

尤其是医疗科技的不断提升,SA 在临床应用将更为广泛,达到更加理想的治疗效果。

参考文献

[1] 孙艳涛,张玉璞,毕淑云,等.牛血清白蛋白与保泰松和布洛芬相互作用的荧光光谱研究[J].高等学校化学学报,2009,30(6):1095-1100.

[2] 贾宇,刘利杰,胡功成.铅接触者职业健康监护血锌原卟啉筛选指标值的探讨[J].职业与健康,2008,24(14):1370-1371.

[3] 吴根华,汪春华.荧光法研究了 Pb²⁺ 与牛血清白蛋白的相互作用[J].光谱学与光谱分析,2005,25(2):246-248.

[4] 陶慧林,朱仕毅,梁吴东.铈-铬天青 s 与牛血清白蛋白结合反应及其应用[J].分析试验室,2009,28(10):53-55.

[5] 张根成,许洁艳. Cr(VI) 与牛血清白蛋白的相互作用[J].应用化学,2010,27(2):191-196.

[6] 高旭,李树伟,马玉洁,等.牛血清白蛋白与铬(VI)相互作用的荧光光谱法研究[J].西部皮革,2011,33(22):30-33.

[7] 杨乡珍.钐的光度分析进展[J].湿法冶金,2007,26(2):109-112.

[8] 邓凡政,陈琳琳,汤秀琴.稀土钐离子与人血清白蛋白的相互作用[J].中国卫生检验杂志,2011,21(1):85-86.

[9] 赵芳,黄超锋,梁慧,等.大尿酸锌配合物与牛血清白蛋白相互作用的研究[J].分析化学,2011,39(3):401-404.

[10] 周能,梁逸曾,王平,等.荷花碱与牛血清白蛋白的相互作用[J].分析化学,2008,36(8):1066-1070.

[11] Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to ironbinding[J]. Cell Biochem Biophys, 2009, 53(2):75-100.

[12] Lamoral-Theys D, Pottier L, Dufrasne F, et al. Natural polyphenols that display anticancer properties through inhibition of kinase activity[J]. Curr Med Chem, 2010, 17(9):812-825.

[13] 朱美霖,陆洁,韩梅.表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)与人血清白蛋白相互作用的研究[J].北京师范大学学报:自然科学版,2011,47(3):277-280.

[14] Lucie Trnková, Iva Boušová, Veronika Staňková. Study on the interaction of catechins with human serum albumin using spectroscopic and electrophoretic techniques[J]. J Molecul Struct, 2011, 985(2):243-250.

[15] 宫淑艳,石春生.头孢美唑钠致不良反应 7 例[J].医药导报,2009,28(5):672-673.

[16] 张洪芹,张怀斌.注射用头孢美唑钠与牛血清白蛋白相互作用的研究[J].光谱实验室,2011,28(1):136-139.

[17] 栾尼娜,吴锦绣,宋玉民,等.芦丁与血清白蛋白结合作用的热力学研究(I)[J].光谱学与光谱分析,2008,28(4):856-859.

[18] 张怀斌,张洪芹,董秀丽,等.头孢美唑钠与 BSA 及纳米银-BSA 体系相互作用的研究[J].化学研究与应用,2011,23(11):1428-1434.

[19] Liu CH, Li ZP, Du BA, et al. Silver nanoparticle-based ultrasensitive chemiluminescent detection of DNA hybridization and single-nucleotide polymorphisms[J]. Anal Chem, 2006, 78(11):3738-3744.

[20] Rijiravanich P, Somasundrum M, Surareungchai W. Femtomolar electrochemical detection of DNA hybridization using hollow polyelectrolyte shells bearing silver nanoparticles[J]. Anal Chem, 2008, 80(10):3904-3909.

(收稿日期:2012-12-12)

• 综 述 •

生物传感器在肠道致病菌临床快速检测中的新进展

庄稚佳 综述,丁世家[△]审校

(重庆医科大学检验医学院/临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆 400016)

关键词:生物传感器; 肠杆菌属; 纳米粒子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)01-0075-03

肠道致病菌是引起感染性腹泻的主要原因之一,主要包括大肠埃希菌、沙门菌属、金黄色葡萄球菌等。传统的细菌培养技术耗时繁琐、检测灵敏度低,无法满足临床上所需的精准快速鉴定。因此,如何快速、灵敏地检测肠道致病菌在疾病预防与控制以及临床诊断中具有重要的意义。生物传感器是对生物物质敏感并将其浓度转换为电信号进行检测的设备,具有方便、快捷、特异性强、灵敏度高、检测时间短等优点。主要由生物识别元件和信号转换器件两部分组成,根据其转换原理的不同,可将生物传感器分为三大类:电化学型、光学型、质量型^[1]。近几年来,研究人员利用各种方法提高生物传感检测的灵敏度,并用于各个领域肠道致病菌的快速检测,取得了一些进展。本文就近几年,生物传感器在肠道致病菌临床快速检测中的新进展作一评述,并对其发展前景作出展望。

1 电化学生物传感器

1.1 DNA 生物传感器 DNA 生物传感器通过将单链 DNA 固定在电极表面形成捕获探针,利用碱基配对原则对样品溶液

中的靶序列进行识别,根据加入信号探针后检测电活性指示剂的电流变化或形成双螺旋结构时产生的电化学界面性质的变化检测肠道致病菌含量。2011 年 Pandey 等^[2]在十八硫醇化的金膜表面进行分子自组装,通过与 4-叠氮基-1-氟-2-硝基苯结合后固定单链 DNA,用甲基蓝作为氧化还原指示剂,可测得大肠埃希菌 DNA 的线性范围为 $0.5 \times 10^{-18} \sim 1 \times 10^{-6}$ mol/L,检测限可低至 0.5×10^{18} mol/L,实现了对大肠埃希菌的快速、超灵敏检测。2012 年 Li 等^[3]用单链 DNA 作为探针,采用快捷简便的“三明治”DNA 杂交方法实现了沙门氏菌较为灵敏的快速检测,检测限可低至 0.5×10^{-12} mol/L。

根据纳米粒子具有比表面积大、容易修饰和磁性纳米粒子对肠道致病菌进行浓缩和富集等特点,可提高其检测灵敏度。2011 年 Geng 等^[4]用海藻酸这个天然含有羧基多糖的物质修饰的钴磁珠与含有氨基端大肠埃希菌特定序列的 DNA 探针相结合,采用道诺霉素(DNR)作为杂交指示剂,得到 50 CFU/mL 的检测限。2011 年 Li 等^[5]将金离子沉积到预先处理好的

三氧化二铁纳米粒子上,并与磁性纳米结合,用“三明治”型 DNA 探针杂交的方法能在 4 个小时内完成大肠埃希菌的检测,并将检测限降低到 5 CFU/mL。

在磁性纳米粒子研究的基础上,近几年,丝网印刷电极与各种已有技术相结合逐渐应用于生物传感器的研究中。2011 年 Setterington 和 Alocilja^[6]用免疫磁珠从一个复杂样品中分离大肠埃希菌,采用一次性印刷电极只需 70 min 即实现快速、灵敏的检测,检测大肠埃希菌数量可低至 70 CFU/mL。2012 年 Setterington 和 Alocilja^[7]再次采用丝网印刷碳电极和免疫的磁性纳米粒子对大肠埃希菌进行测定,可检测到低至 6 CFU/mL 大肠埃希菌 O157:H7。

1.2 免疫传感器 免疫传感器是以固定化抗体(抗原)为识别元件,基于特异性的免疫反应原理,不需要裂解大肠埃希菌即可直接对肠道致病菌进行检测,具有选择性好、灵敏度高、检测速度快等优点^[8]。2012 年 Chowdhury 等^[9]就将特异性抗体直接交联到聚苯胺的金电极表面,利用免疫反应检测大肠埃希菌,并成功实现了 10^2 CFU/mL 的检测限。

2011 年 Tan 等^[10]采用了一种聚二甲基硅氧烷阻免疫传感器,通过与特定的抗体固定的纳米多孔膜的结合构成微芯片,用电化学阻抗谱的方法在 2 个小时内,实现快速检测食源性病原体大肠埃希菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌,其检测限为 102 CFU/mL。同年 Teng 等^[11]用抗体和二茂铁修饰氧化锌纳米棒并作为一个核心复合物,采用“三明治”夹心的方法对大肠埃希菌进行检测,其检测限可达 50 CFU/mL。

2012 年 Esteban-Fernández de Ávila 等^[12]采用存在于葡萄球菌细胞壁的一种表面蛋白-葡萄球菌 A 蛋白,将其结合到磁珠上并固定于金丝网印刷电极,再分别特异性地与抗体、金黄色葡萄球菌和辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌 A 蛋白结合,用四硫富瓦烯作为传导媒介,过氧化氢作为酶分解底物,在短短 2 个小时内即可完成金黄色葡萄球菌的测定。在生牛奶样品中可得到 1 CFU/mL 高灵敏的检测限,结果表明生物传感在临床样本检测中具有较好的应用前景。

1.3 适配体传感器 适配体通常是一段 40~100 个碱基的寡核苷酸序列,经体外筛选而得,能与相应的配体进行高亲和力和强特异性的结合。它提供了一种新的高效快速识别的研究平台,在生物传感等方面的应用正日益受到研究人员的重视,相关的报道也逐日渐增。2012 年 Wang 等^[13]就适配子在各类生物传感器中的发展情况进行了陈述,并列出了与各种病原微生物特异性结合的适配体序列。2012 年 Luo 等^[14]用一种巧妙的设计,选择能与大肠埃希菌 O111 特异性结合的适配体,采用杆菌带走适配体暴露捕获探针,再与信号探针结合的形式对杆菌进行检测的方式,在磷酸盐缓冲液中得到 112 CFU/mL 的检测限。

2 光学生物传感器

2.1 表面等离子体共振(SPR) SPR 是一种物理的光学现象,通过测量金属表面物质折射率变化来研究物质的化学物理吸附性质,而折射率的变化又和结合在金属表面的生物分子质量成正比。因此可以通过获取生物反应过程中 SPR 角的动态变化,得到生物分子之间相互作用的特异性信号。它具有用量少、在线检测、可再生、无样品前处理等优点,属于光学生物传感的重要研究方法之一。2012 年 Zhang 等^[15]采用 SPR,用生物素亲和素的特异性结合与碱基之间的配对关系来检测沙门氏菌,该方法检测限可达 102 CFU/mL,同时可实现良好的再生。Gifford 等^[16]用捕获探针与靶 DNA 相结合,以靶 DNA 为

模板对捕获探针进行扩增,高温变形后特异性与修饰到金纳米上的靶 DNA 结合,实现了对靶 DNA 10^{-17} mol/L 的超灵敏检测,从而为肠道致病菌的定量分析提供了新方法。

金纳米粒子可以更多地结合物质从而增加物质改变的量,又可以加强信号的传递,从而放大 SPR 的信号,提高灵敏度。2010 年 Temur 等^[17]用金纳米球和金纳米棒两种不同类型的金纳米粒子实现了大肠埃希菌的超灵敏检测。亲和素通过硫键结合到芯片金膜表面,用亲和素、生物素特异性结合的方法固定上大肠埃希菌的抗体,在金纳米粒子表面通过化学结合多个抗体,采用“双夹心法”对大肠埃希菌检测,其检测大肠埃希菌浓度的线性范围为 $10^1 \sim 10^5$ CFU/mL。

Arya 等^[18]在 2011 年将 T4 噬菌体固定在金膜表面,利用噬菌体与大肠埃希菌 K12 之间特有的相互作用对大肠埃希菌 K12 进行新颖而巧妙的快速检测,得到 $7 \times 10^2 \sim 7 \times 10^8$ CFU/mL 的线性检测范围。2012 年 Gupta 等^[19]巧妙地通过提取伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白,采用单克隆得到抗体,利用免疫反应进行快速灵敏的检测,检测限可达到 2.63×10^{-14} mol/L。

2.2 化学发光 化学发光是物质在进行化学反应过程中伴随的一种光辐射现象,可根据待测物浓度与化学发光值成正比从而进行肠道致病菌的检测。葡萄球菌肠毒素是金黄色葡萄球菌产生的代谢产物,因此,对毒素的检测也是检测肠道致病菌的一个重要手段。2012 年 Chen 等^[20]将辣根过氧化物酶和抗 B 型葡萄球菌肠毒素单克隆抗体固定到多孔二氧化硅纳米粒子上,得到了 0.01~1 ng/mL 葡萄球菌 B 型肠毒素单克隆抗体的线性范围。Xue 等^[21]用“三明治”酶联免疫吸附的方法,用化学发光方法成功检测了金黄色葡萄球菌 B 型肠毒素。

2.3 荧光 2011 年 Wang 等^[22]用掺杂荧光的三联吡啶钉的硅纳米粒子连接到寡核苷酸上作为指示探针,以“三明治”DNA 杂交夹心的方法对沙门氏菌进行了检测,具有良好线性关系,线性范围为 $10^{-14} \sim 10^{-11}$ mol/L,检测限为 3×10^{-15} mol/L,最低能检测到的大肠埃希菌数量为 30 CFU/mL。2011 年 Tennant 等^[23]用微波诱导细胞裂解,释放出 DNA,利用杂交的原理形成 DNA 发卡结构,采用低能量的微波加热,利用玻璃基板固定银纳米粒子放大荧光信号的新型原理对沙门氏菌等菌体进行测量,检测限可降低至 1 CFU/mL。荧光生物传感器在临床微生物的快速检测(特别是血液中)中具有应用前景。

3 压电生物传感器

3.1 石英晶体传感器 压电传感器是利用化学反应产生的质量变化来进行测试的一类传感器。2011 年 Cai 等^[24]采用 2×5 模型石英晶体微量天平 DNA 生物传感器阵列检测五种不同的细菌,结合金纳米对信号进行放大,其检测细菌的线性范围可达 $1.5 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL。和传统方法相比,这种生物传感系统提供了一个快速、敏感的方法,可用于临床诊断定量分析中的多个致病细菌检测。Salmain 等^[25]用免疫的方法在 15 min 内对葡萄球菌肠毒素 A 进行了测量,可获得 20 ng/mL 的检测限。2011 年 Shen 等^[26]用克隆抗体与大肠埃希菌 O157:H7 相结合的方法,利用磁性纳米粒子和金纳米粒子在磷酸盐缓冲液和牛奶中进行测量,分别得到了 23 CFU/mL 和 53 CFU/mL 非常低的检测限。

3.2 磁弹性型 磁弹性生物传感技术是一门近几年来新兴的生物传感研究技术。它基于磁致伸缩原理,传感器与检测仪器之间没有任何物理连接,具有非接触式、远程操作的特点,具有广阔的运用前景。2009 年 Huang 等^[27]利用磁弹性生物传感

器,将 E2 噬菌体固定到其表面,在流动的鼠伤寒沙门氏菌的悬浮溶液中得到了 $5 \times 10^1 \sim 5 \times 10^8$ CFU/mL 良好的线性范围。2010 年 Li 等^[28]直接在新鲜番茄上使用基于噬菌体的磁弹性生物传感器,在 30 min 内成功完成了对鼠伤寒沙门氏菌的检测。这种方法以快速、简便、成本低的特点,为实际样品中肠道致病菌的检测提供了有效的信息。

4 小 结

随着生物传感器的发展,各种检测仪器和方法被广泛地应用于肠道致病菌的检测中。极大地提高了肠道致病菌的检测速度和灵敏度,为肠道致病菌的检测开辟了一个新领域。生物传感器在肠道致病菌中可能将会出现如下趋势:(1)利用多学科的新成果和新技术,发展不同的快速超灵敏检测肠道致病菌的新策略和新方法。(2)通过生物传感器的进一步研究开发一系列新产品,实现检测的全自动化和小型化,完成对肠道致病菌多个复杂标本的临床检测,真正实现其快速性、高灵敏、高特异性的临床应用价值。

参 考 文 献

[1] 张捷,陈广全,乐加昌,等. 生物传感器在食源性致病菌检测中的应用[J]. 食品工业科技, 2011, 34(10): 453-457.

[2] Pandey CM, Singh R, Sumana G, et al. Electrochemical genosensor based on modified octadecanethiol self-assembled monolayer for Escherichia coli detection[J]. Sens Actuators B, 2011, 151(2): 333-340.

[3] Li Q, Cheng W, Zhang DC, et al. Rapid and Sensitive Strategy for Salmonella Detection Using an InvA Gene-Based Electrochemical DNA Sensor[J]. Int J Electrochem Sci, 2012, 7(1): 844-856.

[4] Geng P, Zhang X, Teng Y, et al. A DNA sequence-specific electrochemical biosensor based on alginic acid-coated cobalt magnetic beads for the detection of E. Coli[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(7): 3325-3330.

[5] Li K, Lai Y, Zhang W, et al. Fe₂O₃@Au core/shell nanoparticle-based electrochemical DNA biosensor for Escherichia coli detection[J]. Talanta, 2011, 84(3): 607-613.

[6] Settingington EB, Alcilija EC. Rapid electrochemical detection of polyaniline-labeled Escherichia coli O157: H7[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(5): 2208-2214.

[7] Settingington EB, Alcilija EC. Electrochemical Biosensor for Rapid and Sensitive Detection of Magnetically Extracted Bacterial Pathogens[J]. Biosensors, 2012, 2(1): 15-31.

[8] 刘继超,姜铁民,陈历俊,等. 电化学免疫传感器在食品安全检测中的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2011, 23(1): 216-222.

[9] Chowdhury AD, De A, Chaudhuri CR, et al. Label free polyaniline based impedimetric biosensor for detection of E. coli O157: H7 Bacteria[J]. Sens Actuators B, 2012, 171-172(6): 916-923.

[10] Tan F, Leung PHM, Liu ZB, et al. A PDMS microfluidic impedance immunosensor for E. coli O157: H7 and Staphylococcus aureus detection via antibody-immobilized nanoporous membrane [J]. Sens Actuators B, 2011, 159(1): 328-335.

[11] Teng Y, Zhang X, Fu Y, et al. Optimized ferrocene-functionalized ZnO nanorods for signal amplification in electrochemical immunoassay of Escherichia coli [J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(12): 4661-4666.

[12] Esteban-Fernández de Ávila B, Pedrero M, Campuzano S, et al. Sensitive and rapid amperometric magnetoimmunosensor for the determination of Staphylococcus aureus[J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 403(4): 917-925.

[13] Wang YX, Ye ZZ, Si CY, et al. Application of Aptamer Based Biosensors for Detection of Pathogenic Microorganisms[J]. Chin J Anal Chem, 2012, 40(4): 634-642.

[14] Luo CH, Lei YN, Yan L, et al. A Rapid and Sensitive Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Direct Detection of Escherichia Coli O111[J]. Electroanalysis, 2012, 24(5): 1186-1191.

[15] Zhang DC, Yan YR, Li Q, et al. Label-free and high-sensitive detection of Salmonella using a surface plasmon resonance DNA-based biosensor[J]. J Biotechnol, 2012, 160(3/4): 123-128.

[16] Gifford LK, Sendroui IE, Corn RM, et al. Attomole Detection of Mesophilic DNA Polymerase Products by Nanoparticle-Enhanced Surface Plasmon Resonance Imaging on Glassified Gold Surfaces [J]. J Am Chem Soc, 2010, 132(27): 9265-9267.

[17] Temur E, Boyac IH, Tamer U, et al. A highly sensitive detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for Escherichia coli enumeration[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397(4): 1595-1604.

[18] Arya SK, Singh A, Naidoo R, et al. Chemically immobilized T4-bacteriophage for specific Escherichia coli detection using surface plasmon resonance[J]. Analyst, 2011, 136(3): 486-492.

[19] Gupta G, Sharma PK, Sikarwar B, et al. Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella typhi antibodies in buffer and patient serum[J]. Biosens Bioelectron, 2012, 36(1): 95-102.

[20] Chen LL, Zhang ZJ, Zhang XM, et al. A novel chemiluminescence immunoassay of staphylococcal enterotoxin B using HRP-functionalised mesoporous silica nanoparticle as label[J]. Food Chemistry, 2012, 135(1): 208-212.

[21] Xue P, Li YM, Zhang ZJ, et al. Novel chemiluminescent assay for staphylococcal enterotoxin B[J]. Microchim Acta, 2011, 174(1/2): 167-174.

[22] Wang ZP, Xu H, Wu J, et al. Sensitive detection of Salmonella with fluorescent bioconjugated nanoparticles probe [J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 779-784.

[23] Tennant SM, Zhang Y, Galen JE, et al. Ultra-fast and sensitive detection of non-typhoidal Salmonella using microwave-accelerated metal-enhanced fluorescence ("MAMEF") [J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18700.

[24] Cai J, Yao CY, Xia J, et al. Rapid parallelized and quantitative analysis of five pathogenic bacteria by ITS hybridization using QCM biosensor[J]. Sens Actuators B, 2011, 155(2): 500-504.

[25] Salmain M, Ghasemi M, Boujday S, et al. Piezoelectric immunosensor for direct and rapid detection of staphylococcal enterotoxin A(SEA) at the ng level[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 29(1): 140-144.

[26] Shen ZQ, Wang JF, Qiu ZG, et al. QCM immunosensor detection of Escherichiacoli O157: H7 based on beacon immunomagnetic nanoparticles and catalytic growth of colloidal gold[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(7): 3376-3381.

[27] Huang S, Yang H, Johnson ML, et al. Detection of S. typhimurium and Bacillus anthracis spores in a flow system using ME Biosensors by optimizing phage chemistry[J]. IEEE Sens J, 2009, 9(9): 1091-1097.

[28] Li S, Li Y, Chen H, et al. Direct detection of Salmonella typhimurium on fresh produce using phage-based magnetoelastic biosensors[J]. Biosens Bioelectron, 2010, 26(4): 1313-1319.