

辣根过氧化物酶标间苯二胺膜电极的研制

陈瑞川 卢方 王凯华
(厦门大学抗癌研究中心)
万 楨*
(厦门大学化学系)

目前, 用作传感器的功能膜材料不多, 见诸文献的有: 测定梅毒抗体的醋酸乙烯膜^[1], 测定二硝基酚(DNP)的聚氯乙烯膜^[2], 测定人体免疫球蛋白IgG的聚苯乙烯活性膜^[3]等。本文采用电化学聚合方法形成间苯二胺膜, 并探讨了电化学聚合、活化、偶联制备辣根过氧化物酶标膜电极的实验条件及其性能。实验证明: 聚合膜具有较多的供生物材料偶联的氨基, 制成的膜极薄, 在电极表面结合牢固, 具有抗碱及非氧化性酸腐蚀的性能, 有一定的电导性, 共价交联的过氧化物酶结合牢固, 在样品检测中性能稳定, 重现性好, 使用及保存寿命较长, 是制备生化传感器的良好材料。可望在免疫电极及微型电极研究方面应用。

实 验 部 分

辣根过氧化物酶(HRP)(生化试剂)为中科院上海生化所产品; 间苯二胺(PDA)(化学纯)为上海白鹤化工厂产品; 25%戊二醛为E. Merck进口分装; 2,2-连氨基-2(3-乙基-苯并噻唑啉磺酸-6)铵盐(ABTS)为Zymed Laboratories Inc产品。

MINIREADER II型酶标读数仪为Dynatech Laboratories Inc产品。

电化学聚合 称取1.30gPDA溶于1.2M H₂SO₄, 并加水稀释到100ml, 摇匀备用。以光谱纯石墨电极为研究电极, 铂电极为对电极, 在2.5V电池电压下聚合20分钟, 取出研究电极, 用蒸馏水洗净, 避光干燥保存备用。

活化 将以上电极于室温下(15℃)在3%戊二醛液中浸泡4小时, 取出洗净备用。

偶联 将以上电极置1.2mg/mlHRP液中于15℃偶联24小时。取出后用0.01缓冲平衡盐水(pH7.2)洗净。然后置0.2M甘氨酸-盐酸缓冲液(pH2.8)中浸泡洗涤1小时。洗净于4℃保存。

检测 将待测底物样品配制成所需的浓度范围。移取0.5ml于反应板孔内, 将酶标电极浸入, 反应二分钟取出, 滴加20μl0.5%的叠氮钠以终止反应。然后在酶标读数仪上读取410nm的OD值。

结 果 与 讨 论

循环伏安图 以光谱纯石墨电极为研究电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂电极为辅

* 通信联系人。

助电极。在电聚合液中于 $0 \sim 1.6\text{V}$ 间进行循环伏安扫描 1 分钟,扫描速率为 $100\text{mV}/\text{sec}$ 。循环伏安曲线如图 1 所示。由图可见,间苯二胺在 $+1.1\text{V}$ 处有一个氧化峰,随着扫描次数的增加,峰电流逐渐下降。在电极表面可看到一层均匀、亮黑蓝色聚合膜形成,与电极表面结合牢固,该膜有抗酸、抗碱性能。

电池电压的影响 按照电聚合方法在不同的电池电压下进行实验,再进行活化、偶联、检测。实验表明,电压增大,OD 值增大,说明偶联的酶量也增大。但电压过大,由于放氢放氧,聚合膜粗糙、疏松、易脱落实验中选择的电池电压为 2.5V 。

聚合液的浓度 分别改变间苯二胺和硫酸的浓度进行实验。间苯二胺浓度增高,酶标聚合膜的 OD 值增大;硫酸浓度增大,OD 值也增大。实验中选择的浓度为:间苯二胺 0.12M ,硫酸 1.2M 。

聚合时间 改变电聚合时间,然后测定不同时间制成的酶标电极的 OD 值。实验表明,聚合 15 分钟后,酶标电极可得较为稳定的结果,20 分钟时有一个最大 OD 值。实验中选择的聚合时间为 20 分钟。

活化液浓度 我们采用戊二醛交联法以活化氨基,进行了活化条件试验。改变戊二醛浓度,并测定酶标电极的 OD 值。戊二醛浓度增大,OD 值增大,但当戊二醛浓度超过一定值时,OD 值反而下降。这时由于戊二醛浓度过大时,其二个醛基均与膜上氨基缩合而减少了自由醛基的量,至使偶联的酶量减少,因而 OD 值下降。实验中,以采用 3% 戊二醛浓度为宜。

活化时间 实验表明,活化时间过长,测定的 OD 值反而下降。活化时间以 4 小时为宜。

活化温度 实验表明,温度较高时,活化较快,但戊二醛挥发性较大,故选择在室温下 (15°C) 活化较宜。

辣根过氧化物酶浓度 我们采用辣根过氧化物酶偶联,进行了偶联条件试验。配制不同浓度酶溶液进行实验,结果表明,酶浓度增高,OD 值增大直至饱和。如图 2 所示。实验中选择的浓度为饱和处的 $1.2\text{mg}/\text{ml}$ 。

偶联时间 偶联时间达 24 小时时,可接近饱和值。故偶联时间选择为 24 小时。

偶联温度 由于酶在较高温度下,易变性失活,低温时偶联反应又较慢。故以在室温

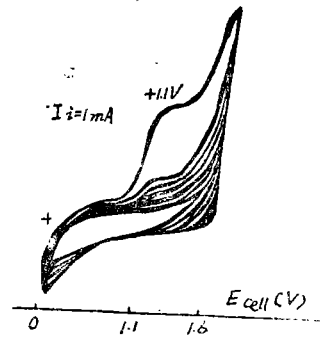


图1 间苯二胺循环伏安图

研究电极: $\phi 6\text{mm}$ 石墨电极 对电极: $2 \times 2\text{mm}^2$ 铂电极
参比电极: 饱和甘汞电极 PDA 浓度: 0.12M
溶剂: $1.2\text{MH}_2\text{SO}_4$ 扫描速率: $100\text{mv}/\text{sec}$ 。

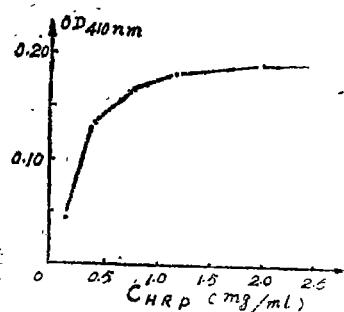


图2 酶浓度和膜性能的关系

(15℃)下进行偶联为宜。

酶标电极的洗涤 偶联的酶标电极上通常会有一些非共价吸附的HRP,影响检测的真实结果。因而我们采用0.2M的甘氨酸—盐酸缓冲液(pH2.8)进行浸泡洗涤。实验表明,经1小时后,非共价吸附的HRP可被洗脱。

酶标电聚合膜性能的测试

标准曲线 辣根过氧化物酶可催化无色的ABTS底物转变为兰色的产物,且颜色的深浅与酶量成正比。因此应用该反应绘制标准曲线以检测功能膜的性能。配制系列浓度的底物,同时用单根酶标电极和多根酶标电极进行实验,所得如图3所示。结果表明,所得曲线相当一致,在1/900~1/400浓度范围线性良好,性能稳定,重现性好。同时也说明在相同制备条件下制备的膜电极,实验结果是一样的。

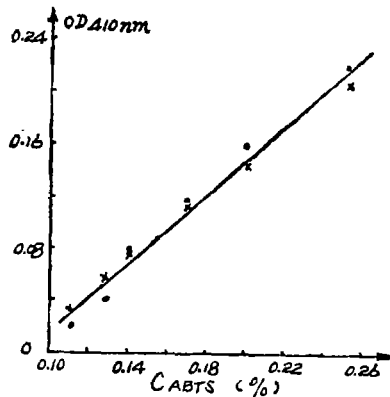


图3 标准曲线

· · · · · 为用同一根电极所得曲线 × · · · · · 为用多根电极所得曲线

保存和使用寿命 在4℃和15℃干燥保存的膜电极,经二个月后再进行测试,所得结果几乎无变化。在连续测定中证明,膜电极的半衰期可达40次以上。

参 考 文 献

- (1) 山本直登等, 化学の领域, 34(386), 101(1982)
- (2) R.L.Solsky et al, Anal.Chim.Acta, 123, 135(1981)
- (3) 苏殿杰等, 生物化学与生物物理进展, 6, 73(1985)