文章编号:1007 - 4252(2020)04 - 0004 - 311

人体挥发性气味分子实时检测的硅纳米线电子鼻开发与应用

黄宗琳[1,2],魏擅红[1,2],陈世兴[1,*],王跃林[1],李铁[1,*]
(1. 中国科学院上海微系统与信息技术研究所,上海 200050; 2. 中国科学院大学,北京 100049)

摘要: 为了分析人体挥发性气味分子(人体 VOCs)的种类和浓度变化,本研究开发了一种基于蚊子气味结合蛋白(OBPs)修饰的硅纳米线(SiNW)阵列化电子鼻,实现了人体 VOCs 的实时与高灵敏检测。当修饰在 SiNW 表面上的 OBPs 与人体 VOCs 结合时,引起了 OBPs 的构象变化,在 SiNW 表面产生电场变化,从而导致电路检测电流变化,完成了人体 VOCs 的实时检测分析。同时,通过圆二色谱技术,检测到 VOCs 和 OBPs 结合导致的蛋白构象变化,证明了构建人工电子鼻的生化可行性。本研究设计的电子鼻具有灵敏度高与选择性强的特点,最低可检测到 5ppb 人体 VOCs 分子,不同种类的 OBPs 识别人体 VOCs 具有明显的选择性,且 SiNW 阵列器件与互补金属氧化物半导体(CMOS)兼容性高,可通过自上而下的制造方法批量制备,本研究为将来开发可定制型人体气味电子鼻提供了重要的生化和器件基础。

关键词: 电子鼻; 硅纳米线; 气味结合蛋白; 挥发性气味分子
中图分类号: TN432 **文献标志码:** A

Development and application of silicon nanowire electronic nose for real-time detection of human volatile odorant molecules

HUANG Zonglin[1,2], WEI Shanhong[1,2], CHEN Shixing[1,*], WANG Yuelin[1], LI Tie[1,*]
(1. Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to analyze the type and concentration of human volatile odorant molecules (human VOCs), this study developed a silicon nanowire (SiNW) array electronic nose based on mosquito odorant binding proteins (OBPs) modified to achieve real-time and highly sensitive detection to human VOCs. The OBPs were modified on the surface of SiNW to recognise human VOCs, which caused the change of OBPs' conformation, and then the change of electric field on the SiNW surface. Finally, the device recorded all the current changes and achieved the real-time detection and analysis of human VOCs. Impor-

收稿日期: 2020-05-21; **修订日期:** 2020-06-23
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 00000000; No. 1111111); 国家重点实验室基金资助项目.
作者简介: 陈世兴,男,博士,副研究员,主要研究方向为生化传感器及系统的开发与应用(E-mail: sxchen@mail.sim.ac.cn);
李 铁,男,博士,研究员,博士生导师,上海市学术带头人,国家技术二等奖获得者,主要研究方向为微纳传感器机理、器件及应用(E-mail: tli@mail.sim.ac.cn).

tantly, through circular dichroism, the conformation changes caused by the combination of VOCs and OBPs were detected, which proved the biochemical feasibility of constructing artificial electronic nose. The electronic nose designed in this study has the characteristics of high sensitivity and selectivity. It can detect human VOCs molecules at 5ppb and different types of modified OBPs have obvious selectivity for human VOCs. SiNW array devices are highly compatible with complementary metal oxide semiconductor (CMOS) and can be prepared in batches using top-down manufacturing methods. This study develops customizable human odorant electronic noses for the future and provides an important biochemical and device foundation.

Key words: electronic nose; silicon nanowire; odorant binding protein; volatile odorant molecules

0 引言

人体不同器官来源的气味具有明显的差异性，对人体气味种类和浓度的实时及高灵敏监测具有重要意义。皮肤、呼吸道和消化道中的挥发性有机化合物(VOCs)携带大量信息，这些信息在现代医学中可应用于肺癌诊断，也可应用在传统中医的气味检查，还可在法医学中用于鉴定生物特征以及在化妆品行业开发特异香水与除臭剂[1-7]。人体释放的非芳香族化合物是由人体的生理代谢过程、病理生理过程(例如炎症或与氧化应激相关的活动)或外部因素(例如药物使用或微生物组变化)产生，因此这类 VOCs 可作为各种疾病的生物标志物[8]。理想的检测技术要实现精确的生物特征描述，不仅要检测到某些化合物的存在，而且要确定相对丰度并使每种化合物与其他同系物区分开。

目前用于人体气味检测的各种技术中，气相色谱-质谱法是具有最高精度与灵敏度的技术手段，该方法可对特定单个 VOCs 进行识别和定理，但是价格昂贵、操作费时且需要专业人员进行操作与分析[9]。电子鼻是一种人工嗅觉系统，作为一种低成本、便携且可实时检测的分析工具，已应用于空气环境质量评估，辅助医学诊断，和食品质量检测等领域[10-12]。

近年来，电子鼻的研发引起人们越来越多的兴趣。其技术是通过利用动物的组织、细胞或嗅觉受体(OR)等生物材料结合到高效的电子传感器中来模仿狗或老鼠的嗅觉[13-15]。但是基于动物组织或细胞的传感器稳定性差且对环境要求高而基于 OR 的传感器灵敏度高且选择性强[13; 16-19]。

嗜人性冈比亚按蚊(Ag)凭借其具有敏锐感知的嗅觉系统可将人与动物区分开[20]。Ag 除了其基因组中的 70 个 OR 外，还有 57 个编码气味结合蛋白(OBPs)的基因[21; 22]。OBPs 是一种高度浓缩在昆虫血淋巴中的水溶性蛋白，具有优异的热稳定性和化学稳定性，且具有极高的水溶性，不仅适合在原核表达系统中大规模生产，而且对气味具有强亲和力与特异性[23]。并且目前已有对气味反应产生不同亲和力、不同净电荷与整体偶极矩的全套 OBPs 构象[24]。OBPs 可通过门控效应达到气味检测的目的，其原理是 OBPs 的构象平衡由于某些气味的结合产生干扰导致构象改变，构象异构体的再分布引起静电状态变化，进而使相邻换能器的载流子耗尽或积累[25]。OBPs 已应用于表面声波(SAW)，石英晶体微天平(QCM)与薄膜体声谐振器(FABR)等各种检测手段中用于 TNT、食品 VOCs 与驱蚊剂等检测[16; 26-29]。因此采用 OBPs 进行电子鼻的研发具有很大优势。

在已报道的电子鼻系统中，传感材料被浸没在溶液中以保持分子完整性和生物学功能[16; 30]。尽管在液相中进行检测的电子鼻达到 nM 甚至 pM 以下的灵敏度，但是很少有设备在气相中达到 ppm 灵敏度的情况，因此急需小型化系统快速检测气相中的 VOCs[31; 32]。用作生物传感器的一维纳米功能材料硅纳米线由于其灵敏度高、选择性好以及无标记和实时检测的优点而受到广泛关注[33; 34]。

本研究开发了基于 OBPs 功能化的硅纳米线(OBPs-SiNW)阵列开发的电子鼻，核心器件 SiNW 阵列采用了新型低成本自上而下的制造技术，并且在商用 SOI(111)晶圆上完成了全部制造过程。OBPs-SiNW 器件在气相检测中，通过电信号读出的方式显示出稳定的响应，灵敏度低至 5ppb，具有极高的结构选择性。

1　构建方法

1.1　材料和试剂

VOCs 是从 TCI 化学品公司(日本东京)购买的，使用前未经进一步纯化。限制性内切酶来自新英格兰生物实验室(伊普斯维奇，马萨诸塞州，美国)。KOD 聚合酶是从丰田(中国上海)购买的。表达载体 pET28a 购自 Novagen(德国达姆施塔特)。蛋白质纯化树脂和柱购自 GE healthcare(美国宾夕法尼亚州匹兹堡)。3－氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)，乙醇胺从 Sigma Aldrich(美国密苏里州圣路易斯市)购买。其他试剂从 Sigma Aldrich(美国密苏里州圣路易斯市)或 Amresco(美国俄亥俄州梭伦市)购得。

1.2　SiNW 制造

硅纳米线阵列的制造需要先在 n 型(111) SOI 片上淀积一层氮化硅(Si_3N_4)，通过光刻与深离子反应刻蚀，将 SOI 晶圆上的顶层硅刻蚀至氧化层，形成两个相邻的矩形刻蚀腔。在 KOH 溶液中进行各向异性湿法刻蚀后，在相邻刻蚀腔之间形成 350－400nm 的硅壁。由于自限制氧化，除靠近 Si_3N_4 的硅壁中间没被氧化外，其余硅墙均被氧化。去除氧化层后，得到具有倒三角形横截面的悬浮 SiNW。最后通过离子注入工艺对源漏区进行重掺杂并在晶圆上淀积金层作电极。

1.3　OBPs 的表达与纯化

在 Genscript(南京)合成 OBP1、OBP7 和 OBP20 基因，并将其克隆到 BamHI 和 XhoI 限制性位点之间的 pET28a 载体上。用 DNA 测序法验证了 N 端多聚组氨酸标记 pET28a－OBPs 的序列并利用大肠杆菌 BL21(DE3)表达 OBPs 蛋白。OBP7 的纯化方法是对文献中的方法进行改良，改良后的方法脱脂效果更好[35]。冻干纯化后的 OBPs 并保存在－80℃以待下一步实验使用。

1.4　表面修饰

首先，氧等离子体对 SiNW 表面处理 1 h 以实现羟基修饰。通过加入 APTES 溶液，SiNW 表面生成氨基。与连接剂戊二醛反应后，在 37℃下将 OBPs (500 μg/ml，10mM PBS)滴加到 SiNW 上孵育 2 h，然后用 PBS 冲洗，从而将 OBPs 修饰到 SiNW 表面，最后用氮气吹干(图 1)。

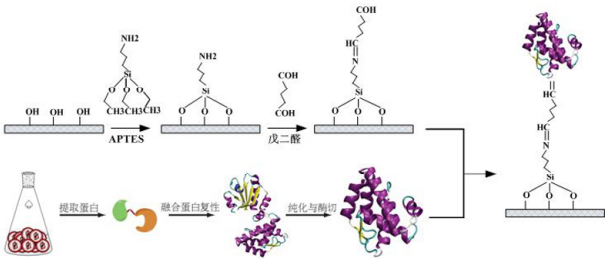

图 1　电子鼻的表面修饰过程示意图

Fig. 1 Surface modification processof bioelectronic nose

1.5　电学信号读出

如图 2 所示，为了避免环境因素对测试的影响，将修饰好的器件放于密闭的空间中，外接 Keithley 4200 半导体参数分析仪。室温下，不同浓度的 VOCs 的注入会使 Keithley 4200 实时监测电流产生变化。为了更好地比较器件，电流变化被标准化为

$$\Delta I/I_0 = (I - I_0)/I_0 \qquad (1)$$

其中，I_0 是初始电流; I 是实时测量的电流值。

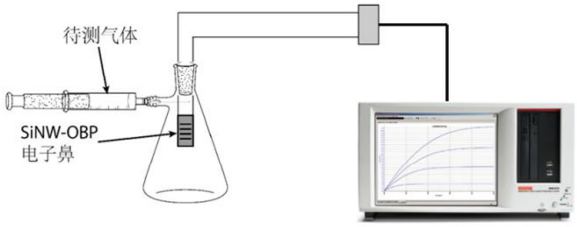

图 2　测试系统示意图

Fig. 2 Schematic diagram of test system

2　传感机理表征

电子鼻的检测信号主要是由于气味结合蛋白和气味分子结合时的构象变化导致硅纳米线载流子改变所引起的，为了表征和证实蛋白构象的变化，本文对 OBPs 与气味分子结合前后进行了圆二色谱分析。

圆二色光谱仪通过测量生物大分子的圆二色光谱从而得到生物大分子的二级结构。常应用于蛋白质折叠、蛋白质构象的研究，是研究稀溶液中蛋白质构象的快速、简单、较准确的方法[36]。

本文用 OBP7 与不同浓度乙酸反应前后的圆二

色谱分析如图 4 和表 1。由图可知，OBP7 对三种不同浓度的乙酸均产生了二级结构的变化，并且随着目标物浓度的增加，α-螺旋结构逐渐减少，证实了 OBPs 结合气味分子后会产生构象变化，说明用其构建人工电子鼻具有生化可行性。

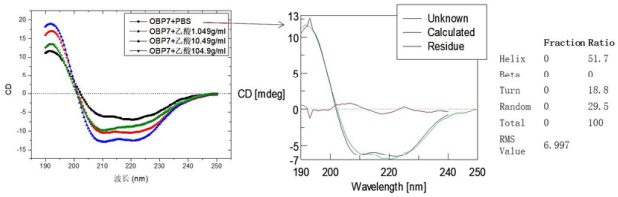

图 3 OBP7 与不同浓度乙酸反应前后的圆二色谱分析图

Fig. 3 Analysis chart of OBP7 before and after reaction with different concentrations of acetic acid

表 1 OBP7 与不同浓度乙酸反应前后的二级结构含量变化

Table1 Changes of secondary structure content of OBP7 before and after reaction with different concentrations of acetic acid

	Helix	Beta	Turn	Random	Total	RMS Value
OBP7+PBS	51.7%	0%	18.8%	29.5%	1	6.997
OBP7+乙酸 1.049g/mL	45.1%	3.2%	19.2%	32.4%	1	4.834
OBP7+乙酸 10.49g/mL	36.4%	18.9%	13.9%	31.4%	1	4.129
OBP7+乙酸 104.9g/mL	36.1%	15.5%	15.7%	32.7%	1	6.611

表 2 六种 VOCs 的序号、名称、饱和蒸汽压下的浓度

Table2 Serial number, name and concentration under saturated vapor pressure of six VOCs

编号	VOCs	饱和蒸汽压 P(Pa)	饱和浓度 C_0(ppm)
1	1 辛烯-3 醇	168.264	1661.050
2	间甲酚	9.091	89.750
3	壬酸	0.116	1.000
4	香叶基丙酮	2.093	20.660
5	乙酸	0.50×10^{-6}	4.93×10^{-6}
6	己酸	3.822	37.730

3 检测结果

3.1 不同 VOCs 的响应

生物嗅觉的传感机制是不同嗅觉受体对不同气味分子进行信息编码，电子鼻模拟这一过程，通过修饰不同气味结合蛋白(代码分别为 OBP1、OBP7、OBP20)获得对同一种气味分子的响应信号，完成对该气味分子的编码。我们依次测试了表 2 中的挥发至饱和状态的气味分子，通过对响应信号的统计，得到三种 OBPs 修饰的电子鼻对六种气体识别图谱(如图 4)。

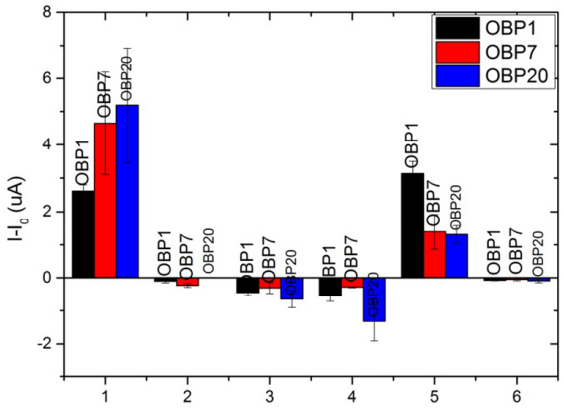

图 4 OBP1、OBP7、OBP20 修饰的传感器对六种气体的响应

Fig. 4 Response of sensors modified by OBP1, OBP7, OBP20 to six gases

3.2 极限分辨力

考虑到实际测试中对于传感器分辨能力的高性能要求，我们对基于硅纳米线阵列器件电子鼻的极限分辨能力展开研究，采用饱和壬酸蒸汽作为目标气体，在密闭测试盒中依次通入 5ppb、10ppb、15ppb

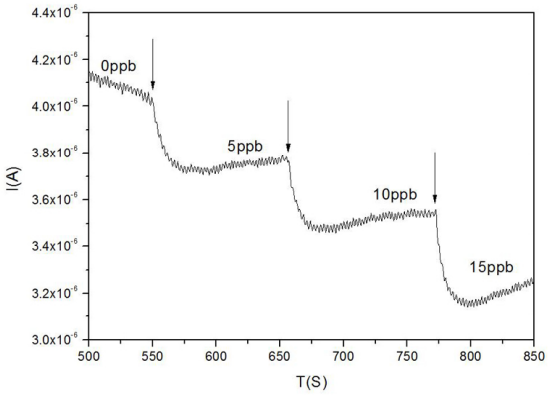

图 5 电子鼻对低浓度壬酸的响应

Fig. 5 Response of bionic olfactory sensor to low concentration nonanoic acid

浓度的壬酸。如图 5 所示，对 5ppb 的壬酸，电子鼻响应明显，响应时间约为 20s，说明电子鼻的极限分辨能力能达到 ppb 量级。

4　结论

本研究介绍了一种新型 OBPs-SiNW 阵列化电子鼻的制造过程与实际性能。SiNW 阵列可通过自上而下的制造方法批量制备，具有小型化、成本低和可与 CMOS 兼容的特性，为后续的实际应用奠定了坚实的制造基础。同时，不同类型 OBPs 与 VOCs 结合后的蛋白质构象变化可在圆二色谱仪上明显区分，证明 OBPs 用于构建人工电子鼻的生化可行性。该新型电子鼻在气相条件下达到了 ppb 量级的超高灵敏度检测，且对不同 VOCs 区分能力较强，可应用于不同环境下的 VOCs 检测，为未来开发可定制型人工电子鼻提供了重要的生化和器件基础。

参考文献:

[1] Adiguzel Y, Kulah H. Breath sensors for lung cancer diagnosis [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2015, 65: 121-138.

[2] Agapiou A, Amann A, Mochalski P, et al. Trace detection of endogenous human volatile organic compounds for search, rescue and emergency applications [J]. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2015, 66: 158-175.

[3] Capuano R, Santonico M, Pennazza G, et al. The lung cancer breath signature: a comparative analysis of exhaled breath and air sampled from inside the lungs [J]. Scientific Reports, 2015, 5.

[4] Sorokowska A, Schriever V A, Gudziol V, et al. Changes of olfactory abilities in relation to age: odor identification in more than 1400 people aged 4 to 80 years [J]. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 2015, 272(8): 1937-1944.

[5] Allen C, Cobey K D, Havlicek J, et al. The impact of artificial fragrances on the assessment of mate quality cues in body odor [J]. Evolution and Human Behavior, 2016, 37(6): 481-489.

[6] Liu Q J, Ye W W, Yu H, et al. Olfactory mucosa tissue-based biosensor: A bioelectronic nose with receptor cells in intact olfactory epithelium [J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2010, 146(2): 527-533.

[7] Statheropoulos M, Spiliopouiou C, Agapiou A. A study of volatile organic compounds evolved from the decaying human body [J]. Forensic Science International, 2005, 153(2-3): 147-155.

[8] Filipiak W, Mochalski P, Filipiak A, et al. A Compendium of Volatile Organic Compounds (VOCs) Released By Human Cell Lines [J]. Current Medicinal Chemistry, 2016, 23(20): 2112-2131.

[9] Arasaradnam R P, Covington J A, Harmston C, et al. Review article: next generation diagnostic modalities in gastroenterology - gas phase volatile compound biomarker detection [J]. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2014, 39(8): 780-789.

[10] De Vito S, Piga M, Martinotto L, et al. CO, NO2 and NOx urban pollution monitoring with on-field calibrated electronic nose by automatic bayesian regularization [J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2009, 143(1): 182-191.

[11] Saidi T, Zaim O, Moufid M, et al. Exhaled breath analysis using electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry for non-invasive diagnosis of chronic kidney disease, diabetes mellitus and healthy subjects [J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2018, 257: 178-188.

[12] Musatov V Y, Sysoev V V, Sommer M, et al. Assessment of meat freshness with metal oxide sensor microarray electronic nose: A practical approach [J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2010, 144(1): 99-103.

[13] Du L P, Wu C S, Liu Q J, et al. Recent advances in olfactory receptor-based biosensors [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 42: 570-580.

[14] Glatz R, Bailey-Hill K. Mimicking nature's noses: From receptor deorphaning to olfactory biosensing [J]. Progress in Neurobiology, 2011, 93(2): 270-296.

[15] Wasilewski T, Gebicki J, Kamysz W. Bioelectronic nose: Current status and perspectives [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2017, 87: 480-494.

[16] Lee S H, Oh E H, Park T H. Cell-based microfluidic platform for mimicking human olfactory system [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2015, 74: 554-561.

[17] Liu Q J, Cai H, Xu Y, et al. Olfactory cell-based biosensor: A first step towards a neurochip of bioelectronic nose [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2006, 22(2): 318-322.

[18] Potyrailo R, Naik R R. Bionanomaterials and Bioinspired Nanostructures for Selective Vapor Sensing [J]. Annual Review of Materials Research, Vol 43, 2013, 43: 307-334.

[19] Son M, Kim D, Ko H J, et al. A portable and multi-

plexed bioelectronic sensor using human olfactory and taste receptors [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2017, 87: 901-907.

[20] Carey A F, Wang G R, Su C Y, et al. Odorant reception in the malaria mosquito Anopheles gambiae [J]. Nature, 2010, 464(7285): 66-U77.

[21] Biessmann H, Walter M F, Dimitratos S, et al. Isolation of cDNA clones encoding putative odourant binding proteins from the antennae of the malaria-transmitting mosquito, Anopheles gambiae [J]. Insect Molecular Biology, 2002, 11(2): 123-132.

[22] Mastrobuoni G, Qiao H L, Iovinella I, et al. A Proteomic Investigation of Soluble Olfactory Proteins in Anopheles gambiae [J]. Plos One, 2013, 8(11).

[23] Brito N F, Moreira M F, Melo A C A. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception [J]. Journal of Insect Physiology, 2016, 95: 51-65.

[24] Rubenstein L A, Lanzara R G. Activation of G protein-coupled receptors entails cysteine modulation of agonist binding [J]. Journal of Molecular Structure-Theochem, 1998, 430: 57-71.

[25] Rubenstein L A, Zauhar R J, Lanzara R G. Molecular dynamics of a biophysical model for beta(2)-adrenergic and G protein-coupled receptor activation [J]. Journal of Molecular Graphics & Modelling, 2006, 25(4): 396-409.

[26] Yao Y, Lu Y L, Zhang Q, et al. Biomimetic Olfactory Sensor for Dynamically and Conveniently Monitoring Ligands Binding to Odorant-Binding Proteins with Impedance Sensing [J]. International Journal of Electrochemical Science, 2015, 10(7): 5548-5560.

[27] Di Pietrantonio F, Cannata D, Benetti M, et al. Detection of odorant molecules via surface acoustic wave biosensor array based on odorant-binding proteins [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 41: 328-334.

[28] Barou E, Sigoillot M, Bouvet M, et al. Electrochemical detection of the 2-isobuty1-3-methoxypyrazine model odorant based on odorant-binding proteins: The proof of concept [J]. Bioelectrochemistry, 2015, 101: 28-34.

[29] Manai R, Scorsone E, Rousseau L, et al. Grafting odorant binding proteins on diamond bio-MEMS [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 60: 311-317.

[30] Jin H J, Lee S H, Kim T H, et al. Nanovesicle-based bioelectronic nose platform mimicking human olfactory signal transduction [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2012, 35(1): 335-341.

[31] Park S J, Kwon O S, Lee S H, et al. Ultrasensitive Flexible Graphene Based Field-Effect Transistor (FET)-Type Bioelectronic Nose [J]. Nano Letters, 2012, 12(10): 5082-5090.

[32] Son M, Kim D, Kang J, et al. Bioelectronic Nose Using Odorant Binding Protein-Derived Peptide and Carbon Nanotube Field-Effect Transistor for the Assessment of Salmonella Contamination in Food [J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(23): 11283-11287.

[33] Gao A R, Lu N, Dai P F, et al. Silicon-Nanowire-Based CMOS-Compatible Field-Effect Transistor Nanosensors for Ultrasensitive Electrical Detection of Nucleic Acids [J]. Nano Letters, 2011, 11(9): 3974-3978.

[34] Stern E, Klemic J F, Routenberg D A, et al. Label-free immunodetection with CMOS-compatible semiconducting nanowires [J]. Nature, 2007, 445(7127): 519-522.

[35] Lagarde A, Spinelli S, Tegoni M, et al. The Crystal Structure of Odorant Binding Protein 7 from Anopheles gambiae Exhibits an Outstanding Adaptability of Its Binding Site [J]. Journal of Molecular Biology, 2011, 414(3): 401-412.

[36] Levitt M, Chothia C. Structural Patterns in Globular Proteins [J]. Nature, 1976, 261(5561): 552-558.