

УДК 621.315

СЕНСОРЫ НА СТРУКТУРАХ ЭЛЕКТРОЛИТ–ДИЭЛЕКТРИК–ПОЛУПРОВОДНИК, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТАМИ

М. ТУРЕК^{1,2}, М. КОЙСГЕН³, А. ПОГОСЯН^{1,2},
А. МУЛЧАНДАНИ⁴, Дж. ВАНГ⁵, М.Дж. ШИННГ^{1,2}

¹Институт нано- и биотехнологий (ИНБ),

Аахенский университет прикладных наук, Юлих, Германия

² Институт био- и наносистем (ИБН-2), Исследовательский центр Юлих, Германия

³ Институт фармацевтической химии, Университет Филиппс, Марбург, Германия

⁴ Инженерный отдел химии и охраны окружающей среды,

Университет Риверсайд, Калифорния, США

⁵ Центр биоэлектроники и биосенсоров, Университет штата Аризона, Темпе, США

(Поступила в редакцию 24 октября 2007 г.)

Реализованы полевые емкостные ферментные биосенсоры для детектирования пенициллина, фосфорорганических пестицидов, цистеин-сульфоксид аллиина и цианида. Биосенсоры получены путем иммобилизации соответствующих ферментов (пенициллиназы, фосфорорганической гидролазы, аллииназы и цианидазы) на поверхность элемента рН-чувствительной структуры ЭДП (электролит–диэлектрик–полупроводник). Принцип действия таких биосенсоров основан на детектировании изменения локального рН в результате той или иной каталитической реакции фермента. В качестве рН-чувствительных датчиков использовались тонкие пленки Ta₂O₅, Si₃N₄ или Al₂O₃. Для каждого типа ферментных биосенсоров оптимизировался состав и рН буферного раствора с целью получения высокой чувствительности, большого интервала линейного измерения и низкого предела детектирования. Дана сводка основных характеристик разработанных ферментных биосенсоров.

1. Введение

В последние годы сенсоры на полупроводниковых устройствах в сочетании с биологическими компонентами привлекают большое внимание как для исследований, так и для возможных промышленных применений (см., например, последние обзоры [1-4] и литературу в них). Это обусловлено их хорошими электрохимическими свойствами, возможностью миниатюризации и низкими расходами производства по сравнению с

комплексными методами обычного инструментального анализа. Применения подобных биохимических сенсоров весьма разнообразны: от мониторинга окружающей среды, биомедицинских и биотехнологических применений до анализа пищевых продуктов и лекарств. Благодаря особой способности связывания, а также каталитической активности ферменты часто используются в качестве элементов биологического распознавания для высокоселективного аналитического детектирования. Ферменты являются протеинами с каталитическим действием; они понижают энергетический порог, при котором данная реакция имеет место.

Настоящая работа подытоживает последние разработки и исследования в области ферментно-модифицированных полевых емкостных ЭДП-сенсоров. В отличие от хорошо известных ферментно-модифицированных полевых транзисторов [1-4], ЭДП-сенсоры более просто устроены, легче изготавливаются и обходятся дешевле (фотолитографические процессы обычно не требуются) и могут быть сравнительно легче защищены от действия раствора электролита посредством уплотнителей, позволяя таким образом обходиться без сложных процессов инкапсуляции.

В работе приводятся основные характеристики разработанных ферментно-модифицированных ЭДП-сенсоров для детектирования антибиотика пенициллина [4-7], фосфорорганических пестицидов (параоксан, паратион, диазинон и дихлорфос) [4,8-11], цистеин-сульфоксидного аллиина [4,12] и цианида [4,11,13,14] с использованием, соответственно, ферментов пенициллиназы, фосфорорганической гидролазы, аллииназы и цианидазы. Особенно большой коммерческий интерес представляют последние два типа сенсоров, которые могут применяться для контроля содержания цианидов (например, в металлодобывающей и штамповочной промышленности), остротоксичных для животных и человека, и аллиинов, количество которых определяет качество растительных препаратов, содержащих чеснок и известных как антидиабетические, антиатеросклеротические и понижающие холестерин средства.

2. Принцип действия ферментно-модифицированного ЭДП-сенсора

Простейший полевой ферментный биосенсор основан на структуре ЭДП, являющейся (био)химически чувствительной емкостью. Ферментно-модифицированный сенсор строится обычно на иммобилизации фермента на диэлектрическом элементе структуры ЭДП. В общем случае действие такого сенсора можно объяснить следующим образом [1]: в процессе реакции фермента со своей подложкой либо образуются продукты реакции, либо расходуются реагенты. Это изменение концентраций может быть измерено полевым датчиком. В наших исследованиях ферментные биосенсоры сделаны на pH-чувствительных ЭДП-структурах, которые регистрируют изменения локального pH в результате ферментной реакции. В качестве примера приведем ферментную реакцию, происходящую при детектировании пенициллина:



Фермент пенициллиназы катализирует гидролиз пенициллина с образованием пенициллиновой кислоты, приводящей к изменению локального pH вблизи области элемента ЭДП-структуры. Это изменение является сигналом биосенсора: чем выше концентрация пенициллина в тестируемом образце, тем больше изменение pH.

3. Эксперимент

Нами получены полевые емкостные ферментные биосенсоры для детектирования пенициллина, фосфорорганических пестицидов, цистеин-сульфоксид аллиина и цианида. Биосенсоры получены путем иммобилизации соответствующих ферментов (пенициллиназы, фосфорорганической гидролазы, аллииназы и цианидазы) на поверхность элемента pH-чувствительной структуры ЭДП. Рис.1 схематически показывает сечение слоистой структуры ферментно-модифицированного ЭДП-сенсора и экспериментальную установку, использованную для измерения характеристик сенсора. В качестве датчиков использовались тонкие пленки Ta_2O_5 , Si_3N_4 или Al_2O_3 . Для проведения измерений ЭДП-биосенсор монтировался в самодельную ячейку с уплотнительным кольцом, которая соединена с фронтальной стороны с электролитом и реперным электродом (обычно $Ag/AgCl$), а с тыльной стороны – с позолоченной иглой. Размеры чипа ЭДП-структуры составляли 10 мм (10 мм). Площадь контакта ЭДП-сенсора с раствором была примерно 0.5 см^2 . Для каждого типа ферментных биосенсоров оптимизировались состав и pH буферного раствора с целью получения высокой чувствительности, большого интервала линейного измерения и низкого предела детектирования [4,9,12, 14,15].

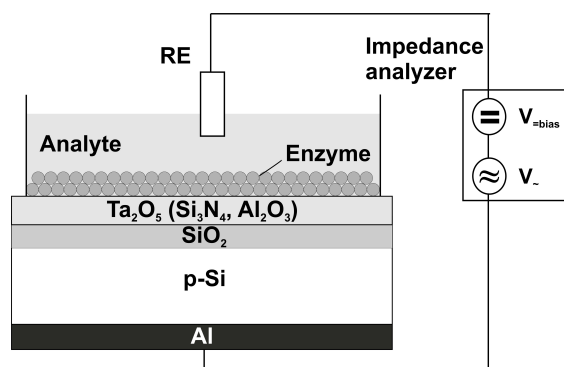


Рис.1. Схематическое изображение сечения слоистой структуры ферментно-модифицированного ЭДП-сенсора и экспериментальная установка, использованная для измерения характеристик сенсора. РЕ – реперный электрод.

Для снятия характеристик разработанных ЭДП-сенсоров использовались импедансные анализаторы (Zahner Elektrik). Применялись два основных метода измерений: метод емкость–напряжение (E–N), аналогичный известным измерениям в МОП (металл–оксид–полупроводник) конденсаторах и метод постоянной емкости (ПЕ) [1,4]. Метод ПЕ допускает исследование динамического поведения сенсора, а также изучение эффектов дрейфа и гистерезиса. Для измерений прикладывалось постоянное поляризующее напря-

жение посредством реперного электрода для установления рабочей точки (как правило, в линейной области кривой Е–Н на уровне 60% от максимальной емкости) и малое переменное напряжение (10–50 мВ) – для измерения емкости при слабых сигналах ЭДП-сенсора.

4. Результаты и обсуждение

Результаты электрохимического описания ферментно-модифицированных ЭДП-сенсоров продемонстрируем на примере биосенсора, реагирующего на пенициллин. На рис.2 приведены типичная Е–Н кривая (слева) в рабочем буфере (0.25 ммоль полимикс буфер с рН 8) и ПЕ-отклик (справа) в растворах пенициллина G различных концентраций от модифицированной пенициллиназой ЭДП-структуры. В данном эксперименте фермент пенициллиназы (ЕС 3.5.2.6., *Bacillus cereus* от Sigma, удельная активность 1650 ед/мг протеин) был адсорбционно иммобилизован на рН-чувствительный элемент Та₂О₅. Основными преимуществами метода адсорбционной иммобилизации являются простота и низкая стоимость без каких-либо потерь в активности фермента и возможности его последующей регенерации [1,15].

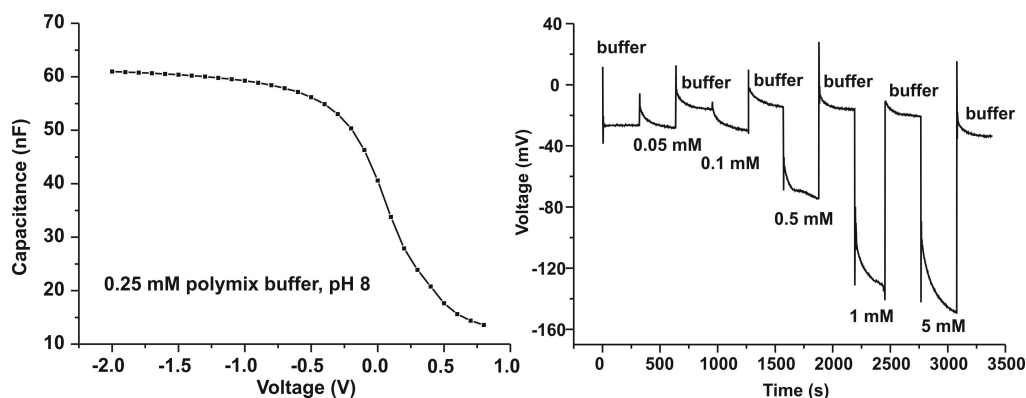


Рис.2. Типичная Е–Н кривая (слева) в рабочем буфере (0.25 ммоль полимикс буфер с рН 8) и ПЕ-отклик (справа) в растворах пенициллина G различных концентраций от модифицированной пенициллиназой ЭДП-структуры.

С увеличением концентрации пенициллина от 0.05 до 5 ммоль концентрация Н⁺-ионов, образующихся при катализе пенициллина, также возрастает. Возникающие при этом изменения поверхностного потенциала элемента, а значит, изменения напряжения на выходе сенсора коррелируют непосредственно с соответствующей концентрацией пенициллина в растворе.

Характеристики всех четырех изготовленных ферментных биосенсоров, т.е. чувствительность, линейный рабочий интервал, тип фермента, способ иммобилизации и детектируемое вещество, приведены в табл.1. Время жизни полученных ЭДП-биосенсоров –

от нескольких недель в случае сенсоров, чувствительных к цианидам [4,13,14], до примерно года для биосенсоров, чувствительных к пенициллину [1,4,15]. В случае пенициллиновых биосенсоров дополнительные эксперименты показывают также следующие свойства: адсорбция фермента на пористую структуру слоев ЭДП [1,4], позволяющая миниатюризировать сенсор, сохраняя сравнимую чувствительность и вафельное соединение ЭДП-биосенсора с микрообработанной проточной микроячейкой, имеющая преимущество работы с образцами малого объема – до 300 нл [5,6].

Табл.1. Сводка характеристик разработанных ферментно-модифицированных ЭДП-сенсоров, включающая тип фермента, способ иммобилизации и детектируемое вещество.

Детектируемое вещество	Фермент	Иммобилизация	Линейный интервал измерения	Чувствительность
Аллиин	Аллииназа	Сублимационная сушка и захват под диализную мембрану	$1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4}$ моль	~18 мВ/декада
Пенициллин	Пенициллиназа	Структурирующая; адсорбционная	0.05–2 ммоль	~130 мВ/моль
Цианид	Цианидаза	Ковалентная связь с NHS-активированной сефарозой TM и захват под диализную мембрану	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-2}$ моль	~4 мВ/декада
Фосфорорганические пестициды	Фосфорорганическая гидролаза	Адсорбционная; структурирующая (глутаральдегид); захват в нафине	10–100 μ моль	~0.29 мВ/ μ моль

5. Заключение

Мы разработали ферментно-модифицированный полевой биосенсор для детектирования пенициллина, фосфорорганических пестицидов, аллиина и цианида, используя конструктивно простую, легко изготавливаемую емкостную ЭДП-структуру. Некоторые из этих биосенсоров, например, сенсоры для регистрации пенициллина и фосфорорганических пестицидов, подробно исследованы для оптимизации их работы, другие же подобные сенсоры, детектирующие цистеин-сульфоксид аллиин либо цианид, находятся в стадии предварительного изучения и показывают осуществимость регистрации вышеуказанных веществ при помощи ферментно-модифицированных ЭДП-структур.

Авторы благодарят Федеральное министерство образования и исследований (проект "SAFE" BMBF) за финансовую поддержку, а также J.P.Kloock, T.Wagner, N.Ndther and D.Rolka за техническую поддержку и полезные обсуждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. **A.Poghossian, M.J.Schoning.** Silicon-based chemical and biological field-effect sensors, in C.A.Grimes, E.C.Dickey, M.V.Pishko (eds.), *Encyclopedia of Sensors*, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch (USA), 2006, vol.9, pp.463-534.
2. **M.J.Schoning, A.Poghossian.** **18**, 1893 (2006).
3. **M.J.Schoning, A.Poghossian.** *Analyst*, **127**, 1137 (2002).
4. **M.J.Schoning.** *Sensors*, **5**, 126 (2005).
5. **N.Nather, D.Rolka, A.Poghossian, M.Koudelka-Hep, M.J.Schoning.** *Electrochimica Acta*, **51**, 924 (2005).
6. **M.J.Schoning, N.Nather, V.Auger, A.Poghossian, M.Koudelka-Hep.** *Sens. Actuators, B*, **108**, 986 (2005).
7. **D.Rolka, A.Poghossian, M.J.Schoning.** *Sensors*, **4**, 84 (2004).
8. **M.J.Schoning, M.Arzdorf, P.Mulchandani, W.Chen, A.Mulchandani.** *Sensors*, **3**, 119 (2003).
9. **M.J.Schoning, M.Arzdorf, P.Mulchandani, W.Chen, A.Mulchandani.** *Sens. Actuators B*, **91**, 92 (2003).
10. **M.J.Schoning, R.Krause, K.Block, M.Musameh, A.Mulchandani, J.Wang.** *Sens. Actuators B*, **95**, 291 (2003).
11. **M.J.Schoning, J.P.Kloock, D.-T.Knobbe, R.Krause, W.Block, J.Wang, A.Mulchandani, M.Keusgen.** *VDI-Berichte*, **1829**, 699 (2004).
12. **M.Keusgen, M.Junger, I.Krest, M.J.Schoning.** *Sens. Actuators B*, **95**, 297 (2003).
13. **M.Keusgen, J.P.Kloock, D.-T.Knobbe, M.Junger, I.Krest, M.Goldbach, W.Klein, M.J.Schoning.** *Sens. Actuators B*, **103**, 380 (2004).
14. **M.Turek, L.Ketterer, M.Classen, H.K.Berndt, G.Elbers, P.Kruger, M.Keusgen, M.J.Schoning.** *Sensors*, **7**, 1415 (2007).
15. **A.Poghossian, M.Thust, P.Schroth, A.Steffen, H.Luth, M.J.Schoning.** *Sens. Mater.*, **13**, 207 (2001).

ENZYME-MODIFIED ELECTROLYTE-INSULATOR-SEMICONDUCTOR SENSORS

M. TUREK, M. KEUSGEN, A. POGHOSSIAN,
A. MULCHANDANI, J. WANG, M.J. SCHÖNING

Field-effect capacitive enzyme biosensors for the detection of penicillin, organophosphorous pesticides, the cysteine sulphoxide alliin, and cyanide have been realized by means of immobilization of the respective enzymes (penicillinase, organophosphorous hydrolase, alliinase and cyanidase) onto the gate surface of a pH-sensitive EIS (electrolyte-insulator-semiconductor) structure. The functional principle of these biosensors is based on the detection of a local pH change resulting from the particular catalytic reaction of the enzyme. As pH-sensitive transducer materials, thin films of Ta_2O_5 , Si_3N_4 or Al_2O_3 have been utilized. For each type of enzyme biosensor, the composition and pH value of the buffer solution have been optimized in terms of a high sensitivity, a wide linear measuring range, and a low detection limit. Basic characteristics of the developed enzyme biosensors are summarized.