

研究报告

甘油三酯酶传感器的研制及应用*

王永生 李贵荣 吕昌银 万载阳 刘传湘

(衡阳医学院化学教研室, 衡阳 421001)

摘要 将脂肪酶固定在 pH 玻璃电极上, 制成甘油三酯酶传感器. 对传感器的制作方法和响应性能进行了研究. 在 37℃, 选择 Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 8.5) 为测量介质, 所制传感器对甘油三酯的响应线性范围为 3.09×10^{-6} ~ 1.91×10^{-3} mol/L, 响应斜率为 32.7 mV/pC, 响应时间为 5~10 min, 使用寿命可达 25 d. 用研制的传感器测定了人和兔血清中的甘油三酯含量, 结果满意.

关键词 甘油三酯, 生物传感器, 脂肪酶, 血清

学科分类号 O657.1

血脂含量与动脉粥样硬化的发生率密切相关. 因此, 临床血脂测定愈益受到人们重视. 而现行的测定方法中, 无论是化学法还是酶法, 都是测定甘油三酯 (triglyceride, TG) 水解后生成甘油的量. 化学法测定时须先经抽提, 操作繁琐、费时; 酶法测定被广泛采用, 但血清中游离甘油干扰严重^[1,2], 临床检验常采用减去固定值以排除游离甘油对测定结果的影响, 但糖尿病、肝病等患者血清游离甘油明显升高, 减去固定值引起较大偏差^[3]. 本文基于脂肪酶在适当条件下能选择性地催化甘油三酯水解成甘油和脂肪酸, 生成的脂肪酸将快速引起电极电位发生改变, 这种电极电位的改变 (ΔE) 与 TG 浓度 (C_{TG}) 的对数值呈线性关系, 即 $\Delta E = k \lg C_{TG}$ (k 在一定条件下是常数). 选择 pH 玻璃电极为基础电极, 将脂肪酶固定在玻璃电极上, 即制成了对甘油三酯响应灵敏的甘油三酯酶传感器. 该传感器具有制作简单、使用方便的特点, 已用于人和兔血清中甘油三酯含量的测定, 抗干扰性好, 结果满意.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

PXD-12 型数字式离子计 (国营江苏电分析仪器厂), CS501 型超级恒温器 (上海实验仪器厂), pHS-3C 型酸度计 (上海第二分析仪器厂), 78-1 型磁力加热搅拌器 (上海南汇电讯器材厂).

聚氯乙烯粉 (polyvinyl chloride, PVC), 四氢呋喃 (tetrahydrofuran, THF)、海藻酸钠为化学

纯; 脂肪酶 (Sigma 公司, 酶活力 $\geq 10\,000$ U/g); 牛磺胆酸钠 (Sigma 公司) 溶液: 0.149 mol/L; Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 8.5). 除指明的外, 所用试剂为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水.

1.2 溶液配制

甘油三酯标准溶液配制: 取 33.0 ml 100 g/L 阿拉伯树胶溶液, 加入 2.0 ml 橄榄油 (化学纯, 平均相对分子质量为 884.2, 密度为 0.913 kg/L) 和 5.0 ml 蒸馏水, 在冰浴中快速搅拌均匀化 30 min, 即得 TG 贮备液, 于 4℃ 冰箱保存备用; 使用时, 将此乳剂重新匀化, 稀释至 2.58×10^{-3} mol/L 工作溶液.

1.3 传感器的制作

称取 0.1 g PVC 粉, 溶于 3 ml THF 中, 加入 0.2 ml 邻苯二甲酸二丁酯 (dibutyl phthalate, DBP), 搅拌得均匀溶液; 然后取 0.238 g 脂肪酶混合于 PVC 胶液中, 搅拌均匀; 取 pH 玻璃电极先用蒸馏水浸泡过夜, 再依次用蒸馏水和 THF 洗涤后, 晾干, 直接浸入脂肪酶-PVC 胶液中, 1 min 后取出, 转动电极, 尽可能使液膜均匀, 晾干, 再浸入再晾干, 重复数次, 直至表面涂上一层均匀的薄膜 (约厚 0.2 mm), 在空气中晾干 2 h; 然后将电极浸入 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液中 (pH 8.5), 贮于冰箱内备用.

其余试验溶液按常规配制.

* 湖南省自然科学基金资助课题 (湘科计字 [1995] 59 号 32 项).

收稿日期: 1998-06-01, 修回日期: 1998-10-05

1.4 实验方法

取 25 ml Tris-HCl 缓冲溶液, 加入 1 ml 牛磺胆酸钠溶液和适量蒸馏水 (以保持最终总体积为 30 ml), 连接离子计 (或酸度计使用 mV 档), 以脂肪酶传感器作指示电极 (负极), 以饱和甘汞电极为参比电极 (正极) 组成测量电池. 恒温 (37 ± 0.1) $^{\circ}\text{C}$, 在磁力搅拌下测定空白电位值, 待其稳定后记录空白电位值 (E_0), 快速加入适量标准 TG 乳化液或样品, 此时电位值将改变, 10 min 后, 记录电位值 (E_t), 求出 $\Delta E = E_t - E_0$, 并绘制 $\Delta E - \lg C_{\text{TG}}$ 曲线.

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶在基础电极表面固定方法的确定

试验了三种脂肪酶固定方式, 即直接 PVC 酶膜法, 海藻酸钠酶膜-醋酸纤维素保护膜法和海藻酸钠酶膜-PVC 保护膜法. 直接 PVC 酶膜法制得的传感器脂肪酶活性高; 而脂肪酶海藻酸钠凝胶包埋-PVC 保护膜法, 先用海藻酸钠凝胶包埋脂肪酶, 然后再涂上一层 PVC 保护膜, 该法酶活力降低, 传感器响应时间长, 但稳定性好, 传感器使用寿命长. 若用醋酸纤维素膜作保护膜, 实验表明, 该膜易破裂. 考虑到脂肪酶的活性和临床检验快速、简便的要求, 本文采用直接 PVC 膜固定脂肪酶的方法, 制备了甘油三酯酶传感器.

2.2 酶用量对电极响应的影响

在固定 THF 为 3 ml、PVC 粉为 0.1 g、DBP 为 0.2 ml 后, 改变脂肪酶用量, 配制不同组成的膜溶液; 用同一个 pH 玻璃电极分别涂上酶量不同的膜, 制成相应的酶传感器; 取不同体积的 TG 标准溶液配成标准系列, 按实验方法测定电位改变值 ΔE , 并以 ΔE 对 $\lg C_{\text{TG}}$ 绘图, 用线性回归法计算, 结果见表 1. 表 1 数据表明, 脂肪酶用量在 0.238 ~ 0.248 g 时, 传感器灵敏度较高, 本文选用脂肪酶 0.238 g.

表 1 酶用量与传感器响应性能的关系

传感器编号	脂肪酶/g	斜率 ($\Delta E / -\lg C_{\text{TG}}$)	相关系数
1	0.200	19.0	0.9993
2	0.238	32.7	0.9991
3	0.248	29.3	0.9942
4	0.336	23.2	0.9992

2.3 酸度的影响

试验考查了酶传感器在 Tris-HCl 缓冲体系不

同 pH 值介质中, 对 $3.09 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的 TG 响应情况 (图 1). 由图 1 可见, 在 pH 8.5 时, 酶传感器响应最灵敏, ΔE 有极大值. 故本文选用 pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液作为测量介质.

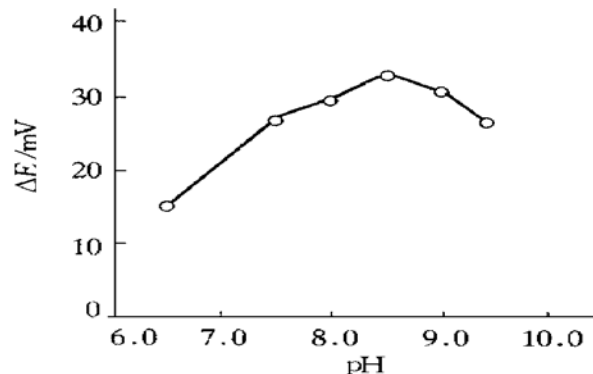


图 1 pH 对酶传感器的影响

2.4 温度的影响

试验表明, 在 $35 \sim 45$ $^{\circ}\text{C}$ 时, 传感器响应性能最佳, 考虑到温度太高影响脂肪酶的活力和酶传感器的使用寿命, 故本实验选择在 (37 ± 0.1) $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中进行.

2.5 线性范围及检测限

分别移取不同体积的 TG 标准溶液, 配制成标准系列, 按实验方法测定酶传感器的响应曲线如图 2 所示. 其线性响应范围为 $3.09 \times 10^{-6} \sim 1.91 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 响应斜率 ($\Delta E / -\lg C_{\text{TG}}$) 为 32.7, 检测下限为 $1.03 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 响应时间为 5~10 min.

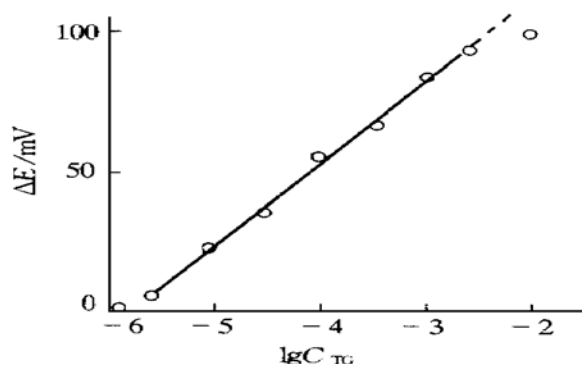


图 2 响应曲线

2.6 可逆性和重现性

在每次测定一个样品后, 将酶传感器先用蒸馏水淋洗, 再浸入 Tris-HCl 缓冲溶液中, 在电磁搅拌下洗涤 5~7 min, 即可回复到初始的空白电位值, 可用于另一样品的测定.

用同一酶传感器在不同时间对 TG 浓度为 $3.09 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的合成样品进行 5 次测定, 其

ΔE 值分别为 32.7、33.2、31.2、32.0 和 33.5 mV. 其相对标准偏差 (RSD) 为 2.9%. 说明传感器重现性良好.

2.7 共存物质的影响

在试验条件下, 对 8.6×10^{-5} mol/L 的 TG 溶液加入适当的干扰物质, 按实验方法进行电位测定, 相对误差不大于 $\pm 5\%$ 时, 下列物质的允许量 (mg) 分别为: 葡萄糖 (1 800), 尿素 (600), 天冬氨酸 (1 330), D、L-亮氨酸 (1 310), NaCl (58.5), CaCl_2 (27.8), 甘油 (126).

2.8 稳定性和使用寿命

酶传感器使用完后, 浸入 pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 于 4℃ 冰箱中保存. 每隔一定时间测量其响应性能, 25 d 后其响应性能基本不变.

3 样品中甘油三酯含量测定

本文报道的甘油三酯酶传感器具有制作简单, 使用方便, 抗干扰性好的特点, 克服了现行化学法操作繁琐、费时和酶法受游离甘油干扰的缺点. 应用该传感器测定了人和兔血清中的甘油三酯含量, 同时按文献 [4] 法进行对照实验和样品加标回收实验. 结果见表 2.

表 2 样品中甘油三酯含量测定结果

样品	测定值 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%	文献[4]测定值 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率/%
人血清 1 号	0.645	4.6	0.779	98.3
人血清 2 号	0.473	5.4	0.573	96.5
兔血清 1 号	0.220	5.6		110.3
兔血清 2 号	0.230	3.6		98.3

注: $n=4$.

参 考 文 献

- 1 Ikuhiro M, Sadao H, Ryo F, *et al.* Error detection of high concentrations of endogenous free glycerol in determination of serum triglyceride with the TBA-80S automated discrete analyzer. Clin Chem, 1992, **38** (7): 1376~ 1377
- 2 Keith N F, Sandy M H. Do enzymatic analyses of serum triglycerides really need blanking for free glycerol. Clin chem, 1991, **37** (7): 1301
- 3 Elin R J, Ruddel M, McClean S. The variability of the glycerol concentration in human serum. Clin Chem, 1983, **29** (6): 1174
- 4 朱忠勇. 实用医学检验学. 北京: 人民军医出版社 (Zhu Z Y. Practical Medical Laboratory Sciences. Beijing: People's Military Surgeon Press), 1992. 300~ 301

Preparation of Triglyceride Enzyme Sensor and Its Application. WANG Yong-Sheng, LI Gui-Rong, LÜ Chang-Yin, WAN Zai-Yang, LIU Chuan-Xiang (*Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China*).

Abstract A triglyceride enzyme sensor has been prepared by immobilizing lipase on pH glass electrode. The immobilized methods of lipase and the response characteristics of the sensor were studied. The linear range of detection is $3.09 \times 10^{-6} \sim 1.91 \times 10^{-3}$ mol/L for triglyceride with a slope of 32.7 mV/pC in the pH 8.5 Tris-HCl buffer solution at 37℃. The response time is 5~ 10 min. The sensor is relatively stable for 25 days. The sensor has been applied to the determination of triglyceride in serum with satisfactory results.

Key words triglycerides, biosensor, lipase, serum

盐藻 β -胡萝卜素异构体胁迫积累的 HPLC 研究*

王 勇 钱凯先

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

摘要 采用 HPLC 技术分析了盐藻在胁迫条件下积累 β -胡萝卜素异构体的规律. 结果表明: 胁迫条件增强, 有利于全反式异构体积累, 胁迫条件减弱有利于顺式异构体的积累. 即: 32℃, 10 000 lx, 18% 盐度积累的全反式异构体含量最多 (2.593 mg/L), 25℃, 自然光照射, 24% 盐度积累的顺式异构体含量最多 (0.630 mg/L); 顺式异构体种类及数量随不同的胁迫条件而不同, 25℃, 自然光照射, 24% 盐度, 培养 30 d 测到全反式异构体及 2 种顺式异构体, 32℃, 10 000 lx, 18% 盐度培养 30 d 测到全反式异构体及一种顺式异构体; 相同胁迫条件不同时间异构体积累也不同. 在 18% 盐度, 25℃, 10 000 lx 光照条件下, 0 d 只测到全反式异构体, 8 d, 19 d 分别测出全反式异构体及 2 种顺式异构体, 34 d 测到全反式异构体及一种顺式异构体.

* 国家自然科学基金 (39370360), 浙江省自然科学基金资助项目 (393208). 收稿日期: 1997-10-20, 修回日期: 1998-03-25