

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410096073.1

[51] Int. Cl.

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 33/561 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 27/42 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 3 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 100374852C

[22] 申请日 2004.11.29

[21] 申请号 200410096073.1

[73] 专利权人 清华大学

地址 100084 北京市海淀区清华园

[72] 发明人 施汉昌 何苗 蔡强

[56] 参考文献

CN1447113A 2003.10.8

A disposable amperometric immunosensor for 2, 4 - dichlorophenoxyacetic acid. Tomas Kalab, Petr Skladal. Analytica Chimica Acta, Vol. 304 . 1995

Ferrocene - Nafion 修饰厚膜碳糊电极的葡萄糖传感器研究. 贾能勤, 高林, 孙翠珏, 章宗穰. 上海师范大学学报, 第 27 卷第 4 期. 1998

电化学免疫传感器在环境污染监测中的研究进展. 蔡强, 何苗, 施汉昌. 传感技术学报, 第 3 期. 2004

丝网电化学传感器及其应用研究进展. 张贤珍, 刘旭辉, 莫志宏. 现代科学仪器, 第 4 期. 2002

审查员 海岩冰

[74] 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所

代理人 廖元秋

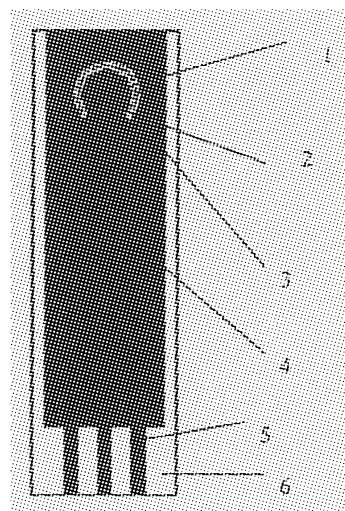
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种检测 2, 4 - 滴的一次性安培型免疫传感器的制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种检测 2, 4 - 滴的一次性安培型免疫传感器的制备方法, 属于环境监测领域。该方法包括: 丝网印刷工艺制备传感器; 2, 4 - 滴 - 多聚赖氨酸的合成; 2, 4 - 滴抗血清的选用; 2, 4 - 滴敏感生物分子在传感器表面的固定化。该方法制备的传感器结构简单, 与其他对称式三电极结构相比, 具有电场分布均匀, 呈环形对称, 与电子媒介体的扩散方向一致, 可以较好地抑制电流噪声、消除干扰。该制备和使用方法操作方便, 成本低, 可快速进行 2, 4 - 滴的野外分析。



1、一种检测 2,4-滴的一次性安培型免疫传感器的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

1) 丝网印刷工艺制备传感器：先在 PVC 基片上印刷银浆层形成同心分布的三电极，银浆层上的部分区域印刷碳浆层，再印刷绝缘层；工作电极为中心的碳圆盘电极；

2) 2,4-滴-多聚赖氨酸的合成：采用碳二亚胺法合成 2,4-滴-多聚赖氨酸偶联物，偶联比在 10~20 之间；

3) 2,4-滴抗血清的选用：选用兔源 2,4-滴抗血清，其效价大于 2000；

4) 2,4-滴敏感生物分子在传感器表面的固定化：首先采用戊二醛交联法固定多聚赖氨酸-2,4-滴、卵清白蛋白、戊二醛，其中卵清白蛋白用于阻断非特异性结合位点；然后进行抑制反应的预温育，在传感器表面滴加标准浓度 2,4-滴和抗血清混合溶液固化后形成生物分子膜层。

## 一种检测 2,4-滴的一次性安培型免疫传感器的制备方法

### 技术领域

本发明属于环境监测领域，特别涉及可快速检测 2,4-滴的新技术。这种一次性免疫传感器可以用于湖泊、水库、河流、污水处理厂、农药厂等的污染快速监测，也可以用于蔬菜等食品中 2,4-滴农药残留的快速检测。

### 背景技术

40 年代以来，人类大量使用合成有机化学农药防治农田病虫害，2,4-滴是 2,4-二氯苯氧乙酸（2,4-滴 *ichlorophenoxyacetic Acid* 滴，中文名称缩写为 2,4-滴）是一种世界范围内广泛使用的除草剂和植物生长调节剂，是全世界年销售额超过亿元的农药之一，也是 20 世纪全球使用最广泛和对全球农业影响最大的农药品种的 22 种农药之一。目前大量研究表明，2,4-滴易于通过皮肤和呼吸进入人体，具有潜在的致癌性（诱发软组织恶性肿瘤和何杰金氏淋巴瘤）、致突变性，并影响人类的正常生育，对人类健康和生态环境造成的危害不容忽视。《中华人民共和国标准饮用水水质卫生规范》的非常规检测项目中将 2,4-滴的最大浓度规定为 0.03mg/L。目前，常用的 2,4-滴检测方法是固-液萃取（*Liqui 滴-Soli 滴 Extraction*）和气相色谱-质谱技术（GC-MS），需要复杂的预处理和昂贵的设备，检测过程繁复（萃取、还原、衍生化和纯化）、耗时长，限制了常规监测次数。

免疫分析技术也是检测 2,4-滴的重要分析方法之一。主要是利用放射性同位素、酶等物质标记 2,4-滴，在待测 2,4-滴与标记 2,4-滴共同竞争结合 2,4-滴抗体后，通过测定标记物含量反映待测水样中 2,4-滴的浓度。近年来，检测环境有机污染物的安培型免疫传感器也越来越引起人们的重视。这种电化学器件，与传统的免疫化学分析方法相结合，既有很好的特异性，又有较低的检测限。而且与其他技术相比，这种传感器对仪器设备的要求低，操作简单。采用丝网印刷工艺制备的一次性厚膜型电化学免疫传感器更进一步降低了检测的成本，使大规模地快速、现场检测环境有机污染物成为可能。

近年来，相继采用丝网印刷工艺开发了三电极结构的免疫传感器，主要结构是条式和对称的圆盘式。其中条式结构没有考虑电极表面溶液扩散方向圆心对称的特点，需要额外增加定量池的结构。对称圆盘式虽然改进了这一点，但其参比电极和对电极对称的分立于工作电极两侧，其电场分布和电流趋势呈单边分布，导致信号检测不稳定。

目前 2,4-滴免疫传感器制备技术主要是停留在实验室研究阶段，使用的主要是玻碳电极。少数集成电路工艺制备的电极，也都是基于直接竞争实验的。而间接免疫竞争法的研究，也由于偶联物的桥基作用明显，因此检测中要采用 2,4-滴与其抗血清预先温育的方法。该方法的检测时间和检测步骤较长。

## 发明内容

本发明目的是为克服已有技术的不足之处，提出一种检测 2,4-滴的一次性安培型免疫传感器及其制备和使用方法，该传感器结构简单，与其他对称式三电极结构相比，具有电场分布均匀，呈环形对称，与电子媒介体的扩散方向一致，可以较好地抑制电流噪声、消除干扰。该制备和使用方法操作方便，成本低，可快速进行 2,4-滴的野外分析。

本发明的检测 2,4-滴的一次性安培型免疫传感器，为采用丝网印刷工艺制备的厚膜电极，其特征在于，包括 PVC 基板，及在该基板上依次同心分布的碳圆盘电极、参比电极、对电极及与各电极相连的接线端，绝缘层，以及在碳圆盘电极上固定的生物分子膜层。

本发明的上述 2,4-滴一次性安培型免疫传感器的制备方法如下：

1) 丝网印刷工艺制备传感器：先在 PVC 基片上印刷银浆层形成同心分布的三电极，银浆层上的部分区域印刷碳浆层，(碳粉直径可在  $10\sim 100\mu\text{m}$ )，再印刷绝缘层；工作电极为中心的碳圆盘电极(印刷好的电极可在  $50\pm 3^\circ\text{C}$  下过夜；同一批制备的碳圆盘电极中抽样测定电极的电荷传递系数)；

2) 2,4-滴-PLL 的合成：采用碳二亚胺法合成 2,4-滴-PLL 偶联物，偶联比在  $10\sim 20$  之间；

3) 2,4-滴抗血清的选用：选用兔源 2,4-滴抗血清，其效价大于 2000；

4) 2,4-滴敏感生物分子在传感器表面的固定化：首先采用戊二醛交联法固定多聚赖氨酸-2,4-滴、卵清白蛋白(OVA)、戊二醛，其中 OVA 用于阻断非特异性结合位点；然后进行抑制反应的预温育，在传感器表面滴加标准浓度 2,4-滴和抗血清混合溶液固化后形成生物分子膜层。

本发明使用上述免疫传感器测定 2,4-滴的方法，包括以下步骤：

(1) 间接竞争免疫：(由于免疫传感器表面已经预先温育了 2,4-滴标准样与抗血清)测定时直接在上述免疫传感器上滴加 2,4-滴与电极表面抗原进行竞争免疫后(每个传感器可滴加样品  $4\sim 40\mu\text{l}$ )，把过氧化物酶标阳抗兔(IGG)滴加到电极表面，与传感器上的多克隆抗体(即生物分子膜层)发生免疫，然后加底物溶液(本底物溶液可为  $\text{H}_2\text{O}_2$  与 OPD)；

(2) 电流测定：当滴加底物溶液后反应  $120\pm 10\text{s}$  后，在极化电压是  $-100$  至  $-150\text{mV}$  的条件下，使用恒电位仪检测恒电位下的时间-电流曲线；从电流-浓度标准曲线可查得样品中 2,4-滴的浓度。

本发明的特点技术效果：

本发明采用多抗技术制备 2,4-滴抗血清，采用丝网印刷工艺制备厚膜电极，并采用交联法固定生物分子。2,4-滴与多聚赖氨酸(PLL)的偶联物，并与 2,4-滴抗血清和 HRP 酶标二抗进行间接免疫竞争反应。在还原电位控制下，在 HRP 酶在邻苯二胺和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的共同作用下发生酶促反应产生还原电流，检测还原电流可反映 2,4-滴的浓度。

为了克服预温育造成的检测时间长的缺点，本发明把 2,4-滴与抗血清直接温育在传

感器表面，从而减少检测时间，简化检测步骤

本发明具有灵敏度高，检测下限低，检测速度快，成本低廉，操作简单等优点。

#### 附图说明

图 1 是本发明的 2, 4-滴免疫传感器的结构图。

图 2 是本发明采用丝网印刷工艺制备的传感器的工艺过程图。

图 3 是本发明的间接免疫竞争反应的流程图。

图 4 是 2, 4-滴检测的标定曲线。

#### 具体实施方式

本发明提出的一种检测 2, 4-滴的一次性安培型免疫传感器及其制备和使用方法结合附图及实施例进一步说明如下：

本发明的一种检测 2, 4-滴的一次性安培型免疫传感器如图 1 所示：

该传感器采用丝网印刷工艺制备的厚膜电极，采用同心式三电极结构，电极结构，包括 PVC 基板 6，及在该基板 6 上丝网印刷成的依次同心分布的碳圆盘电极 1、参比电极 2、对电极 3 及与各电极相连的接线端 5，绝缘层 4，以及在碳圆盘电极上固定的生物分子膜层。

本发明的实施例的碳圆盘电极 1 直径为 2mm，参比电极 2 的半径为 2mm，对电极 3 的半径为 3mm。。

本发明的 2, 4-滴一次性安培型免疫传感器的制备方法如图 2 所示：

1) 丝网印刷工艺制备传感器：先在 PVC 基片上印刷形成同心分布的三电极，如图 2 (1) 所示，银浆层上的部分区域印刷碳浆层，如图 2 (2) 所示，本实施例的碳粉直径在 10~100  $\mu\text{m}$ ，再印刷绝缘层，如图 2 (3) 所示，印刷后的电极，如图 2 (4) 所示；工作电极为中心的碳圆盘电极（本实施例的碳圆盘电极为直径 2mm。印刷好的电极在 50  $\pm$  3 $^{\circ}\text{C}$  下过夜；测定同次批量制备碳电极的电荷传递系数)；

2) 2, 4-滴-PLL 的合成：采用碳二亚胺法合成 2, 4-滴-PLL 偶联物，偶联比在 10~20 之间；

3) 2, 4-滴抗血清的选用：选用免源 2, 4-滴抗血清，其效价应大于 2000；

4) 2, 4-滴敏感生物分子在传感器表面的固定化：首先采用戊二醛交联法固定多聚赖氨酸-2, 4-滴、OVA、戊二醛，其中 OVA 用于阻断非特异性结合位点；然后进行抑制反应的预温育，滴加标准浓度 2, 4-滴和抗血清混合溶液固化后形成生物分子膜层。

本发明使用上述免疫传感器测定 2, 4-滴的方法如图 3 所示，包括以下步骤：

(1) 间接竞争免疫：由于免疫传感器表面已经预先温育了 2, 4-滴标准样与抗血清，测定时直接在上述免疫传感器上滴加待测的含 2, 4-滴的液体与电极表面抗原进行竞争免疫，每个传感器滴加样品 4~40  $\mu\text{l}$  后，把过氧化物酶标阳抗兔 (IGG) 滴加到电极表面，与传感器上的多克隆抗体 (即生物分子膜层) 发生免疫，然后加底物溶液 (本实施例为  $\text{H}_2\text{O}_2$  与 o-邻苯二胺 (OPD))；

(2) 电流测定：当滴加底物溶液后反应  $120 \pm 10$ s，在极化电压是  $-100$ mV 至  $-150$ mV 条件下，使用恒电位仪检测恒电位下的时间—电流曲线。从电流—浓度曲线（如图 4 所示）可查得 2,4-滴的浓度。

本发明的实施例详细说明如下：

### 1. 传感器的制备

(1) 制备 2,4-滴-PLL 偶联物步骤如下：

称取 18mg 的 2,4-滴，溶于 1.5 mL 0.05 M 的 PBS 缓冲液，加入 19mg EDC 并搅拌。然后加 200  $\mu$ L 10mg/mL 的 PLL 到溶液中并搅拌。混合溶液在室温下静置 1 小时。 $4 \pm 1^\circ$  C 透析 24 h（0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ ，换 4 次 PBS 溶液）。

(2) 制备抗血清步骤如下：

采用雌性新西兰白兔进行。采用水溶性碳二亚胺（EDC）偶联试验得到的免疫偶联比为 16:1 的合成抗原免疫小鼠。新西兰白兔的免疫剂量采用相同的初次免疫和加强免疫剂量。免疫原剂量为 0.8mg，半抗原剂量为 40  $\mu$ g。初次免疫的免疫原用弗氏完全佐剂乳化。加强免疫的免疫原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。初次免疫后 10 天或 14 天，进行加强免疫。随后 7 天或 10 天采血测定效价。重复加强免疫，直到获得效价较高（大于 2000）的抗血清。新西兰白兔采用耳缘静脉取血法。

(3) 采用本发明传感器的结构。丝网印刷工艺制备传感器的材料为：0.2mm 厚的 PVC 薄膜，银浆为 Acheson 公司 427SS，碳浆是日本 Jujo Ch01，印刷蓝色油墨作为绝缘层。在每次印刷完毕之后，电极都在烘箱内以  $40^\circ\text{C}$  干燥 2h。在固定抗体之前，制备好的电极在室温下老化 7 天。

(4) 进行生物分子固定。先进行去离子水超声清洗，氮气吹干；后在传感器表面包被液多聚赖氨酸-2,4-滴、OVA、戊二醛；包被方法：每个电极滴加样品 4  $\mu$ L， $37^\circ\text{C}$  温育 2hr，清洗吹干后， $4^\circ\text{C}$  保存。最后滴加把标准浓度 2,4-滴，抗血清混合溶液， $37^\circ\text{C}$  反应 1hr，清洗吹干。

### 2. 传感器的使用

(1) 检测时直接滴加 2,4-滴与电极表面抗原进行竞争免疫，每个传感器滴加样品 4~40  $\mu$ L， $37 \pm 1^\circ\text{C}$  反应 1hr，清洗吹干。然后把过氧化物酶标阳抗兔（IGG）滴加到电极表面，与传感器上多克隆抗体（即第一抗体）发生免疫，每个传感器点样 4  $\mu$ L， $37 \pm 1^\circ\text{C}$  反应 0.5hr，清洗吹干。

(2) 酶活力的检测：底物溶液是  $\text{H}_2\text{O}_2$  与 OPD 浓度分别为 1mM，5mM。电流测定的底物溶液，用 PBS 缓冲液稀释，OPD 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度分别为 5mM，1mM。每个传感器滴加 40  $\mu$ L 底物溶液，反应  $120 \pm 10$ s 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 至  $-150$ mV，检测时间  $120 \pm 10$ s。从电流—浓度曲线（图 4）可查得 2,4-滴的浓度。

(3) 标准电流—浓度曲线的制作：采用上述免疫传感器和检测方法，用 2,4-滴标准样配制 600mg/L 的 PBS 溶液。并稀释到 1.0ng/mL。测定其标准曲线。结果如图 4 所示：检测下限：1ng/mL；线性区间：1ng/mL-30  $\mu$ g/mL；线性度：R=97.4%

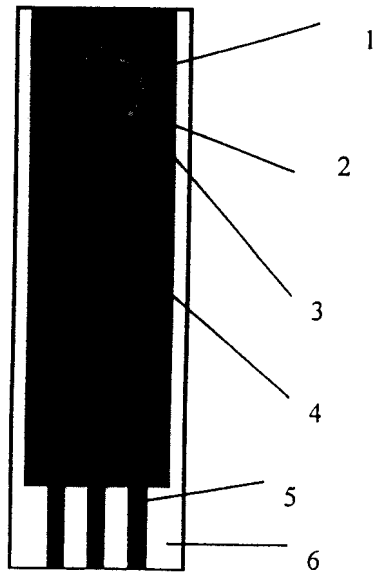


图 1

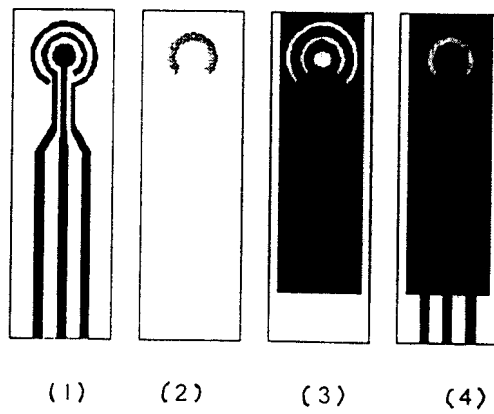


图 2

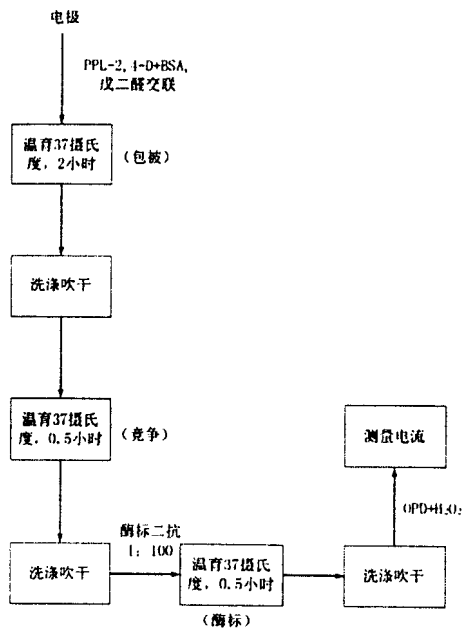


图 3

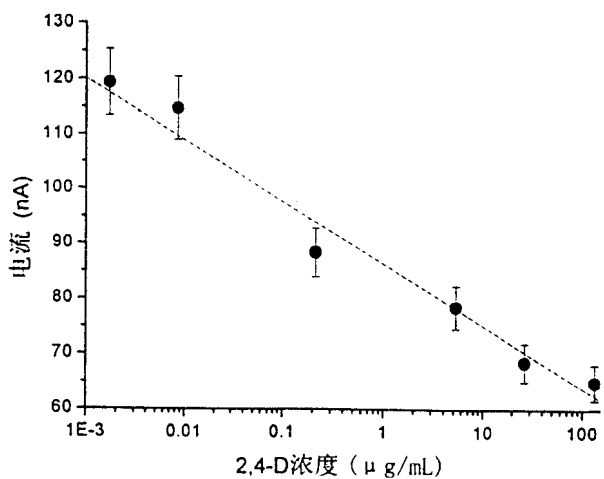


图 4

专利名称(译)	一种检测2, 4 - 滴的一次性安培型免疫传感器的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN100374852C</a>	公开(公告)日	2008-03-12
申请号	CN200410096073.1	申请日	2004-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学		
申请(专利权)人(译)	清华大学		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学		
[标]发明人	施汉昌 何苗 蔡强		
发明人	施汉昌 何苗 蔡强		
IPC分类号	G01N27/327 G01N33/561 G01N33/53 G01N27/42		
其他公开文献	CN1603809A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种检测2, 4-滴的一次性安培型免疫传感器的制备方法, 属于环境监测领域。该方法包括: 丝网印刷工艺制备传感器; 2, 4-滴-多聚赖氨酸的合成; 2, 4-滴抗血清的选用; 2, 4-滴敏感生物分子在传感器表面的固定化。该方法制备的传感器结构简单, 与其他对称式三电极结构相比, 具有电场分布均匀, 呈环形对称, 与电子媒介体的扩散方向一致, 可以较好地抑制电流噪声、消除干扰。该制备和使用方法操作方便, 成本低, 可快速进行2, 4-滴的野外分析。

