

鱼鳔膜为基质的生物传感器测定葡萄糖的研究

贾文娟 崔 淼 张 彦 双少敏*

(山西大学化学化工学院, 太原 030006)

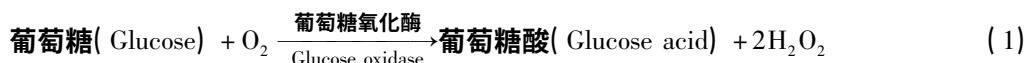
摘 要 以鱼鳔膜为基质固定葡萄糖氧化酶,偶联氧电极,构建了葡萄糖生物传感器,通过测定溶解氧浓度的变化定量测定葡萄糖。考察了酶浓度、pH 值、缓冲液浓度对传感器的影响,优化了实验条件: 即酶浓度为 1 mg, pH 7.0,缓冲液浓度为 100 mmol/L。此传感器具有较宽的线性范围(0.016 ~ 1.2 mmol/L),较短的响应时间(70 s),较低的检出限(8 μ mol/L),良好的重复性(2.5% , $n = 10$) 和重现性(1.2% , $n = 3$),连续使用 200 次后响应信号能保持 95% 以上; 3 个月后响应信号为初始值的 88.5%。此传感器已成功应用于人血清中葡萄糖含量的测定,测定结果与市售试剂盒法获得的结果相一致。回收率为 95.2% ~ 106.3%。

关键词 葡萄糖传感器; 鱼鳔膜; 葡萄糖氧化酶

1 引 言

葡萄糖的定量测定在临床医学、生物化学、食品科学等领域有极其重要的作用。健康人体中空腹血糖浓度的正常范围为 3.89 ~ 5.83 mmol/L,血糖浓度持续偏高,是发生某些疾病征兆^[1],如糖尿病、高血糖症等。葡萄糖的测定方法有色谱法^[2]、光谱法^[3]和毛细管电泳法^[4]等,而这些方法有的需要复杂的前处理过程,有的仪器设备成本高。生物传感器法^[5~9]由于具有检测速度快、选择性好、体积小、易操作等优点,得到了广泛应用。

生物传感器包括酶传感器、微生物传感器、免疫传感器、组织传感器、基因传感器、细胞及细胞器传感器等^[5~9]。在葡萄糖传感器的研究中,酶传感器研究最广,它基于葡萄糖氧化酶的催化氧化反应,反应式如下式:



葡萄糖氧化酶的固定化是构建葡萄糖传感器的重要环节。固定酶的载体可采用无机材料、有机高分子膜及天然生物材料等。天然膜材料(鸡蛋膜^[10]、竹腔内膜、洋葱内膜^[11]等) 具有生物相容性好、无毒等优点,已被用于固定葡萄糖氧化酶。但这些膜材料的机械强度差,限制了葡萄糖生物传感器的应用。

鱼鳔膜具有良好的透气性和透水性,价廉易得,机械强度高且韧性好,可以为酶的固定化提供优良的生物基质^[12]。本研究基于溶解氧电极,采用天然的生物材料鱼鳔膜和交联剂戊二醛、包埋剂壳聚糖,构建了新型的葡萄糖生物传感器。对影响因素进行了优化,建立了新型葡萄糖分析测试方法,并成功应用于血液中葡萄糖含量的测定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Pasco CI-6542 溶解氧传感器(15 cm $\times$ 10 cm $\times$ 5 cm, Pasco Scientific, Roseville, CA); pH S-3C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂); 恒温磁力搅拌器(上海雷磁新泾仪器有限公司); TU1901 紫外可见分光光度计(北京普析仪器公司); L600 低速台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

葡萄糖氧化酶(酶活力为 273 Units/mg, Sigma 公司); β -D-葡萄糖(Acros Organics 公司); 壳聚糖(脱乙酰度 75% ~ 85%, Sigma 公司); 葡萄糖试剂盒(北京北化康泰临床试剂有限公司); 新鲜鱼鳔膜;

2010-11-22 收稿; 2011-03-14 接受

本文系国家自然科学基金(No. 90813018) 和山西省回国留学基金资助

* E-mail: smshuang@sxu.edu.cn

$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.0), $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ 和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-HCl}$ 缓冲溶液。血样由山西大学校医院提供,其它试剂均为分析纯。实验用水为蒸馏水。

2.2 血样的处理

新鲜血样加入抗凝剂肝素后,以 4000 r/min 离心 5 min,静置分层,用吸管将上清液吸出,置于另一试管中,加盖保存至 4 °C 冰箱中备用。

2.3 酶膜的制备

取新鲜鱼鳃一个,依次用自来水和蒸馏水冲洗,在顶端处剪开一缺口,铺置于洁净的表面皿中,小心截取一个直径为 1.5 cm 的圆形膜。在膜上滴加 50 μL 0.3% (w/V) 壳聚糖溶液,15 min 后滴加 50 μL 2.0% (w/V) 葡萄糖氧化酶溶液,晾干稍干后再滴加 10 μL 交联剂 10% (V/V) 戊二醛溶液,室温放置 2 h,置于冰箱中冷藏过夜。用 100 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7) 冲洗数次,以便将未固定的酶及多余的包埋剂和交联剂洗掉。制得的酶膜浸泡在 100 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7) 中,置于 4 °C 冰箱中保存备用。

2.4 测定方法

将制备好的酶膜紧贴于溶解氧电极的表面,即成酶电极,将此酶电极浸入 5 mL 100 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7) 中,在均匀搅拌条件下加入一系列葡萄糖标准溶液 (0.05 mol/L) 和待测溶液,用 Work-shop 500 软件记录溶解氧浓度的下降值,从而求得葡萄糖溶液的浓度。

3 结果与讨论

3.1 传感器的响应特性

将电极浸入 5 mL 100 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7) 中,在搅拌条件下加入不同浓度的葡萄糖标准溶液。随着葡萄糖溶液的加入,传感器产生一系列的响应,如图 1 所示。随着葡萄糖浓度的增加,溶解氧下降值增大,这是葡萄糖浓度定量分析的基础。葡萄糖浓度 C (mmol/L) 和溶解氧浓度下降值 Y (mg/L) 之间的线性关系为 $Y = 7.33662C - 0.16732$, $R = 0.9998$,如图 1 插图。

3.2 实验条件的优化

3.2.1 固定酶浓度的影响 酶的活性的高低直接影响酶所催化反应的速率,固定时所用酶溶液的浓度会影响电极表面固定的酶量,从而影响传感器的响应信号。本实验制备了 5 张酶膜,固定化酶所用的酶浓度依次为 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% 和 2.5% (w/V),连接溶解氧装置,考察固定酶浓度对传感器响应的影响。

在 5 mL 100 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7) 中,加入 50 μL 0.05 mol/L 葡萄糖标准溶液,记录溶解氧浓度响应曲线 (图 2)。结果表明,随固定酶浓度的增加 (0.5% ~ 2.0%),响应信号增强,但当酶浓度大于 2.0% 时,信号增强幅度变小,所以固定酶浓度选取 2.0%。

3.2.2 戊二醛浓度的影响 戊二醛作为交联剂,它的浓度也会影响传感器的响应行为,在 5 mL 缓冲溶液中加入适量葡萄糖标准溶液,记录溶解氧浓度下降曲线。结果表明,随戊二醛浓度的增大 (5% ~ 20%, V/V),响应信号同时增强;当戊二醛浓度为 20% 时,响应达到最大值。这是由于高浓度的戊二醛会抑制酶活性^[3],从而引起响应信号的降低。本研究中戊二醛浓度选取 20% (V/V)。

3.2.3 pH 值的影响 取固定酶浓度为 2.5% (w/V),戊二醛浓度为 20% 的鱼鳃膜,依次以 pH 5.0, 6.

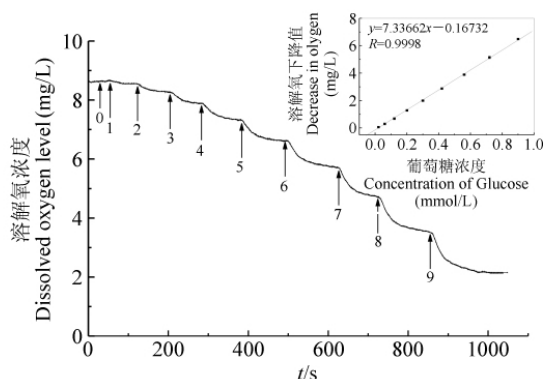


图1 葡萄糖传感器对不同浓度葡萄糖溶液的响应曲线

Fig. 1 Typical response curve of glucose biosensor at pH 7.0 phosphate buffer (100 mmol/L) after each successive addition of various volume of 0.05 mol/L glucose standard. Error bars are 95% confidence intervals calculated from three replicate measurements

加入 0.05 mol/L 葡萄糖标准溶液体积 (The standard addition of 0.05 mol/L glucose solution in volume, respectively) (0) 0.0; (1) 2.0; (2) 4.0; (3) 6.0; (4) 8.0; (5) 10.0; (6) 12.0; (7) 14.0; (8) 16.0; (9) 18.0 μL 。

0, 7.0, 8.0 和 9.0 的磷酸盐缓冲液(100 mmol/L) 为底液,考察了 pH 值对传感器的影响。

在 5 mL 底液中加入适量葡萄糖标准溶液,记录溶解氧浓度的响应曲线。结果表明,响应信号与 pH 值呈现“钟”型曲线;在 pH =7.0 时,响应信号最大;当 pH <6.0 或 pH >8.0 时,响应值明显降低。这是由于过酸或过碱的底液会破坏酶的结构,使之活性降低,进而导致传感器灵敏度下降。本实验选取 pH =7.0。

3.2.4 缓冲液浓度的影响 选取一系列浓度(25, 50, 100, 200, 300 和 400 mmol/L) 磷酸盐缓冲液(pH 7.0), 在5 mL 上述底液中加入适当葡萄糖标准溶液,记录溶解氧浓度下降曲线。结果表明,随着缓冲液浓度的增加,响应信号增强,但相应的响应时间也增长。考虑到测定速度,后续实验选取缓冲液浓度为 100 mmol/L。

3.3 线性范围、检出限、响应时间、重复性及重现性
本传感器的葡萄糖浓度在 0.016 ~ 1.2 mmol/L 内呈现良好的线性关系; 检出限为 8 μmol/L (3σ); 响应时间以从加样到溶解氧浓度值达到稳定值 95% 时的时间计算,平均响应时间为 70 s。

对同一张酶膜加入 0.2 mmol/L 葡萄糖溶液,重复测定 10 次,响应信号的 RSD 为 2.5%,说明此传感器有良好的重复性;采用3张不同的酶膜,分别加入0.02 mmol/L 葡萄糖溶液,响应信号的RSD为1.2%,说明传感器具良好的制备重现性。

3.4 传感器的寿命

本葡萄糖生物传感器在同一张酶膜上对葡萄糖连续测试 200 次,响应信号仍能达到初始值的 95% 以上; 若存放于 4 ℃ 冰箱中,每隔 3 ~4 d 重复检测 0.2 mmol/L 葡萄糖溶液的响应值,3 个月后响应信号为初始值的 88.5%。

3.5 葡萄糖传感器的干扰的测定

本实验选取血样为测定对象,考察了血样中可能存在的干扰物质对测定结果的影响(表 1)。结果表明,血液中的常见物质对葡萄糖的测定几乎无影响。

3.6 样品分析

取 100 μL 处理好的血清,加入 5 mL 100 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7),连接溶解氧装置,进行测定;在各样品中分别加入 5.55 mmol/L 葡萄糖标准溶液,进行回收率测定(表 2),回收率在 95.2% ~ 106.3% 之间;用试剂盒法进行对照,两种方法所得结果吻合。

表 2 血样分析及回收率实验结果

Table 2 Determination and recoveries results of glucose in blood samples

样品 Blood samples	本传感器测定 Biosensor method (mmol/L)	试剂盒方法测定 Assay kit method (mmol/L)	加入浓度 Added (mmol/L)	测得浓度 Found (mmol/L)	回收率 Recovery (%)	RSD (% , n = 3)
1	4.64	4.46	5.55	5.42	97.6	2.5
2	3.33	3.42	5.55	5.28	95.2	3.1
3	5.13	5.08	5.55	5.82	104.9	2.7
4	5.05	4.98	5.55	5.90	106.3	2.9
5	4.48	4.42	5.55	5.51	99.3	1.9

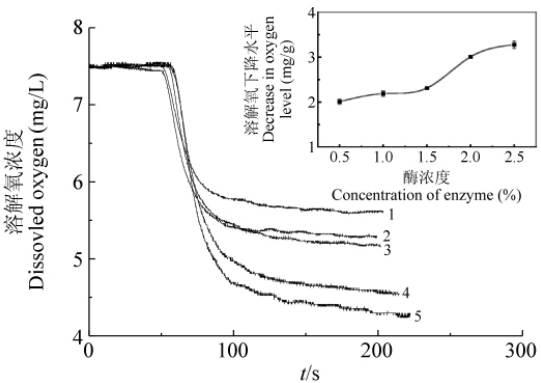


图 2 固定酶浓度的影响

Fig.2 Effect of enzyme loading

加入酶浓度(Enzyme concentration, %): (1) 0.5; (2) 1.0; (3) 1.5; (4) 2.0; (5) 2.5。Error bars are 95% confidence intervals calculated from three replicate measurements.

表 1 干扰实验

Table 1 Interference study

干扰物 Interferent	干扰物浓度 Concentration of interferent (mmol/L)	葡萄糖的 表观浓度 Concentration equivalent to glucose (mmol/L)
CaCl ₂	20	-0.0108
KCl	20	0.0124
FeCl ₃	20	-0.0113
MgSO ₄	20	0.0158
NaCl	20	0.0088
NH ₄ Cl	20	0.0062
氨基乙酸 Aminoacetic acid	20	0.0025
尿素 Urea	20	-0.0052
抗坏血酸 Ascorbic acid	20	0.0244

4 结 论

本研究制备的基于鱼鳔膜固定葡萄糖氧化酶的葡萄糖生物传感器具有响应间短、线性范围宽、操作简单、寿命长等优点,并已成功应用于人体血液中葡萄糖的测定,测定结果与试剂盒一致,获得了较为满意的结果。说明本实验构建的以鱼鳔膜为基质的葡萄糖生物传感器可以为血液中葡萄糖的测定提供一种简便、快速、精确的方法。

References

- 1 Wang J. *Electroanalysis*, **2001**, 13(12): 983 ~ 988
- 2 DONG Xiao-Dong, HOU Wan-Ling, SU Shao-Zhe, ZHANG Yu-Bin(董晓东, 侯宛玲, 苏绍哲, 张玉彬). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2000**, 28(5): 656
- 3 WU Ling-Li, ZHANG Huan-Huan, LI Quan-Min(吴伶俐, 张欢欢, 李全民). *Chinese J. Analysis Laboratory*(分析试验室), **2009**, 28(3): 85 ~ 88
- 4 Kuci Z, Hins J, Kuci S. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2006**, 69(1-2): 79 ~ 87
- 5 XIONG Zhi-Gang, LI Jian-Ping, TANG Li, CHEN Zhi-Qiang(熊志刚, 李建平, 唐 丽, 陈志强). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2010**, 38(6): 800 ~ 804
- 6 Quinto M, Losito I, Palmisano F. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 420: 9 ~ 17
- 7 Lomillo M A A, Ruiz J G, Pascual F J M. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 547(2): 209 ~ 214
- 8 ZHU Yu-Nu, PENG Tu-Zhi, LI Jian-Ping(朱玉奴, 彭图治, 李建平). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2004**, 32(10): 1299 ~ 1303
- 9 TANG Fang-Qiong, WEI Zheng, CHEN Dong, MENG Xian-Wei, GOU Li, RAN Jun-Guo(唐芳琼, 韦 正, 陈 东, 孟宪伟, 苟 立, 冉均国). *Chem. Chinese University*(高等学校化学学报), **2000**, 21(1): 91 ~ 94
- 10 Wu B, Zhang G, Zhang Y, Shuang S, Choi M M F. *Anal. Biochem.*, **2005**, 40(1): 181 ~ 183
- 11 YANG Xiao-Feng, ZHOU Zai-De, QIAO Li-Na, XIAO Dan(杨晓凤, 周在德, 乔丽娜, 肖 丹). *Chinese J. Chemical Sensors*(化学传感器), **2005**, 25(3): 61 ~ 66
- 12 Kumer J, D'Souza S F. *Biosens. Bioelectron*, **2009**, 24: 1792 ~ 1795
- 13 Pozzo A D, Vanini L, Fagnoni M, Benedittis A, Muzzarelli R A A. *Carbohydrate Polym.*, **2000**, 42: 201 ~ 206

A Biosensor Based on Swim Bladder Membrane as Substrate for Determination of Glucose

JIA Wen-Juan, CUI Miao, ZHANG Yan, SHUANG Shao-Min*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract A glucose biosensor based on the swim bladder immobilized glucose oxidase has been developed. The glucose concentration was quantified by the decrease of dissolved oxygen. The effects of enzyme loading, pH, buffer concentration and interference were studied. When the enzyme concentration was 2.0%, pH was 7.0, and the buffer concentration was 100 mmol/L, the biosensor showed a maximum response. The biosensor showed a wide linear response with a concentration range of 0.016 – 1.2 mmol/L, fast response time (70 s), good repeatability (2.5%, $n = 10$) and satisfactory reproducibility (1.2%, $n = 3$). The biosensor retained 88.5% of its initial response after 3 months, and the immobilized enzyme retained its 95% activity after 200 times used. The proposed biosensor method was successfully applied to the determination of glucose concentration in human blood serum, and the results were agreement with that obtained from a colorimetric assay kit method. The recoveries were between 95.2% and 106.3%.

Keywords Glucose biosensor; Swim bladder; Glucose oxidase

(Received 22 November 2010; accepted 14 March 2011)