

醋酸纤维素膜为基础的 葡萄糖生物传感器的研制

王顺光 吉鑫松 袁中一

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘要 采用共价法将酶固定在醋酸纤维素膜上,方法简便易行,制造的酶膜稳定,比活力高。同时采用该方法制备了葡萄糖氧化酶酶膜,与氧电极组装成测定葡萄糖的生物传感器,线性范围为 50~800mg/dl,仪器工作的最适 pH 为 6.0,最适温度为 40℃。将该膜与过氧化氢电极组装得到的传感器具有以下特性:线性范围为 10~200mg/dl,最适 pH 为 6.0,测定结果与酶试剂盒有良好相关性。

关键词 醋酸纤维素膜,共价法固定化,葡萄糖生物传感器

醋酸纤维素(CA)是一种广泛使用的膜材料,一般采用包埋法制成酶膜^[1,2]。为了防止使用过程中酶分子从膜上脱落,影响测定的稳定性及灵敏度,还需用戊二醛交联或外加一层透析膜^[3~6]。这些方法共同的缺点是在固定化过程中,酶分子直接与有机溶剂接触导致酶的大量失活,降低了固定化酶的活力回收,因此所制备的酶膜活力不高;此外采用包埋法制备的固定化酶膜在使用过程中酶分子易从膜上脱落,这都影响了传感器的性能。Mizutani 等^[5]提出将 CA、戊二醛和 1,8-二氨基-4-氮甲基正乙烷按 5:1:4 的比例混合后铺膜,用戊二醛将酶分子共价地固定在膜上。该方法在一定程度上提高了固定化酶的活力回收,但由于酶分子与 CA 之间没有共价键结合,仍无法防止使用时酶分子脱落。Sternberg 等^[7]提出用高碘酸氧化的方法在膜上引入活性基团,将酶共价地固定在膜上。该方法制造的酶膜稳定性良好,解决了使用过程中酶分子脱落的问题。但方法较繁琐,增加了操作的难度,使得该方法难以得到普遍的应用。在此基础上我们研制了较为简便的活化方法,不但可以提高酶活的回收率,而且简便易行,具有普适性,适于大规模制备。本文还比较该膜在氧电极和过氧化氢电极上的使用情况,并研制了可选择性通过过氧化氢的薄膜,有效地降低了样品中其他杂质的干扰。

1 材料与方法

1.1 材料

醋酸纤维素(上海化学试剂采购供应站);葡萄糖氧化酶,尿酸(Sigma 公司);辣根过氧化物酶、半胱氨酸盐酸盐、酪氨酸和谷胱甘肽(中国科学院上海生物化学研究所东风试剂公司);4-氨基替吡啶(上海试剂一厂);戊二醛(Merck 公司);极谱式氧电极、过氧化氢电极及过氧化氢测试仪(中国科学院上海冶金研究所);葡萄糖氧化酶试剂盒(卫生部上海生物制品研究所);其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 酶膜的制备: 5%醋酸纤维素的丙酮溶液, 铺成 $30\mu\text{m}$ 厚的薄膜, 浸入 0.2mol/L 的高碘酸钠溶液反应 20min, 在用 0.05mol/L pH7.0 磷酸缓冲液洗涤后与 0.1mol/L 乙二胺室温下反应 2h。蒸馏水洗涤后与 5%的戊二醛溶液反应 1h, 得到带有醛基的 CA 活化膜。与 5mg/ml 的葡萄糖氧化酶溶液反应 2h, 用 0.05mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液洗涤。

1.2.2 葡萄糖氧化酶和酶膜的活力测定: (a) 溶液酶活力测定: 3.5mg 辣根过氧化物酶与 3.5mg 4-氨基安替吡啉溶于 20ml 0.2mol/L pH7.0 磷酸缓冲液混合均匀, 加入 1ml 3%的苯酚溶液配成溶液 A; 溶液 B 为 6.5%葡萄糖水溶液。测定时将 1.5ml 溶液 A 与 1.5ml 溶液 B 的混合液在 25°C 保温, 加入葡萄糖氧化酶液, 测定 A_{500} 的变化。(b) 固定化酶活力测定: 取 1cm^2 酶膜放入 9ml 的底物混合溶液中剧烈搅拌, 定时取出 0.5ml 反应液测定 A_{500} 的变化。

1.2.3 过氧化氢选择性通透膜的制备: 4%的醋酸纤维素丙酮溶液铺在玻璃板上成厚约 $10\mu\text{m}$ 的薄膜, 空气中挥发干燥即可。用前浸入蒸馏水中, 将 CA 膜从玻璃板上剥离下来。

1.2.4 测试系统: 将 GOD 酶膜和透氧膜用“O”型圈紧贴在电极的表面, 连接电信号处理系统, 即构成葡萄糖传感器^[9]。把 $20\mu\text{l}$ 的样品加入 $300\mu\text{l}$ 的反应池内记录其响应值, 用 0.05mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液彻底洗涤反应池, 使仪器回到基线。

2 结果

2.1 葡萄糖氧化酶膜的制备

2.1.1 戊二醛浓度对酶膜活力的影响: 分别将带有氨基的载体膜浸入 0.1%、1%、5%及 10%的戊二醛溶液中, 反应 1h 后取出用蒸馏水洗涤, 再浸入 5mg/ml 的葡萄糖氧化酶溶液中反应 2h。缓冲液洗涤后测定活力, 结果如图 1。从图中可知随着戊二醛浓度的增加, 酶膜的活力也增加。当戊二醛浓度为 5%时所获得的酶膜活力最高, 以后随着戊二醛浓度的增加, 酶膜活力显著下降。可能的原因是: 当戊二醛的浓度太低时, 膜上的活性基团相应较少, 这样膜上偶联的蛋白量也较少, 因而酶膜的活力较低; 相反当戊二醛的浓度过大时, 膜上过多的活性醛基导致酶分子与载体之间形成多点结合, 这样会产生立体结构障碍, 且酶分子的活性中心有可能受多余的醛基束缚, 从而使酶活力损失。只有当戊二醛的浓度适当时, 才可以固定足够多的酶量, 并可防止多点结合, 获得较高活力的酶膜。

2.1.2 酶量对酶膜活力的影响: 5%戊二醛活化的醋酸纤维素膜分别浸入浓度 (mg/ml) 为: 1、5、10、20 和 40 的葡萄糖氧化酶溶液中, 反应 2h, 取出用缓冲液洗涤后测定活力, 结果如图 2。随着酶量的增加, 酶膜的活力也增加, 当酶浓度为 10mg/ml 时酶膜的

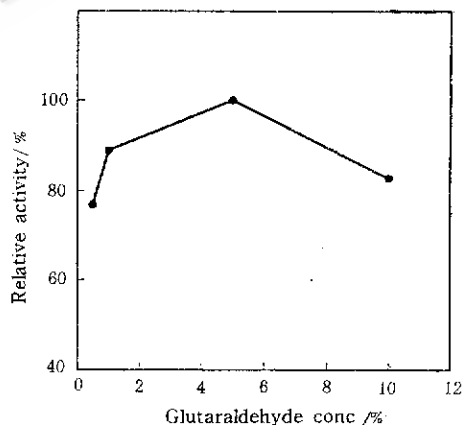


图 1 戊二醛浓度对酶膜活力的影响
Fig. 1 Effect of the concentration of glutaraldehyde on the activity of cellulose acetate enzyme membrane

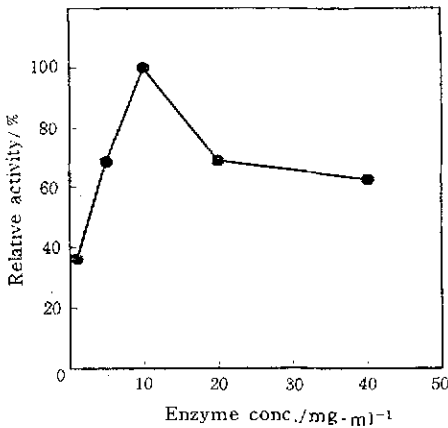


图 2 酶量对酶膜活力的影响

Fig. 2 Effect of the amount of enzyme used during immobilization on the activity of cellulose acetate enzyme membrane

具有一定大小孔径的薄膜,使分子量大于 100 的物质较难通过;一方面膜材料本身带有与干扰物质相同的负电荷,有利于阻止干扰物质到达电极表面⁽⁸⁾。结果如表 1:

表 1 有或无过氧化氢选择性通透膜,传感器对干扰物质的响应

Table 1 Response of the biosensor to some potential interference in the absence or presence of hydrogen peroxide permiselective membrane

Substance	Concentration (mg/dl)	Response value* (μV)	Interferring level** (mg/dl)
Glucose	5	15	
Glucose	10	40	
Uric acid	5	304	166.7
Vitamin C	5	245	1000
Cysteine HCl	5	46.5	500
Tyrosine	5	20	>1000
Glutathione	10	11.3	500

* : No hydrogen peroxide permiselective membrane

** : Corresponds to the level of interferent which would give an error of 10mg/dl in an apparent glucose response measured with the biosensor in the presence of the hydrogen peroxide permiselective membrane.

从表中可看出,当传感器中没有选择性通透膜时,各物质的干扰很大;选择性通透膜可显著地提高传感器的抗干扰能力。以维生素 C 为例,没有选择性通透膜时,5mg/dl 维生素 C 的电极响应值约为同样浓度葡萄糖的响应值的 17 倍,而选择性通透膜可使传感器在 1000mg/dl 的维生素 C 存在下进行准确的测定。该膜的引入提高了响应的重复性,稳定性以及抗干扰能力等。

2.3 葡萄糖传感器的响应特性

2.3.1 葡萄糖传感器的动力学性质:分别向传感器反应池中注入 $20\mu\text{l}$ 50~800mg/dl 的葡萄糖标准溶液,每隔 10s 记录传感器的响应值,90s 之内的动力学响应曲线如图 3。从图中可见,对于以氧电极为换能器的传感器而言,反应的初始阶段,响应值变化较快,30s 后变化的幅度明显地减小,进而趋于平台曲线(见图 3(A));以过氧化氢电极为换能器的传感器在 10s 即达到平衡(见图 3(B))。该传感器的响应时间是膜式生物传感器中所

活力最高;当酶量继续增加,酶膜的活力反而下降。可能的原因是:酶量较少时固定在膜上的酶量也较少,酶膜的活力较低;而当酶量较大时大量的酶被固定在膜上,酶分子紧密聚集一起。相互之间有空间重叠的限制,造成酶膜的表观活力反应下降。

2.2 过氧化氢选择性通透膜对传感器响应的影响

为了比较以过氧化氢电极或氧电极为换能器的酶传感器的响应性能,考察样品中可能出现的电性物质对过氧化氢电极响应的影响。选用醋酸纤维素为制膜材料研制过氧化氢选择性通透膜,有可能通过控制适当的条件制备

见的最短的时间^[8]，有利于提高传感器的工作效率。

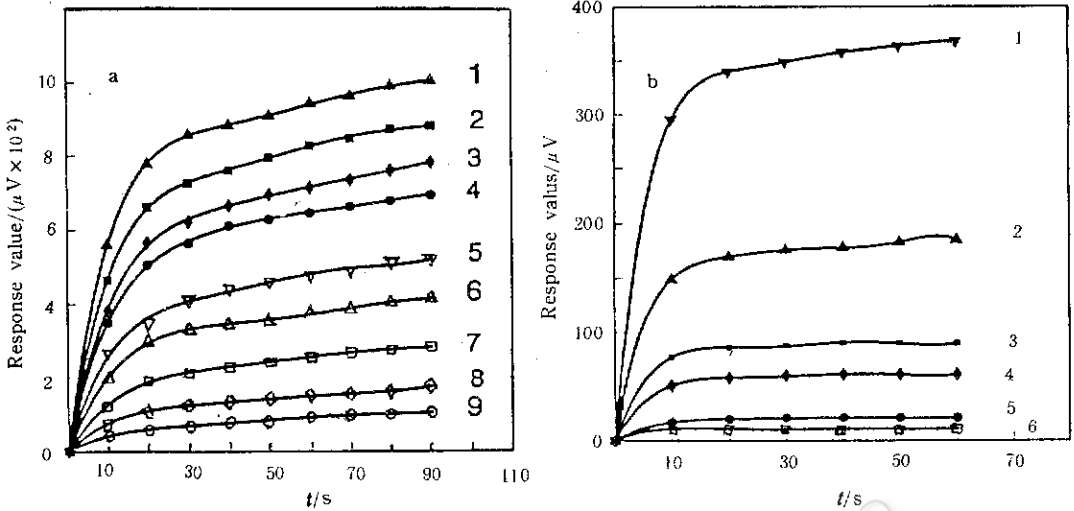


图 3 传感器响应的动力学曲线
Fig. 3 Kinetic response curves for the CA membrane based biosensor at different concentration of glucose using

Conciousensor. of glucose as follows:
a. Oxygen electrode: 1~9 is 8、7、6、5、4、3、2、1 and 0.5mg/ml, respectively,
b. H₂O₂ electrode as transducer; 1~6 is 2、1、0.5、0.3、0.1 and 0.05mg/ml, respectively.

2.3.2 葡萄糖传感器测量的线性范围:向反应池内注入 20μl 不同浓度的葡萄糖标准溶液,以不同时间的响应值为纵坐标,葡萄糖浓度为横坐标作曲线,结果如图 4。以氧电极为换能器的传感器可测定 50~800mg/dl 的葡萄糖,相关系数分别为 $r_{10} = 0.998$, $r_{20} = 0.999$, $r_{30} = 0.999$ 。所制备的酶膜有良好的传质性能,可以保证传感器有极快的响应时间。在实际测定中,选用 10s 为其响应时间,一个完整的循环约需 60s。当选用过氧化氢电极为换能器时,传感器的线性范围为 10~200mg/dl,相关系数为 0.9999。

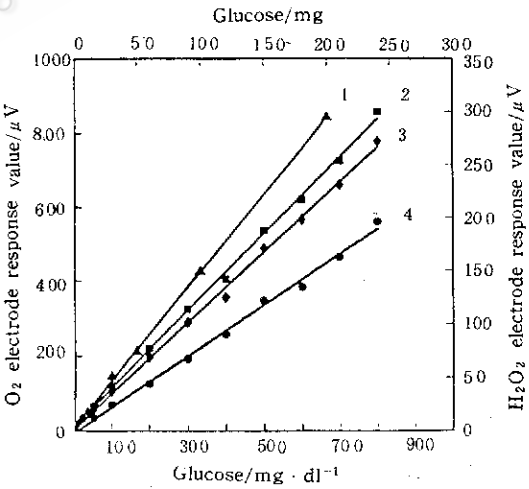


图 4 传感器测定葡萄糖的标准曲线
Fig. 4 Calibration curves for glucose determined by the biosensor
1. H₂O₂, 10s, 2. O₂, 30s, 3. O₂, 20s, 4. O₂, 10s

2.3.3 pH 对传感器测定的影响:以不同 pH 值的缓冲液为测试反应液,向反应池内注入 20μl 100mg/ml 的葡萄糖标准液,以 20s 的响应值与 pH 作图,结果如图 5。其它条件相同时,对两种传感器而言, pH6.0 时传感器的响应值最大。

2.3.4 温度对传感器测定的影响:在不同温度下,向反应池内注入 20μl 100mg/dl 的葡萄糖标准溶液,以 20s 的响应值与温度作图,结果如图 6。温度对传感器的电极响应酶膜活力及气体跨膜扩散等有影响。实验中测定的是温度对上述各方面影响的综合表现。以

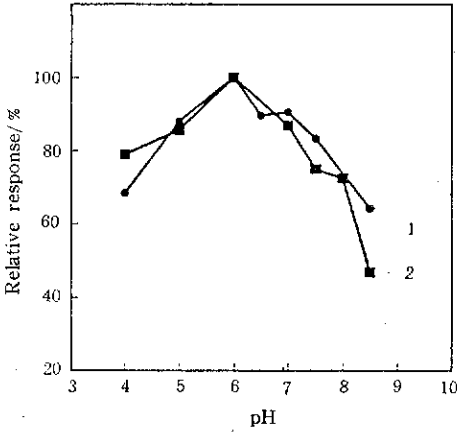


图5 pH对传感器响应的影响

Fig. 5 Effect of pH on the response of glucose biosensor

1. O₂ electrode, 2. H₂O₂ electrode

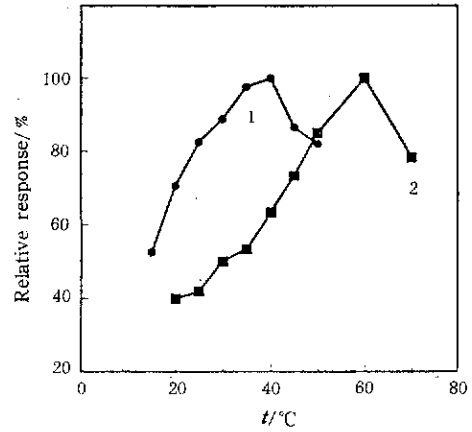


图6 温度对传感器测定的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the response of glucose biosensor

1. O₂ electrode, 2. H₂O₂ electrode

氧电极为换能器的传感器在 40℃ 时响应值最大；以过氧化氢电极为换能器的传感器，其响应值随着温度的上升也不断上升，70℃ 时传感器的响应值才下降。实验发现在此温度下连续地注射 5 次相同浓度的葡萄糖，传感器的响应值大幅度下降，这可能是与酶分子大量失活有关。考虑到酶分子的温度稳定性及传感器的响应性质，在 pH6.0、25℃ 的条件下进行测定。

2.3.5 酶膜的稳定性和传感器的重复性：酶膜保存在 4℃、0.05mol/L (pH7.0) 的磷酸缓冲液中。60d 后酶膜的活力仍保持了原来活力的 90% 以上，且其工作状态与新制备的酶膜基本一致。用 300mg/dl 的葡萄糖标准溶液重复测定 23 次，其变异系数小于 2%。

2.3.6 葡萄糖传感器的使用寿命：采用 Hornby 等的方法^[10]来估计以过氧化氢电极为基础的传感器的工作寿命。在 25℃，pH7.0 的条件下连续将 1.5mmol/L 的葡萄糖标准溶液以 0.6ml/min 的流速通过酶电极，流过一定体积后用缓冲液洗涤，测定对同一浓度葡萄糖在 10s 的响应值。当流过 1400ml 1.5mmol/L 的葡萄糖溶液后，酶电极的响应值与起始值没有明显的变化，说明酶膜足以进行 4000 次以上的测定。

2.3.7 传感器测定的可靠性：将不同的血清样品分别用过氧化氢传感器和葡萄糖试剂盒进行测定，结果如图 7。从图中可知，传感器与葡萄糖试剂盒之间有良好的相关性，相关系数为 0.9994。与以氧电极为换能器的传感器相比，过氧化氢传感器的响应有更好的稳定性（数据没有列出）。

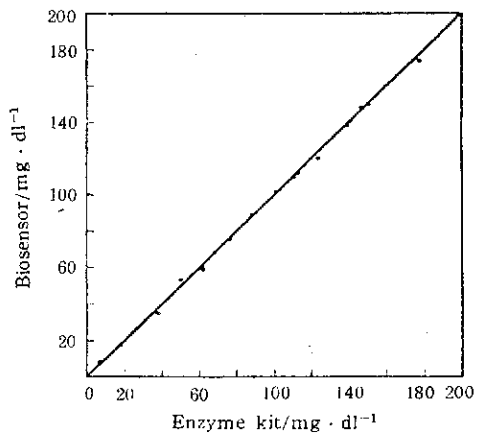


图7 用传感器和酶试剂盒测定血清样品中葡萄糖含量的相关性

Fig. 7. Correlation of serum glucose assayed by the biosensor and enzyme kit procedure

3 讨论

所研制的葡萄糖传感器具有以下优点: (1) 响应时间短, 一般只需 10s 即可, 整个循环约需 60s; (2) 线性范围广, 所需的样品体积小; (3) 由于采用共价法制备了高比活稳定的酶膜, 因此在传感器的设计中没有必要加上外部的保护膜, 这不但降低了底物的传质阻力, 缩短了传感器的响应时间, 而且也提高了测定灵敏度; 另外由于酶分子与载体膜之间有着稳定的共价键连接, 酶不易脱落, 从而延长了酶膜的使用寿命, 大大提高了传感器的工作稳定性。

同一酶膜既可与氧电极又可与过氧化氢电极组成传感器。前者测定的线性范围较宽, 但灵敏度以及平衡响应时间都比后者差。过氧化氢电极传感器的突出优点是灵敏度高、响应的重复性以及稳定性比氧电极传感器优越。

从上述结果可以看出, 我们研制的醋酸纤维素膜的活化方法与目前所报道的方法相比, 具有简便易行的特点。在活化过程中酶分子没有与易导致酶失活的有机溶剂接触, 这可明显地提高固定化酶的活力回收, 得到单位(面积)活性较高的酶膜, 这对提高传感器测定的灵敏度极为有利^[9]。

参 考 文 献

- (1) Tsuchida T *et al.* Nippon Kagaku Kaish., 1982, 8: 1347.
- (2) Wilson G S *et al.* Biosensor: A Practical Approach 1~17, IRL Press, 1990.
- (3) Watanabe E *et al.* J Food, Sci, 1983, 48: 496.
- (4) Mascini M *et al.* Anal Chim Acta, 1986, 179: 439.
- (5) Mizutani F *et al.* Anal Chim Acta, 1980, 18: 65.
- (6) Koyama M *et al.* Anal Chim Acta, 1980, 116: 307.
- (7) Sternberg R *et al.* Anal Chem, 1988, 60: 2781.
- (8) Coulet P R *et al.* Bioinstrumentation and Biosensors., 1990, 753~793.
- (9) 袁中一等. 生物工程学报, 1989, 6 (2): 165~168.
- (10) Hornby T *et al.* In: Mosbach K ed, Methods in Enzymology, 1976, Vol. 44, pp. 633.

Study of Cellulose Acetate Membrane-based Glucose Biosensor

Wang Shunguang Ji Xinsong Yuan Zhongyi
(Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Abstract A new method was developed to covalently immobilize enzyme onto the cellulose acetate (CA) membrane. Cellulose acetate was casted on glass plate to form a thin film, which was oxidised by sodium periodate. Ethylenediamine was then coupled to the oxidised CA membrane followed by treatment with glutaraldehyde. Glucose oxidase was covalently bound onto the CA membrane and combined with either an oxygen electrode or a hydrogen peroxide electrode to construct glucose biosensor. The response characteristics of both sensors were compared.

Key words Cellulose acetate membrane, covalent immobilization, glucose biosensor