

氢离子敏场效应管型尿素传感器及其应用

钟丽婵¹ 韩泾鸿² 黎高翔¹
崔大付² 范杰² 杨修亮³

(中国科学院微生物研究所, 北京)¹

(中国科学院电子研究所, 北京)²

(山东大学生物系, 济南)³

在 H^+ -IS FET (离子敏场效应晶体管)的二个栅极表面分别复盖一层戊二醛交联的牛血清清蛋白-脲酶膜及牛血清清蛋白膜即制成差分式尿素-酶FET传感器。该传感器的响应时间小于1 min。尿素浓度为1.0—8.0mg/dL时,响应值与尿素浓度对数值呈线性关系,线性相关系数为0.997,响应灵敏度为50mV/dec.(mg/dL)。尿素浓度为0.1—1.0mg/dL时,响应值与尿素浓度呈线性关系,线性相关系数为0.998,响应灵敏度为12—15mV/mg/dL。该传感器对100mg/dL尿素溶液的20次响应的标准偏差及变异系数分别为1.39mV和1.44%。用该尿素-酶FET测定血清样品中的 \bar{BUN} (血中尿素氮)值时,与酶法相比较,两者之间的相关系数为0.9912。该传感器在1个半月内累计使用250次后,响应灵敏度下降约10%。

关键词 离子敏场效应晶体管(H^+ -ISFET);酶场效应晶体管(ENFET);固定化脲酶膜;尿素传感器

病人血液及尿中尿素含量的定量测定在临床诊断中是一项很重要的试验,其测定的传统方法是采用以专一性的酶催化反应或非酶催化反应为基础的分光光度分析法。但不够简便,采用酶法还要消耗价格昂贵的酶。1962年 Clark^[1]等首次提出酶传感器的方案,接着,Hicks和Updike^[2]报道了用葡萄糖氧化酶电极来检测葡萄糖。其后不断有各种酶传感器的报道。其中用于检测尿素的传感器就有直接测定铵离子的电极^[3,4],测定氨气的电极^[5-7],以及测定酶反应后pH变化的玻璃电极^[8,9]等。

将ISFET与固定化酶技术相结合即可制成一种小型化的生物传感器-酶场效应(晶体)管,它最早是由Janata在1976年提出的,1980年制成了青霉素酶场效应管^[10]。以后又陆续有葡萄糖、尿素、乙酰胆碱^[11-14]等酶场效应管及可同时测定葡萄糖和尿素的复合酶场效应管^[15]的

研究报告。本文报道小型化的尿素-酶FET传感器的制备、对溶液中尿素的响应特性及其在临床分析上的用途及测试结果。

材料和方法

(一) 器件、测试仪器及试剂

1. H^+ -ISFET:中国科学院电子研究所研制,其主要技术性能如下:测量范围:0—14pH;精度:0.002pH;响应时间:小于0.1s(90%);灵敏度:~50mV/pH;敏感面积~2mm²;探头尺寸:φ5×80mm。

2. BI-88型生物离子敏FET测试仪:中国科学院半导体研究所研制。

3. LKB2210型记录仪。

本文于1990年12月7日收到。

本研究中所用的血清样品及其尿素氮值(用酶法测定)均由北京医院检验科提供,特此致谢。

4. 试剂：脲酶为Boehringer Type C-3 12000u/18mg；牛血清清蛋白(BSA)为上海生化所产品；戊二醛(25%)由Emerch 进口产品分装；γ-氨丙基-三乙氧基硅烷(APTES)为国产分析纯产品。其余所用化学试剂均为分析纯产品。除另加说明外，本研究所用缓冲液均为 0.01 mol/L pH7.0的磷酸盐缓冲液。

(二)对管差分式尿素-酶FET 的制备

探头的制备方法基本上与青霉素-酶FET的制备方法相同^[16,17]。用10% pH 7.0的APTES水溶液将 IS-FET的氮化硅表面处理并洗净后，在二个栅极表面分别制备固定化脲酶膜及牛血清清蛋白膜。用 0.01mol/L pH7.0 的磷酸盐缓冲液配

制 15%的 BSA 溶液，然后用此溶液配制 0.3mg/10μl BSA的脲酶-BSA 溶液。将 4μl脲酶-BSA溶液与 2 μl 2.5%的戊二醛水溶液混合均匀后，取一滴混合物涂于对管IS-FET 的一个栅极表面，室温下交联 15min 后用磷酸缓冲液洗净，探头浸入 0.01mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液中 4 ℃ 下保存。对管IS-FET中的另一个 FET作为参比 FET，在其栅极表面上用同法制备一层牛血清清蛋白膜，其不同之处只在于用15%BSA溶液代替脲酶-BSA 溶液。

(三) 测试电路及方法

测定尿素-酶 FET对尿素溶液的响应性能及测定血清中尿素含量时均采用差分输出电路(图1)。差分输出电路的原理可参

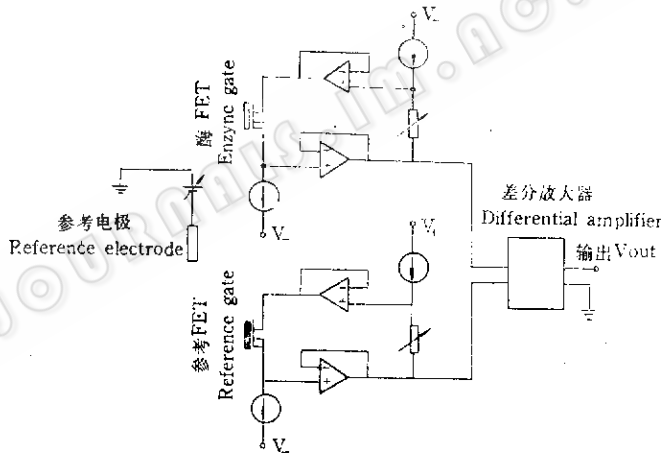


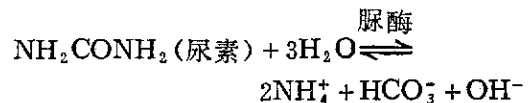
图 1 尿素-酶FET的差分测量电路图
Fig. 1 Circuit diagram for differential measurement of urea-ENFET probe

阅文献[17]。测试在室温下进行，在5ml烧杯中加4.9ml 磷酸缓冲液，在磁力搅拌器的恒速搅拌下待输出电压达到稳定后，加入0.1ml尿素溶液(用同样缓冲液配制)或血清样品，记录1min内的输出电压变化。

结果和讨论

(一) 缓冲液浓度及 pH 对 尿 素-酶 FET 响应性能的影响

由于H⁺-ISFET 型的酶传感器的工作原理是基于酶反应过程中所产生的氢离子浓度的变化。例如尿素在脲酶的催化下发生以下反应：



因此，反应系统中缓冲液的浓度及pH对该传感器的响应性能有很大的影响。为了使

尿素-酶FET在响应重现性、响应时间、标定曲线的斜率及回复至基线状态所需的时间等方面能满足实际使用的需要, 首先要选择缓冲液的最适使用浓度及pH值。图2为在三种不同浓度, pH为7.0的磷酸盐缓冲液中测得的标定曲线。缓冲液浓度越高, 缓冲能力越大, 反应产物所引起的酶膜附近pH值的变化越小, 故响应灵敏度越低。但由于pH变化小, 酶反应动力学范围就宽, 因此在缓冲液浓度高时, 标定曲线线性范围的上限也高。反之, 缓冲液浓度低时, 响应灵敏度大而线性范围的上限低。

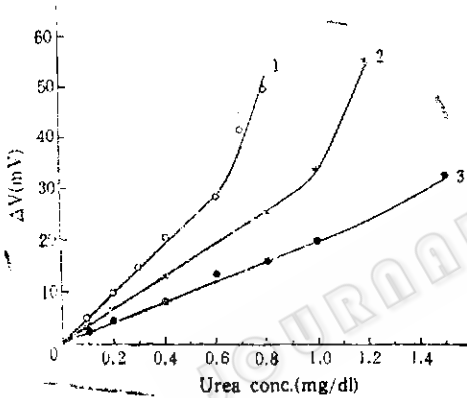


图2 缓冲液浓度对尿素-酶FET响应灵敏度及标定曲线线性范围的影响

Fig. 2 Effect of buffer capacity on response sensitivity and linear range of urea-ENFET

缓冲液浓度 Buffer conc.(mol/L):

1. 0.001; 2. 0.005; 3. 0.01

由于酶反应动力学与反应系统的pH有关, 同时pH值对缓冲液的缓冲能力有影响, 因此, ENFET的响应性能又与缓冲液的pH值有依赖关系。尿素-酶FET在0.01mol/L不同pH的磷酸缓冲液中的时间响应曲线如图3所示。由图可知, 响应值在pH为6.5时最高。考虑到人体血清的pH值为7.0左右, 而且磷酸缓冲液在pH7.0时的缓冲能力最强, 以下测定均采用

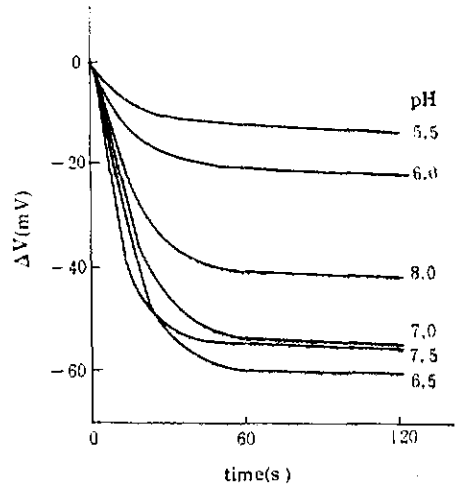


图3 pH对尿素-酶FET响应性能的影响

Fig. 3 Effect of pH on response of urea-ENFET to urea

尿素浓度 Urea conc.: 20mg/dl

0.01mol/L pH7.0的磷酸盐缓冲液。

(二) 尿素-酶FET的响应性能

1. 响应时间: 图4为一组尿素-酶FET对不同浓度尿素溶液的时间响应曲线, 由该曲线可见, 在1min内响应值已达到平衡状态, 故传感器的响应时间为1min。

2. 响应灵敏度及线性范围: 在用尿素-酶FET测定尿素的酶水解反应过程中, 按照能斯特方程, 反应系统中碱的含量 C_B 与输出电压 E 的关系为:

$$E = E_0 + 2.3 \frac{RT}{F} \log(H^+) \quad (1)$$

式中 (H^+) 与 C_B 直接有关, E_0 为标准状态下的电极电势; R 为气体常数; T 为绝对温度; F 为法拉第常数。反应前($t=0$)与反应后($t=1min$)的输出电压差 ΔE 可用下式表示:

$$\begin{aligned} \Delta E &= 2.3 \frac{RT}{F} \Delta \log(H^+) \\ &= 2.3 \frac{RT}{F} \Delta pH \quad (2) \end{aligned}$$

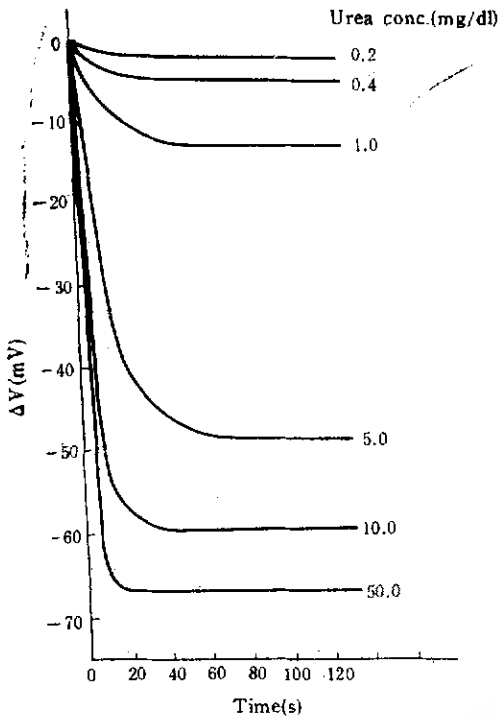


图 4 尿素-酶FET对各种浓度的尿素溶液的时间响应曲线

Fig. 4 Typical time response curves of urea-ENFET to various concentrations of urea

设缓冲液的缓冲能力指数

$$\beta = \frac{dC_B}{dpH} \quad (3)$$

β 定义为引起pH变化为 dpH 时所需的碱浓度的变化。由(3)得

$$dpH \approx \frac{dC_B}{\beta} \quad (4)$$

将(4)代入(2)得

$$\begin{aligned} \Delta E &= 2.3 \frac{RT}{F} \cdot \frac{\Delta C_B}{\beta} \\ &= 59.2 \cdot \frac{\Delta C_B}{\beta} \end{aligned} \quad (5)$$

由Michaelis方程可知

$$\frac{\Delta p}{\Delta t} \approx \frac{dp}{dt} = \frac{V_m \cdot s}{K_m + s} \quad (6)$$

式中 Δp 为产物变化量,在尿素水解反应中即为 ΔC_B 。在酶过量的情况下, $K_m \gg s$,故 s 可忽略。合并式(5)和(6)得

$$\Delta E = 59.2 \cdot \frac{V_m \Delta t \cdot s}{K_m \beta} \quad (7)$$

式中 Δt 为反应时间。

式(7)表明,在低底物浓度时,

$\frac{V_m}{K_m}$ 及 β 为常数,故 ΔE 与 s 之间呈线性关系,如图5所示,尿素浓度为0.1—1.0

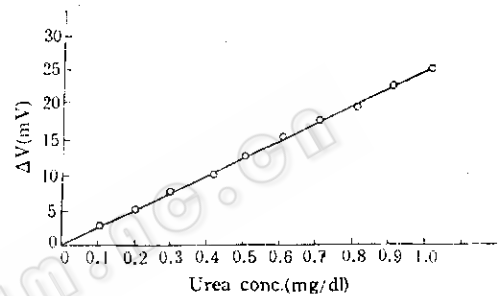


图 5 输出电压对尿素浓度作图所得的尿素-酶FET标定曲线

Fig. 5 Calibration curve of urea-ENFET for determining urea concentration plotted on linear scales

mg/dl时,电压输出与尿素浓度呈线性关系,线性相关系数为0.998,响应灵敏度为12—15mV/mg/dl。反之,在底物浓度较高时,酶活力相对较低, V_m/K_m 值下降, β 亦不为常数,此时 ΔE 与 s 的对数呈线性关系。如图6所示,尿素浓度为1.0—8.0 mg/dl时, ΔE 与尿素浓度的对数值呈线性关系,线性相关系数为0.997,响应灵敏度为50mV/dec(mg/dl)。由图7可见,底物浓度再增加,酶活力相对来说更低,此时输出电压不再随底物浓度增加而增加。

3. 响应重现性:反复测定了尿素-酶FEN在0.01mol/L磷酸缓冲液中对100 μ g/dl尿素溶液的响应共20次,其结果如表1所示。20次测定的标准偏差SD

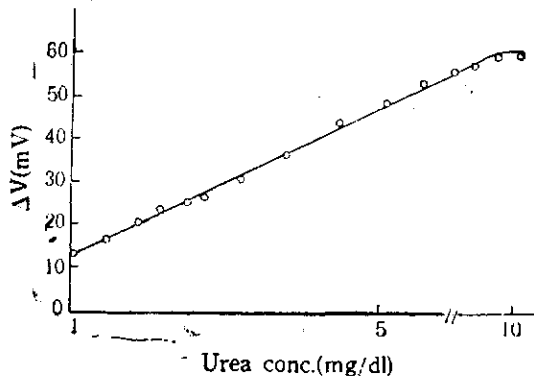


图 6 输出电压对尿素浓度对数值所得的尿素-酶FET标定曲线

Fig. 6 Calibration curve of urea-ENFET for determining urea concentration plotted on logarithmic scales

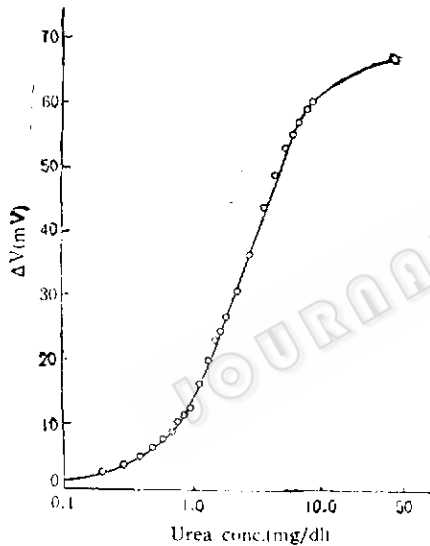


图 7 尿素-酶FET对尿素的响应

Fig. 7 Response of urea-ENFET to urea plotted on logarithmic scales

及变异系数 CV 分别为 1.39mV 和 1.44%，该结果说明尿素-酶FET 有较好的重现性。

4. 使用寿命：反应系统中添加稳定剂对尿素-酶FET 的操作稳定性有很大的影响。表 2 为测试反应系统中添加稳定剂后，尿素-酶FET 操作稳定性的比较。在无稳定剂的情况下，尿素-酶FET 在磷酸缓

表 1 尿素-酶FET对尿素响应的重现性

Table 1 Reproducibility of urea-ENFET response to urea

测定次数	ΔV (mV)	测定次数	ΔV (mV)
1	95	11	96
2	96	12	97
3	97	13	96
4	95	14	96
5	95	15	97
6	93	16	98
7	95	17	98
8	96	18	97
9	95	19	97
10	93	20	95

SD(mV):1.39, CV(%):1.44; 尿素浓度Urea concentration:100mg/dl

冲液中冰箱内放置过夜后即完全无响应；加入稳定剂 I 后，连续测试15次后，响应灵敏度降低10%，加入稳定剂 I 及 II 后，尿素-酶FET在 1 个半月内使用250次后（用于测定缓冲液中尿素含量及血清中尿素含量），响应灵敏度降低 10%，不用时，尿素-酶FET在0.01mol/L pH7.0磷酸缓冲液中冰箱内保存。

表 2 稳定剂对尿素-酶FET操作稳定性的影响

Table 2 Effect of stabilizer on operation stability of urea-ENFET

添加的稳定剂 Added stabilizer	使用次数 Assay number	响应灵敏度的降低 Decrease in response sensitivity (%)
无 None	4℃下放置过夜 Stay overnight at 4℃	无响应 No response
I	15	10
I + I	250	10

5. 回收试验：将含有尿素的血清样品分成体积相同的二份，在一份血清中加入一定体积已知浓度的尿素溶液，另一份中加入相同体积的溶剂，然后测定二份血清的尿素含量。由尿素溶液的浓度及加入体积可算出加入的尿素量，由实测值可计

算尿素的回收量,回收量与加入量之比值即为回收率。在三种不同加入量的情况下,尿素-酶FET测定尿素的回收率如表

3所示。三种加入量的回收率分别为102.2%、97.4%及99.7%,平均回收率为99.77%。该结果说明用尿素-酶FET测定

表 3 尿素-酶FET测定尿素的回收率

Table 3 Recovery of urea-ENFET for determination of urea

血清样品		Sample		添加的尿素			测定值 Detected conc. (mg/dl)	回收量 Recovered amount (mg)	回收率 Recovery (%)
No.	体 积 Volume (ml)	浓 度 Conc. (mg/dl)	体 积 Volume (ml)	加 入 量 Added am- ount (mg)					
1	A	0.5	500	0.1	0.5	101.03	0.5113	102.2	
	B	0.5	0	0.1	0	15.80			
2	A	0.5	500	0.05	0.25	61.92	0.2486	97.4	
	B	0.5	0	0.05	0	17.62			
3	A	0.5	500	0.02	0.1	39.25	0.0997	99.7	
	B	0.5	0	0.02	0	20.08			

平均回收率 Average recovery: 99.77%

表 4 用酶法及酶-FET法测定的BUN(血中尿素氮)值数据

Table 4 Data of BUN(blood urea nitrogen) determined by both enzymatic and enzyme-FET methods

样品号 Sample No.	BUN(mg/dl)		样品号 Sample No.	BUN(mg/dl)	
	酶法 Enzymatic method	酶-FET法 Enzyme-FET method		酶法 Enzymatic method	酶-FET法 Enzyme-FET method
1	16.8	16.5	26	14.0	13.8
2	11.0	10.5	27	29.0	26.0
3	21.0	21.0	28	10.0	10.0
4	16.5	15.2	29	20.0	20.5
5	14.3	14.0	30	12.0	11.4
6	9.0	9.4	31	15.0	15.2
7	13.8	13.8	32	9.9	9.8
8	10.3	10.5	33	4.4	4.3
9	13.8	12.9	34	10.0	11.1
10	44.1	39.7	35	15.0	12.9
11	51.7	51.4	36	7.7	7.0
12	14.0	12.7	37	18.0	19.4
13	13.0	11.5	38	10.0	11.2
14	15.0	13.8	39	8.4	7.8
15	19.0	17.8	40	11.0	12.5
16	23.0	20.3	41	16.0	14.5
17	13.0	13.6	42	27.0	28.2
18	19.4	17.2	43	18.0	16.0
19	21.0	18.4	44	46.0	46.3
20	11.0	11.9	45	25.0	26.6
21	14.0	13.8	46	10.0	9.2
22	6.7	6.9	47	17.0	16.0
23	61.0	59.7	48	16.0	16.5
24	14.0	13.8	49	17.0	17.9
25	19.0	18.4	50	10.0	9.5

回归方程 Regression equation $y = -0.1272 + 0.9895x$

相关系数 Correlation coefficient: $r = 0.9912$

血清中尿素含量时, 其准确性较好。

(三) 尿素-酶FET的应用

用尿素-酶FET对50例病人血清的尿素氮BUN(Blood urea nitrogen)值进行了测试, 并与酶法测定的结果进行比较, 表4为该50个样品的测试结果。其中 x 为用酶法测得的数据, y 为用酶FET法测得的数据。由表4所列的数据可得回归方程: $y = -0.1272 + 0.9695x$ 。并计算得两种方法之间的相关系数 γ 为0.9912。根据以上实验结果, 尿素-酶FET可以用于临

床分析的尿素氮含量测定中。与酶法测定BUN的过程相比, 用尿素-酶FET法测定血清中尿素氮含量有以下优点: 1. 操作简便, 且除缓冲液外不需任何其他试剂; 2. 快速。分析一个样品仅需3min左右, 故每小时可完成20个样品的分析; 3. 重复性好。重复测定同一样品时变异系数CV为1.49%, 优于酶法测定的2.7—3.9%。因此, 该测试系统经进一步改进后, 作为一种快速、准确的尿素氮测定方法在临床分析中将会有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Clark, L.C. and Lyons, C.: *Ann. N.Y. Acad. Soic.*, 102: 29, 1962.
- [2] Hicks, G. and Updike, S.: *Anal. Chem.*, 38: 726, 1966.
- [3] Guilbault, G.G. and Montalvo, J.G.: *J. Am. Chem. Soci.*, 92: 2533, 1970.
- [4] Guilbault, G.G. and Montalvo, J.G.: *ibid.*, 91: 2164, 1969.
- [5] Llenado, R.A.: *Anal. Chem.*, 46: 1109, 1974.
- [6] 中根清司等: *临床检查*, 20: 1096, 1976.
- [7] Guilbault, G.G. and Tarp, M.: *Anal. Chim. Acta*, 73: 355, 1974.
- [8] Nilsson, H. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 320: 529, 1973.
- [9] Ruzicka, J. et al.: *Anal. Chem.*, 51: 199, 1979.
- [10] Caras, S. and Janata, J.: *Anal. Chem.*, 53: 1935, 1980.
- [11] Hanazata, Y. et al.: *Proc. Int. Meeting on Chem. Sensor*, 513, 1983.
- [12] 宫原裕二等: *日本化学会誌*, 6: 823, 1983.
- [13] Miyahara, Y. et al.: *Anal. Chem. Symp. Ser.*, 17: 501, 1983.
- [14] Bart, H. et al.: *Biosensors*, 3: 161, 1987/88.
- [15] Miyahara, Y. et al.: *Sensors and Actuators*, 7: 1, 1985.
- [16] 钟丽婵等: *生物工程学报*, 6(2): 145, 1990.
- [17] 汪正孝等: *生物工程学报*, 6(2): 151, 1990.

Miniature Urea Sensor Based on H^+ -ion Sensitive Field Effect Transistor and Its Application in Clinical Analysis

Zhong Lichan¹, Han Jinghong²,
Li Gaoxiang¹, Cui Dafu²,
Fan Jie², Yang Xiuliang³

Institute of Microbiology Academia Sinica, Beijing)¹

Institute of Electronics Academia Sinica, Beijing)²

Department of Biology, Shan Dong University, Shan Dong)³

An urea-ENFET (Enzyme field effect transistor) probe was made by modifying one gate of the dual ISFET (Ion sensitive field effect transi-

stor) with a membrane of cross-linked bovine serum albumin(BSA)-urease and the other with cross-linked BSA, and the response characteristics of the probe was then tested through differential measurement. In different concentration of phosphate buffer, the sensor responded to various concentrations of urea solution within 10—60 s. From the calibration curve plotted on logarithmic scales a linear concentration range of 1.0—8.0mg/dl was acquired, and the correlation coefficient and response sensitivity were 0.997 and 50mV/dec.(mg/dl) respectively. However, in low concentration urea solution, the sensor responded linearly to urea over the concentration 0.1—1.0mg/dl with a correlation coefficient of 0.998 and a response sensitivity of 12—15mV/dl. The standard deviation and variation coefficient for 20 times performances response to 100mg/dl urea in 0.01M pH7.0 phosphate buffer were found to be 1.39mV and 1.44% respectively. The urea-ENFET was used for determining BUN (Blood urea nitrogen) and the BUN values were compared with those determined by enzymatic method, the regression equation and correlation coefficient for 50 assays were $y = -0.1272 + 0.9695 x$ and $r = 0.9912$ respectively. When the urea-ENFET was used for determining urea either in beffer solution or in serum for 250 runs over a period of 1.5 months (the enzyme FET was stored at 4 °C between measurements during this period), the response sensitivity decreased by about 10%. Thus, the urea-ENFET has a potential application in clinical analysis for determining the urea content in human serum.

Key words

H⁺-ISFET (H⁺-ion sensitive field effect transistor); ENFET (Enzyme field effect transistor); immobilized urease membrane; urea sensor