

细菌膜电极

姚守拙

(湖南大学化工系,长沙)

近二十年来,对具有高选择性的酶反应与灵敏的电化学探测元件相结合的酶电极在生物医学等领域内进行了广泛的研究。从1977年 Rechnitz 等^[1]提出用微生物细胞制成相应的电极,可减少酶的分离、提纯手续,延长了使用寿命之后,细菌膜电极(或称微生物传感器)的研制进入了新的阶段。本文拟就其原理、方法与应用作一综述。

原理

细菌膜电极是一种生物选择性电化学探测器,将经适当方法培养的细菌细胞(或经固定化的细胞)覆于相应的电化学传感元件表面,利用细胞中所具有的酶对待测底物的水解、氨解或氧化等化学反应的选择性催化作用,由电化学传感元件对反应物作选择性探测,并依据反应的化学计量关系,从而定量地提出底物存在量的信息。按电化学传感元件作用机理的不同,可将细菌膜电极分为两类。

一、电位法细菌膜电极

常用气敏电极(多用氨敏电极、硫化氢气敏电极),在其表面覆以细菌层,作成薄膜状,其外

覆透析膜,以防细菌渗漏(图1)。溶液中底物经透析膜扩散入细菌层,并经细胞膜进入细胞内,接受其中酶的催化反应之后,复向外扩散,反应产物氨(或硫化氢)可为气敏电极所响应(图2)。一些常用的电位法细菌膜电极的生物化学反应示如表1。

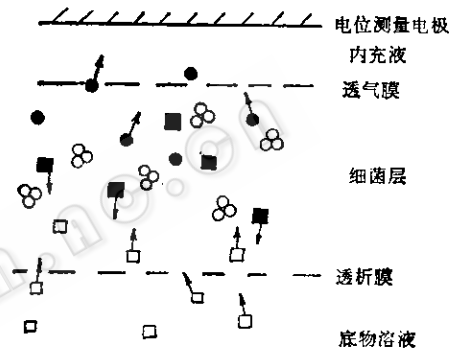
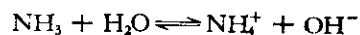


图2 电位法细菌膜电极的作用原理

- 底物
- 其它反应产物
- NH₃
- ⊗ 细菌

气敏电极系由一个外覆一层憎水性透气膜的电位测量电极(平板玻璃pH电极或硫离子电极)与贮于电位测量电极与透气膜之间的一薄层内充液(0.01—0.1M氯化铵溶液或含硫离子的pH5柠檬酸缓冲液)所组成。透气膜只允许反应产生的气体(氨或硫化氢)通过。此气体(以氨为例)扩散通过透气膜后,溶于内充液中并达平衡:



由亨利定律与平衡常数计算(用浓度代活度)得:

$$\frac{[\text{NH}_4^+][\text{OH}^-]}{[\text{NH}_3]} = K$$

内充液中 [NH₄⁺] 浓度相当大,可视作不变量,

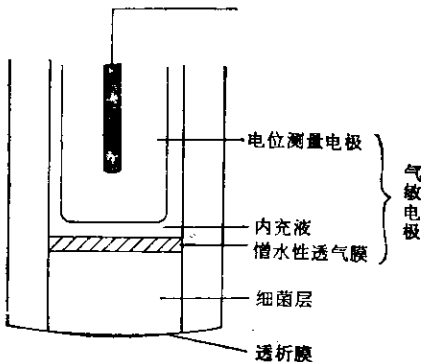


图1 电位法细菌膜电极构造示意图

表 1 电位法细菌膜电极的生化反应

电 极	生 化 反 应
单 酶 催 化	
黄色八叠球菌谷胱胺电极	$L\text{-谷胱胺} + H_2O \xrightarrow{\text{谷胱胺酶}} \text{谷氨酸} + NH_3$
摩氏变形杆菌半胱氨酸电极	$L\text{-半胱氨酸} + H_2O \xrightarrow{\text{半胱氨酸脱硫基酶}} \text{丙酮酸} + NH_3 + H_2S$
尿酸杆菌丝氨酸电极	$\text{丝氨酸} + H_2O \xrightarrow{\text{丝氨酸酶}} \text{丙酮酸} + NH_3 + H_2O$
多 酶 反 应	
维涅兰德固氮菌 硝酸盐电极	$NO_3^- + NADH \xrightarrow{\text{硝酸盐还原酶}} NO_2^- + NAD^+ + H_2O$ $NO_2^- + 3NADH \xrightarrow{\text{亚硝酸盐还原酶}} NH_3 + 3NAD^+ + 2H_2O$
屎链球菌 L-精氨酸电极	$\text{精氨酸} + H_2O \xrightarrow{\text{精氨酸脱氨酶}} \text{瓜氨酸} + NH_3$ $\text{瓜氨酸} + H_3PO_4 \xrightarrow{\text{鸟氨酸氨基酰基转移酶}} \text{鸟氨酸} + \text{氨基酰磷酸}$ $\text{氨基酰磷酸} + ADP \xrightarrow{\text{氨基甲酸激酶}} ATP + \text{氨基甲酸}$ $CO_2 + NH_3 \leftarrow$
假单胞杆菌 L-组氨酸电极	$L\text{-组氨酸} \xrightarrow{\text{组氨酸氨解酶}} \text{尿刊酸} + NH_3$ $\text{尿刊酸} \rightarrow \dots \text{多步反应} \rightarrow \text{谷氨酸} + NH_3$

$$[OH^-] = K'[NH_3]$$

由能斯特方程, pH 电极的相应电位为:

$$E = E_0 - \frac{2.3RT}{F} \lg [OH^-]$$

$$= E_0 - \frac{2.3RT}{F} \lg [NH_3]$$

鉴于产物氨的浓度与底物浓度成正比,

$$[NH_3] = kC_s, \text{ 故 } E = E_0'' - \frac{2.3RT}{F} \lg C_s$$

即电极的电位响应值与底物浓度的对数成线性关系。目前多数细菌膜电极均是按电位法原理设计的。

二、电流法细菌膜电极

此系按电化学反应所提供的电流信息来探测底物,分作两类。

(一) 氧电极法

氧电极系由铂阴极与银/氯化银参考电极组成,外覆氧透气膜,外加电压 -0.6 伏。在氧电极透气膜外敷细菌层,呈膜状,再外覆透析膜。底物经透析膜进入细菌层被相应的氧化酶所催化而消耗氧(图 3 及表 2),驱使铂阴极上氧的还原电流降低,其降低值系与底物浓度成

正比:

$$\Delta I \sim \Delta PO_2 \sim C_s$$

用这种方法可测胆固醇等^[2]。

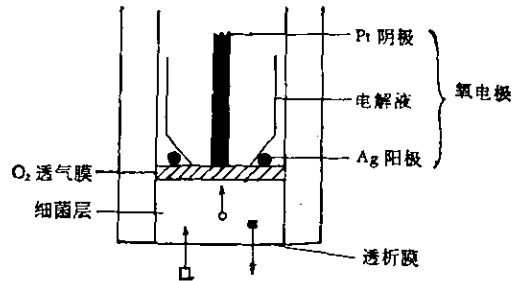


图 3 氧电极法细菌膜电极
□ 底物, ■ 产物, ○ 氧

(二) 极谱法

一些物质在细菌酶的催化下经受氧化还原反应,用适当的电极在一定的外加电压下测定反应产物的扩散电流,求出样品量。例如用暗色诺卡氏菌膜电极测定 Δ^1 -烯-3-酮时,利用细菌中的 Δ^1 脱氢酶催化底物与氧化剂(2,6-二氯酚靛酚)之间的反应,所得还原产物继而在旋转玻璃炭电极上,于+0.2 伏(相对于 SCE)

表 2 电流法细菌膜电极的生物化学与电化学反应

电 极	生化反应与电化学反应
红平诺卡氏菌 胆甾醇电极	胆甾-5-烯-3-醇 + $\frac{1}{2} O_2 \xrightarrow[\text{氧化酶}]{\text{胆甾醇}}$ 胆甾-4-烯-3-酮 + $\frac{1}{2} H_2O_2$
	$\frac{1}{2} O_2 + 2H^+ + 2e \xrightarrow[-0.6V]{Pt} H_2O$
暗色诺卡氏菌 甾体激素电极	睾丸酮 (或雄甾-4-烯-3, 17-二酮) + 2, 6-二氯酚靛酚
	$\xrightarrow[\text{脱氢酶}]{\Delta^1}$ 雄甾-1, 4-二烯-3-酮 (或 3, 17-二酮) + 2, 6-二氯酚对氨基酚
	2, 6-二氯酚对氨基酚 $\xrightarrow[+0.2V]{\text{旋转玻璃炭电极}}$ 2, 6-二氯酚靛酚 + $2H^+ + 2e$
硝化细菌 氨电极	$NH_3 + 1.5O_2 \xrightarrow{\text{Nitrosomonas sp.}} NO_2^- + H_2O + H^+$
	$NO_2^- + \frac{1}{2} O_2 \xrightarrow{\text{Nitrobacter sp.}} NO_3^-$
	$\frac{1}{2} O_2 + 2H^+ + 2e \xrightarrow[-0.6V]{Pt} H_2O$

外加电压下氧化, 其扩散电流值即与底物浓度成正比:

$$I_D \sim C_s$$

此类电极的典型测量装置示如图 4。

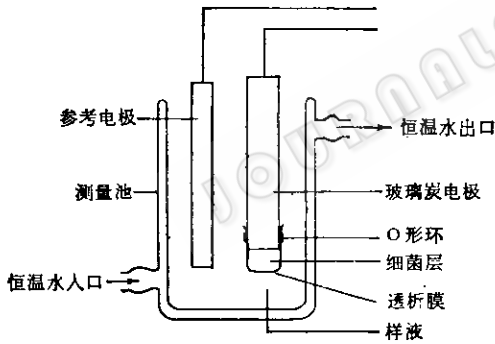


图 4 极谱法细菌膜电极测量池

方 法

一、细菌的培养与电极的组装

细菌膜电极多用好气性细菌, 最近也有使用厌气性细菌的报道^[3]。

1. 好气性细菌: 视菌种不同, 选取适宜的培养基, 在一定温度、pH 值下通气培养后, 离心分离出细菌细胞, 用缓冲液洗后, 将所得糊状物覆于传感电极的表面, 外面再覆透析膜, 置培

养液中备用。屎链球菌 (*Streptococcus faecium*) 精氨酸电极^[1], 尸胺杆菌 (*Bacterium Cadaveris*) L-天门冬氨酸电极^[4], 棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 硝酸盐电极^[5]均用此法。

2. 厌气性细菌: 需用无氧条件, 例如尿酸梭菌 (*Clostridium acidurici*) 丝氨酸电极所用细菌在 85% 氮、10% 氢、5% 二氧化碳气中培养, 并需在培养液中加入除氧剂, 如硫代乙醇酸。电极组装方法同以上好氧细菌。

二、细菌的固定

微生物细胞采用适当方法固定化, 可获稳定性高等优点。所以目前细菌膜电极趋向使用固定化细胞。用得较多的固定化方法是用物理包埋或吸附法及化学交联法。

1. 包埋法: 以聚丙烯酰胺凝胶包埋法为最多。典型方法: 将湿重 1.6--1.8g 细菌细胞与 10ml 含丙烯酰胺 1.425g 和甲叉双丙烯酰胺(交联剂)0.075g 的溶液混悬, 再加入四甲基乙二胺与过硫酸铵(催化剂)各 0.05g, 置玻片之间进行聚合。细菌细胞即被包埋在凝胶格子之中。

2. 交联法: 借助于双功能团试剂(常用戊二醛)使细菌细胞蛋白分子之间发生交联, 凝集成网状结构使细胞固定。

三、电极测量方法

电位法细菌膜电极常用标准曲线法。电流法细菌膜电极的测量可分为稳态法与动态法两种方法。前者是测定标准溶液达到稳态时的电流值,绘制 $I \sim C_s$ 曲线(或 $\Delta I \sim C_s$ 曲线)。通常为一直线(在一定浓度范围内)。后者是测定电流-时间曲线的斜率 dI/dt , 绘出 $dI/dt \sim C_s$ 图,此法测定快速。

特 点

同一般酶电极比,细菌膜电极有以下特点:

1. 制备细菌膜电极不需分离、提纯或浓集酶的繁杂操作。

2. 稳定性好,使用寿命较长。如谷酰胺酶电极仅稳定一天^[6],而黄色八叠球菌(*Sarcina flava*)细菌膜谷酰胺电极稳定 14 天^[7],组氨酸酶电极寿命为 8 天,相应的细菌膜电极为 21 天^[8]。

3. 细菌膜电极在响应转弱时,往往可置培养介质中浸泡而获再生,恢复原有响应性能。如屎链球菌细菌膜电极使用 20 天后,经培养液处理即可恢复其响应性能^[4]。此法利于降低成本。

4. 细菌中一般含有多种酶,对于需要多种酶的反应,细菌膜电极更为方便。例如屎链球菌中含有精氨酸脱氨酶,鸟氨酸氨甲酰基转移酶与氨基甲酸激酶等,可测精氨酸^[1]。如用相应的酶组合成酶电极则颇为不便。

5. 有些酶至今尚无分离方法,如半胱氨酸脱巯基酶,其酶无法取得,不能制出酶电极。但用含有此酶的摩氏变形细菌(*Proteus morgani*)制成半胱氨酸细菌膜电极,性能较好^[8]。

6. pH 与温度对细菌膜电极的影响小^[9]。不足的是由于细菌为多酶体系,一些细菌膜电极专一性较差。特别是氨敏电极易受干扰酶的影响。其次是因底物需通过细胞壁扩散,一般响应时间较长,但最近有人提出对电流-时间曲线取微分的动态法,在缩短时间方面取得了好的结果(35—70 秒)^[2]。

影响电极效应的因素

1. pH: 细菌膜电极通常遇到的一个问题

是细菌生长与传感电极要求的最适 pH 值不一,需要找出一个折衷的最佳值。如摩氏变形杆菌要求 pH 7.45, 而传感的硫化氢电极要求 pH < 5, 测量最适 pH 为 6.75^[3]。对于氨敏电极,其最佳 pH (>11) 不适于多数细菌生长,常取 pH 7—8 范围测量^[1,4,5,7,8]。

2. 缓冲液的种类与用量: Tris 缓冲液可产生氨,而焦磷酸盐缓冲液对细菌有抑制作用,均不能用于用氨敏电极的组氨酸电极^[8]。此外,缓冲剂用量不足有时会引起超能斯特响应^[8]。

3. 细菌用量: 细菌用量增加可使能斯特响应区增宽,但继续增加用量又会导致响应减缓,且电极用缓冲液浸泡也不易恢复到原有的响应值^[1,8]。

4. 温度: 细菌膜电极要求适宜的温度,但不如酶电极敏感。适当提高温度,可使细菌的新陈代谢以及底物的扩散加快,使响应时间缩短。

5. 活化剂与稳定剂: 硬脂酸铁可提高尿酸梭菌细菌膜电极对丝氨酸的响应^[3]。二硫代苏丁醇可稳定尸杆菌的活性(防止其-SH 活性基氧化),使电极寿命增长甚多^[4]。

6. 异烟肼的作用: 一些以氨敏电极为传感元件的细菌膜电极,由于细菌本身合成氨基酸的需要而保留部分氨,使电极对它不响应,底物浓度低时表现更为突出,在高浓度时则又导致超能斯特响应。加入异烟肼,利用其对氨同化代谢的抑制作用,可克服此弊^[4,8]。

7. 气氛的影响: 尿酸梭菌膜电极要求严格的无氧条件,因而必须排除氧气,而摩氏变形杆菌膜电极则要求无二氧化碳,需要供给氮(80%)、氧(20%)气体。

性能及应用

细菌膜电极的各项性能如表 3、表 4 所示。其中有些电极适于临床检验用。例如黄色八叠球菌膜电极可用于血清中谷酰胺浓度的检测,响应快速,选择性好,能斯特响应范围及稳定性均较理想。

表 3 电位法细菌膜电极的性能

细菌	检测对象	传感电极	线性响应范围(M)	响应斜率*	pH	响应时间(分)	稳定期(天)	干扰物质	参考文献
尿链球菌	L-精氨酸	氨敏电极	$5 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$	40—45	7.4	20	20	谷酰胺天冬酰胺	1
棕色固氮菌	NO ₂ ⁻	氨敏电极	$1 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-4}$	45—50	7.4	5—8	14	NO ₂ ⁻	5
尸胺杆菌	L-天门冬氨酸	氨敏电极	$3 \times 10^{-4} - 7 \times 10^{-3}$	45—50	8.0	<5	10	腺苷天冬酰胺	4
黄色八叠球菌	谷酰胺	氨敏电极	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-2}$	48.5	7.5	5	14		7
假单胞杆菌	L-组氨酸	氨敏电极	$1 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-3}$	48—53	7.5	7—12	21	尿刊酸脲	8
尿酸梭菌	丝氨酸	氨敏电极	$1.8 \times 10^{-4} - 1.6 \times 10^{-2}$	54	8.5	3—5	3	O ₂ , 谷酰胺	6
摩氏变形杆菌	L-半胱氨酸	硫化氢气敏电极	$5 \times 10^{-5} - 9 \times 10^{-4}$	25	6.75	5—8	6	CO ₂ , β-巯基-α-氨基丁酸	9

* 响应斜率 = $\Delta E / \Delta \lg C_S$, E: 电极电位 (mV), C_S: 待测物克分子浓度

表 4 电流法细菌膜电极的性能

细菌	检测对象	传感电极	线性响应范围 (M)	pH	响应时间	稳定时间(天)	干扰物	参考文献
暗色诺卡氏菌	睾丸酮 4-雄甾烯-3, 17-二酮	旋转玻璃炭电极 +0.2V	$2.5 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$	9.0	2—5 分			10
红平诺卡氏菌	胆甾醇	氧电极 -0.6V	$1.5 \times 10^{-5} - 1.3 \times 10^{-4}$	7.0	35—70秒 (动态法) 5—8 分 (稳态法)	28	葡萄糖	2
硝化细菌	氨	氧电极 -0.6V	$6 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-3}$	10	4 分	10		11

结 语

通过近年来的研究,细菌膜电极已获得一些进展,颇有发展前途。但仍有以下问题需要研究解决:(1)选择适宜的菌种和适合其生长的培养基,杜绝干扰,提高电极的选择性,(2)在动态电流法的基础上,研究提高响应速度。(3)目前细菌膜电极仅限于氨基酸、胆甾醇应用的研究,对无机离子的测定尚缺乏研究,若能找到适当的细菌使 $SO_4^{2-} \rightarrow S^{2-}$, 再结合使用高灵敏的 S^{2-} 电极以测硫酸盐,这将是很有意义的。(4)现多数研究系用细菌直接作电极,重复性差,应大力发展固相细胞技术,有利于改善电极性能。

参 考 文 献

- [1] Rechnitz, G. A. et al.: *Anal. Chim. Acta*, **94**: 357, 1977.
- [2] Wollenberger, U. et al.: *Anal. Lett* **13** (B 10): 825, 1980.
- [3] Di Paolantonio, A. L. et al.: *Anal. Chim. Acta*, **123**: 121, 1981.
- [4] Kobos, R. K., G. A. Rechnitz.: *Anal. Lett.*, **10**: 751, 1977.
- [5] Kobos, R. K., G. A. Rechnitz.: *Anal. Chem.*, **51**: 1122, 1979.
- [6] Guilbault, G. G., F. R. Shu.: *Anal. Lett.* **56**: 333, 1971.
- [7] Rechnitz, G. A. et al.: *Sci.*, **199**: 440, 1978
- [8] Walters, R. et al.: *Anal. Chem.*, **52**, 1680, 1980.
- [9] Jansen, M. A., G. A. Rechnitz.: *ibid.*, **101**, 125, 1978.
- [10] Wollenberger, U. et al.: *Anal. Lett.*, **13**(B13), 1201, 1980.
- [11] Karube, I. et al.: *Anal. Chem.*, **53**, 1852, 1981.