

酶电极及其在生物化学中的应用

陈 执 中

(上海市药品检验所)

离子选择性电极测定法是近年来发展起来的一种新的测定技术,随着科学技术的迅速发展,离子选择性电极及其应用有了更新的进展。从1969年第一种酶电极——尿素电极问世后,离子选择性电极测定法开始用于生化分析及生化研究。近年来,由于敏化电极的发展,新型酶电极不断涌现,酶电极及其分析技术在酶及酶底物的测定、氨基酸分析、葡萄糖的测定等生物化学分析以及生物医学研究等方面获得了广泛的应用。

一、理 论 基 础

用于生物化学分析及研究中的酶电极是一种敏化的离子选择性电极。根据国际理论化学和应用化学协会(IUPAC)分析化学分会分析化学命名委员会推荐的定义:酶电极为一传感器,由离子选择性电极覆盖含有能引起有机物或无机物(底物)反应而生成使电极响应的物质的一种酶层组成的。

目前,酶电极根据其结构的不同可分为三类:(1)酶涂层的固态膜离子选择性电极;(2)固相酶与气敏电极组成的酶电极;(3)以氧电极为骨架的酶电极。因此,离子选择性电极、气敏电极及氧电极的电化学理论是为酶电极测定法的基础。

1. 离子选择性电极原理

离子选择性电极具有一个敏感的膜,电极借助敏感膜对某一离子产生选择性响应。有关膜电位理论,许多电化学工作者^[1-3]已作了比较详细的综述和讨论。电极电位与组分活度间的关系可用能斯特(Nernst)方程式表示:

$$E = E^0 + \frac{2.303 RT}{Z_A F} \log [a_A + K_{A,B}^{p.o.t.} (a_B) Z_A / Z_B] \quad (1)$$

式中 E ——电极电位; E^0 ——常数;
 R ——气体常数(8.315 焦耳/度·克分子);
 T ——绝对温度; F ——法拉第常数(96495 库仑/克当量); a_A ——被测定的A离子的活度;
 a_B ——干扰离子B的活度; $K_{A,B}^{p.o.t.}$ ——选择性系数;
 Z_A ——被测定的A离子的电荷数(包括正负号); Z_B ——干扰离子B的电荷数。

离子的活度(a_i)和浓度(c_i)间的关系可简单地以下式表示: $a_i = c_i \gamma_i$

离子活度系数(γ_i)与溶液的离子强度(I)有关,大体上是溶液离子强度的函数。离子的活度系数一般可由下式求得:

$$\log \gamma_i = - \frac{AZ_i^2 \sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}}$$

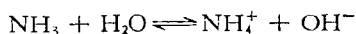
根据电极电位与离子活度关系的能斯特方程式,当离子强度一定时,则方程式(1)可简化为:

$$E = \text{常数} \pm S \log c_i \quad (2)$$

方程式(2)即为离子选择性电极测定离子浓度的理论基础。

2. 气敏电极的响应原理

气敏电极是一组合电极,电极结构包括离子敏感电极(指示电极)和参比电极^[4]。以基于酸碱平衡反应的氨气敏电极为例,电极是由平板pH复合电极,疏水性可透气体的高分子薄膜及内电解溶液(0.01 M氯化铵溶液)组成的,氨透过透气膜使下列平衡向右移动:



$$[\text{OH}^-] = K \frac{[\text{NH}_3]}{[\text{NH}_4^+]} \simeq K' [\text{NH}_3]$$

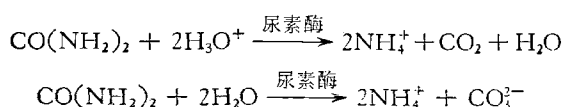
内电解液中的氢氧根离子浓度增加,膜内的 pH 平板玻璃电极对 $[\text{OH}^-]$ 响应,即可指示氨的浓度。

$$\begin{aligned} E &= \text{常数} - S \log [\text{OH}^-] \\ &= \text{常数} - S \log [\text{NH}_3] \end{aligned}$$

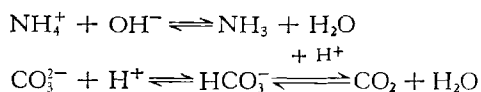
3. 酶电极的催化反应原理

当第一类或第二类酶电极(即以离子选择性电极或气敏电极与酶层组成的酶电极)浸入溶液中时,电极中的固相酶与被测定溶液中的底物反应,酶催化水解底物生成一种离子,使离子选择性电极膜产生响应,从能斯特(Nernst)方程式即可测得生成离子的浓度,从而求出被测定溶液中底物的含量。如反应生成气体则一般用气敏电极组成的酶电极(第二类酶电极)检出。

以尿素酶电极为例,测定尿素时,其反应如下所示:



生成的铵及碳酸盐可使铵离子电极或碳酸根电极感膜响应而加以测定。铵离子和碳酸根离子在一定的 pH 条件下可生成氨或二氧化碳,反应如下:



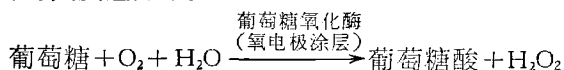
因此,亦可用第二类酶电极(即氨气敏电极或二氧化碳气敏电极作为骨架的酶电极)进行测定,从而计算出底物的含量。

基于同样原理,如果在制备酶电极时,以能与酶反应的底物涂层或与电极组合,测定时电极涂层中的底物扩散与样品中酶反应生成离子,根据测得生成离子的浓度即可求出样品中酶的活性(酶的效价)。

第三类酶电极(以氧电极为骨架的酶电极)则反应原理不同,氧电极是极谱原理,主要是通过氧电流和氧分压(氧含量)之间的关系,是从消耗氧来进行测定的,在保证存在强烈浓差极

化,没有超电压保持铂阴极表面状态时,氧电流与氧分压成线性关系。

以葡萄糖氧化酶涂层电极测定葡萄糖为例,其反应如下:



基于上述反应,用当天制备的酶电极(酶涂层的氧电极)直接测定。原理见图 1。

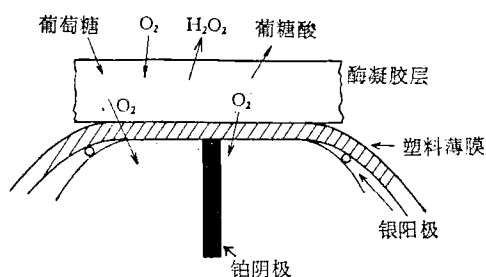


图 1 葡萄糖氧化酶电极原理

当这种电极与含葡萄糖的生物溶液接触时,葡萄糖扩散到固相酶的凝胶层中,凝胶中含葡萄糖氧化酶,在酶的存在下,由于酶催化葡萄糖的氧化作用,因而氧通过塑料膜层向电极的扩散速度相应减少。当葡萄糖浓度低于不溶性葡萄糖氧化酶的 K_m 值时,而且氧量在非限量浓度下,则含氧量的下降值与葡萄糖的浓度之间为一线性关系,绘制电极反应的百分率(%)对葡萄糖浓度(c)的校正曲线图,根据校正曲线即可计算出样品中葡萄糖的实际含量。

二、生化分析及研究用的酶电极

1. 酶固相法

酶电极(不论是哪一类)是由一种电极为骨架与固相酶组合而成的,将酶制成一种固相的(不溶性)形式而不使活性遭致损失以制备酶电极的方法,称为酶固相法。

酶固相法大致可分为四大类:(1)吸附法,酶被吸附于惰性固相载体或离子交换剂上;(2)载体偶联法(共价法),酶通过化学共价键联结于固相载体上;(3)交联法,酶应用二官能团试剂造成分子间交联而聚集成网状结构;(4)包埋法,酶被包裹于凝胶格子中,最常用的为聚丙烯

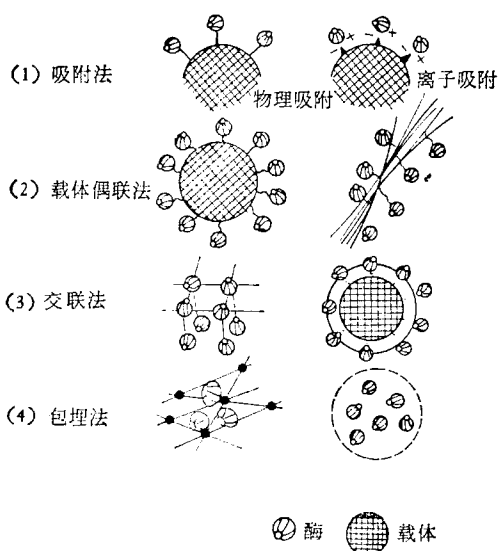


图2 固相酶模式图

酰胺凝胶法。

2. 酶电极的制备

酶电极根据其电极的组合结构可分为酶涂层电极及三膜电极两类:

(1) 酶涂层电极

以离子选择性电极用交联酶活性液直接涂层或用聚丙烯酰胺凝胶固相法涂层制备即得。

交联活性液涂层法 取铵离子电极(或65-1A型复合玻璃电极)1支,以去离子水洗涤后,用滤纸吸干。取酶(尿素酶 3,000 国际单位)溶

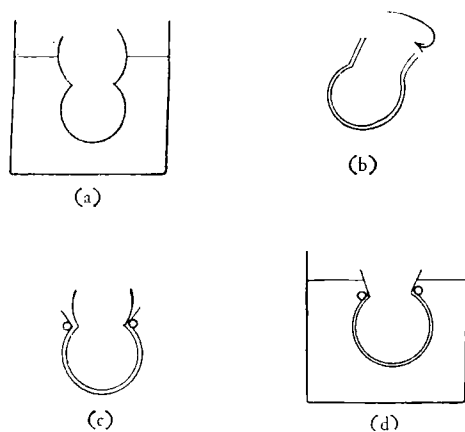


图3 玻璃电极直接涂层法

- (a) 玻璃电极浸入活性液中
- (b) 交联反应时旋转电极
- (c) 加一“O”环,套住涂层
- (d) 电极用甘氨酸溶液及水洗涤

于 0.02 M pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中,加 17.5% 牛血清白蛋白溶液 5 毫升, 然后再加入 25% 戊二醛溶液 0.32 毫升(使溶液的最后浓度为 0.8%)。搅拌 2 分钟, 将电极的整个球部浸入此活性液中(图 3a), 将电极绕轴缓缓旋转 15 分钟(图 3b), 套一“O”环使膜粘附电极圆球(图 3c), 然后将电极分别用去离子水, 甘氨酸溶液洗涤, 以洗去或中和剩余的二官能试剂(图 3d)。酶涂层电极结构见图 4。

准确的固化时间必须严格注意: 时间太短, 涂层脆弱且易于撕裂, 如时间太长, 则活性较低且粘附性较差。

聚丙烯酰胺固相酶涂层法 取铵离子选择性电极(或复合玻璃电极)玻璃膜部分套一尼龙网。将 175 毫克尿素酶溶于 1 毫升丙烯酰胺单体溶液中(N, N' 甲叉双丙烯酰胺 0.6 克, 丙烯酰胺 5 克, 过硫酸钾 3 毫克及核黄素 3 毫克溶于 25 毫升水中), 取上述溶液 1 滴置入网内, 经光照射 60 分钟聚合反应即得。

(2) 三膜酶电极

整个电极由三部分组成: ①气敏电极; ②憎水性气体可透性膜; ③酶活性膜。电极结构如图 5。

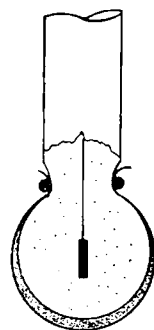


图4 酶涂层电极

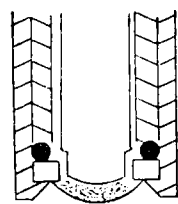


图5 三膜酶电极

这类电极主要由气敏电极敏感膜, 透气膜及酶活性膜三种膜组成的, 因此称为三膜电极。(Triple-membrane electrode)

3. 酶电极的响应时间

酶电极的响应时间与 d^2/D 成正比 (d = 反应层的厚度, D = 有效扩散系数), 反应层实际上不能超过 30 微米的厚度, 否则涂层变为非常不稳定。以隔膜式气敏电极为骨架的酶电极

响应时间可以由通过膜的气体扩散速率充分控制,一般响应时间为 30 秒至 5 分钟。在空气间隙体系及其他技术情况下则用较少量的样品体积,采用固相酶以及减小扩散长度(进行有效搅拌)等使酶反应完全则可缩短响应时间。

4. 酶电极的寿命问题

酶电极的寿命,除了与骨架电极有关外,主要取决于酶层中酶在外界环境中的稳定性:

(1) 痕量的重金属离子(如从参比电极渗出的 Hg^+)抑制酶的活性,使酶电极“中毒”。一般可加入金属离子的掩蔽剂(如半胱氨酸,乙二胺四乙酸等)加以防止。

(2) 某些阴离子的抑制作用(如硝酸盐抑制尿素酶,有机磷杀虫剂抑制胆碱酯酶)。

(3) 细菌的生长可破坏酶的活性,防止这一钝化的方法,可在测定溶液中加入 $10^{-3}M$ 的叠氮化钠溶液。

另一方面,在酶层或溶液中加入激活剂可以增进酶电极的寿命(如磷酸盐可增加尿素酶的活性,胆酸钠可以增加胆碱酯酶的活性等)。

三、分析技术

应用酶反应的离子选择性电极测定法主要有以下两种测定技术

1. 应用可溶性酶反应的测定法

取样品溶液(底物)插入对反应产物响应的离子选择性电极及参比电极,加入相应的可溶性酶,待酶反应完成后,测量电极电位以测定反应产物的浓度,根据反应产物的浓度,即可求出样品的浓度^[5]。(测定装置见图 6。)

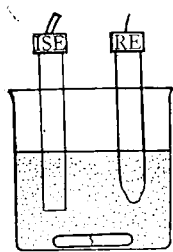


图 6 可溶性酶直接反应的测定装置

如进行酶活性的测定,则以酶溶液为样品溶液,加入底物进行反应。记录时间反应的电极电位。反应产物与电位之间的关系可用能斯特方程式表示:

$$E = \text{常数} + \frac{RT}{ZF} \ln [\text{产物}] \quad (3)$$

方程式(3)求对时间的微分:

$$\frac{dE}{dt} = \frac{RT}{ZF} \times \frac{I}{[\text{产物}]} \times \frac{d[\text{产物}]}{dt} \quad (4)$$

现假设在反应最初阶段, $I/[\text{产物}]$ 的改变相对地较 $d[\text{产物}]/dt$ 为慢,因此,它可包括在比例项因数中。电极电位对时间的改变,外推 $t = 0$, 则电位与 $d[\text{产物}]/dt$ 成正比。

以 $\Delta E/\text{分}$ 对酶浓度作图制备校正曲线即可测定出酶的活性。

另一方面,如以酶测定底物,控制酶的浓度恒定,则以 $\Delta E/\text{分}$ 对底物浓度作图制备校正曲线,同样可用于底物(如尿素、乙酰胆碱、肌酸酐、磷酸腺苷、氨基酸及葡萄糖等)的测定。

2. 应用酶电极的直接测定法

应用酶电极中的固相酶(酶活性膜)的反应直接测定,一般采用校正曲线法:

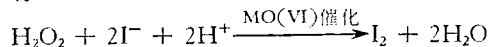
用被测定底物的对照品制备不同浓度的标准溶液,以酶电极进行测定,记录不同浓度的电极电位,测得电位(毫伏值)对浓度的对数作图以制备校正曲线。样品测得的电位从校正曲线中即可求出样品的含量。

四、应用

酶是具有特殊催化能力的蛋白质类生物催化剂。由于酶学的迅速发展,酶催化反应广泛地用于各类底物、激活剂、抑制剂以及酶活性的分析测定。近年来现代最新技术的发展与邻近学科的渗透,应用酶催化反应的酶法分析在生物化学研究中越来越受到生物化学和分析化学工作者的重视。随着固相酶的进一步发展和新型酶电极的出现,应用酶催化反应原理的离子选择性电极测定法及其应用更有了新的进展。

1. 糖类的分析

葡萄糖氧化酶催化水解葡萄糖生成葡萄糖醛酸和过氧化氢可用葡萄糖氧化酶电极直接测定^[6]。反应生成的过氧化氢在 pH5.7 六价钼离子存在下可使碘离子氧化生成碘:

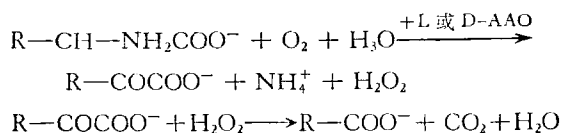


因此,亦可用酶涂层的碘离子选择性电极进行测定^[6]。

半乳糖经酶电极中的半乳糖氧化酶反应生成半乳己二醛糖和过氧化氢,可用酶涂层的过氧化氢电极进行测定^[7]。

2. 氨基酸分析

L-或 D-氨基酸类可用氨基酸氧化酶电极直接测定^[8]:



应用上述反应,用 L-氨基酸氧化酶(L-AAO)或 D-氨基酸氧化酶(D-AAO)的酶电极可测定酪氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸及 D-甲硫氨酸等氨基酸的含量。

其它氨基酸如谷氨酰胺、门冬酰胺及精氨酸等可与相应的酶产生反应,可用特定的酶电极进行测定^[9]。

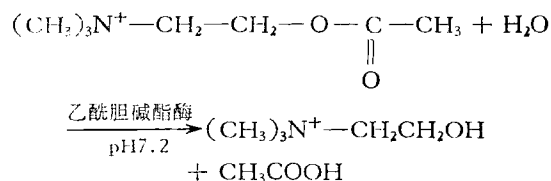
3. 蛋白质的分析

白蛋白可与抗血清白蛋白反应(免疫反应),在 0.1 M 氢氧化钠溶液中以银离子选择性电极进行测定。D'Orazio 等应用离子选择性电极测定法对含硫蛋白质的测定作了进一步研究取得了较为满意的结果^[10]。

4. 其它有机化合物的测定

(1) 乙酰胆碱

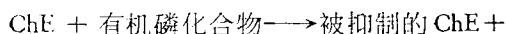
乙酰胆碱可直接用酶涂层的溴化乙酰胆碱选择性电极测定。乙酰胆碱与乙酰胆碱酯酶水解反应如下:



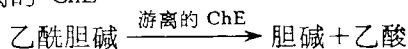
测定乙酰胆碱酯酶可用乙酰胆碱为底物涂层的溴化乙酰胆碱液膜电极(Corning 476200)进行测定,或用玻璃电极测定水解生成的醋酸量。

(2) 抗胆碱酯酶化合物

有机磷化合物可抑制胆碱酯酶(ChE)反应如下:



游离的 ChE



用上述测定胆碱酯酶的方法测定游离的 ChE 即可求出有机磷化合物的量^[11]。

(3) 单磷酸腺苷

5'-单磷酸腺苷(5'-AMP)与单磷酸腺苷脱氨基酶反应生成5-单磷酸肌苷和氨。可用单磷酸腺苷脱氨基酶电极进行测定。

D'Orazio 和 Rechnitz 报道,离子选择性电极测定法可用于免疫测定。以载负有三甲基苯基铵(TMPA⁺)标示物的绵羊红血球进行反应测定补体和抗体的水平,可获得满意的结果^[12]。

目前,酶电极和有关酶体系反应在生物化学和生物医学中的应用,尚处在发展阶段,可以预见,由于新型酶电极及其有关技术的迅速发展,离子选择性电极测定法将不断地扩大应用范围,且在不久的将来必将进一步扩展至科学研究的各个领域。

参 考 文 献

- [1] N. Lakshminarayanaiah, "Membrane Phenomena" in G. J. Hills (Ed.) *Electrochemistry, Specialist Periodical Report*, Chemical Soc., London Vol. 2, 1972 and Vol. 4, 1974.
- [2] Koryta, J.: *Ion-Selective Electrodes*, Cambridge University Press, Cambridge, 1975.
- [3] Moody, G. J. and Thomas, J. D. R.: "Selectivity and Sensitivity of Ion-Selective Electrodes" in E. Pungor (Ed.) *Ion-Selective Electrodes Hungary*, 1972.
- [4] Ruzicka, J. and Hansen, E. H.: *Anal. Chim. Acta*, **67**, 129, 1975.
- [5] Cammann, K.: *Anal. Chem.*, **287**, 1, 1977.
- [6] Llenado, R. A. and Rechnitz G. A.: *Anal. Chem.*, **45**, 826, 2163, 1973.
- [7] Taylor, F. J. et al.: *Anal. Chem.*, **49**, 789, 1977.
- [8] Moody, G. J. and Thomas, J. D. R.: *Analyst*, **100**, 609, 1975.
- [9] Larsen, N. R. et al.: *Anal. Chim. Acta*, **79**, 9, 1975.
- [10] D'Orazio, P. and Rechnitz, G. A.: *Anal. Chem.*, **49**, 41, 1977.
- [11] Gibson, K. and Guilbault, G. G.: *Anal. Chim. Acta*, **76**, 245, 1975.
- [12] D'Orazio, P. and Rechnitz, G. A.: *Anal. Chem.*, **49**, 2083, 1977.

[本文于 1978 年 10 月 15 日收到]