

基于便携拉曼光谱仪和双层纸芯片的头发皮质醇超高灵敏检测

高志刚^a 郑婷婷^a 邓九^a 李晓瑞^a 曲玥阳^a 陆瑶^b

刘婷娇^c 罗勇^{*a} 赵伟杰^a 林炳承^a

(^a 大连理工大学 制药科学与技术学院 大连 116024)

(^b 大连化学物理研究所 生物技术部 大连 116023)

(^c 大连医科大学 口腔医学院 大连 116044)

摘要 人头发中的皮质醇是反映现代人长期精神压力累积的主要临床标记物。建立了一种人发皮质醇的超高灵敏检测方法。方法基于表面增强拉曼光谱、免疫分析和双层纸芯片。纸芯片的第一层用于滤除人发提取液中的头发残渣(样品前处理)，第二层用于实施竞争性免疫反应和拉曼检测。固定在纸表面的皮质醇抗原和游离的头发皮质醇竞争结合能产生拉曼信号的皮质醇单克隆抗体，通过检测结合在纸表面的皮质醇抗原-抗体复合物的拉曼信号进行游离头发皮质醇的定量。在便携式拉曼光谱仪上，皮质醇抗体的拉曼信号经过优化，方法的检测限可以达到 1 pg/mL，平行测定相对标准偏差为 8.38% (*n*=6)。进行了两例实际样品检测，液质检测结果分别为 0.771 和 0.153 ng/mL，本方法检测结果分别为 0.63 和 0.247 ng/mL，两种方案的结果在一个数量级，证明了方法的实用性。利用此方法，一块芯片可以同时测定 48 个样品，专属性和准确性很好，特别适合于人群精神压力的普查。

关键词 头发皮质醇；表面增强拉曼光谱；纸芯片；便携式拉曼光谱仪；竞争性免疫

Ultrasensitive Detection of Hair Cortisol Based on Portable Raman Spectrometer and Double-layer Paper Microdevice

Gao, Zhigang^a Zheng, Tingting^a Deng, Jiu^a Li, Xiaorui^a Qu, Yueyang^a Lu, Yao^b
Liu, Tingjiao^c Luo, Yong^{*a} Zhao, Weijie^a Lin, Bingcheng^a

(^a School of Pharmaceutical Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024)

(^b Biological Division, Dalian Institute of Chemical Physics, Dalian 116023)

(^c College of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044)

Abstract Cortisol in the human hair is a clinical biomarker of long-term social-and-work-related mental stress, which is of high morbidity rate in the current modern society. This study developed a sensitive hair cortisol assay, featuring surface-enhanced Raman spectroscopy, immunoreaction, and a double-layer paper microdevice. The first layer of the paper microdevice was used to remove the hair residue in the hair extract by filtration (sample pretreatment). The second layer was used for competitive immunoreaction and detection. Standard cortisol antigen immobilized in the second layer and the free cortisol in hair extract competed to bind the spiked Raman-active cortisol monoclonal antibody solution. The hair cortisol can be quantitated by the intensity of Raman signal of monoclonal antibody bound on the paper. We found the Raman signal decreased as the cortisol concentration increases in hair samples. The relative Raman intensity measured was linearly proportional to the logarithmic value of the cortisol concentration in hair samples we measured. The detection of limit (LOD) was 1 pg/mL with the portable Raman spectrometer. The RSD of measurement was 8.38% (*n*=6). In addition, we used LC-MS to measure two real samples as a comparison with our method as above. The results are 0.771 and 0.153 ng/mL by LC-MS method and 0.63 and 0.247 ng/mL by the proposed method. It can be observed that the results are in same order, demonstrating the validity of the proposed method. In addition, 48 samples can be measured in a single chip. These results showed that this method is sensitive, specific, and suitable for large-scale screening of hair cortisol samples.

Keywords hair cortisol; SERS; paper microdevice; portable Raman spectrometer; competitive immunoassay

1 引言

现代社会竞争愈发激烈，人们的心理压力越来越

大，在很大程度上已经影响到身心健康。对心理压力进行评估，进而采取一定措施进行舒缓，逐渐成为一种广泛的社会需求。但在现阶段，心理压力的评估主要依赖

* E-mail: yluo@dlut.edu.cn; Tel.: +86-411-84986360; Fax: +86-411-84986360

Received November 11, 2016; published February 14, 2017.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21675017).

项目受国家自然科学基金(No. 21675017)资助。

于一些主观的医疗记录和心理医生的临床经验，效率低下，不适于大面积普查。在这种情况下，利用一些生化标记物进行心理压力评估逐渐变得流行，特别是在国外已经开展的比较普遍。

目前，应用较广的心理压力标志物是皮质醇，它甚至被称为“压力荷尔蒙”。它由下丘脑-垂体-肾上腺轴分泌，分泌的量随着心理压力的变化而波动^[1,2]。分泌的皮质醇首先进入血液，然后分布于全身，包括组织液、唾液、尿液和头发等，检查这些基质中皮质醇便可辅助临床诊断，而其中头发中的皮质醇具有一定的特殊性，不似血液、尿液或者组织液中的皮质醇，头发中的皮质醇降解速率极慢，可稳定存在超过几个月，因此测定头发中的皮质醇可以了解在一段较长时间内的心理压力状况^[3]，是强有力的临床诊断参考。

毛发皮质醇的测定有多种方法，主要包括放射性免疫、酶联吸附免疫、液质联用等。譬如，Davenport 等^[4]利用酶联吸附免疫测定恒河猴毛发中的皮质醇含量，检测限为 0.9 pg/mL；Raul 等^[5]利用液质联用测定头发中的皮质醇，检测限为 5 pg/mL；Accorsi 等^[6]利用放射性免疫测定头发皮质醇，检测限为 0.26 pg/mg。这些方法优点是测量准确，缺点是仪器设备庞大且昂贵、操作繁琐、花费高，因此不适合于临幊上大样本量的普查。大样本的毛发样本普查需要开发新的技术。

纸芯片是新近发展起来的一种分析测试装置，通过在纸上图案化的疏水修饰，形成一定几何构型的亲水区间，结合毛细管力，进行流体的控制，进而完成微量化的生化分析^[7,8]。纸芯片可以和多种检测手段联用^[9~11]，包括电化学、荧光、比色、质谱、拉曼、化学发光等，因此应用范围广泛，它的核心优势是成本低廉，特别适用于大样本生化样品的筛查^[12,13]。

表面增强拉曼光谱(SERS)是一种高灵敏度的检测技术，理论上灵敏度可至单个分子，近段时间，它的研究热点集中在新型表面增强基底的研发^[14~17]和它在生化和食品分析上的应用，譬如瘦肉精的多重检测^[18]，胰腺癌标志物的检测^[19]和食品中酸性橙 II 的检测^[20]等。

免疫方法是检测实际样品的一种利器，通过抗体-抗原特异性的相互作用消除复杂基质的干扰，保证检测的专属性，对于难于标记小分子抗原，竞争性免疫是一种常见的方法，可以是抗原分子竞争抗体分子，也可以抗体分子竞争结合抗原分子。

本文结合纸芯片、SERS 和竞争性免疫技术，发展了一种测定毛发皮质醇的新方法，该方法成本低廉、灵敏度高、专属性强，结合便携式的拉曼光谱仪，有望应用于大样本毛发样品的筛查。

2 结果与讨论

2.1 双层纸芯片设计

纸芯片的设计图如图 1a 所示，它包括两层，第一层

用于进样和滤除毛发提取液中的头发残渣，第二层进行竞争性免疫反应和拉曼检测，因此该芯片集成了过滤、反应和检测三种功能，可以用于实际样品的直接检测，该芯片通量还可以提高，理论上提高的倍数无限制，图 1b 显示了一个包含 96 个反应单元的高通量芯片，可以测定 48 个样品。

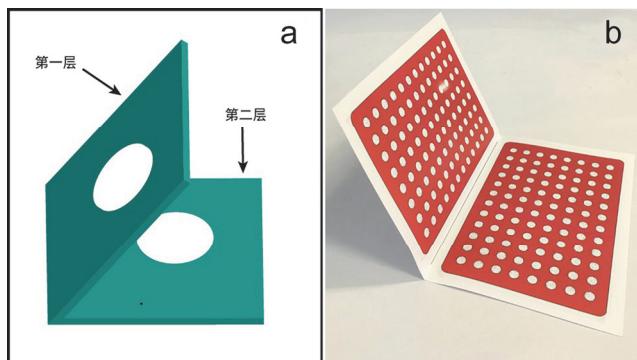


图 1 (a)纸芯片设计示意图; (b)高通量纸芯片的照片

Figure 1 (a) Illustration of the paper microdevice; (2) Photograph of a high-throughput paper microdevice containing 96 reaction zones

2.2 免疫分析过程

如图 1a 所示，将纸芯片沿中线折叠，使纸芯片呈现一种立体状态，但第一层和第二层并不接触，将原始的毛发提取液滴加至第一层正面，吹干，此时毛发残渣和提取液中的皮质醇都存留在第一层，如图 2 所示，黑色的部分就是存留在第一层的毛发残渣。然后压紧第一层和第二层，使第一层和第二层的亲水区域(图 1a 中的白色圆圈)紧密接触。然后，从第一层正面滴加入能产生拉曼信号的皮质醇单抗溶液(4-mercaptopbenzoic acid-金纳米粒子-单抗)，由于毛细作用，单抗溶液会先浸润第一层，然后浸润第二层。在这个浸润过程中，物质的传递过程如下：毛发残渣因为颗粒较大，会保留在第一层正面，而不会进入第二层，但第一层中的毛发皮质醇会溶解在抗体溶液中，进而和单抗一起渗透入第二层。



图 2 纸芯片的照片，黑色的部分为头发残渣

Figure 2 Photograph of the paper microdevice, and the black spot on the chip was hair residue

第二层纸的表面预先包备有标准皮质醇抗原，因此当毛发皮质醇和单抗一起渗入第二层时，在第二层表面会发生竞争性免疫反应，游离的毛发皮质醇会和固载的皮质醇抗原竞争性地结合游离的皮质醇抗体。免疫反应的时间为 2 h，所处的温度为室温。然后，用纯水和缓冲

液清洗第二层，将处于游离状态的抗体和抗体-毛发皮质醇复合物冲洗掉。最后，用便携式拉曼光谱仪检测结合在第二层表面的抗体(4-mercaptopbenzoic acid-金纳米粒子-单抗-皮质醇抗原-纸)的拉曼散射信号强度，进而对毛发皮质醇进行定量。纸芯片第二层上免疫分析的过程，如图 3 所示。

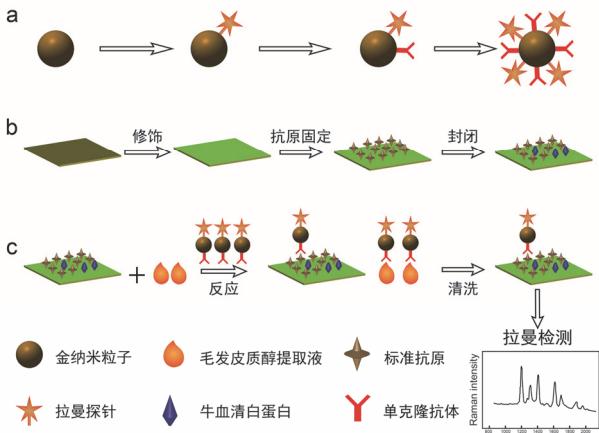


图 3 纸芯片第二层上的免疫分析过程示意图, a, 抗体的拉曼标记过程; b, 标准抗原的固定和封闭; c, 竞争性免疫过程

Figure 3 Illustration of the immunoassay on the paper, a, labeling process of antibody, b, immobilization of cortisol antigen and blocking; c, competitive immunoassay processes

2.3 实验条件优化

影响分析方法效果可能的指标有金纳米颗粒粒径，金纳米颗粒上抗体的修饰量，金纳米颗粒上 4-mercaptopbenzoic acid 的修饰量，样品用量，4-mercaptopbenzoic acid-金颗粒-抗体的用量等。

关于金纳米粒子粒径的选择，我们参考了已有文献^[19]，该文献报导了 60 nm 的金颗粒有比较好的结果，而当时我们实验室存储有 55 nm 的金颗粒，与 60 nm 非常接近，为了提高实验效率，我们最终选择了 55 nm 的金颗粒进行实验，而最终结果也证实 55 nm 金颗粒具有较好的适用性。55 nm 金颗粒上还修饰有抗体，我们拍摄了其透射电镜照片(见 SI)，金颗粒和表面抗体清晰可见。

金颗粒表面单抗的修饰量可能影响实验的结果，但这个指标在本实验中并不是关键，因为无论起始状态一个金纳米颗粒上连接有多少单抗分子，理论上最终有用的只是其中的一个，这个抗体将金纳米颗粒连接在纸上，相对而言，更为关键的一个指标是 4-mercaptopbenzoic acid 的修饰量，它直接关系到最终检测的灵敏度，我们对 4-mercaptopbenzoic acid (MBA)修饰金纳米颗粒过程进行了优化，结果如图 4 所示，可以看到当与金纳米颗粒反应的 MBA 的体积是 2.5 μL，时间是 90 min 时，MBA 的拉曼信号最强，方法具有最高的灵敏度。

关于样品用量，只需要其每次实验的量保持恒定就可以了，我们确定的依据是实验的方便程度，如果量太

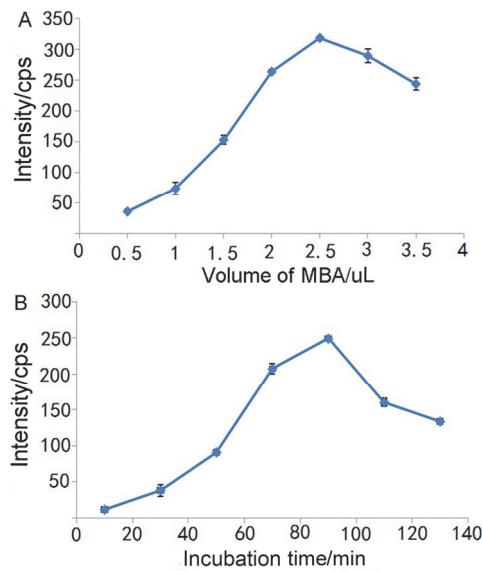


图 4 (A) MBA 反应体积和 MBA 拉曼信号强度间的关系; (B) MBA 反应时间和 MBA 拉曼信号强度间的关系

Figure 4 (A) Intensity of Raman signal of MBA on AuNP vs. volume of MBA in reaction; (B) Intensity of Raman signal of MBA on AuNP vs. incubation time

大，样品会溢出反应区域，如果量太少，竞争性免疫反应不完全，我们最终确定的量为 5 μL。

关于 4-mercaptopbenzoic acid-金纳米粒子-单抗用量，这个指标在本实验中也并非关键指标，只需要它的量大于样品中抗原和外加抗原的量，能将所有抗原捕获，就能满足实验要求，我们在实验中 4-mercaptopbenzoic acid-金纳米粒子-单抗用量为 5 μL (0.75 mg/mL)，远远超过抗原的量，保证了实验的顺利进行。

2.4 竞争性免疫分析

基于 2.2 节描述的免疫分析过程，针对毛发中的皮质醇，我们建立了一种新的竞争性免疫分析方法，我们建立了标准曲线，考察了方法的检测限、重复性、精密度和回收率。

2.4.1 标准曲线

在便携式拉曼检测仪(Sunshine, 长春新产业光电技术有限公司)上，我们采集了不同浓度毛发皮质醇的响应曲线(图 5a)，可以发现随着浓度的升高，纸芯片上的纳米颗粒浓度逐渐减小(见支撑材料)，拉曼信号逐渐变低，符合竞争性免疫的原理，再将 1587 cm^{-1} 处的相对峰强度和样品浓度的负对数作图，得到标准曲线(图 5b)，可以看到，标准曲线的线性良好。

2.4.2 检测限

采集 0、1、10、100 pg/mL 和 1、10、100 ng/mL 的样品信号，取 1587 cm^{-1} 处的平均信号强度($n=3$)作柱状图，阈值线(空白溶液强度减去 2 倍标准偏差)以下的最小浓度定义为检测限。从图 6 中可以看出，在便携式拉曼仪上，该方法的检测限为 1 pg/mL。

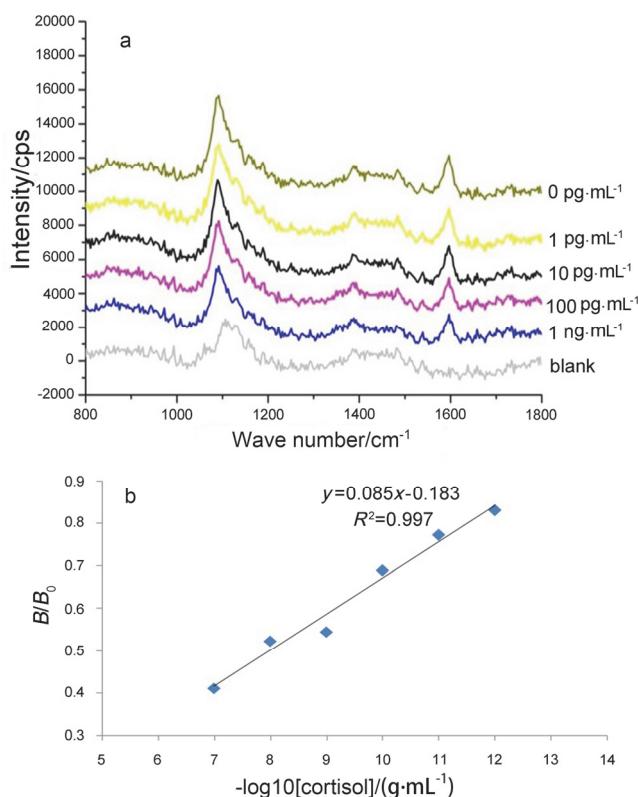


图 5 (a)纸上抗体的拉曼信号随毛发皮质醇浓度的变化; (b) 1587 cm^{-1} 处的相对峰强度和样品浓度之间的关系

Figure 5 (a) Variation of the Raman spectra of bound antibodies with the concentration of hair cortisol; (b) relative intensity of the peak at 1587 cm^{-1} vs. the logarithmic value of hair cortisol concentration

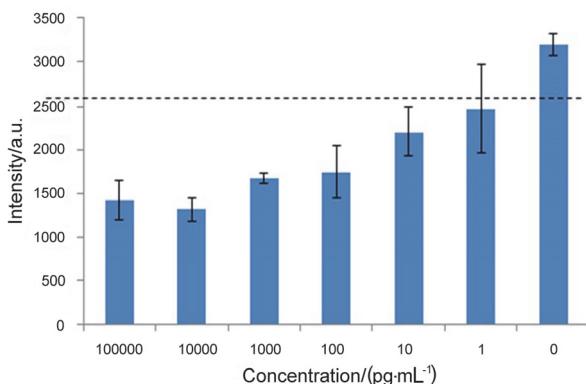


图 6 1587 cm^{-1} 处峰的平均强度和样品浓度之间的关系, 虚线为阈值

2.4.3 精密度、均一性和回收率

取 10 pg/mL 的毛发皮质醇样品, 重复测定 6 次, 1587 cm^{-1} 处测定结果的相对标准偏差经计算为 8.38%, 远远好于一般水平。这主要是因为我们得到的拉曼信号是海量信号分子信号的平均值, 基于拉曼光谱的免疫分析^[19]都具有定量准这个特点。

在我们的实验中, 芯片上的免疫反应发生在一个平面上, 我们在平面上随机选取了 30 个点, 测定这 30 个点的拉曼信号强度, 经计算, 强度的相对标准偏差为 9.26%, 与上述精密度在一个数量级。

我们测定方法的加标回收率(表 1), 显示出我们的方法具有较好的准确度。

表 1 不同浓度下加标回收率的测定

Table 1 Recoveries at different concentrations

浓度/($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	已有的皮质醇/g	外加的皮质醇/g	测出的皮质醇/g	回收率/%
5×10^{-10}	2×10^{-9}	2×10^{-9}	4.06×10^{-9}	103
1.5×10^{-11}	6×10^{-11}	6×10^{-11}	11.72×10^{-11}	95.33
5×10^{-12}	2×10^{-11}	2×10^{-11}	4.25×10^{-11}	112.5

2.5 实际样品检测

我们利用本研究建立的方法和液质方法检测了随机采集的 15 例人头发实际样品, 在其中 2 例样品中检测到了皮质醇, 液质检测结果分别为 0.771 和 0.153 ng/mL, 拉曼检测结果分别为 0.63 和 0.247 ng/mL, 测定的谱图见支撑材料。可以发现, 拉曼检测的结果和液质检测的结果在数量级上是一致的, 进一步证明了该方法的可靠性。

2.6 应用前景

在本研究中, 我们建立了一种适用于大样本筛查的毛发皮质醇高灵敏检测方法, 该方法将来能否得到广泛应用主要取决于时间成本、经济成本和自动化程度。时间成本的降低主要依靠检测通量的提高(图 1b), 经济成本的降低依赖便携式拉曼光谱仪, 本文已经证实了便携式拉曼光谱仪的灵敏度可以达到检测要求(一般而言, 便携机的灵敏度比桌面机低两个数量级), 但是我们实验使用的仪器自动化程度不够, 理想的便携式拉曼仪需要有自动对焦, 自动扫描和自动数据处理的功能。从仪器的角度说, 实现这些功能并不难, 因此本研究建立的方法将来应用前景看好。

3 结论

本研究将竞争性免疫技术、多层次纸芯片技术和表面增强拉曼光谱技术结合起来, 建立了一种毛发皮质醇的分析方法, 免疫分析技术的采用保证了该方法的专属性, 多层次纸芯片技术的采用降低了检测成本, 保证了检测的通量, 并且简化了实验的操作, 表面增强拉曼光谱的采用保证了方法的灵敏度, 结合便携式拉曼光谱检测仪, 该方法有望应用于大样本毛发样品的普查。

致谢

感谢厦门大学周勇亮老师和苏州大学姚建林老师对本研究的指导和帮助。

References

- [1] Ito, N.; Ito, T.; Kromminga, A.; Bettermann, A.; Takigawa, M.; Kees, F.; Straub, R. H.; Paus, R. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1332.
- [2] Van Uum, S. H. M.; Sauve, B.; Fraser, L. A.; Morley-Forster, P.; Paul, T. L.; Koren, G. *STRESS* **2008**, *11*, 483.
- [3] Manenschijn, L.; Koper, J. W.; Lamberts, S. W. J.; van Rossum, E. F. C. *Steroids* **2011**, *76*, 1032.
- [4] Davenport, M. D.; Tiefenbacher, S.; Lutz, C. K.; Novak, M. A.; Meyer, J. S. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2006**, *147*, 255.
- [5] Raul, J. S.; Cirimele, V.; Ludes, B.; Kintz, P. *Clin. Biochem.* **2004**, *37*, 1105.
- [6] Accorsi, P. A.; Carloni, E.; Valsecchi, P.; Viggiani, R.; Garnberoni, M.; Tarnanini, C.; Seren, E. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2008**, *155*, 398.
- [7] Lu, Y.; Shi, W. W.; Jiang, L.; Qin, J. H.; Lin, B. C. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 1497.
- [8] Lu, Y.; Shi, W. W.; Qin, J. H.; Lin, B. C. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 329.
- [9] Klasner, S. A.; Price, A. K.; Hoeman, K. W.; Wilson, R. S.; Bell, K. J.; Culbertson, C. T. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 1821.
- [10] Ge, S. G.; Ge, L.; Yan, M.; Song, X. R.; Yu, J. H.; Huang, J. D. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 9397.
- [11] Vella, S. J.; Beattie, P.; Cademartiri, R.; Laromaine, A.; Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Mirica, K. A.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2883.
- [12] Yan, C.; Yu, S.; Jiang, Y.; He, Q.; Chen, H. *Acta Chim. Sinica* **2014**, *72*, 1099. (严春芳, 余思扬, 蒋艳, 何巧红, 陈恒武. 化学学报, **2014**, *72*, 1099.)
- [13] Zhao, L.; Yan, H. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 1104. (赵联朝, 闫宏涛. 化学学报, **2012**, *70*, 1104.)
- [14] Wang, Y.; Yan, B.; Chen, L. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1391.
- [15] Zhang, W.; Li, B.; Chen, L.; Wang, Y.; Gao, D.; Ma, X.; Wu, A. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 2066.
- [16] Li, B.; Zhang, W.; Chen, L.; Lin, B. *Electrophoresis* **2013**, *34*, 2162.
- [17] Fu, X.; Cheng, Z.; Yu, J.; Choo, P.; Chen, L.; Choo, J. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *78*, 530.
- [18] Dou, B.; Luo, Y.; Chen, X.; Shi, B.; Du, Y. G.; Gao, Z. G.; Zhao, W. J.; Lin, B. C. *Electrophoresis* **2015**, *36*, 485.
- [19] Wang, G. F.; Lipert, R. J.; Jain, M.; Kaur, S.; Chakraboty, S.; Torres, M. P.; Batra, S. K.; Brand, R. E.; Porter, M. D. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2554.
- [20] Zhang, Z.; Liu, R.; Xu, D.; Liu, J. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 1686 (in Chinese). (张宗绵, 刘睿, 徐敦明, 刘景富. 化学学报, **2012**, *70*, 1686.)

(Zhao, X.)