

基于电聚合作用的脂质体免疫传感器检测水体中毒莠定的实验研究

李庭, 曾光明*, 汤琳, 章毅, 黎媛萍

(湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410082)

摘要: 利用脂质体包埋亚铁氰化钾, 通过戊二醛交联毒莠定兔抗制成免疫脂质体, 开发快速检测水中毒莠定的夹心型免疫传感器. 在修饰电极的成分等方面优化传感器的工作参数, 确定了 Nafion、多壁碳纳米管(multiwalled carbon nanotubes, MWCNTs)和毒莠定兔抗浓度的最优值分别为 0.5%、 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. 免疫传感器的制作及测定过程如下: 采用循环伏安法促使 3, 4-乙烯二氧噻吩(3, 4-ethylenedioxythiophene, EDOT)发生电聚合作用, 将毒莠定兔抗直接固定到被修饰的玻碳电极上, 电极再依次与待测水样和毒莠定兔抗修饰的免疫脂质体培育一定时间, 最后利用 TritonX-100 溶解与抗原结合的免疫脂质体, 采用方波伏安法检测还原电流以反映毒莠定浓度, 整个检测过程可以在 70 min 内完成. 在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_3PO_4 中浸泡 5 min, 可实现该传感器的良好再生. 结果表明, 毒莠定的检测下限达到了 $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 线性区间为 $10^{-10} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 适合饮用水中毒莠定浓度的检测要求.

关键词: 毒莠定; 脂质体免疫传感器; 电化学聚合; 方波伏安法

中图分类号: X853 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)06-1660-06

Liposome Immunosensor for Picloram in Water Based on Electrochemical Polymerization

LI Ting, ZENG Guang-ming, TANG Lin, ZHANG Yi, LI Yuan-ping

(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: A "sandwich-type" immunosensor for the determination of picloram in water environment was developed based on the immunoliposomes prepared by crosslinking rabbit antibody against picloram (anti-picloram) and potassium ferrocyanide-encapsulated liposomes with glutaraldehyde. The working conditions including modification components on the electrode were optimized. The best performance is obtained using 0.5% of Nafion, $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ of multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) and $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of anti-picloram. The preparation and detection process of immunosensor was as follows. Cyclic voltammetry was applied to urge the electrochemical polymerization of 3, 4-ethylenedioxythiophene (EDOT) and the anti-picloram was immobilized on the modified glassy carbon electrode (GCE). Then the electrode was incubated with the analytes and immunoliposomes sequentially. The bound liposomes were lysed with TritonX-100, and square-wave voltammetry was applied to determine current response of picloram concentration. The whole process was able to be completed in 70 min. The immunosensor has good reproductivity after being soaked in $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of H_3PO_4 in 5 min. The result shows that lower detection limit for picloram is $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with linear range of $10^{-10} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, which meets the detection requirement of picloram for the safety of drinking water.

Key words: picloram; liposome immunosensor; electrochemical polymerization; square-wave voltammetry

毒莠定(picloram)是当前世界上使用较为广泛的一种激素型除草剂, 化学名称为 4-氨基-3, 5, 6-三氯吡啶甲酸, 多用于防除林业、工矿、铁路等非耕地一年生和多年生阔叶杂草和本本植物. 研究表明, 毒莠定对人眼有轻度刺激性, 可引起角膜损伤. 长期大量接触本品, 有可能引起肝脏损害. 对环境有危害, 对水体和土壤可造成污染. 美国环境保护署(U.S Environmental Protection Agency, EPA)规定饮用水中毒莠定的浓度不能超过 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (相当于 $2.07 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[1].

目前, 毒莠定的检测方法主要为气-液色谱(gas-liquid chromatography)^[2, 3]法, 这类方法需要复杂的

预处理和昂贵的设备, 过程繁复(萃取、还原、衍生化和纯化)、耗时长. 脂质体及免疫传感器是近年来环境免疫分析中的研究热点, 能快速高效的检测环境中的微生物^[4]、细菌毒素^[5]以及有机农药^[6]等痕量物质. 如 Siebert 等^[7]利用包埋罗丹明 B 的脂质体免疫传感器检测了甲草胺, 检测下限达到了 1×10^{-3}

收稿日期: 2007-06-27; 修订日期: 2007-08-07

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2004AA649370); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2005CB724203); 国家杰出青年科学基金项目(50225926, 50425927); 国家自然科学基金青年基金项目(50608029)

作者简介: 李庭(1983~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为免疫传感器在环境监测中的应用, E-mail: liting15519@163.com

* 通讯联系人, E-mail: zgming@hnu.cn

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Baumner 等^[8]用包埋抗坏血酸的脂质体免疫传感器有效检测了水体中的莠去津浓度,检测下限达到了 $1 \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. 免疫传感器对仪器设备的要求低,且操作简单,检测周期短^[9],能够实现对痕量物质的实时、在线、在体测定^[10]. 将脂质体应用于免疫传感器,利用其包埋的大量信号物质放大免疫响应信号,可以极大提高传感器的灵敏度^[11],并使免疫传感器免受非特异性连接干扰^[12]. 已报道的国内外研究中,大多数利用脂质体作为桥梁或载体,开发出各类新型的免疫传感器,如脂质体电化学免疫传感器^[13-15]、脂质体荧光免疫传感器^[16,17]、脂质体石英晶体微天平免疫传感器^[18,19]等. 此外,通过修饰电极可以改善传感器性能,如 Viswanathan 等^[20]利用 Nafion 和 MWCNTs 修饰电极,有效改善了电极的导电性,增强了传感器的灵敏度,并有报道通过戊二醛将抗体与脂质体偶联成免疫脂质体,可以保留较好的抗体活性^[21]. 本研究以毒莠定为目标待测物,利用脂质体包埋电化学活性物质-亚铁氰化钾,开发出夹心型电化学免疫传感器,对水体中的毒莠定进行了检测分析. 这种免疫传感器具有很高的灵敏度和特异性,在环境有毒有害物质快速检测方面有很大的应用潜力.

1 材料与方法

1.1 试剂

DPPC(Sigma, P5911), DPPG(Sigma, P9789), DPPE(Sigma, P1348), 十一醛(Sigma-Aldrich), 5% Nafion 溶液(Fluka), 3, 4-乙烯二氧噻吩(EDOT, Sigma), 94.6%毒莠定(氨基吡啶酸原药, 利尔化学), 毒莠定兔抗(实验室制备), 多壁碳纳米管(MWCNTs, 20~40 nm, 美国应用纳米技术集团公司), 戊二醛(天津市大茂化学仪器供应站), 亚铁氰化钾(天津市博迪化工有限公司), 其他试剂均为分析纯试剂. 如未特殊说明, 清洗电极、稀释或配制溶液时均使用 PBS. PBS 为磷酸盐缓冲溶液, NaCl 9 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 5.543 \text{ g}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 0.519 \text{ g}$ 溶于 1 L 超纯水中, 定标至 $\text{pH} = 7.4$. 透析时使用 TBS, TBS 为 Tris-HCl 缓冲溶液, NaCl 9 g、三羟甲基氨基甲烷(Tris) 12.114 g 溶于 1 L 超纯水中, 用浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 溶液定标至 $\text{pH} = 7.4$.

1.2 设备

pH 计(PHSJ-3F, 上海雷磁), 恒温磁力搅拌器(85-2, 上海青浦沪西仪器厂), P 型移液管(广州吉森仪器贸易有限公司), 超级数显恒温器(重庆慧达

试验仪器有限公司), 超声波清洗器(Branson200S 型, 旭阳公司), 微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器有限公司), 冰箱(BCD-218EI, Electrolux), 紫外分光光度计(UV-2550, 日本 Shimadzu 公司), Zeta 电位仪(英国 Malvern 公司), 滤膜(孔径为 $0.4 \mu\text{m}$, 上海市新亚净化器件厂). 电化学分析工作站(CHI 610C, 上海辰华仪器公司), 电分析中采用的三电极系统以玻璃碳电极(GCE, 直径 3mm)作为工作电极, 饱和甘汞电极(SCE)为参比电极, 铂片电极为对电极.

1.3 制备脂质体

结合旋转蒸馏法和挤压法制备脂质体. 将 22 mg 的混合溶质(由 DPPC、胆固醇、DPPG、DPPE 按摩尔比 10:10:1:1 配成)溶于 4 mL 混合溶剂(由氯仿、异丙醚、甲醇按体积比 6:6:1 配成), 加入 1 mL 浓度为 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的亚铁氰化钾溶液, 超声 5 min, 45°C 下减压旋转蒸发除尽有机溶剂, 残留淡黄色的脂质体悬浮液, 再加入 1 mL 亚铁氰化钾溶液, 超声 5 min, 45°C 下涡旋, 至瓶壁上脂质层全部悬浮于水溶液中, 过 $4 \mu\text{m}$ 的聚碳酸酯薄膜 10 次, 4°C 透析 48 h, 悬于 TBS 中, 4°C 下保存待用.

1.4 制备免疫脂质体

取 1 mL 脂质体溶液, 加入 0.7%的戊二醛, 室温下放置 10 min, 过量的戊二醛通过透析除去. 透析时间为 2 h, 中间更换 1 次透析液. 加入 200 μL 浓度为 $9.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的毒莠定兔抗, 4°C 下过夜, 15 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速下离心 15 min, 弃上清液, 用 PBS 缓冲液重复洗涤离心 5 次, 弃上清液. 最后将各管沉淀脂质体重悬于 0.5 mL PBS 缓冲液中, 置 4°C 冰箱中备用.

1.5 制作电极

GCE 电极用氧化铝泥浆和抛光布打磨抛光, 然后分别经硝酸($\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O} = 1:1$)、丙酮、超纯水超声清洗 5 min, 再用超纯水冲洗后置于 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 中, 采用循环伏安法, 在 $-1.0 \sim 1.5 \text{ V}$ 下, 扫描 30 圈, 除去电极上的氧化杂质; 取 MWCNTs 溶于 1 mL Nafion 溶液, 超声 45 min, 形成均匀的 Nafion-MWCNTs 黑色悬浮液; 取 5 μL 悬浊液滴于电极上, 室温下自然风干; 将抗体溶于 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDOT 溶液(溶剂为 PBS, $\text{pH} 7.4$, 含与水体积比为 4:9 的乙腈), 将 Nafion-MWCNTs 修饰的电极插入抗体溶液中, 在 $-0.5 \sim 1.2 \text{ V}$ 下, 采用循环伏安法扫描 13~15 圈, 抗体经电聚合作用被固定到电极上; 电极经 0.5%的聚乙烯醇(PVA)溶液处理 2 min, 用 PBS 冲洗后, 置于 4°C 冰箱中保存.

1.6 测定方法

图 1 所示为脂质体免疫传感器测定毒莠定过程.将固定了抗体的电极置于 0.1 mL 的待测的毒莠定溶液中,室温下培育 30 min,冲洗.取 10 μ L 免疫脂质体滴于电极表面,反应 30 min,冲洗.滴加 10 μ L TritonX-100 甲醇溶液在电极上,溶解脂质体,反应 5 min.将反应后的电极插入装有 5 mL PBS 溶液的电解池中,在电化学工作站上分别采用循环伏安法(CV)和方波伏安法(SWV)检测释放出来的亚铁氰化钾的氧化还原信号.

每一个测定实验都重复 3 次以取平均值,传感器的再生采用 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹的 H₃PO₄ 浸泡电极.

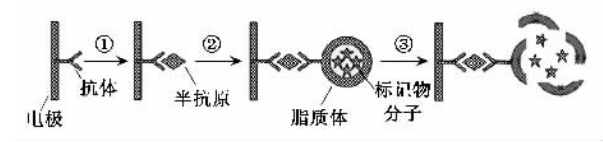


图 1 脂质体免疫传感器测定毒莠定过程

Fig.1 Schematic outlines of liposome immunosensor for picloram

1.7 脂质体免疫传感器检测水体中毒莠定

将毒莠定按标准加入法加入到煮沸后冷却的自来水中,用脂质体免疫传感器检测水体中毒莠定浓度.毒莠定是有毒药品,实验中应注意安全.

2 结果与讨论

2.1 脂质体的特征

脂质体的粒径大小与均匀程度对于传感器的灵敏度和再生性非常重要.本实验将脂质体挤压通过 0.4 μ m 的聚碳酸酯薄膜过滤器来控制脂质体的粒径,采用电位仪检测分析制得的脂质体的粒径为

385 nm,假设脂质体的膜厚为 4 nm,由内径为 377 nm 计算脂质体的包埋体积为 1.116×10^{-17} L.利用紫外分光光度计在 217.6 nm 处检测不同浓度的亚铁氰化钾溶液的吸光度,并作标定曲线,见图 2. 线性区间是 1 ~ 10 μ mol $\cdot$ L⁻¹,线性度 $R^2 = 0.9502$,线性方程为 $y = 0.1654x + 0.1208$. 取 0.1 mL 脂质体用 PBS 溶液稀释 50 倍,加入 0.1 mL TritonX-100 甲醇溶液反应 5 min,用紫外分光光度计在 217.6 nm 处测得脂质体溶解后的吸光度为 1.278,计算得 0.1 mL 脂质体包埋了 34.982 μ mol $\cdot$ L⁻¹的亚铁氰化钾溶液,假设包埋浓度为加入的初始浓度不变,是 0.15 mol $\cdot$ L⁻¹,则 1 mL 脂质体溶液含有 2.0898×10^{11} 个脂质体,每个脂质体含有 1.0077×10^6 个亚铁氰化钾分子,结果见表 1.

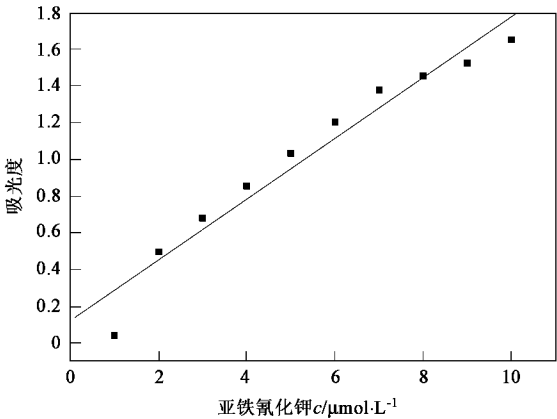


图 2 亚铁氰化钾的标定曲线

Fig.2 Calibration curve of absorbency vs potassium ferrocyanide concentration

表 1 脂质体的特征

Table 1 Characteristics of liposome

粒径 /nm	脂质体包埋体积 /L	脂质体的数量 /个 $\cdot$ L ⁻¹	亚铁氰化钾的初始浓度 /mol $\cdot$ L ⁻¹	脂质体包埋的亚铁氰化钾数目 /个
385	1.116×10^{-17}	2.0898×10^{11}	0.15	1.0077×10^6

2.2 修饰电极的最优化条件

表 2 是对裸玻碳电极和被修饰后的电极的性能的对比.由表 2 看出,上了 Nafion 后电极性能有所下降,这可能是由于 Nafion 膜分散在电极表面形成障碍层,而 MWCNTs 和 EDOT 由于其特殊的导电性使电极性能得到了很大提高.掺杂混合的 Nafion 和 MWCNTs 有助于形成更有效的电荷传导阵列,提高膜的导电性.导电聚合物修饰电极的工作方式是当电聚合发生时,电极表面产生正电荷,阳离子聚合物

网吸附带负电荷的蛋白质.在聚合 EDOT 过程中毒莠定抗体分子被固定在包被了 Nafion-MWCNTs 的玻碳电极上.传统的蛋白质固定方法中大多数蛋白质被固定,产生位阻阻碍部分产生免疫连接的抗原或抗体进入.但包被在电极表面的导电 PEDOT 聚合物仅有一薄层,因此,对抗体的生物活性来说,电聚合物只引起轻微的损失,并且这点损失可以由碳纳米管上的高分子薄膜来补偿.碳纳米管修饰电极产生的大表面积为抗体固定到电极上提供了更多空间,这些固定

表 2 电极性能对比¹⁾

Table 2 Comparison of square-wave voltammetric behavior of electrodes		
电极	峰值电流 × 10 ⁻⁶ /A	峰值电压 /V
裸玻碳电极	- 5.740	0.148
玻碳电极/Nafion	- 3.829	0.156
玻碳电极/Nafion-多壁碳纳米管	- 9.167	0.164
玻碳电极/PEDOT	- 12.90	0.168
玻碳电极/Nafion-多壁碳纳米管-PEDOT	- 15.47	0.168
玻碳电极/Nafion-多壁碳纳米管-PEDOT-抗体	- 15.06	0.168

1)采用方波伏安法,电解液 1.5 × 10⁻³ mol·L⁻¹ 的亚铁氰化钾溶液,频率为 15 Hz,振幅为 0.025 V

的抗体为免疫传感器提供了良好的再生性.

图 3 展示了对用不同浓度的 Nafion、MWCNTs、毒莠定免抗修饰电极表面后免疫传感器的响应程度,检测方法为方波伏安法,电解液为 1.5 × 10⁻³ mol·L⁻¹ 的亚铁氰化钾溶液,频率为 15 Hz,振幅 0.025 V.由图 3 可以看出,随着 Nafion 浓度的增加,峰值电流不断升高,达到了 0.5% 后,峰值电流反而

降低;较浓的 Nation 溶液形成的 Nafion 膜结构密实,不利于免疫反应的发生;而浓度较低的 Nation 溶液形成的 Nation 膜结构松散,不利于抗原的固定化,适中的 Nation 溶液形成的 Nation 膜有一定的空间,允许免疫反应顺利进行,又能兼顾抗原的固定化,因此选择 0.5% 的 Nafion 溶液修饰电极.将 2 ~ 16 mg•mL⁻¹ 的 MWCNTs 用 0.5% 的 Nafion 溶液稀释溶解后滴加到电极上测定性能,当 MWCNTs 的浓度达到 10 mg•mL⁻¹ 时,峰值电流不再明显增大,因此选择 10 mg•mL⁻¹ MWCNTs 的 Nation 溶液修饰电极.随着电极表面抗体浓度(从 0 ~ 50 μg•mL⁻¹)增加,传感器响应提高,当抗体浓度增加到 50 ~ 70 μg•mL⁻¹ 时,传感器响应不再显著增强,原因可能是毒莠定抗体通过 Nafion 膜的磺酸基团的共价键作用,强烈吸附到电极上,PEDOT 电聚合物的电子缺失中心增加了毒莠定抗体的亲和力,直接固定减少了电极表面的有机负荷.

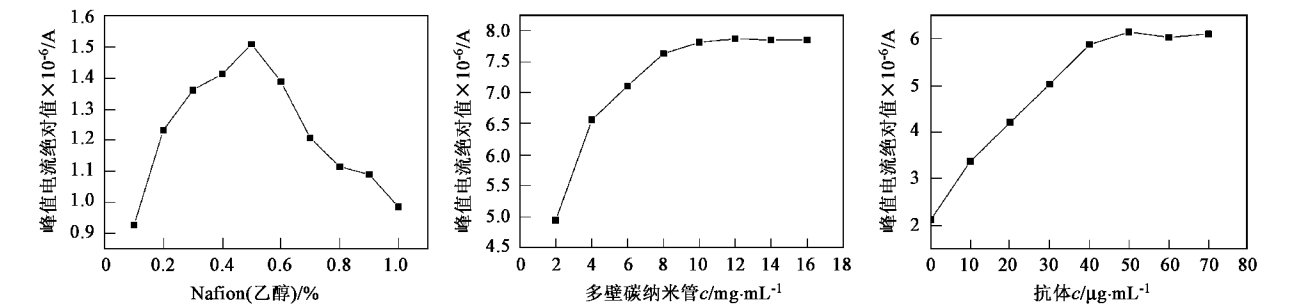


图 3 电极修饰成分的影响
Fig.3 Influence of the electrode compositions

表 3 是电极性能测试的最优化条件,其中,固定了抗体的电极在待测物中的最优培育时间为 30 min,溶胞试剂采用 0.1% 的 TritonX-100 溶于 25% 的甲醇配制,最优静置时间为 5 s,静置电压为 0,初始扫描电位为 - 0.2 V,电位增量为 0.004 V,振幅为 0.025 V,频率为 15 Hz.

2.3 检测毒莠定的标准曲线

本实验用脂质体免疫传感器检测了毒莠定浓度从 10⁻¹¹ ~ 10⁻⁴ mol·L⁻¹ 的响应程度,其标定实验的结果如图 4 所示,毒莠定的检测下限是 10⁻¹⁰ mol·L⁻¹,线性度 R² = 0.968 5,线性区间为 10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁴ mol·L⁻¹.

2.4 检测水体中的毒莠定

采用标准加入法去除基体效应,先后往煮沸后冷却的自来水中加入 10⁻¹⁰、10⁻⁹ 和 10⁻⁷ mol·L⁻¹ 的毒莠定,用脂质体免疫传感器检测水体中的毒莠定

表 3 电极修饰及方波伏安法的最优化条件

Table 3 Optimum parameters for electrode composition and square-wave voltammetry		
测试条件	测试范围	最优值
Nafion(体积分数)/%	0.10 ~ 1.0	0.5
MWCNT/mg•mL ⁻¹	2.0 ~ 16	10
抗体浓度/mg•mL ⁻¹	2.0 ~ 70	50
电极在毒莠定中培育时间/min	0 ~ 120	30
Triton X-100(溶胞试剂)(体积分数)/%	0.050 ~ 0.50	0.1
甲醇(溶胞试剂)(体积分数)/%	10 ~ 50	25
静置时间/s	1.0 ~ 10	2
静置电位/V	0.1 ~ - 0.1	0
初始扫描电位/V	- 0.3 ~ 0	- 0.2
电位增量/V	0.001 0 ~ 0.01	0.004
振幅/V	0.01 ~ 0.05	0.025
频率/Hz	5.0 ~ 50	15

含量,图 5 是 10^{-10} 和 10^{-7} mol·L⁻¹ 的方波伏安法检测图,代入标准曲线计算结果得表 4. 水体中毒莠定的检出率在 95% 以上.

2.5 脂质体免疫传感器的再生

实验采用 0.1 mol·L⁻¹ 的 H₃PO₄ 浸泡电极使传

表 4 水体中毒莠定的检测效果
Table 4 Results of picloram from water sample

加入毒莠定浓度 /mol·L ⁻¹	检测毒莠定浓度 /mol·L ⁻¹	检出率 /%	RSD (n = 3)
1 × 10 ⁻¹⁰	0.957 7 × 10 ⁻¹⁰	95.77	0.089
1 × 10 ⁻⁹	0.967 1 × 10 ⁻⁹	96.71	0.124
1 × 10 ⁻⁷	0.985 2 × 10 ⁻⁷	98.52	0.042

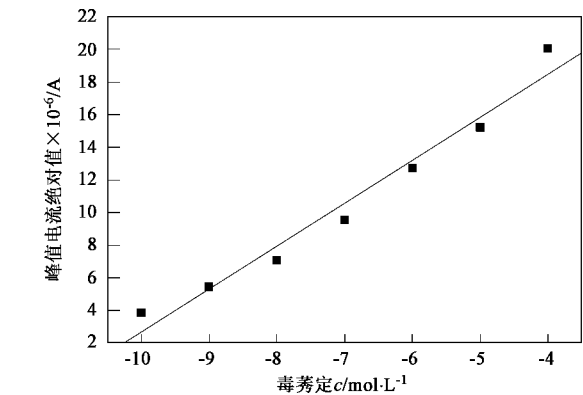
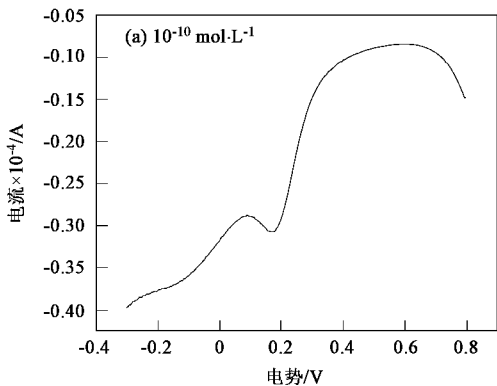


图 4 毒莠定的标定曲线
Fig.4 Calibration plot for picloram

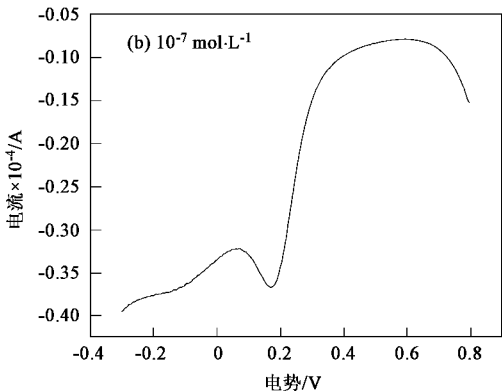


图 5 毒莠定的检测
Fig.5 Detection for picloram

感器再生, H₃PO₄ 能有效破坏抗原/抗体之间的范德华力, 并且不破坏电极上的修饰材料. 浸泡时间在 1 ~ 5 min 内, 电极响应变化比较明显, 5 ~ 8 min 内, 电极响应变化不再显著, 因此选择 5 min 作为再生最优时间.

3 结论

(1) 采用本实验所研制的免疫传感器检测毒莠定的检测下限是 10^{-10} mol·L⁻¹, 线性范围为 10^{-10} ~ 10^{-4} mol·L⁻¹, 达到了 EPA 规定饮用水中毒莠定浓度 ($< 2.07 \times 10^{-6}$ mol·L⁻¹) 的要求, 并且整个检测过程可以在 70 min 内完成, 实现了对环境中毒莠定的快速在线检测.

(2) 这种免疫传感器利用脂质体放大免疫响应信号, 极大提高了传感器的灵敏度; 利用 Nafion 和 MWCNTs 改善电极性能; 采用 ETOD 电聚合作用直接固定毒莠定抗体到电极上, 减少了电极的有机负荷. 脂质体免疫传感器操作简单, 易于再生, 在环境

监测领域有广阔的应用前景.

参考文献:

[1] Donohue J M, Lipscomb J C. Health advisory values for drinking water contaminants and the methodology for determining acute exposure values [J]. Science of the Total Environment, 2002, 288: 43-49.

[2] Moseman R F, Aue W A. The determination of picloram by gas-liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 1970, 53: 367-370.

[3] Moseman R F, Aue W A. The determination of picloram in fescue by gas-liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 1970, 49: 432-441.

[4] Ho J A, Hsu H W, Huang M R. Liposome-based microcapillary immunosensor for detection of Escherichia coli O157: H7 [J]. Analytical Biochemistry, 2004, 330: 342-349.

[5] Singh A K, Harrison S H, Schoeniger J S. Gangliosides as receptors for biological toxins: Development of sensitive fluoroimmunoassays using ganglioside-bearing liposomes [J]. Analytical Chemistry, 2000, 72: 6019-6024.

[6] 蔡强, 余若祯, 何苗, 等. 检测 2,4-D 的一次性安培型免疫传感器[J]. 环境科学, 2005, 26(6): 169-172.

- [7] Siebert S T, Reeves S G, Roberts M A, *et al.* Improved liposome immunomigration determination strip assay for alachlor[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1995, **311**: 309-318.
- [8] Baumner A J, Schmid R D. Development of a new immunosensor for pesticide detection: disposable system with liposome-enhancement and amperometric detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 1998, **13**: 519-529.
- [9] Ho J A, Wu L C, Huang M R, *et al.* Application of ganglioside-sensitized liposomes in a flow injection immunoanalytical system for the determination of Cholera Toxin [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, **79**: 246-250.
- [10] 汤琳, 曾光明, 黄国和, 等. 免疫传感器用于环境中痕量有害物质检测的研究进展[J]. *环境科学*, 2004, **25**(4): 170-176.
- [11] Chen H, Jiang J H, Huang Y. An electrochemical impedance immunosensor with signal amplification based on Au-colloid labeled antibody complex [J]. *Sensors and Actuators B*, 2006, **11**(7): 211-218.
- [12] Edwards K A, Baumner A J. Liposomes in analyses [J]. *Talanta*, 2006, **681**: 421-1431.
- [13] Alfonta L, Singh A K, Willner I. Liposomes Labeled with Biotin and Horseradish Peroxidase: A Probe for the Enhanced Amplification of Antigen-Antibody or Oligonucleotide-DNA Sensing Processes by the Precipitation of an Insoluble Product on Electrodes[J]. *Analytical Chemistry*, 2001, **73**: 91-102.
- [14] Lee K S, Kim T H, Shin M C, *et al.* Disposable liposome immunosensor for theophylline combining an immunochromatographic membrane and a thick-film electrode[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, **380**: 17-26.
- [15] Lee H Y, Jung H S, Fujikawa K. New antibody immobilization method via functional liposome layer for specific protein assays [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, **21**: 833-838.
- [16] Yoon C H, Cho J H, Oh H I. Development of a membrane strip immunosensor utilizing ruthenium as an electro-chemiluminescent signal generator [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, **19**: 289-296.
- [17] Bacigalupo M A, Ius A, Longhi R, *et al.* Homogeneous immunoassay of atrazine in water by terbium-entrapping liposomes as fluorescent markers[J]. *Talanta*, 2003, **61**: 539-545.
- [18] Kobatake E, Yun K, Yanagida Y, *et al.* Immunoassay systems based on immunoliposomes consisting of genetically engineered single-chain antibody [J]. *Sensors and Actuators B*, 2000, **65**: 42-45.
- [19] Alfonta L, Willner I. Electrochemical and quartz crystal microbalance detection of the cholera toxin employing horseradish peroxidase and GM1-functionalized liposomes [J]. *Analytical Chemistry*, 2001, **73**: 5287-5295.
- [20] Viswanathan S, Wu L C, Huang M R, *et al.* Electrochemical Immunosensor for Cholera Toxin Using Liposomes and Poly(3, 4-ethylenedioxythiophene)-Coated Carbon Nanotubes [J]. *Analytical Chemistry*, 2006, **78**: 1115-1121.
- [21] Aslam M, Dent A. *Bioconjugation* [M]. London: Macmillan Reference Ltd, 1998. 370-422.