

检测 2,4-D 的一次性安培型免疫传感器

蔡强,余若祯,何苗,施汉昌

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室,北京 100084)

摘要: 2,4-D 是广泛使用的除草剂,以 2,4-D 为检测目标,研究了安培型免疫传感器.首先采用 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)作为交联剂制备 2,4-D 与 BSA 以及 PLL 的偶联物.用结合比 1:16 的 2,4-D 与偶联物制备兔抗血清.免疫传感器的制备包括 2 个步骤,使用丝网印刷工艺制备一次性碳电极,然后通过戊二醛交联在电极表面固定 2,4-D 与多聚赖氨酸(PLL)的偶联物.待测水样与 2,4-D 抗血清和 HRP 酶标二抗进行间接免疫竞争反应.在 HRP 酶在邻苯二胺和 H_2O_2 的共同作用下发生酶促反应,检测还原电流以反映 2,4-D 的浓度.试验了不同浓度抗血清和酶标二抗对检测信号的影响,结果表明,2,4-D 的检测下限达到 1.69 ng/mL ,线性区间 $1.69 \sim 30\,000\text{ ng/mL}$,适合饮用水中 2,4-D 的检测要求.

关键词: 丝网印刷电极; 2,4-D; 安培型; 免疫传感器

中图分类号: X859 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)06-0169-04

Determination of 2,4-D Using Disposable Amperometric Immunosensor

CAI Qiang, YU Ruozheng, HE Miao, SHE Han-chang

(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) is the herbicide widely applied in the world. An amperometric immunosensor to detect 2,4-D was described. Firstly, 2,4-D protein conjugate was prepared using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC). The rabbit antiserum was prepared with substitution degree of 16. Secondly, the immunosensor was fabricated using screen printing technique. The 2,4-D/PLL conjugate was immobilized on the surface of screen printed carbon electrode via crosslinking method. The free and immobilized 2,4-D competed the binding sites of anti-2,4-D antiserum. After HRP-labeled goat-anti-rabbit IgG binding with anti-2,4 antiserum, the substrate was added and current response was recorded. The dependency of concentration of antiserum and HRP-labeled anti-IgG on current response was also studied. The result shows that limit of detection for 2,4-D is 1.69 ng/mL with linear range $1.69 \sim 30\,000\text{ ng/mL}$, which reveal the potential ability to evaluate the safety of drinking water.

Key words: screen printed electrode; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; amperometric; immunosensor

2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, 2,4-D)是一种世界范围内广泛使用的有机氯除草剂.研究表明,2,4-D 易于通过皮肤和呼吸进入人体,具有潜在的致癌性、致突变性,并影响人类的正常生育.世界卫生组织(WHO)以及我国饮用水卫生规范中规定 2,4-D 的最大浓度小于 30 ng/mL ^[1].

目前 2,4-D 检测技术不能完全保障水质安全,常规方法(如固-液萃取和气相色谱-质谱技术)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,限制了常规监测次数^[2,3].免疫分析技术也是检测 2,4-D 的重要方法,主要是利用 2,4-D 与特异性抗体反应,并通过测定标记物(如放射性同位素、酶等)来反映水体中 2,4-D 的含量^[4,5].而安培型免疫传感器结合了免疫分析与电化学传感器的优点,有良好的特异性和较低检测限,与其它技术相比,对仪器设备的要求低,操作简单^[6],近年来用于检测小分子有机污染物,如 PAH,

毒素、雌二醇等^[7-9].另外,安培型传感器可以采用丝网印刷技术制备,工艺简单,进一步降低了检测的成本^[10].本文以检测 2,4-D 为目标,研究一次性免疫传感器制备技术和检测条件.

1 材料与方法

1.1 试剂

2,4-D (Sigma D70724),牛血清白蛋白(BSA, Amresco),多聚赖氨酸(PLL, Sigma P7890),HRP 标记的羊抗兔 IgG (Amresco),1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC, Sigma),戊二醛(北京益利精细化学品有限公司), σ -邻苯二胺(OPD, Amresco),过氧化氢(北京化工厂).若未特殊说明,

收稿日期:2004-11-26;修订日期:2004-12-29

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA649160);中国博士后基金(023208004)

作者简介:蔡强(1972~),男,博士后,主要从事生物传感器和环境监测方面的研究.

稀释或配制溶液时均使用 PBS;清洗电极或酶标板时均使用 PBST.其中,PBS 为磷酸盐缓冲溶液,NaCl 8.4983g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5.432g、 NaH_2PO_4 0.5198g 溶于 1 L 超纯水中,定标至 $\text{pH} = 7.4$;PBST 由 1 L PBS 中加入 0.5 mL Tween-20 配制,定标至 $\text{pH} = 7.4$.

1.2 设备

超声波清洗仪(Branson200,旭阳公司),手动丝网印刷机(MT-45A,敏太印刷机械公司),电化学工作站(CHI660A,美国 CHI 公司),酶标仪(Model550, Bio-Rad),洗板机(Model1575, Bio-Rad),氮气吹干机(BF2000,八方世纪),生化培养箱(HPS-280,东联电子),冰箱(BCD-218EI, Electrolux).

1.3 2,4-D 偶联物的制备

2,4-D 与蛋白质大分子的偶联物用于制备抗血清和免疫竞争实验.本文采用水溶性碳化二亚胺,活化 2,4-D 的羧基,进行蛋白偶联.研究中制备了 2 种偶联物:2,4-D-PLL 和 2,4-D-BSA.前者用于免疫竞争,后者用于制备抗血清.

2,4-D-PLL 偶联物制备如下:称取 18 mg 的 2,4-D,溶于 1.5 mL 0.05 mol/L 的 PBS 缓冲液,加入 19 mg EDC 并搅拌.然后加 200 μL 10 mg/mL 的 PLL 到溶液中并搅拌.混合溶液在室温下静置 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 24 h(0.1 mol/L NaHCO_3 ,换 4 次 PBS 溶液).

2,4-D-BSA 偶联物制备过程类似:取 2 mL 浓度为 6 mg/mL 的 2,4-D 的 PBS 缓冲液,加入 40 μL 浓度为 50 mg/mL 的 BSA 溶液,加入 7 mg EDC 同时轻轻搅拌.分别在 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 18 h、25 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h,以 0.1 mol/L NaHCO_3 溶液透析.

制备好的偶联物 - 20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存.采用紫外分光光度计法检测其偶联比.

1.4 2,4-D 抗血清的制备

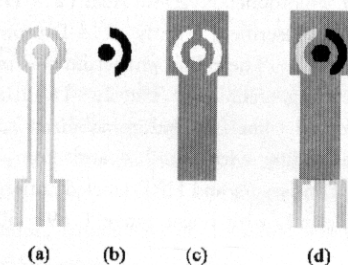
采用偶联比为 16:1 的 2,4-D-BSA 偶联物免疫雌性新西兰白兔制备抗血清.初次免疫和加强免疫时采用相同的剂量.其中 2,4-D-BSA 偶联物剂量为 0.8 mg,2,4-D 为 40 μg .初次免疫时偶联物用弗氏完全佐剂乳化,加强免疫时采用弗氏不完全佐剂乳化.新西兰白兔采用背部皮下多点注射免疫原,并用耳缘静脉取血法提取抗血清.初次免疫后 10 d 或 14 d,进行加强免疫,随后 7 d 或 10 d 采血测定效价.重复加强免疫,并抽血检测抗血清效价,直到获得效价较高(大于 2 000)的抗血清.

2,4-D 包被抗原采用多聚赖氨酸为载体,OVA

为封闭液.抗血清以 4 倍梯度稀释,初始稀释倍数为 400 倍.ELISA 试验的结果以 405 nm 波长下的 OD 值表示.

1.5 免疫传感器的制备

免疫传感器的制备包括丝网印刷电极制作和生物分子的固定化 2 个步骤.图 1 是电极的结构和制作工艺示意图.首先在 0.2 mm 厚的 PVC 薄膜上印刷银导电轨道,选用的银浆为 Acheson 公司 427SS,结构如图 1(a).然后用碳浆(日本 Jujo Ch01)印制碳电极,其中直径 3 mm 的圆盘为工作电极,图 1(b)中的半环为对电极.最后,印刷蓝色油墨作为绝缘层,结构如图 1(c).制成的电极见图 1(d).在每次印刷完毕之后,电极都在烘箱内以 40 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 h.在固定抗体之前,制备好的电极在室温下老化 7 d.由于采用裸露出银导轨作为参比电极,为了信号更稳定,缓冲液中氯离子的浓度应至少大于 0.01 mol/L.测定批量制备碳电极的电荷传递系数,其变异系数 $\text{CV} < 5\%$.



(a)银导电轨道 (b)碳工作电极和碳对电极
(c)绝缘层 (d)丝网印刷电极

图 1 丝网印刷电极制备过程

Fig.1 Scheme of a screen printed electrode preparation

本文采用间接免疫竞争法,所以需在电极上固定 2,4-D-PLL 的偶联物.在固定生物分子前,电极在去离子水中超声清洗 20 min,氮气吹干.包被电极的溶液需要新鲜配制,成分为 1:100 稀释的 2,4-D-PLL 偶联物、5 mg/mL 的 OVA、0.6% 的戊二醛.每个电极点样 4 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h,分别用 PBST 和超纯水清洗吹干后,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存.由于预温育:2,4-D、抗血清混合溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h,清洗吹干;电极在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h,清洗吹干后,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存(清洗步骤:PBST 清洗若干次,超纯水清洗,氮气吹干).

1.6 安培型免疫传感器测定 2,4-D

待测的 2,4-D 与 2,4-D 抗血清(1:300 倍稀释)混合,并滴加到电极表面,每个电极 4 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,清洗吹干.然后把 HRP 酶标记的羊抗兔 IgG 滴加到电极表面,每个电极点样 4 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应

30 min,清洗吹干.酶活力的检测:底物溶液是 H_2O_2 与 OPD,浓度分别为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$.新鲜配制底物溶液,用 PBS 缓冲液稀释,OPD 与 H_2O_2 浓度为 $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$.每个电极点样 $40 \mu\text{L}$ 底物溶液,反应 120s 后,使用 CHI660A 电化学工作站检测恒电位下的时间-电流曲线.其中极化电压是 -100 mV ,检测时间 120s.

1.7 间接竞争 ELISA 测定 2,4-D

为了比较安培型免疫传感器和常规 ELISA 的试验结果,在 96 孔酶标板采用间接竞争法测定 2,4-D.实验步骤如下:在 96 孔板上每孔加 2,4-D PLL 偶联物(1:100 稀释) $100 \mu\text{L}$, 4°C 下过夜. PBST 洗板后,用配制好的 0.5 % OVA 封闭液,每孔 $100 \mu\text{L}$.于 37°C 下放置 1h.竞争反应过程与免疫传感器类似,在 EPPENDORF 管中预温育 1:300 稀释的抗血清和待测水样, 37°C 下 40 min 后,取 $100 \mu\text{L}$ 溶液加入包被有 2,4-D PLL 的酶标板中, 37°C 下竞争反应 30 min,洗板后加 $100 \mu\text{L}$ HRP 酶标记的羊抗兔 IgG (1:100 稀释).洗板后每孔加入 5 mmol/L OPD 溶液 $200 \mu\text{L}$ 和 30 % H_2O_2 溶液 $40 \mu\text{L}$,酶促反应 20 min 后,加入 $10 \mu\text{L}$ 的 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,最后用酶标仪检测 450nm 下的吸光度.

2 结果与讨论

2.1 偶联物与抗血清制备与讨论

高效的特异性抗体是影响免疫传感器性能的关键因素之一.由于 2,4-D 这类小分子半抗原(分子量 <1000),本身不能刺激机体产生抗体,需要 2,4-D 与大分子的偶联物作为免疫原来制备 2,4-D 的抗体.2,4-D 与载体蛋白(如 BSA)的偶联比对于抗体的质量有较大影响:当偶联比在 10~20 的情况下,可获得针对 2,4-D 特异性较强的抗血清;结合比小于 10 的情况下,偶联物上的半抗原远远少于载体蛋白的抗原决定簇,抗血清中对载体蛋白的特异性抗体较多;当偶联比大于 20 时,载体蛋白的免疫原性受到抑制,免疫动物难以产生免疫反应.本试验中采用偶联比为 16:1 的免疫原刺激新西兰白兔产生了较强的免疫反应,提取出的抗血清,采用间接 ELISA 法测定,结果如图 2.其中抗血清稀释度 6.55×10^6 时,从 2 个兔子中采集的抗血清,其反应强度(以吸光度计算)比背景值和阴性样本高 0.02,因此该抗血清对 2,4-D 的效价为 6.55×10^6 .结果一致性较好.

2.2 间接竞争法的棋盘实验

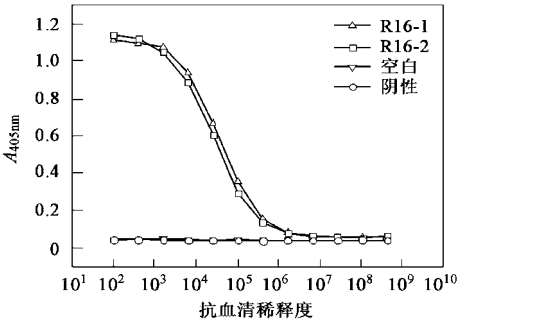


图2 兔抗血清的效价测定曲线(R16-1中R表示新西兰白兔,16表示结合比为16的免疫原,1代表兔子的编号)

Fig.2 ELISA for titer rabbits

免疫传感器的灵敏度、线性区间与竞争反应中的 2,4-D 抗体和酶标二抗浓度相关.通过比较不同浓度的抗体、酶标二抗之间的组合(棋盘实验),确定最优的实验条件(见表1).

表1 不同浓度 2,4-D 抗体和酶标抗体
对免疫传感器的电流响应的影响/ nA

Table 1 Effect of concentration of antibody and
HRP-labeled anti-IgG on current of immunosensor/ nA

2,4-D 抗体 (稀释度)	HRP 酶标二抗浓度(稀释度)		
	1:10	1:100	1:1000
1:10	101.62	38.26	7.75
1:100	51.01	17.34	4.89
1:1000	17.32	9.88	4.17

在 2,4-D 抗体稀释度大于 1:100 时,电流响应小,HRP 酶标二抗稀释度从 1:10 变化到 1:1000,电流变化只有 13.15 nA,灵敏度较低.由于电化学仪器的噪声范围在 0.1 nA 之间,所以,容易对结果产生不良影响.2,4-D 抗体稀释度在 1:10 和 1:100 时其灵敏度都可满足测试要求.而酶标二抗的稀释度 1:10~1:100 时才可以得到较高的电流响应.

非特异性吸附是影响免疫传感器的另外一个重要因素.本文中的非特异性吸附主要来自于酶标二抗.在稀释度 1:10~1:100 之间分析(见表2),酶标二抗稀释度在 1:10 和 1:100 时,非特异性吸附产生的电流占总信号的比率超过 20%.因此酶标二抗为 1:50 时,非特异性吸附的影响小.

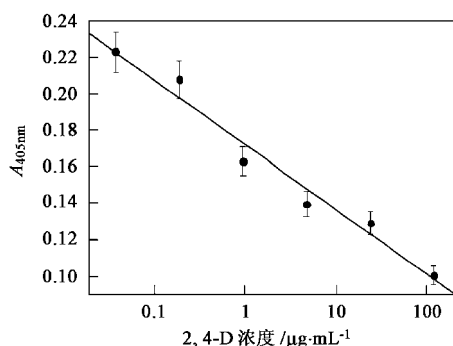
表2 非特异性吸附对传感器电流响应的影响/ nA

Table 2 Impact of non-specific absorbency of immunosensor/ nA

2,4-D 抗体浓度 (稀释度)	HRP 酶标二抗浓度(稀释度)		
	1:10	1:50	1:100
0	22.32	13.74	4.17
1:10	101.62	73.01	41.30
1:50	65.05	30.18	4.88
1:100	51.01	28.50	17.34

2.3 检测 2,4-D 的标定曲线

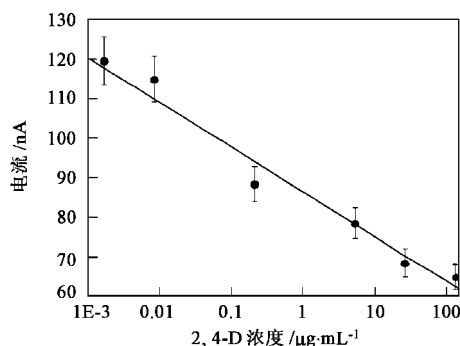
由于本文研究的安培型免疫传感器的免疫反应过程与常规 ELISA 类似,因此在酶标板上作间接免疫竞争试验测定 2,4-D.其标定实验的结果如图 3 所示.其中酶标二抗和抗 2,4-D 抗血清的稀释度均为 1:100.检测下限是 38.4 ng/mL,线性区间为 38.4 ng/mL ~ 120 μ g/mL,线性度 $R = 98.6\%$.但是灵敏度较低,最大吸光度小于 0.3.相同条件下,安培型免疫传感器具有更高的灵敏度,标定实验结果表明(见图 4),2,4-D 的检测下限 1 ng/mL,线性区间在 1.69 ng/mL ~ 30 μ g/mL;线性度 $R = 97.4\%$.当酶标二抗浓度增大为 1:50 时,灵敏度增大,但是检测下限升高(如图 5 所示).



酶标二抗浓度为 1:100

图 3 ELISA 测定 2,4-D 的标定曲线

Fig. 3 Logarithm calibration curve of absorbency vs free 2,4-D based on ELISA(The titre of HRP labeled goat anti IgG 1:100)



酶标二抗浓度为 1:100

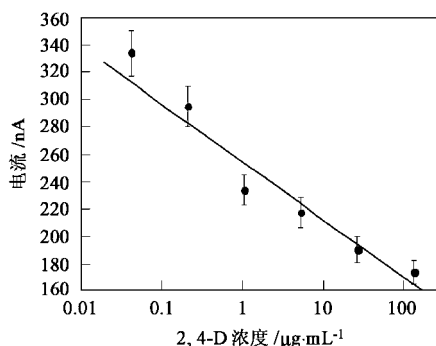
图 4 安培型免疫传感器检测 2,4-D 的标定曲线

Fig. 4 Logarithm calibration curve of current vs free 2,4-D

3 结论

2,4-D 生物素的检测下限 1.69 ng/mL,线性范围是 1.69 ng/mL ~ 30 μ g/mL,符合饮用水标准中关

于 2,4-D 的检测要求(最大检出浓度 < 30 ng/mL)范围.这种传感器采用丝网印刷工艺制备,工艺简单,成本低,便于操作,在快速检测饮用水中 2,4-D 方面有应用潜力.



酶标二抗浓度为 1:50

图 5 安培型免疫传感器检测生物素的标定曲线

Fig. 5 Logarithm calibration curve of current vs free 2,4-D

参考文献:

- [1] World Health Organization. Guidelines for drinking water quality, Vol. 1, 3rd version [M]. Geneva: World Health Organization, 2004.
- [2] Farid E A. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks[J]. Trends in analytical chemistry, 2001, **20**(11): 649 ~ 661.
- [3] Ewa M, Martyna R, Bogdan Z. Sample preparation and chromatographic analysis of acidic herbicides in soils and sediments[J]. Critical reviews in analytical chemistry, 2003, **33**(1): 1 ~ 17.
- [4] Dankwardt A. Immunochemical Assays in Pesticide Analysis [A]. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry [C]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1996. 1 ~ 16.
- [5] González M A, Puchades R, Maquieira A. On-line immunoanalysis for environmental pollutants: from batch assays to automated sensors[J]. Trends in analytical chemistry, 1999, **18**(3): 204 ~ 218.
- [6] Parellada J, Narvóz A, López M A, et al. Amperometric immunosensors and enzyme electrode for environmental application[J]. Analytica Chimica Acta, 1998, **362**: 47 ~ 57.
- [7] Fährnich K A, Pravda M, Guilbault G G. Disposable amperometric immunosensor for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using screen-printed electrodes [J]. Biosensor and Bioelectronics, 2003, **18**(1): 73 ~ 82.
- [8] Mark P Kreuzer, Miloslav Pravda, Ciara K O' Sullivan, et al. Novel electrochemical immunosensor for seafood toxin analysis [J]. Toxicon, 2002, **40**(9): 1267 ~ 1274.
- [9] Rodney W C, Michael J D. Biosensor for on-line measurement of bovine progesterone during milking [J]. Biosensors and Bioelectronics, 1998, **13**(11): 1173 ~ 1180.
- [10] Miquel A S, Arben M, Salvador A. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review [J]. Sensors and Actuators, 2000, **69**: 153 ~ 163.