

基于新型可视化学传感阵列的氨基酸快速识别

霍丹群¹ 张国平¹ 侯长军*¹ 董家乐¹ 张玉婵¹
刘振¹ 罗小刚¹ 法焕宝² 张宿义^{1,3}

¹(重庆大学生物流变科学与技术教育部重点实验室, 生物工程学院, 重庆 400030)

²(重庆大学化学化工学院, 重庆 400030) ³(泸州老窖股份有限公司, 泸州 646000)

摘要 以卟啉和其衍生物及指示剂为传感元件, 构建了一种对氨基酸敏感的可视传感阵列。可视化学传感阵列以交互响应的敏感元件组成阵列, 对不同物质产生特异的响应, 并通过信号识别处理系统, 将检测结果以图谱的方式显示, 实现检测的可视化。研究中筛选了对氨基酸敏感的 36 种化学物质, 构建了 6×6 的传感阵列, 使用自主研发的阵列数据采集与处理系统, 对 10 种具有代表性的常见氨基酸进行了检测, 氨基酸溶液与阵列的反应时间为 5 min。对实验检测结果数据采用主成分分析和判别分析进行了计算和分析。实验结果显示, 通过阵列响应的可视差图可以将浓度为 375 μmol/L 的 10 种氨基酸明显区分。判别分析结果显示, 本可视阵列对氨基酸识别的准确率达到 97%。二维主成分散点图和判别分析散点图对 10 种氨基酸都有显著分辨效果。本可视传感阵列可用于氨基酸的快速识别。

关键词 可视传感阵列; 氨基酸; 识别

1 引言

氨基酸是构成生命体的基本物质, 是细胞代谢的基础物质。氨基酸的快速识别对细胞代谢分析具有重要意义。目前, 对氨基酸进行识别的常用方法是高效液相色谱 (HPLC)、气相色谱 (GC) 和毛细管电泳 (CE) 等各种色谱法^[1~3]。这些方法具有精确度高和检出限低的优点, 但样品前处理时间长、成本高, 很难适应快速检测, 限制了它们的应用^[4~6]。近年来, 研制出多种用于氨基酸鉴别的传感器^[7~9]。多数传感器采用了能够对氨基酸侧链基团进行识别的受体来实现选择性的识别^[10,11], 然而这些传感器却很难对丙氨酸 (Ala) 和缬氨酸 (Val) 这类没有特殊功能基团的氨基酸进行很好的识别。Buryak 等^[12]报道了一种由指示剂组成的化学传感阵列, 通过紫外-可见光谱结合多元分析成功地进行了 20 种常见氨基酸的区分, 为实现氨基酸的快速识别提供了一种全新的思路。然而这种研究仍然要采用光谱仪进行数据采集, 大大影响了实际应用中的识别效率。

基于阵列的化学传感器以交互响应的敏感元件组成阵列, 可以模拟哺乳动物的嗅觉或味觉系统, 对不同物质产生特异的响应^[13]。目前, 多种对不同物质进行特异性识别的可视阵列传感器已经有报道, 识别的物质包括小分子的糖类^[14]、有机物^[15,16] 和脂肪族胺^[17] 等。然而对于研究生命活动现象具有极其重要意义的氨基酸和蛋白质的识别尚未见报道。本研究构建了对氨基酸敏感的可视传感阵列, 对 10 种具有代表性的常见氨基酸进行特异性的识别, 对蛋白质识别和细胞识别研究进行了前期的探索。

2 实验部分

2.1 试剂

各种氨基酸和染料均为分析纯 (Sigma-Arich 公司)。*meso*-四苯基卟啉 (H₂TPP) 及其各种衍生物均为分析纯 (Frontier Scientific 公司)。聚偏氟乙烯膜 (Arkema 公司)。超纯水由 Millipore DirectQ Water system (法国 Molsheim 公司) 制备。

2009-11-04 收稿; 2010-02-26 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 30770568)、国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA04Z349)、重庆市科委重点攻关 (No. 2008AB2024)、重庆大学研究生创新团队 (No. 200909B1008) 和重庆大学“211 工程”三期创新人才培养计划 (No. S-091-4) 资助项目

* E-mail: houjc@cqu.edu.cn

2.2 实验方法

2.2.1 样品准备 以 10 种常见的氨基酸为检测对象, 包括 4 种非极性氨基酸 (*L*-甘氨酸 (Gly)、*L*-缬氨酸 (Val)、*L*-甲硫氨酸 (Met) 和 *L*-脯氨酸 (Pro)); 3 种极性不带电氨基酸 (*L*-丝氨酸 (Ser)、*L*-酪氨酸 (Tyr) 和 *L*-谷氨酰胺 (Gln)); 3 种极性带电氨基酸 (*L*-谷氨酸 (Glu)、*L*-赖氨酸 (Lys) 和 *L*-组氨酸 (His))。其中, Tyr 是唯一的芳香族氨基酸, Gln 是酸性最强的氨基酸, Lys 是碱性最强的氨基酸, His 和 Pro 是杂环氨基酸 (如表 1)。10 种氨基酸分别用超纯水定容至 50 mL, 浓度均为 375 $\mu\text{mol/L}$ 备用。

2.2.2 阵列构建与检测方法 构建可视传感阵列前需要进行大量的前期实验, 通过分析目标物质与大量敏感材料的反应光谱, 筛选出与目标物质反应灵敏、变色显著的敏感材料, 作为传感阵列的传感单元。本课题组经过前期实验, 筛选了对氨基酸敏感的 36 种化学物质, 构建了一种 6×6 的传感阵列。传感阵列采用疏水的聚偏氟乙烯膜作为基底材料, 可有效的防止空气湿度对阵列检测造成的影响。制作好的阵列芯片密封保存于氮气黑暗环境中, 以保持其反应活性。

实验采用本课题组研发的阵列数据采集与处理系统, 系统原理图及检测过程如图 1 所示。实验检测时, 只需采集传感阵列与氨基酸溶液反应前后的可见光区阵列光谱变化, 系统软件就能自动提取并保存阵列上每个点的 R、G 和 B 数值, 这些数据就显示了传感器阵列的反应变化。通过系统软件标准化处理, 最后生成反应前后的阵列点 RGB 差图; 通过系统软件计算出的 R、G、B 数据就是对应的氨基酸与阵列作用的指纹响应结果。本实验中采用了 6×6 维的传感阵列, 每个阵列点上包含 R、G、B 三维向量数据, 指纹响应结果包含了 108 维有效数据, 每维数据理论上的变化范围为 0~255, 包含 256 个值, 由此可得阵列在理论上的响应模式有 256^{108} 种, 这就保证了阵列强大的识别能力, 可以对每种检测物的指纹响应结果进行特异性的识别。

本实验中, 每种氨基酸进行了 10 次平行检测, 阵列与氨基酸溶液的反应时间为 5 min。

3 结果与讨论

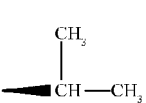
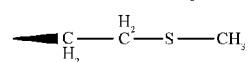
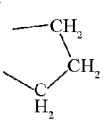
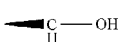
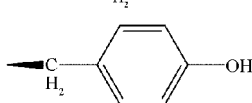
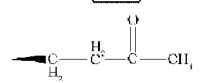
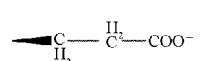
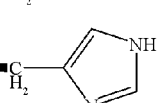
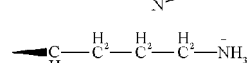
3.1 基于分子识别的可视化学传感阵列

“特定识别受体”的模式识别方法是有效分析不同化学结构和混合物的有力工具。合成的识别受体不需要特异性或者选择性的与目标分析物结合, 取而代之的唯一要求是, 阵列中的识别受体可以与不同分析物不同程度的结合, 并由此产生可用于分析的诸多模式。但对识别受体进行一定程度的理性设计, 以保证其对分析物具有一定的亲和力和选择性, 依然是有必要的。

可视化学传感阵列是近年来发展起来的一种新的模式识别传感技术, 其利用传感阵列检测待测样本特征响应信号, 通过信号识别处理系统, 将检测结果以图谱的方式显示, 实现检测的可视化。该传感阵列的设计过程中需要考虑到 4 个方面: (1) 化学传感阵列每单元应具有一定的选择性, 分析物能够与其中心位点牢固结合, 以保证阵列对分析物的响应是强的相互作用; (2) 作用位点要有一个良好的生色基团与其配位, 这就保证阵列与分析物的响应能引起敏感元件色彩变化; (3) 阵列上的传感单元必须具有交叉敏感效应, 即每个传感单元对不同的组分具有不同的响应能力; (4) 传感器各项参数以及相应信号稳定, 并具有良好的重现性。本研究中主要采用了 3 种满足上述要求的传感单元: 卟啉及其衍生物,

表 1 10 种氨基酸的残基结构和等电点

Table 1 Residue structure and pI of ten amino acid used

Amino acid	Residue structure	pI
Gly	—H	5.97
Val		5.96
Met		5.74
Pro		6.30
Ser		5.68
Tyr		5.66
Gln		5.65
Glu		3.22
His		7.59
Lys		9.74

酸碱指示剂以及极性指示剂。

卟啉分子具有大 π 共轭环状结构, 与待检测物配位结合后能产生较大的光谱响应, 可有效识别分子间的相互作用, 如键的形成、酸碱相互作用、氢键作用、偶极和多极作用、 π - π 共轭作用以及范德华力和物理吸附等。因此, 以多种卟啉及衍生物分子作为传感器阵列材料, 根据阵列与待测物的响应特征图谱, 对不同物质的特异性识别, 可有效解决大多数传感器对不同物质的分辨能力较差的缺点, 又能保持传感器的特异选择性。另外, 在可视传感阵列中采用卟啉衍生物、酸碱指示剂以及极性指示剂与目标物质反应之后, 会产生明显的颜色变化, 通过比对反应前后阵列颜色变化的 R、G 和 B 数据即可实现对物质的特异性识别, 与传统传感器以光谱数据进行识别的方式相比, 可视阵列传感器的应用更加快捷简便。

3.2 阵列分析识别结果

采用已建立的实验系统 (图 1), 对浓度为 $375 \mu\text{mol/L}$ 的不同氨基酸进行了研究, 可视传感阵列对 10 种氨基酸的响应结果如图 2 所示。由图 2 可见, 传感阵列对 10 种氨基酸具有显著的相应, 且响应结果各不相同, 用肉眼即可将它们区别出来。通过观察可以发现, 有些性质相近的氨基酸的相应指纹图相似度也高, 如 His 和 Lys 以及 Tyr 和 Ser 等。但通过系统软件分析很容易对它们进行识别。而氨基酸性质相差较大, 响应指纹图相差也较大, 如 Glu 作为酸性最强的氨基酸, His 和 Lys 作为碱性最强的氨基酸, 均表现出与其它氨基酸极为显著的差异。相比文献 [18-19] 利用单一溶液色度变化进行物质识别的方法而言, 彩色传感阵列的识别效果和识别能力都显著提高。

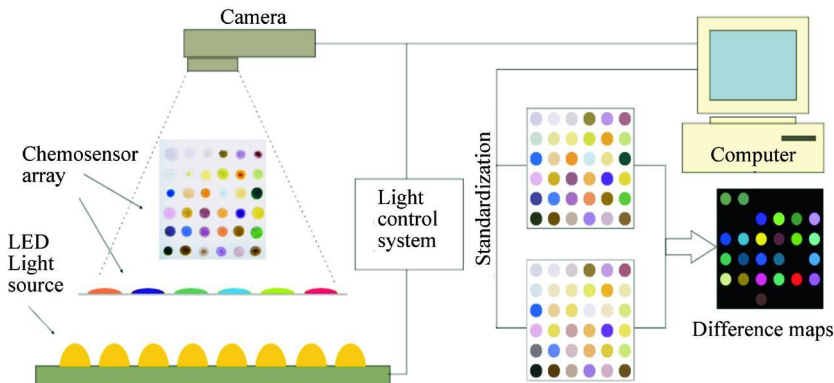


图 1 可视传感阵列系统原理图

Fig. 1 Schematic diagram of colorimetric sensor array

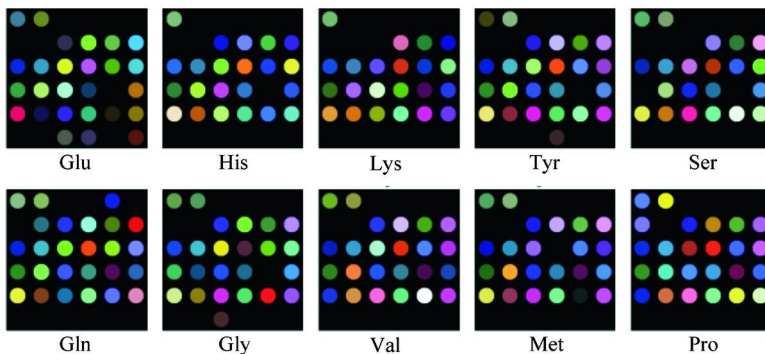


图 2 10 种氨基酸与阵列作用的响应可视差图

Fig. 2 Average color change profiles of ten amino acids visualized as color difference maps

3.3 实验结果主成分分析 (PCA)

主成分分析是一种常用的传感阵列分析方法。其基本原理是设法将原来众多具有一定相关性的指标, 重新组合成一组新的互相无关的综合指标来代替原来的指标, 用几个主要的综合指标尽可能多的反映整体的信息, 达到降维的目的。在可视传感阵列上, 每个阵列点包含有 R、G、B 三维信息, 因此其原始信息指标相当多, 达到 $3N$ 维 (N 为阵列上的阵列点个数)。本实验中采用 6×6 的传感阵列, 原始信息

有 108 维, 因此通过主成分分析整合原始信息对于后续快速准确分析很有必要。

实验研究中对每种氨基酸进行 10 次平行实验, 用 SPSS 对得到的 100 个检测结果进行主成分分析, 作出主成分累积图 (图 3)。主成分分析结果显示, 最主要的 8 维主成分包含了全部 108 维数据 90.8% 的信息量。相比之下, 电子鼻分析中, 一般前两维主成分就包含了全部数据 95% ~ 99% 的信息量, 这主要是因为传统的电子鼻是基于一种或少数几种特定的分子反应。而可视传感阵列中包含了多种化学反应和分子识别方式, 这就使得阵列的分辨能力更高, 能够对结构和性质都相近的分析物进行区分。

以主成分分析结果中的第一主成分为横坐标, 第二主成分为纵坐标, 可作出样本的二维散点分布图 (图 4)。两维主成分之和仅占全部信息量的 54.1%, 但二维散点图却可以将 10 种氨基酸很好地区分出来, 显示出阵列强大的识别能力。碱性较强的 Lys His 和酸性较强的 Glu Gln 各自分布于二维散点图的不同方向上, 而酸碱性和极性都相近的另外 6 种氨基酸则比较集中于二维散点图的中央, 可见氨基酸在图中的位置分布基本可以反映它们之间结构和化学性质的差异。从图 4 可见, 散点在第一主成分轴 (横轴) 上的投影基本满足从左到右等电点逐渐降低的规律, 如 Lys 和 His 分布在横轴最左侧, 而 Glu 分

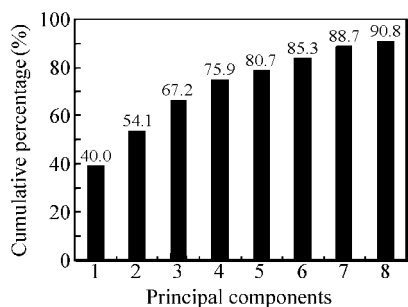


图 3 对 10 种氨基酸的 100 个样本进行主成分分析得到的前 8 个主成分累积图

Fig 3 Scree plot of cumulative percentage of variance for the 8 most important principal components obtained from color change profile numerical data

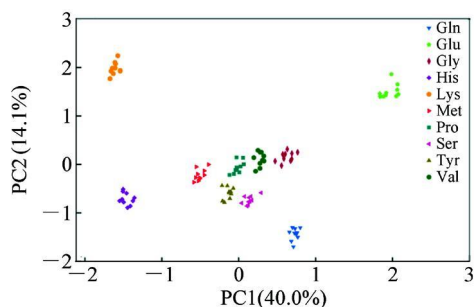


图 4 前两个主成分为轴的氨基酸散点分布图

Fig 4 PCA score plot using the two most important principal components based on the data for analysis of ten amino acids

布在横轴最右侧。可见第一主成分可能主要代表可视传感阵列对分析物酸碱性的识别能力, 追溯到阵列构建上, 这种对分析物酸碱性的识别主要可能是酸碱指示剂的识别作用; 而散点在第二主成分轴 (纵轴) 上的投影基本满足原点附近分布非极性氨基酸, 原点两侧则分布极性氨基酸的规律, 如 Gly Val Met 和 Pro 在纵轴的投影分布在原点附近, 而 Lys Glu Gln 在纵轴的投影分布在原点两侧。可见第二主成分可能主要代表的是可视传感阵列对分析物极性的识别能力, 追溯到阵列构建上, 这种对分析物极性的识别主要可能是极性指示剂的识别作用。另外, 吡啶及其衍生物具有很好的分子识别能力, 对于不同功能基团具有很好的识别效果, 这可能也是阵列能够对酸碱性和极性相近的氨基酸进行区别的一个重要原因。

3.4 实验结果判别分析 (LDA)

判别分析是在分类确定的条件下, 根据某一研究对象的各种特征值判别其类型归属问题的一种多变量统计分析方法。它按照一定的判别准则, 建立一个或多个判别函数, 用研究对象的大量资料确定判别函数中的待定系数, 并计算判别指标。根据建立的判别函数判断未知样本的类型归属。利用判别分析可以从可视传感阵列上的反应指纹信息中提取 2 个或 3 个包含综合信息的函数, 将这几个函数作为坐标就可以将指纹信息可视化为一张散点图 (图 5)。每个判别分析散点图上的点都代表了一个分析样品与阵列反

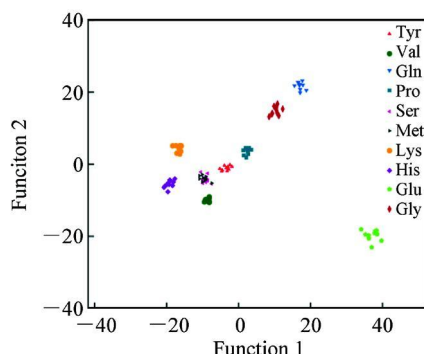


图 5 传感阵列检测 10 种氨基酸响应结果的 LDA 散点分布图

Fig 5 Linear discriminant analysis (LDA) plot of response patterns for ten amino acids

应的识别结果: 聚在一起表明这些点所代表的分析样品与阵列的识别反应模式相近, 反之, 点之间的距离越远则表明这些点所代表的分析样品与阵列的识别反应模式差别大。

从图 5 中的判别分析散点图可以清楚的看到, 此可视传感阵列可以对 10 种氨基酸进行显著地区分。同一种氨基酸的平行实验结果在图中聚集在一起, 表明阵列识别结果具有很好的重现性。更重要的是, 10 种氨基酸的识别结果除了 Met 和 Ser 有一定程度的重叠外, 其余 8 种氨基酸均无重叠, 表明阵列能够对这 10 种氨基酸进行较好的分类。在本研究中, 对氨基酸检测的 100 个样本进行判别分析。随机取出 1 个样本, 以剩余的 99 个样本为“训练样本”建立判别函数, 然后对开始取出的 1 个样本进行判别, 确定其类别, 并与样本实际类别比对。通过对 100 个样本进行上述判别分析, 其中 97 个样本均得到正确的判别, 误分率为 3%, 实验表明, 本研究构建的可视传感阵列对氨基酸的识别准确率可达 97%, 优于传统的电子鼻。本研究构建的氨基酸快速识别可视传感阵列, 对十种常见的氨基酸检测结果表明, 可视传感阵列可以根据氨基酸的性质对其进行显著的分辨, 识别准确率达到 97%, 优于传统的电子鼻。而检测时间仅需 5 min, 优于各种大型仪器的检测时间。由此可见, 该可视传感阵列分辨率高, 检测速度快, 操作便捷, 显示出其在细胞实时监测、微生物鉴定、食品质量检测等领域均有潜在应用价值。

References

- 1 Awawdeh M A, Legako J A, Hamon H J *Sensors and Actuators B*, **2003**, 91(1-3): 227~ 230
- 2 Wu Y, Xie J, Wang F, Chen Z L *Journal of Separation Science*, **2009**, 32(3): 437~ 440
- 3 Y N Dong-Guang(尹东光), WU Ming-Hong(吴明红), XIE Chun-Juan(谢春娟), ZHANG Li(张礼), LIU Bin-Hu(刘斌虎), ZHOU Xiao-Zhou(周小舟), WANG Peng(王鹏). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(1): 152~ 156
- 4 Xie Y, Jiang Y N, Berramotz D *Analytical Biochemistry*, **2005**, 343(2): 223~ 230
- 5 Kim B H, Lee H S, Jang Y A, Lee J Y, Cho Y J, Kim C I *Journal of Food Composition and Analysis*, **2009**, 22(1): 44~ 52
- 6 Carignan M O, Cardozo K H, Oliveira-Silva D, Colepicolo P, Carreto J I *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **2009**, 94(3): 191~ 200
- 7 Villari V, Mineo P, Micali N, Angelini N, Vitalini D, Scamporrino E *Nanotechnology*, **2007**, 18(37): 5503~ 5516
- 8 Inai H, Misawa K, Munakata H, Uanori Y. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **2008**, 56(10): 1470~ 1472
- 9 Angelini N, Micali N, Mineo P, Scamporrino E, Villari V, Vitalini D. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2005**, 109(39): 18645~ 18651
- 10 Prasad B B, Tiwari K, Singh M, Shama P S, Patel A K, Srivastava S *Journal of Separation Science*, **2009**, 32(7): 1096~ 1105
- 11 Vasjari M, Mekoci A, Hart J P, Alegret S *Microchimica Acta*, **2005**, 150(3-4): 233~ 238
- 12 Buryak A, Severin K. *J. AM. CHEM. SOC.* **2005**, 127(11): 3700~ 3701
- 13 Rakow N A, Suslick K S *NATURE*, **2000**, 406(6797): 710~ 713
- 14 Lin S H, Musto C J, Park E, Zhong W X, Suslick K S *Org. Lett.*, **2009**, 10(20): 4405~ 4408
- 15 Chen Zhang Kenneth S, Suslick, 2005. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(49): 11548~ 11549
- 16 Suslick K S, Rakow N A, Sen A. *Tetrahedron*, **2004**, 60(49): 11133~ 11138
- 17 Bang J H, Lin S H, Park E, Suslick K S *Langmuir*, **2008**, 24(22): 13168~ 13172
- 18 Shao J, Lin H, Yu M, Cai Z S, Lin H K. *Talanta*, **2008**, 75(2): 551~ 555
- 19 Li J W, Lin H, Cai Z S, Lin H K. *Spectrochimica Acta Part A*, **2009**, 72(5): 1062~ 1065

A Colorimetric Sensor Array for Identification of Natural Amino Acids

HUO Dan-Qun¹, ZHANG Guo-Ping¹, HOU Chang-Jun^{* 1}, DONG Jia-Le¹,

ZHANG Yir-Chan¹, LIU Zhen¹, LUO Xiaogang¹, FA Huar Bao², ZHANG Su-Yi³

¹(Key Laboratory of Bioreological Science and Technology, Chongqing University, Ministry of Education,

Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400030)

²(College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030)

³(Luzhou Laojiao Group Co. Ltd., Luzhou 646000)

Abstract A colorimetric sensor array was developed for the identification of natural amino acids. Using a cross-responsive array containing a diverse family of chemically responsive dyes, the colorimetric sensor array provides enormous discriminatory power among different analytes. Digital imaging of the dye array before and after immersion provides a color change profile as a unique fingerprint for each specific analyte. The 6 × 6 array used in this study has 36 dyes that were sensitive to amino acids. A functional portable type apparatus was developed for data acquisition and data processing. Using colorimetric sensor arrays, ten natural amino acids have been analyzed within 5 min. The digital data library generated was analyzed with statistical and chemometric methods, including principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA). Facile identification of all of the amino acids was readily achieved using comparison of the color change profiles or a PCA score plot. Using LDA analysis, the classification accuracy of identification was 97%. These results suggest that colorimetric sensor arrays may be useful for the identification of natural amino acids; also represent a potential application in the field of cell recognition, food quality assurance and microbial identification.

Keywords Colorimetric sensor array; Amino acid; Identification

(Received 4 November 2009; accepted 26 February 2010)

《中药红外光谱分析与鉴定》

中药是成分复杂的混合物,其分析研究与质量控制一直是科研和实践领域的重大难题。该书阐述了“中药红外光谱宏观指纹分析法”的理论基础与应用实例,提出了将红外光谱用于中药分析与质量控制的方法与特点优势。全书共 9 章,前两章提出了红外光谱法用于混合物分析的基本理论和方法,以及将红外光谱法用于中药质量控制的方法优势,并对混合物红外光谱解析所需的一些化学计量学方法做了简单介绍。第 3 章至第 9 章,用具体的研究实例说明红外光谱法在中药材、中药饮片和中药制剂等领域的研究应用,包括中药成分分析、炮制机理分析,以及中药提取物、中药配方颗粒和中药制剂的分析。

该书重在实践,可供化学和药学等相关专业的师生、中医药领域的科研人员以及中药生产企业的管理和检验人员参考。

该书由孙素琴、周群、陈建波著,化学工业出版社于 2010 年 6 月出版,定价 78.00 元。