

两步活化法制备葡萄糖氧化酶电极的研究^{*}

郭刚军, 刘 鹏, 谢文林, 阮继武, 古练权

(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 采用多步活化法制备的聚乙烯醇膜, 可在温和的条件下实现酶的固定化。用对甲基苯磺酰氯处理聚乙烯醇膜, 与二乙胺反应引入氨基, 再用戊二醛处理, 最后用取得的活化膜载体可在温和条件下固定葡萄糖氧化酶。所得酶膜与碘离子选择性电极组装成的葡萄糖氧化酶电极, 测定葡萄糖浓度时, 线性响应范围为 $1.6 \times 10^{-4} \sim 5.8 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。

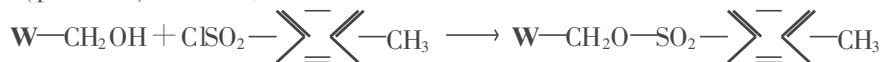
关键词: 聚乙烯醇; 葡萄糖; 碘离子选择电极; 酶膜

中图分类号: O652 3; Q554 4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 04-0049-03

生物传感器在医学检验和药物测试中有着很重要作用。生物传感器膜的成膜和活化方法的探索是生物传感器研究中的关键问题, 聚乙烯醇具有良好的机械强度和亲水性, 是制备酶电极膜的理想载体。常用物理包埋法制备聚乙烯醇酶膜, 但酶易漏失, 电极寿命短; 聚乙烯醇上有大量的羟基, 亦可用溴化氰^[1] 和有机磺酰氯^[2] 进行活化后再固定酶, 但用这些方法活化的载体在用于酶的固定化时, 反应需在碱性条件 ($\text{pH} > 8.5$) 下进行, 许多酶在此

条件下会损失较大的活力。为了克服聚乙烯醇作为载体制备酶膜的不足, 本文试验了用多步活化的化学方法来制备聚乙烯醇酶膜。即先用对甲基苯磺酰氯与聚乙烯醇反应, 所得产物与乙二胺反应使聚乙烯醇上膜引入氨基, 再用双功能基团试剂戊二醛活化, 最终获得的活化载体可在非常温和条件下用于酶的固定化。本文所用的试剂均为常规试剂, 反应也在常规条件下进行, 操作简单, 所得酶活力较高。

二步法活化、固定化酶过程如下:



A



B



C



E = Enzyme

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

葡萄糖氧化酶 (Type X S, Sigma), 辣根过氧化物酶 (RZ 3, 上海丽珠东风生物技术公司), 牛血清蛋白 (电泳纯, 北京红兴化学试剂厂), 4 氨基安替比林 (分析纯, 北京西中化工厂), 对甲基苯磺酰氯 (化学纯, 上海佘山化工厂), 戊二醛 (25%高纯试剂, NACAL TESQUE), 乙二胺 (分

析纯, 广东汕头平安化工厂), 聚乙烯醇 (平均相对分子质量 22 000, 进口分装)。

超级恒温水浴 (南通科学仪器厂), WL-15 微离子计 (江苏电分析仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 酶活力和蛋白浓度的测定 葡萄糖氧化酶和过氧化酶活力测定参照文献 [3] 方法; 蛋白浓度测定参照文献 [4], 以牛血清蛋白为基准做标准

* 收稿日期: 2002-01-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20032021)

作者简介: 郭刚军 (1963-), 男, 博士, 通讯联系人; 古练权; Email: cedc14@zsu.edu.cn

曲线。

1.2.2 电极膜的制作

(1) $\rho=5\%$ 聚乙烯醇水溶液铺膜后, 参照文献 [5] 方法冷冻固化成膜, 后冷冻干燥, 待用。

(2) 干燥聚乙烯醇膜用 $\varphi=50\%$ 丙酮水溶液充分浸泡、洗涤, 用丙酮洗涤 3 次, 最后用干燥丙酮 (氯化钙干燥) 洗涤 3 次, 待用。

(3) 称取 5 g 对甲基苯磺酰氯溶于 10 mL 干燥丙酮配成溶液, 将溶液加到处理过的聚乙烯醇膜, 加入 5 mL 吡啶作催化剂, 振荡, 室温下其充分反应 1 h。用丙酮洗涤 3 次, 再用 1 mmol/L 的 HCl 溶液和蒸馏水充分洗涤, 即得引入对甲基苯磺酰的聚乙烯醇膜。

(4) 取上步处理过的聚乙烯醇膜, 加入 0.1 mol/L 乙二胺的乙醇溶液, 室温下振荡反应 1 h, 用蒸馏水充分洗涤, 即得引入氨基的聚乙烯醇膜。

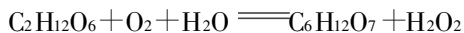
(5) 取上步处理过的聚乙烯醇膜, 加入 $\varphi=2\%$ 的戊二醛溶液, 室温下反应 5 h, 用 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液充分洗涤, 即得活化的聚乙烯醇膜。

(6) 将活化的聚乙烯醇直接浸入葡萄糖氧化酶和过氧化物酶 (两者活力比为 1:2) 混合溶液, 在 4 °C 反应过夜, 即得活化的聚乙烯醇膜。

1.2.3 葡萄糖氧化酶电极测定

(1) 葡萄糖氧化酶电极的组装。取适当大小的葡萄糖氧化酶膜圆片, 用尼龙网固定在 303 型碘离子选择电极 (江苏分析仪器厂) 上即得葡萄糖氧化酶电极。

(2) 测试原理。将葡萄糖氧化酶电极置入葡萄糖溶液时, 在电极膜中葡萄糖氧化酶作用下葡萄糖被氧化为葡萄糖酸:



生成的 H_2O_2 在过氧化物酶的作用下使电极膜附近的 I^- 被氧化:



I^- 选择性电极附近的 I^- 浓度变化, 引起的电极电位变化, 是酶电极测定葡萄糖浓度的基础。

(3) 测试。在 WL-15 微电脑离子计上进行。准确移取 20 mL KI (5.8×10^{-3} mol/L) + 磷酸盐 (0.2 mol/L pH 5.5) 缓冲液于烧杯中, 置入葡萄糖氧化酶电极和甘汞电极 (参比电极), 待电位稳定后测量得空白电位; 然后精确加入 0.1 mL 不同浓度的葡萄糖标准溶液, 待电位稳定后记录电位值; 加入葡萄糖后测得的电位与空白电位的差值 ΔE 对葡萄糖浓度的负对数 $-\lg c$ 作图即得葡萄糖氧化酶电极的标准工作曲线。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖氧化酶电极膜的制备

2.1.1 固定化的酶浓度对电极膜活力的影响 将活化的聚乙烯醇膜分别浸入浓度为 1, 5, 10, 20, 30, 40 mg/mL 的葡萄糖氧化酶溶液, 在 4 °C 反应过夜, 测定膜的酶活力, 结果表明酶浓度影响固定到膜的酶活力, 酶浓度为 20 mg/mL 时, 固定酶的活力最大。

2.1.2 戊二醛浓度对酶膜活力的影响 引入氨基的聚乙烯醇浸入不同浓度的戊二醛溶液室温反应 5 h 后浸入 10 mg/mL 的葡萄糖氧化酶溶液进行反应, 发现戊二醛浓度对膜上固定酶活力有影响, 戊二醛的最适浓度为 2%。

2.2 葡萄糖氧化酶电极的电位对葡萄糖浓度响应

加入葡萄糖后测得的电位与空白电位 (葡萄糖浓度 $c=0$) 的差值 ΔE 随葡萄糖浓度 (c) 负对数变化而变化, 如图 1 所示。电位差值 ΔE 与葡萄糖浓度的对数在 c 为 $1.6 \times 10^{-4} \sim 5.8 \times 10^{-3}$ mol/L 范围内呈线性关系, 斜率为 69.1 mV。

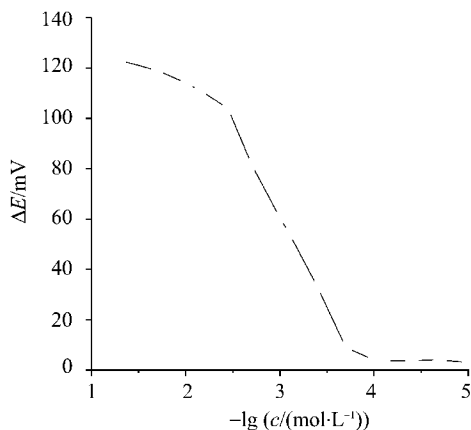


图 1 电极电位与葡萄糖浓度的关系

Fig. 1 The relationship between potential of electrode and concentration of glucose

KI (5.8×10^{-4} mol/L) + 磷酸盐 (0.2 mol/L) 缓冲液, pH 5.5, 25 °C

2.3 pH 值和测试介质对电极响应的影响

(1) pH 值对电极响应的影响很大, 结果表明, pH 5.0 时电位差值最大, 见图 2。一方面, H_2O_2 氧化 I^- 需要 H^+ 参与反应; 另一方面葡萄糖氧化酶作为生物催化剂, 作用 pH 范围为 5.0~6.8, pH 值过低会使酶活性降低。实验发现可在 pH 5.0~5.5 进行葡萄糖浓度的测定。

(2) 实验表明, 缓冲液的浓度对葡萄糖氧化酶电极测定有影响, 当磷酸盐缓冲液浓度小于 $1 \times$

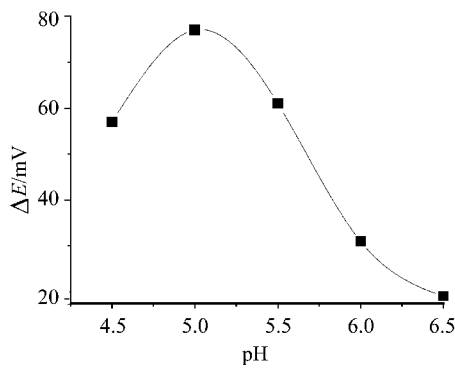


图 2 pH 值对葡萄糖氧化酶电极测试的影响
Fig 2 Effect of pH on the electrode of glucose oxidase
KI ($5.8\times10^{-3}\text{mol/L}$) + 磷酸盐 (0.2mol/L) 缓冲液,
 $c(\text{葡萄糖})=1\times10^{-3}\text{mol/L}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

10^{-2}mol/L 时电位不稳定, 浓度达到 0.1mol/L 时才
可得到稳定读数; $c(\text{I}^-)$ 对测试也有影响, $c(\text{I}^-)$ 越
小电位差 ΔE 越大, 测定灵敏度越好, $c(\text{I}^-)$ 取 $1\times$
 10^{-4}mol/L 时测定葡萄糖浓度时有较好的电极响
应。

2.4 电极对葡萄糖浓度的测定回收率

取标准葡萄糖溶液, 用酶电极测定的浓度值与实
际浓度之比即得电极测定的回收率。表 1 列出了用
酶电极测定已知葡萄糖浓度的回收率。

表 1 酶电极测定不同浓度葡萄糖的回收率

Tah 1 The recovery of glucose in different concentrations
on the electrode of glucose oxidase

$c^1)$	0.193	0.286	0.872	1.04	2.73	3.61	4.23	5.09
回收率/%	97.6	98.1	99.3	101.3	99.1	101.6	99.2	99.7

1) c 的单位为 $10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

2.5 葡萄糖氧化酶电极的稳定性

将聚乙烯醇膜保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7.0 的磷酸缓冲
溶液, 每隔 7 d 取出组装成酶电极, 在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 测
定 $1\times10^{-3}\text{mol/L}$ 葡萄糖溶液。发现 6 个月后酶电
极测得的电位差仍保持了初始值的 84% 以上, 说
明葡萄糖氧化酶电极具有理想的使用寿命和良好的
储存稳定性。

本文讨论的酶的固定化及制膜方法从理论上
讲, 也适应于其它含羟基载体的活化。所用试剂容
易获得, 操作过程简单, 且活化的载体可在非常温
和的条件下用于活性蛋白分子的固定化, 固定化酶
有较高活力回收。

参考文献:

[1] MARCH S C, PARIKH I, CUATRECASAS P. A simplified
method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity
chromatography[J] . Anal Biochem, 1974, 60: 149— 152.
[2] NILSSON K, MOSBACH K. Immobilization of enzymes and
affinity ligands to various hydroxyl group carrying supports us-
ing highly reactive sulphonyl chlorides[J] . Biochem Biophys
Res Commun, 1981, 102: 449— 451.
[3] 张国雄, 戴愉勤, 朱夫民, 等. PVA-葡萄糖氧化酶膜制
备的研究[J] . 生物工程学报, 1991(7): 242— 246.
[4] SPECTOR P K. Refinement of the coomassie blue method of
protein quantitation[J] . Anal Biochem, 1978, 86: 142—
146.
[5] 侯惠民. 控释与靶向辅料品种 // 张光杰. 药用辅料应
用技术[M] . 北京: 中国医药科技出版社, 1991: 382.

Two step Method for Preparation of Glucose
Oxidase Membrane for Enzyme Electrode

GUO Gang jun, LIU Peng, XIE Wen lin, GU Lian quan

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat sen(Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Polyvinyl alcohol (PVA) was used as support to develop a new type of enzyme membrane for glucose oxidase
electrode. The PVA membrane was first activated with *p* toluenesulfonyl chloride followed by coupling with ethyldiamine.
After treated with glutaraldehyde, the PVA membrane was immobilized with glucose oxidase. The enzyme membrane was
used to construct glucose oxidase electrode. The linear range was $6\times10^{-4}\sim5.8\times10^{-3}\text{mol/L}$ for determination of glu-
cose.

Key words: polyvinyl alcohol; glucose; iodine ion selective electrode; enzyme membrane