

青霉素敏感的酶场效应晶体管的研究和应用

汪正孝 李淑英

(中国科学院半导体研究所, 北京)

钟丽婵 黎高翔

(中国科学院微生物研究所, 北京)

酶场效应晶体管 (ENFET) 是近年来发展起来的一类半导体技术和生物技术相结合的新型器件。双管差分输出式 ENFET 对环境温度变化及总体 pH 变化等外界因素有自动补偿作用, 其输出电压随时间的漂移较之单管输出有很大的改善。此外, 还可采用金电极作参比电极以实现探头的小型化。青霉素 ENFET 在 0.01mol/L 和 0.02mol/L 的磷酸缓冲液中的响应灵敏度分别为 $6.5-7.0\text{mV/mmol/L}$ 和 $3.2-3.6\text{mV/mmol/L}$, 线性范围为 $0.5-14\text{mmol/L}$ 和 $0.5-25\text{mmol/L}$ 。当浸于 0.01mol/L 磷酸缓冲液、置于 4°C 下保存时, 探头的贮存寿命大于 6 个月。探头的累计使用次数可超过 1000 次。本文还论述了青霉素 ENFET 在青霉素发酵液浓度测定中的应用。

关键词 氢离子敏场效应晶体管 (H^+ -ISFET); 酶场效应晶体管 (ENFET); 固定化酶膜; 青霉素浓度测定; 半导体化学传感器件

酶场效应晶体管 (简称 ENFET) 的基本结构是由氢离子敏场效应管 (H^+ -ISFET) 及涂覆于栅敏感区上的固定化酶膜组合而成。它是近年来发展的一类半导体技术与生物技术相结合的新型器件。ENFET 与酶电极相比, 具有体积小、响应快、输出阻抗低及易于采用双管差分与集成化技术等一系列优点。

当 ENFET 用于发酵液中青霉素浓度测定时与碘量法相比, 可大大简化操作, 加快检测速度 (测定一个试样耗时少于 5 min), 同时在检测过程中无需消耗任何试剂。更重要的是, 由于 ENFET 法是以低输出阻抗的电信号来显示青霉素浓度的, 故在进一步发展的基础上可以实现青霉素浓度的在线监测, 这将使青霉素发酵生产的过程监控大为改善。

我们已研制成性能较好的青霉素

ENFET 样管, 并已发表了有关单管输出式青霉素 ENFET 的实验研究结果^[1]。本文着重论述有关双管差分输出的实验研究结果以及用于发酵液青霉素浓度的测定结果。其结果与现行碘量法的一致。这在国外文献上未见报道^[2]。

实 验

(一) 器件

1. 两种类型的 H^+ -ISFET: 中科院半导体所研制的供生物敏 FET 应用的 H^+ -ISFET 有两种类型: SOS 型和 Si 型。有关前者的研制、性能及优缺点请参见文

本文于 1989 年 6 月 27 日收到。

在采用 ENFET 法测定发酵液中青霉素浓度的工作中, 得到华北制药厂贺秉坤、朱慎旺和马东杰等同志的大力协助, 特此致谢。

传感技术联合开放研究实验室资助课题。

献[3,4]。后者的优点是成本低、器件的参数一致性好及光敏效应不显著等。缺点是封装工艺很复杂。在实际应用中,可根据具体要求来选用某一类型。

2. 双管差分输出式ENFET的结构: 有关单管输出式 ENFET 的原理及电路结构图请参见文献[1]。图1示出了双管差分输出式 ENFET 的电路结构图。图1中

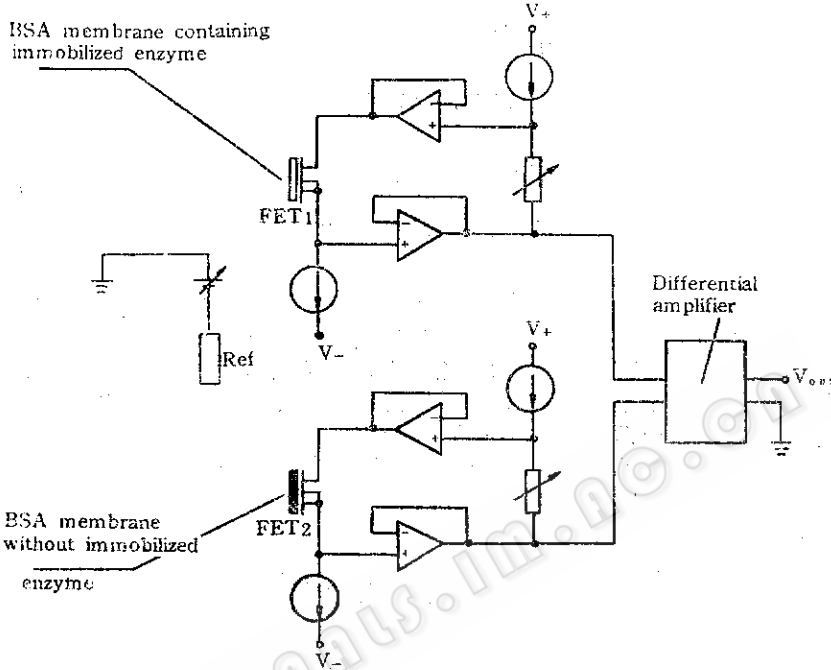


图1 双管差分输出式酶FET的电路结构图

Fig.1 Measurement circuit for differential output of ENFET

的管1和管2是两个特性完全相同的 H^+ -ISFET。在管1的栅敏感区上覆盖一层含有固定化酶的牛血清白蛋白(简称BSA)膜,在管2的栅敏感区上覆盖一层不含有固定化酶的BSA膜,将此两管共用一个参比电极 Ref,然后将此两管的源极输出电压的差通过差分放大器放大后输出。

双管差分输出与单管输出相比有以下优点:

(1) 前者对被测液的总体 pH 变化及环境温度变化等外界干扰因素有自动补偿作用。同时,前者较之后者其输出电压随时间的漂移有很大的改善。表1为两者几项性能的比较。在差分对管型的ENFET中,两个 H^+ -ISFET 的栅敏感区上均覆盖一层 BSA膜(含酶和不含酶的)。由于 BSA膜

不影响氢离子的通过,故基本情况与表1相同。图2示出了在4ml pH=7.0的0.01

表1 单管输出式与双管差分输出式 H^+ -ISFET 几项性能的比较

Table 1 Comparisons of the output of single model FET with differential mode FET

变化因素 Variation parameters	单管输出 Single output	双管差分输出 Differential output
环境温度变化 Temperature variation (mV/°C)	1.3—1.6	≤0.2
总体pH变化 Bulk pH variation (mV/pH)	50—53	0.2—0.3
时间漂移 Drift with time (mV/h)	0.5—1.0	<0.5

mol/L磷酸缓冲液中加入1ml pH=6.5的0.01mol/L磷酸缓冲液时青霉素酶FET的

双管差分输出与单管输出随时间变化的曲线。图中 $t=0$ 为加入时间。由图可见,在约 10s 后,双管差分输出回复到零,即完全抵消了总体 pH 变化的影响。前 10 s 的过渡过程是由于两个栅区覆盖的 BSA 膜的 H^+ -ISFET 的 pH 响应快慢不同而引起的。

(2) 在双管差分输出方式下,可用金(或白金)等“模拟参比电极”来代替普通的参比电极(如甘汞电极)。这样就可将参比电极与管子芯片集成在一起,实现了敏感探头的小型化。当金电极浸于溶液中时,由于各种氧化还原作用的影响,其电位不是稳定的,故不能作为单管输出的参比电极。在双管差分输出下,上述金电极电位的不稳定性被抵消,因此可用以代替普通的参比电极。表 2 为在不同的参比电极方式下两者的比较。表中所示数字为 3 min 内输出电压的漂移。

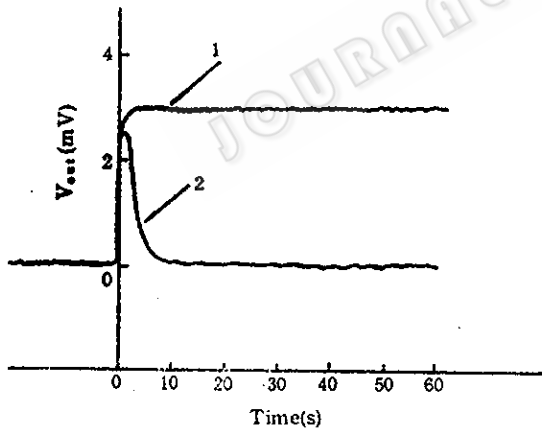


图 2 在总体 pH 变化下青霉素 ENFET 的双管差分输出与单管输出随时间的变化

Fig. 2 Relations of differential output and single output of penicillin-ENFET with time under the variation of bulk pH

1. 单管输出 Single output 2. 差分输出 Differential output

(二) H^+ -ISFET 栅敏感区上 BSA 膜的制备

文献[1]已叙述了栅敏感区上固定化

表 2 在不同的参比电极方式下单管输出与双管差分输出的比较

Table 2 Comparisons of the output of single model FET with differential model FET under different types of reference electrodes

参比电极方式 Reference electrode type	单管输出 Single output	双管差分输出 Differential output
金电极 Gold electrode	3—4mV	0.2—0.3mV
甘汞电极 Calomel electrode	0.5—0.6mV	0.2—0.3mV

酶膜的制备方法。本文只叙述作为双管差分输出的参比 H^+ -ISFET 栅敏感区上 BSA 膜的制备方法。

试剂:牛血清白蛋白,中科院上海生化所出品;戊二醛(25%),E. Merck 产品进口分装,其余试剂均为分析纯。 H^+ -ISFET 栅敏感区的 Si_3N_4 表面硅烷化处理同[1]。将两份体积 10% 的 BSA 与一份体积 2.5% 的戊二醛水溶液混合,用微量进样器取一滴覆盖于栅敏感区表面,室温下交联 15min 后,在 0.1mol/L 的赖氨酸溶液中浸 10min,然后用 0.01mol/L pH=7.0 的磷酸缓冲液洗净,并浸于同样的缓冲液中于 4℃ 下保存。

结果和讨论

(一) 对青霉素 G 钾溶液的测试结果

青霉素 G 钾采用华北制药厂生产的注射用粉剂,效价为 1595IU/mg。用适当浓度的磷酸缓冲液将青霉素 G 钾粉剂配制成溶液。测试方法:先将青霉素 ENFET 探头浸入一定体积的某一浓度的磷酸缓冲液中,待输出电压稳定后,将其示值调零,然后加入一定体积的某一浓度青霉素 G 钾溶液,记录下某一时刻(如 1 min)的输出电压值。以下均为双管差分输出的

结果。

1. 响应灵敏度和线性范围: 图 3 示出了在 0.01mol/L 和 0.02mol/L 磷酸缓冲液中青霉素 ENFET 的输出电压随青霉素浓度的变化关系。由图 3 可见, 双管差分型的青霉素 ENFET 的响应灵敏度和线性范围与文献 [1] 报道的单管型器件的情况基本相同。

2. 重现性: 表 3 列出了 3 个青霉素 ENFET 在 0.02mol/L 磷酸缓冲液中对 10 mmol/L 青霉素溶液进行的 6 次重复测量的响应情况。表中 \bar{V}_{out} 为平均的输出电压, SD 为标准偏差, CV 为变异系数。由表 3 可见, 器件的重现性较好。

表 3 青霉素 ENFET 在 0.02mol/L 磷酸缓冲液中对 10mmol/L 青霉素溶液测定的重现性
Table 3 Response reproductivity of penicillin-ENFET to 10mmol/L penicillin solution in 0.02mol/L phosphate buffer

管号 FET number	次数 Number of times						\bar{V}_{out} (mV)	SD (mV)	CV (%)
	1	2	3	4	5	6			
	V_{out} (mV)								
A	33.6	33.4	33.6	34.0	33.2	33.5	33.55	0.27	0.80
B	33.3	32.8	32.8	33.3	34.0	32.7	33.15	0.49	1.49
C	33.8	34.3	33.9	33.9	34.6	34.0	34.08	0.31	0.91

3. 贮存稳定性: 将青霉素 ENFET 浸入 0.01mol/L pH=7.0 的磷酸缓冲液中置于 4 °C 下贮存, 并隔一段时间在 0.01 mol/L 磷酸缓冲液中对 10mmol/L 的青霉素溶液进行测定。由图 4 结果可见, 青霉素 ENFET 的输出电压在半年内的波动约为 $62 \pm 5mV$ 。因此可以说器件的响应灵敏度约在半年内基本保持不变。造成输出电压的波动的一个原因可能是测量中未采取恒温措施之故。

4. 使用寿命: 这里是指器件能维持正常性能的累计使用次数。在一般情况下, 器件的累计使用次数可达 1000 次以上。

(二) 对青霉素发酵液的测定结果

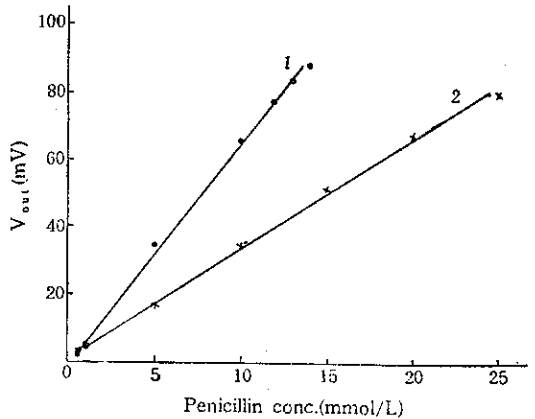


图 3 青霉素 ENFET 的输出电压随青霉素浓度的变化关系
Fig.3 Relations Between output of penicillin ENFET and penicillin concentration
1. 0.01mol/L 2. 0.02mol/L

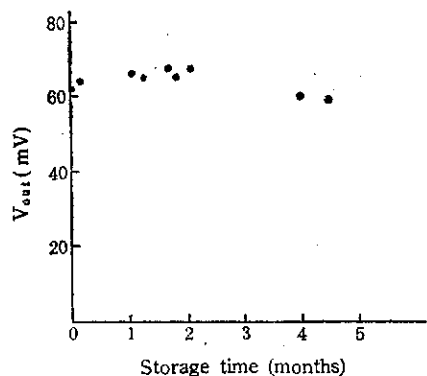


图 4 青霉素 ENFET 的贮存稳定性
Fig.4 Storage stability of penicillin ENFET

青霉素发酵液的成分较之上述青霉素 G 钾溶液要复杂得多。采用 ENFET 法对青霉素发酵液中青霉素浓度(即发酵单位)进行了多次全周期的测定, 并与碘量法的

测定结果进行比较,两者取得了很好的一致。

采用 ENFET 法测定青霉素浓度的过程分为两步。第一步是用已知浓度的青霉素标准液对探头的响应灵敏度进行标定:

$$A = \frac{V_1}{C_s} \cdot D_1 \quad (\text{mV}/\text{mmol}/\text{L}) \quad (1)$$

式中: A 为响应灵敏度,单位 $\text{mV}/\text{mmol}/\text{L}$; C_s 为标准液浓度,单位为 mmol/L ; V_1 为探头对于标准液的输出电压,单位为 mV 。 D_1 为标准液的稀释倍数。第二步是测定试样的浓度:

$$C_x = \frac{V_2}{A} \cdot D_2 = \frac{V_2 \cdot D_2 \cdot C_s}{V_1 \cdot D_1} \quad (\text{mmol}/\text{L}) = \frac{V_2 \cdot D_2 \cdot C_s}{V_1 \cdot D_1} \cdot 600 \quad (\text{IU}/\text{ml}) \quad (2)$$

式中: C_x 为试样浓度; D_2 为试样的稀释倍数。对于青霉素 G 钾溶液, $1\text{mol}/\text{L}$ 约相当于 $600\text{IU}/\text{ml}$ 。

表 4 列出了一个全周期的采用 ENF-

表 4 采用 ENFET 法对发酵液中青霉素浓度测定的示例

Table 4 An example of measurement results of penicillin concentration of [fermentation broth by using ENFET method

发酵时间 Fermentation time(h)	ENFET法 ENFET method	碘量法 Iodometric method	比色法 Colorimet- ric method
45	7394	6900	
69	13200	12800	
93	21000	21200	
117	27840	28800	
165	43410	43600	
189	43982	43700	47000
213	49461	49600	53650
237	54000	52500	
260	54639	55600	

ET 法对发酵液中青霉素浓度进行测定的结果,并以碘量法及比色法的测定数据作为对照。表中的单位是 IU/ml 。

为了判断 ENFET 法能否代替碘量法,应采用数理统计方法对两法的数据进行回归分析和线性相关分析。设 y 为 ENFET 法的数据, x 为碘量法的数据,由表 4 可得出:

$$\text{回归方程: } y = 1.001x + 70 \quad (\text{IU}/\text{ml})$$

$$\text{线性相关系数: } r = 0.9994$$

由此可见, ENFET 法完全可以代替碘量法。

(三) 讨论

在目前已进行的对于青霉素发酵液的测定中,大多数场合下 ENFET 法与碘量法的测定数据对应得很好,但有时两者的测定数据之间有一定的偏差。究竟哪个方法较准确,目前尚难于下结论,也缺乏另一种简便、准确的测量青霉素浓度的方法来加以判别。该问题尚待进一步研究。

在青霉素发酵生产中,发酵产物除青霉素 G 外,还有 6-APA 母核及其他几种青霉素 (F、K、O、V、N) 等成分,上述两法所测的都是青霉素类的总浓度,而不是真正有实用价值的青霉素 G 的浓度。从发酵生产的角度来看,除了希望知道青霉素类的总浓度外,还迫切希望知道青霉素 G 的浓度,因为非青霉素 G 类的物质将对提炼工序带来很多麻烦。因此今后应再研制一种专测青霉素 G 浓度的 ENFET,方法是将目前用的固定化青霉素酶 (β -内酰胺酶) 换成固定化青霉素 G 酰胺 (化) 酶。

参 考 文 献

- [1] 钟丽婵等:生物工程学报,6(2):145—150,1990。
- [2] Caras, S. and Janata, J.: *Anal. Chem.*, 52:1935, 1980。
- [3] 汪正孝等:化学传感器,8(4):40,1988。
- [4] 汪正孝:半导体学报,10(1):62,1989。

RESEARCH AND APPLICATION OF ENZYME FET SENSITIVE TO PENICILLIN

Wang Zhengxiao Li shuyin

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

Zhong Lichan Li Gaoxiang

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

Enzyme FET is a kind of new device developed recently, which is made through the combination of semiconductor and biological technology. Enzyme FET with differential output can provide automatic compensation for some external factors, e.g. variations of temperature and pH of bulk solution. By using differential measurement, drift of the output voltage with time is improved, and the sensor can be miniaturized through the use of "pseudo-reference electrode". Differential model penicillin-ENFET was constructed by modifying one of the dual ISFET gate with a membrane of cross-linked bovin serum albumin (BSA)-penicillinase and the other with a membrane of cross-linked BSA. It responded linearly to penicillin in 0.01mol/L and 0.02mol/L phosphate buffer with sensitivities of 6.5—7.0mV/mmol/L and 3.2—3.6mV/mmol/L over the concentration ranges of 0.5—14mmol/L and 0.5—25mmol/L, respectively. When immersed in 0.01mol/L phosphate buffer and stored in 4 °C, this detector had a life time of 6 months with only a slight decline of output. Accumulative total usage times of the detector could be over one thousand. Finally, the Practical application of differential model penicillin-ENFET in assaying penicillin concentration of fermentation broth is concerned.

Key words

H⁺-ISFET; enzyme FET; immobilized enzyme membrane; assays of penicillin concentration; semiconductor chemical sensors