

一种免受乙醇干扰的 GOD 的酶电极

胡伟平 张晓梅 张先恩 危宏平 张治平

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘要 将酶电极应用于发酵糖的测定时,与糖共存的乙醇常常会影响测糖的准确性,通过对葡萄糖氧化酶(GOD)电极的研究,探讨了乙醇对测糖酶电极测定影响,进而研制出抗干扰的 GOD 酶电极,若是 GOD 电极的酶膜通过夹心法制备,在乙醇含量为 0.1% (V/V) 时,即产生显著的影响,使测定结果偏大 4.3%,且乙醇的影响随浓度的升高而增大,若用尼龙网固定 GOD 膜, GOD 电极在测定 20mmol/L 和 5mmol/L 左右的葡萄糖溶液时,含量高达 9% 的乙醇仍未对测定产生显著的影响,表现出良好的不受乙醇干扰的特性,并且,该尼龙网 GOD 电极具有良好的重复性、稳定的响应活性及较长的保存期。

关键词 葡萄糖氧化酶, 固定化酶, 酶电极, 葡萄糖测定, 乙醇干扰, 抗干扰

自 Updike 等^[1]创立酶电极法,迄今已报道了一大批用于测糖的生物传感器^[2-12],测糖传感器主要应用于发酵过程中糖浓度的监测及临床血糖测定。

在将酶电极用于某一具体环境时,常常需要克服特定理、化因子的干扰,以确保测定的准确性。例如在酵母发酵过程中,总伴随着乙醇的产生。而乙醇的存在常常会对酶电极的检测产生一定的干扰。此时,测糖酶传感器实用化的前提之一是必须有效地排除乙醇的干扰。由于葡萄糖氧化酶(GOD)电极是最经典的酶电极,人们研究得最多,应用最广,且已商品化,因此本文以它为主要研究对象,探讨乙醇的影响,研制出抗干扰的酶电极。

1 材料和方法

1.1 酶电极制作

1.1.1 BSA 法制备 GOD 酶膜^[10] 主要试剂: GOD(Sigma, E. C. 1. 1. 3. 4., Type II, 18 500IU/g)溶于蒸馏水,浓度为 4% (W/V),牛血清白蛋白(BSA,浙江黄岩人民化工厂,生化级)溶于 0.2mol/L 醋酸缓冲液,浓度为 20% (W/V),戊二醛(上海化学试剂厂,分装,25%)用蒸馏水稀释至 2% (V/V)。

酶电极制作: 3 μ l BSA 溶液, 4 μ l GOD 溶液和 2 μ l 戊二醛溶液在直径 2cm 的 Teflon 薄膜上均匀扩散,静置交联反应 10 分钟(25 $^{\circ}$ C)形成酶膜,再于酶膜之上覆盖一层透析膜,将此复合膜固定于氧电极外套顶端(透析膜向外),即成为酶电极。

1.1.2 尼龙网固定 GOD 酶膜^[13-14] 材料: 三种尼龙网(N1, N2, N3)为市售, GOD(Sigma, E. C. 1. 1. 3. 4., Type II, 18 500IU/g)溶于蒸馏水,浓度为 4% (W/V),

戊二醛（上海化学试剂厂，分装，25%），甲醇（分析纯，广东汕头化工一厂），乙二醇胺（分析纯，武汉制氮厂）。

1.1.3 GOD 酶膜的制备：(a) 尼龙网的水解：将 N1, N2, N3 三种尼龙网各两张 ($\Phi=20\text{mm}$) 在 45°C 水浴中用 18.6% 氯化钙-18.6% 水-甲醇溶液浸泡 30 分钟，再用 3.65 mol/L 盐酸溶液水解 30 分钟后立即将尼龙网浸于冰水浴中，并洗至中性。(b) 联戊二醛：方法 A：用 0.2 mol/L, pH8.5 的硼酸缓冲液配制 7.8% 的戊二醛并与乙二醇胺按 3.8:1 的摩尔比混溶 (25°C)，在小烧杯中搅拌 30 分钟，取经水解处理的 N1, N2, N3 膜各一张浸入其中，立即放入 4°C 冰箱中反应 4 小时，取出水洗至中性，再用 0.1 mol/L HCl 洗涤，脱去乙二醇胺，然后用 0.05 mol/L, pH7.5 的磷酸缓冲液洗至中性，立即进行联酶反应。方法 B：将剩余的 N1, N2, N3 膜各一张直接浸入装有 7.8% 戊二醛（用硼酸缓冲液配制）的小烧杯中，在 4°C 冰箱中反应 4 小时，再用 0.05 mol/L, pH7.5 的磷酸缓冲液洗至中性，立即进行联酶反应。(c) 联酶反应：以含 1 mg/ml 的酶-磷酸缓冲液 (pH7.5) 在 4°C 下对经上述处理的尼龙网进行联酶反应（过夜），再用 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液洗涤至无游离酶蛋白，即得到固定化酶尼龙网，将此网固定于氧电极外套顶端的 Teflon 膜外，即成为酶电极。

2 工作系统和测试过程

采用多功能自动进样阀 (V-16A)，自制的智能酶电极葡萄糖测定仪 (GAC-I) 等组成一连续流动测试系统（图 1），在测试过程中，自动阀定时、定量采集样品并与载液（蒸馏水）混合流经酶电极表面，产生响应信号（脉冲峰），经葡萄糖测定仪进行信号转换与处理，最后自动显示并打印测定结果，经载液连续洗涤，电极很快恢复到起始状态即可自动进行下次测定。工作条件：载液流速 2.8 ml/min，进样量 $50\mu\text{l}$ 。

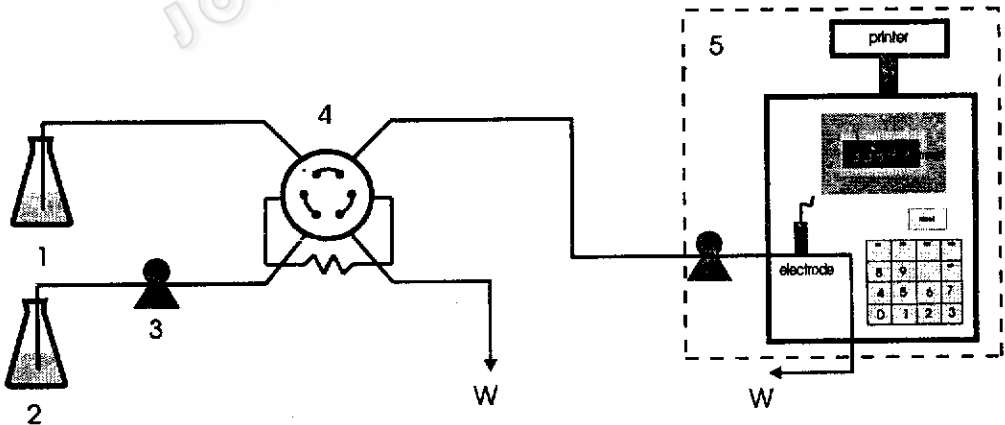


图 1 工作系统示意图

Fig. 1 Diagram of the working system

1. Carrier stream, 2. Glucose solution, 3. Peristaltic pump
4. Automatic sampling valve, 5. GAC-I, W. Waste

3 结果与讨论

3.1 乙醇对夹心法 GOD 酶电极测定的干扰

顺序配制含梯度乙醇的葡萄糖样品 (No. 1—9), 乙醇浓度从 0—13.04% (V/V), 检测不同浓度的乙醇对 GOD 酶电极测定葡萄糖的影响。工作条件为室温 ($\sim 18^{\circ}\text{C}$), 每份样品连续测 10—13 次, 取其平均值 \bar{X} , 实验结果见表 1。

表 1 乙醇对夹心法 GOD 酶电极测定的干扰

Table 1 Disturbance of alcohol to GOD electrode (Sandwich)

Sample No.	Glucose (mmol/L)	Alcohol content (%)	\bar{X} (mmol/L)	Response increase (%)	Net increase (%)
1	20.00	0	21.54	7.7	0
2	20.00	0.005	21.27	6.35	-1.35
3	19.99	0.01	21.77	8.91	1.21
4	19.99	0.05	21.82	9.16	1.46
5	19.98	0.1	22.38	12.00	4.3
6	19.90	0.5	21.89	10.00	2.3
7	19.80	0.99	22.17	11.97	4.27
8	19.05	4.76	21.81	14.49	6.79
9	17.39	13.04	20.18	16.04	8.34

实验表明, 低浓度乙醇 ($\leq 0.05\%$) 对该 GOD 酶电极无显著的影响, 但随乙醇浓度的增加, 其影响则越来越大, 当乙醇浓度为 4.76% (V/V) 时, 即可使测定值偏大 6.79%, 由此可见, 较高浓度的乙醇存在时, 该 GOD 电极测定的准确性会受到很大干扰, 下面将对其原因进行分析和讨论。

夹心法是一种最常见的酶膜制备方法, 操作简便, 易于掌握, 并广泛应用于各种酶电极的制备, 本实验采用的酶膜由三层膜制成: (1) Teflon (位于最里层), 具有对 O_2 的选择透性; (2) BSA-GOD 交联膜, 为固定化酶; (3) 透析膜 (位于最外层), 主要起保护和支持作用, 它允许小分子物质通过, 可阻止大分子及微生物进入, 并防止 GOD 流失, 从夹心膜的结构来看, 上述三层膜中最外层的透析膜受乙醇影响的可能性最大, 因为只有该膜直接与含乙醇的样品溶液接触, 在流动注射分析系统 (FIA) 中, 样品瞬时流过电极表面, 在此瞬间, 样品中的乙醇透过透析膜的量极少, 不会对内部的 (1) (2) 两层膜产生显著的影响。并且在通常情况下, 透析膜在使用之前需要在乙醇中浸泡进行亲水处理。由此可见, 乙醇能影响透析膜对水溶液中溶质分子的透过性, 如果上述推论成立, 则样品中的乙醇导致透析膜对葡萄糖的透过量增大是测定结果偏大的原因, 下面将改变酶膜制作工艺, 用尼龙网固定 GOD 酶替代夹心法, 以期消除或减小乙醇的干扰。

3.2 尼龙网 GOD 酶电极的响应活性

选用 3 种尼龙网材料 (N1, N2, N3), 分别通过 2 种方法 (A 和 B) 进行固定化酶处理, 并分别制成酶电极。在自制的酶电极仪上检测各酶电极对一定浓度葡萄糖样品的

响应活性 (用响应数值 D 表示, 该仪器的满度值为: 333), 找出制备酶膜的最适材料和方法。

实验中样品葡萄糖浓度为 10mmol/L, 在室温 (约 28℃) 下, 每个酶膜连续测 10 次, 记录响应值, 实验结果见表 2。

表 2 尼龙网固定 GOD 酶电极的响应活性

Table 2 Response activity of GOD electrode with nylon mesh

Membrane type	Response (D)	Average response (D)
N1A	80, 82, 88, 88, 88, 87, 86, 86, 87, 87	86
N1B	66, 64, 68, 68, 64, 60, 64, 65, 65, 64	65
N2A	109, 112, 112, 110, 110, 109, 109, 110	110
N2B	46, 55, 48, 55, 53, 54, 52, 53, 53, 52	52
N3A	5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5	5
N3B	12, 10, 10, 11, 10, 11, 10, 10, 10, 10	10

比较检测结果发现, 采用方法 A 在材料 N1 和 N2 上固定化酶的活性较高, 尤其以 N2A 的响应最灵敏, 活性最高, 因此, 首先选用该酶膜制成的酶电极进行乙醇耐受性实验, 检测其抗干扰能力。

3.3 尼龙网 GOD 酶电极抗干扰性能的测试

参照乙醇对夹心法 GOD 酶电极的干扰实验, 分别对两种不同浓度范围的葡萄糖样品 (含乙醇) 进行检测, 乙醇浓度从 0—9.09%, 连续测定各样品 20 次, 取其平均值进行数据分析, 结果见表 3。

表 3 尼龙网 GOD 酶电极抗乙醇干扰的性能

Table 3 Result of N2A GOD electrode resistance to Alcohol

Sample No.	Glucose (mmol/L)	Alcohol content (%)	\bar{X} (mmol/L)	Response increase (%)	Net increase (%)
A1	20.00	0	20.28	1.4	0
A2	19.99	0.02	20.13	0.7	-0.7
A3	19.98	0.1	20.06	0.41	-0.99
A4	19.9	0.5	19.98	0.4	-1
A5	19.8	0.99	20.44	3.23	1.83
A6	19.05	4.76	19.53	2.50	1.48
A7	18.18	9.09	18.72	2.97	1.57
B1	5.00	0	5.09	1.81	0
B2	4.99	0.02	5.12	2.64	0.83
B3	4.99	0.1	5.14	3.00	1.19
B4	4.97	0.5	5.03	1.17	-0.64
B5	4.95	0.99	4.90	-1.01	-2.82
B6	4.76	4.76	4.72	-0.77	-2.58
B7	4.55	9.09	4.73	3.93	2.12

实验结果表明, 当葡萄糖样品为 20mmol/L 时, 乙醇浓度从 0 增至 9.09%, 测定值

的净变化均在 $\pm 2\%$ 以内,即使在乙醇浓度高达 9.09%,测定值也仅净增加 1.57%,且测定值的变化并不与乙醇浓度相关,只是在检测系统的误差范围内波动。

在检测 5mmol/L 葡萄糖样品时,测定值的变化(%)范围略有增大,接近 3%,但也未呈现随乙醇浓度升高而增大的趋势,由于 5mmol/L 的葡萄糖已接近仪器的检测下限,检测误差增大在所难免,仪器在正常条件下测定的误差也将达到或超过 $\pm 3\%$ 。

通过检测不同浓度的乙醇对 5mmol/L 和 20mmol/L 葡萄糖溶液测定的影响,可以得出这样的结论:该尼龙网酶电极具有良好的抗乙醇干扰能力。

3.4 尼龙网 GOD 酶电极的误差分析

配制浓度为 5 和 20mmol/L 的葡萄糖样品,分别连续测定各样品 20 次,进行误差分析,其结果见表 4。

该尼龙网 GOD 电极检测 20mmol/L 葡萄糖样品的变异系数为 1.17%,对较低浓度的 5mmol/L 样品的 CV 值也仅 2.8%,结果表明,该 GOD 酶电极的重复性很好,达到了实用化要求。

表 4 尼龙网 GOD 酶电极的误差分析

Table 4 Error analysis of GOD electrode with nylon mesh

Sample (mmol/L)	\bar{X} (mmol/L)	SD (mmol/L)	CV (%)
20	20.284	0.2375	1.17
5	5.095	0.167	2.8

3.5 尼龙网 GOD 酶电极的响应稳定性

通过定时检测尼龙网 GOD 电极对 10mmol/L 葡萄糖溶液的响应值,可以了解到酶电极响应活性的变化,图 2 为 N1A, N2A 酶电极的实验结果,经过连续 5 天的检测, N2A 酶电极的响应值为初始状态的 102.3%,酶电极对葡萄糖的响应活性基本没下降,表明该酶电极的稳定性很好。由于未采用控温装置,曲线中的波动主要是由于环境温度的变化所引起的, N1A 酶电极的响应值有一定程度的下降,经过 5 天的实验,响应值为初始状态的 84%,其稳定性比前者略差,从实验结果来看,只要适时(每隔 3—5 小时)采用标准的葡萄糖溶液对酶电极进行标定,就能满足实际应用的需要。

3.6 尼龙网 GOD 酶电极的保存期

实验于 4—5 月进行,室温为 15—30℃,隔日测定 N1A 和 N2A 酶电极的响应活性,每次实验后取下安装有酶膜的电极套,于磷酸缓冲液(pH=7.5, 0.05mol/L)中 4℃ 湿态保存,实验结果见表 5, N2A 酶膜在 20 天后仍然保持原有活性。由此可见,该酶膜至少可以保存一个月以上。

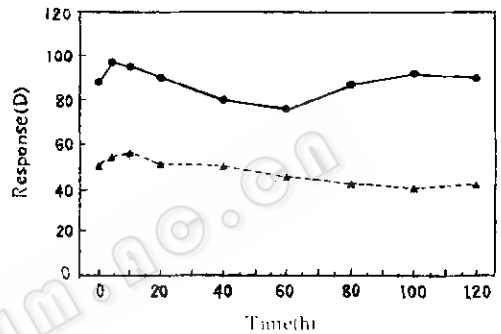


图 2 酶电极的响应稳定性

Fig. 2 Stability of GOD electrode with nylon mesh

Dotted curve: N1A electrode; Solid curve: N2A electrode

表 5 尼龙网 GOD 酶电极的保存稳定性

Table 5 Storage life of GOD electrode with nylon mesh

Membrane type	Remained activity (%)		
	1	10	20 (d)
N1A	100	80	50
N2A	100	100	100

4 结 论

实验表明,乙醇的存在对 GOD 电极有一定影响,并且浓度越高干扰越大,采用尼龙网固定 GOD 代替夹心法,这种干扰被基本消除,因此推断,样品中的乙醇能影响透析膜对葡萄糖的通透性,从而导致测定结果偏高,本研究为建立抗乙醇干扰的酶电极提供了一种有效手段。

参 考 文 献

- [1] Updike S L *et al.* *Nature*, 1967, 214: 986.
- [2] Satoch I *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1976, 18: 269.
- [3] Karube I *et al.* *Europ J Appl. Microbiol. Biotechnol*, 1979; 7: 343.
- [4] Hirose S *et al.* *J Molec Catal*, 1979, 6: 251.
- [5] Enfors E J *et al.* *Enzyme Microb Technol*, 1981, 3: 29.
- [6] Graham A *et al.* *Biotech Advance*, 1985, 3: 209.
- [7] Wollenberger U *et al.* *Analytica Chimica Acta*, 1986, 187: 39.
- [8] Satoch I *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1976, 18: 296.
- [9] Hamid J A *et al.* *Analyst*, 1988, 113: 81.
- [10] 张先恩等. *生物化学杂志*, 1990, 6 (4): 296—300.
- [11] 胡伟平等. *生物工程学报*, 1991, 7 (4): 339—344.
- [12] 张先恩等. *生物工程学报*, 1989, 5 (2): 140—145.
- [13] 孙志敏等. *生物工程学报*, 1990, 6 (2): 172—174.
- [14] 陈长治等. *生物工程学报*, 1986, 2 (2): 46—50.

A GOD Electrode Free from the Influence of Alcohol

Hu Weiping Zhang Xiaomei Zhang Xianen Wei Hongping Zhang Zhiping

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

Abstract The influence of alcohol on GOD electrode was investigated. When enzyme electrode was made by Sandwich method, 0.1% (V/V) alcohol had an obvious influence on the response of the electrode, the result deviated by +4.3%. The influence increased with the increase of alcohol content of samples. This influence can be avoided by using a nylon mesh GOD electrode, which was successfully used for determination of glucose in range of 5—20mmol/L with alcohol content up to 9% (V/V). Such an electrode showed a good reproducibility, stable response activity and long storage life (>30 days).

Key words Glucose oxidase, enzyme immobilization, enzyme electrode, glucose determination, ethanol influence, anti-interference