

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/28

C12Q 1/26



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410011340.0

[43] 公开日 2005 年 8 月 31 日

[11] 公开号 CN 1661043A

[22] 申请日 2004. 12. 10

[21] 申请号 200410011340.0

[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 5625 号

[72] 发明人 刘 洋 王美佳 李 迪 李景虹

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 离子液体溶胶 - 凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器

[57] 摘要

一种离子液体溶胶 - 凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法, 其主要步骤为: 将 1 - 2 毫升 1 - 丁基, 3 - 甲基咪唑四氟化硼, 2 - 4 毫升四乙氧基硅, 1 - 2 毫升水和 0.05 - 0.1 毫升 0.1 mol L⁻¹ 的盐酸在室温下混合, 磁力搅拌 3 小时, 室温下放置 1 - 2 小时, 得到溶胶 A; 将 1 - 3 毫克的酶, 加入 50 微升 0.05 mol L⁻¹ 的 pH = 6 - 7 的磷酸缓冲溶液中混合均匀得溶液 B; 将溶胶 A 和溶液 B 按照体积比 1 : 1 - 2.5 混合均匀, 涂覆到电极表面, 于 0 - 4°C 下放置 24 - 48 小时, 得生物传感器。本发明的制备方法简单, 制备的生物传感器响应快, 使用寿命长。

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

1. 一种离子液体溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法，其主要步骤为：

a)将 1-2 毫升 1-丁基,3-甲基咪唑四氟化硼，2-4 毫升四乙氧基硅，1-2 毫升水和 0.05-0.1 毫升 0.1mol L^{-1} 的盐酸在室温下混合，磁力搅拌 3 小时，室温下放置 1-2 小时，得到溶胶 A；

b)将 1-3 毫克的酶，加入 50 微升 0.05 mol L^{-1} 的 pH=6-7 的磷酸缓冲溶液中混合均匀得溶液 B；

c)将溶胶 A 和溶液 B 按照体积比 1:1-2.5 混合均匀，涂覆到电极表面，于 $0-4^{\circ}\text{C}$ 下放置 24-48 小时，得生物传感器。

2. 如权利要求 1 所述的离子液体溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法，其特征在于，步骤 c 中涂覆电极之前先在电极表面涂覆 10 微升二茂铁乙醇溶液，放置至干后再滴涂混合液。

3. 如权利要求 1 所述的离子液体溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法，其特征在于，所述二茂铁乙醇溶液浓度为 7.5-15 毫克/毫升。

4. 如权利要求 1 所述的离子液体溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法，其特征在于，所述酶是辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶或多酚氧化酶。

离子液体溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器

技术领域

本发明属于离子液体溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法。

技术背景

溶胶-凝胶包埋法是迄今应用最普遍的固定化酶的方法，利用这种方法可在低温下对有机硅烷化物水解、聚合形成网络状的膜，制得的含酶凝胶膜具有物理刚性，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凝胶/聚合物的体系。B.A.Gregg, A. Heller, 在 J.Phys.Chem., 1991, 95,5976 中公开了一种电极表面用长链双环交联聚 4-乙烯基吡啶并同时固定化酶的方法，所得酶凝胶能牢固固定于电极表面并有较快的响应，但是在聚合物的交联过程中会造成酶的失活。在 Analysis 1992, 20, 543 中, Lev 公开了一种以表面活性剂掺杂到溶胶中制备了一种无开裂的溶胶-凝胶膜。但是表面活性剂会破坏膜中酶的活性进而影响生物传感器的性能。

发明内容

本发明的目的是提供一种离子液体溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的方法。

本发明选用了一种新型固定化酶载体-离子液体溶胶-凝胶。由于

1-丁基,3-甲基咪唑四氟化硼是一种粘稠的导电性离子液体,具有超分子结构,它成功的避免了传统溶胶-凝胶载体容易干裂、溶胀的缺点;同时由于离子液体良好的生物相容性及模板作用,固定化酶具有良好的生物活性而且使得其与被检测物的接触更容易。

本发明离子液体溶胶-凝胶复合膜包埋酶制备生物传感器的制备方法,其主要步骤为:

a)将 1-2 毫升 1-丁基,3-甲基咪唑四氟化硼, 2-4 毫升四乙氧基硅, 1-2 毫升水和 0.05-0.1 毫升 0.1mol L^{-1} 的盐酸在室温下混合, 磁力搅拌 3 小时, 室温下放置 1-2 小时, 得到溶胶 A;

b)将 1-3 毫克的酶, 加入 50 微升 0.05 mol L^{-1} 的 pH=6-7 的磷酸缓冲溶液中混合均匀得溶液 B;

c)将溶胶 A 和溶液 B 按照体积比 1:1-2.5 混合均匀, 涂覆到电极表面, 于 $0-4^{\circ}\text{C}$ 下放置 24-48 小时, 得生物传感器。

上述步骤 c 中涂覆电极之前也可以先在电极表面滴涂 10 微升浓度为 7.5-15 毫克/毫升的二茂铁乙醇溶液, 放置至干后再滴涂混合液。

所述酶是辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶和/或多酚氧化酶。

本发明采用的电极为本领域公知的基底电极。

本发明制备的生物传感器响应快, 使用寿命长, 适合于检测各种酶底物。

具体实施方式

实施例 1 制备辣根过氧化物酶传感器:

先在基底电极表面先滴加 10 微升 7.5 毫克/毫升的二茂铁的乙醇

溶液，放置 10 分钟；再将 1 毫升 1-丁基,3-甲基咪唑四氟化硼，2 毫升四乙氧基硅，1 毫升水和 0.05 毫升 0.1mol L^{-1} 的盐酸于室温下混合，磁力搅拌 3 小时，即得到均相溶胶 A，然后室温下放置 1 小时；另将 1 毫克的辣根过氧化物酶加入 50 微升 0.05mol L^{-1} 的 pH6.86 的磷酸缓冲溶液中混合均匀得溶液 B；然后将溶胶 A 和溶液 B 按照 1:1 的比例混合均匀，用微量注射器移取该混合液 10 微升滴涂到上述基底电极表面，然后再在 4°C 下放置 24 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。该生物传感器平衡时间在 5 分钟以内；相应时间为 15 秒；线形范围为 2×10^{-5} - $2\times 10^{-4}\text{mol L}^{-1}$ ；检测限为 $1\times 10^{-6}\text{mol L}^{-1}$ ；稳定性，2 个月以上。

实施例 2 制备葡萄糖氧化酶传感器：

2 毫升 1-丁基,3-甲基咪唑四氟化硼，4 毫升四乙氧基硅，2 毫升水和 0.1 毫升 0.1mol L^{-1} 的盐酸于室温下混合，磁力搅拌 3 小时，即得到均相溶胶 A，然后室温下放置 2 小时；另将 3 毫克的葡萄糖氧化酶，加入 50 微升 0.05mol L^{-1} 的 pH6 的磷酸缓冲溶液中混合均匀得溶液 B；然后将溶胶 A 和溶液 B 按照 1:2.5 的比例混合均匀，用微量注射器移取该混合液 5 微升滴涂到基底电极表面，然后再在 0°C 下放置 36 小时，即制得葡萄糖氧化酶传感器，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；稳定性，2 个月以上。

实施例 3 制备多酚氧化酶传感器：

将 1.5 毫升 1-丁基,3-甲基咪唑四氟化硼，3 毫升四乙氧基硅，1.5

毫升水和 0.075 毫升 0.1molL^{-1} 的盐酸于室温下混合,磁力搅拌 3 小时,即得到均相溶胶 A,然后室温下放置 1.5 小时;另将 1 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 50 微升 0.05mol L^{-1} 的 pH7 的磷酸缓冲溶液中混合均匀得溶液 B;然后将溶胶 A 和溶液 B 按照 1:2 的比例混合均匀,用微量注射器移取该混合液 10 微升滴涂到基底电极表面,然后再在 4°C 下放置 24 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 6 分钟以内;响应时间为 15 秒;稳定性,1 个月以上。

实施例 4 制备葡萄糖氧化酶传感器:

先在基底电极表面先滴涂 15 微升 15 毫克/毫升的二茂铁的乙醇溶液,放置 10 分钟;再将 2 毫升 1-丁基,3-甲基咪唑四氟化硼,4 毫升四乙氧基硅,2 毫升水和 0.1 毫升 0.1mol L^{-1} 的盐酸于室温下混合,磁力搅拌 3 小时,即得到均相溶胶 A,然后室温下放置 1 小时;另将 2 毫克的葡萄糖氧化酶,加入 50 微升 0.05mol L^{-1} 的 pH6 的磷酸缓冲溶液中混合均匀得溶液 B;然后将溶胶 A 和溶液 B 按照 1:2.5 的比例混合均匀,用微量注射器移取溶胶 A 和溶液 B 的混合液 5 微升滴涂到基底电极表面,然后于 4°C 下放置 48 小时,即制得葡萄糖氧化酶传感器,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 14 秒;稳定性,1 个月以上。

实施例 5 制备辣根过氧化物酶传感器:

先在基底电极表面先滴涂 15 微升 10 毫克/毫升的二茂铁的乙醇

溶液，放置至干燥；再将 1.5 毫升 1-丁基,3-甲基咪唑四氟化硼，2 毫升四乙氧基硅，1 毫升水和 0.05 毫升 0.1mol L^{-1} 的盐酸于室温下混合，磁力搅拌 3 小时，即得到均相溶胶 A，然后室温下放置 1 小时；另将 1.2 毫克的辣根过氧化物酶加入 50 微升 0.05mol L^{-1} 的 pH6.86 的磷酸缓冲溶液中混合均匀得溶液 B；然后将溶胶 A 和溶液 B 按照 1:1.5 的比例混合均匀，用微量注射器移取该混合液 10 微升滴涂到上述基底电极表面，然后再在 4°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。该生物传感器平衡时间在 6 分钟以内；相应时间为 15 秒；稳定性，2 个月以上。

实施例 6 制备多酚氧化酶传感器：

先在基底电极表面先滴涂 7.5 微升 12 毫克/毫升的二茂铁的乙醇溶液，放置至干燥；将 1.5 毫升 1-丁基,3-甲基咪唑四氟化硼，3 毫升四乙氧基硅，1.5 毫升水和 0.075 毫升 0.1mol L^{-1} 的盐酸于室温下混合，磁力搅拌 3 小时，即得到均相溶胶 A，然后室温下放置 1.5 小时；另将 1 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 50 微升 0.05mol L^{-1} 的 pH6.86 的磷酸缓冲溶液中混合均匀得溶液 B；然后将溶胶 A 和溶液 B 按照 1:1.5 的比例混合均匀，用微量注射器移取该混合液 10 微升滴涂到基底电极表面，然后再在 4°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 6 分钟以内；响应时间为 16 秒；稳定性，1 个月以上。