

## PVA-葡萄糖氧化酶膜制备的研究

张国雄 戴愉勤 朱天民\* 袁中一\*

(中国科学院上海冶金研究所, 上海)

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)\*

合成了新的光交联载体 PVA-SbQ-GA, 通过物理包埋和化学键相结合的办法固定了葡萄糖氧化酶。对SbQ和GA在载体中量及光照时间进行了优化试验, 酶膜活力回收达40%。与氧电极结合制成葡萄糖传感器, 对其性能进行了测定。

**关键词** PVA-SbQ-GA; 葡萄糖氧化酶膜; 葡萄糖传感器

水溶性高聚物聚乙烯醇(PVA)具有韧性和无毒性特点, 是一种常见的酶固定化载体<sup>[1-3]</sup>。Imai<sup>[4]</sup>等利用PVA与光敏剂苯甲酸钠作用, 光交联固定蔗糖酶、葡萄糖淀粉酶、纤维素酶。Ichimura<sup>[5]</sup>合成苯乙烯基吡啶鎓盐(Stibazolium 简写SbQ)基团的PVA, 在紫外光下光交联酶, 其活力及使用寿命较Imai报道为好。Ichimura<sup>[6]</sup>又用该法制备了葡萄糖、胆碱、甘油等生物传感器。

本文合成PVA-SbQ-GA光交联载体, 并用于固定葡萄糖氧化酶, 对固定化条件进行了优化试验, 制得的酶膜其活力回收达40%, 与极谱式氧电极结合, 制成葡萄糖生物传感器, 其测量范围、稳定性、重现性、寿命等性能均良好, 用以测定血中葡萄糖量, 获得满意结果。

### 材料与 方法

#### (一)试剂

PVA(Serva), 分子量约22000, 未经进一步纯化。葡萄糖氧化酶(Sigma, type II, EC 1.1.3.4)、辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白(BSA)(上海东风生化试剂

厂), 4-氨基安替吡啉(化学纯, 上海试剂一厂), 其余试剂均为分析纯或化学纯。

#### (二)方法

1. SbQ的制备: 按Ichimura<sup>[5]</sup>报道的方法, 适当修改。在圆底烧瓶中加入20g对苯二甲醛, 10ml 2-甲基吡啶, 13ml醋酐, 6ml乙酸, 混和。加热回流5h, 加入150ml 1mol/L HCl, 过滤, 滤液用80ml苯分二次萃取, 合并水相。调节水相pH呈弱碱性, 放置1h。过滤, 洗涤沉淀, 干燥。将固体溶于乙酸乙酯, 滤去不溶物, 加入95ml硫酸二甲酯, 反应5h, 过滤, 干燥, 得SbQ8.6g。

2. PVA-SbQ及PVA-SbQ-GA的制备: 将60g PVA溶于724ml热水中, 加入3g  $H_3PO_4$ , 分成4等份, 分别加入0.7、1.4、2.8、4.2g SbQ, 连续搅拌40h, 得PVA-SbQ溶液。

取加入2.8g SbQ的PVA-SbQ溶液20ml三份, 分别加入0.5、1.0、10% GA 5ml, 搅拌2h, 得PVA-SbQ-GA溶液。

在上述两种溶液中分别缓缓加入丙酮, 析出沉淀, 过滤, 用甲醇洗涤数次,

本文于1989年10月13日收到。

真空干燥, 避光保存。

3. 葡萄糖氧化酶膜的制备: 分别取 4mg PVA-SbQ 及 PVA-SbQ-GA, 加 100 $\mu$ l 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.0), 溶解, 加葡萄糖氧化酶 3mg, BSA 3mg, 混匀, 取 30 $\mu$ l 在透析袋上铺膜, 干燥后以紫外灯光照。

4. 葡萄糖氧化酶活力的测定: 取 3.5mg 过氧化物酶和 3.5mg 4-氨基安替吡啉溶于 20ml 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液, 加入 1ml 3% 苯酚水溶液, 取 1.5ml 该溶液与 1.5ml 6.5% 葡萄糖水溶液混合, 加入 10 $\mu$ l 葡萄糖氧化酶溶液 (1mg/ml), 用 1cm 光径比色皿, 在 500nm, 跟踪该溶液吸光度变化。

将固定化酶膜置于成倍体积的混合液中, 搅拌, 定时取样, 测定 500nm 处消光度, 得出每 mg 固定化酶膜的活力。

## 结果与讨论

### (一) 最佳固定化条件的选择

分别取 SbQ 含量不同的 PVA-SbQ 载体 3mg, 加入葡萄糖氧化酶 3mg, 用 100 $\mu$ l 0.05mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液溶解, 按前述固定化步骤制膜, 测其活力, 其不同量 SbQ 对固定化膜活力的影响列于表 1。

表 1 SbQ 含量对葡萄糖氧化酶膜活力的影响  
Table 1 Effect of SbQ content on enzymatic activity of glucose oxidase membrane

PVA-SbQ	1	2	3	4
SbQ content (mg/g PVA)	46.5	93.0	186.5	230.0
Activity of glucose oxidase membrane ku/mg	29.49	36.96	41.4	37.9

PVA-SbQ 中 SbQ 量明显影响酶膜的活力。随着 SbQ 含量增加, 更多的酶被包埋在 PVA 网格中, 使酶膜活力增高, 但 SbQ 量过高, 酶膜交联过于致密, 底物经膜网格扩散的阻力增加, 表现初速度减小。本文取含 186mg/g 的 PVA-SbQ 作载体。

PVA 中 SbQ 在紫外光照条件下, 发生光交联, 包埋葡萄糖氧化酶, 光照时间对酶膜活力的影响示于图 1。光照 2h, 包埋在网格中酶量趋于稳定, 酶膜活力达到平衡。

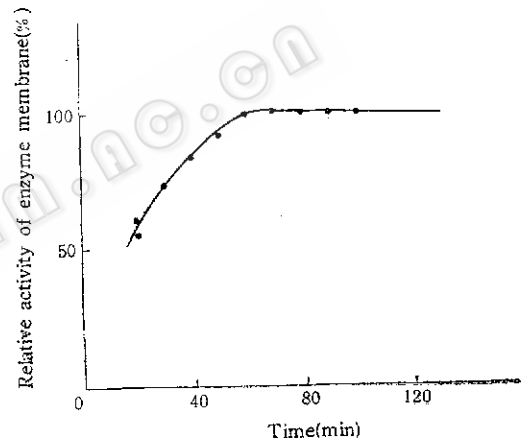


图 1 光照时间对酶膜活力的影响  
Fig.1 Effect of irradiation time on enzymatic activity of glucose oxidase membrane

按上法制得的酶膜与氧电极结合, 制成葡萄糖传感器, 在测定葡萄糖溶液时, 观察到工作稳定性较差, 酶膜经过一天连续使用后, 其活力明显下降, 估计 PVA 网格中酶逐渐脱落所致。将 PVA-SbQ 固定化的葡萄糖氧化酶膜进一步用戊二醛处理, 结果列于表 2。酶膜经戊二醛浸泡处理后, 活力明显下降, 系戊二醛交联导致酶失活所致。

本文提出一种新的载体, 即将含 SbQ 18% 的 PVA-SbQ 溶液与一定浓度的戊二醛混合, 搅拌 2h, 然后倒入丙酮中, 所

表 2 戊二醛浸泡处理的酶膜活力回收  
Table 2 Recovery of enzymatic activity after glutaraldehyde treatment

酶膜* Enzyme film (No.)	戊二醛处理 Glutaraldehyde treatment		干燥时间 Time for drying	活力回收 Activity recovery (%)
	Conc.(%)	Time(min)		
1	2	1	In desiccator	1.2
2	1	1	Air dried, 1h	2.5
3	1	20	No	1.9
4	0.5	2	Air dried, 1h	4.6
5	0.5	10 $\mu$ l coating	Air dried, 1h	7.3
6				46.9

\* 3mg PVA-SbQ, 3mg glucose oxidase, 3mg BSA were thoroughly mixed with 100 $\mu$ l 0.05mol/L pH7.0 phosphate buffer, and then were spread and exposed to UV lamp for one hour

析出沉淀经甲醇洗涤,干燥后得 PVA-SbQ-GA, 以此作载体,固定葡萄糖氧化酶膜。

不同浓度戊二醛处理制得的 PVA-SbQ-GA, 用于固定葡萄糖氧化酶,其活力回收见表 3。PVA-SbQ-GA 用于固定葡萄糖氧化酶,其活力回收高达 40%, 略低于单纯用 PVA-SbQ 固定化的 46.9%, 但这种固定化酶膜与氧电极结合制得的葡萄糖传感器,其稳定性和寿命均较单纯物理包埋法明显提高。

表 3 戊二醛预处理对酶固定化的影响  
Table 3 Effect of pre-treatment with glutaraldehyde on enzymatic activity of enzyme film

PVA-SbQ solution (ml)	Addition of glutaraldehyde	Activity recovery (%)
20	0.5%, 5ml	40.0
20	1%, 5ml	39.4
20	10%, 5ml	—*

\* After glutaraldehyde treatment, PVA-SbQ solution turned into gel. No use for immobilization

### (二) pH 对酶膜活力影响

从图 2 可知,固定化酶膜最适 pH 为 7.0,与溶液酶相比,最适 pH 向碱性方向移动了一个单位<sup>[8]</sup>。可能系酶在固定化后在膜内微环境发生变化所致。Ichimura<sup>[5]</sup>

也观察到同样情况。

试验了温度与固定化酶膜活力关系,结果表明自然酶与酶膜情况基本相同。

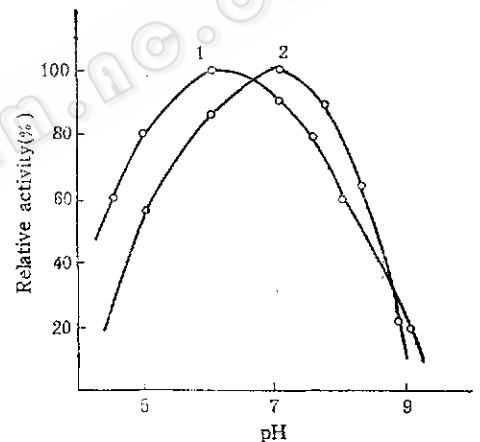


图 2 pH 对葡萄糖氧化酶和酶膜活力的影响  
Fig.2 Effect of pH on the activity of glucose oxidase and enzyme film

1. Glucose oxidase 2. Immobilized glucose oxidase film

### (三) 葡萄糖氧化酶传感器特性及应用

将酶膜紧贴于溶氧电极<sup>[7]</sup>,取不同浓度的葡萄糖溶液,以 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液为底液,用动力学法测量不同浓度时的电位值。结果表明,在  $3 \times 10^{-5}$ — $1.3 \times 10^{-3}$  mol/L 浓度范围电极有良好的线性响应,线性相关系数大于 0.999。测量血清中葡萄糖时其典型的校正曲线如图 3 所示。

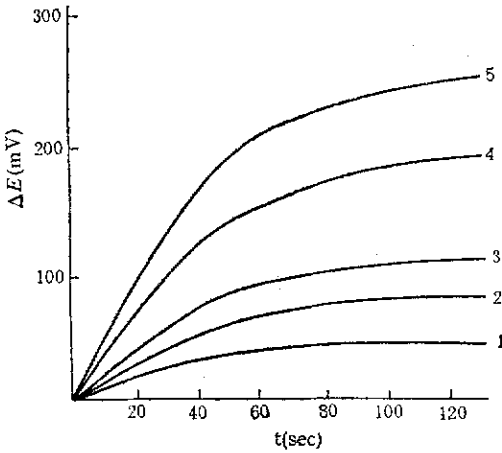


图 3 葡萄糖氧化酶电极的响应曲线

Fig.3 Response of glucose by glucose oxidase electrode

Glucose(mg/dl); 1. 50, 2. 80, 3. 100, 4. 150, 5. 200

对5.33mg/dl 和 10.00mg/dl 的葡萄糖标准溶液反复测定10次, 其测得结果的相对标准偏差分别为0.97%和0.41%, 重现性较好。将 10.00mg/dl 的葡萄糖标准溶液以 1ml/min 速度通过测量池, 1min 后换通缓冲溶液清洗电极至空白电位, 再通过葡萄糖标准溶液, 如此反复, 结果表明通过1000ml 葡萄糖标准溶液, 葡萄糖溶液的测得值与起始值误差小于10%, 酶膜工作状态良好。酶膜在 4℃ 保存 2 个月, 其活力为初始值的 95%, 说明用 PVA-

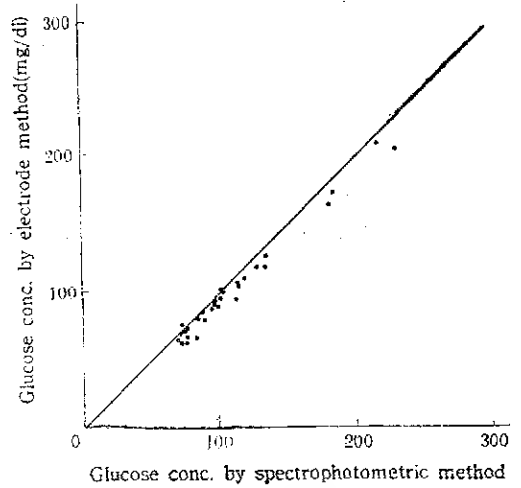


图 4 电极法和分光光度法测定血清中葡萄糖的相关性

Fig.4 Correlation between the immobilized glucose oxidase electrode method and the conventional spectrophotometric method using the free enzyme for determination of D-glucose.

SbQ-GA 为载体固定葡萄糖氧化酶, 制备葡萄糖电极, 有实用价值。

按前述方法<sup>[7]</sup>, 用该法制得的葡萄糖酶膜与葡萄糖传感器, 测定了血清中葡萄糖量, 其结果与葡萄糖氧化酶分光光度法测得的比较示于图 4。二者有良好的相关关系。

### 参 考 文 献

- [1] Manecke, G. and Vogt, H. G.: *Biochimie*, 62:603, 1980.
- [2] Jancsik, V, et al.: *J. Molecular Catalysis*, 14(3):297, 1982.
- [3] Imai, K. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 25:613, 1983.
- [4] Imai, K. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 28: 1721, 1986.
- [5] Ichimura, K. et al.: *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, 22:2817, 1984.
- [6] 松本邦男等: 高分子论文集, 41:221, 1984.
- [7] 张国雄等: 分析化学, 15:1038, 1987.
- [8] 袁中一等: 生物工程学报, 5:165, 1989.

## Preparation of PVA-Glucose Oxidase Film as An Element of Glucose Sensor

Zhang Guoxiong Dai Yuqin Zhu Tianmin\* Yuan Zhongyi\*

(Shanghai Institute of Metallurgy, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai)

(Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai)\*

A new photocrosslinkable polymer PVA-SbQ-GA was prepared for immobilization of glucose oxidase through entrapment and covalent bonding. Optimized the content of SbQ and glutaraldehyde in polymer, and time of irradiation, the glucose oxidase film was obtained with activity recovery of 40%. The properties of the enzyme film were investigated. The enzyme film was combined with O<sub>2</sub> electrode to form a glucose sensor. The glucose sensor responded linearly to D-glucose between  $3 \times 10^{-5}$  and  $1.3 \times 10^{-3}$  mol/L with  $r = 0.9999$ . The glucose sensor was applied to determine glucose content in serum, and the correlation between glucose sensor method and the conventional spectrophotometric method using the free enzyme was satisfactory.

### Key words

PVA-SbQ-GA; glucose oxidase film; glucose sensor