

固定化酶-化学发光分析法测定葡萄糖和一种 新型葡萄糖传感器的研制

周宜开 魏顺和 刘红卫 李 红 任 恕

(同济医科大学, 武汉)

本文提出用固定化酶-化学发光分析法测定葡萄糖并在此基础上构建了一种新型葡萄糖传感器。这种传感器系由固定化酶膜、光敏二极管及醋酸纤维滤膜构成。与其他类型的葡萄糖传感器相比,它具有灵敏度高、响应速度快、工作稳定等特点,其线性工作范围可达4个数量级,检测下限为0.5ppm,可连续测定200个样品,测定结果与邻甲苯胺法所得结果相一致。

关键词 固定化酶; 化学发光分析; 葡萄糖传感器

葡萄糖的测定常用邻甲苯胺法或铜还原法^[1]。临床生化检验中的血糖测定和发酵工业中葡萄糖的跟踪监测迫切需要一种速快而灵敏的方法。自60年代以来,国内外有很多关于葡萄糖电极的报道,它们的检测器都是基于电化学原理。这类电极在灵敏度、选择性和工作曲线的线性方面都比较差而且使用寿命短^[2]。近年来,国外对化学发光分析的研究极为重视并将这一技术用于葡萄糖及体内其他代谢产物的测定^[3-4]。我们在原有的工作基础上^[5,6],采用固定化酶-化学发光分析法测定葡萄糖并在此基础上研制了一种新型葡萄糖传感器。这种传感器系由固定化酶膜、光敏二极管和醋酸纤维滤膜等构成,具有灵敏度高、响应速度快、使用寿命长和工作稳定等特点。用于血糖测定时,样品不需前处理,其结果与邻甲苯胺法所得结果相一致。

实 验 部 分

(一)仪器与试剂

1. 仪器: (1)GJ-II型微光功率计(电子工业部23所研制); (2)超级恒温水槽(上海实验仪器总厂); (3)HW-1型电磁搅拌机(杭州仪表电机厂); U-135C记录仪(日本岛津公司); pH-3C酸度计(上海雷磁仪器厂)

2. 试剂: 鲁米诺(西德进口); 葡萄糖氧化酶(Sigma公司,活力为294u/mg); 辣根过氧化物酶(Sigma公司,活力为320u/mg); 丙烯酰胺(分析纯,北京化学试剂厂); 双丙烯酰胺(分析纯北京化学试剂厂); 葡萄糖标准液(北京化工厂); 核黄素、过硫酸钾(上海试剂二厂); 戊二醛(进口分装、上海)。本实验使用的水为双蒸去离子水(D.D.W)

(二)酶的固定化

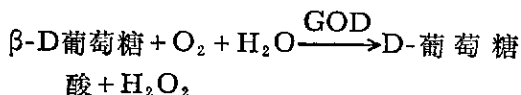
葡萄糖氧化酶(GOD)、辣根过氧化物酶(HRP)按30u/ml用量称量、加入到按比例配制的丙烯酰胺、双丙烯酰胺和戊二醛溶液中,在催化剂和氧化剂作用下,光照成膜。形成的聚丙烯酰胺凝胶是一种

本文于1989年8月15日收到。

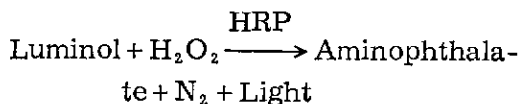
具有三维网状结构的膜, GOD、HRP 分子借助于双功能试剂与膜结构发生交联而牢固地嵌入凝胶的网孔内。

(三) 固定化酶-化学发光法测定葡萄糖

β -D 葡萄糖由 β -D 葡萄糖氧化酶氧化, 生成葡萄糖酸和过氧化氢, 其反应如下:



葡萄糖电极则通过测定上述反应消耗的氧(氧电极型)或反应所生成的过氧化氢(过氧化氢电极型)来定量葡萄糖。而化学发光分析法则是利用鲁米诺-过氧化氢化学发光体系, 通过光强度的测定来定量葡萄糖。在固定化酶-化学发光分析法测量中, 固定化酶膜有识别底物(葡萄糖)的能力, 当酶膜与待测样品接触后, 样品中的葡萄糖分子通过醋酸纤维滤膜进入膜相, 样品中的其他成分(如血样中的蛋白质分子)被阻留在膜相外。进入膜相的葡萄糖分子在 GOD 作用下, 发生氧化反应, 生成 H_2O_2 。生成的 H_2O_2 在 HRP 作用下, 与化学发光试剂作用, 进行如下化学发光反应:



反应所发出的光经光功率计检测。由于光强度的大小与样品中葡萄糖的含量成比例。因此, 通过光强度的测定可以定量样品中葡萄糖的含量。

(四) 葡萄糖传感器的构建和运转

这种新型的葡萄糖传感器系由固定化酶膜、光敏二极管、醋酸纤维滤膜等构成。其结构如图 1。按图 1 所示, 将固定化酶膜固定在滤光片和醋酸纤维滤膜之间即成。

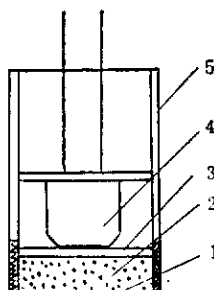


图 1 葡萄糖传感器结构示意图

Fig.1 Diagrammic view of the glucose sensor

1. 醋酸纤维滤膜 Cellulose acetate membrane
2. 固定化酶膜 Enzyme-immobilized membrane
3. 滤光片 Filter
4. 光敏二极管 Photodiode
5. 绝缘套管 Insulation jacket

该传感器测量系统组装图如图 2 所示。

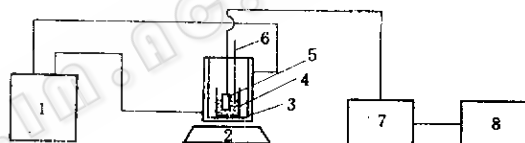


图 2 传感器工作系统

Fig.2 Working system of the glucose sensor

1. 恒温水浴 Water bath
2. 磁力搅拌器 Magnetic stirrer
3. 温控暗盒 Black box with temperature-controlled
4. 测量池 Measuring cell
5. 传感器 Sensor
6. 加样器 Sampler
7. 光功率计 Luminometer
8. 记录仪 Recorder

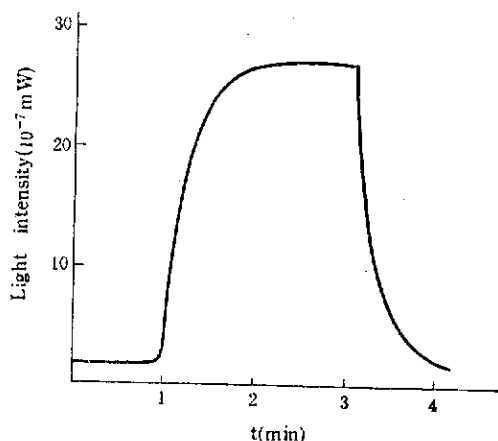


图 3 发光反应动力学曲线

Fig.3 Dynamic curve of the chemiluminescence reaction

在测量池内加入分析操作液 2ml(1ml 磷酸缓冲液, 1 ml Luminol溶液)和样品 1 ml, 开动恒温水槽、启动 搅 拌 器 并 将 传 感 器 探 头 与 分 析 液 接 触, 打 开 记 录 仪 记 录 发 光 反 应 动 力 学 曲 线 (图 3) 根 据 最 大 光 强 度 从 标 准 曲 线 上 计 算 样 品 中 葡 萄 糖 的 含 量。

结 果 与 讨 论

(一)酶用量的选择

实验中发现, 在酶固定化时, 当酶用量大于30u/ml, 化学发光强度受到抑制, 这是酶蛋白对化学发光反应有抑制作用所造成的。不同酶用量与发光强度的关系如图 4 所示。

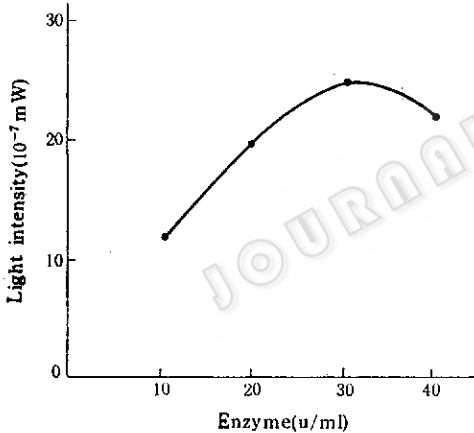


图 4 酶用量与发光强度的关系
Fig.4 Relation between quantity of enzyme and light intensity

(二)最佳反应条件的选择

1. 温度对固相酶活性的影响: 酶促反应受温度的影响较大, 温度与酶的活性的关系如图 5 所示。从图 5 可知, 温度在 10—35℃ 之间, 酶活性随温度上升而明显增加, 温度超过 35℃, 酶活性随之减小。考虑到温度过高不利于发光反应, 实验中温度控制在 $30 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 。

2. 反应时间与发光强度的关系: 从

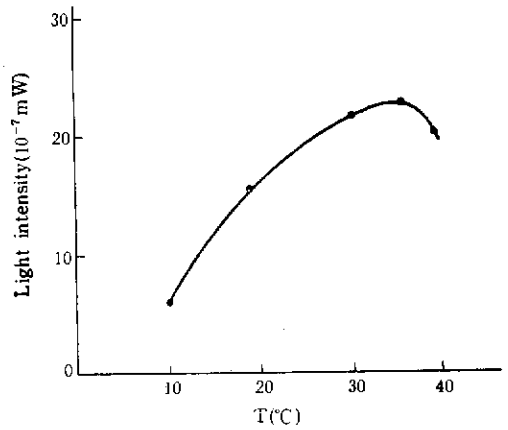


图 5 温度对酶活性的影响
Fig.5 Effect of temperature on enzyme activity
发光反应动力学曲线可知, 反应从开始到 2 min, 光强度随时间的延长而增加, 2 min 以后, 发光强度趋向稳定, 持续一段时间后, 光强度开始减弱。实验中, 待反应进行 2 min 后, 读取最大发光强度。

3. 鲁米诺浓度的影响: 鲁米诺浓度与发光强度的关系如图 6 所示。图 6 表明: 当鲁米诺浓度为 $3 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 时, 发光强度有最大值。实验中鲁米诺的浓度为 $3 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 。

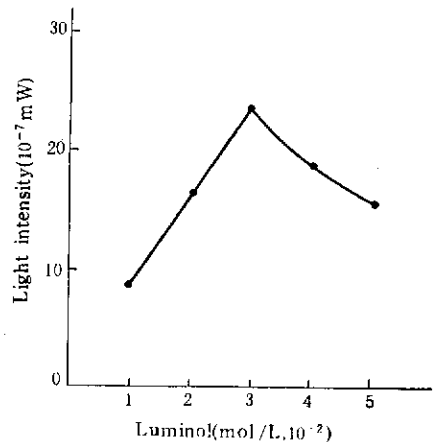


图 6 鲁米诺浓度对发光强度的影响
Fig.6 Effect of luminol concentration on light intensity

(三)工作曲线和检测下限

按实验方法, 分别取不同浓度的葡萄

糖标准溶液进行测定, 读出最大发光强度、以光强度对葡萄糖浓度作图(图7), 从图7可知, 当葡萄糖浓度在 10^{-1} — 10^3 mg/dl范围内, 光强度与浓度的对数成线性关系($r=0.999$)。若以空白值的平均值加上两倍标准差定义为检出下限, 则本方法的检出下限为0.5ppm。

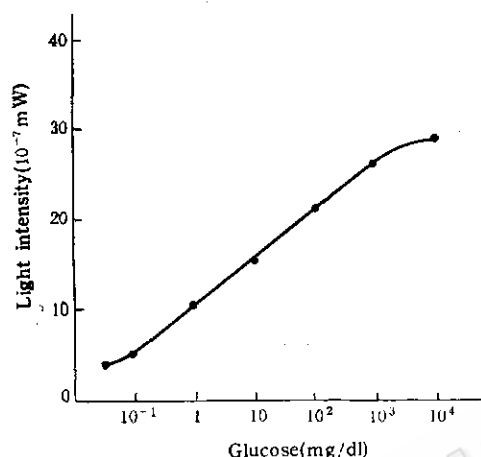


图7 工作曲线
Fig.7 Calibration curve

(四) 干扰试验

在选定的实验条件下, 试验了几种离子对测定的影响, 结果表明: K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- 等均无干扰。 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 和 Fe^{3+} 能催化鲁米诺- H_2O_2 发光体系, 但在本实验条件下, 由于使用了HRP, 它们作用完全可以忽略。实验还表明: 生物样品中的蛋白质分子能严重抑制发光反应。由于固定化酶膜表面复盖了醋酸纤维滤膜, 从而阻止了蛋白质分子进入膜相, 消除蛋白质的干扰。因此, 该传感器在用于血糖测定时, 样品(血清或血浆)可不经前处理而直接用于测定。

(五) 传感器的稳定性

该传感器的稳定性主要取决于固定化酶膜的稳定性。我们考查了传感器的工作及保存稳定性, 结果见图8和表1。图8

表明, 用浓度为50mg/dl的葡萄糖标准溶液进行连续多次测定, 在一个月內其光强度输出几乎不变, 总的测定次数超过200次。

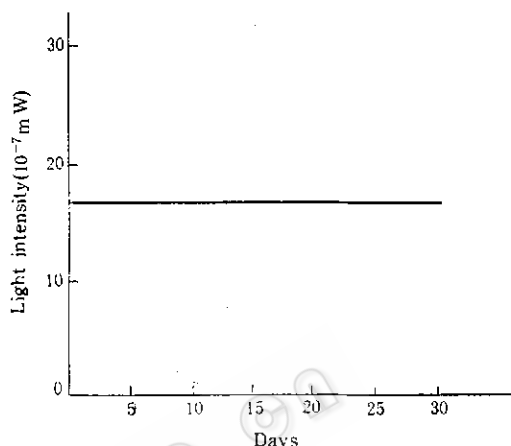


图8 传感器的工作稳定性
Fig.8 Working stability of the sensor

表1表明, 固定化酶膜经冰箱4℃保存, 五个月內, 对同一浓度的葡萄糖标准溶液(50mg/dl)测定, 其信号输出基本不变。

表1 固定化酶膜保存稳定性

Table 1 The storing stability of enzyme-immobilized membrane

保存时间(天)	1	10	30	90	150
Time(day)					
光强度(10^{-7} mW)	17.5	17.4	17.3	17.6	17.4
Light intensity					

(六) 样品分析

样品同时用邻甲苯胺法和本文方法同时测定, 结果见表2。

表2 血糖测定

Table 2 Determination of blood glucose

样品号	传感器法*	邻甲苯胺法
Sample No.	Glucose sensor (mg/100ml)	o-toluidine method (mg/ml)
1	110	115
2	64	64
3	100	99.4
4	68	70

* 6次测定结果的平均值 Average value of 6 times determination

从表2可知,两者无显著性差异($P > 0.05$),对含量为100mg/100ml的样品进行6次测定变异系数为2.8%。

参 考 文 献

- [1] 吉林医学院生化教研室编: 临床生化检验, 1982.
- [2] Cleland, N. et al.: *Anal. Chem.*, 56:1198, 1984.
- [3] Aizawa, M. et al.: *Anal. Lett.*, 17(B7):555, 1984.
- [4] Nakahara, S. et al.: *Anal. Chim. Acta*, 141:255, 1982.
- [5] 周宜开等: 药学报, 24(8):611, 1989.
- [6] 周宜开等: 投稿中.

The Determination of Glucose with Immobilized Enzyme-chemiluminescence Analysis and Development of A New Type of Glucose Sensor

Zhou Yikai Wei Shunhe Liu Hongwei Li Hong Ren Shu
(Tongji Medical University, Wuhan)

A new type of glucose sensor based on the determination of glucose with immobilized enzyme-chemiluminescence analysis was presented. The sensor is fabricated with immobilized enzyme membrane, a photodiode and cellulose acetate membrane. Compared with other types of glucose sensor, this proposed sensor has some features, such as high sensitivity, fast response rate and long-term stability in operation. The linear working range is four orders of magnitude, with a detection limit of 0.5 ppm. More than 200 samples can be continuously analyzed and good agreement has been obtained with o-toluidine method.

Key words

Immobilized enzyme, chemiluminescence analysis, glucose sensor