

用于 1,3-二硝基苯快速检测的免疫传感器研究

龙峰¹, 施汉昌^{2,3}, 王洪臣¹, 盛建武²

(1. 中国人民大学环境学院, 北京 100872; 2. 清华大学环境学院, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084; 3. 水污染控制先进技术与装备协同创新中心, 南京 210093)

摘要: 利用倏逝波全光纤生物传感平台, 发展了一种用于 1,3-二硝基苯快速检测的免疫传感器, 其检测限可达 $0.054 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 检测时间少于 10 min. 采用先将小分子污染物与惰性蛋白 OVA 结合制备成复合物, 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作为生物识别元件, 使得传感器具有良好的鲁棒性和再生性能, 可以重复使用上百次, 而且没有明显的活性损失. 实际水样的加标回收实验表明, 所有样品的加标回收率在 80% ~ 120% 之间, 相对标准偏差为 4.5% ~ 10.0%, 具有很好的精密度和准确性, 受环境基质的影响较小, 因此, 该免疫传感器能够用于实际水样中 1,3-二硝基苯的快速检测.

关键词: 1,3-二硝基苯; 倏逝波; 光纤传感器; 免疫分析

中图分类号: X830.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2014)04-1561-05 DOI: 10.13227/j.hjxx.2014.04.052

Immunosensor for Rapid Detection of 1,3-Dinitrobenzene

LONG Feng¹, SHI Han-chang^{2,3}, WANG Hong-chen¹, SHENG Jian-wu²

(1. School of Environment and Natural Resources, Renmin University of China, Beijing 100872, China; 2. State Key Joint Laboratory of Environmental Simulate and Pollution Control, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 3. Collaborative Innovation Center for Advanced Water Pollution Control Technology and Equipment, Nanjing 210093, China)

Abstract: An immunosensor for the rapid detection of 1,3-dinitrobenzene was developed based on an evanescent wave all-fiber biosensing platform with the detection limits of $0.054 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and the detection cycle was less than 10 min. Hapten-carrier conjugates NB-OVA were synthesized by mixing 4-nitrohippuric acid and OVA activated by EDC, and then the conjugates were immobilized onto the silane layer on the probe with a heterobifunctional crosslinker. The probe modified had good robustness and regeneration performance, which allowed the performance of more than 100 assay cycles without significant loss of reactivity. Several water samples of different origins were measured with less than 4.5%–10.0% deviation of the detection and the recovery rate of 1,3-dinitrobenzene was between 80% and 120%, which proved the system's precision and accuracy and negligible matrix effects. This immunosensor shows great potential in rapid detection of 1,3-dinitrobenzene in practical waters.

Key words: 1,3-dinitrobenzene; evanescent wave; fiber optic immunosensor; immunoassay

硝基苯类化合物广泛用于医药、农药、炸药、染料、造纸、纺织等工业领域, 主要用来生产染料、农药、香料、炸药等^[1-3]. 该类化合物是高毒性的物质, 通过呼吸道及皮肤侵入人体后, 可引起腹痛、腹泻、头痛、头昏、气促及神经系统症状, 并具有较强的致癌、致突变性^[3-5]. 因此, 硝基苯被列为美国饮用水中检出的有机污染物及 EPA 制订的“优先污染物”之一^[5], 也被列入我国环境优先污染物“黑名单”^[6], 并被列为常规检测指标. 硝基苯类化合物结构稳定、种类繁多, 其超标排放或者事故排放均可能造成严重的环境污染并难以降解. 如 2005 年我国吉林省吉林市的中国石油吉林石化公司双苯厂发生爆炸, 造成大量的苯类污染物进入松花江, 给下游城市带来严重的“水危机”. 其中主要污染物就包括多种硝基苯类化合物. 目前, 硝基苯类化合物的常规检测方法包括高效液相色谱、气相色谱等^[7,8], 虽然检测灵敏度高, 但其前处理复杂、分析时间长, 不能

满足污染事故发生后对其主要污染物进行快速定性和定量检测要求. 因此, 发展便携式快速检测仪器已成为必然趋势.

本研究以前期研发的倏逝波全光纤生物传感平台为基础^[9], 采用固定小分子包被抗原的光纤探头作为敏感元件, 发展了基于倏逝波荧光分析和间接竞争免疫检测原理的 1,3-二硝基苯检测免疫分析方法. 该方法具有检测快速、费用低廉、再生性能良好等特点, 以期在日常水质检测提供一种可靠的定量分析手段.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

所有试剂均为分析纯或更好. 3-巯基丙基三甲

收稿日期: 2013-08-25; 修订日期: 2013-10-18

基金项目: 中国人民大学明德青年计划项目 (13XNLJ01)

作者简介: 龙峰 (1972 ~), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为环境监测与生物传感器. E-mail: longf04@ruc.edu.cn

氧基硅烷 (MTS , Fluka , 瑞士); *N*-(4-Maleimidobutyryloxy) succinimide (GMBS , Fluka); Cy5.5 (Amersham , 瑞典); 4-硝基苯马尿酸 (4-nitrohippuric acid)、EDC 及 1,3-二硝基苯购自 Sigma-Aldrich (Steinheim , 德国) . 除特殊说明外 , 其它所有试剂均购自北京化学试剂公司 .

抗硝基苯抗体 (编号 : NB4X18) 由课题组自行研发 , 并用 Cy5.5 标记 . 硝基苯包被抗原 NB-OVA 复合物制备方法如下 : 将 101 mg 4-硝基苯马尿酸溶解在 10 mL 0.05 mol·L⁻¹ PBS 缓冲溶液中 , 然后加入 35 mg EDC 和 20 mg OVA 在 4℃ 下反应过夜 . 复合物用 Bond Elute C₁₈ 固相萃取柱纯化 . 所得产物在 -20℃ 保存备用 .

1.2 光纤探头的制作、清洗与修饰

配制 piraha 溶液 (浓 H₂SO₄ : H₂O₂ = 3 : 1) , 将探头浸入其中 30 min ; 然后放入超声波清洗机中洗涤 , 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 . 按照文献 [10] 的方法先将探头硅烷化 , 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⁻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 . 为制备免疫传感器 , 将硅烷化好的探头放入 0.06 mg·mL⁻¹ NB-OVA 混合物中反应 2 h . 用 PBS 冲洗后 , 放入 2 mg·mL⁻¹ BSA 溶液中 20 min 以封阻非特异性吸附位点 . 制备好的免疫传感器放在 4℃ 冰箱保存备用 .

1.3 便携式全光纤生物传感平台的构建

本研究采用的便携式倏逝波光纤维生物传感平台如图 1 所示 , 主要包括激光激发光路、荧光接受光路和光纤探头与样品流路 . 在激发光路上 , 以波长为 635 nm、输出功率为 8 mW 的带尾纤半导体脉冲激光器 (BWT Beijing Ltd.) 作为光源 , 激光器发出的激光直接进入单多模光纤耦合器中的单模光纤 , 由于单模光纤只传递一种模式的光 , 可有效地阻止光的损失 . 然后再经单多模光纤耦合器的多模光纤 (NA 为 0.22 , 芯径为 600 μm) 传输 , 经光纤连接器进入光纤探头 , 光纤探头与单多模光纤耦合器的多模光纤为同种光纤 . 激光在探头表面附近区域产生倏逝波 , 激发光纤探头表面连接的抗体或抗原分子上标记的荧光物质 . 系统采用光电二极管检测荧光信号 . 光电二极管将光信号转换成电信号后 , 通过自制的数字锁相放大器滤波放大 . 在该系统中 , 通过利用单

多模光纤耦合器 , 激发光的传输与激发荧光的收集与传输均通过光纤来实现 , 极大地简化了系统的光学结构 , 并且不需要严格的光学定位 .

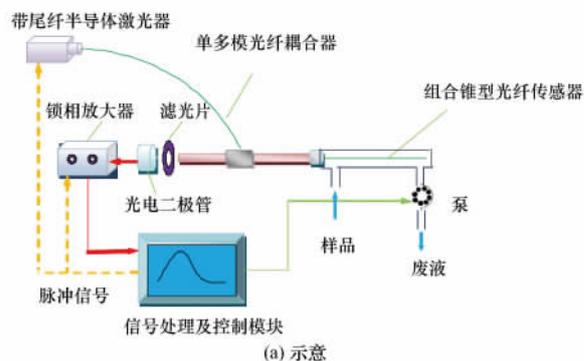


图 1 便携式倏逝波全光纤生物传感平台结构示意图及实物
Fig. 1 Schematic of a portable evanescent wave all-fiber biosensing platform and photo of a biosensing platform

1.4 1,3-二硝基苯的免疫分析

本研究采用间接竞争抑制的方法对 1,3-二硝基苯进行免疫传感分析 . 抗硝基苯抗体浓度为 5 μg·mL⁻¹ NB4X18 (有特殊说明的除外) . 标准溶液是使用 1 × PBS (pH 7.4) 稀释 200 mg·L⁻¹ 1,3-二硝基苯储备液制备而成 . 为检测 1,3-二硝基苯 , 先将 200 μL 荧光标记抗体溶液与不同浓度的 1,3-二硝基苯标准溶液混合 , 混合液反应 5 min (预反应) . 然后将混合液以 200 μg·mL⁻¹ 输入到样品池 , 持续 2 min . 便携式倏逝波全光纤生物传感平台同时记录荧光信号 . 使用 0.5% SDS (pH 1.9) 溶液再生免疫传感器 .

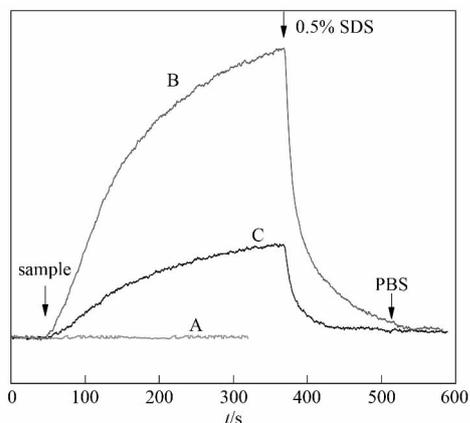
2 结果与讨论

2.1 光纤免疫传感器的性能分析

为评价硝基苯包被抗原的固定效果及确认所得到的荧光信号来自荧光标记抗体和固定的包被抗原特异性亲和反应 , 笔者进行了两个对照实验 , 结果如图 2 所示 . 首先 , 将 5 μg·mL⁻¹ 荧光标记抗微囊藻毒素-LR 抗体泵入样品池 , 系统没有检测到

明显的荧光信号(图 2A 曲线),表明荧光标记抗体不会非特异性吸附到光纤传感器表面.同时,游离的荧光染料对系统检测的荧光信号的贡献也非常少.然后,将 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 荧光标记的硝基苯抗体泵入样品池,可以检测到明显的荧光信号,信噪比(最大荧光值与基线值比)可以达到 8 以上(图 2B 曲线).而当 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 荧光标记的抗体与 $5 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 1,3-二硝基苯混合反应 5 min 后,再加入样品池,系统可以检测到明显的荧光信号(图 2C 曲线),但最大荧光值明显小于未加 1,3-二硝基苯的荧光信号值.这说明部分荧光标记抗体已与 1,3-二硝基苯结合,从而减少了含有自由位的荧光标记抗体浓度,因此系统检测到的荧光信号小.以上结果表明传感器可以高效检测到抗体抗原之间特异性亲和反应.

同时,图 2B 曲线为一条典型完整的倏逝波全光纤生物传感平台检测 1,3-二硝基苯的荧光信号轨迹.从中可以看出,随着免疫反应的进行,信号值也随之增大,清楚显示了标记抗体和探头上固定抗原特异性结合的动态过程.在进样的 2 min 内,系统检测荧光信号快速增大,停止进样后,系统检测荧光信号增幅逐渐回落,并逐渐达到一种平衡状态.通过分析易知,实际荧光信号值为结合的荧光分子被激发的荧光信号与解离的和结合在光纤表面上被漂白的荧光分子失去的荧光信号的叠加.在进样初期,由于抗体溶液在样品池中处于流动状态,标记抗体与探头上固定抗原的结合处于非平衡状态,而且反应



A. $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 荧光标记微囊藻毒素-LR 抗体; B. $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 荧光标记硝基苯抗体; C. $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 硝基苯抗体与 $5 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 1,3-二硝基苯混合物

图 2 倏逝波全光纤生物传感平台检测 1,3-二硝基苯的典型信号轨迹

Fig. 2 A typical fluorescence trace for 1,3-dinitrobenzene detection using an evanescent wave all-fiber biosensing platform

初期标记抗体与探头上固定抗原也处于一个快速反应结合期,因此系统的信号快速增大;当停止进样后,探头上可与标记抗体反应的大部分抗原已与抗体结合,只有部分未结合的抗原将继续与标记抗体反应,因此,系统检测信号的增幅逐渐回落并逐步达到一种平衡状态.当结合到探头表面上的荧光分子被激发的荧光量与解离的和结合在光纤表面上被漂白的荧光量相等时,系统检测的荧光信号值将达到最大值.此时,如继续检测,由于荧光被漂白,系统检测的信号值将逐渐下降.在整个测试过程,始终开启脉冲激光器,因此标记抗体的荧光分子在结合后将一直处于被脉冲激发光激发的状态.在本研究中,为缩短检测周期,取 6 min 时的信号值作为检测的有效信号值,此时的信号值约为最大信号的 85%.实际一个样品的检测周期约为 10 min(包括进样、反应和传感器再生过程).

2.2 1,3-二硝基苯的检测标准曲线

图 3 是使用倏逝波全光纤传感平台检测 1,3-二硝基苯的标准曲线,每个点的值均使用空白值归一化,然后使用四参数 Logistic 方程拟合,拟合曲线方程:

$$y = 0.00648 + 0.988 / [1 + (x/1.993)^{0.8498}] \quad (1)$$

从图 3 中可以看出,曲线呈现明显的反 S 型.误差线为 3 次平行实验的相对标准偏差,变异系数均在 8% 以内,表明系统具有良好的稳定性和可重复性.从图 3 中还可以看出,在间接竞争检测模式下,系统检测到的荧光信号随 1,3-二硝基苯浓度的提高而降低,该系统的检测限(LOD)可达 $0.054 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.定量检测区间为 $0.1 \sim 10 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.虽然本研究仅检测了 1,3-二硝基苯,但由于使用的抗体

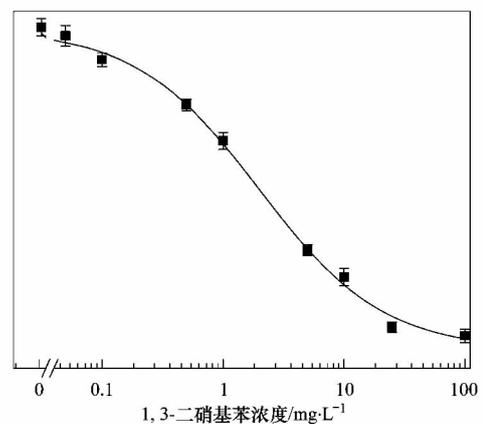


图 3 倏逝波全光纤生物传感平台检测 1,3-二硝基苯的标准曲线

Fig. 3 Dose-response curve of 1,3-dinitrobenzene using an evanescent wave all-fiber biosensing platform

识别部位为苯环及其硝基基团,因此,该系统同样可用于硝基苯及其它二硝基苯的检测。

2.3 探头的再生性能及稳定性

良好的再生与重复使用性能对于免疫传感器的实际应用至关重要^[11]。本研究采用固定包被抗原方法,即先将小分子和惰性蛋白 OVA 合成包被抗原,然后将其作为生物识别分子固定在传感器表面,可以避免识别分子的亲和性能损失。通过大量的实验表明,修饰到传感表面的生物识别分子具有良好的稳定性和反应活性,固定生物识别分子的传感器可以至少使用 100 次以上,而且不会影响传感器的检测性能。在每一次检测完成后,非共价结合的抗体可用 0.5% SDS 溶液 (pH 1.9) 完全去除 (图 2B、图 2C),传感器表面的活性得到再生。

从图 4 中可以看出,当探头保存 3 个月后,系统的检测性能变化不大,其中检测限由原来的 $0.054 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $0.066 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 检测区间由 $0.1 \sim 10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 变为 $0.2 \sim 20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 而 IC_{50} 值变化稍大,由 $2.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $3.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这样的变化并不会对实际应用产生明显的影响,说明本研究修饰的探头具有较好的稳定性。这主要是因为在本研究的修饰过程中,是将抗原复合物修饰到探头上,在保存过程中,虽然抗原复合物中惰性蛋白可能会发生结构变化,但其上结合的小分子半抗原并不会受到影响,因此,在检测过程中,能与标记抗体的活性位点很好地结合,从而使得检测信号不会受到显著影响。如果采用将抗体修饰在光纤探头上,在保

存过程中,由于抗体结构或活性位点受到破坏,则将直接影响系统的检测信号和检测灵敏度。

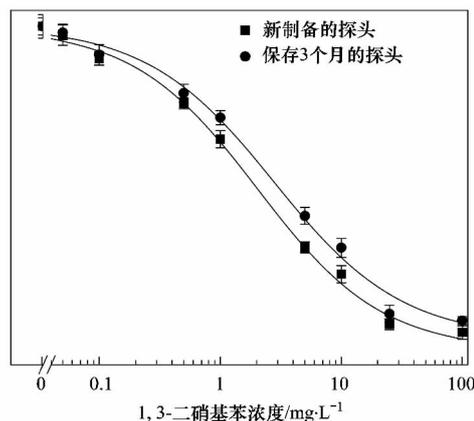


图 4 探头保存的稳定性

Fig. 4 Stability of probes

2.4 加标水样的检测

环境基质对传感分析方法影响是评价新发展的传感器性能又一重要方面^[12]。在本研究中,进行了不同浓度的 1,3-二硝基苯加标回收实验。加标水样包括:实验室自来水、购买的瓶装水及太湖水样。使用 1,3-二硝基苯储备液配制浓度为 0.5 、 1 、 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 加标水样,然后采用上述程序对加标水样进行分析(所有浓度均进行 3 次平行样分析),结果如表 1 所示。所有样品的加标回收率在 $80\% \sim 120\%$ 之间,相对标准偏差为 $4.5\% \sim 10.0\%$ 。这些实验结果表明该传感器具有足够的精密度和准确性,可以用于实际水样的检测。

表 1 实际水样 1,3-二硝基苯加标检测结果¹⁾

Table 1 Detection results of 1,3-dinitrobenzene added in real samples

水源	1,3-二硝基苯加标量 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1,3-二硝基苯检测值(平均值) / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	CV/%	回收率/%
实验室自来水	0.5	0.52	6.1	104
	1	0.89	5.4	89
	5	5.26	7.6	112
太湖水样	0.5	0.49	8.8	98
	1	1.06	9.4	106
	5	5.06	6.3	101
瓶装水	0.5	0.55	4.5	110
	1	1.12	6.1	112
	5	5.23	7.2	105

1) 所有水样于 2012 年 11 月 18 日收集,且没有检测到 2,4-二硝基苯的存在 ($<0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); 所有实验结果为 3 次分析结果的平均值

3 结论

(1) 本研究发展了一种基于倏逝波全光纤生物传感平台的 1,3-二硝基苯快速免疫分析方法,其检测限可达 $0.054 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,检测速度快(10

min)。由于采用固定小分子与惰性蛋白复合物作为生物识别分子,使得传感器具有良好的鲁棒性和再生性能,可以重复使用上百次而没有明显的活性损失。

(2) 加标回收实验结果显示,该传感器具有很好

的精密度和准确性,受环境基质的影响较小,能够用于实际样品 1,3-二硝基苯的快速检测。

参考文献:

- [1] Wang S P, Chen W J. Separation and determination of nitrobenzenes by micellar electrokinetic chromatography and high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, **979**(1-2): 439-446.
- [2] Ni Y, Li W, Kokot S. Simultaneous determination of nitrobenzene and nitro-substituted phenols by differential pulse voltammetry and chemometrics [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, **431**(1): 101-113.
- [3] World Health Organization. Environmental Health Criteria 230 [S]. Nitrobenzene, Geneva, 2003. 1-10.
- [4] James D R, Nigel J B. Electrochemical treatment of 2,4,6-trinitrotoluene and related compounds [J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, **35**(2): 406-410.
- [5] Liang S X, Zhang H K, Lu D. Determination of nitrobenzene in wastewater using a hanging mercury drop electrode [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2007, **129**(1-3): 331-337.
- [6] Majumder P S, Gupta S K. Hybrid reactor for priority pollutant nitrobenzene removal [J]. *Water Research*, 2003, **37**(18): 4331-4336.
- [7] Zhao X K, Yang G P, Gao X C. Studies on the sorption behaviors of nitrobenzene on marine sediments [J]. *Chemosphere*, 2003, **52**(5): 917-925.
- [8] Marple R L, Lacourse W R. Application of photoassisted electrochemical detection to explosive-containing environmental samples [J]. *Analytical Chemistry*, 2005, **77**(20): 6709-6714.
- [9] Long F, He M, Zhu A N, *et al.* Portable optical immunosensor for highly sensitive detection of microcystin-LR in water samples [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, **24**(8): 2346-2351.
- [10] Long F, Shi H C, He M, *et al.* Surface modification and characterization of the probe based on evanescent wave fiber-optic immunosensor [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2008, **66**(4): 454-458.
- [11] Homola J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, **377**(3): 528-539.
- [12] Rodríguez-Mozaz S, Alda M L, Barceló D. Analysis of bisphenol A in natural waters by means of an optical immunosensor [J]. *Water Research*, 2005, **39**(20): 5071-5079.