

媒体酶电极

胡 军

(上海市工业微生物研究所)

提 要

通过精心设计电极表面,电解质系统并以小分子有机导电化合物作为电子传递体,可在生物氧化-电化学反应过程中达到无氧反应,因而为排除反应系统中的 pH,氧分压和其他电活性物质的干扰,提高分析测定的灵敏度,精度和扩大测定范围打下基础。本文拟就媒体修饰电极系统中的酶、有机导电媒体、电极、以及此类酶电极的应用与前景作一综述。

关键词 媒体,酶电极,伏安图谱

一、媒体和氧化还原酶

采用媒体作为生物氧化还原反应中的电子传递体,一般有二种形式:即直接电子传递和间接电子传递。直接电子传递指的是氧化还原酶反应活性中心同电极之间电子的自由传递。如细胞色素 c 在改良的金电极上所展示的可逆电化学反应。这个反应已被用于偶联一些还原型和氧化型的酶,构成酶传感器用于理论研究^[1-3]。目前研究较多且有实用报道的^[4]反应系统是所谓间接媒体系统。在这类反应系统中,电子由一类有机导电化合物运送传递于蛋白质和电极之间^[5-8]。作为一个好的媒体有机导电化合物尚需具备以下一些条件:

(1) 极易参与有生物材料和电极存在的氧化还原反应,并有效地加快电子传递。

(2) 在测定条件下媒体本身十分稳定。

(3) 在传递电子的同时不参与副反应,如同氧的还原反应。

(4) 同反应系统中存在的电活性物质之电位差相差大。

(5) 不受广范围 pH 的影响。

(6) 最好无毒性。

(7) 易于同生物催化剂固定化^[9]。

Cass 等人^[10],在 1984 年用二茂铁及其衍生物作为电子媒介体成功地制成了一种媒体改良酶传感器。并在此基础上制成笔形血糖仪,这种仪器目前主要用于糖尿病人的家用自我监测,同现有产品相比较^[4],具有记忆和液晶数字显示功能,其特点是快速,精确和使用简便^[11]。

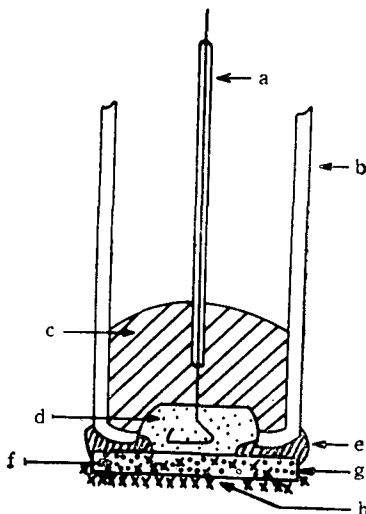


图 1 媒体酶电极结构简图

a, 金属联接线; b, 玻璃管; c, 绝缘树脂; d, 导电树脂; e, 环氧树脂; f, 媒体; g, 石墨片; h, 固定化酶

媒体改良电极的结构简图及反应方式见图 1 和图 2。

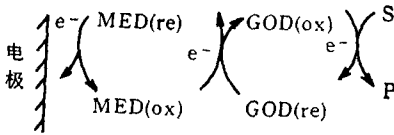


图 2 媒体酶电极反应过程

MED: 媒体; GOD: 葡萄糖氧化酶; S: 底物 P: 产物

现已投入应用研究的媒体除二茂铁外, 尚有四塞富瓦烯 (TTF)^[5], 四氰基醌二甲烷 (TCNQ)^[6], 苯醌^[7]等。在技术上普遍采用直流循环伏安法 (Direct current cyclic voltammetry) 来考察媒体的电化学性质。对媒体而言, 一般应具有低的工作电压和高的电化学速度常数, 这一点能确保传感器的响应不受电极动力学的限制。

以二茂铁及其衍生物为例, 测定系统中设置三个不同电极。a, 工作电极; b, 辅助电极和 c, 参考电极。工作电极一般由金, 白金或碳材料制成, 辅助电极常用白金网状电极, 饱和甘汞电极作为参考电极。实验原理是将工作电极参照饱和甘汞电极设定一个恒定的电压, 然后使电流在辅助电极和工作电极之间通过。

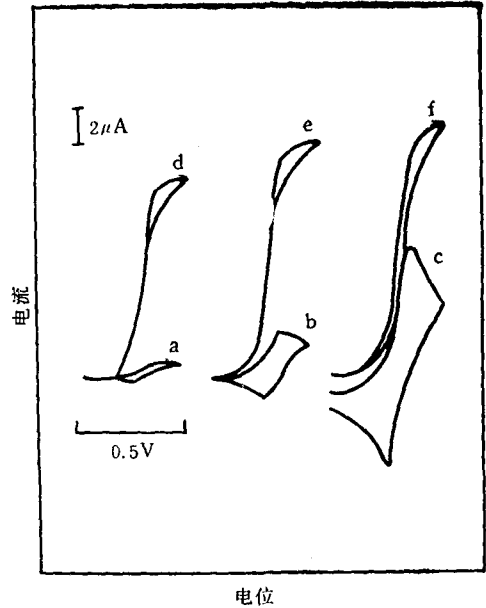


图 3 DC-直流循环伏安图谱

输出电流联接在一个配有三角波形发生器的稳压计和 X-Y 记录仪, 记录下电流-电压曲线图谱 (图 3)。

目前采用媒体作为电子载体而组建的酶传感器已有近 10 种 (表 1)^[9]。

将 200 μmol/L 的二茂铁单羧基酸溶于

表 1 二茂铁改良酶电极的种类

底物	酶	固定化方法	范围 (mmol/L)	线性范围 (mmol/L)	达95%响应时间(秒)	30℃连续使用半寿期(小时)
葡萄糖	葡萄糖氧化酶	共价键	<0.1~70	0~30	60~90	24~600
葡萄糖	葡萄糖脱氢酶	共价键	<0.25~4.0	0~4	<30	36
甲醇	酒精脱氢酶	包埋	$1 \times 10^{-3} \sim 0.2$	0~0.1	<20	1.5
一氧化碳	一氧化碳脱氢酶	包埋	$<2 \times 10^{-3} \sim >7 \times 10^{-2}$	0~0.068	<10	~6
L-乳酸	L-乳酸氧化酶	共价键	1~4	0~1	75	~10
氨基酸	L-氨基酸氧化酶	包埋	<1~15	0~4	120	18
羟乙酸	(S)-2-羟基酸氧化酶	包埋	<1~20	0~7	180	3
半乳糖	半乳糖氧化酶	包埋	<1~40	0~20	180	~1.5
NADH	二氢硫辛酸胺脱氢酶	共价键	0.1~3	0~1	60	—

50mmol/L 磷酸盐电解质中, pH7.0。图中 abc 为无氧化酶时的伏安扫描图谱, 其速率依次为 1, 10 和 100 mV S⁻¹。图中 def 表示加入

11 μmol/L 葡萄糖氧化酶和 50 mmol/L 葡萄糖底物时的扫描图谱。

二、电极和媒体修饰

媒体电极系统中,工作电极和参考电极二者的表面积最好一致。采用 Ag/AgCl 电极作为参考电极,一般在使用 1 或 2 天后应实行再生,其方法是将银片(0.13mm)置于 0.1mol/L HCl 或 0.1mol/L KCl 溶液内,电压相对于饱和甘汞电极(SCE)维持在 +400mV,约 30 分钟,电流密度约 0.4mA/cm²。

由于碳材料表面易于改造,易于固定化操作,白金所产生的基础电流低下,因而常被用作改造对象。

电极表面的修饰对电极本身同酶蛋白偶联,从而进行良好的电化学反应极其重要。电极表面修饰的目的是以达到电极表面上存在能使某一氧化还原蛋白相偶联的功能基因,从而

使电子在酶活性中心和电极之间的转移得以实现。

因此作为一个电极表面修饰剂,其本身必需是一个双功能团化合物(见图 4 的一种双功能团表面修饰剂)。其 X-端联接电极,而另一端 Y 则联接氧化还原蛋白质。X-Y 化合物的分子结构可以是芳香族类,也可以是直链脂肪族,其长度并不影响电子转换的速率^[14]。另一种表面修饰剂具有多功能基团,它在电极-液体界面上至少有二种以上的功能基团可供利用^[15]。图 5 所示的多功能团修饰剂称为吡啶醛硫代咪唑(PATS),其功能团主要是一个吡啶氮和若干个硫酰胺 N-H 基团。它们之间的顺序排列可有效地将电子传递到带正或负电荷的蛋白质上。

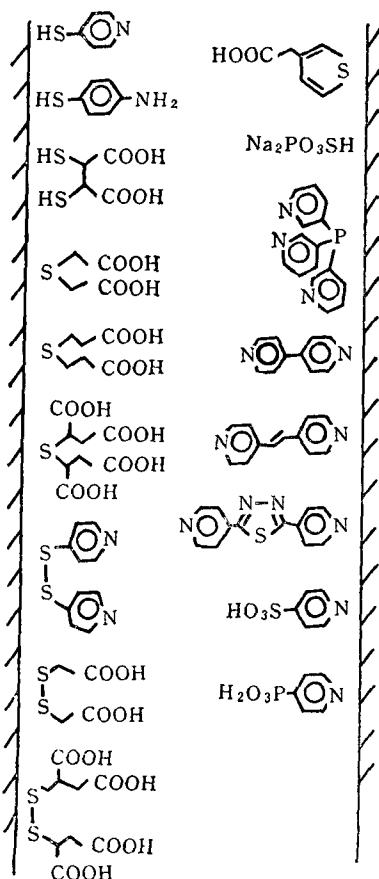


图 4 X-Y 表面修饰剂结构图
图右是 X-基团,图左为 Y-基团

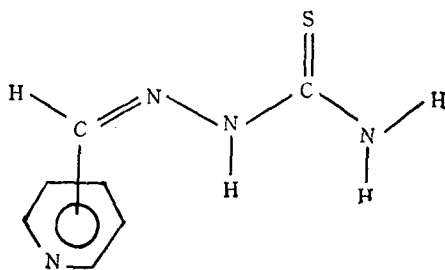


图 5 PATS 表面修饰剂结构图

三、笔形血糖仪^[11]

笔形血糖仪是采用媒体作为电子载体获得成功的代表。血糖仪的总长度为 13.5cm,直径为 0.9cm,总重量不到 30g,血糖测定范围在 2.2—25mmol/L 之间(图 6)。

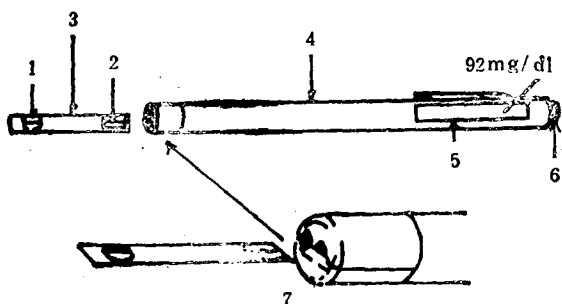


图 6 笔形血糖仪简图

1. 葡萄糖氧化酶电极; 2. 联接接触片; 3. 探头; 4. 笔身;
5. 液晶显示块; 6. 开关; 7. 笔端放大图

从图6可见葡萄糖氧化酶被固定在一次性使用的探头末端,氧化葡萄糖后产生的电子由二茂铁媒体转移至电极。产生的电流同血糖浓度成正比例,并在30秒后在液晶显示块上显示结果。每个探头使用一次,每购买一批探头(50个)用配套的校正探头将仪器校正一次即可。同现有YSI葡萄糖分析仪对照测试,相关性达到0.985。在自愿接受试验的40名男子和13名女子中(年龄在15—74岁)有73—90%的人认为本仪器比现有测试法好。92—96%的问及者表示愿意使用新仪器。目前血糖笔形测试仪已投放欧美市场受到相当好评^[1]。

四、酶电极的发展

电流型酶电极的发展可经过三个阶段。第一阶段是结构类型比较复杂的酶电极分析仪,如实验室使用的葡萄糖分析仪^[12,13]。这类系统通常用四种关键部件:a,透析器;b,生物接受器;c,换能器;d,电子放大系统。第二阶段或称第二代生物传感器是媒体酶电极,其间的电化学生物元件之间的连接更为密切,省略了电子透析和换能器。第三代生物传感器就是所谓的生物芯片(Biochip)这将是集生物功能,电子技术,传感和信息处理为一体的超级生物传感器。

媒体技术的发展开辟了生物传感器研究的

新领域,相信在今后几年内将会有更多有关的媒体酶电极商品化的报道,希望国内关心和从事这一研究的科研人员加以重视。

作者对 John Higgins 教授给予本工作的帮助表示衷心感谢。

参 考 文 献

- 1 Niwa M *et al.* *Tokai J Exp Clin Med*, 1981; 6(4): 403
- 2 Eddowes M J, Hill H A O. *J Chem Soc Chem Commun*, 1977; 89: 771
- 3 Albery W J *et al.* *J Am Chem Soc*, 1981; 103: 3904
- 4 McCann J M. *Pharmaceuticals and health care*. Pinner, England: Online Publications 1987; 450—453;
- 5 Hendry S P. *Biosensor: Instrumentation and processing*. Pinner, England: Online Publications, 1987; 125
- 6 Kulys S P *et al.* *Analytica Chimica acta*, 1980; 117: 115
- 7 Turner A P F. *Methods in Enzymology*, 1987; 137: 91
- 8 Cass A E G. *Anal Chem*, 1984; 56: 667
- 9 Matthews D R. *Lancet*, 1987; April (4): 773
- 10 Davis G. *Biosensors: Fundamental and applications*. Oxford: Oxford University Press, 1987; 247—275
- 11 Scheller F *et al.* *Phil Trans R Soc Lond*, 1987; 316: 85
- 12 Allen P M *et al.* *J Electroanal Chem*, 1984; 178: 69
- 13 Hill H A O *et al.* *J Electroanal Chem*, 1985; 181: 315
- 14 D'Costa E J *et al.* *Biosensors*, 1986; 2: 71
- 15 Brooks S L *et al.* *Biosensors*, 1987; 3: 45

[本文于1989年4月28日收到]

稻壳制复合肥料技术

所需原料丰富,产品用途广泛,是乡镇及家庭企业上马的好项目,厂房面积100平方米,主要设备为粉碎机、蒸煮釜、糖化罐和配料缸,需水电,投资5千—1万元便可。原料成本0.15元/斤,售价0.3元/斤,利润0.1元/斤,若日产2吨,2个月便可收回全部投资。培训费:单位500元,个人390元;函授:单位100元,个人60元。

稻壳制饲料技术

近年来,饲料原料紧缺,产品脱销。稻壳制成饲料,将大大缓解饲料紧缺现象。生产所需厂房100平方米,主要设备为粉碎机、蒸煮釜、糖化罐,配料缸,需水电,投资5千—1万元便可投产。原料成本0.15元/斤,售价0.30元,利润0.1元/斤以上。若日产一吨,半年内即可收回全部投资。适合乡镇、家庭企业上马。培训费:单位500元,个人390元;函授:单位200元,个人99元。

[北京市星火技术研究所,北京867信箱20816组,邮政编码100024,李群]