

研究报告

苯酚在预活化聚酰胺膜酪氨酸酶
生物传感器上的响应特性*

胡效亚 冷宗周

(扬州大学师范学院化学系, 扬州 225002)

摘要 研究苯酚在预活化聚酰胺膜酪氨酸酶生物传感器上的响应特性, 适量儿茶酚的存在可加快传感器到达恒态的速度。被固定酶的量、活性及传感器的有效面积等是影响检测灵敏度的主要因素。首次采用预活化聚酰胺膜固定酪氨酸酶, 并与浸蜡石墨电极组合成酪氨酸酶生物传感器, 在温度 25℃ 电位 -0.200 V_{vs}SCE, 儿茶酚浓度 5×10^{-7} mol/L, 底液 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 pH6.50 下, 采用电流法测定苯酚及水样中的酚。酶膜的制备、替换和贮存极为方便, 酶膜贮存 5 个月未见活性下降, 有良好的重现性和线性范围 $2 \times 10^{-7} - 1.25 \times 10^{-5}$ mol/L。

关键词 电极, 生物传感器, 酶, 酪氨酸酶, 苯酚。

酪氨酸酶生物传感器测定酚的研究已有报道^[1-4], 但传感器的寿命一般仅 1—4 个星期, 在水相中测酚时传感器的制作较为烦琐与实际应用相差甚远。本文首次采用预活化聚酰胺膜固定酪氨酸酶, 并与浸石蜡石墨电极组合成酪氨酸酶生物传感器, 酶的固定仅需 1—2 min, 操作简便, 酶膜的替换和贮存极为方便, 贮存 5 个月未见活性下降, 传感器的使用寿命显著提高, 并用于苯酚及水中酚的测定, 对传感器的机理进行了探讨。

1 实验部分

1.1 仪器

3036X-Y 记录仪(四川仪表四厂), DH-1 型多功能双恒电位仪(长春应化所, 龙井电讯仪器厂), 501 型超级恒温器(上海实验仪器厂), PXD-12 型数字式离子计(江苏电分析仪器厂), 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂)。

1.2 试剂及材料

酪氨酸酶(Tyrosinase, EC1.14.18.1)从蘑菇中提取, SIGMA 公司提供。2400 μg/mg, 预活化聚酰胺膜(120 μm 厚)由 Pall Industrie 提供。牛血清蛋白(BSA, Boehringer 公司), 所用试剂均为分析纯。实验用水为去离子蒸馏水。

1.3 酶的固定

用打孔器取一直径 7.0 mm 的预活化聚酰胺膜, 正反两面各滴加 10 μl 10 mg/ml 酪氨酸酶溶液(0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 pH7.0)1—2 min 后, 酶以共价键的形式被固定在预活化聚酰胺膜上, 用 1 mol/L KCl-1% BSA 洗 10 min 后即可使用, 不用时贮存于 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 pH7.0-10% 甘油中温度 -10℃, 使用前用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液清洗 2 次, 每次 2 min。

1.4 电极

表面经砂纸、滤纸抛光后的光谱纯石墨棒在熔化的石蜡中浸泡 5 min, 冷却后用滤纸抛光成镜, 活性酶膜置于螺母套中并与固定于电极杆上的浸蜡石墨棒相套。酶膜与石墨棒紧贴的程度可通过旋转螺母加以调整。

1.5 酚的测定

使用三电极系统, 对电极为铂片电极, 参比电极为饱和甘汞电极, 实验温度 25℃, 电位控制在 -0.200 V_{vs}SCE, 儿茶酚浓度为 5×10^{-7} mol/L, 在匀速磁搅拌下, 采用电流法进行测

* 江苏省教委自然科学基金资助项目

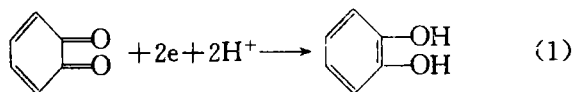
收稿日期: 1994-11-23

定, 底液为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 pH6.50。

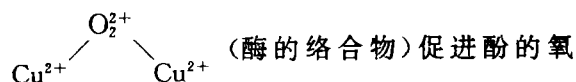
2 结果与讨论

2.1 传感器机理及动力学性质

酪氨酸酶(来自蘑菇)含有 4 个铜原子, 休止状态的酶含有反铁磁性耦合的 $\text{Cu}^{2+} \cdots \cdots \text{Cu}^{2+}$ 。酪氨酸酶对酚的活性反应机理见文献 [5]。酚的氧化产物邻苯醌可在浸蜡石墨电极表面上被还原成儿茶酚(邻苯二酚):



被测液中加入适量儿茶酚可形成一定量的



当反应达到恒态并且儿茶酚和酚的浓度均较小时, 酶催化反应的各中间产物的形成速度等于其分解速度, 由此可推出:

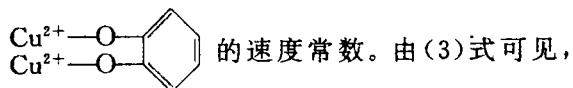
$$v = K[M][E_t] \quad (2)$$

v 为恒态时酶对酚的催化反应速度, K 与速度常数和 pH 有关, $[M]$ 为苯酚的浓度, $[E_t]$ 为单位面积膜上被固定活性酶的量。

电极表面反应层内邻苯醌的来源有二: 一是酚的氧化, 二是电极还原产物儿茶酚在酶的催化下, 一部分被氧化成邻苯醌。根据电极反应动力学原理可以推出传感器的还原电流为:

$$i = nFAK[M][E_t] \left(\mu_0 + \frac{K_1 \mu_D [E_t]}{1 - K_1 [E_t]} \right) \quad (3)$$

式中, A 为传感器的有效面积; μ_0 和 μ_D 分别为邻苯醌和儿茶酚的反应层厚度, 它们与各自的扩散系数有关, K_1 为形成酶络合物



当温度、电位和 pH 等一定时, i 与酚的浓度成正比, 这是定量分析水溶液中酚含量的理论依据。增加传感器的有效面积 A 、被固定酶的密度及活性和 K_1 , 可提高检测酚的灵敏度。

2.2 线性范围

不含儿茶酚时, 酪氨酸酶催化酚氧化达到恒态时的速度很慢, 尤其酚的浓度很低时。

25℃, pH 为 6.5 的磷酸盐缓冲溶液, 儿茶酚浓度为 5.0×10^{-7} mol/L (儿茶酚浓度在 $2 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-6}$ mol/L 之内, 对测酚的灵敏度无影响), 电位控制在 $-0.200 \text{ V}_{\text{vsSCE}}$, 传感器对酚的响应线性范围为 $2.0 \times 10^{-7} - 1.25 \times 10^{-5}$ mol/L (图 1)。

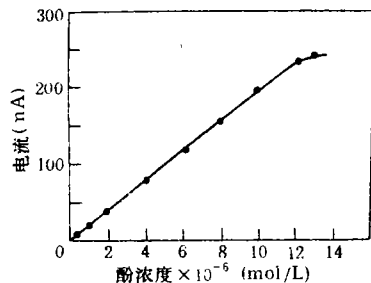


图 1 酚浓度与电流的关系

电位: $-0.200 \text{ V}_{\text{vsSCE}}$, 底液: 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH6.5, 温度 25℃

2.3 pH 的影响

溶液 pH 值对酪氨酸酶电流传感器灵敏度的影响较大(图 2), pH 值在 6.5 左右有最高灵敏度 20 mA/mol, pH 值过高或过低都会引起灵敏度的大幅度下降, 这可能是 H^+ 浓度影响氨基酸残基对 Cu 的配位及对底物酚的作用的缘故。

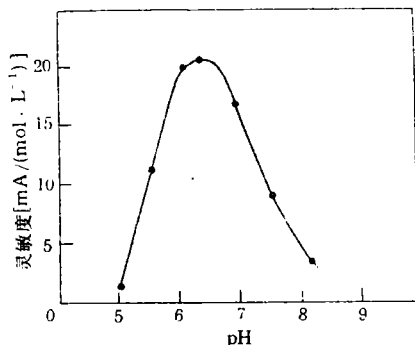


图 2 传感器灵敏度与 pH 的关系

pH6.0—8.2 为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液
pH5.0—5.8 为 0.1 mol/L 醋酸盐缓冲溶液
电位: $-0.200 \text{ V}_{\text{vsSCE}}$, 温度 25℃

2.4 温度的影响

温度对传感器灵敏度的影响较显著(图 3)。温度低于 10℃, 已无法检测, 响应时间极长。温度越高, 响应时间越短, 温度高于 35℃ 时, 传感器的稳定性下降, 并且灵敏度无显著增加。

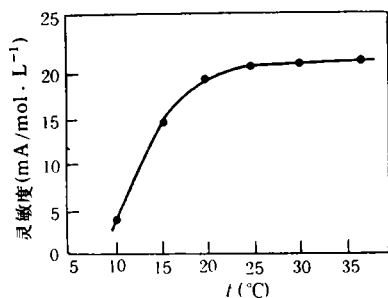


图 3 传感器灵敏度与温度的关系
除温度外，其余条件同图 1

2.5 电位的控制

酚和儿茶酚在浸蜡石墨电极上的循环伏安图见图 4。酚在 $+0.72 \text{ V}_{\text{vsSCE}}$ 处有一氧化峰。邻苯醌的还原峰电位为 $-0.064 \text{ V}_{\text{vsSCE}}$ ，儿茶酚的氧化峰电位为 $+0.391 \text{ V}_{\text{vsSCE}}$ 。图 4 显示，采用电流法测定酚，电位控制在 $-0.200 \text{ V}_{\text{vsSCE}}$ 比较适宜。电位过负，传感器灵敏度增加不明显，而干扰却在增大。

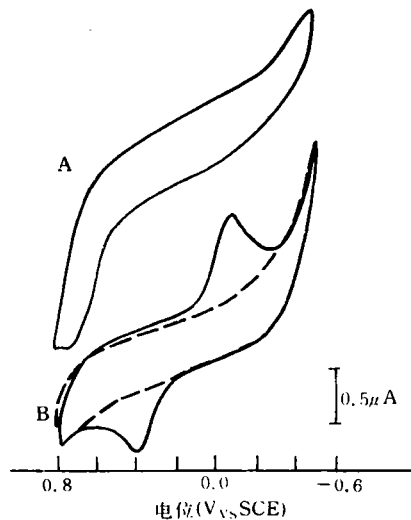


图 4 酚和儿茶酚的循环伏安图

电极：浸蜡石墨电极， 25°C ，扫描速度 36 mV/s 。
A：酚 ($2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)；B：儿茶酚 ($2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ，实线)；虚线为不含儿茶酚，底液为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 $\text{pH}6.5$

2.6 稳定性

在最佳条件下，活性酶膜连续使用 8 h ，灵敏度下降 11% ，在 5°C 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中保存过夜，传感器仍保持 62% 的灵敏度

(图 5B)，制备的酶膜保存在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 $\text{pH}7.0$ 10% 甘油中 -10°C ， 5 个月未见灵敏度下降。由于传感器替换酶膜非常方便，传感器的寿命显著延长，每次使用时换上新酶膜可使测定结果具有较高的灵敏度和良好的重现性。

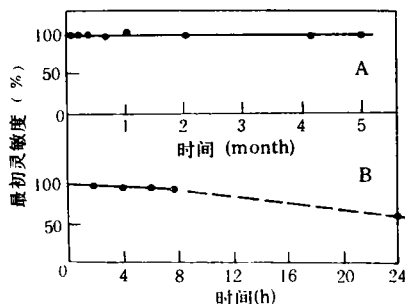


图 5 活性酶膜的稳定性

A：酶膜保存于 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液- 10% 甘油 ($\text{pH}7.0$)， -10°C ；B：酶膜连续使用时的稳定性，在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液， $\text{pH}6.5$ 中过夜， 5°C

2.7 苯酚回收率的测定

采用加入标准法测定了苯酚不同加入量的含量(见表 1)，其回收率为 $95\% - 102\%$ ，标准偏差 2.4 。

表 1 苯酚回收率的测定

加入量(μg)	1.88	2.82	4.70	14.1	23.5	32.9	47.0
检出量(μg)	1.79	2.84	4.77	13.9	24.0	33.0	46.1
回收率(%)	95.2	100.7	101.5	98.6	102.1	100.3	98.1

2.8 水样中酚的测定

采用标准加入法测定一水样中酚的含量，并与国际标准化组织颁布的 4-氨基安替比林萃取光度法对照，酪氨酸酶生物传感器测出的平均值为 0.071 mg/L ，标准偏差 0.004 ，4-氨基比林萃取光度法测出平均值为 0.069 mg/L ，标准偏差 0.003 。

参考文献

- Wang J et al.. Anal. Lett.. 1992, **25**(8): 1399
- Kulys J et al.. Anal. Lett.. 1990, **23**(4): 589
- Scheller F and Schubert F.. Biosensors. Amsterdam-London-New York-Tokyo, 1992: 142
- Hall G F et al.. Anal. Chim. Acta.. 1988, **213**: 113
- Wilcox D E et al.. J. Am. Chem. Soc.. 1985, **107**: 4015

Abstracts

Chinese Journal of Environmental Science

Response Characteristics of Phenol on a Tyrosinase Biosensor. Hu Xiaoya et al. (Dept. of Chem. Teacher's School, Yangzhou Univ., Yangzhou 225002); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(3), 1995, pp. 1-3

The response time decreases in the presence of catechol. The principal factors influencing the sensitivity were described. The amperometric biosensor of tyrosinase was prepared firstly by immobilizing tyrosinase onto preactivated polyamide support which contacted tightly with wax-impregnated graphite electrode. Amperometric measurements of phenol in water were carried out by applying a potential of $-0.200 V_{vsSCE}$ in a 0.1 mol/L phosphate buffer of pH 6.50 and $5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ catechol at 25°C . The preparation, storage and replacement of immobilized enzyme are convenient. No activity of immobilized enzyme was lost during five months of storage, with linear range of $2 \times 10^{-7} - 1.25 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ of phenol.

Key words: electrode, biosensor, enzyme, tyrosinase, phenol.

Effect of Magnetic Field on Dehydrogenase Activity of Purple Nonsulfur Photosynthetic Bacteria. Ma Haizhen et al. (Taiyuan Univ. of Technology, Taiyuan 030024); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(3), 1995, pp. 4-7

Some properties of native and immobilized cells of purple nonsulfur photosynthetic bacteria (PSB) were studied and compared under the condition of magnetic field. The results show that under the condition of optimum magnetic field both types of cells were thermally and pH stable, with an optimum dehydrogenase temperature of $30 - 40^\circ\text{C}$, and an optimum pH of 8. As compared to the control, the dehydrogenase activity was 10% - 20% higher for native cells and was 20% - 30% higher for immobilized cells. The magnetic field augmented the sensitivity of PSB to metal ions (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}). But these two types of cells were different in the value of optimum magnetic field and the accumulative effect of magnetic field. The effect of magnetic field on the dehydrogenase activity of immobilized cells remained constant after 45 - 210 days of storage at 4°C , with a dehydrogenase activity improved by 20%.

Immobilized cells had a dehydrogenase activity of 150% - 200% higher than native cells under the same conditions but without an applied magnetic field.

Key words: magnetic field, magnetic biological effect, purple nonsulfur photosynthetic bacteria, immobilized cells, dehydrogenase.

Study on Two-phase Anaerobic Digestion Process for Treating High Strength Organic Wastewater Containing a High Level of Sulphate. Yang Jingliang et al. (Dept. of Environ. Eng., Tsinghua Univ., Beijing 100084); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(3), 1995, pp. 8-11

A two-phase anaerobic digestion process has been developed for treating high strength organic wastewater containing a high level of sulphate. The system comprises: ① anaerobic filter packed with Rasching rings which was used as an acidogenic reactor with a volumetric loading of $5 \text{ kg SO}_4^{2-}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ and a SO_4^{2-} removal efficiency of 80%; ② a desulphiding reactor with a sulphide removal rate of more than 90%, of which more than 95% was converted to S^0 ; ③ a methanogenic reactor with a COD volumetric loading rate of $15.8 \text{ kg COD}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ and a COD removal efficiency of 83.3%. The whole system has an overall COD removal efficiency of 87.6% and a SO_4^{2-} removal efficiency of 99.4% - 100%.

Key words: organic wastewater containing sulphate, sulphate reducing bacteria, two-phase anaerobic digestion process.

Information Theoretic Indices and Application to Predicting the Toxicities of Organophosphorus Pesticides. Peng Ji et al. (Institute of Environmental Medicine, Tongji Medical Univ., Wuhan, 430030); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(3), 1995, pp. 12-14

The information theoretic indices and the valence molecular connectivity indices as the characteristics of molecular structure were applied to predicting the toxicities of organophosphorus pesticides. Radical information parameter was suggested. According to the data on acute toxicities of 114 organophosphorus pesticides and different channels that the pesticides were given, the qualitative and quantitative prediction models were established.