压电免疫生物传感器及其在食品分析中的应用 (综述)

高志贤 陶桂全 军事医学科学院卫生学环境医学研究所 (300050)

随着经济的发展,人们生活水平的逐步提高,食品营养和饮食卫生已被人们所重视。因此,食品分析的技术手段也要随之改进。对于食品的工业监控、⁽¹⁾食品污染物的检测、⁽²⁾食品质量的鉴定、⁽³⁾食品新鲜度的评价、⁽⁴⁾生物传感器以其快速、灵敏、简便、价廉而被公认为是很好的分析技术。

生物传感器由生物识别系统和换能器构成,人们除了对生物识别系统研究之外,对换能器的研究也迈出了新的一步,希望研究出性能更好的生物传感器,其中,压电免疫生物传感器就是人们研究的热点之一。据此,本文对压电免疫生物传感器及其在食品分析中的应用作一综述,以期待新的发展。

1 压电免疫生物传感器的基本概况

压电免疫生物传感器的原理

压电生物传感器又称为晶振生物传感器,在振荡晶体表面固定极薄的涂层,该涂层能与被测物质发生反应,生成的复合物使其谐振频率发生变化,出现石英振子的晶体频率是表面沉积物的函数,符合 Sauerbrey⁽⁵⁾ 提出的质量和频率的平衡方程: $\Delta F = -K F^2 \Delta M/A$

式中:

ΔF —晶体吸附外来物质后振动频率的变化 (Hz)

K—常数

A—被吸附物所覆盖的面积

F—压电晶体的基本频率 (由晶体性质和切割方向所决定,单位: MHz)

ΔM —被吸附物质的质量

由方程得知, ΔF 与 ΔM 之间成负相关关系。

如果设法让晶体选择性地吸附外源性物质,便能制成压电传感器。据此原理,人们先将生物分子识别系统物质—抗原或抗体均匀地涂在晶体表面,就可得到一个基础的频率 F_1 ,然后将涂布有分子识别物质的晶体放到被测的气体或液体中,使其与被测物质发生反应形成复合物。对吸附了被测物质后的压电晶体再进行振动频率测定,就得到了另一频率变化 F_2 ,从它们之间的变化 $\Delta F = F_2 - F_1$,就可得到被测物质的量。这就是压电免疫生物传感器设计的理论基础。

压电免疫生物传感器的基本构成

压电免疫生物传感器是由用免疫物质包被过的石英晶体、振荡器和频率计等几部分组成。最常用的晶体为石英晶体,按 AT 方式切割,其振动频率是 5、9 或 10MHz 等,

直径为 10 ~ 16mm,厚度约为 0.15mm。压电生物传感器通常有上述规格的晶体层及 3 ~ 8mm 的金电极组成,石英晶片夹在两片金电极中间,成为夹心形,在石英晶体表面涂有生物分子识别物质。

压电检测系统有两个振荡回路,一个晶体检测振荡器,一个晶体的参比振荡器。参比振荡器不包被生物识别物质,是为了校正温度、湿度、波动和其它干扰的影响,消除一些误差。

压电免疫生物传感器的选择性取决于吸附剂,灵敏度取决于晶体的性质。一般来说,涂膜振动频率范围在 9 ~ 14MHz,质量增加对振动频率的改变约为 50Hz/PPb,计频器精度在 0.1Hz 以下。灵敏度非常高,理论上可允许检测 $10^{-12}g$ 级的痕量物质。⁽⁶⁾

固化方法⁽⁷⁾

生物识别物质 (抗原或抗体) 在石英晶片上的固化方法有: ①是将抗原或抗体、牛血清蛋白与戊二醛作用,交联后涂布在石英片上; ②是先在石英片上涂上一层 γ -氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 或聚乙烯亚胺 (PEI),再用戊二醛将抗原或抗体偶联到上述涂布过硅烷或聚乙烯亚胺的石英片上; ③是用高聚物将抗原或抗体包埋,然后涂布在石英片的表面。④生物素—亲合素使抗体生物素化,然后,和包被在晶体上的亲合素作用,固化在晶体表面。

测定

进行免疫检测时,需要两个晶体,一个用作参比,一个用作指示。首先浸入空白溶液进行测定,指示晶体和参比晶体产生波的共振频率比,然后在浸入含有相应的抗原或抗体的样品中,进行免疫化学反应后,测定两晶体的共振频率的变化,并求出新的共振频率比。据此作出标准曲线,将接触样品前后共振频率的比与标准曲线相比较,即可求出样品中的抗体或抗原的浓度。

2 压电免疫传感器用于食品中微生物和毒物检测

微重量的免疫检测

由于液相阻尼较大,石英晶体不易产生压电谐振。所以,尽管 King⁽⁸⁾ 早在 1972 年就提出了把低频率振动晶体应用于液体构想,并得到 Recharadson⁽⁹⁾ 理论支持,但直到八十年代才由日本 Nomura、美国的 Konash⁽¹⁰⁾ 独立地使晶体一面接触液体成功,稍后 Nomura⁽¹¹⁾ 等又使双面接触液体振荡成功。1991 年他又通过电解质溶液施加交变电场,使无电极晶片在液相振荡成功,开辟了微重量免疫生物传感器新领域。微重量式免疫测定法是基于石英晶体

重量的微小变化,这种变化是由于一种免疫源在一种专门处理的表面上吸收。最先证明抗原可作为压电晶体涂覆物的是 Shous,⁽¹²⁾他们在晶体上预涂一层低表面能的塑料 Nyerbar C 的 30% 1,3-二-(三氟甲基)苯溶液,以形成能和蛋白质结合的憎水层,然后使晶体结合上 BSA,再和抗 BSA 抗体作用,来测定抗体活性。当抗体选择性地与抗原结合时,晶体频率的降低量与抗体的浓度成正比而进行检测。

Oliveira 和 Silver⁽¹³⁾在一篇专利中提出用微重量免疫测定法测定溶液中的抗原,其灵敏度可达到每毫升纳克级。Rice^(14,15)先后在两个专利中介绍用压电晶体进行免疫检测,基本原理与免疫检测的夹心法相似,这种技术已应用于人 IgG 和 IgE 检测蜜蜂的毒汁和维生素、激素、糖类的检测。

Mueller-Schultc⁽¹⁶⁾在他们的专利中介绍了压电晶体用酰胺处理,然后抗甲状腺素抗体吸附在晶体表面,用于检测甲状腺素,检测限为 $5.17 \times 10^{-12}g$,是一种具有很好灵敏度的压电晶体免疫生物传感器,可较好地应用于食品分析。

压电免疫传感器检测食品中的微生物

抗原或抗体包被在压电晶体上构成的压电免疫生物传感器可应用于食品微生物污染检测,通过压电晶体结合抗体在复杂的基质中区分各类微生物已成为可能,现将近年来的研究现状作一简述:

白假丝酵母的检测

Muramatsu⁽¹⁷⁾等人第一个报道了微重量法检测微生物,这个系统是由一个 AT 方向切割的石英压电晶体、振荡器和频率计组成,压电晶体表面用 γ -氨基丙基三乙氧基硅烷处理后,然后用抗 *C.albicans* 抗体包被,压电免疫生物传感器浸入可疑的样品液中,由于免疫吸附白假丝酵母,晶体表面的质量增加,测得频率降低,在 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^8$ cell/mg 范围内频率的变化与白假丝酵母浓度相关,在相同的混合液中对其它酵母菌属无影响。

大肠杆菌和肠道细菌的检测

对食物、日常用品和饮用水中的大肠杆菌、志贺氏痢疾杆菌、鼠疫耶尔森氏菌、沙雷菌属等可快速、可靠地检测。检测时不象其它酶免疫过程或放射免疫技术,要求免疫标记,压电免疫生物传感器能够直接用非标记方法检测上述细菌。

Plomer⁽¹⁸⁾等人介绍了一种利用肠道细菌共同抗原的单克隆抗体和共同抗原特异性结合的特点,用压电免疫生物传感器检测食物和饮用水中所有的肠道细菌。在这种技术中是用抗一肠道细菌的抗体包被在晶体表面,然后,浸入含有细菌的液体进行测定,根据包被晶体的频率变化,可以测出肠道的细菌数量。从频率与大肠杆菌的坐标图上来看,频率的变化与大肠杆菌 (*K12,pkt146stain*) 在 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ cell/mL 范围内呈线性关系。

多核苷酸杂交的肠道细菌检测

Fawcett 等人⁽¹⁹⁾应用压电晶体检测多核苷酸杂交,一种多核苷酸固定在压电晶体表面,利用其振荡频率的变化

而被测定。多核苷酸包被在晶体上,然后暴露在单独的多核苷酸放射源中,经一段充足的时间后,在合适的条件下杂交,解育前后的振荡频率的变化,说明杂交的程度。虽然这种技术比放射免疫法灵敏度低,但是,在临床和食品细菌污染的日常检测中,这种灵敏度也就足够了。

沙门氏菌的检测

Prusak-Sochaczewski⁽²⁰⁾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 ($<1 \times 10^5$ cells/mL) 的 3~5h 到高密度 (1×10^8 cells/mL) 0.5h 之间,压电免疫生物传感器能够检测出 1×10^4 cells/mL 的溶液浓度。本法一般在 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ cells/mL 时呈线性关系。

食品中农药的测定

Gullbault⁽²¹⁾介绍一种压电晶体免疫生物传感器检测饮用水及食品中的除莠剂,这种传感器的检测范围为 $0.03 \sim 100 \mu g/L$,方法的相关标准偏差为 8%。Atrazine 抗体包被在预先浸过蛋白 A 的 10Hz 晶体表面,构建成此传感器。这种传感器可反复使用 10 次。

压电免疫生物传感器还可应用于食品中其它类别的微生物、金属毒物、营养素等方面的检测。由于篇幅所限,在此不作叙述。

3 存在的问题

虽然压电免疫生物传感器发展方向的主流是液体测定,但液相检测仍还存在一定问题。如液体的性质及界面特性对压电晶体的谐振频率有很大影响,这在压电免疫生物传感器的研究中尤其突出。要克服这一影响,难度还比较大。

气相测定时,虽有较好的线性关系,但对蛋白质的活性有损害,要缩短传感器的寿命。晶片干燥需要一定的时间,也增加了操作程序。另外,温度和湿度对实验有影响,生物涂布在一定湿度环境中才能执行其正常功能。鉴于水蒸汽在晶体上的凝聚会引起振荡停止或测量误差较大,对实验条件要求比较苛刻。

存在着交叉反应和干扰,虽然采用参考压电晶体可以解决,但不能完全消除。

目前,报道的生物物质固化压电晶体表面的固化方法,稳定性不太好,可重复检测次数少。由于抗原抗体的反应既强烈又不可逆,因此将结合的分析物从包被的晶体上解离下来,仍然是一个问题,而且存在理论和实验的不一致性。

总之,尽管压电免疫生物传感器尚有不足之处,但因其方法简单、成本低、专一性强、灵敏度高等特点,在对食品中毒素、细菌、激素、农药的测定方面具有很大的潜力,在小分子的葡萄糖、蔗糖等方面的应用也将成为可能。

(顾景范 审校)

(下接第 54 页)