

表 1 aFGF 对新生大鼠海马神经元中 cAMP 含量的影响

组别	aFGF 剂量/(ng/ml)	C _{cAMP} /(pmol/10 ⁷ 细胞)
对照		279.05±65.64
I	50	547.67±51.68 ¹⁾
II	500	731.38±269.40 ¹⁾

n=2.

¹⁾与对照相比 $P<0.01$.

讨 论

我们已证实, aFGF 能促进新生大鼠海马神经元的体积增大及突起伸长, 这里我们利用 ³H-Leu 参入神经元中蛋白质合成及流式细胞术测定细胞蛋白质总量的方法, 又进一步证实了 aFGF 能增加神经元中蛋白质的合成, 说明 aFGF 促进神经元中蛋白质的合成可能是其诱导神经元形态上分化的基础. 另外, 我们的结果还表明, aFGF 能使神经元的内 cAMP 的含量增加. 一般认为, 细胞内 cAMP 的升高与细胞分化相一致. aFGF 促进神经元内 cAMP 的合成与它能从形态上诱导神经元

分化的结果相一致, 也提示 aFGF 神经营养作用的信号转导途径中可能有腺苷酸环化酶系统的参与. 上述结果为进一步研究 aFGF 对神经损伤的修复与再生提供了依据.

参 考 文 献

- 1 Walicke P, Cowan W M, Ueno N *et al.* Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; **83**:3012
- 2 Walicke P A. Basic and acidic fibroblast growth factors have trophic effects on neurons from multiple CNS regions. *J Neurosci*, 1988; **8**:2618
- 3 Sievers J, Hausmann B, Unsicker K *et al.* Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve. *Neurosci Lett*, 1987; **76**:157
- 4 邵宁生, 王会信, 薛沿宁等. 人酸性成纤维细胞生长因子神经营养作用的初步研究. *中国应用生理学杂志*, 1992; **8**:102

以氟离子选择电极为基础的半乳糖传感器*

纪学锋** 章咏华***

(中国科学院长春应用化学研究所电分析化学开放研究实验室, 长春 130022)

关键词 氟电极, 半乳糖氧化酶, 辣根过氧化物酶, 对氟苯酚, 电位式传感器

D-半乳糖的测定多使用酶法, 近年来用酶电极测定血液中的半乳糖含量的方法已有报道^[1-3], 这些酶电极都有良好的重现性和很短的响应时间, 缺点是测定时干扰严重, 选择性差.

本文描述一种以氟电极为基础电极的电位式半乳糖传感器, 该传感器由氟电极和固定化的酶膜制成, 方法简单、快速, 突出的优点是选择性高, 在最佳 pH 条件下, 抗坏血酸、尿酸、各种氨基酸对测定都不产生干扰, 而这些物质在电流法测定中对半乳糖测定的干扰是相当严重的.

1 实验方法

1.1 仪器

Orion 901 离子计(美国 Orion 公司); Sg-1 磁力搅

拌器(苏州标准计量局实验工厂); pHs-3 型酸度计(上海第二分析仪器厂); CSB-F 氟离子选择电极(长沙半导体材料厂); 双液接参比电极(美国 Orion 公司), 外套充 0.1mol/L 的 Na₂SO₄ 溶液.

1.2 试剂

半乳糖氧化酶(GAO)(E.C.1.1.3.9, 100U/mg, Sigma); 辣根过氧化物酶(HRP)(E.C.1.11.1.7, 250U/mg, 上海), 用磷酸盐缓冲液(0.1mol/L, pH6.30)配成 1000U/ml 的水溶液; 对氟苯酚

*国家自然科学基金资助课题.

**现在天津石化公司研究所工作.

***通讯联系人.

收稿日期: 1992-07-16 修回日期: 1992-11-14

(Sigma), 配成 0.1mol/L 的水溶液; D-半乳糖、抗坏血酸、尿酸、各种氨基酸都为生化试剂。以上试剂和溶液都放在冰箱中保存。其余各物质都是分析纯, 所有溶液都用去离子水配制, 所有缓冲液的浓度都为 0.1mol/L。

1.3 实验部分

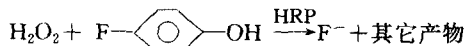
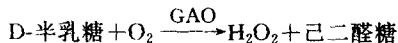
1.3.1 电位式半乳糖传感器的制备 取约 80 单位的半乳糖氧化酶, 加 2mg 牛血清白蛋白 (BSA), 用 pH6.30 的磷酸盐缓冲液稀释至 200 μ l, 加入 20 μ l 12.5% 的戊二醛溶液, 搅匀。将高锰酸钾溶液 (0.1 mol/L) 浸过, 并将洗净的直径 8mm 的 80 目尼龙网圆片放在酶溶液中, 然后取出, 在室温下干燥。再蘸涂, 再干燥, 反复 3 次, 得到尼龙网支持的固定化酶膜。酶膜放在 pH6.30 的磷酸盐缓冲液中, 冰箱保存。取一片酶膜, 附在氟电极表面, 然后用电极套固定酶膜, 把制成的半乳糖氧化酶电极放在 pH6.30 的磷酸盐缓冲液 (含有 4×10^{-6} mol/L 的氟化钠) 中, 在冰箱中保存。每次测定以后, 将膜取下, 用 pH6.30 的磷酸盐缓冲液反复冲洗酶膜和基底电极, 然后装好电极再测定。

1.3.2 D-半乳糖的测定 在 25ml 聚乙烯烧杯中, 加入磷酸盐缓冲液 (pH6.18), 对氟苯酚和 HRP 溶液, 溶液中对氟苯酚和 HRP 的浓度分别为 1×10^{-3} mol/L 和 20U/ml。将酶电极和双液接参比电极插入溶液中, 搅拌, 记录平衡时离子计的读数。加入 D-半乳糖溶液, 记录平衡时电位的变化值。用标准曲线法确定被测物的浓度。

2 结果与讨论

2.1 测定条件的选择

2.1.1 辣根过氧化物酶和对氟苯酚对测定的影响 这种电位式酶电极的作用原理如下:



在过氧化物酶作用下, 酶促反应中生成的 H_2O_2 可以和有机氟化物作用^[4-6], 生成的 F^- 用氟电极测定, 所以体系中 HRP 和对氟苯酚的浓度是非常重要的。我们将对氟苯酚的浓度定为 1.0×10^{-3} mol/L^[6-9], 然后确定 HRP 的最佳浓度。根据图 1, 我们确定工作液中 HRP 的浓度为 20U/ml。

2.1.2 pH 对测定的影响 当 pH 很低时酶促反应很慢, 而随着 pH 的升高, OH^- 对测定又产生了干扰。图 2 为不同 pH 条件下的 $\Delta E - \lg C$ (C 代表半乳糖的浓度)。根据半乳糖氧化酶的最适宜酸度范围和氟电极的最佳工作范围, 选择工作液的酸度为 pH=6.18。

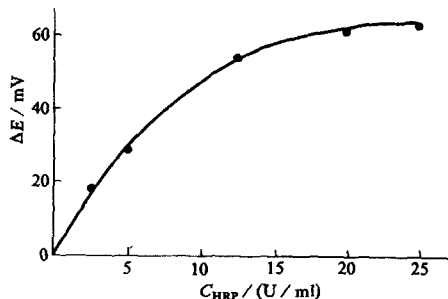


图 1 HRP 浓度对测定电位的影响

对氟苯酚 1×10^{-3} mol/L, pH6.18, 20 $^{\circ}\text{C}$;
D-半乳糖 1×10^{-3} mol/L

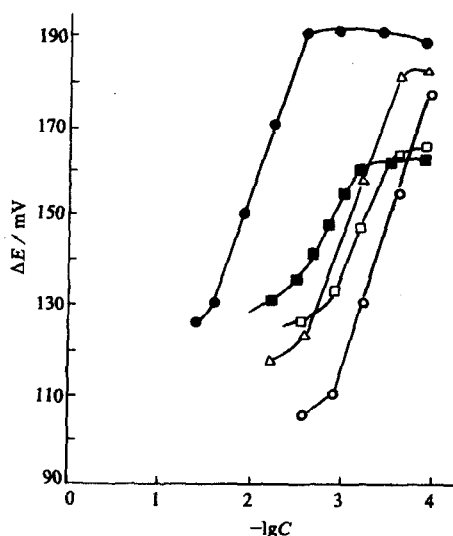


图 2 pH 的影响

●—● pH4.5; △—△ pH5.73; ○—○ pH6.18;
□—□ pH7.00; ■—■ pH7.85 对氟苯酚
 1×10^{-3} mol/L, 20 $^{\circ}\text{C}$, HRP 为 20U/ml

2.2 电位式半乳糖传感器的性能

2.2.1 电极的响应特性 在一定的工作条件下, 电极的工作曲线如图 3 所示。线性范围为 $1.2 \times 10^{-4} - 1.2 \times 10^{-3}$ mol/L, 斜率为 $68 \pm 2 \text{ mV} / (-\lg C)$, 为什么斜率大于 $59 \text{ mV} / (-\lg C)$, 目前还不清楚。响应时间根据底物浓度的不同为 5—8min。

2.2.2 酶电极的稳定性 实验证明, 用戊二醛固定在尼龙网上的半乳糖氧化酶具有良好的稳定性。电极不用时放在 pH6.30 的缓冲液中冰箱保存, 10d 内酶电极具有良好的响应性能。

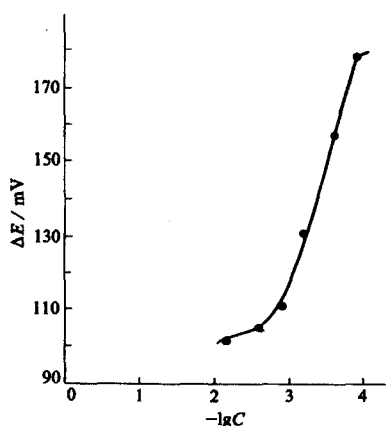


图3 D-半乳糖传感器的工作曲线
对氟苯酚 $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 温度 20°C ,
HRP 为 20 U/ml , pH6.18

2.2.4 干扰实验 我们知道, 酶电极测定的干扰有两个方面, 一个是来源于酶促反应本身, 对于半乳糖氧化酶来说, 因为它不象葡萄糖氧化酶那样专一, 可能干扰的物质有乳糖, 棉子糖等. 另一种干扰是由于基底电极的选择性差造成的. 表1为各种物质的干扰实验, 结果表明, 这些物质对测定基本上没有干扰. 和电流式酶电极相比较, 大大地提高了测定的选择性.

表1 干扰实验

底物	$\Delta E/\text{mV}$	底物	$\Delta E/\text{mV}$
半乳糖	72	半胱氨酸	0
葡萄糖	0	L-苯丙氨酸	0
抗坏血酸	0	乙酸	0
尿酸	0	乙醇	3

20°C , pH6.18, 对氟苯酚为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, HRP 为 20 U/ml 各物质浓度 $1.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$.

2.2.5 酶电极测定的重现性 对相同浓度的样品进行5次平行测定, 结果如表2所示, 5次测定的相对标准偏差 (RSD) 为 0.8% , 重现性相当好.

表2 重现性测定

	1	2	3	4	5
$\Delta E/\text{mV}$	60.3	61.1	60.8	60.1	61.2
$\Delta \bar{E}/\text{mV}$					60.7
σ					0.487
$\sigma/\Delta \bar{E}(\text{RSD})$					0.8%

20°C , pH6.18, 对氟苯酚为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, HRP 为 20 U/mL D-半乳糖为 $9.7 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

结 论

成功地制备了以氟离子选择电极为基底的电位式半乳糖传感器, 制备方法简单快速, 电极具有良好的响应性能, 突出的优点是可以消除电活性物质的干扰, 具有很高的选择性.

致谢: 感谢奚星林, 吴金兰同志对本工作的大力支持.

参 考 文 献

- 1 Taylor P J, Kmetec E, Johnson J M. Design, construction and Application of a galactose selective electrode. *Anal Chem*, 1977; **49**:789
- 2 Cheng F S, Christian G D. Rapid assay of galactose in blood serum and urine by amperometric measurement of enzyme-catalyzed oxygen consumption. *Anal Chim Acta*, 1979; **104**:47
- 3 Dicks J M, Aston W J, Davis G *et al.* Mediated amperometric biosensors for D-galactose, glycolate and L-amino acid on a ferrocene-modified carbon paste electrode. *Anal Chim Acta*, 1986; **182**:103
- 4 Hughes G M K, Saunders B C. Enzymatic rupture of C-F bond. *Chem Ind (London)*, 1954; **41**:1265
- 5 Hughes G M K, Saunders B C. Studies in peroxidase action, Part IX, Reaction involving the reupture of C-F, C-Br, C-I linking in aromatic amines. *J Chem Soc*, 1954; 4630
- 6 Yamazaki I, Piette L. Identification by electron paramagnetic response spectroscopy of free radical generated from substrates by peroxidase. *J Biol Chem*, 1960; **235**:2444
- 7 Siddiqi I W. Anelectrochemical assay system for peroxidase and peroxidase-coupled reactions based on a fluoride ion selective electrode. *Clin Chem*, 1982; **9**:1962
- 8 Ho M H, Wu T G. Enzyme electrode based on a fluoride ion selective sensor coupled with immobilized enzyme membrane. *Ann N Y Acad Sci*, 1984; **434**:523
- 9 Ho M H, WU T G. Amperometric and potentiometric enzyme electrodes. *ISA Trans*, 1985; **24**:61