

地表水微囊藻毒素的表面等离子波子共振 免疫检测方法研究

王晓萍¹ 詹舒越¹ 罗昭锋² 周宏敏²

(¹ 浙江大学现代光学仪器国家重点实验室, 浙江 杭州 310027)
(² 中国科学技术大学合肥微尺度国家实验室, 安徽 合肥 230027)

摘要 结合表面等离子波子共振 (SPR) 技术与免疫检测技术, 研究和建立了一种响应速度快、免标记、低成本的地表水微囊藻毒素 (MC-LR) 检测方法。基于 Spreeta™ 传感器构建了小型 SPR 免疫检测系统, 采用共价偶联方法在传感器金膜表面修饰 MC-LR-BSA 抗原为生物敏感膜; 开展了 MC-LR 的 SPR 免疫检测方法实验研究, 结果表明该方法的相对标准偏差为 1.0% ($n=6$), 定量范围为 2~32 ng/mL, 检测限为 0.63 ng/mL, 半抑制浓度 $C_{1/2}$ 为 10.7 ng/mL, 空白加标回收率和样品加标回收率在 90%~113% 之间。实样检测实验中, 管道末梢饮用自来水水样未能检测出 MC-LR, 而某湖水水样中 MC-LR 的质量浓度为 2.46 ng/mL。实验研究与结果表明, MC-LR 的 SPR 免疫检测方法可以满足世界卫生组织 (WHO) 对于饮用水中 MC-LR 最低含量检测的需求。

关键词 测量; 表面等离子波子共振; 水质检测; 微囊藻毒素 MC-LR; 免疫检测方法

中图分类号 O661.1 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS201232.0212005

Research of Surface Plasmon Resonance Immunoassay Method for Microcystin-LR in Surface Water

Wang Xiaoping¹ Zhan Shuyue¹ Luo Zhaofeng² Zhou Hongmin²

(¹ State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China)
(² Hefei National Laboratory for Physical Sciences at Microscale and School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230027, China)

Abstract A novel assay detection method for microcystin-LR (MC-LR) in surface water is researched and established which combines surface plasmon resonance (SPR) technique with immunoassay method. Spreeta™ sensor is adopted in the SPR flow injection analysis (FIA) system. The reusable biosensor chip is functionalized with (MC-LR)-BSA using covalent-coupling method. Experimental studies of SPR immunoassay method for MC-LR are carried out, the results show that relative standard deviation (RSD), quantitative range, detective limit and half maximal inhibitory concentration ($C_{1/2}$) are 1.0% ($n=6$), 2~32 ng/mL, 0.63 ng/mL and 10.7 ng/mL, respectively. Recovery rate of blank sample and different water samples spiked MC-LR ranges from 90% to 113%. It is concluded that tap water does not contain MC-LR while pond water contains 2.46 ng/mL MC-LR in real sample assay. The experimental results demonstrate that the SPR immunoassay can well meet drinking water guidelines of the World Health Organization (WHO) for MC-LR.

Key words measurement; surface plasmon resonance; water-quality detection; microcystin-LR; immunoassay method

OCIS codes 120.1880; 240.6680

1 引言

微囊藻毒素 MC-LR (Microcystin-LR) 是目前

已知的出现频率最高、产生量最大、毒性最强及急性危害最大的一种淡水蓝藻毒素, 且具有水溶性和耐

收稿日期: 2011-08-08; 收到修改稿日期: 2011-10-03

基金项目: 国家 863 计划 (2009AA06Z406)、国家自然科学基金重点项目 (61036012) 和中央高校基本科研业务费专项资助课题。

作者简介: 王晓萍 (1962—), 女, 博士, 教授, 主要从事水环境的物理检测方法与监测仪器设计、表面等离子波子共振生物光学传感技术与仪器设计、电子舌设计及其应用等方面的研究。E-mail: xpwang@zju.edu.cn

热性,不挥发,抗 pH 变化,在水中自然降解过程十分缓慢等特点^[1]。该毒素是一种肝毒素,是肝癌的强烈促癌剂,长期饮用含有 MC-LR 的水会严重威胁人体健康^[2]。世界卫生组织(WHO)在其推荐的饮用水标准中,规定 MC-LR 质量浓度不准超过 $1 \mu\text{g/L}$ ^[3]。如何准确、快速、简易地检测出水体中 MC-LR 的含量是当前水质分析领域关注的热点之一。微囊藻毒素分析检测新方法的探索与研究对于维护环境安全和全人类的健康具有重要意义。

目前 MC-LR 常用的检测方法有生物分析法、化学仪器分析法和免疫检测法。以小鼠实验为典型的生物分析法,虽然简单易行,但因生物个体差异等导致测量结果偏差大,且灵敏度非常低,特异性差^[4]。以色谱、质谱技术为主的化学仪器分析法可对藻类毒素各种同系物进行鉴别、定量,但是该方法依赖大型仪器设备以及熟练操作的技术人员,且样品前处理复杂,因此分析成本高、时间长^[5]。酶联免疫分析法由于具有较高特异性和选择性^[6],样品前处理相对简单以及商品化的试剂盒为该方法的进一步应用提供了可能性。但其检测过程需要酶标记抗体及依赖于酶催化反应的比色检测,导致成本增加,需耗时数小时,且检测过程需依赖于实验室环境,难以满足现场分析检测的实时性要求。

将灵敏度高、特异性强的免疫分析方法与计算机、传感器等技术相结合,是环境检测技术的发展趋势。如 Campas 等^[7,8]在电化学免疫传感器及 Long

等^[9]在倏逝波全光纤新型免疫传感器的研究中都已取得了较好的研究成果,但这些免疫传感器仍然无法摆脱对酶或荧光标记物的依赖。

为了建立一种免标记、响应速度快、灵敏度高、成本低的 MC-LR 检测分析方法,本文把免疫分析方法与表面等离子波共振(SPR)检测技术相结合,提出并设计了一种小型化、可适用于现场的 SPR 免疫检测分析系统,制备了可识别 MC-LR 的特异性分析免疫传感器,通过实验分析评价了该检测系统的性能指标,实现了地表水水质 MC-LR 含量的测定。

2 检测原理与实验装置

SPR 是光在玻璃与金属薄膜界面发生全反射时产生的倏逝波引发金属表面的自由电子产生表面等离子波(SP),并在 SP 与倏逝波频率和波数相同的情况下产生的一种共振现象,由此导致反射光的能量急剧下降,反射光谱上出现共振峰^[10]。在传感芯片表面固定一层生物分子识别膜,当待测样品流过芯片表面时,若样品中有能够与芯片表面的生物分子相互作用的分子,会引起金膜表面折射率变化,最终导致 SPR 共振峰变化,从而可获得被分析物的浓度、亲和力、动力学常数和特异性等信息。

自行研制开发的 SPR 免疫检测分析系统结构如图 1 所示。传感器选用 Kretschmann 结构的 TSPR1A170100 Spreeta™ 传感器,其折射率分辨率

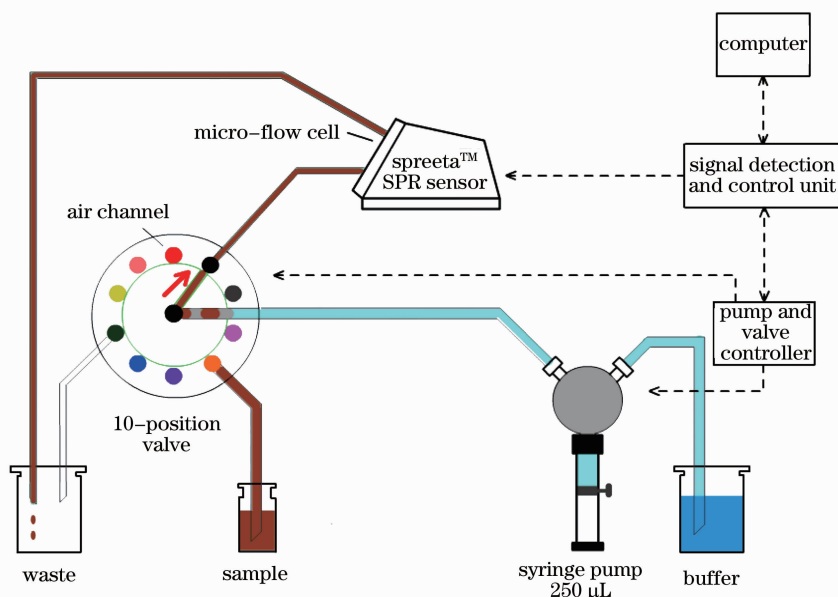


图 1 SPR 生物检测分析系统结构图

Fig. 1 Schematic of the SPR bioanalyzer

为 5×10^{-6} RIU(单位折射率),具有体积小、功耗低、性价比高等特点;十通阀(美国 Valco Inc.)用于切换选择缓冲液、待检样品和再生液等;工业注射泵(Sapphire EngineeringTM Inc.)依据程序将各种溶液注射并流经表面功能化的 SPR 传感器表面,传感器输出的 SPR 光谱经信号检测与控制电路采集后,传送到计算机进行分析处理。系统具有自动测量、清洗、再生等功能,并且结构小巧轻便,可满足环境水质分析领域现场实时检测的需求。

3 材料与方法

3.1 材料

N-羰基琥珀酰亚胺(NHS);水溶性碳化二亚胺(EDC);四氯苯酚(TECP);盐酸乙醇胺(1 mol/L ethanolamine hydrochloride, pH 值为 8.5, Alfa Aesar Inc.);纯度大于 98%;十二烷基硫酸钠(SDS)溶液:质量分数为 10%;MC-LR 单克隆抗体(MC-LR-mAb, 清华大学生命科学学院);MC-LR 标准品(Sigma Inc.);纯度大于 95%;磷酸盐缓冲液(PBS):将 8.0 g NaCl, 2.9 g Na_2HPO_4 , 0.2 g KH_2PO_4 , 0.2 g KCl 溶于 800 mL 蒸馏水中,调整溶液 pH 值至 7.4,补充液体使溶液体积为 1 L,分装、

高压蒸汽灭菌后室温保存;再生液:100 mmol/L 的 NaOH 溶液与质量分数为 0.05% 的 SDS 溶液混合。

3.2 测试方法及生物芯片制备

由于 MC-LR 是小分子,为提高检测灵敏度通常采用间接检测法即抑制法进行测量。其过程为:将 MC-LR 抗原偶联在 SPR 传感器芯片(金膜)表面;将适量的 MC-LR-mAb 与含有 MC-LR 分子的被测溶液混合,抗原抗体结合后,混合液中尚有一定余量的 MC-LR-mAb;将该混合液作为 SPR 仪器的被测样品注入并流经传感器金膜表面,此时混合液中多余的 MC-LR-mAb 与修饰在传感器金膜表面的 MC-LR 抗原结合,SPR 输出信号发生变化,根据 SPR 输出信号的大小,可以得到混合液中多余 MC-LR-mAb 的量,从而可以计算出被测溶液中的 MC-LR 分子浓度。

为使 SPR 传感器对特定待测分子具有特异性,需要对传感器芯片(金膜)表面进行修饰。对于 MC-LR 传感芯片的制备,是利用(MC-LR)-BSA 偶联物的巯基与传感器金表面共价偶联,形成一层自组装的单分子检测层。具体的步骤如图 2 所示。

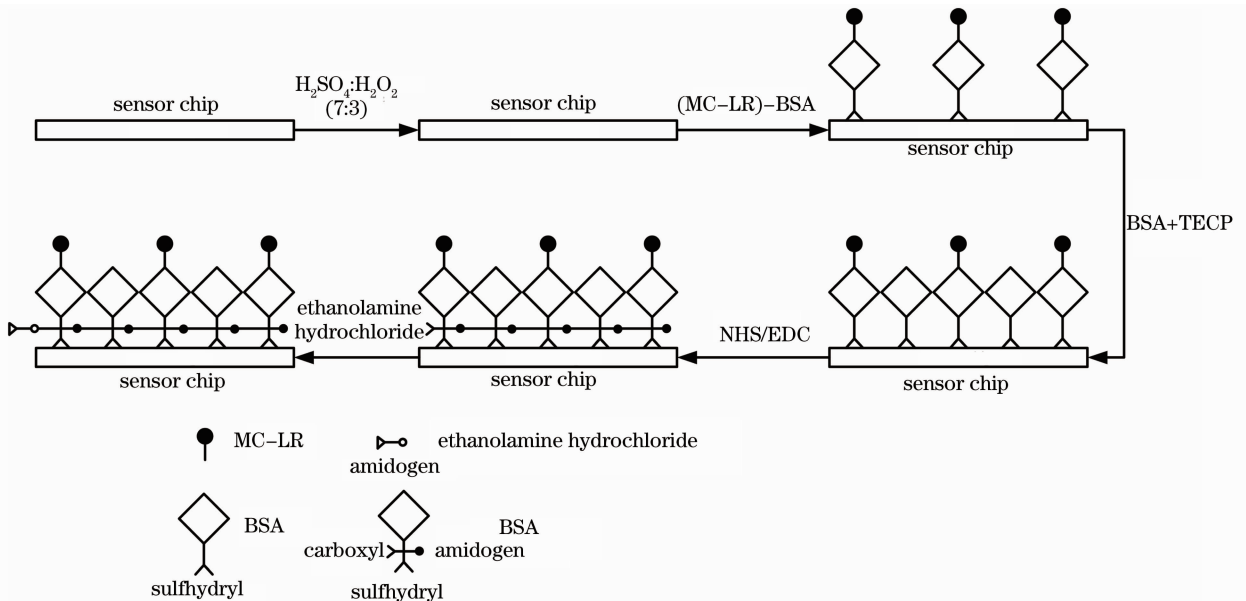


图 2 MC-LR 生物芯片制备过程

Fig. 2 MC-LR biosensor chip preparation procedure

- 1) 用体积比为 7:3 的浓硫酸(质量分数为 98%)和双氧水(体积分数为 30%)的混合溶液清洗传感器金膜表面 12 h。
- 2) 取(MC-LR)-BSA 溶液 20 μL 滴于芯片表面

反应 8 h,使(MC-LR)-BSA 通过巯基固定于芯片表面。

- 3) 回收芯片表面的 MC-LR-BSA 溶液,冲洗芯片表面,氮气吹干,取 2 mg/mL BSA + 1% TECP

(质量分数)溶液 20 μL 滴于芯片表面,反应 5 h。在 TECP 作用下,BSA 的蛋白二硫键被打开,封闭未吸附(MC-LR)-BSA 的金膜表面,以减少结合过程的非特异性吸附。

4) 冲洗芯片表面,氮气吹干。取 NHS/EDC 混合溶液 20 μL 滴于芯片表面反应 5 h,交联活化芯片,使得芯片表面的独立蛋白 BSA 之间的羧基与氨基交联在一起,提高结合的稳定性。

5) 冲洗芯片表面,氮气吹干。取盐酸乙醇胺 20 μL 滴于芯片表面反应 12 h,封闭芯片表面多余的羧基,减少羧基对抗体蛋白的非特异性吸附。

3.3 性能测试实验

3.3.1 实验条件确定

再生液确定:分别以 100 mmol/L NaOH 和 100 mmol/L NaOH+0.05% SDS(质量分数)混合液为再生液,以稀释 600 倍的 MC-LR-mAb 溶液作为检测样品,以 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度进样,进样量为 50 μL ,考察芯片的再生结果,即基线回复到初始值的情况。

抗体稀释比确定:将 MC-LR-mAb 与 PBS 按体积比为 1:300,1:600,1:1000 比例稀释,分别作为检测样品,以 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ 速度进样,进样量为 50 μL ,测试并比较三种样品的 SPR 响应值,作为选择抗体稀释比例的依据。

3.3.2 检测性能测试

重复性测试:以 1:600 MC-LR-mAb 稀释液为测试样品,以 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ 速度进样,进样量为 50 μL 并再生;重复 20 次,以测试芯片的稳定性。

标准品测试实验:用 PBS 缓冲液、MC-LR 标准品和 1:600 MC-LR-mAb 稀释液,配制出 MC-LR 质量浓度分别为 64,32,10,5,2,0.5 ng/mL 的标准溶液。并从高浓度到低浓度依次进行检测,每个样品重复 3 次,求得每个样品的平均 SPR 响应值,从而得到 MC-LR 的标准曲线。

3.3.3 实际样品检测

空白加标水样测试:以二级去离子水作为空白水样,用空白水样、MC-LR 标准品和 1:600 MC-LR-mAb 稀释液,配制出 MC-LR 质量浓度分别为 16,4,2 ng/mL 的空白加标样品。分别测试这三个样品,每个样品重复 3 次,求得每个样品的平均 SPR 响应值,并计算空白加标回收率。

实际水样测试:以某湖水、饮用自来水管道末梢的水样为被测样品,分别取样 100 μL 。样品放置于离心机上以 12000 r/m 的速度离心 6 min,去除颗粒

杂质,取上清液作为被测水样。分别在这两种水样与 1:600 MC-LR-mAb 稀释液的混合液中,添加 4 ng/mL 的 MC-LR,得到水样加标样品。分别对这两种水样及水样加标样品进行检测,每个样品重复 3 次,求得每个样品的平均 SPR 响应值,并计算两种水样加标回收率及其水样的 MC-LR 含量。

4 结果与讨论

4.1 测试条件选定

两种再生液的传感图如图 3 所示,由图可见,当以 100 mmol/L NaOH 为再生液时,再生后基线与初始基线存在约 32RU 的结合量差值,表明该再生液不能使传感器表面的抗原和抗体结合物完全分离。而对于 100 mmol/L NaOH+0.05% SDS 再生液,再生后基线复原。

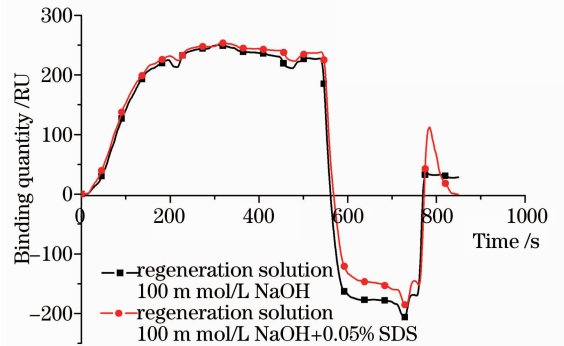


图 3 抗体稀释 600 倍,两种不同再生液的 SPR 谱图

Fig. 3 Sensorgrams of two different regeneration solutions with 1:600 diluted antibody

MC-LR-mAb 与 PBS 分别按体积比为 1:300,1:600,1:1000 比例稀释的稀释液的 SPR 传感图如图 4 所示。由图可见,在同样的进样量和进样速度的条件下,1:300 MC-LR-mAb 稀释液的结合量为最大,达 300 RU;1:1000 MC-LR-mAb 稀释液的结合量为最小,仅为 102 RU。1:300 MC-LR-mAb 稀释液结合值较大,但抑制浓度随之增大,最终导致检测限变大,且抗体消耗量也大,会增加分析成本;而 1:1000 MC-LR-mAb 稀释液结合值低,竞争抑制曲线动态响应范围小,会导致定量浓度范围变窄。因此选择 1:600 MC-LR-mAb 稀释液较为恰当,其响应值为 220 RU,能在检测限、样品消耗量及信号动态响应范围之间取得一个合理的平衡。

4.2 重复性

分析重复性实验的 20 次测量结果,求得 20 次测量的平均 SPR 响应值为 223.2 RU,标准偏差为 2.0 RU,相对标准偏差(RSD)值为 1.0%,响应信号

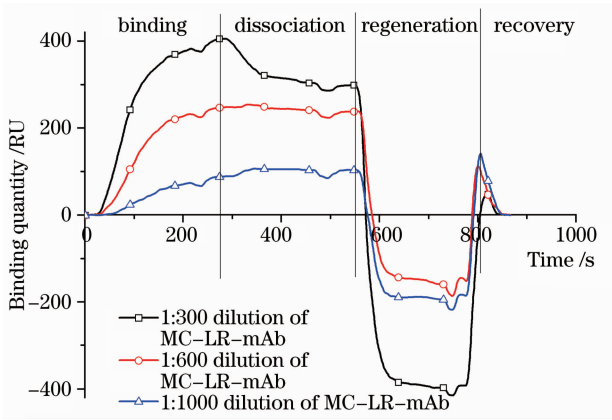


图4 单次完整的测量过程,包括结合-解离-再生-恢复四个过程

Fig. 4 Sensorgram of complete measuring process, including 4 steps of binding, dissociation, regeneration and recovery

的最大偏差在 4 RU 之内。结果表明传感器芯片表面偶联的抗原结合牢固,抗体稀释倍数和再生条件选择合理。在该条件下,测试方法具有良好重复性。

4.3 标准曲线

分析不同浓度 MC-LR 溶液的 SPR 测量结果,以 SPR 传感器的响应结合值为纵坐标,MC-LR 浓度值的对数为横坐标,用 Sigmoidal 非线性关系拟合拟合曲线的相关系数 $R^2=0.997$,得到 MC-LR 标准曲线如图 5 所示。结合值最低和最高端分别由于饱和结合及抑制溶液中抗体浓度低而趋向于平稳,中间部分呈线性递减的过程,很好地符合抑制模式的抗原抗体生物测量过程。FDA 的《标准分析方法与步骤依据指南》^[11]中定义检测限为 $3.3\sigma/S$,其中 σ 为重复性测量的标准偏差, S 为标准曲线的斜率。由标准曲线测量点可以计算 $S=9.52 \text{ RU}\cdot\text{mL}/\text{ng}$, $\sigma=2.0 \text{ RU}$,因此该方法的检测限为 $0.63 \text{ ng}/\text{mL}$,半抑制浓度 $C_{1/2}$ 为 $10.7 \text{ ng}/\text{mL}$ 。由标准曲线及检测限可确定其定量范围为 $2\sim 32 \text{ ng}/\text{mL}$ 。结果表明该检测方法可以很好地满足 WHO 对于饮用水中 MC-LR 最低含量检测的需求。

由图 4 可知,一次完整的 SPR 检测过程包括结合、解离、再生及恢复四个过程,耗时约为 10 min。在实际应用过程,根据单次测量的响应值,由标准曲线可以得到 MC-LR 的浓度值。相比于化学仪器分析法及酶联免疫法,其快速定量是一大优势,可满足现场实时检测的需求。

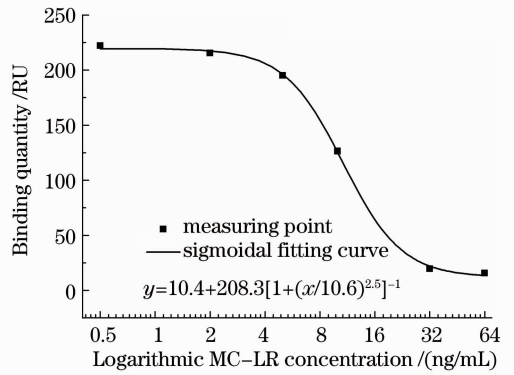


图5 MC-LR 的标准曲线

Fig. 5 Calibration curve for MC-LR standard solutions

4.4 实样测试结果与回收率

根据空白加标样品测试实验结果,可得到各样品的平均响应值,根据标准曲线反演计算得到的 MC-LR 添加浓度和回收率如表 1 所示,回收率最大偏差在 10% 左右,结果表明所建立的 MC-LR 检测方法具有较高的准确性。

表 1 空白与空白加标的响应值、反演计算 MC-LR 浓度值和回收率

Table 1 Response, derived concentration and recovery rate of blank sample and blank sample water spiking MC-LR with three different concentrations

Samples / (ng/mL)	Mean response /RU	Derived concentration / (ng/mL)	Recovery /%
Blank	224.3		
2	214.8	2.25	112.5
4	198.6	4.41	110.3
16	60.1	16.8	105.0

根据实际水样及加标测试实验结果,得到的各样品平均响应值如表 2 所示。自来水空白的响应值低于检测限响应值,因此认为自来水样中未能检测出 MC-LR;根据自来水加标的 SPR 响应值,由标准曲线反演计算得到其质量浓度为 $4.25 \text{ ng}/\text{mL}$,回收率为 106.3%。湖水空白的 SPR 响应值为 213.4 RU,反演计算得到其质量浓度为 $2.46 \text{ ng}/\text{mL}$;由湖水加标的响应值反演计算其质量浓度为 $6.27 \text{ ng}/\text{mL}$,扣除湖水空白的浓度值,可得添加质量浓度为 $3.81 \text{ ng}/\text{mL}$,湖水样品的回收率为 95.3%,因此湖水含有质量浓度为 $2.46 \text{ ng}/\text{mL}$ 的 MC-LR。

表 2 四种样品的响应值、反演计算 MC-LR 浓度值和回收率

Table 2 Response, derived concentration of MC-LR and recovery rate of four kinds of samples

Samples	Mean response /RU	Derived concentration / (ng/mL)	Recovery / %
Blank tap water	223.5		
Tap water spiked 4 ng/mL MC-LR	200.6	4.25	106.3
Blank pond water	213.4	2.46	
Pond water spiked 4 ng/mL MC-LR	175.6	6.27	95.3

5 结 论

将 SPR 技术与免疫检测技术相结合,研究和建立了一种水质 MC-LR 检测新方法。基于自行研制开发的 SP 免疫检测分析系统,开展了一系列的性能测试实验,分析评价了 MC-LR SPR 免疫检测方法的主要性能指标。研究和实验结果表明,所建立的检测方法具有较高的灵敏度,能满足 WHO 对于饮用水中 MC-LR 最低含量检测的需求;采用免疫检测技术具有特异性,可直接检测水中 MC-LR 的含量;样品前处理简单,分析速度快(单次样品的分析时间仅为 10 min);检测过程无需标记,分析成本低。因此 MC-LR 的 SPR 免疫检测方法及 SPR 免疫检测分析系统为地表水的分析检测提供了新的选择方案。

参 考 文 献

- 1 K. Harada, K. Tsuji, M. F. Watanabe *et al.*. Stability of microcystins from cyanobacteria-III. * effect of pH and temperature[J]. *Phycologia*, 1996, **35**(6S): 83~88
- 2 E. M. Jochimsen, W. W. Carmichael, J. S. An *et al.*. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil[J]. *New England Journal of Medicine*, 1998, **338**(13): 873~878
- 3 S. Yamamura, J. Bartram, M. Csanady *et al.*. Drinking water guidelines and standards [C]. World Health Organization,

Geneva, Switzerland, 2004

- 4 I. R. Falconer. Mechanism of Toxicity of Cyclic Peptide Toxins from Blue-Green Algae [M]. London: Acad. Press, 1993. 177~186
- 5 T. Yu, P. Xie, M. Dai *et al.*. Determinations of MC-LR and (Dha 7) MC-LR concentrations and physicochemical properties by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2009, **83**(5): 757~760
- 6 T. Tsutsumi, S. Nagata, F. Yoshida *et al.*. Development and application of highly sensitive anti-immune complex ELISAs for microcystins in tap water [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2000, **12**(3): 231~241
- 7 M. Campas, D. Szydłowska, M. Trojanowicz *et al.*. Enzyme inhibition-based biosensor for the electrochemical detection of microcystins in natural blooms of cyanobacteria[J]. *Talanta*, 2007, **72**(1): 179~186
- 8 F. Zhang, S. H. Yang, T. Y. Kang *et al.*. A rapid competitive binding nonseparation electrochemical enzyme immunoassay (NEEIA) test strip for microcystin-LR (MCLR) determination [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, **22**(7): 1419~1425
- 9 F. Long, M. He, H. C. Shi *et al.*. Development of evanescent wave all-fiber immunosensor for environmental water analysis [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, **23**(7): 952~958
- 10 Wood, R. W. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum[J]. *Proceedings of the Physical Society of London*, 1902, **18**: 269
- 11 FDA IDraft Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation, Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation (draft guidance) [S]. U. S. : Federal Register, 2000

栏目编辑:李文喆