

技术与方法

场效应晶体管型赖氨酸传感器的研究

俞 宝 明 李 幼 荣

汪 正 孝

(江苏农学院基础课部, 扬州 225001)

(中国科学院半导体研究所, 北京 100083)

提 要

用自行研制的 SOS 型氢离子敏场效应晶体管, 结合聚乙烯醇膜和赖氨酸脱羧酶膜, 研制成场效应晶体管型赖氨酸传感器, 其线性响应范围为: 0.02%—0.10%, 响应灵敏度 75 ± 3 mV, 响应时间约 2 min. 传感器寿命达 60 d, 在 pH 6.2 的磷酸盐缓冲液中(含 10^{-3} mol/L 磷酸吡哆醛), 37°C 时器件性能最优, 同时还考察了硅烷化及膜厚对器件性能的影响. 用该传感器初步检测强化赖氨酸饮料的含量, 结果与经典的茚三酮显色法基本一致.

关键词 赖氨酸, 酶场效应晶体管, 赖氨酸脱羧酶, 生物传感器

生物传感器的研究及应用已受到国内外学者的普遍重视^[1,2], 酶场效应传感器(酶 FET)是近年来发展起来的一类半导体技术与生物技术相结合的新型器件. 酶 FET 与传统的酶电极相比, 具有体积小、响应快、输出阻抗低及易于集成化智能化等特点. 酶 FET 的基本结构是由氢离子敏场效应晶体管 (pH-ISFET) 及涂覆于栅敏感区上的固定化酶膜组合而成. 目前, 国内外已研制出尿素、葡萄糖、青霉素、乙酰胆碱等酶 FET^[3,4]. 我们应用自行研制的 SOS 型(蓝宝石上外延硅) pH-ISFET^[5] 结合聚乙烯醇(PVA)膜和赖氨酸脱羧酶膜, 研制成 FET 型赖氨酸传感器, 并研究了 pH 值、温度等条件对器件性能的影响. 该器件国内外文献均未见报道.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

BI-88 型生物离子敏 FET 测试仪(中国科学院半导体研究所), Orion SA 720 智能酸度计(美国 Orion 公司), 76-1 型恒温水浴(上海

标本模型厂), SOS 型 pH-ISFET (自制)^[5], CHJ-1 型恒温磁力搅拌器(江苏金坛环保仪器厂). 赖氨酸脱羧酶(Bacterium Cadaveris AS 1.1009 之丙酮粉末, 上海天厨味精厂提供), 磷酸吡哆醛 (Sigma 公司), PVA (日本进口分装), L-赖氨酸(生化试剂, 上海康达氨基酸厂), 戊二醛(生化试剂, 国产分装), 牛血清白蛋白(电泳单点纯, 上海长阳生化制药厂). 其余试剂均为国产分析纯, 所用水为二次重蒸水.

1.2 器件的制作

pH-ISFET 是构成酶 FET 的基础元件, 其性能好坏对酶 FET 有决定性影响, 我们采用自行研制的具有高稳定性的新型 SOS 型 pH-ISFET, 如图 1 所示. 为了使酶膜与栅极表面结合牢固可先将场效应管的栅极浸入 10% pH 为 7.0 的 γ -氨基异丙基三乙氧基硅烷水溶液中, 在 50°C 下反应 2 h, 然后用水洗晾干. 在管 1 和管 2 的栅敏感区上分别滴 2 μ l 10% PVA 水溶液, 室温下放置 20 min. 赖氨酸脱羧酶、牛

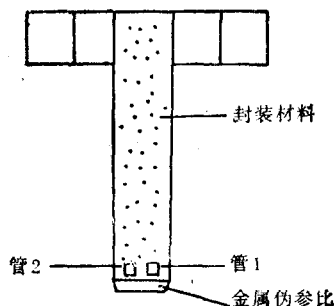


图1 pH-ISFET 示意图

血清白蛋白和戊二醛以适当的比例配制于 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.2)中,在管 1 的栅敏感区上涂 2 μ l 含酶溶液,在管 2 的栅敏感区上涂 2 μ l 只含牛血清白蛋白和戊二醛的溶液,室温下放置 45 min,去离子水浸 15 min, 0.1 mol/L 甘氨酸水溶液中浸泡 15 min,然后再在去离子水中浸泡 15 min,保存于含有 1×10^{-4} mol/L NaN_3 , 1×10^{-3} mol/L 磷酸吡哆醛之 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.2) 中备用。

1.3 实验装置

本文采用的实验装置如图 2 所示。反应介质为含有 1×10^{-4} mol/L 磷酸吡哆醛之 0.025 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.2),反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。测量时采用双管差分电路。

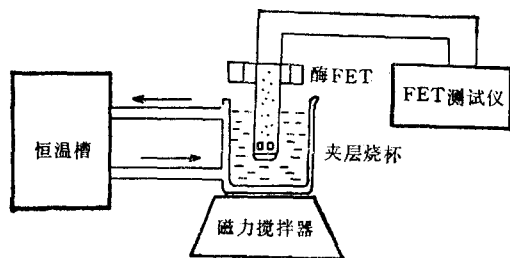


图2 测试装置图

2 结果与讨论

2.1 响应灵敏度及线性范围

应用上述实验装置和反应条件,对不同浓度的赖氨酸溶液进行了检测。先将酶 FET 清洗至空白电位,然后测试标准赖氨酸溶液的差动输出电位,其稳态电位与浓度关系见图 3。由图 3 可看出,该器件的线性响应范围为: 0.02 %

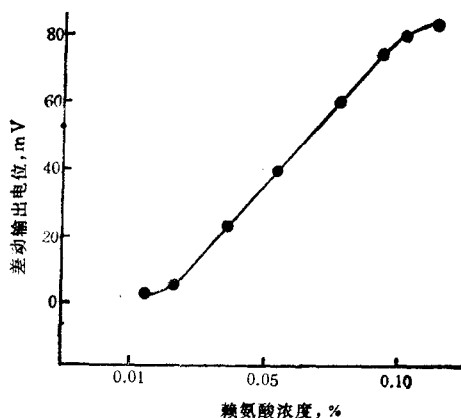


图3 酶 FET 响应曲线

—0.10%,响应灵敏度为 73 ± 3 mV。

该器件的响应时间约 2 min,这比其它酶 FET 的响应时间要长一些,这可能与采用 PVA 膜与酶膜结合的双膜方法有关。

2.2 酶 FET 的使用稳定性和保存稳定性

为了检验该酶 FET 的使用稳定性,在 60 d 内连续进行了 60 次以上的测定,在测定的间歇时间,酶 FET 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中存放。图 4 为该酶 FET 对 0.1% 和 0.05% 两种浓度的赖氨酸溶液连续测定 60 d 的结果。由图 4 可看出,酶 FET 的最初使用性能呈上升趋势,使用数次后性能趋于稳定,这可能是由于一开始生物膜中的某些离子通道尚未打通;使用 40 d 左右性能开始下降,这是由于部分酶在使用过程中失活及部分酶流失的缘故。使用约 60 d 后,活性下降到 70% 左右。

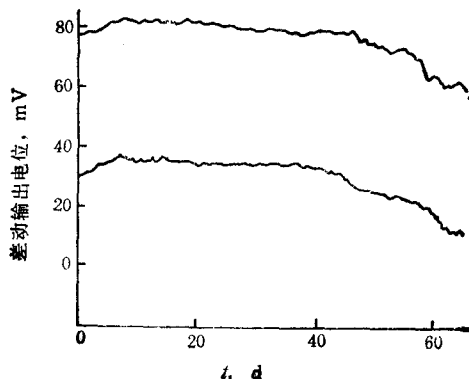


图4 酶 FET 使用稳定性

2.3 温度对酶 FET 性能的影响

在 pH 6.2 的磷酸缓冲液中,分别测定不同温度下器件的响应性能,结果见表 1。由表 1 可见在 37℃时,酶 FET 响应性能最优。

表 1 温度对酶 FET 的影响

温度 °C	30	34	37	41	44
响应范围 %	0.05—0.10	0.02—0.10	0.02—0.10	0.02—0.10	0.05—0.10
灵敏度 mV	54	70	75	50	22
响应时间 min	4	2.5	2	2	1

2.4 pH 对器件响应性能的影响

在 37℃ 的恒温槽中,采用不同 pH 值的 0.025 mol/L 的磷酸缓冲液,分别测定器件的响应性能,结果见表 2。由表 2 可见,当采用 pH 6.2 的缓冲液时,器件响应性能较优。

表 2 pH 对器件响应性能的影响

pH 值	5.4	5.8	6.2	6.6	7.0
响应范围 %	0.05—0.10	0.02—0.10	0.02—0.10	0.05—0.10	0.05—0.10
灵敏度 mV	67	70	75	62	43
响应时间 min	4.5	3	2	2	2.5

2.5 酶 FET 对辅酶的需要

磷酸吡哆醛是氨基酸脱羧酶的辅助因子,为了检验酶 FET 对它的需要情况,在反应系统中不加磷酸吡哆醛的条件下,对 0.05% 的赖氨酸进行了连续测定,结果见图 5。随测定次数的增加,酶 FET 的性能逐渐下降,估计在没有磷酸吡哆醛存在时,部分酶失活;添加磷酸吡哆醛,响应逐渐恢复,但不能回升至原来水平,因为磷酸吡哆醛不仅和酶的催化活性有关,它

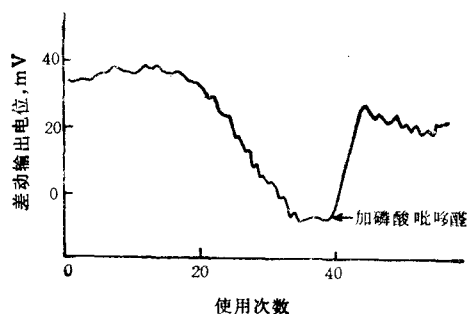


图 5 酶 FET 对辅酶的需要

和酶蛋白结合也可能有助于酶活性结构的稳定^[6]。

2.6 其它影响

PVA 的量对酶 FET 性能有影响, PVA 量太多,响应时间延长,同时灵敏度亦降低, PVA 的量太少,灵敏度较低,一般以 2 μ l 10% PVA 为宜。

硅烷化对器件性能亦有较大的影响。我们发现,未经硅烷化的膜易脱落,同时输出信号亦不稳定。

2.7 应用

将强化赖氨酸饮料通 N_2 10min,用酶 FET 测定其赖氨酸含量 3 次,平均为 0.11%,用茚三酮显色法测定结果为 0.12%,两者结果基本一致。但传感器法快速、简便、选择性好。

参 考 文 献

- 1 Janata J. *Anal Chem*, 1990; 62:33
- 2 谢云,黄德培,南轸. 传感技术学报, 1988;1(2): 53
- 3 俞宝明,陈文飞,汪正孝. 传感技术学报, 1991;4(1): 58
- 4 Miyahara Y, Moriizumi T. *Sensors and Actuators*, 1985; 16(7):1
- 5 汪正孝. 化学传感器, 1988;8(4): 40
- 6 Guilbault G G. *Handbook of enzymatic methods of analysis*. New York: Pergamon Press, 1976:216