

倏逝波荧光免疫传感器在环境检测中的研究进展

龙峰,施汉昌,何苗,朱安娜

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室,北京 100084)

摘要:倏逝波荧光免疫传感器是利用光波在波导内,以全反射方式传输时在波导界面产生倏逝波,结合荧光免疫分析原理进行检测的一类新型传感器。该类传感器具有特异性强、灵敏度高、检测速度快、费用低、操作简便等优点,在环境检测、医学临床、食品卫生等领域具有广泛的应用前景。在介绍倏逝波荧光免疫传感器原理、结构及其特点的基础上,综述了该类传感器在环境检测领域的研究进展。

关键词:倏逝波;荧光;免疫传感器;环境检测

中图分类号:X85 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2008)03-0545-06

Progress of Evanescent Wave Fluorescence Immunosensors in Environmental Detection

LONG Feng, SHI Han-chang, HE Miao, ZHU An-na

(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollutants Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The evanescent wave fluorescence immunosensor, which employs evanescent wave produced in interface of the waveguide when the light transmits on the manner of total internal reflection in the waveguide, is relatively new kind of sensor on the basis of fluorescence immunoassay principle. This sensor has many advantages including strong specificity, high sensitivity, rapid detection, cost-effective and simple operation, which will be widely applied for environmental detection, clinical medicine and food industry. The principle, structure and characteristics of evanescent wave fluorescence immunosensors were covered and the applications of this kind of sensor in environmental detection were introduced.

Key words: evanescent wave; fluorescence; immunosensors; environmental detection

倏逝波荧光免疫传感器利用光波在平面波导或光纤内,以全反射方式传输时在传感器所处的介质中产生倏逝波,该倏逝波可以激发传感器表面连接的抗体或抗原分子上标记的荧光物质,同时结合免疫反应原理,实现待测目标物质的定量检测^[1,2]。通常倏逝波场的渗入深度只有数十 nm 至几百 nm,所以倏逝波免疫传感器只能探测到位于倏逝波场范围内的荧光分子发出的荧光,而溶液本体中游离的荧光分子对检测结果几乎没有影响^[3],可以减少溶液中的杂质对检测结果的干扰。1975 年, Kronick 等^[4]首次将倏逝波激发应用于荧光免疫分析。荧光免疫分析是免疫分析技术和荧光检测技术结合的产物,具有特异性强、灵敏度高、检测速度快、示踪物稳定、检测费用低廉等优点,在临床医学上一直发挥着重要的作用。

目前,水体中持久性有机污染物(POPs)、内分泌干扰物(EDCs)等微量/痕量有毒有害有机物的检测大多需要使用价格昂贵、体积庞大的 HPLC-MS 或 GC-MS 等仪器,样品制备过程复杂、耗时长,需要专业技术人员操作,检测费用高,常规检测次数有限。

倏逝波荧光免疫传感器利用倏逝波原理和荧光免疫分析原理,可实现目标物的灵敏、准确、快速和经济检测,因此正成为检测环境中微量/痕量有毒有害物质方法的研究热点^[5-9]。

1 倏逝波荧光免疫传感器原理

倏逝波荧光免疫传感器所使用的换能器通常是平面波导或光纤,因此可分为平面波导型免疫传感器和光纤免疫传感器,二者基本原理相同。

当光束由折射率 n 大的介质(如平面波导或光纤)进入 n 小的介质(如水溶液)时,若入射角 θ 大于临界角 θ_c ,入射光将全部反射回 n 大的介质中,称为全反射(total internal reflection, TIR),其中 θ_c 定义为:

$$\theta_c = \sin^{-1}(n_1/n_2) \quad (1)$$

式中, n_1 为介质 1 的折射率, n_2 为介质 2 的折

收稿日期:2007-04-02;修订日期:2007-05-14

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA649160)

作者简介:龙峰(1972~),男,博士研究生,主要研究方向为环境监测, E-mail: longf04@mails.thu.edu.cn

射率, $n_1 < n_2$. 在全反射的条件下, 由于横向电场与横向磁场的 Fresnel 传递系数不为 0, 这意味着虽然光能全部被反射, 但电磁场却可从 2 种介质的界面延伸至 n 小的介质中, 即所谓的“倏逝波”, 并遵循下面公式呈指数衰减^[10], 见图 1.

$$E(z) = E_0 \exp(-z/d_p) \quad (2)$$

式中, z 为距介质界面的距离, $E(z)$ 为 z 处倏逝波振幅, E_0 为界面处电磁场振幅, d_p 为渗入深度. 对于多模波导, 渗入深度 d_p (定义为电磁场为界面处电磁强度 $1/e$ 的距离, 见图 1), 为折射率、入射角和波长的函数:

$$d_p = \frac{\lambda_{ex}}{2} [(n_2)^2 \sin^2 \theta - (n_1)^2]^{-1/2} \quad (3)$$

式中, λ_{ex} 是激发光的波长; θ 是激发光与法线间夹角.

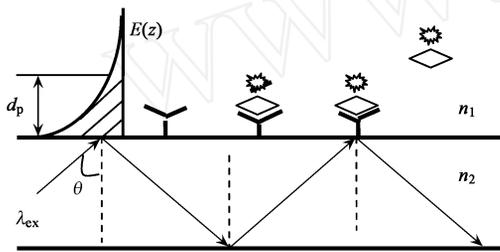


图 1 倏逝波荧光免疫传感器原理示意
Fig. 1 Principle schematic of evanescent wave fluorescence immunosensors

如果抗体或抗原上标记的荧光分子位于倏逝波穿透深度范围内, 则能够被倏逝波激发并产生荧光, 对于平面波导型免疫传感器而言, 荧光由放置在波导另一侧的光电探测器收集; 对于光纤免疫传感器而言, 部分荧光将返回光纤探头中, 并从光纤探头的一端射出, 通过检测荧光信号, 即可得到波导界面的物质信息.

2 倏逝波荧光免疫传感器结构及特点

无论是平面波导型还是光纤型倏逝波免疫传感器, 其主要硬件包括以下 3 个部分: 光学元件, 如平面波导或光纤、激发光源和探测器等; 流动进样系统及样品池; 数据采集分析及控制系统.

2.1 平面波导型免疫传感器

平面波导型免疫传感器(图 2)以具有一定结构的玻璃芯片作为传感元件, 芯片上固定一定量的生物识别分子(抗体或抗原), 其可与荧光标记物进行特异性反应. 激发光(目前常采用半导体激光器)则

从芯片的一端射入传感元件并在其内部形成全反射, 在芯片表面产生倏逝波并激发其上的荧光分子产生荧光, 荧光由光电二极管、CCDs 或光电倍增管等探测器收集并转换成电信号, 通过采集检测电信号以得到待测目标物信息. 如果以多路激发光或线性光射入芯片, 并且在各个全反射点上固定不同的生物识别分子, 即可制成同时分析多目标物的阵列免疫传感器.

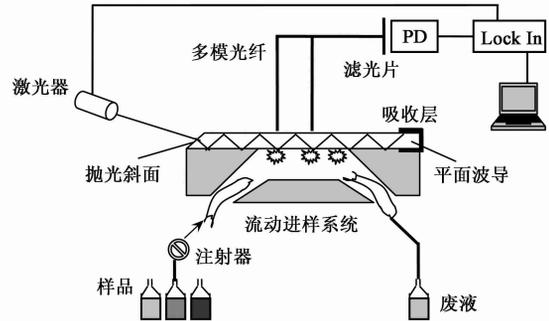


图 2 平面波导型免疫传感器示意
Fig. 2 Schematic of planar waveguide immunosensors

相对于其他的免疫分析仪器, 平面波导型荧光免疫分析仪具有如下优点: 抗电磁干扰, 信号相对稳定; 检测速度快, 操作简便; 生物特异性强, 灵敏度高; 能够实现多通道检测, 即同时测定多种物质, 这是它最显著的特点, 但要求各分析物之间不得存在明显的交叉反应; 可以对生物反应的动态过程进行实时监测. 这些特点使得平面波导型荧光免疫分析仪在食品和环境检测等需要大量测定并快速得到结果的领域具有很大的应用潜力, 受到了各国研究单位的重视. 欧盟自 1996 年开始用于地表水污染物检测的平面波导型免疫传感器研究, 并由德国的 Tubingen 大学牵头开发了 1 台原型机——RIANA(图 2), 并以此为基础, 开发了自动化水分析计算机支持系统(automated water analyser computer supported system, AWACSS)^[11, 12].

2.2 光纤免疫传感器

倏逝波光纤免疫传感器将倏逝波原理、荧光免疫分析原理及光纤检测优势结合于一体, 除了具备平面波导型荧光免疫传感器的优点外, 其最大的优势在于可实现仪器的小型化, 有望成为日常野外检测的主体技术.

国内外报道较多的光纤免疫传感器主要是利用光纤作为探头和收集荧光, 而激发光和荧光的传输、采集和检测采用常规的光学系统, 其中包括反射镜、

透镜组、滤光片、斩波器等光学元件^[13,14],系统对光学元件的定位要求极高,一旦光路的任何元件发生位移,将导致整个系统的破坏,并且很难恢复. Golden 等^[15]对系统的结构进行了改进,利用光纤束替代了部分光学分离元件,开发了 Analyte 2000 型产品. 邓立新等^[16]也开发了一套类似的光纤束型免疫传感器实验装置,但尚未见检测实际样品的报道.

图 3 为笔者开发的一套倏逝波全光纤免疫传感器^[17]. 该传感器利用单多模光纤耦合器结构,使得激发光的传输和荧光的收集与传输都利用光纤来完成,并利用脉冲半导体激光器作为光源,省去了传统的倏逝波光免疫传感器所需的常规光学系统(如斩光器、二色镜等),因此该系统光学分离元件少,结构简单、紧凑,可制成便携式检测仪;光传递效率高、损耗低、仪器的信噪比高.

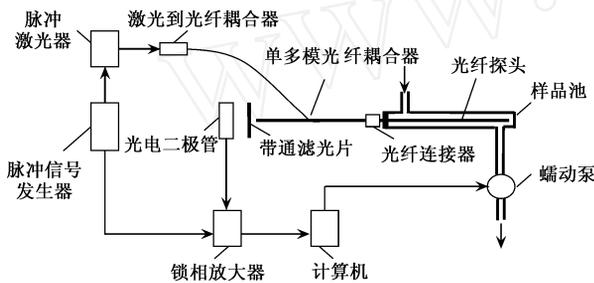


图 3 倏逝波全光纤免疫传感器示意

Fig. 3 Schematic of evanescent wave all-fiber immunosensor

3 传感器生物识别元件的修饰

生物识别元件的修饰是倏逝波荧光免疫传感器研制的关键步骤,修饰到生物识别元件上的生物识别分子应保持有良好的反应活性,且其活性或亲和位点能与目标物结合,并尽可能地降低非特异性吸附. 常用的修饰方法包括物理吸附法、共价键法等.

物理吸附法是固定抗体等生物识别分子最简单的方法,也是标准化实验室免疫分析方法(如 ELISA)最常用的固定化技术. 在倏逝波光免疫传感器中,当使用塑料光纤作为识别元件时,通常采用物理吸附法将抗体固定在其表面上^[15]. 物理吸附法的缺点就是当环境条件变化(如 PH 值、溶液)时,吸附分子会脱吸,从而造成检测结果的偏差;且吸附层的生物识别分子密度不如其它方法高.

共价键法是目前最常用、研究最广泛的方法,也就是采用化学键合的方法,将抗体等生物识别分子以共价键方式键合于具有活性基团的载体上,其优

点是结合牢固,使用寿命长. 不足之处是抗体活性可能因化学键合反应而降低. 由于平面波导和光纤多由石英、玻璃制成,二氧化硅表面的羟基无法与生物识别分子上的氨基、羟基、酚基和巯基等活性基团直接反应,因此,通常需先对识别元件表面进行活化修饰,一般采用以下 3 种方法:

先用硅烷化试剂与识别元件上的羟基反应,在识别元件表面引入巯基或氨基,然后借助双功能试剂固定生物识别分子. 如 Bhatia 等^[18]将 3-巯基丙基三甲硅烷(MTS)与石英表面羟基反应,在其表面引入巯基,巯基与双功能试剂 *N*-琥珀酰亚胺基-4-马来酰亚胺-丁酸酯(GMBS)的马来酰亚胺的双键反应,将双功能试剂接在硅表面,GMBS 的琥珀酰酐再与抗体分子表面的氨基反应,从而将抗体固定于光纤表面.

通过一个中介层将生物识别分子固定在识别元件上. 如生物素-亲和素体系,即先将亲和素固定到识别元件上,其可同时与 2 个生物素分子结合,然后将生物素分子一端的羟基通过单一的生化反应连接生物识别分子^[19]. 把生物素-亲和素体系引入免疫传感器具有放大效应,与直接固定生物识别分子相比,信号响应值可提高几倍. 但亲和素的非特异性吸附高. 也可以利用蛋白 A 或蛋白 G 作为中介层固定生物识别分子^[20].

利用亲水性高分子聚合物对识别元件表面进行修饰. 由于高分子聚合物所含的活性基团丰富,可为生物识别分子的固定提供充足的活性位点;而且它在水相中具有三维结构,能够掩蔽芯片表面,可以很好地消除非特异性吸附所带来的问题. Piehler 等^[21]利用壳聚糖、葡聚糖(AMD)、聚氧乙烯等聚合物修饰芯片,可使非特异性吸附降低到 5%~50%,结合到芯片上的特异性抗体量明显提高,密度最高可达 5~6 ng/mm². Brazen 等^[22]人先将玻璃芯片清洗好后,用 COPTS 将表面硅烷化,然后将 AMD-污染物的衍生物结合到芯片阵列点上,表面的其它区域用未连接衍生物的 AMD 封闭,以阻止非特异性吸附,该芯片可以同时检测多种物质.

在环境检测中,目标物一般为小分子物质(分子量 < 1000),直接将小分子物质固定在识别元件表面非常困难,目前常用的方法是固定抗体法. 具有良好的再生性能是免疫传感器优于其它免疫分析方法(如 ELISA)的一大特点,当采用固定抗体法时,由于再生条件常常比较苛刻,这将影响抗体的活性,进而影响仪器的稳定性和再现性. 而采用高分子聚合物

固定法,可以将小分子抗原固定在识别元件表面,可以实现良好的再生性能,这在平面波导型免疫传感器中应用得较多^[22~26]。笔者采用先将小分子物质与惰性蛋白(如 BSA、OVA)结合,然后将该复合物通过双功能试剂连接到硅烷化后的光纤探头表面,修饰好的光纤探头可以重复使用上百次。

4 倏逝波荧光免疫传感器在环境检测中的应用

随着环境污染物的增加及其残留浓度要求的提高,对快速高效检测技术的需求日益迫切,倏逝波荧光免疫传感器因其良好的性能及应用前景,在环境检测领域得到越来越多的研究和应用。

4.1 平面波导型免疫传感器

Mallat 等^[23]将流动注射系统与倏逝波光学免疫传感器耦合,用来检测各种水体中的杀虫剂异丙隆。先将抗原衍生物固定在经过氨基葡聚糖处理过的玻片上,然后利用 Cy5.5 标记的抗-异丙隆抗体和水样预反应 15 min 以上,再将此混合物输入反应池进行检测,对实际水样的检测限可达 0.14 $\mu\text{g/L}$ 。

Barzen 等^[22]利用平面波导型免疫传感器——RIANA 分别同时检测阿特拉津、甲草胺、PCP 和 2,4-D、西玛津、异丙隆 2 组物质。除 PCP 和异丙隆 2 种物质的检测限高于欧盟标准外,其它物质的检测限均可满足欧盟规定的单种污染物浓度不得高于 0.1 $\mu\text{g/L}$ 的标准。Tschmelak 等^[22]利用该系统进行了实际水样检测,同时检测阿特拉津、双酚 A、雌酚酮、异丙隆 4 种物质,其检测限分别为 0.002、0.005、0.019、0.016 $\mu\text{g/L}$,标准偏差均不超过 2%。Rodriguez-Mozaz 等^[25]也用该系统进行了自然水体中双酚 A 的检测,检测限为 0.014 $\mu\text{g/L}$,完成一次分析的时间为 15min,并获得了很好的再生效果,标准偏差在 1.48%~6.93%之间。

以 RIANA 为基础,Tschmelaka 等^[12,26]发展了集免疫分析、远程监控、网络功能、趋势分析、早期预警等功能于一体的 AWACSS 系统。该系统在无需预处理的情况下,可在数 min 内同时检测多达 32 种浓度在纳克级的有机污染物,包括杀虫剂、内分泌干扰物及药物等。而且基于网络的 AWACSS 数据库具有自动进行数据分析评估功能。

内分泌干扰物黄体酮也可利用荧光免疫分析法进行检测^[27]。将传感元件表面先用氨基葡聚糖修饰,然后将分析衍生物固定在葡聚糖分子上,采用间接竞争法检测黄体酮,检测限可达 0.37 ng/L,定量检测限为 4.88 ng/L,IC₅₀ 值为 (0.71 ± 0.23) $\mu\text{g/L}$ 。

Klotz 等^[28]利用免疫荧光传感器检测了 2,4-D 和西玛津,其检测限分别为 0.035 和 0.026 $\mu\text{g/L}$ 。

Rowe 等^[29]发展了 1 种多目标物检测的阵列荧光免疫传感器,利用 CCD 探测结合到平面波导上抗体抗原的荧光信号,可以同时检测金黄色葡萄球菌肠毒素 B (SEB)、鼠疫杆菌的 F1 抗原和 D-dimer 等物质。

美国海军研究实验室(NRL)也开发了 1 种阵列荧光免疫传感器^[30],将抗体通过生物素-亲和素体系固定在平面波导上,理论上最多一次可同时检测 36 种物质,文献中一次检测了蓖麻毒素、霍乱毒素、SEB 等 9 种毒素。

4.2 光纤免疫传感器

美国海军研究实验室是研发倏逝波光纤免疫传感器最成功的典范,自上个世纪末开始致力于该传感器的研究,经过多年的发展,已经开发出较为成熟的免疫型光纤免疫传感器商业化产品,如 RAPTOR、Analyte2000 等。美军目前装备了 RAPTOR 型产品,并在海湾战场上得到了应用。

RAPTOR 的前身为原型机 MANTIS,1999 年,King 等^[31]利用后者对 SEB 进行检测,并考察了基质对检测的影响。随后,NRL 实验室对该原型机进行了改进,研制出半自动便携式光纤免疫传感器——RAPTOR,该型号传感器含 4 个光纤探头,可以同时检测 4 种不同物质。Anderson 等^[32]利用该传感器对 SEB、蓖麻毒素、弗朗西斯菌和枯草杆菌样品进行了验证性实验测试,灵敏度分别为 10 ng/mL、50 ng/mL、 5×10^5 cfu/mL 和 5×10^4 cfu/mL,假阳性和假阴性率都比较低,分析速度快,仅为 3~10 min。2003 年,Jung 等^[30]又对该产品进行了升级,重新设计了流动系统和光学系统,使得产品更便携、更易操作,利用生物素-亲和素体系将抗体固定到传感元件上,并使用 Alexa Fluor647 作为标记荧光分子,增大了检测信号,检测灵敏度也提高了 1 个数量级。

便携式多通道光纤免疫传感器“Analyte2000”可以现场检测爆炸物 2,4,6-三硝基甲苯(TNT)和六氢-1,3,5-三硝基-1,3,5-三嗪(RDX)^[33~35]。将抗体共价偶联于光纤探头表面,利用 TNT 或 RDX 与荧光标记的类似物 Cy5-EDA-TNB(或 RDH)竞争探头表面上的抗体,进行样品检测。将探头浸入 50%乙醇 PBS 溶液中,1 min 后即可实现再生。该传感器最多可同时检测 4 种不同物质。TNT、RDX 的检测限分别为 5、2.5 ng/mL。“Analyte2000”免疫传感器也被用来检测 SEB^[36]。采用三明治法检测毒素,先将免抗-SEB 抗体

共价固定在探头上,以 Cy5 标记的羊抗-SEB 抗体作为二抗进行检测.在缓冲液中,其检测灵敏度可达 0.5 ng/mL.可在 45 min 内完成 4 种样品的定量检测,15~20 min 内可完成定性检测.

Brummel 等^[37]研制了将多克隆抗体共价固定于探头表面,以检测环戊二烯类杀虫剂的倏逝波光纤维免疫传感器.该传感器灵敏度高,对于氯丹和七氯的检测限可达 1 nmol/L,对于狄氏剂和艾氏剂检测灵敏度与常规方法比较可分别提高 10 倍和 1 000 倍.

Mosiello 等^[38]构建了 1 种倏逝波光纤维免疫传感器检测 2,4-D.比较了 2 种荧光染料 Cy5 和 FITC 作为标记的检测结果,结果表明:用 FITC 标记的检测限低,而用 Cy5 标记的有更高的信噪比.当采用将单克隆抗体或半抗原固定在探头上的测试形式时,发现后者具有更高的响应信号和更好的重复性,由于采用的抗体质量缘故,检测限较高,不能满足环境检测的要求.

Thompson 等^[39]研制了 1 种使用直接竞争分析法检测腐马素 B1 的倏逝波免疫传感器.单克隆抗体通过双功能试剂共价固定于硅烷化后的光纤探头表面.实验表明该传感器的工作范围为 10~1 000 ng/mL,IC₅₀ 值为 70 ng/mL,检测限为 10 ng/mL.

Anderson 等^[40]建立了倏逝波光纤维生物传感器检测炭芽孢杆菌的方法.光纤烷基化后,使用双功能试剂与芽孢杆菌多克隆抗体共价结合,其保护性抗原与固定了多抗的光纤反应后,再使用 Cy5 标记的保护性抗原单克隆抗体作为二步反应抗体和荧光报告分子.结果表明,该传感器可以检测到 5~50 ng/mL 的抗原蛋白.

DeMarco 等^[41,42]研制了用于检测大肠杆菌 O157 H7 的光纤免疫传感器.该传感器采用三明治法,即将大肠杆菌 O157 H7 特异性多抗固定在光纤探头上,Cy5-标记的二抗用于产生荧光信号.对于牛肉样品,大肠杆菌 O157 H7 的检测范围为 3~30 cfu/mL.与传统的需要几天的微生物鉴别试验相比,该仪器可在 20min 内完成检测,基本实现了对大肠杆菌 O157 H7 的实时鉴定.

笔者设计的倏逝波全光纤免疫传感器初步实现了对微囊藻毒素 MC-LR 和 2,4-D 的检测,检测限分别为 0.03 μg/L 和 0.09 μg/L,IC₅₀ 值分别为 1.1 μg/L 和 3.8 μg/L.采用先将小分子物质与惰性蛋白结合,然后将该复合物通过双功能试剂连接到已用硅烷化试剂处理好的光纤探头上,使用 2 mg/mL 胃蛋白酶 (pH = 1.0) 作为再生液,实现了良好的再生性能.

5 展望

环境污染物种类繁多,且由于污染物大多为小分子物质,其本身不具备免疫原性,需要与大分子物质偶联后才能制备相应的抗体,因此小分子污染物优良抗体的制备是免疫传感器开发应用的关键技术环节.要使免疫传感器在环境检测领域有更大的作为,需要进一步研发灵敏度高、特异性强、稳定性好的高质量抗体.生物识别元件的修饰是免疫传感器检测过程中最重要的一环.要提高免疫传感器系统的检测性能,制备出生物识别分子活性高、载量大、均匀性、一致性好、非特异性吸附弱且具备良好再生性能的生物识别元件是修饰方法发展方向.

融合芯片、微加工、微电子学及生物信息等方面的新技术,未来的倏逝波荧光免疫传感器应将流动进样系统、检测系统、数据处理系统集成化、一体化,构成可实现自动采样、进样、分析样品、处理数据的智能型便携式检测仪.其有望成为日常野外检测、环境事故应急检测、在线检测的重要手段.鉴于倏逝波荧光免疫传感器所具备的诸多优点,欧美等发达国家投入了大量的人力物力进行研究,并正在推广应用,特别是倏逝波光纤维免疫传感器,美国已制定多种污染物的检测标准,而我国尚处于起步阶段,因此应加大此类传感器的研制开发力度.

参考文献:

- [1] Rabbany S Y, Donner B L, Ligler F S. Optic immunosensors [J]. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 1994, 22(5/6): 307-346.
- [2] Slovacek R E, Furlong S C, Love W F. Feasibility Study of a plastic evanescent-wave sensor [J]. *Sensor Actuator B*, 1993, 11(1-3): 307-311.
- [3] Golden J P, Shriver-Lake L C, Anderson G P, et al. Fluorometer and tapered fiber optic probes for sensing in the evanescent wave [J]. *Optical Engineering*, 1992, 31: 1458-1462.
- [4] Kronick M N, Little W A. A new immunoassay based on fluorescence excitation by internal reflection spectroscopy [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1975, 8: 235-240.
- [5] Jung C C, Saaski E W, McCrae D A, et al. RAPTOR: a fluorimmunoassay-based fiber optic sensor for detection of biological treats [J]. *IEEE Sensors Journal*, 2003, 3(4): 352-360.
- [6] Van Bergen S K, Bakaltcheva I B, Lundgren J S, et al. On-site detection of explosives in groundwater with a fiber optic biosensor [J]. *Environmental Science and Technology*, 2000, 34: 704-708.
- [7] Lim D V. Detection of microorganisms and Toxins with evanescent wave fiber-optic biosensors [J]. *Proceeding of the IEEE*, 2003, 91(6): 902-907.
- [8] González-Martínez M A, Puchades R, Maquieira A. Optical immunosensors for environmental monitoring: How far have we come? [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387: 205-218.

- [9] Tschmelak J, Proll G, Gauglitz G. Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: Assay optimization process for estrone as example [J]. *Talanta*, 2005, **65**: 313-323.
- [10] Harrick N J. *Internal reflection spectroscopy* [M]. New York: Wiley, 1967. 8-25.
- [11] Brecht A, Klotz A, Barzen C, *et al.* Optical immunoprobe development for multiresidue monitoring in water [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1998, **362**: 69-79.
- [12] Tschmelak J, Proll G, Riedta J, *et al.* Automated Water Analyser Computer Supported System (AWACSS) Part : Intelligent, remote-controlled, cost-effective, on-line, water-monitoring measurement system [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2005, **20**: 1509-1519.
- [13] Golden J P, Shriver-Lake L C, Anderson G P, *et al.* Fluorimeter and tapered fiber optic probes for sensing in the evanescent wave [J]. *Optical Engineering*, 1992, **31** (7): 1458-1462.
- [14] 黄惠杰, 翟俊辉, 赵永凯, 等. 多探头光纤倏逝波生物传感器及其性能研究[J]. *中国激光*, 2004, **31**(6): 718-722.
- [15] Golden J P, Saaski E W, Shriver-Lake L C, *et al.* Portable multichannel fiber optic biosensor for field detection [J]. *Optical Engineering*, 1997, **36**(4): 1008-1013.
- [16] 邓立新, 冯莹, 姜广文, 等. 基于相关检测的光纤倏逝波生物传感器研究[J]. *传感技术学报*, 2006, **19**(3): 783-789.
- [17] 龙峰, 施汉昌, 何苗, 等. 倏逝波全光纤免疫传感器的开发及性能研究[J]. *分析化学*, 2007, **35**(6): 919-923.
- [18] Bhatia S K, Shriver-Lake L C, Prior K J, *et al.* Use of thiol-terminal silanes and heterobifunctional crosslinkers for immobilization of antibodies on silica surfaces [J]. *Analytical Biochemistry*, 1989, **178**: 408-413.
- [19] Schuderer J, Akkoyun A, Brandenburg A, *et al.* Development of multichannel fluorescence affinity sensor system [J]. *Analytical Chemistry*, 2000, **72**: 3942-3948.
- [20] Anderson G P, Jacoby A A, Ligler F S, *et al.* Effectiveness of protein A for antibody immobilization for a fiber optic biosensor [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 1997, **12**: 329-336.
- [21] Piehler J, Brecht A, Cöckeler K E, *et al.* Surface modification for direct immunoprobes [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 1996, **11**(6/7): 579-590.
- [22] Barzen C, Brecht A, Gauglitz G. Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2002, **17**: 289-295.
- [23] Mallat E, Barzen C, Abuknesha R, *et al.* Part per trillion level determination of isoproturon in certified and estuarine water samples with a direct optical immunosensor [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, **426**: 209-216.
- [24] Tschmelak J, Proll G, Gauglitz G. Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: Assay optimization process for estrone as example [J]. *Talanta*, 2005, **65**(2): 313-323.
- [25] Rodriguez-Mozaz S, Lopez de Alda M, Barceló D. Analysis of bisphenol A in natural waters by means of an optical immunosensor [J]. *Water Research*, 2005, **39**: 5071-5079.
- [26] Tschmelak J, Proll G, Riedta J, *et al.* Automated water analyser computer supported system (AWACSS) Part : Project objectives, basic technology, immunoassay software design and networking [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2005, **20**: 1499-1508.
- [27] Tschmelak J, Proll G, Gauglitz G. Sub-nanogram per litre detection of the emerging contaminant progesterone with a fully automated immunosensor based on evanescent field techniques [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, **519**: 143-146.
- [28] Klotz A, Brecht A, Barzen C, *et al.* Immunofluorescence sensor for water analysis [J]. *Sensors and Actuators B*, 1998, **51**: 181-187.
- [29] Rowe C A, Scruggs S B, Feldstein M J, *et al.* An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes [J]. *Analytical Chemistry*, 1999, **71** (2): 433-439.
- [30] Rowe-Taitt C, Anderson G P, Lingerfelt B M, *et al.* Nine-analyte detection using an array-based biosensor [J]. *Analytical Chemistry*, 2002, **74** (23): 6114-6120.
- [31] King K D, Anderson G P, Bullock K E. Detecting staphylococcal enterotoxin B using an automated fiber optic biosensor [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 1999, **14**: 163-170.
- [32] Anderson G P, Lingerfelt B M, Taitt C R. Eight analytes detection using a four-channel optical biosensor [J]. *Sensor Letter*, 2004, **2**: 1-7.
- [33] Jung C C, Saaski E W, McCrae D A, *et al.* RAPTOR: A fluorimmunoassay-based fiber optic sensor for detection of biological threats [J]. *IEEE SENSORS JOURNAL*, 2003, **3**(4): 352-360.
- [34] Shriver-Lake L C, Donner B L, Ligler F S. On-Site detection of TNT with a portable fiber optic biosensor [J]. *Environmental Science and Technology*, 1997, **31**: 837-841.
- [35] Bakaltcheva I B, Ligler F S, Patterson C H, *et al.* Multi-analyte explosive detection using a fiber optic biosensor [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, **399**: 13-20.
- [36] Bergen S K, Bakaltcheva I B, Lundgren J S, *et al.* On-site detection of explosives in groundwater with a fiber optic biosensor [J]. *Environmental Science and Technology*, 2000, **34**: 704-708.
- [37] Tempelman L A, King K D, Anderson G P, *et al.* Quantitating staphylococcal enterotoxin B in diverse media using a portable fiber-optic biosensor [J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, **233**: 50-57.
- [38] Brummel K E, Wright J, Eldefrawi M E. Fiber optic biosensor for cyclodiene insecticides [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1997, **45**: 3292-3298.
- [39] Masiello L, Nencini L, Segre L, *et al.* A fibre-optic immunosensor for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid detection[J]. *Sensor Actuator B-Chem*, 1997, **38-39**: 353-359.
- [40] Thompson V S, Maragos C M. Fiber-optic immunosensor for the detection of fumonisin B-1 [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1996, **44**: 1041-1046.
- [41] Anderson G P, King K D, Cuttino D S. Biological agent detection using an airborne biosensor [J]. *Field Analytical Chemistry Technology*, 1999, **3**: 307-314.
- [42] DeMarco D R, Saaski E W, McCrae D A, *et al.* Rapid detection of *Escherichia coli* O157 H7 in ground beef using a fiber-optic biosensor[J]. *Journal of Food Protection*, 1999, **62**: 711-716.
- [43] Kramer M F, Tims T B, DeMarco D R, *et al.* Recovery of *Escherichia coli* O157 H7 from fiber optic waveguides used for rapid biosensor detection [J]. *Journal of Rapid Methods Automatic Microbiology*, 2002, **10**: 93-106.