

H⁺-ISFET型青霉素酶传感器

钟丽婵 黎高翔

(中国科学院微生物研究所, 北京)

汪正孝 刘鲁娜

(中国科学院半导体研究所, 北京)

将SOS型H⁺-ISFET与戊二醛交联的牛血清蛋白-青霉素酶膜组合成单管输出式青霉素酶-H⁺-ISFET传感器的探头(以下简称青霉素-酶FET), 并用于测定溶液中的青霉素含量。青霉素-酶FET在0.005mol/L、0.01mol/L、0.02mol/L磷酸缓冲液中的响应灵敏度分别为11—12mV/m mol/L、7.5—8.0mV/m mol/L以及3.7—4.0mV/m mol/L; 响应时间为30s; 在0.02mol/L磷酸缓冲液中的标定曲线线性范围为0.5—25mmol/L; 相关系数为0.9976。该青霉素-酶FET在青霉素浓度为10mmol/L的0.01mol/L磷酸缓冲液中重复测定8次的标准偏差SD为1.67mV, 变异系数CV为2.1%; 贮存寿命大于4个月, 使用寿命在1个月以上(每天测试一次)。

关键词 离子敏场效应晶体管; 青霉素酶; 固定化酶; 青霉素-酶FET传感器

离子敏场效应晶体管(下面简称ISFET)以及在此基础上发展起来的生物敏场效应晶体管是近年来发展起来的一类新型的微型半导体化学器件。它与离子选择电极及酶电极相比, 具有体积小、响应快、输出阻抗低等一系列优点, 引起了国内外有关方面的重视, 其研制开发的速度正在加快^[1]。

在ISFET中, 氢离子敏场效应晶体管(即H⁺-ISFET)是很重要的一类。很多生物物质, 如葡萄糖、青霉素、尿素等, 在其相应的酶催化下进行的反应往往伴随着溶液pH值的变化。例如:

变化与溶液中青霉素的含量成正比, 从而可间接地测得溶液中青霉素的含量。

在青霉素发酵生产过程中, 需要经常检测青霉素的浓度。目前通常采用的青霉素浓度检测方法, 如碘量法, 手续烦琐、耗时长、精度也不够高。因此需要有快速简便的方法来取代碘量法。从70年代以来, 关于青霉素酶电极方面的工作国内外均有些报道^[2-7], 关于青霉素-酶FET方面的研究只见于国外的报道^[8-9]。

经研究, 我们制成了性能较好的青霉素-酶FET样管, 并可用来快速简便地测定溶液中的青霉素的含量。该器件的响应灵敏度、响应时间、标定曲线的线性范围等方面的性能与国外文献报道的基本一致, 在贮存稳定性方面优于国外文献报道的同类器件。



这个反应引起了溶液pH值的变化, 该

本文于1988年9月18日收到。

本工作得到国家传感技术开放实验室的经费支持。

材 料 和 方 法

(一) 材 料

牛血清蛋白 (BSA) 为中国科学院生物化学研究所产品; 戊二醛(25%)为E. Merck产品进口分装; 青霉素酶(蜡状芽孢杆菌 β -内酰胺酶, 40IU/mg 由医科院医药生物技术研究所提供。其余所用试剂均为分析纯, 磷酸缓冲液pH为7.2。

(二) 器 件 结 构

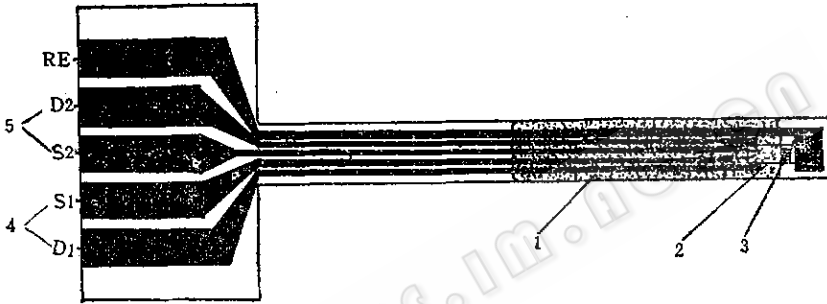


图 1 青霉素-酶FET探头结构图

Fig.1 Structure diagram of penicillin-ENFET probe

1. 密封材料Sealing material 2. 管芯Chip 3. 敏感区Sensitive area 4. 管1FET1 5. 管2FET2

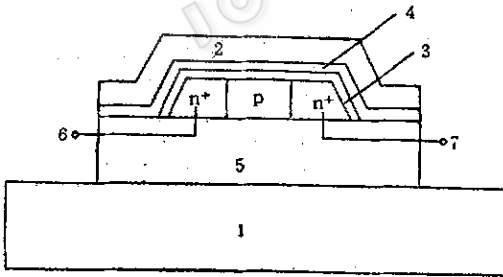


图 2 青霉素-酶FET探头管芯部分横截面示意图

Fig.2 Cross section diagram of the chip of penicillin-ENFET probe

1. 基板Supporting plate 2. 青霉素酶膜Penicillinase membrane 3. SiO₂层SiO₂ layer 4. Si₃N₄层Si₃N₄ layer 5. 蓝宝石衬底 Sapphire substrate 6. 源极 Source 7. 漏极 Drain

其典型特性如下: 响应灵敏度为 50mV/pH; 线性相关系数(pH = 3—9) $r \geq 0.999$; 响应时间 < 1 s; 对一价正离子(Na⁺, K⁺)

青霉素-酶 FET 探头的基本结构是在 H⁺-ISFET 的栅极敏感区上覆盖一层固定化青霉素酶膜。具体的结构如图 1 所示。由图 1 可见, 探头的引线采用印刷电路, 连接采用接插件, 图 2 为探头管芯部分的横截面示意图。

(三) 器 件 的 制 造

1. SOS型 H⁺-ISFET 的制造及其特性: H⁺-ISFET是采用较先进的SOS(Silicon-On-Sapphire), 即蓝宝石上外延硅的材料和工艺制成的,

的选择系数 < 10⁻⁴; 在稳定工作状态下的时漂 < 1mV/h。

2. 固定化酶膜的形成: ISFET栅极上的固定化青霉素酶膜系采用戊二醛-牛血清白蛋白交联法制成。为了使酶膜与栅极表面牢固结合, 先将FET浸入 10% pH 7.0的 γ -氨基丙基三乙氧基硅烷水溶液中, 在50℃下反应 2—3 h, 然后用水洗净晾干。用 0.02mol/L pH7.2的磷酸缓冲液将牛血清白蛋白及青霉素酶配成溶液, 戊二醛配成 2.5%的水溶液。将此三种溶液等体积混合均匀后, 用微量进样器将一滴混合物注在FET的栅极表面, 室温下交联 15min 后浸入 0.1mol/L 赖氨酸溶液中 10min, 以终止反应。最后用 0.01mol/L pH7.2的磷酸缓冲液充分洗净后在同样的

缓冲液中 4°C 下保存。

(四) 测试装置、电路及方法

青霉素-酶FET的特性是在 10ml 烧杯中用电磁搅拌器在恒速搅拌下,以甘汞电极为参比电极进行测定的。烧杯中加入 4ml 磷酸盐缓冲液和 1 ml 不同浓度的青霉素溶液(用同样的缓冲液配制),记录 1 分钟内的输出电压变化。

器件特性的测量电路如图 3 所示。图中 Ref 为参比电极(如甘汞电极、银-氯化银电极等)。 I_0 为恒流源。ISFET 或生物敏 FET 的漏源电流 $I_{DS} = I_0$, 漏源电压 $V_{DS} = I_0 \cdot R$, 器件工作于恒流恒压的状态下。如溶液的青霉素浓度发生变化,溶液-青霉素酶膜及栅极表面 Si_3N_4 膜的界面电势差就变化,这样就会调节青霉素-酶FET 的沟道电导,使器件的漏源电流 I_{DS} 有增加或减少的趋势。但因 I_{DS} 是一恒定值,这样就使源电位要相应地增加或减小,以维持 I_{DS} 的恒定。由于源极通过跟随器与输出端相连,所以溶液中青霉素浓度的变化就表现为输出电压 V_{out} 的变化。

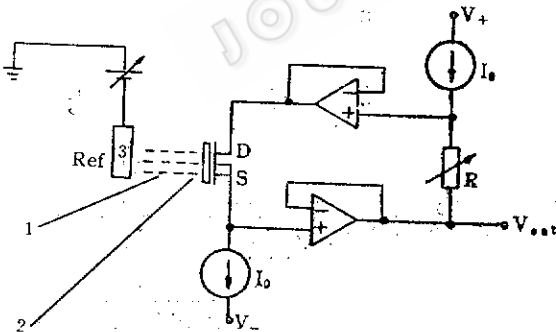


图 3 测量青霉素-酶FET特性的电路图

Fig.3 Circuit diagram for determining the characteristics of penicillin-ENFET

1. 溶液 Solution
2. 酶膜 Enzyme membrane
3. 参比电极 Reference electrode

结果与讨论

(一) 青霉素-酶FET的时间响应

曲线

图 4 示出了青霉素-酶 FET 在不同浓度的青霉素溶液中的输出电压 $\Delta V(\text{mV})$ 随时间的变化曲线。由图可见,一般在 30s 左右,曲线已趋于平缓。

(二) 缓冲液浓度对青霉素-酶 FET 响应灵敏度的影响

图 5 为青霉素-酶 FET 在不同浓度的磷酸缓冲液中的输出电压 $\Delta V(\text{mV})$ 与青霉素浓度之间的关系。由图 5 可得到如表 1 所列的关系。

表 1 青霉素-酶FET在 pH7.0 的不同浓度磷酸缓冲液中的响应灵敏度及标定曲线线性范围

Table 1 Sensitivity and linear range of calibration curve of penicillin-ENFET in different concentrations of phosphate buffer at pH7.0

磷酸缓冲液浓度 Concentration of phosphate buffer(mol/L)	0.005	0.01	0.02
响应灵敏度 Response sensitivity (mV/mmol/L)	11—12	7.5—8.0	3.7—4.0
线性范围 Linear range (mmol/L)	0.5—10	0.5—13	0.5—25
线性相关系数 Linear correlation coefficient (r)	0.9983	0.9979	0.9978

青霉素-酶FET 标定曲线的线性范围下限为 0.5mmol/L 。其上跟随测试时所用的缓冲液浓度的增高而提高,但灵敏度降低。因为浓度高的缓冲液有较强的缓冲能力,从而使酶反应在恒定的 pH 下进行,因此其线性范围的上限升高。但同时较强的缓冲能力又导致了该传感器的响应灵敏度降低。反之,在缓冲液浓度低的情况下,传感器的响应灵敏度高,但随缓冲液浓度的降低引起了酶活力的下降,而使其线性范围的上限降低。

(三) 青霉素-酶FET 对青霉素响应的重现性

图 9(a) 为青霉素-酶 FET 在 0.01mol/L

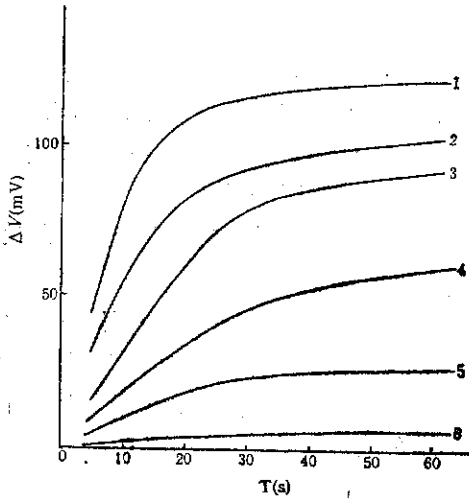


图 4 青霉素-酶FET 在不同浓度青霉素溶液中的时间响应曲线

Fig.4 Time response curves of penicillin-ENFET to different concentrations of penicillin solution

青霉素浓度 Penicillin concentration (mmol/L):
 1. 15.0, 2. 10.0, 3. 8.0, 4. 5.0, 5. 2.0, 6. 0.2;
 磷酸缓冲液浓度 Phosphate buffer conc.(mol/L):
 0.005; 测量温度 Temperature(°C): 20

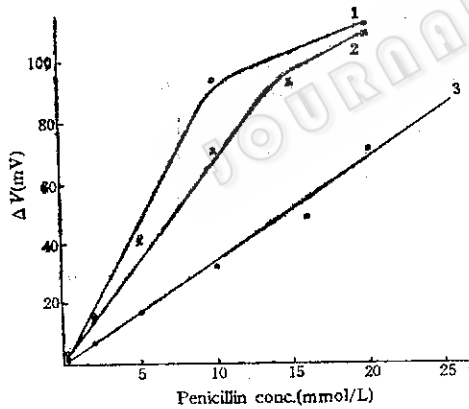


图 5 青霉素酶-FET 在不同浓度的磷酸缓冲液中的标定曲线

Fig.5 Calibration curves of penicillin-ENFET in different concentrations of phosphate buffer
 缓冲液浓度 Buffer conc.(mol/L): 1. 0.005, 2. 0.01, 3. 0.02

磷酸缓冲液配制的 10mmol/L 青霉素溶液中进行八次重复测定的结果。8次重复测定的输出电压均在 $78 \pm 2 - 3$ mV 内，其标准偏差 SD 为 1.67mV，变异系数 CV 为 2.1%。此外，我们还在 0.01mol/L 磷酸缓

冲液中测定青霉素浓度从低到高 (1 → 20mmol/L)，再从高到低 (20 → 1mmol/L) 变化时该传感器的输出电压变化。如图 6 (b)所示，青霉素浓度上行及下行变化时所测得的电压输出值几乎完全重合。

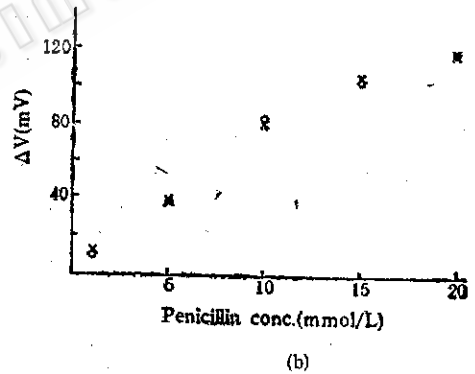
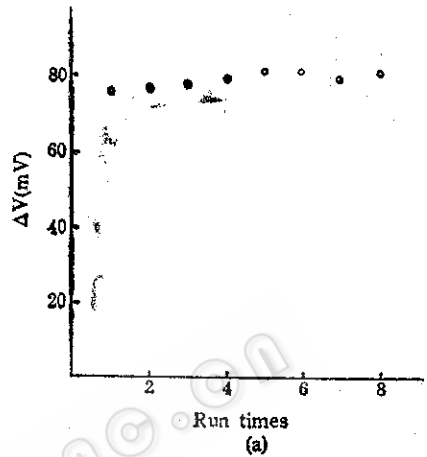


图 6 青霉素-酶FET响应的重现性测定结果
 Fig.6 Reproductivity of response of penicillin-ENFET to penicillin

(a) 在同一浓度青霉素溶液中测定
 Performed in phosphate buffer with same concentration penicillin
 (b) 在不同浓度的青霉素溶液中测定
 Performed in phosphate buffer with different of concentrations of penicillin

○青霉素浓度由低向高 With penicillin concentration increasing
 ×青霉素浓度由高向低 With penicillin concentration decreasing

(四) 青霉素-酶FET 探头的贮存稳定性

将青霉素酶-FET探头于 0.01mol/L 磷

酸缓冲液中, 4°C 下贮存。在一定的时间间隔内, 测定其对 10mmol/L 青霉素溶液 (用 0.01mol/L 磷酸缓冲液配制) 的响应。测定结果表明该探头在上述条件下贮存 4 个月后, 输出电压仅稍有下降。表 2 为青霉素-酶FET的贮存稳定性数据。

表 2 青霉素-酶FET的贮存稳定性

Table 2 Storage stability of penicillin-ENFET

贮存天数 Store days	1	14	21	48	57	61	66	71	79	82	86	97	105	122
输出电压 $V_{\text{out}}(\text{mV})$	75	71	70	76	71	71	69	69	69	71	70	81	68	74

此数据是在室温下测得的, 温度范围为 $22-29^{\circ}\text{C}$
The data were determined at room temperature ranged from $22-29^{\circ}\text{C}$

(五) 青霉素-酶FET的使用寿命

在 0.01mol/L 的磷酸缓冲液中测定青霉素-酶FET对 10mmol/L 青霉素溶液的响应, 每天使用一次, 每次测定之间将传感器在 0.01mol/L 磷酸缓冲液中 4°C 下保存。图 7 为青霉素-酶 FET 的操作稳定性。该传感器制成后按上述贮存条件下贮存 28 天后开始每天测试, 图中输出电压的波动可

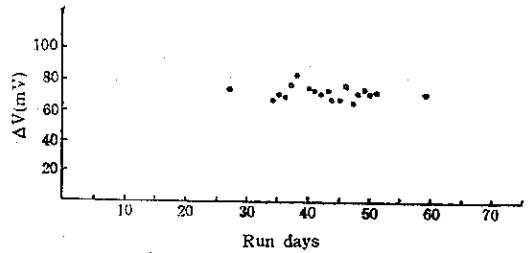


图 7 青霉素-酶FET的操作稳定性

Fig.7 Operation stability of penicillin-ENFET
在室温下测定, 温度变化范围为 $22-29^{\circ}\text{C}$
Determined at room temperature ranged from $22-29^{\circ}\text{C}$

能是由于测试时室温的波动而引起的。由图 7 可知, 在上述工作条件下, 青霉素-酶 FET 可稳定工作 30 天以上。

目前我们所研制的青霉素-酶 FET 仅是单管输出式的传感器, 测定溶液中的青霉素含量时还需要用甘汞电极作为参比电极。因此还存在体积大, 温度、光以及其他环境因素对测定有干扰等缺点。为了克服这些缺点, 我们将继续研制带参比电极的双管差分输出式青霉素-酶 FET, 以期获得体积小, 性能更优越的青霉素-酶 FET。

参 考 文 献

- [1] 王贵华等: 中国电子学会敏感技术学会第一届学术会议论文摘要, p.16, 1987.
- [2] Papariello, G.J. et al.: *Anal. Chem.*, 45:790, 1973.
- [3] Cullen, L.F. et al.: *Anal. Chem.*, 46:1955, 1974.
- [4] Rusling, J.F.: *Anal. Chem.*, 48:1211, 1976.
- [5] Nilsson, H. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 20:527, 1978.
- [6] Enfors, S.O. et al.: *Enzyme. Microb. Technol.*, 1:260, 1979.
- [7] Nilsson, H. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 320:529, 1973.
- [8] Caras, S. D. et al.: *Anal. Chem.*, 52:1935, 1980.
- [9] Caras, S. D. et al.: *Anal. Chem.*, 57:1924, 1985.
- [10] Miyahara, Y. et al.: *Sensors and Actuators*, 7:1, 1985.

ENZYME SENSOR OF H⁺-ISFET TYPE SENSITIVE TO PENICILLIN

Zhong Lichan Li Gaoxiang

(*Institute of microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Wang Zhengxiao Liu Luna

(*Institute of semiconductors; Academia Sinica, Beijing*)

A single H⁺-ISFET sensitive to penicillin (the short for penicillin-ENFET was used hereunder) was constructed by combination of a SOS-H⁺-ISFET with the immobilized β -lactamase membrane and used for determining the concentration of penicillin in phosphate buffer solution. Sensitivities of The penicillin-ENFET in 0.005, 0.01, 0.02mol/L phosphate buffer were 11—12mV/mmol/L, 7.5—8.0mV/mmol/L, and 3.7—4.0mV/mmol/L, respectively. The penicillin-ENFET responded linearly to penicillin in 0.02mol/L phosphate buffer over the concentration range of 0.5—25mmol/L with a correlation coefficient of 0.9976. The reproductivity of response of the penicillin-ENFET was tested, and the *SD* and *CV* for 8 performances were found to be 1.67mV and 2.1%, respectively. When immersed in 0.01mol/L phosphate buffer and stored in refrigerator, the penicillin-ENFET had a life time of 4 months with only a slight decline of output; it could also be used for assaying 10mmol/L penicillin (once aday) over one month.

Key words

ISFET (Ion sensitive field effect transistor); penicillinase immobilized enzyme; penicillin-ENFET sensor