

---

# 第11章 生物传感器

---

# 一、生物传感器的基本概念

---

- 生物传感器通常是指由一种生物敏感部件和转化器紧密结合，对特定种类生物活性物质具有选择性和可逆响应的分析装置。
  - 它是发展生物技术必不可少的一种先进的检测与监控方法，也是对物质在分子水平上进行快速和微量分析的方法。
-

## (一) 生物传感器工作原理

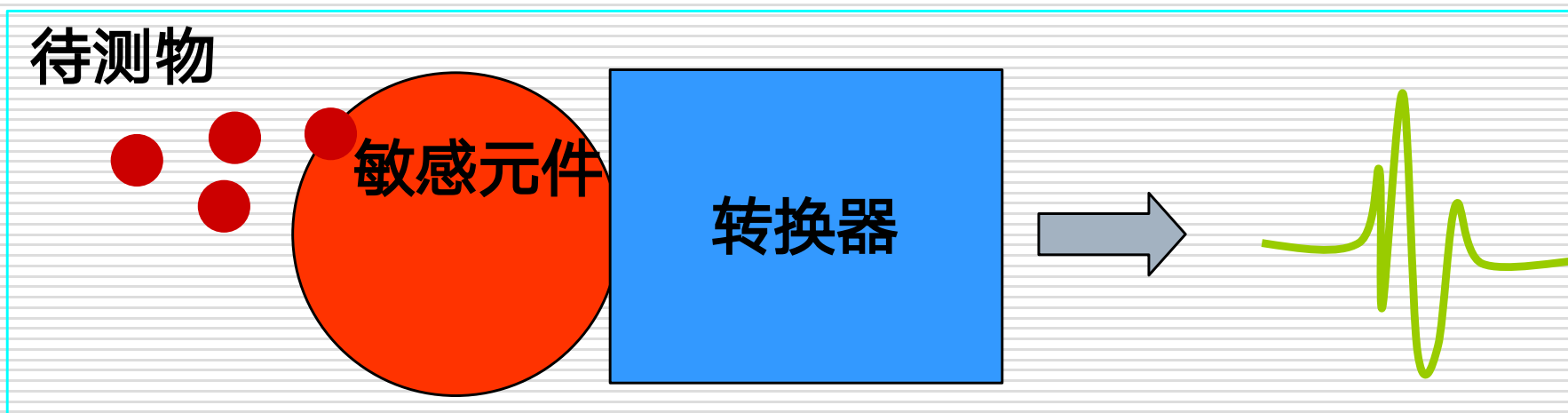
---

待测物质经扩散作用进入固定生物膜敏感层，经分子识别而发生生物学作用，产生的信息如光、热、音等被相应的信号转换器变为可定量和处理的电信号，再经二次仪表放大并输出，以电极测定其电流值或电压值，从而换算出被测物质的量或浓度。

---

# 1 生物传感器的模型

---



- 是一门由生物、化学、物理、医学、电子技术等多种学科互相渗透成长起来的高新技术。
  - 应用领域：环境监测、食品分析、生物医学、发酵工业等
-

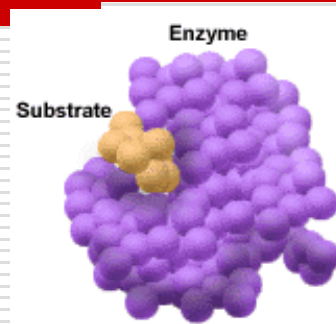
## 2 生物传感器的组成

敏感元件：

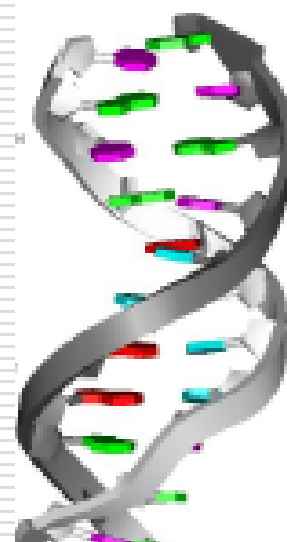
酶、抗体、核酸、细胞等。

转换器：

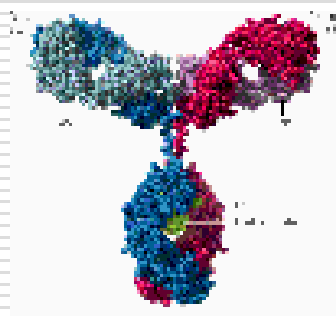
电化学电极、光学检测元件、场效应晶体管、压电石英晶体、表面等离子共振。



酶 (Enzyme)



DNA



抗体 (Antibody)

### 3 转化器转化为电信号的方式

#### (1) 将**化学变化转变成电信号**

---

酶传感器为例，酶催化特定底物发生反应，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，常用转换装置有**氧电极、过氧化氢**。

---

## (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。

---

### (3) 将**光信号**转变为电信号

---

例如，过氧化氢酶能催化**过氧化氢/鲁米诺**体系发光，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。

---



---

上述三原理的生物传感器共同点：

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。

---

## (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。

---

## (二) 生物传感器发展历程

---

- 开端于 20 世纪 60 年代。
  - 1962 年**克拉克**等人报道了用葡萄糖氧化酶与氧电极组合检测葡萄糖的结果，可认为是最早提出了生物传感器(**酶传感器**)的原理。
  - **1967年Updike**等人实现了酶的固定化技术，研制成功酶电极，这被认为是**世界上第一个生物传感器**。
-

- 20世纪70年代中期后,生物传感器技术的成功主要集中在对生物活性物质的探索、活性物质的固定化技术、生物电信号的转换以及生物传感器等研究,并获得了较快的进展,如Divies首先提出用固定化细胞与氧电极配合,组成对醇类进行检测所谓“微生物电极”。
  - 1977年,铃木周一等发表了关于对生化需氧量(BOD)进行快速测定的微生物传感器的报告,并在微生物传感器对发酵过程的控制等方面,作了详细报导,正式提出了对生物传感器的命名。
-

## (三) 生物传感器分类

---

### 1 根据输出信号产生的方式

生物亲和型、代谢型

### 2 根据生物分子识别元件上的敏感物质

酶传感器、组织传感器、微生物传感器、免疫传感器、基因传感器等

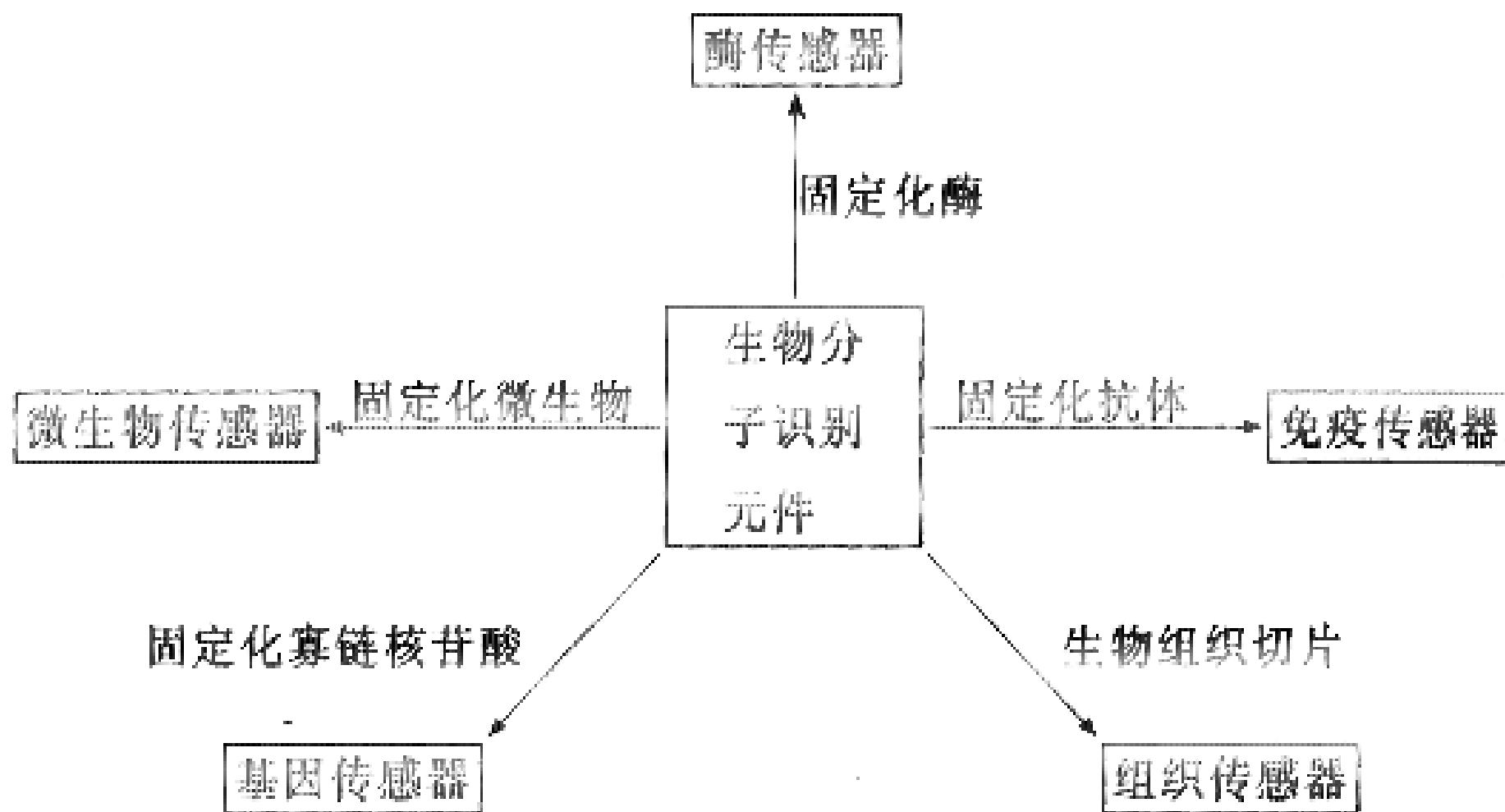
### 3 根据信号转化器

电化学生物传感器、半导体生物传感器、测热型生物传感器、测光型生物传感器、测声型生物传感器等

### 4 其他分类

被测对象、大小、功能

---



生物传感器按生物分子识别元件敏感物质分类

---

## (1) 生物亲合型传感器

被测物质与分子识别元件上的敏感物质具有生物亲合作用，即二者能特异地相结合，同时引起敏感材料的分子结构和/或固定介质发生变化。例如：电荷、温度、光学性质等的变化。反应式可表示为：



---

## (2) 代谢型传感器

底物（被测物）与分子识别元件上的敏感物质相作用并生成产物，信号转换器将底物的消耗或产物的增加转变为输出信号，这类传感器称为代谢型传感器，其反应形式可表示为：





- 
- 上面介绍的各种名称都是类别的名称，每一类又都包含许多种具体的生物传感器。
  - 例如，仅酶电极一类，根据所用酶的不同就有几十种，如葡萄糖电极、尿素电极、尿酸电极、胆固醇电极、乳酸电极、丙酮酸电极等等。
  - 就是葡萄糖电极也并非只有一种，有用pH电极或碘离子电极作为转换器的电位型葡萄糖电极，有用氧电极或过氧化氢电极作为转换器的电流型葡萄糖电极等。实际上还可再细分。
-

## (四) 生物传感器组成部分

---

- 一是生物分子**识别元件(感受器)**,是具有分子识别能力的生物活性物质(如组织切片、细胞、细胞器、细胞膜、酶、抗体、核酸、有机物分子等);
  - 二是**信号转换器(换能器)**,主要有**电化学**电极(如电位、电流的测量)、**光学**检测元件、**热敏电阻**、**场效应晶体管**、**压电石英晶体及表面等离子共振器件**等,当待测物与分子识别元件特异性结合后,所产生的复合物(或光、热等)通过信号转换器变为可以输出的电信号、光信号等,从而达到分析检测的目的。
-

## (五) 生物传感器优点

---

- 1 根据生物反应的特异性和多样性，理论上可以制成测定所有生物物质的传感器，因而测定范围广泛。
  - 2 一般不需进行样品的预处理，它利用本身具备的优异选择性把样品中被测组分的分离和检测统一为一体，测定时一般不需另加其他试剂，使测定过程简便迅速，容易实现自动分析。
  - 3 体积小、响应快、样品用量少，可以实现连续在位检测。
-

- 
- 4 通常其敏感材料是固定化生物元件，可**反复多次使用**。
  - 5 **准确度高**，一般相对误差可达到1%以内。
  - 6 **可进行活体分析**。
  - 7 传感器连同测定仪的**成本远低于**大型的分析仪，因而便于推广普及。
  - 8 有的微生物传感器能可靠地指示**微生物培养系统**内的供氧状况和副产物的产生，能得到许多复杂的物理化学传感器综合作用才能获得的信息。
-

## 二、生物传感器的信号转换器

---

- 生物传感器中的信号转换器是将分子识别元件进行识别时所产生的化学的或物理的变化转换成可用信号的装置。
  - 生物传感器的信号转换器已有许多种，其中到目前为止用得最多的且比较成熟的是电化电极，用它组成的生物传感器称为电化学生物传感器。
  - 可用作生物传感器的信号转换器的电化电极，一般可以分为两种类型。电位型电极和电流型电极。
-

# (一) 电位型电极

---

## 1 离子选择电极

离子选择性电极是一类对特定的离子呈选择性响应的电极，具有快速、灵敏、可靠、价廉等优点，因此应用范围很广。离子选择性电极作为生物传感器的信号转换器只是它的一种应用，在生物医学领域也常直接用它测定体液中的一些成分（如 $\text{H}^+$ ， $\text{K}^+$ ， $\text{Na}^+$ ， $\text{Ca}^{2+}$ 等）。

## 2 氧化还原电极

氧化还原电极是不同于离子选择电极的另一类电位型电极。

---

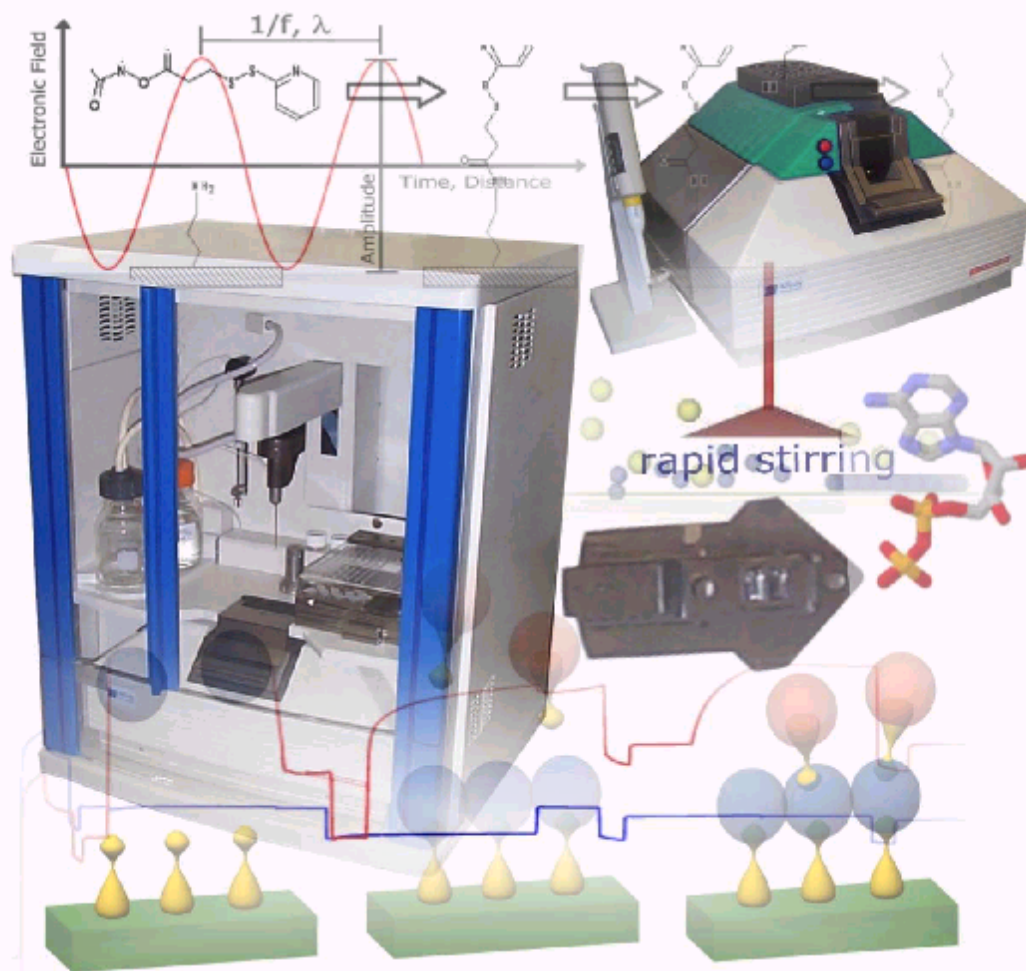
## (二) 电流型电极

---

电化学生物传感器中采用电流型电极为信号转换器的趋势日益增加，这是因为这类电极和电位型电极相比有以下优点：

- (1) 电极的输出直接和被测物的**浓度呈线性关系**，不像电位型电极那样和被测物浓度的对数呈线性关系。
  - (2) 电极输出值的**读数误差**所对应的待测物浓度的相对误差比电位型电极的**小**。
  - (3) 电极的**灵敏度**比电位型电极的**高**。
-

### 三、敏感器件（分子识别元件）





# (一) 酶传感器(EnzymeSensor)

---



# 1 酶的活力单位（酶单位）

---

## （1）标准酶单位

国际生物化学协会酶委员会规定了酶单位的标准形式为：一个酶单位（U）是在特定的条件下1min内催化形成 $1\mu\text{mol}$ 产物的酶量（或转化 $1\mu\text{mol}$ 底物的酶量）。

特定条件一般是指选定的条件，如温度为 $25^{\circ}\text{C}$ ， $30^{\circ}\text{C}$ ， $37^{\circ}\text{C}$ ，最适pH，底物为饱和溶液。

---

## (2) 酶的比活力

每毫克蛋白质所含某酶的活力单位数称某酶的比活力。

## (3) 酶浓度

每毫升酶蛋白溶液所含某酶的活力单位数称某酶浓度。

一定重量或一定体积酶制剂所具有的酶活力单位数叫做**总活力**。在酶的提纯过程中，总活力逐渐下降，比活力逐渐提高。

---

---

#### (4) 转换值

也称分子活力或摩尔活力。其定义是1摩尔酶在最适条件下，1min内所转化的底物的摩尔数。转化值的单位为 $\text{min}^{-1}$ ，转换值的倒数是一个催化循环所需要的时间。

---

## 2 酶的固定化技术

---

**固定化酶**(Immobilized Enzyme) 是20世纪60年代发展起来的一项新技术。以往使用的酶绝大多数是水溶性的酶。这些水溶性酶催化结束后，极难回收，因而阻碍了酶工业的进一步发展。60年代后，在酶学研究领域内涌现出固定化酶。**它是通过物理的或化学的手段，将酶束缚于水不溶的载体上，或将酶束缚在一定的空间内，限制酶分子的自由流动，但能使酶充分发挥催化作用；过去曾称其为水不溶酶或固相酶。**1971年第一届国际酶工程会上正式建议采用固定化酶的名称。

从60年代起，固定化酶的研究发展很快，起初人们把注意力集中在酶的固定化方法研究上，近年来，不但固定化方法和载体开发有了长足发展，并且已转向它在工业、医药、化学分析、亲和层析、环境保护、能源开发以及理论研究等方面的应用研究。

---

---

**固定化酶**的研究已取得大量重要成果，发挥着巨大作用，受到人们极大的关注。其重要原因是它和水溶性酶比较具有以下**优点**：

- (1)极**易**将固定化酶与底物、产物**分离**；产物溶液中没有酶的残留，**简化了提纯工艺**。
  - (2)**可**在较长时间内**反复**使用，有利于工艺的连续化、管道化。
  - (3)酶**反应过程**可以**严格控制**，有利于工艺自动化和微电脑化。
  - (4)在绝大多数情况下**提高**了酶的**稳定性**。
  - (5)较能适应于多酶反应。
  - (6)酶的使用**效率提高**，产物得率提高，产品质量有保障，**成本低**。
-

**固定化细胞同时也存在一些缺点：**

(1)必须保持菌体的完整，防止菌体自溶，否则，将影响产品纯度。

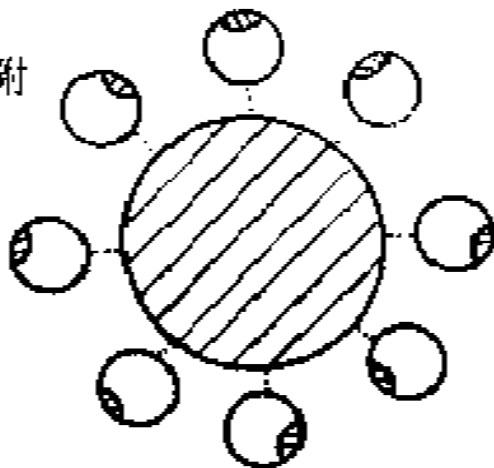
(2)必须防止细胞内蛋白酶对所需酶的分解，同时，需抑制胞内其他酶的活性副产物的形成。

(3)细胞膜、壁会阻碍底物渗透和扩散。

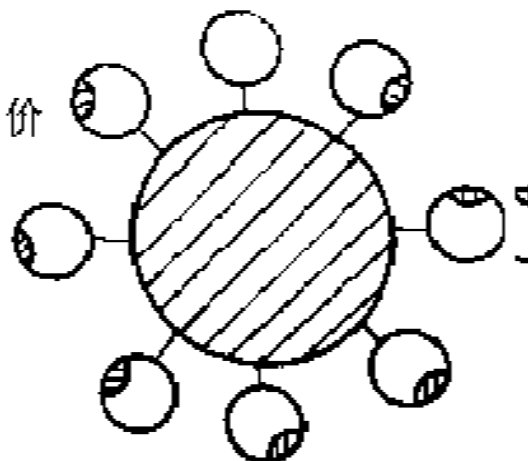
## 1 酶的固定化方法

酶的固定化方法有：**吸附法；共价键结合法；交联法；包埋法。**  
如下图：

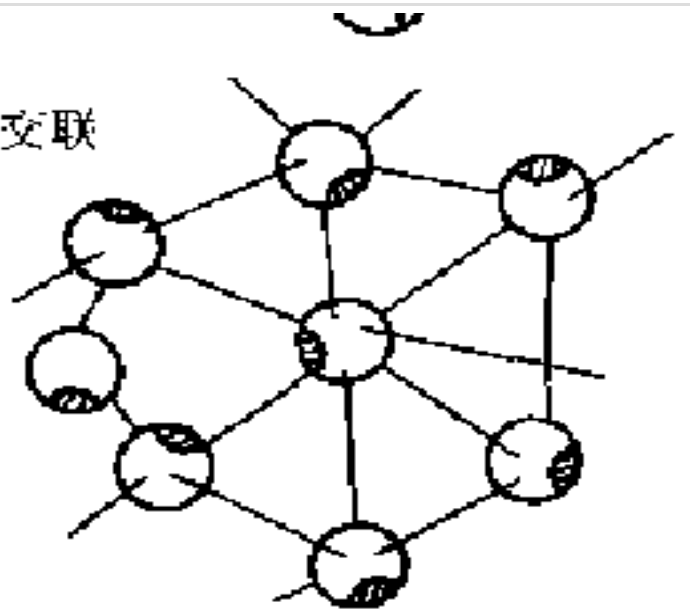
1. 吸附



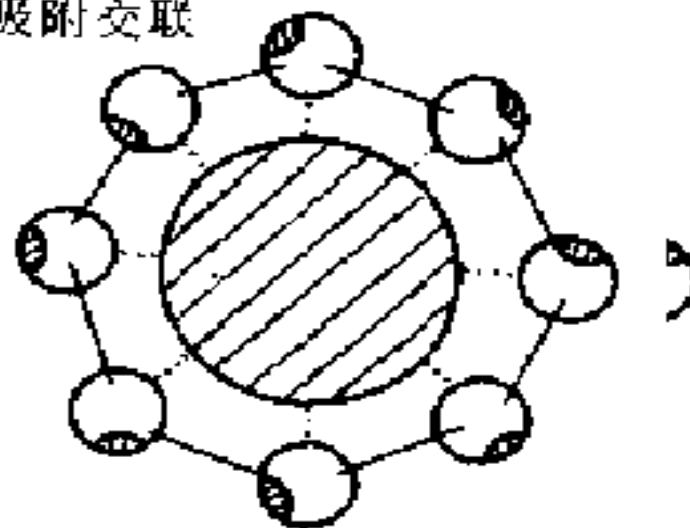
2. 共价



### 3. 交联

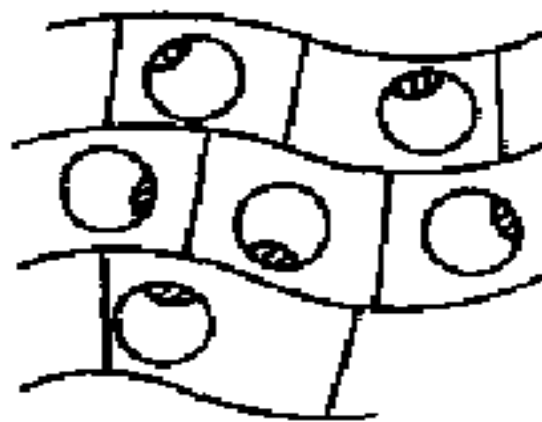


### 吸附交联

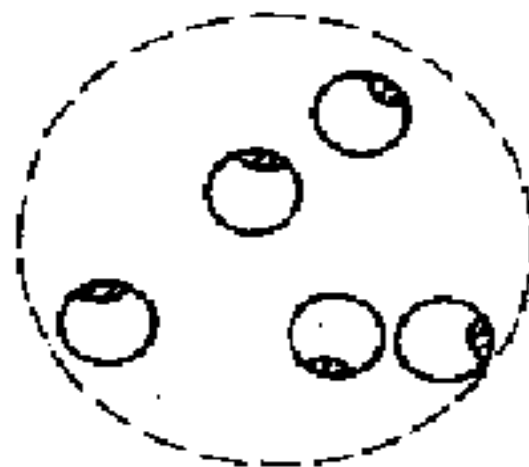


### 4. 包埋

#### (1) 基质包埋



#### (2) 微胶囊包埋





---

## □ (1) 惰性载体——物理吸附法

- 此法是酶分子通过极性键、氢键、疏水力或 $\pi$ 电子相互作用等吸附于不溶性载体上。
  - 常用的载体有：多孔玻璃、活性炭、氧化铝、石英砂、纤维素酯（包括硝酸纤维素、醋酸纤维素）、葡聚糖、琼脂糖、聚氯乙烯、聚苯乙烯等。
  - 已用此法固定化的酶如：脂肪酶、 $\alpha$ -D葡萄糖苷酶、过氧化物酶等。
-

---

## □ (2) 离子载体—交换法

选用具有离子交换剂的载体，在适宜的pH下，使酶分子与离子交换剂通过离子键结合起来，形成固定化酶。常用的带有离子交换剂的载体如下DEAE—纤维素（二乙氨基乙基纤维素）、TEAE—纤维素（三乙氨基乙基纤维素）、AE—纤维素（氨基乙基纤维素）、CM—纤维素（羧甲基纤维素）、DEAE—葡萄糖、肌酸激酶等。

## □ (3) 活化载体—共价结合法

- a.重氮法      b.迭氮法      c.卤化氰法.
  - d.缩合法      e.烷基化法
-

---

## □ (4) 物理包埋法

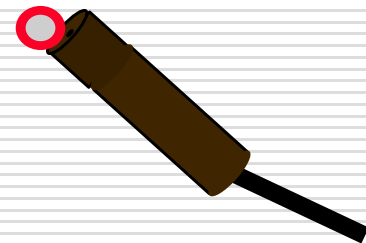
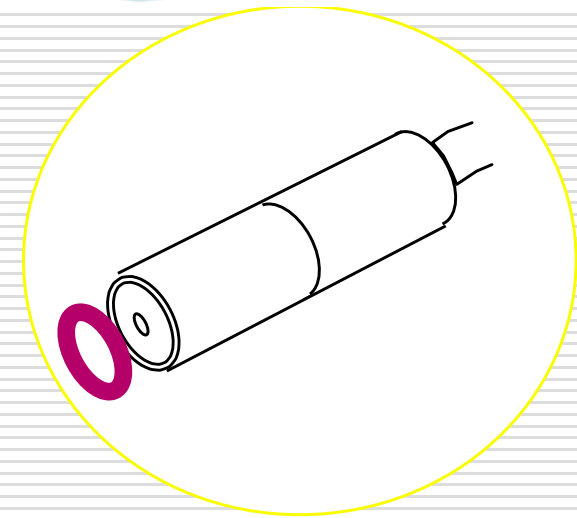
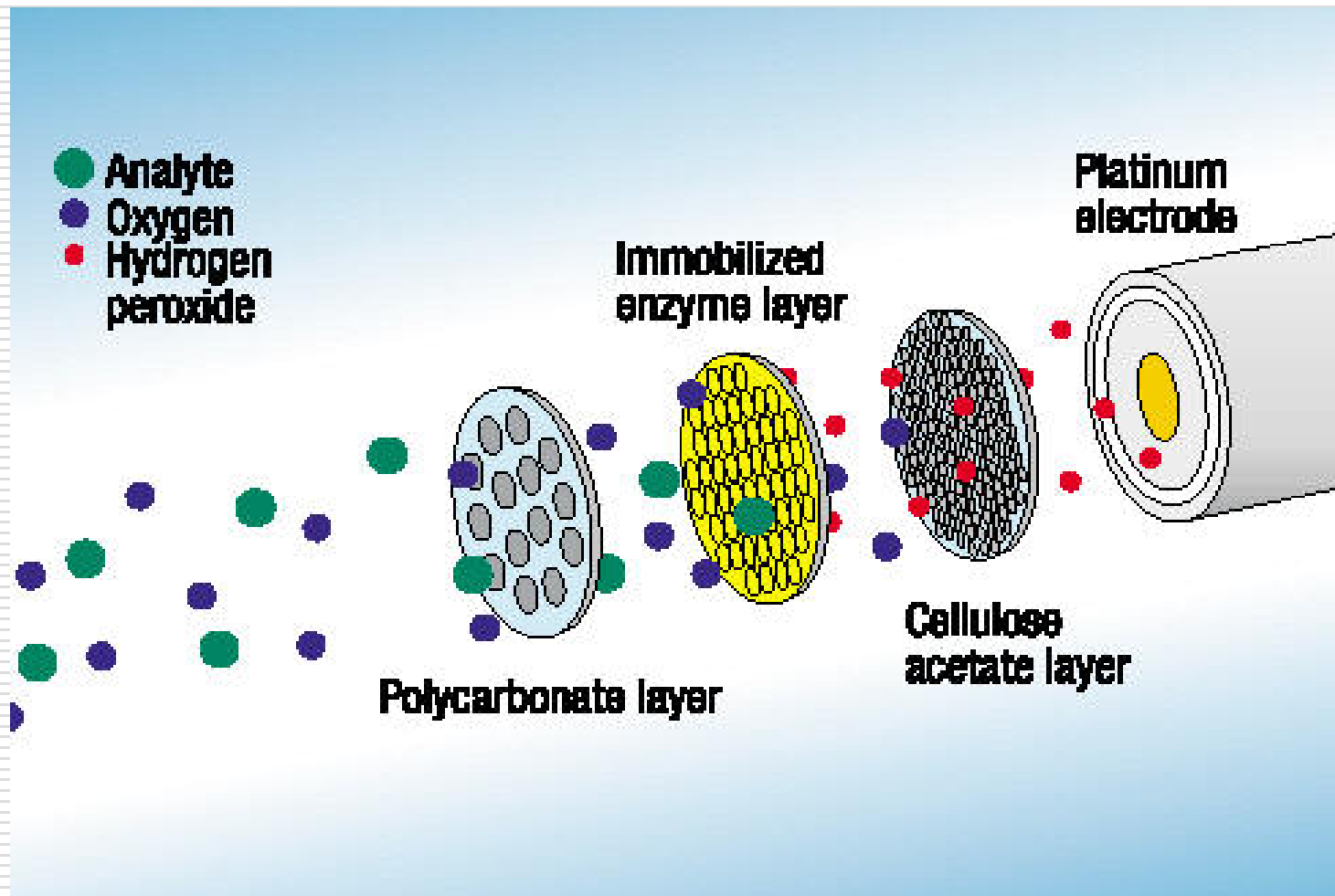
- 此法是将酶分子包埋在凝胶的细微格子里制成固定化。
  - 常用的凝胶有：聚丙烯酰胺、淀粉、明胶、聚乙烯醇、海藻酸钙、桂树脂等。
  - 用凝胶包埋法制备的固定化酶如：木瓜蛋白酶、纤维素酶、乳酸脱氢酶等。
-

# 各种固定化方法的优缺点

---

- (1) 共价键结合：牢固，易失活，单层；
  - (2) 交联固定：固定量大，部分失活；
  - (3) 包埋：多样，失活小，影响因素多；
  - (4) 吸附：简单，失活小，牢固性差。
-

### 3 固定化酶感应器

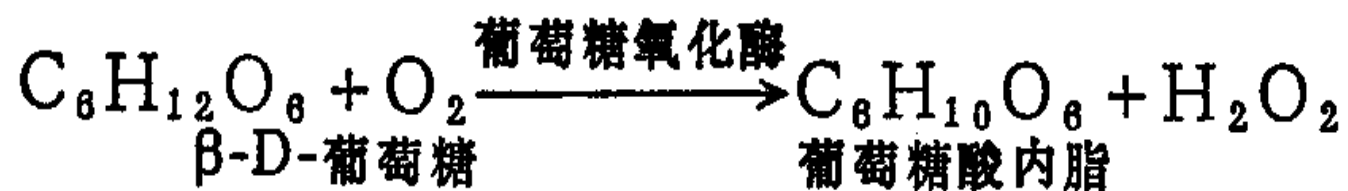


# (1) 酶传感器实例

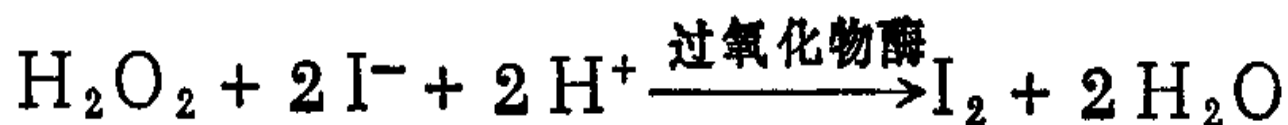
---

- 它将活性物质酶覆盖在电极表面，酶与被测的有机物或无机物反应，形成一种能被电极响应的物质。
  - 例如，脲在尿素酶催化下发生反应
  - 1967年Updick和Hicks将固定化的葡萄糖氧化酶膜结合在氧电极上，做成了第一支葡萄糖电极；此后，这类酶传感器通常是通过检测产物H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的浓度变化或氧的消耗量来检测底物。
-

$\beta$ -D-葡萄糖由 $\beta$ -D-葡萄糖氧化酶 (GOD) 的作用消耗氧生成葡萄糖酸内酯和过氧化氢。



生成的过氧化氢用过氧化物酶或无机催化剂 ( $\text{Mo(VI)}$ ) 等的作用使碘化物离子氧化, 产生下列反应



可见, 葡萄糖可以用检测氧或过氧化氢的电极, 以及碘化物离子电极等作成酶电极来进行定量测量。

---

## 葡萄糖电极**缺点**:

- ①溶解氧的变化可能引起电极响应的波动;
  - ②由于氧的溶解度有限,当溶解氧贫乏时,响应电流明显下降而影响检测限;
  - ③传感器响应性能受溶液pH值和温度影响较大。
-



## (2) 酶传感器的**特点**:

---

**优点**: 酶易被分离, 贮存较稳定, 所以目前被广泛 的应用。

**缺点**: 1.酶的特异性不高, 如它不能区分结构上稍有差异的梭曼与沙林。

2.酶在测试的过程中因被消耗而需要不断的更换。

---

## (二) 组织传感器(TissueSensor)

---

- 组织传感器是以动植物组织薄片中的生物催化层与基础敏感膜电极结合而成，该催化层以酶为基础，基本原理与酶传感器相同。
  - 与酶传感器比较，组织传感器具有如下优点：
    - 1.酶活性较离析酶高
    - 2.酶的稳定性增大
    - 3.材料易于获得
-

# 1 肝组织电极

---

动物肝组织中含有丰富的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，可用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧电极组成测定H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度。1981年Mascini等研究了数种哺乳动物和其它动物（鸟、鱼、龟）的肝组织电极，翌年，报道了基于牛肝组织的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>电极。

---

表 2 组织传感器

测定项目	组织膜	基础电极	稳定性/d	线性范围
谷氨酸	木瓜	CO <sub>2</sub>	7	$2 \times 10^{-4} \sim 1.3 \times 10^{-2} \text{mol/L}$
尿素	夹克豆	CO <sub>2</sub>	94	$3.4 \times 10^{-5} \sim 1.5 \times 10^{-3} \text{mol/L}$
L-谷氨酰胺	肾	NH <sub>3</sub>	30	$1 \times 10^{-4} \sim 1.1 \times 10^{-2} \text{mol/L}$
多巴胺	香蕉	O <sub>2</sub>	14	
丙酮酸	玉米芯	CO <sub>2</sub>	7	$8 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-3} \text{mol/L}$
过氧化氢	肝	O <sub>2</sub>	14	$5 \times 10^{-3} \sim 2.5 \times 10^{-1} \text{U/mL}$

### (三) 微生物传感器(Microorganism Sensor)

---

#### 1 微生物传感器分为两类：

一类是利用微生物在同化底物时**消耗氧的呼吸作用**；

另一类是利用**不同的微生物含有不同的酶**。

好氧微生物在繁殖时需消耗大量的氧，可以氧浓度的变化来观察微生物与底物的反应情况。

---

---

2 **装置**是：由适合的微生物固定化膜与氧电极组成。

3 **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。

---

- 
- 例如，荧光假单胞菌，能同化葡萄糖；芸苔丝孢酵母可同化乙醇，因此可分别用来制备葡萄糖和乙醇传感器，这两种细菌在同化底物时，均消耗溶液中的氧，因此可用氧电极来测定。
  - 基于不同类型的信号转换器，常见的微生物传感器有电化学型、光学型、热敏电阻型、压电高频阻抗型和燃料电池型。
-

表 3 微生物传感器

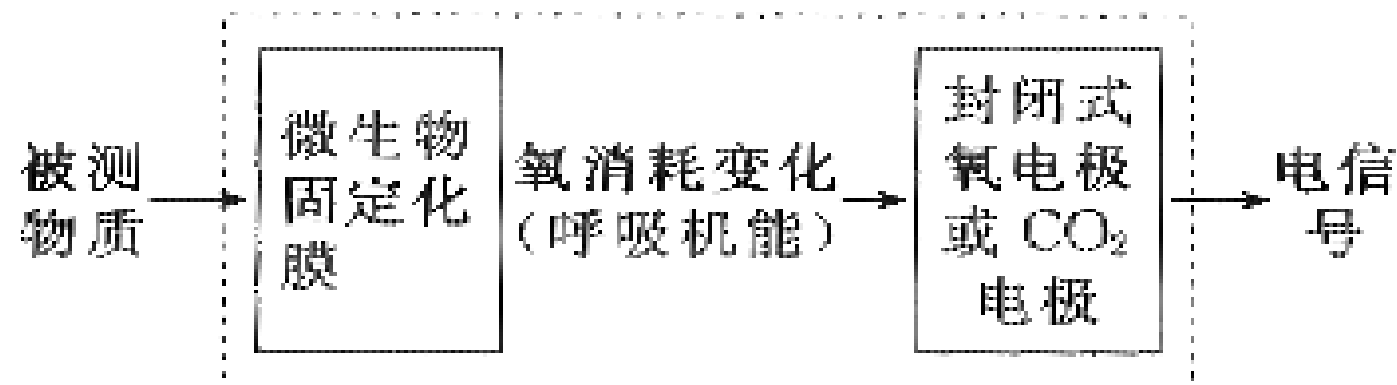
测定项目	微生物	测定电极	检测范围/(mg/L)
葡萄糖	荧光假单胞菌	O <sub>2</sub>	5~ 200
乙醇	芸苔丝孢酵母	O <sub>2</sub>	5~ 300
亚硝酸盐	硝化菌	O <sub>2</sub>	51~ 200
维生素 B <sub>12</sub>	大肠杆菌	O <sub>2</sub>	
谷氨酸	大肠杆菌	CO <sub>2</sub>	8~ 800
赖氨酸	大肠杆菌	CO <sub>2</sub>	10~ 100
测定项目	微生物	测定电极	检测范围/(mg/L)
维生素 B <sub>1</sub>	发酵乳杆菌	燃料电池	0.01~ 10
甲酸	梭状芽胞杆菌	燃料电池	1~ 300
头孢菌素	费式柠檬酸细菌	pH	
烟酸	阿拉伯糖乳杆菌	pH	



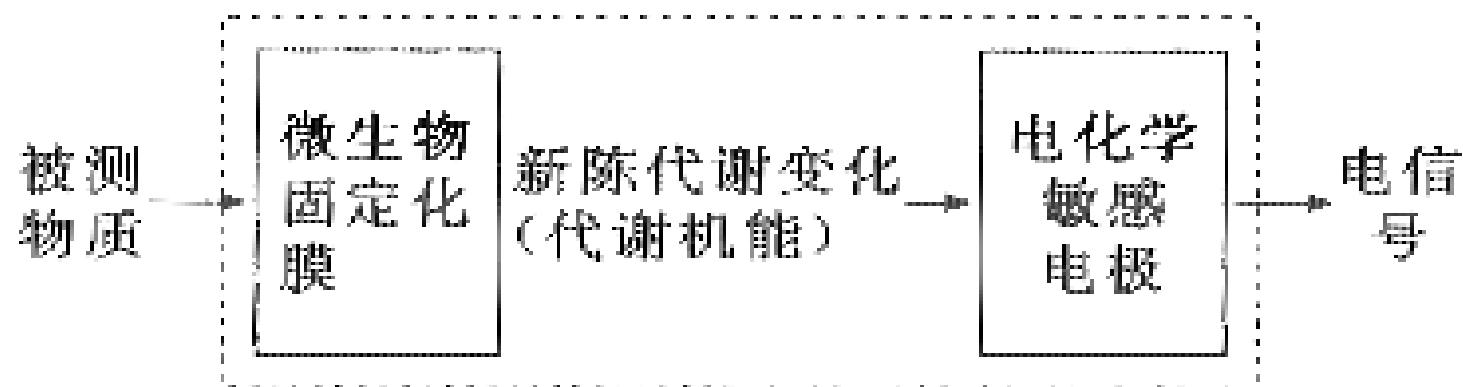
## 4 微生物传感器**特点**:

---

- (1) 适合发酵体系
  - (2) 微生物的菌株价格低
  - (3) 其细胞内酶的活性因细胞增殖而再生，寿命长
  - (4) 适合完成需要辅助因子的复杂连续反应
  - (5) 干扰较酶传感器严重
-



(a) 呼吸机能型



(b) 代谢机能型

微生物传感器的工作原理

## (四) 免疫传感器(Immunosensor)

---

### 1 抗体 (antibody)

抗体是一种免疫球蛋白，免疫球蛋白有5种，分别命名为IgG，IgA，IgM，IgD和IgE。

无脊椎动物不产生免疫球蛋白，鱼有IgM，两栖类有IgM和IgG。

除人类有5种免疫球蛋白外，大多数哺乳动物只有IgG，IgA,IgM和IgE四种免疫球蛋白。

### 2 抗原 (antigen)

抗原是一种进入机体后能刺激机体产生免疫反应的物质。

它可能是生物体(如各种微生物)，也可能是非生物体(如各种异类蛋白、多糖等)。

通常，分子量大于10000，而且具有一定结构（如苯环或杂环等结构）的物质均可成为抗原性物质，都能有效地诱发产生抗体。

---

### 3 基本原理

---

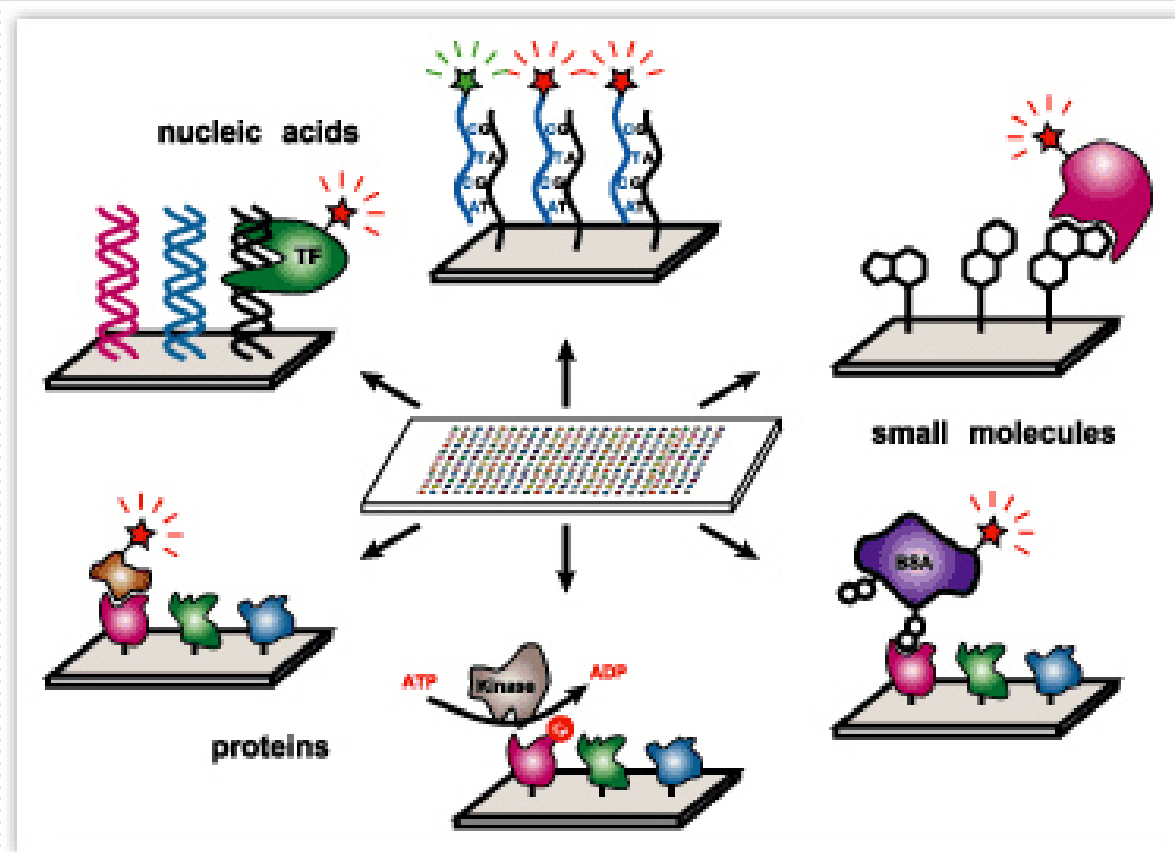
- 抗体对相应的抗原具有识别和结合的双重功能,在与抗原结合时,选择性强,灵敏度高,免疫传感器就是利用其双重功能将抗体或抗原和换能器组合而成的装置。
  - 由于蛋白质分子(抗体或抗原)携带有大量电荷、发色基团等,当抗原抗体结合时,会产生电学、化学、光学等变化,通过适当的传感器可检测这些参数,从而构成不同的免疫传感器,总的来说可分为两类: (1)非标记型  
(2)标记型
-

- 
- 如黄曲霉毒素传感器，它由氧电极和黄曲霉毒素抗体膜组成，加到待测样品中，酶标记的及未标记的黄曲霉毒素便会与膜上的黄曲霉毒素抗体发生竞争反应，测定酶标黄曲霉毒素与抗体的结合率,便可知样品中的含量。
  - 根据使用的信号转换器，有电化学免疫传感器、光学免疫传感器、压电免疫传感器及表面等离子体共振(SPR)型传感器。
-

# (1) 生物芯片

生物芯片是生物传感器的阵列和集成化。

生物芯片是指包被在硅片、尼龙膜等固相支持物上的高密度的组织、细胞、蛋白质、核酸、糖类以及其它生物组分的微点阵。芯片与标记的样品进行杂交，通过检测杂交信号即可实现对生物样品的分析。



# 生物芯片的类型

---

常见的生物芯片主要有:

- 基因芯片
- 蛋白质芯片
- 组织芯片

世界著名生物芯片公司: Affymetrix  
(Santa Clara, California)



其他: Brax Genomics Limited (Cambridge, UK) ,

Hyseq (Sunnyvale, California) ,

Incyte Pharmaceuticals(Palo Alto, Cali- fornia) 等等。

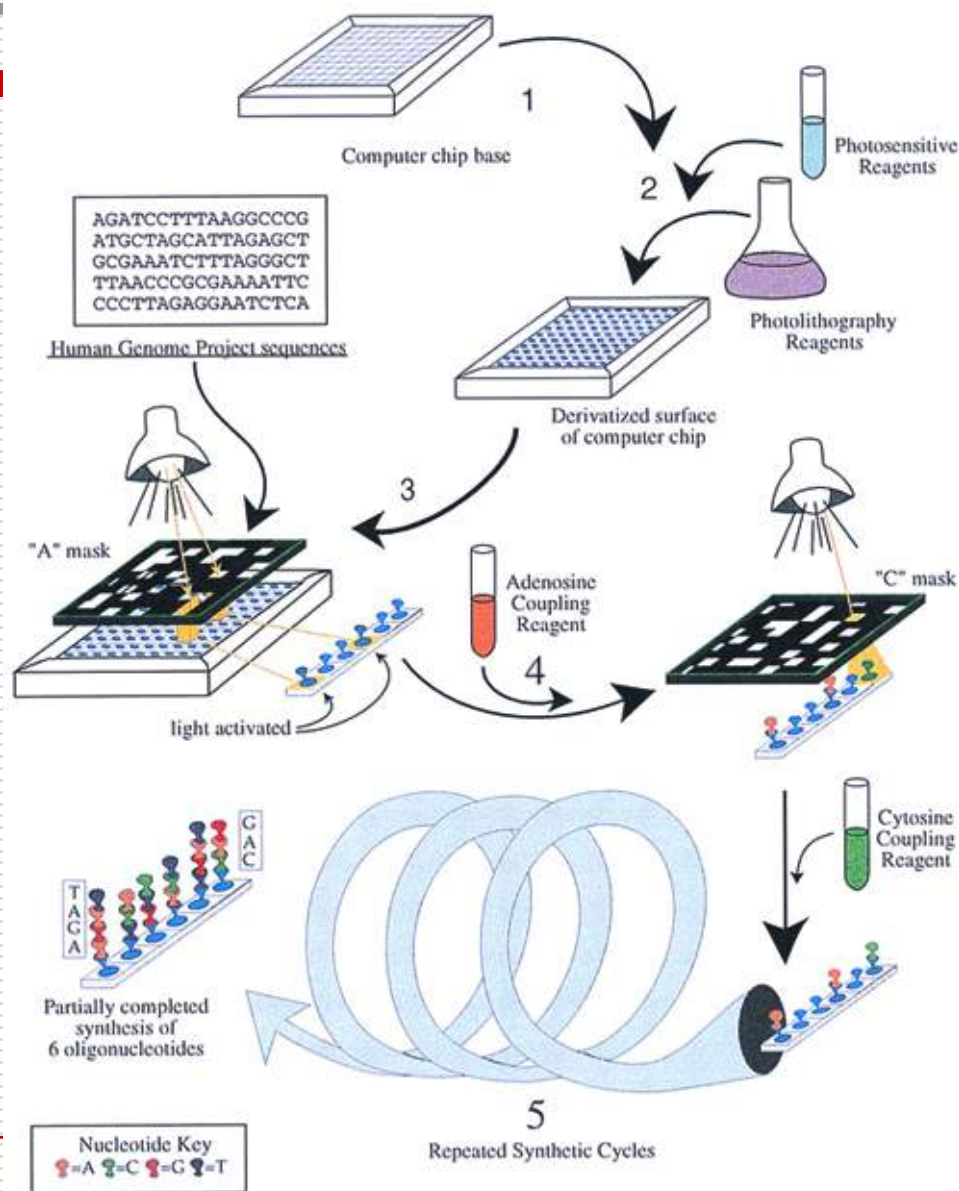
## (2) 基因芯片

基因芯片又称寡核苷酸探针微阵列。将系列DNA片段固定在载体上（硅片、尼龙膜）。可同时进行数百次常规测试。

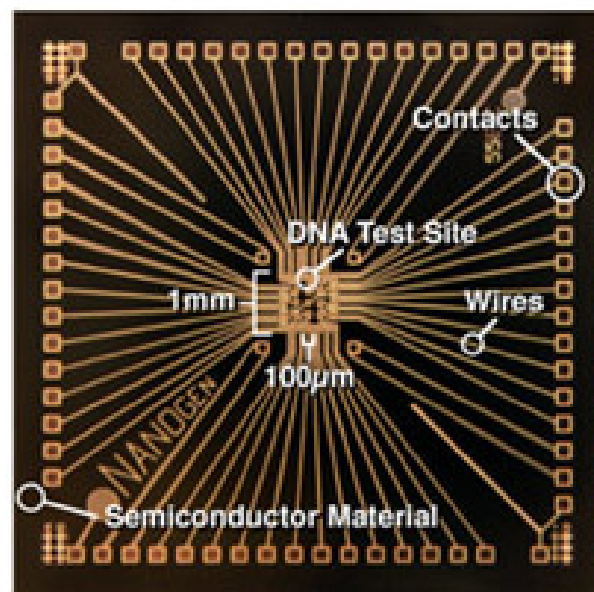
大量探针分子固定于支持物上后，利用DNA双链的互补碱基之间的氢键作用，与标记的样品分子进行杂交，然后用精密扫描仪或摄像纪录，通过计算机软件分析处理，得到有价值的生物信息。

在基因芯片制备过程中，使用了半导体领域的微加工技术（如右图中的光刻技术）。

基因芯片可同时对大量核酸分子进行检测分析，已应用于生物医学、生物分子学、人类基因组研究和医学临床诊断领域。



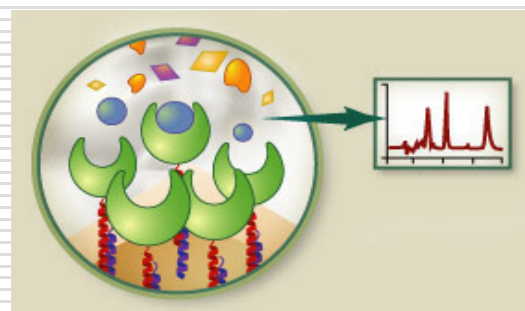
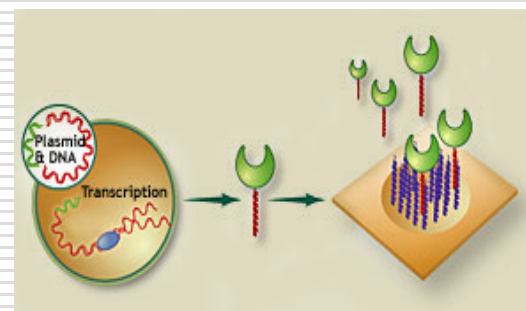
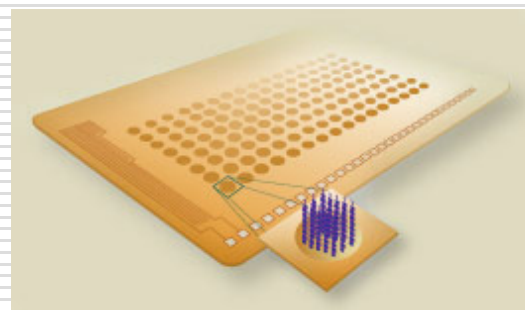
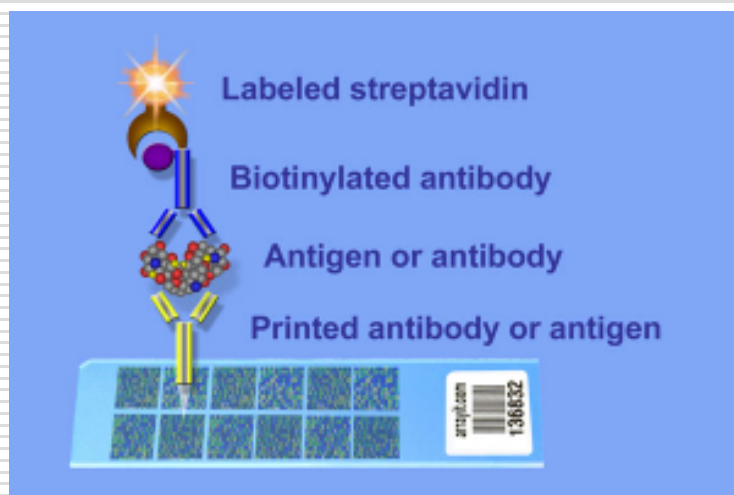




### (3) 蛋白质芯片

蛋白质芯片主要是蛋白质如抗原或抗体在载体上的有序排列，依据蛋白质分子、蛋白质与核酸相互作用的原理进行杂交、检测和分析。

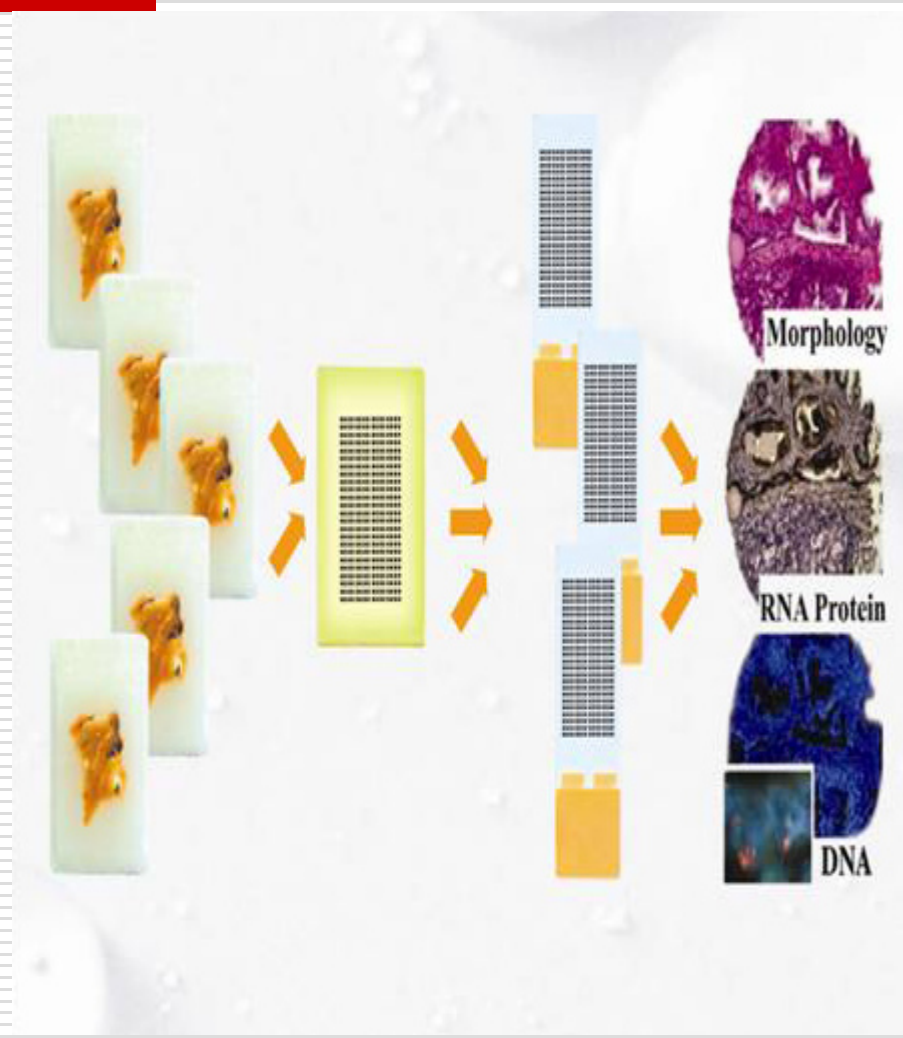
如：



## (4) 组织芯片

组织芯片与基因芯片、蛋白质芯片及细胞芯片等一样，属于一种特殊、新型的生物芯片，是一种新型的高通量、多样本的研究工具。

它将数十个甚至上千个不同个体的组织标本集成在一张固相载体上，为医学分子生物学提供了一种高通量、大样本以及快速的分子水平的分析工具。



## 四、生物传感器的发展方向

---

- 集成化与功能化
  - 提高灵敏度
  - 智能化
-

# 生物传感器在生物医学上的应用

**1 基础研究：**生物传感器可实时监测生物大分子之间的相互作用。借助于这一技术动态观察抗原、抗体之间结合与解离的平衡关系，可较为准确地测定抗体的亲和力及识别抗原表位，帮助人们了解单克隆抗体特性，有目的地筛选各种具有最佳应用潜力的单克隆抗体。

**2 临床应用：**用酶、免疫传感器等生物传感器来检测体液中的各种化学成分，为医生的诊断提出依据。

**3 生物医药：**利用生物工程技术生产药物时，将生物传感器用于生化反应的监视，可以迅速地获取各种数据，有效地加强生物工程产品的质量管理。