

尿酸酶-鲁米诺化学发光传感器

刘建国¹ 郭 健² 黎高翔¹

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)¹

(卫生部临床检验中心 北京 100730)²

摘 要 研制了依赖于鲁米诺化学发光反应和固定化尿酸酶柱的测定血清尿酸的生物传感器。其测定血清样品响应时间 47s, 测定每份样品需时 1.5min, 样品体积 17 μ l。工作曲线的线性范围 1~20mg/dl。批内不精密度 3.22%~4.36%; 批间 6.18%~7.8%。测定值回收率为 93%~109%。与医院常规酶试剂盒方法比较相关系数 $r=0.9909$ 。固定化尿酸酶柱室温使用, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 连续使用 5 个半月测定样品 2000 次以上, 仍保持原酶柱活力的 94%。

关键词 尿酸传感器, 化学发光, 流动注射分析, 固定化酶

鲁米诺 (Luminol) -H₂O₂ 化学发光经光敏二极管将光信号转变成电信号, 灵敏地反映出 H₂O₂ 的浓度。这系统用来检测经许多酶催化反应生成的 H₂O₂, 进而测定各种底物分子可分析至 10⁻⁶数量级^[1~6]。近年来, 基于这一系统的生物传感器的研究很活跃。这是因为光学传感较电极传感有许多优点: 不需要参考电极; 不受电噪声的干扰; 光学装置在体内监测安全, 当与光导纤维相连后, 微型探头可在体内连续动态观察被测物的变化, 不受生物体内生物电、磁的干扰; 灵敏度高。

血清中尿酸的浓度是临床诊断痛风症, 风湿性关节炎, 肾炎等疾病的指标。生物传感器的使用可使血清尿酸含量测定快速、简便。在尿酸酶电极^[9]研究中, 发现氧电极灵敏度达不到要求, 尤其当血清尿酸低于 3mg/dl 时, 信号微弱。而化学发光传感器具有较高的灵敏度, 与流动注射分析系统相结合, 可充分发挥其优越性。本文介绍的传感器是基于鲁米诺-H₂O₂ 化学发光反应的流动注射分析系统。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器: GJ-I 型微光光功率计 (机械电子工业部二十三所); FIA-BC 流动注射分析仪 (核工业部五所); 蠕动泵 P-1 (Pharmacia 公司); 150-20 双光束紫外分光光度计 (日本日立公司); 2210 记录仪 (LKB 公司)。

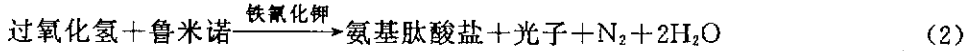
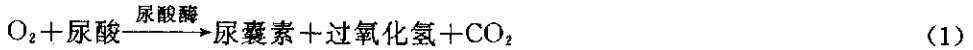
1.1.2 试剂: 尿酸酶 (德国 Boehringer 公司, 15u/mg, 917613); 微孔玻璃珠 (美国 Sigma 公司, 孔径 50.4nm, 120~200 目, PG-500-200); 鲁米诺 (美国 Sigma 公司, A-8511), 用 1mol/L pH13.4 硼酸-氢氧化钾缓冲液溶解, 浓度是 7mmol/L, 使用时经适当比例蒸馏水稀释; 铁氰化钾 (中国医药公司, 891212) 用蒸馏水配成 200mmol/L 储备液, 使用时用蒸馏水经适当稀释; 载流缓冲液 10mmol/L pH8.5 硼酸缓冲液; 其余试剂均为国产

本研究属传感技术国家重点实验室资助项目。
本文于 1994 年 3 月 14 日收到。

分析纯。

1.2 化学发光法测定尿酸的原理

血清中尿酸含量的测定基于以下 2 步偶联反应，反应式如下：



当反应体系中其它条件保持不变，则发光反应所产生的光强度与样品中尿酸含量成正比例。

1.3 化学发光传感器的构造

1.3.1 固定化尿酸酶柱的制备：微孔玻璃珠经 γ -氨基丙基 3-乙氧基硅烷在 80°C 下 3h 硅烷化后，与 1% 戊二醛室温活化，经蒸馏水充分洗涤去除多余戊二醛后，加入尿酸酶液 ($70\sim 100\text{u/ml}$)， 4°C 固定化过夜。把固定了酶的微孔玻璃珠装在直径 2mm，长 30mm 的硬塑料管内，组成固定化尿酸酶柱。

1.3.2 传感器的装配：图 1 表示传感器的流程，流动注射分析系统应用直径 1mm 的塑料管。缓冲液经蠕动泵流过手动进样阀后进入固定化尿酸酶柱；而鲁米诺和铁氰化钾试剂分别经蠕动泵后混合并流过一段延长管道（消除两试剂混合后的自然发光）与经过酶柱的反应液混合流入反应池进口，从出口流入废液缸。光敏探头（二极管）紧贴贴在反应池口上，把化学发光反应生成的光信号转换后输入微光功率计，由窗口显示微光功率值。

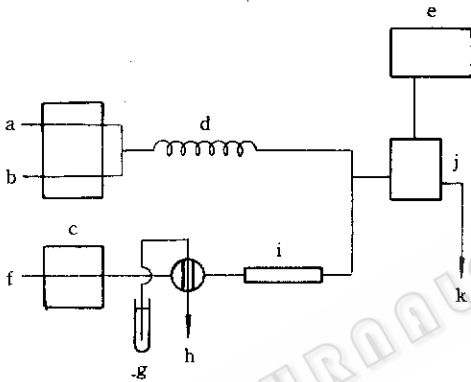


图 1 化学发光传感器流程图

Fig. 1 Flow diagram for the biosensor based on chemiluminescence

- a. Luninol
- b. Potassium ferricyanide
- c. Peristaltic pump
- d. Delay coil
- e. Luminophotometer
- f. Carrier-buffer
- g. Sample
- h. Valve injector
- i. Enzyme column
- j. Reaction cell
- k. Drain

2 结果与讨论

2.1 传感器使用条件的选择

鲁米诺化学发光反应非常灵敏，许多因素会影响反应产生光子的强弱。为了提高传感器信号的检出性能，使测定尿酸的灵敏度高，线性范围宽，分别观察了反应物和流速对化学发光反应的影响。

2.1.1 鲁米诺浓度对化学发光反应的影响：当浓度从 0.125mmol/L 增加到 1.4mmol/L 时，反应生成的光功率几乎成直线上升；当

浓度再继续从 1.4mmol/L 增加到 2.8mmol/L 时，反应生成的光功率缓慢下降（图 2）。

2.1.2 铁氰化钾浓度对化学发光反应的影响：当 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的浓度从 2.5mmol/L 增加到 5mmol/L 时，反应生成的光功率直线上升；而当浓度继续从 5mmol/L 增加到 10mmol/L 时，反应生成的光功率直线下降，后随着浓度再增加而缓慢下降（图 3）。

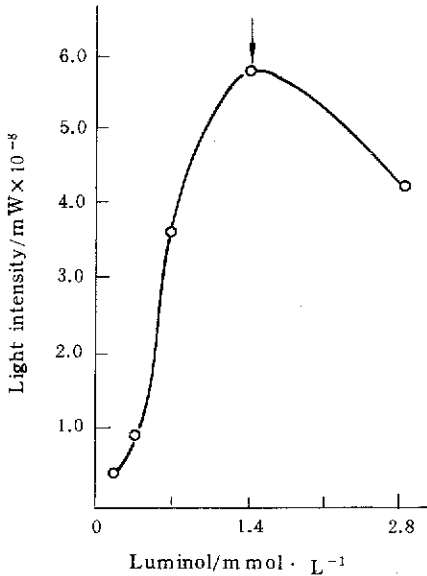


图2 鲁米诺浓度对反应发光强度的影响

Fig. 2 Effect of concentration of luminol on the light intensity

Conditions: 5mmol/L potassium ferricyanide, 6mg/dl uric acid, Reagent flow rate 1.35ml/min, Flow rate of carrier buffer 0.57ml/min, A vertical arrow indicates the condition finally employed

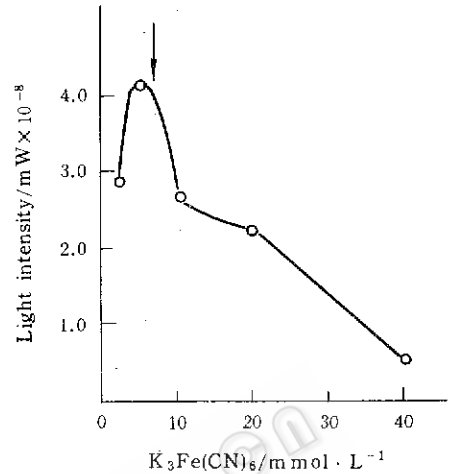


图3 铁氰化钾浓度对反应发光强度的影响

Fig. 2 Effect of concentration of potassium ferricyanide on the light intensity

Conditions: 0.7mmol/L luminol, 6mg/dl uric acid, Reagent flow rate 1.35ml/min, Flow rate of carrier buffer 0.57ml/min, A vertical arrow indicates the condition finally employed

2.1.3 载流(缓冲液)流速对化学发光反应的影响: 当硼酸缓冲液的流速从 0.1ml/min 增加到 0.6ml/min 时, 反应生成的光功率呈上升趋势, 流速继续从 0.6ml/min 增高到 0.8ml/min 时, 光功率下降。

2.1.4 鲁米诺、铁氰化钾试剂流速对化学发光反应的影响: 试剂流速从 0.25ml/min 增加到 1.8ml/min 时, 反应生成的光功率呈上升趋势。

实验中发现各参数间的适当配合也可降低噪音的干扰。考虑到上述诸因素, 选择传感器使用条件为: 1.4mmol/L 鲁米诺; 6.7mmol/L 铁氰化钾, 缓冲液流速 0.6ml/min, 试剂流速 1.35ml/min。

2.2 传感器性能及测定方法的评价

2.2.1 传感器的响应时间: 传感器采用上述条件, 样品体积 17 μ l, 分别测定不同尿酸浓度的血清样品, 反应产生的光功率从基线上升到最高值约需 47s, 测定每份样品平均需时 1.5min。

2.2.2 工作曲线的线性范围: 用透析处理后的血清分别配制不同尿酸浓度的标准样品, 传感器测定结果表明, 当血清中尿酸浓度在 1~20mg/dl 范围内, 测定的光功率值与浓度成线性关系 ($r=0.9999$) (图 4), 这线性范围宽于尿酸酶电极法^[9]和 Tabata, M.^[6]报道的相同类型传感器测定所得的结果。

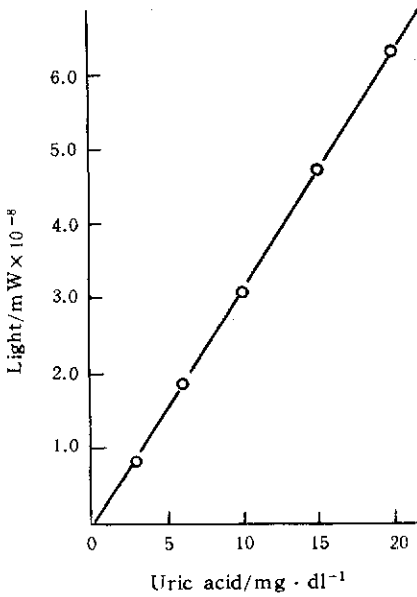


图 4 化学发光传感器工作曲线的线性范围

Fig. 4 Linear range of the working curve by the biosensor

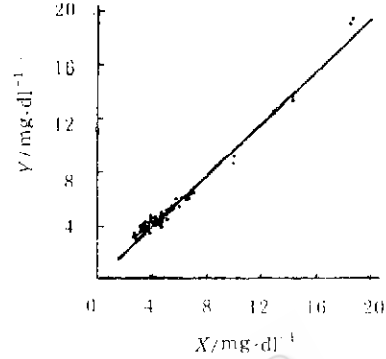


图 5 传感器与酶试剂盒法相关比较

Fig. 4 Correlation between the results of uric acid in serum assayed by the biosensor method and by the enzymatic kit method

X Indicates the results assayed by enzymatic kit method,

Y Indicates the results assayed by biosensor method

2.2.3 测定方法的精密度:收集数份尿酸含量高值和低值的血清样品。在1d内对同份血清样品,连续测定20次,批内变异<5%;在10d时间内,对同份血清样品,连续测定20次,批间变异<8%(表1)。

2.2.4 回收实验:在已知尿酸浓度的血清样品中分别加入6mg/dl,8mg/dl和9mg/dl的尿酸,测定血清中总的尿酸含量,其回收率在93%~109%范围内(见表2)。

2.2.5 使用稳定性:该传感器的稳定性主要取决于固定化酶柱的稳定性。固定化尿酸酶柱室温使用,4℃冰箱保存,连续使用达5个半月,测定样品2000次以上,酶柱能保持原酶柱活力的94%,光功率输出不变,传感器正常使用。

2.2.6 相关性比较:收集61份含有高值和低值尿酸的血清样品,分别用国产酶法尿酸试剂盒(上海、长征)在Hitachi 7150自动生化分析仪上测定和用本传感器测定结果进行相关比较(图5)。回归方程:Y=0.4+0.938X(X示酶试剂盒测定值;Y示传感器测定值)相关系数r=0.9909,表明用传感器测定的结果与现医院常规临床诊断采用的酶法试剂盒测定的结果有很好的相关性。

表 1 传感器尿酸测定法的精密度

Table 1 Imprecision by the biosensor method for serum uric acid assay

Sample	Uric acid conc. (mg/dl) (X±SD)	CV (%)	
		Within day	Day to day
1	3.70±0.1616	4.36	—
2	10.47±0.3367	3.22	—
3	2.09±0.1626	—	7.80
4	7.17±0.4437	—	8.18

表 2 传感器测定尿酸回收率

Table 2 Recovery by the biosensor method for serum uric acid assay

Sample initial conc. (mg/dl)	Added conc. (mg/dl)	Measured conc. (mg/dl)	Recovery (%)
3.93	6	9.74	96.8
	9	12.30	93.0
3.40	6	9.93	109
	9	12.89	105
2.5	8	10.47	99.6

过氧化物酶催化鲁米诺-H₂O₂ 化学发光反应,易受抗坏血酸的干扰,而铁氰化钾催化此化学发光反应抗坏血酸的干扰小^[6]。本传感器采用铁氰化钾催化,可降低血清中抗坏血酸的影响,利于在临床生化检验中使用。同时,把鲁米诺-H₂O₂ 化学发光反应与流动注射分析系统结合起来,与批式分析法相比有样品体积小,分析时间短的优点。另外,采用酶膜的形式构建传感器,常因反应池大小的限制,膜上固定的酶量有限,影响传感器的使用寿命。而采用酶柱形式,可适当增加酶柱长度,提高固定化酶量,从而相对延长传感器的使用寿命。化学发光传感器测定系统采用固定化酶柱,经 5 个半月连续测定 2000 次以上,酶柱活力仅损失 6% 左右,测定值保持不变。这比酶试剂盒用液体酶测定,成本低,使用方便、稳定。同时,化学发光反应的高灵敏度和流动注射分析系统的稳定性好相结合,使这一测定系统比采用氧分压电极组装成的酶电极系统有测定线性范围宽,灵敏度高的优点。测定值经统计学分析,完全符合临床诊断对精密度、重现性和线性范围的要求。

致 谢 北京医院检验科周序开同志参加部分工作。

参 考 文 献

- [1] Karube I. In: 4th Chemical Sensors'92, Tokyo Japan: Japan Association of Chemical Sensors, 1992, p. 12~15.
- [2] Tanaka M. In: 4th Chemical Sensors; 92, Tokyo Japan: Japan Association of Chemical Sensors, 1992, p. 224.
- [3] 周宜开, 魏吸和, 刘红卫等, 生物工程学报, 1991, 7 (2): 154~158.
- [4] Petersson B A, Hansen E H, Ruzicka J. Anal Lett, 1986, 19: 649~.
- [5] Aizawa M, Ikariyama Y, Kuno H. Anal Lett, 1984, 17 (B7): 555~564.
- [6] Tabata M, Fukunaga C, Ohyabu M. J Appl Biochem, 1984, 6: 251.
- [7] Bostick D T, Heroules D M. Anal Chem, 1975, 47 (3): 447.
- [8] Auses J P, Cook S L, Maloy J T, Anal Chem, 1975, 47 (2): 244~249.
- [9] Li G. X, Shao Yan, Liu Jianguo *et al.* Biosensors'90, 1990, p. 297.

Biosensor Based on Chemiluminescence for Serum Uric Acid Determination

Liu Jianguo¹ Guo Jian² Li Gaoliang¹

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)¹

(*National Center for Clinical Study, Beijing 100730*)²

Abstract A biosensor based on luminol chemiluminescent reaction and immobilized uricase column for serum uric acid determination has been developed. The response time by the sensor for various concentration of serum uric acid was 47 seconds with 17 μ l sample volume and at 40 samples per hour. The linear range of standard curve was from 1 up to 20 mg/dl of serum uric acid. The within day imprecision was 3.22%~4.36%. The day to day imprecision was 6.18%~7.80%. The recovery rate by the method was 93%~109%. Compared with standard colorimetric method employed enzymatic kit revealed that the linear regression and correlation coefficient were $Y=0.4+0.938X$ and $r=0.9909$ respectively. The immobilized uricase column retained 94% of its original activity even after over 2000 runs for five and half monthes' continual usage.

Key words Uric acid sensor, chemiluminescence, flow injection analysis, immobilized enzyme