

阻抗生物传感器连续叠加法检测毒死蜱研究

叶尊忠, 王婷, 王一娴, 徐文道, 靳顺茹, 应义斌*, 王剑平

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 农业部设施农业装备与信息化重点实验室, 杭州 310058)

摘要: **目的** 研究微电极阻抗生物传感器快速检测农药以及回归模型建立。**方法** 用蛋白 A 修饰叉指微电极, 把 5 个不同浓度的毒死蜱样品依次滴加到已经制备好的阻抗生物传感器上进行检测, 分析 6 个特定频率下毒死蜱浓度与阻抗信号的相关性。**结果** 在 10 Hz 频率下, 毒死蜱浓度在 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 建立的回归模型方程为: $Y=136.4L_n(X)+2075$, 相关系数 R^2 为 0.961。**结论** 该方法具有操作简单、检测速度快等优点, 可以适用于其他生物传感器研究。

关键词: 毒死蜱; 阻抗生物传感器; 叉指微电极; 农药残留; 叠加法

Additive assay method for detection of chlorpyrifos using impedance biosensor

YE Zun-Zhong, WANG Ting, WANG Yi-Xian, XU Wen-Dao, JIN Shun-Ru,
YING Yi-Bin*, WANG Jian-Ping

(Key Laboratory of Equipment and Informatization in Environment Controlled Agriculture of the Ministry of Agriculture, College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: Objective To develop an impedance biosensor based on interdigitated microelectrode for rapid detection of pesticide residue and establish its regression model. **Methods** The microelectrode was modified by protein A. And five sample solutions with different concentrations of chlorpyrifos were added to the prepared impedance biosensor for analysis. Then the relationships between chlorpyrifos concentration and its impedance value under six selected frequencies were analyzed. **Results** The regression equation was $Y=136.4L_n(X)+2075$ ($R^2=0.961$), under 10 Hz frequency and chlorpyrifos concentration between 0.01~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **Conclusion** The method is simple and rapid, and can be used in field of other biosensor research.

KEY WORDS: chlorpyrifos; impedance biosensor; interdigitated microelectrode; pesticide residue; additive assay

1 引言

近年来, 农药的违规使用对环境、农产品和人类造成了十分严重的危害, 因此, 对农药残留实施快速检测和分析是确保农产品和食品安全的重要措施。目前农药残留常规的分析方法有色谱法^[1]、质谱法^[2]等传统方法。虽然这些方法测定结果准确可靠, 但存在着仪器昂贵、操作复杂、分析费用高等不足^[3]。而生

物传感器作为一种新兴快速检测技术越来越受到研究人员的重视。

生物传感器是由敏感元件与换能器组成的一种分析仪器, 具有操作简单、灵敏度高、特异性好、无需标记等优点^[4], 已经在农药残留检测研究中发挥优势。如利用压电免疫生物传感器实现对有机磷农药的检测^[5, 6], 检出限为 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 甚至更低。而基于电化学阻抗图谱分析方法的阻抗生物传感器由于可以

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201003008)

*通讯作者: 应义斌, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 农产品品质与安全快速检测技术和智能化装备。Email: ybying@zju.edu.cn

快速表征界面特性而得到快速发展^[7-9], 其中, 以叉指微电极为换能器的阻抗生物传感器以体积小、灵敏度高、检测速度快以及适用范围广等优点在科学研究中受到青睐, 特别是在检测致病菌中发挥了优势^[10-12], 然而它在农药残留检测方面报道较少。由于叉指微电极的敏感电极小而薄, 因此采用常规固定方法如自组装法或者共价结合法^[13]会导致电极的使用寿命降低, 而蛋白 A 吸附法具有可定向固定抗体, 结合后抗体活性损失小^[14]以及电极重复使用次数高等优点。本研究利用蛋白 A 修饰叉指微电极, 制备检测毒死蜱的阻抗生物传感器, 建立叠加法检测毒死蜱的回归模型, 为阻抗生物传感检测仪器研发打下基础。

2 材料与方法

2.1 试剂与材料

毒死蜱标样及其单克隆抗体(浙江大学农药与环境毒理研究所); 牛血清白蛋白(BSA, 华美生物工程有限公司); 金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA, Bio Basic Canada Inc.); 铁氰化钾、亚铁氰化钾(分析纯, 华东医药股份有限公司); 磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4)自行配制; 实验用水是由 Millipore 公司的 Milli-Q 纯水仪制备的超纯水(18.2 MΩ·cm); 氮气(高纯氮, 杭州金工); 其余试剂均为分析纯或以上。

2.2 仪器与设备

电化学阻抗测试仪器由英国输力强公司的 1260 阻抗/增益-相位分析仪和 1287 电化学接口组成。实验研究采用双电极体系测量。仪器数据采集和分析软件分别采用输力强公司提供的 Zplot 和 Zview。阻抗测试的参数: 直流偏置电压为 0 V, 交流激励电压为 5 mV, 测试频率从 1 Hz 到 100 kHz。

检测电极采用美国 ABtech Scientific 公司的金叉指微电极(IME AU-1550.5)。如图 1 所示, 它由 50 对指宽和间隙都为 15 μm 的交叉阵列电极组成。与常规电极相比, 叉指微电极具有传质速率快、双电层充电电流小、时间常数(RC)低等优点^[15]。

2.3 生物传感器制备与测量方法

电极表面预处理: 叉指微电极首先在 0.1 mol/L HCl 溶液中浸泡 15 min, 之后用超纯水冲洗电极表面, 随后将电极浸泡在 0.1 mol/L NaOH 溶液中 15 min, 最后再用超纯水冲洗电极, 用氮气干燥电极表面。

电极修饰: 在电极表面滴加 20 μL 0.5 mg/mL 的 SPA, 然后将其放在 37 °C 培养箱中培育 2 h, 之后用超纯水润洗电极表面, 用氮气吹干电极表面。

抗体固定: 在电极上滴加 20 μL 1.6 mg/ml 的毒死蜱抗体, 放在 37 °C 培养箱中培育 2 h, 之后用超纯水轻轻冲洗电极表面, 以去除没有结合的抗体, 然后用氮气吹干。

电极封闭: 在电极上滴加 20 μL BSA, 放在 37 °C 培养箱中培育 30 min, 用超纯水轻轻冲洗电极表面, 以去除电极表面多余的 BSA, 然后用氮气吹干。自此, 用于毒死蜱检测的生物传感器已制备好。

毒死蜱检测: 在生物传感器上滴加 20 μL 所需浓度的毒死蜱检测样品, 放在 37 °C 培养箱中培育 30 min, 然后用超纯水轻轻冲洗掉未固定的毒死蜱, 用氮气吹干。

阻抗测量: 测量装置如图 2 所示。将微电极的一端连接在 1287 的辅助电极和参考电极 1 探头上, 另一端和 1287 的工作电极以及参考电极 2 探头相连。阻抗测试的指示剂是含 10 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的 PBS 溶液,

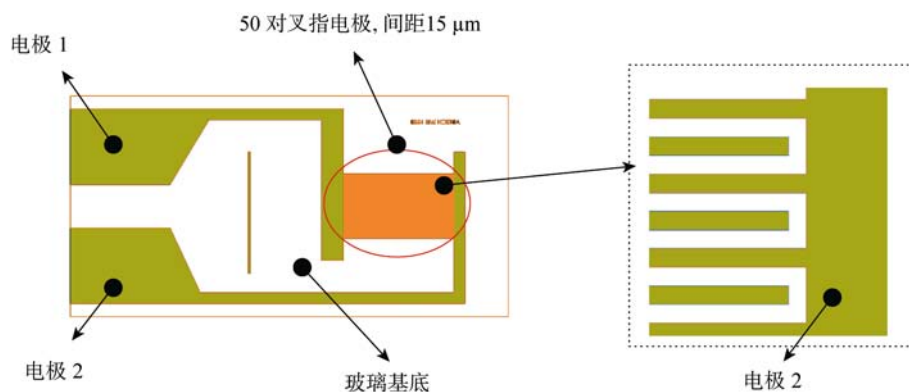


图 1 叉指微电极

Fig. 1 Interdigitated microelectrode

在传感器制备的每一步之后，都要把连接好的电极浸没在盛有 10 mL 阻抗指示剂的玻璃检测池中。待测试阻抗后，取出微电极，用超纯水轻轻冲洗电极表面，然后用氮气吹干，再进行下一步骤。

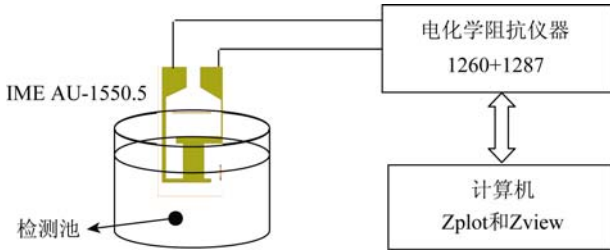


图 2 阻抗测量示意图

Fig. 2 Schematic diagram of impedance instrument measurement

由于在微电极上固定了浓度较大的抗体，当一部分抗体捕获了低浓度的毒死蜱后，其它部分抗体仍然可以捕获新的毒死蜱。因此可以通过滴加法来获得一定浓度范围毒死蜱的回归模型。先把 121.42 $\mu\text{g/mL}$ 毒死蜱标样在 PBS 中稀释成 12.142 $\mu\text{g/mL}$, 1.214 $\mu\text{g/mL}$, 121.42 ng/mL , 12.142 ng/mL 浓度，然后在制备好的阻抗生物传感器上依次滴加 PBS(作为空白对照)，以及 5 个从低到高浓度的毒死蜱样品，并记录 6 条阻抗数据曲线。

3 结果与讨论

3.1 阻抗生物传感器制备过程表征

微电极阻抗生物传感器检测原理见图 3。图 3(A) 是微电极表面未加生物材料时电极间的电子自由迁移活动示意图。在图 3(B)，由于微电极表面固定了生物材料(如抗体以及和抗体特异结合的农药)，使得电

子的迁移活动受到不同程度的影响或阻碍，随着电极上固定的生物材料增多，电子的迁移活动被影响或阻碍的程度会加剧，因此利用阻抗分析仪可以建立微电极阻抗信号与不同浓度农药残留的线性关系，从而为检测未知浓度农药残留奠定基础。

阻抗图谱图 4 表征了生物传感器制备的各个过程，验证了阻抗生物传感器的检测原理。当微电极经过清洗预处理后，电极表面非常清洁，电极间的电子迁移活动几乎没有受到任何阻碍，所以从图 4(A)中可以明显看出，曲线 m 的高频半径非常小，当随着传感器制备过程的进行，曲线 m-q 的半径不断增大。从图 4(B)中频率-阻抗曲线上也可以发现，阻抗值也相应增大；从频率-相位曲线图上看，在频率范围为 10~1000 Hz 范围内，其相位也随着制备过程的进行而增大。这说明随着传感器制备过程的进行，微电极上不断增加新的生物材料，从而导致电极间的电子迁移活动不断受到阻碍，即电极的阻抗依次递增。因此可以通过阻抗测试来分析样品中毒死蜱的浓度。

3.2 叠加法检测毒死蜱的较优频率确定

由于阻抗测试仪器的测试频率从 1 Hz ~ 100 kHz，但考虑实际开发的仪器往往在某个频率下工作，为了今后开发的仪器与阻抗测试仪器比对方便，所以选择 1 Hz, 10 Hz, 100 Hz, 1 kHz, 10 kHz 和 100 kHz 等 6 个频率点。记录对应频率点下检测 PBS 以及 5 个浓度毒死蜱的阻抗值，并计算以 BSA 封闭为基准对应的阻抗差值，结果见表 1。

从表 1 中看出，随着扫描频率的增加，各个浓度下的毒死蜱(包括对照)的阻抗差值依次减小，其中从 10 Hz 到 100 Hz 这个范围内阻抗值减小最明显。同

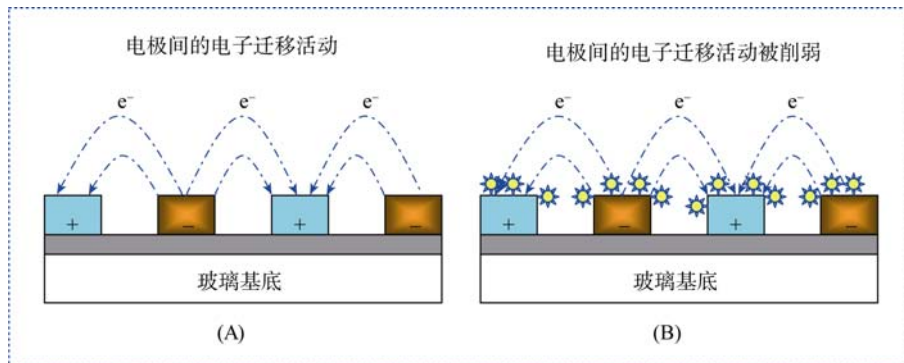


图 3 微电极阻抗生物传感器检测原理示意图

Fig. 3 Working principle of microelectrode impedance biosensor

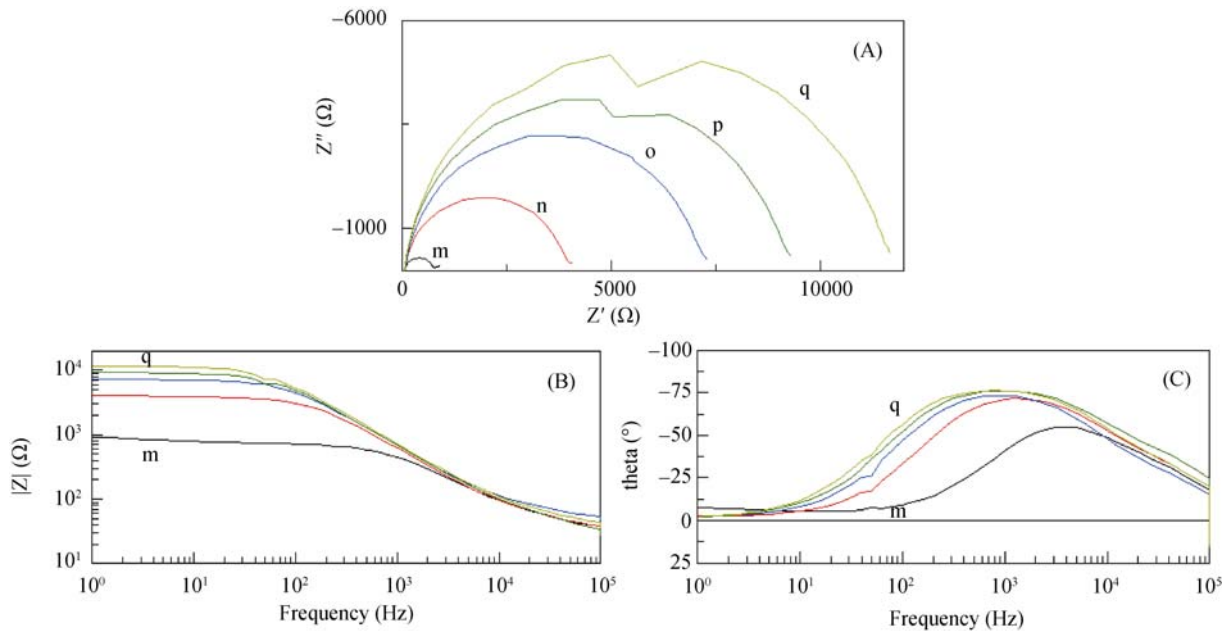


图 4 阻抗生物传感器制备过程的 Nyquist 图(A)和 Bode 图(B 和 C)。

(A) Nyquist 图, (B)阻抗-频率曲线, (C)相位-频率曲线。曲线 m-q 分别代表电极预处理, SPA 修饰, 抗体固定, BSA 封闭, 以及 1.214 μg/mL 毒死蜱阻抗检测过程。

Fig. 4 Nyquist (A) and Bode (B and C) diagram of impedance spectra of the fabrication procedure for biosensors (A) Nyquist, (B) impedance versus frequency, (C) phase versus frequency. Curves m-q represent the electrode cleaning, SPA modification, antibody immobilization, BSA blocking, and 1.2142 μg/mL chlorpyrifos, respectively.

表 1 不同频率下毒死蜱阻抗检测差值

Table 1 Impedance difference of chlorpyrifos samples under different frequencies

频率 (Hz)	PBS (对照)	12.142 ng/mL	121.42 ng/mL	1.214μg/mL	12.142μg/mL	121.42μg/mL
1	476.40	1455.80	2007.80	2376.80	2645.80	2868.80
10	463.00	1364.40	1862.40	2221.40	2479.40	2639.40
100	145.40	445.60	313.30	332.50	435.70	696.40
1 k	13.27	23.21	27.52	36.93	27.69	45.44
10 k	2.61	2.14	5.57	8.49	8.82	6.94
100 k	4.59	0.85	4.88	10.00	10.95	5.47

时, 在 1 Hz 和 10 Hz 频率下, 各个浓度的毒死蜱在微电极上引起的阻抗信号差值都很明显, 但由于 1 Hz 的检测时间比 10 Hz 要慢 10 倍左右。所以考虑到今后的研发仪器的检测时间以及硬件要求, 本文选定 10 Hz 作为检测毒死蜱的较优频率。

3.3 毒死蜱浓度与阻抗差值的回归模型

在选定测试频率 10 Hz 的基础上, 列出毒死蜱浓度与对应的阻抗差值就可以确定相应的回归模型。由于采用的是叠加法, 如果不考虑损耗, 所测阻抗信号对应是所有滴加在微电极上的毒死蜱累积总和。因此重新计算毒死蜱浓度与阻抗差值的关系就可以确定

叠加法得到的回归模型, 如图 5 所示。毒死蜱浓度在 0.01~100 μg/mL 范围内, 回归方程为: $Y = 136.4L_n(X) + 2075$, 相关系数 R^2 为 0.961。

4 结 论

本研究以毒死蜱为例, 对如何用叠加法获得阻抗检测的回归模型进行深入分析。由于在通常的生物传感器研究中, 往往采用已制备好的生物传感器测量样品的一个浓度, 然后重新处理电极表面进行新的测试, 这样容易导致生物传感器测量信号的一致性, 而叠加法可以避免这个问题。研究表明, 采

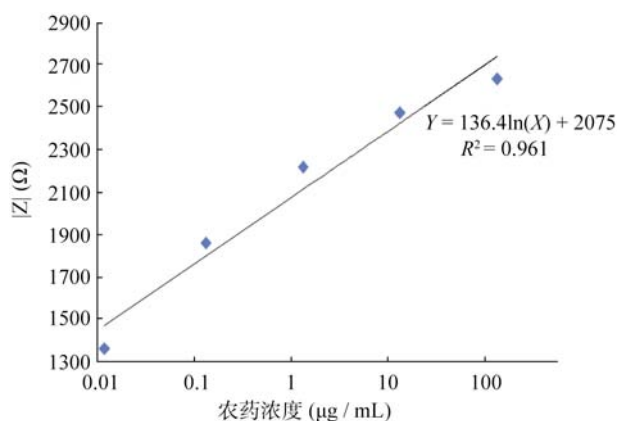


图5 毒死蜱浓度与阻抗差值的回归模型

Fig. 5 Regression model of concentrations of chlorpyrifos pesticide versus impedance difference

用 SPA 修饰的微电极阻抗生物传感器具有非常高的灵敏度, 可以检测 0.01 μg/mL 浓度毒死蜱。采用叠加法可以快速获得测量毒死蜱的回归模型, 毒死蜱浓度与阻抗差值的相关性高, 相关系数 R^2 为 0.961。同时, 获得了阻抗生物传感器检测毒死蜱的较优频率, 这为下一步研究开发快速检测农药残留的阻抗生物传感器打下坚实的基础。本叠加分析法可以用在其他生物传感器研究中, 可缩短测量时间、简化实验操作步骤和节省昂贵的试剂消耗。

参考文献

- [1] 陈林鹏. 仪器设备在食品检测中的应用及发展[J]. 食品安全质量检测学报, 2011, 2(5): 239-247.
- [2] 宋莹, 张耀海, 黄霞, 等. 气相色谱-串联质谱法快速检测水果中的多效唑残留[J]. 分析化学, 2011, 39(8): 1270-1273.
- [3] 蒋雪松, 应义斌, 王剑平. 生物传感器在农药残留检测中的应用[J]. 农业工程学报, 2005, 21(4): 118-122.
- [4] Nunes GS, Barcelo D. Electrochemical biosensors for pesticide determination in food samples [J]. Pestic anal, 1998, 26: 156-159.
- [5] 黄君冉, 盖玲, 叶尊忠, 等. 压电免疫生物传感器快速检测三唑磷农药[J]. 分析化学, 2010, 38(10): 1483-1486.
- [6] 蒋雪松, 王剑平, 叶尊忠, 等. 用于农药残留快速检测的压电免疫生物传感器的研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(06): 189-192.
- [7] 王丰, 府伟灵. 电化学阻抗谱在生物传感器研究中的应用进展[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(3): 549-552.
- [8] 蒋清锋. 基于电化学阻抗免疫生物传感器的抗生素残留的检测[D]. 浙江大学, 2007.
- [9] 薛瑞, 康天放, 鲁理平. 层层自组装纳米金与乙酰胆碱酯酶电化学生物传感器检测有机磷农药[J]. 分析测试学报, 2012, 31(8): 940-944.
- [10] Varshney M, Li YB. Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells [J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24: 2951-2960.
- [11] Yang LJ, Bashir R. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria [J]. Biotechnol Adv, 2008, 26: 135-150.
- [12] Settingington EB, Alcolija EC. Electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of magnetically extracted bacterial pathogens [J]. Biosensors, 2012, 2: 15-31.
- [13] 周玲, 王明华, 王剑平, 等. 传感器表面的适配体固定方法及其在生物传感器中的研究进展[J]. 分析化学, 2011, 39(3): 432-438.
- [14] 裴仁军, 胡继明, 胡毅, 等. 蛋白 A 定向固定抗体的纤维蛋白压电免疫传感器的研究[J]. 高等学校化学学报, 1998, 19(3): 363-367.
- [15] 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]. 浙江大学, 2008.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



叶尊忠, 讲师, 研究方向: 农产品安全快速检测生物传感器技术以及仪器。

E-mail: zzye@zju.edu.cn



应义斌, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 农产品品质与安全快速检测技术和智能化装备。

E-mail: ybying@zju.edu.cn