

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00381

表面等离子体共振生物传感器连续检测莱克多巴胺

李 辉 蔡浩原 陈 兴 孙建海 张璐璐 崔大付*

(中国科学院电子学研究所传感技术国家重点实验室, 北京 100191)

摘 要 利用表面等离子体共振生物传感器对莱克多巴胺抗体与固定在芯片表面的莱克多巴胺衍生物的相互作用进行了分析, 解离常数为 $2.56 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 。根据一定范围内相对响应值和时间近似呈线性关系的动力学特性, 建立了连续检测的方法, 从而简化了实验步骤, 有利于提高芯片的使用寿命。检测莱克多巴胺采用抑制法, 将莱克多巴胺衍生物固定在芯片的表面, 莱克多巴胺抗体与样品混合后流过芯片的表面, 所得相对响应值与样品中莱克多巴胺的浓度成反比。单个样品的检测时间设定为 15 min, 对应的检出限小于 $4 \mu\text{g/L}$ 。

关键词 表面等离子体共振; 生物传感器; 动力学; 连续检测; 莱克多巴胺

1 引 言

近年来, 表面等离子体共振 (Surface plasmon resonance, SPR) 生物传感器受到关注^[1,2]。利用 SPR 技术进行分析的原理是: 将能够与待测物结合的物质固定在传感器芯片上, 当待测物流过芯片表面时与芯片表面的物质结合, 引起芯片表面光学参数变化, 并以电信号的形式表现出来。与传统的生化分析方法相比, SPR 传感技术具有以下优点: 无需对分子进行标记, 方法的建立更为简单, 所需样品量少, 样品预处理简单, 可利用动力学特性绘制标准曲线, 检测时间短, 可分析弱相互作用或瞬间相互作用, 可实时检测。目前, SPR 传感器已被广泛应用于药物筛选、食品安全检测、疾病诊断、环境监测等领域^[3,4]。

莱克多巴胺 (Ractopamine, Rac) 属于 β -肾上腺兴奋剂, 曾被养殖户普遍使用添加在饲料中促进动物肌肉生长, 残留在动物性食品中会严重危害人类健康。我国农业部 2002 年 176 号公告将其规定为违禁药物。目前, 检测莱克多巴胺的实验室确证技术是高效液相色谱 (HPLC) 或液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS), 检出限可达到 $2 \mu\text{g/L}$ ^[5,6], 但是样品前处理过程复杂, 分析过程费时、费力。酶联免疫法 (ELISA) 具有通量高、操作相对简单的特点, 缺点是检测时间长以及终点检测本身具有的盲目性。现有农兽药残留检测技术的缺陷促使人们继续探索更为灵敏、快捷的检测方法^[7,8]。

本研究利用自行研制的 SPR-2004 型生物传感器, 对检测莱克多巴胺的方法进行检测。由于莱克多巴胺的分子量较小 (337.85), 直接将抗体固定在芯片表面检测莱克多巴胺的方法很难实现。因此, 本研究采用抑制法, 检测原理如下: 抗莱克多巴胺单克隆抗体与固定在芯片表面的莱克多巴胺衍生物结合将引起 SPR 传感器产生相对响应值, 如果将抗体与含有莱克多巴胺的样品混合后流过芯片表面, 样品中的莱克多巴胺会抑制抗体与芯片表面的衍生物结合。因此, SPR 传感器产生的相对响应值与样品中莱克多巴胺的浓度成反比。本研究利用抗莱克多巴胺单克隆抗体与固定在芯片表面的莱克多巴胺衍生物结合的动力学特征, 建立了连续检测法, 即连续检测多个样品后再对芯片表面进行冲洗使其再生, 从而简化了检测过程, 有利于提高芯片的使用寿命。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

基于固定入射角度对光强进行监测的原理, 本实验室自行研制 SPR-2004 生物传感器^[9,10]。系统主要由以下模块组成: 机械扫描系统、光学系统 (入射光源、光接收器、光路系统)、流体注入分析系统、生化传感器芯片、系统控制和分析软件。

2009-07-06 收稿; 2009-09-16 接受

本文系国家自然科学基金 (Nos. 60701019, 60976088)、中国科学院重大科研装备研制项目 (No. YZ200807) 和国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA10Z431) 资助

* E-mail: dfcui@mail.ie.ac.cn

莱克多巴胺标准品、单克隆抗体及衍生物(山东农业科学院赠送),其它试剂购自 Sigma 公司和北京化学试剂公司。莱克多巴胺用乙醇溶解为 10 g/L 的储备液,并用 0.01 mol/L PBS 缓冲液(2 mmol/L NaH_2PO_4 , 2 mmol/L Na_2HPO_4 , 150 mmol/L NaCl, pH 7.4) 稀释成 1 g/L 到 10 $\mu\text{g/L}$ 浓度梯度的溶液。所有溶液在使用前均经 0.22 μm 微孔滤膜过滤和超声脱气处理。

2.2 检测芯片的制备

实验中所使用的 SPR 生物传感器芯片为自行制备。采用真空蒸发镀膜的方法,在 18 mm $\times$ 18 mm $\times$ 0.14 mm 的玻璃片上沉积 50 nm 的金。金膜表面利用羧甲基化葡聚糖进行化学修饰^[11]。

将芯片装入仪器中,通入 HBS 缓冲液(10 mmol/L Hepes, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 0.005% (V/V) Surfactant P20, 3 mmol/L EDTA) 待基线稳定后,以 10 $\mu\text{L/min}$ 的流速通入 0.4 mol/L *N*-乙基-*N'*-(3-二氨基丙基) 碳二亚胺(EDC) 和 0.1 mol/L *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 的混合液(1:1, V/V) 对芯片表面活化 7 min。芯片活化后,将莱克多巴胺衍生物用 pH 4.6 醋酸缓冲液稀释至适当的浓度后,以 10 $\mu\text{L/min}$ 的流速注入仪器中反应 10~20 min,随后将 1 mol/L 乙醇胺以 10 $\mu\text{L/min}$ 的流速注入 7 min,灭活剩余的酯键。在各溶液之间通入仪器的均为 HBS 缓冲液。所有反应均在 20 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行。

2.3 构建标准曲线

配制一系列不同浓度的莱克多巴胺与抗体的混合物,莱克多巴胺的终浓度分别为 4, 6, 8, 10 和 12 $\mu\text{g/L}$, 抗体的最终稀释度为(1:50)。按随机顺序将混合物以 10 $\mu\text{L/min}$ 的流速通入芯片表面反应 15 min,各混合物之间通入 PBS 缓冲液。以通入不同混合物所得相对响应值为纵坐标,混合物中所含莱克多巴胺的浓度为横坐标,绘制标准曲线。

3 结果和讨论

3.1 芯片表面的再生

抗体与固定在芯片表面的抗原结合后通入缓冲液,抗体将从芯片表面解离。解离速率与抗体本身的性质、温度及反应体系的缓冲液成分密切相关。抗体与芯片表面的衍生物结合后,以 20 $\mu\text{L/min}$ 的流速通入 0.01 mol/L PBS,即可得到解离曲线。根据 Langmuir 模型^[12,13]中的公式 $\frac{dR}{dt} = -k_d R$,对解离曲线进行非线性拟合(图 1),得到抗体与衍生物相互作用的解离常数为 $2.56 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$,表明抗体从芯片表面解离的速度极慢。

通入酸或碱溶液,或具有较高离子强度的溶液可加速解离过程,再生芯片可重复使用。芯片再生的效果对于数据的准确性以及芯片的利用率和使用寿命都有很大的影响。对 0.1 mol/L NaOH, 0.1 mol/L H_3PO_4 , 0.1 mol/L HCl 3 种再生溶液能力进行了比较。其中 0.1 mol/L HCl 再生能力相对较强。利用 0.1 mol/L HCl 冲洗芯片的表面 2 min,约有 50% 抗体解离。但是在此基础上再继续通入 0.1 mol/L HCl 冲洗芯片表面 2 min,仅有 5% 抗体解离,延长冲洗时间也不能使基线下降到抗体结合前的水平。

优化芯片的再生条件比较费时费力,而且通入酸碱等溶液在一定程度上会降低芯片的使用寿命。

因此,应尽量减少利用酸或碱溶液使芯片表面再生的次数或时间。

3.2 莱克多巴胺的连续检测

利用 SPR 传感器得到的分子间相互作用典型曲线为指数增长曲线。但是在某些情况下,一定时间范围内反应时间与相对响应值近似呈线性关系。例如:流动相中待测分子浓度较低,且解离速度慢;固定在芯片表面的配体的数量较多,导致产生质量传递限制效应,反应速度受到溶液中待测物质向芯片表

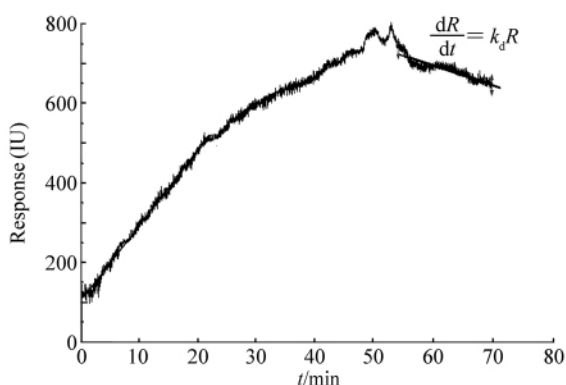


图 1 解离常数的计算

Fig. 1 Calculation of dissociation constant

面扩散的速度的影响。如图2a所示,在反应起始的一段时间内,待测物与配体结合的相对响应值与时间近似呈线性关系,线性相关系数大于99.9%。图2b为交替通入低浓度的待测物与缓冲液所得的动态曲线。其中,待测物与固定在芯片表面的配体结合形成的5个上升部分所对应的相对响应值之间只有很小的差异(RSD < 3%)。可以认为,短时间内与待测物结合的配体只占芯片表面全部配体的一小部分,配体数量的减少对待测物的继续结合并无明显影响。

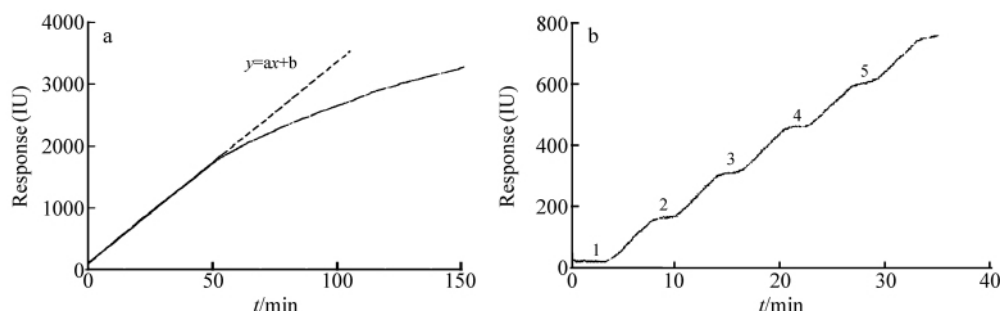


图2 不洗脱连续检测方法原理

Fig. 2 Principle of continuous detection method

基于以上分析,本实验利用连续检测的方法对莱克多巴胺进行了检测。不同浓度莱克多巴胺与抗体混合后流过芯片表面所得到的连续检测曲线如图3所示,其中包括6个连续检测过程。混合物中剩余的抗体与芯片表面的衍生物结合形成曲线上1~6对应的上升部分。平台期对应通入缓冲液后抗体从芯片表面解离的过程。由于抗体从芯片表面解离的速度缓慢,短时间内无明显的解离下降信号。6对应的部分无明显的上升信号,说明当混合物中莱克多巴胺浓度为12 $\mu\text{g/L}$ 时,混合物中的抗体已经全部与莱克多巴胺结合,没有剩余的抗体与固定在芯片表面的莱克多巴胺衍生物结合。连续检测是基于一定浓度的抗体与固定在芯片表面的莱克多巴胺衍生物结合所得相对响应值与时间近似呈线性关系的原理,因此本研究中所构建的标准曲线仅在一定的相对响应值范围内有效。如果进一步提高SPR生物传感器的灵敏度,缩短单个样品的检测时间,在一定相对响应值范围内可以对更多数量的样品进行连续检测,从而最大程度地减少芯片再生过程。

3.3 标准曲线

检测标准曲线受到很多因素的影响,如抗体浓度、反应时间、缓冲液成分等,需要对这些条件进行优化^[14]。图4为利用连续检测法所得的莱克多巴胺检测标准曲线。检测时间为15 min,对应的检出限小于4 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} 值为8.5 $\mu\text{g/L}$ 。 IC_{50} 值是衡量标准曲线灵敏度的参数,是在标准曲线上所对应的相对响应值达到空白反应的1/2的检测物的浓度。 IC_{50} 值越低,曲线越敏感。莱克多巴胺的抗体与莱克多巴胺之间的结合反应在15 min之内远未达到平衡状态,所以延长反应时间可进一步扩大标准曲线的莱克多巴胺检测范围,降低检出限,标准曲线将呈现更为完整的倒“S”型曲线。

3.4 样品基质对检测的影响

样品中含有的基质如蛋白质、脂肪等可以非特异性地吸

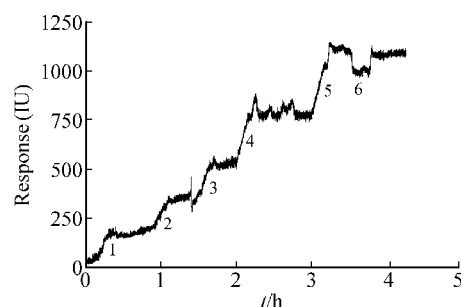


图3 利用表面等离子共振生物传感器检测莱克多巴胺的连续检测反应曲线

Fig. 3 Sensorgram of continuous detection method for Ractopamine (RAC) with surface plasmon resonance (SPR) biosensor

1. 10 $\mu\text{g/L}$ RAC; 2. 8 $\mu\text{g/L}$ RAC; 3. 6 $\mu\text{g/L}$ RAC; 4. 4 $\mu\text{g/L}$ RAC; 5. 0 $\mu\text{g/L}$ RAC; 6. 12 $\mu\text{g/L}$ RAC.

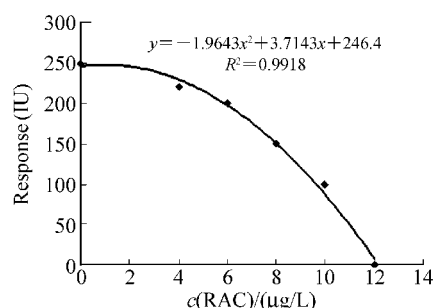


图4 不洗脱连续检测法检测莱克多巴胺时的标准曲线

Fig. 4 Calibration curve of RAC with continuous detection method

附在芯片的表面,阻碍抗原抗体之间的相互作用,从而影响检测结果的准确性。在本实验采用葡聚糖修饰的金片中,葡聚糖的存在显著降低了生物分子的非特异性吸附。减少样品基质影响的方法还包括各种样品前处理技术,如离心、有机溶剂抽提、稀释等;同时也包括数据处理技术,如制备参比表面,将实际反应表面所得响应值减去参比表面所得的响应值,或将待检测的物质添加到阴性样品中构建标准曲线等。

References

- 1 Patrick Englebienne, Anne Van Hoonacker, Michel Verhas. *Spectroscopy*, **2003**, 17(2-3): 255 ~ 273
- 2 CUI Da-Fu(崔大付), ZHANG Lu-Lu(张璐璐), WANG Yu-Jie(王于杰), LI Hui(李辉), LIU Chang-Chun(刘长春). *Modern Scientific Instrument(现代科学仪器)*, **2007**, 17(2): 3 ~ 7
- 3 Crooks S R H, Baxter G A, O'Connor M C, Elliot C T. *Analyst*, **1998**, 123(12): 2755 ~ 2757
- 4 Bjurling P, Caselunghe M, Jomson C, Persson B, Baxter G A, O'Connor M, Elliott C T. *Analyst*, **2000**, 125(10): 1771 ~ 1774
- 5 Shishani E I, Chai S C, Jamokha S, Aznar G, Hoffman M K. *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 483(1-2): 137 ~ 145
- 6 Williams L D, Churchwell M I, Doerge D R. *J. Chromatogr B.*, **2004**, 813(1-2): 35 ~ 45
- 7 Akkoyun A, Kohen V F, Bilitewski U. *Sensors and Actuators B*, **2000**, 70(1-3): 12 ~ 18
- 8 Chen Situ, Crooks S R H, Baxter G A, Julie Ferguson, Elliott C T. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 473(1-2): 143 ~ 149
- 9 LI Hui(李辉), CUI Da-Fu(崔大付), WANG Yu-Jie(王于杰), CAI Hao-Yuan(蔡浩原), WANG Jun-Bo(王军波), Zheng Zi-Pan(郑自攀), CHEN Xing(陈兴). *Food Science(食品科学)*, **2007**, 28(6): 288 ~ 292
- 10 CUI Da-Fu(崔大付), WANG Yu-Jie(王于杰), CAI Hao-Yuan(蔡浩原), XIANG Si-Hai(向四海), ZHANG Guo-Qing(张国青), WANG Jin-Fang(王晋芳), QIAN Shi-Jun(钱世钧). *Progress in Natural Science(自然科学进展)*, **2003**, 13(8): 874 ~ 876
- 11 Lofas S, Johnsson B, Edstrom A, Hansson A, Lindquist G, Hillgren R M M, Stigh L. *Biosensors & Bioelectronics*, **1995**, 10(9-10): 813 ~ 822
- 12 Katia Z, Sebastian C, Mireille B, Yves N, Danie'le A, Gilles T. *J. Mol. Biol.*, **2005**, 349(2): 401 ~ 412
- 13 O'shannessy D J, Brighamburke M, Soneson K K, Hensley P, Brooks I. *Anal. Biochem.*, **1993**, 212(2): 457 ~ 468
- 14 LI Hui(李辉), CUI Da-Fu(崔大付), LIANG Jin-Qing(梁金庆), LIU Chang-Chun(刘长春), WANG Yu-Jie(王于杰), CAI Hao-Yuan(蔡浩原). *Chinese Journal of Sensors and Actuators(传感技术学报)*, **2007**, 20(7): 1479 ~ 1483

Continuous Detection Method for Ractopamine with Surface Plasmon Resonance Biosensor

LI Hui, CAI Hao-Yuan, CHEN Xing, SUN Jian-Hai, ZHANG Lu-Lu, CUI Da-Fu*

(State Key Lab. of Transducer Tech., Inst. of Electronics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190)

Abstract The interaction between the anti-Ractopamine (Rac) monoclonal antibody and the Rac derivation immobilized on the sensor chip surface was studied with surface plasmon resonance (SPR) biosensor. A continuous detection method based on the linear response during the association phase was developed. The sensor chip surface was regenerated after several tests performed continuously, thus the detection step was simplified and the life span of the chip was prospected to be prolonged. The detection was performed as an inhibitive immunoassay. The mixture of anti-Rac monoclonal antibody and the sample flowed over the surface with Rac derivation was immobilized. The relative response was in inversely proportion to the concentration of Rac. The detection limit was less than 4 $\mu\text{g/L}$ with a detection time of 15 min.

Keywords Surface plasmon resonance; Biosensor; Kinetics; Continuous detection; Ractopamine

(Received 6 July 2009; accepted 16 September 2009)