

无标记快速检测蝇毒磷的表面等离子体共振生物传感器

齐攀^{1,2} 马骁² 钟金钢^{2,3} 李莹^{3*}

¹广东交通职业技术学院电子工程系, 广东 广州 510650

²暨南大学光电工程系, 广东 广州 510632

³暨南大学光电信息与传感技术广东普通高校重点实验室, 广东 广州 510632

摘要 针对现有农药检测方法操作复杂、仪器贵重、不利于现场快速检测等问题,将自行研制的便携式表面等离子体共振生物传感器应用于高毒性农药蝇毒磷的检测,采用直接法检测抗体。提出连续检测法,对质量浓度分别为500、200、100、50、0 μg/L的蝇毒磷小分子样品进行了连续检测实验。通过实验证明了该装置和方法的可行性。基于表面等离子体共振的无标记蝇毒磷检测方法简单,仪器便携,操作简便,可实现现场快速检测。

关键词 表面光学;生物医学信息技术;表面等离子体共振生物传感器;便携式;无标记快速检测;蝇毒磷

中图分类号 TN247 文献标识码 A doi: 10.3788/LOP51.082801

Surface Plasmon Resonance Biosensor for Rapid Unmarked Coumaphos Detection

Qi Pan^{1,2} Ma Xiao² Zhong Jingang^{2,3} Li Ying³

¹Department of Electronic Engineering, Guangdong Communication Polytechnic, Guangzhou, Guangdong 510650, China

²Department of Optoelectronic Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

³Laboratory of Optoelectronic Information and Sensing Technologies of Guangdong Higher Education Institutes, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract The self-developed portable surface plasmon resonance biosensor is used in the detection of highly toxic pesticide coumaphos, as the existing pesticide detection methods are complicated, with precious instrument, and not conducive to on-site rapid detection. The antibody direct detection experiments are conducted; the continuous detection method is proposed and preceded in small coumaphos molecules with concentrations of 500, 200, 100, 50 and 0 μg/L. The validity of this method and the device is demonstrated by experiments. The unmarked coumaphos detection method based on the surface plasmon resonance is simple. The developed device is portable and easy to operate. The rapid and real-time detection can be realized by this method.

Key words optics at surfaces; biomedical information technology; surface plasmon resonance biosensor; portable; unmarked rapid detection; coumaphos

OCIS codes 280.1415; 240.6680; 120.4570

1 引言

有机磷农药(OPP)是一类含有不同取代基团的磷酸酯,通过对乙酰胆碱酯酶的抑制作用起到杀虫效

收稿日期: 2014-02-12; 收到修改稿日期: 2014-03-14; 网络出版日期: 2014-07-18

基金项目: 国家自然科学基金(41206081)、海洋赤潮灾害立体监测技术与应用国家海洋局重点实验室项目(MATHAB20120208)、粤港关键领域重点突破招标项目(2005A20501001)

作者简介: 齐攀(1982—),男,博士,主要从事光电检测技术方面的研究。E-mail: qiqipan@163.com

*通信联系人。E-mail: 916407691@qq.com

本文电子版彩色效果请详见中国光学期刊网 www.opticsjournal.net

果,但是会在农产品中残留,严重威胁人类健康,由此引发的中毒事件时有发生^[1-2]。因此,有机磷农药已被禁止使用,一些国家及国际组织对食品中有机含磷农药的残留规定了严格限量,我国规定蝇毒磷在蔬菜和水果中的残留量低于0.05 mg/kg。传统的农药检测方法有气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术^[3]、高效液相色谱法(HPLC)^[4-5]、酶联免疫技术(ELISA)^[1]等,这些方法的样品前处理过程繁琐,通常需要标记,仪器贵重,操作复杂,不利于快速检测和现场检测^[6-7],因此,开发简单、快速、灵敏和低成本的农药检测方法是一个亟待解决的问题。

基于免疫分析原理的表面等离子体共振(SPR)生物传感器,无需标记、灵敏度高、特异性强、操作简便、样品前处理简单,已被广泛用于药物分析、食品分析、环境监测等众多领域^[8-13]。本研究采用自行开发的便携式SPR生物芯片检测仪,利用免疫反应的特异性,研究高毒性农药蝇毒磷的检测,分析动力学反应过程。与传统农药检测方法相比,该仪器携带方便,操作简便,无需标记,无污染,成本低,可进行现场大量样品的实时连续检测和快速筛选,适用于超市、集市、工厂等需要实时检测的场所。

2 SPR生物传感器原理

基于麦克斯韦电磁波理论的SPR,是一种发生在电介质与金属薄层分界面上的物理光学现象^[14-18]。SPR效应对附着在贵金属膜表面上的电介质的折射率变化非常敏感,而折射率是所有材料的固有特征,使得基于SPR效应的生化分析技术不需要对样品标记,就可通过探测样品折射率的微小变化,实现对样品的生化分析^[19]。

利用SPR进行生化分析实验时,一般还要在传感芯片表面固定一种反应物,使其形成分子敏感膜;然后将含待测物的样品注入传感芯片,传感芯片上分子间相互作用的情况可由SPR信号(共振波长或者共振角)的改变反映出来,并通过计算机软件将整个反应过程显示和记录下来。

SPR传感器检测和芯片再生的过程曲线如图1所示^[20-21],首先在芯片表面通入缓冲液,扫描一段时间后形成稳定的检测基线,然后将含有待分析物的样品注入芯片表面,此时将会引起检测曲线产生一系列相应的变化。分析物在芯片上的吸附达到饱和后,检测曲线稳定,响应值不再变化。若将再生溶液注入芯片,分析物将从芯片表面解离,芯片得到再生,重新回到检测基线,此时可继续对分析物进行检测。

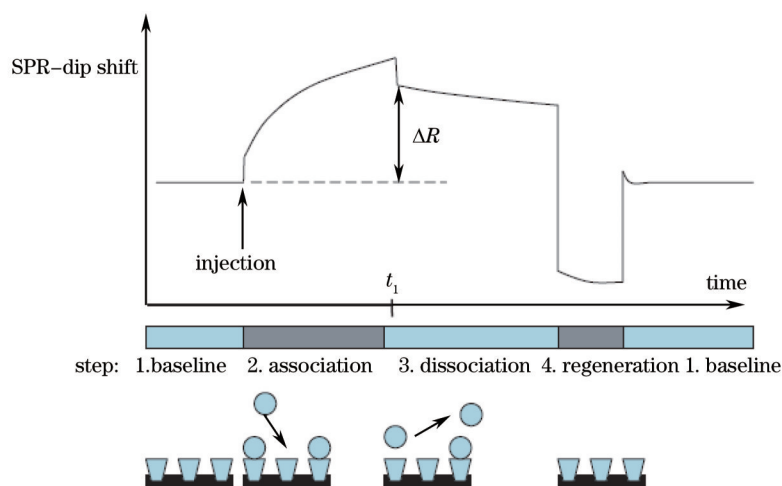


图1 SPR传感器工作过程示意图
Fig.1 Schematic of SPR sensor work process

3 实验部分

3.1 实验系统

实验中使用自行研制的便携式SPR生物传感器,整个光路和电路系统都集成在统一的机械框架中(图2),光路、电路、流路模块化设计,系统易拆装、易联用。外置开放式光路,设计巧妙。由于系统采用高精度振镜,可提高测量分辨率,并且无需设计繁琐的角度扫描装置,可以简化结构,缩小仪器体积,降低结构及零配件成

本。本系统尺寸为550 mm×200 mm×330 mm,远小于瑞典BIAcore AB公司的BIAcore 2000(760 mm×350 mm×610 mm),方便携带,可用于现场快速检测。而Spreeta2000、SensiQ等价格较低的小型SPR仪器,在测量范围、灵敏度或易操作性等方面都较有限,有的只能作为用于检测少数样品的专用仪器。本文自行研制的SPR系统角度扫描范围为64°~84°,对应折射率范围为1.2415~1.3762,足以检测大部分生化溶液样品;系统测量精度可达0.002°,对应折射率测量分辨率可达 10^{-6} 。软件部分采用集成化图形编程环境LabVIEW进行动力学检测功能设计。扫描过程中可根据预扫描的共振峰位置来改变扫描起点和扫描范围等参数以提高系统的灵活性。扫描参数改变后,程序会根据新的参数和预扫描时间重新计算单次扫描的时间,不会影响动力学曲线。同时,通过多项式拟合的数据处理方法减少电噪声等信号引起的误差。

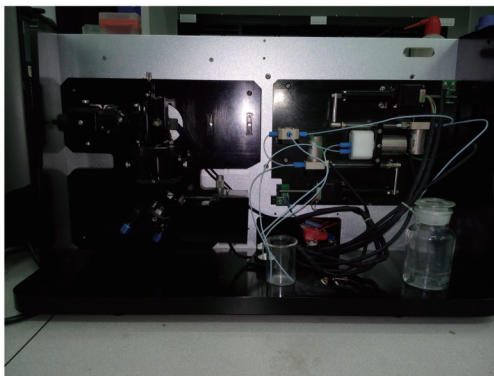


图2 SPR系统实物图

Fig.2 Photograph of SPR

3.2 生物芯片制备

生物芯片为直径20 mm、厚度1 mm的圆形玻璃片,表面沉积50 nm的金属Au。将镀有Au膜的传感芯片固定到仪器上,安装流通系统,通入PBS缓冲液(2 mmol/L NaH_2PO_4 , 2 mmol/L Na_2HPO_4 , 150 mmol/L NaCl , pH7.4),基线稳定几分钟后进行生物芯片的自组装,通入1 mmol/L的 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ (巯基十一酸)和 $\text{HS}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ (巯基己酸)的乙醇溶液,质量比为1:9,对金膜表面进行化学修饰2 h,然后通入PBS缓冲液清洗。基线稳定后加入0.1 mol/L的NHS和0.1 mol/L的EDC混合液(体积比为1:1),活化芯片表面15 min,之后用PBS冲洗2 min,这时的基线比活化前略有升高。然后在生物芯片表面固定用PBS缓冲液稀释15倍的蝇毒磷衍生物($\text{H}_{11}\text{-OVA}$)作为生物探针,此时SPR响应值明显升高,30 min后通入PBS缓冲液冲洗2 min,响应值只有小幅下降,说明探针固定效果较好。加入1 mol/L的 $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$ (乙醇胺,pH8.5)封闭灭活剩余的酯键,5~7 min后用PBS缓冲液冲洗,生物芯片制备完成,可用于下一步的免疫检测。

3.3 抗体检测

将稀释15倍的 $\text{H}_{11}\text{-OVA}$ 固定在生物芯片表面,检测对象是蝇毒磷抗体,抗体质量浓度分别为0.1、0.5、1、2 mg/L。图3是固定 $\text{H}_{11}\text{-OVA}$ 的生物芯片检测蝇毒磷抗体的共振曲线,记录的是免疫反应350 s时的SPR

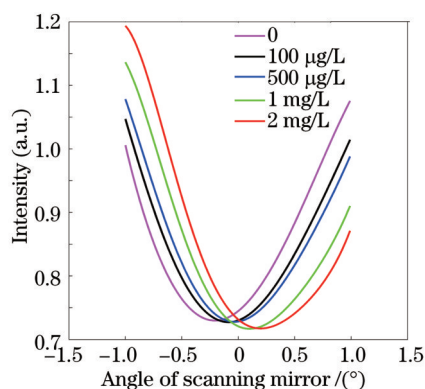


图3 SPR生物芯片检测蝇毒磷抗体的共振曲线

Fig.3 Resonance curve of coumaphos antibody detection with SPR biochip

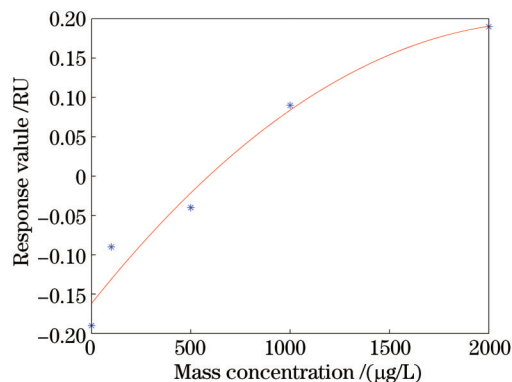


图4 直接检测蝇毒磷抗体的标准曲线

Fig.4 Standard curve of direct detection of coumaphos antibody

响应。检测样品中的抗体与芯片表面的抗原发生免疫反应,形成抗原-抗体结合物,SPR响应值增大。随样品中抗体质量浓度的增大,反应时间相同时更多的抗体与抗原结合,共振角增大。图4是直接检测蝇毒磷抗体的标准曲线,室温(20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 条件下,以通入样品免疫反应350 s时的相对响应值为纵坐标,样品中抗体的质量浓度为横坐标,可见0~1 mg/L的样品SPR响应值与质量浓度基本呈线性关系,并且由未知浓度的待测样品SPR响应值,查询标准曲线,可得出样品中抗体的质量浓度。为研究免疫反应规律,可延长反应时间,图5是固定 H_{11} -OVA的生物芯片检测抗体的动力学曲线,样品质量浓度为2 mg/L,反应时间约为500 s。如图5所示,SPR响应值随检测时间增加,反应速度先快后慢,逐渐趋于饱和。该方法适用于蝇毒磷抗体筛选及抗体亲和力和免疫反应动力学研究。实验中扫描步长设为 0.01° ,根据光路设计,对应的角度分辨率为 0.02° ,直接检测蝇毒磷抗体检测限可达 $25\ \mu\text{g/L}$ 。

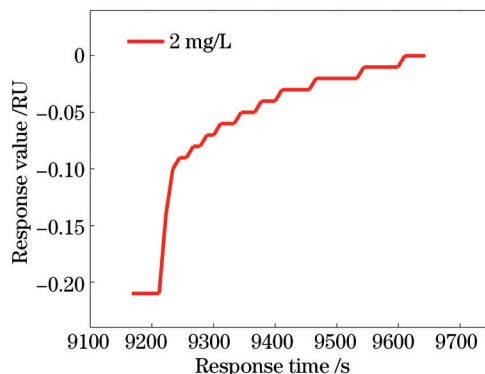


图5 固定 H_{11} -OVA的生物芯片检测2 mg/L蝇毒磷抗体样品的动力学曲线

Fig.5 Kinetic curve of detection of 2 mg/L coumaphos antibody with H_{11} -OVA fixed biochip

3.4 连续检测

蝇毒磷抗原、抗体免疫反应完成后,通入SDS-HCl溶液可实现抗原-抗体结合物从芯片表面解离,但是对芯片表面有很强的破坏性,影响芯片的检测次数和使用寿命,并且可能会改变基线的位置,影响检测结果的准确性。因此要尽量减少使用酸或碱洗脱再生芯片的次数。

SPR检测蝇毒磷免疫反应得到的曲线为对数增长曲线,如图5所示,先快后慢,逐渐趋于平缓,最后免疫反应达到饱和。蝇毒磷免疫反应速度较慢,在起始阶段(5 min内)免疫反应的响应值与时间近似呈线性关系,通常5 min以后反应速度趋于平缓,15 min后会达到平衡,并且当生物芯片表面固定的生物探针较多、待测样品的浓度不高时,起始阶段探针与待测物的结合数量少,只占芯片表面探针的小部分,对后面加入的样品中待测物与芯片探针的结合影响很小。解离速度与抗体本身的性质、温度以及缓冲液成分有关。蝇毒磷免疫反应完成后,通入PBS缓冲液使抗原-抗体结合物解离,解离速度很慢。

基于上述情况提出蝇毒磷连续检测法,如图6所示,阶段1是PBS缓冲液形成的基线,2是通入EDC/NHS,使生物芯片活化,3是活化后使用PBS缓冲液清洗,4是探针(H_{11} -OVA,质量浓度为2 mg/L)固定,5是PBS缓冲液清洗,6是 $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$ 封闭,7是封闭后PBS缓冲液清洗。竞争法连续检测5个样品,蝇毒磷抗体工作质量浓

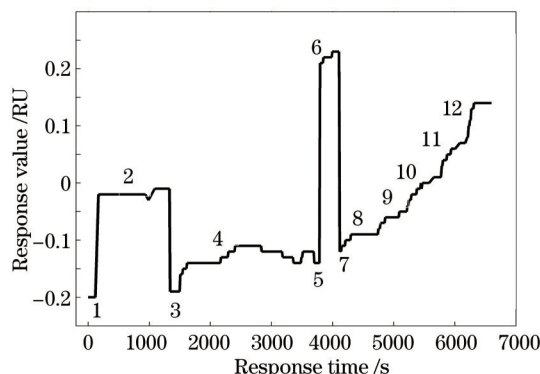


图6 连续检测蝇毒磷的响应曲线

Fig.6 Response curve of continuous coumaphos detection

度为 10 mg/L, 蝇毒磷小分子质量浓度分别为 500、200、100、50、0 $\mu\text{g/L}$, 抗体与蝇毒磷小分子混合, 静置 5 min, 然后依次通入生物芯片表面, 阶段 8、9、10、11、12 记录了 5 个样品的动态检测曲线, 每个样品检测完仅用 PBS 缓冲液清洗。蝇毒磷小分子和芯片表面探针都能与抗体结合, 是竞争关系。样品中蝇毒磷小分子抑制了抗体与芯片表面的探针结合, 小分子的浓度与 SPR 响应值的变化成反比关系。现场实际检测中, 如果减少单个样品的检测时间, 可以对更多组别的样品进行连续检测。该方法省略酸或碱洗脱的步骤, 减少了实验步骤, 简化了芯片再生过程, 降低了测量成本, 有利于推广到大量样品的现场检测。

4 结 论

将自行研制的角度扫描型便携式 SPR 传感器应用于蝇毒磷检测, 提出了连续检测法, 进行了蝇毒磷抗体检测实验。抗体检测可研究抗原与抗体亲和力及动力学反应过程, 适用于基础研究和抗体的筛选等。连续检测法对蝇毒磷标准品的梯度溶液进行检测, 适用于对样品中蝇毒磷的现场检测、大量样品的筛选等, 减少洗脱的过程, 增加芯片使用次数, 减少检测时间, 降低成本, 有很高的推广价值。与传统生化分析方法相比, SPR 生物芯片检测蝇毒磷具有免标记、只需单一抗体、所需样品量少、可迅速给出定量结果、可研究反应动力学等一系列优点。该装置和方法可进行现场大量样品的实时连续检测和快速筛选, 适用于超市、集市、工厂等需要实时检测的场所。

参 考 文 献

- 1 Xie Guimian, Sun Yuanming, Xu Zhenlin, *et al.*. Design of generic haptens for O, O-diethyl phosphorothioate pesticides and recognition properties of antibodies [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2009, 30(11): 2193-2198.
谢桂勉, 孙远明, 徐振林, 等. 硫代磷酸二乙酯类农药半抗原设计及抗体识别特性[J]. *高等学校化学学报*, 2009, 30(11): 2193-2198.
- 2 Song Shuling, Li Chongjiu, Ma Xiaodong. Study on clean-up method for co-extractions of multiple pesticide residues in vegetables [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2008, 27(8): 795-799.
宋淑玲, 李重九, 马晓东. 蔬菜农药多残留分析中基质共提物净化方法的研究[J]. *分析测试学报*, 2008, 27(8): 795-799.
- 3 Zong Dai, Hui Liu, Yudong Shen, *et al.*. Attomolar determination of coumaphos by electrochemical displacement immunoassay coupled with oligonucleotide sensing [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(19): 8157-8163.
- 4 Zhang Guowen, Pan Junhui, Ni Yongnian. Resolution of synchronous fluorimetric spectrum for carbaryl and coumaphos and its application study [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, 26(6): 1092-1095.
张国文, 潘军辉, 倪永年. 西维因和蝇毒磷的同步荧光光谱解析及应用研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26(6): 1092-1095.
- 5 Kamel A, Al-Ghamdi A. Determination of acaricide residues in Saudi Arabian honey and beeswax using solid phase extraction and gas chromatography[J]. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 2006, 41(2): 159-165.
- 6 Jimenez J J, Bernal J L, del Nozal M J, *et al.*. Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 829(1): 269-277.
- 7 Rial-Otero R, Gaspar E M, Moura I, *et al.*. Gas chromatography mass spectrometry determination of acaricides from honey after a new fast ultrasonic-based solid phase micro-extraction sample treatment[J]. *Talanta*, 2007, 71(5): 1906-1914.
- 8 Homola J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species [J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108(2):462-493.
- 9 Shiping Li, Jingang Zhong. Simultaneous amplitude-contrast and phase-contrast surface plasmon resonance imaging by use of digital holography [J]. *Biomedical Optics Express*, 2012, 3(12):3190-3202.
- 10 Rafael Attilo Espiritu, Nobuaki Matsumori, Michio Murata, *et al.*. Interaction between the marine sponge cyclic peptide theonellamide A and sterols in lipid bilayers as viewed by surface plasmon resonance and solid-state ^2H nuclear magnetic resonance [J]. *Biochemistry*, 2013, 52(14): 2410-2418.
- 11 Homola J, Lu H B, Yee S S. Dual-channel surface plasmon resonance sensor with spectral discrimination of sensing channels using dielectric overlayer [J]. *Electronics Letters*, 1999, 35(13):1105-1106.
- 12 Gao Xingyu, Ning Lihua. Optical properties research on surface plasmons excited by metallic nanostructure

- waveguides [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2011, 48(4): 042401.
高兴宇, 宁黎华. 金属纳米结构波导激发表面等离子体的光学特性[J]. *激光与光电子学进展*, 2011, 48(4): 042401.
- 13 Guan Chunying, Yuan Libo, Shi Jinhui. Microstructured- fiber surface plasmon resonance sensor [J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, 31(2): 0206003.
关春颖, 苑立波, 史金辉. 微孔光纤表面等离子体共振传感特性分析[J]. *光学学报*, 2011, 31(2): 0206003.
- 14 Bryce P Nelson, Timothy EGrimsrud, Mark R Liles, *et al.*. Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays [J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(1): 1-7.
- 15 Jong Seol Yuk, Hyun-Soo Kim, Jae-Wan Jung, *et al.*. Analysis of protein interactions on protein arrays by a novel spectral surface plasmon resonance imaging [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21(8):1521-1528.
- 16 Shuai Binbin, Xia Li, Zhang Yating, *et al.*. Principle and study progress of surface plasmon resonance sensors based on gratings [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2011, 48(10):100502.
帅彬彬, 夏 历, 张雅婷, 等. 基于光栅的表面等离子体共振传感器的原理及进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2011, 48(10): 100502.
- 17 Yeh L Y. Real-time measurement of glucose concentration and average refractive index using a laser interferometer [J]. *Opt Lasers in Engng*, 2008, 46(9):666-670.
- 18 Liu Chang, Zou Zhengfeng, Chen Shufen, *et al.*. Surface plasmon resonance sensor based on compact disk grating [J]. *Chinese J Lasers*, 2012, 39(3): 0314001.
刘 畅, 邹正峰, 陈淑芬, 等. 基于光盘光栅的表面等离子体共振传感器[J]. *中国激光*, 2012, 39(3): 0314001.
- 19 Qi Pan, Li Ying, Feng Mingchuang, *et al.*. Scanning surface plasmon resonance biosensor for array samples detection [J]. *Optical and Precision Engineering*, 2012, 20(11): 2363-2372.
齐 攀, 李 莹, 冯明创, 等. 用于阵列样品检测的扫描式表面等离子体共振生物传感器[J]. *光学 精密工程*, 2012, 20(11): 2363-2372.
- 20 Richard B M Schasfoort, Anna J Tudos. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*[M]. London: Royal Society of Chemistry,2008.
- 21 Karlsson R. SPR for molecular interaction analysis: A review of emerging application areas[J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2004, 17(3): 151-161.