

以铁氰化钾为介体的苹果酸脱氢酶电极的研制*

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)

提 要

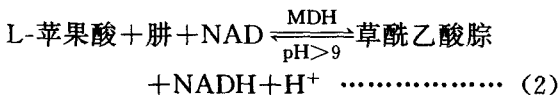
通过化学交联法将苹果酸脱氢酶(MDH)固定在玻碳电极表面($d=0.5\text{cm}$), 使用N-甲基吩嗪甲基硫酸盐(PMS)和铁氰化钾为介体, 间接地测定酶促反应中生成的还原辅酶I(NADH). 工作电位 $+350\text{mV}$ (vs. Ag/AgCl), L-苹果酸测定的线性范围为 $25\mu\text{mol/L}-300\mu\text{mol/L}$, 响应时间小于60s, 电极的使用寿命可达10d. 并对电极的选择和重现性进行了讨论.

关键词 苹果酸脱氢酶, 介体, 电流式传感器.

L-苹果酸几乎存在于所有的水果中, 它的测定对饮料和食品工业非常重要. L-苹果酸的含量直接影响果汁和果酒的味道和质量, 比如在鉴别葡萄酒质量的30多个测量数据中, L-苹果酸的测定最为重要^[1]. 因此, 准确、快速、选择性高的分析方法对L-苹果酸的测定是必要的, 酶法分析能够满足这个要求. 酶法测定L-苹果酸, 一般使用固定化的苹果酸脱氢酶(MDH)进行分析, 其反应原理如下:



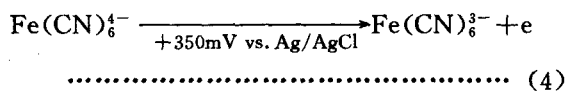
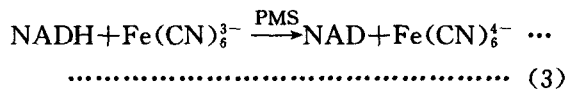
酶促反应中生成的NADH可以用分光光度法, 荧光光度法^[2], 和电化学法进行测定^[3]. 但此反应的平衡远偏向于左方($K=1.2 \times 10^{-12}$)^[4], 不利于NADH的生成, 为此, 必须选择适当的有利于NADH生成的条件, 进行L-苹果酸的定量分析. 有两种方法可以使反应平衡向生成NADH的方向移动, 第一种是在碱性介质中, 同时使用胍做为截获剂, 使反应平衡向右移动:



反应过程可以分光光度法或荧光光度法跟踪NADH的形成. 第二种方法是使NADH通过电化学方法或化学方法快速地再生成NAD, 和反应(1)形成循环, 来达到平衡移动的目的,

这也就为电化学方法测定L-苹果酸提供了方便. W. J. Blaedel等制备了一个L-苹果酸脱氢酶电极^[3], 电化学法直接测定酶促反应中生成的NADH的氧化电流和底物的浓度关系, 方法简便. 但这个电极的工作电位太高($+0.8\text{V}$, vs. Ag/AgCl), 所以选择性很差. 在这样的条件下, 干扰物质抗坏血酸的响应为被测物的20倍^[5], 而且这个电极的响应时间也特别长(5—15min). Mizutani等为了提高测定的选择性, 以Clark氧电极为基底电极, 使用MDH和NADH氧化酶双酶体系, 测定反应中的耗氧量和L-苹果酸的浓度关系. 这个酶传感器具有选择性高, 响应快的优点, 但双酶体系增加了成本和操作的复杂性.

本文介绍一种使用N-甲基吩嗪甲基硫酸盐(PMS)和 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 为介体, 间接测定酶促反应中生成的NADH的MDH传感器. 原理如下:



*国家自然科学基金资助项目.

**通讯联系人.

通过化学反应(3)使酶促反应中生成的NADH再生成NAD,而铁氰化钾被NADH还原成亚铁氰化钾,亚铁氰化钾在电极上被氧化,产生的氧化电流和体系中L-苹果酸的浓度在一定范围内呈线性关系.这种传感器由于使用介体间接测定NADH所以克服了高工作电位下选择性和重现性差的缺点,而且电极的响应速度也大大地加快了.

1 实验方法

1.1 仪器

DH-1型恒电位仪(吉林省龙井仪器厂),X-Y记录仪(Series 60 000,沈阳精密仪器厂),Sg-1型磁力搅拌器(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),电解池由三电极体系构成:酶电极、铂电极、银-氯化银参比电极.

1.2 试剂

苹果酸脱氢酶MDH(E. C. 1. 1. 1. 37, 5 000U/0.6mL, Sigma); NAD, (Sigma, Grade III),用pH7.0的 NaH_2PO_4 -NaOH缓冲液配成0.1mol/L的NAD溶液,N-甲基吩嗪甲基硫酸盐PMS(Fluka产),配成5mmol/L的溶液;铁氰化钾(分析纯),配成 5×10^{-2} mol/L水溶液;L-苹果酸(上海试剂二厂,生化试剂),配成0.1mol/L的标准溶液.PMS, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, L-苹果酸溶液都放在冰箱中保存,其余各种试剂都为分析纯,所有溶液都用重蒸水配制.

1.3 实验方法

1.3.1 MDH电极的制备

将自制的玻碳电极($d=0.5\text{cm}$)在砂纸上磨平,然后依次在 $1.0\mu\text{m}$, $0.3\mu\text{m}$ 的氧化铝粉末上抛光.最后在超声洗涤器上依次用丙酮、乙醇、重蒸水洗涤,自然干燥后备用.

取MDH(5 000U/0.6ml) $20\mu\text{l}$, 5mg BSA(牛血清白蛋白),用pH7.0的磷酸缓冲液 $100\mu\text{l}$ 溶解,再加 $30\mu\text{l}$ 2.5%戊二醛溶液,搅拌均匀.取此溶液 $15\mu\text{l}$ 滴加在玻碳电极表面,放在冰箱中干燥成膜,4h后取出,得到均匀的固定化酶膜.在膜上罩上80目尼龙网来支持酶

膜,尼龙网用圆环固定,然后用冷的pH7.0的磷酸缓冲液反复冲洗,最后将酶电极放入pH7.0的磷酸缓冲液中,冰箱保存.

1.3.2 L-苹果酸的测定

在10ml电解池中,分别加入pH9.50的甘氨酸-NaOH缓冲液1.55ml,浓度为 5.0×10^{-2} mol/L的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液0.1ml,浓度 5.0×10^{-3} mol/L的PMS溶液0.3ml,0.1mol/L NAD溶液 $60\mu\text{l}$, $1\mu\text{l}$ 0.1mol/L的 ZnCl_2 溶液.体系中各物质浓度为:NAD:3mmol/L, PMS 0.75mmol/L, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2.5mmol/L, Zn^{2+} 0.05mmol/L.将苹果酸脱氢酶电极与铂对极,银-氯化银电极一起插入电解池,构成三电极体系,测定时体系的温度保持在 20°C ,用磁力搅拌器搅拌,工作电位+350mV vs. Ag/AgCl,在x-y记录仪上记录电流随苹果酸的浓度变化.

2 结果与讨论

2.1 工作电位的选择

将MDH电极和铂对极,参比电极一起插入含有5mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的磷酸缓冲液中(pH7.0),进行循环扫描,发现氧化峰电位在+330mV vs. Ag/AgCl,因此我们选择工作电位为+350mV vs. Ag/AgCl.

2.2 NAD浓度的选择

由方程式(1)可知,增加NAD的浓度有利于平衡向右移动,如图1所示.在其它条件

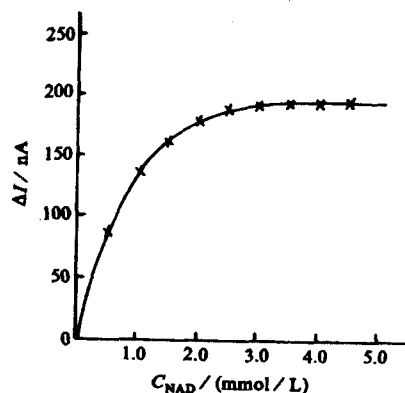


图1 NAD浓度的影响

t: 22°C , pH: 8.5, E: +350mV vs. Ag/AgCl, PMS: 0.5mmol/L, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$: 5.0mmol/L, Zn^{2+} : 0.05mmol/L, LMA: 0.25mmol/L

固定的情况下, NAD 浓度的变化引起电流变化, 当 NAD 的浓度增加到 3mmol/L 时, 电流随 NAD 的浓度的变化很小, 所以我们选择体系中 NAD 的浓度为 3mmol/L, 这样既可以得到较高的灵敏度, 又可以降低成本.

2.3 PMS 浓度的选择

在测定体系中, PMS 是必不可少的催化剂, 它能以极快的速度被 NADH 还原, 生成 PMSH, PMSH 又能快速地还原 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$:



所以 PMS 的浓度同样影响响应电流的大小. 当 PMS 的浓度以 0.05—1mmol/L 变化时, 相应的电流变化如图 2 所示. 当 PMS 的浓度为 0.75mmol/L 时, 响应电流最大. 之后, 随着 PMS 浓度的增加, 电流反而减小, 所以 PMS 的最适宜浓度为 0.75mmol/L.

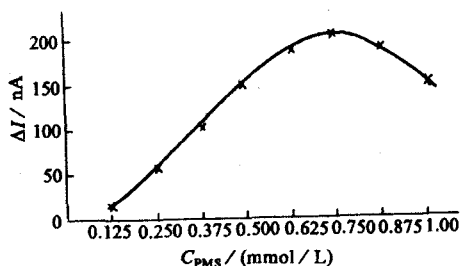


图 2 PMS 浓度的影响

t : 20°C, pH: 8.5, E : +350mV vs. Ag/AgCl,
NAD: 3.0mmol/L, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$: 5.0mmol/L,
 Zn^{2+} : 0.05mmol/L, LMA: 0.25mmol/L

2.4 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度的选择

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度的大小, 不但影响响应电流的大小, 当 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的浓度过高时, 会产生严重的背景干扰, 影响测定的灵敏度. 从图 3 可以看出, 随着 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度的增加, 电流响应随之增加, 当 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度增加到 2.5mmol/L 时, 电流不再增加, 而趋于稳定, 所以 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的最适宜浓度为 2.5mmol/L.

2.5 Zn^{2+} 浓度的影响

Zn^{2+} 对 MDH 有激活作用, 当有少量的 Zn^{2+} 存在时, 可以加速酶促反应. 我们调查的结果表明当 Zn^{2+} 浓度在 5×10^{-5} mol/L 时, 电极

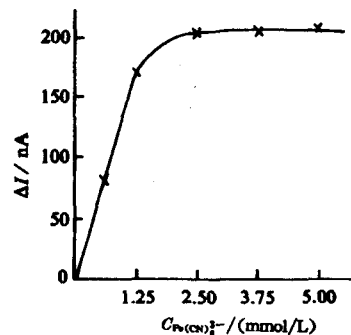


图 3 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度的影响

t : 20°C, pH8.5, E : +350mV vs. Ag/AgCl NAD:
3.0mmol/L, PMS: 0.75mmol/L, Zn^{2+} :
0.05mmol/L, LMA: 0.25mmol/L

的响应时间比没有锌离子存在时要快许多 (图 4). 对响应电流的大小影响不明显, 但当 Zn^{2+} 浓度增加到 5×10^{-4} mol/L 时, 响应电流大约下降 15%, 说明锌离子浓度太大时会降低测定的灵敏度.

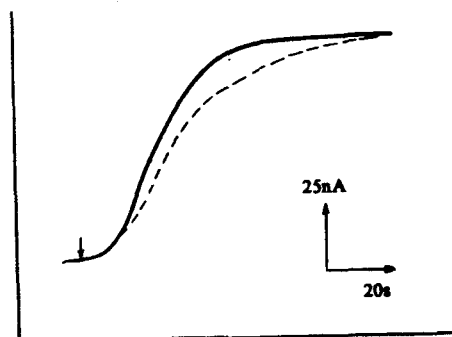


图 4 Zn^{2+} 对电极响应时间的影响

NAD: 3.0mmol/L, PMS: 0.75mmol/L
 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$: 2.5mmol/L, Zn^{2+} : 0.05mmol/L,
pH9.5, t : 20°C, E : +350mV vs. Ag/AgCl.
实线加 Zn^{2+} , 虚线不加 Zn^{2+}

2.6 pH 的影响

从反应式 (1) 可以看出, 增加 pH 对催化反应有利, 而 pH 过高, 又会降低酶的活性, 所以对酶催化反应来说, 有一个最佳酸度范围, 在此范围内可以得到较快的反应速度和较高的灵敏度. 在考察 pH 的影响时, 我们使用了磷酸缓冲液, Tris-HCl 缓冲液, 甘氨酸-NaOH 缓冲液, 在 pH7.0—10.5 之间进行比较, 结果发现最佳 pH 在 9.5, 如图 5 所示.

2.7 温度的影响

一般来说,反应速度随着温度的升高而加快,而温度继续升高又会使酶失活,所以温度的选择是非常重要的.图6为苹果酸脱氢酶电极的响应电流随温度变化的曲线,可以看出,在温度达到37.5℃时,电极的响应电流最大,超过37.5℃,响应电流急剧下降,说明酶的活性降低很快,我们选择在20℃条件下测定,得到很好的响应.

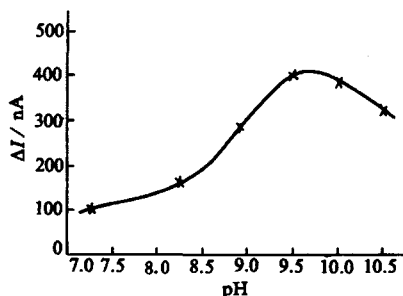


图5 pH的影响

t : 20℃, E : +350mV, vs. Ag/AgCl, NAD: 3.0mmol/L, PMS: 0.75mmol/L, $K_3Fe(CN)_6$: 2.5mmol/L, Zn^{2+} : 0.05 mmol/L, LMA: 0.25 mmol/L

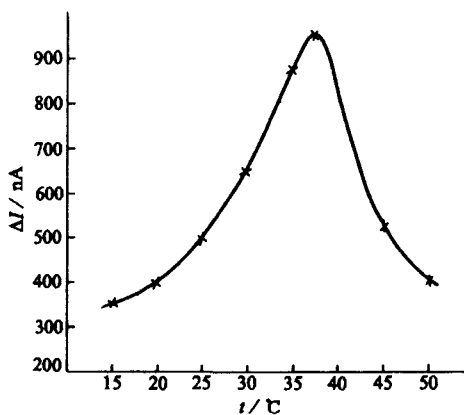


图6 温度的影响

pH: 9.5, E : +350mV, NAD: 3.0mmol/L, PMS: 0.75mmol/L, $K_3Fe(CN)_6$: 2.5mmol/L, Zn^{2+} : 0.05mmol/L, LMA: 0.25mmol/L

2.8 MDH 电极的工作曲线

在工作条件确定之后,测定电流随L-苹果酸浓度的变化,如图7. MDH 电极测定的线性范围为25-300 μ mol/L,下限为 5×10^{-6} mol/L.

2.9 MDH 电极的响应时间

酶电极的响应时间是和酶的固定化方法,

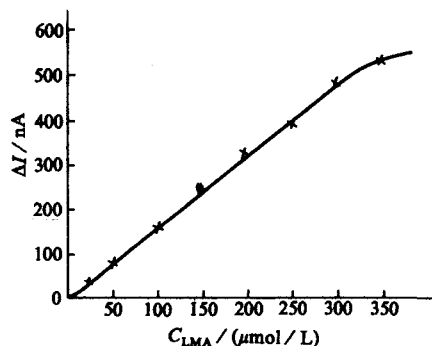


图7 MDH 电极的工作曲线

t : 20℃, pH9.5, E : +350mV, NAD: 3.0mmol/L, PMS: 0.75mmol/L, $K_3Fe(CN)_6$: 2.5mmol/L, Zn^{2+} : 0.05mmol/L

测定条件等多种因素有关,是衡量酶电极性能的一个重要参数.由于我们在测定时使用介体间接地测定NADH,加之将酶直接固定在电极表面,所以和以往的MDH 电极相比^[3],响应较快.从图4可以看出,响应时间在60s之内.

2.10 MDH 电极的使用寿命

酶电极的寿命主要和酶的固定化方法,测定条件,以及存放条件相关.由于使用化学交联法,所以制备的MDH 电极比较稳定.在上述的工作条件下,如果每天测定30次,10d之内响应电流变化很小,在6%左右,15d时下降20%,20d下降60%.

2.11 干扰实验

假设L-苹果酸的电流响应为100%,其它相同浓度的干扰物质的电流响应见表1.除抗坏血酸在此条件下有一定干扰外,其它各物质的响应很小或没有响应,和在高电位下直接测定NADH 相比,抗坏血酸的干扰消除了很多^[6].

表1 各种物质对MDH 电极的干扰

底物	相对响应电流/(%)	底物	相对响应电流/(%)
L-苹果酸	100	抗坏血酸	15
甲酸	4	葡萄糖	0
乙酸	2	脲	0
乳酸	3	甲醇	0
酪氨酸	4		
丙氨酸	0		

t : 20℃, pH: 9.50, E : +350mV vs. Ag/AgCl, 各物质浓度为0.25mmol/L.

2.12 MDH 电极测定的重现性

在工作条件下,对浓度为0.25mmol/L的L-苹果酸溶液连续测定7次,结果如表2所示,重现性非常好。

表2 MDH 电极的重现性

次序号	1	2	3	4	5	6	7
$\Delta I/nA$	390	380	395	410	400	390	395
$\bar{\Delta I}/nA$	394.2						
$\sigma/\Delta I$ (RSD)	2.4%						

本法成功地制备了L-苹果酸的酶传感器,该传感器灵敏度高,响应快,重现性好,而且方法非常简单,在饮料行业中应用,可能是一种很有发展前途的传感器。

参 考 文 献

1 Chemnitus G C, Schmid R D. L-Malate determination in wines and fruit juices by flow injection analysis, adaptation

of a coupled dehydrogenase/transferase system. *Anal letters*, 1989;22(15):2897

2 Guilbault G G, Sadar S H, Mcqueen R. A fluorimetric enzymic method for the assay of mixtures of organic acids. *Anal Chim Acta*, 1960;45:1

3 Blaedel W J, Engstrom R C. Reagentless enzyme electrodes for ethanol, lactate and malate. *Anal Chem*, 1980;52:1691

4 Bergmeyer H U. *Methods of enzymatic analysis*, 3rd edition, 1984;1:169

5 Fumio M, Soichi Y, Michihiko A. L-Malate-sensing electrode based on malate dehydrogenase and NADH oxidase. *Anal Chim Acta*, 1991;245:145

6 Joseph W, Donal L, Mehmet O *et al.* One-step fabrication of glucose sensors based on entrapment of glucose oxidase within poly (ester-sulfonic acid) coatings. *Anal Chim Acta*, 1991;245:139

应用亲和免疫印迹技术检测血清微量单克隆 Ig

阎有功 解兵

(广州军区武汉总医院, 武汉 430070)

提 要

介绍了一种简便、快速、灵敏的检测血清微量 mIg 的新方法——亲和印迹法。首先将特异性 Ab 结合到 NC 膜上,以薄层琼脂糖凝胶区带电泳把蛋白分离,蛋白经毛细印迹到 NC-Ab 膜上与其抗体亲和,再用酶标抗体探测被印迹之蛋白。2h 内可显示出 mIg 的特征。不需任何昂贵特殊设备。其敏感度大约是自然印迹法的 10 倍,是 IF 银染色法的 100 倍。

关键词 亲和, 印迹, 单克隆, 免疫球蛋白

通常认为,在单克隆 Ig (monoclonal Ig, mIg) 的鉴定中,免疫固定电泳 (IFE) 的敏感度优于免疫电泳,然而对低浓度的 mIg 及其轻链则难以检出^[1,2]。1982 年 Reitart 等^[3]运用自然印迹 (native blotting) 法虽然取得了一定效果,但无法克服的困难是所有 Ig 均可非选择性印迹到硝酸纤维素 (NC) 膜上。最近我们将亲和印迹 (affinity blotting) 技术^[2,4,5]用于血清微量 mIg 的检测,排除了其他 Ig 的干扰,使其敏感度明显提高。方法与结果介绍如下。

1 材料与方 法

1.1 检测样品 经醋纤膜电泳,免疫电泳及 IFE 确认为 M 蛋白血症病人的血清。

1.2 蛋白定量 按双缩脲法 (在 ENCORE I 型生化自动分析仪上进行)。Ig 定量用 SRID 法^[7]。

1.3 电泳 采用薄层琼脂糖凝胶电泳,加