

高灵敏电位型免疫传感器对乙型肝炎表面抗原的诊断技术研究*

袁若** 唐点平 柴雅琴 张凌燕 刘颜 钟霞 戴建远

(西南师范大学化学化工学院, 重庆 400715)

摘要 以乙型肝炎表面抗原和乙型肝炎表面抗体为模型免疫蛋白,对传染病的诊断技术进行了研究. 利用吸附在铂电极表面 Nafion 膜中负电性的磺酸基与乙型肝炎表面抗体(HBsAb)分子中的氨基阳离子之间的静电作用实现抗体的结合,同时通过纳米金(Au)增加抗体的固定量,以及聚乙烯醇缩丁醛(PVB)薄膜的笼效应把乙型肝炎表面抗体和纳米金固定在铂电极上,从而制得高灵敏、高稳定电位型免疫传感器(PVB/Au/HBsAb/Nafion/Pt). 通过循环伏安法和交流阻抗技术考察了电极表面的电化学反应特性,并对该免疫传感器的性能进行了详细的研究. 该免疫传感器具有制备简单、灵敏度高、线性范围宽、响应时间快(<3 min)、稳定性好、寿命长(>4 个月)、选择性高等特点,将其用于病人的血清样品分析,其结果令人满意.

关键词 Nafion 聚乙烯醇缩丁醛 纳米金 乙肝 电位型免疫传感器 铂电极

免疫传感器分析法是利用抗原-抗体特异性反应来测定痕量物质的一种高灵敏度、高选择性的方法,该方法的提出和发展不仅推动了血清学的应用,而且也有助于从理论上研究抗原-抗体的关系及其本质.

在免疫传感器的研究中,生物分子的固定化方法是构建性能优良的传感器较为关键的步骤^[1]. 近年来,在国内外有不少学者对免疫传感器的固定化方法进行了报道,如:湖南大学沈国励、俞汝勤研究小组利用等离子体聚合膜、纳米金、静电吸附等固定方法对压电免疫传感器进行了深入的研究^[2-5];南京大

学鞠焯先、陈洪渊研究小组利用TiO₂气相沉积溶胶凝胶技术固定CA199, CA125, hCG等肿瘤标志物于载体表面以及利用免疫和纳米组装技术构建高活性的酶-免疫结合物-纳米金胶载体的三维有序膜,成功的发展了一系列肿瘤标志物免疫传感器^[6-10];中山大学蔡沛祥研究小组利用溶胶-凝胶技术,并结合交联技术,通过双功能试剂把抗体固定在电极表面,制得电流型和电位型免疫传感器^[11,12],这些方法制得的免疫传感器灵敏、可靠,但电极制作过程繁琐,成本高,需要专门的设备,技术要求较高,时间较长. 因此,开

2004-01-08 收稿, 2004-06-11 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 29705001)和教育部优秀青年教师(批准号: 2002-40)资助项目

** E-mail: yuanruo@swnu.edu.cn

发性能更为优越的新型免疫传感器及建立快速、灵敏的检测方法对医学研究和临床检测具有重要的理论意义和实际应用价值。

本文采用自组装技术和静电吸附技术, 先将 Nafion 吸附在铂电极表面, 然后利用纳米金的比表面积大、吸附能力强等特性以及聚乙烯醇缩丁醛(PVB)膜的笼效应和微水环境^[13]把抗体牢牢地包埋于其中, 使抗体不会泄露出来并保持良好的生物活性, 不仅增加了抗体的固定量, 而且增强了敏感膜与基体电极结合的牢固程度。本文以乙型肝炎表面抗体和乙型肝炎表面抗原为模型, 对该免疫传感器的性能以及影响该免疫传感器性能的一些因素作了详细的研究。与传统的固定方法制得的免疫传感器相比, 该免疫传感器具有制备简单、响应时间短、使用寿命长、灵敏度高、稳定性好等特点, 将该免疫传感器用于病人的血清样品分析, 其结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

MP230 酸度计(瑞士 Metter Toledo 公司), pHs-4C 型酸度计(成都方舟科技开发公司), IM6e 型交流阻抗测试系统(德国 ZAHNER Elektrik 公司), CHI 660A 型电化学工作站(上海 CHI 公司), AB204-S 电子天平(瑞士 Metter Toledo 公司), 透射电子显微镜(TEM)(H600, 日本 Hitachi Instrument 公司), BRANSONIC 200 超声清洗仪(德国 BRANSON ULTRASCHALL 公司)。

乙型肝炎表面抗体($4.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, HBsAb)和乙型肝炎表面抗原($1.28 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, HBsAg)(上海科华生物工程公司提供); 白喉类毒素($800 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Diph)(成都生物制品研究所提供), 牛血清白蛋白(BSA 96~99%)、Nafion (v/v, 5%)、IgG 免疫球蛋白、马抗人 γ 干扰素抗原、氯金酸、柠檬酸三纳(Sigma, 美国), 聚乙烯醇缩丁醛(PVB)(上海化学试剂厂提供), 其他试剂均为分析纯, 所用水均为二次去离子水。

磷酸盐生理缓冲溶液(PBS, pH 7.4)的配制: NaCl 8.0 g, Na_2HPO_4 1.15 g, KH_2PO_4 0.2 g, KCl 0.2 g, 配成 1000 mL 溶液。

1.2 纳米金的制备及表征

纳米金的制备参照文献^[14], 在搅拌 HAuCl_4 溶液($1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 500 mL)并回流的情况下, 迅速加入 50 mL, $3.88 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的柠檬酸三纳, 溶液的颜色将由灰黄色变为深红色, 继续回流 15 min, 然后冷却至室温, 即得到纳米金颗粒, 然后通过透射电子显微镜(TEM)进行表征, 其粒径约为 16 nm(如图 1)。

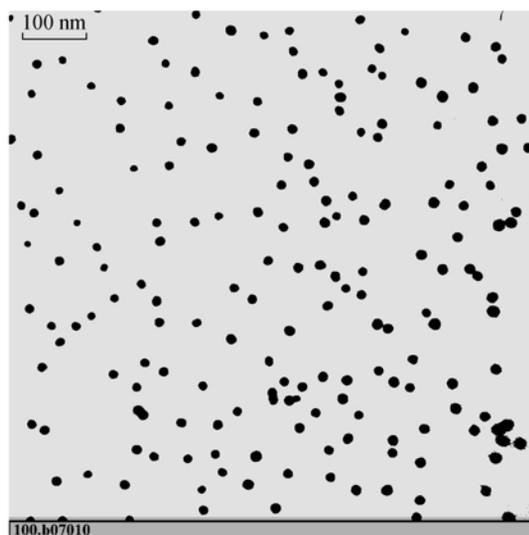


图 1 纳米金的 TEM 照片

1.3 免疫传感器的制备

免疫传感器的制备过程见图 2(a)。铂电极($\phi = 1 \text{ mm}$)经 $0.6 \text{ }\mu\text{m}$ 的金相砂纸抛光后, 蒸馏水清洗两次, 于 $\text{HNO}_3(\text{v}) : \text{H}_2\text{O}(\text{v}) = 1 : 1$ 的溶液中加热沸腾 5 min, 取出冲洗, 然后分别在丙酮、蒸馏水中超声洗涤, 自然凉干待用。

将洁净的铂电极插入体积分数为 5% 的 Nafion 乙醇溶液中 5 min, 取出自然凉干后于红外灯下烘 20 min; 取 20 mL 的乙肝表面抗体($4.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)溶液和 0.3 mL 纳米金(粒径约为 16 nm)于小烧杯, 在冰浴下静置 10 min, 再和 3 mL PVB 无水乙醇溶液($W=2\%$)充分混合, 用带有 Nafion 膜的铂电极充分搅拌, 然后静置于其中 10 min, 取出, 凉干, 于 4 °C 干态放置 24 h; 然后将电极置于 0.25% BSA 溶液中于 37 °C 温育 1 h, 以封闭活性基团, 取出, 水洗, 置于 4 °C 的冰箱中保存待用。

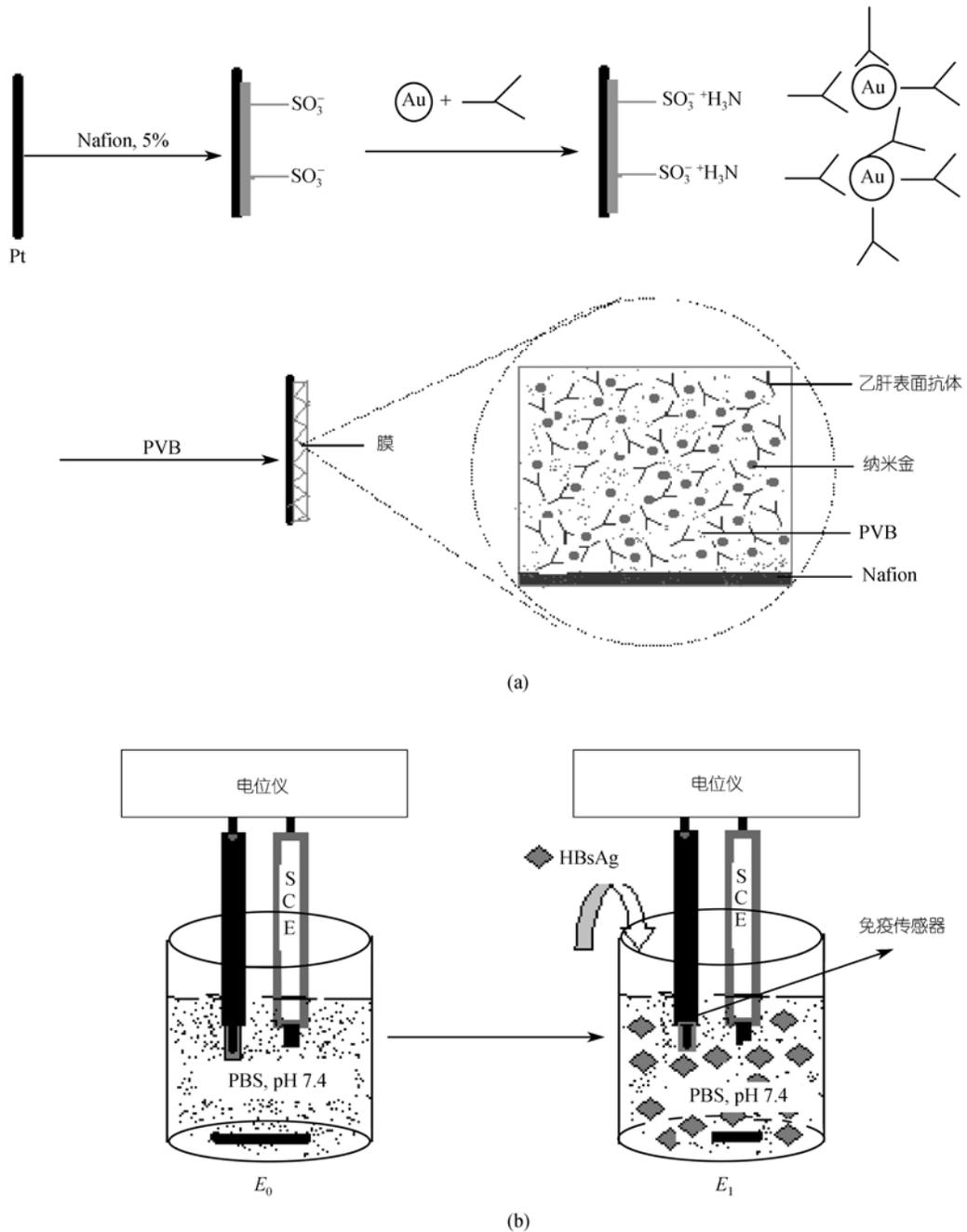


图 2 免疫传感器的结构示意图(a)和检测方法(b)

1.4 测试方法

1.4.1 自组装过程的电化学表征 利用循环伏安法和交流阻抗技术表征电极在自组装过程中不同阶段的电化学特性。采用三电极系统，免疫电极为工作

电极，铂丝为对电极，饱和甘汞电极为参比电极，于 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-} + 0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KCl} + \text{PBS} (\text{pH } 7.4)$ 溶液中，分别在 $-0.3 \sim 0.7 \text{ V}$ 电位范围内进行循环伏安扫描和在 $10^{-2} \sim 10^6 \text{ Hz}$ 范围内进行交流阻抗测试。

1.4.2 免疫传感器对 HBsAg 的电位响应 免疫传感器对 HBsAg 的检测方法见图 2(b). 以免疫电极为工作电极, 饱和甘汞电极为参比电极. 先将两电极插入磷酸盐生理缓冲溶液(pH 7.4)中, 测出免疫电极在稳态时的空白电位(E_0 , 一般 E_0 在 -280 mV 左右), 然后向其溶液中加入不同浓度的 HBsAg 溶液, 在搅拌器的作用下, 记录电位稳定后的电位值(E_1), 用 $\Delta E = E_1 - E_0$ 表示该免疫传感器对不同浓度 HBsAg 的电位响应值, 并相对于 HBsAg 浓度的对数制作标准曲线.

1.4.3 用 ELISA 法检测 HBsAg 按试剂盒提供的使用说明操作, 先将微孔条编号, 再加入待测样品、HBsAg 阴性对照、HBsAg 阳性对照各 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$, 同时留一孔作空白对照, 随即加入测 HBsAg 酶标结合物 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$, 空白对照不加, 置于 37°C 恒温水浴中 30 min; 甩去各孔内样品, 拍干并加满清洗液, 放置 $15\sim 20$ min 后甩去, 拍干, 如此反复洗涤 6 次, 每次均拍干; 加底物液 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$, 随即加显色剂 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 下显色 10 min, 加终止液 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2SO_4 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$; 选定波长 450 nm, 空白孔校零, 用酶标仪对每孔进行比色, 并记录 OD 值; 以阴性对照平均 OD 值 $\times 2.1$ 作为 CUT OFF 值, 样品 OD 值 $>$ CUT OFF 值为阳性, 样品 OD 值 $<$ CUT OFF 值为阴性.

2 结果与讨论

2.1 电极在自组装过程中的电化学表征

用不同的修饰电极为工作电极, 于 2.5×10^{-3}

$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-} + 0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KCl} + \text{PBS}$ (pH 7.4) 溶液中, 在 $-0.3\sim 0.7$ V 的电位范围内进行循环伏安测定, 所得 CV 曲线如图 3(a)所示. 由图 3(a)曲线 1 可见, 在裸铂电极上有一对 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 的可逆氧化还原电流峰, 峰电位为 $E_{\text{pa}}=0.25$ V, $E_{\text{pc}}=0.16$ V, $i_{\text{pa}}/i_{\text{pc}}=1$. 当铂电极被 Nafion 修饰后, 响应电流明显下降, 说明吸附到铂电极表面的 Nafion 膜阻碍了电子的传输(图 3(a)曲线 2). 当被 Nafion 修饰后的铂电极再次被纳米金、HBsAb 和 PVB 修饰, 虽然纳米金有利于电子的传输, 但由于大分子抗体蛋白以及 PVB 的空间网状结构的影响, 其阻碍力远远大于纳米金的传输动力, 使得 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 向铂电极表面扩散的有效截面积不断变小, 因此 $i_{\text{c}} < i_{\text{b}} < i_{\text{a}}$. 特别是当 HBsAb 和 HBsAg 专一性结合后, 生成的抗原-抗体复合物堵塞了修饰电极表面更多孔径通道, 这样一方面增大了 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 在通过膜时的阻力, 另一方面, 也使 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 向电极表面扩散的有效截面积进一步变小, 从而致使其响应电流进一步地下降. HBsAg 的浓度越高, 敏感膜上生成的抗原-抗体复合膜就越多. 当 HBsAg 的浓度很高时(如: $1000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 生成的抗原-抗体复合膜将敏感膜表面的微孔通道封闭, 使得 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 无法通过, 因而响应电流消失(如图 3(a)曲线 4).

交流阻抗谱图能进一步表明 HBsAb 已固定在铂电极表面. 图 3(b)为不同电极在 PBS (pH 7.4) + $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KCl} + 2.5 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 溶液中的交流阻抗谱图. 从图可以看出, 随着电极表面层层自

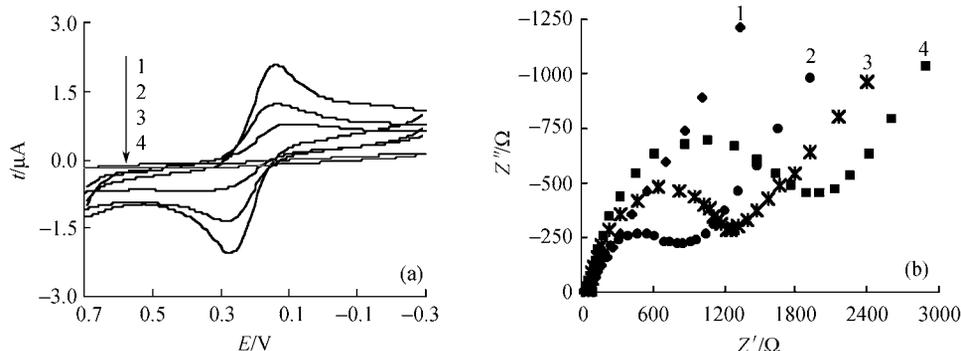


图 3 不同修饰电极在 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-} + 0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KCl} + \text{PBS}$ (pH 7.4) 溶液中的循环伏安图(a)和交流阻抗谱图(b)

1——Pt 裸电极; 2——Nafion-Pt 电极; 3——PVB-Au-HBsAb-Nafion-Pt 电极; 4——结合 HBsAg ($C_{[\text{HBsAg}]}=1000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 后的 PVB-Au-HBsAb-Nafion-Pt 电极. 循环伏安的扫速为 $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

组装, 阻抗也随之发生变化, 并且半圆的直径约为电子传递的阻抗(R_{et})。图 3(b)曲线 1 为裸铂电极的交流阻抗谱图, 曲线近似一条直线, 表明电子传递到电极表面只受扩散控制。当电极被 Nafion 修饰后, 出现了高的 R_{et} 阻抗($R_{et}=9.16 \times 10^2 \Omega$, 图 3(b)曲线 2), 表明 Nafion 修饰层阻碍了 $Fe(CN)_6^{3-}$ 到电极表面参加反应。特别是当 HBsAb 和 HBsAg 专一性结合后, 其阻抗远远高于 Nafion+HBsAb+Au+PVB 修饰的电极(图 3(b)曲线 4, $R_{et}=2.0 \times 10^3 \Omega$), 其原因是产生的抗原-抗体复合物覆盖在电极表面, 进一步增大了 $Fe(CN)_6^{3-}$ 到电极表面参加反应的阻力。以上结果表明, 通过逐层自组装方法在铂电极表面形成了稳定的 HBsAb 膜, 达到预期的修饰目的, 而该抗体膜修饰电极能与相应的抗原发生免疫反应预示其具有实际应用的可能性。

2.2 HBsAb 固定方法的选择

固定化抗体对于免疫传感器具有十分重要的作用, 抗体的固定量以及固定的牢固程度是免疫传感器性能好坏的关键。为此, 我们分别对四种不同固定抗体的方法进行了探讨(如图 4), 结果表明, 在没有 PVB, Au 或者 Nafion 的情况下, 电位响应不灵敏, 原因是电极上固定的抗体的量较少, 而 PVB-HBsAb-Au-Nafion 修饰电极对不同浓度的 HBsAg 的电位响应较大(图 4 曲线 4), 原因是 Nafion 膜中负电性的磺酸基对 HBsAb 中的氨基阳离子具有

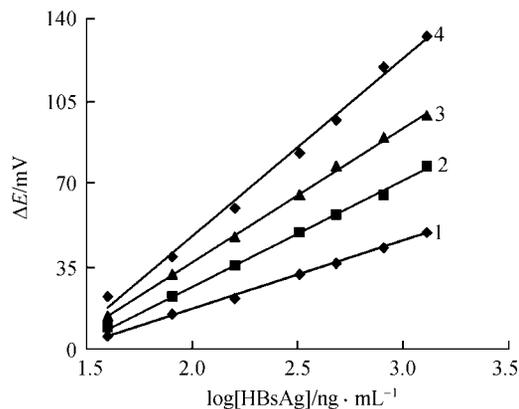


图4 不同固定方法制备的电极对 HBsAg 的电位响应曲线
1—HBsAb-Au-Pt 电极; 2—PVB-HBsAb-Pt 电极; 3—PVB-HBsAb-Au-Pt 电极; 4—PVB-HBsAb-Au-Nafion-Pt 电极

强的吸附作用以及 PVB 膜的笼效应和微水环境, 把 HBsAb 抗体牢牢地包埋于其中, 同时负电性的纳米金能在抗体之间起着连接作用, 不但增加了固定抗体的量, 也增强了敏感膜与电极结合的牢固程度, 提高了检测灵敏度。

2.3 动力学响应曲线

图 5 为该乙肝免疫传感器对 HBsAg 的动力学响应曲线, 样品为 HBsAg 标准阳性血清及 HBsAg 标准阴性血清(上海科华生物有限公司提供)。由图可见, 阳性血清样品的反应曲线在测定时间范围内可分为两个阶段: 第一阶段为一级响应阶段, 随着时间的延长, 样品中的 HBsAg 迅速与电极膜上的 HBsAb 结合, 形成免疫复合物, 使电极表面的电荷重新分布, 电位差的绝对值正移, 呈线性上升; 第二阶段为混合响应阶段, 至 3 min 左右, 抗原-抗体结合率明显下降, 电极电位变化值呈非线性上升。故本文后继实验均采用反应 3 min 时的电极电位值。HBsAg 阴性血清的电极电位变化值在整个响应时间内变化较小($\Delta E < 7$ mV)。因此, 我们可以根据电位的变化值定性的判断出 HBsAg 阳性或阴性的待测血清样品(判定的标准是 $\Delta E \geq 7$ mV 为阳性, $\Delta E < 7$ mV 为阴性)。

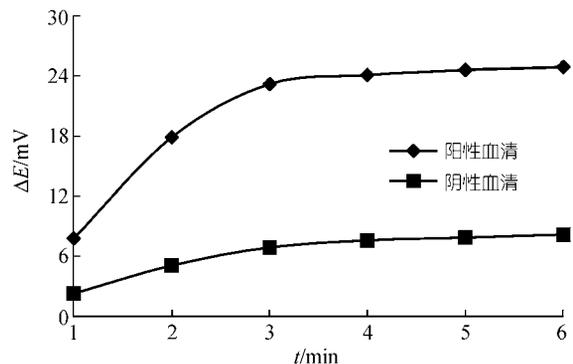


图5 电极电位随时间的响应曲线

为了进一步证明 7 mV 作为判断 HBsAg 阳性血清和阴性血清的标准, 我们对此免疫传感器测得的电位值在 7 mV 左右的 27 个标准血清样品进行了统计, 并与酶联免疫吸附分析法进行了对照。在免疫传感器测得的电位值 $\Delta E \geq 7$ mV 的 5 个样品中, 酶联免疫吸附分析法测得全为阳性, 符合率为 100%(5/5); 在免疫传感器测得的电位值 $\Delta E < 7$ mV 的 22 个样品中,

酶联免疫吸附分析法测得 21 例为阴性, 另一例为阳性(且其电位值为 6.48 mV), 符合率为 95.5%(21/22). 由此可见, $\Delta E=7$ mV 可以作为定性判断 HBsAg 阳性血清和阴性血清的标准.

2.4 检出限的确定及免疫传感器的电位响应性能

为确定该免疫传感器的检出限, 用修饰有 HBsAb 抗体的免疫传感器在室温下对不含 HBsAg 的空白磷酸缓冲溶液进行重复测定 15 次, 其电位值的标准偏差为 0.27 mV, 将其作为免疫传感器的噪音值, 取 3 倍噪音值(即 0.81 mV)作为免疫传感器的最小有效值, 只有大于该值的响应值才作为检出的电位响应信号. 分别取不同体积的乙肝表面抗原用 pH 7.4 的磷酸缓冲溶液稀释成不同浓度的标准溶液, 然后用电位仪在室温条件下测定其膜电位与空白磷酸盐缓冲液的电位之差. 结果表明, 电极电位随着抗原浓度对数呈现出“S”线性关系(如图 6(a)), 并在 26 ~ 1280 ng·mL⁻¹ 的范围内保持良好的线性关系(如图 6(b)), 回归方程为 $\Delta E = -92.8 + 70.9 \log [\text{HBsAg}]$, $r = 0.9983$, 然后将该免疫传感器对不同浓度的 HBsAg 标准溶液的电位响应结果进行多项式拟合. 根据拟合的曲线可知, 电位差值在 0.81 mV 时所对应的 HBsAg 的浓度为 3.1 ng·mL⁻¹. 因此, 将 3.1 ng·mL⁻¹ 作为该免疫传感器对 HBsAg 的最低检出浓度(即检出限).

2.5 传感器的再生性能

免疫传感器的可逆再生性能是决定其实用性的

重要因素之一. 在免疫化学中, 可以通过一定浓度的酸、碱以及高离子强度的溶液将抗原和抗体间的键合作用解离. 为此, 我们分别用甘氨酸-盐酸缓冲溶液(pH 2.8)、0.1 mol·L⁻¹ H₃PO₄ 和 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 作为解离剂进行了对照. 实验发现, 采用甘氨酸-盐酸缓冲溶液(pH 2.8)可使传感器重复使用 15 次; 而采用 0.1 mol·L⁻¹ 的 H₃PO₄ 和 NaOH 溶液, 只能使传感器重复使用 2 次. 其原因是强酸、强碱可使蛋白质变性, 降低了铂电极与抗体之间的结合力, 使电极表面的抗体物质不断的洗脱下来, 同时高强度的酸碱易使抗原和抗体失活.

2.6 免疫传感器的特异性

将不同时间、不同批次制备的乙肝免疫传感器置于 60 ng·mL⁻¹ 乙型肝炎表面抗原的磷酸缓冲溶液中, 测定其膜电位, 然后向此溶液中加入不同浓度的白喉类毒素、马抗人 γ 干扰素、IgG 免疫球蛋白, 分别测定其中的电位值. 结果表明, 检测到的膜电位值与在纯的乙型肝炎表面抗原的磷酸缓冲溶液中的膜电位值相比, 结果无显著性差异, 表明该免疫传感器具有良好的选择性.

2.7 免疫传感器的重现性和稳定性

分别取不同时间、不同批间制备的免疫传感器, 对同一浓度的样品标准溶液进行检测, 结果标准偏差 RSD<3%(表 1), 表明该免疫传感器具有良好的重

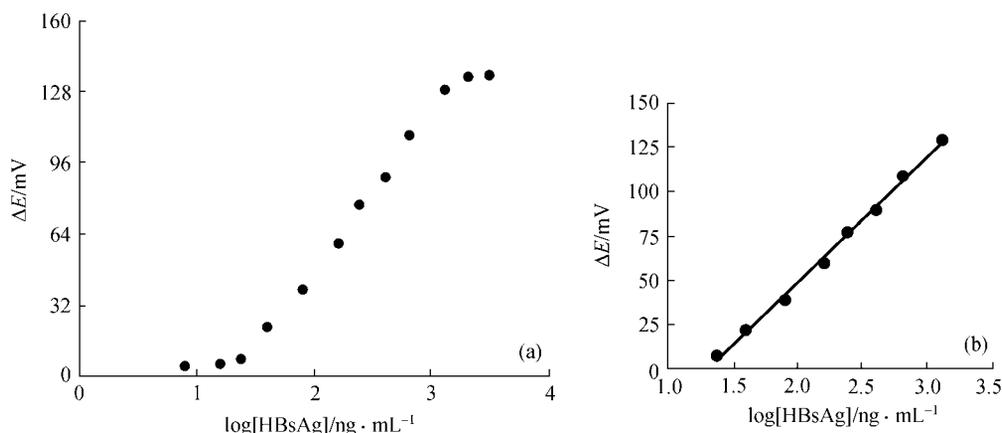


图6 免疫传感器对不同浓度的 HBsAg 的电位响应特性

表1 免疫传感器的重现性($\Delta E/mV$)

HBsAg/ng·mL ⁻¹	传感器编号					RSD/%
	1	2	3	4	5	
40	20.8	21.5	20.6	21.1	20.4	2.1
60	33.7	32.6	33.9	32.3	34.1	2.5
100	41.9	42.0	42.1	42.3	42.4	2.2
400	90.3	89.6	90.2	89.5	90.5	2.2

表2 不同方法对临床血清样品检测结果的比较^{a)}

样品编号	1	8	12	16	22	29	32	34	38	40
本实验方法	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
酶联免疫吸附分析法	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-

a) +为阳性血清; -为阴性血清

表3 ELISA 法与免疫传感器法的结果统计

检测方法	阳性	阴性	总计
ELISA 法	30	10	40
免疫传感器法	28	10+2 ^{a)}	40

a) ELISA 法检测为阳性的 30 例样品中有 2 例免疫传感器检测为阴性

现性.

稳定性和寿命是免疫传感器性能好坏的关键之一, 在本实验中, 我们将 PVB-Au-HBsAb-Nafion 修饰的电极在 4 下干态放置, 每隔 3~5d 对同一浓度的乙肝表面抗原溶液进行检测, 结果表明此免疫传感器在前四个月内, 电位基本保持不变, 到第六个月时电位值只有开始的 87.3%. 免疫传感器这种优良的稳定性和长时间的寿命主要是因为纳米金的强吸附效应和 PVB 网状结构的包埋效应, 把乙型肝炎表面抗体牢牢的固定在铂电极表面, 并保持良好的生物活性.

2.8 临床样品的检测

为考察本免疫传感器制作方法的可靠性, 我们收集本校医院 40 份学生的血清样品, 用 pH 7.4 PBS 稀释 5 倍, 然后利用电位仪测出该样品的电位值, 最后根据 HBsAg 阳性血清和 HBsAg 阴性血清的动力学反应曲线进行定性的判断: $\Delta E \geq 7$ mV 为阳性; $\Delta E < 7$ mV 为阴性; 并和酶联免疫吸附分析法(ELISA)进行双盲平行测试(部分结果列于表 2).

在 ELISA 检测为阳性 30 例中, 免疫传感器检测为 28 例阳性, 另 2 例为阴性, 敏感性为 93.3%(28/30);

在 ELISA 检测为阴性的 10 例中, 免疫传感器检测也为阴性, 其特异性为 100%(10/10), 两法基本相符(结果见表 3). 因此, 本文研制的免疫传感器能较好的应用于临床上对乙型肝炎表面抗原的检测.

3 结论

本文首次将聚乙烯醇缩丁醛和纳米金联用于免疫传感器的研制, 与用复合纤维素膜包埋法^[15]和静电吸附逐层自组装法^[16]相比, 该免疫传感器具有如下几个优点: (1)设备简单, 制作方便, 不需酶标. 降低了免疫传感器的成本; (2)电位响应差值 ΔE 较大. 提高了免疫传感器的灵敏度; (3)检测时间短. 只需 3 min 就能达到稳定; (4)具有较宽的线性范围和较低检测下限. 适合于临床上对样品的分析; (5)稳定性和重现性特别好. 适合于批量生产和产业商品化; (6)寿命较长. 因此, 利用该免疫传感器的制作方法, 改变固载抗体的种类, 根据电位值变化的大小, 就能及时、准确地对样品血清进行判断, 该方法对传染病的诊断方面具有潜在的应用价值.

参 考 文 献

- 1 Bunde R L, Jarvi E J, Rosentreter J J. Piezoelectric quartz crystal biosensors. *Talanta*, 1998, 46: 1223-1236[DOI]

- 2 Wang H, Shen G L, Yu R Q, et al. Novel immunoassay for *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G using a silica nanoparticle-based biomolecular immobilization method. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 501: 37~43[DOI]
- 3 Li J S, Shen G L, Yu R Q, et al. A piezoelectric immunoagglutination assay for *Toxoplasma gondii* antibodies using gold nanoparticles. *Biosens Bioelectron*, 2004, 19: 701~709[DOI]
- 4 Wu Z Y, Shen G L, Yu R Q, et al. A reusable piezo-immunosensor with amplified sensitivity for ceruloplasmin based on plasma-polymerized film. *Talanta*, 2004, 62: 201~208
- 5 Liu G D, Shen G L, Yu R Q, et al. Renewable amperometric immunosensor for *Schistosoma japonicum* antibody assay. *Anal Chem*, 2001, 73: 3219~3226[DOI]
- 6 Zhang S S, Jiao K, Chen H Y, et al. Detection of ferritin in human serum with a MAP-H₂O₂-HRP voltammetric enzyme-linked immunoassay system. *Talanta*, 1999, 50: 95~101[DOI]
- 7 Du D, Yan F, Ju H X, et al. Electrochemical immunosensor for carbohydrate antigen 19-9 based on immunological reaction and its immobilization in titania sol-gel matrix. *J Immuno Methods*, 2003, 283: 67~75[DOI]
- 8 Ye Y K, Zhao J H, Ju H X, et al. Electrochemical behavior and detection of hepatitis B virus DNA PCR production at gold electrode. *Biosens Bioelectron*, 2003, 18: 1501~1508[DOI]
- 9 Yan G F, Ju H X, Liang Z C, et al. Technical and clinical comparison of two fully automated methods of CA 125 immunoassay in serum. *J Immuno Methods*, 1999, 225: 1~8[DOI]
- 10 Chen H Y, Ju H X, Xun Y G. Methylene blue/perfluorosulfonated ionomer modified microcylinder carbon fiber electrode and its application for the determination of hemoglobin. *Anal Chem*, 1994, 66: 4538~4542
- 11 蔡沛祥, 梁汝萍, 邱建丁, 等. 溶胶-凝胶-HBsAb 膜免疫传感器的研制与应用. *高等学校化学学报*, 2003, 24(5): 793~797
- 12 邱建丁, 梁入萍, 蔡沛祥, 等. 自组装抗-HBs 膜免疫电极的研制和应用. *应用化学*, 2001, 18: 705~708
- 13 李丽东, 李文江, 孙长青. 基于溶胶-凝胶技术的磷钨杂多酸化学修饰电极的组装及其电催化. *高等学校化学学报*, 2000, 21(6): 865~869
- 14 Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Phys Sci*, 1973, 241: 20~22
- 15 姜泓海, 邹汉法, 汪海林, 等. 固定化酶微升反应与 MALDI-TOF MS 联用技术用于蛋白质肽谱研究. *中国科学, B 辑*, 2000, 30(5): 385~391[摘要] [PDF]
- 16 李美玲, 李宝芳, 江 龙, 等. 聚电解质/均质交替沉积膜两种定向方式及光致变色特性. *中国科学, B 辑*, 2000, 30(3): 275~282[摘要] [PDF]