

Electrochemical Immunosensor for Rapid Detection of Anti-AIV H_5N_1 Based on Four Channels Screen-Printed Carbon Electrode *

ZHAO Guang-ying^{*}, WU Shu-chun

(College of Food Science and Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University,
Food Safety Key Lab of Zhejiang Province, Hangzhou 310035, China)

Abstract: A novel electrochemical immunosensor for detection of antibodies against avian influenza virus H_5N_1 (anti-AIV H_5N_1) based on the four channels screen-printed carbon electrode (4-SPCE) coated with chitosan Au colloid membrane and AIV has been developed in the experiment. Then the immunosensor was characterized by cyclic voltammetry (CV). Whether anti-AIV H_5N_1 could be detected according to the shift of reduction current while CV was used as electrochemical means to detect the products of the enzymatic reaction. Under the optimum experimental conditions, the value of the response current increase percentage (K) was used to distinguish samples: $K < 20\%$, negative samples; $20\% < K < 30\%$, suspicious samples; $K > 30\%$, positive samples. The immunosensor had acceptable specificity, reproducibility, stability and accuracy. Furthermore, the 4-SPCE showed much more consistent compared with the classical electrodes. Therefore, effective prevention and control of avian influenza could be supplied by the immunosensor.

Key words: amperometric immunosensor; rapid detection of antibodies against avian influenza virus; cyclic voltammetry; four channels screen-printed carbon electrode

EEACC:7230J

基于四通道丝网印刷碳电极的禽流感 (H_5N_1) 抗体电化学免疫传感器的研制 *

赵广英^{*}, 吴淑春

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江省食品安全重点实验室, 杭州 310035)

摘要: 研制快速检测禽流感 (H_5N_1) 抗体的四通道丝网印刷碳电极电化学免疫传感器是采用循环伏安法表征免疫电极和监测酶促反应, 利用还原电流的变化率来测定禽流感抗体。在优化的实验条件下, 设定判定标准如下: $K < 20\%$ 为阴性; $20\% < K < 30\%$ 为可疑样品; $K > 30\%$ 为阳性。该免疫传感器具有较好的选择性、重现性、稳定性和准确性。采用 4-SPCE 提高了免疫电极的精确性。因此, 该免疫传感器有望用于禽类的宰前检疫, 为禽流感的有效防控提供了新方法。

关键词: 电流型免疫传感器; 快速检测禽流感 (H_5N_1) 抗体; 循环伏安法; 四通道丝网印刷碳电极

中图分类号: TP212.3

文献标识码: A 文章编号: 1004-1699(2008)08-1295-06

由禽流感病毒 H_5N_1 亚型 (Avian influenza virus H_5N_1 , AIV H_5N_1) 引起的高致病性禽流感 (Highly pathogenic avian influenza, HPAI) 是一种危害严重的传染性疾病, 因其传播快、危害大, 世界动物卫生组织 (OIE) 将其列为 A 类疾病, 我国将其

列为一类动物疫病。其传播对象不仅是禽类, 还有人、猪、马、海洋哺乳动物等^[1]。该病自 1878 年在意大利首次报道以来, 禽流感疫区不断蔓延, 目前世界许多国家和地区均有暴发和流行^[2], 不仅带来巨大经济损失, 还威胁人类健康。禽流感病毒抗体的检

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571623); 浙江省食品质量安全重点实验室开放项目资助 (Z04-179); 浙江省重中之重项目资助 (Z05-178)

收稿日期: 2007-12-10 修改日期: 2008-04-13

测,是该病检疫、疫情监控和免疫效果评定的必备方法。目前,禽流感主要检测方法为琼脂凝胶扩散试验(AGP)^[3-4]、免疫荧光技术(IFTr)^[4-5]、ELISA^[6-7]、RT-PCR^[8-10]和依赖核酸序列的扩增技术(NASBA)^[11-12]等,这些方法虽各具优点,但在快速、特异、经济、简便易行等方面还不理想,探求更好的快速检测方法仍是目前的研究热点和发展趋势。

1990年Henry提出了免疫传感器的概念^[13]。电化学免疫传感器(Electrochemical immunosensor, ECIS)作为一种多学科交叉的高新检测技术,经国内外众多学者的潜心研究,已取得许多研究成果。由于ECIS具有简便易行、灵敏度高^[14],所用仪器设备相对简单等优点,现已成为医学、动物医学、环境和食品安全等领域快速检测技术的研究热点和前沿,具有重要的研究价值和广泛的应用潜力^[15]。但报道的ECIS尚存在诸如电极较贵、难以批量生产、重现性较差、阴阳性电流响应曲线的离散度不够明显等不足^[16],这些关键技术问题桎梏了ECIS的实际应用。

本文采用四通道丝网印刷碳电极(Four channels screen-printed carbon electrode, 4-SPCE)作为支持电极,用壳聚糖金胶膜辅助修饰生物活性元件于电极上,利用其能放大电化学反应信号,增强阴阳性电流响应曲线的离散度,制备了可用于禽流感(H₅N₁)抗体(Antibodies against avian influenza virus H₅N₁, anti-AIV H₅N₁)快速测定的一次性电流型免疫传感器。研制出的anti-AIV免疫传感器具有检测操作简单,响应迅速,特异性、重现性和稳定性都好,一次性使用,可批量生产等优点,有望应用于禽流感宰前检疫、疫情监控和免疫效果评定。经查阅文献发现目前还未见有关禽流感电流型免疫传感器的研究报道。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

CHI 1030 电化学工作站(上海辰华仪器公司);四通道丝网印刷碳电极(4-SPCE,南京天鼎生物技术有限公司,浙江工商大学食品安全重点实验室);禽流感H₅N₁型抗原(AIV)和禽流感H₅N₁型抗体(anti-AIV,中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、青岛国家外来动物检验检疫中心);辣根过氧化物酶标兔抗鸡抗体(兔抗鸡IgG/HRP,北京骏腾兴业生物科技有限公司);牛血清白蛋白(BSA,华美生物工程有限公司);高纯氮(含量99.999%,杭州今工特种气体有限公司);金氯酸(分析纯,上海试剂一厂);壳聚糖

(上海伯奥生物科技有限公司);硫堇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);30% H₂O₂(分析纯,中外合资上海远大过氧化物有限公司);磷酸盐缓冲生理盐水(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4)^[17];醋酸缓冲溶液(HAc-NaAc, 0.1 mol/L, pH 7.0)^[18];其余试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水,所有溶液均充N₂ 5 min 除氧以消除干扰。

1.2 四通道丝网印刷碳电极

丝网印刷碳电极具有制备简单、低成本、便携和易于批量生产等优点^[19-20]。本研究采用丝网印刷工艺制备三电极体系4-SPCE,工作电极为碳电极,参比电极为银/氯化银电极,对电极为碳电极(示意图见图1)。首先在0.2 mm厚的PVC薄膜上印刷银导电轨道,其宽度为1.3 mm,各导电轨道间的间距为3 mm;然后用银浆印刷大头针状为参比电极;接着用碳浆印刷碳电极,其中直径3 mm的圆盘为工作电极,而大头针状的为对电极;最后印刷绿色油墨作为绝缘层,仅露出六电极部分与连接处。每次印刷后将电极浸入KCl溶液中,利用溶液中的Cl⁻自然卤化将电极中裸露的银层部分电化学氧化成氯化银,形成Ag/AgCl参比电极。

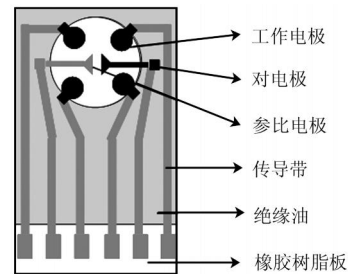


图1 四通道丝网印刷碳电极示意图

本研究将该4-SPCE代替传统的金属、玻碳等单电极,可同时平行检测四份样品,克服了检测和免疫反应干扰因素不一致性问题。另外该电极还具有所需时间短、样品消耗少等突出优点,使得基于该电极的免疫传感器具有更大的研究前景。

1.3 壳聚糖金胶的制备

纳米金(Nano-Au)作为一种功能型材料,具有比表面积大、小尺寸效应、生物相容性好、量子效应和良好的电子传递能力^[21]等优点,被广泛应用于生物传感器的制备^[22-24]。目前,纳米金经典制备方法为柠檬酸钠还原法^[25]。然而,壳聚糖同样具备还原金氯酸的功能,并且自身为良好的生物分子固定载体,含有丰富的亲水性氨基和羟基^[26-27],具有易成膜^[28]、化学惰性、无毒、低成本和良好的生物相容性^[29]等优点。因此,本实验采用壳聚糖代替柠檬酸钠还原金氯酸来制备功能性材料——壳聚糖金胶。

制备方法按照文献[30]进行。

1.4 免疫电极的制备

将壳聚糖金胶与 AIV 溶液(375 ng/mL)等体积充分混合,于 4 放置过夜;取 3.0 μ L 混合液滴涂于工作电极表面,并于室温下干燥成膜 3~4 h;将干燥后的免疫电极置于含 0.2% BSA 的 PBS 溶液中搅拌洗涤 1 h,用以封闭电极表面的非特异性吸附位点。制得的免疫电极于 4 , pH 7.4 PBS 溶液中保存备用。

1.5 实验方法

检测采用三电极体系:四通道免疫电极为工作电极,碳电极为对电极,Ag/AgCl 电极为参比电极。以循环伏安法(CV)和差分脉冲法(DPV)为免疫电极表征和定性判定的方法。测试底液为 1 mmol/L 硫堇 + 0.40 mmol/L H₂O₂ + HAc-NaAc 缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 7.0),测试温度为室温。制得的免疫电极在 anti-AIV 溶液(1.3 mg/mL)中 20 孵育 10 min 后,用 PBS-T(含 0.5% Tween 的 PBS 溶液)搅拌洗涤三次,每次 5 min,而后用二蒸水仔细清洗,晾干,用 CV 法测得还原峰电流 I_{p1} ;接着将免疫电极置于酶标抗体(兔抗鸡 IgG/HRP)溶液中 30 孵育 30 min,同上洗涤,用 CV 法测得还原峰电流 I_{p2} 。以 $K = (I_{p2} - I_{p1}) / I_{p1} \times 100\%$ 判定血清中是否含有禽流感抗体。

2 结果与讨论

2.1 4-SPCE 的一致性

SPCE 的一致性是影响检测重复性的重要因素,为满足电极一致性要求,本实验设计了 4-SPCE。以硫堇作为氧化还原探针,实验采用 CV 对 4-SPCE 进行组内和组间一致性测试。随机抽取 9 个 4-SPCE 进行一致性测试,结果还原峰电流 I_{pc} 为 $-1.928 \pm 0.041 \mu A$ (RSD = 2.11%);还原峰电位 E_{pc} 为 $-0.343 \pm 0.0024 V$ (RSD = 0.70%),见图 2。由此可得出,4-SPCE 具有较好的组内和组间一致性和重现性,这为免疫电极的精确性提供保障。

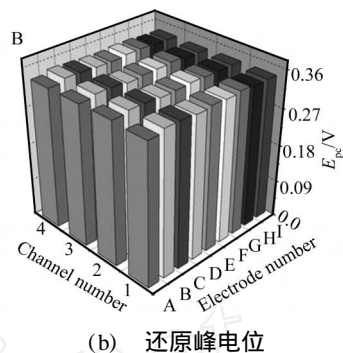
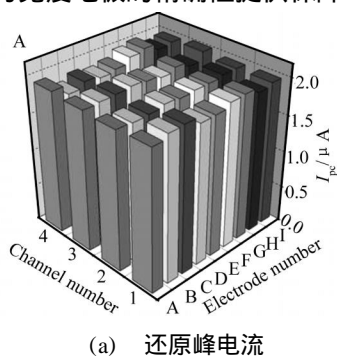


图 2 4-SPCE 一致性分析

2.2 传感器的电化学信号

图 3 是不同电极在含有 0.40 mmol/L H₂O₂ 和 1.0 mmol/L 硫堇的 HAc-NaAc 缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 7.0)中的循环伏安表征。在 0.1 V/s 的扫速下,裸电极出现一对稳定的硫堇氧化还原峰(曲线 a)。曲线 b 为免疫电极在测试底液中的循环伏安行为,其氧化还原峰信号有所增强,这是由纳米金的信号放大作用引起的;经 BSA 孵育后的免疫电极在硫堇溶液中的氧化还原峰几乎不变(曲线 c)。d 曲线是免疫电极在 anti-AIV 阳性血清中孵育后,所出现的氧化还原峰,峰电流也变化不大。再将测试电极与酶标抗体孵育后,免疫电极还原峰电流明显增强(曲线 e)。这表明电催化过程是由标记在兔抗鸡抗体上的 HRP 引起的,免疫电极与禽流感抗体发生特异性免疫反应,且酶标兔抗鸡抗体成功地与禽流感抗体结合。

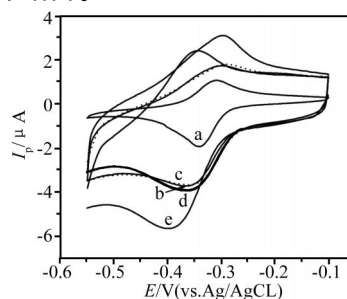


图 3 不同电极在 HAc-NaAc + 1.0 mmol/L 硫堇 + 0.40 mmol/L H₂O₂ 溶液中的循环伏安行为:

- 裸电极
- 免疫电极,即修饰上抗原的电极,比 a 的峰大
- 封闭后的免疫电极 + BSA 和 b 的变化不大
- c + 阳性血清,结合抗原的免疫电极,变化不明显。为易于阴、阳性的鉴别,加上 e 的酶标抗体(二抗),见 e;
- e + 酶标抗体,阳性血清能够结合酶标抗体,反应后还原电流明显增强,而阴性血清被洗掉,不能结合酶标抗体,还原电流就不会出现明显增强。

图 4 为免疫电极在不同扫描速率的循环伏安曲线。从图中可以看出,随着扫描速率的增加,氧化还原

峰电流不断增大,氧化峰电位发生轻度的正向偏移,还原峰电位发生轻度的负向偏移(图 4a);且峰电流与扫描速率的平方根呈现出较好的线性关系(图 4b),表明硫堇在电极上的氧化还原反应受表面扩散控制。

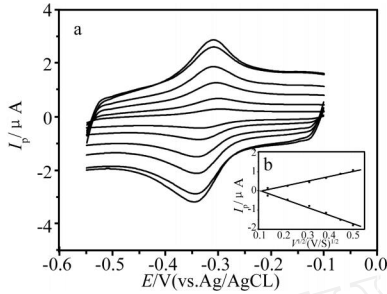


图 4 免疫电极在不同扫描速率下的循环伏安曲线:(a) 0.01,0.02,0.05,0.1,0.15,0.2,0.25 V/s(从内到外); (b) 扫描速率与氧化还原峰电流之间的线性关系

2.3 免疫检测条件的优化

2.3.1 壳聚糖金胶膜中 AIV 量的确定

壳聚糖金胶膜中 AIV 量的确定是由差分脉冲伏安法表征的,以 $I = I_{p2} - I_{p1}$ 表示不同抗原包埋量时修饰电极的电流响应,其中 I_{p1} , I_{p2} 分别是电极修饰前后的 DPV 峰值。

从图 5 中可以看出,在一定范围内随着 AIV 与壳聚糖纳米金胶的混合比例增大, I 减小,当 AIV 与壳聚糖金胶的混合比例为 1:9 ($C_{AIV} = 0.10$) 时, I 达到最小值,然后随比例增大而基本保持不变。故本实验选择 AIV 与壳聚糖金胶的混合比例为 1:9。

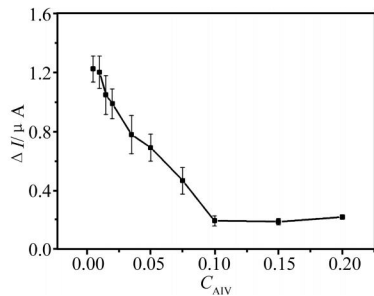


图 5 壳聚糖金胶膜中 AIV 量的确定

2.3.2 孵育条件的选择

温度对免疫反应有着显著影响,在 15~40 孵育温度范围内,实验选定 20 为禽流感抗原抗体对的孵育温度,30 为禽流感抗体与酶标兔抗鸡 IgG 的孵育温度。孵育时间也是影响免疫反应的一个重要因素。选择 10、20、30、40 和 50 min 作为孵育时间进行实验,结果表明,AIV 抗原抗体对的孵育最佳时间为 10 min,禽流感抗体与酶标兔抗鸡 IgG 的孵育时间为 30 min。

2.3.3 酶标抗体用量的确定

在一定条件下,结合到电极上的酶越多,越有利于电化学检测信号的放大。试验中,考察了酶标抗体

(兔抗鸡 IgG/HRP) 从稀释比 1:200~1:4 之间的 K 值(图 6)。结果表明大于 1:10 稀释比后 K 值不再明显增大,故试验均采用此浓度的兔抗鸡 IgG/HRP。

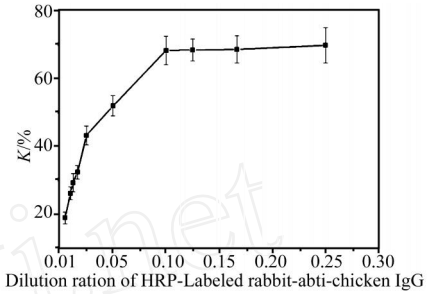


图 6 酶标抗体用量与还原峰电流变化率之间的关系

2.3.4 过氧化氢量的确定

过氧化氢浓度对酶催化反应的影响如图 7 所示。当醋酸溶液中硫堇的浓度为 1.0 mmol/L,随着溶液中过氧化氢浓度的增加,还原峰电流相应增大,并在 0.40 mmol/L 后趋于稳定。本实验采用 0.40 mmol/L 过氧化氢作为免疫电极的检测浓度。

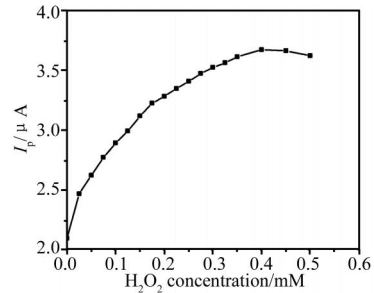


图 7 H₂O₂ 浓度与还原峰电流之间的关系

2.3.5 测试底液 pH 的选择

溶液的酸度是影响酶活性的重要因素。大多数酶只有在一定 pH 值范围环境中才能表现出良好的活性。试验考察了不同 pH 值下,酶对过氧化氢和硫堇的催化情况(图 8)。在含有 1.0 mmol/L 硫堇,0.40 mmol/L 过氧化氢的底物溶液中,免疫传感器在 pH 值 7.0 时出现最大的峰电流,这表明在此 pH 值左右酶的活性达到最大。故本研究选 pH 7.0 作为酶最佳催化反应的酸度。

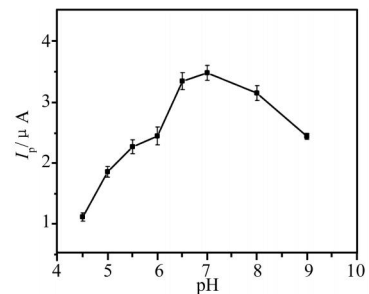


图 8 底液 pH 值与还原峰电流之间的关系

2.4 免疫电极的选择性

为确定免疫电极检测 AIV 的阴阳性判定标准,

采用以下实验方案:

免疫电极检测 anti-AIV 阳性血清和阴性血清

免疫电极检测 anti-AIV 阳性血清时,其峰电流的下降百分比 K 为 65.65%,RSD 为 7.78%,而免疫电极检测鸡阴性血清时峰电流下降百分比 K 为 16.25%,RSD 为 10.90%,如图 9。

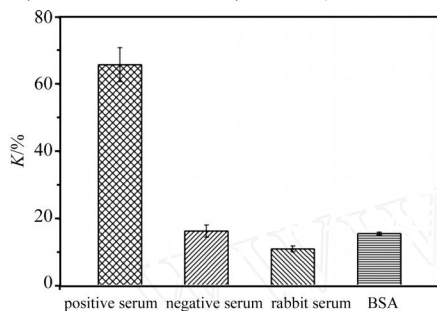


图 9 免疫电极特异性

干扰实验

抗干扰性是衡量免疫电极性能好坏的一个重要指标。实验中选取 BSA,兔血清进行杂蛋白干扰试验,其结果为免疫电极检测 BSA, $K = 15.50%$, $RSD = 2.94%$;检测兔血清 $K = 10.94%$, $RSD = 7.68%$ 。说明该免疫电极具有良好的抗干扰能力,表现出较好的特异性,因此我们可以根据 K 来判定 AIV 阴阳性。综合上述因素,实验初步设定 AIV 阴阳性判定标准为:

$$K \begin{cases} < 20\%, & \text{阴性;} \\ 20\% < K < 30\% & \text{可疑样品;} \\ 30\%, & \text{阳性。} \end{cases}$$

2.5 准确性

为了进一步证明 anti-AIV 阴阳性判定标准的可行性,实验采用免疫电极检测 28 份样品,并与琼脂糖扩散(A GP)实验比较,部分结果见表 1。

表 1 免疫电极准确性测定的部分结果 ($n = 28$)

Method		Sample								
		2	5	9	13	16	18	22	25	27
Immuno sensor	K/ %	65.47	20.83	67.41	15.88	15.75	62.39	28.45	15.58	58.56
	Result	+	+	+	-	-	+	+	-	-
A GP		+	-	+	-	-	+	-	-	-

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

在琼脂糖扩散实验检测为阴性的 14 例中,免疫电极检测出 12 例为阴性,2 例为可疑,出现假阳性,符合率为 85.71% (12/14)。在琼脂糖扩散实验检测为阳性的 14 例中,免疫电极检测出 14 例为阳性,符合率为 100% (14/14),两法基本相符。表明该免疫电极具有较好的准确性和区分效果,可初步用于 anti-AIV 的快速检测。

2.6 重现性和稳定性

分别取不同批次制备的免疫电极对同一浓度的禽流感抗体阳性血清进行检测,测定结果 $RSD = 2.48%$ ($n = 6$),表明免疫电极具有良好的重现性。将免疫电极于 $4 \text{ pH } 7.4$ PBS 溶液中放置 11 d,其响应电流为初始电流的 89% ($n = 6$),表明免疫具有良好的稳定性。

3 结论

本文以四通道丝网印刷碳电极为基础电极,用壳聚糖金胶膜将 AIV 修饰到电极表面上,从而制得一次性禽流感(H₅N₁)抗体免疫传感器。以 $K = (I_{p2} - I_{p1}) / I_{p1} \times 100\%$ (即酶免疫反应前后还原电流的增加率)来判定血清中是否含有禽流感抗体。在优化的实验条件下,该免疫传感器不仅保留了以往免疫传感器诸如敏感、特异、快速等优点,还很大程度上克服了如

前言中所述的诸多桎梏其实际应用的关键技术问题,具有经济、简便、可一次性使用和批量生产、较好的重现性和稳定性、与常规检测方法的符合率较高等优点,由此可知,该免疫传感器可用于禽类活体血清中 anti-AIV 的检测,有望成为疫情监测、疫病检验和免疫效果评价等的一种新型快捷技术。

参考文献:

- [1] Lau L T, Banks J, Aherne R. et al. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Methods to Detect Avian Influenza Virus [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 313: 336-342.
- [2] Alexander D.J. A Review of Avian Influenza in Different Bird Species[J]. Veterinary Microbiology, 2000, 74: 3-13.
- [3] 邓振旭. 禽流感病毒检测技术的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(12): 2740-2741.
- [4] 李文涛, 杨利峰, 王宏伟, 等. 禽流感监测技术综述[J]. 中国动物检疫, 2005, 22(6): 41-43.
- [5] 邹冬辉, 梁基, 王伟利. 荧光 RT-PCR 技术与古典病原分离技术检测 AIV 比较试验[J]. 中国动物检疫, 2004, 21(9): 25-28.
- [6] 蔡剑平, 肖尧, 周晓阳. 禽流感病毒的生物学特性及其实验室检测[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(3): 232-234.
- [7] Huang H L, Dan H B, Zhou Y J, et al. Different Neutralization Efficiency of Neutralizing Monoclonal Antibodies Against Avian Influenza H₅N₁ Virus to Virus Strains from Different

- hosts[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44: 1052-1055.
- [8] 张鹤晓, 赖平安, 刘环, 等. 荧光 RT-PCR 检测活禽和禽组织中禽流感病毒的研究[J]. *检验检疫科学*, 2004, 14(1): 1-5.
- [9] Xie Z X, Pang Y S, Liu J B, et al. A Multiplex RT-PCR for Detection of Type A Influenza Virus and Differentiation of Avian H5, H7, and H9 Hemagglutinin Subtypes[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2006, 20: 245-249.
- [10] Ke G M, Cheng H L, Ke L Y, et al. Development of a Quantitative Light Cycler Real-Time RT-PCR for Detection of Avian Reovirus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 133: 6-13.
- [11] Collins R A, Ko L S, So K L, et al. A NASBA Method to Detect High and Low-Pathogenicity H5 Avian Influenza Viruses[J]. *Avian Diseases*, 2003, 47: 1069-1079.
- [12] GB/T 19440-2004, 禽流感病毒 NASBA 检测方法[S].
- [13] 邢丰峰, 赵广英. 免疫传感器在食品检测中的应用及相关思考[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(3): 98-99.
- [14] 蔡强, 何苗, 施汉昌. 电化学免疫传感器在环境污染监测中的研究进展[J]. *传感技术学报*, 2004, 3: 526-530.
- [15] 温志立, 汪世平, 沈国励. 免疫传感器的发展概述[J]. *生物医学工程学杂志*, 2001, 18(4): 642-646.
- [16] 陈汉忠, 蒋金书. 微型电化学免疫传感器的研制及初步应用[J]. *分析化学*, 2004, 32(7): 958-960.
- [17] 朱产平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003, 454-455.
- [18] Zhao G Y, Xing F F, Deng S P. A Disposable Amperometric Enzyme Immunosensor for Rapid Detection of *Vibrio Parahaemolyticus* in Food Based on Agarose/Nano-Au Membrane and Screen-Printed Electrode[J]. *Electrochemistry Communications*, 2007, 9: 263-268.
- [19] O'Halloran M P, Pravda M, Guilbault G G, et al. Prussian Blue Bulk Modified Screen-Printed Electrodes for H_2O_2 Detection and for Biosensors[J]. *Talanta*, 2001, 55(3): 605-611.
- [20] Palchetti I, Cagnini A, Carlo M D, et al. Determination of Anticholinesterase Pesticides in Real Samples Using a Disposable Biosensor[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1997, 337(3): 315-321.
- [21] Liang R P, Qiu J D, Cai P X. A Novel Amperometric Immunosensor Based on Three-Dimensional Sol-Gel Network and Nanoparticle Self-Assemble Technique[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 534: 223-229.
- [22] 王丽江, 陈松月, 刘清君, 等. 纳米技术在生物传感器及检测中的应用[J]. *传感技术学报*, 2006, 19(3): 581-587.
- [23] 徐肖邢, 王升富. 纳米金修饰电流型 CA19-9 免疫传感器的制备及应用[J]. *分析实验室*, 2005, 24(12): 68-71.
- [24] 赵广英, 邢丰峰. 基于琼脂糖和纳米金的电流型免疫传感器快速检测副溶血性弧菌[J]. *传感技术学报*, 2007, 20(8): 57-61.
- [25] 刘恒权. 金、银纳米材料的光化学、化学和电化学制备与表征[D]. 天津: 天津大学, 2003.
- [26] Huang R Y M, Moon G Y, Pal R. Chitosan/Anionic Surfactant Complex Membranes for the Pervaporation Separation of Methanol/MTBE and Characterization of the Polymer/Surfactant System[J]. *Journal of Membrane Science*, 2001, 184(1): 1-15.
- [27] Wang G, Xu J J, Chen H Y, et al. Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor with Sol-Gel/Chitosan Network-Like Film as Immobilization Matrix[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2003, 18(4): 335-343.
- [28] Miao Y, Tan S N. Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor with Silica Sol-Gel/Chitosan Film as Immobilization Matrix[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 437(1): 87-93.
- [29] 王丽荣, 杨丽珠, 曾艳, 等. 壳聚糖在分析化学中的应用[J]. *分析科学学报*, 2004, 20(5): 542-545.
- [30] Huang H Z, Yang X R. Synthesis of Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles in the Absence/Presence of Tripolyphosphate[J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5: 2340-2346.



赵广英(1960-),女,教授,硕士研究生导师。主要研究领域是食品质量安全快速检测、动物及人兽共患病源微生物检验及传染病防治。主持和参加过国际合作项目、国家自然科学基金项目、国家863计划项目等8项科研项目。获得过国家科技进步三等奖、部级科技进步二等奖、三等奖各一项。发表论文40余篇,出版教材7本,其中主编2本, zhaogy-user @163.com