

Biochemistry, 1983, 22 (10): 4856~ 4860

Nucleotide Sequence of Cloned cDNA for α Subunit of Bovine Follicle Stimulating Hormone.

XI Feng-gong, YU Hong, CHEN Xin-guo, SHI Yu-hu (*Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Ürmqi 830000, China*); CHEN Qing-xuan, ZHANG Zhi-hong (*Institute of Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*).

Abstract Total RNA was prepared from pituitary of bovine. mRNA was isolated from the total RNA. cDNA was synthesized as template

used in PCR for amplification of cDNA for α subunit of bovine follicle stimulating hormone. Sequence analysis showed that the obtained cDNA fragment is 380 bp and all these nucleotides except one coding for Lys of No. 24 are as same as that Erwin reported. Comparison of bovine, human and rodent indicated that the amino acid and nucleotide sequences of the α subunit in these mammalian species are highly conservative.

Key words α subunit of bovine follicle stimulating hormone, cDNA, nucleotide sequence analysis

环糊精交联固定酶的生物传感器及临床应用*

李海虹

(浙江维美纺织公司医务科, 杭州 310015)

严少华 漆德瑶 刘海鹰

(上海大学化学化工系, 上海 200072)

摘要 通过交联方式将辣根过氧化物酶固定在 Eastman-AQ-N-甲基吩嗪修饰电极上, 制备成过氧化氢生物传感器。通过循环伏安法和计时电流法证明固定在 Eastman-AQ 阳离子交换树脂中的 N-甲基吩嗪有效地在辣根过氧化物酶和玻碳电极之间传递电子。由于该生物传感器对过氧化氢具有良好的生物电催化还原的功能, 所以将它与葡萄糖氧化酶和半乳糖苷酶结合, 制备成双酶和三酶体系的生物传感器, 用于葡萄糖和乳糖的测定。该生物传感器具有灵敏度高、响应快、响应范围宽及选择性好等优点。对糖尿病患者的血糖测定结果与采用葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶的分光光度法的结果一致。

关键词 生物传感器, Eastman-AQ 聚合物, N-甲基吩嗪, 辣根过氧化物酶, 葡萄糖, 乳糖, β 环糊精
学科分类号 O657.1

酶与电极之间的有效电子传递在电流型生物传感器中起决定性的作用^[1,2]。虽然辣根过氧化物酶能够在热解石墨电极上发生直接电子传递, 但是由于空间障碍, 这种直接电子传递过程比较缓慢, 因此利用这种方式制备的生物传感器对过氧化氢响应不灵敏^[3]。采用一些氧化还原物质作为辣根过氧化物酶与电极之间的电子传递体是克服上述电子传递缓慢的一种有效途径。常使用的电子传递体有二茂铁及其衍生物^[4]、二茂镍^[5]、铁氰化钾^[6]和钌联吡啶化合物^[7]。但这些电子传递体对抗坏血酸

具有催化作用, 使得采用这类电子传递体的生物传感器受生物样品中抗坏血酸的干扰。本文采用 N-甲基吩嗪为辣根过氧化物酶的电子传递体^[2], 将其固定在 Eastman-AQ 聚合物膜中, 制成 Eastman-AQ-N-甲基吩嗪修饰电极。将辣根过氧化物酶交联在聚 β 环糊精上, 然后将其固定在修饰电极的表面, 制成过氧化氢生物传感器。该生物传感器具有对过氧化氢响应

* 国家自然科学基金 (29675012) 和上海市教委资助项目。

收稿日期: 1996-12-23, 修回日期: 1997-06-09

灵敏度高、响应快及选择性好等特点。在此基础上, 将葡萄糖氧化酶和半乳糖苷酶固定在过氧化氢生物传感器上, 分别制备成双酶和三酶体系的葡萄糖和乳糖生物传感, 并应用于临床的糖尿病患者的测定。采用交联法将酶固定在 β 环糊精聚合物上, 利用环糊精对水具有络合作用, 提高酶膜的稳定性, 防止酶膜干裂。同时利用环糊精的主客体化学性质能够防止N-甲基吩嗪的流失。

1 材料与方法

1.1 试剂

辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶和半乳糖苷酶是美国Sigma公司产品。Eastmar-AQ-55D高分子聚合物是美国Eastman Kodak Co公司产品。N-甲基吩嗪是德国Fluka公司产品。 β 环糊精、葡萄糖、乳糖、过氧化氢(30%)、牛血清白蛋白和戊二醛从上海化学试剂公司购得。其他试剂均为分析纯。溶液均采用二次重蒸馏水配制。

1.2 仪器

电化学测定在Model 270恒电位仪(EG&G, Princeton)进行。在所有测定中, 采用三电极体系即饱和甘汞电极为参比电极、铂片为辅助电极和生物传感器为工作电极。在恒电位实验中, 控制电解池的温度为25℃, 并在工作电极上施加工作电位为-0.20 V, 待残余电流达到稳定时, 逐渐滴加过氧化氢或葡萄糖(或乳糖)溶液后, 记录还原电流的变化。

1.3 生物传感器的制备

Eastmar-AQ-N-甲基吩嗪修饰电极制作: 在洗净的玻碳电极表面修饰12 μ l含0.08 mol/L N-甲基吩嗪的2% Eastmar-AQ-55D丙酮溶液, 在室温下让溶剂自然挥发成膜。

将40 mg β 环糊精和150 μ l 5%戊二醛溶液混合后(β 环糊精和戊二醛缩合反应, 生成带有游离醛基的环糊精聚合物, 该游离的醛基能够与酶蛋白质交联反应), 再加入10 mg辣根过氧化物酶和10 mg牛血清白蛋白并混合均匀。取上述混合液12 μ l修饰在Eastmar-AQ-

N-甲基吩嗪修饰电极上, 在室温下让其固化成膜。当生物传感器不用时, 保存在4℃的冰箱中。

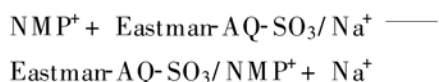
葡萄糖生物传感器的制作: 在上述环糊精聚合物溶液中加入8 mg辣根过氧化物酶、10 mg牛血清白蛋白和8 mg葡萄糖氧化酶并混合均匀, 取该混合液14 μ l修饰在Eastmar-AQ-N-甲基吩嗪修饰电极上。

乳糖生物传感器的制作: 在制作葡萄糖传感器的配比上加7 mg半乳糖苷酶并均匀, 取该混合液12 μ l修饰在Eastmar-AQ-N-甲基吩嗪修饰电极上。

2 结果与讨论

2.1 N-甲基吩嗪的电化学行为

Eastmar-AQ聚合物是一种具有良好交换能力的新型阳离子交换树脂。它具有良好的导电性能、化学性质稳定并对阴离子和一些生物大分子具有阻挡的作用。N-甲基吩嗪很容易通过离子交换方式嵌入Eastmar-AQ聚合物膜: 将修饰有Eastmar-AQ聚合物膜的玻碳电极浸入1.0 mmol/L N-甲基吩嗪溶液中5 min后, 取出电极并用二次重蒸馏水清洗后, 可以观察到Eastmar-AQ聚合物膜由无色变成黄色。另外, 还可以通过下列实验得到证明: 将Eastmar-AQ聚合物修饰电极放置在1.0 mmol/L N-甲基吩嗪的磷酸盐缓冲液中, 扫描电位控制在-0.3 V至0.3 V之间, 记录其循环伏安图。N-甲基吩嗪的循环伏安图随扫描次数增加而不断增大, 当扫描150次后, 达到平衡。N-甲基吩嗪在Eastmar-AQ聚合物膜中的化学反应为:



2.2 生物电催化还原过氧化氢

Eastmar-AQ-N-甲基吩嗪修饰电极对过氧化氢无任何催化作用。图1是过氧化氢生物传感器在加入过氧化氢前后的循环伏安图。当无过氧化氢存在时, 只观察到固定在Eastmar-AQ聚合物膜中的N-甲基吩嗪的氧化还原峰

(图 1a). 当加入过氧化氢后, 发现 N-甲基吩嗪的还原峰显著增大, 同时其氧化峰基本上消失 (图 1b). 这说明该生物传感器对过氧化氢具有良好的电催化还原作用.

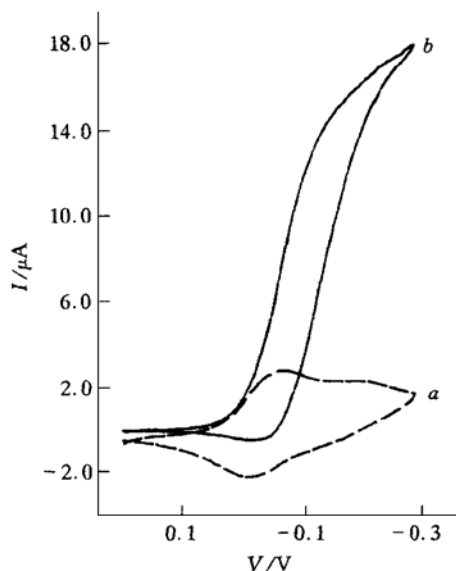


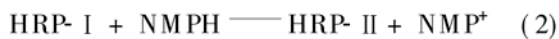
图 1 过氧化氢生物传感器在加入过氧化氢前后的循环伏安图

a: 无过氧化氢, b: 0.1 mmol/L 过氧化氢; 扫描速度: 20 mV/s.

辣根过氧化物酶是分子质量44 000以铁卟啉为辅酶的一种氧化还原酶. 它常被用来催化还原过氧化氢和一些有机过氧化物来提高测定过氧化物的灵敏度和选择性, 这是因为辣根过氧化物酶具有良好的稳定性和对过氧化氢有非常高的催化活性即每毫克蛋白质有 600 以上活性单位, 其中每活性单位能够每分钟有效地将 25 000过氧化氢分子转变为水. 过氧化氢氧化辣根过氧化物酶 HRP (Fe^{3+}), 产生中间化合物 HRP-I:

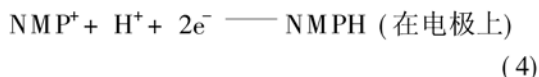


可以通过电子传递体将中间化合物 HRP-I 还原成 HRP (Fe^{3+}):



其中 HRP-II 是过氧化物酶另一种过渡中间态化合物, NMP⁺ 和 NMPH 分别是 N-甲基吩嗪的氧化态和还原态.

氧化态的 N-甲基吩嗪能够在电极上还原再生, 产生还原电流:



所以该生物传感器测定过氧化氢的原理是测量加入过氧化氢前后 N-甲基吩嗪的还原电流的变化来进行定量分析的.

图 2 是生物传感器对连续增加过氧化氢的计时电流响应. 生物传感器对过氧化氢的响应时间小于 30 s. 说明采用 N-甲基吩嗪为电子传递体的生物传感器对过氧化氢具有良好的生物电催化活性. 该生物传感器对过氧化氢的线性响应范围在 0.1 μmol/L 至 3.2 mmol/L 之间, 其检测下限为 75 nmol/L.

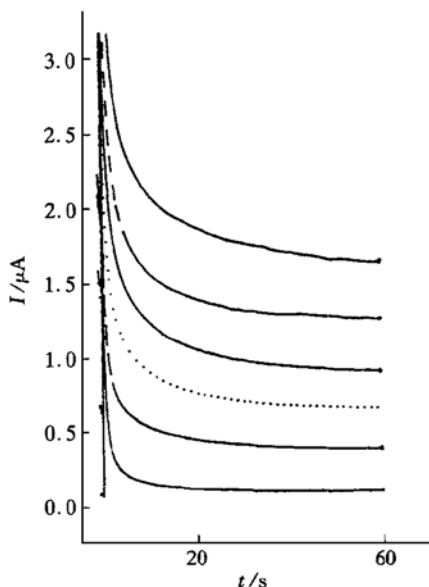
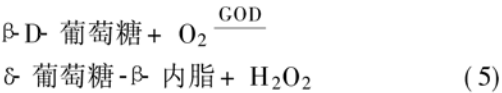


图 2 生物传感器对连续增加过氧化氢的计时电流响应
过氧化氢每次增加量: 3.0 μmol/L, 工作电位: -0.2 V.

2.3 生物电催化氧化葡萄糖

当溶液无葡萄糖时, 在双酶体系中辣根过氧化物酶和葡萄糖氧化酶产生信号只有固定在 Eastman AQ 聚合物膜中的 N-甲基吩嗪发生氧化还原反应. 当溶液中加入葡萄糖时, 双酶体

系的生物传感器的还原峰电流急剧增大同时伴随氧化峰基本消失. 葡萄糖氧化酶 (GOD) 催化氧化葡萄糖生成 δ -葡萄糖- β 内脂和过氧化氢:

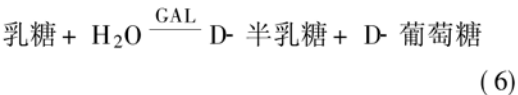


酶催化反应产生的过氧化氢引起上述反应 (1)、(2)、(3) 和 (4) 等一系列连锁化学反应, 所以可以在双酶体系的葡萄糖生物传感器观察在与图 1 相似的现象. 双酶体系生物传感器测定葡萄糖的原理与过氧化氢生物传感器一样.

双酶体系的生物传感器具有对葡萄糖响应快和灵敏度高等优点. 其响应时间为 33 s, 其检测下限为 2.0 $\mu\text{mol/L}$, 其线性响应上限为 5.5 mmol/L.

2.4 三酶体系的乳糖生物传感器

当加入乳糖时, 可以在三酶体系的生物传感器上观察到图 1 相似的现象. 这是由于乳糖在半乳糖苷酶 (GAL) 的作用下, 水解成半乳糖和葡萄糖:



生成的葡萄糖引起化学反应 (5)、(1)、(2)、(3) 和 (4), 所以三酶体系的生物传感器测定乳糖的原理与过氧化氢和葡萄糖生物传感器的相同. 由于半乳糖苷酶的催化活性很大程度上取决于缓冲液体系. 据文献报道, 钾离子和镁离子对半乳糖苷酶具有激活作用. 所以, 我们考察了钾离子和镁离子对乳糖生物传感器的影响. 实验表明钾离子对三酶体系生物传感器没有明显的影响. 但是, 镁离子能够使乳糖生物传感器对乳糖的响应增大 2~ 4 倍 (图 3). 当葡萄糖作为底物时, 三酶体系的生物传感器的响应不受镁离子浓度变化的影响, 但用乳糖作为底物代替葡萄糖时, 镁离子对三酶体系的生物传感器的影响是显著的. 在磷酸缓冲液中加入 1.4 mmol/L 钙离子, 三酶体系的生物传感器的响应信号不变, 所以, 实验中加入磷酸缓

冲液中的镁离子浓度为 2.5 mmol/L.

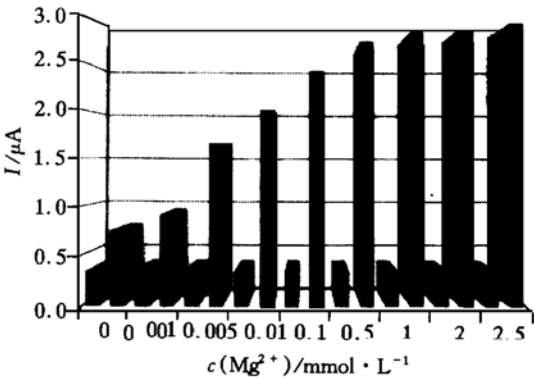


图 3 镁离子对乳糖生物传感器的影响
■: 0.5 mmol/L 葡萄糖; □: 0.6 mmol/L 乳糖.

乳糖生物传感器的响应线性范围在 8.0 $\mu\text{mol/L}$ 至 8.5 mmol/L 之间.

2.5 pH 对生物传感器的影响及干扰实验

酶的催化活性和 N-甲基吩嗪的电化学性质都受溶液 pH 的影响. 随着溶液 pH 的增大, 固定在 Eastman AQ 聚合物膜中的 N-甲基吩嗪的标准电位发生负移. 实验表明过氧化氢、葡萄糖和乳糖分别在 pH 6.5、6.5 和 7.0 表现理想的响应.

在过氧化氢、葡萄糖和乳糖浓度分别为 0.1 mmol/L、3.0 mmol/L 和 4.0 mmol/L 时, 0.5 mmol/L L-赖氨酸、L-甘氨酸、L-组氨酸、L-亮氨酸、麦芽糖、L-谷氨酸、L-胱氨酸、脲、蔗糖; 0.3 mmol/L 尿酸和抗坏血酸对测定无干扰.

2.6 生物传感器的稳定性

采用交联法将酶固定在 β 环糊精聚合物上, 利用环糊精对水具有络合作用, 提高酶膜的稳定性, 防止酶膜开裂. 同时利用环糊精的主客化学性质能够防止 N-甲基吩嗪的流失.

生物传感器分别连续测定 0.1 mmol/L 过氧化氢、1.0 mmol/L 葡萄糖和乳糖 20 次, 其标准偏差分别为 3.6%、3.7% 和 3.9%.

过氧化氢、葡萄糖和乳糖生物传感器保存一个月后, 其活性分别为 95.5%、94.7% 和 93.4%. 保存二个月后, 其活性分别为

89.5%、88.8%和87.3%。

2.7 糖尿病患者血糖的测定

将糖尿病患者的血清用磷酸缓冲液稀释20倍，用葡萄糖生物传感器进行测定。表1说明其测定结果与采用葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶的分光光度法^[8]的测定结果相一致。

表1 生物传感器和分光光度法测定糖尿病患者血糖的比较

mmol/L		
样品	葡萄糖生物传感器	采用葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶的分光光度法
1	25.5	25.7
2	21.7	20.6
3	19.4	19.5
4	23.8	23.9
5	19.4	19.3
6	27.2	27.3
7	22.1	22.0
8	28.3	28.5
9	24.8	24.7

参 考 文 献

1 Bourdillon C, Demaille C, Gueris J *et al.* A fully active monolayer enzyme electrode derivatized by antigen/antibody attachment. *J Am Chem Soc*, 1993, **115** (26): 12264~12269

2 钱江红, 刘海鹰, 邓家祺等. 以 N-甲基吩嗪硫酸盐为电子传递体的过氧化氢传感器. *分析化学*, 1996, **24** (4): 300~303

3 Ruzgas T, Gorton L, Emneus J *et al.* Kinetic models of horseradish peroxidase action on a graphite electrode. *J Electroanal Chem*, 1995, **391** (1-2): 41~49

4 Garguilo M G, Huynh N, Proctor A *et al.* Amperometric sensors for peroxide, choline, and acetylcholine based on electron transfer between horseradish peroxidase and a redox polymer. *Anal Chem*, 1993, **65** (5): 523~528

5 Liu H, Qian J, Liu Y *et al.* Nickelocene mediating sensor for hydrogen peroxide based on bioelectrocatalytic reduction of hydrogen peroxide. *Anal Proceed*, 1995, **32** (6): 437~447

6 Liu Y, Liu H, Qian J *et al.* Feature of an amperometric ferrocyanide mediating hydrogen peroxide sensor for organic phase assay based on regenerated silk fibroin as immobilization matrix for peroxidase. *Electrochim Acta*, 1996, **41** (1): 77~82

7 Reeke M, Rocca P, Heller A. Direct electrical detection of dissolved biotinylated horseradish peroxidase, biotin, and avidin. *Anal Chem*, 1995, **67** (2): 303~306

8 Bergmeyer H U, Bergmeyer J, Grabi M. *Methods of enzymatic analysis, metabolites 1: carbohydrates*. 3rd. New York: Elsevier, 1984. 178~183

Biosensors and Clinic Application Based on Immobilization of Enzymes with β -Cyclodextrin. LI Hai-hong (Clinic Department, Weimei Cooperation of Zhejiang, Hangzhou 310015, China); YAN Shao-hua, QI De-yao, LIU Hai-ying (Department of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200072, China).

Abstract Biosensor highly sensitive to hydrogen peroxide has constructed by immobilizing horseradish peroxidase in Eastman-AQ-N-methyl phenazine methosulphate modified electrode via cross-linking. Cyclic voltammetry and chronamperometry were employed to demonstrate the effective electron transfer between immobilized horseradish peroxidase and a glassy carbon electrode via N-methyl phenazine methosulphate in Eastman-AQ polymer film. Because of high efficiency of bioelectrocatalytic reduction of hydrogen peroxide via N-methyl phenazine methosulphate, the hydrogen peroxide sensor was combined with glucose oxidase and β -galactosidase for bienzyme and trienzyme-based biosensor for determination of low glucose and lactose. The biosensors for hydrogen peroxide, glucose and lactose possessed a wide variety of advantages including long stability, rapid response times, wide dynamic range, high sensitivity and selectivity. Comparison of glucose biosensor with colorimetric method with glucose oxidase and peroxidase for the determination of serum glucose from diabetic patients indicates that the results display a good consistency.

Key words biosensor, Eastman-AQ polymer, N-methyl phenazine methosulphate, horseradish peroxidase, glucose, latose, β -cyclodextrin