

文章编号 1004-924X(2015)03-0723-06

多孔分子印迹膜修饰的表面等离子体 共振微囊藻毒素 LR 检测传感器

何 皓^{1,2,3}, 张 涛¹, 姚 佳¹, 李传宇¹, 周连群^{1*}, 王 毅⁴, 李明宇⁵, 黎海文¹, 董文飞¹

(1. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏 苏州 215163;

2. 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033;

3. 中国科学院大学, 北京 100049;

4. 南洋理工大学仿生传感器科学中心, 新加坡 637553;

5. 浙江大学光电信息工程学系, 浙江 杭州 310027)

摘要:开发了一种多孔分子印迹膜修饰的表面等离子体共振 (SPR) 传感器, 用于快速检测水中微囊藻毒素 LR。研究了利用该传感器检测微囊藻毒素 LR 的方法。首先, 通过原位聚合法在 SPR 传感芯片的裸金表面合成了微囊藻毒素 LR 的多孔分子印迹膜, 制备出可以特异性捕获微囊藻毒素 LR 的 SPR 传感芯片。然后, 利用 Kretschmann 棱镜耦合结构, 构建了基于 Kretschmann 结构的波长调制型表面等离子体共振传感器。最后, 通过检测不同浓度的微囊藻毒素 LR 溶液以及干扰物质微囊藻毒素 RR 溶液, 研究了该传感器的测量范围、特异性等参数。结果表明, 该传感器对于微囊藻毒素 LR 的检测灵敏度很高, 可实现微囊藻毒素 LR 的定量检测, 动态测量达 $2.1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-6}$ mol/L。另外, 传感器对于干扰物质微囊藻毒素 RR 无明显信号响应, 表明传感器对于微囊藻毒素 LR 具有很好的特异性检测能力。

关键词:表面等离子体共振传感器; 分子印迹膜; 微囊藻毒素 LR; 水污染检测

中图分类号: TP212.3; X832 **文献标识码:** A **doi:** 10.3788/OPE.20152303.0723

Surface plasmon resonance sensor coated with poriferous MIPs for microcystin-LR detection

HE Hao^{1,2,3}, ZHANG Tao¹, YAO Jia¹, LI Chuan-yu¹, ZHOU Lian-qun^{1*},

WANG Yi⁴, LI Ming-yu⁵, LI Hai-wen¹, DONG Wen-fei¹

(1. Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology,
Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China;

2. Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics,
Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

4. Centre for Biomimetic Sensor Science, Nanyang Technological University, Singapore 637553;

5. State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation,
Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

* Corresponding author, E-mail: zhoulq@sibet.ac.cn

收稿日期: 2014-06-11; 修订日期: 2014-08-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 51202154, No. 51205268, No. 91123029, No. 61340032)

Abstract: A novel surface plasmon resonance (SPR) sensor coated with porous molecularly imprinted polymers (MIPs) was developed to detect the trace microcystin-LR in water. The method to detect the trace microcystin-LR in water was explored. Firstly, the in situ self-assembly method was used to synthesize a porous thin MIPs film on the gold-plated glass. The SPR chip to specifically capture the microcystin-LR was obtained. Then, based on the typical Kretschmann prism coupling structure, a new type of SPR sensor based on wavelength interrogation was constructed by utilizing the MIPs coated gold-plated glass as the sensing chip. The sensor was used to detect different concentration of microcystin-LR solutions and microcystin-RR solutions and to obtain its measuring ranges and specificity parameters. The result indicates that the sensor is sensitive to microcystin-LR and completes a quantitative determination with a dynamic measure range of $2.1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-6}$ mol/L. Moreover, the sensor did not have obvious response to microcystin-RR, the analogues of microcystin-LR. It means that the sensor has special selectivity to recognize the microcystin-LR.

Key words: surface plasmon resonance sensor; molecularly imprinted polymer; microcystin-LR; water pollution detection

1 引言

表面等离子共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 是一种由光激励的金属表面电子集体震荡现象, 由 Wood 于 1902 年发现^[1]。SPR 传感技术不仅能检测到分子结合、薄膜形成等表面现象, 还可以免标记实时得到生物分子互相作用和不同药物与生物分子间的相互作用等重要信息^[2], 在环境检测、临床诊断、食品安全以及国防安全等领域发挥着重要作用, 被广泛应用于生物大分子等物质的检测^[3-7]。

传统用于生物分子检测的 SPR 传感器主要使用抗原抗体的识别方法, 成本较高且制备的 SPR 传感芯片不易保存^[8-10]。分子印迹技术 (Molecular Imprinting, MI) 是指以某一特定的目标分子为模版, 制备对该分子具有特意选择性聚合物的过程^[11]。通过将目标分子、功能单体、交联剂以及引发剂进行聚合反应, 然后将目标分子洗脱, 就可以得到所需的分子印迹聚合物。该技术具有成本低、稳定及识别率高等优点, 被广泛应用于各个领域, 如传感器、固相萃取、临床药物分析及模拟酶催化等。虽然分子印迹技术被应用到了很多传感器上, 但还很少应用于 SPR 传感器, 这主要是因为传统的在传感器表面修饰分子印迹膜的方法是先合成分子印迹聚合物颗粒, 再将合成的颗粒通过蘸涂、滴涂或旋涂的方法结合到传

感器表面^[12]。这种方法制作的分子印迹膜较厚且均一性差, 对于过厚的分子印迹膜, 待测分子大部分会吸附在膜的表面, 对于膜的折射率影响不大, 但对于 SPR 这种检测折射率变化的传感器, 却对检测信号影响很大, 而均一性差则会造成测量的一致性差, 无法达到检测要求。目前在传感器表面直接合成分子印迹膜的原位聚合法已得到应用。原位聚合法是将聚合反应的混合溶液涂覆到传感器表面, 然后在光或热的作用下引发聚合, 在传感器表面形成分子印迹膜^[13]。通过原位聚合法合成的分子印迹膜很薄, 而且还可以合成均一多孔状的分子印迹膜, 这对 SPR 传感技术和分子印迹技术的结合有着很大帮助, 可以促进将 SPR 传感技术应用到更多的小分子检测。

微囊藻毒素 LR (Microcystin, LR) 是一种水中藻类分泌的有毒环多肽, 水华现象带来的藻类异常增殖往往会使水体中 LR 增加^[14], 而长期饮用含过量 LR 的水会导致肝癌的发生^[15-16], 国家有关标准也限定了饮用水中 LR 的浓度。因此对其检测十分必要。目前的方法主要为高效液相色谱、酶联免疫技术等^[17-19], 这些方法普遍存在操作复杂、要求高、耗时长、价格高等缺点, 因此研究一种简便、快速、灵敏度高的 LR 检测方法十分有必要。本文通过结合 SPR 传感器的高灵敏度以及分子印迹技术的高特异性, 研究了基于 SPR 传感器的 LR 检测方法, 对于简单、快速、灵敏的检测微囊藻毒素 LR 提供了帮助。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

试验主要材料和仪器包括:微囊藻毒素 LR (台湾藻研),甲基丙烯酸 MAA、11-巯基十一烷酸 MUA、氨基丁酰胺盐酸盐 AHBH、三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯 TRIM、二甲基亚砜 DMSO(西格玛奥德里奇),丙酮、乙醇(分析纯,国药),镀金玻璃片(玻璃片厚度 1 mm,633 nm 波长处折射率为 1.522,表面金层厚度为 45 nm),表面等离子体共振(SPR)分析仪,扫描电镜 SEM(日立 SB4800)等。

2.2 实验过程

SPR 传感器芯片的制备。首先,使用丙酮、乙醇、去离子水依次超声清洗镀金玻璃片,氮气吹干后使用氧气等离子体清洗器清洗玻璃片 3 min,然后浸入 20 mL 1 mmol/L 的 MUA 乙醇溶液中室温过夜,取出后使用乙醇和去离子水依次冲洗并氮气吹干,然后浸入 20 mL 200 mmol/L 的 ABAH 水溶液中室温放置 3 h,取出氮气吹干后浸入含 500 μg 的微囊藻毒素-LR、0.43 mg 的 MAA、0.99 mg 的 TRIM 以及 9 mL 的 DMSO 混合溶液中,氮气处理 10 min 后密封,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下

反应 18 h。取出芯片用乙酸乙醇体积比 1:9 的混合溶液冲洗 8 h,氮气吹干。

芯片制备完成后,将制备好的芯片紧夹在棱镜与样品槽之间,通过耦合液使芯片背面紧贴棱镜底面并且分子印迹膜暴露于样品槽内,通过进样装置加入不同浓度溶液,稳定 20 min 后(前期实验得到微囊藻毒素 LR 分子印迹膜的吸附时间最长在 15 min 左右^[20]),记录光谱信号。为了减小误差,实验环境温度保持在(25 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$,每次实验重复 3 次。

3 结果与讨论

3.1 SPR 传感器

采用的 SPR 传感器检测装置系统及原理如图 1 所示,主要由 LS-1 卤钨灯、可见光波段光谱分析仪(美国 Ocean Optics 公司)、45 $^{\circ}$ /45 $^{\circ}$ /90 $^{\circ}$ 玻璃棱镜(北京北东光电自动化开发公司,633 nm 波长处折射率为 1.799)、透镜、线性偏振片(北京大恒光电技术公司)、多模石英光纤(浙江雷畴科技有限公司)、硅橡胶测试槽、流动注射装置等构成。

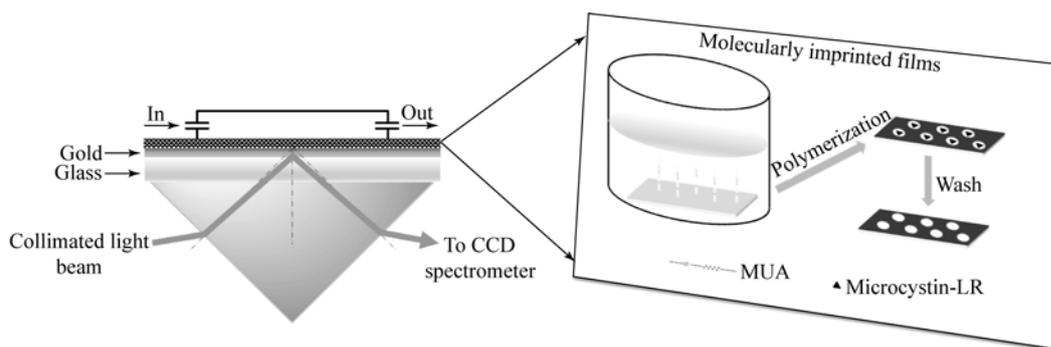


图 1 多孔分子印迹膜修饰的表面等离子体共振传感器

Fig. 1 Surface plasmon resonance sensor coated with poriferous MIPs

卤钨灯光源发出的多色光穿过多模石英光纤、聚焦透镜和线性偏振片后,成为 p 偏振的平行光束,进入棱镜的入射角为 15 $^{\circ}$ 。进入棱镜后的光束在芯片的玻璃/金膜界面发生全反射,通过全反射产生的消逝场在金膜/分子印迹膜界面激发表面等离子体模或在分子印迹膜内激发导模。表

面等离子体模的激发会使得全发射光谱在某一波段出现一个波谷。从棱镜输出的全反射光束通过聚焦透镜和另一根石英光纤传输到光谱仪中进行测量。微囊藻毒素分子印迹膜对目标分子吸附导致表面等离子体模的改变就会引起波谷位置移动,从而通过监测反射光谱中波谷位置的变化达

到传感的目的。光谱仪的波长分辨率为 0.5 nm, 光谱仪实时记录输出光, 并由计算机处理。

3.2 多孔分子印迹膜

为了避免传统的间接法合成分子印迹膜所带来的缺点, 使用原位聚合法在芯片表面合成微囊藻毒素 LR 分子印迹膜。芯片表面首先使用 MUA 进行了分子自组装, 引发剂 ABAH 通过共价键作用结合到自组装层中并引导了分子印迹膜和分子自组装层的结合。通过这种方法, 得到薄且多孔状的微囊藻毒素 LR 分子印迹膜如图 2 所示, 多次合成的膜厚度均在 40~50 nm 之间, 一致性较好。

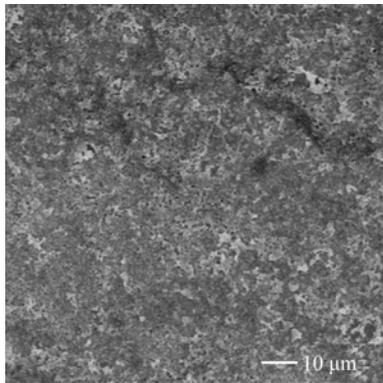


图 2 多孔分子印迹膜 SEM 表征

Fig. 2 SEM image of MIPs

3.3 多孔分子印迹膜修饰 SPR 传感器的测试

根据之前的研究结果^[21-22], 采用式(1)计算得到的 SPR 吸收光谱 $A(\lambda)$, 可以更加准确地确定共振波长:

$$A(\lambda) = -\log \left[\frac{I_S(\lambda) - I_B(\lambda)}{I_R(\lambda) - I_B(\lambda)} \right], \quad (1)$$

式中: $I_B(\lambda)$ 为光谱仪的背景信号, $I_R(\lambda)$ 和 $I_S(\lambda)$ 分别为空气和溶液样品条件下测得的反射光强度谱。

传感器对纯水以及应不同浓度微囊藻毒素 LR 水溶液 ($10^{-10} \sim 10^{-5}$ mol/L) 的共振吸收光谱如图 3 所示。随着微囊藻毒素 LR 浓度的增加, 分子印迹膜逐渐吸附微囊藻毒素 LR 分子, 共振吸收光谱逐渐红移。通过对光谱图高斯拟合后寻峰的方法来确定 SPR 共振波长。图 4 给出了 SPR 共振波长红移量 $\Delta\lambda_R$ (中心波长为 627.66 nm) 与微囊藻毒素 LR 浓度 c 的对数值的相关性, 最终信号值 $\Delta\lambda_R$ 为 3 次重复试验平均值, 噪声为多次实验差异。

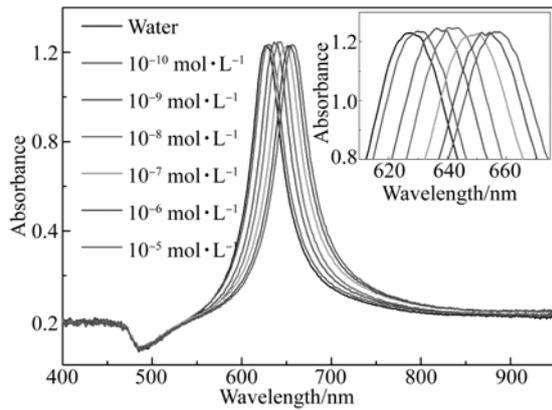


图 3 SPR 传感器对不同浓度微囊藻毒素 LR 溶液的共振吸收谱

Fig. 3 Absorption spectrum of SPR sensor to microcystin-LR solution with different concentrations

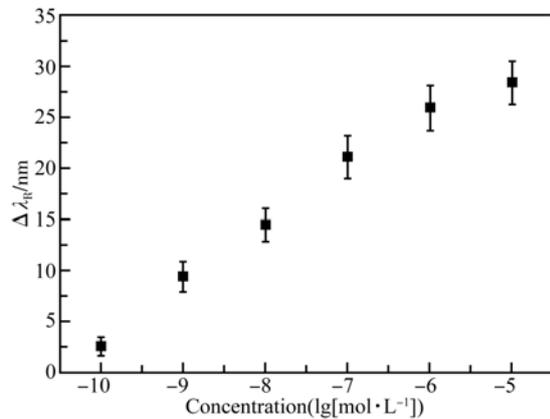


图 4 共振波长红移量(中心波长为 627.66 nm)与微囊藻毒素 LR 浓度的对数值的依赖关系 ($n=3$)

Fig. 4 Relationship between shift in resonance wavelength (central wavelength is 627.66 nm) and the logarithm of LR concentration

为了得到传感器的对微囊藻毒素 LR 的最低检测限, 将 $10^{-10} \sim 10^{-6}$ mol/L 微囊藻毒素 LR 浓度内信噪比 S/N 与微囊藻毒素 LR 浓度 c 的对数值进行了线性拟合:

$$S/N = \Delta\lambda_R / N = 2.47 \lg(c) + 26.88. \quad (2)$$

当信号为 3 倍噪声时, 即 $S/N=3$, 计算得到传感器的最低检测限为 2.1×10^{-9} mol/L。

从图 3(b) 可以看出, 被测微囊藻毒素 LR 在较低浓度时 ($10^{-10} \sim 10^{-6}$ mol/L), 共振波长红移量 $\Delta\lambda_R$ 与微囊藻毒素 LR 的浓度 c 的对数值线性相关, 当被测样品浓度继续升高后, 微囊藻毒素 LR 分子印迹膜的吸附逐渐达到饱和状态, 共振波长红移趋于平衡。

将 $10^{-10} \sim 10^{-6}$ mol/L 浓度内共振波长红移量 $\Delta\lambda_R$ 与微囊藻毒素 LR 的浓度 c 的对数值进行线性拟合,拟合结果如下 ($R^2 = 98.6\%$):

$$\Delta\lambda_R = 5.83 \lg(c) + 61.37. \quad (2)$$

在 $10^{-10} \sim 10^{-6}$ mol/L 微囊藻毒素 LR 浓度内信号与样品浓度的线性关系意味着传感器在动态测量 ($2.1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-6}$ mol/L) 内有着进行定量检测微囊藻毒素 LR 的能力。

为了探讨传感器的定量检测能力,使用传感器对 $2.1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-6}$ mol/L 微囊藻毒素 LR 浓度内不同浓度样品进行了检测,并通过式(2)计算出来的浓度值与实际值进行了对比(表1)。传感器的实验值与实际值误差不大于 9.4%。表明了传感器在定量检测微囊藻毒素 LR 方面的潜力且定量检测能力良好。

为了验证传感器的特异性,使用传感器检测 10^{-6} mol/L 的微囊藻毒素 RR(微囊藻毒素 LR 的异构体)溶液,发现产生的 SPR 共振波长红移量为 4.543 nm,相对同等浓度微囊藻毒素 LR 样品的 25.951 nm,检测样品信号约为干扰样品信号 6 倍,结果表明传感器对于微囊藻毒素 LR 的检测具有很好的特异性检测能力。

参考文献:

- [1] WOOD R W, XLII. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum [J]. *Philosophical Magazine Series*, 1902, 6(4): 396-402.
- [2] 黄强,王敏,李昂,等. 对称型长程表面等离子体共振分析系统 [J]. *光学精密工程*, 2014, 22(1): 44-49. HUANG Q, WANG M, LI A, *et al.*. Symmetrical long range surface plasmon resonance sensing system [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2014, 22(1): 44-49. (in Chinese)
- [3] CHINOWSKY T M, SOELBERG S D, BAKER P, *et al.*. Portable 24-analyte surface plasmon resonance instruments for rapid, versatile biodetection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(9): 2268-2275.
- [4] ZHANG Y, WEI J, MENG C Y, *et al.*. Detection of penicillin via surface plasmon resonance biosensor [J]. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2012, 28(5): 792-796.

表1 传感器探测的微囊藻毒素 LR 的浓度值和实际浓度值的对比

Tab. 1 Comparison of concentration calculated from sensor response and actual concentration of microcystin-LR

实际浓度/(mol · L ⁻¹)	5×10^{-9}	4×10^{-8}	8×10^{-7}
实验 $\Delta\lambda_R$ /nm	12.86	18.05	26.05
计算浓度 (mol · L ⁻¹)	4.78×10^{-9}	3.70×10^{-8}	8.75×10^{-7}
误差/%	-4.4	-7.5	9.4

4 结 论

基于 SPR 传感器和分子印迹技术设计了新型的微囊藻毒素 LR 的检测传感器,该传感器不仅具有对于微囊藻毒素 LR 的定量检测能力,动态测量可达 $2.1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-6}$ mol/L,同时具有良好的特异性检测能力。研究结果表明原位聚合法合成分子印迹膜在 SPR 传感器上可以得到良好应用,SPR 传感器和分子印迹技术的结合具备良好前景,将在小分子检测方面得到更加广阔的应用。

- [5] 王弋嘉,张崇磊,王蓉,等. 差分干涉表面等离子体共振传感器的优化与验证 [J]. *光学精密工程*, 2013, 21(3): 672-679. WANG G J, ZHANG CH L, WANG R, *et al.*. Optimization and validation of differential interferometric surface plasmon resonance sensor [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2013, 21(3): 672-679. (in Chinese)
- [6] ZHANG Z, LU D F, LIU Q, *et al.*. Wavelength-interrogated surface plasmon resonance sensor with mesoporous-silica-film-enhanced sensitivity to small molecules [J]. *Analyst*, 2012, 137(20): 4822-4828.
- [7] LI Q, HE H, WANG J, *et al.*. Label-free detection of biotin using nanoporous TiO₂/DNA thin-film coated wavelength interrogated surface plasmon resonance sensors [J]. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2014, 30(1): 157-162.
- [8] 栗大超,李国卿,张晶鑫,等. GGBP 蛋白修饰的表面等离子体共振微创血糖检测仪 [J]. *光学精密工程*, 2013, 21(9): 2333-2339. LI D CH, LI G Q, ZHANG J X, *et al.*. Minimally-invasive blood glucose detection instrument based on

- surface plasmon resonance sensor decorated with GGBP [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2013, 21(9), 2333-2339. (in Chinese)
- [9] 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): 2365-2372.
- QI P, LI Y, FENG M CH, *et al.*. Scanning surface plasmon resonance biosensor for array sample detection [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2012, 20(11): 2365-2372. (in Chinese)
- [10] LI Y, XIA L, ZHAO L. Recent developments and applications of surface plasmon resonance biosensors for the detection of mycotoxins in foodstuffs [J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(3): 1549-1554.
- [11] RAMSTROM O, ANSELL R J. Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future [J]. *Chirality*, 1998, 10(3): 195-209.
- [12] CHINANELLA I, PILETSKY S A, TOTHILL I E, *et al.*. MIP-based solid phase extraction cartridges combined with MIP-based sensors for the detection of microcystin-LR [J]. *Biosensors & bioelectronics*, 2003, 18(2-3): 119-127.
- [13] LOTIERZO M, HENRY O Y F, PILETSKY S, *et al.*. Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 20(2): 145-152.
- [14] CARMICHAEL W W. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins [J]. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1992, 72(6): 445-459.
- [15] PELANDER A, OJANPERA I, SIVONEN K, *et al.*. Screening for cyanobacterial toxins in bloom and strain samples by thin layer chromatography [J]. *Water Research*, 1996, 30(6): 1464-1470.
- [16] MEZ K, BEATTIE K, GODD G, *et al.*. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland [J]. *European Journal of Phycology*, 1997, 32(2): 111-7.
- [17] HARADA K I. Trace analysis of microcystins [J]. *Phycologia*, 1996, 35(6S): 36-41.
- [18] CHU F S, HUANG X, WEI R D. Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms [J]. *Association of Official Analytical Chemists*, 1990, 73(3): 451-456.
- [19] XU L H, LAM P K S, CHEN J P, *et al.*. Use of protein phosphatase inhibition assay to detect microcystins in Donghu Lake and a fish pond in China [J]. *Chemosphere*, 2000(1-2), 41: 53-58.
- [20] HE H, ZHOU L, WANG Y, *et al.*. Detection of trace microcystin-LR on a 20 MHz QCM sensor coated with in situ self-assembled MIPs [J]. *Talanta*, 2015, 131: 8-13.
- [21] 张喆, 祁志美. TiO₂ 纳米多孔薄膜漏模光波导共振传感器研究小分子的光谱灵敏度 [J]. *分析化学*, 2010, 38(11): 538-1543.
- ZHANG ZH, QI ZH M. Study of spectral sensitivity to small molecule analytes using TiO₂ nanoporous thin-film leaky waveguide resonance sensors [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2010, 38(11): 1538-1543. (in Chinese)
- [22] QI Z N, ITARU H, ZHOU H S. Nanoporous leaky waveguide based chemical and biological sensors with broadband spectroscopy [J]. *Applied Physics Letters*, 2007, 90(1): 011102.

作者简介:



何 皓(1992—),男,博士研究生,安徽安庆人。2012年于中国科技大学少年班获得学士学位,主要从事生物传感器等方面的研究。E-mail: 281513350@qq.com



周连群(1981—),男,山东金乡人,博士,副研究员,2010年于法国 Université de Franche-Comté 大学和中科院研究生院获博士学位,主要从事生物微纳传感器及系统方面的研究。E-mail: zhoulq@sibet.ac.cn

(版权所有 未经许可 不得转载)