

化学媒介修饰葡萄糖氧化酶电极

胡 军

(上海市工业微生物研究所, 上海)

摘要 采用四氰对醌 (TCNQ) 修饰石墨碳电极, 葡萄糖氧化酶被吸附固定在电极表面。构成的酶电极以电流法测定底物葡萄糖, 其浓度线性响应范围为 0—40 mmol/L。研究了媒介电极对葡萄糖的响应, TCNQ 的电化学性质, 温度和 pH 对酶电极的影响。讨论了氧对媒介修饰电极的竞争作用以及媒介修饰酶电极的稳定性。

关键词 酶电极; 四氰对醌 (TCNQ); 媒介体; 固定化

继以氧电极和过氧化氢电极为基础的酶电极问世并有商品应用后^[1,2], 已有很多文章报道了采用各种有机媒介体代替氧作为生物氧化还原反应的电子传递体而组成的生物传感器。以这种技术为基础制成的各种酶电极一般具有: (1) 测定工作电压低, 不受氧分压控制; (2) 抗电活性物质干扰强; (3) 制作简单, 易于操作。目前已有产品进入市场^[3-5]。在医学临床分析和发酵工艺过程在线控制方面具有很大的实用价值。

在电化学性质上一般认为 TCNQ 须同电子供体组成氧化还原偶联对, 方可显示出有效的电化学活性。而本研究则将 TCNQ 溶解后吸附固定在石墨碳电极表面, 在同葡萄糖氧化酶协同工作时, 表现出良好的电子传递作用。

材 料 和 方 法

(一) 材料

四氰对醌二甲烷 (Tetracyanoquinodimethane, TCNQ) (Sigma); 石墨箔片 (La Carbone); 葡萄糖氧化酶 15 u/mg, II 型 (Sigma); 伏安溶出仪 BAS-100 (IN 47906, 美国); 绝缘及导电树脂, 碳二亚胺(上海化学试剂商店)。

(二) 方法

1. 化学修饰电极的制备: 石墨箔片切成直径 6 mm、厚 1 mm 的圆片, 用环氧树脂胶粘合在 3 cm 长的空心玻璃管上。树脂在 100℃ 硬化处理 20 min; 将 6 cm 长的电导线连接在管

内石墨片表面上, 用导电树脂粘合剂粘合。粘合过程在 100℃, 20 min 内完成。50 mmol/L TCNQ 溶于甲苯中至透明。将已制成的石墨电极浸入甲苯-TCNQ 溶液中, 室温保持 120 min。取出后溶剂挥发干燥 30 min。然后置于 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 保藏备用。

2. 酶电极的制备: 将上述化学修饰电极转入 25 mmol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 5.8, 内含 2.5% 碳二亚胺) 60 min, 取出后转入 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 9.0, 内含葡萄糖氧化酶 25 mg/ml), 室温保持 120 min。取出后用不含酶的 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤, 除去未交联的残余酶, 于 4℃ 冰箱保藏备用。

3. 测定装置: 电极同一个四通道生物传感器编码中间转换器连接, 用 BBC 64 K 微电脑分析电极的各种性能。参比电极为 Ag/AgCl。反应在一个 5 ml 玻璃夹套装置内进行。温度控制在 30±0.5℃。反应池体积 4 ml (20 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0) 电压设定在 200 mV。

4. TCNQ 的电化学性质分析: TCNQ 在酶反应过程中传递电子的电化学性质, 可用循环伏安法测定^[6]。测定在一个双管电极反应杯中进行, 其中工作电极为石墨碳电极, 辅助电极为铂网电极, 参比电极为饱和甘汞电极。相对于饱和甘汞电极, 溶出伏安计在 -300 mV 至 +500 mV 的范围内标记。扫描速率为 5 mV/min。

结果和讨论

(一) 酶电极的校正曲线

酶电极在 pH 7.0 和 30℃ 温度时, 其线性稳定态响应范围为 0—40 mmol/L (图 1)。超过 40 mmol/L, 曲线趋向非线性并在 55 mmol/L 葡萄糖浓度时达到饱和。酶电极对葡萄糖的响应 30 秒可达 95%, 3 min 达到稳定态。

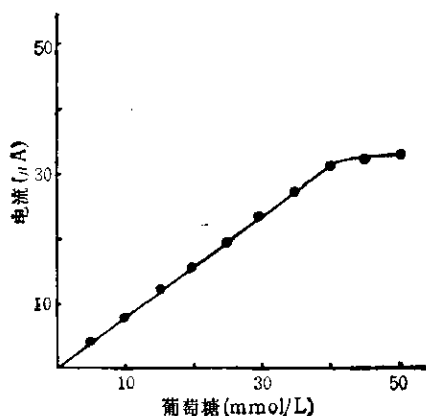


图 1 酶电极的校正曲线

(二) 酶电极的 pH 范围

在 pH 4.0—9.0, 温度 30℃ 用 50 mmol/L 葡萄糖对 pH 的影响进行了研究 (图 2)。

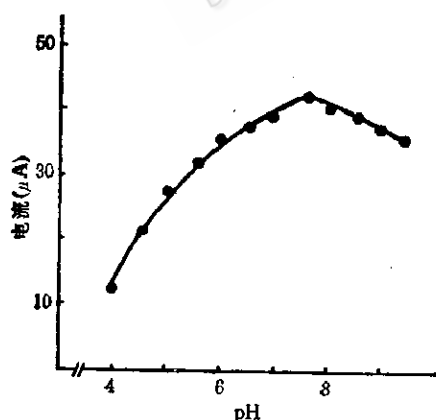


图 2 酶电极的 pH 范围

对 TCNQ 修饰酶电极的 pH 范围研究表明, 该酶电极的最佳 pH 为 7.5, 同前述采用人工电子传递体的葡萄糖氧化酶电极相类似^[7,8]。可溶性葡萄糖氧化酶的最适 pH 为 5.5—5.7^[9],

这一差别可能是改良电极反应系统中, 无氧参与氧化还原反应而较少 H_2O_2 产生, 因而只有极少量的质子参与了 TCNQ 离子的还原。但过高或过低的 pH 条件仍将导致酶蛋白的变性失活。

(三) TCNQ 的电化学性质

采用循环伏安方法可考察 TCNQ 的电化学性质 (图 3)。图中 (a) 表明 TCNQ 与葡萄糖共存时的伏安图谱, (b) 是在系统中加入葡萄糖氧化酶后伏安图发生的变化, 可见在 220 mV 处产生很大的氧化电流。这说明 TCNQ 这一电子受体可以氧化葡萄糖氧化酶而使本身处在还原状态, 然后又可进一步被碳电极氧化放出电子。

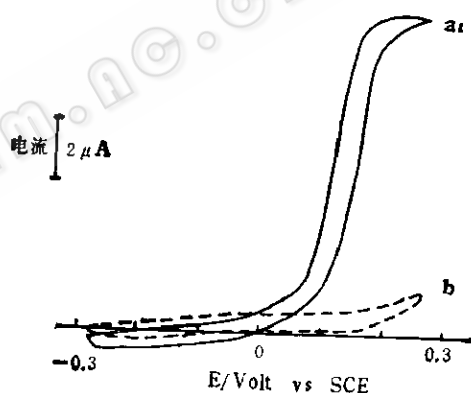


图 3 TCNQ 伏安图谱

TCNQ (50 mmol/L), 磷酸缓冲液 (pH 7.0, 20 mmol/L); 温度 30℃; 50 mmol/L 葡萄糖, 葡萄糖氧化酶 25 mg/ml

(四) 温度对酶电极的影响

用 50 mmol/L 葡萄糖, 在 pH 7.0, 于 4—50℃ 范围内考察了温度对酶电极的影响 (图 4)。在饱和葡萄糖浓度下, 电极的稳定态电流随温度的增加而增加。图示的非线性曲线可能是因为从低温度的底物扩散限制转为高温时的酶反应限制所致。

(五) 氧气对媒介修饰电极的干扰

在用纯氧饱和的缓冲液, 于 pH 7.0、30℃ 时测定葡萄糖, 其电流的峰值比用充氮的缓冲液测定低 12.5%。但由于媒介电极的工作电压

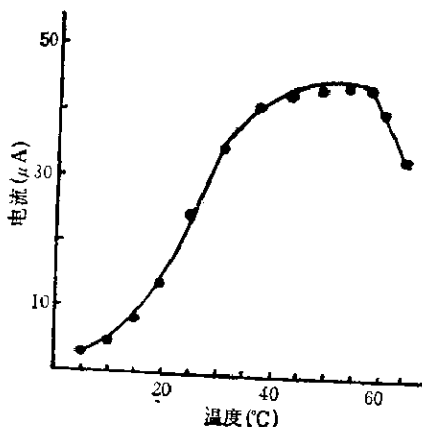


图4 温度对酶电极的影响

较低,一般在 200 mV 左右,因此所产生的 H_2O_2 无法被电极氧化产生干扰电流。氧的干扰显然是由于 TCNQ 同氧之间存在着竞争电子的作用;如能适当提高媒介浓度则可减少这类竞争干扰。在用空气饱和的缓冲液所做的试验中证明上述这一推测。此时氧的干扰小于 5%。

(六) 媒介修饰电极的稳定性

一个时期来,媒介修饰电极一般注重反应的低干扰、灵敏度和其精确度以及它的低价格。对于酶电极的长期操作的稳定性较少重视,这显然是受了一次性使用的笔型血糖测试仪的影响^[10]。通过采用碳电极表面修饰和戊二醛协同交联法可获得稳定的酶固定在电极表面,因而

有利于媒介修饰电极的长期稳定的工作^[11]。

研究和发 展媒介或电子直接传递生物传感器是目前生物传感器研究中令人关注的研究方向之一,因为这类生物传感器比之传统的以氧电极或过氧化氢电极为基础的酶电极更为简单,价格更具竞争性,且响应快速,更少干扰性。TCNQ 同其他电子传递媒介一样具备上述优点,因而具有很大的实用潜力。对 TCNQ 修饰电极的长期稳定性及同传统测定方法的比较有待进一步研究。

参 考 文 献

1. Clark L et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**: 29—45, 1962.
2. Updick S J et al.: *Science*, **158**: 270, 1967.
3. Williams D L et al.: *Anal. Chem.*, **42**: 118—121, 1970.
4. Cass A E G et al.: *Anal. Chem.*, **56**: 667—672, 1984.
5. McCann J M: *Online Publications*, 213—215, Pinner, U. K., 1987.
6. Davis G: *Biosensors: Fundamental and applications*, 216—230, Oxford University Press, Oxford, 1987.
7. Inaiello R M et al.: *Anal. Chem.*, **53**: 2090—2095, 1981.
8. Turner A P F et al.: *Methods in Enzymology*, **137**: 90—98, 1988.
9. Bentley R: *The Enzymes* 7, Academic Press, New York, 567, 1963.
10. 胡 军: *生物化学与生物物理进展*, **17**: 198—201, 1990.
11. J Hu: *Proceedings of China-Japan Joint Symposium on Enzyme Engineering*, Oral 18, 1990.