

# 对传感器在生物领域应用的探讨

**摘要：**生物传感科学是一门新兴的交叉学科，它涉及到生物化学、电化学、固体物理学、微电子学和纤维光学等领域。生物传感器是由固定化生物活性物质(酶、蛋白质、抗原、抗体、生物膜等)做敏感元件与适当的化学信号换能器件组成的生物电化学分析系统。与传统的检测方法相比具有选择性高、分析速度快、操作简易和仪器价格低廉等特点，而且可以进行在线，甚至活体分析。 本文章对用溶胶,凝胶非标记免疫传感器检测幽门螺杆菌的可行性进行了探讨.

**关键词：**生物传感器 溶胶凝胶 非标记免疫传感器 幽门螺杆菌

## 0. 引言

目前，检测幽门螺杆菌感染可分为微生物学方法、酶免疫测定方法、基因诊断、尿素酶依赖技术和形态学方法五大类。诊断幽门螺杆菌感染的方法根据实验取材的途径可分为创伤性和无创性诊断实验。有创性实验给病人带来痛苦，无创性实验有的价格昂贵且费时，有的有放射性污染。而一种简便、快捷、准确、无创诊断幽门螺杆菌感染的方法一定会成为胃溃疡, 胃癌等病人的福音。

## 1 现阶段幽门螺杆菌检查方法

目前幽门螺杆菌的诊断检测方法包括侵入性和非侵入性两大类。侵入性方法需通过内镜获取活组织进行检测，非侵入性方法则不需进行内镜检查。

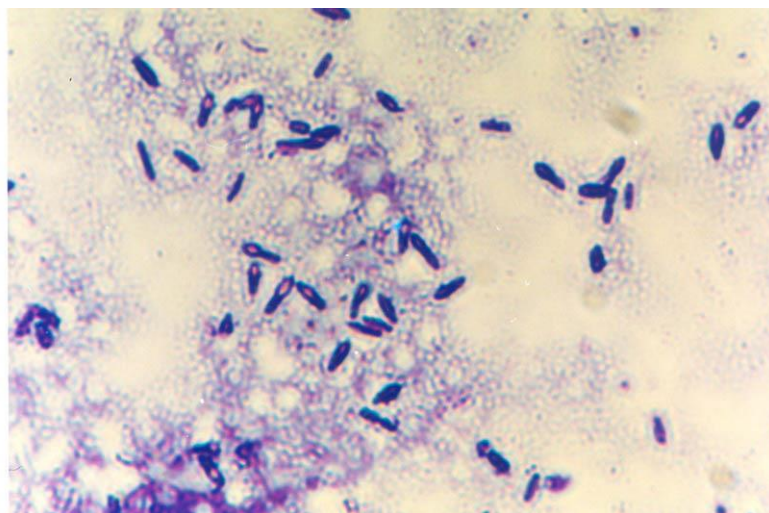


图 1 幽门螺杆菌

## 1.1 侵入性检测方法

(1) 细菌培养:将胃粘膜活检标本做微需氧环境下培养,如培养出幽门螺杆菌即可诊断为幽门螺杆菌感染。因其特异性高达100%,常被视为幽门螺杆菌感染诊断的”金标准”。但它是幽门螺杆菌诊断试验中技术要求最高的一种方法,需要经费、时间和人力均较多,因此限制了其临床使用,主要用于科学研究。

(2) 快速尿素酶试验(RUT) 幽门螺杆菌产生的尿素酶,可分解尿素产生 $\text{NH}_3$ 和 $\text{CO}_2$ , $\text{NH}_3$ 的产生可使pH值升高,胃粘膜组织呈碱性,据此原理可通过加入pH指示剂通过颜色的改变判断有无幽门螺杆菌感染存在。

(3) 胃粘膜组织切片染色镜检:将胃粘膜活检组织标本固定、脱水后常规石蜡包埋、切片染色、镜下观察,根据幽门螺杆菌的形态学特征进行检测和分析,可以直接观察胃粘膜表面定植的幽门螺杆菌。

(4) 胃粘膜直接涂片染色镜检:即将胃粘膜组织直接涂于玻璃片,一般用Gram染色后相差显微镜下观察幽门螺杆菌。

(5) 聚合酶链反应试验(PCR检测技术):利用与幽门螺杆菌功能基因分布有关的核酸片段设计PCR引物或探针,依次进行体外基因扩增或杂交,通过对该菌DNA的测定而诊断有否感染幽门螺杆菌。

## 1.2 非侵入性检测方法

1.  $\text{C}_{13}$ 和 $\text{C}_{14}$ 尿素呼气试验(UBT) 幽门螺杆菌产生的尿素酶可将内源性或外源性尿素分解成 $\text{NH}_3$ 和 $\text{CO}_2$ ,后者在小肠上段吸收,进入血后随呼气排出。口服一定量的 $\text{C}_{13}$ 和 $\text{C}_{14}$ 尿素后,通过高灵敏度质谱仪或液闪仪分别测定呼气中 $\text{C}_{13}$ 和 $\text{C}_{14}$ 的量可判断有无幽门螺杆菌感染。 $\text{C}_{13}$ 为稳定同位素,无放射性,但价格昂贵; $\text{C}_{14}$ 为放射性同位素,辐射量较小,也有较高的安全性,其价格较廉,但孕妇及儿童仍不宜采用,且大规模使用可能给环境污染带来隐患。

2.  $^{15}\text{N}$ 尿氨排泄试验:口服含 $^{15}\text{N}$ 尿素后,利用 $^{15}\text{N}$ 尿素可被幽门螺杆菌产生的尿素酶分解产生 $\text{NH}_3$ 和 $\text{CO}_2$ , $\text{NH}_3$ 经吸收在肝脏代谢而经尿中排出的原理,通过色质联用仪器检测尿中 $^{15}\text{N}$ 尿氨而判断有否幽门螺杆菌感染。该法无创、无放射性,敏感性和特异性高,但检测结果受机体吸收、代谢、排泄等众多因素干扰,且设备昂贵,临床应用受到一定限制。

3. 粪便幽门螺杆菌抗原检测:由于定居在胃上皮细胞表面的幽门螺杆菌,随着胃粘膜上皮的快速更新脱落,幽门螺杆菌也随之脱落,并通过胃肠道从粪便排出。幽门螺杆菌粪便抗原检测试检采用酶联免疫分析双抗体夹心法,能够特异性诊断人体内幽门螺杆菌感染。

4. 血清及分泌物抗体检测:幽门螺杆菌菌体表面存在多种抗原成分,如尿素酶、脂多糖、粘附素等成分,这些抗原均可刺激宿主产生免疫反应,产生IgG、IgA、IgM抗体,传统的血清学检测主要是检测可长期存在于血清中的IgG抗体。常用的方法主要有酶联免疫吸附法、免疫酶试验、免疫印迹技术、胶乳凝集试验等。酶联免疫吸附法(ELISA)是目前最常选用的定性或定量的检测幽门螺杆菌抗体IgG的方法。但由于常选用活体细菌、福尔马林处理过的细菌、酸性甘氨酸抽取物等制备物作为抗原,与其它的细菌间可能发生交叉反应,影响检测结果。

## 2 国内外研究现状

### 2.1 国内研究现状

自从1962年, Clark在氧电极基础上提出了研制酶传感器的原理和设计, 对生物传感器的研究已经扩展到许多领域, 与医学有关的如免疫传感器, 微生物传感器等 在电化学免疫传感器的研究中, 西南师范大学的唐点平和中山大学梁汝萍等人对电流和电位免疫传感器敏感膜进行了广泛的研究和探讨。如唐点平等[1]将巯基乙胺(AET) 固载到玻碳电极(GCE) 表面, 进而化学吸附纳米金(NG), 并通过半胱氨酸(Cys) 用戊二醛(GA) 作交联剂将白喉抗体(anti2Diph) 固定在玻碳电极上, 从而制得高灵敏电位型白喉类毒素(Diph) 免疫传感器。

梁汝萍[2]等用溶胶- 凝胶的三维网状结构和纳米金自组装技术研制了测量乙肝表面抗原的电流型传感器。

### 2.2 国外研究现状

美国密苏里大学的科研人员正在研制一种能检测出肌钙蛋白释放情况的植入式生物传感器, 以能在病人感知症状前检测出心脏疾病即将发作。[3] R. M. Pemberton[4]等人对用电化学免疫传感器测量血清中的雌二醇进行了研究, 他们把兔抗鼠的IgG和鼠的单抗anti-E2被动吸附在电极上, 并用碱性磷酸酶标记E2进行了竞争性免疫分析。能测量到皮克水平。

Michael S. Wilson\*, R. David Rauh等利用氧化铱薄膜的亲水性, 多孔性和立体网状结构特点制作了电流型免疫传感器。因其与抗体或抗原结合好, 并能很容易的进行批量生产, 前景较好。

## 3 主要创新点

将电化学与微生物检测有机的结合起来是本研究的创新, 国内外尚未发现检测幽门螺杆菌的电化学免疫传感器。

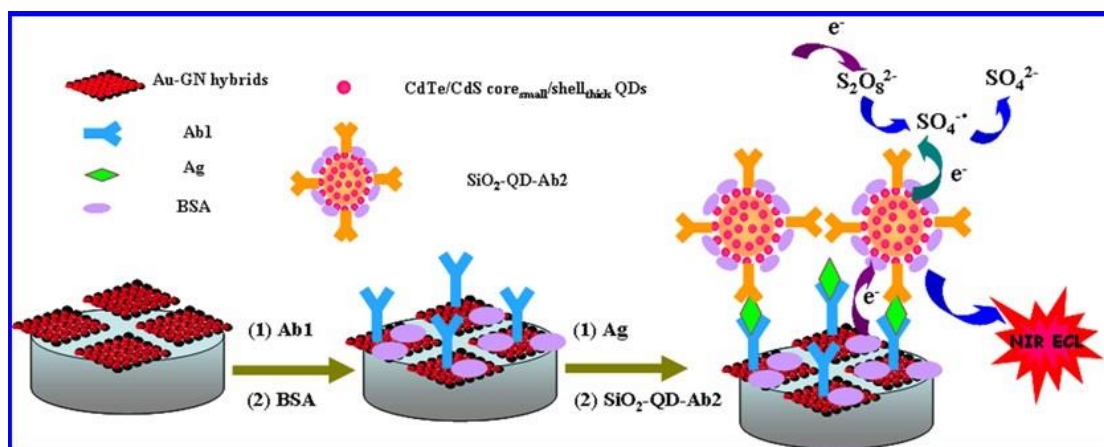


图 2 电化学免疫传感器

### 3.1 关键点

敏感材料的选择、成膜技术和敏感膜固定技术是传感器的关键所在。既要敏感物质牢牢的固定在电极上，又要使其保持应有生物活性，同时又具有良好的导电性是电化学免疫传感器的技术关键。

## 4. 试剂制备

### 4.1 二氧化硅溶胶- 凝胶的制备

将50  $\mu\text{L}$  正硅酸乙酯 (TEOS, Aldrich)、160  $\mu\text{L}$  水、30  $\mu\text{L}$  乙醇、10  $\mu\text{L}$  0.1 mol/L 的HCl和20  $\mu\text{L}$  Triton X- 100 混合，室温下超声振荡1 h，使其形成均匀澄清的溶胶，然后室温放置2~3 h。使用前用10 mmol/L 的NaOH将其pH值调至7.4。

### 4.2 溶胶- 凝胶免疫电极的制备

铂盘电极 (<1 mm) 经金相砂纸和不同粒度的A1 203 糊抛光后，依次在HN03 ( $\phi = 50\%$ )、丙酮和双蒸水中超声清洗，清洗后的电极置于室温下干燥。将10  $\mu\text{L}$  350  $\mu\text{g/L}$  的Ab加入到90  $\mu\text{L}$  已制备好的二氧化硅溶胶中，充分搅拌均匀，用微量注射器将混合液5  $\mu\text{L}$  滴涂于铂盘电极表面，于4  $^{\circ}\text{C}$  干态放置24 h。所制电极经PBS 充分清洗后于4  $^{\circ}\text{C}$  干态保存备用。

## 5. 传感器的表征

### 5.1 红外光谱表征

对1、2中所制备的sol-gel抗-hp膜经PBS 浸泡后进行红外光谱分析( IR) , 并与纯净sol-gel 的IR 谱图比较。

### 5.2 循环伏安表征

传感器从制备到样品测定过程, 其电极表面状态相应地发生变化。本实验利用铁氰化钾作为氧化还原探针, 通过循环伏安法(CV) 进一步考察电极表面在不同阶段所发生的变化。

### 5.3 扫描电镜( SEM) 表征

利用扫描电镜观察不同修饰状态的电极表面, 即sol-gel 膜表面状态图、sol-gel抗-hp膜表面状态图、和sol-gel抗-hp-hp膜表面状态图。

## 6. 实验方法

电化学测量采用三电极系统, 以不同修饰状态的电极为工作电极, Ag/ AgCl (饱和KCl) 电极为参比电极, 铂丝电极为对电极。在 $-0.4 \sim +0.8$  V 电位范围内, 以 $5 \text{ mmol/L}$  铁氰化钾-  $0.1 \text{ mol/L}$  硝酸钾-  $0.1 \text{ mol/L}$  PBS 为测试底液, 采用循环伏安法(CV) 考察表面不同修饰状态电极的电化学特性。

电位测量采用两电极系统: 将 $5 \mu\text{L}$  血清样品滴于制备的免疫电极表面, 室温培育 $3 \text{ min}$  , 然后用含BSA(  $w = 0.1\%$  ) 的PBS 清洗液充分清洗表面所得电极为指示电极, Ag/ AgCl (饱和KCl) 电极为参比电极, 一起置于PBS 中组成测量电池, 记录稳定的电位值。以 $c_{\text{HP}} > 0$  时所得电位值 $V$  与 $c_{\text{HP}} = 0$  时所得电位值 $V_0$  之差 $\Delta V(\text{mV})$  ( $\Delta V = V - V_0$ ) 作为传感器的响应信号。

## 7. 实验条件探讨

### 7.1 pH 的选择

Sol - gel 的pH直接影响被包埋Ab的活性, 考虑到传感器的应用目标是对医学临床唾液直接进行检验, 因此, 实验条件应尽量接近口腔环境, 使pH在 $6.75$  ( $6.0-7.9$ ) 左右。

## 7.2 Sol - gel 膜中 Ab 包埋量的选择

Sol - gel 膜中Ab的包埋量是决定传感器性能的重要因素。在sol - gel 制备过程中加入表面活性剂Triton X- 100 , 有效地增强了sol -gel 膜的柔韧性, 防止了膜的干裂, 在此条件下sol - gel 可包埋一定量的Ab , 并能保持其生物活性。此过程选择不同浓度的抗体测量其相应信号, 决定抗体的包埋量。

## 7.3 响应电位- 时间曲线

为考察传感器的响应速度, 选取一定浓度的抗-hp对sol - gel - Ab免疫电极培育3 min 后, 置于PBS 中作响应电位- 时间曲线。

## 8. 传感器检出线的确定及对 HP 的电位响应

将制备的sol - gel - Ab免疫电极分别置于不同浓度的Hp菌液中培育3 min , 在选定的实验条件下, 按实验方法测定响应电位, 制作校准曲线。

## 9. 传感器的稳定性和重现性

传感器于PBS 中达稳定电位后, 测定1 h 内电位漂移。实验后将传感器置于4 °C干态保存 , 每隔五天测量一次其响应信号, 考察其稳定性。分别取不同时间, 不同批次制备的传感器对同一浓度的标准液进行测定, 来观察其重现性。

## 10. 临床应用探讨

采用传感器法以及采用的酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 分别对例临床唾液作双盲实验。

### [参考文献]

[1]唐点平 袁若柴雅琴 刘颜 钟霞 戴建远: 纳米金修饰玻碳电极固载抗体电位型白喉类毒素免疫传感器的研究化学学报2004 年第62 卷第20 期, 2062~2066

Dianping Tang, Ruo Yuan\*, Yaqin Chai, Linyan Zhang, Xia Zhong, Yan Liu, Jianyuan Dai Preparation and application on a kind of immobilization method of anti-diphtheria for potentiometric immunosensor modified colloidal Au and polyvinyl butyral as matrixes Sensors and Actuators B 104 (2005) 199 - 206

[2]梁汝萍: 基于生物相容性三维纳米生物传感界面的重大疾病识别诊断新方法研究

Ruping Liang Jianding Q Peixiang Cai A novel amperometric immunosensor based on three-dimensional sol - gel network and nanoparticle self-assemble technique Analytica Chimica Acta 534 (2005) 223 - 224 millimeter test

[3] 中国医疗器械杂志 2004年28卷第4期

- [4] R.M. Pemberton, T.T. Mottram, J.P. Hart Development of a screen-printed carbon electrochemical immunosensor for picomolar concentrations of estradiol in human serum extracts  
J. Biochem. Biophys. Methods 63 (2005) 201–212