

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 27/327

C12Q 1/26

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01128285.1

[43]公开日 2002年5月1日

[11]公开号 CN 1346983A

[22]申请日 2001.10.12 [21]申请号 01128285.1

[71]申请人 中国科学院长春应用化学研究所  
地址 130022 吉林省长春市人民大街159号

[72]发明人 陈旭 董绍俊

[74]专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司  
代理人 曹桂珍

权利要求书1页 说明书4页 附图页数0页

[54]发明名称 氧化钛溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法

[57]摘要

本发明属于氧化钛溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法。本发明的目的是提供一种氧化钛溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的新方法,即将异丙氧基钛水解制得的氧化钛溶胶与含酶的聚乙烯醇接枝4-乙烯基吡啶水溶液混合,混匀后直接滴涂于电极表面,4℃下放置24-48小时,得到含酶的均匀胶膜且牢固粘附于电极表面,这样制备出的生物传感器响应快,灵敏度高,使用寿命长。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

## 权 利 要 求 书

---

1. 一种氧化钛溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法, 其特征在于将 20—40 $\mu\text{l}$  异丙氧基钛溶于 10—15 $\mu\text{l}$  异丙醇中, 加入 7—14 $\mu\text{l}$  0.1mol L<sup>-1</sup> 盐酸和 240—480 $\mu\text{l}$  水溶液, 混匀, 超声振荡 1 小时后, 得溶胶 A; 另取接枝度为 12.5%的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 8—10%的水溶液, 再将 1—3 毫克的葡萄糖氧化酶、多酚氧化酶、辣根过氧化物酶中的一种, 加入 100 $\mu\text{l}$  上述水溶液中, 混匀, 得溶液 B; 然后将溶胶 A 与溶液 B 按 1:1—2.5 的比例混匀, 用微量注射器移取 5—10 $\mu\text{l}$  该混合液滴涂到基底电极表面, 4 $^{\circ}\text{C}$  下放置 24—48 小时, 即制得所需的生物传感器。

2. 如权利要求 1 所述的氧化钛溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法, 其特征在于取接枝度为 12.5%的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 8—10%的水溶液, 再将葡萄糖氧化酶加入上述水溶液中, 混匀, 得溶液 B。

3. 如权利要求 1 所述的氧化钛溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法, 其特征在于取接枝度为 12.5%的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 8—10%的水溶液, 再将多酚氧化酶加入上述水溶液中, 混匀, 得溶液 B。

4. 如权利要求 1 所述的氧化钛溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法, 其特征在于取接枝度为 12.5%的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 8—10%的水溶液, 再将辣根过氧化物酶加入上述水溶液中, 混匀, 得溶液 B。

# 说明书

---

## 氧化钛溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法

技术领域:本发明属于氧化钛溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法。

背景技术:溶胶-凝胶包埋法是近年发展起来的一种有效的固定化酶方法,利用这项技术可在低温下对烷氧化物水解、浓缩能形成网络状的膜,具有生物相容性,非常适合于生物分子的固定,且制得的含酶胶膜具有物理刚性,化学惰性和可忽略的溶胀性等优点。目前已报道的溶胶-凝胶膜固定酶的生物传感器主要集中在硅烷体系,此外邓家祺等人报到了用三氧化二铝溶胶-凝胶膜固定酶,但上述两种固定酶的膜都是不导电的。为了加快酶分子与电极间的电子转移, Glezer and Lev 在 J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 2533-2534 中发表了一种以五氧化二钒胶体包埋葡萄糖氧化酶制备生物传感器的方法,由于四价钒离子有很好的电子导电性,导致该膜具有半导体的性质,适用于活性蛋白质的支持材料,据报道用此法制得的生物传感器在 4°C 贮存时在 10 天内活性没有降低。

发明内容:本发明的目的是提供一种氧化钛溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的新方法,即将异丙氧基钛水解制得的二氧化钛溶胶与含酶的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶水溶液混合,混匀后直接滴涂于电极表面,4°C 下放置 24—48 小时,得到含酶的均匀胶膜且牢固地粘附于电极表面,这样制备出的生物传感器灵敏度高,响应快,使用寿命

可维持在一个月以上，适合于检测各种酶底物。

本发明将 20—40 $\mu\text{l}$  异丙氧基钛溶于 10—15 $\mu\text{l}$  的异丙醇中，加入 7—14 $\mu\text{l}$  0.1mol L<sup>-1</sup> 盐酸和 240—480 $\mu\text{l}$  水溶液，混匀，超声振荡 1 小时后，得溶胶 A；另将接枝度为 12.5% 聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 8—10% (w/v) 的水溶液，再将 1—3 毫克的酶，即葡萄糖氧化酶、辣根过氧化物酶、多酚氧化酶中的一种，加入 100 $\mu\text{l}$  上述水溶液中，混匀，得溶液 B；然后将溶胶 A 与溶液 B 按 1:1-2.5 的比例混匀，用微量注射器移取该混合液 5—10 $\mu\text{l}$  滴涂到基底电极表面，4 $^{\circ}\text{C}$  下放置 24—48 小时，即制得所需的生物传感器。

与传统的溶胶-凝胶包埋酶制备生物传感器的方法相比，本发明提出的制备生物传感器的方法具有许多优点。一方面二氧化钛是一种半导体材料，有利于促进酶分子与电极之间的电子转移；同时二氧化钛粒子具有良好的生物相容性，有利于最大程度保持生物分子活性；此外钛与酶分子表面的氨基、羧基及羟基具有配位作用，有利于酶分子的固定；另一方面聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶可以通过氢键等相互作用稳定酶，同时 4-乙烯基吡啶支链在多种电极表面均有较强的吸附作用，能增强含酶胶膜在电极表面的粘附力。当把氧化钛胶体和聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶相混合时，可形成互穿网络，使酶分子牢固的固定在复合膜中。该复合膜的性质优于单独使用每一种物质的性质。

具体实施方式如下：

实施例 1：

葡萄糖氧化酶传感器。将 30 $\mu\text{l}$  异丙氧基钛溶于 13 $\mu\text{l}$  的异丙醇中，加入 360 $\mu\text{l}$  水和 10 $\mu\text{l}$  0.1mol L<sup>-1</sup> 盐酸混合溶液，混匀，超声振荡

1 小时后, 得溶胶 A; 另将接枝度为 12.5 %聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 8%的水溶液, 向 70 $\mu$ l 此溶液中加入 2 毫克的葡萄糖氧化酶, 混匀, 得溶液 B; 然后将溶胶 A 与溶液 B 按 1:2.5 的比例混匀, 用微量注射器移取 8 $\mu$ l 该混合液滴涂到玻碳电极表面, 4 $^{\circ}$ C 下放置 24 小时, 即制得葡萄糖生物传感器, 可用于水相中检测葡萄糖。该生物传感器平衡时间在 6 分钟以内; 响应时间为 15 秒; 线性范围为  $5 \times 10^{-6}$ — $9 \times 10^{-3}$  mol L $^{-1}$ ; 稳定性保持 1 个月以上。

#### 实施例 2:

多酚氧化酶生物传感器。将 20 $\mu$ l 异丙氧基钛溶于 10 $\mu$ l 异丙醇中, 加入 7 $\mu$ l 0.1 mol L $^{-1}$  盐酸和 240 $\mu$ l 水溶液, 混匀, 超声振荡 1 小时后, 得溶胶 A; 另将接枝度为 12.5%聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 10%的水溶液, 向 100 $\mu$ l 此溶液中加入 1.5 毫克的多酚氧化酶混匀, 得溶液 B; 然后将溶胶 A 与溶液 B 按 1:1 的比例混匀, 用微量注射器移取 10 $\mu$ l 该混合液滴涂到玻碳电极表面, 4 $^{\circ}$ C 下放置 30 小时, 即制得多酚氧化酶生物传感器, 可用于水相中测定苯酚, 儿茶酚等物质。该生物传感器平衡时间在 5 分钟以内; 响应时间为 15 秒; 稳定性保持 2 个月以上。

#### 实施例 3:

辣根过氧化物酶传感器。将 40 $\mu$ l 异丙氧基钛溶于 15 $\mu$ l 异丙醇中, 加入 14 $\mu$ l 0.1 mol L $^{-1}$  盐酸和 480 $\mu$ l 水溶液, 混匀, 超声振荡 1 小时后, 得溶胶 A; 另将接枝度为 12.5%聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 9%的水溶液, 向 100  $\mu$ l 此溶液中加入 1 毫克的辣根过氧化物酶, 混匀, 得溶液 B; 然后将溶胶 A 与溶液 B 按 1:2 的比例混匀, 用微量注射器移取 5 $\mu$ l 该混合液滴涂于石墨电极表面, 4 $^{\circ}$ C 下放置 48 小时, 即制得辣根过氧

化物酶传感器, 可用于水相中检测过氧化氢, 酚, 胺等物质。该生物传感器平衡时间在 5 分钟以内; 响应时间为 15 秒; 稳定性保持 2 个月以上。