

## 葡萄糖氧化酶膜和葡萄糖传感器的构建

袁中一 朱天民 李士云 陈佩颖  
汪静英 吉鑫松

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

葡萄糖的测定是临床诊断和发酵控制的重要依据, 葡萄糖传感器已成为国内外的重要研究对象<sup>[1, 2]</sup>, 早在60年代Updike和Hicks就利用酶反应及电化学电极构成酶电极<sup>[3]</sup>。近代酶固定化技术的进步加速了“无试剂测定”的葡萄糖传感器商品化<sup>[4, 5]</sup>。我们在原有的工作基础上<sup>[6, 7]</sup>, 用牛血清白蛋白和戊二醛固定葡萄糖氧化酶获得了高活力、高稳定性的生物功能膜, 考察了酶膜的基本性质及与氧电极联合构成的葡萄糖传感器。测定葡萄糖的重现性好, 响应时间短, 工作和保藏稳定性好, 对实际应用有巨大潜力。

### 材料与 方法

#### (一) 材料

黑曲葡萄糖氧化酶, 2型(Sigma), 辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白(中国科学院上海生化所附属东风试剂厂), 4-氨基安替吡啉(上海试剂二厂), 戊二醛(E. Merk)。极谱式氧电极和L-85型数字 $O_2$ -mV测定仪(中国科学院上海冶金所, 张国雄等研制并提供)。

#### (二) 方法

1. 葡萄糖氧化酶膜的制备: 参照Guilbault和Nanjo的方法<sup>[8]</sup>。2mg牛血清白蛋白, 2mg葡萄糖氧化酶和50 $\mu$ l 10%戊二醛水溶液混和, 铺展于半透膜上, 空气干燥后即成。

2. 葡萄糖氧化酶活力测定: 溶液A, 3.5mg辣根过氧化物酶与3.5mg 4-氨基安替吡啉的20ml 0.2mol/L pH7.0磷酸缓冲液中加入1ml 3%苯酚水溶液; 溶液B, 6.5%葡萄糖水溶液。1.5ml溶液A与1.5ml溶液B的混和液在25℃

时加入酶溶液。在1cm光径的比色杯中跟踪 $A_{500}$ 变化。经计算, 以国际单位(IU)表示酶活力。

3. 葡萄糖氧化酶膜活力测定: 测定方法基本同溶液酶。葡萄糖氧化酶膜剪碎, 称取一定份量, 在烧杯内以0.1ml水溶胀半小时, 然后加入25℃预保温的15ml反应混合液中搅拌反应, 定时取样。

4. 葡萄糖氧化酶传感器的构成和运转: 葡萄糖传感器由酶电极、反应池和L-85型数字式 $O_2$ -mV测定仪组成(见图1)。以“O”型圈紧扣葡萄糖氧化酶膜于氧电极顶部形成酶电极。恒流泵把pH7.0 0.05mol/L磷酸缓冲液引入体积为300 $\mu$ l的反应池中, 仪器显示出空白溶液的含氧量。当20 $\mu$ l含葡萄糖的样品注入反应池, 开动磁力搅拌器后, 葡萄糖扩散入酶膜即发生氧化反应, 耗去溶液中 $O_2$ , 测定仪上显示电位值的减小, 通常根据40秒内的电位产值, 从标准曲线上算出葡萄糖含量。

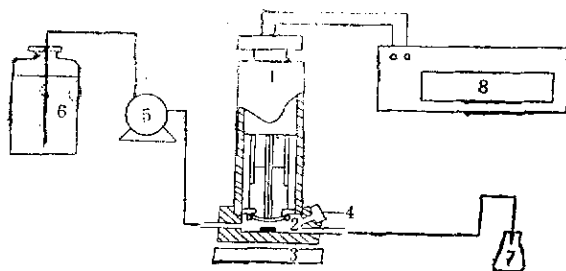


图1 葡萄糖传感器的构造

1. 葡萄糖氧化酶电极 2. 反应池 3. 磁力搅拌器  
4. 加样口 5. 蠕动泵 6. 缓冲液 7. 废液  
8.  $O_2$ -mV测定仪

本文于1988年4月20日收到。

本课题属国家重点项目75-71-08-10, 并获中国科学院联合传感器实验室支持。

## 结 果

## (一) 葡萄糖氧化酶膜的制备

葡萄糖氧化酶和牛血清白蛋白用戊二醛共交联, 空气干燥后得酶膜。回力回收约为10—20%, 每片酶膜具有32.9—65.8IU。

## (二) 温度和 pH 与葡萄糖氧化酶及其固定化酶的关系

葡萄糖氧化酶和固定化酶膜的活力-pH关系曲线和活力-温度的关系曲线如图2与图3所示。

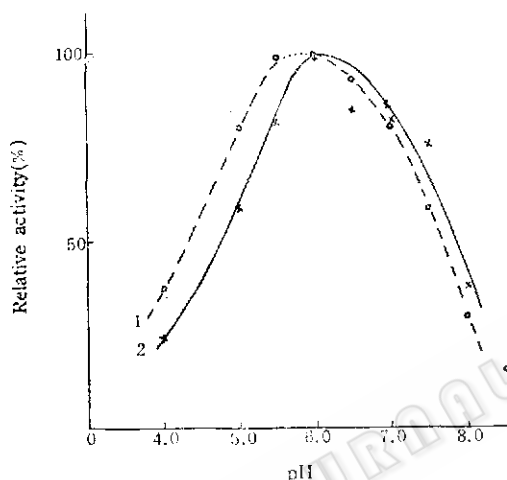


图 2 pH值与葡萄糖氧化酶活力关系  
实验条件见方法部分  
1. 葡萄糖氧化酶 2. 固定化葡萄糖氧化酶

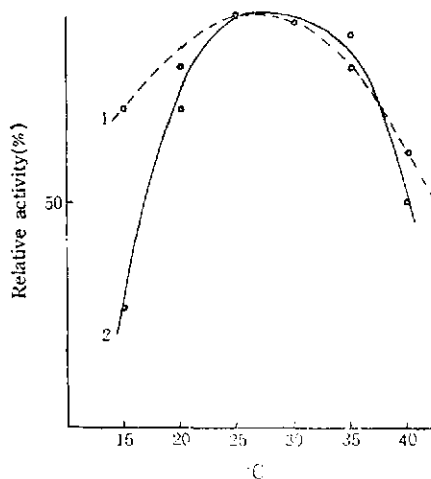


图 3 温度与葡萄糖氧化酶活力关系  
1. 葡萄糖氧化酶 2. 固定化葡萄糖氧化酶

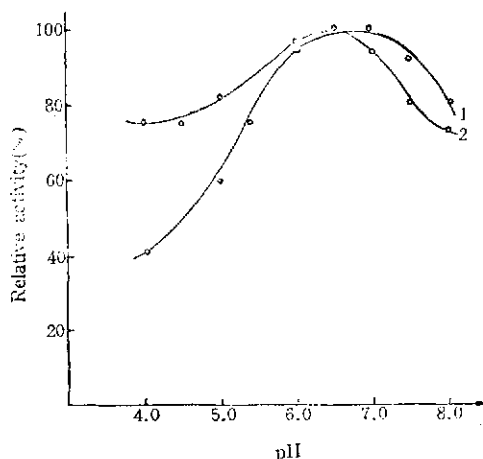


图 4 pH对葡萄糖氧化酶稳定性的影响  
葡萄糖氧化酶和固定化酶在不同pH、25℃保温  
2h后, 以标准法测定活力  
1. 葡萄糖氧化酶 2. 固定化葡萄糖氧化酶

不同 pH 对葡萄糖氧化酶和固定化酶膜的稳定性影响见图 4。

从以上结果可以看到, 经固定化形成酶膜后, 葡萄糖氧化酶分子所处微环境发生了变化, 固定化酶的最适pH为6.0, 比溶液酶提高了0.5 pH单位。最适温度为27℃, 也比溶液酶略有升高。固定化酶在pH高于6.5的条件下稳定性有所提高。

## (三) 葡萄糖传感器的运转

向反应池输入 $2.8 \times 10^{-4}$ — $1.1 \times 10^{-3}$  mol/L的葡萄糖溶液, 其响应曲线如图5。表明既可以用动力学法也可以用恒态法测定葡萄糖的含量。我们采用动力学法测定, 0.5 mol/L, pH 7.0的磷酸缓冲液为反应池的底液和清洗液, 50—300 mg/dl葡萄糖以20 μl的量注入反应池, 不同时间作出的标准曲线如图6。葡萄糖标准液12次测定变异系数CV为1—2%, 测定线性相关系数 $r = 0.999$ 。

## (四) 酶膜和葡萄糖传感器的工作和保藏稳定性

酶膜的稳定性是传感器稳定性的关键因素。采用Hornby和Noyin类似方法估计工作稳定性<sup>[9]</sup>。连续将 $1.4 \times 10^{-3}$  mol/L葡萄糖溶液以0.6 ml/min的流速通过酶电极, 间隔数小时后用缓冲溶液洗涤, 测定对同一浓度葡萄糖在1分钟

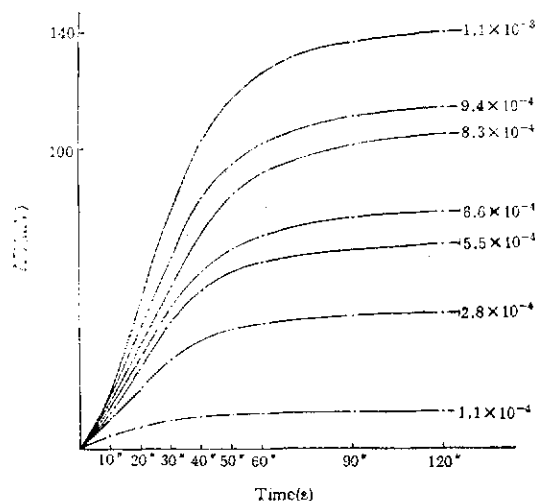


图 5 酶电极对葡萄糖溶液的响应曲线  
测定按标准条件进行

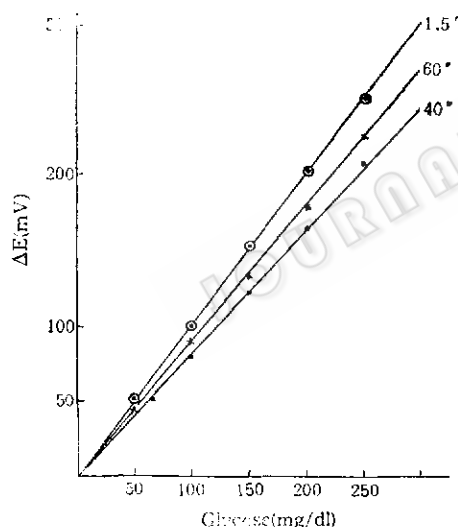


图 6 葡萄糖浓度和酶电极线性响应的关系  
注入样品 20  $\mu$ l, 实验条件与图 5 相同

时的相对耗氧量, 通过 800ml  $1.4 \times 10^{-3}$  mol/L 葡萄糖溶液后, 酶电极的响应值没有发生明显降低。本实验表明酶膜足以进行 3000 次以上测定。酶膜的保藏稳定性在实际使用也极为重要。通过各种保藏条件下试验后 (见表 1、2), 这些酶膜与新制备的酶膜工作状态一致。

表 1 葡萄糖氧化酶膜保藏稳定性

保藏条件	干态 4 $^{\circ}$ C	干态 20—25 $^{\circ}$ C	湿态 20—25 $^{\circ}$ C	干态 37 $^{\circ}$ C
残留活力	43.8%	25.0%	30.3%	21.1%

每片酶膜的初活力为 34.2 IU

表 2 葡萄糖氧化酶膜 4  $^{\circ}$ C 保藏稳定性

保藏时间	1	7	14	21	125	300
每片膜活力 (IU)	34.2	32.9	19.7	16.5	15.0	7.8
相对活力 (%)	100	91.2	57.7	48.1	43.8	22.7

葡萄糖氧化酶膜以干态 4  $^{\circ}$ C 存放, 间隔测定酶活力。

## 讨 论

基于葡萄糖在生物体新陈代谢中的地位, 它的含量测定对许多领域都是很重要的, 如人体血糖迅速而灵敏的测定, 发酵工业残糖及食品工业中糖的分析等, 葡萄糖传感器的研制对我国生物工程发展是很重要的。

葡萄糖氧化酶固定化以后, 其酶学特性有所改变, 酶膜的最适 pH 和最适温度升高, 反映了酶分子周围的凝胶基质形成了不同于溶液酶的新的微环境, 扩散限制使得酶分子周围积累较多氢离子, 造成固定化酶的最适 pH 移向碱侧。然而, 固定化酶更显著的优点是它们可以把以往只用一次的酶长期反复地使用了, 从本研究中表明这一酶膜足以进行 3000 次以上葡萄糖的测定。目前的临床酶法测定葡萄糖, 消耗较昂贵的辣根过氧化物酶, 而使用酶膜的葡萄糖传感器, 只需消耗磷酸缓冲液, 测定成本大大降低了。而且测定迅速, 一个样品在少于 1 分钟时间里即可快速完成。酶膜在多种条件下的保藏试验证明可以满足商店和用户的贮存和运输中可能遇到的环境条件。本文结果显示, 葡萄糖传感器十分简便、迅速、灵敏而准确地进行葡萄糖的测定, 为进一步测定奠定了坚实基础。已经证明在临床分析中血糖的测定和发酵过程、葡萄糖的跟踪监测中具有显著优点, 我们将有新的报道 [10]。

## 参 考 文 献

- [1] 袁中一: 前进中的生物化学论文集, 沈昭文主编, 中国科学技术出版社, p.268, 1987.
- [2] Carr, P.W. and Bowers, L.D.: *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*, John Wiley & Sons, 1980.
- [3] Updike, S.J. and Hicks, G.P.: *Nature* (London), 214:986, 1967.
- [4] Guilbault, G.G.: *Methods in Enzymol.*, 44:579, 1976.
- [5] 王永祥: 生物工程学报, 3:22, 1987.
- [6] 吉鑫松等: 固定化葡萄糖氧化酶电极的研究, 临床检验杂志, (3):1, 1985.
- [7] 袁中一等: 上海市生化学会1986年年会论文摘要, p.31, 1987.
- [8] Guilbault, G.G. and Nanjo, M.: *Anal. Chim. Acta*, 73:367, 1974.
- [9] Hornby, W.E. and Noy, G.A.: *Methods in Enzymol.* 44:633, 1976.
- [10] 袁中一等: 投稿中.

## PREPARATION OF GLUCOSE OXIDASE MEMBRANE AND CONSTRUCTION OF GLUCOSE SENSOR

Yuan Zhongyi Zhu Tianmin Li Shiyun  
Chen Peiying Wang Jinyin Ji Xinsong

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)

Glucose oxidase (*Asp. niger*) was immobilized on the semipermeable membrane using bovine serum albumin and glutaraldehyde. Immobilization resulted in change of some properties such as the optimal pH, optimal temperature and pH stability. The enzyme membrane was attached on the top of an  $O_2$ -electrode to obtain a sensor specific to glucose. An apparatus composed of enzyme electrode and  $O_2$ -mV monitor was designed. The good linearity of glucose between  $10^{-4}$  to  $2 \times 10^{-3}$  mol/L with  $r = 0.999$  and  $CV < 3\%$  made it possible to use 20  $\mu$ l sample for each assay. Response time is 40 seconds. The glucose oxidase membrane possesses high operational stability that may be used for over 3,000 assays. The glucose oxidase membranes were stable at 4  $^{\circ}C$  for over one year or at 37 $^{\circ}C$  for 135 days.

### Key words

Glucose oxidase membrane; glucose sensor