DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.09.010

论著

文章编号:1000-5404(2004)09-0774-04

NH_4^+敏传感器的研制及初步应用

蒲晓允[1],李招权[1],黄 辉[1],邓 均[1],张正元[2],李 俊[2] ([1]第三军医大学医学检验系临床检验学教研室,重庆 400038;[2]中国电子科技集团第24研究所,重庆 400050)

提 要:目的 结合平面半导体技术及生物化学原理,制作NH_4^+敏感的尿素传感器,并对其检测性能进行评价。方法 采用平面半导体技术制作ISFET,在栅上固化脲酶得到NH_4^+敏尿素传感器,并在ISFET自身稳定性、传感器响应时间、检测范围及保存时间几个方面对该传感器进行评价。结果 ISFET自身性能较稳定,传感器响应时间<60 s,尿素检测范围为10~1 000 mg/L,保存7 d内该传感器检测性能较稳定。结论 NH_4^+敏感的尿素传感器有实际应用价值。

关键词:ISFET;NH_4^+;尿素;传感器

中图法分类号:R312;R318 文献标识码:A

Design of NH_4^+ sensitive urea sensor with reinforced ISFET

PU Xiao-yun[1], LI Zhao-quan[1], HUANG Hui[1], DENG Jun[1], ZHANG Zheng-yuan[2], LI Jun[2] ([1]Department of Clinical Laboratory, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Twenty-fourth Research Institute, China Electronics Technology Group Cooperation, Chongqing 400050, China)

Abstract: **Objective** To fabricate the NH_4^+ sensitive urea sensor with reinforced ion-sensitive field effect transistor (ISFET) using the plane semiconductor technique with biochemical theory, and to evaluation its detecting function. **Methods** The ISFET was obtained using the plane semiconductor technique, and then urease was solidified on the gate of ISFET. The self-stability of ISFET, the response time, the detected range, and the effect of preservation time of the sensor were tested. **Results** The stability of ISFET was fine. As for the sensor, the response time was less than 60 s; the detected range of urea was 10—1 000 mg/L; and the detecting function was stable within 7 d. **Conclusion** The urea sensor fabricated in our experiment has some practical values of application.

Key words: ion-sensitive field effect transistor; NH_4^+; urea; biosensor

基于离子敏感场效应晶体管(ion-sensitive field-effect transistor, ISFET),可以研制出ChemFETs、EnFETs、DNAFETs及ImmunoFETs等系列生物传感器[1]。与电极式传感器相比,ISFET传感器具有体积小,价格便宜,响应快和易集成等优点,这些优点使ISFET传感器有很广泛的应用前景[2]。随着微电子技术和酶技术的发展,将二者结合起来研制出的EnFETs在生物医学领域已显示出了它的优越性,并受到了人们的重视。本实验研究是将脲酶制成酶膜固化于增强型ISFET的敏感栅极上,制成对NH_4^+敏感的尿素传感器,检测底物中尿素的浓度,现对相关内容报告如下。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

脲酶(EC 3.5.1.5 Sigma 23 U/mg),牛血清白蛋白(ZLI-9026北京中山生物技术有限公司),Nafion 117 Solution(Fluka),二茂铁、戊二醛、尿素、甲醇、丙酮均为分析纯试剂,试验用水为去离子水。场效应管检测平台由电子工业部第24研究所提供。

1.2 场效应晶体管的制作

由电子工业部第24所完成。制作采用平面半导体工艺技术,用P(100)型单晶硅,经切片、磨片、抛光氧化、生长Si_3N_4膜、蚀刻、引线联接等技术过程,制成n沟道增强型具有裸露Si_3N_4栅区的离子敏场效应晶体管(平面结构见图1)。

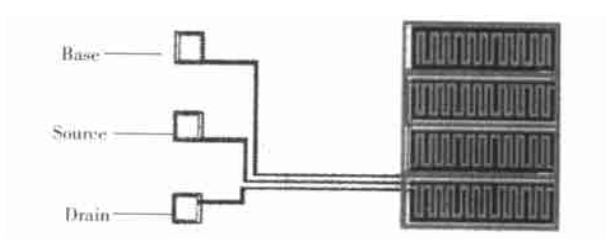


图1 ISFET芯片

Fig 1 Chip of ISFET

1.3 NH_4^+敏感膜及尿素传感器的制作

1.3.1 NH_4^+敏感膜酶液的组成及配制 NH_4^+敏感膜酶液

作者简介:蒲晓允(1963—),男,四川省南充市人,博士,副教授,主要从事医学快速检验及造血调控方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68752312

收稿日期:2003-12-24;修回日期:2004-02-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的组成包括脲酶、牛血清白蛋白及交联剂戊二醛。配制酶液时将 2.5 mg 脲酶混合 10 mg 牛血清白蛋白, 用 50 μl 去离子水溶解, 制成酶蛋白混悬液。

1.3.2　场效应晶体管的修饰　　吸取适量 5% Nafion 原液以甲醇稀释至 0.1%(修饰Ⅰ液), 称取适量二茂铁以丙酮溶解, 制成 0.05 mol/L 溶液(修饰Ⅱ液)。修饰时先取 2 μl 修饰Ⅰ液均匀涂覆于场效应晶体管栅区, 自然干燥后再取 2 μl 修饰Ⅱ液均匀涂覆于场效应晶体管栅区, 自然干燥 2 h 以上。

1.3.3　酶膜形成及固化　　取 3.1 所述酶蛋白悬液 2 μl 涂敷于经修饰的场效应晶体管栅区上, 将之连同戊二醛一起置于 37 ℃ 恒温孵箱 2 h(戊二醛熏蒸), 使脲酶通过戊二醛交联于 ISFET 的栅上, 栅表面约 2 个脲酶活性单位。NH_4^+ 敏感尿素传感器如图 2 所示。

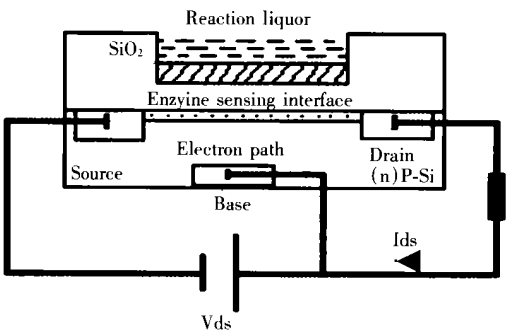


图 2　酶传感器结构

Fig 2　Structure of EnFET

1.4　检测方法

将酶传感器插入用去离子水配制成的不同浓度的尿素溶液, 以 Ag/AgCl 电极为参比电极, 在 ISFET 栅的敏感酶膜上, 漏源加载电压(Vds)为 3V, 场效应管检测平台检测漏源电流的变化量(△Ids)。漏源电流(Ids)改变与离子活度成正比, 离子活度与底物和酶的反应强度成正比, 则底物的浓度(C)则与 Ids 成正比, 此关系可用简单的对应式表达: Ids = K·C, 因此酶与底物反应信号可用 Ids 量化表达, K 为系数, 与 ISFET 的阈值电压(VT)、栅电容(CO)、沟道宽度(W)、沟道长度(L)及栅表面电子迁移率(μ)等相关[3]。因此, 反应液中底物(尿素)的浓度变化将影响漏源电流的变化量(△Ids)。

1.5　统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2　结果

2.1　空白及酶固化后场效应管 Ids 值检测

检测 5 只未经修饰的 ISFET, 其 Ids 分别为 55、57、52、49、54 mA, $\bar{x} \pm s$ = 53.4±3.05(n = 5); 固化后 Ids' 分别为 0.219、0.218、0.220、0.222、0.224 mA, $\bar{x} \pm s$ = 0.221±0.002(n = 5)。

空白场效应管一定 Ids 值的存在, 说明此时场效应管处于微导通状态, 经修饰及酶固化后 Ids 很小, 此时场效应管基本关断, 即不导通。同型管管只间 Ids 及 Ids' 值差异不大, 因此不同管只对标本检测影响较小, 稳定性较好, 这有利于标本的检测。

2.2　响应时间

采用 250 mg/L 尿素反应液测试, 将反应液滴加在敏感膜上, 场效应管检测平台动态观察 Ids 变化, 每 10 s 记录一次, 记录反应时间及 Ids 变化量(△Ids)。反应时间与 △Ids 变化曲线见图 3。

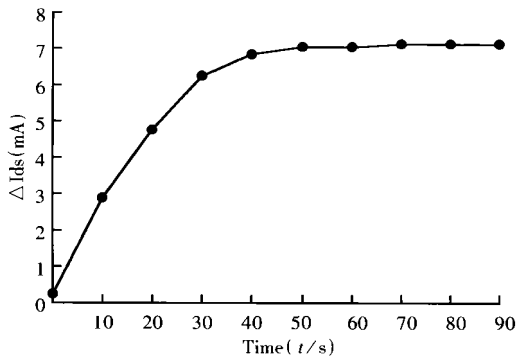


图 3　尿素浓度 250 mg/L 时反应时间与△Ids 的关系

Fig 3　Curve of time-△Ids with a 250 mg/L solution of urea

由此可见, 加样后 10 s 内即发生反应, Ids 上升, 加样后约 40 s 上升到最大值, 在 60 s 可读取一稳定的 Ids 值, 因此, 该传感器的响应时间< 60 s。

2.3　检测限度(范围)的测定

用去离子水将尿素分别配制成 0、1、10、20、50、100、200、500、1 000、1 500 mg/L 的反应液, 每个浓度点检测 5 次, 每次检测在加样后 60s 记录△Ids 值。反应液浓度与△Ids 变化曲线见图 4。

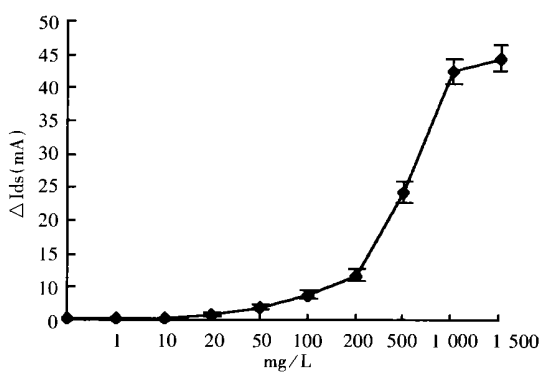


图 4　不同尿素浓度与△Ids 的关系

Fig 4　Relationship of △Ids with different concentrations of urea

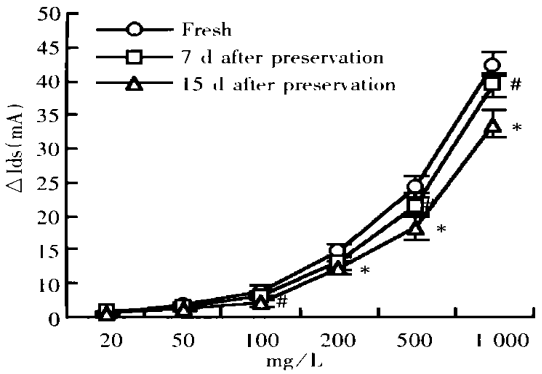
由图 4 各检测点 Ids 值与反应液浓度的关系对比, 反应液浓度在 10~1 000 mg/L, 随反应液浓度升高, △Ids 值相应上升, 并呈一定的比例关系, 但反应液浓度在 1 500 mg/L 及< 10 mg/L 时, 此比例关系不明显, 因此, 该传感器的最佳检测范围在 10~1000 mg/L。

2.4　保存时间对传感器检测性能的影响

将制作好的传感器密封干燥室温保存, 分别于保存后 3、7

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

d 检测，并与新鲜制备的传感器比较，观察保存时间对传感器检测性能的影响。检测点反应液浓度分别为 20、50、100、200、500、1 000 mg/L，每个浓度点检测 5 次，每次检测在加样后 60 s 记录 △Ids 值。结果见图 5。



#：$P<0.05$，*vs* fresh；*：$P<0.01$，*vs* fresh

图 5 保存时间与△Ids的关系

Fig 5 Relationship of △Ids and preserving time

由图 5 可知，保存一定时间后，该传感器检测△Ids 值有一定程度降低，保存 3 d 后 500 mg/L 及 1 000 mg/L 两个浓度点检测△Ids 值与新鲜制备的传感器比较 $P<0.05$，而保存 7 d 后 200、500、1 000 mg/L 3 个浓度点检测△Ids 值与新鲜制备的传感器检测值比较 $P<0.01$，在 100 mg/L 浓度点 $P<0.05$，提示保存时间对该尿素传感器的检测活性有一定影响，保存时间越长，其检测活性越低。从本实验结果看，本实验制备的尿素传感器在密闭干燥室温条件下保存 3 d 以内，基本可保持其原有检测活性。

3 讨论

1970 年荷兰人 P·Bergveld 将金属—绝缘体—半导体场效应晶体管(MOSFET)的金属栅极去掉，把绝缘体氧化物 SiO_2 直接插在 NaCl 溶液中，发现场效应管的一个参数 Ids(漏源电流)与 Na^+ 离子在 2～1 000 mol/m^3 浓度范围内呈线性关系，这种现象引起了世界各国科学家的极大兴趣，后来把这种工作电流随溶液离子浓度而变化的场效应管称为离子敏场效应晶体管(ion sensitive field effect transistor，ISFET)[4]，由于电化学与半导体技术和理论的相互渗透，以 ISFET 为基本元件研制出多种传感器，这些传感器在生物医学、环境保护、工业生产和人民生活等方面有着越来越重要的作用，因为它具有异于其他检测手段和方法的特点：微型化、微量化、集成化和响应迅速等。目前，在临床医学上利用 ISFET 制成的传感器，已可用于检测无机离子如 H^+、K^+、Na^+、Cl^-、Ca^{2+}、NH_4^+ 等[5]，有机化合物如葡糖糖、多巴胺、尿素[6,7]等，其他如抗原、抗体、微生物、细胞等许多方面[8]。但国内相关研究却相对落后，而以 ISFET 制作的生物传感器却有广泛的应用市场，加强此类研究具有重要意义。

尿素是人体蛋白质代谢的终产物，体内生成的尿素主要由肾脏排出，是肾脏排泄的低分子含氮废物的主要成分，小部分可由汗液、唾液等排出。血浆尿素浓度在一定程度上可反映肾小球滤过功能，对慢性肾脏疾病的病程、病情监控及预后判断均有意义。因此，尿素浓度的高低是了解肾功能的重要指标之一。而唾液尿素浓度与血浆尿素浓度具有良好的相关性[9]，因此检测尿素浓度可了解肾脏的功能状态。

以 ISFET 研制酶传感器主要要解决两个关键问题：一是 ISFET 自身对生物电的反应性能，这主要是半导体技术需要解决的问题；二是如何把酶化学反应与 ISFET 感应性能相结合的问题，后者核心问题即酶膜的固化。目前固化方法通常是间接固定，其中硅烷化连接法、聚乙烯亚胺法和非特异吸附性蛋白法是最常用的方法。栅表面羟基化或者巯基化，利用化学键通过戊二醛把酶交联在 FET 的栅上，但这种技术有一定的难度[10]。本实验利用 Nafion(全氟代磺酸酯)、二茂铁修饰 ISFET 栅表面，在经牛血清白蛋白通过戊二醛熏蒸把酶交联到栅表面，而 Nafion，是一种含过氟磺酸钠的高聚体，在此充当螯合剂和离子交换剂，其内部含有增水性的畴氟碳骨架和亲水性的畴磺酸基，磺酸基起离子交换作用，对阳离子有较好的选择性[11]，另外，Nafion 修饰可在传感器表面形成一层隔离膜，能够阻挡尿酸、抗坏血酸的干扰[12]。本实验使用的二茂铁在此应用是作为电子介体，传导电子的传递，同时，它作为信号放大剂，可以提高传感器的电化学行为，有放大电信号的作用，使微弱的电化学信号能够被检测到[13]。从实验过程及结果来看，初步效果还不错。我们所使用的增强型 n 沟道 ISFET 本身稳定性较好，经修饰和酶固化处理后对脲酶与尿素反应所产生的生物电信号反应敏感，在 10～1 000 mg/L 范围内呈现一定线性关系，具有良好的实际应用价值，而唾液尿素浓度正常值范围 213～291 mg/L 正在此线性范围之内，为无创检测尿素创造了条件。

参考文献：

[1] Lehmann M, Baumann W, Brischwein M, *et al*. Non-invasive measurement of cell membrane associated proton gradients by ion-sensitive field effect transistor arrays for microphysiological and bioelectronical applications [J]. Biosens Bioelectron, 2000, 15(3-4): 117—124.

[2] Munoz J, Jimenez C, Bratov A, *et al*. Photosensitive polyurethanes applied to the development of CHEMFET and ENFET devices for biomedical sensing [J]. Biosens Bioelectron, 1997, 12(7): 577—585.

[3] 张乾生. 临床医学需要 ISFET 传感器[J]. 中国医疗器械杂志，

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1997, 21(2): 107－109.
[4] Bergveld P. Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 1970, 17(1): 70－71.
[5] Lahav M, Kharitonov A B, Katz O, *et al*. Tailored chemosensors for chloroaromatic acids using molecular imprinted TiO2 thin films on ion-sensitive field-effect transistors[J]. Anal Chem, 2001, 73(3): 720－723.
[6] Torbicz W, Pijanowska D, Dawgul M, *et al*. Urea biosensors and their application in hemodialysis－perspective of EnFET application[J]. Front Med Biol Eng, 2000, 10(2): 139－145.
[7] Ito N, Saito A, Kayashima S, *et al*. Transcutaneous blood glucose monitoring system based on an ISFET glucose sensor and studies on diabetic patients[J]. Front Med Biol Eng, 1995, 6(4): 269－280.
[8] Tsuruta H, Matsui S, Hatanaka T, *et al*. Detection of the products of polymerase chain reaction by an ELISA system based on an ion sensitive field effect transistor[J]. J Immunol Methods, 1994, 176(1): 45－52.
[9] 张秀明. 现代临床生化检验学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2001. 8－11.
[10] 许　博, 朱果逸. 压电免疫质量传感器中生物大分子的固定化方法[J]. 分析化学, 1999, 27(4): 479－483.
[11] 王凤兰, 刘　艳. Nafion 膜修饰电极在分析化学中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 1998, 8(1): 52－53.
[12] Acobs A, Dahlman O. Enhancement of the quality of MALDI mass spectra of highly acidic oligosaccharides by using a nafion-coated probe[J]. Anal Chem, 2001, 73(3): 405－410.
[13] 金利通, 毛翼萍, 方禹之. 羧酸二茂铁为介体的生物传感器的研究. 华东师范大学学报[J]. 自然科学版, 1995, 18(2): 60－64.

（编辑　薛国文）

文章编号: 1000-5404(2004)09-0777-02

个案与短篇

上尿路梗阻性急性肾衰的急诊处理

Emergency management of acute renal failure caused by upper urinary tract obstruction: a report of 64 cases

李宏彬[1], 邱功阔[2], 周尤强[1], 殷　波[1], 夏　钢[1], 栗　恒[1], 赫建芳[1], 苏丽华[1]　([1] 河南信阳市中心医院泌尿外科; [2] 解放军第 154 医院泌尿外科, 信阳 464000)

1990 年 1 月至 2002 年 6 月, 我院共收治上尿路梗阻所致的急性肾功能衰竭患者 64 例, 经急诊处理, 效果满意, 现报告如下。

1　资料与方法

1.1　临床资料

本组 64 例, 男 37 例, 女 27 例, 年龄 16～77 岁, 平均 45 岁。临床症状主要有腰部酸痛、胀痛, 由少尿逐渐发展至无尿 51 例, 双侧输尿管结石患者 30 例(其中输尿管上段结石 28 例侧, 输尿管中段结石 14 例侧, 输尿管下段结石 18 例侧)。双肾脏铸形结石在外院行体外冲击波碎石术(ESWL)后形成"石街"梗阻 3 例(其中双侧输尿管"石街"形成 1 例, 左肾多发性铸形结石并肾积水, 右侧输尿管结石 2 例)。既往有肾切除手术史, 孤立肾输尿管梗阻 8 例。行子宫切除术后致术后无尿 2 例。无尿症状持续 1～9 d, 平均 3 d, 血尿素氮(BUN)16～58 mmol/L; 血清肌酐(SCr)460～2 010 μmol/L。常规行腹部平片及 B 超检查明确诊断。

1.2　治疗方法

本组 64 例, 根据急性衰竭的程度, 采取不同的治疗方法。其中急诊行血液透析治疗 24 例; 行 ESWL 治疗后解除梗阻 16 例 L 行输尿管逆行插管引流尿液成功 10 例; 行输尿管镜下气压弹道碎石成功 6 例; 开放手术一次性解除双侧输尿管梗阻 5 例; 经皮肾穿刺造瘘术 3 例。

2　结果

本组 64 例, 无 1 例死亡。梗阻解除后即进入多尿期, 术后 24 h 尿量达 2 500～5 000 ml, BUN, SCr 明显下降。由于大量利尿后细胞外液的过度丧失易造成脱水, 通常补液量为每日排出水分量的 1/3～1/2。同时大量利尿后有过多的钠离子和钾离子丧失, 可造成电解质失衡, 故按每日血电解质测定结果来决定补给氯化钠和氯化钾的量。氮质血症随之逐渐缓解, 术后 2 周肾功能恢复正常或接近正常。对于出现少尿、无尿超过 2 d, 血钾超过 6.5 mmol/L, SCr 大于 600 μmol/L, BUN 大于 28 mmol/L, 急诊行血液透析[1], 待一般情况好转后再行病因治疗。术后随访 1～6 个月, 肾功能均恢复正常。

3　讨论

上尿路梗阻引起的急性肾功能衰竭是泌尿外科常见的急症之一, 若不及时抢救治疗可以导致死亡。据病史、体征、实验室生化检查、KUB 及 B 超检查能及时作出正确诊断。由于急性肾功能衰竭, 使体内有害毒素淤积出现代谢性酸中毒, 内环境紊乱, 使急性肾功能衰竭进一步恶化。因此, 如何及时抢救生命, 挽救肾功能是急诊处理急性肾功能衰竭的关键所在。

据 1998 年欧洲透析移植年会上, 对急性肾功能衰竭尽早进行血液透析治疗的观点, 再次得到了肯定, 它能大大提高急性肾功能衰竭的救治率(94.7%以上), 降低了死亡率[2]。我院

(下转 780 页)

作者简介: 李宏彬(1965－), 男, 河南省信阳市人, 主治医师, 主要从事腔内泌尿外科方面的研究, 发表论文 10 余篇。电话: (0376) 6331518

收稿日期: 2003-06-04; 修回日期: 2003-11-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net