

394—552 bp and 139—150 bp was amplified by PCR from clinical specimens (cervical carcinoma, genital condylomata, ovarian adenocarcinoma etc.) containing DNA from various HPV types. The digestion pattern of restriction endonuclease Rsa I analysis of PCR products by PAGE can be used for typing.

This method is simple, sensitive, specific and is suitable for detection and typing for genital HPV types in clinical samples.

Key words human papillomavirus, polymerase chain reaction, restriction endonuclease analysis, cervical cancer, genital condylomata

二茂铁-交联剂修饰的葡萄糖传感器*

刘海鹰 邓家祺**

(复旦大学化学系, 上海 200433)

摘要 用牛血清白蛋白-戊二醛交联剂把葡萄糖氧化酶固定在 Nafion-二茂铁修饰电极上, 最后在电极上修饰一层 Nafion 膜, 制备成葡萄糖传感器. 电活性物质如抗坏血酸、尿酸等对葡萄糖的测定无干扰. 该传感器的线性范围为 5.0×10^{-4} — 1.3×10^{-2} mol/L, 响应时间小于 60s.

关键词 生物传感器, Nafion, 二茂铁, 葡萄糖

介体修饰的酶传感器近年来发展较快, 由于介体代替了氧的作用, 克服了背景电流大, 易受环境中氧浓度的影响等缺点. 用于修饰的介体有铁氰化钾^[1]、四硫富瓦烯^[2]、金属卟啉化合物^[3]、醌及其衍生物^[4]及麦尔多蓝^[5]、二茂铁及其衍生物^[6,7]. 但上述文献中, 二茂铁的固定主要是吸附在电极表面或混合在碳糊中间, 这种电极, 二茂铁易流失, 从而引起寿命下降, 而且二茂铁对尿酸、抗坏血酸均有电催化作用, 因此造成样品测定误差增大. 我们先把二茂铁 (Fc) 固定在 Nafion 膜内, 然后用牛血清白蛋白-戊二醛把葡萄糖氧化酶 (GOD) 固定在修饰电极上, 最后在电极上修饰一层 Nafion 膜, 成功地制备成一种无干扰而高效的 Nafion-Fc-GOD-Nafion 多层夹心式葡萄糖传感器. 内层 Nafion 膜的作用主要是使二茂铁固定, 防止其流失; 外层 Nafion 膜是使用 Nafion 水溶液形成的, 它不影响酶的活性, 却能把尿酸、抗坏血酸等电活性物质阻挡在电极

外, 消除其干扰. 该传感器具有抗干扰能力强, 稳定性好, 响应快等优点.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

FDH-3204 型循环伏仪 (复旦大学科教仪器厂), TYPE 3086 函数记录仪 (日本横河公司).

葡萄糖氧化酶 (35.3 U/mg, Sigma 公司), Nafion (Dupont 公司), 二茂铁 (Sigma 公司), 葡萄糖及其它试剂均为分析纯, 牛血清白蛋白 (上海化学试剂公司), 戊二醛 (E. Merck 公司), 试验用水均为二次重蒸馏水.

1.2 Nafion 水溶液的制备

取 4ml 5% Nafion 甲醇溶液置于标有刻度

* 国家自然科学基金及中国科学院长春应用化学研究所电化学开放实验室资助课题.

** 通讯联系人.

收稿日期: 1994-01-28, 修回日期: 1994-05-16

的称量瓶中,把称量瓶放入恒温槽中,慢慢升温蒸发,通过逐渐滴加二次蒸馏水保持溶液体积不变,直到甲醇被蒸发完.放置一段时间后,Nafion 水溶液呈无色、透明,能以任一比例与水互溶.

1.3 Nafion-二茂铁修饰电极的制作

将玻碳电极($\Phi=4\text{mm}$)在金相砂纸上打磨其表面,用氧化铝悬浊液把电极抛光成镜面,然后依次在 1:1 HNO_3 、丙酮、二次蒸馏水中清洗,在红外灯下烘干.在预处理好的电极表面滴加 $4\mu\text{l}$ 0.1% Nafion 甲醇溶液,自然晾干后,再滴加 $4\mu\text{l}$ 0.1mol/L 二茂铁丙酮溶液,自然晾干成膜.

1.4 酶传感器的制备

将 20mg 葡萄糖氧化酶,15mg 牛血清白蛋白,0.5ml pH7.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液,10 μl 5%戊二醛混和,迅速搅拌均匀,取 8 μl 混和液修饰在 Nafion-二茂铁修饰电极表面,待自然晾干成膜后,浸入 0.5% Nafion 水溶液中,取出自然晾干后置于 pH7.0 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液中,放入 4℃ 冰箱中保存.

1.5 测定方法

实验采用三电极体系即酶传感器为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝为辅助电极.10ml 烧杯中加入 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液 5ml,控制温度为 25℃,插入电极,恒速搅拌,扫描电位为 $-0.2\sim+0.45\text{V}$ (vs. SCE) 之间,记录加入葡萄糖前后二茂铁的循环伏安图,根据二茂铁氧化峰电流的增值与加入葡萄糖的量成正比进行定量分析.

2 结果与讨论

2.1 Nafion-二茂铁修饰电极的性能

图 1 是 Nafion-二茂铁修饰电极在 pH 7.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中,不同扫描速度下的循环伏安图,由图 1 可知,固定在 Nafion 膜中的二茂铁峰形可逆性好,尽管其氧化还原峰电位都负移了 0.04V 左右(相对二茂铁修饰电极),但其氧化峰电位与还原峰电位差不变,为 0.05V.

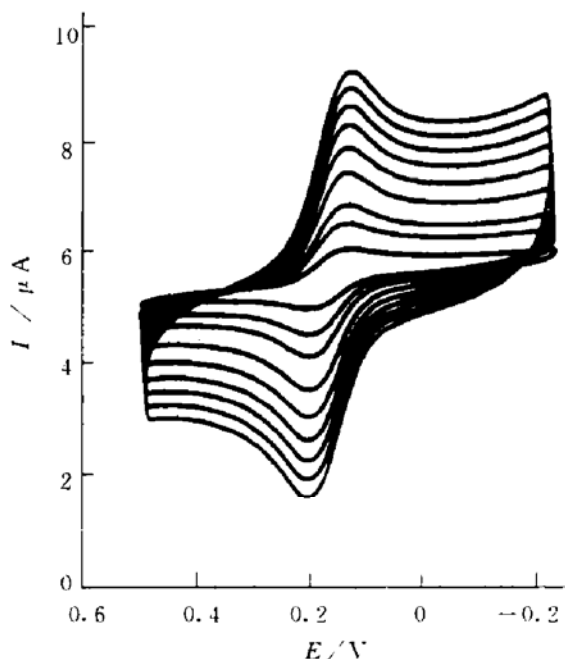


图 1 Nafion-二茂铁修饰葡萄糖传感器在不同扫描速度下的循环伏安图

底液: pH 7.0 0.1mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 中,由内到外扫描速度分别为: 5mV/s, 15mV/s, 25mV/s, 45mV/s, 65mV/s, 85mV/s, 105mV/s, 125mV/s, 145mV/s.

2.2 葡萄糖传感器的性能

Nafion-二茂铁修饰葡萄糖传感器测定葡萄糖原理如图 2 所示,它是以测量二茂铁的循环伏安图中氧化峰电流增值来定量测定葡萄糖:

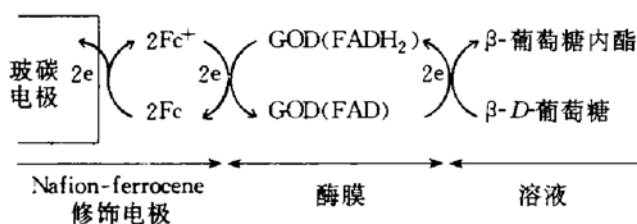
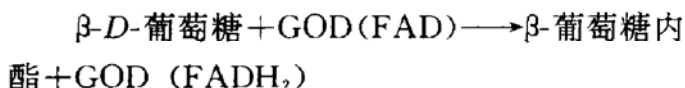
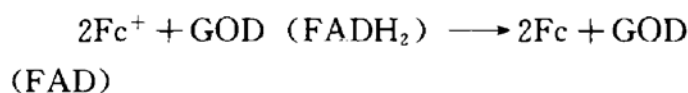


图 2 Nafion-二茂铁修饰葡萄糖传感器测定原理图

$\beta\text{-D-葡萄糖}$ 从溶液中扩散到电极表面,被固定在电极表面上的葡萄糖氧化酶 GOD (FAD) 氧化:



Nafion 膜中的二茂正铁离子 (Fc^+) 把 GOD (FADH₂) 氧化为 GOD (FAD):



二茂铁又在电极被氧化为二茂正铁离子, 产生氧化电流:

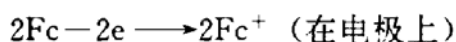


图 3 是 Nafion-二茂铁修饰葡萄糖传感器的在 0.1mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中加入葡萄糖前后的循环伏安图. 其中 *a* 是未加入葡萄糖的循环伏安图, 由 *a* 可知电极呈现快速、可逆的电子传递, 二茂铁的氧化、还原峰大致相等; 随着葡萄糖浓度的增大, 二茂铁氧化峰电流逐渐增大, 还原峰电流逐渐减小. 图 2 中 *h* 是葡萄糖浓度为 3.5mmol/L 循环伏安图, 由图 3 可知, 由于酶催化反应, 二茂铁的氧化峰明显增大, 而还原峰基本消失, 说明固定在 Nafion 膜上二茂铁能有效地在玻碳电极和 GOD 之间传递电子.

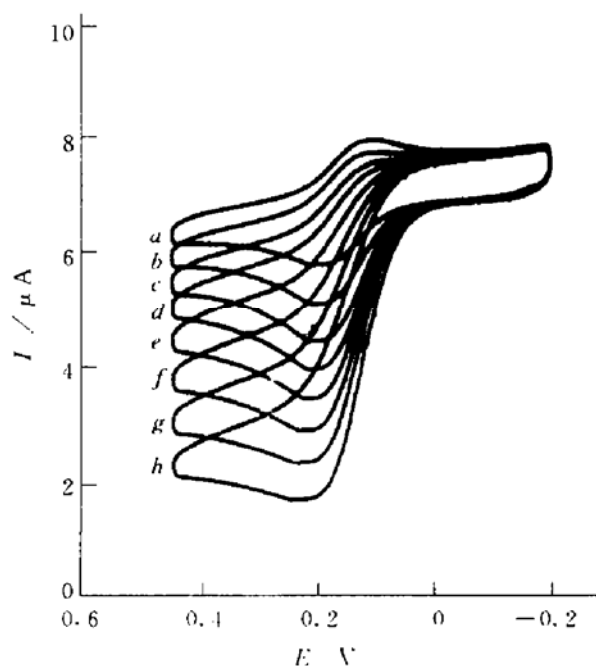


图 3 二茂铁-Nafion 修饰葡萄糖传感器的循环伏安图

底液: 0.1mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.0). *a*: 没有葡萄糖存在; *b, c, d, e, f, g, h* 加入的葡萄糖浓度分别为: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5mmol/L. 扫描速度: 25mV/s, 实验温度: 25℃.

2.3 pH 对葡萄糖传感器的影响

pH 对酶的活性有一定影响. 如图 4 所示,

在 pH 为 6.0—8.0 之间, 该传感器的响应值基本不变, 这表明该电极在生理 pH 范围内的测定基本上不受溶液酸度影响.

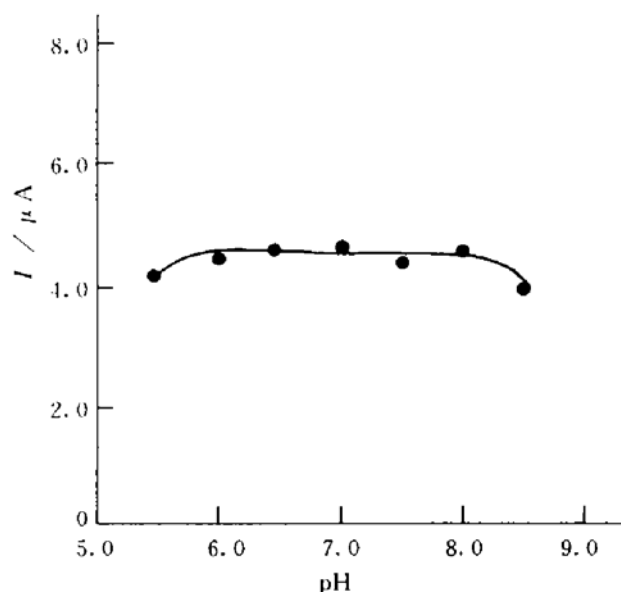


图 4 pH 对葡萄糖传感器的影响

实验温度: 25℃; 葡萄糖浓度: 4.0mmol/L.

2.4 温度对葡萄糖传感器的影响

温度对酶的催化反应速度及活性都有影响. 实验表明温度在 20—50℃ 之间, 随着温度升高时, 其响应值逐渐增大, 当温度超过 50℃, 其响应值急剧减小. 这是因为温度过高, 部分酶失活所致. 故本文选择实验温度为 25℃.

2.5 葡萄糖传感器的工作曲线及响应时间

在上述最佳条件下, 测试该传感器的催化电流与葡萄糖浓度的关系, 如图 5 所示, 线性范围为 5.0×10^{-4} — 1.3×10^{-2} mol/L. 该传感器的响应时间小于 60s.

2.6 干扰实验

在葡萄糖浓度为 6mmol/L. 0.5mmol/L *L*-赖氨酸、*L*-脯氨酸、*L*-胱氨酸、*L*-谷氨酸、甘氨酸、*L*-组氨酸、*L*-亮氨酸、*L*-蛋氨酸、乳酸、蔗糖、麦芽糖、脲; 0.25mmol/L 尿酸、抗坏血酸等对测定没干扰. 这是因为在生理 pH 值下, 尿酸、抗坏血酸为阴离子, 被 Nafion 阳离子交换膜挡在传感器外, 所以可消除其干扰. 在常规测试条件下不受底液中溶解氧影响.

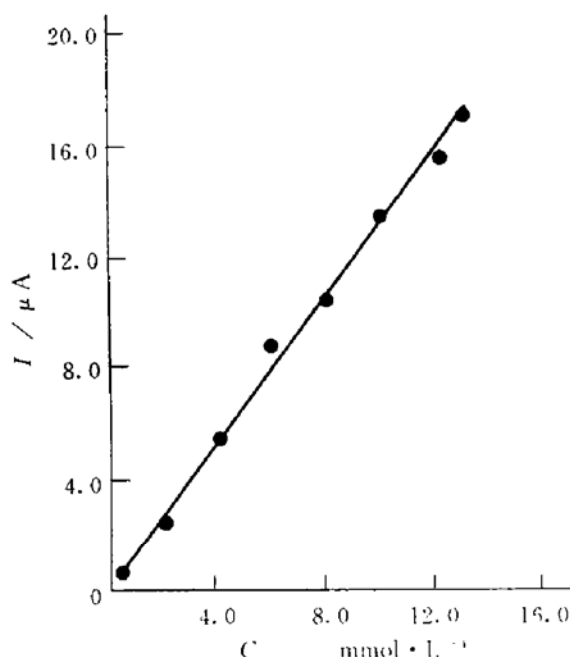


图5 葡萄糖浓度与葡萄糖传感器输出电流关系曲线

底液: 0.1mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ (pH = 7.0); 扫描速度: 25mV/s; 实验温度: 25℃.

2.7 传感器的稳定性

对 8.0mmol/L 葡萄糖的溶液重复测定 10 次, 其相对标准偏差为 2.2%. 电极在制成后的一个月, 经连续使用与存放, 对同一浓度葡萄糖的响应电流的相对标准偏差为 3.9%, 该传感器在冰箱中保存二个半月, 酶的活性基本不变.

2.8 回收率实验

用标准曲线对样品进行回收率实验, 结果列于表 1. 其回收率在 98.8%—101.2% 之间.

表 1 回收率测定

加入量/mm $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	6.50	7.50	12.50	4.50	9.50
检出量/mm $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	6.58	7.41	12.39	4.55	9.61
回收率/%	101.2	98.8	99.1	101.1	101.2

参 考 文 献

1 Juan R Mor, Guarnaccia R. Anal Biochem, 1977; 79: 319

- 2 Palleschi G, Turner A P F. Anal Chim Acta, 1990; 234: 459
- 3 Wring S A, Hart J P, Birch B J. Electroanalysis, 1992; 4: 1
- 4 Kulys J J, Genas N K. Biochim Biophys Acta, 1983; 744: 57
- 5 Appelquist R, Marko-Varge G, Gorton L *et al.* Anal Chim Acta, 1985; 167: 237
- 6 Christian B, Christophe D, Jacques M *et al.* J Am Chem Soc, 1993; 115: 2
- 7 Amine A, Kauffmann J M, Guilbault G G *et al.* Anal Lett, 1993; 26 (7): 1281

A Glucose Sensor Based on Ferrocene and Cross Linker Modification. Liu Haiying, Deng Jiaqi (Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China).

Abstract Electrical communication between the flavin adenine dinucleotide redox centers of glucose oxidase and glassy carbon electrode has been achieved by employing ferrocene immobilized in Nafion membrane. The glucose sensor is made by using bovine serum albumin and glutaraldehyde to immobilize glucose oxidase on Nafion-ferrocene modified electrode. It is further coated by Nafion, which is aqueous solution made from Nafion methanol solution by distilling and is not detrimental to the enzyme but to forstall electrochemically active anionic interferents such as ascorbate and urate from reaching the electrode. The Polymer coating also avoids ferrocene's leaking and keeps the biosensor from fouling agents. The biosensor responds rapidly to glucose in less than 60 second and its calibration linear curve is from 5.0×10^{-4} to 1.3×10^{-2} mol/L.

Key words biosensor, Nafion, ferrocene, glucose

更 正

“SDS电泳半干新技术”一文(1994; 21(3): 265)中阳极缓冲液(pH6.4)应改为(pH8.4). 表1中时间/min 80 应改为 60. 以上错误由作者造成, 敬请原谅.

[郭尧君 闻设]