

## 新型尿素传感器的研究

王厚行 李青

(野战外科研究所, 重庆)

生物传感器适于自动化多项目连续检测, 对临床生化检验、对工业生化过程特别有用。因此, 近年来对开发和利用生物传感器, 特别是酶传感器非常重视<sup>[1]</sup>。

选用恰当的电化学传感器是构建生物传感器的关键。许多酶促反应都涉及到直接消耗或产生质子, 而pH玻璃电极目前仍然是一种最灵敏、选择性良好的商品离子选择性电极。已经有用pH玻璃电极构建尿素传感器、青霉素传感器、甘油三酯传感器、乙酰胆碱传感器、葡萄糖传感器等的报告<sup>[2-5]</sup>。通常构建酶传感器都是在电化学传感器表面制备含酶层, 再将它用物理支持物如透析膜等在适当的位置用O型圈固定。这类传感器由于外被物理支持物使响应时间延长、传质速率减慢。因而近年来学者们趋向于可以随意组装、直接贴附于传感器表面、无需物理支持物的含酶层。例如, Tor等<sup>[3]</sup>制备的酶传感器的含酶层是先合成聚丙烯酰胺-酰肼, 再合成共聚聚丙烯酰胺-甲丙烯酰胺-酰肼, 将这种共聚物-酶溶液涂于pH玻璃电极表面后用乙二醛交联而成。鉴于这类方法繁杂, 作者在研究PVC固定化脲酶膜的基础上<sup>[6]</sup>, 用国产231型玻璃电极构建了一种新型尿素传感器, 现将初步结果报告如下。

### 材料与 方法

#### (一) 试剂及器材

1. PVC固定化脲酶膜: 80mg PVC(上海化工厂)溶于1ml 四氢呋喃(AR, 宜兴县第二化学试剂厂), 加入30mg 脲酶(四川省校办企业公司生化试剂一厂), 涂在玻璃板上自然干燥成膜。本研究使用者为3mg(15u)脲酶/11mg膜重, 膜厚100 $\mu$ m, 膜面积0.7 $\times$ 0.7cm<sup>2</sup>。

2. Berthelot 氏脲酶法测定尿素的试剂参照文献[7]配制。其中尿素标准液亦用相应pH值的20mmol/L磷酸盐-10mmol/L EDTA 缓冲液配制和稀释。

3. 尿素传感器: 从60或120mg 脲酶/ml PVC胶液涂于上海电光器件厂的231型玻璃电极的电极泡, 室温干燥半小时即成。

4. 尿素氮测定试剂盒(二乙酰乙脲比色法): 由卫生部上海生物制品研究所购得。

5. 相应pH值的10mmol/L 组氨酸-1mmol/L EDTA缓冲液。

6. pH S-3型酸度计(上海第二分析仪器厂)。

#### (二) 方法

1. 参照文献[7]用 Berthelot 氏脲酶法测定尿素及酶活力。

2. 将尿素传感器置于1ml pH7.6-7.8的10mmol/L组氨酸-1mmol/L EDTA 缓冲液, 室温, 在pH S-3型酸度计上读取基线电位, 然后加入标准液或血浆标本, 搅匀, 观察电位变化直到获得稳定的电位值。将标准液不同浓度的对数与测得的电位变化在坐标纸上绘制校正曲线, 其直线斜率即为尿素传感器斜率( $mV/\Delta \log$ [尿素]=1)。根据血浆标本测得的电位变化从校正曲线上查找其浓度。

### 结果与 讨论

#### (一) 固定化脲酶的稳定性

将脲酶2.5mg溶于25ml pH8.0、20mmol/L磷酸盐-10mmol/L EDTA缓冲液, 室温保存, 第二天酶活力即下降36%。固定化脲酶膜室温保存两个月仍有很高活力, 其后亦在上述缓冲液

本文于1987年12月28日收到。

(pH7.5)中浸泡20天,第77次测定与第1次测定相比,活力仅下降15%:尿素传感器在室温贮存23天,连续测定110次,其中5次校正斜率,其斜率 $\bar{X} = 49.8$ ,  $SD = 1.2$ ,  $CV = 2.4\%$ 。

在大多数情况下,酶经固定化后,稳定性均有所增加:载体为酶提供了保护层,可以防止引起酶失活的因素所致的构象变化;固定化酶的高酶载量即意味着在正常情况下只有部分酶参加反应,因而一部分酶失活后,仍有充分数量的酶参加反应<sup>[8]</sup>。

## (二) 最适pH

在37℃、不同pH的20mmol/L磷酸盐-10mmol/L EDTA缓冲液中使天然脲酶作用于50mg尿素氮/dl,测得其最适pH为8.0,测得PVC固定化脲酶膜表现最适pH为7.5<sup>[9]</sup>(图1)。

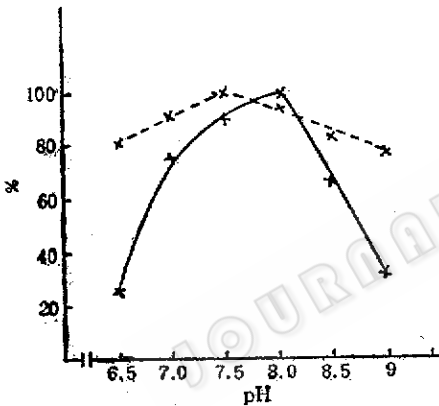


图1 pH-活力曲线

实线:天然脲酶,以pH8.0的活力为100%

虚线:PVC固定化脲酶,以pH7.5的活力为100%

脲酶膜在pH9.3以下的酶促反应中吸收 $H^+$ ,使脲膜的pH比外部溶液高,因而表现最适pH低于天然脲酶<sup>[10]</sup>。在本研究中,PVC固定化脲酶膜的表现最适pH酸移0.5。同样的现象也有其他作者报告<sup>[11]</sup>。

参照Tor等<sup>[3]</sup>使用相应pH的10mmol/L组氨酸-1mmol/L EDTA缓冲液2ml,加入100mmol/L尿素20 $\mu$ l,测得尿素传感器的表现最适pH为7.6-7.8(表1),与Tor等的7.6接近。仅就pH而言,此值在天然脲酶的最适pH与PVC固定化脲酶膜的表现最适pH之间,尽管一般认为传感器的表现最适pH与酶的最适pH不同<sup>[1]</sup>。

表1 尿素传感器的表现最适pH

pH	7.45	7.55	7.60	7.81	7.91	8.01
$\Delta mV$	14	14	21	21	18	16

## (三) $K_m$

如图2,测得天然脲酶的 $K_m$ 为6.6mmol/L(37℃,pH8.0,20mmol/L磷酸盐-10mmol/L EDTA缓冲液)。与Carr<sup>[12]</sup>报道的4mmol/L(pH6.7-7.6)、试剂手册<sup>[13]</sup>所载4mmol/L(pH8.0,Tris缓冲液)相近似。PVC固定化脲酶膜的表现 $K_m$ 为25mmol/L(37℃,pH7.5,20mmol/L磷酸盐-10mmol/L EDTA缓冲液)。

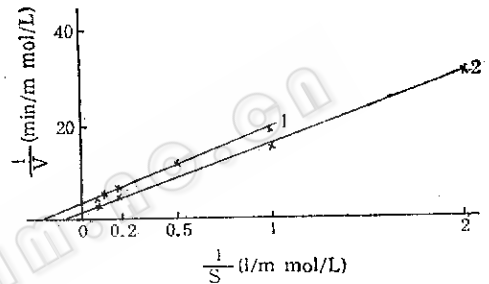


图2 Lineweaver-Burk图

1. PVC固定化脲酶膜 2. 天然脲酶

一般认为固定化酶由于底物和产物的扩散限制,其表现 $K_m$ 大都有增大的趋势<sup>[14]</sup>。本研究测得的PVC固定化脲酶膜的表现 $K_m$ 比天然脲酶 $K_m$ 约大4倍。

## (四) 校正曲线

见图3。用60mg脲酶/ml PVC胶液制备的尿素传感器线性范围在0.25-4.76mmol/L,斜率34。用120mg脲酶/ml PVC胶液制备者线性范围在0.24-5.00mmol/L,斜率50。

人血浆尿素正常值在3-7mmol/L之间。100 $\mu$ l(血浆量可根据尿素浓度酌情加减)加入1ml缓冲液测定时血浆被稀释11倍,因而可检测的血浆浓度范围分别为2.75-52mmol/L和2.64-55mmol/L,符合临床常规使用。

一般的酶传感器在底物浓度 $[S] \leq 0.1-0.2K_m$ 时有线性关系,而且线性范围随酶载量增加而增加<sup>[12]</sup>。但是本研究中,酶载量增加一倍,线性范围只是稍有增加,线性范围的上限 $[S]$ 接近天然脲酶 $K_m$ ,而为固定化酶膜的

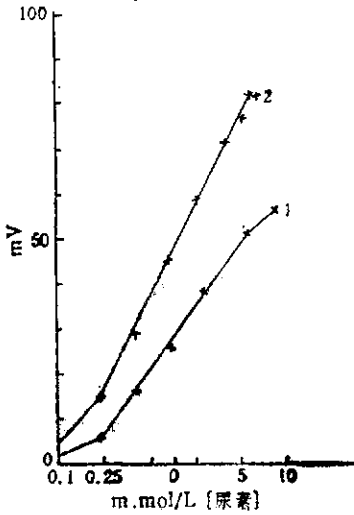


图3 尿素传感器校正曲线

1. 60mg脲酶/ml PVC胶液 2. 120mg脲酶/ml PVC胶液

0.2Km。酶载量增加一倍后, 最明显的变化是斜率由34增至50, 后者接近于一价离子在25℃时的理论斜率 59, 与其他类型的尿素传感器类似<sup>[15]</sup>。

#### (五) 响应时间和洗涤时间

表2 斜率重复性试验

次 数	1	2	3	4	5	$\bar{X}$	SD	CV
斜率 (mV/ $\Delta \log[\text{尿素}] = 1$ )	51	50.9	48.5	48.6	49.8	49.8	1.2	2.4%

表3 血浆样品重复性试验

次 数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{X}$	SD	CV
浓度 (mmol/L)	15.3	15.3	15.3	15.3	16	15.3	15.3	16	15.3	16	15.51	0.34	2.2%

缓冲液pH几乎没有影响。

使用pH 玻璃电极构建酶传感器之所以实用很少, 其主要难题是样品所致的缓冲液pH和缓冲容量的变化干扰测定<sup>[2]</sup>。本研究采用稀释样品, 选用缓冲容量适当的组氨酸-EDTA 缓冲系, 缓冲液的pH选在大于血浆pH7.4的碱性范围(因为血浆缓冲碱性变化的能力极弱), 解决了这一难题。因而无需使用无酶pH电极校正pH的变化。

#### (七) 重复性试验

同一支尿素传感器23天中5次测定其斜率  $\bar{X} = 49.8$ ,  $SD = 1.2$ ,  $CV = 2.4\%$ 。同一血浆重

两者均为3—5min, 与其他类型的尿素传感器类似<sup>[3]</sup>。若采用流动注射系统可望加快检测速度。

#### (六) 血浆样品对缓冲液pH的影响

按常规用量用Beckman $\phi$ 71pH Meter测定在pH约7.6的10mmol/L 组氨酸-1mmol/L EDTA 缓冲液中加入血浆样品前后的pH: 第一次加入前为7.604, 加入后为7.604, 第二次加入前为7.610, 加入后为7.605。可见血浆样品加入后对

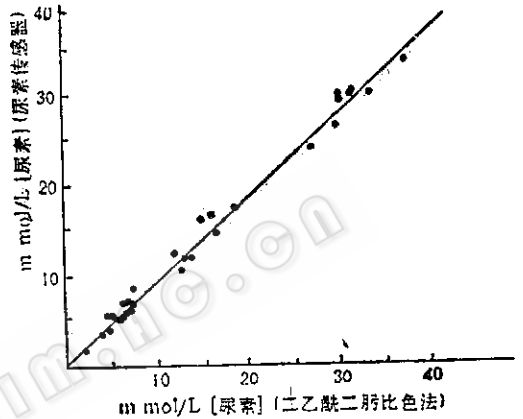


图4 尿素传感器与二乙酰乙肼比色法测定尿素的回归曲线

$$\hat{y} = 0.960x + 0.426 \quad r = 0.992 \quad n = 30$$

复测定10次,  $\bar{X} = 15.51 \text{ mmol/L}$ ,  $SD = 0.34 \text{ mmol/L}$ ,  $CV = 2.2\%$ 。见表2、3。这表明尿素传感器精密度良好。

#### (八) 与二乙酰乙肼比色法对照

30个血浆样品分别用临床经典方法二乙酰乙肼法与尿素传感器测定结果相对照, 从图4可见两者良好相关:  $\hat{y} = 0.960x + 0.426$ ,  $r = 0.992$ ,  $n = 30$ 。

以上初步结果证明, 这种新型尿素传感器容易制作、操作方便、符合临床常规使用的要求。

加之,这种尿素传感器全部用国产试剂和器材制作、测试,这就为其推广应用奠定了良好的基础。

### 参 考 文 献

- [1] 河野拓治: 蛋白质·核酸·酵素, 30:247, 1985.
- [2] Vadgama, P.: *Analyst*, 111:875, 1986.
- [3] Tor, R. et al.: *Anal. Chem.*, 58:1042, 1986.
- [4] Satoh, I. et al.: *Anal. Chim. Acta*, 106:369, 1979.
- [5] Booker, H. E. et al.: *Anal. Chem.*, 46:1054, 1974.
- [6] 王厚行: 第三军医大学学报, 10(5):400, 1988.
- [7] Kaplan A, et al.: *Selected Methods of Clinical Chemistry*, Vol. 9, Faulkner, p. 357, 1982
- [8] Trevan, M. D.: *Immobilized Enzyme*. John Wiley & Sons, p. 18, 1980.
- [9] 王厚行: 全国第二次工业生化学术会议论文摘要, p. 195, 1987.
- [10] 王厚行: 临床检验, 6(1):66, 1988
- [11] Konceny, J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 403:573, 1975.
- [12] Carr, P. W. et al.: *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*. John Wiley & Sons, p. 183, 1980.
- [13] 上海化学试剂采购供应站. 试剂手册, 上海科学技术出版社, p. 1274, 1985.
- [14] Wingard, L. B. et al.: *Immobilized Enzyme Principles*. Academic Press, p. 128, 1976.
- [15] Lanniello, R. M. et al.: *Anal. Chim. Acta*, 146:249, 1983.

## THE STUDY ON A NEW KIND OF UREA SENSOR

Wang Houxing Li Qing

(The Research Institute of Surgery, Taping, Chongqing, China)

An immobilized urease membrane was produced with PVC. The apparent optimum pH was 7.5. The apparent  $K_m$  was 25mmol/L. There still existed the higher activity when the immobilized urease membrane was stored at room temperature for 60 days. An urea sensor was constructed by the enzyme membrane and a pH electrode made in china, with an apparent optimum pH of 7.6—7.8. The logarithmic calibration curve of the sensor has a linear range of 0.24—5.00mmol/L, and the slope of  $50\text{mV}/\Delta \log [\text{urea}] = 1$ . Both the response time and washing time are 3—5min. The CV of slopes in 5 measurements within 23 days 2.4% and the CV of same plasma in 10 measurements was 2%. The urea sensor response has a good correlation with the diacetylmonoxine colorimetry:

$$\hat{y} = 0.960x + 0.426, r = 0.992, n = 30.$$