

分类号: TS207.7

密 级:

单位代码: 10433

学 号: 18503170269

山东理工大学

工程硕士学位论文

基于广谱性抗体识别的有机磷农药残留
快速检测方法研究

**Rapid Detection Methods of Organophosphorus Pesticides
Residues Based on Broad-specificity Antibodies Recognition**

研 究 生: 董浩玮

指 导 教 师: 郭业民 教授

协 助 指 导 教 师: 孙 霞 教授

学 位 类 别: 工程硕士

专 业 领 域: 食品工程

研 究 方 向: 食品安全技术

论 文 完 成 日 期: 2021年04月03日

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得山东理工大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：董若玮

时间：2021年6月9日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解山东理工大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅；学校可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：董若玮

时间：2021年6月9日

导师签名：郭世民

时间：2021年6月9日

摘要

有机磷农药 (Organophosphorus pesticides, OPs) 作为一种广谱且高效的杀虫剂而经常被用于保障农产品质量, 但因其种类繁多、违规滥用, 对食品安全、人体健康和环境保护等都造成了巨大的威胁, 也导致对其残留的检测面临着严峻的挑战。大型仪器检测方法操作复杂、专业化要求较高, 难以满足 OPs 的日常监测需求。而快速检测方法大多具有方便携带、操作简单等优势, 利于推广应用。其中, 免疫分析方法因其高效、稳定等特点已成为目前的主流快速检测方法之一。因此, 本论文采用有机磷农药广谱性抗体 (Abs) 作为核心识别元件, 对 3 种不同原理的快速检测方法进行了探究, 可满足不同的 OPs 快速检测要求。主要研究内容如下:

(1) 为更好地满足实验室条件下的 OPs 快速初筛检测需求, 运用响应面法对间接竞争酶联免疫吸附测定检测方法的工作条件进行了优化分析。首先, 对有机磷农药通用结构抗原和 Abs 的最佳工作浓度组合进行了探究。然后, 在单因素试验的基础上, 进行了响应面优化设计试验。在修正后的最佳工作条件 (离子浓度 0.04 M、pH 值 7.89、甲醇浓度 2.9%) 下进行加标测试, 表现出了稳定和重复性好的检测结果, 灵敏度为 1.28 ng/mL。该 Abs 对不同 OPs 的识别灵敏度差异较小, 对硫磷、蝇毒磷、啶硫磷、甲基对硫磷的检测灵敏度分别为: 0.72、3.39、4.62、4.88 ng/mL。可应用于实验室中大量样本的初步筛选检测需要。

(2) 为满足 OPs 的快速微量检测需要, 以普鲁士蓝 (Prussian-blue, PB) 为导电基底制备了一种新型免疫电化学传感器。为加强抗体与 PB 的有效结合, 将 Abs 与纳米金偶联, 制备了金标探针。为简化传感器的制备流程, 在金标探针与 PB 的混合溶液中, 通过一步电沉积法在电极表面制备了电沉积复合膜。在最佳的实验条件下, OPs 的浓度与相应的电化学响应值呈现出良好的线性关系 ($R^2=0.9918$), 检测限为 0.003 ng/mL。在实际样品的加标测试中, 回收率为 98.05%~102.05%。因此, 当样品中目标物浓度较低时, 可利用该传感器进行检测。

(3) 为降低 OPs 检测工作的专业化门槛, 进一步提高检测效率, 通过对羊抗鼠抗体 (Sheep anti-mouse antibodies, SaMIgG) 进行荧光标记, 制备了一种时间分辨荧光纸基传感器。将 Abs 通过 SaMIgG 与氧化钬乳胶微球联接, 形成了间接时间分辨荧光探针, 这一策略能够有效地实现信号放大, 并可节约靶标抗体用量。待检测结束后, 借助 365 nm 波长的紫外光源, 即可通过监测检测线处的荧光强度实现定性判断, 筛出的阳性样本图像利用 ImageJ 软件分析后即可完成定量检测。对传感器的构建和工作条件进行了优化, 其检测限可达到 0.53 ng/mL。该传感器可以较稳定地应用于在蔬菜样品基质的加标测试。该传感器制备成本较低, 方便携带, 操作简单, 可供非专业

人员或大量样本快速检测使用。

以上研究为 OPs 的检测提供了多样的检测方案，可基本满足不同人群、不同场景下的快速检测需求。

关键词：有机磷农药；广谱性抗体；快速检测方法；酶联免疫吸附测定法；电化学传感器；纸基传感器

Abstract

As broad-spectrum and highly effective insecticide, Organophosphorus (OPs) have been frequently used to ensure the quality of agricultural products. However, due to their wide variety and illegal abuse, OPs have posed great threats to food safety, human health and environmental protection, and thus have faced severe challenges in the detection of their residues. The detection method of large instrument is complicated in operation and requires high specialization, which is difficult to meet the daily monitoring needs of OPs. Most of the rapid detection methods are convenient to carry and easy to operate, which is conducive to popularization and application. Among them, immunoassay has become one of the mainstream rapid detection methods because of its high efficiency and stability. Therefore, this paper used broad-specificity antibody of organophosphorus pesticides (Abs) as the core identification element to explore three rapid detection methods with different principles, which could meet different OPs rapid detection requirements. The main research contents were as follows:

(1) In order to better meet the requirements of OPs rapid preliminary screening detection under laboratory conditions, response surface methodology was used to optimize the working conditions of the indirect competitive ELISA assay. Firstly, the optimal working concentration combination of organophosphorus pesticide general structural antigen and Abs was studied. Then, on the basis of single factor test, the response surface optimization design experiment was carried out. The modified optimum operating conditions (ion concentration of 0.04 M, pH value of 7.89, methanol concentration of 2.9%) were used to test the standard. It showed a stable and reproducible detection result, with a sensitivity of 1.28 ng/mL. The detection sensitivity of the Abs to different OPs had little difference, and the detection sensitivity of parathion, phosphomebium, queathion and methyl parathion were 0.72, 3.39, 4.62 and 4.88 ng/mL, respectively. So, it could be applied to the preliminary screening and detection of a large number of samples in the laboratory.

(2) In order to meet the need of rapid trace detection of OPs, a novel immunoelectrochemical sensor was prepared with Prussian-Blue (PB) as conductive substrate. In order to strengthen the effective binding between antibody and PB, the gold labeled probe was prepared by coupling Abs with AuNPs. In order to simplify the process of sensor preparation, the electrodeposition composite film was prepared on the electrode

surface by one-step electrodeposition method in the mixed solution of gold labeled probe and PB. Under the optimal experimental conditions, the concentration of OPs showed a good linear relationship with the corresponding electrochemical response value ($R^2=0.9918$), and the detection limit was 0.003 ng/mL. The recoveries of actual samples were 98.05%~102.05%. Therefore, when the concentration of the target substance in the sample was low, the sensor could be used for detection.

(3) In order to reduce the professional threshold of OPs detection and further improve the detection efficiency, a time-resolved fluorescent paper-based sensor was prepared by fluorescence labeling the Sheep anti-mouse antibody (SaMIgG). An indirect time-resolved fluorescent probe was fabricated by connecting Abs with europium oxide latex microspheres via SaMIgG. This strategy could effectively amplify the signal and save the amount of target antibody. After the detection, the fluorescence intensity at the detection line could be monitored qualitatively with the help of the ultraviolet light source with the wavelength of 365 nm. The screened positive sample images could be analyzed by the software ImageJ to complete the quantitative detection. The construction and working conditions of the sensor were optimized, and the detection limit could reach 0.53 ng/mL. The sensor could be used stably in the test of vegetable sample matrix. The sensor had the advantages of low production cost, easy portability, simple operation, and could be used by non-professionals or a large number of samples for rapid detection.

The above studies provided a variety of detection schemes for OPs detection, which could basically meet the rapid detection needs of different populations and different scenarios.

Keywords: Organophosphorus pesticides; Broad-specificity antibody; Rapid detection method; Enzyme-linked immunosorbent assay; Electrochemical sensor; Paper-based sensor

目录

摘要	I
ABSTRACT	III
目录	V
第一章 绪论	1
1.1 研究背景及意义	1
1.2 国内外研究现状	2
1.2.1 主要敏感识别元件	2
1.2.2 主要快速检测方法	3
1.2.3 多残留免疫分析方法	5
1.3 研究目的与主要内容	6
1.3.1 研究目的	6
1.3.2 主要内容	6
第二章 基于响应面法优化的间接竞争酶联免疫吸附测定检测方法研究.....	8
2.1 引言	8
2.2 材料与方法	8
2.2.1 主要仪器及耗材	8
2.2.2 主要试剂及溶液配制	9
2.3 实验方法	10
2.3.1 构建 icELISA 检测方法	10
2.3.2 单因素试验	12
2.3.3 响应面优化试验方案	12
2.3.4 数据统计	13
2.4 结果与讨论	13
2.4.1 icELISA 检测方法工作浓度的确定	13
2.4.2 单因素试验结果	13
2.4.3 响应面优化试验结果	15
2.4.5 OPs 的 icELISA 检测	18
2.4.6 OPs 的特异性测试	19
2.5 本章小结	20
第三章 基于一步电沉积的电化学免疫传感器的制备.....	22
3.1 引言	22
3.2 材料与方法	22
3.2.1 主要仪器及耗材	22
3.2.2 主要试剂及溶液配制	23
3.3 实验方法	24
3.3.1 电沉积液的制备	24
3.3.2 AuNP-Abs-PB/SPCE 免疫传感器的制备	25

3.3.3 电化学测定方法	26
3.3.4 样品预处理方法	26
3.4 结果与讨论	26
3.4.1 AuNP-Abs-PB/SPCE 的表征	26
3.4.2 免疫传感器的工作条件优化	27
3.4.3 OPs 的电化学检测	29
3.4.4 免疫传感器的性能测试	31
3.4.5 蔬菜样品中 OPs 的检测	31
3.5 本章小结	32
第四章 基于二抗标记法的信号放大型时间分辨荧光免疫层析纸基传感器的构建. 33	
4.1 引言	33
4.2 材料与方法	34
4.2.1 主要仪器及耗材	34
4.2.2 主要试剂及溶液配制	34
4.3 实验方法	36
4.3.1 Eu-SaMIgGs 的制备	36
4.3.2 TRFIA 纸基传感器的制备	36
4.3.3 TRFIA 纸基传感器的工作方法	37
4.3.4 样品预处理	38
4.4 结果与讨论	39
4.4.1 Eu-SaMIgGs 的表征	39
4.4.2 TRFIA 纸基传感器的工作条件优化	39
4.4.3 OPs 的 TRFIA 纸基传感器检测	41
4.4.4 TRFIA 纸基传感器的性能测试	42
4.4.5 OPs 的样品检测	43
4.5 本章小结	44
第五章 结论与展望	45
5.1 结论	45
5.2 展望	46
参考文献	47
在读期间成果	52
致谢	54

第一章 绪论

1.1 研究背景及意义

农药是农业生产的重要组成部分, 在提高农产品质量、保障粮食供给等方面起到了极为重要的作用。自从 20 世纪 60 年代有机氯类农药被禁用后, 其他合成农药如有机磷农药 (Organophosphorus pesticides, OPs)、氨基甲酸酯类农药 (Carbamates pesticide) 和拟除虫菊酯类农药 (Pyrethroids pesticide, Pyrs) 被引入使用。其中, OPs 在农业生产中是最常见的品种, 其因高效、广谱的特点而被广泛应用^[1, 2], 其用量在各种农药的总使用量中约占 70%^[3, 4]。OPs 存在一定的神经毒性, 进入机体后会与乙酰胆碱酯酶的羟基结合并使之磷酸化, 磷酸化后的乙酰胆碱酯酶活性受到了抑制, 无法有效分解乙酰胆碱, 从而导致乙酰胆碱过量蓄积, 使机体发生神经性中毒^[5], 由此起到灭虫剂的作用。一般情况下, OPs 只对目标害虫有致死作用, 不会影响非目标群体。并且, 在农作物的种植、生产过程中, 只要合理使用 OPs、严格执行安全间隔期就可以在保障农产品质量的同时, 也不会对人群身体健康造成危害^[6]。然而, 由于农药难以降解, 长期残留于生态系统中, 通过空气、水和土壤进入食物链, 最终会在高级消费者体内富集^[7]。另外, 由于部分生产者过分追求农作物生长速度, 不规范地使用 OPs, 随之而来的超标和残留问题对食品安全构成了严重的威胁。这不仅影响到了我国农产品的生产质量安全、公众的身体健康和环境的可持续发展, 也在一定程度上阻碍了我国农产品的出口贸易行业的发展^[8, 9]。

据报道, 已经商业化使用的 OPs 有 150 多种^[7]。另外, 由于地理位置、饮食习惯的不同, 不同国家和地区使用的 OPs 种类和残留水平也存在差异。果蔬、茶叶、土壤等基质类型复杂多样、农药用量大、农药理化性质各异、农药多残留污染, 这些都导致 OPs 残留检测面临着巨大的挑战^[9, 10]。面对如此严峻的 OPs 残留污染现状, 除了加快开发新型、绿色农药外, 加强对市面上现有农药的监管力度成为了当下最有效的手段^[11]。而有效的监管体系则需要依赖于精准、高效的检测方法。传统的农药检测方法包括质谱法、气相色谱法、高效液相色谱法及其相互之间的联用方法等, 它们虽具有灵敏度较高、特异性较强、检测结果准确可靠的特点, 但样品前处理复杂、检测过程繁琐费时、需要专业人员操作等问题阻碍了这些方法的使用和普及^[12, 13]。一些新型检测技术, 如免疫传感器、酶传感器、适配体传感器等, 因其便携、快速、准确、高效等特点, 且在实际应用中表现出了比较好的检测效果, 而受到了部分科研人员的广泛关注。同时, 由于 OPs 种类繁多, 常用的基于单一靶标识别的检测方法已经难以满足监管机构的需求^[14-16], 开发稳定性好、灵敏度高的 OPs 残留快速检测方法已成为当务之急。

1.2 国内外研究现状

目前,常见的快速检测方法大多是基于传感器原理建立的,敏感识别元件与被分析物质之间发生特异性结合时发生的电子转移、共价键合、催化等生物、化学反应,会表达出相应的物理、化学信号,需通过物理化学换能器转换为定性判断或定量监测的信号^[17]。由于检测速度较快、操作速度较为简单、检测性能较好等优点,搭载着不同敏感识别元件的不同换能原理的快速检测方法在 OPs 残留检测方面展现出重要的应用价值和前景。

1.2.1 主要敏感识别元件

快速检测方法能够有效应用于 OPs 的分析与检测,首先需要具备高亲和力、高特异性识别能力的敏感识别元件。

(1) 酶

近年来,有许多关于酶(Enzyme)传感方法应用于 OPs 检测的报道,他们主要是利用了酶抑制的原理^[18]。Hou 等^[19]利用乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AchE)作为核心识别元件,借助氧化石墨烯、纳米金笼的优异导电性,构建了一种用于检测毒死蜱农药的电化学酶传感器。在该传感体系中,OPs 能够与 AchE 上面的丝氨酸残基发生共价结合,这导致 AchE 发生不可逆的磷酸化^[20],整个体系中乙酰胆碱的催化效率降低,最终体现为电流信号下降。该方法的检测限(Limit of detection, LOD)为 3 ng/mL,并且在加标回收实验中表现出了较好的稳定性和回收率。Liu^[21]等构建了由酪氨酸酶介导的上转换发光荧光传感器,在酪氨酸酶的催化作用下,上转换发光纳米粒子的荧光信号发生淬灭。随着 OPs 的加入,酪氨酸酶的活性逐渐被抑制,使得整个体系的荧光信号随之升高。以酶抑制为原理的传感器的发展较为成熟、操作简便、检测时间短、检测成本低。但是,氨基甲酸酯类农药也存在类似的酶抑制作用^[18],会在一定程度上对检测结果造成干扰。此外,传统的酶抑制传感方法的前处理条件通常以水相为主^[22, 23],这使得农药残留组分的提取效率较低,制约了该方法检测性能的提升^[23]。

(2) 适配体

适配体(Aptamer, Apt)是通过体外筛选获得的寡核苷酸序列,它与目标物的结合方式类似于抗原-抗体间的相互作用,能够针对目标物实现高亲和力、高特异性地识别^[24],故也被称为“化学抗体”。适配体易于合成、重复性较好、制备成本低^[25],正作为一种新兴的敏感识别元件被广泛应用于 OPs 检测工作。王丽^[26]利用 SELEX 筛选技术得到了可以同时识别丙溴磷、甲拌磷、水胺硫磷、氧化乐果 4 种 OPs 的 DNA 适配体序列^[27],该序列后来被许多研究者用作核心识别元件^[28-30],来进行 OPs 适配体传感器的研究。Bala 等^[31]基于竞争模型构建了比色传感器,互补肽与马拉硫磷共

同竞争适配体上同一识别位点,未与适配体结合的互补肽会引起纳米金颗粒聚沉并使溶液由红变蓝,通过检测整个反应体系的光学信号变化,可以实现对马拉硫磷的定性及定量检测。然而,由于适配体序列的筛选较为困难,目前已知的能够准确识别目标农药类别的适配体序列数量还很有限,这一定程度上阻碍了适配体传感器的深入探究和推广应用^[18, 25]。

(3) 分子印迹聚合物

分子印迹聚合物 (Molecular imprinting polymers, MIPs) 是在分子印迹技术中能够与模板分子进行特异性识别的一类物质,它与印迹分子之间存在着类似酶-底物或者抗体-抗原的相互作用^[32-34]。MIPs 作为敏感识别元件,热稳定性较好^[35],其识别效率较为稳定,不易受 pH、温度等环境因素的影响^[18]。Karimi-Maleh 等^[36]以吡咯为功能单体,以克线磷为分析分子,通过循环伏安法制备了基于 $\text{Co}_3\text{O}_4@\text{MOF-74}$ 纳米复合材料的分子印迹电极,对克线磷农药的 LOD 可达到 $1.0 \times 10^{-11} \text{ M}$,并在后续性能测试中表现出了较为理想的稳定性、重现性和高选择性。MIPs 是一类新兴的敏感识别元件,发展还不成熟,还存在着功能单体选择较少、模板分子洗脱不彻底等不足之处^[37]。目前关于 MIPs 的研究仍停留在实验室阶段,若要实现大规模商业化仍是一个较大的挑战^[38]。

(4) 抗体

抗体 (Antibody, Ab) 是将抗原免疫到机体内以后,在免疫应答系统的作用下,机体产生的能够高亲和力、高特异性识别并结合抗原的一类物质^[39, 40]。抗体因其灵敏度高、检测范围广、准确有效等特点^[41, 42],常被作为一种高效、耐久的敏感识别元件被广泛应用于各类传感检测方法的构建^[18, 40, 43, 44]。Yu^[45]使用能够发出红色荧光的 $\beta\text{-NaY}(\text{Gd})\text{F}_4:\text{Yb,Er}$ 上转换发光颗粒来标记单克隆抗体,在硝酸纤维素膜上依次固定抗原和羊抗兔抗体,构建了用于检测杀螟硫磷的上转换发光免疫层析纸基传感器,该方法可实现现场实时的高灵敏度检测。Talan 等^[44]将毒死蜱抗体固定在纳米金表面构建了电化学免疫传感器,并利用氟掺杂锡氧化物的导电性来增强电流信号,在苹果和卷心菜中的 LOD 可达到 10 nM 。尽管基于抗体的免疫分析方法无需复杂仪器就可以实现高特异性、高灵敏度的检测,但必须注意到的是,抗体主要为蛋白质成分,对作用环境和储藏条件的要求较为严格,加之生产成本较高,在应用于农药残留等农产品质量监测时,或可带来过高的检测成本。

1.2.2 主要快速检测方法

(1) 酶联免疫吸附测定

酶联免疫吸附测定 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 是免疫学中的经典实验,也是目前较为成熟、常用的快速检测方法。它是指将特异性抗原或靶标抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上,进行抗原-抗体特异性结合反应后,加入能够识别

靶标抗体的酶标二抗,洗脱掉多余的二抗后,利用间接标记到抗体上的过氧化物酶进行底物催化反应,通过分析产物溶液的吸光度(450 nm)和目标物质浓度之间的关系,最终实现定性判断和定量检测^[46, 47]。以 ELISA 为原理开发的检测试剂盒因其特异性强、灵敏度高、重复性好等特点,得到了众多科研工作者的认可和推崇,在医学诊断、食品安全监管、环境监测等领域得到了广泛地应用^[48]。王恒玲^[49]曾利用菊酯类农药广谱性抗体作为核心识别元件建立了间接竞争酶联免疫吸附测定(Indirect noncompetitive enzyme-linked immunity, icELISA)检测方法,其中,针对醚菊酯、氯菊酯和苯醚菊酯三种菊酯类农药的检出限分别可达到 3.16、3.72、4.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$,可满足对大量样本进行快速初筛的检测需求。

(2) 电化学传感器

电化学传感器(Electrochemical sensor)因其制备过程和操作方法简单,加之成本低廉、便于携带、易于实现集成化等优势^[24],已经成为 OPs 快速检测方法中最常用的传感技术之一。它是通过将敏感识别元件与被分析物质之间发生的生物、化学反应转换为电流、电压等电信号输出,进而建立被分析物质浓度与电信号变化之间的关系^[50, 51]。Mehta 等^[52]利用功能化石墨烯量子点实现信号的有效放大,构建了一种电化学免疫传感器,对于对硫磷的 LOD 可达到 46 pg/L 。Cao 等^[53]报道了一种用于检测毒死蜱的电化学免疫传感器,固定在电极表面的抗体捕捉到毒死蜱农药分子后,使得电极表面的阻抗明显升高,该方法的 LOD 为 1.4×10^{-5} $\mu\text{g}/\text{mL}$,并且在后续测试中表现出了较好的特异性。

(3) 化学发光传感器

化学发光传感器(Chemiluminescence sensor)是一种根据纳米材料的化学发光强度来确定被分析物质浓度的光谱技术^[54, 55]。该传感方法在工作时无需外部光源,具有灵敏度高、操作简单、成本低等优势^[56]。欧阳辉^[56]成功制备了具有类过氧化物酶作用的石墨相氮化碳-铁酸铋纳米复合物,与毒死蜱抗体偶联形成化学发光探针,用于构建免疫层析试纸条,该复合物呈深棕色,可作为定性判断的颜色信号;又可以通过监测其对鲁米诺-过氧化氢化学发光体系的增敏效果,来作为定量检测信号。

(4) 荧光传感器

荧光传感器(Fluorescence sensor)是将能够产生荧光信号的纳米材料与靶标抗原或抗体进行偶联标记,随着特异性识别反应的进行,体系中的荧光强度会因荧光淬灭而相应减弱^[55]或者因荧光集团聚集而相应增强^[57]。借助特定波长的激发光源,即可监测到上述变化。荧光传感器具有较高的信噪比,有利于提高检测灵敏度^[58]。Zou 等^[59]利用上转换发光纳米粒子标记抗体,建立了横向流动免疫层析纸基传感器方法,以定性判断和定量检测结合的方式,实现对甲基对硫磷、对硫磷和杀螨硫磷三种 OPs 的快速、高灵敏检测。

1.2.3 多残留免疫分析方法

(1) 基于混合抗体识别的多残留免疫分析方法

混合抗体^[60]是最常见的多靶检测方法,它是利用不同信号标记材料对多个不同抗体分别进行标记,或者仅用一种标记材料但是将多个不同抗体分别固定在不同区域,仅通过一次加样检测,便可获得多种被分析物的信号。例如, Lan 等^[61]报道了一种可同时检测 7 种农药(三唑磷、甲硫磷、丙氰菊酯、克百威、噻虫啉、百菌清、多菌灵)的多联免疫分析方法,他们构建了固定有七种抗原的微阵列芯片,以金标探针为示踪剂,建立并优化了基于间接模型的七联免疫芯片分析方法,该方法农药检测范围为 0.02~6.45 ng/mL,符合我国农药残留检测要求。但是,在利用混合抗体识别机制建立检测方法时,需要同时制备多种靶标抗体,并且要进行不同抗原的混合包被,工作量大,操作较为复杂^[60]。

(2) 基于双特异性抗体识别的多残留免疫分析方法

双特异性抗体(Bispecific antibodies, BsAbs)是一类同时具有两种不同抗原结合臂的抗体,该抗体可以同时结合两种不同的抗原^[62]。付志峰团队采用混合杂交技术制备了一种能同时识别甲基对硫磷和吡虫啉的 BsAbs^[56, 63],并且以辣根过氧化物酶(Horse radish peroxidase, HRP)和碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)作为化学发光探针分别标记甲基对硫磷半抗原和吡虫啉半抗原,建立了基于时间分辨化学发光方法的间接竞争多重免疫层析检测试纸,用于农药残留的定量检测,使用该方法检测甲基对硫磷和吡虫啉,其线性范围均为 0.1~250 ng/mL, LOD 为 0.058 ng/mL,整个检测过程可在 22 min 内完成^[64]。目前 BsAbs 多通过基因工程、多倍体细胞融合等方法来制备^[65],但其结构不够稳定、制备难度较大、筛选和纯化方法较为复杂,以上技术难题限制了 BsAbs 在免疫分析方法中的推广应用。

(3) 基于广谱性抗体识别的多残留免疫分析方法

广谱性抗体(Broad-specific antibodies)是以一类或几类物质的共有结构作为抗原或半抗原,通过识别共有结构而实现对这一类或几类物质的广谱性识别^[66]。徐振林^[60, 67-69]设计合成了针对二乙氧基类有机磷农药的四种不同结构的抗原,通过杂交瘤技术获得了抗 OPs 的广谱性单克隆抗体,并首次从构效关系、弱相互作用及空间识别 3 个层面系统深入研究了抗体与 OPs 的识别机制,并建立了直接竞争酶联免疫分析(Direct competitive enzyme-linked immunity, dcELISA)、直接竞争化学发光酶联免疫分析(Direct competitive chemiluminescence enzyme-linked immunoassay, dcCLEIA)、荧光偏振免疫分析(Fluorescence polarization immunoassay, FPIA)及直接竞争时间分辨荧光免疫分析(Direct competition time resolved fluorescence immunoassay, dcTRFIA)等一系列免疫分析方法。由于对应的抗原决定簇是多种 OPs 的共有结构,使得广谱性抗体具有广泛的识别能力,但关于该抗体的快速检测方法尚处于摸索阶段。因此,

可利用其特点, 建立一系列通用型免疫分析方法, 应用于大量样本的快速检测筛选, 并可有望为大型仪器分析方法提供检测参考基础^[15]。

1.3 研究目的与主要内容

1.3.1 研究目的

OPs 是农业生产中最为常见的农药品种, 因其高效、广谱的特点而被广泛应用。在目前的农药市场中, OPs 种类繁多, 且占据着较大比重。该类农药具有一定的神经毒性, 进入机体后会与乙酰胆碱酯酶结合并使之磷酸化, 最终导致乙酰胆碱过量蓄积, 使机体发生神经性急性或慢性中毒。由于 OPs 难以降解, 加之部分生产者的不合理、不规范甚至多种 OPs 混合使用, 由此引发的 OPs 超标和残留问题, 严重地影响了我国农产品的质量安全、公众的身体健康和环境的可持续发展, 也在一定程度上阻碍了我国农产品的出口贸易。

面对如此严峻的 OPs 残留污染现状, 借助精准、高效的检测方法以加强对市面上现有农药的监管力度, 成为了当下最直接有效的手段。免疫分析方法因其高效灵敏、操作简单、检测速度快等特点, 在 OPs 的快速检测中表现出了优良的检测效果。同时, 随着监管标准和居民消费水平的提高, 针对不同人群、不同场景, 存在着不同的快速检测需求。目前常见的免疫分析方法多是基于单一靶标识别, 这已远远无法满足现下的检测需求, 开发稳定性好、灵敏度高、可满足多种需求的 OPs 残留快速检测方案已成为当务之急。

1.3.2 主要内容

本文以 OPs 作为目标物质, 以能够有效识别大部分 OPs 的有机磷农药广谱性抗体 (Abs) 作为核心识别元件, 构建了 3 种不同原理的免疫分析方法, 实现了 OPs 的快速检测, 并应用于实际样品检测。主要研究内容如下:

(1) 探究得到了有机磷农药通用结构抗原 (OPs-BSA) 和 Abs 的最佳工作浓度组合。在单因素试验的基础上, 设计了响应面优化试验。结合实际检测工作需要, 分析获得了 icELISA 检测方法的最佳工作参数及竞争抑制曲线, 并对该方法的特异性进行了验证。

(2) 将纳米金颗粒与 Abs 结合形成金标探针, 利用一步电沉积的方法在丝网印刷碳电极表面修饰了电沉积复合膜。对在电极表面修饰的电沉积复合膜进行形貌表征, 并对该传感器电极的组装过程进行电化学表征和性能分析。在最佳实验条件下, 探究 OPs 的浓度与其相应的电化学响应之间的线性关系, 同时研究该免疫传感器的检测范围、灵敏度、特异性以及稳定性等性能。

(3) 利用羊抗鼠抗体作为中间体, 将氧化铈乳胶微球荧光标记材料和 Abs 联接

在一起，形成间接时间分辨荧光探针，制备了时间分辨荧光纸基传感器。对偶联前后的氧化铈乳胶微球进行了紫外光谱扫描和荧光光谱扫描，以验证探针的成功偶联和对比荧光信号的变化。在最佳实验条件下，探究 OPs 的浓度与条带显色强度之间的响应关系。探究了该传感器在不同样品基质溶液中的检测效果，以对比分析该传感器的适用样品种类。

在以上内容的基础上，分析了 3 种快速检测方法的工作特点和检测效果，总结了每种方法的适用情况。

第二章 基于响应面法优化的间接竞争酶联免疫吸附测定检测方法研究

方法研究

2.1 引言

抗原、抗体是一类以蛋白质成分为主的生物识别元件，对所处环境较为敏感，不同的 pH 值、离子浓度等作用条件对其工作效果影响较大。同时，由于抗原、抗体制备步骤复杂、制备周期长、价格昂贵等特点，使得我们在构建免疫分析方法时，需对工作条件进行更加完善的优化讨论，以实现以较少的抗原、抗体用量获得更好的检测效果。

响应面法是一项集试验设计、数理统计、最优化分析于一体的综合技术，它通过对试验点的位置进行合理布置，以达到仅利用较少量的试验点就可得到较高精度响应面的目的^[70]。该方法具有试验次数少、试验周期短、精度高、预测性能好等优点，并且可以同时研究几种因素间的交互作用^[71]。目前已经在生物学过程、化学过程、农业领域、工程学等方面得到了广泛地应用，能够有效地指导生产工作参数的优化，显著地提高了生产效率和效益。

本研究以 Abs 作为敏感识别元件，通过响应面法优化构建了基于间接竞争模型的 icELISA 检测方法。首先，利用间接非竞争 ELISA 实验得到 OPs-BSA 和 Abs 的最佳工作浓度组合作为后续试验的基础。然后，在单因素试验结果的基础上，选取有显著影响的离子浓度、pH 值、甲醇浓度（甲醇：PBS, v/v）参数进行响应面优化试验。结合实际情况对优化结果进行了修正。建立了适用于该 icELISA 检测方法的工作竞争抑制曲线，并对该检测方法的特异性进行了验证。

2.2 材料与方法

2.2.1 主要仪器及耗材

本实验中所用的超纯水均由 PALL 超纯水净化系统制备；在 96 孔聚苯乙烯酶标板上进行实验，每个步骤完成后，用洗板机对酶标板进行洗脱；利用电热鼓风干燥箱维持恒定的 37℃ 孵育温度；各类生物试剂按照不同储存要求分别保存于冰箱的 4℃、-20℃ 区域；利用酶标仪获取吸光度值数据；另外，在本实验中还使用了电子分析天平、移液枪等仪器。本实验所用主要仪器如表 2.1 所示。

表 2.1 主要仪器及耗材

Tab. 2.1 Main instruments and consumables

名称	型号	厂家
超纯水系统	LS MK2	美国 PALL 公司
酶标仪	Varioskan LUX	美国 Seymour Fisher 公司
洗板机	888	美国 Seymour Fisher 公司
冰箱	BCD-576WT	海信集团有限公司
电子分析天平	AL 104	德国梅特勒托利多仪器上海有限公司
电热鼓风干燥箱	DHG-9070A	上海一恒科技有限公司
移液枪	1~5,000 μL	德国 Eppendorf 公司
96 孔聚苯乙烯酶标板	3590	美国 Costar 公司

2.2.2 主要试剂及溶液配制

(1) 主要试剂

表 2.2 主要试剂

Tab. 2.2 Main reagents

名称	规格	厂家
有机磷农药广谱性抗体 (Abs)	1 mg/mL	北京博奥龙免疫技术有限公司
有机磷农药通用结构抗原 (OPs-BSA)	1 mg/mL	北京博奥龙免疫技术有限公司
过氧化物酶标羊抗鼠抗体 (HRP-SaMIgG)	1 mg/mL	山东绿都生物科技有限公司
3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)	分析纯	美国 Sigma 试剂有限公司
过氧化氢脲	分析纯	美国 Sigma 试剂有限公司
农药标准品	1 mg/mL	上海农药研究所有限公司
脱脂奶粉	500 g	内蒙古伊利实业集团股份有限公司
H_2SO_4	分析纯	国药化学试剂有限公司
Tween-20	分析纯	国药化学试剂有限公司
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	分析纯	国药化学试剂有限公司
H_2SO_4	分析纯	国药化学试剂有限公司

本实验采用 Abs 作为构建 icELISA 方法的关键敏感识别元件；将 OPs-BSA 作为包被抗原，将标记有过氧化物酶的羊抗鼠抗体 (HRP-SaMIgG) 作为鼠源 Abs 的间接指示源；脱脂奶粉用于提供蛋白质分子，以封闭非特异性识别位点；以 TMB 作为底物参与

酶促反应, H_2SO_4 则用于终止酶促反应。用于加标测试的农药标准品种类有对硫磷、蝇毒磷、喹硫磷、甲基对硫磷等。本实验中使用的化学试剂均为分析纯。本实验所用的主要试剂如表 2.2 所示。

(2) 主要溶液配制

①PBS缓冲溶液 (0.01 M, pH 7.4): 准确称取0.60 g KCl、0.81 g KH_2PO_4 、24.00 g NaCl、4.26 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 用超纯水溶解, 并定容至3 L, 室温放置待用。

②PBST溶液 (0.05%, v/v): 从①中量取1 L的PBS溶液, 加入0.5 mL的Tween-20, 磁力搅拌均匀, 室温放置待用。

③脱脂奶粉封闭溶液 (5%, m/v): 该试剂需现用现配, 从②中量取100 mL的PBST溶液, 加入5 g的脱脂奶粉, 涡旋混匀。

④柠檬酸盐缓冲溶液: 用超纯水溶解0.933 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、1.841 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 并定容至100 mL, 于4°C下保存待用。

⑤TMB溶液: 量取50 mL的无水乙醇, 用以溶解100 mg的TMB固体粉末, 避光密封, 于-20°C保存待用。

⑥过氧化氢脲溶液 (3%, m/v): 用超纯水溶解0.30 g过氧化氢脲, 并定容至10 mL, 避光密封, 于4°C保存待用。

⑦ H_2SO_4 溶液 (2 M): 量取10.90 mL H_2SO_4 , 加入到80 mL超纯水中, 待混合溶液冷却至室温后, 定容至100 mL, 于室温下放置待用。

⑧底物显色液: 该试剂需在避光环境下现用现配, 依次量取9.50 mL的柠檬酸盐缓冲溶液、0.50 mL的TMB溶液和32 μL 的过氧化氢脲溶液, 混合后摇晃容器使混合均匀。

2.3 实验方法

2.3.1 构建 icELISA 检测方法

(1) 确定工作浓度

icELISA 检测方法的核心是抗原、抗体之间的特异性结合反应。在构建该方法之前, 通过间接非竞争 ELISA 实验来确定合适的抗原、抗体浓度。将 OPs-BSA 分别配置成 4、2、1、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 共 6 个工作浓度; Abs 则从 4,000 倍的稀释度作为起始浓度, 2 倍比稀释 6 个浓度 (4,000、8,000、16,000、32,000、64,000、128,000)。采用棋盘法进行间接非竞争 ELISA 实验, 具体步骤如下:

①包被: 按照 2 行/浓度、100 μL /孔的方式, 将经 PBS 稀释至不同工作浓度的 OPs-BSA 溶液加入到 96 孔酶标板中, 在 37°C 下孵育 2 h 使抗原包被到聚苯乙烯酶标板孔壁上, 反扣酶标板将孔内溶液甩干, 利用 PBST 溶液对酶标板进行 3 次洗脱操作。

②封闭: 按照 200 μL /孔的方式, 利用脱脂奶粉封闭溶液对包被后酶标孔内剩余的非特异性的结合位点进行封闭, 37°C 孵育 1 h 以充分封闭, 用 PBST 溶液进行 3 次洗板。

③加入抗体：将 Abs 的系列梯度浓度溶液按照 100 μL /孔加入到酶标板孔内，同时设置空白对照，只加入等量 PBST 溶液。经 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h，使 Abs 与 OPs-BSA 充分发生特异性结合反应而被截留在孔壁上。孵育结束后，用 PBST 溶液洗板 3 次。

④加入酶标抗体：利用 PBST 溶液对 HRP-SaMIgG 进行 10,000 倍稀释，按照 100 μL /孔的方式加入到每个酶标孔内。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h，HRP-SaMIgG 因与孔壁上的 Abs 发生特异性结合反应而留在孔内。由于酶的催化能力过于灵敏，在孵育结束后至少需进行 6 次洗板操作（洗脱试剂仍为 PBST 溶液），以保证洗脱充分。

⑤显色：在避光环境下，按照 100 μL /孔的方式加入底物显色液，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的避光环境下孵育 15 min。由于过氧化物酶量不同，每个孔内的 TMB 发生了不同程度的催化反应，最终孔内溶液呈现出不同深浅程度的蓝色。

⑥终止：按照 50 μL /孔加入 H_2SO_4 溶液，孔内的溶液逐渐转变为黄色。

⑦数据获取及结果判定：待反应结束后，将酶标板置于酶标仪内，在 450 nm 波长的条件下读取各酶标孔的吸光度值 (A)。选择 $A \approx 1$ 时所对应的 OPs-BSA、Abs 浓度组合作为 icELISA 方法的工作浓度。

(2) icELISA 检测方法的工作流程

将 (1) 中获得的 OPs-BSA、Abs 工作浓度应用于构建 icELISA 检测方法，其工作流程如下：

①包被：将工作浓度的 OPs-BSA 溶液按照 100 μL /孔加样，37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h，用 PBST 溶液进行 3 次洗板。

②封闭：将脱脂奶粉封闭溶液按 200 μL /孔进行封闭，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h，用 PBST 溶液进行 3 次洗板。

③加入抗体和样品：将处理后的样品溶液按照 50 μL /孔加样，再将工作浓度的 Abs 同样按照 50 μL /孔加样。经 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h，用 PBST 溶液进行 3 次洗板。OPs 与 OPs-BSA 共同竞争 Abs 上的同一特异性识别位点，未与 OPs 结合的 Abs 与孔壁上的 OPs-BSA 结合，而与 OPs 结合的 Abs 则被洗脱。

④加入酶标抗体：将 10,000 倍稀释后的 HRP-SaMIgG，按 100 μL /孔加入酶标板。经 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h，用 PBST 溶液进行 6 次洗板。

⑤显色：按 100 μL /孔加入底物显色液，37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 15 min。

⑥终止：按 50 μL /孔加入 H_2SO_4 溶液。

⑦数据获取及结果判定：在 450 nm 波长下读取吸光度 (A) 值。通过分析吸光度值，探究竞争抑制率与 OPs 浓度之间的关系。竞争抑制率 (%) 的计算公式^[52]为：

$$\text{竞争抑制率} = \frac{A_s - A_o}{A_n - A_o} \times 100\% \quad (2.1)$$

其中， A_s 为待检样品溶液的吸光度值；

A_n 为阴性对照溶液的吸光度值；

A_0 为空白对照溶液的吸光度值。

2.3.2 单因素试验

(1) 离子浓度单因素优化试验

按照 icELISA 检测方法的工作流程, 固定缓冲溶液的 pH 值为 7.2, 样品溶液的甲醇浓度为 10%, 对缓冲溶液的离子浓度进行单因素实验。为保持抗体活性, 需设置适宜的缓冲体系, 故将缓冲溶液的离子浓度设定为 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08 M 用于 icELISA 检测, 测定 450 nm 波长下的吸光度值并计算竞争抑制率。

(2) pH 值单因素优化试验

按照 icELISA 检测方法的工作流程, 固定缓冲溶液的离子浓度为 0.01 M, 样品溶液的甲醇浓度为 10%, 对缓冲溶液的 pH 值进行单因素实验。由于抗体工作的适宜 pH 值多呈中性, 故将缓冲溶液的 pH 值设定为 5.6、6.4、7.2、8.0、8.8 用于 icELISA 检测, 测定 450 nm 波长下的吸光度值并计算竞争抑制率。

(3) 甲醇浓度单因素优化试验

按照 icELISA 检测方法的工作流程, 固定缓冲溶液的离子浓度为 0.01 M、pH 值调节至 7.2, 对样品溶液的甲醇浓度进行单因素实验。在样品前处理过程中需加入甲醇以充分提取目标农药, 但过量甲醇含量则会影响抗体活性。故将样品溶液的甲醇浓度设定为 0、10、20、30、40% 用于 icELISA 检测, 测定 450 nm 波长下的吸光度值并计算竞争抑制率。

2.3.3 响应面优化试验方案

在单因素试验的基础上, 采用 Box-behnken 响应面设计法优化试验方案, 以离子浓度 (A)、pH 值 (B) 和甲醇浓度 (C) 为考察变量, 以 -1、0、1 表示低、中、高三个水平, 以竞争抑制率 (y) 作为响应值。采用三因素三水平的响应面设计方案 (表 2.3) 进行试验。

表 2.3 响应面试验因素水平表

Tab. 2.3 Factors and levels in response surface design

水平	因素		
	离子浓度 (A) /M	pH 值 (B)	甲醇浓度 (C) /%
-1	0.04	7.2	0
0	0.06	8.0	10
1	0.08	8.8	20

2.3.4 数据统计

本试验均进行 3 次重复，利用 Microsoft Office Excel 软件进行数据的录入和处理。采用 Design Expert 10 软件设计响应面试验因素水平表，并对试验数据进行 Box-behnken 响应面分析，使用 Origin 9.0 软件作图。

2.4 结果与讨论

2.4.1 icELISA 检测方法工作浓度的确定

抗原、抗体是 icELISA 检测方法的核心识别元件，确定合适的工作浓度有利于后续检测方法的确立。首先，采用间接非竞争 ELISA 检测方法，以确定在包被不同浓度 OPs-BSA 时的 Abs 效价；在此基础上，宜选择 OPs-BSA 和 Abs 的消耗量均较少的组合作为最佳工作浓度组合。在 450 nm 波长下，包被有不同浓度的 OPs-BSA、不同稀释倍数的 Abs 时，吸光度值存在一定差异（表 2.4）。当 OPs-BSA 的浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、Abs 的稀释倍数为 16,000 时，吸光度值接近 1，且 OPs-BSA、Abs 的使用量相对比较少。因此，宜将“OPs-BSA 浓度 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、Abs 稀释倍数 16,000”作为 icELISA 检测方法的最佳工作浓度组合。

表 2.4 间接非竞争 ELISA 的检测结果
Tab. 2.3 Results of indirect non-competitive ELISA

OPs-BSA 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	抗体稀释倍数					
	4,000	8,000	16,000	32,000	64,000	128,000
4	2.301	1.979	1.446	0.925	0.545	0.332
2	2.570	2.268	1.744	1.205	0.823	0.411
1	2.234	1.869	1.429	0.883	0.530	0.302
0.5	2.227	1.637	1.143	0.692	0.445	0.270
0.25	2.065	1.391	0.938	0.487	0.321	0.200
0.125	2.005	1.406	0.880	0.472	0.305	0.201

2.4.2 单因素试验结果

(1) 离子浓度对竞争抑制率的影响

由图 2.1A 可知，缓冲溶液的离子浓度通过影响抗体活性，而显著地影响着 icELISA 检测方法的竞争抑制率变化。在 0.01~0.06 M 的范围之内，随着离子浓度的增加，竞争抑制率降低，即抗体活性逐渐恢复；在 0.06 M 时，竞争抑制率最低，即此时抗体达到

最大活性；而后在 0.06~0.08 M 范围内，随离子浓度的升高，抗体活性略有下降。这是由于抗体对环境条件较为敏感。当缓冲溶液离子浓度的过高或过低时，会导致渗透压的升高或降低，这都会使抗体活性受到一定的抑制。故将“0.04、0.06、0.08 M”确定为离子浓度单因素试验的三个水平。

(2) pH 值对竞争抑制率的影响

由图 2.1B 可知，缓冲溶液的 pH 值通过影响抗体活性，而显著影响着 icELISA 检测方法的竞争抑制率变化。当 pH 值为 5.6 时，作用环境处于酸性状态，对抗体内的蛋白质结构有一定程度的破坏，导致其活性降低；在 5.6~7.2 范围内，随着 pH 值的增加，抗体活性逐渐恢复；在 7.2 时，pH 值接近中性，竞争抑制率最低，即此时抗体达到最大活性；而后在 7.2~8.8 范围内，随 pH 值的升高，抗体活性略有下降。适当提高 pH 值有利于增加抗体活性，但 OPs 在碱性溶液中易分解，导致抗体无法充分捕捉到目标物质，最终也会导致竞争抑制率升高。故将“6.4、7.2、8.0”确定为 pH 值单因素试验的三个水平。

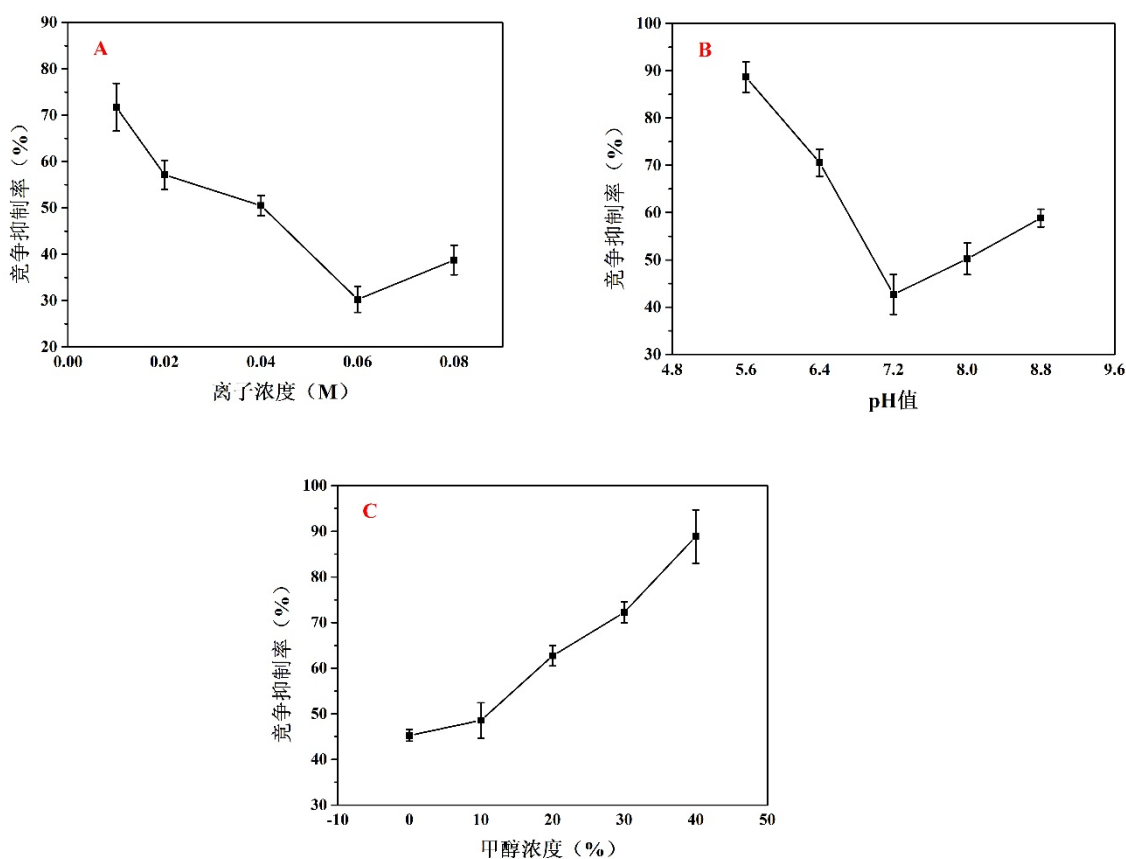


图 2.1 单因素试验：(A) 离子浓度；(B) pH 值；(C) 甲醇浓度

Fig. 2.1 Single factor test: (A) Ion concentration; (B) pH value; (C) Methanol concentration

(3) 甲醇浓度对竞争抑制率的影响

由图 2.1C 可知, 样品溶液中的甲醇浓度对 icELISA 检测方法的竞争抑制率有显著影响。OPs 易溶于有机溶剂, 故在样品预处理工作中常利用甲醇来提取。甲醇虽有利于充分地提取 OPs, 但若其浓度过高则会损伤抗体活性, 影响检测效率。当甲醇浓度为 0 时, 抗体可表现出最大活性和最高识别能力, 但此时样品中 OPs 没有被完全提取到, 最终影响了抗体的竞争抑制率; 在之后的试验中, 随着甲醇浓度的增加, 使得有效提取到的 OPs 的量增加, 但抗体结构受到一定程度破坏, 其活性明显降低。故将“0、10%、20%”确定为 pH 值单因素试验的三个水平。

2.4.3 响应面优化试验结果

(1) 响应面试验设计与结果分析

表 2.5 响应面试验方案及结果

Tab. 2.5 Scheme and results of response surface test

试验编号	离子浓度 (A)	pH 值 (B)	甲醇浓度 (C)	竞争抑制率 (y)
1	-1	-1	0	85.24
2	1	-1	0	58.55
3	-1	1	0	74.75
4	1	1	0	68.04
5	-1	0	-1	52.20
6	1	0	-1	39.32
7	-1	0	1	80.72
8	1	0	1	71.24
9	0	-1	-1	38.46
10	0	1	-1	35.04
11	0	-1	1	77.29
12	0	1	1	69.96
13	0	0	0	44.81
14	0	0	0	43.26
15	0	0	0	45.84
16	0	0	0	42.87
17	0	0	0	41.56

在分析单因素试验结果的基础之上, 以竞争抑制率为响应值, 选取对 icELISA 检测方法的竞争抑制率 (y) 有显著影响的离子浓度、pH 值、甲醇浓度参数进行三因素三水

平的响应面优化分析试验。利用 Design Expert 10 软件设计了共 17 组试验，其中前 12 组为析因试验，后 5 组为中心试验，用以评估试验误差。试验结果如表 2.5 所示。

对响应面试验的结果数据进行多元回归拟合，建立了二次响应面回归模型方程为：

$$y=61.90+11.11A+18.31B+9.98C+3.45AB-5.59AC-2.54BC-8.68A^2+14.82B^2+3.64C^2$$

表 2.6 回归模型方差分析表

Tab. 2.6 Regression model variance analysis table

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	5919.967	9	657.7741	123.5513	<0.0001	***
A-A	987.3257	1	987.3257	185.4517	<0.0001	***
B-B	2681.91	1	2681.91	503.7494	<0.0001	***
C-C	797.1006	1	797.1006	149.7213	<0.0001	***
AB	47.56447	1	47.56447	8.934147	0.0203	*
AC	125.2127	1	125.2127	23.51901	0.0019	**
BC	25.88774	1	25.88774	4.862556	0.0633	不显著
A ²	316.9668	1	316.9668	59.53662	0.0001	***
B ²	924.6922	1	924.6922	173.6871	<0.0001	***
C ²	55.67191	1	55.67191	10.45699	0.0144	*
残差	37.26727	7	5.323896			
失拟值	21.7923	3	7.264101	1.877639	0.2743	不显著
纯误差	15.47497	4	3.868742			
总和	5957.235	16				
R ²	0.9937					
R ² _{Adj}	0.9857					
CV/%	3.47					

注：***表示极显著 ($P<0.001$)；**表示非常显著 ($P<0.01$)；*表示显著 ($P<0.05$)；不显著 ($P>0.05$)。

对该回归模型进行显著性方差分析（表 2.6）可知，模型的 $F=123.55$ ， $P<0.0001$ ，表明该试验所采用的二次响应面回归模型是极显著的，具有统计学意义。失拟项的 P 值为 0.2743，大于 0.05，说明该模型无失拟因素存在，即其他因素对模型的干扰程度低，试验结果与所得回归模型的拟合程度较好。回归方程的可信度分析显示，该模型的校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.9857$ ，变异系数（CV）为 3.47%，说明该模型的预测值与试验值相关性较好，试验误差比较小，可将此模型用于分析和预测 icELISA 检测方法的工作条件。由 F 值可知，影响竞争抑制率的因素顺序依次为：B（pH 值）、A（离子浓度）、C（甲

醇浓度)。根据该模型的试验结果可知,因素 A、B、C、 A^2 、 B^2 的 P 值均小于 0.0001,说明因素 A、B、C、 A^2 、 B^2 对竞争抑制率的影响均是极显著的;交互项 AC 的 P 值为 0.0019,小于 0.01,对竞争抑制率有非常显著影响;交互项 AB、 C^2 的 P 值分别为 0.0203、0.0144,均小于 0.05;对竞争抑制率有显著影响;而交互项 BC 的 P 值为 0.0633,大于 0.05,即对竞争抑制率没有显著影响。

(2) 响应面试验图形分析

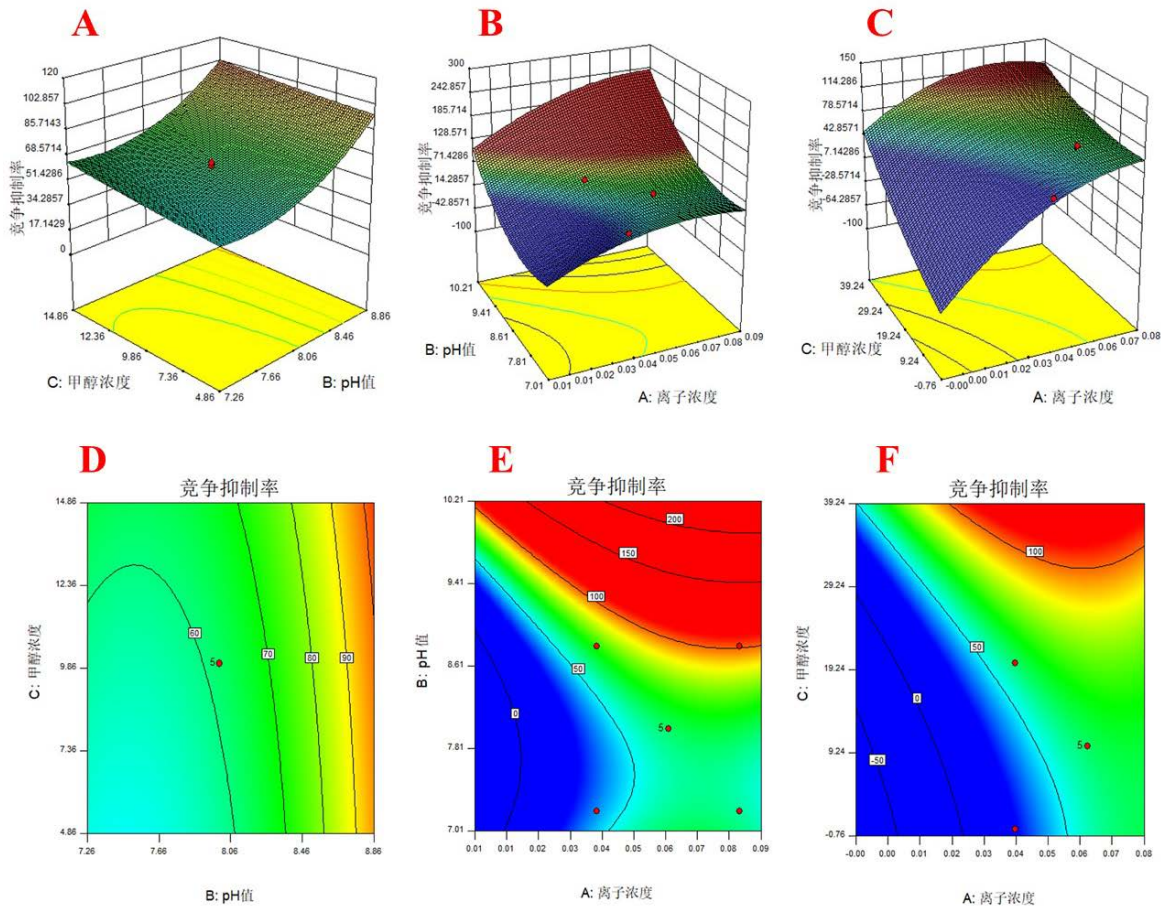


图 2.2 各因素间交互作用的响应面及等高线图

Fig. 2.2 Response surface and contour plot of interaction between various factors

图 2.2A、2.2B、2.2C 为各个因素之间交互作用的响应面三维曲线图,它能直观地反应各个试验因素的交互作用。图 2.2A 的响应面较平缓,说明 BC 因素间交互作用对竞争抑制反应率的影响较小;而图 2.2B、2.2C 的响应面较为陡峭,则表明 AB、AC 因素间的交互作用对竞争抑制率的影响较大。图 2.2D、2.2E、2.2F 为各个因素之间交互作用的响应面等高线图,它可以客观反映各因素的交互作用及其对响应值的影响。图 2.2D 接近圆形,表示 BC 因素间交互作用对竞争抑制率的影响不显著。与上述结论一致。

(3) 最佳工艺参数确定及验证

利用 Design Expert 10 软件对所得模型进行分析, 得到 icELISA 检测方法的最佳工作条件为: 离子浓度 0.04 M、pH 值 7.53、甲醇浓度 0, 此时的竞争抑制率为 25.06%。由于在实际检测工作中不可避免地会使用到甲醇, 考虑到实际工作参数的可操作性, 将最佳工作条件修正为: 离子浓度 0.04 M、pH 值 7.89、甲醇浓度 2.9%, 该条件下得到的竞争抑制率为 30.87%。在修正后的工作条件下, 进行 3 次平行试验, 并测定其与阴性、空白溶液的吸光度值, 测得竞争抑制率分别为 31.58%、30.05%、29.89%, 平均值为 30.51%, 与预测值接近。这说明通过该响应面法建立的模型是合理的, 得到的 icELISA 检测方法稳定可靠、重复性好, 可应用于样品检测工作。

2.4.5 OPs 的 icELISA 检测

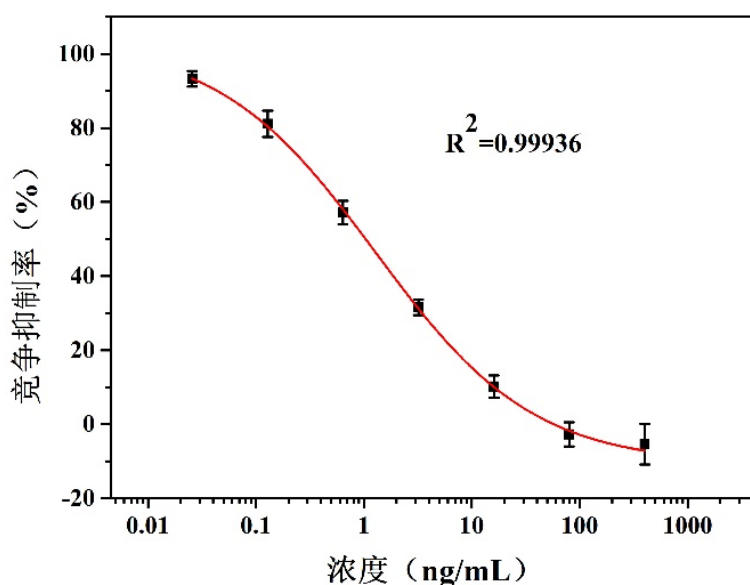


图 2.3 用于 OPs 检测的竞争抑制曲线

Fig. 2.3 Competitive inhibition curve of the OPs

在最佳工作条件下, 对 OPs 浓度 (C) 的对数与相应的竞争抑制率 (y) 的关系进行了研究。本实验使用对硫磷、蝇毒磷、啶硫磷、甲基对硫磷的标准溶液进行等量混合, 得到混合标准溶液。将 1000 ng/mL 作为初始浓度, 5 倍比稀释 7 个浓度, 得到系列梯度浓度的 OPs 混合溶液。将上述溶液与阴性溶液、空白溶液一同进行 icELISA 检测, 测定相应的吸光度值。按照公式 (2.1) 分别计算竞争抑制率, 如图 2.3, 该检测方法的竞争抑制曲线方程为 $y = -10.79797 + 114.31452 / [1 + (\lg C / 1.28729)]^{0.59426}$, 线性相关系数 $R^2 = 0.99936$ 。以该曲线的 IC_{50} 值 (1.28 ng/mL) 作为该方法的灵敏度, LOD 为 0.12 ng/mL。

随着目标浓度的增加,更多的抗体因识别了 OPs 分子而无法与孔壁上的抗原结合,使得反应到最后的吸光度值减小,进而竞争抑制率呈现下降趋势。

与其他类型 ELISA 检测方法的检测性能进行比较(如表 2.7)。对比结果表明,本研究提出的 icELISA 检测方法可识别的目标范围较广,LOD 较低。

表 2.7 与其他类型 ELISA 的比较

Tab. 2.7 Comparison with other types of ELISA

检测方法	识别范围	目标物	LOD (ng/mL)	参考文献
icELISA	广谱性	醚型菊酯类农药	3160	[49]
icELISA	广谱性	有机磷农药	20	[72]
dcELISA	广谱性	有机磷农药	≤1	[60]
dcTRFIA	广谱性	有机磷农药	≤10	[60]
icELISA	广谱性	有机磷农药	0.12	本研究

2.4.6 OPs 的特异性测试

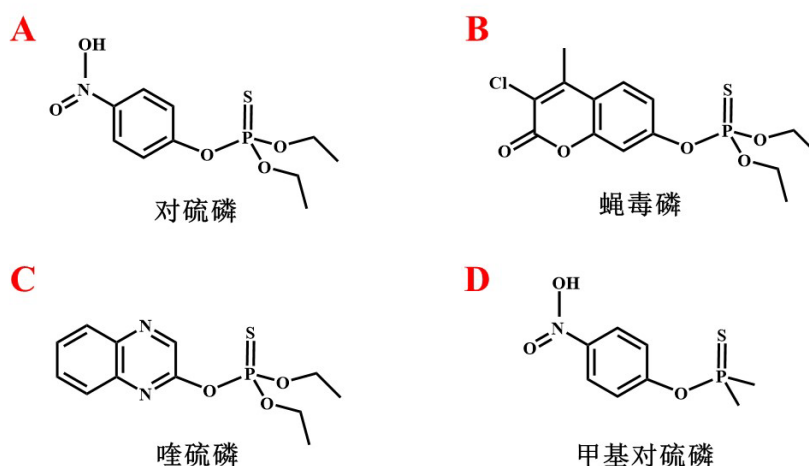


图 2.4 不同 OPs 的化学结构式

Fig. 2.4 Chemical structure formula of different OPs

本 icELISA 检测方法使用 Abs 作为关键识别元件,识别对象为 OPs 的共同结构,因此针对不同的 OPs 其灵敏度略有不同。这与农药分子的结构有着密切的关系。如图 2.4 所示,不同 OPs 有其共同结构,也有不同之处。由此可知我们利用不同种类的 OPs 对本 icELISA 方法的特异性进行了验证。图 2.5 为部分 OPs 检测的竞争抑制曲线,其中,对硫磷、蝇毒磷、啶硫磷、甲基对硫磷四种有机磷农药的检测灵敏度分别为: 0.72、3.39、

4.62、4.88 ng/mL。由此可知, 该 Abs 的主要识别结构为对硫磷; 蝇毒磷的结构与对硫磷结构较为接近, 在其他结构的干扰下, 抗体识别能力下降, 但灵敏度仍比啶硫磷和甲基对硫磷高; 啶硫磷分子的结构在对硫磷结构的中间多了氮元素, 这以结构变化使得抗体识别的能力有所下降, 进而导致灵敏度升高; 甲基对硫磷虽与对硫磷最为相似, 但由于乙基的缺失, 导致灵敏度明显升高。由以上可初步判断, 对 Abs 而言, 乙基和苯环都是决定抗体识别能力的重要官能团结构, 并且乙基的决定性高于苯环。综合以上, 本实验所用 Abs 对不同种类 OPs 的识别灵敏度差异较小, 可满足大量样本的初步筛选工作。

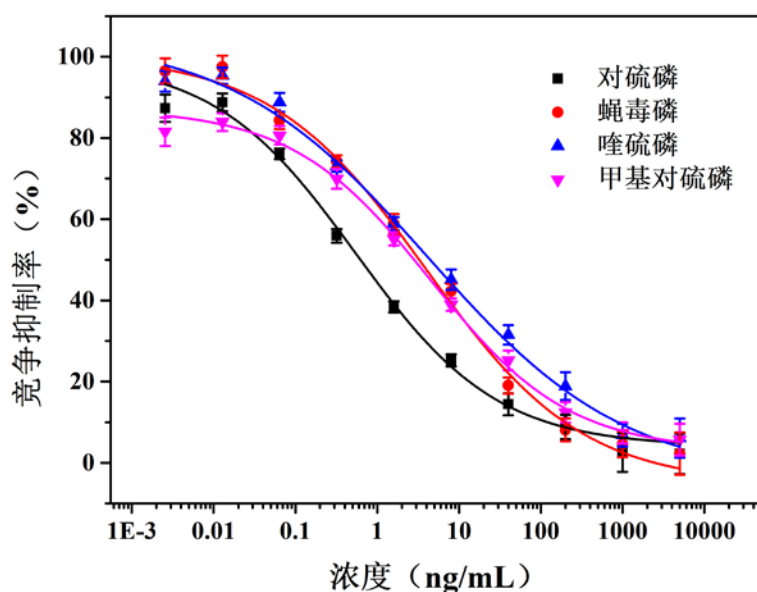


图 2.5 用于 OPs 检测的竞争抑制曲线

Fig. 2.5 Competitive inhibition curve of the OPs

2.5 本章小结

在本章节中, 以 Abs 作为核心识别元件, 对 icELISA 检测方法的工作条件进行探究, 得到 OPs-BSA 和 Abs 的最佳工作浓度组合为: OPs-BSA 浓度 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、Abs 稀释倍数 16,000。在单因素试验的基础上, 利用响应面法进行了优化试验。并结合实际检测工作, 将最佳工作参数修正为: 离子浓度 0.04 M、pH 值 7.89、甲醇浓度 2.9%, 该条件下得到的竞争抑制率最低, 为 30.87%。在最佳工作条件下, 对 OPs 进行加标测试, 测得的竞争抑制率及其平均值均与预测值较为接近。这说明通过该响应面法建立的模型是合理的, 据该模型得到的 icELISA 检测方法较为稳定可靠、重复性较好。同时, 建立了适用于该方法的工作竞争抑制曲线, 灵敏度为 1.28 ng/mL, LOD 为 0.12 ng/mL, 线性回

归系数为 0.99936。在对该检测方法特异性的验证中发现,所使用的 Abs 对不同种类的 OPs 的识别灵敏度差异较小,故可考虑以本方法为原理构建快速检测试剂盒,应用于实验室条件下的大量样本中 OPs 初步筛选检测工作,为后续大型仪器检测提供范围和数据参考基础。

第三章 基于一步电沉积的电化学免疫传感器的制备

3.1 引言

在化学免疫传感器的应用中,抗体通常附着在特定纳米材料修饰的电极表面^[73],通过抗体对靶标的特异性识别,捕获靶标并连接到电极表面。在基于竞争免疫分析模型的电化学免疫传感器的构建中,检测到的信号随着靶标浓度的增加而降低,并表现出信号闭合的趋势^[74, 75]。在这种情况下,电化学信号的放大就显得尤为重要。研究人员通常使用高亲和力抗体和适当的标记物偶联来放大电化学信号^[76-78]。纳米金颗粒(AuNPs)是一种性能优异的纳米材料,它具有高导电性和生物相容性^[79]等优良特性,可为电化学免疫传感器中的抗体提供理想的活性结合位点^[39, 80, 81]。Shaikh 等^[82]制备了纳米材料标记的抗体探针,然后通过介质电泳将纳米探针电沉积在电极表面,所制备的免疫传感器已成功应用于实际临床检测中。普鲁士蓝(Prussian-blue, PB)具有良好的氧化还原性能,是制造电化学免疫传感器中应用最广泛的化合物之一。Haji-Hashemi 等^[83]在玻碳电极表面连续电沉积 PB 和 AuNPs,有效地提高了 PB 作为电子介质的稳定性和电活性。电沉积方法操作简单,可以使纳米材料在电极表面分散更加均匀分散^[84],构建更加稳定的电化学传感平台^[85]。该方法在临床医学中经常用于肿瘤标志物的检测,但在农药残留检测中的报道较少。

本研究以较为简单的制备工艺构建一种能够识别多种 OPs 的免疫传感器。采用能够有效识别大部分 OPs 的 Abs 作为敏感识别元件。通过将 Abs 与 AuNPs 偶联,制备金标探针(AuNP-Abs),将 AuNP-Abs 与 PB 按照一定剂量制备电沉积液。通过一步电沉积操作,在丝网印刷碳电极(Screen printed carbon electrode, SPCE)电极表面制备 AuNP-Abs-PB 复合膜。通过监测电极表面电化学行为的变化,探究关于 OPs 的定量检测。对该免疫传感器的构建和工作条件进行了优化实验。在最佳实验条件下对其性能进行了探究,并应用于实际蔬菜样品的检测中。

3.2 材料与方法

3.2.1 主要仪器及耗材

本实验中所用的超纯水均由 PALL 超纯水净化系统制备;利用扫描电子显微镜(Scanning electron microscope, SEM)对电极表面形貌进行表征;所有电化学测试过程均在 CHI 660D 电化学工作站上完成;SPCE 的工作电极和对电极均为碳,参比电极为 Ag/AgCl;超声机和离心分离机用于金标探针的制备和重悬洗涤。另外,在本实验中还使用了 pH 计、电热鼓风干燥机等仪器。本实验所用主要仪器如表 3.1 所示。

表 3.1 主要仪器及耗材

Tab. 3.1 Main instruments and consumables

名称	型号	厂家
超纯水系统	LS MK2	美国 PALL 公司
扫描电子显微镜	S-3000N	日本 Hitachi 公司
电化学工作站	CHI 660D	上海辰华仪器有限公司
丝网印刷碳电极 (SPCE)	TE100, 3.0 mm	台湾禅谱科技股份有限公司
超声机	SK3300H	上海科导超声仪器有限公司
离心分离机	TGL-20B	上海安亭科学仪器厂
pH 计	FE20K	上海智光仪器仪表有限公司
电热鼓风干燥箱	DHG-9070A	上海一恒科技有限公司
移液枪	1~5,000 μL	德国 Eppendorf 公司

3.2.2 主要试剂及溶液配制

(1) 主要试剂

表 3.2 主要试剂

Tab. 3.2 Main reagents

名称	规格	厂家
有机磷农药广谱性抗体 (Abs)	1 mg/mL	北京博奥龙免疫技术有限公司
壳聚糖 (CS)	分析纯	美国 Sigma 试剂有限公司
牛血清蛋白 (BSA)	分析纯	美国 Sigma 试剂有限公司
农药标准品	1 mg/mL	上海农药研究所有限公司
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	分析纯	国药化学试剂有限公司
HAuCl_4	分析纯	国药化学试剂有限公司
K_2CO_3	分析纯	国药化学试剂有限公司
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	分析纯	国药化学试剂有限公司
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	分析纯	国药化学试剂有限公司
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	分析纯	国药化学试剂有限公司

本实验采用 Abs 作为构建电化学免疫传感器的关键敏感识别元件； $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 用以还原 HAuCl_4 以获得纳米金； K_2CO_3 用于构建碱性环境以利于抗体与纳米金偶联形成探针；BSA 在探针偶联过程中用以封闭非特异性识别位点；将铁氰化

钾、亚铁氰化钾溶解于 CS 中以制备分散性较好的 PB 溶液。用于加标测试的农药标准品种类有对硫磷、蝇毒磷、啉硫磷、甲基对硫磷、水胺硫磷、克百威、溴氰菊酯等。本实验中使用的化学试剂均为分析纯。本实验所用的主要试剂如表 3.2 所示。

(2) 主要溶液配制

①氯金酸溶液 (1%, m/v) : 将 1.0 g $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 用超纯水溶解并定容至 100 mL, 经 0.22 μm 有机系滤膜过滤后, 避光密封, 于 4°C 下保存待用。

②柠檬酸溶液 (1%, m/v) : 称取 1.0 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 经超纯水溶解并定容至 100 mL, 经 0.22 μm 有机系滤膜过滤后待用。

③ K_2CO_3 溶液 (0.1 M) : 称取 1.38 g K_2CO_3 经超纯水溶解并定容至 100 mL, 经 0.22 μm 有机系滤膜过滤后, 于 4°C 下保存待用。

④硼酸缓冲液 (2.0 mM) : 用超纯水将 0.1 g H_3BO_3 、2.0 g PEG20000 溶解并定容至 1 L, 经 0.22 μm 有机系滤膜过滤后, 于 4°C 下保存待用。

⑤BSA 溶液 (10%, m/v) : 用 4 mL 超纯水溶解 0.4 g BSA, 超声混匀, 使溶液充分溶解, 再使用 0.45 μm 有机系滤膜进行过滤, 于 4°C 下保存待用, 该试剂易变质, 需在 7 天内使用完毕。

⑥PBS 缓冲溶液 (0.01 M, pH 7.4) : 准确称取 0.60 g KCl、0.81 g KH_2PO_4 、24.00 g NaCl、4.26 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 用超纯水溶解, 并定容至 3 L, 室温放置待用。

⑦CS 溶液 (0.05%, m/v) : 将 0.05 g 的 CS 溶于 100 mL 的醋酸溶液 (1.0%, m/v) 中, 室温下磁力搅拌 3 h, 使其完全溶解。

⑧电化学测试底液 (5.0 mM 的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) : 称取 0.211195 g 亚铁氰化钾 ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$)、0.16625 g 铁氰化钾 ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)、0.7455 g 氯化钾 (KCl), 使用⑥中的 PBS 缓冲溶液定容至 100 mL。

3.3 实验方法

3.3.1 电沉积液的制备

(1) 合成纳米金 (AuNPs) 溶液

利用柠檬酸还原氯金酸的原理制备纳米金 (AuNPs) [86]。将实验中可能用到的玻璃容器全部提前置于王水 (硝酸与盐酸按照 1:3 的体积比混合配制) 中浸泡 24 h, 经超纯水冲洗 10 遍, 烘干待用。量取 200 mL 的超纯水, 加入 2 mL 氯金酸溶液, 轻摇溶液以混匀, 置于微波炉中, 调至高火档加热 4 min 至溶液沸腾。取出后平稳且快速地摇晃瓶身, 以使溶液受热均匀, 快速逐滴加入 4.8 mL 的柠檬酸溶液, 继续同一方向摇晃容器使溶液混合均匀。放回微波炉中, 调至中高火档继续加热 4 min。加热结束后此时的瓶内溶液呈现出酒红色。待溶液温度冷却到室温后, 再次加入超纯水, 定容至 200 mL, 即为纳米金溶液 (0.1 mg/mL)。整个操作过程中, 需要特别注意保持环境洁净, 防止灰尘等杂质落入

溶液，引起纳米金颗粒聚沉。

(2) 偶联金标探针 (AuNP-Abs)

将 18 μL 的 K_2CO_3 溶液加入到 1 mL 纳米金溶液中，以创造碱性环境，利于 AuNPs 与抗体结合^[87]。向其中逐滴加入 60 μL 的 Abs (0.1 mg/mL)，在室温下匀速摇床反应 30 min，使纳米金表面带负电荷的蛋白质与抗体表面带正电荷的蛋白质基团因静电吸附而形成牢固的键合^[88]。加入 119 μL BSA 溶液，持续振荡反应 30 min，以封闭多余抗体上的特异性识别位点以及纳米材料上的非特异性识别位点。在 4 $^\circ\text{C}$ 下孵育 2 h，以保证反应充分。待反应完全后，进行重悬，以洗涤掉过量、未与纳米金连接的抗体。以 12000 rpm 的速度在离心机中离心 30 min，弃去上清液。加入 100 μL 硼酸缓冲溶液，振荡至均匀。以上重悬操作重复 2 次，以保证洗涤充分。于 4 $^\circ\text{C}$ 下保存待用。

(3) 配置电沉积液

将 0.0625 g FeCl_3 、0.0822 g $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、0.7455 g KCl ，量取 1 mL 浓盐酸一同加入 100 mL CS 溶液中，在室温下超声以分散，直至得到溶液分散至均匀稳定且呈现暗绿色，即为 PB 溶液。将 1 mL AuNP-Abs 加入 PB 溶液中，在 4 $^\circ\text{C}$ 下超声分散 0.5 h 直至完全溶解，于 4 $^\circ\text{C}$ 下避光保存。

3.3.2 AuNP-Abs-PB/SPCE 免疫传感器的制备

采用电还原法制备免疫传感器。经电沉积处理后，在 SPCE 表面形成 AuNP-Abs-PB 复合膜。首先，将预处理后的 SPCE 浸入电沉积溶液中，采用循环伏安法在 -0.3~+0.3 V 的电位范围内（扫描速度为 100 mV/s）处理一定时间，得到 AuNP-Abs-PB/SPCE。然后用超纯水冲洗，氮气吹干，于 4 $^\circ\text{C}$ 密封保存，以备后续测试实验使用。图 3.1 是该免疫传感器的电沉积过程示意图和检测工作原理示意图。

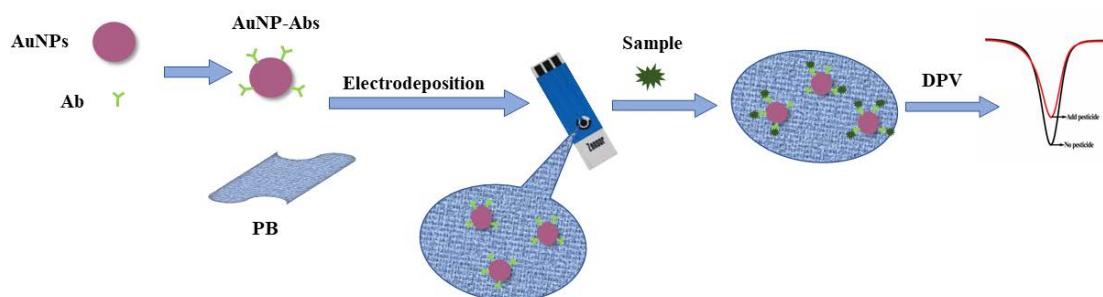


图 3.1 免疫传感器的电沉积过程及工作原理示意图

Fig. 3.1 Electrodeposition process and the detection principle of the immunosensor.

3.3.3 电化学测定方法

当检测到目标物质时，免疫传感器电极表面的电化学反应行为会随之发生相应变化。为了监测这一变化，在 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液中进行差分脉冲伏安法（DPV）扫描（电位范围-0.6~+0.6 V，电位增量 4 mV/s，振幅 100 mV）。并对得到的 DPV 电化学图谱进行分析和响应值数据提取。依据电沉积前后 SPCE 表面的电流变化（ $\Delta I'$ ）来评价该免疫传感器的电沉积效果，为方便讨论，定义公式形式如下：

$$\Delta I' = I_2 - I_1 \quad (3.1)$$

其中， $\Delta I'$ 为电沉积前后 SPCE 表面的电流变化值，A；

I_1 为空白 SPCE 表面的 DPV 响应值，A；

I_2 为 AuNP-Abs-PB/SPCE 表面的 DPV 响应值，A。

在最佳实验条件下，分析结合目标农药前后 SPCE 表面的电流变化（ ΔI ）与目标农药浓度（C）之间的关系，为方便讨论，定义公式形式如下：

$$\Delta I = I_3 - I_2 \quad (3.2)$$

其中， ΔI 为结合目标农药前后 SPCE 表面的电流变化，A；

I_2 为 AuNP-Abs-PB/SPCE 表面的 DPV 响应值，A；

I_3 为目标农药/AuNP-Abs-PB/SPCE 表面的 DPV 响应值，A。

3.3.4 样品预处理方法

从市场上购买小白菜和菠菜的样品，完全粉碎至匀浆。称取25.0 g的样品匀浆，加入80.0 mL甲醇-PBS（70%，v/v）。超声混匀2 min，经滤纸过滤后得到均匀的滤液，将滤液进行高速离心（10000 rpm, 5 min），提取得到的上清液即为样品溶液。将样品溶液与PBS缓冲溶液按1:6的体积比混合，混匀得到基质样品溶液，4℃避光储存，以供后续实验使用。

3.4 结果与讨论

3.4.1 AuNP-Abs-PB/SPCE 的表征

利用扫描电子显微镜（SEM）对电沉积后的 SPCE 电极的表面进行了形貌表征。如图 3.2A 所示，电极表面有明显的球形突起，这表明抗体与 AuNPs 成功偶联。同时，还利用 SEM 对电极表面进行了元素分析。从图 3.2B 和图 3.2C 可以看出，Fe 和 N 元素均匀分布在电极表面表面，说明 PB 和 AuNPs 已经成功电沉积在电极表面。此外，用 CV 表征了电极表面电沉积的不同复合材料的电化学反应行为(图 3.2D)。与裸 SPCE(图 3.2D-a)相比，经过电沉积后的电极表面(图 3.2D-b)具有更高的电流峰值，说明电极表面上被成功地修饰了 PB。当 PB 和 AuNPs 同时沉积在电极上时(图 3.2D-c)，得到的 PB-AuNPs/SPCE 图谱的电流峰值有所提高，说明 AuNPs 在电极表面的修饰是成功的。

当在电沉积溶液中加入金标探针后(图 3.2D-d)，由于携带负电荷的 Abs 数量的增加而导致电子转移电阻的增大，从而引起了氧化还原峰值的明显降低。上述结果可表明，电沉积是制备电化学免疫传感器的一种可行且有效的方法。

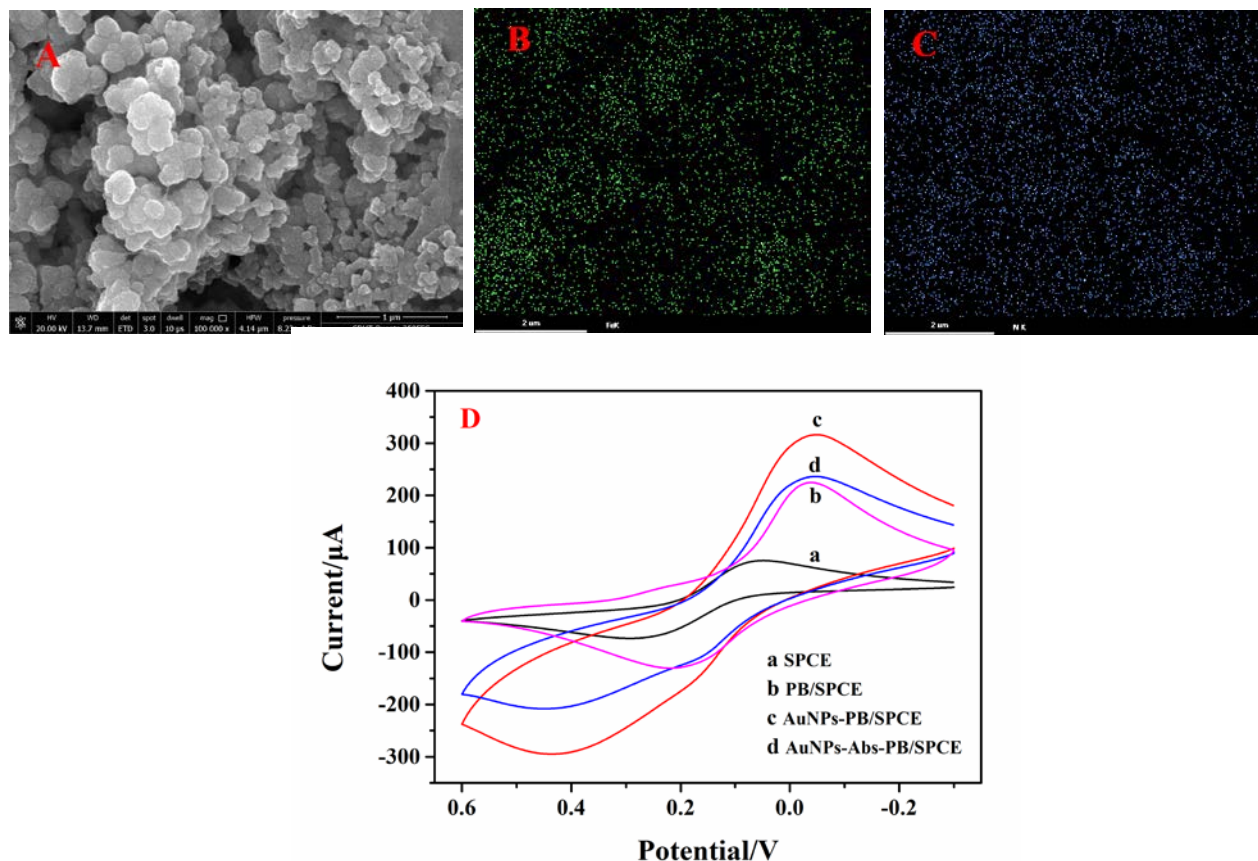


图 3.2 (A) AuNP-Abs-PB/SPCE 的 SEM 图像；(B) Fe 的元素分析；(C) N 的元素分析；(D) AuNP-Abs-PB/SPCE 的 CV 图像

Fig. 3.2 (A) SEM image of AuNP-Abs-PB/SPCE; (B) the element analysis of Fe; (C) the element analysis of N; (D) CV image of AuNP-Abs-PB/SPCE

3.4.2 免疫传感器的工作条件优化

抗体与 AuNPs 的偶联比是影响免疫传感器检测效率的重要因素。添加更多的抗体可以提高检测的灵敏度，但随之而来的是检测成本的增加。同时，偶联过多的抗体会导致 AuNP-Abs 导电能力的下降。在本研究中，我们尝试将不同剂量的抗体与 AuNPs 偶联，以探究抗体剂量对电沉积复合膜的电导率的影响。向等量 (1 mL) 的 AuNPs 溶液中分别加入不同剂量 (1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 μg) 的抗体。利用 DPV 研究了电沉积前后的电极表面转移 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 能力的变化。从图 3.3A 可以看出，当抗体剂量为 3 μg 时， ΔI 相对较大。最重要的是，此时 ΔI 的平行试验结果之间的平均偏差最小，表明用这种电沉积溶液制备的免疫传感器具有最好的稳定性。因此，选择“3 μg”

作为最佳抗体添加剂量。

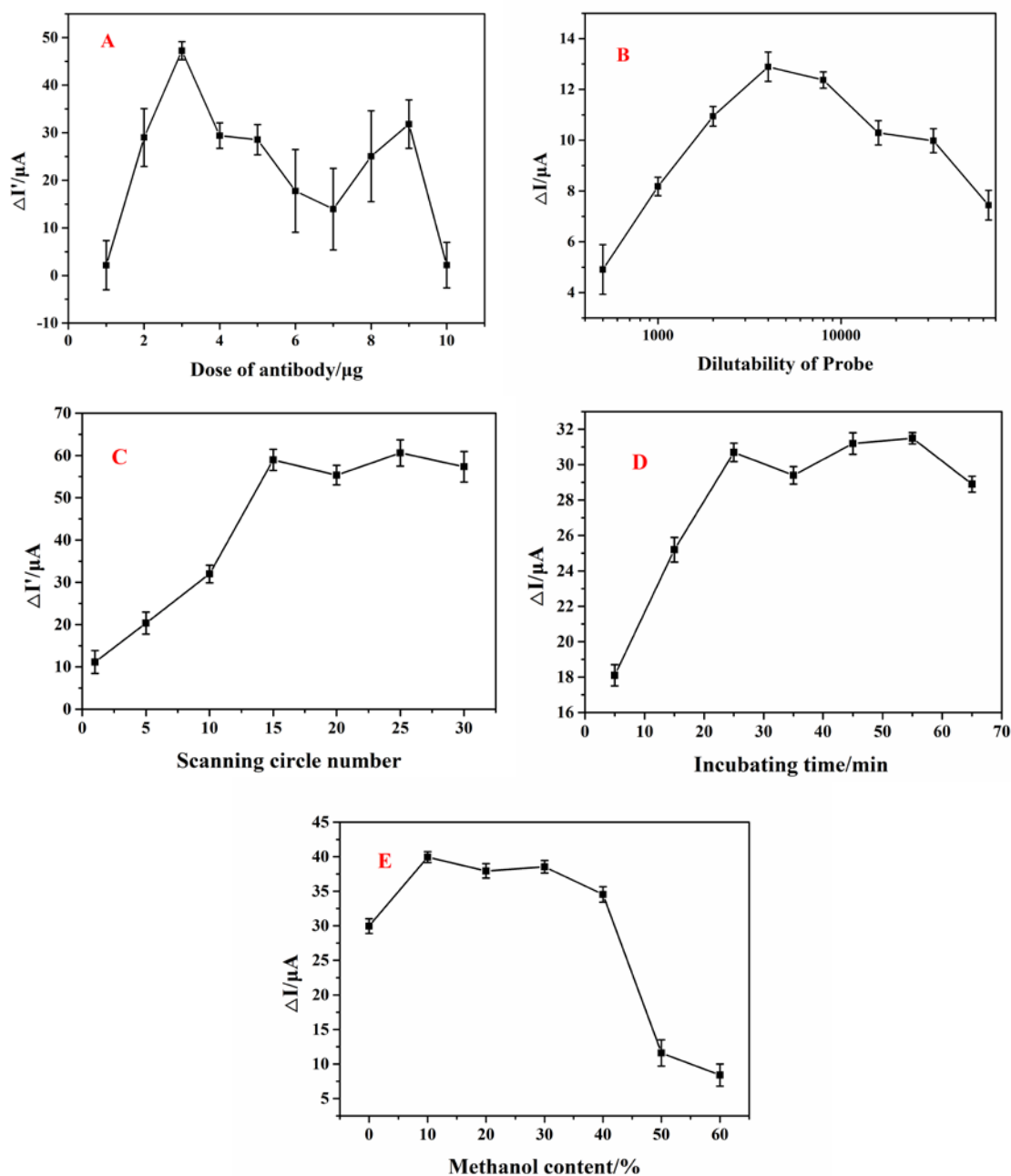


图 3.3 实验条件优化：(A) 抗体剂量；(B) 探针稀释倍数；(C) 循环次数；(D) 孵育时间；(E) 甲醇浓度

Fig. 3.3 Optimizing the experimental conditions: (A) Dose of antibody; (B) Dilutability of Probe; (C) Scanning circle number; (D) Incubation time; (E) Methanol content

如图 3.3B 所示，我们探究了以 AuNP-Abs 的稀释倍数 (PBS: AuNP-Abs, v/v) 对免疫传感器性能的影响。通过实验发现，随着 AuNP-Abs 稀释倍数的增加 (即 AuNP-Abs

数量的减少), ΔI 值随之升高。过多的 AuNP-Abs 可能导致了它们分子之间的杂化, 降低其数量则能够增加 AuNP-Abs 在电极上的有效固定量, 使得电极表面能捕获目标物质的量增加, 即 ΔI 值变大。但随着 AuNP-Abs 稀释倍数的进一步增加, ΔI 值呈现下降趋势。这显然是由于有特异性识别位点的减少而引起免疫传感器的识别能力降低。因此, 在制备免疫传感器时, AuNP-Abs 的稀释倍数宜设置为 4,000 倍。

电沉积膜的厚度能够直接影响免疫传感器的信号放大能力, 通过控制电沉积的时间可以实现对电沉积膜厚度的控制。本部分则通过设置不同的 CV 循环次数, 来实现在免疫传感器制备的过程中对电沉积时间的控制。并测量 ΔI 值, 以探究电沉积时间对免疫传感器导电能力的影响。随着 CV 循环次数的逐渐增加, 该免疫传感器电极表面的 ΔI 值逐渐增大, 如图 3.3C 所示。当 CV 循环次数达到“第 15 个”时, 电极表面的 ΔI 值达到最大。随着电沉积时间的延长, ΔI 值基本保持不变, 这表明在电极表面的电沉积量已经达到最大。因此, 以“15 个循环”作为该免疫传感器的最佳电沉积时间。

当靶标分子(即 OPs)存在时, 在 Abs 的特异性识别下, 电极表面形成了有机磷农药-广谱性抗体(OPs-Abs)复合物, 这一过程会阻碍电极表面的电子转移过程, 进而导致相应电流峰值的降低^[89, 90]。孵育时间(即目标物质和抗体之间的特异性结合时间)与该复合物的形成数量密切相关, 影响着免疫传感器的性能。如图 3.3D 所示, 随着孵育时间的延长, 在电极表面处捕获了越来越多的 OPs 分子, 从而形成了越来越多的 OPs-Abs 复合物, 这会导致电极表面的电子转移过程严重受阻, 使得 ΔI 值升高。当达到一个临界点(25 min), SPCE 表面的 Abs 的可结合位点数量达到饱和, 无法继续特异性识别 OPs。在此之后, 即便孵育时间进一步延长, ΔI 值也不会发生明显变化。因此, 选择“25 min”作为该传感器在样品溶液中最佳孵育时间。

因为农药可溶于有机溶剂, 在样品处理过程中, 甲醇常被用作提取溶剂。若基质溶液中甲醇浓度过低, 无法有效地提取到样品中的农药成分; 但由于抗体是一类具有生物活性的敏感识别元件, 过高的甲醇浓度则会影响其生物活性, 降低识别能力^[91]。因此, 本实验研究了样品溶液中甲醇浓度的适宜范围(图 3.3E)。实验发现, 当甲醇浓度在 10%~40% 范围内时, 能够较好地同时兼顾样品的有效提取和抗体的最佳活性。因此, 适宜该免疫传感器工作的甲醇浓度范围为 10%~40%。

3.4.3 OPs 的电化学检测

在最佳实验条件下, 对 OPs 浓度(C)与相应电化学信号变化值(ΔI)的关系进行了研究。本实验使用对硫磷、蝇毒磷、啶硫磷、甲基对硫磷的标准溶液进行等量混合, 得到混合标准溶液。将该免疫传感器与不同浓度(10^{-5} ~ 10^4 ng/mL)的混合标准溶液进行孵育, 测量相应的 ΔI 值, 得到竞争抑制曲线(图 3.4A)。该曲线的方程为 $\Delta I = 106.99121 - 99.63115 / [1 + (\text{Lg}C / 2.45007)]^{0.19247}$, R^2 为 0.9856, 灵敏度为 2.45 ng/mL, 检测范围(IC₂₀~IC₈₀)为 1.82×10^{-3} ~ 3.29×10^4 ng/mL。随着目标农药分子浓度的增加, 使得

电极表面附着的OPs-Abs复合物越来越多，电极表面的电子转移过程受到严重阻碍，显著增加了电极表面的阻抗，进而使得 ΔI 增大。由于在竞争抑制曲线的两端位置易出现“假阳性”或“假阴性”的情况，我们选择在检测范围内探究 OPs 浓度 (C) 的对数与 ΔI 的线性关系 (图 3.4B)，得到线性方程为 $\Delta I=53.59096+10.31913\lg C$ ， R^2 为 0.9918。根据 $S/N=3$ 计算，可得该免疫传感器的 LOD 为 0.003 ng/mL。

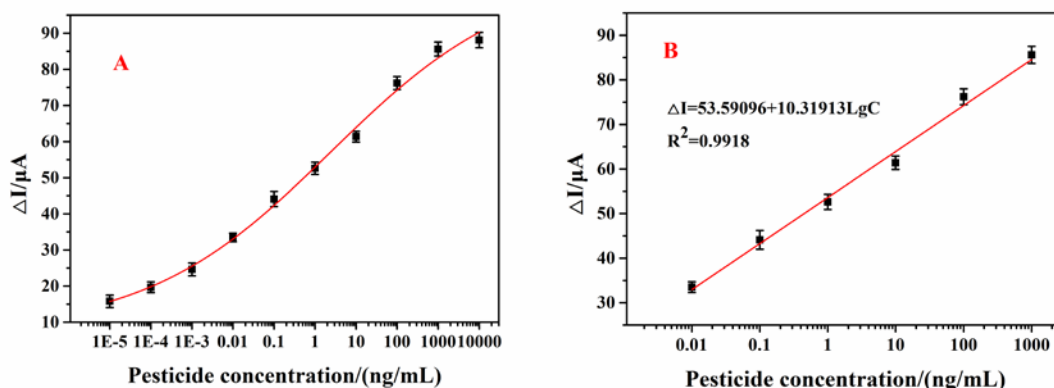


图 3.4 用于 OPs 检测的 (A) 竞争抑制曲线及 (B) 标准工作曲线

Fig. 3.4 (A) Competitive inhibition curve and (B) standard curve of the OPs

与其他类型的传感器（如无标记传感器、适配体传感器、酶传感器）的性能进行比较（如表 3.3）。对比结果表明，本研究提出的电化学免疫传感器制备步骤简单，可检出的目标物种类较多，检测范围较广。

表 3.3 与其他类型电化学传感器的比较

Tab. 3.3 Comparison with other types of electrochemical sensors

传感器构成	修饰方式	目标物	检测范围 (ng/mL)	参考文献
CuO-TiO ₂ /GCE	直接滴加	甲基对硫磷	0~2×10 ³	[92]
AChE/Ce/UiO-66@MWCNTs/GCE	逐层滴加	对硫磷	2.6~3.9×10 ⁴	[93]
Chl-Ab/AuNPs/FTO	逐层滴加	毒死蜱	3.50×10 ⁻¹ ~3.29×10 ³	[44]
Aptamer-rGO-CuNPs/SPCE	电沉积	丙溴磷	3.73~3.73×10 ⁴	[94]
		甲拌磷	2.64~2.64×10 ⁴	
		水胺硫磷	2.89×10~2.89×10 ⁴	
		氧化乐果	2.13×10 ² ~1.07×10 ⁵	
AuNP-Abs-PB/SPCE	电沉积	OPs (对硫磷、蝇毒磷、啶硫磷、甲基对硫磷等)	1.82×10 ⁻³ ~3.29×10 ⁴	本研究

3.4.4 免疫传感器的性能测试

特异性和抗干扰能力是评价一个免疫传感器能否有效应用于实际检测工作的重要指标。将该免疫传感器分别与不同 OPs 的目标物质或其他类农药的干扰物质进行孵育，通过监测孵育前后 SPCE 表面 ΔI 值变化，探究、鉴定该免疫传感器的特异性和抗干扰能力。选择氨基甲酸酯类农药——克百威（图 3.5-a）和拟除虫菊酯类农药——溴氰菊酯（图 3.5-b）作为干扰农药；图 3.5-c 为水胺硫磷，它是一种 OPs，但没有包含在混合标准溶液中；图 3.5-d 为混合标准溶液（对硫磷、蝇毒磷、啶硫磷、甲基对硫磷）；图 3.5-e 为 OPs（对硫磷、蝇毒磷、啶硫磷、甲基对硫磷）和非 OPs（克百威、溴氰菊酯）的混合。从图 3.5 中可以看出，在没有特异性靶点的情况下 ΔI 值非常小，说明抗体很难与这些干扰农药分子结合。而图 3.5-c、3.5-d、3.5-e 的 ΔI 值均较大，且结果数值接近，说明该免疫传感器具有良好的特异性和一定的抗干扰能力。

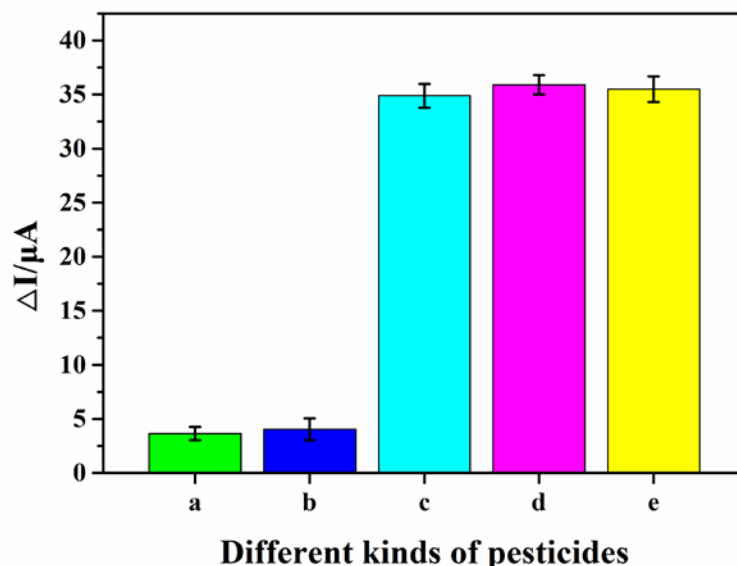


图 3.5 免疫传感器的性能评价 (a-克百威; b-溴氰菊酯; c-水胺硫磷; d-对硫磷、蝇毒磷、啶硫磷、甲基对硫磷; e-对硫磷、蝇毒磷、啶硫磷、甲基对硫磷、克百威、溴氰菊酯)

Fig. 3.5 Performance evaluation of the immunosensor(a-carbocarbonylate; b-deltamethrin; c-isocarbophos; d-parathion, coumaphos, quintiofos, methyl parathion; e-parathion, coumaphos, quintiofos, methyl parathion, carbocarbonylate, deltamethrin)

同时，我们考察了该免疫传感器的稳定性。将制备完成的免疫传感器于 4°C 密封保存，分别于第 1、3、7 天进行检测，其产生的电化学信号为刚制备完成时的电化学信号的 94.39%~113.62%。这表明该免疫传感器具有良好的稳定性。

3.4.5 蔬菜样品中 OPs 的检测

我们从市场购买了娃娃菜和菠菜作为样品代表，按照 3.3.4 制备基质样品溶液用于

实际样品实验,以评价本研究构建的免疫传感器在实际样品检测工作中的应用效果。我们采用标准加入法,将不同体积的混合标准溶液加入无基质样品溶液(即10%甲醇-PBS)和两种不同蔬菜基质样品溶液中,最终使得每组样品溶液都分别配制成3种不同浓度(0、100、1,000 ng/mL)。利用本研究构建的免疫传感器对样品溶液进行浓度检测和回收率分析。实验分组及结果见表3.4。其中,以10%甲醇-PBS配制的加标无基质样品溶液进行检测,回收率为99.57%~100.46%,相对标准偏差(RSD)为1.24%~9.33%。用蔬菜样品溶液配制的加标基质样品溶液进行检测,回收率为98.05%~102.05%,RSD为1.35%~16.54%。整体来看,该免疫传感器的回收率较高,RSD较低。因此,本研究构建的电化学免疫传感器可以有效地应用于蔬菜样品的检测。

表3.4 免疫传感器的样品回收率(n=3)

Tab. 3.4 Recovery of the immunosensor in samples (n=3)

样品	加标量 (ng/mL)	检测量 (ng/mL)	RSD (%)	回收率 (%)
10% 甲醇-PBS	0	0	0	-
	100	99.57	1.24	99.57
	1,000	1,004.59	9.33	100.46
娃娃菜	0	0	0	-
	100	102.05	1.35	102.05
	1,000	980.48	13.33	98.05
菠菜	0	0	0	-
	100	100.91	1.96	100.91
	1,000	1,011.84	16.54	101.18

3.5 本章小结

综上,我们利用电沉积技术制备了一种新型电化学免疫传感器,并将其应用于OPs的检测。首先,将AuNPs与Abs结合形成AuNP-Abs。然后,通过一步电沉积的方法在SPCE表面修饰AuNP-Abs/PB复合膜。这一步骤有效地简化了免疫传感器的制备过程,并且提高了抗体的固定效果,增强了免疫传感器的稳定性。在最佳实验条件下,OPs的浓度与其相应的电化学响应之间具有良好的线性关系,线性相关系数为0.9918,LOD可达到0.003 ng/mL。该免疫传感器的检测范围较广($1.82 \times 10^{-3} \sim 3.29 \times 10^4$ ng/mL),灵敏度较高(2.45 ng/mL),具有良好的特异性和稳定性。此外,该免疫传感器在加标样品回收率实验中表现出了较为满意的回收率。本工作可满足实验室条件下的OPs的快速微量检测需求,组装好的电极在搭配相应的便携快速检测仪器后即可应用于现场检测。

第四章 基于二抗标记法的信号放大型时间分辨荧光免疫层析 纸基传感器的构建

4.1 引言

近年来,时间分辨荧光免疫层析(Time-resolved fluorescence immunochromatography, TRFIA)纸基传感器作为一种操作简单、成本较低的现场检测技术受到了研究者的广泛关注^[95]。“时间分辨”是指通过波长分辨和延时检测技术对待测物体的信号强度进行检测以实现定性和定量分析。TRFIA 纸基传感器是以铕(Eu)、钛(Ti)、钐(Sm)等镧系元素作为标记材料,以抗体、适配体等特异性生物材料为核心识别元件,在层析作用下,与固定在硝酸纤维素膜上的相应的靶标物质发生特异性结合免疫反应,而后监测标记材料的颜色或荧光信号强度^[96, 97]。它可以有效地减弱传统标记材料(如荧光染料、酶、纳米金)的存在背景干扰等缺点。大部分 TRFIA 纸基传感器在构建过程中常采用 Eu 元素,其在经过一定程度的螯合反应后,具有斯托克斯位移较长、荧光寿命较长和发射峰较窄等优势,甚至可以减少激发光的干扰^[98]。由该元素制备而成的氧化铕乳胶在紫外线灯(波长 365 nm)照射下能发出橙红色荧光^[99]。

传统的 TRFIA 纸基传感器是基于靶标抗体标记的。在实际检测工作中,过多的靶标抗体消耗量会增加 TRFIA 纸基传感器的制备成本,而过少的靶标抗体则会使得 TRFIA 纸基传感器的灵敏度下降甚至出现“假阴性”的情况。在靶标抗体检测能力一定且数量受限的情况下,若要提高 TRFIA 纸基传感器的灵敏度,可以采用二抗(如羊抗鼠抗体、兔抗羊抗体等)标记法以实现荧光信号的放大,最终达到灵敏度的大幅提高。在二抗标记法中,靶标抗体通过多个二抗间接与氧化铕乳胶相偶联,使整个检测系统中的单位抗体的荧光信号强度远高于传统方法^[100-102]。Marjan Majdinasab 等人^[101]曾利用二抗标记法成功地建立了检测赭曲霉毒素的方法,与传统抗体标记方法相比,该方法的 LOD 为 0.4 pg/mL,提高了 100 倍。二抗标记法一方面可以使靶标抗体消耗量下降,灵敏度提高;另一方面,二抗代替了靶标抗体参与复杂繁琐的偶联步骤,可最大程度地保护靶标抗体的生物活性和识别能力。

本研究以 OPs 作为目标物质,以 Abs 作为敏感识别元件,构建了基于二抗标记法的信号放大型 TRFIA 纸基传感器。首先,将 SaMIgG 与氧化铕乳胶微球通过键合偶联以制备时间分辨荧光探针(Eu-SaMIgGs)。而后 Abs 通过与 SaMIgG 特异性识别,实现其与氧化铕乳胶微球的间接连接,即制备了间接时间分辨荧光探针(Eu-SaMIgGs-Abs)。将 OPs-BSA、兔抗羊抗体(Rabbit anti-sheep antibodies, RaSIgG)依次固定到 NC 膜上。借助 365 nm 波长的紫外光源,可监测到 TRFIA 纸基传感器检测线处灰度值的变化,利用 ImageJ 软件分析后即可对目标物质进行定性判断或定量检测。此外,我们还对该 TRFIA

纸基传感器的构建和工作条件进行了优化,也对其性能进行了探究,并应用于实际蔬菜样品的检测中。

4.2 材料与方法

4.2.1 主要仪器及耗材

本实验中所用的超纯水均由 PALL 超纯水净化系统制备;在 Eu-SaMIgGs 偶联的过程中使用了高速冷冻离心机、超声机等仪器;利用酶标仪对 Eu-SaMIgGs 偶联过程进行表征;纸基传感器由硝酸纤维素(NC)膜、吸水垫、玻璃纤维素膜、底板四个部分组成;使用点膜喷金仪在组装好的纸基传感器上喷涂 T 线(测试线)、C 线(质控线);利用斩切机进行裁切。本实验中还使用了电热鼓风干燥箱、移液枪等仪器。本实验所用主要仪器如表 4.1 所示。

表 4.1 主要仪器及耗材
Tab. 4.1 Main instruments and consumables

名称	型号	厂家
超纯水系统	LS MK2	美国 PALL 公司
点膜喷金仪	XYZ3050	美国 Biodot 公司
斩切机	CM4000	美国 Biodot 公司
超声机	SK3300H	上海科导超声仪器有限公司
高速冷冻离心机	CF16RX	日本 Hitachi 公司
酶标仪	Varioskan LUX	美国 Seymour Fisher 公司
电热鼓风干燥箱	DHG-9070A	上海一恒科技有限公司
365 nm 紫外灯	ZF-1	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
数码单反相机	EOS 6D	佳能(中国)有限公司
移液枪	1~5000 μ L	德国 Eppendorf 公司
硝酸纤维素(NC)膜	HF135	美国 Millipore 公司
吸水垫	CFSP223000	美国 Millipore 公司
玻璃纤维素膜	GFCP2030	上海捷宁生物科技有限公司
底板	J-86	上海捷宁生物科技有限公司

4.2.2 主要试剂及溶液配制

(1) 主要试剂

本实验采用 Abs 作为构建 TRFIA 纸基传感器的关键敏感识别元件;以氧化铈乳胶

微球作为荧光标记材料，其表面的羧基基团通过 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（EDC）进行活化；利用 SaMIgG 将抗体与标记材料间接连接；在 TRFIA 纸基传感器上依次喷涂 OPs-BSA、RaSIgG 作为 T 线、C 线；用于加标测试的农药标准品种类有对硫磷、蝇毒磷、啶硫磷、甲基对硫磷、水胺硫磷、克百威、溴氰菊酯等。本实验中使用的化学试剂均为分析纯。本实验所用的主要试剂如表 4.2 所示。

表 4.2 主要试剂
Tab. 4.2 Main reagents

名称	规格	厂家
有机磷农药广谱性抗体 (Abs)	1 mg/mL	北京博奥龙免疫技术有限公司
羊抗鼠抗体 (SaMIgG)	1 mg/mL	北京博奥龙免疫技术有限公司
兔抗羊抗体 (RaSIgG)	1 mg/mL	北京博奥龙免疫技术有限公司
有机磷农药通用结构抗原 (OPs-BSA)	1 mg/mL	北京博奥龙免疫技术有限公司
牛血清蛋白 (BSA)	分析纯	美国 Sigma 试剂有限公司
鸡卵清蛋白 (OVA)	分析纯	美国 Sigma 试剂有限公司
1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC)	分析纯	美国 Sigma 试剂有限公司
农药标准品	1 mg/mL	上海农药研究所有限公司
氧化钨乳胶微球	200 nm	国药化学试剂有限公司
聚乙烯吡咯烷酮-K30 (PVP-K30)	分析纯	国药化学试剂有限公司
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	分析纯	国药化学试剂有限公司

(2) 主要溶液配制

①BSA溶液 (0.5%, m/v)：该试剂需现用现配，用10.0 mL超纯水将0.05 g BSA充分溶解，经0.22 μm有机系滤膜过滤后方可使用。

②硼酸缓冲液 (0.2 M, pH 8.18)：用超纯水将1.907 g Na₂B₄O₇定容至100.0 mL，记为A液；用超纯水将1.2368 g H₃BO₃定容至100.0 mL，记为B液。量取35.0 mL的A液与65.0 mL的B液混合，即得到100.0 mL的硼酸缓冲液。

③EDC溶液：该试剂需现用现配，将15.0 mg EDC加入到1.0 mL超纯水中，涡旋混匀，使其充分溶解，经0.22 μm有机系滤膜过滤后方可使用。

④荧光微球封闭液：该试剂需现用现配，量取10.0 mL②中的硼酸缓冲液，称取0.05 g OVA加入其中，涡旋混匀至充分溶解，经0.22 μm有机系滤膜过滤后方可使用。

⑤样品垫封闭液：准确称取0.3 g NaH₂PO₄·2H₂O、0.5 g OVA、1.0 g PVP-K30、2.9 g Na₂HPO₄·12H₂O、1.0 g Tween-20、0.25 g 乙二胺四乙酸 (EDTA)，将以上试剂置于同一烧杯中，并用超纯水定容至100.0 mL，经0.22 μm有机系滤膜过滤后，于4℃保存待用。

⑥样品缓释液：准确称取1 g蔗糖、0.5 g OVA、0.5 g PVP-K30、2.5 g Tween-20，用

超纯水将以上试剂溶解并定容至100.0 mL, 经0.22 μm 有机系滤膜过滤后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

⑦PBS缓冲溶液 (0.01 M, pH 7.4) : 准确称取0.60 g KCl、0.81 g KH_2PO_4 、24.00 g NaCl、4.26 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 用超纯水溶解, 并定容至3 L, 室温放置待用。

4.3 实验方法

4.3.1 Eu-SaMIgGs 的制备

用移液枪量取 50 μL 氧化铈乳胶微球, 加入到装有 200 μL 硼酸缓冲溶液的 2 mL 离心管中, 振荡混匀, 10 $^{\circ}\text{C}$ 下超声 10 min 使氧化铈乳胶微球得以均匀分散在硼酸缓冲溶液中。向其中加入 10 μL 的 EDC 溶液, 涡旋混匀 15 min 使氧化铈乳胶微球上的羧基基团得以充分活化。将混合后的溶液置于高速冷冻离心机中进行离心分离 (10 $^{\circ}\text{C}$, 13,300 rpm, 10 min)。由于离心产物极易复溶, 待离心结束后, 应迅速且平稳地取出离心管, 弃去含有过量 EDC 的上清液。加入 250 μL 荧光微球封闭液, 涡旋混匀, 10 $^{\circ}\text{C}$ 下超声 10 min 使分散均匀。加入一定剂量的 SaMIgG, 涡旋混匀后, 进行 12 h 的摇床反应 (20 $^{\circ}\text{C}$, 250 rpm) 以使 SaMIgG 的氨基基团与氧化铈乳胶微球表面的羧基基团得以充分结合形成酰胺键, 即制得 Eu-SaMIgGs。此时的溶液中可能含有部分未与氧化铈乳胶微球成功偶联的 SaMIgG。为保证后续 Eu-SaMIgGs-Abs 的顺利制备, 需进行重悬操作以清除溶液中未与氧化铈乳胶微球偶联的 SaMIgG。将离心管置于高速冷冻离心机中进行离心分离 (10 $^{\circ}\text{C}$, 13,300 rpm, 10 min)。待离心机停止转动后, 需迅速且平稳地取出离心管, 弃去上清液。再重复上述重悬操作 1 次, 以保证充分清除干净。再次加入 250 μL 荧光微球封闭液, 涡旋混匀, 10 $^{\circ}\text{C}$ 下超声 10 min。最后, 经 2 h 的摇床反应 (20 $^{\circ}\text{C}$, 250 rpm) 后, 使制得的 Eu-SaMIgGs 在溶液中均匀分散。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光密封保存。

4.3.2 TRFIA 纸基传感器的制备

首先, 如图 4.1 所示的位置, 将 NC 膜 (25 mm \times 300 mm) 组装到底板 (90 mm \times 300 mm) 上, 以备喷涂 OPs-BSA 和 RaSIgG。在开始划线喷涂前, 按照“先甲醇, 后超纯水”的顺序, 对点膜喷金仪上的毛细加样管道进行多次充分的清洗, 以防止管道堵塞。依次将含有一定浓度的 OPs-BSA、RaSIgG 溶液分别喷涂到 NC 膜区域的 T 线、C 线位置。平放置于烘箱中, 调节至 37 $^{\circ}\text{C}$, 烘干 2 h。同时, 将裁剪好的玻璃纤维素膜 (即样品垫, 20 mm \times 300 mm) 置于一洁净干燥试管中, 加入适量样品垫封闭液以完全没过样品垫, 浸泡 15 min 后取出, 平放于烘箱中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干 2 h。待干燥完全后, 按照图 4.1 所示, 将吸水垫 (45 mm \times 300 mm) 与样品垫组装到底板正面, 每两个相邻部分之间有 1~2 mm 的重叠且均保持 NC 膜在下。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 15~20 min, 待完全粘合牢固后, 用斩切机按照 3.8 mm/条的宽度进行裁切, 获得 TRFIA 纸基传感器成品, 组装结构图如图 4.1。用自封袋密封后, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存, 以备后续测试之用。

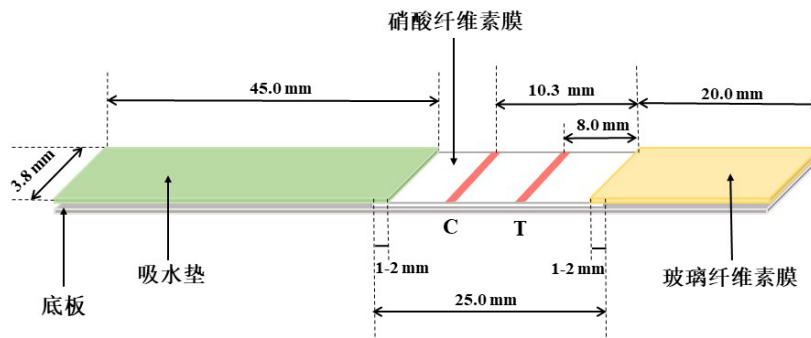


图 4.1 时间分辨荧光纸基传感器的组装结构图

Fig. 4.1 Time-resolved fluorescence paper-based sensor assembly structure diagram

4.3.3 TRFIA 纸基传感器的工作方法

(1) Eu-SaMIgGs-Abs 的制备

在检测工作开始前 30 min 内，制备 Eu-SaMIgGs-Abs。按照一定体积比例将样品缓释液和 Eu-SaMIgGs 充分混合，加入一定体积的 Abs 后在 37°C 下孵育 30 s，即制得 Eu-SaMIgGs-Abs。以上步骤需用现制备，不宜与检测步骤间隔太久，以免造成氧化铈乳胶微球的荧光信号发生部分淬灭，影响后续检测结果。

(2) TRFIA 纸基传感器的工作方法

向每个样品孔中预先加入 20 μL 的 Eu-SaMIgGs-Abs，再加入 100 μL 待检测样品溶液，并用移液枪反复吸打 2~3 次，使混合均匀。经过 3 min 的 37°C 避光孵育后，Eu-SaMIgGs-Abs 与 OPs 发生特异性结合，形成 Eu-SaMIgGs-Abs-OPs 复合物；未与 OPs 结合的 Eu-SaMIgGs-Abs 仍保持原结构。将 TRFIA 纸基传感器的样品垫一端平稳插入样品孔中，置于 37°C 环境下，避光孵育 15 min。在这一过程中需始终使 TRFIA 纸基传感器保持竖直状态，避免因层析面倾斜而导致层析速度有差异。在孵育过程中，样品孔内的溶液在层析作用下由样品垫一端向吸水垫一端层析展开。被固定在 T 线处的 OPs-BSA 可与 OPs 共同竞争 Abs 上的同一特异性结合位点；被固定在 C 线处的 RaSIgG 可以特异性识别 Eu-SaMIgGs-Abs 中的 SaMIgGs。如图 4.2 所示，在层析过程中，未与目标农药结合的 Eu-SaMIgGs-Abs 在 T 线、C 线处依次被 OPs-BSA 和 RaSIgG 捕获，条带处因探针聚集而显现颜色；而已与目标物质结合的则只在 C 线处被捕获，T 线不显现颜色。每次检测时，需设置空白对照组。

待反应完全后，取出 TRFIA 纸基传感器，包括空白对照组在内一同置于 365 nm 波长的紫外光源下，使用数码单反相机在暗箱中拍摄（曝光时间 4 s）荧光照片，利用 ImageJ 软件对检测条带区域进行框选，分析所得照片中检测区域的灰度值。为减少背景干扰，通过公式 (4.1) 得到每个待检样品的灰度值变化率 $G^{[83]}$ ：

$$G = \frac{G_0 - G_n}{G_0} \quad (4.1)$$

其中， G 为待检样品的灰度值变化率；

G_n 为待检样品溶液的 T 线条带灰度值；

G_0 为空白样品溶液的 T 线条带灰度值。

通过探究 T 线灰度值变化率 (G) 与 OPs 浓度 (C) 之间的关系，实现对 OPs 的定性及定量检测。

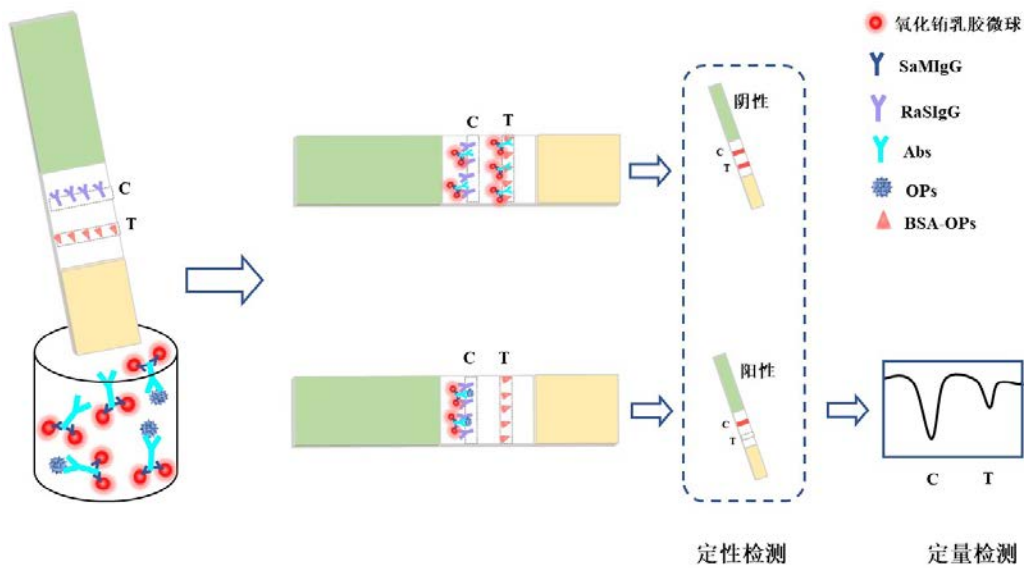


图 4.2 时间分辨荧光纸基传感器的工作及检测原理示意图

Fig. 4.2 Schematic diagram of the operation and detection principle of the time-resolved fluorescence paper-based sensor

4.3.4 样品预处理

(1) 蔬菜样品

蔬菜样品的预处理方法如3.3.4所述。

(2) 水样品

分别盛取自来水和湖泊水作为样品。各量取30 mL，分别加入70 mL甲醇，超声混匀2 min。经滤纸过滤后，将滤液进行高速离心（10000 rpm，5 min），提取到的上清液即为样品溶液。将所得样品溶液与PBS缓冲溶液按1:6的体积比混合，混匀得到基质样品溶液，4°C避光储存，以供后续实验使用。

4.4 结果与讨论

4.4.1 Eu-SaMIgGs 的表征

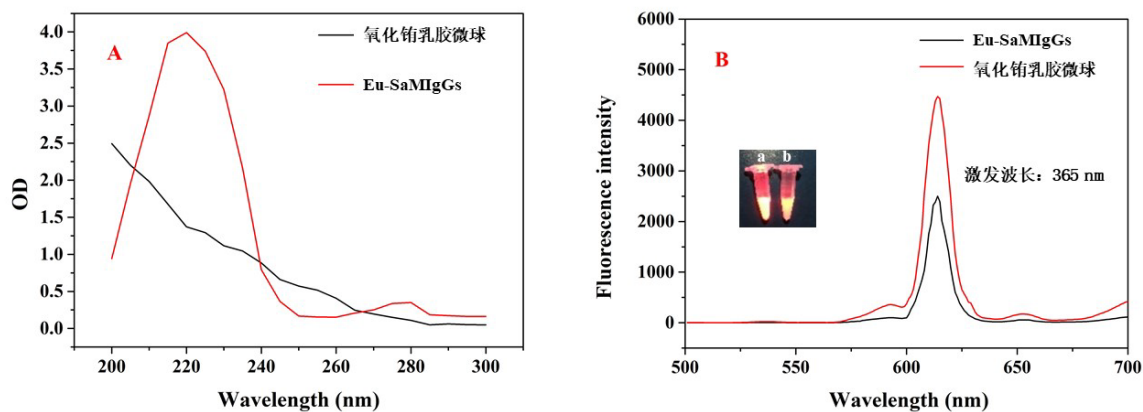


图 4.3 (A) 氧化铈乳胶微球偶联 SaMIgG 前后的紫外-可见吸收光谱; (B) 氧化铈乳胶微球与偶联 SaMIgG 前后的荧光光谱, 插图为氧化铈乳胶微球与 SaMIgG 结合之前 (a) 和之后 (b) 的实物图

Fig. 4.3 (A) Uv-vis absorption spectra of europium oxide latex microspheres before and after SaMIgG conjugation; (B) Fluorescence spectra of europium oxide latex microspheres before and after conjugation to SaMIgG; the illustration is a fluorescence picture of the europium oxide latex microspheres before (a) and after (b) the conjugation to SaMIgG

为了证明氧化铈乳胶微球与 SaMIgG 的成功偶联, 我们对空白氧化铈乳胶微球和 Eu-SaMIgGs 进行了紫外-可见光谱扫描 (图 4.3A)。在空白氧化铈乳胶微球的紫外光谱中未发现波峰, 而在 Eu-SaMIgGs 的紫外光谱中, 在 220 nm 和 260 nm 处附近出现了明显的波峰。以上结果表明, 氧化铈乳胶微球成功地与 SaMIgG 偶联, 形成了 Eu-SaMIgGs。此外, 我们还对与 SaMIgG 偶联前后的氧化铈乳胶微球进行了荧光光谱扫描 (图 4.3B), 发现最大发射峰均在 614 nm 处, 这说明确系氧化铈乳胶微球。但偶联了 SaMIgG 的氧化铈乳胶微球的波峰值较偶联前的略有下降, 如图 4.3B 所示。原因是氧化铈乳胶微球与 SaMIgG 偶联后形成了复合物, 导致部分荧光信号淬灭, 即荧光信号减弱。在图 4.3 的插图中, 则直观地呈现了氧化铈乳胶微球偶联 SaMIgG 之前 (图 4.3B-a) 和之后 (图 4.3B-b) 的荧光信号差异。

4.4.2 TRFIA 纸基传感器的工作条件优化

SaMIgG 是连接 Abs 与氧化铈乳胶微球的重要桥梁。SaMIgG 数量过少时, 无法有效偶联全部氧化铈乳胶微球, 导致标记材料的浪费; 而添加过多的 SaMIgG 则会导致氧化铈乳胶微球微球表面聚集过多蛋白质, 而引起荧光信号的下降。为了探究 SaMIgG

的最佳用量,我们尝试在偶联 Eu-SaMIgGs 时加入不同剂量(10、15、20、25、30、35、40、45 μg)的 SaMIgG,对比不同 C 线位置的显色情况。从图 4.3A 可以看出,当 SaMIgG 剂量为 35 μg 时, C 线条带的显色程度达到最大,后续即便继续加大添加剂量,仍保持该显色程度不变。因此,选择“35 μg ”作为最佳的 SaMIgG 添加剂量值。

Abs 是本 TRFIA 纸基传感器的核心识别元件,在保证检测效果的前提下,尽可能减少该抗体消耗是本部分的主要目标。本实验通过添加不同剂量(1、2、4、6、8、10、12 μg)的 Abs,对比观察不同 T 线位置的显色情况。如图 4.3B 所示,当 Abs 的添加剂量为 6 μg 时, T 线条带的显色程度达到最大并保持稳定。因此,选择“6 μg ”作为 Abs 的最佳添加剂量值。

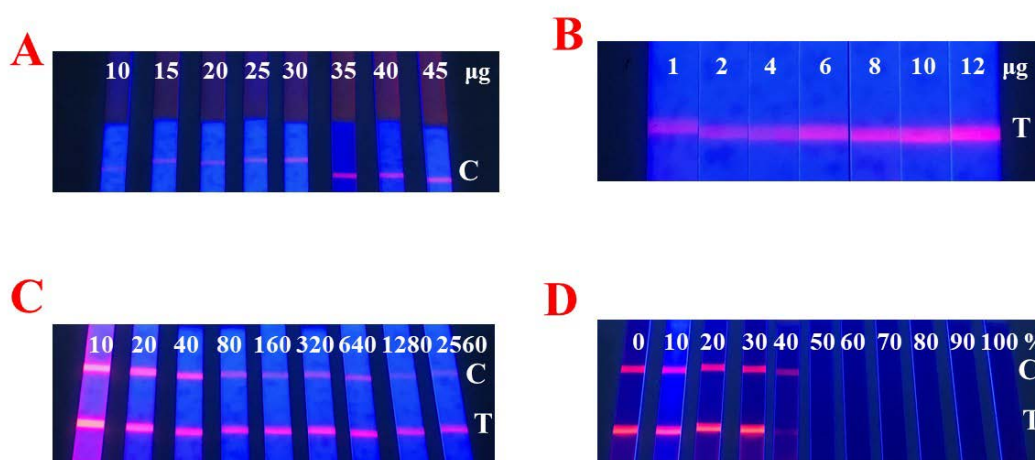


图 4.3 实验条件优化: (A) SaMIgG 用量; (B) Abs 添加量; (C) 稀释倍数; (D) 甲醇浓度

Fig. 4.3 Optimizing the experimental conditions: (A) The dose of SaMIgG; (B) The amount of Abs added; (C) Dilutability; (D) Methanol content

我们按照 10、20、40……2,560 的稀释倍数(样品缓释液: Eu-SaMIgGs-Abs, v/v)设置了不同的实验组。图 4.3C 显示了 Eu-SaMIgGs-Abs 稀释倍数对 TRFIA 纸基传感器性能的影响。通过实验发现,当 Eu-SaMIgGs-Abs 按照 10、20 倍稀释时, C 线、T 线条带的显色程度均过高,且有大量 Eu-SaMIgGs-Abs 滞留在吸水垫、NC 膜上;尤其“10 倍”组的背景色存在严重干扰,不利于提取条带数据。在 40~640 倍稀释的范围内, C 线条带的显色程度逐渐降低,说明随稀释倍数的增大,可结合的探针量逐渐降低;同时, T 线条带显色程度保持不变,这意味着 T 线上的 OPs-BSA 结合能力处于完全饱和状态。在 1,280、2,560 倍稀释时, C 线条带的显色程度过低,不适宜作为质控指示; T 线条带的显色程度也出现明显下降, T 线上的 OPs-BSA 处于非饱和结合状态,造成部分结合位点闲置。综合以上分析,将 Eu-SaMIgGs-Abs 的稀释倍数设置为 640 时,既可充分利用各条带上的结合位点,保证检测和质控效果;又可节约 Eu-SaMIgGs-Abs 用量。

在样品处理过程中，甲醇常被用作 OPs 的提取溶剂，若基质溶液中甲醇浓度过低，则无法有效地提取到样品中的农药成分。但由于抗体是一类具有生物活性的敏感识别元件，过高的甲醇浓度则会影响其生物活性，降低识别能力。因此，本实验通过研究 Eu-SaMIgGs-Abs 对甲醇的耐受程度，以及 OPs 在甲醇中的有效提取程度，以探究样品溶液中甲醇浓度的适宜范围（图 4.3D）。实验发现，当甲醇浓度在 0~30% 范围内时，C 线、T 线条带的显色程度正常，即 TRFIA 纸基传感器可正常工作；而自 40% 起，C 线、T 线条带的显色程度降低，甚至完全不显色，说明 Eu-SaMIgGs-Abs 的活性受到了抑制，无法有效识别 OPs-BSA 和 RaSIgG。另外，在实验中还发现，当甲醇浓度在 70%~100% 的范围内时，大量探针尚未开始层析，便因甲醇的挥发而粘附在样品池内壁上。以上表明，当样品溶液中的甲醇浓度在“0~30%”范围时，能够较好地同时兼顾样品的有效提取和抗体的最佳活性，超出此范围则导致抗体活性的降低甚至丧失。

4.4.3 OPs 的 TRFIA 纸基传感器检测

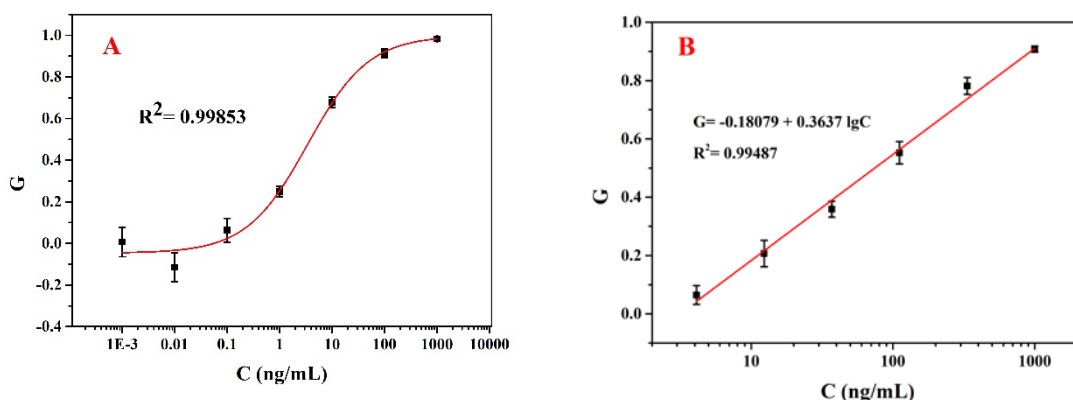


图 4.4 用于 OPs 检测的 (A) 竞争抑制曲线及 (B) 标准工作曲线

Fig. 4.4 (A) Competitive inhibition curve and (B) standard curve of the OPs

在最佳实验条件下，对 OPs 浓度 (C) 的对数与其相应 T 线灰度值变化率 (G) 的关系进行了研究。本实验使用对硫磷、蝇毒磷、啶硫磷、甲基对硫磷的标准品溶液进行等量混合得到混合标准溶液，并将其以 3×10^3 ng/mL 为起始浓度，按照 3 倍比的方式依次稀释得到 7 个浓度。利用系列浓度混合标准溶液和阴性样品溶液进行 TRFIA 纸基传感器检测工作标准曲线的探究。按照 4.3.4 获取各 TRFIA 纸基传感器的 G 值，经分析后得到适用于该传感器工作的竞争抑制曲线，如图 4.4A 所示。该曲线的方程为 $G = 0.99789 - 1.04464 / [1 + (\lg C / 3.41689)]^{0.74527}$ ， R^2 为 0.99853，灵敏度为 3.42 ng/mL。随着目标浓度的增加，T 线处的 OPs-BSA 能够竞争结合到的 Eu-SaMIgGs-Abs 减少，故 T 线条带显色程度降低，导致 G 值升高。由于在竞争抑制曲线的两端位置易出现假阳性或假

阴性的情况，我们又在线性范围内探究了 C 与 G 值的线性关系（图 4.4B），得到线性方程为 $G = -0.18079 + 0.36371gC$ ， R^2 为 0.99487。根据 $S/N=3$ 计算，得到 TRFIA 纸基传感器的 LOD 为 0.53 ng/mL。

与其他类型纸基传感器的检测性能进行比较（如表 4.3）。对比结果表明，基于二抗标记法建立的纸基传感器灵敏度明显低于靶标抗体标记方法；另外，本研究提出的 TRFIA 纸基传感器检测方法识别目标范围较广，LOD 较低，适用样品基质种类较多。

表 4.3 与其他类型纸基传感器的比较

Tab. 4.3 Comparison with other types of paper-based sensors

信号分子	标记位置	目标物	LOD (ng/mL)	适用样品基质种类	参考文献
Fe_3O_4	SaMIgG	17 β -雌二醇	0.2	4	[102]
上转换发光颗粒	靶标抗体	有机磷农药	3.44	3	[59]
氧化铈乳胶微球	SaMIgG	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	0.12	2	[103]
氧化铈乳胶微球	靶标抗体	醚型菊酯类农药	9.12	3	[49]
氧化铈乳胶微球	SaMIgG	有机磷农药	0.53	4	本研究

4.4.4 TRFIA 纸基传感器的性能测试

特异性和抗干扰能力是评价一个 TRFIA 纸基传感器能否有效应用于实际检测工作的重要指标。在加标物质浓度相同的情况下，利用该 TRFIA 纸基传感器分别对不同 OPs 的目标物质或其他类农药的干扰物质进行测试，通过对 T 线条带的灰度值进行分析，以探究该传感器的特异性和抗干扰能力。建立空白组（图 4.5-a）作为对照；图 4.5-b 为对硫磷标准品溶液；图 4.5-c 为水胺硫磷标准品溶液，它是一种 OPs，但没有包含在混合标准溶液中；图 4.5-d 为混合标准溶液（对硫磷、蝇毒磷、啶硫磷、甲基对硫磷）；图 4.5-e 为 OPs（对硫磷、蝇毒磷、啶硫磷、甲基对硫磷）和非 OPs（克百威、溴氰菊酯）的混合；另外，以氨基甲酸酯类农药—克百威（图 4.5-f）和拟除虫菊酯类农药—溴氰菊酯（图 4.5-g）作为干扰农药。从图 4.5 中可以看出，在没有特异性靶点的情况下 T 线条带显色情况与空白组接近，说明抗体很难与这些干扰农药分子结合。而图 4.5-b、4.5-c、4.5-d、4.5-e 的灰度值均较低，且结果数值接近，说明该免疫传感器具有良好的特异性和一定的抗干扰能力。

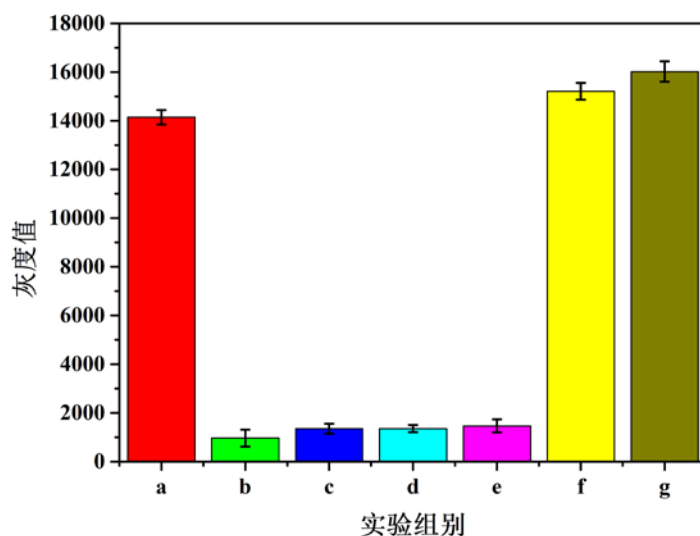


图 4.5 时间分辨荧光纸基传感器的性能评价 (a-空白; b-对硫磷; c-水胺硫磷; d-对硫磷、蝇毒磷、喹硫磷、甲基对硫磷; e-对硫磷、蝇毒磷、喹硫磷、甲基对硫磷、克百威、溴氰菊酯; f-克百威; g-溴氰菊酯)

Fig. 4.5 Performance evaluation of the time-resolved fluorescence immunochromatography paper-based sensor (a-blank; b-parathion; c-isocarbophos; d-parathion, coumaphos, quintiofos, methyl parathion; e-parathion, coumaphos, quintiofos, methyl parathion, carbocarboxylate, deltamethrin; f-carbocarboxylate; g-deltamethrin;)

4.4.5 OPs 的样品检测

我们从市场购买了娃娃菜和油菜作为蔬菜样品代表,以自来水和湖泊水作为水样品代表,按照 3.2.3 和 4.2.4 制备基质样品溶液用于实际样品测试实验,以评价本研究构建的 TRFIA 纸基传感器在实际样品检测工作中的应用效果。我们采用标准加入法,将不同体积的混合标准溶液分别加入无基质样品溶液(即 10% 甲醇-PBS)和四种不同基质样品溶液中,最终使得每组样品溶液的系列浓度梯度均一致。利用本研究构建的 TRFIA 纸基传感器对样品溶液进行竞争抑制曲线的探究。实验结果如图 4.6 所示。由于样品基质成分复杂多样,可能会在层析过程中不同程度地堵塞毛细通道,所以所有基质溶液的灵敏度数值均略高于无基质样品溶液。在针对蔬菜样品的测试实验中,“娃娃菜”实验组和“油菜”实验组的竞争抑制曲线与无基质样品溶液基本保持一致。但由于油菜基质溶液中含有绿色色素,在数据提取时,产生了一定的背景干扰,导致其检测范围比“娃娃菜”略窄。在水样品的测试实验中,“自来水”实验组表现出了与“娃娃菜”接近的检测效果;而湖泊水中成分复杂,其中众多的杂质干扰了 TRFIA 纸基传感器正常工作,导致“湖泊水”实验组的检测范围大幅度缩小。

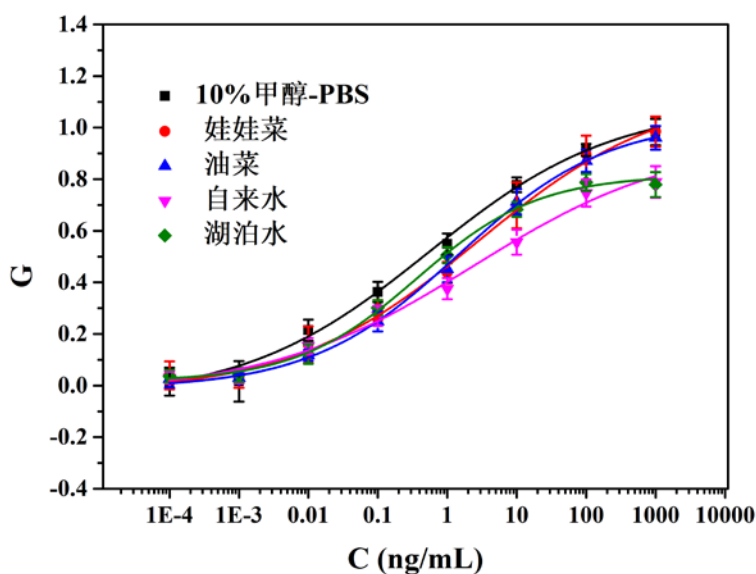


图 4.6 用于样品中 OPs 检测的竞争抑制曲线

Fig. 4.6 Competitive inhibition curves for determination of OPs in samples

4.5 本章小结

综合以上探究，我们基于二抗标记的原理，建立了一种用于 OPs 检测的 TRFIA 纸基传感器。采用氧化铈乳胶微球作为荧光标记材料，减少了背景色干扰。利用 SaMIgG 作为中间体，将氧化铈乳胶微球和 Abs 链接在一起，形成 Eu-SaMIgGs-Abs。该策略可节约靶标抗体的用量，有效地实现荧光信号的放大，最终提高检测方法的灵敏度。更重要的是，二抗代替靶标抗体参与复杂繁琐的偶联步骤，避免了靶标抗体的生物活性和特异性识别能力的下降。在最佳实验条件下，研究了 OPs 的浓度与显色强度的竞争抑制曲线关系，灵敏度为 3.42 ng/mL。并建立了该 TRFIA 纸基传感器的工作标准线性曲线，线性相关系数可达到 0.99487，LOD 可达到 0.53 ng/mL。同时，利用不同样品基质溶液中对该 TRFIA 纸基传感器的检测效果进行了对比分析。最重要的是，本实验建立的 TRFIA 纸基传感器可实现定性和定量检测，在应用于大量样品检测时，可先在 365 nm 波长的紫外光下，通过肉眼观察判断出阴性样品，可快速筛选出阳性样品以进行后续的定量检测，显著地提高了检测效率。本 TRFIA 纸基传感器有着广阔的应用前景，可以较好地满足日常快速检测需求。

第五章 结论与展望

5.1 结论

本文以 OPs 作为目标物质,以 Abs 作为核心识别元件,构建了 3 种不同原理的免疫分析方法,可基本满足不同的快速检测要求。主要结论如下:

(1) 为实现实验室条件下 OPs 的快速初筛检测,我们运用响应面法对 icELISA 检测方法的工作条件进行了优化分析。探究得到了 OPs-BSA 和广谱性抗体的最佳工作浓度组合。在单因素试验的基础上,设计了响应面优化试验。并结合实际检测工作的需要,将最佳工作参数修正为:离子浓度 0.04 M、pH 值 7.89、甲醇浓度 2.9%,该条件下得到的竞争抑制率为 30.87%。在后续有加标测试中,该方法的灵敏度为 1.28 ng/mL,且检测结果稳定可靠、重复性较好。另外,在特异性验证实验中发现,所使用的广谱性抗体对不同种类的 OPs 的识别灵敏度差异较小,基本可满足大量样本的 OPs 初步筛选检测工作。

(2) 为实现更加快速、灵敏的微量检测,我们利用电沉积技术制备了一种新型电化学免疫传感器。将 AuNPs 与广谱性抗体结合形成 AuNP-Abs 后,利用一步电沉积的方法在 SPCE 表面修饰了 AuNP-Abs/PB 复合膜。这一步骤有效地简化了免疫传感器的制备过程,并且提高了抗体的固定效果,增强了免疫传感器的稳定性。在最佳实验条件下,OPs 的浓度与其相应的电化学响应具有良好的线性关系,LOD 可达 0.003 ng/mL,可应用于较低浓度目标物的检测。同时,该免疫传感器检测范围较广,灵敏度较高,特异性和稳定性良好。该免疫传感器可于实验室内检测使用,也可搭配快速检测仪在非实验室条件下应用。

(3) 为提高检测效率、降低检测成本 and 专业化门槛,我们基于二抗标记的原理建立了一种 TRFIA 纸基传感器。采用氧化钬乳胶微球作为荧光标记材料,减少了背景色干扰。利用 SaMIgG 作为中间体,将氧化钬乳胶微球和 Abs 链接在一起,形成 Eu-SaMIgGs-Abs。该策略可节约靶标抗体的用量,有效地放大荧光信号。且二抗代替靶标抗体参与复杂繁琐的偶联步骤,避免了靶标抗体的生物活性和特异性识别能力的下降。在最佳实验条件下,OPs 的浓度与显色强度具有良好的线性关系,LOD 可达到 0.53 ng/mL。同时,探究了该 TRFIA 纸基传感器不同样品基质溶液中的检测效果,以对比分析该传感器的适用样品。本实验建立的 TRFIA 纸基传感器可实现定性和定量检测,在应用于大量样品检测时,借助紫外灯即可直观判断出阴性样品,快速筛选出阳性样品进行定量检测。本 TRFIA 纸基传感器有着广阔的应用前景,可以较好地满足日常或大量样本快速检测需求。

表 5.1 3 种检测方法的性能对比

Tab. 5.1 Performance comparison of three detection methods

方法名称	检测时长	是否可 批量检测	灵敏度 (ng/mL)	LOD (ng/mL)	定性/定量
icELISA 检测方法	2.5 h	是	1.28	0.12	定性、定量
电化学免疫传感器	25 min	否	2.45	0.003	定量
TRFIA 纸基传感器	15 min	是	3.42	0.53	定性、定量

对本文建立的 3 种检测方法进行对比分析, 如表 5.1 所示。icELISA 检测方法作为传统方法, 检测性能较为稳定, 通过酶标仪获取检测数据, 使得检测结果较为可靠; 其检测时间较长, 且对操作人员和检测环境的专业程度要求较高, 因此在实验室内大量样本的日常监测检测工作中较为适用。电化学免疫传感器的检测时间较短, 其 LOD 明显低于其他两种方法, 不会因样品基质存在颜色而导致信号干扰, 搭载配套的便携式电化学检测仪即可实现现场快速微量检测; 但由于每台检测仪每次只能检测一份样品, 检测效率相较其他两种方法略有下降, 故较适用于实验室或现场抽样检测。TRFIA 纸基传感器能够实现可视化定性判断, 筛出的阳性样本可直接继续用于定量检测, 明显节约检测时间, 提高检测效率; 尽管灵敏度和 LOD 都略高于其他两种方法, 但是也能够满足快速初筛检测工作的需求; 另外, 其制备成本较低, 检测时间短, 操作简单, 专业化要求较低, 适用于普通居民日常使用或大量样品的快速检测。

综合以上, 本文研究的 3 种快速检测方法, 基本上满足了不同人群、不同场景下的快速检测需求, 并为后续大型仪器的精准检测提供重要参考基础。

5.2 展望

本文以广谱性抗体作为核心识别元件, 构建了 3 种不同原理的免疫分析方法, 且均表现出了较为满意的检测结果, 可为不同快速检测需求提供多套检测方案。诚然, 本研究仍存在一些不足之处, 需要进一步地探讨和研究。结合作者在硕士研究生在读期间的研究经历和经验, 对本论文的研究内容提出如下展望, 希望在后续研究中得以完善:

(1) 目前所用的 Abs 在识别每种 OPs 时, 尚不能做到同等程度地识别。这需要对通用结构抗原进行更加合理的设计合成, 结合高效的抗体制备筛选方法, 获得识别范围更加广谱、亲和力更高的广谱性抗体识别元件;

(2) 受专业背景知识的限制, 本论文的研究仅囿于检测技术的研究。后续研究可着眼于与之配套的快速检测仪器以及移动端 APP 的开发, 这将能够更快、更清晰地向用户呈现检测结果。如此, 便可显著地简化数据处理过程, 进一步提高检测效率, 进而有利于本文中的检测技术的推广应用。

参考文献

- [1] 戴莹, 王纪华, 韩平, 等. 生物传感器在有机磷农药残留量检测中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015,6(8):2976-2980.
- [2] 张亚佳, 李忠海. 果蔬中有机磷农药残留检测方法研究进展[J]. 食品与机械, 2016,32(2):173-177.
- [3] 王沛, 田英, 高宇, 等. 孕妇有机磷农药代谢产物暴露水平检测[J]. 中国公共卫生, 2009,25(4):470-471.
- [4] 俞发荣, 李登楼. 有机磷农药对人类健康的影响及农药残留检测方法研究进展[J]. 生态科学, 2015,34(3):197-203.
- [5] 张盼, 高牧丛, 周强, 等. 生物传感器在有机磷农药检测中的应用[J]. 分析实验室, 2019,38(5):622-626.
- [6] 姜健. 农药使用道德风险的发生与防范研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
- [7] 王威, 贺红武, 王列平, 等. 有机磷农药及其研发概况[J]. 农药, 2016,55(2):86-90.
- [8] Chen Z, Dond F, Xu J, et al. Management of pesticide residues in China[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2015,14(11):2319-2327.
- [9] Liu H, Bai X, Pang X. Intercity variability and local factors influencing the level of pesticide residues in marketed fruits and vegetables of China[J]. *Science of The Total Environment*, 2020,700:134481.
- [10] Pang G, Chang Q, Bai R, et al. Simultaneous Screening of 733 Pesticide Residues in Fruits and Vegetables by a GC/LC-Q-TOFMS Combination Technique[J]. *Engineering*, 2020,6(4):432-441.
- [11] 蒋雪松. 用于有机磷农药残留检测的免疫生物传感器的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [12] Parrilla Vázquez P, Ferrer C, Martínez Bueno M J, et al. Pesticide residues in spices and herbs: Sample preparation methods and determination by chromatographic techniques[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019,115:13-22.
- [13] Sivaperumal P, Anand P, Riddhi L. Rapid determination of pesticide residues in fruits and vegetables, using ultra-high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2015,168:356-365.
- [14] Liu G, Guo W, Song D. A multianalyte electrochemical immunosensor based on patterned carbon nanotubes modified substrates for detection of pesticides[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014,52:360-366.
- [15] 刘贤进, 颜春荣, 刘媛, 等. 有机磷杀虫剂通用结构半抗原的设计及广谱特异性抗体的制备[J]. 中国农业科学, 2008(03):727-733.
- [16] 李盼, 张晓帅, 邱雨楼, 等. 有机磷农药广谱特异性单克隆抗体的制备及特性分析[J]. 江苏农业学报, 2017,33(06):1415-1421.
- [17] 崔宗强, 李炜, 张先恩. 纳米生物传感研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2020,50(07):755-765.
- [18] C. S. Pundira A M P. Bio-sensing of organophosphorus pesticides: A review[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019,140:111348.
- [19] Hou W, Zhang Q, Dong H, et al. Acetylcholinesterase biosensor modified with ATO/OMC for detecting organophosphorus pesticides[J]. *New journal of chemistry*, 2019,43(2):946-952.
- [20] Vinotha Alex A, Mukherjee A. Review of recent developments (2018-2020) on acetylcholinesterase inhibition based biosensors for organophosphorus pesticides detection[J]. *Microchemical Journal*, 2021,161:105779.
- [21] Liu M, Wei J, Wang Y, et al. Dopamine-functionalized upconversion nanoparticles as fluorescent sensors for organophosphorus pesticide analysis[J]. *Talanta*, 2019,195:706-712.
- [22] Arduini F, Cinti S, Caratelli V, et al. Origami multiple paper-based electrochemical biosensors for pesticide detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019,126:346-354.
- [23] 金莉莉. 基于微流控纸芯片技术的有机磷和氨基甲酸酯类农药残留快速检测研究[D]. 杭州: 中国农业科学院茶叶研究所, 2019.
- [24] 符家驹. 电化学适配体传感器的构建及其在蔬菜有机磷农药残留检测中的应用[D]. 淄博: 山东理工大学, 2019.

- [25] Liu M, Khan A, Wang Z, et al. Aptasensors for pesticide detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019,130:174-184.
- [26] 王丽. 四种有机磷农药核酸适体的筛选、鉴定及其活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [27] 王丽, 桑宏庆. 基于有机磷农药与碱基作用的核酸适体活性位点研究[J]. *分析试验室*, 2014,33(04):395-398.
- [28] Wang R, Zhu C, Wang L, et al. Dual-modal aptasensor for the detection of isocarbophos in vegetables[J]. *Talanta*, 2019,205:120094.
- [29] Fu J, Dong H, Zhao Q, et al. Fabrication of refreshable aptasensor based on hydrophobic screen-printed carbon electrode interface[J]. *Science of The Total Environment*, 2020,712:136410.
- [30] 白文荟, 陈爱亮. 适配体传感器在农药残留检测中的应用[J]. *分析测试学报*, 2016,35(10):1360-1368.
- [31] Bala R, Dhingra S, Kumar M, et al. Detection of organophosphorus pesticide-Malathion in environmental samples using peptide and aptamer based nanoprobe[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017,311:111-116.
- [32] 王颖, 李楠. 分子印迹技术及其应用[J]. *化工进展*, 2010,29(12):2315-2323.
- [33] 韦梦醒. 有机磷农药磁性虚拟模板分子印迹聚合物的制备及分离富集性能研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2018.
- [34] 徐丽娟. 基于多壁碳纳米管修饰的分子印迹电化学传感器的研制与应用[D]. 兰州: 西北师范大学, 2015.
- [35] 赵伟. 基于大分子自组装构建分子印迹聚合物传感涂层[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- [36] Karimi-Maleh H, Yola M L, Atar N, et al. A novel detection method for organophosphorus insecticide fenamiphos: Molecularly imprinted electrochemical sensor based on core-shell Co_3O_4 @MOF-74 nanocomposite[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2021,592:174-185.
- [37] 许楨毅, 吴玉琼, 范俐, 等. 分子印迹技术在食品安全检测领域的应用进展[J]. *食品研究与开发*, 2021,42(3):207-212.
- [38] Rebelo P, Costa-Rama E, Seguro I, et al. Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for environmental analysis[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021,172:112719.
- [39] Pérez-Fernández B, Mercader J V, Abad-Fuentes A, et al. Direct competitive immunosensor for Imidacloprid pesticide detection on gold nanoparticle-modified electrodes[J]. *Talanta*, 2020,209:120465.
- [40] Raza N, Kim K. Quantification techniques for important environmental contaminants in milk and dairy products[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018,98:79-94.
- [41] Gopinath S C B, Tang T, Citartan M, et al. Current aspects in immunosensors[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014,57:292-302.
- [42] Li Y, Sun Y, Beier R C, et al. Immunochemical techniques for multianalyte analysis of chemical residues in food and the environment: A review[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2017,88:25-40.
- [43] Jiang X, Li D, Xu X, et al. Immunosensors for detection of pesticide residues[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008,23(11):1577-1587.
- [44] Talan A, Mishra A, Eremin S A, et al. Ultrasensitive electrochemical immuno-sensing platform based on gold nanoparticles triggering chlorpyrifos detection in fruits and vegetables[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018,105:14-21.
- [45] Yu J, Guo T, Zhang W, et al. Simultaneous detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and fenitrothion through lanthanide doped $\beta\text{-NaYF}_4$ upconversion nanoparticles with different emitting light colors[J]. *Materials Research Bulletin*, 2019,111:133-139.
- [46] 张光胤, 鲁迨, 邓放明, 等. 基于纳米材料改良酶联免疫吸附法的研究进展[J]. *食品与机械*, 2020,36(03):225-231.
- [47] 杜小粉, 董全. 酶联免疫吸附分析技术及其在食品农药残留检测中的应用[J]. *食品科学*, 2009,30(17):330-333.
- [48] Zhao Q, Lu D, Zhang G, et al. Recent improvements in enzyme-linked immunosorbent assays based on nanomaterials[J]. *Talanta*, 2021,223:121722.
- [49] 王恒玲. I型菊酯类农残通用单克隆抗体研制与快速检测技术研究[D]. 武汉: 中国农业科学院油料作物研究所, 2014.

- [50] 李文进, 刘霞, 李蓉卓, 等. 电化学传感器在农药残留检测中的研究进展[J]. 食品与机械, 2013,29(04):241-245.
- [51] 褚光雷. 铜纳米粒子电化学传感器的构建及在亚硝酸盐检测中的应用研究[D]. 淄博: 山东理工大学, 2020.
- [52] Mehta J, Bhardwaj N, Bhardwaj S K, et al. Graphene quantum dot modified screen printed immunosensor for the determination of parathion[J]. Analytical Biochemistry, 2017,523:1-9.
- [53] Cao Y, Sun X, Guo Y, et al. An electrochemical immunosensor based on interdigitated array microelectrode for the detection of chlorpyrifos[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015,38(2):307-313.
- [54] 蒋艳, 余姓鸿, 谢礼, 等. 化学发光免疫方法在食品安全检测中的应用及展望[J]. 食品安全质量检测学报, 2020,11(20):7603-7609.
- [55] 聂荣彬. 新型化学发光免疫传感器的构建与应用[D]. 沈阳: 东北师范大学, 2020.
- [56] 欧阳辉. 中药中农药残留和重金属的化学发光免疫传感器的构建及性能研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [57] 田美玲. 免疫层析试纸条新型信号放大策略的构建与性能研究[D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- [58] 徐重新, 刘敏, 张霄, 等. 农药危害风险及其残留检测用广谱特异性抗体研究进展[J]. 江苏农业学报, 2019,35(02):489-496.
- [59] Zou R, Chang Y, Zhang T, et al. Up-converting nanoparticle-based immunochromatographic strip for multi-residue detection of three organophosphorus pesticides in food[J]. Frontiers in Chemistry, 2019,7.
- [60] 徐振林. 有机磷农药多特异性抗体识别机制与多残留免疫检测新方法研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2011.
- [61] Lan M, Guo Y, Zhao Y, et al. Multi-residue detection of pesticides using a sensitive immunochip assay based on nanogold enhancement[J]. Analytica Chimica Acta, 2016,938:146-155.
- [62] 魏雪晨, 颜炜群. 双特异性抗体的作用机制及制备与纯化方法研究进展[J]. 生物技术, 2021,31(01):89-95.
- [63] 舒棋. 用于中药中外源性有害物质检测的光学免疫分析方法研究[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- [64] Shu Q, Wang L, Ouyang H, et al. Multiplexed immunochromatographic test strip for time-resolved chemiluminescent detection of pesticide residues using a bifunctional antibody[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017,87:908-914.
- [65] 李刚. 抗吡虫啉-甲基对硫磷双特异性单克隆抗体的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [66] 王菡, 李高华, 陈涛, 等. 基于广谱性单克隆抗体免疫分析有机磷农药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2015,6(11):4399-4408.
- [67] Xu Z, Shen Y, Zheng W, et al. Broad-specificity immunoassay for O,O-Diethyl organophosphorus pesticides: Application of molecular modeling to improve assay sensitivity and study antibody recognition[J]. Analytical Chemistry, 2010,82(22):9314-9321.
- [68] Xu Z, Wang H, Shen Y, et al. Conformational changes of hapten-protein conjugates resulting in improved broad-specificity and sensitivity of an ELISA for organophosphorus pesticides[J]. Analyst (London), 2011,136(12):2512-2520.
- [69] Xu Z, Xie G, Li Y, et al. Production and characterization of a broad-specificity polyclonal antibody for O,O-diethyl organophosphorus pesticides and a quantitative structure-activity relationship study of antibody recognition[J]. Analytica Chimica Acta, 2009,647(1):90-96.
- [70] 黄新仁. 响应面法在生物过程优化中的应用[D]. 长沙: 湖南大学, 2011.
- [71] 李莉, 张赛, 何强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015,34(8):41-45.
- [72] Jiao S, Liu P, Liu Y, et al. Binding properties of broad-specific monoclonal antibodies against three organophosphorus pesticides by a direct surface plasmon resonance immunosensor[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018(410):7263-7273.
- [73] Khanmohammadi A, Aghaie A, Vahedi E, et al. Electrochemical biosensors for the detection of lung cancer biomarkers: A review[J]. Talanta, 2020,206:120251.
- [74] Zhou Q, Tang D. Recent advances in photoelectrochemical biosensors for analysis of mycotoxins in food[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2020,124:115814.

- [75] Huang L, Chen J, Yu Z, et al. Self-powered temperature sensor with seebeck effect transduction for photothermal-thermoelectric coupled immunoassay[J]. *Analytical Chemistry*, 2020,92(3):2809-2814.
- [76] Zhang K, Lv S, Lin Z, et al. Bio-bar-code-based photoelectrochemical immunoassay for sensitive detection of prostate-specific antigen using rolling circle amplification and enzymatic biocatalytic precipitation[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018,101:159-166.
- [77] Zhang K, Lv S, Lin Z, et al. CdS:Mn quantum dot-functionalized g-C₃N₄ nanohybrids as signal-generation tags for photoelectrochemical immunoassay of prostate specific antigen coupling DNAzyme concatamer with enzymatic biocatalytic precipitation[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017,95:34-40.
- [78] Pei X, Zhang B, Tang J, et al. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013,758:1-18.
- [79] Chen H, Yang T, Liu F, et al. Electrodeposition of gold nanoparticles on Cu-based metal-organic framework for the electrochemical detection of nitrite[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019,286:401-407.
- [80] Dou X, Chu X, Kong W, et al. A gold-based nanobeacon probe for fluorescence sensing of organophosphorus pesticides[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015,891:291-297.
- [81] Makaraviciute A, Ramanaviciene A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013,50:460-471.
- [82] Husmann S, Orth E S, Zarbin A J G. A multi-technique approach towards the mechanistic investigation of the electrodeposition of Prussian blue over carbon nanotubes film[J]. *Electrochimica Acta*, 2019,312:380-391.
- [83] Haji-Hashemi H, Habibi M M, Safarnejad M R, et al. Label-free electrochemical immunosensor based on electrodeposited Prussian blue and gold nanoparticles for sensitive detection of citrus bacterial canker disease[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018,275:61-68.
- [84] Ping J, Mao X, Fan K, et al. A Prussian blue-based amperometric sensor for the determination of hydrogen peroxide residues in milk[J]. *Ionics*, 2010,16(6):523-527.
- [85] Ping J, Wu J, Fan K, et al. An amperometric sensor based on Prussian blue and poly(o-phenylenediamine) modified glassy carbon electrode for the determination of hydrogen peroxide in beverages[J]. *Food Chemistry*, 2011,126(4):2005-2009.
- [86] Yao Y, Wang G, Chu G, et al. The development of a novel biosensor based on gold nanocages/graphene oxide-chitosan modified acetylcholinesterase for organophosphorus pesticide detection[J]. *New journal of chemistry*, 2019,43(35):13816-13826.
- [87] 华修德. 有机磷农药单残留及多残留免疫分析方法的建立与应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [88] 蒋芸. 表面增强拉曼光谱在标记免疫检测中的应用[D]. 苏州: 苏州大学, 2005.
- [89] 赵娟. 碳基复合纳米材料构建新型适配体传感器检测抗生素[D]. 济南: 济南大学, 2017.
- [90] 杜淑媛. 克百威农药残留检测用无标记电流型免疫传感器的制备方法研究[D]. 淄博: 山东理工大学, 2012.
- [91] Dong H, Zhao Q, Li J, et al. Broad-spectrum electrochemical immunosensor based on one-step electrodeposition of AuNP-Abs and Prussian blue nanocomposite for organophosphorus pesticide detection[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021,44(3):585-594.
- [92] Tian X, Liu L, Li Y, et al. Nonenzymatic electrochemical sensor based on CuO-TiO₂ for sensitive and selective detection of methyl parathion pesticide in ground water[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018,256:135-142.
- [93] Mahmoudi E, Fakhri H, Hajian A, et al. High-performance electrochemical enzyme sensor for organophosphate pesticide detection using modified metal-organic framework sensing platforms[J]. *Bioelectrochemistry*, 2019,130:107348.
- [94] Fu J, An X, Yao Y, et al. Electrochemical aptasensor based on one step co-electrodeposition of aptamer and GO-CuNPs nanocomposite for organophosphorus pesticide detection[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019,287:503-509.
- [95] Niazi S, Khan I M, Yu Y, et al. A "turnon" aptasensor for simultaneous and time-resolved fluorometric determination of zearalenone, trichothecenes A and aflatoxin B1 using WS2 as a quencher[J]. *Microchimica Acta*, 2019,186(8):575-584.

- [96] 朱建国. 粮油中真菌毒素和农药残留多组分检测技术研究[D]. 武汉: 中国农业科学院油料作物研究所, 2016.
- [97] 安兴爽. 基于免疫分析的黄曲霉毒素 M1 和呕吐毒素高灵敏快速检测方法研究[D]. 淄博: 山东理工大学, 2020.
- [98] Zhu F, Zhang H, Qiu M, et al. Dual-label time-resolved fluoroimmunoassay as an advantageous approach for investigation of diethyl phthalate & dibutyl phthalate in surface water[J]. *Science of The Total Environment*, 2019,695:133793.
- [99] Li K, Li X, Fan Y, et al. Simultaneous detection of gastric cancer screening biomarkers plasma pepsinogen I/II using fluorescent immunochromatographic strip coupled with a miniature analytical device[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019,286:272-281.
- [100] Li G, Wang D, Zhou A, et al. Rapid, on-site, ultrasensitive melamine quantitation method for protein beverages using time-resolved fluorescence detection paper[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018,66(22):5671-5676.
- [101] Majdinasab M, Zareian M, Zhang Q, et al. Development of a new format of competitive immunochromatographic assay using secondary antibody-europium nanoparticle conjugates for ultrasensitive and quantitative determination of ochratoxin A[J]. *Food Chemistry*, 2018,275:721-729.
- [102] Yao X, Wang Z, Dou L, et al. An innovative immunochromatography assay for highly sensitive detection of 17 β -estradiol based on an indirect probe strategy[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019,289:48-55.
- [103] Dong H, An X, Xiang Y, et al. Novel Time-Resolved Fluorescence immunochromatography paper-based sensor with signal amplification strategy for detection of deoxynivalenol[J]. *Sensors*, 2020(20):6577.

在读期间成果

(1) 发表论文情况:

- [1] **Haowei Dong**; Qingxue Zhao; Jiansen Li; Yaodong Xiang; Huimin Liu; Yemin Guo*; Qingqing Yang; Xia Sun. Broad-spectrum electrochemical immunosensor based on one-step electrodeposition of AuNP-Abs and Prussian blue nanocomposite for organophosphorus pesticide detection[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, 44: 585-594. (SCI 三区, IF=2.419)
- [2] **Haowei Dong**[#]; Xingshuang An[#]; Yaodong Xiang; Fukai Guan; Qi Zhang; Qingqing Yang; Xia Sun; Yemin Guo*. Novel time-resolved fluorescence immunochromatography paper-based sensor with signal amplification strategy for detection of deoxynivalenol[J]. *Sensors*, 2020, 20: 6577. (SCI 三区, IF=3.275)
- [3] Jiayun Fu[#]; **Haowei Dong**[#]; Qingxue Zhao; Shuting Cheng; Yemin Guo*; Xia Sun*. Fabrication of refreshable aptasensor based on hydrophobic screenprinted carbon electrode interface[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 712: 136410. (SCI 二区, IF=6.551)
- [4] Wenjie Hou[#]; Qianqian Zhang[#]; **Haowei Dong**; Falan Li; Yanyan Zhang; Yemin Guo*; Xia Sun. Acetylcholinesterase biosensor modified with ATO/OMC for detecting organophosphorus pesticides[J]. *New Journal of Chemistry*, 2019, 43: 946. (SCI 三区, IF=3.288)
- [5] Qingxue Zhao; Yuxiang Wu; Xiaojie Shi; **Haowei Dong**; Huimin Liu; Yan Zheng; Qingqing Yang*; Xia Sun; Yemin Guo; Shancang Zhao. Rapid quantitative detection of capsaicinoids in serum based on an electrochemical immunosensor with a dual-signal amplification strategy[J]. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2020. (Online) (SCI 三区, IF=2.646)
- [6] Yemin Guo; Fengzhen Yang; Yao Yao; Jiansen Li; Shuting Cheng; **Haowei Dong**; Hui Zhang; Yaodong Xiang; Xia Sun*. Novel Au-tetrahedral aptamer nanostructure for the electrochemiluminescence detection of acetamiprid[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 401: 123794. (SCI 一区, IF=9.038)
- [7] Huimin Liu; Shuting Cheng; Xiaojie Shi, Hui Zhang; Qingxue Zhao; **Haowei Dong**, Yemin Guo*; Xia Sun. Electrochemiluminescence aptasensor for profenofos detection based on silver nanoparticles enhanced luminol luminescence system[J]. *Journal of The Electrochemical Society*, 2019, (166): B1562-B1566. (SCI 二区, IF=3.721)
- [8] Yao Yao; Guangxian Wang; Xiaojie Shi, Jiansen Li; Fengzhen Yang; Shuting Cheng;

Hui Zhang; **Haowei Dong**; Yemin Guo*; Xia Sun*; Yuxiang Wu*. Ultrasensitive aptamer-based biosensor for acetamiprid using tetrahedral DNA nanostructures[J]. Journal of Materials Science, 2020. (Online) (SCI 三区, IF=3.553)

(2) 获奖情况:

- [1] 2021年06月, 获山东理工大学研究生优秀毕业生;
- [2] 2020年12月, 获山东理工大学研究生优秀成果奖;
- [3] 2020年06月, 获山东理工大学竞赛类研究生优秀成果单项奖;
- [4] 2020年10月, 获山东理工大学研究生二等学业奖学金;
- [5] 2019年11月, 获“中联重科”杯第五届全国大学生智能农业装备创新大赛, 全国二等奖;
- [6] 2019年10月, 获山东理工大学研究生二等学业奖学金;
- [7] 2018年10月, 获山东理工大学研究生三等学业奖学金。

致谢

稷下湖水汤汤，如箭如梭时光。转眼间，三年的硕士研究生生活已至尾声。值此论文完稿之际，我谨向所有帮助、陪伴我走过这段日子的人表示最诚挚的感谢。

首先，要将向我的导师——郭业民教授致以最深的感激和最高的敬意。三年来，在郭老师的悉心指导和着力栽培下，我得以顺利成长、逐渐成熟。老师为人宽厚谦和，处事体贴周到，工作务实忘我，治学严谨不苟，待学生如子女，是我在今后的科研以及人生道路上学习的榜样。本论文从最初选题到实验，以及后期写作过程中，无不倾注了老师大量的心血。大到课题框架，小至标点符号，老师自始至终都不厌其烦、认真细致地给与指导和修改意见。求学期间，我曾因课题进行不顺而沮丧萎靡，老师及时了解到我的困境并为我指明方向，动员多位同学对我进行谈心疏导。是老师的深切关心和无私帮助，让我重新拾起了前进的信心。大爱铭记于心，我以能够遇到这样一位导师而感到深深的骄傲和自豪。

同样要感谢我的副导师——孙霞教授，她严谨的学术作风、活跃的学术思维、忘我的工作精神以及乐观慈祥的笑容时刻激励着我，使我受益颇多。感谢本课题组的所有老师在我求学期间给与的关心与帮助，特别感谢杨青青老师、李发兰老师、张妍妍老师、陈薇老师、李培老师在实验操作、论文撰写以及日常生活上的指导和帮助。

感谢符家昀、侯文杰、刘增宁、岳凤玲、姚瑶、褚光雷、安兴爽、王广现等师哥师姐在实验上的指导和生活中的照顾；感谢赵庆雪、张慧、程淑婷、刘惠敏、姚立民等同学一直以来的陪伴和鼓励；感谢项耀东、杨凤珍、时文悦、李建森、黄靖程、孔倩倩、尹佳琪、管福凯、王冠杰等师弟师妹给与我的关心和帮助。

由衷地感谢我的家人，求学多年，不曾为家分担一丝一毫，你们却给了我一切。感谢你们义无反顾的支持和无条件的理解信任。感谢谭德蕾，三年来，喜悦时的见证有你，失落时的陪伴也有你；前行中的并肩是你，无助时的后盾还是你。谢谢你！

最后，感谢我自己。凛冬散尽，星河长明。纵然道路坎坷，心中都不曾放弃希望；虽然前行缓慢，却也步步坚定。

感谢三年来所有的相遇、相知和相伴。何其有幸！在你们的支持和陪伴下，我才得以在科研和人生的道路上且行且砥砺，渐行渐坚定，愈行愈欣欣！

董浩玮
2021年4月 于稷下湖畔