

生物传感器在生物毒素检测中的应用进展

许艳丽*, 鲍蕾*, 静平, 吕宁, 吴振兴, 石媛媛, 孙静克, 梁成珠
(山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 青岛 266001)

摘要: 生物传感器技术是一种全新的微量分析技术, 通过生物传感器进行检测可以实现高通量、高精度、快速筛查及定量分析等目标, 本文介绍了生物传感器的原理、分类及其在真菌毒素、细菌毒素检测中的应用现状, 并讨论了所存在的问题和未来的发展展望。

关键词: 生物传感器; 生物毒素; 应用

Research and application of biosensor on detection of biotoxin

XU Yan-Li*, BAO Lei*, JING Ping, LV Ning, WU Zhen-Xing, SHI Yuan-Yuan,
SUN Jing-Ke, LIANG Cheng-Zhu

(Technical Center of Inspection and Quarantine, Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau,
Qingdao 266001, China)

ABSTRACT: Biosensor technique is a new microanalysis method. Detection by biosensor could reach a high throughput, more accurate, faster screening, and quantitative analysis result. This paper reviewed the basic principles of biosensor technique, classification and its application in bacteria and fungus toxins detection.

KEY WORDS: biosensor; biotoxin; application

生物毒素(biotoxin)是生物机体分泌代谢或半生物合成产生的、不可自复制的有毒化学物质, 也称为天然毒素。已知化学结构的生物毒素有数千种, 依据来源可以把生物毒素分为微生物毒素、植物毒素和动物毒素^[1]。微生物毒素是微生物在生长繁殖过程中产生的一种次级代谢产物。植物毒素按其致毒成分分为酚类化合物、生氰化合物、生物碱、萜类化合物以及酶、多肽和蛋白质等。动物毒素的主要成分是多聚肽、酶和胺类等。随着目前对生物毒素研究的深入, 人们越来越认识到它对于化学生态学、化学生物以及医学、药学等诸多生命科学领域的研究有着十分重要的意义^[2-4]。

生物传感器(biosensor)是将生物技术和电子技术相结合, 以生物物质作为识别元件, 将生物反应转变

成可量化的物理、化学信号, 从而能够进行生命物质和化学物质检测和监控的装置^[5-6]。

本文重点介绍生物传感器技术在真菌毒素和细菌毒素检测中的应用。

1 生物传感器的分类

生物传感器按照分子识别元件的不同可分为: 酶传感器、免疫传感器、微生物传感器、组织传感器等^[5-9]。无论何种生物传感器都会有以下共同的结构^[7-8]: 包括一种或数种相关生物识别元件及能把生物活性表达的信号转换为电信号的物理或化学换能器, 二者组合在一起, 用现代微电子和自动化仪表技术进行生物信号的再加工, 构成各种可以使用的生物传感器分析装置、仪器和系统。生物识别元件可能是一

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2009IK167)

*通讯作者: 许艳丽, 硕士, 中级工程师, 研究方向: 生物毒素研究与检测。E-mail: evillive1124@163.com

鲍蕾, 博士, 研究员, 研究方向: 食品安全检测。E-mail: baoleiqd@yahoo.com.cn

种抗体、抗原、微生物、细胞、有机体、酶、生物膜、组织或核酸等。信号转换器是一种或多种电化学的、光学的、压电的、热敏的、磁性的技术组合。因此生物传感器也可以根据信号转换器件的种类进行分类。

2 生物传感器在真菌毒素检测中的应用

真菌毒素(Mycotoxin)一词源于希腊语“*Mykes*”和拉丁语“*Toxicum*”, 它是由产毒真菌在适宜的环境下产生的有毒代谢产物。按其产毒菌种可分为曲霉毒素(如黄曲霉毒素、棕曲霉毒素等)、青霉菌毒素(如展青霉素、桔青霉素等)、镰刀菌毒素(如脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮等)及其他(如孢子毒等)几大类。粮食和饲料的真菌毒素污染主要与这类霉菌有关, 所以在食品卫生学和饲料卫生学领域, 人们通常将真菌毒素称为霉菌毒素^[9]。真菌毒素的概念比较广泛, 根据天然存在的情况可以分成几大类, 其中许多实际上是作为有毒的化学物质而引起人类和动物疾病的产生。

真菌毒素分子结构上没有可供化学方法直接分析的基团, 但是大多数毒素本身具有与其他大分子蛋白质结合的能力, 从而赋予其抗原性, 能在体内产生相应的抗体。以抗体抗原特异性结合为基础, 各种免疫标记技术的发展, 使免疫传感器成为检测真菌毒素的有效装置。目前用于食品真菌毒素检测的传感器种类有电阻抗生物传感器、热导率传感器、电化学传感器、压电免疫传感器和光免疫传感器等^[10]。

韩鹏飞等^[10]系统介绍了不同生物免疫传感器快速检测各种真菌毒素的方法, 主要针对各类粮食、食品等基质中真菌毒素检测的应用做了详细介绍。Radi 等^[11]使用电阻抗免疫传感器检测棕曲霉毒素 A。其原理是将棕曲霉毒素 A 单克隆抗体利用碳二亚胺固定在 4-羧基单层上, 利用循环伏安和电化学阻抗谱进行观察传感器表面的抗体之间的免疫化学反应情况, 免疫传感器表面的免疫交互作用引起电阻改变, 以此来检测棕曲霉毒素 A; 检测浓度 1~20 ng/mL, 方法的检测限为 0.5 ng/mL。Jing Yuan 等^[12]利用表面等离子(SPR)传感器建立了棕曲霉毒素 A 的检测方法, 该方法将棕曲霉毒素 A 通过卵清蛋白(OVA)偶联上聚乙二醇(PEG), 形成新的棕曲霉毒素 A 化合物 OTA-PEG-OVA, 该化合物分子量变大, 在芯片表面具有更强的抗原性, 可以与抗体特异性结合, 从而使

芯片表面物质质量变化更显著, 该方法的检测低限可以达到 0.042 ng/mL。Anees 等^[13]建立了一种纳米锌氧化物平台完成了对真菌毒素的检测, 将纳米锌氧化物薄膜结合在锡锡氧化玻璃表面, 共同固定化免疫球蛋白单克隆抗体和牛血清蛋白, 检测棕曲霉毒素 A。

Nagwa 等^[14]设计了一种电化学传感器, 该传感器以间接竞争的 ELISA 法为基础, 使用微分脉冲伏安法测定大麦中的 AFB1, 检测限可达 30 pg/mL, 且具有较高的回收率。Yao 等^[15]用改良后的多壁碳纳米管、黄曲霉脱毒酶建立了一种检测杂色曲霉毒素的电化学传感器。碳纳米管具有特定的表层, 不仅可以起到固定大量酶分子的作用, 增加了固定化酶和基质反应的面积; 还能够促进电子的转移, 具有高电导性, 提高传感器响应度。其检测限更低, 并且其检测限比通过薄层层析法和高效液相色谱串联质谱法检测得到的要低。Massimiliano 等^[16]采用将胰蛋白酶偶联到金属芯片表面, 利用黄曲霉毒素 B1 和 G1 与胰蛋白酶能够特异性吸附的性质, 将污染黄曲霉毒素的玉米样品经过甲醇-水溶液提取后, 稀释、过滤, 将滤液通过偶联胰蛋白酶的芯片表面, 黄曲霉毒素 B1 和 G1 会与胰蛋白酶吸附, 使芯片表面分子质量发生变化, 从而引起吸光值的变化, 该方法的定量限能够达到 3.10 μg/kg, 方法的特异性较好。

Nancy 等^[17]采用多层碳纳米管改良的玻璃碳电极, 将其与连续流动装置相结合后制成的免疫传感器用于玉米中的玉米赤霉烯酮毒素检测, 检测过程耗时 15 min, 其检测限和灵敏度都优于 ELISA 方法; 表面等离子共振技术在生物治疗、制药和生命科学中的应用已经有多年时间, 近年在食品分析检测领域发挥了重要的作用。B 族单端孢霉烯族毒素包括呕吐毒素和 T-2 毒素等, Julie 等^[18]将 B 族单端孢霉烯族毒素与其对应的抗体偶联到芯片表面, 采用涂有 HT-2 毒素衍生物和单克隆抗体的传感器芯片的快速表面等离子体共振检测技术能够对 T-2 和 HT-2 毒素进行复合检测, HT-2 抗体表现出与 T-2 毒素的高度交叉反应, 但与其他常见的单端孢霉烯族毒素未见交叉反应。基于表面等离子体共振的间接竞争免疫传感器已经用于呕吐毒素(DON)的检测。Schnerr 等^[19]利用酪蛋白可与呕吐毒素特异性结合的特性, 将酪蛋白-呕吐毒素化合物结合在芯片上, 此时将含有呕吐

毒素抗体的溶液通过芯片, 呕吐毒素抗体会与芯片表面的抗原结合, 该方法的检测线可以达到 2.5 ng/mL。

姚冬生等^[20]探索了酶生物传感器三电极系统对杂色曲霉素的电化学分析。在实验中, 应用多壁碳纳米管作为分子识别元件黄曲霉毒素解毒酶的固定化基质和传感器的电子传递体构建了 Au 工作电极, 对杂色曲霉毒素进行检测, 检测下限为 8.32×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$, 响应时间 10 s。伏马霉毒素可导致马产生白脑软化症(EL EM)、神经性中毒而呈现意识障碍、失明和运动失调, 甚至造成死亡; 对猪产生肺水肿综合症(PPE), 并被怀疑可诱发人类的食道癌等疾病, 从而对畜牧业及人类的健康构成威胁^[9], Vickis 等^[21]采用表面等离子体共振传感器检测玉米样品中的伏马菌素 B₁ 浓度, 可达到检测下限为 50 ng/mL, 分析时间为 10 min; Thampson 等^[22]用光纤免疫传感器来检测伏马菌素 B₁, 可测得下限为 10 ng/mL, 响应时间提高到 4 min。

3 生物传感器在细菌毒素检测中的应用

细菌毒素是由细菌分泌产生于细胞外或存在于细胞内的致病性物质, 许多疾病都是由细菌毒素引发的^[21], 细菌毒素分为内毒素和外毒素。

3.1 细菌内毒素

细菌内毒素(Lipopolysaccharide, 又称脂多糖, LPS)是革兰氏阴性菌(Gram negative bacteria, GNB)细胞壁外膜表面的, 由 O 型特异链、核心多糖和类脂 A 组成的大分子, 是国际医学界研究发现的人类健康的威胁, 它是创伤、烧伤、休克及并发症中, 引起细胞因子产生的重要刺激物, 其有效的激活成分是脂多糖, 来自革兰氏阴性细菌细胞壁, 对热稳定, 抗原性差, 不能转化为类毒素, 毫克水平即可能引起动物死亡^[23]。

James 等^[24]开发出了一种光纤传感器。它是利用 Polymyxin B (PMB) 共价结合到光纤传感器的探头上, 在实际检测过程中, 将 200 $\mu\text{g/L}$ 的 TR ITC-LPS 与待测样品一起加入反应池, 当含有未标记的 LPS 样品与光纤探头接触时, 荧光标记的 LPS 将与未标记的 LPS 产生竞争反应, 通过检测探头上荧光标记的荧光强度的变化, 而检测出待测样品的含量。其检出限为 10 $\mu\text{g/L}$, 检测时间为 30 s, 这种方法简单、方便, 而且无需标记。

3.2 细菌外毒素

细菌外毒素(Bacteria exotoxin)是细菌分泌到胞

外的一种蛋白质, 其热稳定性差, 抗原性强, 能转化成类毒素, 毒性很强, 微克水平就能引起动物死亡。

Orgert 等^[25]使用瞬波光纤传感器, 检测肉毒梭菌毒素 A。方法是将肉毒毒素单抗或多抗共价结合在光纤表面, 与肉毒毒素 A 和荧光素化抗肉毒毒素 IgG 液体孵化, 瞬波激发光纤表面结合的荧光素标记的抗体, 10 min 内检测荧光信号变化, 与样品中毒素的含量成正比, 最低可检测至 5 ng/mL, 需时 1 min。Kumar 等^[26]报道了荧光素-抗体光纤传感器将抗肉毒毒素 B IgG 共价结合到光纤表面的条件, 发现待分析样品最好为 150 μL 。在这种条件下, 待测样品毒素与生物素化毒素竞争结合抗体, 导致 FITC-链霉亲和素聚合物荧光信号的降低, 在 250 ng 固定浓度的生物素化肉毒毒素 B 和不超过 300 ng 待测样品时信号下降呈线性关系, 检测需时 5 min, 此实验中的抗体包被光纤不能重复使用。

魏华等^[27]利用光纤生物传感器检测葡萄球菌肠毒素 B, 该方法利用双抗体夹心法, 实验中使用聚苯乙烯代替石英作为光纤材料, 生物分子通过疏水键直接吸附到聚苯乙烯光纤上, 在一定程度上减少了光纤的个体差异; 该方法的检测范围在 0.1 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$, 具有灵敏、快速、便捷的特点。

4 生物传感器在生物毒素检测应用中存在的问题及展望

生物传感器检测生物毒素是一种新兴的检测方法, 使测定过程变得更为简单, 而且便于实现自动化, 不仅减少了分析时间, 还提高了灵敏度, 使生物毒素的现场检测成为可能。与目前常用的化学分析法、生物分析法等相比, 该方法能准确定量, 对样品的纯净度要求低, 这样就能节省前处理时间, 同时能降低检测成本, 可有效提高实验室的检测能力; 该方法在检测过程中, 多使用的是 PBS、HBS 或其它的缓冲液, 而不是液相色谱所用的甲醇、乙腈等有机溶剂, 这样能减少有机试剂的使用, 降低废液对环境的污染, 与化学分析法相比, 具有环保、节约资源等优势。

生物毒素的产生是一个极其复杂的过程, 有学者研究报道^[28], 像黄曲霉毒素是由黄曲霉菌株在其生长过程中合成的次级代谢产物, 这是由于菌株生长过程中一些关键的基因表达后才会产生黄曲霉毒素, 并不是所有的黄曲霉菌株均能产生黄曲霉毒素,

因此,可以考虑监控生物毒素合成过程中一些关键的、特定的合成中间物,这样可以有效预防和控制毒素的产生和蔓延。生物传感器技术可以实现,根据特定的合成中间物选定有特异性的基团,合成能与其特异性吸附的化合物,可以将合成中间物或者能与其特异性吸附的化合物偶联的芯片表面,采用直接或者间接法测定生物毒素合成过程中的中间物的含量,生物传感器技术为我们以后研究真菌毒素产生的过程提供了有效的技术支持。

生物传感器技术的应用非常广泛,但也具有一定的局限性,如本课题研究的采用表面等离子共振生物传感器检测常见的几种生物毒素,需要将生物毒素的抗体偶联到芯片表面,由于芯片表面采用的是氨基偶联方式,因此需要单克隆抗体的纯度较高,如果没有纯度较高的单抗,所以实验过程中芯片偶联抗体的时候,其它的抗体及带有氨基的蛋白也会连接到芯片表面,对后来生物毒素的检测影响较大。

生物传感器技术作为一种新兴的检测技术,是一种方便、快速、自动化的检测技术。随着生物传感芯片技术、实验方法学以及分析技术的不断发展,生物传感器的应用领域将不断扩大,技术水平以及实用程度也将不断提高。生物传感器技术的应用将更加趋向多样化,具有更广阔的发展前景。

参考文献

- [1] Chen JS. A prospect on research and application of natural toxins[J]. *Eng Sci*, 2003, 5(2): 16–19.
- [2] Donald MG, Paul W. Barbara JH. The epipolythiodioxopiperazine(ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis[J]. *Microbiol*, 2005, 151: 1021–1032.
- [3] Geoffrey AC, Louise FM, James SM. Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection[J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2005, 203: 264–272.
- [4] Daniel EV, Jimmy DB. Clostridium difficile toxins: Mechanism of action and role in disease[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(2): 247–263.
- [5] 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, 32: 453–456.
- [6] Rich RL, Myszk DG. Survey of the year 2000 commercial optical biosensor literature[J]. *J Mol Recognit*, 2001, 14: 273–275.
- [7] McDonnell JM. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5: 572–577.
- [8] Rich RL, Myszk DG. BIACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis[J]. *J Mol Recognit*, 2001, 14: 223–228.
- [9] 张艺兵, 鲍蕾, 褚庆华. 农产品中真菌毒素的检测分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 1–20.
- [10] 韩鹏飞, 李洪军, 邹忠义. 免疫传感器在食品真菌毒素检测中的应用[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(4): 430–435.
- [11] Abd-Elgawad Radi, Xavier Muñoz-Berbel, Vasilica Lates, et al. Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of ochratoxin A[J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(7): 1888–1892.
- [12] Jing Yuan, Dawei Deng, Denis R. Lauren, et al. Surface Plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in cereals and beverages[J]. *Anal Chim Acta*, 2009: 63–71.
- [13] Anees A Ansari, Ajeet Kaushik, Pratima R Solanki, et al. Nanostructured zinc oxide platform for mycotoxin detection[J]. *Bioelectrochemistry*, 2010, 77(2): 75–81.
- [14] Nagwa HS, Ammida, Laura M, et al. Electrochemical immunosensor for determination of aflatoxin B1 in barley[J]. *Anal Chim Acta*, 2004(5): 159–164.
- [15] Yao D, Cao H, Wen S, et al. A novel biosensor for sterigmatocystin constructed by multi-walled carbon nanotubes (NWNT) modified with aflatoxin-detoxifying enzyme(ADTZ)[J]. *Bioelectrochemistry*, 2006, 68(2): 126–133.
- [16] Cuccioloni M, Mozzicafreddo M, Barocci S, et al. Biosensor-Based Screening Method for the Detection of Aflatoxins B1-G1[J]. *Anal Chem*, 2008, 80: 9250–9256.
- [17] Nancy V Panini, Franco A Bertolino, Eloy Salinas, et al. Zearalenone determination in corn silage samples using an immunosensor in a continuous-flow/stopped-flow systems[J]. *Biochem Eng J*, 2010, 51(1–2): 7–13.
- [18] Julie P Meneely, Michael Sulyok, Sabine Baumgartner, et al. A rapid optical immunoassay for the screening of T-2 and HT-2 toxin in cereals and maize-based baby food[J]. *Talanta*, 2010, 81(1–2): 630–636.
- [19] Schnerr H, Vogel R, Niessen L. Biosensor-based Immunoassay for Rapid Screening of Deoxynivalenol Contamination in Wheat [J]. *Food Agric Immunol*, 2002, 14(4): 313–321.
- [20] 姚冬生, 文圣梅, 刘大岭, 等. 多壁碳纳米管固定化生物酶修饰电极检测杂色曲霉素的初步研究[J]. *生物工程学报*, 2004, 20(4): 601–606.
- [21] Vickis S Thompson, Chris M. Fiber-optic immunosensor for the detection of Fumonisin B1[J]. *Agric Food Chem*, 1996, 44: 1041–

- 1046.
- [22] Tempelman LA, King KD, Anderson GP, *et al.* Quantitating Staphylococcal Enterotoxin B in Diverse Media Using a Portable Fiber-Optic Biosensor [J]. *Anal Biochem*, 1996, 1(8): 50–57.
- [23] 杨君, 冯志彪. 生物传感器在为生物毒素检测中的应用研究[J]. *农产品加工·学刊*, 2007(5): 80–85.
- [24] James EA, Schmeltzer K, Ligler FS. Detection of endotoxin using an evanescent wave fiber optic biosensor[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1996, 60(3): 189–202.
- [25] Orgert RA, Brown JE, Singh BR, *et al.* Detection of Clostridium botulinum toxin A using a fiber optic-based biosensor[J]. *Anal Biochem*, 1992, 205(2): 306.
- [26] Kumar P, Colston JT, Rael ED, *et al.* Detection of botulinum toxin using an evanescent wave immunosensor[J]. *Biosens Bioelectron*, 1994, 9: 57–60.
- [27] 魏华, 姜永强, 赵永凯, 等. 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[J]. *生物技术通讯*, 2006, 17(3): 374–379.
- [28] 徐进, 罗雪云. 黄曲霉毒素生物合成的分子生物学[J]. *卫生研究*, 2003, 32(6): 628–631.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



许艳丽, 硕士, 中级工程师, 研究方向: 生物毒素研究与检测。

E-mail: evillive1124@163.com



鲍蕾, 博士, 研究员, 研究方向: 食品安全检测。

E-mail: baoleiqd@yahoo.com.cn

“食品加工与质量控制”专题约稿

《食品安全质量检测学报》感谢各位专家的大力支持! 本刊自 2010 年 1 月创刊以来, 得到本领域专家及管理部門的充分肯定, 在国内食品安全与质量研究领域的影响越来越大。

近年来, 食品安全得到了国家越来越多的重视, 但我国的食品安全问题仍较严重。鉴于此, 本刊特别策划了“食品加工与质量控制”专题, 围绕食品加工技术、加工过程污染物的检测、食品加工的安全质量控制等的相关技术和方法等问题展开讨论, 计划在 2013 年出版。编辑部特向各位专家诚征惠稿, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表专题论文。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: tougao@chinafoodj.com

《食品安全质量检测学报》编辑部