究了 pH 和铜离子对倏逝波全光纤免疫传感器检测微囊藻毒素-LR(MG-LR)的影响及其消除措施. 研究表明, 过酸或过碱条件对 MG-LR 免疫检测均有较强烈的影响, 当 $\text{pH} < 6$ 或 $\text{pH} > 8$ 时, 系统检测的信号随 pH 的降低或增大明显下降; 而当 pH 在 6~8 之间时, 检测标准曲线的 IC_{50} 为 $1.01 \sim 1.04 \mu\text{g/L}$, 检测区间在 $0.12 \sim 10.5 \mu\text{g/L}$ 之间, 较适合 MG-LR 的检测. 低浓度铜离子对 MG-LR 免疫检测的影响不大, 当 CuSO_4 浓度 $> 5 \text{ mg/L}$ 时, 系统检测荧光信号明显下降, 而当 CuSO_4 浓度达到 10 mg/L 时, 系统检测信号下降 70% 以上. 在预反应混合物中添加 1% 的螯合剂 EDTA, 能有效抑制铜离子对免疫检测的影响.

关键词: 微囊藻毒素-LR; 铜离子; 荧光免疫检测; 倏逝波; 光纤免疫传感器

中图分类号: X830 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)07-1974-04

Effects of pH and Cu^{2+} on the Detection of the Microcystin-LR Based on Fluorescence Immunoassay and Their Elimination

LONG Feng, SHI Han-chang, ZHU An-na, HE Miao

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

Abstract: The effects of pH and Cu^{2+} on the detection of the Microcystin-LR based on evanescent wave all-fiber immunosensor (EWAI) and their elimination were studied. The experimental results indicated that both low pH and high pH greatly affected the immunoassay results of MG-LR. When pH was less than 6 or higher than 8, the fluorescence signals detected by immunosensor system obviously reduced with the decrease or increase of pH. While pH ranged from 6 to 8, IC_{50} and the linear working range of MG-LR calculated from the calibration curve were $1.01 \sim 1.04 \mu\text{g/L}$ and $0.12 \sim 10.5 \mu\text{g/L}$, respectively, which was favourable for MG-LR immunoassay. Low concentration Cu^{2+} rarely affected the detection performance of MG-LR. When the concentration of CuSO_4 was higher than 5 mg/L , the fluorescence signal detected by EWAI clearly decreased. Furthermore, when the concentration of CuSO_4 equalled to 10 mg/L , the fluorescence signal detected reduced 70%. The influence of Cu^{2+} on the immunoassay could effectively be compromised when 1% EDTA was added to the pre-reaction mixture.

Key words: microcystin-LR; Cu^{2+} ; fluorescence immunoassay; evanescent wave; fiber-optic immunosensor

基质效应是荧光免疫传感器应用于实际样品检测中所面临的重要问题. 所谓的基质效应是指样品中除分析物以外的其它成分对分析物测定值的影响或基质对分析方法准确测定分析物能力的干扰^[1,2], 如 pH、温度、重金属离子、颗粒物、有机物等. 在使用荧光免疫传感器进行环境水样检测过程中, 由于水体基质成分复杂, 对免疫检测将产生不同程度的影响, 但目前对这方面的研究还鲜见报道^[3~5].

本研究以微囊藻毒素-LR(microcystin-LR, MG-LR)为检测对象, 探讨 pH 和重金属离子等因素对荧光免疫检测的影响. MG-LR 是富营养化水体中最普遍、急性毒性最强的一种藻毒素. 文献[6, 7]均将其限制浓度定为 $1 \mu\text{g/L}$. 由于富营养化水体往往含有多种重金属, 如汞、铜、锌、铅、镉、铬等. 这类金属在水环境中的环境行为表现出价态变化多、配位络合能力强、生物毒性效应明显等特点, 可能使一些蛋白

质及酶的活性降低; 某些溶解性的有机物如蛋白、氨基酸等也可以作为重金属离子的配位体, 与重金属离子结合在一起. 因此, 水体中存在的重金属离子将不可避免地对抗荧光免疫检测产生一定的影响.

硫酸铜溶液常用来做除藻剂, 在富营养化水体中可能含量较多, 因此, 本研究选用铜离子作为重金属离子的代表, 利用自行研制的倏逝波全光纤免疫传感器, 考察不同铜离子浓度对抗荧光免疫检测的影响及其消除措施. 另一方面, 也研究了 pH 值对抗倏逝波全光纤免疫传感器检测 MG-LR 的影响.

收稿日期: 2008-08-04; 修订日期: 2008-10-20

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)青年基金项目(2005AA641040)

作者简介: 龙峰(1972~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境监测. E-mail: longf04@mails.thu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 实验材料

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); 胃蛋白酶、OVA (Sigma, 美国); Microstain-LR (MG-LR, Alexis, 产品号 ALX-350-012); 二甲亚砜(DMSO)、浓硫酸、无水乙醇、 H_2O_2 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、盐酸(1:1)、氢氧化钠、乙氰、丙酸(北京市化学试剂公司); 0.01 mol/L PBS 缓冲溶液(1×PBS, pH=7.4); 0.1 mol/L 的碳酸钠缓冲溶液(pH=9); OVA-MG-LR、Cy5.5 标记的抗 MG-LR 单克隆抗体(MC8C10)(自行制备)。

600 μm 石英光纤(数值孔径 NA=0.22, 南京春辉), 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)。

1.1.2 倏逝波全光纤免疫传感器

倏逝波全光纤免疫传感器如图 1 所示。

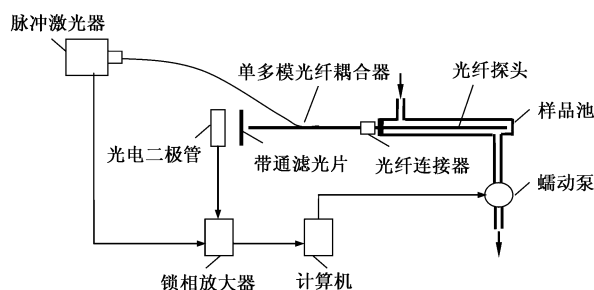


图 1 倏逝波全光纤免疫传感器结构示意图

Fig. 1 Schematic of evanescent wave all-fiber immunosensor

倏逝波全光纤免疫传感器检测机制如下: 激发光经过单多模光纤耦合器中的单模光纤进入单多模光纤耦合器的多模光纤, 然后进入光纤探头并以全反射方式传播, 在探头表面产生倏逝波。倏逝波激发结合到探头表面的抗体或抗原上标记的荧光分子发出荧光。由于倏逝波场的渗入深度只有数十 nm 至几百 nm, 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^[8]。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, 结合免疫检测原理即可得到待测目标物的浓度^[9]。

1.2 实验方法

1.2.1 光纤探头的制备与修饰

配制 piranha 溶液(浓 H_2SO_4 : H_2O_2 = 3:1, 体积比), 将组合锥型石英光纤探头浸入其中 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^[10,11]。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 mol/L 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 mg/mL OVA-MG-LR 中反应 2 h, 用 PBS 冲洗后, 放入 2 mg/mL BSA 中 30 min 以封闭非特异性吸附位点, 在 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 倏逝波全光纤免疫传感器的检测

为使用倏逝波全光纤免疫传感器对待测物进行检测, 将修饰好的探头置于反应池中, 打开激光, 然后将待测样品用蠕动泵以 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ 输入反应池, 时间为 2 min, 再继续反应 6 min 后, 测定其响应信号。为再生探头, 用 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胃蛋白酶溶液(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(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, 重复一次上述过程。再生后的探头可以进行下一次的检测。

1.2.3 pH 对 EWAI 检测 MG-LR 的影响

过高或过低的 pH 值不仅可能影响抗体蛋白的活性, 而且也能影响抗原抗体的结合状况, 从而对免疫检测结果造成影响。为考察不同 pH 条件对系统检测 MG-LR 的影响, 将 1×PBS 溶液分别用 1 mol/L HCl 和 NaOH 溶液配制成 pH 值为 3、5、6、7、8、9、11 的溶液。用不同 pH 值 PBS 溶液将 MG-LR 储备液分别配制成 0.002、0.02、0.2、2、6、20、60、200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 8 种浓度的标准样品。然后将标记抗体储备液分别用不同 pH 值 PBS 溶液配制成 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准液。再将等量的标记抗体溶液和 MG-LR 标准溶液混合后, 室温下预反应 10 min 后输入样品池进行检测。

每个浓度的溶液采用 2 个平行, 每次检测完后, 用再生液再生, 然后再进行下一次检测。取各浓度下的检测曲线以反应 8 min 后的信号值作为基准值, 绘制检测曲线。

1.2.4 铜离子对EWAI检测MG-LR的影响与消除

当用硫酸铜溶液来作为除藻剂时,其投加量一般为1~4 mg/L,因此,本研究考察的硫酸铜浓度范围为0~10 mg/L.为考察不同铜离子浓度对系统检测的影响,称取1.00 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,溶解于10 mL纯水中,配制100 g/L的硫酸铜贮备液.用纯水将配制的硫酸铜溶液稀释为10、5、1、0.1 mg/L,以纯水为空白样.然后将MG-LR储备液分别用不同浓度硫酸铜溶液配制成0.002、0.02、0.2、2、6、20、60、200 $\mu\text{g/L}$ 共8种浓度的标准样品.再将标记抗体储备液分别用不同浓度硫酸铜溶液配制成0.6 $\mu\text{g/mL}$ 标准液.最后将等量的标记抗体溶液和MG-LR标准溶液混合后,室温下预反应10min后输入样品池进行检测.

每个浓度的溶液采用2个平行,每次检测完后,用再生液再生,然后再进行下一次检测.取各浓度下的检测曲线在反应8 min后的信号值作为基准值,绘制检测曲线.

当硫酸铜浓度较高时,对样品检测影响较大时,采用含1% EDTA的10×PBS缓冲液对抗体进行稀释,重复上述试验,以测定对硫酸铜影响的控制或消除.

2 结果与讨论

2.1 pH对检测结果的影响

不同pH值条件下的标准曲线如图2所示.从中可以看出,当pH在6~8之间时,其对检测标准曲线的影响不大,3条曲线的 IC_{50} 分别为1.01、1.03和1.04 $\mu\text{g/L}$;检测区间为0.14~10.1、0.16~10.5和0.12~9.8 $\mu\text{g/L}$.而过酸或过碱条件对免疫反应均有较强烈的影响,当 $\text{pH} < 6$ 或 $\text{pH} > 8$ 时,系统检测的信号随pH的降低或增大明显下降,特别是当pH为11.0,系统几乎检测不到荧光信号,一方面说明碱性条件对抗原抗体结合非常不利,另一方面也可验证,本研究修饰的探头非特异性吸附很小,系统的检测信号不可能是由于杂散光引起的.

抗原抗体之间结合为弱相互作用,其氢键结合力以及离子化抗体配位受体受pH值影响较大,另一方面pH值可能影响抗原和抗体的分子结构,因此pH过高或过低都将不利于目标物的检测.实验结果表明,pH值接近中性或动物体液环境时($\text{pH} = 7.4$),最利于抗原抗体的结合反应.

因此,在实际样品检测过程中,如果样品的pH过高或过低,可以考虑使用较高浓度缓冲溶液(如5

×PBS或10×PBS)来配制样品,以消除pH值对检测结果的影响.

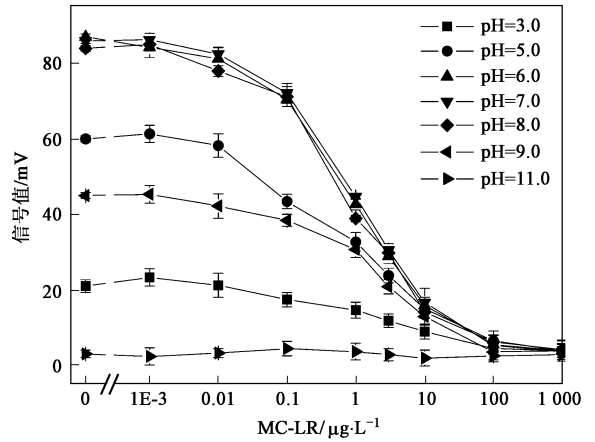


图2 不同pH值条件下的EWAI检测信号曲线

Fig. 2 Response signs of the EWAI for immunoreaction at different pH

2.2 铜离子对检测结果的影响与消除

本研究采用铜离子来作为重金属离子的代表,测定其对免疫检测的影响.不同浓度的硫酸铜溶液条件下EWAI检测信号曲线如图3所示,实验表明,当 CuSO_4 浓度 $< 1 \text{ mg/L}$ 时,其对系统检测MG-LR的影响不大,而当 CuSO_4 浓度 $> 5 \text{ mg/L}$ 时,对检测信号有明显影响.当 CuSO_4 浓度为5 mg/L时,系统检测的最大信号下降一半多,而当 CuSO_4 浓度达到10 mg/L时,系统检测信号下降70%以上,说明高浓度铜离子对荧光免疫检测影响非常大,此时的检测结果已严重偏离正常值,因此为得到较好的结果,有必要采取措施消除高浓度铜离子的影响.

为了降低样品中铜离子浓度带来的影响,本研究在抗体的稀释液中添加了1%的螯合剂EDTA,实

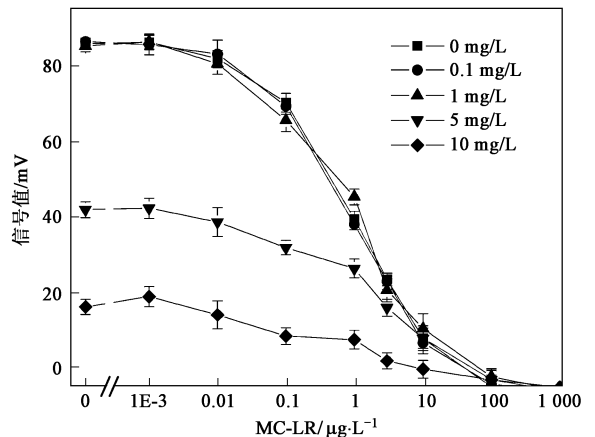
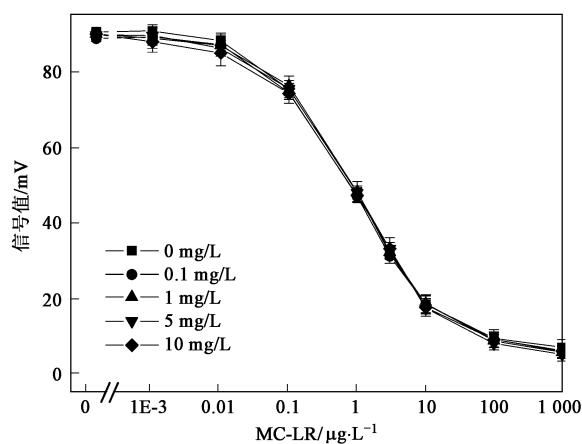


图3 不同 CuSO_4 浓度下EWAI检测信号曲线

Fig. 3 Response signs of the EWAI for immunoreaction at different concentrations of CuSO_4

验结果如图 4 所示. 结果表明, 此时铜离子对荧光免疫检测的影响明显地受到抑制. 各检测信号曲线的一致性较好, 最大信号值和半抑制浓度都没有明显变化. 这也从另一个侧面说明, 导致荧光免疫检测信号的降低因素除了铜离子对抗体蛋白的毒性作用外, 铜离子与抗体蛋白发生络合反应也可能是导致抗体蛋白活性降低重要原因之一.

总之, 检测体系加入一定量的 EDTA 后, 在常用除藻剂浓度范围内硫酸铜将不会对 EWAI 检测构成明显的影响. 另一方面, 即使在没有铜离子存在的情况下, 在溶液中加入 EDTA 也不会对检测产生影响.



抗体稀释液含 2% EDTA

图 4 不同 CuSO_4 浓度下 EWAI 检测曲线

Fig. 4 Response signs of the EWAI for immunoreaction at different concentrations of CuSO_4

3 结论

以 MG-LR 为检测对象, 研究了 pH 和铜离子对倏逝波全光纤免疫传感器免疫分析的影响. 过酸或过碱条件对 MG-LR 免疫检测均有较强烈的影响, 当 $\text{pH} < 6$ 或 $\text{pH} > 8$ 时, 系统检测的信号随 pH 的降低或增大明显下降. 为降低 pH 对检测的影响, 可考

虑在高浓度的缓冲溶液体系下进行检测. 另一方面, 低铜浓度离子对荧光免疫检测的影响不大, 当 CuSO_4 浓度 $> 5 \text{ mg/L}$ 时, 系统检测荧光信号明显下降, 而当 CuSO_4 浓度达到 10 mg/L 时, 系统检测信号下降 70% 以上. 在预反应混合物中添加 1% 的螯合剂 EDTA, 能有效抑制铜离子对免疫检测的影响.

参考文献:

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of Matrix Effects; Approved Guideline-Second Edition, CLSI document EP14-A2 [J]. CLSI, Wayne, PA, USA, 2005, **21**(3): 1-21.
- [2] Kroll M H, Elin R J. Interference with clinical laboratory analyses [J]. Clin Chem, 1994, **40**(11): 1996-2005.
- [3] González-Martínez M A, Puchades R, Maquieira A. Optical immunosensors for environmental monitoring: How far have we come? [J]. Anal Bioanal Chem, 2007, **387**: 205-218.
- [4] Gascón J, Oubiña A, Onnerjord P, et al. Performance of two immunoassays for the determination of atrazine in sea water samples as compared with on-line solid phase extraction-liquid chromatography-diode array detection [J]. Anal Chim Acta, 1996, **330**: 41-51.
- [5] Shama S K, Goloubinoff P, Christen P. Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, **372**: 341-345.
- [6] World Health Organization. Guidelines for Drinking Water Quality [M]. (Third Edition). Vol. 1, Geneva: WHO, 2004.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 生活饮用水卫生标准[M]. 北京: 中华人民共和国卫生部卫生监督与监督司, 2006.
- [8] Long F, He M, Shi H C, et al. Development of evanescent wave all-fiber immunosensor for environmental water analysis [J]. Biosens Bioelectron, 2008, **23**: 952-958.
- [9] Golden J P, Shriver-Lake L C, Anderson G P, et al. Fluorometer and tapered fiber optic probes for sensing in the evanescent wave [J]. Opt Eng, 1992, **31**: 1458-1462.
- [10] Bhatia S K, Shriver-Lake L C, Prior K J, et al. Use of thiol-terminated silanes and heterobifunctional crosslinkers for immobilization of antibodies on silica surfaces [J]. Anal Biochem, 1989, **178**: 408-413.
- [11] Shriver-Lake L C, Donner B L, Ligler F S. On-Site detection of TNT with a portable fiber optic biosensor [J]. Environ Sci Technol, 1997, **31**: 837-841.