

# 生物传感器检测主要病原微生物研究进展

张艳玲, 黄俊生

(中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 儋州 571737)

**摘要:**生物传感器是一种新兴的技术研究工程领域,也是当今的热门领域。笔者综述了生物传感器发展状况,对目前主要和热门的各种检测病原微生物的传感器检测技术进行总结。通过对各种技术的总结提出生物传感器技术的应用构想,探讨了生物传感器的发展趋势。

**关键词:**生物传感器;病原菌;微生物;菌液浓度

**中图分类号:**Q819 **文献标识码:**A

## Advance in the Study on Biosensors Detection of the Main Pathogens

Zhang Yanling, Huang Junsheng

(Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences Environment and Plant Protection Institute, Danzhou 571737)

**Abstract:** Biosensor is an emerging area of technology research projects and hot field in nowadays. This paper reviews the development of biological sensors, top of the current major and detection of pathogenic microorganisms technical summary. Through the various technical summary of the proposed biosensor technology applications idea, discussion on the trend of development of biological sensors.

**Key words:** biosensor, pathogenic bacteria, microbion, bacterium density

生物传感器研究起源于20世纪的60年代,1967年Updike和Hicks把葡萄糖氧化酶(GOD)固定化膜和氧电极组装在一起,首先制成了第一种生物传感器<sup>[1]</sup>。到80年代生物传感器研究领域已基本形成,1985年“生物传感器”国际刊物在英国创刊;1987年生物传感器经典著作在牛津出版社出版;1990年首届世界生物传感器学术大会在新加坡召开,并且确定以后每隔2年召开一次。中国生物传感器研究始于20世纪80年代初,从事生物传感器研究的科研机构有中国科学院微生物所、中国科学院上海生化所、上海冶金所、中国科学院武汉病毒所、华东理工大学和山东省科学院生物研究所等单位,直至今日,这些单位仍在生物传感器领域进行着创新研究和开发。

常见的生物传感器有:酶传感器、组织传感器、微生物传感器、免疫传感器、场晶体管传感器。生物传感器在检测病原微生物方面的应用一般是利用抗原和抗体之间的高度特异性,将抗原(或抗体)结合在生物敏

感膜上,来测定样品中相应抗体(或抗原),用传感器内的信号转换器和信号放大器来读取数据进行检测。

### 1 生物传感器现状

目前,生物传感器应用较多的领域是在医疗、医药、生物工程、环境保护、食品、农业、畜牧等与生命科学关系密切的一些领域。例如,临床上用免疫传感器等生物传感器来检测体液中的各种化学成分,为医生的诊断提供依据;生物工程产业中用生物传感器监测生物反应器内各种物理、化学、生物的参数变化以便加以控制;环境监测中用生物传感器监测大气和水中各种污染物质含量,食品行业中用生物传感器检测食品中营养成分和有害成分的含量、食品的新鲜程度等。早在1979年,Matssunage等开发了非染料偶合的燃料电池型微生物电极系统,检测范围 $10^7\sim 10^9$ cfu/ml。1982年,Nishikawa等以2,6-二氯酚靛酚为媒介,并用滤膜预富集制成的生物传感器对细菌的检测极限可达 $10^4$ cfu/ml。1989年,Muramatsu等用一个压电晶体传感

**基金项目:**国家科技支撑计划项目(2007BAD48B02),中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2007hzs1J007),科技部“国家技术基础条件平台工作”(2005DKA21201)。

**第一作者简介:**张艳玲,女,1983年出生,汉族,硕士,浙江义乌,研究方向为微生物应用。通信地址:571737 海南省儋州市环境与植物保护研究所黄俊生课题组, Tel: 0898-23300209, E-mail: zyl520320@126.com。

**通讯作者:**黄俊生,男,汉,讲师,从事生物农药的开发和研究。通信地址:571737 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所。Tel: 0898-23300187, Email: h888111@126.com。

**收稿日期:**2008-06-24, **修回日期:**2008-07-19。

器系统测定病原微生物 (*Canolidaalbicans*), 测定范围  $10^6 \sim 10^8$  cfu/ml。Cao 等在 1995 年应用光纤传感器检测分析血清、全血、血浆中的鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原; Rowe-Taitt 等在 2000 年使用光纤传感器检测了炭疽杆菌、土拉弗氏菌等; Anderson 等应用光纤传感器 RAPTOR, 先后检测了鼠疫杆菌 F1 抗原、葡萄球菌肠毒素、蓖麻毒素、炭疽芽孢、土拉弗氏菌等。2004 年在西班牙格拉纳达会展中心召开的第八届世界生物传感器大会可以说是世界生物分析系统领域的一次大的盛会, 参会代表人数和发表论文数量都创造了历史新高。共有 700 余名来自世界各地的学者参加了大会, 对 9 个专题进行了分组讨论。包括核酸传感器和 DNA 芯片、免疫传感器、酶传感器、组织和全细胞传感器、用于生物传感器的天然与合成受体、新的信号转导技术、系统整合 / 蛋白质组学 / 单细胞分析、生物电化学 / 生物燃料 / 微分析系统、商业发展和市场。其中, 单分子 / 细胞分析和生物印迹生物传感器由于它们良好的发展态势及在生命科学研究中的重要位置成为与会学者讨论的热点问题。

## 2 生物传感器在检测病原微生物方面的应用

### 2.1 鼠疫杆菌的检测

目前, 对鼠疫的检测方法可分为 4 类, 包括常规检测方法、以检测蛋白质为标志的免疫学检测方法、以检测核酸为标志的聚合酶链反应和全自动微生物分析系统。但是这些方法存在一些缺陷, 细菌培养是一种较为敏感的方法, 但在实践中并非如此, 因为现场的材料常常是长时间放置甚至是腐败的, 不易得到准确结果。免疫学检测是一种很常用的方法, 灵敏度也很高, 但不能进行快速诊断。PCR 检测技术能快速准确地检测鼠疫, 而且还能做追溯诊断, 但检测费用比较高, 难以广泛的运用于鼠疫的监测<sup>[1]</sup>。

最新的光纤传感器 FOB—3 由光学系统、电子学系统、数据采集系统及控制与处理系统组成。目前使用的光纤材料是聚苯乙烯。FOB—3 中激光激发光路产生的光波在光纤全反射的过程中激发光纤纤芯表面标记在生物分子上的荧光染料, 接受光路接受荧光信号, 并由光电倍增管转换成电信号, 计算机对输出的电信号进行分析并给出光电倍增工作电压的控制电压值 (PMT Val)、光信号值 (Flou Val)、功率值 (Laser Val) 及 Flou/Laser 值。运用双抗体夹心法进行检测。将包被有抗鼠疫杆菌抗体 (500  $\mu$ g/ml) 的光纤分别与浓度为 5、20、50、100、200、500、1000 ng/ml 的鼠疫杆菌抗原反应 10 min, 清洗, 再与荧光素 Cy5 标记的 F1 单抗 (50  $\mu$ g/ml) 反应 10 min, 鼠疫杆菌抗原浓度在

50~1000 ng/ml 时, 可以就可得到明显的阳性信号<sup>[1]</sup>。

### 2.2 炭疽芽孢杆菌 (繁殖体) 和炭疽芽孢的检测

Gatta-Menking<sup>[4]</sup>等采用免疫磁珠作为生物反应载体, 以钉作为激发生物发光物质, 来实现炭疽芽孢的传感器检测。Dvna1 免疫磁珠直径为 2.8  $\mu$ m, 磁珠表面在出厂时已经进行了链霉亲和素包被。生物素标记的捕获抗体可以通过亲和素生物素系统牢固地吸附在磁珠表面, 在与芽孢抗原进行孵育后, 加入山钉标记的报告抗体。然后用光源激发, 产生的激发光山传感器设备检测。结果检测极限最少可至 100 个芽孢。

2006 年, 魏华, 姜永强等人用光纤生物传感器 FOB—3 检测, 将炭疽芽孢杆菌 Sterne 株在 LB 肉汤中于 37 $^{\circ}$ C 培养一定浓度, 将包被抗 Sterne 株全菌多抗 (500  $\mu$ g/ml) 的光纤分别插入不同浓度的炭疽芽孢杆菌溶液中孵育 10 min, 加阴性对照, 清洗后再与标记 Cy5 的抗全菌多抗 (5  $\mu$ g/ml) 反应 10 min 测量结果。炭疽芽孢杆菌 Sterne 株繁殖体浓度为  $3 \times 10^1 \sim 3 \times 10^6$  cfu/ml 时, 可检测到阳性信号; 炭疽芽孢浓度为  $4 \times 10^4 \sim 4 \times 10^6$  cfu/ml 可得到阳性结果<sup>[5]</sup>。

### 2.3 葡萄球菌肠毒素的检测

1990 年, Huet 等用玻碳电极上标记固相化第一抗体的 ELISA 法, 检测了葡萄球菌 A 型肠毒素并对其进行了定量研究, 结果表明, 该法检测样品体积不受限制, 检测灵敏度可以达到  $10^{-12}$  mol/dm<sup>3</sup><sup>[6]</sup>。Homola J<sup>[6]</sup>等应用表面质粒共振生物传感器 (surface plasmon resonance biosensor, SPR) 检测牛奶样品中的肠毒素 B, 灵敏度为 0.5 ng/ml, 并可达到实时监控的目的。Huei-Cing Lin 等人利用压电晶体免疫传感器检测葡萄球菌肠毒素 B, 他们以聚乙烯亚胺作为媒介, 把抗 SEB 抗体连接到晶体表面, 让其选择性与 SEB 结合, 通过测定晶体振荡频率的变化来实现对 SEB 定量, 检测范围为 2.5~6.0  $\mu$ g/ml, 这一方法具有很高的灵敏度和特异性, 但稳定性较差。

2003 年, 向四海, 崔大付等人利用自行研制开发的表面等离子体谐振 SPR-2000 生化分析仪检测金黄色葡萄球菌肠毒素 B (SEB) 与其羊的单克隆抗体 IgG 的免疫吸附反应, 并研究了用 SPR 技术检测生物大分子相互识别反应相关的一些问题<sup>[7]</sup>。

2006 年, 魏华, 姜永强等人运用新研制的光纤生物传感器 FOB—3 检测葡萄球菌肠毒素 B, 将包被 SEB (葡萄球菌肠毒素 B) 多抗 (500  $\mu$ g/ml) 的光纤分别与浓度为 100、10、1、0.1、0.05、0.02、0.01  $\mu$ g/ml 的 SEB 孵育 10 min, 加阴性对照, 清洗后再与标记 Cy5 的 SEB 单抗 (5  $\mu$ g/ml) 反应 10 min。测量结果。SEB 浓度为

0.1~100 $\mu$ g/ml 时,可检测到阳性信号。

#### 2.4 大肠杆菌快速检测

2005年葛晶,殷涌光等人运用胶体金 SPR(表面等离子体子共振 Surface Plasmon Resonance)生物传感器快速检测大肠杆菌<sup>[8]</sup>。由于 SPR 对金属表面电介质的折射率非常敏感,不同电介质其表面等离子体共振角不同。同种电介质,其附在金属表面的量不同,则 SPR 的响应强度不同。基于这种原理的生物传感器通常将一种具特异识别属性的分子即配体固定于金属膜表面,监控溶液中的被分析物与该配体的结合过程。在复合物形成或解离过程中,金属膜表面溶液的折射率发生变化,随即被 SPR 生物传感器检测出来。胶体金能稳定又迅速地吸附蛋白质,而蛋白质的生物活性无明显改变。胶体金标记,实质上是抗体蛋白等生物大分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程。采用胶体金复合抗体夹心系统,将 SPR 传感器对大肠杆菌 E.Coli O 157:H7 的检测限从 10<sup>6</sup>cfu/ml 提高到了 10<sup>1</sup>cfu/ml,检测时间为 33~40min。

2006年,李群和,王剑平<sup>[9]</sup>等人用压电免疫生物传感器检测大肠杆菌 O157:H7,在 QCM 石英金电极表面采用 4 种不同的抗体固定方法:硅烷固定法,聚乙烯亚胺固定法,3-巯基丙酸固定法和蛋白 A 固定法等将抗体固定于金电极表面,将抗体固定在电极表面,并通过气相分析法和流动注射法来跟踪了解石英金电极表面每一步反应的频率变化方法来检测大肠杆菌 O157:H7。根据不同浓度的菌体溶液响应值存在规律性来测定菌体浓度。建立了基于 QCM 的压电免疫生物传感器的微生物检测系统,能够快速准确的检测大肠杆菌 O157:H7。

#### 2.5 沙门氏菌的检测

1992年,Pboktheha<sup>[10]</sup>利用压电晶体免疫生物传感器检测沙门氏菌,沙门氏菌的抗体被固定在晶体的表面,根据其产生的频率进行检测。包被过的晶体浸入可疑微生物液体中,晶体和微生物之间发生结合,完成检测的时间长短主要取决于细胞数,从低密度 1 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/mg 的 3~5h 到高密度 1 $\times$ 10<sup>8</sup>cells/mg 0.5h 之间,压电免疫生物传感器能够检测出 1 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/mg 的溶液浓度。

2007年 Morales MD, Serra B<sup>[11]</sup>用葡萄糖电化学生物传感器检测沙门氏菌的原理是葡萄糖石墨-聚四氟乙烯复合涂层电极测量葡萄糖的消耗量而引起电流计的变化来检测。将葡萄糖电化学生物传感器分别放入浓度为 6.5 $\times$ 10<sup>1</sup>~6.5 $\times$ 10<sup>6</sup>cfu/ml 的沙门氏菌溶液中进行测量。细菌消耗葡萄糖,引发一系列的氧化还原反应,

电子发生转移,可以通过生物传感器检测到,并放大为电流在电流计中显示。

2007年 Guntupalli R, Hu J<sup>[12]</sup>等人运用磁致弹性共振生物传感器成功检测沙门氏菌。磁致弹性共振生物传感器有一个特性就是共振频率能够通过磁通量被检测到,而磁通量与菌液浓度相关。检测沙门氏菌的生物传感器是把多克隆抗体固定在磁致伸缩平面上。然后将生物传感器是直接插入含有沙门氏菌的溶液中。抗体和细菌抗原发生结合,通过磁通量的变化进而被磁致弹性共振生物传感器检测。

#### 2.6 生物传感器检测微量 SARS 病毒、天花病毒

《科学》杂志报道,华裔科学家陈建柱最新制成的生物传感器,仅需 20s 时间即可侦测出微量 SARS 病毒、天花病毒等的存在。通过遗传工程他和他的同事培育出了 B 淋巴细胞,这种 B 淋巴细胞带有水母中的钙敏感生物发光蛋白质。当 B 淋巴细胞同病原体接触时,钙的水平在几秒钟内增多,水母蛋白质就会发射光,从而显示出病原体—SARS 病毒、天花病毒等的存在。即使存在少量病毒,用这种生物传感器,也能在 20s 内测出病毒的存在。这种测定病原体存在的技术,其速度和灵敏度都大大高于目前所有其他方法。

#### 2.7 新型生物传感器的研发

还有一些新的检测技术在不断的发展和运用。美国 Rochester 大学医学中心的科学家目前研究发现了一新的生物传感器,它能精确而快速地检测出传染因子,该研究主要领导人 Benjamin Miller 称,在传统检测方法中,细菌只能存活几天,而这种新型的生物传感器存活的时间可以持续到拍摄过程结束。研究人员称该技术为“阵列成像反射法”。其检测系统主要将硅片制成一定形状以便激光反射切断芯片,并且,只有在目标细菌存在的情况下,这些芯片才可以被看到。这种蛋白质提取自细菌,这种易位 Intimin 受体(Tir)蛋白被放置于芯片中,可以在“分子叉”中观察到 Tir。大肠杆菌将叉状物植入细胞,这时,Tir 会绑定一种叫做 Intimin 的大肠杆菌蛋白。在芯片中的 Tir 位置和样本中任何大肠杆菌之间也发生有同样的过程。探针样本与细菌改变芯片表面结合,相机拍摄芯片便可俘获相关分析进而成像。

### 3 总结与展望

综合以上的方法,可以设计实验,要确定生物体感染了什么病原菌,只要从病发部位把病原菌分离出来,进行液体纯培养。用抗体和抗原特异结合的原理,分别用不同的抗原(抗体)来检测,特异的抗原(抗体)只和特异抗体(抗原)就合,根据各种微生物的特性

(产生电子转移、发生光学变化等)用生物传感器对其信号进行转换、放大,就可以鉴定该病原菌。例如在植物病原菌检测方面,传统孢子捕捉器有一些缺陷,有时很难鉴定所捕获病原菌的种类,或对所捕获孢子的计数和定量工作繁琐费时等,运用现代生物学方法如生化和分子生物学方法技术要求高,又繁琐<sup>[13]</sup>。若是能将生物传感器技术运用与植物病原菌检测方面将是一个历史性的突破。目前这方面的研究已愈来愈受到人们的关注。如英国牛津大学 Molly Dewey 教授的研究小组近年来通过研究已建立了快速定量检测灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 孢子的免疫荧光技术;英国 Rothamsted<sup>[14]</sup> 试验站通过把单克隆抗体技术与 Rotorod 捕捉器结合。设计出了旋转臂“免疫捕捉器(Immunotrap)”。已尝试用来定量监测油菜黑斑病菌(*Alternaria brassicae*)孢子。生物传感器用于微生物检测最主要的优点是它的现场检测能力。传统的酶联免疫吸附试验需要专业人员在几个小时内才能完成,而传感器可以在 10~20min 内得出结果。生物传感器还可以做到小型化和自动化,使没有经过培训的人员在很短的时间内完成检测。

近年来,随着生物科学、信息科学和材料科学发展的推动,生物传感器技术飞速发展。未来的生物传感器将具有以下特点:功能多样化,微型化,智能化与集成化,低成本、高灵敏度、高稳定性和高寿命。当今世界发达国家对传感器技术发展极为重视,视为涉及国家安全、经济发展和科技进步的关键技术之一,将其列入国家科技发展战略计划之中。因此,近年来传感技术迅速发展,传感器新原理、新材料和新技术的研究更加深入、广泛,传感器新品种、新结构、新应用不断涌现、层出不穷。

### 参考文献

- [1] 冯德荣. 生物传感器产业现状和发展前景 [J]. 生物工程进展, 1996,16(3):13-15.
- [2] 魏玉利,邱芳蕾,刘圣臣. 鼠疫菌检测方法的研究进展. 生命科学仪器,2007,5(4):32-34.
- [3] 魏华,姜永强,赵永凯. 用光纤生物传感器检测炭疽杆菌、鼠疫杆菌及葡萄球菌肠毒素 B. 生物技术通讯,2006,17(3):374-377.
- [4] Gatto-Menking D L, Yu H, Bruno J G, et al. Sensitive detection of biotoxoids and bacterial spores using an immunomagnetic electrochemiluminescence sensor[J]. ASAIO J., 1996, 42(6):942-946.
- [5] 杨君,冯志彪. 生物传感器在微生物毒素检测中的应用研究. 农产品加工,2007,5(5):80-84.
- [6] Homola J, Dostalek J, Chen S, et al. Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk [J]. Int J Food Microbiol, 2002, 75:61-69.
- [7] 向四海,崔大付. 利用表面等离子体谐振技术检测金黄色葡萄球菌肠毒素 B. 中国实验诊断学,2003,7(3):190-194.
- [8] 葛晶,殷涌光. 使用 SPR 生物传感器快速检测大肠杆菌的研究[D]. 吉林大学博士学位论文,2005,8.
- [9] 李群和,王剑平. 基于压电免疫生物传感器的大肠杆菌 O157:H7 检测方法研究[D]. 浙江大学硕士学位论文,2006,6.
- [10] Plomer M Guilbault GG, Hock B. Development of Piezoelectric Immunosensor for Detection of Enterobacteria [J]. Enzymol Microb Technol, 1992, 14(3):23-40.
- [11] Morales MD, Serra B, Guzman-Vazquez de Prada A, et al. An electrochemical method for simultaneous detection and identification of Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Salmonella choleraesuis using a glucose oxidase-peroxidase composite biosensor. Analyst, 2007, 132(6):572-578.
- [12] Guntupalli R, Hu J, Lakshmanan RS, Huang, et al. A magnetoelastic resonance biosensor immobilized with polyclonal antibody for the detection of Salmonella typhimurium. Biosens Bioelectron, 2007, 15: 22(7):1474-1479.
- [13] 周益林,黄幼玲,段霞瑜. 植物病原菌监测方法和技术. 植物保护, 2007,33(3):20-23.
- [14] Dewey F M, Ebeler S E, Adams S D, et al. Quantification of Botrytis in grape juice determined by a monoclonal antibody-based immunoassay[J]. American Journal of Viticulture and Enology, 2000, 51: 276-282.