

生物传感器

张先恩 王志通 简浩然

(中国科学院武汉病毒研究所)

在生物圈中,存在数以千计的物质,它们影响着生物学过程的各个方面,对这些物质进行快速自动分析,是科学家们梦寐以求的目标。在过去二十年中,生物学与物理学、化学融为一体,产生了一代新的传感元件—生物传感器(Biosensor),从而导致了分析生物学技术的一场革命。

生物传感器的起源、概念及原理

生物传感器的起源可追溯到六十年代。临

床诊断迫切需要建立各种快速分析方法,Updike等^[1]率先发表葡萄糖氧化酶传感器的研究报告,并引入酶电极一词。1977年,Rechnitz^[2]另辟途径,用粪便链球菌取代纯酶制成测精氨酸的微生物传感器,并预言,该传感器“将成为发展其它新的传感系统的模式”。其后,各种类型的生物传感器也应运而生,如免疫传感器,组织传感器,细胞传感器等。

生物传感器至今尚无精确的定义,它可以认为是“一种探针、装置或电极,当与生物基质

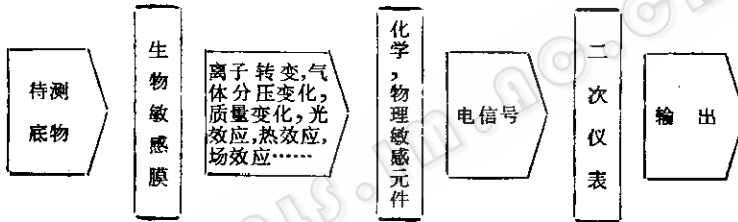


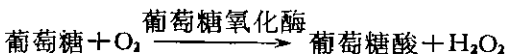
图1 生物传感器工作原理模式图

接触时,能将分析底物的存在状况(即浓度)转化为电信号^[3]。其工作原理可用图1表示。待测物质进入固定化生物敏感膜层,经生物学作用产生的信息被相应的化学或物理敏感元件转变成可定量和可处理的电信号,再经二次仪表放大并输出,便可知被测物浓度。

生物传感器的应用

(一) 临床诊断

1. 血糖测定:糖尿病,尿毒症,内分泌亢进等疾病的诊断常需要测定血糖,已设计出多种相应的酶电极。Hirose等^[4]用聚乙烯碳酸酯多孔膜固定葡萄糖氧化酶,与铂电极和参比甘汞电极组装在一起,样品中葡萄糖经扩散进入酶膜层立即发生氧化反应:



在+700mV极化电压作用下, H₂O₂在铂电极上被氧化,因而在铂与甘汞电极之间产生氧化还原电流,电流大小与H₂O₂浓度亦即葡萄糖浓度成正比,线性范围0—4,000mg/l,响应时间仅15秒(动态法),对新鲜血样的测定与常规法相关系数r=0.93,电极可连续工作两个月。

2. 胆固醇的测定:胆固醇含量过高是心血管疾病的危险信号,常规色度法耗时,专一性也不够高。Wollenberger等^[5]报道了一种放线菌传感器,菌体固定化以前经诱导产生胆固醇氧化酶。用动态法测定胆固醇只需30—70秒,线性范围0—0.13mM,变异系数为2—7%,在正常血糖水平下,葡萄糖对传感器的干扰可以忽略不计,可使用4周。

用于临床分析最成功的是尿酶电极^[6-8],其

表 1 各种用途的生物传感器

检测底物	生物敏感材料	传感元件	检测范围	响应时间 (min)
乙 酸	酵母菌	氧 电 极	5—54mg/l	30
甲 酸	丁基梭菌	氧 电 极	10—10 ³ mg/l	30
水 杨 酸	水杨酸羧化酶	二氧化碳电极	4—300mg/l	<8
中性脂质	脂蛋白酶	玻璃电极	5—50μm	1
胆 碱	胆碱氧化酶	氧 电 极	0.1mM	<2
过氧化氢	过氧化氢酶	氧 电 极	1.5mM	2
甲 醇	细菌细胞	氧 电 极	2—22mg/l	10
甲 烷	甲烷菌	氧 电 极	13μm—6.6mM	1
单磷酸腺苷	兔肌组织切片	氨 电 极	10 ⁻² —10 ⁻⁴ M	<8
维生素 B ₁	发酵乳酸杆菌	燃料电池	10 ⁻³ —10 ⁻² mg/l	360
制霉菌素	酵母菌	氧 电 极	0.5—54Units	60
GPT	丙酮酸氧化酶	铂 电 极	5—1600IU/l	1
苦 味 素	苷 酶	氟 电 极	10—10 ⁻⁴ M	<15
细菌数		燃料电池	10 ⁶ —10 ¹¹	15
谷氨酰胺	酶, 组织切片线粒体或细菌	氨 电 极	不同导	<7

它见表 1。

(二) 发酵产物分析

1. 氨基酸测定 醪液中氨基酸浓度测定通常采用微生物生长速率法,呼吸速率法,层析法和酶法,这些方法都不能满足流线 (on-line) 分析的要求。目前已经研究了至少 7 种传感器,可用来测定精氨酸,谷氨酸,酪氨酸,门冬氨酸,半胱氨酸,组氨酸和赖氨酸,其中赖氨酸的流线分析已由计算机控制。

人们未能分离到半胱氨酸脱巯基酶, Jensen 等^[9]用摩氏变形菌与 H₂S 电极组装成细菌传感器,样品中的半胱氨酸经细菌酶的作用分解成丙酮酸, NH₃ 和 H₂S, H₂S 被电极响应,电极电位随 H₂S 浓度增加而上升,胱氨酸浓度在 5×10^{-5} — 9×10^{-4} M 范围内与 H₂S 电极电位呈能斯特关系,响应时间 5—8 分钟。

2. 酒精测定: Hikinma 和 Karnbe^[10,11] 研制出测乙醇浓度的微生物传感器。传感器由固定化酵母菌, Teflon 膜和氧电极组成。酵母细胞对乙醇进行耗氧呼吸,氧电极膜表面氧分压下降导致氧电极输出电流下降,电流下降值与乙醇浓度成正相关,线性范围 0—22.5mg/l, 响应时间 <10 分钟,相对误差 ±6%,与气相色谱法的相关系数 $r = 0.98$, 传感器可连续工作三个星期。

(三) 环境质量监测

1. 环境诱变物的筛选

诱变物的快速筛选一般采用 Ames 法,在此基础上, Karube 等^[12,13]。建立了微生物传感器检测法。检测系统包括一对细菌电极: *B. subtilis* Rec⁺ 电极和 *B. subtilis* Rec⁻ 电极,将对电极插入含有葡萄糖的反应池中,待细菌外源呼吸稳定后(此时电极输出电流稳定),加入诱变剂, Rec⁺ 电极中的菌株具有重组修复功能,能够修复诱变剂对 DNA 所造成的化学损伤而正常生长,而 Rec⁻ 电极中的菌株无此修复能力,菌体渐渐死亡,由差示呼吸法,在 20—60 分钟便能得出结果。

2. BOD 测定: BOD (生物化学需氧量)是评价水体有机污染的重要指标,标准稀释法需要 5 天,不便于污水处理的分析控制。从 1977 年起,就陆续有 BOD 传感器的报道^[14—16]。Mikuma 等^[15]设计出 BOD 连续自动分析系统,样品通过测量池时,微生物外源呼吸速率被转化成电流而记录下来,测定一个样品约需 15 分钟,可使用 17 天。作者^[17]最近研制的 BOD 传感器实际工作寿命可达 6 周以上,且有较广泛的污水适用范围。

3. 无机氮化合物的测定: 利用自养菌电极测定某些无机物使生物传感器成为离子选择性

电极大家族中新的成员。目前报道主要见于无机氮化合物的测定^[18,19]。

新型生物传感器的开发研究

(一) 混合型生物传感器

Kubo 等^[20]研究了一种混合型传感器——结合酶反应和细菌代谢对血清和尿液中肌酸酐进行电流法测定。肌酸酐经酶水解释放出 NH_4^+ , NH_4^+ 继而被细菌氧化成 NO_2^- 和 NO_3^- , 消耗的氧被氧电极所测, 电极输出电流大小反应肌酸酐浓度, 线性范围 50—1000mg/l, 响应时间约 3 分钟, 肌酸酐类似物(如尿素, 尿酸)对传感器无干扰, 故适合生物流质的肌酸酐测定。

另一只类似的传感器用于尿素的测定^[21]。

(二) 复合功能酶传感器

ATP 是活机体中高能磷酸化合物, 一旦机体死亡, ATP 迅速消失, 其降解产物依次为二磷酸腺嘌呤核苷酸 (ADP), 一磷酸腺嘌呤核苷酸 (AMP), 次黄嘌呤核苷酸 (IMP), 次黄嘌呤核苷 (HXR), 次黄嘌呤 (HX), 黄嘌呤 (X), 尿酸 (U) 等。鱼肉鲜度可用 K 值表示:

$$K = \frac{\text{HXR} + \text{HX}}{\text{IMP} + \text{HXR} + \text{HX}}$$

Karube 等^[22]研制出一种新的鱼肉鲜度计, 用三种酶 (5'-核苷酸酶, 核苷磷酸化酶, 黄嘌呤氧化酶) 制成酶膜, 与氧电极组装成传感器对上述核苷酸关联物进行测定, 然后计算出 K 值, 定量地估计出鱼肉鲜度, 20 分钟可以完成一次测定。

(三) 酶标免疫传感器

Aizama 等^[23]用酶标免疫传感器测定人绒毛膜促性腺激素 (HCG), 用于诊断妊娠。整个过程包括三个步骤: (1) 竞争免疫化学反应, 即用一定量的过氧化氢酶标记的 HCG 与未标记的样品 HCG 竞争与膜载体结合; (2) 洗脱未结合上的游离 HCG 和酶标 HCG; (3) 酶活测定, 加入 H_2O_2 , 经酶催化产生 O_2 , 阳极电流随 O_2 浓度增加而升高, 亦反应出酶活, 酶活与样品 HCG 浓度成反比, 故能定量求得 HCG 浓度。

酶标免疫传感器提高了免疫反应的检测灵

敏度, 已报道用这类传感器测定血清抗原决定簇, 肿瘤抗原 α -甲基胎盘蛋白 (AFP)^[24,25] 等。

(四) 酶热敏电阻 (ET)

酶反应通常伴随可观的热量变化 (5—100 KJ/mol), 根据这一现象, 人们设计出酶热敏电阻 (ET)。一种以 ET 为主体的流动注射式热生物分析仪已经问世^[26]。酶首先被固定化, 再制成酶管, 严格控制酶管周围的温度 ($\pm 10^{-4}\text{C}$), 待底物通过酶管时, 用微热计监视酶管与参比电阻的热差, 分析热曲线可知底物浓度, Guilbaut^[27] 将醇氧化酶电极与醇氧化酶 ET 作了比较, 后者灵敏度高出前者 10 倍。ET 用于青霉素的联机常规检测, 与高压液相色谱法相比, 具有很强的竞争性^[28], 最近还报道用 ET 检测尿素, 肌酸酐和乳糖等^[29,30]。

(五) 酶膜电压晶体探测器

膜电压晶体探测器近年来用于大气痕量污染物的监测, 原理是当某气体物质被晶体表面膜特异性吸附后, 增加了晶体质量, 于是晶体振频下降, 频率下降与质量增加符合 Sauerbreg 关系式, 理论检出下限是 10^{-12} g。

Guilbaut^[31] 在两只金电极表面固定甲醛脱氢酶及辅酶因子 (NAD 和谷胱甘肽), 电极紧贴石英晶片, 制成晶体探针。工作时先输送过滤空气, 记频器读出晶体探针与参比晶体的频差。算出晶体上酶的质量, 以此频差为基线, 再送进样品空气, 晶体表面即有酶-底物复合物形成, 通过增加的质量算出甲醛含量。该探针对于甲醛蒸汽的线性响应为 10ppb—10ppm, 斜率为 200Hz/10ppb, 能使用 3 天, 或 100 次, 晶体可重复使用, 只需更换酶膜。整个监测系统已设计成携带式装置。

(六) 生物燃料电池

生物有机体在代谢过程中释放的物质若是电极活性物质如 H_2 , 就能构成所谓生物电池。这类传感器可用于维生素 B_1 和活菌数 (表 1) 以及 BOD^[32] 的测定。

(七) 酶光纤传感器

酶促反应产物常在某一波长具特征吸收峰, 此特征光波在光导系统中的变化代表酶促

反应程度,因而可知底物浓度。根据这一原理,碱性磷酸酶光纤传感器已研制成功^[32]。

(八) 生物敏感场效应晶体管 (BSFET)

将生物敏感膜与去掉金属栅的绝缘栅场效应晶体管结合起来就构成 BSFET, 又称生物芯片 (biochip)。当传感器浸渍于样品溶液时, 在膜中发生的生化反应使绝缘栅的膜电位改变, 进而调制沟道区的电子, 通过测量漏电流就可知溶液中底物的浓度。

FET (场效应晶体管) 具有灵敏度高, 噪声低, 体积小, 机械强度大等特点, 十分适合微型生物传感器的研制, Caras 等^[33]首先报道了青霉素 FET, 以后其它酶和微生物 FET 也相继问世。最近, 日本学者又成功研制出多功能生物芯片, 在一只微型基片上集成了脲酶电极和葡萄糖氧化酶电极, 能同时测定两种生理指标^[34,35], 而美国研究者们正在设计能同时测定 16 种生理指标的生物芯片^[36]。多功能生物芯片的问世, 意味着第二代生物传感器的诞生。

结 语

生物传感器的研究使生物物质的无损耗快速分析成为可能。国际生物工程年会 (1984) 已将生物传感器列为现代生物工程的五大领域之一, 国际性刊物 "Biosensor" 已于 1985 年在英国创刊, 首次以生物传感器为主调的国际生物工程年会 (Biotech 87') 于 1987 年 3 月在西德召开, 这一切为生物传感器的研究发展创造了良好的条件。除了预料将出现更多类型和用途的生物传感器以外, 人们还期望利用基因工程和固定化酶技术提高生物传感器的热稳定性和化学稳定性。

人们还注意到, 生物体本身就是各种传感器的汇集体, 其精巧的结构和奇特的功能是现阶段任何人工传感器都无法比拟的, 利用 FET 开发多功能生物芯片, 是向生物体借鉴的重要途径。

另一方面, 生物传感器与计算机联用, 已经实现了若干生物物质自动化分析。可以预料, 随着生物传感器的集成化和器件化, 将会出现

以计算机为主体的, 包括生物芯片和其它敏感元件的多功能全自动信息处理网, 它的出现将赋予生命科学巨大的推动力。

参 考 文 献

- [1] Updike, S. L. et al.: Nature, 214: 986, 1967.
- [2] Guilbaut, G. G. et al.: Anal. Chim. Acta, 94: 358, 1977.
- [3] Lowe, C. R.: Biosensors, 1: 3, 1985.
- [4] Hirose, S. et al.: J. Molecul. Catal., 6: 251, 1979.
- [5] Wollenberger, U. et al.: Anal. Lett., 13(B13): 1201, 1980.
- [6] Guilbaut, G. G. et al.: J. Amer. Chem. Soc., 91: 2164, 1969.
- [7] Papastathopoulos, D. S. et al.: Anal. chim. Acta, 79: 17, 1975.
- [8] Szuminsky, N. H. et al.: Biotechnol. Bioeng., 24: 642, 1984.
- [9] Jensen, M. A. et al.: Anal. Chim. Acta, 101: 125, 1978.
- [10] Hikuma, M. et al.: Biotechnol. Bioeng., 111: 1845, 1979.
- [11] Karube, I. et al.: Biochimie, 62: 567, 1980.
- [12] Karube, I. et al.: Anal. chem. 53: 1852, 1981.
- [13] Karube, I. et al.: ibid, 54: 1725, 1982.
- [14] Karube, I. et al.: biotechnol. Bioeng., 19: 1535, 1977.
- [15] Hiduma, M. et al.: E. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 8: 189, (1977).
- [16] Strand, S. E. et al.: JWPCF, 56: 262, (1984).
- [17] 张先恩等: 环境科学学报, 6: 184 1986.
- [18] Okada, T. et al.: Biotechnol. Bioeng., 25: 1641, 1983.
- [19] Karube, I. et al.: Anal. Chem., 53: 1852, 1981.
- [20] Kubo, I. et al.: Anal. chim. Acta, 151: 371, 1983.
- [21] Okada, T. et al.: E. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 15: 149, 1982.
- [22] Karube, I. et al.: J. Agric. Food. Chem., 32: 314, 1984.
- [23] Aizawa, M. et al.: Anal. Biochem., 94: 22, 1979.
- [24] Biotienx, J. L. et al.: Clin. Chimica Acta, 136: 19, 1984.
- [25] Aizawa, M. et al.: Anal. chim. Acta, 115: 61, 1980.
- [26] Moskch, K. et al.: Anal. chem., 53: 83A, 1981.
- [27] Guilbaut, G. g. et al.: Anal. chem., 55: 1582, 1983.
- [28] Decristoforo, G. et al.: Anal. Chem., 56, 263, 1984.
- [29] Winquist, F. et al.: Anal. Chem., 58: 145, 1986.
- [30] Scheller, F. et al.: Anal. Chem., 57: 1741, 1985.
- [31] Guilbaut, G. G.: Anal. Chem., 55: 1682, 1983.
- [32] Arnold, K. A.: Anal. Chem., 57: 565, 1985.
- [33] Caras, I. S. et al.: Anal. Chem., 52: 1935, 1980.
- [34] Hanazato, Y. et al.: Proc. Int. Meet. Chem. Sens.. Fukuoka, 513, 1983.
- [35] Hanazato, Y. et al.: IEEE Trans. Electron Devices, ED-33: 47, 1986.
- [36] Garreff, H. De Y.: High Technology, Nov. 1983, 41.