

文章编号:1673-1689(2010)06-0801-08

β -内酰胺抗生素残留检测的生物传感器研究进展

王明华, 叶尊忠, 王剑平*

(浙江大学 生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310029)

摘 要: β -内酰胺抗生素残留痕量检测技术具有保障动物性食品安全、促进国际贸易的重要意义。生物传感器的便携、自动化快速检测潜力,吸引了众多的研究者。依照所倚赖的特异性生物化学反应原理的不同,分为酶传感器、青霉素结合蛋白(PBPs)传感器和免疫生物传感器 3 种。酶传感器开发最早,但检测限较高;PBPs 传感器为 β -内酰胺抗生素残留检测的特有方法,但受到生物技术的发展影响较大且检测过程需要对生物材料进行标记;免疫生物传感器检测限低,相对较易于深入研究。近年来免疫生物传感器研究较多,主要集中在纳米技术的应用、换能检测方法的创新和改进,多残留自动化检测方案实现等方面。计算机科学、生物学、生物信息学研究的新成果和方法已经用于生物传感器开发,包括抗原、抗体辅助筛选设计以及传感过程的研究等这些新研究方法在 β -内酰胺抗生素残留痕量检测生物传感器的研究中具有很大的应用潜力。

关键词: β -内酰胺抗生素;残留;痕量检测;生物传感器;生物信息学

中图分类号: TP212.3;Q6-33;Q71

文献标识码: A

Biosensor for β -Lactam Antibiotics Residue Detection-A Review

WANG Ming-hua, YE Zun-zhong, WANG Jian-ping*

(College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: β -Lactam antibiotics residue trace detection has proved to be an important safety problem, due to its relationship of animal derived food safety and international trade. Biosensor which would rapidly and automatically detecting β -Lactam antibiotics in convenient, has attracted more and more researchers. Based on the different biological reaction, it can be divided into three classes: enzymic, penicillin binding proteins (PBPs) and immune. Firstly, enzymic biosensor has been took into practice, but their capacities were not enough to residue detection. PBPs were a kind of β -Lactam antibiotics sensitive bacteria functional protein, which needs to be determined, characterized, and produced through advanced biotechnology. Comparative advantage of immunosensors was its low detection limit and systematic development. Recently, more research concerned with the immunosensors and studied on the new transducer, nano-technology and multi-residue automatically detection. New achievements and methodologies of computer, molecular biology and bioinformatics had been used to design and screen bio-recognition elements

收稿日期: 2010-02-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(20907041)。

作者简介: 王明华(1982—),女,山西原平人,生物系统工程博士研究生,主要从事食品安全生物传感器研究。

Email:wmh82031@126.com

***通信作者:** 王剑平(1960—),男,黑龙江龙江人,教授,博士生导师,主要从事生物传感器研究。

Email:jpwang@zju.edu.cn

for biosensors development, as well as to investigate the biosensing process. It hopes that biosensor practicability would be improved though new biological research methods and findings.

Key words: β -Lactam antibiotics, residue, trace detection, biosensor, bioinformatics

β -内酰胺抗生素是一类来源于微生物的广谱抗生素,大量的用于畜禽疾病的预防和治疗^[1-2]。为了提高动物性食品的产量,有一些还被作为饲料添加剂使用^[3-5],从而大大增加了抗生素在食品和环境中的残留风险,引起随之而来的人过敏反应、微生物抗药性、发酵乳产品生产等多种问题^[6-8]。随着人民生活水平不断提高和科学技术的发展,动物性食品的需求量大幅提高,国内外贸易量也逐年增加,抗生素残留量指标作为被联合国粮农组织(FAO)、世界贸易组织(WTO)选定的监测指标备受关注^[9-10]。相关国际组织和国家制定的最大残留量标准虽稍有不同,但共同的特点是大都需要先进的“痕量”检测技术才能实现。基于此,目前检测技术中常用的化学分析方法是色谱法和色谱-质谱联用法,近些年来不断开发的依赖与生物技术原理和产品的酶联免疫分析、生物传感器方法也是受到很多青睐^[11-13]。色谱方法检测准确性好,但需要对样品进行前处理,操作较复杂且仪器的移动性差,难以满足现场快速筛查的需求。酶联免疫分析试剂盒为一次性使用,由此造成的耗费比较多。多年来,研究者一直在关注生物传感器方法检测 β -内酰胺抗生素的建立和改进,以期解决监测中的实际问题。

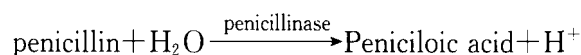
检测 β -内酰胺抗生素残留的生物传感器按照所倚赖生物反应类型的不同可以分为3类,即酶传感器、青霉素结合蛋白传感器、免疫传感器,作者通过对方法进行叙述、比较,分析近年来显现出来的新发展趋势,说明生物传感器技术的发展与生物技术以及其研究方法的联系愈加紧密。

1 酶传感器

酶传感器是最早开发的传感器类型,自20世纪50年代酶电极最早用于生物传感器^[14]以来一直是研究的重点。它依赖于酶催化反应的专一性,通过检测反应的产物或/和底物,得到抗生素的含量。不同酶传感器检测 β -内酰胺抗生素所用的酶不同检测原理也不同,以酶为基础的生物传感器检测浓度大都为 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ mol/L,略高于最大残留量标准,但在青霉素生产等需要检测较高浓度样品时仍具有实用意义。

1.1 β -内酰胺酶传感器

20世纪80年代,Caras S和Janata J^[15-16]第一次用 β -内酰胺酶场效应晶体管生物传感器检测青霉素,这类酶传感器的检测原理如下:



2001年,Poghossian A^[17-18]等人即将 β -内酰胺酶直接吸附固定在pH敏感的 Ta_2O_5 表面,分别通过酶场效应晶体管(EnFETs)、电容性电解质-绝缘体-半导体(capacitive electrolyte-insulator-semiconductor, EIS)和光寻址电位计(light-addressable-potentiometric, LAPS)实现将 H^+ 浓度的变化转换为检测信号,获得青霉素的检测时间为2.5~3.0 min,检测限为5~10 $\mu\text{mol/L}$,酶传感器可通过简单的重新浸入酶液中进行再生,传感器的使用时间长达372 d。2009年, Lee, S.-R.^[19]等人对 β -内酰胺酶传感器进行了新的研究,开发了利用电荷转移技术的青霉素传感器,酶催化青霉素水解反应产生的氢离子浓度变化可引起半导体材料中势阱的深度发生变化。该研究采用电荷转移技术,实现将5次依赖酶催化青霉素水解反应产生电荷集成,用来控制传感区域氢离子的电荷量进而影响势阱深度,从而不需要再经过信号放大即可获得良好检测性能。检测范围和灵敏性都比离子敏感场效应晶体管传感器有了显著加强。该方法可靠性强,0~25 mmol/L范围内重复检测60次错误率低于1%。随后, Siqueira J R^[20]等进一步将纳米技术应用到了酶传感器研究中,改进了传感器的性能。

1.2 间接检测微生物活动相关酶活性传感器

Rinken T^[21]等人则使用了乳酸盐氧化酶作为检测青霉素生物传感器的生物敏感元件。细菌的呼吸作用在酶的催化作用下将葡萄糖氧化产生乳酸,因此通过间接检测乳酸盐氧化酶催化乳酸氧化反应引起的信号变化,可以得到细菌的呼吸强度的大小,即样品中微生物的数量,从而检测抗生素,青霉素的检测范围为0.1~2.5 $\mu\text{g/mL}$ 。作为一种间接检测方法,他们在实验基础上建立了检测动力学模型,并对不同季节细菌生长差异进行了修正。

2008年, Ferrini, A M^[22]等人开发了一种基于检测微生物生长过程中 CO_2 变化的间接抗生素残留检测生物传感器。抗生素存在抑制微生物生长,

进而影响 CO₂ 产量。该方法通过电化学方法分析含有抗生素的牛奶样品与另外一份添加广谱 β-内酰胺酶的相同样品之间 CO₂ 产率的变化,从而得到抗生素含量。检测限可达欧盟标准,最初 120 min 内可得检测结果。

1.3 羧肽酶传感器

羧肽酶是催化水解多肽链含羧基末端氨基酸的酶,细菌一些种类的青霉素结合蛋白(PBPs)具有羧肽酶活性^[23]。Gustavsson. E^[24]等人则利用 β-内酰胺抗生素对羧肽酶活性的抑制作用,通过 SPR 传感器的信号变化检测反应产物量来间接获得抗生素残留的状况。牛奶样品混合三肽和羧肽酶在 47 °C 条件下培养 5 min,其间酶催化三肽水解为二肽,当抗生素存在时,酶活性降低,产生的二肽也随之减少。随后,将二肽抗体加入到反应体系中然后使反应混合物通过固定了二肽的传感器表面,反应产物与通过 NHS - EDC 活化电极后用乙醇胺固定的二肽竞争结合二肽抗体。传感器表面的免疫反应引起信号变化,通过检测可间接获得样品中 β-内酰胺抗生素的含量,它与检测信号的大小成负相关。该传感器对于青霉素的检测限为 2.6 μg/kg。2004 年^[25],在该作者的另一篇报道中,以同样的反应原理,分别用 SPR 传感器表面固定的二肽或三肽抗体检测了反应体系中二肽(产物)或三肽(底物)的含量变化,青霉素的检测限有差异,分别为 1.2 μg/kg 和 1.5 μg/kg。

2 青霉素结合蛋白生物传感器

由于 β-内酰胺抗生素能够与细菌体内的功能蛋白质——青霉素结合蛋白(PBPs)特异性相结合,从而抑制微生物的生长。研究人员据此开发了基于 PBPs 检测抗生素残留的生物传感器,这是该类抗生素检测的特有方法。

1999 年,Setford S J^[26]开发了利用固定 β-内酰胺受体结合蛋白的工作电极和 Ag/AgCl 参比电极体系,用于检测牛奶中的青霉素 G 含量水平,检测限达到 5 μg/kg,检验过程包括 2~4 min 的培养时间、快速冲洗和 1~2 min 的检测步骤。2004 年,Cacciatore. G^[27]等人开发了一种用表面等离子体振荡生物传感器检测青霉素和头孢菌素的检验方法。第一步,样品与 PBPs 一起混合,阳性样品中含有的 β-内酰胺类抗生素将和 PBP 结合,没有结合的 PBP 接下来一步将与 DIG-AMPI(地高辛标记的氨苄青霉素)结合形成复合物。地高辛单克隆抗体通过胺类化合物与试剂盒相连后固定在传感器芯片

表面,用来再次特异性识别 DIG-AMPI-PBP 结合形成的复合物,通过 SPR 检测传感器芯片表面该识别反应引起的信号变化。信号变化的大小与样品中 β-内酰胺类抗生素的含量成反比。检测限低于欧盟标准。

2007 年,Lamar J^[28]等人用 *Streptococcus pneumoniae* 青霉素结合蛋白 PBP 2x * 开发了一种受体微平台来检测和检查食品样品中具有完整 β-内酰胺环结构的青霉素和头孢菌素。在分析中,也采用了间接竞争方法:PBP 2x * 固定在基底上,地高辛标记氨苄青霉素与样品中抗生素竞争结合 PBP 2x *,然后再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗地高辛 Fab 片断与 PBP 2x * /DIG-AMPI-复合物特异性结合,最后加入 HRP 的底物进行显色反应。当样品中没有 β-内酰胺残留时,可用于催化反应的过氧化物酶最多,以四甲基对氨基联苯作为显色剂时颜色达到最深,检测限达到 2 μg/kg。

3 免疫生物传感器

免疫传感器(Immunosensor)是将免疫测定法与传感技术相结合而构建的一类新型生物传感器。免疫测定法应用广泛^[29],是一种以抗体作为生物化学监测器对化合物、酶、蛋白质等物质进行定性和定量的分析方法,是以抗原特异性识别和结合反应为基础的。免疫传感器利用免疫测定法的高亲和性和特异性,将抗原(或抗体)固定在传感器基体上,通过传感技术使吸附发生时产生物理、化学、电学或光学上的变化,转变成可检测的信号来测定环境中待测分子的浓度。从测定原理上可分为标记型免疫传感器和非标记型免疫传感器。前者利用待测抗原(或抗体)与固定在传感器表面的抗体(或抗原)发生特异吸附时直接产生电信号或光信号。而后者是用一定的标记物如酶、荧光试剂、化学发光试剂、核素、核糖体、红细胞或金属标记物等使免疫反应产生可测定的信号。免疫传感器也能用来检测内酰胺抗生素。

1981 年,Miura T^[30]等人即开发了一种应用高灵敏的酶免疫传感器用于检测牛奶中的青霉素残留,化验程序能检测牛奶中高于 0.01 μg/kg 的氨苄西林残留。2005 年,Samsonova^[31]等也报道了一种用对氨苄西林具有特异性的多克隆抗体检测牛奶中氨苄西林的间接酶免疫传感器,检测范围 10~1 000 ng/mL。在检测样品稀释时加入干酪素补充缓冲液以降低基质效应,起始(稀释样品)检测浓度为 5 ng/mL,相当于实际样品中的 50 ng/mL。近

两年来,免疫传感器的研究增长较快,研究主要集中在纳米技术的应用、换能检测方法的创新和改进,多残留自动化检测方案实现等方面,都获得了比较好的检测结果。

2007年, Thavarungkul P^[32]等人研制了一种非标记型的阻抗免疫生物传感器来检测牛奶中的青霉素 G。青霉素 G 抗体用硫辛酸单层自组装膜固定在金工作电极上,用最佳频率 160 Hz 实时监测阻抗。在最优化系统条件下得到了广泛的线性范围 $1.0 \times 10^{-13} \sim 1.0 \times 10^{-8}$ mol/L, 和较低的检测限 3.0×10^{-15} mol/L, 远低于牛奶中青霉素 G 的最大残留量 1.2×10^{-8} mol/L。传感器重复使用 45 次, 电极上固定的青霉素抗体表现出了良好的稳定性和重复性, 相对标准偏差低于 4%。

2008年, Jiang Z L^[33]等人开发基于纳米金修饰青霉素 G 兔抗体的免疫纳米金-催化 Cu_2O -加强型共振散射谱分析传感器。免疫纳米金催化加强效应表现在 Cu^{2+} 和葡萄糖之间的慢粒子反应和 $(\text{Au})_{\text{nucleus}}(\text{Cu}_2\text{O})_{\text{shell}}$ 复合粒子在 608 nm 处的共振散射效应, 即可作为检测信号。作者以 9 nm 的金颗粒标记抗体作为青霉素 G 探针, 在磷酸盐-柠檬酸缓冲液中探针和青霉素 G 的进行免疫反应, 经过离心后, 剩余的金标探针浮在反应液上部用来催化粒子反应放大共振散射信号。当加入待测液中含有青霉素 G 时, 上部的金标探针浓度线性减少, 相应的引起 608 nm 处的反射光强度减小。共振散射强度随青霉素 G 浓度增加而减小的线性范围为 0.09~21.6 ng/mL, 检测限 0.01 ng/mL。同年, 作者^[34]的研究组还开发了一种基于纳米金在 560 nm 处的共振散射效应的免疫纳米金共振散射谱生物传感器。纳米金标记的免疫反应在含有聚乙烯的

pH 5.4 磷酸盐-柠檬酸缓冲液中时进行。当加入青霉素 G 时, 纳米金标记的免疫复合物形成越来越多。560 nm 增强的共振散射率在 7.5~1 700 ng/mL 与青霉素 G 浓度呈线性关系, 检测限为 0.78 ng/mL。这种免疫分子方法对于牛奶中青霉素抗生素具有极高的灵敏性。

2008年, Duan H^[35]等人开发基于在盐酸溶液中加热条件下, 青霉素 G 可与 Fe^{3+} 反应形成 Fe^{2+} , 随后再与溶液中的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 形成 $\text{Fe}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ 复合物。在疏水作用力和范德华力的作用下, 复合物聚集形成平均粒径为 45 nm 的颗粒。从而增强了共振瑞利散射 (RRS) 和二阶散射 (SOS)、倍频散射 (FDS) 等非线性散射。散射率的增加在一定的范围内直接与抗生素的浓度成比例。检测限分别为, RRS: 2.9~6.1 ng/mL, SOS: 4.0~6.8 ng/mL, FDS: 7.4~16.2 ng/mL。

2009年, Xie H L^[36]等人以多克隆抗体连接在胶体金颗粒上作为免疫色谱分析的检测试剂, 用来检测头孢菌素。5 min 内半定量检测灵敏性高, 头孢氨苄和头孢羟氨苄具有极高的灵敏性 (0.5 ng/mL), 其余 5 种抗生素的检测浓度也低于 100 ng/mL。

2009年, Katrin K^[37-38]等人开发了一种在聚乙二醇表面固定抗生素、以 HCl-glycine (pH 3) 缓冲液作为再生溶液的自动化快速竞争型化学发光微阵列免疫分析方法, 检测原料乳中的 13 种不同抗生素。该芯片通过流动系统设计、嵌入控制、数据处理软件等基本实现了抗生素的多残留自动检测。可以达到再生重复利用 40 次以上 (图 1)。

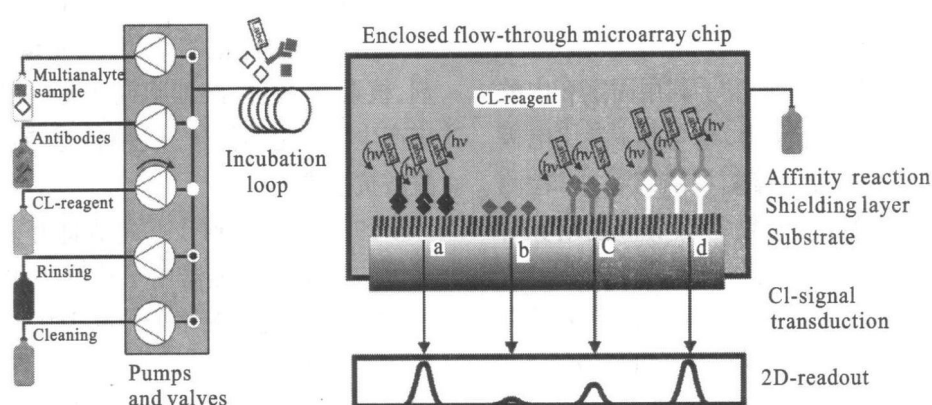


图1 微阵列流通平台检测分析物原理图(a,b间接法,c直接法,d三明治型)^[37]

Fig. 1 Schematic set-up of an analytical CL flow-through microarray platform for quantifying of analytes with indirect (a and b), direct (c), and sandwich (d) assay formats^[37]

4 生物传感器研究中的新方法

随着科技的不断发展,人们各学科领域的认识和研究大量积累,涌现出了许多新的研究方法和研究成果。这种快速发展所带来的成果对生物学领域的影响尤为凸现,随着研究的深入,学科交叉更加紧密,基因组学、蛋白质组学、生物信息学等方面都形成了一系列系统研究方法和成果。生物传感器依赖于生物学的重要技术和成果,在研究过程中,以这些方法和成果作为基础,借鉴医药研究领域的应用方式,有利于提高生物传感器的性能。这一趋势正在引起越来越多研究者的关注。

4.1 生物敏感分子筛选设计

生物传感器区别于其他检测技术的主要特点是它利用了生物反应的高度灵敏性与特异性,并于换能信号检测仪器直接联接,提高了检测的效率。因此,生物传感器的性能在很大程度上受到了生物技术相关的影响。近年生物学相关研究中的新技术、成果对于生物传感器的开发也有助益。

生物传感器所倚赖生化反应的特异性生物分子,需要其具有明确、高效的生物功能,因此除了需要先进的生物技术提取天然存在的生物分子外,更先进的需求则是能够按照需求进行设计、筛选生物分子。2007 年 Ryan B. J.^[39]等人用精氨酸(Arg)取代了 HRP 活性中心的赖氨酸(Lys)形成重组分子,将其通过氨基与醛基的相互作用固定于生物传感器修饰了活化聚醚砜的电极表面上,并获得了良好的效果。2003 年,NATURE 发表 Looger L L^[40]等人的研究成果,利用计算机技术,通过对已知三维结构的 5 种大肠杆菌周质结合蛋白进行活性部位关键残基区的系列突变,进行大量模拟和计算,设计、筛选出了 TNT、L-乳酸盐或血清素的特异性抗体,用于开发生物传感器。同期,DeGrado W F^[41]对此发表了评论。除了直接筛选抗体,也可以通过设计抗原间接获得抗体。2009 年,Cao L M^[42]等人采用已经在生命科学研究中广泛使用的基于分子力学和量子力学理论的分子模拟方法,通过 Accelrys 公司的 Cerius2 软件包,在计算机上经过相关运算设计出了较为理想的喹诺酮类抗生素抗原。以期用该抗原免疫动物后获得的抗体对多种喹诺酮类抗生素具有类特一行,达到多残留检测。抗体特异性对应抗原设计时的运算结果具有良好的一致性,说明了计算机辅助设计生物分子用于构建生物传感器是可信的。其它功能性生物分子也可以进行设计。2009 年,Giardi, M. T^[43]等人通过基于

蛋白同源性的计算机建模,对虚拟的各种变异体进行筛选,定位了与除草剂具有特异性作用的电子传递链 D1 蛋白功能氨基酸残基。用单细胞绿藻构建了一系列变异蛋白库,计算了除草剂与这些变异蛋白的相互作用。以理论计算为基础,筛选出了与除草剂具有最高、最低结合能的变异株,用于构建生物传感器并用于荧光检测。对于三和尿素类除草剂的检测限在 $0.8 \times 10^{-11} \sim 3.0 \times 10^{-9}$,传感器重复利用时也未表现出性能降低。

4.2 生物传感器反应过程理解优化

对于检测 β-内酰胺抗生素的生物传感器,已有的研究报道虽尚未涉及生物分子设计,但有研究者着重关注了生物传感器的反应过程。Chan, P H^[44]等人则对基于 β-内酰胺酶的生物传感器进行了深入细致的研究。2004 年,他们通过对 β-内酰胺酶结构和催化功能的详细研究,揭示了酶催化反应的过程和相关氨基酸残基的作用,指出一个 17 个残基的 Ω-环片断能够调节酶的活性位点,是酶活性中心必须的柔性区域,这一环区包含着一个很重要的残基:Glu166,酶的晶体结构表现出该氨基酸侧链指向活性位点。对该残基进行半胱氨酸(Cys)点突变后的研究表明,活性下降 1 800 倍,酶-底物复合物稳定性得到提高,并且突变后赋予了酶分子能够与具有硫醇连接性能的荧光素结合的巯基(-SH),荧光素标记的变异酶称为 E166Cf(图 2)。

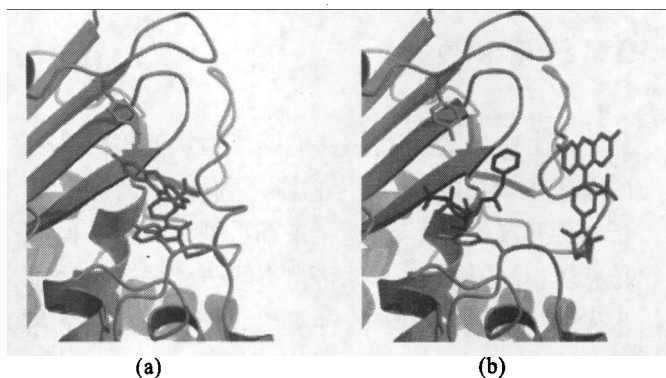


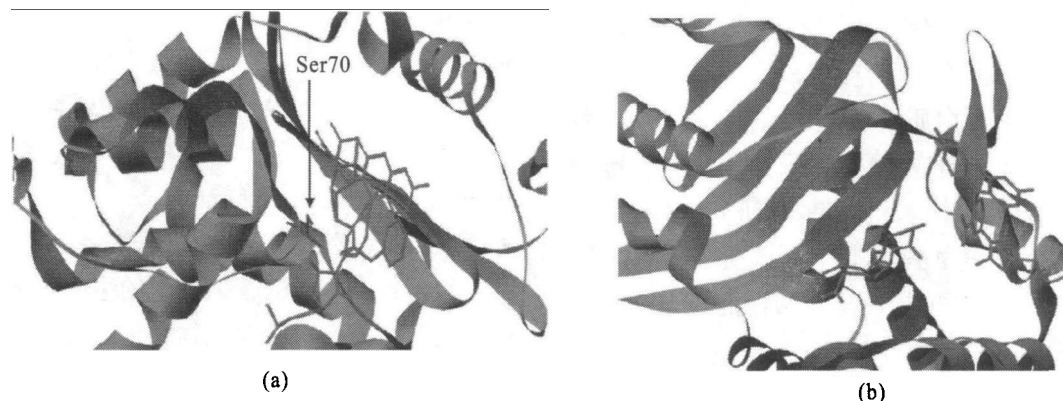
图 2 荧光标记(a)E166Cf 结合青霉素 G(b)前、后的分子模型^[44]

Fig. 2 Molecular models of the fluorescein label (a) on E166Cf before (b) and after binding with penicillin G

该变异酶分子被成功地用来构建了生物传感器。2008 年^[45],作者又对 β-内酰胺连接和水解过程中的荧光变化生物传感具体过程进行了研究。分子模拟研究 E166Cf 和青霉素 G 的复合物表明荧光标签可能与 β-内酰胺和抗生素的噻唑烷环共用相同的活性位点。这种空间上的冲突引起荧光素标记从活性位点底物连接处迁移到外部的水环境中因此

接触到更多的水分子。对不同酶分子的热变性试验表明变异酶可能增加了 Ω -环的可变性。这种“修饰”的结构特性可能补偿荧光标记底物连接的空

间位阻效应(图 3)。对于 β -内酰胺酶结构和功能的详细理解,将有助于提高生物传感器性能。



(a) Stereoview of the active site of E166Cf (with the fluorescein label staying inside the active site) docked with an intact penicillin G molecule. Note that the xanthene ring and the benzoic group of the fluorescein label clash spatially with the thiazolidine ring and the exocyclic R1 amide group of the penicillin G molecule, respectively. (b) Stereoview of the active site of E166Cf in the noncovalent ES state. The fluorescein label stays out of the active site to avoid the spatial clash with the penicillin G molecule in this state. The Ser70 and Cys166 residues are shown in blue and magenta, respectively

图 3 E166Cf 结合青霉素 G 分子模型^[45]

Fig. 3 Molecular models of E166Cf with penicillin G

由此可见,生物传感器研究中应用计算机技术与生物技术新方法,有利于提高研究过程的安全性,节省研究中的人、财、以及时间耗费,有针对性的提高生物传感器的性能。

5 结论和展望

综上所述,生物传感器能够作为快速检测 β -内酰胺抗生素的方法,酶传感器、免疫传感器和受体蛋白传感器各有优势,近年来都得到了发展。但酶传感器检测限较高;受体蛋白生物传感器受生物技术发展的影响,PBPs 的种类多,功能也不完全相同,从中筛选出具有内酰胺高亲和力的蛋白种类并实现其标准化产出,需要依赖研究的深入和技术的进步,报道的该类生物传感器其 PBPs 大多是通过实验室通过生物技术自制的,且需要标记,操作步

骤较繁;免疫生物传感器主要受抗体的限制较大,包括制备及性质,抗体的高度特异性使得有些检测只能针对某种内酰胺抗生素。但总体上,免疫生物传感器的灵敏、可靠性较好,较方便开发。近年来,对其研究的热点主要是纳米技术的应用、换能检测方法的创新和改进,多残留自动化检测方案实现等方面,都获得了比较好的检测结果。

计算机信息技术的飞速发展,渗透着各个领域。在生物学研究中,它不仅用于对试验数据的分析整理,还可以作为一种独立的研究方法更加安全、经济、准确的研究速度极快的反应和变化。生物传感器的开发建立在生物学研究成果的基础之上,计算机和信息技术的发展将会推动生物学相关的研究,也有助于解决生物传感器开发中遇到的困难,促进该技术的市场化,进而影响生物技术产业,开发检测 β -内酰胺抗生素的生物传感器也不例外。

参考文献(References):

- [1] Andrew S M, Moyes K M, Borm A A, et al. Factors associated with the risk of antibiotic residues and intramammary pathogen presence in milk from heifers administered prepartum intramammary antibiotic therapy[J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 134(1-2): 150-156.
- [2] Pengov A, Kirbis A. Risks of antibiotic residues in milk following intramammary and intramuscular treatments in dairy sheep[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 637(1-2):13-17.
- [3] Perez-Lozano P, Garcia-Montoya E, Orriols A, et al. Stability evaluation of amoxicillin in a solid premix veterinary for-

- mulation by monitoring the degradation products through a new HPLC analytical method[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 42(2): 192–199.
- [4] Dousa M, Hosmanova R. Rapid determination of amoxicillin in premixes by HPLC[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 37(2): 373–377.
- [5] De Baere S, De Backer P. Quantitative determination of amoxicillin in animal feed using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 586(1-2): 319–325.
- [6] Brooks J P, McLaughlin M R. Antibiotic resistant bacterial profiles of anaerobic swine lagoon effluent[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2009, 38(6): 2431–2437.
- [7] Silva R, Cruz L, Botelho C, et al. Work up of patients with history of beta-lactam hypersensitivity[J]. *Allergologia et Immunopathologia*, 2009, 37(4): 193–197.
- [8] Grunwald L, Petz M. Food processing effects on residues: penicillins in milk and yoghurt[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 483 (1-2): 73–79.
- [9] Veterinary drug residues in food maximum residue limits[EB/OL]. <http://www.codexalimentarius.net/mrls>.
- [10] Trade policy review body -overview of developments in the international trading environment -annual report by the director-general[EB/OL]. <http://www.docsonline.wto.org>.
- [11] Kantiani L, Farre M, Barcelo D. Analytical methodologies for the detection of β -lactam antibiotics in milk and feed samples[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28(6): 729–744.
- [12] Blasco C, Torres C M, Pico Y. Progress in analysis of residual antibacterials in food[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26(9): 895–913.
- [13] 陈兆波. 农产品质量安全分子生物检测的研究现状和发展趋势[J]. *食品与生物技术学报*, 2009, 28(4): 444–450.
- CHEN Zhao-bo. Molecular detection of the quality and safety of agricultural produces: advances and trends[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 28(4): 444–450. (in Chinese)
- [14] 张先恩. 生物传感器[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006. 1
- [15] Caras S, Janata J. Field-effect transistor sensitive to penicillin[J]. *Analytical Chemistry*, 1980, 52(12): 1935–1937.
- [16] Caras S, Janata J. pH-Based enzyme potentiometric sensors[J]. *Analytical Chemistry*, 1985, 57(9): 1917–1925.
- [17] Poghosian A, Schoning M J, Schroth P, et al. An ISFET-based penicillin sensor with high sensitivity, low detection limit and long lifetime[J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2001, 76 (1-3): 519–526.
- [18] Poghosian A, Yoshinobu T, Simonis A, et al. Penicillin detection by means of field-effect based sensors: EnFET, capacitive EIS sensor or LAPS[J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2001, 78 (1-3): 237–242.
- [19] Lee S R, Rahman M M, Sawada K, et al. Fabrication of a highly sensitive penicillin sensor based on charge transfer techniques[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24 (7): 1877–1882.
- [20] Siqueira J R, Abouzar M H, Poghosian A, et al. Penicillin biosensor based on a capacitive field-effect structure functionalized with a dendrimer/carbon nanotube multilayer[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 25(2): 497–501.
- [21] Rinken T, Riik H. Determination of antibiotic residues and their interaction in milk with lactate biosensor[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2006, 66(1-3): 13–21.
- [22] Ferrini A M, Mannoni V, Carpico G, et al. Detection and identification of beta-lactam residues in milk using a hybrid biosensor[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(3): 784–788.
- [23] Sauvage E, Kerff F, Terrak M, et al. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis[J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2008, 32(2): 234–258.
- [24] Gustavsson E, Bjurling P, Sternesjo A. Biosensor analysis of penicillin G in milk based on the inhibition of carboxypeptidase activity[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 468(1): 153–159.
- [25] Gustavsson E, Degelaen J, Bjurling P, et al. Determination of beta-lactams in milk using a surface plasmon resonance-based biosensor[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(10): 2791–2796.
- [26] Setford S J, Van Es R M, Blankwater Y J, et al. Receptor binding protein amperometric affinity sensor for rapid β -lactam quantification in milk[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 398(1): 13–22.
- [27] Cacciatore G, Petz M, Rachid S, et al. Development of an optical biosensor assay for detection of β -lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 520(1-2): 105–115.
- [28] Lamar J, Petz M. Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 586(1-2): 296–303.
- [29] 林影, 叶茂, 韩双艳, 等. 免疫检测技术的研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2006, 26(4): 117–120.

- LIN Ying, YE Mao, HAN Shuang-yan. et al. The progress on the research of immunoassay [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(4): 117–120. (in Chinese)
- [30] Miura T, Kouno. H, Kitagawa. T. Detection of Residual penicillin in milk by sensitive enzyme immunoassay[J]. **Journal of Pharmacobio-Dynamics**, 1981, 4(9): 706–710.
- [31] Samsonova Zh V, Shchelokova O S, Ivanova. N L, et al. Enzyme immunoassay of ampicillin in milk[J]. **Prikl Biokhim Mikrobiol**, 2005, 41(6): 668–675.
- [32] Thavarungkul P, Dawan S, Kanatharana P, et al. Detecting penicillin G in milk with impedimetric label-free immunosensor[J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2007, 23(5): 688–694.
- [33] Jiang Z L, Liang A H, Li Y, et al. Immunonanogold-Catalytic Cu_2O -Enhanced Assay for Trace Penicillin G With Resonance Scattering Spectrometry[J]. **IEEE Transactions on Nanobioscience**, 2008, 7(4): 276–283.
- [34] Jiang Z L, Li Y, Liang A H, et al. A sensitive and selective immuno-nanogold resonance-scattering spectral method for the determination of trace penicillin G[J]. **Luminescence**, 2008, 23(3): 157–162.
- [35] Duan H, Liu Z F, Liu S P, et al. Resonance Rayleigh scattering, second-order scattering and frequency doubling scattering methods for the indirect determination of penicillin antibiotics based on the formation of $\text{Fe}_3\text{Fe}(\text{CN})(6)](2)$ nanoparticles[J]. **Talanta**, 2008, 75(5): 1253–1259.
- [36] Xie H L, Ma W, Liu L Q, et al. Development and validation of an immunochromatographic assay for rapid multi-residues detection of cepheims in milk[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2009, 634(1): 129–133.
- [37] Kloth K, Niessner R, Seidel M. Development of an open stand-alone platform for regenerable automated microarrays[J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2009, 24(7): 2106–2112.
- [38] Kloth K, Rye-Johnsen M, Didier A, et al. A regenerable immunochip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk[J]. **Analyst**, 2009, 134(7): 1433–1439.
- [39] Ryan B J, Fagain C O. Arginine-to-lysine substitutions influence recombinant horseradish peroxidase stability and immobilisation effectiveness[J]. **BMC Biotechnology**, 2007, 7: 86.
- [40] Looger L L, Dwyer M A, Smith J J, et al. Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions[J]. **Nature**, 2003, 423(6936): 185–190.
- [41] DeGrado W F. Computational biology - Biosensor design[J]. **Nature**, 2003, 423(6936): 132–133.
- [42] Cao L M, Kong D X, Sui J X, et al. Broad-Specific Antibodies for a Generic Immunoassay of Quinolone: Development of a Molecular Model for Selection of Haptens Based on Molecular Field-Overlapping[J]. **Analytical Chemistry**, 2009, 81(9): 3246–3251.
- [43] Giardi M T, Scognamiglio V, Rea G, et al. Optical biosensors for environmental monitoring based on computational and biotechnological tools for engineering the photosynthetic D1 protein of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2009, 25(2): 294–300.
- [44] Chan P H, Liu H B, Chen Y W, et al. Rational design of a novel fluorescent biosensor for beta-lactam antibiotics from a class A beta-lactamase[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2004, 126(13): 4074–4075.
- [45] Chan P H, So P K, Ma D L, et al. Fluorophore-labeled beta-lactamase as a biosensor for beta-lactam antibiotics: A study of the biosensing process[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2008, 126(13): 6351–6361.

(责任编辑:朱明)