

烷基胺玻璃固定化葡萄糖氧化酶测定血糖

V. Kalia L. Goyal C. S. Pundir *

(Biochemistry Research Laboratory, Department of Bio-Sciences,
Maharshi Dayanand University, Rohtak-124001, Haryana, INDIA)

定量分析血糖在门诊和许多疾病如糖尿病, 甲状腺机能亢进, 粘液腺癌, 垂体机能减退, 肾上腺机能减退和妨碍葡萄糖吸收等疾病的诊断有重要意义。测定葡萄糖有很多方法, 采用葡萄糖氧化酶比色法, 由于操作简便, 专一性强, 灵敏度高, 因此比较适合用于常规测定^[1]。但是葡萄糖氧化酶的价格高。把酶固定在不溶于水的支持物上, 酶可以重复使用, 因此可以降低成本。虽然葡萄糖氧化酶固定在烷基胺玻璃上, 在连续流动系统中测定葡萄糖, 但烷基胺固定的酶还没有用来测定血糖。一般来说, 烷基胺玻璃抗微生物的腐蚀, 有很广的 pH 适应性和不同溶剂如乙醇和丙酮的稳定性。本文报道利用烷基胺玻璃固定葡萄糖氧化酶常规分析血糖。

1 材料和方法

1.1 化学试剂

烷基胺玻璃珠(孔径 55nm)由 H. H. Weetalljiao 教授(Corning Glass Work, New York)赠送。由黑曲霉(*Aspergillus niger*)生产的葡萄糖氧化酶(100u/mg, 固体)从 Sisco 研究室 Pvt. . Ltd. M. Mumbai 获得。辣根过氧化酶(RZ = 1.1, 85u/mg, 固体)。4-氨基安替比林从 Sigma 公司购买。戊二醛(25% 溶液)从英国 BDH, Poole 公司购买。

1.2 葡萄糖氧化酶的测定

黑暗条件下, 在 15ml 测定管中测定酶活。测定液中含有 1.8ml 的磷酸盐缓冲液(0.1mol/L, pH7.0), 0.1ml 的葡萄糖溶液(1mmol/L)和 0.1ml 葡萄糖氧化酶(240u/ml 在反应缓冲液中)。30℃ 保温 2min 后, 加 1.0ml 显色液在室温下, (28℃ ± 3℃)放置 15min 显色。在 520 毫波长处测定吸收值(A_{520nm}), 反应产生的 H_2O_2 含量从过氧化氢的标准曲线获得。

1.3 显色剂的制备

显色剂的制备按参考文献[4]介绍的方法进行。显色液含有: 50mg 的 4-氨基安替比林, 100mg 固体苯酚, 在 100ml 0.4mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0)中加 1.0mg 的辣根过氧化酶。1 单位的酶活定义为: 在标准测定条件下, 每分钟产生 1nmol H_2O_2 所需的酶量。

1.4 葡萄糖氧化酶的固定化

按参考文献[5]的方法, 通过戊二醛偶联法将酶固定在烷基胺玻璃珠(孔径 55nm)上。100mg 烷基胺玻璃珠在 0.1mol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液中另加 2ml 2.5% 的戊二醛, 以上混合物在室温下不时搅拌维持 2h 进行活化, 然后弃去多余的戊二醛, 用蒸馏水洗直至滤液 pH7.0, 最后, 用 0.1mol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液洗玻璃珠。0.1mol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH5.5)中的葡萄糖氧化酶溶液 1ml(240u/ml)加到上述已活化的玻璃珠上。在 4℃ 下不时搅拌维持 48h。弃去游离的酶, 测定酶活和蛋白质。用反应缓冲液洗玻璃珠(0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液, pH7.0)直到洗液中没有检测到酶活性为止。利用 Lowry^[6]等

人的方法固定化酶的过程中, 根据溶液中蛋白质的损失测定固定在烷基胺玻璃珠上的酶量。

1.5 固定化葡萄糖氧化酶的测定

按照上述(1.2节)测定游离葡萄糖氧化酶的方法, 在 15ml 的三角瓶中加入 100mg 固定化酶和 1.9ml 的反应缓冲液置于黑暗中。反应液显色后, 倾斜三角瓶使玻璃珠沉于瓶壁。用滴管将反应液转入比色杯, 在波长 520nm 处测定吸收值(A_{520nm})。

1.6 不连续的分析血糖

1.6.1 血清样品的收集: 从健康人抽取 1ml 血, 在 5000r/min 离心 10min, 收集上清液于 4℃ 存放待用。

1.6.2 血糖的测定: 按上述固定化葡萄糖氧化酶的测定方法测定血清中葡萄糖的含量。0.1ml 血清样代替葡萄糖溶液, 血清中葡萄糖的含量从葡萄糖和葡萄糖氧化酶活性的标准曲线获得。将固定化酶放在蒸馏水中于 4℃ 存放待用。玻璃珠在下次使用之前, 用反应缓冲液洗玻璃珠 3-4 次。

2 结果和讨论

2.1 酶生产菌

由黑曲霉(*Aspergillus niger*)产生的葡萄糖氧化酶用戊二醛偶联法固定在烷基胺玻璃珠上。连接产量为每克玻璃珠可固定 15.12mg 的酶。保留酶活为 88.5%, 游离酶和固定化酶的动力学特征比较见表 1:

用此法不连续分析血糖操

作简便, 灵敏, 专一性强。

测定方法基于测定固定化酶从血糖产生的 H_2O_2 的量。利用 4-氨基安替比林、辣根过氧化物酶和苯酚作为层析系统的 Trinder's 显色反应。

2.2 直线性

在 A_{520nm} 值达到 0.85 时, 葡萄糖的浓度和吸收值有直线关系(见图 1)。

2.3 可检测量

用这种方法固定化酶测定血糖的最低检出量为 100ml 样品中含糖 33.6mg。

2.4 回收率

样品中加入葡萄糖的回收率为 $95.6 \pm 3.6\%$ (见表 2)。

这与用固定化葡萄糖氧化酶流动注射法回收率相近($95.4\% \sim 103.5\%$)^[8]

2.5 精确度

批内测定的相对误差小于 1%~2%, 批间测定的相对误差 3%~6% (见表 3)。这与用固定化葡萄糖氧化酶采用流动注射分析的相对误差接近($0.8\% \sim 2.2\%$ 和 $2.2\% \sim 4\%$)^[9]。用此方法测定健康男性成年人血糖的范围是 100ml 血清含糖 76~100mg。平均值是 87.95/100。

表 1 固定化酶和游离酶的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of free and alkylamine glass bound glucose oxidase

Parameters	Free	Immobilized
Optimum pH	5.5	7.0
Temperature for maximum activity	37℃	37℃
K_m for glucose	6.2mmol/L	2.8mmol/L
$V_{max}(H_2O_2)$	0.120mmol/min	0.066mmol/min
* Stability after storage in distilled water at 4℃ for 6 months	60%	80%

* The initial activity of free and immobilized glucose oxidase was considered as 100%

表 2 用固定化酶测定加入血清的葡萄糖的回收率

Table 2 Recovery of added glucose in serum as determined by immobilized glucose oxidase

Glucose added/ (mg/100ml)	Glucose found/ (mg/100ml)	Recovery/% (mean \pm S.D.) _{n=5}
Nil	70	Nil
30	96	96.25 ± 3.6
60	124	95 ± 3.6

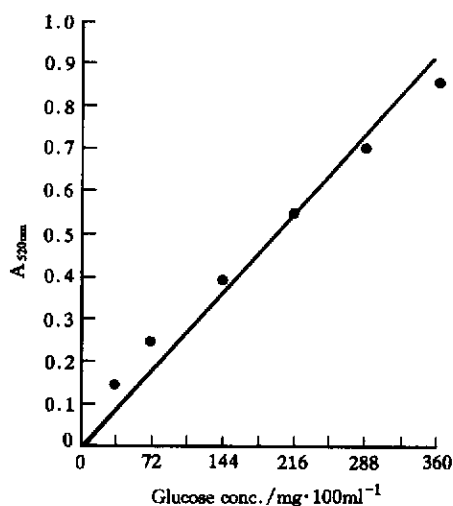


图1 固定化葡萄糖氧化酶和葡萄糖浓度的标准曲线

2.6 重复使用和贮存稳定性

在蒸馏水中的固定化酶于 4℃ 存放,可重复多次使用 6 个月以上,保留酶活 80%。

参 考 文 献

- 1 Bergmeyer H U, Bernt E. In: Bergmeyer H U ed. *Methods of Enzymatic Analysis*, Berlin. Verlag Chemie, 1974, p. 1205
- 2 Hossain M Md, Do D D. *Biotech Bioengg*, 1985, 27:842
- 3 Murachi T, Sakaguchi Y. *Biochimia*, 1980, 62(8-9):581
- 4 Bais R et al. *Anal Chem*, 1980, 53:508
- 5 Lunn M. In: Weetall H H ed, *Immobilized Enzymes Antigen, Antibody and Peptides. Preparation and Characterization*, New York; Marcel Dekker Inc., 1975, 1:1
- 6 Lowey O H et al. *J Biol Chem*, 1951, 193:265
- 7 Trinder P. *Ann Clin Biochem*, 1969, 6:24
- 8 Guo J A, Mo P S, Li G X. *Appl Biochem Biotechnol*, 1990, 23(1):5

Determination of Serum Glucose with Alkylamine Glass Bound Glucose Oxidase

V. Kalia L. Goyal C. S. Pundir*

(Biochemistry Research Laboratory, Department of Bio-sciences, Maharshi Dayanand University, Rohtak-124001, Haryana, INDIA)

Abstract Serum glucose was analysed using glucose oxidase from *Aspergillus niger* immobilized on to alkylamine glass (pore diameter 55 nm) by glutaraldehyde coupling method. The minimum detection limit was 3.6mg/100ml sample. The recovery of added glucose was 95%. A good correlation ($r = 0.808$) was found between glucose values obtained by a standard commercial method and the present method.

Key words Glucose, glucose oxidase, serum, alkylamine glass, immobilized enzyme

表3 用固定化酶批内和批间
测定血糖的相对误差

Table 3 Within assay and between assay coefficient of variation of determination of glucose in serum

Type of assay n(5)	Glucose mg/100ml	Coefficient of variation/%
Within assay*	85	<1.2
Between assay** (5)	80	<3.6

* Sample assayed on the same day

** Same samples assayed after one week storage at 4℃
Standard assay conditions were used in each assay. The data shown are the mean of 5 observations.

为了测定这种方法的精确性,用我们的方法(y)得到的血糖值与用 Ranbaxy India Ltd 提供的方法测定的血糖值进行比较(x)。得到很好的相关值。 $r = 0.808$ 。回归方程 $y = 0.773x + 25.3$