

生物传感器的应用*

何星月¹ 刘之景^{2, †}

(1 中国科学技术大学生命科学院 合肥 230027)

(2 中国科学技术大学近代物理系 合肥 230026)

摘要 综述了生物传感器的类型、基本原理、目前的研究现状及应用情况. 生物传感器是以生物分子作为敏感元件的一类新兴传感器, 将化学信号、热信号、光信号转化成电信号或者直接产生电信号予以放大输出, 从而得到检测结果. 生物传感器广泛应用于食品工业、环境监测、发酵工业、军事领域和临床医学等方面. 主要用于一些食品和污染物浓度的测量, 微生物呼吸活性的测定, 微生物培养方法的选择等. 此外, 还可以作为水处理设备的终端. 可以预料, 生物传感器将向着微型化、实用化、多样化和人工智能化的方向发展, 并且还将用于对生物功能进行人工模拟, 研究人工感官. 生物传感器具有快速、准确、方便等优点, 具有广阔的应用前景, 必将在市场上开辟出一片新的天地.

关键词 生物传感器, 食品工业, 环境监测, 发酵工业

The application of biosensors

HE Xing-Yue¹ LIU Zhi-Jing^{2, †}

(1 Department for Biology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

(2 Department of Modern Physics, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract The types, principles, status and applications of biosensors are reviewed. Biosensors are a new kind of sensor that uses biological molecules as the sensing element. Chemical, thermal and optical signals can be converted into electrical signals, or an electrical signal can be directly produced and amplified. Biosensors are widely used in food production, environmental inspection, fermentation industry, defence and clinical medicine. They are mainly used for determining the concentration of food and contamination, the respiration activity and selection of cultivation methods for microorganisms, as well as the final process in water treatment. It can be expected that future developments will aim at miniaturization, practicality, diversification and artificial intelligence. They may also be used for research on artificial sense organs. Swift, accurate and convenient to use, biosensors have broad application prospects, and a new place in the market.

Key words biosensors, food industry, environmental inspection, fermentation industry

1 原理

传感器是能感受特定的被测量的物质质量并按照一定规律将其转换成可用信号的器件或装置. 它通常由敏感元件、转换元件及相应的机械结构和电子线路所组成. 生物传感器技术是建立在固定化细胞和固定化酶技术的基础之上的, 它以生物分子去识别被测目标, 然后将生物分子所发生的物理或化学

变化转化为相应的电信号予以放大输出, 从而得到检测结果. 生物传感器的工作原理主要有以下几种类型.

1.1 将化学变化转变成电信号

已研究的大部分生物传感器的工作原理均属于

* 2002-06-13 收到初稿, 2002-12-09 修回

† 通讯联系人. E-mail: zjliu@ustc.edu.cn

这种类型. 以酶传感器为例, 酶催化特定底物(底物是指在酶反应中, 和酶发生反应的特定物质即反应物, 在酶反应中特称为底物)发生反应, 从而使特定生成物的量有所增减. 用能把这类物质的量的改变转换为电信号的装置和固定化酶耦合, 即组成酶传感器. 常用的这类信号转换装置有氧化电极、过氧化氢电极、氢离子电极、其他离子选择性电极、氨气敏电极、二氧化碳气敏电极、离子场效应晶体管等. 除酶以外, 用固定化细胞、微生物、固定化细胞器、抗原和抗体也可以组成相应的传感器, 其原理和酶传感器类似.

1.2 将热变化转换成电信号

固定化的生物材料与相应的被测物作用时常伴有热的变化. 例如大多数酶反应的热焓变化量在 25—100kJ/mol 的范围. 这类生物传感器的工作原理是把反应的热效应借热敏电阻转换为阻值的变化, 后者通过有放大器的电桥输入到记录仪中.

1.3 将光信号转变为电信号

有些酶, 例如过氧化氢酶, 能催化过氧化氢/鲁米诺体系发光, 因此如设法将过氧化氢酶膜附着在光纤或光敏二极管的前端, 再和光电流测定装置相连, 即可测定过氧化氢含量. 还有很多细菌能与特定底物发生反应, 产生荧光. 也可以用这种方法测定底物浓度.

上述三种原理的生物传感器, 都是将分子识别元件中的生物敏感物质与待测物发生化学反应, 将反应后所产生的化学或物理变化再通过信号转换器转变为电信号进行测量, 这种方式统称为间接测量方式. 此外还有一种直接测量方式.

1.4 直接产生电信号方式

这种方式可以使酶反应伴随的电子转移、微生物细胞的氧化直接(或通过电子递体的作用)在电极表面上发生. 根据所得的电流量即可得底物浓度.

2 应用

2.1 食品工业

食用牛肉很容易被大肠杆菌 O157. H7. (*Escherichia coli* O157. H7.) 所感染, 因此需要快速、灵敏的方法检测和防御大肠杆菌 O157. H7. 一类的细菌. 2002 年, Kramer 等人研究的光纤生物传感器可以在几分钟内检测出食物中的病原体, 如大肠杆菌 O157. H7., 而传统的方法则需要几天. 生物传感器可以直接测量 10^2 CFU(菌落形成单位)的大肠杆菌 O157. H7., 检测病原体之后即可以将它分离到培养

基上生长. 从检测出病原体到从样品中重新获得病原体并使它在培养基上独立生长总共只需 1 天时间, 而传统方法需要 4 天^[1].

2002 年, Niculescu 等人研究的一种安培生物传感器可以检测饮料中的乙醇. 这种生物传感器是将一种醌蛋白醇脱氢酶埋在聚乙烯中, 酶和聚合物的比例不同可以影响该生物传感器的性能. 在目前进行的实验中, 该生物传感器对乙醇的测量极限为 1nM. 已经对不同的酒样品进行了实验, 该生物传感器可以成功地应用于酒发酵工程中乙醇的连续自动在线监测^[2].

还有一种快速灵敏的免疫生物传感器可以用于测量牛奶中双氢除虫菌素的残余物, 它是基于细胞质基因组的反应, 通过光学系统传输信号. 已达到的检测极限为 16.2 ng/ml. 一天可以检测 20 个牛奶样品^[3].

2002 年, Morales 等人研究的一种聚四氟乙烯-酪氨酸酶生物传感器可以测量食物中的安息香酸, 原理是基于安息香酸对酶的抑制作用. 该生物传感器的电极可以长时间稳定运作, 测量极限为 $9.0 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. 并且它的专一性好, 在同时含有众多其他物质的食物中可以准确地检测安息香酸的浓度而不受影响. 用该生物传感器对两类不同的样品进行了测量, 高度不沾水的蛋黄酱和可乐类饮料, 不需要任何样品的处理过程, 其结果令人满意^[4].

还有一种发光的大肠杆菌(*Escherichia coli* K-12)用于测量鱼肉样品中四环素等抗菌素的含量. 该生物传感器是将一种带荧光素酶操纵子的质粒导入大肠杆菌中. 从鱼肉中可以检测的四环素和土霉素的浓度极限分别为 20ng/kg 和 50ng/kg, 测量时间为两小时. 该生物传感器可以检测低于欧盟所规定的最大浓度极限, 不需要样品的溶解和分离过程, 已经用于测量鱼肉中的土霉素等含量^[5].

2.2 环境监测

生物传感器可以用于测定生化耗氧量(biochemical oxygen demand, BOD). 生化耗氧量的测定是监测水体被有机物污染的最常用指标. 生化耗氧量是指在规定条件下, 微生物分解存在于水中的某些可氧化物质(特别是有机物)所进行的生物化学过程中所消耗溶解氧的量. 常规的 BOD 测定需要 5 天的培养期. 它操作复杂, 重复性差, 耗时耗力, 干扰性大, 不宜现场监测. 一种毛孢子菌(*trichosporon cutaneum*)和芽孢杆菌(*bacillus licheniformis*)被用于制作一种微生物 BOD 传感器. 实验发现, 该毛孢子

菌对葡萄糖反应灵敏,而芽孢杆菌对谷氨酸反应灵敏,因此,将两种细菌一起用于测量,可以得到能同时精确测量葡萄糖和谷氨酸浓度的 BOD 生物传感器。所用菌种细胞浓度:毛孢子菌为 $1.1 \times 10^8 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$,芽孢杆菌为 $2.2 \times 10^3 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。测量范围为 $40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 到 $0.5 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$ 。灵敏度为 $5.84 \text{ nA} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$ 。该生物传感器稳定性好,在 58 次实验中,标准偏差仅为 0.0362。所需的反应时间为 5—10min^[6]。

除了生化耗氧量的测定以外,生物传感器还可以用于测定多种污染物的浓度。一种安培生物传感器用于测量酚类化合物已经运用于纸浆厂的污水测定。它是基于漆酶的抑制作用。该生物传感器显示了相当好的稳定性,可以连续工作 3 个月。分别用苯酚、邻二氯苯酚、邻甲氧基苯酚等进行实验,该生物传感器显示了在微摩尔浓度时对这些化合物选择性的检测能力。传感器上的一种透析膜可以保护它不受污泥等影响,并且提供适合的工作环境。这使得它可以用于测量一些复杂的样品,而不需要样品的处理过程^[7]。

2002 年,Weitz 等人将一些能发光的真菌(*armillaria mellea* 和 *mycena citricolor*)用于制作一种发光的生物传感器,该传感器可用于毒性检测。主要用于检测 3,5-二氯苯酚,五氯苯酚,铜和锌等离子。实验证明,同时使用原核和真核的真菌做生物传感器可以达到很好的效果。通过监测菌类的生长情况可以监测污染物的浓度,所用时间为 1 小时。目前,有些丝状真菌也开始用来进行毒性监测^[8]。

污水中重金属离子浓度的测定也是不容忽视的。目前人们已经成功设计了一个完整的重金属离子的生物有效性测定的监测和分析系统。它是以固定化微生物和生物体发光测量技术为基础的。将弧菌属细菌(*vibrio fischeri*)体内的一个操纵子在一个铜诱导启动子的控制下导入产碱杆菌属细菌(*alcaligenes eutrophus*, AE1239)中,可使细菌在铜离子的诱导下发光,发光程度与离子浓度成比例。将微生物和光纤一起包埋在聚合物基质中,可以获得灵敏度高、选择性好、测量范围广、储藏稳定性强的生物传感器。目前,这种生物传感器可以达到的最低测量浓度为 1 nM ^[9]。

除了单独的监测外,生物传感器也可以作为水处理设备的一部分。人们发展了一种新型的 pH 生物传感器,用于监测生活污水的卫生状况,以利于污水的再利用。其原理是基于细菌对葡萄糖的新陈代

谢作用。在 37°C 的工作温度下,利用肠细菌的生长状况来监测 pH 值。该传感器适用于在线检测,可以作为水处理装置的终端。该传感器绝对的监测极限为 10^5 CFU (菌落形成单位)/ $\text{ml} \cdot \text{h}$ ^[10]。

2.3 发酵工业

各种生物传感器中,微生物传感器最适合发酵工业中的测量。因为发酵过程中常存在对酶的干扰物质,并且发酵液往往不是清澈透明的,不适用于光谱等方法测定。应用微生物传感器则极有可能消除干扰,并且不受发酵液混浊程度的限制。同时,由于发酵工业是大规模的生产,微生物传感器具有的低成本、设备简单的特点占了极大的优势。

微生物传感器可用于原材料如糖蜜、乙酸等的测量,代谢产物如头霉素、谷氨酸、甲酸、甲烷、醇类、青霉素、乳酸等的测量。测量的装置基本上都是由适合的微生物电极与氧电极组成,原理是利用微生物的同化作用耗氧,通过测量氧电极电流的变化量来测量氧气的减少量,从而达到测量底物浓度的目的。

2002 年, Tkac 等人将一种以铁氰化物为媒介的葡萄糖氧化酶细胞生物传感器用于测量发酵工业中的乙醇含量,在 13s 内可以测量达到灵敏度为 $3.5 \text{ nA} \cdot \text{mM}^{-1}$ 。该微生物传感器的检测极限为 0.85 nM ,测量范围为 2 到 270 nM,稳定性能很好。在连续 8.5h 的检测中,灵敏度没有任何降低。该生物传感器已经成功地应用于乙醇发酵工业中的测量^[11]。

微生物传感器还能用来进行代谢试验的鉴定。传统的微生物代谢类型的鉴定都是根据微生物在某种培养基上的生长情况进行的,这些实验方法需要较长的培养时间和专门的技术。微生物对底物的同化作用可以通过其呼吸活性进行测定。用氧电极可以直接测量微生物的呼吸活性。因此,可以用微生物传感器来测定微生物的代谢特征。这个系统已用于微生物的简单鉴定。微生物培养基的选择,微生物酶活性的测定,废水中可被生物降解的物质估计,用于废水处理的微生物选择,活性污泥的同化作用试验,生物降解物的确定,微生物的保存方法选择等。

除了在食品工业、发酵工业、环境监测方面的应用,生物传感器还广泛应用于军事和医学领域。在军事上使用最多的是乙酰胆碱酯酶传感器,可以检测出 $0.1\text{—}0.5 \text{ ppm}$ 的沙林,这一方法至今仍被各国普遍应用于神经性毒剂毒包和报警器中。还可以将单克隆抗体与微电子技术相结合,制成可以快速检测和识别许多病原体的有用工具。在医学方面,生物传

感器多用于测定 pH 值,一些电解质离子浓度、葡萄糖、胆固醇等物质浓度,还可以利用抗体-抗原生物传感器进行免疫分析等。

3 展望与讨论

美国的 Harold H. Weetal 指出,生物传感器商品化要具备以下几个条件:(1)要有足够的敏感性和准确性;(2)易操作;(3)价格便宜;(4)易于批量生产;(5)能在生产过程中进行质量监测。其中价格因素决定了传感器在市场上有无竞争力。在各种生物传感器中,微生物传感器最大的优点就是成本低、操作简便、设备简单,因此在前途上的前景是十分巨大和诱人的。相比起来,酶生物传感器等的价格就比较昂贵。但微生物传感器也有其自身的缺点,主要的缺点就是选择性不够好,这是由于在微生物细胞中含有多种酶引起的。现已有报道加专门抑制剂以解决微生物电极的选择性问题。除此之外,微生物固定化方法也需要进一步完善,首先要尽可能保证细胞的活性,其次细胞与基础膜结合要牢固,以避免细胞的流失。另外,微生物膜的长期保存问题也有待进一步的改进,否则难于实现大规模的商品化。

总之,常用的微生物电极和酶电极在各种应用中各有其优越之处。若容易获得稳定、高活性、低成本的游离酶,则酶电极对使用者来说是最理想的。相反,若生物催化须经过复杂途径,需要辅酶,或所需酶不宜分离或不稳定时,微生物电极则是更理想的选择。而其他各种形式的生物传感器也在蓬勃发展,其应用也越来越广泛。可以预料,生物传感器将向着微型化、实用化、多样化和人工智能化的方向发展。生物传感器的实用化和商品化是长期奋斗的目标。现在很多生物传感器的商品化已成现实,各种生物传感器正在逐步进入市场。生物传感器的多样化,不仅类型多样化,而且功能也多样化,多种新的生物活性材料、生物敏感材料和新的换能器件不断出现,带来生物传感器类型的多样化,而不同功能的集成,将带来功能的多样化。生物传感器的微型化并同生

物微系统组合是科学技术发展的必然趋势。近年来,由于分子电子学的发展,具有自组装功能的分子电子器件或生物芯片已经出现。生物传感器今后发展的另一个重要方向,即对生物功能进行人工模拟,研究人工感官。目前,多集中于嗅敏、味敏传感器方面。

我国的生物传感器研究工作也在飞速发展,尤其是对微生物传感器在 BOD 测定中的应用研究较为广泛。目前,国内从事生物传感器研究较多的有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、中国科学院理化技术研究所、哈尔滨理工大学测控技术与通信工程学院、湖南大学化学化工学院、西安交通大学材料科学与工程学院等研究机构。可以预料,随着固定化技术的进一步完善,随着人们对生物体认识的不断深入,生物传感器必将在市场上开辟出一片新的天地。

参 考 文 献

- [1] Kramer M F, Tims T B, DeMarco D R *et al.* *Journal of rapid methods and automation in microbiology*, 2002, 10 (2) : 93
- [2] Niculescu M, Erichsen T, Sukharev V *et al.* *Analytica chimica acta*, 2002, 463 (1) : 39
- [3] Samsonova J V, Baxter G A, Crooks S R H *et al.* *Journal of aoac international*, 2002, 85 (4) : 879
- [4] Morales M D, Morante S, Escarpa A *et al.* *Talanta*, 2002, 57 (6) : 1189
- [5] Pellinen T, Bylund G, Virta M *et al.* *Journal of agricultural and food chemistry*, 2002, 50 (17) : 4812
- [6] Suriyawattanukul L, Surareungchai W, Sritongkam P *et al.* *Applied microbiology and biotechnology*, 2002, 59 (1) : 40
- [7] Freire R S, Duran N, Kubota L T. *Analytica chimica acta*, 2002, 463 (2) : 229
- [8] Weitz H J, Campbell C D, Killham K. *Environmental microbiology*, 2002, 4 (7) : 422
- [9] Leth S, Maltoni S, Simkus R *et al.* *Electroanalysis*, 2002, 14 (1) : 35
- [10] Dewettinck T, Van Hege K, Verstraete W. *Applied and microbiology and biotechnology* 2001, 56 (5—6) : 809
- [11] Tkac J, Vostiar I, Gemeiner P *et al.* *Bioelectrochemistry*, 2002, 56 (1—2) : 127

IUPAP 宣布 2005 年为“世界物理年”

2002 年 10 月在德国柏林举行的全体大会上,国际纯粹与应用物理联合会(IUPAP)通过了将 2005 年定为“世界物理年”的决议。这一计划由欧洲物理学会(EPS)最先提出,旨在在世界范围内提高公众对物理学的了解,之所以定在 2005 年是为了纪念爱因斯坦在 100 年前写下的传奇性的论文,它为物理学的三个领域奠定了基础:相对论、量子论和布朗运动。有关活动计划正在酝酿当中。