

基于对羟基桂皮醇的新型酶联荧光免疫传感系统 测定布氏杆菌抗体

湛雪辉, 周随安, 龚福春, 李飞, 曹芬, 李侠

(长沙理工大学 化学与生物工程学院, 湖南 长沙, 410076)

摘要: 以一种纯天然产物对羟基桂皮醇(4-hydroxycinnamic alcohol, HCA)为辣根过氧化物酶(HRP)底物, 建立对羟基桂皮醇-辣根过氧化物酶-过氧化氢新体系。对羟基桂皮醇本身只有极弱的荧光, 在 HRP 催化下可被 H_2O_2 氧化成二聚体产物, 该二聚体在 315 nm 的激发光下能发射波长为 467 nm 的强荧光, 并且反应体系荧光强度增加值与 HRP 量在一定浓度范围内呈线性相关。根据此关系和竞争型免疫定量原理, 建立兔布氏杆菌抗体测定的荧光酶联免疫传感体系, 并对免疫测定条件如 pH 值、HRP-BrAb 用量、BSA 和流速等进行优化。运用制备传感体系测定兔布氏杆菌抗体的质量浓度线性范围为 2.7~90 $\mu\text{g/L}$, 检测限为 2.7 $\mu\text{g/L}$, 相对标准偏差为 4.6%; 对羟基桂皮醇在空气中较稳定, 对人体无毒害, 在临床上可代替传统 HRP 底物。

关键词: 对羟基桂皮醇; HRP 荧光底物; 布氏杆菌抗体; 免疫传感体系

中图分类号: O656.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-7207(2010)03-0890-06

An enzyme-linked fluoroimmunosensing system for *Brucella melitensis* antibody detection based on a novel substrate 4-hydroxycinnamic alcohol for HRP

ZHAN Xue-hui, ZHOU Sui-an, GONG Fu-chun, LI Fei, CAO Fen, LI Xia

(School of Chemical and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410076, China)

Abstract: A natural product, 4-hydroxycinnamic alcohol (HCA) was used as a substrate for HRP in enzyme-linked fluoroimmunoassay. In enzymatic reaction procedure, HRP-*Brucella melitensis* antibody conjugate (HRP-BrAb) catalyze the polymerization of HCA by H_2O_2 , and the HCA is partly converted to polymers, a fluorescent species. The fluorescence increase of the HRP-enzymatic product at emission of 467 nm (excitation at 315 nm) is proportional to the concentration of HRP-BrAb binding to the *Brucella melitensis* antigens, which were entrapped in cellulose-paraffin matrix. The linear range of determination for BrAb is 2.7~90 $\mu\text{g/L}$ with the relative standard deviation of 4.6%. The detection limit is 2.7 $\mu\text{g/L}$. HCA is stable in air and non-toxic to human health. The proposed method can be used for analysis of commercial formulation and plasma sample with satisfactory results.

Key words: 4-hydroxycinnamic alcohol; HRP fluorogenic substrate; *Brucella melitensis* antibody; immunosensing system

由于酶联免疫分析方法结合了酶的催化放大和免疫反应的特异性, 具有分析灵敏度高和选择性好的特

点, 在实际中得到了广泛应用。基于辣根过氧化物酶(HRP)的酶联免疫分析是其中应用最成功的方法之

收稿日期: 2009-06-30; 修回日期: 2009-09-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20976017, 50774016)

通信作者: 湛雪辉(1972-), 男, 湖南岳阳人, 博士, 副教授, 从事精细化工的研究; 电话: 13574813956; E-mail: zhanxueh@163.com

—^[1-5],该方法通常利用 HRP 标记抗体/抗原,通过 HRP 催化 H_2O_2 氧化酶底物,生成不同二聚或多聚产物如醌式或偶氮类物质等。然后,采用分光光度、电化学或化学/电化学发光等方法测定酶催化产物的光/电信号,间接测定抗体/抗原或半抗原。因此,HRP 酶底物体系决定了所选择方法的灵敏性、检测限及稳定性等性能。目前,HRP 主要底物有苯二胺类^[6]、氨基酚类^[7]、联苯胺类^[8]以及由苯胺类衍生出来的一些偶氮染料^[9]等,但是,这些底物存在以下不足:(1)稳定性差,多数见光或在空气中极易被氧化,底物保存困难,一般只能现配现用;(2) H_2O_2 单独氧化底物的信号强,体系背景信号较强;(3)有的底物或反应产物对人类身体有毒害作用^[10-11],如偶氮染料、苯胺和苯二胺等。针对上述问题,本文作者对 HRP 底物进行研究。以免布氏杆菌抗体为分析对象,建立了以对羟基桂皮醇为 HRP 底物的酶联荧光免疫分析方法。该方法由于将 ELISA 方法的酶的积累放大作用与荧光检测相偶联,与电化学方法和紫外-可见光度法相比灵敏度有较大提高。这种方法初步用于血清样品测定,结果与其他方法所得结果相吻合,可以满足临床分析的要求。

1 实验

1.1 仪器

HITACHI F4500 荧光光谱仪,用于荧光测定;江苏产蠕动泵,用于产生水流;重庆产 CSS501 型恒温水浴槽,用于控制培育温度。

1.2 试剂

辣根过氧化物酶(HRP,编号为 EC 1.11.1.7,比活力 $RZ > 3$)和对羟基桂皮醇(4-hydroxycinnamic alcohol,HCA),购于 Sigma 公司;微晶纤维素和石蜡,购于上海化学试剂公司;布氏杆菌抗原(BrAg)和布氏杆菌抗体(BrAb),由湖南省生物与机电职业技术学院提供;1.00 mmol/L 对羟基桂皮醇储备液:将 2.31 mg 对羟基桂皮醇(Sigma 公司)溶于 100 mL 无水乙醇中,避光保存,使用时用 pH=6.8 的 B-R 缓冲液稀释。本实验所用的其他溶液用二次蒸馏水制备。

1.3 酶标抗体(HRP-BrAb)的制备

在 10 mL pH 值为 6.8 的磷酸缓冲溶液(PBS)中加入适量的 HRP(3.5 mg)和 2 mL 体积分数为 1%的戊二醛,充分混合,在室温下培育 12 h。将得到的溶液在温度为 4 ℃、浓度为 10 mmol/L PBS 和 0.15 mol/L

NaCl 溶液(pH 为 7.2)中透析过夜。将溶解在 1 mL pH 值为 9.6 的由 0.15 mol/L NaCl 和 0.1 mol/L Na_2CO_3 组成的溶液中的 BrAb(5 mg)与透析过的 HRP-戊二醛溶液混合,在 4 ℃ 培育 24 h。得到的溶液在 10 mmol/L, pH 值为 7.2 的 PBS 中透析。用 Sephadose G-200 柱凝胶过滤进一步纯化,即得 HRP-BrAb 连结物(0.48 g/L),于 4 ℃ 储存备用。

1.4 布氏杆菌抗原的固定

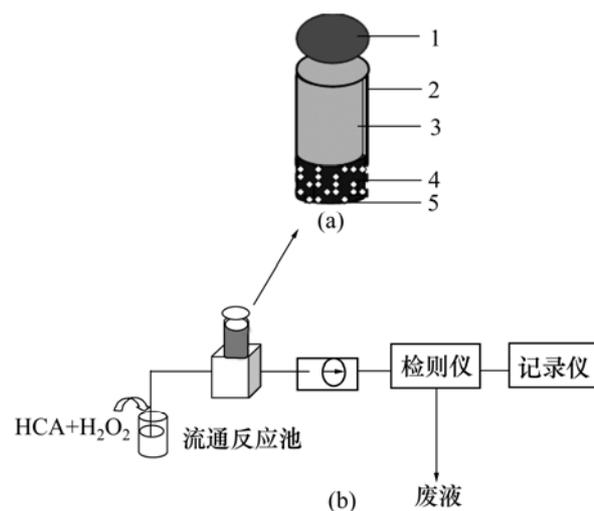
取 5.5 mg BrAg 和 12 mg 牛血清白蛋白(BSA)溶解在 1.5 mL pH 值为 7.0 的冷 PBS 中(4 ℃),该溶液与 0.9 g 微晶纤维素粉充分混合,然后,将混合物置于干燥器中于 4 ℃ 干燥。将吸附有 BrAg-BSA 的干粉与石蜡按质量比 1:1 混合(石蜡事先溶解在乙醚中),待乙醚挥发后(约 5 min),将得到的糊状物挤压进直径为 6 mm 的聚氯乙烯(PVC)管中,管另一端是旋转螺帽。生物组分—纤维素—石蜡支撑体的结构如图 1(a)所示。

1.5 生物组分—纤维素—石蜡支撑体的再生

通过旋转螺帽使纤维素—石蜡—生物组分复合物层挤出约 0.1 mm,用水润湿后在三氧化二铝砂纸(0.05 μm)上抛光,用二次蒸馏水冲洗即可获得更新的表面。

1.6 测定步骤

酶联荧光免疫分析程序如图 1(b)所示,操作步骤如下:第 1 步,将更新后的支撑体 A 放在 5 mL 含有 100 μL HRP-BrAb(0.48 mg/L)和不同体积的 BrAb(分析物)组成的缓冲溶液(质量分数为 0.1% 的 BSA,



1—PVC 螺帽;2—PVC 管;3—PVC 螺体;4—溶胶凝胶—石墨基质;5—布氏杆菌抗原(BrAg)

(a) 布氏杆菌抗原支持体结构;(b) 酶联免疫传感测定示意图

图 1 布氏杆菌抗体测定传感体系

Fig.1 Configuration of biocomposite support body and schematic diagram of injection system coupling with fluometry

pH=7.5, 0.1 mmol/L Tris-HCl)中培育 30 min;第 2 步, 培育后的支撑体用缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl-KCl, pH=7.5)充分冲洗, 荧光测定前储存在相同的缓冲液中;将处理好的支撑体安装到流通反应池中。

含有 2.5×10^{-7} mol/L HCA 底物溶液通过蠕动泵泵入反应池, 测定激发光波长为 315 nm 时 467 nm 处 HCA 的荧光, 加入一定量的 5×10^{-7} mol/L H_2O_2 于 HCA 溶液中, 当含有 HCA 和 H_2O_2 的底物溶液流过支撑体表面时, 连接在支撑体表面的 HRP-BrAb-BrAg 复合物中的 HRP 催化 H_2O_2 氧化 HCA, 使一部分 HCA 转化为强荧光的物质。通过测定 HCA 底物溶液荧光强度的变化可定量测定样品中的 BrAb。

2 结果与讨论

2.1 酶催化反应机理及定量基础

对羟基桂皮醇(4-hydroxycinnamic alcohol, HCA) 是广泛存在于植物体内的天然活性成分, 其中以肉桂皮和紫苏油含量较高, 它在植物体中通过氧化可以形成木脂素, 还起到抗氧化作用^[12-13]。本研究中将 HCA 用作 HRP 底物, 在 BrAb 测定中起信号分子的作用, 以 HCA 为底物的酶催化反应机理与文献^[14-16]中报道的类似, 可以表示为如图 2 所示机理: HCA 只有很弱的荧光, 当 HRP 催化 H_2O_2 氧化 HCA 时, 生成自由基中间体, 然后 2 个含自由基的中间体转化为二聚体产物(强荧光物质), 体系荧光强度增加。

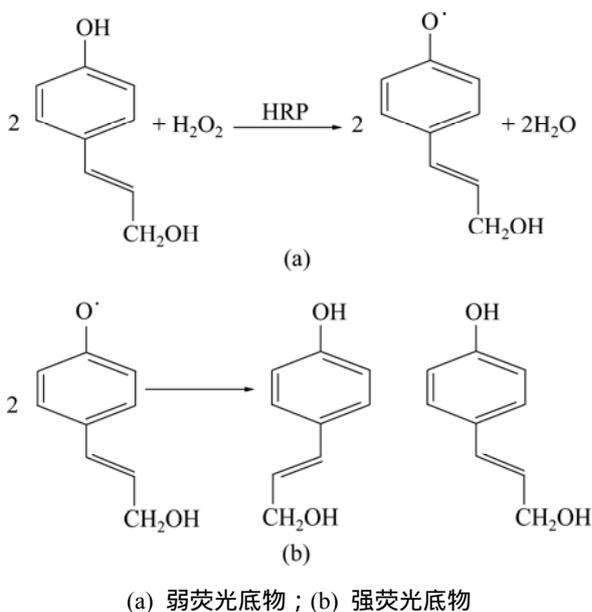
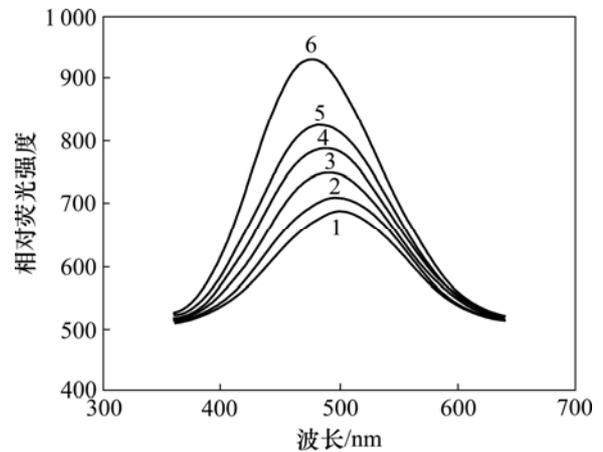


图 2 酶催化反应机理

Fig.2 Mechanism of HRP-catalyzed reaction

在竞争免疫反应分析过程中, 分析样品中的 BrAb 和加入的标准溶液 HRP-BrAb 竞争结合到固定的 BrAg 上。连接到支持生物组分表面的 HRP-BrAb 的量与分析样品中 BrAb 的量成反比, 因此, 样品中 BrAb(分析物)浓度与 HCA 溶液荧光强度增加成反比。这就是本方法进行免疫分析测定 BrAb 的基础。

对 HCA-HRP- H_2O_2 反应体系的荧光特性进行研究, 结果表明: 底物 HCA 在 312 nm 处仅有 1 个极弱的荧光发射峰(激发峰为 299 nm)。图 3 所示是 HRP-BrAb 催化 H_2O_2 氧化 HCA 的荧光光谱图, 可以看出: 在底物 HCA 溶液中加入 HRP-BrAb 和 H_2O_2 后, 酶产物在 467 nm 处有 1 个较大的荧光发射峰(激发波长为 315 nm), 且在一定范围内荧光增加与 HRP-BrAb 呈线性相关。



磷酸-柠檬酸缓冲溶液中, 含 2.5×10^{-5} mol/L HCA, 5×10^{-5} mol/L H_2O_2 , pH=4.5, 催化反应 1 min

HRP-BrAb 的质量浓度/($mg \cdot L^{-1}$): 1— 1.9×10^{-6} ; 2— 9.6×10^{-7} ; 3— 4.8×10^{-7} ; 4— 2.4×10^{-7} ; 5— 1.2×10^{-7} ; 6— 6.0×10^{-8}

图 3 HRP-BrAb 催化 H_2O_2 氧化 HCA 的荧光光谱

Fig.3 Fluorescence spectra of HCA solution catalyzed by HRP-BrAb

2.2 降低支撑体表面非特异性吸附方法

因抗原抗体间的结合力较强, 免疫传感体系实际应用的主要障碍之一是生物反应表面再生困难。使用微纤维素-石蜡吸附和包埋 BrAg 除了有利于保持活性外, 支撑体表面可通过简单的抛光得到更新。为了降低 HRP-BrAb 与支持体表面的非特异性吸附, 加入 BSA 可以占据微纤维素-石蜡基质多余的位点。微纤维素对 HRP-BrAb 和 BrAb 生物分子有相容性, 有利于免疫反应。对微纤维素(Cellulose)与石蜡(paraffin)的质量比进行研究, 表 1 所示是采用不同比例的纤维素和石蜡制备生物组分支持体获得的荧光强度。由表

1 可知: 在生物复合物中加入质量分数为 0.1% BSA 能降低 HRP-BrAb 在支持体表面的非特异性吸附, 表明 BSA 能与 BrAb 和 HRP-BrAb 竞争占据基质表面的多余位点。实验还表明: 增加纤维素含量有利于提高一定量 HRP-BrAb 引起的荧光响应, 但所记录的信号不稳定。故本研究中纤维素/石蜡的质量比选定为 1:1。

表 1 BSA 对荧光强度的影响

Table 1 Effect of BSA on fluorescence intensity

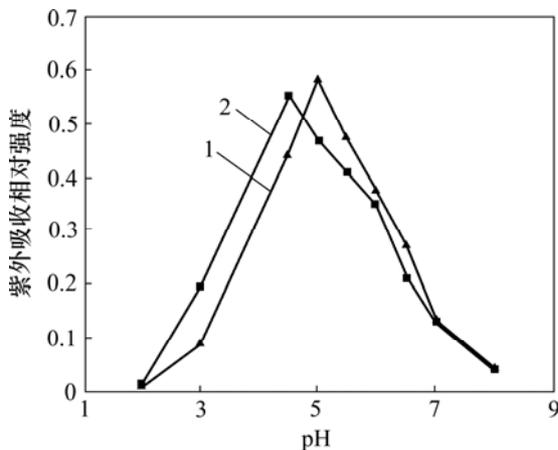
基质组成	荧光强度增加值*
微纤维素-石蜡	52
微纤维素-石蜡-BSA	11
微纤维素-石蜡-BrAg	287
微纤维素-石蜡-BrAg-BSA	273

* 荧光强度为任意单位。

2.3 溶液 pH 的影响

除 HCA 溶液本身的荧光强度易受 pH 影响外, HRP-BrAb 的活性和 HRP-Ab-Ag 复合物增加值的稳定性也受 pH 的影响。对 pH 对 HCA 溶液本身的荧光强度的影响进行研究, 结果显示: pH < 6 时, 荧光强度随 pH 增加而增加, pH > 6 时, 呈下降趋势。这可能是 pH 影响了 HCA 基态和激发态的平衡的原因。

对 pH 对 HRP-BrAb 的催化作用及 HRP 本身的影响也进行了研究, 结果如图 4 所示。可见: HCA 酶催化反应的产物在可见区 315 nm 处有吸收峰, 通过测定 315 nm 处的吸收峰可以估计酶催化反应活性; HRP-BrAb 催化产物对紫外光的吸收随 pH 增加而增加, 至 pH=5.5 时趋于稳定, 在更高 pH 下, 吸收趋于



1—辣根过氧化物酶; 2—抗体-辣根过氧化物酶连接物
紫外测定波长为 315 nm

图 4 pH 对酶活性的影响

Fig.4 Effect of pH on activity of HRP

下降, 表明催化反应的最佳 pH 为 5.5, 这与 HRP 直接催化反应的最佳 pH 略有不同(pH=5.0), 可能是 HRP 与带电荷的 BrAb 交联后使 HRP-BrAb 带更多正电致使 pH 低于酶反应的原始 pH 的缘故。但 pH 太低不利于 BrAb 与 BrAg 的紧密结合, 当底物溶液流过生物复合物的表面时, 将导致 HRP-BrAb 损失。因此, 本研究中采用的 pH 为 5.5。

2.4 流速对荧光强度的影响

当 HCA 和 H₂O₂ 被连续传送到流通反应池中时, HCA 和 H₂O₂ 与 HRP-BrAb 接触并发生反应, 使测量体系荧光信号发生变化, 底物的流动速度直接影响 HCA 和 H₂O₂ 与 HRP-BrA 接触机会。如图 5 所示: 底物溶液流速越低, 荧光信号增加越大, 但流速过低会使分析时间延长。本实验中采用的流速为 30 mL/h。

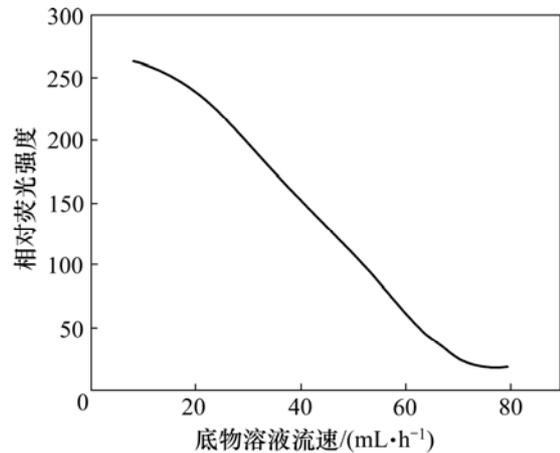


图 5 底物溶液流速对荧光的影响

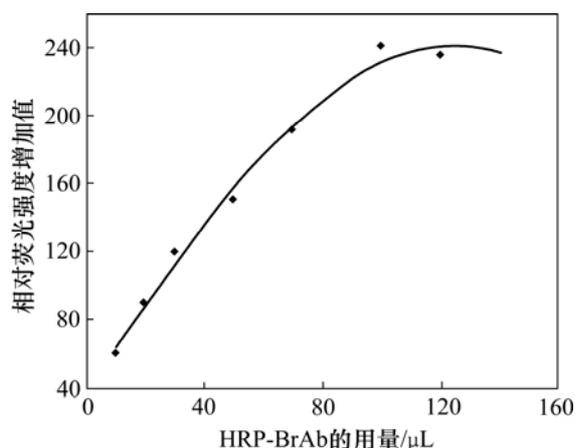
Fig.5 Effect of flow rate of substrate carrier solution on fluorescence

2.5 实验参数的优化

图 6 所示为 HRP-BrAb 的用量对荧光强度的影响。可见: 在 5 mL 包含有不同浓度的 HRP-BrAb 的培育液中, 响应随 HRP-BrAb 用量的增加而增加, 至 100 μL HRP-BrAb(0.48 mg/L)后趋于饱和。这是因为免疫传感器表面抗原结合位点的量是有限的。因此, 本实验采用在 5 mL 培育液中加入 100 μL HRP-BrAb 为基本工作液。实验表明: 最佳培育温度为 27 °C, 最佳培育时间为 30 min。

2.6 传感装置的应用

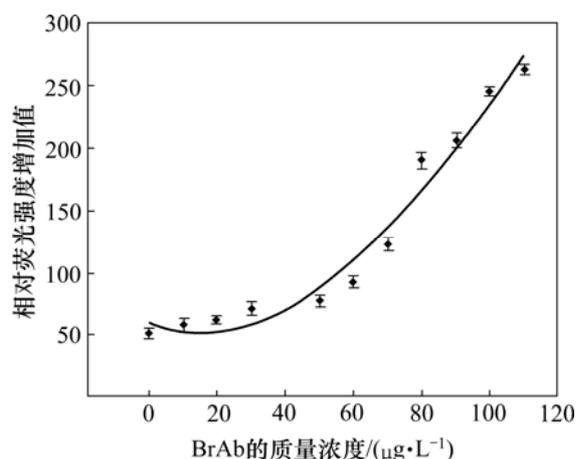
图 7 为测定 BrAb 的校正曲线。由图 7 可知: 底物溶液荧光强度和培育液中的 BrAb 呈相关性, 线性范围为 2.7~90 μg/L, 检测限为 2.7 μg/L。此方法的检测限低于用压电免疫传感方法的检测限(7.2 μg/L)。



HRP-BrAb 的质量浓度为 0.48 mg/L

图 6 HRP-BrAb 用量对荧光强度的影响

Fig.6 Effect of amount of HRP-BrAb on fluorescence strength



此图为免疫传感体在包含有不同浓度 BrAb 抗体、0.48 μg/mL BrAb-HRP 和体积浓度为 0.1% BSA 的 0.1 mol/L Tris-HCl-1 mmol/L EDTA 缓冲溶液中测定的曲线。每个点表示 4 次测定的平均值相对偏差(3.5%~6.1%)

图 7 BrAb 测定的工作曲线

Fig.7 Calibration curve for BrAb determination obtained by competitive immunoassay

以质量浓度为 55 mg/L 的 BrAb 作标准溶液测定此方法的重现性, 结果和标准偏差见表 2。由表 2 可知: 该免疫传感体系的重现性较高。

表 2 免疫传感方法的重现性

Table 2 Reproducibility of immunosensing system

样品组号	荧光增加值	平均值	偏差/%
	275, 280, 265, 277, 267, 271	272.5	2.2
	208, 226, 230, 214, 240, 232	225.0	5.3

表 2 组中的每一个数值代表 1 个生物组分支持体表面经过抛光、培育和荧光测定步骤后所测得的荧光增加值; 培育中 BrAb 的质量浓度为 0.055 g/L。表 2 组为用不同生物组分支持体的测定值。即用过的支持体在存放时间为 1.5 月后的更新表面的测定值。使用次数为 68 次, 累计使用时间 79 h(温度为 27)。

制备的免疫传感装置用于检测被感染的兔血清样品(湖南生物机电职业技术学院提供), 结果见表 3。由表 3 可知: 用此方法测定的结果与 ELISA 法测定的结果较吻合。所以, 此法可用于检测血清样品中的 BrAb。

表 3 兔血清样品中 BrAb 含量的测定

Table 3 BrAb determination in rabbit serum samples μg/L

样品号	新酶联免疫传感方法	酶联免疫吸附分析法
1 号(31 d)	4.31±0.27	4.42
2 号(41 d)	5.85±0.36	5.44
3 号(53 d)	7.82±0.51	7.29
4 号(268 d)	11.35±0.57	11.43

注: 以布氏杆菌感染的时间表示样品感染度; 使用时样品稀释 100 倍; 新酶联免疫法为 4 次测定偏差的平均值。

3 结论

基于新底物对羟基桂皮醇的酶联荧光免疫分析方法与传统测定 BrAb 的免疫分析方法相比, 具有较大优势:

- (1) 实现了酶联荧光免疫传感测定 BrAb, 灵敏度提高, 实验步骤大大简化。
- (2) 可进行支持生物组分表面更新, 分析成本降低。
- (3) 微纤维素-石蜡基质直接包埋完整细菌方法简单, 有利于布氏杆菌抗原活性的保持。
- (4) 新底物为天然产物, 对人体无毒害作用。这种方法对其他免疫试剂测定也有借鉴作用。

参考文献:

- [1] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G[J]. Immunochemistry, 1971, 8(5): 871-874.
- [2] Carlo M D, Mascini M. Enzyme immunoassay with amperometric flow-injection analysis using horseradish peroxidase as a label. Application to the determination of

- polychlorinated biphenyls[J]. *Anal Chim Acta*, 1996, 33(6): 167-174.
- [3] Takatoshi S, Masanori Y, Hiroya I, Kiyoshi M. Flow injection analysis of amitrole by chemiluminescent immunosensor using alkaline phosphatase and adamantyl methoxyphosphoryloxy phenyldioxetane[J]. *Anal Sci*, 2001, 17(5): 1407-1410.
- [4] Hossein S, Martin G S, Oliver H, et al. Development of enantioselective chemiluminescence flow- and sequential injection immunoassays for α -amino acids[J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2002, 53(1): 1-14.
- [5] Villarta R L, Guilbault G G, Suleiman A A. Flow injection analysis of glucose by fibre optic chemiluminescence measurement[J]. *Anal Lett*, 1993, 26(4): 1493-1503.
- [6] Lonergan G, Mew E, Schliephake K, et al. Phenolic substrates for fluorometric detection of laccase activity[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 153(2): 485-490.
- [7] Ci Y X, Chen L, Wei S. Fluorescence reaction of the system mimetic peroxidase [Mn-T(4-TAP)P]-homovanillic acid-hydrogen peroxide. Spectrofluorimetric determination of H_2O_2 [J]. *Fresenius' J Anal Chem*, 1989, 33(4): 124-129.
- [8] Gong F C, Zhou Z J, Shen G L, et al. Schistosoma japonicum antibody assay by immunosensing with fluorescence detection using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as substrate[J]. *Talanta*, 2002, 58(2): 611-618.
- [9] Chen L, Chang W B. Studies on the structure of substrate for peroxidase[J]. *Chemical Research in Chinese Universities*, 1995, 16(5): 683-687.
- [10] Tatyana V V, Ian J R. Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 43(1): 138-144.
- [11] Michel P E, Rooij de N F, Koudelka-Hep, et al. Redox-cycling type electrochemiluminescence in aqueous medium. A new principle for the detection of proteins labeled with a ruthenium chelate[J]. *J Electroanal Chem*, 1999, 47(4): 192-194.
- [12] Lee H S. Tyrosinase inhibitors of Pulsatilla cernua root-derived materials[J]. *J Agri Food Chem*, 2002, 50(6): 127-132.
- [13] Zapata J M, Calderón A A, Muñoz R, et al. Oxidation of natural hydroxybenzoic acids by grapevine peroxidases: kinetic characteristics and substrate specificity[J]. *Am J Enol Vitic*, 1992, 43(1): 134-138.
- [14] Beier R C, Young C R, Stanker L H. USDA agricultural research service, detection of bacteria from a cecal anaerobic competitive exclusion culture with an immunoassay electrochemiluminescence sensor[J]. *Proc SPIE*, 1991, 35(44): 10-20.
- [15] Tuuminen T, Palomaki P, Rakkolainen A, et al. 3-p-hydroxyphenylpropionic acid-a sensitive fluorogenic substrate for automated fluorometric enzyme immunoassays[J]. *Immunoassay*, 1991, 12(1): 29-46.
- [16] Limoges B, Degrand C, Brossier P, et al. Homogeneous electrochemical immunoassay using a persulfonated ionomer-modified electrode as a detector for a cationic labeled hapten[J]. *Anal Chem*, 1993, 65(3): 1054-1060.

(编辑 任楚威)