

过氧化氢酶固定化方法的改进

周祖新

提 要 报道通过更换烷基化试剂,即用三乙基氧膦四氯化硼代替硫酸二甲酯,使固定化过氧化氢酶膜的性能有了很大的改善.

关键词 过氧化氢酶;酶固定化;生物传感器

中图分类号 O657.15

H_2O_2 由于有较强的氧化性、漂白和消毒能力,且还原产物简单、无毒,不造成环境污染,因此常用于轻纺、食品和化工等领域. 目前测定 H_2O_2 一般用容量法和比色法^[1],选择性较差,花费时间长. 用电化学传感器是测定 H_2O_2 较理想的方法^[2~4],它的关键是酶膜的制备,笔者用尼龙网作载体,对过氧化氢酶的固定化方法和酶膜的性能进行了研究.

1 实 验

1.1 材料和试剂

过氧化氢酶(自制^[5]),50目尼龙网(上海金属筛网厂),1-氯-2,3-环氧丙烷,三氟化硼(干乙醚液),二氯代甲烷,二氧六环,己二胺,磷酸二氢钾,磷酸氢二钾,赖氨酸,甘氨酸,无水甲醇(提纯),无水乙醇,戊二醛,硫酸二甲酯,氯化钠和去离子水(试剂均为分析纯).

1.2 仪器

752型分光光度计(上海第三分析仪器厂),数字式酸度计(上海光明电珠厂),超级恒温槽(上海县实验仪器厂),磁力搅拌器(江苏电分析仪器厂),LM-1型测氧仪和氧电极(上海冶金所).

1.3 实验方法

1.3.1 用硫酸二甲酯作烷基化试剂(以下称方法1)

室温下将尼龙网浸在0.5mol/L的HCl中活化30min,取出后用蒸馏水冲至中性,放在硫酸二甲酯中,盖好容器,在100℃时反应16min,快速冷却到0℃,终止反应. 取出尼龙网,在无水甲醇中清洗2~3次,晾干,再在40℃时,与0.5mol/L的赖氨酸反应2.5h,然后用

收稿日期:1998-03-18

作者周祖新,男,讲师,上海化工高等专科学校,上海,200234

0.5mol/L NaCl 溶液洗去在尼龙网上残留的赖氨酸,将此尼龙网与5%(wt/vol)的戊二醛反应15min,用无水乙醇清洗数次,抽干,在4℃下,将尼龙网与0.5mg/mL的过氧化氢酶固定化3h,取出后放在0.2mol/L的甘氨酸中搅拌1h,取出即成固定化了的过氧化氢酶的酶膜.最后分别用0.2mol/L NaCl和0.1mol/L磷酸氢钾缓冲液(pH7.0)清洗.在4℃下保存于0.1mol/L的磷酸氢钾缓冲液(pH7.0)中,用分光光度法测定酶膜的酶活性^[6].

1.3.2 用三乙基氧脲四氟化硼为烷基化试剂(以下称方法2)

(1) 三乙基氧脲四氟化硼络盐的制备

在50℃时,500mL 10%的1-氯-2,3-环氧丙烷干乙醚液慢慢滴加到200mL 5%三氟化硼干乙醚液中,同时搅拌,回流1h,在常温下再搅拌3h,这时生成三乙基氧脲四氟化硼沉淀,用干乙醚液洗涤沉淀3次,每次用量30mL,然后按10%把沉淀溶入二氯代甲烷中.

(2) 酶在尼龙网上的固定化

将用HCl处理过的尼龙网(同方法1)浸放在新鲜合成的10%的三乙基氧脲四氟化硼二氯化甲烷溶液中,7min取出膜片,依次在二氯代甲烷,二氧六环内各清洗2min,随即在室温下与10%的已二胺甲醇溶液反应3h,膜片用蒸馏水清洗3h,吸干,用甲醇清洗约10min,再与2.5%的戊二醛反应15min,用无水乙醇清洗数次,抽干,在4℃下,将该尼龙网与0.25mg/mL的过氧化氢酶固定化反应3h,以下操作同方法1.

2 结果与讨论

2.1 活性比较

用方法1制成的酶膜活性为35.6u/cm²,用方法2制成的酶膜活性为80u/cm²,后者是前者的两倍多.硫酸二甲酯有毒性,并且活化需要在100℃下进行,而合成的三乙基氧脲四氟化硼没有毒性,常温下即可把尼龙网烷基化.

2.2 烷基化时间比较

用硫酸二甲酯作烷基化试剂,在100℃下,固定化16min时能获得最高酶活性的酶膜,如再延长时间,尼龙网将会软化,无法形成良好的酶膜;用三乙基氧脲四氟化硼作烷基化试剂,7min时表面开始糊化,这时活性很高,如再延长时间,尼龙网会发生形变,无法形成良好的膜.可见,后者的烷基化时间短(图1).

2.3 最适酶用量

酶的价格昂贵,因此希望提高固定化效率使酶用量尽可能少而酶膜活力尽可能高,经对工艺不断探索,得出了酶用量与酶膜活力的关系(图2).由图可见,用三乙基氧脲四氟化硼作烷基化试剂能减少酶用量而活性较高.

2.4 酶膜的稳定性

酶膜一般会渐渐降低其活性,笔者曾分别将两种方法制成的酶膜在4℃时保存于pH7.0的磷酸盐缓冲液中,90天后,用方法1制成的酶膜活性降低了20%,而用方法2制成的酶膜在8个月,活性没有明显下降,寿命远远大于前者.

2.5 电极的性能

分别用以上两种酶膜与测氧仪装配成过氧化氢酶电极,用方法1制成的电极线性范围

为 $10^{-3} \sim 10^{-2} \text{ mol/L}$, 检测下限为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 范围小, 响应时间 25min, 而用方法 2 制成的电极线性范围为 $5.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 响应时间 5min 左右, 检测下限为 $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 上限为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ (图 3、图 4)。

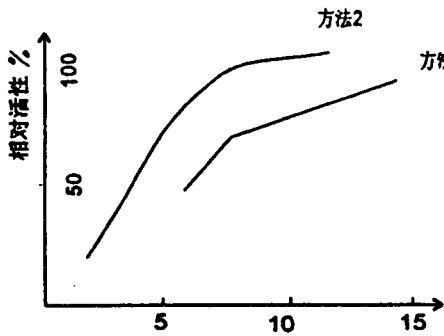


图 1 烷基化时间选择

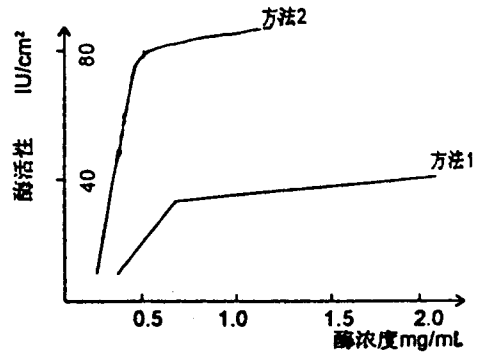


图 2 酶的合适用量选择

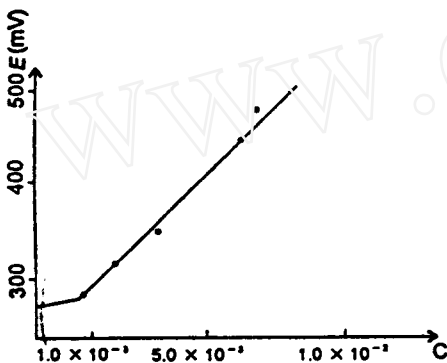


图 3 CTS 电极标准工作曲线(方法 1)

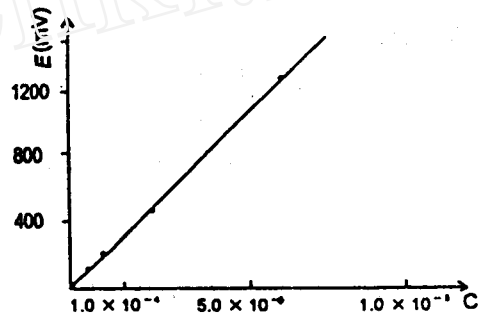
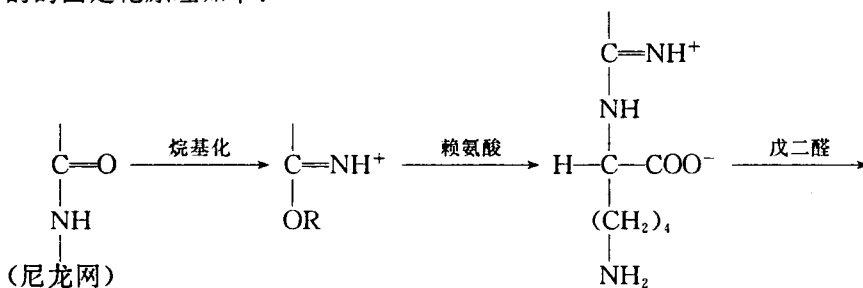
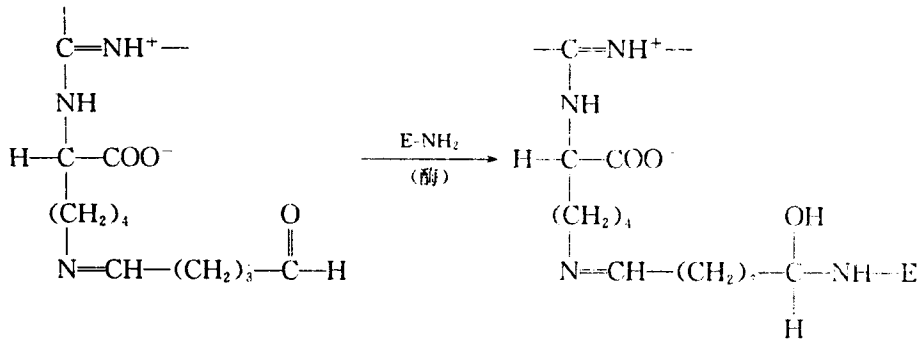


图 4 CTS 电极标准工作曲线(方法 2)

2.6 讨论

酶的固定化原理如下:





用硫酸二甲酯作烷基化试剂,接上去的是甲基,长度较短,空间体积小,与赖氨酸或其它基团碰撞几率小,接上去的比较少,最后导致单位面积上固定化酶的数量少,而用三乙基氨脲四氯化硼作烷基化试剂,接上去的是乙基,比甲基长,与其它欲连接的基团接触容易,相当于“空间”试剂,接上其它基团的比例大,最后使单位面积上固定化酶的数量大为增加,酶膜性能良好。

参 考 文 献

- 1 李俊义等. 分析化学(第2版). 北京:高等教育出版社,1987,328~329
- 2 Alzawa M, et al. A Specific Bio-electrochemical Sensor for Hydrogen Peroxide. *Anal Chim Acta*, 1974, 69:421
- 3 Cicuca A, et al. Enzyme Electrode Sensor for Hydrogen Peroxide. *Anal Lett*, 1965, 18(B3):299
- 4 Masicini M, et al. A Liver Tissue-Based Electrochemical Sensor for Hydrogen Peroxide.
- 5 陆中庆,季中煜. 从牛肝中提取乳酸脱氢酶. *生物化学杂志*,1989,1:30
- 6 Gailbault G G. *Handbook of Enzyme Method of Analysis*. New York: Pergamon Press, 1976, 68

The Improvement of Immobilization for Catalase

Zhou Zuxing

(Shanghai Institute of Chemical Technology)

Abstract A new method by using triethylxonium fluoborate instead of dimethyl sulfate as silylating reagent for nylon-based membrane to immobilize catalase was reported, by which the characters of immobilized enzyme membrane was greatly improved.

Key words catalase; immobilization of enzyme; biosensors