

# 免疫传感器用于环境中痕量有害物质检测的研究进展

汤琳, 曾光明, 黄国和, 牛承岗

(湖南大学环境科学与工程系, 长沙 410082, E-mail: etanglin@hotmail.com)

**摘要:** 随着免疫测定技术与传感技术的发展, 人们开发了以固定化的抗体(抗原)为识别元件, 基于特异性的免疫反应原理的免疫传感器。该传感器灵敏度高、选择性好, 可实现对农药分子、工业有机污染物、重金属、生物毒素等有害物质的实时、在体、在线测定, 在环境污染监测中具有巨大的应用前景。本文对免疫传感器的原理、制备、分类作了简要介绍, 综述了近年来用于痕量有害物质检测的免疫传感器在固定化方法和传感技术等方面的最新研究成果, 并探讨了免疫传感器在环境监测中的应用和发展方向。

**关键词:** 免疫传感器; 痕量有害物质; 环境监测

中图分类号: O657 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)04-0170-07

## Study Progress on Determination of Environmental Trace Toxicants by Immunosensor

TANG Lin, ZENG Guang-ming, HUANG Guo-he, NIU Cheng-gang

(Department of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China Email: etanglin@hotmail.com)

**Abstract:** Along with the advances in immunoassay and sensing techniques, the immunosensors based on specific immunoreaction and immobilized antibody (antigen) as recognition element were developed. They can be used for real-time, in-vivo and on-the-spot determination of pesticides, industrial organic pollutants, heavy metals, biotoxins, etc. with high sensitivity and selectivity. They possess a great potential for environmental monitoring. The working mechanism, fabrication and classification of immunosensor are briefly introduced in this paper. The latest study progress on immobilization methods and sensing techniques of immunosensor for determination of trace toxicants is reviewed. The application of immunosensor in environmental monitoring and the future development are also discussed.

**Key words:** Immunosensor; Trace toxicants; Environmental monitoring

免疫传感器(Immunosensor)是将免疫测定法与传感技术相结合而构建的一类新型生物传感器, 应用于痕量免疫原性物质的分析研究。它利用动物体内抗原、抗体能发生特异性的吸附反应的性质, 将抗原(或抗体)固定在传感器基体上, 通过传感技术使吸附发生时产生物理、化学、电学或光学上的变化, 转变成可检测的信号来测定环境中待测分子的浓度<sup>[1]</sup>。免疫传感器能识别较大分子之间的微小差异, 具有很强的专一性, 可成为用于检测的抗原的物质很多, 1890 年 Behring 和 Kitasato 发现微生物细胞可以在免疫动物体内产生抗体; 1923 年 Heidelberger 和他的合作者们发现多糖也具有抗原性; Landsteiner 则首次系统地研究了一些他称之为“半抗原”的低分子量的化学物质与蛋白质载体结合后用于免疫, 使小分子化合物的免疫测定成为可能<sup>[2]</sup>。

传统的环境污染物分析过程常常需要繁杂、冗长的萃取、提纯、浓缩、色谱分离等步骤, 而且试剂用

量大、费用高<sup>[3]</sup>; 免疫测定法则具有专一性好、灵敏度高等优点, 但抗原、抗体反应与过量抗原(或抗体)的分离是免疫测定法的关键步骤和难点; 免疫传感器将抗原(或抗体)固定在载体上, 可以很方便地与未反应的抗体(或抗原)分离, 从而使免疫测定法自动化、小型化, 实现对单(多)种物质进行实时、在体、在线测定。在过去的研究中, 免疫传感器被用于分析从复杂的病毒、微生物、生物毒素到简单的农药分子、工业有机污染物、重金属离子等各种物质, 成为检测环境中痕量有害物质方法的研究热点<sup>[4]</sup>。

### 1 免疫传感器的测定原理

免疫传感器从测定原理上可分为标记型免疫传

收稿日期: 2003-09-18; 修订日期: 2003-12-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20077006, 50179011, 70171055); 国家杰出青年科学基金项目(50225926); 2000 年教育部高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划资助项目; 国家 863 高技术研究项目(No. 2001 AA644020)

作者简介: 汤琳(1979.10~), 女, 硕士研究生, 籍贯安徽六安, 主要研究方向为生物传感器在环境监测中的应用。

## 传感器和非标记型免疫传感器

### 1.1 非标记型免疫传感器

利用待测抗原(或抗体)与固定在传感器表面的抗体(或抗原)发生特异吸附时直接产生电信号或光信号.如 Pribyl 等人将莠去津(atrazine)的单克隆抗体用蛋白 A 法固定在压电晶体上的金电极表面,样品中的莠去津吸附时引起石英晶体上负荷质量的改变从而使晶体振荡频率发生变化来测定待测物浓度,检测莠去津的浓度下限达到  $1.5 \text{ ng/mL}$ ;他们还试验了另一种测定方法,将莠去津用自组装固定在压电晶体表面,与待测莠去津反应达到平衡的抗体吸附时引起振荡频率变化间接测定莠去津,检测限为  $0.025 \text{ ng/mL}$ <sup>[5]</sup>. Ngehr Ngwainbi 等曾将对硫磷(parathion)的抗体固定在压电晶体的两侧用以直接测定气相中的对硫磷,压电晶体的振荡频率变化值  $\Delta F$  与对硫磷浓度之间呈线性关系的浓度范围是  $2 \sim 35 \text{ ng/L}$ <sup>[6]</sup>.一般来说,非标记免疫传感器的灵敏度比标记免疫传感器低<sup>[1]</sup>.

### 1.2 标记型免疫传感器

选用一定的标记物如酶、荧光试剂、化学发光试剂、核素、核糖体、红细胞或金属标记物等使免疫反应产生可测定的信号.如 Penalva 等在用竞争型荧光免疫传感器测定西维因(carbaryl)的实验中,将西维因的几种衍生物半抗原与标记物辣根过氧化物酶(HRP)偶联分别用于竞争免疫反应,在含有待测物西维因的溶液中加入一定量的酶标记抗原,标记抗原和非标记抗原均竞争地与传感器上的抗体膜发生反应结合到固定表面上,再结合酶催化底物产生荧光信号的过程来测定西维因浓度,改变实验条件可筛选出一种酶标衍生物作为最佳酶标抗原<sup>[7]</sup>.而 Green 等制作的测定海水中炸药 TNT 的流动注射荧光免疫传感器则是先在微型柱中让荧光分子修饰的 TNT 抗体与 TNB-Affr-Gel 亲和达到平衡,用缓冲溶液洗去柱中未结合的物质,然后让待测溶液通过微型柱,其中的 TNT 将荧光标记的抗体置换出来,通过测定流出液的荧光强度来反应 TNT 的浓度<sup>[8]</sup>.而 Goldman 等制作的 TNT 传感器则用荧光修饰能与 TNB 发生特异性吸附的噬菌体表达缩氨酸(phage displayed peptides),替代 TNT 抗体进行置换分析<sup>[9]</sup>.

## 2 免疫传感器的制备

免疫传感器的制备中的关键步骤为抗原的制备、抗体的制备、抗原(或抗体)的固定.

### 2.1 人工抗原的合成

自然界中的生物毒素与病原体经过一定方法纯化后即可直接作为免疫原制备抗体.而半抗原物质如农药、炸药、多环芳烃、重金属离子等小分子量物质(分子量  $< 1000$ ),本身不具有诱导产生抗体的能力,必须与蛋白质载体偶联制备出人工抗原.因此,能否制备出人工抗原是免疫传感器制备成功与否的决定性一步.常用作人工抗原载体的有球蛋白(globulin)、牛血清蛋白(bovine serum albumin,简称 BSA)、人血清蛋白(human serum albumin,简称 HSA)、钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)、卵清蛋白(ovalbumin)、甲状腺球蛋白(thyroglobulin)、纤维蛋白原(fibrinogen)以及人工合成的多聚赖氨酸(poly-L-Lysine).偶联方法的选择因半抗原的结构而异.带有游离羧基或游离氨基的半抗原可采用碳化二亚胺法或戊二醛法直接与载体连接;有其它活性官能团(羟基、酚基、酮基、巯基)的半抗原须通过适当方法转变为带有游离氨基或游离羧基的衍生物,才能与载体连接.但是有些待测分子不能通过双功能试剂与载体偶联,则需通过特殊方法实现免疫测定.如 Abad 等用与农药呋喃丹(carbofuran)结构相似的化学分子合成具有羧基的衍生物用作半抗原,制备出测定呋喃丹的抗体<sup>[10]</sup>; Fährnich 等则是将 BSA 与己二酸双酰肼(adipic acid dihydrazide)交联后再与菲-9-甲醛(phenanthrene-9-carboxaldehyde)交联,制备出用于免疫测定多环芳烃(PAHs)的抗原<sup>[11]</sup>;而 Shan 等用含有苯醚结构的物质合成出各种衍生物作半抗原制备抗体来测定拟除虫菊酯(synthetic pyrethroid)<sup>[12]</sup>;重金属离子则是通过与乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、2,9-乙二酸-1,10-邻二氮杂菲(DCP)等螯合后作半抗原制成单克隆抗体<sup>[13]</sup>.

### 2.2 有害物质抗体的合成

为了制备免疫传感器,必须制备出效价高特异性强的抗体.抗体的产生一般可通过两种途径:多克隆抗体技术和单克隆抗体技术.

(1) 多克隆抗体 多克隆抗体(polyclonal antibody,简称 pAb)是通过将抗原注入动物体内,由动物体内 B 细胞产生的抗体.由于多数抗原分子具有多种抗原决定簇,因此可刺激多个 B 细胞克隆产生针对多种抗原决定簇的混合抗体<sup>[1]</sup>.由于在免疫血清中存在一些不相关的杂蛋白或非特异性的免疫球蛋白分子,在免疫传感器测定中,这些杂质会影响特异性抗体与抗原的结合量,使灵敏度降低,故须

对抗体进行纯化。

(2) 单克隆抗体 1975 年 Kohler 和 Milstein 发展了一种生产单克隆抗体 (monoclonal antibody, 简称 mAb) 的系统<sup>[14]</sup>。用免疫鼠系的免疫 B 细胞-浆细胞瘤细胞融合形成的杂交瘤细胞系可产生单一特异性、纯化的抗体。该融合的细胞是经过反复克隆 (clone) 出来的, 由该克隆细胞所产生的在分子结构、氨基酸序列以及特异性等方面都是一致的抗体称为单克隆抗体。单克隆抗体具有特异性高、亲和力强、效价高、交叉反应少等优点, 已经在免疫测定和免疫传感器方面发挥了重要作用。Sardinha 等利用谷连松 (azinphos-methyl) 的单克隆抗体制备酶联免疫传感器, 测定谷连松的最小浓度达到  $6 \text{ nmol/L}$ <sup>[15]</sup>。前述 Penalva 等分别用西维因和  $\alpha$ -萘酚的单克隆抗体和多克隆抗体制备免疫传感器, 取得较好的灵敏度和选择性<sup>[7]</sup>。

### 2.3 抗原 (或抗体) 的固定

将抗原 (或抗体) 固定在基体传感器的表面是免疫传感器制作过程中的重要一步。由于固定方法直接影响到传感器的稳定性、灵敏度、选择性等一系列性能指标, 近年来不断更新, 一直是免疫传感器科研开发工作中的热点。常用的固定方法有吸附固定法、包埋固定法、交联固定法、蛋白 A 法、黏附法等<sup>[16]</sup>, 如图 1。

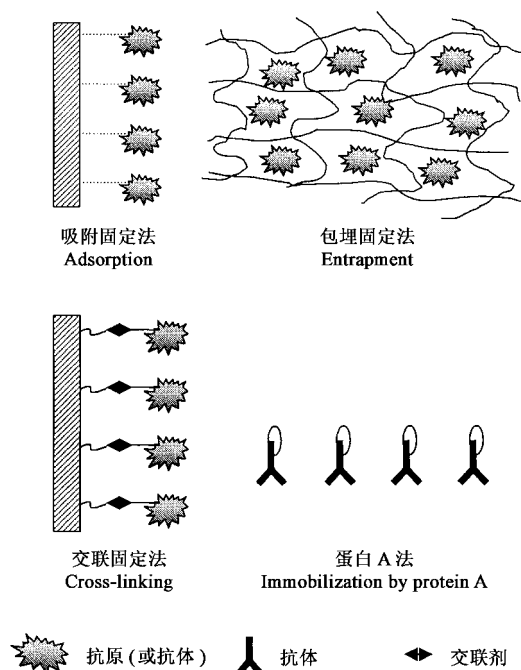


图 1 常用抗原 (或抗体) 固定方法

Fig. 1 Regular immobilization methods for antigens (antibodies)

(1) 吸附固定法 吸附法一般是将电极经过适当的处理或修饰并用抗原 (或抗体) 溶液浸泡或涂覆, 使其通过静电引力、范德华力、氢键等作用力固定在电极表面, 过程简单, 但稳定性差。Kröger 等采用直接物理吸附的方法, 将  $4 \mu\text{L}$  2, 4-D BSA 偶联物滴加到预处理过的碳电极表面,  $60^\circ\text{C}$  干燥后用磷酸缓冲溶液及水清洗除去松散的吸附物, 再次干燥后在  $4^\circ\text{C}$  下保存, 制成测定用甲醇萃取的土壤中除草剂 2, 4-D 的安培免疫传感器, 检测限可达到  $0.2 \mu\text{g/L}$ <sup>[3]</sup>。Anis 等则是将石英晶体浸在羊抗除草剂普沙特 (imazethapyr) 的抗体的磷酸盐缓冲溶液中, 在  $4^\circ\text{C}$  下过夜, 然后又用磷酸盐缓冲溶液清洗除去非特异性吸附, 制成测定普杀特的光纤免疫传感器, 检测限为  $0.3 \text{ ng/mL}$ <sup>[17]</sup>。

(2) 包埋固定法 包埋法是将抗原 (或抗体) 的单体溶液在温和的条件下形成聚合物的同时, 将抗原 (或抗体) 包埋在高聚物的微小格子中, 或用物理方法将抗原 (或抗体) 包埋在凝胶中的方法<sup>[1]</sup>。常用的基底材料有硅烷基凝胶、固体石蜡、环氧树脂、电聚吡咯、纤维素、淀粉等。Bender 等制作了一种测定水中多氯联苯 (polychlorinated biphenyls, 简称 PCBs) 的电化学免疫传感器, 在恒电位  $+0.7 \text{ V}$  下, 在铂电极 (或银电极) 的表面电聚合一层带负电的聚吡咯膜, 再将 PCBs 抗体和  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  作为带相反电荷的离子包埋在聚吡咯膜中。此法对水中氯化三联苯 (arochlors) 1242, 1248, 1254 和 1016 的检测限分别为  $3.3$ ,  $1.56$ ,  $0.39$  和  $1.66 \text{ ng/mL}$ <sup>[18]</sup>。

(3) 交联固定法 交联法是将传感器表面预先组装上一层具有特定基团的载体膜, 再通过 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 或戊二醛 (glutaraldehyde) 等偶联活化剂分别以羧基氨基键形式或席夫碱形式等将抗原 (或抗体) 键合到电极表面。Minunni 等用 EDC/NHS 活化传感器表面, 清洗后再将含带氨基的莠去津衍生物的 DMF-硼酸-乙醇溶液涂在传感器表面, 在  $25^\circ\text{C}$  下培育  $75 \text{ min}$  成膜, 清洗除去非特异性吸附后保存, 这样制成测定饮用水中莠去津浓度的表面等离子体共振免疫传感器, 检测限达到  $0.05 \text{ ng/L}$ <sup>[19]</sup>。Wittmann 等也用 EDC 将 2, 4-D 固定到经氨基硅烷化 (aminosilanized) 的石英晶体表面, 制成测定 2, 4-D 的光纤免疫传感器, 检测限可达  $0.2 \mu\text{g/L}$ <sup>[20]</sup>。Selvanayagam 等制作的离子感应场效应晶体管 (ion-sensitive field effect transistor, 简称 ISFET) 则也是利用同样的方法将抗  $\beta$  金环蛇毒素 ( $\beta$

bungarotoxin) 的抗体固定在晶体表面<sup>[21]</sup>。

(4) 蛋白 A(蛋白 G)法 蛋白 A(蛋白 G)固定抗体方法为定向固定,蛋白 A(蛋白 G)能和 IgG 的 Fc 段特异性结合,这种结合能使抗体上与抗原决定簇发生键合的活动中心所在的 Fab 段远离载体而伸向溶液,从而不影响免疫反应的活性。而且蛋白 A(蛋白 G)在金电极表面可强烈吸附,形成的膜较稳定。前述 Pribyl 等就是将莨菪去津单克隆抗体固定在涂敷有蛋白 A 的 10 MHz 石英晶体上的金电极表面<sup>[5]</sup>。而 Oh 等则利用蛋白 G 将嗜肺退伍军人菌(*Legionella pneumophila*)的抗体固定到 SPR 传感器表面制成能够测定嗜肺退伍军人菌的免疫传感器,检测限为  $10^{-5}$  cells/mL<sup>[22]</sup>。

此外,还有许多新的固定方法。Taitt 等就是利用亲和素(avidin)、生物素(biotin)之间的结合作用将抗体固定在传感器表面制成测定多种毒素的免疫传感器。首先用 biotin-LC-NHS 酯将抗体生物素化,再将其固定在包被有亲和素的传感器表面。这种固定方法能更多地保持生物分子的活性<sup>[23]</sup>。Barzen 等则将多种除草剂的衍生物与氨基右旋糖苷(aminodextran)偶联,键合到硅烷化的光纤传感器表面制成可用来测定河水中除草剂浓度的流动注射荧光免疫传感器(river analyzer,简称 RIANA)<sup>[24]</sup>。

### 3 应用于环境中有害物质检测的免疫传感器的研究开发现状

应用于检测环境中有害物质的免疫传感器多种多样,其检测原理基于免疫学、生物化学、环境科学等多种理论基础,其传感技术涉及电化学、压电学、光学等多个领域,是一门新兴跨学科交叉技术。近期发展起来的表面等离子体共振免疫传感器(surface plasmon resonance(简称 SPR) immunosensor)、消逝波免疫传感器(evanescent wave immunosensor)、平面阵列免疫传感器(planar array immunosensor)、颗粒基免疫传感器(automated particle-based immunosensor)、表面声波免疫传感器(surface acoustic wave(简称 SAW) immunosensor)等新型传感器在检测环境中有害物质方面也有相关报道。

#### 3.1 电化学免疫传感器

电流免疫传感器(amperometric immunosensor)是应用最广泛的免疫传感器之一,它基于在恒电位下电极表面发生氧化还原反应引起电流的变化来测定溶液中相应的待测物质的浓度。由于抗原抗体本身不具备电活性,一般需要使用酶做标记物。前述

Kröger 等人制作的夹心型(sandwich)2,4-D 电流免疫传感器是将一定浓度的葡萄糖氧化酶标记的 2,4-D 抗体与待测溶液混合反应一段时间后,游离的标记抗体再与固定到电极表面的抗原结合,通过催化产物的电流响应间接测定待测溶液中 2,4-D 的浓度,电流响应与结合上的酶量和待测抗原量成正相关关系<sup>[3]</sup>。竞争型(competitive)电流免疫传感器的反应原理与前述竞争型荧光免疫传感器相似,主要区别是利用酶催化底物反应产生的电信号而不是光信号来测定待测物,相应的报道有<sup>[25]</sup>、<sup>[26]</sup>等文献。前述 Bender 等制备的多氯联苯电流免疫传感器则是用脉冲加速免疫测定技术(Pulsed Accelerated Immunoassay Techniques,简称 PAIT)来测定土壤和水中的多氯联苯浓度。电化学系统中的振荡电位驱动溶液中的多氯联苯与固定在电极上的抗体发生免疫反应,而电流的大小直接与反应的速率有关,即与待测物浓度相关<sup>[18]</sup>。

Susmel 等人制作了测定食品中病原菌的非标记电化学免疫传感器,在铁氰化钾溶液中,当待测抗原与固定的抗体结合时阻碍了铁氰根离子向电极表面的扩散,依据测定一定时间内通过的电量来确定扩散系数的变化,从而测定待测物<sup>[27]</sup>。

Wang 等人制作了一种完全在芯片上操作的基于电位溶出分析(potentiometric stripping analysis,简称 PSA)标记物金属离子  $\text{Bi}^{3+}$  的电化学免疫传感器(electrochemical immunosensor),以 HSA 为基础待测物,用  $\text{Bi}^{3+}$  标记的抗原和非标记待测抗原与固定在离子选择性电极表面上的抗体发生竞争结合,分离未结合的标记物后,采用 PSA 分析芯片上释放出的  $\text{Bi}^{3+}$ ,结果与待测 HSA 浓度相关,检测限为  $0.2 \mu\text{g/mL}$ ,此法可应用于临床和环境分析中<sup>[28]</sup>。Kreuzer 等用同样的方法测定了多种海鲜中存在的毒素岗田酸(okadaic acid)、红潮毒素(brevetoxin)、软骨藻酸(domoic acid)、河豚毒素(tetrodotoxin)<sup>[29]</sup>。竞争型免疫传感器也可制成电位型的,测定标记酶催化底物产生的电位变化来间接测定样品中的抗原,如农药西玛津(simazine)的测定<sup>[30]</sup>。

Sandberg 等人将抗体固定在一层导电薄膜上,制作了一种测定莨菪去津的电导型免疫传感器(conductometric immunosensor),利用标记酶催化产物引起电导变化来定量待测物,检测限达到  $0.025 \mu\text{g/L}$ <sup>[31]</sup>。

此外,用于环境中有害物质的检测的还有基于

电化学阻抗谱 (Impedance Spectroscopy) 的免疫传感器, 如文献 [32], 基于离子感应场效电晶体的免疫传感器, 如文献 [21] [33].

### 3.2 压电免疫传感器

压电材料已广泛用于微量分析, 应用较多的是 AT-Cut 石英晶体. 抗原、抗体 (或其标记物) 都有较大的分子质量, 因此, 伴随着免疫反应的进行, 固定在石英晶体表面的物质重量增加, 从而引起晶体在电路中振荡频率  $F$  的改变.

Yokoyama 等人将莠去津的抗体吸附固定在包被有一层聚苯乙烯 (polystyrene) 的 9 MHz AT-cut 的石英晶体上制成压电免疫传感器 (piezoelectric immunosensor), 再将一定浓度的蛋白质标记的莠去津和待测样品混合, 竞争结合到晶体表面. 由于标记莠去津分子量远大于莠去津的分子量, 引起晶体振荡频率的响应, 间接测定样品浓度, 检测范围为  $0.001 \sim 1.000 \text{ ng/mL}$ , 见图 2. 此法还可测定莠去津的衍生物西玛津、扑灭津 (propazine)、莠去通

(atraton)、特丁津 (terbutryn) [34].

Zhou 等人制作的压电免疫传感器采用辣根过氧化物酶标记的竞争型免疫分析可测定 2,3,7,8-四氯二苯并  $p$ -二恶英 (2,3,7,8-TCDD), 检测线性范围为  $0.01 \sim 1.3 \text{ ng/mL}$  [35].

Horáček 等人还做了有机溶剂对压电免疫传感器测定 2,4-D 和 DCB (一种多氯联苯) 的影响的实验, 发现在 25% 以下的甲醇水溶液中仍然能够发生免疫反应, 且在纯甲苯溶液中 DCB 仍然能与固定的抗体结合 [36].

此外, 表面声波免疫传感器与压电免疫传感器存在相似之处, 它也是通过发生在晶体表面的免疫反应改变了晶体表面的负重, 从而引起声波频率的改变来测定样品中的待测抗原. Kalantar Zadeh 等用这种方法测定了鼠 IgG [37].

### 3.3 光学免疫传感器

由于很多光学性质如荧光、化学发光及反射、折射、散射、干涉、偏振等都可以作为换能器设计的依据, 故由此发展起来了很多光学传感器, 在免疫测定方面用的比较多的有消失波免疫传感器、光纤免疫传感器 (fiber optic immunosensor)、表面等离子体共振免疫传感器.

消失波免疫传感器是依据“消失波”现象设计的. 内反射光在反射点产生能穿入低密度反射介质的“消失波”, 后者随穿入低密度反射介质的距离呈指数衰减. 前述 Taitt 等制备的免疫传感器是一种可测定葡萄球菌肠毒素 B (Staphylococcal enterotoxin B)、蓖麻毒素 (ricin)、霍乱毒素 (cholera toxin)、炭疽芽孢杆菌疫苗 (Bacillus anthracis Sterne)、globigii 杆菌 (Bacillus globigii)、弗朗西斯土拉热杆菌活疫苗菌株 (Francisella tularensis LVS)、鼠疫杆菌 F1 抗原 (Yersinia pestis F1 antigen)、MS2 大肠杆菌噬菌体 (MS2 coliphage) 和鼠伤寒沙门菌 (Salmonella typhimurium) 的  $3 \times 3$  荧光平面阵列免疫传感器. 它利用消失波技术激发免疫吸附在波导表面 (即两个不同折射率的介质的界面) 的荧光分子, 并进入折射率较低的溶液介质中, 通过光波相位变化进行检测, 在对复杂体系的定量测定中具有高灵敏度和选择性 [23]. Székács 等人则是利用消失波场检测中的可见光波导光谱技术 (Optical Waveguide Light mode Spectroscopy, 简称 OWLS) 制成非标记的检测农药氟乐灵 (trifluralin) 的免疫传感器 [38].

前述 Barzen 等制备的流动注射荧光免疫传感器是将除草剂甲草胺 (alachlor)、2,4-D、莠去津、异丙隆

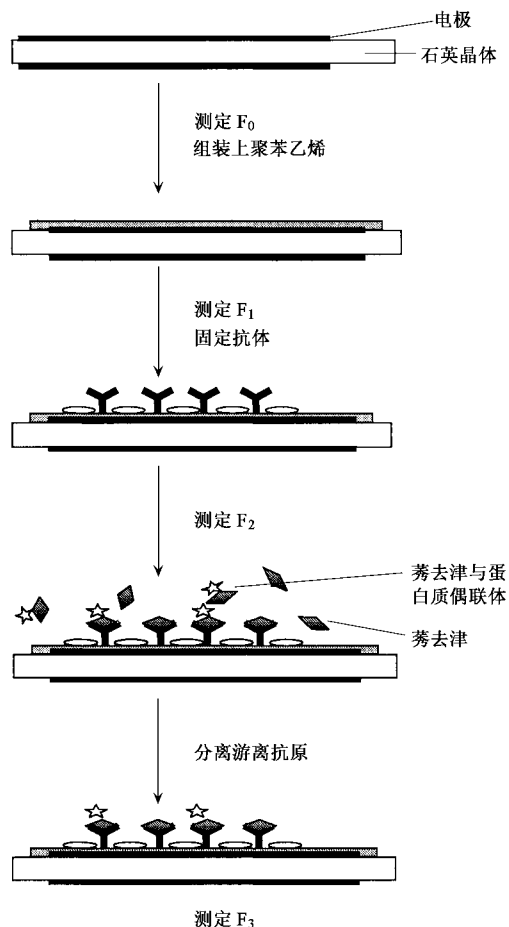


图 2 压电免疫传感器制备和测定过程

Fig. 2 Fabrication and detection process of piezoelectric immunosensor

(isoproturon)、西玛津、杀虫剂五氯酚(pentachlorophenol, 简称 PCP) 的衍生物 3 种为 1 组, 分别固定在光纤传感器表面的 3 个分离的区域上, 其测定原理是: 当传感器中的溶液腔内一定浓度的用荧光标记了的 3 种抗体与流动相中的待测物的免疫结合达到平衡时, 将传感器敏感面与溶液接触, 剩余的抗体则结合到固定相上, 通过内反射光激发结合上物质的荧光分子, 由光纤收集荧光信号, 测定信号强弱可间接得知河水中待测 3 种物质的浓度, 这种测定方法叫做结合抑制(binding inhibition)<sup>[24]</sup>。

表面等离子体共振免疫传感器是一种高灵敏度的实时分子识别系统, 它通过引起金属表面等离子体共振的入射光角度的改变来反映结合在表面的抗原-抗体数量。在前述 Minunni 等的工作中, 含有莠去津及一定量莠去津抗体的溶液流过传感器表面, 结合到表面上的抗体将引起 SPR 角的变化, 再将二抗结合到表面以扩大这种变化信号, 由此测定溶液中莠去津的浓度<sup>[19]</sup>。此外, 还有多篇运用 SPR 免疫传感器测定多环芳烃的文献, 如测定 2-羟基联苯(2-hydroxybiphenyl, 简称 2-HBP)<sup>[39]</sup>及二苯并(a)芘(benzo(a)pyrene, 简称 BaP)<sup>[40]</sup>。

Sakai 等以碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)标记抗体建立检测杀草强(Amitrole)的化学发光免疫传感器, 发光底物为金刚烷二氧丁环磷酸盐(adamantly methoxy phosphoryloxy phenyl dioxetane, 简称 AMPPD), 由光电倍增管接受发光信号, 由信号的强弱来测定杀草强的浓度, 检测限为  $11.9 \mu\text{mol/L}$ <sup>[41]</sup>。

#### 4 结论

免疫传感器是近年来发展起来的可以对环境中有害物质进行快速、准确、实时检测的新方法, 其灵敏度高、选择性好、操作简单, 正逐步走向微型化、阵列化, 从单一测定发展成同时测定多种物质, 在传感技术上也不断得到更新, 因此在环境监测领域的应用越来越广泛。

然而, 现有有害物质对应的抗体有限, 有待于更加广泛的制备; 固定后的抗体的稳定性也是免疫传感器发展的制约因素之一; 此外, 传感器在测定后再生困难, 需要重新固定分子识别膜等, 这些条件制约了免疫传感器技术从实验室技术向商业化产品的转化。因此随着今后具有良好稳定性的新抗体的研制、固定抗体的稳定剂的开发<sup>[42]</sup>及新的微型换能器的应用, 免疫传感器在环境中痕量有害物质检测中的

应用前景必将更加广阔。

#### 参考文献:

- [1] 吴健民. 临床化学自动化免疫分析[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 120~149.
- [2] Dankwardt Andrea. Immunochemical assays in pesticide analysis. In: Robert A. Meyers. Encyclopedia of Analytical Chemistry[C]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000, 1~27.
- [3] Kröger Silke, Setford Steven J, Turner Anthony P F. Immunosensor for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Aqueous/Organic Solvent Soil Extracts[J]. Anal. Chem., 1998, 70: 5047~5053.
- [4] Mastichiadis Christos, Kakabakos Sotirios E, Christofidis Ion, Michael A Koupparis, Caroline Willetts, Konstantinos Misiakos. Simultaneous determination of pesticides using a four-band disposable optical capillary immunosensor[J]. Anal. Chem., 2002, 74: 6064~6072.
- [5] Přibyl J, Hepel M, Halámek J, Skládal P. Development of piezoelectric immunosensors for competitive and direct determination of atrazine[J]. Sens. Actu. B, 2003, 91: 333~341.
- [6] Ngehr Ngwaini J, Foley P H, Kuan Shia S, Guilbault G G. Parathion antibodies on piezoelectric crystals[J]. J. Am. Chem. Soc., 1986, 108: 5444~5441.
- [7] Penalva José, Puchades Rosa, Maquieira Ángel. Analytical properties of immunosensors working in organic media[J]. Anal. Chem., 1999, 71: 3862~3872.
- [8] Green Tiffanee M, Charles Paul T, Anderson George P. Detection of 2,4,6-trinitrotoluene in seawater using a reversed displacement immunosensor[J]. Anal. Biochem., 2002, 310: 36~41.
- [9] Goldman Ellen R, Pazirandeh Mehran P, Charles Paul T, Balighian Eric D, Anderson George P. Selection of phage displayed peptides for the detection of 2,4,6-trinitrotoluene in seawater[J]. Anal. Chim. Acta, 2002, 457: 13~19.
- [10] Abad Antonio, Moreno Maryó José, Montoya Angel. Development of monoclonal antibody-based immunoassays to the N-methylcarbamate pesticide carbofuran[J]. J. Agric. Food Chem., 1999, 47: 2475~2485.
- [11] Fährnich K A, Pravda M, Guilbault G G. Disposable amperometric immunosensor for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using screen printed electrodes[J]. Biosens. Bioelectron., 2003, 18: 73~82.
- [12] Shan Guomin, Stoutamire Donald W, Wengatz Ingrid, Gee Shirley J, Hammock Bruce D. Development of an immunoassay for the pyrethroid insecticide esfenvalerate[J]. J. Agric. Food Chem., 1999, 47: 2145~2155.
- [13] Blake Diane A, Jones R Mark, Blake II Robert C, Pavlov Andrey R, Darwish Ibrahim A, Yu Haini. Antibody-based sensors for heavy metal ions[J]. Biosens. Bioelectron., 2001, 16: 799~809.
- [14] Kohler G, Milstain C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature, 1975, 256: 495.
- [15] Sardinha J P, Gil M H, Mercader J V, Montoya A. Enzyme-linked immunofiltration assay used in the screening of solid supports and immunoreagents for the development of an

- azinphos- methyl flow immunosensor[ J ]. *J. Immunol. Methods*, 2002, **260**(1,2): 173 ~ 182.
- [ 16 ] Mehrvar Mehrab, Bis Chris, Scharer Jenö M, Moor Young Murray, Luong John H. Fiber optic biosensor<sup>4</sup>/ trends and advances[ J ]. *Anal. Sci.*, 2000, **16**: 677 ~ 692.
- [ 17 ] Anis Nabil A, Eldefrawi Mohyee E. Reusable fiber optic immunosensor for rapid detection of imazethapyr herbicide[ J ]. *J. Agric. Food Chem.*, 1993, **41**: 843 ~ 848.
- [ 18 ] Bender Sharin, Sadik Omowunmi A. Direct Electrochemical Immunosensor for Polychlorinated Biphenyls[ J ]. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, **32**: 788 ~ 797.
- [ 19 ] Minunni Maria, Mascini Marco. Detection of pesticide in drinking water using real-time biospecific interaction analysis( BIA)[ J ]. *Anal. Lett.*, 1993, **26**(7): 1441 ~ 1460.
- [ 20 ] Wittmann Christine, Bier Frank F, Eremin Sergei A, Schmid Rolf D. Quantitative analysis of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in water samples by two immunosensing methods[ J ]. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**: 343 ~ 350.
- [ 21 ] Selvanayagam Z Emmanuel, Neuzil P, Gopalakrishnakone P, Sridhar U, Singh M, Ho L C. An ISFET-based immunosensor for the detection of bungarotoxin[ J ]. *Biosens. Bioelectron.*, 2002, **17**: 821 ~ 826.
- [ 22 ] Oh Byung-Keun, Kim Young-Keel, Lee Woochang, Bae Young Min, Lee Won Hong, Choi Jeong-Woo. Immunosensor for detection of *Legionella pneumophila* using surface plasmon resonance[ J ]. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, **18**: 605 ~ 611.
- [ 23 ] Taitt Chris Rowe, Anderson George P, Lingerfelt Brian M, Feldstein Mark J, Ligler Frances S. Nine-analyte detection using an array-based biosensor[ J ]. *Anal. Chem.*, 2002, **74**: 6114 ~ 6120.
- [ 24 ] Barzen Claudia, Brecht Andreas, Gauglitz Guenter. Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control[ J ]. *Biosens. Bioelectron.*, 2002, **17**: 289 ~ 295.
- [ 25 ] Killard Anthony J, Micheli Laura, Grennan Kathleen, Franek Milan, Kolar Vladimir, Moscone Danila, Palchetti Ilaria, Smyth Malcolm R. Amperometric separation-free immunosensor for real-time environmental monitoring[ J ]. *Anal. Chim. Acta*, 2001, **427**: 173 ~ 180.
- [ 26 ] Moore Eric, Pravda Miloslav, Guilbault George G. Development of a biosensor for the quantitative detection of 2, 4, 6-trichloroanisole using screen printed electrodes[ J ]. *Anal. Chim. Acta*, 2003, **484**: 15 ~ 24.
- [ 27 ] Susmel S, Guilbault G G, O' Sullivan C K. Demonstration of labelless detection of food pathogens using electrochemical redox probe and screen printed gold electrodes[ J ]. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, **18**: 881 ~ 889.
- [ 28 ] Wang Joseph, Tian Baomin. Thick-film electrochemical immunosensor based on stripping potentiometric detection of a metal ion label[ J ]. *Anal. Chem.*, 1998, **70**: 1682 ~ 1685.
- [ 29 ] Kreuzer Mark P, Pravda Miloslav, O' Sullivan Ciara K, Guilbault George G. Novel electrochemical immunosensors for seafood toxin analysis[ J ]. *Toxicon*, 2002, **40**: 1267 ~ 1274.
- [ 30 ] Yulaev M F, Sitdikov R A, Dmitrieva N M, Yazynina E V, Zherdev A V, Dzantiev B B. Development of a potentiometric immunosensor for herbicide simazine and its application for food testing[ J ]. *Sens. Actu. B*, 2001, **75**: 129 ~ 135.
- [ 31 ] Sandberg R G, Houten L J Van, Schwartz J L. A Conductive polymer-based immunosensor for the analysis of pesticide residues[ J ]. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 1992, **511**: 81 ~ 88.
- [ 32 ] Vagin Mikhail Yu, Karyakina Elena E, Hianik Tibor, Karyakin Arkady A. Electrochemical transducers based on surfactant bilayers for the direct detection of affinity interactions[ J ]. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, **18**: 1031 ~ 1037.
- [ 33 ] Starodub N F, Dzantiev B B, Starodub V M, Zherdev A V. Immunosensor for the determination of the herbicide simazine based on an ion-selective field-effect transistor[ J ]. *Anal. Chim. Acta*, 2000, **424**: 37 ~ 43.
- [ 34 ] Yokoyama Kenji, Ikebukuro Kazunori, Tamiya Eiichi, Karube Isao. Highly sensitive quartz crystal immunosensors for multisample detection of herbicides[ J ]. *Anal. Chim. Acta*, 1995, **304**: 139 ~ 145.
- [ 35 ] Zhou Xi Chun, Cao Lan. High sensitivity microgravimetric biosensor for qualitative and quantitative diagnostic detection of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins[ J ]. *Analyst*, 2001, **126**(1): 71 ~ 78.
- [ 36 ] Horáček Jiří, Skládal Petr. Effect of organic solvents on immunoassays of environmental pollutants studied using a piezoelectric biosensor[ J ]. *Anal. Chim. Acta*, 2000, **412**: 37 ~ 45.
- [ 37 ] Kalantar-Zadeh Kourosh, Wlodarski Wojtek, Chen Yuen Y, Fry Benjamin N, Galatsis Kosmas. Novel Love mode surface acoustic wave based immunosensors[ J ]. *Sens. Actu. B*, 2003, **91**: 143 ~ 147.
- [ 38 ] Székács András, Trummer Nikolett, Adányi Nóra, Váradai Mária, Szendrő István. Development of a non-labeled immunosensor for the herbicide trifluralin via optical waveguide light mode spectroscopic detection[ J ]. *Anal. Chim. Acta*, 2003, **487**: 31 ~ 42.
- [ 39 ] Gobi K Vengatajalabathy, Sasaki Makoto, Shoyama Yukihiro, Miura Norio. Highly sensitive detection of polycyclic aromatic hydrocarbons( PAHs) and association constants of the interaction between PAHs and antibodies using surface plasmon resonance immunosensor[ J ]. *Sens. Actu. B*, 2003, **89**: 137 ~ 143.
- [ 40 ] Miura Norio, Sasaki Makoto, Gobi K Vengatajalabathy, Kataoka Chiwa, Shoyama Yukihiro. Highly sensitive and selective surface plasmon resonance sensor for detection of sub-ppb levels of benzo[*a*]pyrene by indirect competitive immunoreaction method[ J ]. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, **18**: 953 ~ 959.
- [ 41 ] Sakai Takatoshi, Yamaguchi Masanori, Ishikawa Hiroya, Matsumoto Kiyoshi. Flow Injection Analysis of Amitrole by Chemiluminescent Immunosensor Using Alkaline Phosphatase and Adamantyl Methoxy Phosphoryloxy Phenyl Dioxetane[ J ]. *Anal. Sci.*, 2001, **17**(supplement): il407 ~ il410.
- [ 42 ] Park Jong-Won, Kurosawa Shigeru, Aizawa Hidenobu, Wakida Shirichi, Yamada Satoshi, Ishihara Kazuhiko. Comparison of stabilizing effect of stabilizers for immobilized antibodies on QCM immunosensors[ J ]. *Sens. Actu. B*, 2003, **91**: 158 ~ 162.