

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C12N 11/04

G01N 27/30

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97117266.8

[43]公开日 1999年3月24日

[11]公开号 CN 1211620A

[22]申请日 97.9.15 [21]申请号 97117266.8

[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 李 彬 王炳全

[74]专利代理机构 中国科学院长春专利事务所

代理人 曹桂珍

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 溶胶-凝胶包埋酶制备生物传感器的方法

[57]摘要

本发明属于溶胶-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溶胶-凝胶包埋酶制备生物传感器的新方法,即将含酶的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶水溶液加入硅烷水解制得的溶胶中,混匀后直接滴涂于电极表面,室温放置一段时间,得到含酶胶膜不开裂且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响应快,重现性好,使用寿命长而所需的酶量少。

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

专利文献出版社出版

权 利 要 求 书

1. 一种溶胶-凝胶包埋酶制备生物传感器的方法,其特征在于将接枝度为 5—30% 的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 2—5% 的水溶液,再将 0.5—3.0 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 300 μl 上述水溶液中,混匀,得溶液 A;另取 110—330 μl 4-乙氧基硅烷,430—210 μl 水,即保证 4-乙氧基硅烷和水的总体积为 540 μl ,再加入 20 μl 0.1 mol L^{-1} 盐酸,60 μl 乙醇,混匀,超声振荡 1 小时后静置 3—5 小时,得溶胶 B;然后将溶液 A 与溶胶 B 按 3:1—1:3 的比例混匀,用微量注射器移取 5—10 μl 该混合液滴涂到基底电极表面,室温放置 24 小时,即制得所需的生物传感器.

说明书

溶胶-凝胶包埋酶制备生物传感器的方法

本发明属于溶胶-凝胶包埋酶制备生物传感器的方法。

溶胶-凝胶包埋法是一种最新发展起来的固定化酶方法，它能在室温下实现溶胶-凝胶转变并同时包埋酶，从而有效地防止了酶和抗体等生物大分子的热失活，且制得的含酶胶膜具有物理刚性，化学惰性和抗微生物污染等优点。Bakul C. Dave et al., Anal. chem. 1994, 66, 1120 公开了一种用溶胶-凝胶包埋酶制备生物传感器的方法，指出其主要优点是制备方法简单，酶活损失少且制得的含酶胶膜具有光透性，但此法制得的含酶胶膜很容易开裂，影响了生物传感器的重现性和稳定性。S. Sampath, O. Lev 在 Electroanalysis, 1996, 8, 1112 中将溶胶-凝胶固定化酶和碳糊电极的使用结合起来制备生物传感器，能够防止溶胶-凝胶的开裂，但此法所需的酶量很大，且每次使用前均需要重新抛光也不利于其实际应用。

本发明的目的是提供一种溶胶-凝胶包埋酶制备生物传感器的新方法，即将含酶的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶水溶液加入硅烷水解制得的溶胶中，混匀后直接滴涂于电极表面，室温放置一段时间，得到含酶胶膜不开裂且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响应快，重现性好，使用寿命长而所需的酶量少。

本发明将接枝度为 5—30% 的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 2—5% 的水溶液，再将 0.5—3.0 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 300 μl 上述水溶液中，混匀，得溶液 A；另取 110—330 μl 4-乙氧基硅烷，430—210 μl 水，即保证 4-乙氧基硅烷和水的总体积为 540 μl ，再加入 20 μl 0.1 mol/L 盐酸，60 μl 乙醇，混匀，超声振荡 1 小时后静置 3—5 小时，得溶胶 B；然后将溶液 A 与溶胶 B 按 3:1—1:3 的比例混匀，用微量注射器移取 5—10 μl 该混合液滴涂到基底电极表面，室温放置 24 小时，即制得所需的生物传感器。

本发明所述生物传感器的制备方法，在传统的溶胶-凝胶体系中加入了一种有机高分子—聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶，因而具有以下优点：

说 明 书

1. 聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶能自身物理交联成胶, 又能通过聚乙烯醇支链上的羟基与溶胶-凝胶网络中的硅共价连接, 从而防止了含酶胶膜的开裂, 保证了生物传感器的重现性和稳定性; 2. 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, 减少了酶在溶胶-凝胶过程中的活力损失, 有利于提高生物传感器的灵敏度; 3. 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; 4. 有机高分子的掺入改善了溶胶-凝胶膜的扩散性质, 有利于含酶胶膜对底物的快速响应; 5. 本方法制得的含酶胶膜仍保留了传统溶胶-凝胶体系所具有的物理刚性、化学惰性和抗微生物污染等优点。

本发明提供的实施例如下:

实施例 1. 葡萄糖氧化酶电极. 将接枝度为 17.5% 的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 2% 的水溶液(聚乙烯醇为 PVA-124, 分子量 84000), 向 300 μl 此溶液中加入 3 毫克葡萄糖氧化酶, 混匀, 得溶液 A; 另取 110 μl 4-乙氧基硅烷, 加入 20 μl 0.1 mol L^{-1} 盐酸, 60 μl 乙醇, 430 μl 水, 混匀, 超声振荡 1 小时后静置 3 小时, 得溶胶 B; 再将 100 μl 溶液 A 与 100 μl 溶胶 B 混匀, 用微量注射器移取 10 μl 该混合液滴涂到玻碳电极表面, 室温放置 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, 5 分钟以内; 响应时间, 10—12 秒; 线性范围, $5 \times 10^{-6} - 1.5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; 稳定性, 4 个月以上.

实施例 2: 辣根过氧化物酶电极. 将接枝度为 5% 的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 5% 的水溶液, 向 300 μl 此溶液中加入 0.5 毫克辣根过氧化物酶, 得溶液 A; 另取 220 μl 4-乙氧基硅烷, 加入 20 μl 0.1 mol L^{-1} 盐酸, 60 μl 乙醇, 320 μl 水, 混匀, 超声振荡 1 小时后静置 4 小时, 得溶胶 B; 再将 50 μl 溶液 A 与 150 μl 溶胶 B 混匀, 用微量注射器移取 5 μl 该混合液滴涂于石墨电极表面, 室温放置 24 小时, 即制得辣根过氧化物酶电极. 该电极可用于水相中检测过氧化氢, 酚, 胺等物质. 电极平衡时间, 5 分钟以内; 响应时间, 8—12 秒; 稳定性, 2 个月以上.

实施例 3: 多酚氧化酶电极. 将接枝度为 30% 的聚乙烯醇接枝 4-乙烯基吡啶配成浓度为 3% 的水溶液, 向 300 μl 此溶液中加入 1 毫克多酚氧化酶, 得溶液 A; 另取 330 μl 4-乙氧基硅烷, 加入 20 μl 0.1 mol L^{-1} 盐

说 明 书

酸, 60 μl 乙醇, 210 μl 水, 混匀, 超声振荡 1 小时后静置 5 小时, 得溶胶 B; 再将 300 μl 溶液 A 与 100 μl 溶胶 B 混匀, 用微量注射器移取 8 μl 该混合液滴涂于玻碳电极表面, 室温放置 24 小时, 即制得多酚氧化酶电极. 该电极可用于水相中测定苯酚, 儿茶酚等物质. 电极平衡时间, 5 分钟以内; 响应时间, 10 — 15 秒; 稳定性, 2 个月以上.