

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C12M 1/40

C12N 11/08



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96123528.4

[43]公开日 1998年7月1日

[11] 公开号 CN 1186115A

[22]申请日 96.12.25

[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 董绍俊 程广金 李彬

寇文朋 张敬忠

权利要求书 1 页 说明书 3.0 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 凝胶包埋酶制备生物传感器的方法

[57]摘要

本发明属于凝胶包埋酶制备生物传感器的方法。

本发明的目的是提供一种凝胶包埋酶制备生物传感器的方法，即将酶溶于聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶的水溶液或二甲基亚砜/水混合液后，将所得混和液直接滴涂于电极表面，低温放置一段时间，得到酶膜牢固粘附于电极表面的生物传感器，这样制备出的生物传感器平衡时间短，响应快，重现性好，使用寿命长。

(BJ)第 1456 号

权利要求书

1 一种凝胶包埋制备生物传感器的方法,其特征在于将聚乙烯醇的4-乙烯基吡啶接枝物配成浓度为2~5%的水溶液或二甲基亚砜/水混合液,再将0.5~3.0毫克的酶,包括葡萄糖氧化酶,辣根过氧化物酶,多酚氧化酶等加入150~300微升该溶液中,也可以将 $1 \times 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的媒介体,如铁氰化钾等同时加入其中,混合均匀后,将5~15微升该混合液滴涂到基底电极表面,-20℃~+4℃自然放置16~24小时,即得所需的生物传感器。

说明书

凝胶包埋酶制备生物传感器的方法

本发明属于凝胶包埋酶制备生物传感器的方法。

固定化酶是制备生物传感器的关键步骤。迄今为止，应用最普遍的固定化技术是采用凝胶/聚合物包埋。它能将酶分子或细胞包埋并固定在高分子聚合物三维空间网络结构中。B. A. Gregg, A. Heller, J. Phys. Chem., 1991, 95, 5976 公开了一种在电极表面用长链双环氧交联聚 4-乙炔基吡啶并同时固定化酶的方法，所得的含酶水凝胶能牢固粘附于电极表面并有较快的响应，但纯疏水的 4-乙炔基吡啶载体骨架不利于酶的生物相容性和生物稳定性，且双环氧化学交联过程会造成少量酶失活。Tongyin Yu, Haiying Liu, Jiaqi Deng and Yongcheng Liu, 在 J. of Appl. Polym. Sci., 1995, 58, 973 中报道了一种用再生蚕丝包埋酶来制备生物传感器的方法，其最大的优点是固定化酶过程中避免了化学交联或自由基聚合等容易导致酶失活的操作，但由蚕丝本身的性质所决定，此法制得的胶膜在干燥或长时间暴露于空气中时会变脆，进而影响生物传感器的性能。

本发明的目的是提供一种凝胶包埋酶制备生物传感器的方法，即将酶溶于聚乙烯醇接枝 4-乙炔基吡啶的水溶液或二甲基亚砜/水混合液后，将所得混和液直接滴涂于电极表面，低温放置一段时间，使聚乙烯醇接枝 4-乙炔基吡啶自身物理交联成胶并同时包埋酶，得到酶膜牢固粘附于电极表面的生物传感器，这样制备出的生物传感器平衡时间短，响应快，重现性好，使用寿命长。

聚乙烯醇是一种人工合成的多羟基聚合物，具有良好的生物相容性和生物稳定性，能在水或二甲基亚砜/水混合液中通过自身物理交联成胶并同时包埋酶，且所得含酶胶膜稳定性和耐用性较好，因而被广泛地用作生物传感器和生物反应器中的固定化酶载体。本发明选用聚乙烯醇的 4-乙炔基吡啶接枝物作为固定化酶载体，在保留了聚乙烯醇所有优点的同时，极大地增加了酶膜在电极表面的粘附力，同时，固定化酶的效果也更好。

本发明将聚乙烯醇的 4-乙炔基吡啶接枝物配成浓度为 2 ~ 5% 的水溶

液或二甲基亚砜/水混合液，再将 0.5 ~ 3.0 毫克的酶，包括葡萄糖氧化酶，辣根过氧化物酶，多酚氧化酶等加入 150 ~ 300 微升该溶液中，也可以将 $1 \times 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的媒介体，如铁氰化钾等同时加入其中，混合均匀后，将 5 ~ 15 微升该混合液滴涂到基底电极表面， $-20 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim +4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 自然放置 16 ~ 24 小时，即得所需的生物传感器。该方法也可用于醇氧化酶，胆固醇氧化酶，醇脱氢酶，漆酶，胆碱脂酶，胆碱氧化酶，胆红素氧化酶，脂肪酶等酶的固定。

本发明所述生物传感器的制备方法选用了一种新型固定化酶载体——聚乙烯醇的 4-乙烯基吡啶接枝物，它具有良好的生物相容性和生物稳定性，并能与电极表面牢固结合；通过载体自身物理交联成胶并同时包埋酶，可避免化学交联剂或自由基等造成的酶活损失；可根据检测体系的需要制成水凝胶或二甲基亚砜/水混合液有机凝胶，分别用于水相和有机相中的检测；制备方法简单易行，重现性好；制得的生物传感器适用范围广，平衡时间短，响应快，稳定性好，使用寿命长。

本发明提供的实施例如下：

实施例 1：葡萄糖氧化酶电极。将 3 毫克葡萄糖氧化酶溶解在 150 微升 2 % 的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶水溶液中，搅拌均匀后，用微量注射器移取 6 微升此溶液滴涂于铂电极表面， $+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 24 小时，即制得葡萄糖氧化酶电极。该电极可用于水相中检测葡萄糖，电极平衡时间 1 ~ 2 分钟；响应时间 5 ~ 8 秒；线性范围 $5 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ；检测限 $2 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ；稳定性，2 个月后响应值为初始值的 85 % 左右。

实施例 2：辣根过氧化物酶电极。将 0.6 毫克辣根过氧化物酶溶解在 200 微升 5 % 的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶水溶液中，搅拌均匀后，用微量注射器移取 10 微升此溶液滴涂于石墨电极表面， $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 20 小时，即制得辣根过氧化物酶电极。该电极可用于水相中过氧化氢、酚、胺等物质的检测，电极平衡时间 3 分钟以内；响应时间 10 ~ 15 秒；稳定性，2 个月以上。

实施例 3：多酚氧化酶电极。将 0.5 毫克多酚氧化酶溶解在 300 微升 5 % 的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶水溶液中，搅拌均匀后，用微量注射器移

取 8 微升此溶液滴涂于玻碳电极表面，-10 ℃冰箱放置 18 小时，即制得多酚氧化酶电极。该电极可在水相中测定苯酚、儿茶酚等物质。电极平衡时间 3 分钟以内；响应时间 20 ~ 25 秒；稳定性，2 个月以上。

实施例 4：有机相辣根过氧化物酶电极。将 0.8 毫克辣根过氧化物酶溶解在 200 微升 4 % 的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶的二甲基亚砜/水混合液中，其中二甲基亚砜占总体积的 40 %，再加入亚铁氰化钾并使其最终浓度为 $1 \times 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，搅拌均匀后，用微量注射器移取 12 微升此溶液滴涂于玻碳电极表面，-20 ℃冰箱放置 16 小时，即制得有机相辣根过氧化物酶电极。该电极可用于氯仿等有机溶剂中测定过氧化氢、有机过氧化物及酚、胺等物质的检测，电极平衡时间 10 分钟以内；响应时间 60 ~ 90 秒；稳定性，2 个月以上。