



以双层脂膜为基础的生物传感器和器件及其应用及展望*

H. T. TIEN (田心棣) Z. SALAMON V. KOCHER
A. OTTOVA M. ZVIMAN

(Membrane Biophysics Laboratory, Department of Physiology, Michigan State
University, East Lansing, Michigan 48824 USA, 美国密执安州立大学生理系
膜生物物理实验室)

提 要

详细介绍了如何利用自组装技术建立一个简单的 BLMs。总结了同生物传感器和分子电子器件有关的 BLMs 的工作。讨论了 BLMs 的改进和前景。

关键词 BLM (双层类脂膜), BLMs (双层脂膜系统), 生物传感器, 分子电子器件

构成双层膜的两类主要化合物是脂质和蛋白质。根据测定, 生物膜的脂质形成一种双分子层结构, 在所有生物膜中, 这是一种基本单元。其分子的一端是亲水的, 对介电常数大的介质具有很大的亲和力; 脂质分子的另一端是亲脂的, 它远离水溶液相。现在已知脂质双层很稳定, 是因为亲水力和亲脂力的结合, 使脂质双层具有有利于热力学的结构。于是, 置于水样介质中的脂质或其它两亲化合物会自动排列形成双分子层。这一显著特点曾帮助发现了两个实验双层脂质系统, 即平板双层脂膜(BLM)和球形脂质体(liposomes)。

60 年代以来, 重组双层脂膜作为生物膜模型已被广泛研究^[1-3]。从膜生物物理学和膜生理学的观点来看, 生物膜本质上具有天然传感器和器件的基本结构。例如: 绿色植物的类囊体膜起能量转换器的作用, 把太阳光变成电能或化学能; 视网膜杆细胞外段膜是视觉系统检测光子的重要部分。细胞质膜和细胞器膜具有离子通透能力, 例如, 能够选择性地识别 Na^+ 和 K^+ 。此外, 原生质膜还为配体-受体的接触和相互作用(如抗原-抗体的结合)提供了场所。

1 BLM 系 统

BLM 系统的研究历史和作为生物膜模型的进展情况已有文章详细描述过^[2]。“黑”肥皂膜和 Langmuir-Blodgett (LB) 技术是认识 BLMs 的关键。固体基片上的 LB 层和 BLMs 有重要的差别, 除双分子层厚度不同外, BLM 是一种类似液态的动态结构, 处于亚稳态^[4]。而 LB 技术制成的层状结构是刚性的, 并处于固态。要发展生物传感器, 一种液态的双层结构是至关重要的。本节将详细描述如何利用自组装技术建立一个简单的 BLM 系统^[5]。

1.1 BLM 小池 (BLM cell)

BLM 小池由两个室构成: 一个外容器和一个置于其中的聚四氟乙烯杯子。外容器通常用有机玻璃制成, 以便于观察 BLM 的形成。两室由一个 2mm 小孔相通, 如图 1a 所示。

1.2 形成 BLM 的溶液

* 本文为英文稿, 由四川大学化学系覃军、谢明贵翻译整理, 并经田心棣本人审阅。

收稿日期: 1990-12-17 修回日期: 1991-04-15

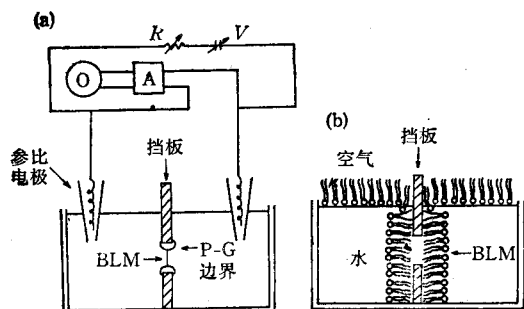


图 1 研究 BLM 电性质的实验装置

(a) 由 P-G 边界支撑的 BLM 常规装置; (b) 用 Takagi 等改进的 LB 技术制成的 BLM

根据研究者的不同目的, 可以配制许多种制备 BLM 的脂质溶液。有三种容易配制的脂质溶液如下: 第一种是 1% 卵磷脂十二烷溶液; 第二种是 4% 氧化胆固醇的正辛烷溶液; 第三种是 0.1ml 单油酸甘油酯 (GMO) 或双油酸甘油酯 (GDO) 溶于 10ml 角鲨烯的溶液。类似地, 还有卵磷脂和石蜡油(医用润滑油)可以分别代替 GDO 和角鲨烯。用第三种溶液制成的 BLMs 已知是“无溶剂”的, C_m (膜电容) = $0.78 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, t_m (单分子层厚度) = 2.5 nm [3]。

1.3 BLM 的形成

直径达 10mm 的 BLMs 能够用多种方法形成。图 1a 表示: 在两室充满水溶液 (如 0.1 mol/L KCl) 将 1 滴生成 BLM 的溶液覆盖在小孔上, 在适当的条件下, 液滴将会自动变薄形成“黑”膜或 BLM。如果变薄过程太慢, 可施加一脉冲电压 (50—100V) 诱导“黑洞”的形成。图 1b 表示的第二种方法是基于 Tagaki 等引入的 LB 技术, 带有小孔 (1mm 或更小) 的聚四氟乙烯隔板把小池分为两室, 在池中的空气/水界面上, 首先形成单分子层。通过降低或升高溶液液面, 就可以形成 BLM [3]。

1.4 电学性质测量

BLM/溶液界面是不均匀的, 由于电荷转移、分离和/或氧化还原反应, 界面通常是带电的。BLM/溶液界面上的电荷形成电场, 这些电场极大地影响了离子、电子、空穴运动和氧化还原的形式 [4]。BLM 的电性质很容易用一对置

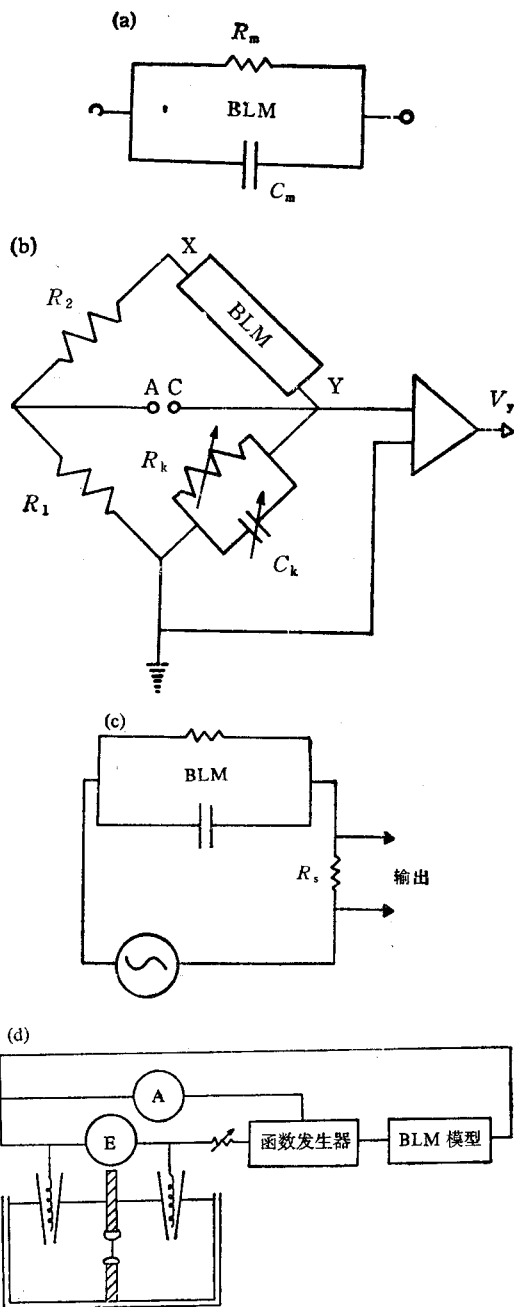


图 2 测量膜电学性能的 BLM 等效电路

(a) BLM 的等效电路 (R_m = 膜电阻, C_m = 膜电容); (b), (c) 膜电容测量电路; (d) 整个装置的框图

于溶液中的 Ag/AgCl 或甘汞电极测出, 这些电性质包括膜电位 (E_m), 膜电阻 (R_m), 膜电流 (I_m), 膜电容 (C_m), 击穿电位 (V_b), 以及 I/V 曲线 (伏安图)。要测量 C_m , 可以应用直流脉冲技术或交流分流方法 (如 RLC 电桥)。

在直流技术中,给串联的 BLM 和一个已知电阻 (R_1) 设置一电位差,并且 R_1 两端的电压可以用示波器监测。在交流电桥方法中,如图 2 所示, C_m 可以用下式计算,

$$C_m = (R_1/R_2)C_k$$

R_1 , R_2 分别为 $1k\Omega$ 和 $100k\Omega$, C_k 是平衡值。在平衡时接点 X 处于虚接地,以便在接点 Y 用放大器测量越过 BLM 出现的交流信号。此外,用脉冲响应分析仪,通过电荷注入技术也可以测量 C_m ^[7]。

2 关于器件应用的实验

在化学/生物传感器领域,平板 BLMs 可望应用于医学、工业,以及临床实验室^[8]。

2.1 离子选择性 BLM

已经发现掺有 2,4-二硝基苯酚 (DNP) 的 BLMs 对 H^+ 敏感, DNP 分子起了 H^+ 载体的作用。在 $pH < 8$ 时,由叶绿体提取物构成的 BLMs 也对 H^+ 具有高度的选择性。并且 pH 在 4—7 的范围内,随 $[H^+]$ 变化而变化的电位差服从 Nernst 方程。多肽抗菌素,如缬氨霉素、恩酮孢菌素、短杆菌肽等等,在浓度为 10^{-6} mol/L 时,都能选择 H^+ 以外的离子,结果将 BLM 的电阻减少 10^4 — 10^8 倍。此外,相对其它离子而言,嵌入抗菌素的 BLMs 对 K^+ 表现出专一性。浓度为 3×10^{-11} mol/L 时,在检测限度内,Thompson 等^[9]找出了缬氨霉素浓度和膜的导电性之间的相互关系。另外一个例子是含碘的 BLMs 对 I^- 是专一的^[9]。显然,照此方法许多化合物都能嵌入 BLMs 中,使它们有助于电化学/生物传感器的发展。用 BLMs 作为测量受体活性和药物反应的敏感元件有:玉米植物激素受体、缬氨霉素、根皮素和刀豆球蛋白。BLM 的强度可以用微孔聚碳酸酯薄膜改进(如 nuclepore 膜),嵌入微孔薄膜中的膜表现出转向和负电阻现象^[10]。由合成脂质形成的,并沉积在石英振荡器上的 BLM 作为化学受体也曾报道过^[11]。Kurihara 等^[12]曾用 BLM 研究了味觉和嗅觉的转导作用机理。目前,普遍用膜片钳 (patch-clamp) 技术来研究膜的单

离子通道性质^[13]。有人提出:单离子通道的功能(如它们的各种适应性)可以在生物传感器的发展方面得到应用^[14]。

2.2 BLM 免疫传感器

1966 年, del Castillo 及其同事首次提出:在免疫细胞溶解中, BLM 能够代替生物膜。其基本原理是:任何发生在 BLM 上的免疫反应都将改变其电性质,这是可以检测的电信号。显然,伏安测量法免疫分析的发展首先需要 BLM 传感器,而且传感器应该是专一的、灵敏的和稳定的。在这方面,应该提到 BLM 电化学/生物传感器也可能用于癌症的研究^[15]。

2.3 BLM 双极电极

未修饰的 BLMs 是极好的绝缘体。通过掺入分子碘或 π 电子多的配合物 (TCNQ: 四氰基奎诺二甲烷; TTF: 四硫富瓦烯) 进行适当的修饰, BLMs 就表现出双极氧化还原电极行为^[3]。BLM 的电阻率很大,但能被碘或碘化物极大地减小。如象已经提到的,将碘掺入生成 BLM 的溶液中,就能将 BLM 制成选择碘化物的电极。目前,已经发现电流不是由于 I^- 跨 BLM 运动产生的,而是由于电子的跨膜运动^[9]。用 TCNQ (或 TTF) 修饰的 BLMs,氧化发生在面对负极的膜的一侧,还原发生在正极的一侧。电子的横向运动通过了膜; BLM 实际上起着双极氧化还原电极的作用^[1]。在这方面,涂有 BLM 的半导体同样表现出一些有趣的性质^[16]。

2.4 持久的 BLM

为了器件的开发和应用,通过吡咯的聚合制成了持久的 BLMs^[17]。聚吡咯-BLM 能显著抵抗机械振动,有持久的稳定性。经测量膜的击穿电压,确定了吡咯 BLM 的耐电强度在 6×10^5 V/cm 以上,与普通的卵磷脂相比,大约是它的三倍。在外加电压为 ± 356 mV 时,吡咯-BLM 的循环伏安图呈现出两个对称的电流峰,这与所报道的涂有聚吡咯的金电极的循环伏安图一致。

2.5 光电 BLMs

在过去十年中,光敏 BLMs 在许多领域得

到了应用^[3]。研究光敏 BLMs 获得了更多的用于光传导的实用体系^[18]。关于器件的应用,将介绍我们的最新研究^[19]。

用掺有 Mg-酞菁染料或四苯基卟啉(TPP)以及胶体 AgBr 的卵磷脂溶液制成 BLMs,观察到具有显著的光电效应。光电/时间曲线依赖于溶液中氧化还原化合物的类型[电子供体:如抗坏血酸和 EDTA;电子受体:如 MV^{2+} (甲基紫精)和 Fe^{3+}],以及 BLM 中的光敏剂。已经研究过各种组合的光敏剂和氧化还原剂的光电/时间曲线。脂质双层相中的 Mg-TPP,光敏染料(孔雀绿和结晶紫),以及水溶液中的氧化还原剂(EDTA 和 MV^{2+})相混合时,产生了最大的光电响应。然而,当这些物质中只有一种单独存在于体系中时,就没有光电响应。此外,实验还证明,对于染料修饰的 BLMs,跨膜电场使双层压缩,使膜的面积增大。受电场影响的这两个特性与 BLM 的电容有关,同时依赖于跨膜电压,也与 BLM 两边的表面电势不同有关^[2]。因此,染料修饰的 BLMs (PBLMs)的电容也应该对光电变化敏感。PBLMs 模型考虑到了光导致所有基本电性质(E_m , R_m 和 C_m)的改变,这不仅在理论上是有益的,而且在生物分子电子器件(BED)的基础研究中,也能促进 BLMs 的实验向应用方向发展。我们用热致液晶,如 4,4'-正己基氰基联苯(6CB)、4,4'-正辛基氰基联苯(8CB),或胆甾醇油酸酯(Choc)和作为光敏剂的 TCNQ 一起制成 BLMs,与通常的 BLMs 相比,这种 BLM 的电容被提高了 5 倍。

3 展 望

为了探测生物环境,我们认为敏感元件应与生物相容并类似于生物膜。用 BLM 开发新型的电化学/生物传感器具有很大的潜力。为了说明我们的研制方法,举例如下:在免疫化学反应中,将需要检测的、和抗体(Ab)相对应的抗原(Ag)嵌入 BLM 中,这种修饰的 BLM 就成为 Ab 专一的敏感元件。根据 Ag 和 Ab 间的相互作用,希望 BLM 的某些电性质会有变

化。用现有的技术,很容易测量 BLM 的电性质,如 E_m , C_m , R_m , V_m , 以及其它一些参数。用电学方法,检测的灵敏度可达 10^{-9} mol/L,或者更高。BLMs 生物传感器一旦研制成功,将会很便宜并且易于测量。

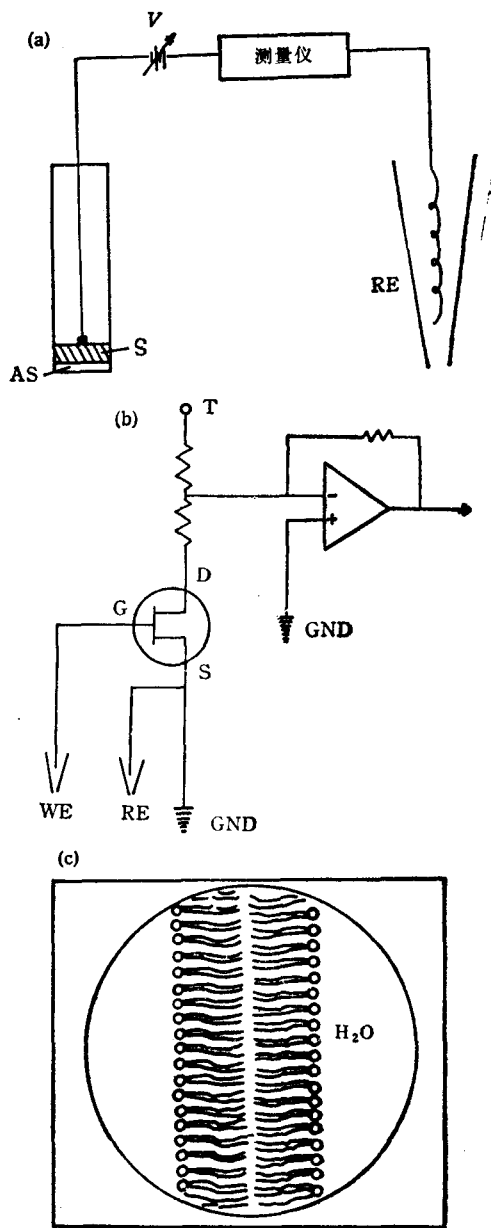


图 3 BLM 器件的设计图

(a) 基本实验装置, V 为电源, S 为基底, AS 为水溶液, RE 为参考电极; (b) 与场效应晶体管有关的 BLM 传感器模型,从 WE(工作电极)输入到 G(栅极)上, D 为漏极(沟), S 为源极, RE 为参考电极, T 为电源端; (c) BLM 的放大图(图 3a 中 S 和 AS 间界面放大图),表示不对称接触, S 为基底

然而,为了制作生物传感器,用通常方法制成的 BLM 存在许多问题,最突出的是 BLM 极易碎裂。这种缺点极大地限制了它作为实际器件的可用性。我们克服这种易碎性的方法,是在光滑的基片或新切开的金属表面上形成 BLMs。这些 BLMs 的电性质和由常规方法制成的 BLMs 的电性质是一致的。

文献[20]报道:在传感器的研制中,已经把场效应晶体管(FET)和脂质层联系起来。一般来说,FET 携带电流(“空穴”或正电荷)穿过硅片基底,从“源”到“沟”。由于场改变了载流子的分布,在置于源和沟之间并与基底绝缘的第三极(所谓的“栅极”)上施加一电压,可以改变电荷的流动。如果用灵敏 BLM(或等效 BLM)代替栅极,由膜中载体引起的电荷累积可能造成电压变化,这也将改变电流,可见电流和载体浓度成正比,因此可以定量描述电流的变化。图 3 说明了我们研制 BLM/FET 器件的一种方法,也表示了验证我们想法的一种简单装置。BLM 电化学器件的核心应该是一种修饰的脂质双层。对于信号的产生和传导,BLM 的电性质是很容易测量的。一些修饰的 BLMs 具有光敏性,因此一系列光谱技术可以和电学测量相结合。

4 结 论

把合成的有机金属(TCNQ, TTF)、磨碎的半导体微粒(CdSe, AgBr)及光敏染料(TPP、亚甲蓝)嵌入 BLM 时,它们给 BLMs 赋予了非线性电子特性,其中一些 BLM 还表现出光敏性。涂在 BLM 表面上的金属和(或)半导体能够作为电极,直接与膜接触。总之,(1) BLM 的形成是一自组装过程。(2)在结构和功能方面,BLMs 具有某些生物膜的特性。(3) BLM 是一种超微结构,其厚度不足 6nm,

呈封闭的液晶结构。(4) BLMs 中的电子和光电过程都已得到解释。(5) BLM 的有限空间可能表现出量子现象。

为了实现这些目的,各学科间的协作是必须的。本文的目的就在于此。

参 考 文 献

- 1 Tien H T. *Bilayer Lipid Membrane (BLM): Theory and Practice*. New York: Marcel Dekker Inc, 1974
- 2 Burton R M *et al.* *J Am Oil Chemists' Soc*, 1968; 45: 201
- 3 Ivanov I *et al.* *Thin Liquid Film*. New York: Marcel Dekker Inc, 1988
- 4 Mittal K L *et al.* *Surfactants in Solution*. New York: Plenum, 1988
- 5 White S H. *Biophys J*, 1978; 23: 337
- 6 Blank M *et al.* *Electrical Double Layers in Biology*. New York: Plenum Press, 1986: 129—166
- 7 Taylor D M, MacDonald A G. *J. Phys D: Appl Phys*, 1937; 28: 1277
- 8 Thompson M, Krull U J, Bendell-Young L I. in: Seiyama T *et al.* eds, *Proc Int'l meeting on chemical sensors*, New York and Tokyo: Elsevier-Kodansha, 1983: 576—581
- 9 Kryszinski P, Tien H T. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1988; 19: 227
- 10 Yoshikawa K, Omochi T, Fujimoto T *et al.* *J Coll Int Sci*, 1986; 113: 585
- 11 Okahata Y, Ebato H, Taguchi K *et al.* *Ann Meets Chem Soc Jap*, 1987; 26
- 12 Laden R W, Yu R K, *Methads in Enzymol*, 1983, 83: *Solid State Sensors*, Tokyo, 1987: 569
- 13 Vassilev P M, Tien H T. in: Harris J R *et al.* eds, *Subcellular Biochemistry*, New York: Plenum, 1988; 14
- 14 Cunnane V J, Schiffri D J, Fleischman M *et al.* *J Elec Chem*, 1988; 243(2): 455
- 15 Vassilev P M *et al.* *Cancer Research*, 1987; 47: 519
- 16 Kutnik J, Tien H T. *Photochem Photobiol*, 1987; 46: 1009
- 17 Kotowski J, Janas T, Tien H T. *Electroanal Chem*, 1988; 19: 277, 283
- 18 Worthy W. *Chem Eng News*, 1988; 66: 32
- 19 Salamon Z, Tien H. T. *Mol Cryst Liq Cryst*, 1988; 154: 195
- 20 Kell D B. in: Turner A P F *et al.* eds, *Biosensor fundamentals and applications*, Oxford: Oxford Press, 1987: 427