doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2014.03.040

布鲁氏菌抗体的无标记电流型免疫传感器检测*

杨　威[1]　左月明[1]　吴海云[2]　张志勇[1]　张　蓉[3]　陈　晨[1]

(1.山西农业大学工学院，太谷 030801；2.天津农学院机电工程系，天津 300384；3.山西农业大学园艺学院，太谷 030801)

摘要：为提高布鲁氏菌抗体检测的检测限及灵敏度，并适应定量、快速的测定要求，以便早期发现病畜，减少经济损失，采用丝网印刷金电极表面修饰巯基乙胺绑定抗原的方法，研制了一种一次性免疫传感器。通过循环伏安法表征免疫电极的反应过程，发现布鲁氏菌抗体在10^{-5}～10^{-3} IU/mL浓度范围内，氧化峰电流的变化值(ΔI_{pa})与抗体的浓度呈良好的线性关系，其相关系数$r=0.999\,9$，检测下限为2.8×10^{-5} IU/mL。将测定的循环伏安曲线进行半微分变换，建立半微分变化值(Δe_{pa})与浓度的关系，在10^{-5}～10^{-3} IU/mL浓度范围内，半微分氧化峰电流的变化值与浓度呈线性关系，相关系数$r=0.992\,9$，检测下限为2.7×10^{-6} IU/mL，且在10^{-2}～1 IU/mL浓度范围内，半微分氧化峰电流的变化值与浓度的相关系数$r=0.999\,2$。表明半微分变换可以明显改善其检测范围和检测下限。

关键词：布鲁氏菌抗体　免疫传感器　丝网印刷金电极　循环伏安法　半微分

中图分类号：TP212.3；TP212.9　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1000-1298(2014)03-0243-07

引言

布鲁氏菌病(Brucellosis)是由布鲁氏菌(brucella)感染引起的人畜共患性传染病[1-2]。布鲁氏菌感染人群常出现高烧、盗汗、关节炎、心内膜炎、不孕等症状[3]。家畜常表现为流产、死胎、不孕等，给农业生产带来损失。目前对该病的诊断多采用细菌学和血清学方法。细菌学检测方法可靠、准确，但所需时间比较长，因而血清学检测方法对布鲁氏菌病有着不可替代的优势。血清学检测方法主要有试管凝集试验(SAT)、平板凝集试验(PAT)、虎红平板凝集试验(RBPT)、补体结合试验(CFT)、酶联免疫吸附试验(ELISA)等[4-5]。传统的凝集试验适用于家畜布病初筛试验。RBPT属于定性的检测，简单易行，是现场大规模初筛布病的方法。CFT操作程序复杂，参与反应的要素多，不适宜在基层推广应用[6]。ELISA比所有其他血清学反应具有高得多的敏感性和特异性，检测为阴性的cut-off值为20 IU/mL[7]，但由于试验条件要求高，操作较繁琐，不宜用作布病的快速诊断，也不宜向基层推广以及进行现场检测[8]。同时并不是所有感染的动物都出现具有诊断意义的抗体水平[9]。因此，能够实现快速检测低浓度抗体，对早期诊断布鲁氏菌病具有重要意义。

近年来为了改善对布鲁氏菌抗体检测的检测限及灵敏度，以便提早发现病畜，减少经济损失，方便、快速的电化学方法成为一种重要检测手段[10]，同时结合丝网印刷电极技术制成的传感器，由于相对便宜，使用简单，已备受人们关注。丝网印刷电极是一种理想的用于微量样品检测的电极，可应用在传感器制作中，易于实现微量、快速的检测[11]。本文建立一种基于丝网印刷金电极、用于检测布鲁氏菌特异性抗体的电化学免疫传感器，试图基于凝集试验这一标准方法实现对布鲁氏菌抗体的微量检测，为布鲁氏菌病的早期、快速诊断建立更加有效的途径。

1　试验

1.1　仪器与试剂

主要试验仪器：CHI760C电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)；隔水式恒温培养箱(GSP-9270MBE型，上海博讯实业有限公司医疗设备厂)；电子分析天平(BSA124S型，德国Sartorius公司)；旋窝混匀器(MS3型，德国IKA公司)；加热磁力搅拌器(RCT Basic型，德国IKA公司)；超纯水机(NW30VM型，力康生物医疗科技控股有限公司)；pH酸度计(PB-10型，德国Sartorius公司)；丝网印

收稿日期：2013-10-07　修回日期：2013-11-26

*国家自然科学基金资助项目(30871445)、高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20121403110002)和山西省回国留学人员资助项目(2013-061)

作者简介：杨威，博士生，主要从事智能检测与传感器技术研究，E-mail：2000yw99@sina.com

通讯作者：左月明，教授，博士生导师，主要从事智能检测、传感器与测控技术研究，E-mail：zyueming88@aliyun.com

刷金电极(X250BT 型,西班牙 DropSens 公司)。

主要试剂:布鲁氏菌病试管凝集试验抗原和布鲁氏菌标准阳性血清由中国兽医药品监察所提供;巯基乙胺(Sigma-Aldrich 公司)、25% 戊二醛(Sigma 公司)、牛血清白蛋白(BSA)(Roche 公司)、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、铁氰化钾、亚铁氰化钾、氯化钾、氯化钠、乙醇购买于上海阿拉丁试剂有限公司,所有化学试剂均为分析纯,所有溶液均用经过高压灭菌的超纯水(18.2 MΩ·cm)配制。

1.2 布鲁氏菌抗原、抗体准备

布鲁氏菌阳性血清(抗体)用磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS, 10 mmol/L, pH 值 7.4)梯度稀释成浓度为 10^{-6} IU/mL、10^{-5} IU/mL、10^{-4} IU/mL、10^{-3} IU/mL、10^{-2} IU/mL、10^{-1} IU/mL、1 IU/mL 和 10 IU/mL 的抗体溶液。布鲁氏菌抗原用 PBS 稀释成浓度为 4×10^{9}CFU/mL 的抗原液。为了避免污染,抗原和抗体的稀释与分装过程在超净工作台中完成。

1.3 电极预处理

为了清除金电极表面可能存在的氧化物,保持电极表面清洁干净[12],吸取 50 μL 的 0.5 mol/L 硫酸均匀地滴涂于裸电极表面,在 -0.1 ~ 1.5 V 的电压范围内进行循环伏安法(Cyclic voltammetry, CV)扫描,直到稳定的循环伏安图出现。

1.4 免疫电极制备

取 50 μL 的 10 mmol/L 巯基乙胺乙醇溶液修饰工作电极,室温密闭环境中静置 2 h 后取出,分别用乙醇和超纯水清洗 2 次,以去除电极表面未结合的巯基乙胺[13]。将 2.5% 的戊二醛溶液滴涂到电极上,37℃恒温湿盒中反应 1 h 取出,用 PBS 和超纯水分别充分清洗 2 次,以去除未结合的戊二醛。吸取 10 μL 浓度为 4×10^{9} CFU/mL 的抗原滴涂于修饰后的工作电极表面,37℃恒温湿盒中静置 2 h 取出,用 PBS 和超纯水清洗。用 1% 的 BSA 溶液滴涂到电极表面,以封闭未反应的非特异性位点[14],在 37℃恒温湿盒中静置 1 h 后,用 PBS 和超纯水清洗,去除未结合的 BSA。最后将得到的免疫电极放置在 4℃冰箱中保存备用。

1.5 检测方法

试验中所用的 X250BT 型丝网印刷金电极是三电极体系,即:工作电极为直径 4 mm 的金电极;银电极为参比电极;铂电极为对电极,电极图参见文献[11]。该一次性丝网印刷电极可避免对固体电极费时费力的打磨抛光,具有易于实现免疫传感器快速检测的特点。文献[15]中报道,电极若经过适当处理,还可重复使用。本研究用循环伏安法考察电极表面不同状态时的电化学特性,同时将建立免疫传感器氧化峰电流的变化值($I_{pa(BSA)}-I_{pa(Ab)}$)与待测抗体浓度之间的关系,并作为定量判定抗体浓度的方法,从而实现对布鲁氏菌抗体的定量检测。测试在 -0.3 ~ 0.6 V 的电压范围内,0.1 V/s 的速率条件下进行 CV 扫描。在测试的过程中用 $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 溶液(2.5 mmol/L $K_4[Fe(CN)_6]$ + 2.5 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ + 0.1 mol/L KCl + 10 mmol/L PBS)作为支持电解液,全部测试在室温下进行。

本试验采用了同一电极依次修饰不同浓度抗体的方法。将所测定的抗体溶液由低浓度到高浓度依次叠加到电极上,每叠加一次对电极进行一次测量。该方法的测试误差要低于重新修饰电极带来的误差[16]。这是由于从理论上来说相邻 2 份抗体溶液的浓度相差 10 倍以及抗原-抗体在一定时间和浓度下反应量是一定的,所以免疫反应时,对于每一次修饰,免疫电极表面结合的抗体数量及电极表面状况是不同的。从而不仅保证了电信号的差别,更重要的是能显著减小多次洗脱给免疫传感器带来的误差。

2 结果与讨论

2.1 电极预处理过程的表征

在电极表征的过程中,氧化峰与还原峰电位差值(ΔE_p)、氧化峰与还原峰电流比值的绝对值($|I_{pa}/I_{pc}|$)及氧化峰电流值(I_{pa})是考察电极的特征参数。下面根据特征参数的变化分析电极预处理过程。经过活化的金电极置于电解液中进行 CV 扫描,得到如图 1 所示的 CV 曲线,经过活化的金电极与裸金电极相比,电位在 -0.2 ~ 0.05 V 范围内,双电层充电电流略有减小;而法拉第电流明显增大。从表 1 中的数据可以看出,I_{pa} 和 I_{pc} 明显增大,ΔE_p 明显减小,$|I_{pa}/I_{pc}|$ 接近于 1;表明经过活化的金电极可逆性变好,导电性明显增强。氧化峰电流值增大,有益于提高免疫传感器的灵敏度。另外,由表 1 可

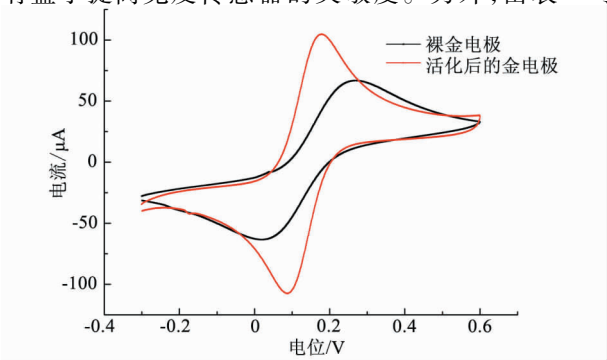

图 1 电极的循环伏安曲线

Fig. 1 Cyclic voltammograms of electrodes

知电极的重复性误差较小，具有足够的潜力满足后续测试要求。

表 1　电极的特征参数

Tab. 1　Characteristic parameters of electrodes

参数	电极	测量值($n=5$)	相对标准偏差/%
I_{pa}/μA	裸金电极	69.15 ± 2.32	3.3
	活化后的金电极	118.30 ± 3.34	2.8
ΔE_p/mV	裸金电极	217.67 ± 7.57	3.4
	活化后的金电极	89.00 ± 4.36	4.8
$\lvert I_{pa}/I_{pc}\rvert$	裸金电极	1.01 ± 0.01	1.2
	活化后的金电极	0.98 ± 0.01	0.5

2.2　电极免疫过程的表征

将 10 mmol/L 的巯基乙胺乙醇溶液滴涂到活化后的金电极表面，室温下静置 2 h 后，形成了稳定、有序的自组装膜[17]。经测试，修饰了巯基乙胺后电极的 I_{pa}(132.80 μA)比裸电极时(69.15 μA)明显增大，ΔE_p(62.33 mV < 217.67 mV)值减小，$\lvert I_{pa}/I_{pc}\rvert$值接近 1，如表 2 所示。说明电极的可逆性、导电性进一步增强。

表 2　修饰巯基乙胺后电极的特征参数

Tab. 2　Characteristic parameters of electrode modified with cysteamine

参数	测量值($n=5$)	相对标准偏差/%
I_{pa}/μA	132.80 ± 4.65	3.5
ΔE_p/mV	62.33 ± 4.16	6.6
$\lvert I_{pa}/I_{pc}\rvert$	1.01 ± 0.01	0.2

将电极的数据经半微分处理后的结果如图 2 所示(以 10 mmol/L 的巯基乙胺乙醇溶液修饰电极为例)，曲线的基线平稳，对称性好，其峰电位、峰宽、峰高绝对值都近似相等，该过程是近似可逆反应过程[18]。这是由于巯基乙胺自组装到电极表面后，巯基与金电极能形成稳定的 Au－S 极性共价键[19]，巯基乙胺是短碳链物质，组装成膜后比较疏松，末端基团—NH_2与电解液中的 H^+结合形成—NH_3^+，—NH_3^+所带的正电荷与$[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$探针负离子发生静电吸引作用，增大了隧穿电流[20-21]。这对提高传感器的初始电流信号和传感器的灵敏度都有一定的好处。更重要的是末端基团—NH_2还可以通过双功能试剂戊二醛与抗原发生共价耦合相连，实现抗原在电极基底表面的固定[22-24]。最后用 BSA 封闭未结合的位点，形成传感器的敏感元件。制备过程示意图如图 3 所示。

2.3　免疫电极与扫速的关系

通过研究扫描速率对峰电流的影响可以发现，在 0.02 ~ 0.5 V/s 范围内，氧化还原峰的电流与速率呈近似的线性关系(图 4)。线性回归方程：I_{pa} = 606.89v + 64.49，相关系数 r = 0.988 1；I_{pc} = 522.99v + 62.70，相关系数 r = 0.985 7。表明氧化还原探针在免疫电极表面的电化学反应是表面控制过程[25]。反映了在此电化学过程中免疫复合物吸附在电极表面的状况。

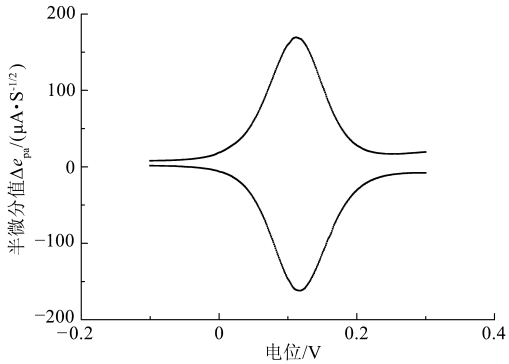

图 2　半微分循环伏安图

Fig. 2　Semi-differential cyclic voltammogram

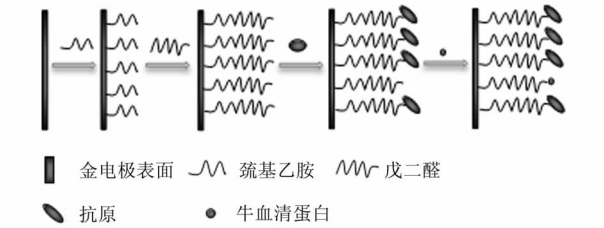

图 3　免疫传感器制作过程示意图

Fig. 3　Schematic diagram for immunosensor processing

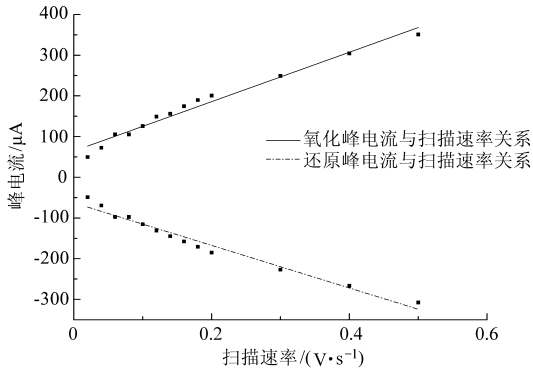

图 4　免疫传感器在不同扫描速率下的循环伏安曲线

Fig. 4　Cyclic voltammograms of immunosensor at different scan rate

2.4　试验条件的选择

2.4.1　抗原浓度

分别选择浓度为 4×10^8 CFU/mL 和 4×10^9 CFU/mL的抗原绑定到修饰电极上。经测定绑定4×10^8 CFU/mL 抗原电极的氧化峰电流下降了 6.1 μA；绑定 4×10^9 CFU/mL 抗原电极的氧化峰电流下降了 9.1 μA。说明绑定 4×10^9 CFU/mL 抗原后，免疫传感器上结合了较多抗原，可为抗体免疫反应提供更多结合位点，所以选择 4×10^9 CFU/mL 浓度作为抗原的绑定浓度。

2.4.2 pH 值

pH 值对免疫传感器抗原、抗体的活性以及二者间的亲和性有很大影响。大多数抗原抗体反应适合的 pH 值在 6 ~ 8 之间。试验中选择病菌在生物体内相似的生存环境，即 pH 值 7.4 为工作的酸碱度[26]，在这样的条件下更适宜免疫反应的发生。

2.4.3 孵育温度

免疫反应对温度有一定的依赖性，鉴于免疫组分一般在动物体温下活力较好的特性，选择 37℃ 作为免疫反应的孵育温度[27]。

2.5 免疫传感器对布鲁氏菌抗体的响应

免疫传感器在每次滴加不同浓度的待测抗体后孵育 30 min，采用 CV 方法检测。当每次不同浓度的待测抗体与布鲁氏菌抗原发生免疫反应后，随着抗体浓度的增大，氧化峰电流响应逐渐减小，见图 5。说明随着固定抗体浓度的增加，抗体抗原结合形成的非导电层免疫复合物堵塞了电子传递的通道，使溶液中的氧化还原探针向电极表面转移时受阻，电子传递到金电极表面的阻力增大[28]。抗体在 10^{-6} ~ 10 IU/mL 的范围内，氧化峰电流的变化值（$n=5$）与抗体浓度呈线性关系，线性回归方程 $y=4.293\,3\lg C+38.110\,1$，相关系数 $r=0.989\,1$（图 6），其中 C 为布鲁氏菌抗体浓度。但是抗体在 10^{-2} ~ 10 IU/mL范围内的线性回归曲线不是很理想，如果将数据进行分段拟合，当抗体在 10^{-5} ~ 10^{-3} IU/mL 浓度范围内时，线性回归方程 $y=5.869\,2\lg C+44.305\,7$，相关系数 $r=0.999\,9$，检测下限为 2.8×10^{-5} IU/mL，可以看出，能够较好地区分 3 个浓度梯度的待测抗体溶液；而浓度在 10^{-2} ~ 10 IU/mL 范围内时，线性回归方程 $y=3.772\,2\lg C+37.642\,7$，相关系数 $r=0.991\,3$，其不同浓度抗体溶液之间的区分度相对较差。通过比较可知，数据进行分段拟合后，相关系数有所提高，拟合效果较好。另外，制作好的免疫传感器在测定抗体时大概需要 40 min，比 SAT 和 ELISA 试验的检测时间有所缩短[29]，显著提高了检测效率。如果配备便携式恒电位仪及恒温箱则便于现场应用。

利用半微分电分析技术[30]，将测定的不同浓度抗体的循环伏安曲线进行半微分变换，建立半微分变化值与浓度的关系（图 7）。由图可知，在 10^{-5} ~ 10^{-3} IU/mL 范围内，半微分氧化峰电流变化值（Δe_{pa}）与浓度的线性回归方程 $y=5.925\,0\lg C+47.554\,9$；相关系数 $r=0.992\,9$，检测下限为 2.7×10^{-6} IU/mL。这是由于半微分技术去除了背景值，使得检测下限有所改善。由图 7 可见，在 10^{-2} ~ 1 IU/mL范围内，半微分氧化峰电流变化值与浓度的线性回归方程为 $y=3.511\,9\lg C+40.441\,7$，相关系数为 0.999 2，此范围内能够区分 3 个梯度的抗体溶液浓度。由此可见将数据进行半微分变换更有利于数据的处理和分析，增大了检测抗体浓度的范围。

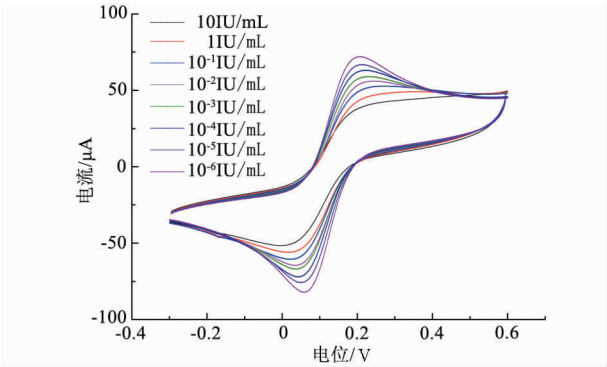

图 5 免疫传感器的循环伏安行为

Fig. 5 Cyclic votammetry behavior of immunosensor

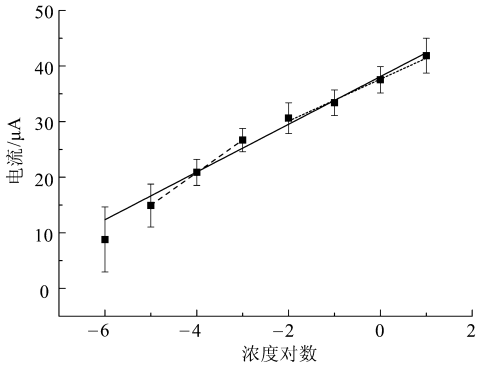

图 6 免疫传感器电流响应与布鲁氏菌抗体浓度的关系

Fig. 6 Correlation between amperometic immunosensor and concentration of brucella antibody

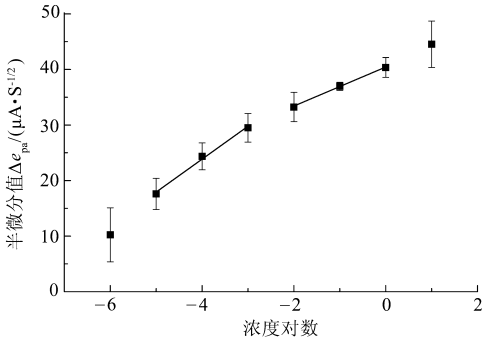

图 7 半微分值与布鲁氏菌抗体浓度的关系

Fig. 7 Correlation between semi-differential value and concentration of brucella antibody

3 结论

（1）丝网印刷金电极在修饰巯基乙胺后，电极的氧化峰还原峰电流比裸电极及预处理后的电极明显增大，氧化峰与还原峰之间的电位差明显减小，且 $|I_{pa}/I_{pc}|$ 接近 1。因此，电极通过合理的预处理和适当的修饰可以明显增强电极的可逆性、导电性，有利于提高免疫传感器的灵敏度。

（2）试验发现，抗体在 10^{-5} ~ 10^{-3} IU/mL 浓度范围内，免疫传感器氧化峰电流值的变化与相应的待测抗体浓度呈线性关系。相关系数为 0.999 9，检测下限为 2.8×10^{-5} IU/mL，能够较好地区分待测抗体溶液。

（3）半微分变换有助于获得更低的检测下限和较宽的检测范围。在 10^{-5} ~ 10^{-3} IU/mL 范围内，半微分氧化峰电流的变化与浓度呈线性关系，相关系数为 0.992 9，检测下限达到 2.7×10^{-6} IU/mL。在 10^{-2} ~ 1 IU/mL 范围内，相关系数为 0.999 2。在这两段范围内都能够较好地区分抗体溶液。

（4）试验制备的免疫传感器不仅使用简单，而且样品测试量少（10 μL）、灵敏度高、检测下限低，有利于检测微量抗体从而早期发现病畜，具有较好的应用前景。

参 考 文 献

1 Boschiroli M L, Foulongne V, O'Callaghan D. Brucellosis: a worldwide zoonosis[J]. Current Opinion in Microbiology, 2001, 4(1):58 - 64.

2 Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, et al. The new global map of human brucellosis[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2006,6(2):91 - 99.

3 何天武，王开雄，刘琴. 动物布鲁氏菌病检测方法[J]. 中国动物保健, 2007, 9(3): 60 - 61.

4 蔡一非，钟旗，伊日盖，等. 两奶牛场布氏杆菌分离鉴定及四种血清学检测方法比较[J]. 中国人兽共患病学报, 2009,25(5):456 - 459.
Cai Yifei, Zhong Qi, Yi Rigai, et al. Isolation and identification of brucella in two dairies and comparison of four serological tests [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2009,25(5):456 - 459. (in Chinese)

5 王秀丽，蒋玉文，毛开荣，等. 布鲁氏菌病实验室诊断方法的研究进展[J]. 中国兽药杂志,2011,45(11):37 - 42.
Wang Xiuli, Jiang Yuwen, Mao Kairong, et al. Research progress on laboratory diagnosis techniques on brucellosis[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2011,45(11):37 - 42. (in Chinese)

6 张德贤，余启茂，王明周，等. 不同方法检测奶牛布氏杆菌抗体的比较试验[J]. 贵州畜牧兽医,2010,34(6):1 - 3.
Zhang Dexian, Yu Qimao, Wang Mingzhou, et al. Comparative study on different methods for dairy cow brucella antibody detection [J]. Guizhou Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2010,34(6):1 - 3. (in Chinese)

7 Szulowski K, Iwaniak W, Pilaszek J, et al. The ELISA for the examination of hare sera for anti-brucella antibodies[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases,1999,22(1): 33 - 40.

8 王佳，徐卫民. 布鲁氏菌病血清学诊断研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2008,3(2):149 - 152.
Wang Jia, Xu Weimin. Advanced on the study of serodiagnosis methods for brucellosis[J]. Journal of Pathogen Biology,2008, 3(2):149 - 152. (in Chinese)

9 齐景文. 布鲁氏菌病常用诊断方法应用现状及评价[J]. 中国畜牧兽医,2006,33(8):70 - 73.

10 青宪，楚霞. 日本血吸虫抗体电化学免疫传感器研究[J]. 化学传感器,2008,28(2):46 - 50.
Qing Xian, Chu Xia. Electrochemical immunosensor for the detection of *Schistosoma japonicum* antibody[J]. Chemical Sensors, 2008,28(2):46 - 50. (in Chinese)

11 Wu Haiyun, Zuo Yueming, Cui Chuanjin, et al. Rapid quantitative detection of brucella melitensis by a label-free impedance immunosensor based on a gold nanoparticle-modified screen-printed carbon electrode[J]. Sensors, 2013, 13(7): 8551 - 8563.

12 魏胤，何晓英，宋桃，等. 金电极上自组装 L - cy/SOD 膜修饰电极的电化学行为[J]. 化学研究与应用,2011,23(3): 336 - 339.
Wei Yin, He Xiaoying, Song Tao, et al. Electrochemical behaviors of L - cysteine SAM-SOD modified electrode[J]. Chemical Research and Application, 2011, 23(3): 336 - 339. (in Chinese)

13 许媛媛，边超，陈绍凤，等. 基于微机电系统技术和纳米金自组装膜的安培型免疫传感器研究[J]. 分析化学,2006,34(5): 608 - 612.
Xu Yuanyuan, Bian Chao, Chen Shaofeng, et al. Amperometric immunosensor based on micro electro mechanical systems and gold nanoparticles self-assembled monolayer techniques[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(5):608 - 612. (in Chinese)

14 许媛媛，边超，陈绍凤，等. 基于 MEMS 和 A 蛋白自组装膜抗体定向固定技术的安培型免疫传感器[J]. 中国科学:E 辑, 2006,36(2):210 - 221.

15 王存嫦，王桦，吴朝阳，等. 纳米金自组装膜的 IgM 压电免疫传感器的研究[J]. 化学学报,2003,61(4):608 - 612.
Wang Cunchang, Wang Hua, Wu Zhaoyang, et al. A novel IgM immunosensor based on the plasma-polymerized film and nano-Au self-assembled monolayer techniques[J]. Acta Chimica Sinica,2003,61(4):608 - 612. (in Chinese)

16 张灯. 检测大肠杆菌的电化学阻抗谱免疫生物传感器研究[D]. 杭州:浙江大学,2005.
Zhang Deng. Immunosensor for the detecton of escherichia coli O157:H7 by using electrochemical impedance spectroscopy[D]. Hangzhou: Zhejiang University,2005. (in Chinese)

17 Shervedani R K, Bagherzadeh M. Electrochemical impedance spectroscopy as a transduction method for electrochemical recognition of zirconium on gold electrode modified with hydroxamated self-assembled monolayer[J]. Sensors and Actuators B:

Chemical, 2009, 139(2):657 – 664.

18 王耀光,黄作澎,林文如.常见电极过程的半微分循环伏安图的探讨[J].福州大学学报:自然科学版,1983,11(2):83 – 96.
Wang Yaoguang, Huang Zuopeng, Lin Wenru. Semidifferential cyclic voltammograms of some typical electrode processes[J]. Journal of Fuzhou University,1983,11(2):83 – 96. (in Chinese)

19 胡海龙,张琨,王振兴,等.硫醇自组装分子膜末端基团对其电荷输运特性的影响[J].物理学报,2007,56(3):1674 – 1679.
Hu Hailong, Zhang Kun, Wang Zhenxing, et al. The effect of terminal group on the electronic transport property of alkanethiol self-assembled monolayer[J]. Acta Physica Sinica,2007,56(3):1674 – 1679. (in Chinese)

20 朱延松,侯冬岩,邵会波.电流滴定法对两种短链分子自组装膜的研究[J].分析化学,2007,35(2):201 – 205.
Zhu Yansong, Hou Dongyan, Shao Huibo. Investigation of self-assembled monolayers of two short-chain molecules by the electrochemical titration method[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2007,35(2):201 – 205. (in Chinese)

21 Shervedani R K, Bagherzadeh M, Mozaffari S A. Determination of dopamine in the presence of high concentration of ascorbic acid by using gold cysteamine self-assembled monolayers as a nanosensor[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006, 115(2):614 – 621.

22 王珂,江德臣,刘宝红,等.无标记型免疫传感器的原理及应用[J].分析化学,2005,33(3):411 – 416.
Wang Ke, Jiang Dechen, Liu Baohong, et al. Label-free immunosensors-principles and applications[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2005,33(3):411 – 416. (in Chinese)

23 Yael L, Liron A, Robert S. et al. Immobilization strategies of Brucella particles on optical fibers for use in chemiluminescence immunosensors[J]. Talanta, 2009, 80(1):338 – 345.

24 周卓晟.检测细菌内毒素的酶联免疫吸附法及免疫传感器法的研究[D].武汉:华中科技大学,2010.
Zhou Zhuosheng. Detection of bacterial endotoxin by enzyme-linked immunosorbent assay and immunosensor[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2010. (in Chinese)

25 王燕,陈蓁蓁.巯基乙胺修饰电极法测定植物体内超氧阴离子自由基[J].分析化学,2008,36(11):1505 – 1509.
Wang Yan, Chen Zhenzhen. Determination of superoxide anion radical in plant by *Mercaptoethylamine* modified electrode[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2008,36(11):1505 – 1509. (in Chinese)

26 周亚民.新型电化学免疫传感器技术用于日本血吸虫等蛋白分子检测的研究[D].长沙:湖南大学,2002.
Zhou Yamin. Development of electrochemical immunosensors for Schistosoma-Japonicum diagnosis and protein determination[D]. Changsha: Hunan University,2002. (in Chinese)

27 龚福春,何德肆,曹忠,等.白藜芦醇作辣根过氧化物酶底物的布氏杆菌抗体酶联免疫传感器研究[J].分析化学,2007,35(12):1783 – 1786.
Gong Fuchun, He Desi, Cao Zhong, et al. An amperometric enzyme-linked immunosensor using resveratrol as the substrate for horseradish peroxidase for horseradish peroxidase for *Brucella Melitensis* antibody assay[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2007,35(12):1783 – 1786. (in Chinese)

28 范丽霞.基于电活性生物相容材料的生物传感界面构建及其应用研究[D].南昌:南昌大学,2010.
Fan Lixia. Design and application of electrochemistry biosensor based on electroactive and biocompatible materials[D]. Nanchang: Nanchang University, 2010. (in Chinese)

29 多里坤·努尔沙发,阿曼古力·马木提,阿布都热衣木·塞提,等.牛布鲁氏菌抗体 ELISA 试剂盒与国标血清学 SAT 试验在布病检测中的比较试验[J].草食家畜,2011,153(4):80 – 81.
Duolikun·Nuershafa, Amanguli·Mamuti, Abudureyimu·Saiti, et al. A comparison of bovine brucellosis ELISA kit from standard tube agglutination test (SAT) in the serological investigation of brucellosis in Xinjiang region of China[J]. Grass-Feeding Livestock,2011,153(4):80 – 81. (in Chinese)

30 Prieto I, Pedrosa J M, Martín M T, et al. Numerical determination of extended semi integrals and semi differentials by using spline cubic functions. Applications to an EE reversible mechanism in cyclic voltammoletry[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry,2000,485(1):7 – 12.

Label-free Amperometic Immunosensor for Detection of Brucella Antibody

Yang Wei[1] Zuo Yueming[1] Wu Haiyun[2] Zhang Zhiyong[1] Zhang Rong[3] Chen Chen[1]

(1. *College of Engineering*, *Shanxi Agricultural University*, *Taigu* 030801, *China*

2. *Department of Electromechanical Engineering*, *Tianjin Agricultural University*, *Tianjin* 300384, *China*

3. *College of Horticulture*, *Shanxi Agricultural University*, *Taigu* 030801, *China*)

Abstract: In order to improve the detection sensitivity of brucella antibody and discover diseased livestock earlier for reducing economic losses, a disposable label-free immunosensor for rapid and

quantitative detection was prepared. It was made by modification of cysteamine onto screen-printed gold electrode surface and immobilization of antigens. By the method of cyclic voltammetry, it was shown that there is a linear relationship between the changes of peak current and the different brucella antibody concentrations within the range of $10^{-5} \sim 10^{-3}$ IU/mL, the relevant correlation coefficient is 0.999 9 and the lower detection limit is 2.8×10^{-5} IU/mL. Furthermore, semi-differential transformation was applied to all of the cyclic voltammograms, the correlation between the changes of semi-differential values and the corresponding concentration of brucella antibody has been established, the correlation coefficient is 0.992 9 and the lower detection limit is 2.7×10^{-6} IU/mL in the range of $10^{-5} \sim 10^{-3}$ IU/mL, and the correlation coefficient is 0.999 2 in the range of $10^{-2} \sim 1$ IU/mL. It was shown that the detection range and the lower detection limit were improved greatly by the semi-differential transformation.

Key words: Brucella antibody　Immunosensor　Screen-printed gold electrode　Cyclic voltammetry　Semi-differential

(上接第 254 页)

Visual Simulation of Cucumber Leaf Color Based on the Relative Content of Chlorophyll

Lu Shenglian[1]　Wang Liping[1,2]　He Huojiao[2]　Guo Xinyu[1]

(1. *Beijing Research Center for Information Technology in Agriculture*, *Beijing* 100097, *China*

2. *School of Information and Engineering*, *Jiangxi Agricultural University*, *Nanchang* 330045, *China*)

Abstract: A method for visual simulating leaf color based on the relative content of chlorophyll was proposed. The mathematical model between cucumber leaf color components and chlorophyll relative content was established according to images acquisited from real field and measuring chlorophyll relative content (SPAD) of the cucumber leaf in normal growth state continuously, and the model was also verified by using root-mean-square error (RMSE). The results showed that the RMSE between the observed values (R, G, B) and simulated vales (R, G, B) in leaf are 13.43%, 8.47%, 7.42% respectively. The rendering for the spatial distribution of apparent color of cucumber leaf was realized by combining with a black and white pigment distribution texture which was a grayscale image before being preprocessed. Then the high level shader language (OpenGL 2.0 Shader Language) was used to realize the rendering of apparent color changing process of cucumber leaf. The above process showed that the method proposed can achieve better realistic rendering results.

Key words: Cucumber leaf　Leaf color simulation　SPAD　Realistic rendering