

文章编号:1004-7220(2009)02-0089-05

· 生物力学测试与分析 ·

利用微悬臂梁传感对瘦肉精进行非标记检测

黄 渊¹, 薛长国¹, 张青川¹, 谭伟明², 王保民², 伍小平¹

(1. 中国科学技术大学 中科院材料力学行为和设计重点实验室, 合肥 230027; 2. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094)

摘要: 目的 利用微悬臂梁传感技术对瘦肉精抗原抗体的特异性结合进行检测。方法 将巯基化的瘦肉精抗体通过自组装修饰到微悬臂梁的金面, 在加入不同浓度的瘦肉精标准样品的过程中, 通过光杠杆原理监测微悬臂梁的实时弯曲信号。巯基化瘦肉精抗体的活性和微悬臂梁上抗原抗体的结合得到酶联免疫吸附(ELISA)实验的验证。结果 该系统能够检测至少 $1 \mu\text{g/L}$ 浓度的瘦肉精标准样品, 而且具有很强的选择性, 在对照实验中加入不含瘦肉精的 1 mg/L 氯霉素溶液没有响应。另外, 瘦肉精抗原抗体的结合导致微悬臂梁产生压应力, 而且微悬臂梁表面应力的改变与样品浓度的对数成线性关系。结论 利用微悬臂梁传感技术对瘦肉精的检测是可行的。

关键词: 微悬臂梁; 生物传感器; 瘦肉精抗原抗体; 表面应力

中图分类号: R155.5 文献标志码: A

Label-free detection of clenbuterol based on microcantilever

HUANG Yuan¹, XUE Chang-guo¹, ZHANG Qing-chuan¹, TAN Wei-ming², WANG Bao-min², WU Xiao-ping¹. (1. Key Laboratory of Mechanical Behavior and Design of Material of Chinese Academy of Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Objective A novel technology of microcantilever sensor platform for label-free detection of clenbuterol antigen-antibody specificity binding is reported. **Method** Thiolated clenbuterol antibody was immobilized on the gold-coated side of the microcantilever by self-assembled monolayer technique. Consequently the deflections of the microcantilever corresponding to the process of injecting different concentration of clenbuterol antigen were real-time monitored by optical lever technique. The activity of thiolated clenbuterol antibody and the clenbuterol antigen-antibody binding on the gold-coated side of the microcantilever were confirmed by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Result** The sensitivity of detecting clenbuterol is better than $1 \mu\text{g/L}$. Microcantilevers functionalized with thiolated clenbuterol antibodies were exposed to 1 mg/L of Chloramphenicol (CAP), and no significant response was detected, which confirmed the specificity of the immobilization method. In addition, clenbuterol antigen-antibody binding on the microcantilever generates a compressive surface stress and the surface stress is linear to logarithm of clenbuterol concentration over a range of concentration from 1 ng/mL to $1 \mu\text{g/mL}$. **Conclusions** It is possible for detection of clenbuterol by microcantilever sensor platform.

Key words: Microcantilever; Biosensor; Clenbuterol antigen-antibody; Surface stress

对畜牧产品中药物残留的检测对人体健康的保障具有十分重要的地位。酶抑制法、酶联免疫及试

纸条法和蛋白质芯片法是现有最常见的检测方法。酶抑制法只能笼统检测有机磷和氨基甲酸酯类杀虫

收稿日期:2009-02-10; 修回日期:2009-02-20

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2006CB300404); 国家自然科学基金项目(10627201;10732080)。

作者简介:黄 渊(1983-), 研究方向:基于微悬臂梁的生化传感。

通讯作者:张青川, 教授, Tel: (0551)3607613; Email: zhangqc@ustc.edu.cn。

剂,无法确定单一成分的残留;酶联免疫及试纸条法是目前最常用的快速检测方法,检测极限较高,能确定单一成分的残留,但是需要进行标记,底物存在污染,多残留难以定量;蛋白质芯片法检测极限与酶联免疫相当,能进行多残留检测,需要多个荧光标记物,但是需要昂贵的仪器。寻求无标记、高灵敏度且快速的检测手段一直是人们研究的目标。随着生物力学的发展,力学方法在生物、医学等领域中应用越来越广^[1,2]。

微悬臂梁传感是在原子力显微镜和机电系统出现后迅速发展起来的一种新型传感方法,在生化传感中有着很好的应用前景^[3]。研究发现,当微悬臂梁的单侧表面(一般为镀金面)有分子吸附或生化反应发生时,微悬臂梁的表面应力会发生变化,由于微悬臂梁上下表面化学性质不同,其上下表面应力会产生一个差值,从而导致微悬臂梁产生弯曲变形,利用光杠杆原理可以检测微悬臂梁的弯曲变形^[4]。近年来,这项新型技术应用于分子自组装^[5]、蛋白质分子构象转变^[6]、DNA双链杂交^[7]、癌症检测^[8]和转录因子^[9]等方面的研究。本研究小组用此方法研究了聚电解质^[10]和大分子的构象转变^[11]以及GST抗原抗体的结合^[12]。

瘦肉精学名为盐酸克伦特罗,分子结构式如图1所示,是一种肾上腺类神经兴奋剂。

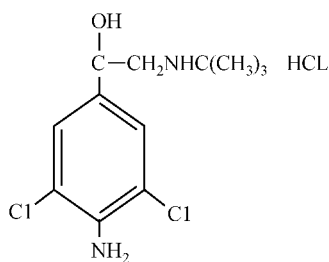


图1 瘦肉精分子结构式

Fig.1 Molecular structure of clenbuterol

猪食用瘦肉精后在代谢过程中促进蛋白质合成,加速脂肪的转化和分解,可以提高猪肉的瘦肉率。人体摄取一定量瘦肉精就会中毒,出现肌肉震颤、头晕、呕吐、腹泻、心跳过速和神经紊乱等症状,严重的会危及生命。本文将瘦肉精抗体修饰在微悬臂梁镀金表面,利用光测方法对不同浓度的瘦肉精进行检测,并通过ELISA对其进行了验证。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

巯基化瘦肉精抗体(应用盐酸硫醇亚胺进行抗体巯基化),瘦肉精标准样品 CLEN,瘦肉精标记酶 CLEN-HRP,氯霉素标准样品 CAP(以上4种样品均取于中国农业大学农学与生物技术学院);96孔ELISA板(Nunc);包被液(0.75 g Na₂CO₃ + 1.465 g NaHCO₃ + 500 ml 去离子水);PBS(4.0 g NaCl + 0.1 g KH₂PO₄ + 1.48 g Na₂HPO₄ · H₂O + 500 ml 去离子水);TPBS(PBS + 0.5% Tween-20);98%浓硫酸;30%双氧水,均为分析纯。

1.2 微悬臂梁传感实验原理及装置

微悬臂梁传感实验装置如图2所示,微梁固定在盛有缓冲液的反应容器(0.5 mL)内,实验中所用微悬臂梁为氮化硅材料,三角型,长200 μm,宽40 μm,厚0.5 μm,在单侧表面有厚度为60 nm的镀金层(电镜照片见图2)。激光器发出的激光束聚焦在微悬臂梁的端部,反射光束被位置敏感探测器(Position Sensitive Detector, PSD)接收,当微悬臂梁发生弯曲变形时,反射光束随之发生偏移,PSD将此偏移信息转化为相应的电信号输出,读取此输出信号即可实现对微悬臂梁变形的检测,微悬臂梁自由端部的最小可分辨位移为0.1 nm。样品溶液由微流量蠕动泵控制进出容器,在本文实验中均以3 mL/h的恒定速度流动,进行缓冲液和反应溶液的置换。在容器底部用热电制冷器控制溶液温度,利用潜水泵作为水循环系统的动力,温度稳定度为0.01 K。整个实验装置放在光学防震实验平台上,实验时容器恒温在37 °C。

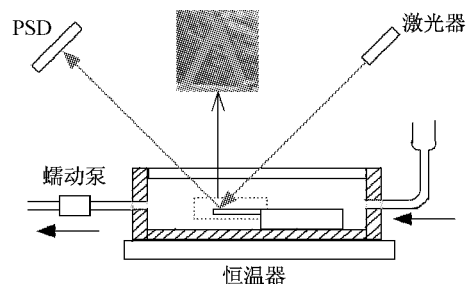


图2 微梁传感实验装置示意图

Fig.2 Schematic diagram of the microcantilever sensor experimental setup

1.3 微悬臂梁上抗体的修饰

首先,将镀金氮化硅微悬臂梁的表面浸入“piranha dip”(H₂O₂: H₂SO₄ = 1: 3)溶液中 30 min(室温),取出后用去离子水冲洗,然后放入修饰巯基(-HS)的瘦肉精抗体溶液中 2 h(37 °C),取出后用 TPBS 冲洗,氮气吹干。然后将微悬臂梁固定在图 2 所示的装置中并流动 PBS 进行监测,等信号稳定后加入 CLEN,抗原抗体结合致使微悬臂梁弯曲的示意图如图 3 所示。

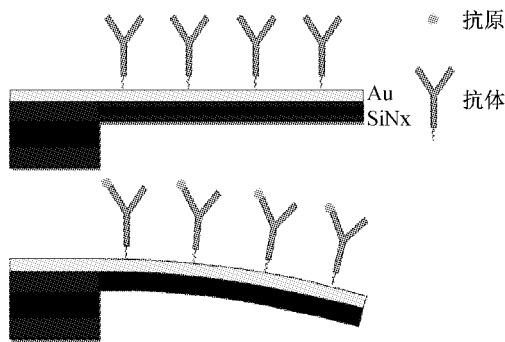


图 3 抗原抗体结合导致微悬臂梁弯曲示意图

Fig.3 Schematic diagram of bending of microcantilever due to antigen-antibody interaction

1.4 ELISA 对比实验

巯基化瘦肉精抗体的活性验证:在 ELISA 孔板上选择 8 个孔(称为孔 1~孔 8)分别进行如下操作:用瘦肉精抗体溶液(将瘦肉精抗体用包被液稀释至 1 μg/mL)对孔 1~4 进行包被,巯基化瘦肉精抗体溶液(将瘦肉精抗体用包被液稀释至 1 μg/mL)对孔 5~8 进行包被,然后在 37 °C 下温育 3 h;倾去包被液后用 TPBS 进行清洗;在孔 1~4 及 5~8 按顺序添加浓度为 50 μg/L、5 μg/L、0.5 μg/L 和 0 μg/L 的 CLEN 溶液 100 μL,以及浓度为 1 μg/L 的 CLEN-HRP 100 μL;半小时(37 °C)后用 TPBS 进行清洗,然后加入显色剂进行显色。

微悬臂梁上抗原抗体结合的 ELISA 实验:将表面修饰了巯基化瘦肉精抗体的微悬臂梁放入孔 9~12;在孔 9 和 11 添加浓度为 100 μg/L 的 CLEN 溶液 100 μL,在孔 10 和 12 添加浓度 0 μg/L 的 CLEN 溶液 100 μL;在孔 9~12 添加浓度为 1 μg/L 的 CLEN-HRP 100 μL;30 min(37 °C)后用 TPBS 进行清洗,然后加入显色剂进行显色,所有显色结果如图 4

所示。

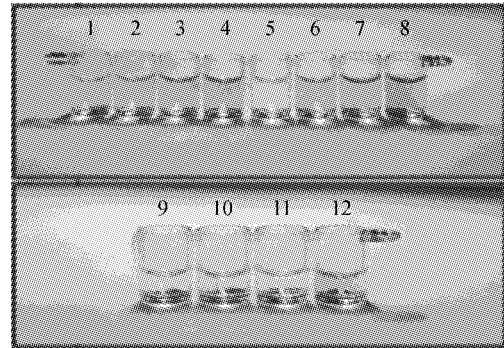


图 4 ELISA 显色实验结果

Fig.4 Color results in ELISA

2 结果

2.1 ELISA 显色结果

从图 4 可以看出:从孔 1 到孔 4 添加的 CLEN 浓度依次减小,而显色却依次增强;孔 5 到孔 8 的趋势也与其一致;说明 CLEN 浓度越大,CLEN-HRP 在和 CLEN 的竞争中就越有劣势,因而显色就越浅。孔 1~4(瘦肉精抗体)与孔 5~8(巯基化瘦肉精抗体)对应的显色程度几乎一致,说明瘦肉精抗体的巯基化对其活性没有影响。

孔 9~12 的实验是对微悬臂梁上 CLEN 抗原抗体结合的可行性的验证,孔 9 和 11 几乎没有显色说明 CLEN-HRP 在和 CLEN 的竞争中就越有劣势;孔 10 和 12 有显色说明 CLEN 抗原抗体在微悬臂梁上产生了特异性结合。

ELISA 实验结果证实利用巯基化方法将瘦肉精抗体修饰到微悬臂梁镀金表面是可行的,并且瘦肉精抗体的活性没有受损,这是利用微悬臂梁进行瘦肉精检测的前提条件。

2.2 微悬臂梁检测结果

利用微悬臂梁检测 CLEN 的结果如图 5 所示(以图 3 所示位移方向为正),分别做了质量浓度 1、10、100 和 1 000 μg/L 四种实验,4 种质量浓度都有不同程度的位移响应,而且随着加入样品浓度的增加,位移值也随之增加;在样品加入约 3 h 后响应都趋于平稳。为了验证分子结合的特异性,1 m/L CAP(另一种兽药残留)加入进行检测,结果没有明显的响应。即瘦肉精抗体具有很强的选择性,微悬

臂梁的弯曲变形是因为 CLEN 加入后与微悬臂梁上的瘦肉精抗体产生了特异性的结合导致分子间的相互作用力,这种作用力只是在微悬臂梁的单侧表面(金面),从而使微悬臂梁的上下表面产生表面应力差。由于产生的位移为正,即瘦肉精抗原抗体之间的特异性结合使微悬臂梁金面产生了压应力。

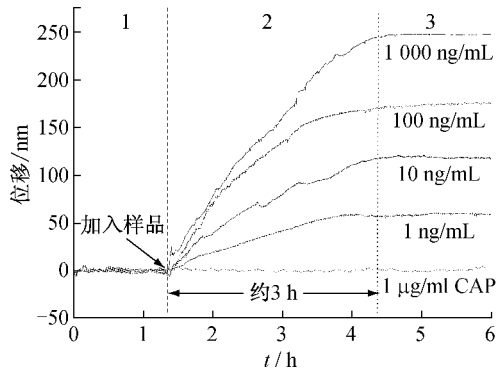


图5 不同 CLEN 质量浓度下,微悬臂梁弯曲变形与时间的关系
Fig.5 Bending of cantilever versus time under different clenbuterol concentrations

微悬臂梁的上下表面应力差与微悬臂梁的端部位移之间遵循 Stoney 公式^[13]:

$$\Delta z = \frac{3(1-\nu)L^2}{Et^2} \Delta\sigma \quad (1)$$

式中: L, t, E, ν 分别代表微悬臂梁的长度、厚度、弹性模量和泊松比; $\Delta\sigma$ 为微悬臂梁的上下表面应力差; Δz 为微悬臂梁的端部位移。瘦肉精浓度与表面应力的关系如图 6 所示,可以看出表面应力与浓度的对数成线性关系。

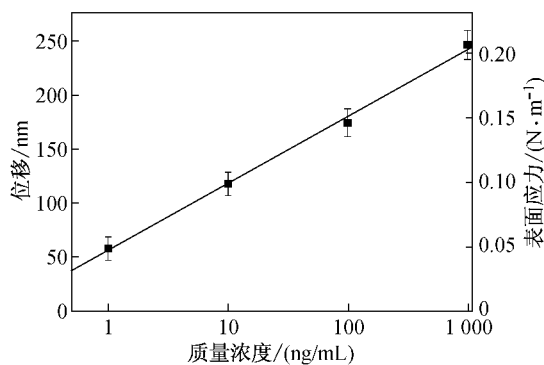


图6 质量浓度与表面应力和微梁弯曲的关系
Fig.6 Surface stress and bending of cantilever as a function of clenbuterol concentration

3 讨论

抗原与抗体的结合是基于两种分子间结构的互补性和亲和性,是一种可逆过程。在微悬臂梁传感实验中,在 CLEN 加入前,微悬臂梁处于平稳状态(图 5 阶段 1);当 CLEN 加入后,CLEN 与修饰在微悬臂梁镀金表面的瘦肉精抗体产生特异性反应导致微悬臂梁的弯曲变形,在蠕动泵的带动下,反应容器内 CLEN 的浓度会慢慢增加,与修饰在微悬臂梁金面的瘦肉精抗体产生特异性反应的 CLEN 分子数量也会增加,从而导致微悬臂梁弯曲变形的增加(图 5 阶段 2);当微悬臂梁上抗原抗体的结合与容器内 CLEN 的浓度达到动态平衡以后,微悬臂梁的弯曲变形也就趋于平衡(图 5 阶段 3)。

抗原抗体结合导致微悬臂梁上表面应力变化的机理还不是十分清楚,目前主要认为是由于亲疏水作用、静电力和氢键等导致^[14]。对于本文研究的瘦肉精而言,认为主要是由静电排斥力导致。瘦肉精是一种小分子盐酸盐,在溶液中会电离带负电的阴离子 Cl^- ,和阳离子 $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}^+$,而与微悬臂梁上瘦肉精抗体结合的是阳离子,当瘦肉精抗原抗体发生结合后,相邻的分子之间存在相互排斥的静电力,即导致微悬臂梁的金面产生了压应力,这与图 5 的实验结果相吻合。随着阳离子的不断结合,微悬臂梁表面带电粒子的密度也越来越大,分子间的排斥作用也变得更大,微悬臂梁的弯曲变形就会越来越大,直到达到平衡。

4 结论

瘦肉精是一种对人体有害的兽药残留,本文利用微悬臂梁传感技术对瘦肉精抗原抗体的特异性结合进行研究。将巯基化的瘦肉精抗体通过自组装修饰到微悬臂梁的金面,通过光杠杆原理对不同浓度的瘦肉精标准样品进行检测,并通过 ELISA 对其进行了验证。微悬臂梁传感技术作为物质检测的一种手段无需标记;具有很高的灵敏度,实验结果表明该系统能够检测至少 1 ng/mL 浓度的瘦肉精标准样品;而且具有很强的选择性,对其他物质(如 CAP)没有响应。由于能够提取到抗原抗体结合过程中分子间相互作用力的信息,为从微观上理解抗原抗体的特异性结合提供了一种可行的方法。更进一步可

以将多种抗体修饰在微悬臂梁阵列的不同梁上,可实现样品中多种物质的同时检测。

参考文献:

- [1] 刘平,于长隆. 生物力学——一门跨学科的学科[J]. 医用生物力学,2008,23(2):99-102.
- [2] 龙勉. 细胞-分子生物力学:力学-生物学、力学-化学耦合[J]. 医用生物力学,2007,22(1):1-3.
- [3] Carrascosa LG, Moreno M, Alvarez M, *et al.* Nanomechanical biosensors: a new sensing tool [J]. *Trends Anal Chem*, 2006, 25(3): 196-206.
- [4] Butt HJ. A sensitive method to measure changes in the surface stress of solids [J]. *J Colloid Interf Sci*, 1996, 180(1): 251-260.
- [5] Berger R, Delamarche E, Lang HP, *et al.* Surface stress in the self-assembly of alkanethiols on gold [J]. *Science*, 1997, 276(5321): 2021-2024.
- [6] Moulin AM, O'Shea S J, Badley RA, *et al.* Measuring surface-induced conformational changes in proteins [J]. *Langmuir*, 1999, 15(26): 8776-8779.
- [7] Hansen KM, Ji HF, Wu GH, *et al.* Cantilever-based optical deflection assay for discrimination of DNA single-nucleotide mismatches [J]. *Anal Chem*, 2001, 73 (7): 1567-1571.
- [8] Wu GH, Datar RH, Hansen KM, *et al.* Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(9): 856-860.
- [9] Zhang J, Lang HP, Huber F, *et al.* Rapid and label-free nanomechanical detection of biomarker transcripts in human RNA [J]. *Nat Nanotechnol*, 2006, 1(3): 214-220.
- [10] Li K, Liu H, Zhang QC, *et al.* Conformational transition of poly (acrylic acid) detected by microcantilever sensing [J]. *Chinese Phys Lett*, 2007, 24(6): 1502-1504.
- [11] 李凯,刘红,张青川等. 利用微悬臂梁表面应力研究聚 N-异丙基丙烯酰胺分子的构象转变[J]. 物理学报,2006,55(8): 4111-4116.
- [12] 薛长国,李凯,朱娟娟等. 微梁传感研究谷胱甘肽转硫酶抗原抗体特异结合[J]. 实验力学, 2007,22(3-4):407-412.
- [13] Stoney GG. The tension of metallic films deposited by electrolysis [J]. *Proc R Soc London Ser A*, 1909, 82: 172.
- [14] Van Oss CJ. Hydrophobic, hydrophilic and other interactions in epitope-paratope binding [J]. *Mol Immunol*, 1995, 32(3): 199-211.
- (上接第 10 页)
- [4] Althof RJ, Wind MG., Dobbins JT. Rapid and automatic image registration algorithm with subpixel accuracy [J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 1997, 16(3):308-316.
- [5] Hou Zhende Qin Yuwen. A study of fractal interpolation method [J]. *The International Society for Optical Engineering*, 2001, 4537:386-389.
- [6] Sutton Michael A, Chao Yuh J. Measurement of strains in a paper tensile specimen using computer vision and digital image correlation. Part 1: data acquisition and image analysis system [J]. *Tappi Journal*, 1988, 71,(3):173-175.
- [7] Schreier HW, Braasch JR. ,Sutton MA. Systematic errors in digital image correlation caused by intensity interpolation [J]. *Optical Engineering*, 2000,39(11):2915-2921.
- [8] Pan B, Xie H, Wang Z,*et al.* Study on subset size selection in digital image correlation for speckle patterns [J]. *Optics Express*, 2008,16,(10): 7037-7048.
- [9] Zhang D, Luo M, Arola D. Displacement / Strain Measurements using an optical microscope and digital image correlation [J]. *Optical Engineering*, 2006, 3: 033605-033710.
- [10] Abraham S, Marcel JE. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures [J]. *Analytical Chemistry*, 1964, 36(8):1627-1639.
- [11] Pan B, Xie H, Guo Z, *et al.* Full-field strain measurement using a two-dimensional Savitzky-Golay digital differentiator in digital image correlation [J]. *Optical Engineering*, 2007, 46(3):033601-033604.
- [12] Zhang D, Eggleton CD, Arola D. Evaluating the Mechanical Behavior of the Arterial Tissue Using Digital Image Correlation [J]. *Experimental Mechanics*, 2002, 42 (4) : 409-416.
- [13] Zhang D, Arola D, Eggleton CD, Measurement of Poisson's Ratio of Bovine Aorta Using Digital Image Correlation. 2nd BMES/IEEE joint meeting [C]// Houston, Texas: [s.n], October 2002, 1276-1277.
- [14] 张东升,鲁成林,牙本质断裂力学行为的研究[J]. 中华口腔医学杂志,2007, 12:733-736.
- [15] Zhang D, Arola D. A Method for Characterizing the Mechanical Behavior of Hoof Horn [J]. *Journal of Materials Science*, 2007, 42(4) :1108-1115.
- [16] Kruzica JJ, Nallaa RK, Kinneyb JH, *et al.* Crack blunting, crack bridging and resistance-curve fracture mechanics in dentin: effect of hydration [J]. *Biomaterials*, 2003, 24: 5209-5221.
- [17] 张东升,罗森,韩永胜.材料力学性能显微测试系统[J]. 实验力学,2006, 21(5): 651-654.
- [18] Mao S, Lu C, Arola D, *et al.* Evaluation of the Shrinkage Strain in Dentin and Enamel using Digital Image Correlation. Proceedings of the International Conference on Experimental Mechanics [C]// Nanjing, China: [s.n], 2008, 1313.