

酶传感器的应用

注：贵州省科学技术基金资助项目（黔科合 J 字[2008]2093 号）

摘要：酶传感器是电化学生物传感器中研究最早、应用最广的一类传感器，也是近年来生物传感器研究的热点。简要介绍了酶传感器的发展历程，着重介绍酶传感器在食品工业、环境监测、生物医学、军事领域等方面的应用，并对酶传感器的发展进行了展望。

关键词：酶传感器；应用；食品；环境

中图分类号：TP212.3 文献标识码：A 文章编号：1006-883X (2012) 04-0009-04

收稿日期：2012-03-07

韩莉 陶菡 张义明 石瑞丽



一、引言

电化学生物传感器中，酶传感器在生物传感器领域最具代表性。在生物传感器发展的早期，酶传感器首先应用于葡萄糖的检测分析。随后这一技术引起化学、生物学、临床、环境、食品等领域科学工作者的高度重视，从而得到迅速发展^{[1][2]}。酶传感器与传统分析方法相比，具有独特的优点：选择性好，能够直接在复杂试样中进行测定；响应速度快，灵敏度高；体积小，可实现在线监测。

二、酶传感器的发展

根据酶与电极之间的电子传递机理，酶传感器发展经历了三代。

第一代酶传感器是以氧为介体的电催化。Barsan等^[3]研究在钴、铁氰化铜及聚乙烯3种媒介上固定葡萄糖氧化酶，设计了基于电化学生物传感器的碳膜流动室，用以监测葡萄汁发酵过程中的葡萄糖。上述研究均采用氧作为葡萄糖氧化酶的电子传递剂，也就是传统意义上的第一类葡萄糖传感器。这种酶传感器通过检测氧消耗量或 H_2O_2 浓度变化来测定底物，受溶解氧、pH值、温度影响很大。

第二代酶传感器是以诸如二茂铁、铁氰化钾等物质作为媒介体的电催化。该种酶传感器增加了化学修饰层，扩大了基体电极可测化学物质的范围，提高了测定灵敏度。电子媒介体促进电子传递过程，减小了溶解氧的干扰。但加入的媒介体易污染电极，影响电极性能。常用的媒介体主要有二茂铁及其衍生物^[4]、铁氰酸盐^[5]、醌类^[6]、有机导电盐^[7]、有机染料^[8]和有机介体^[9]等。

第三代酶传感器是酶在电极上的直接电催化。该种酶传感器无需加入其他试剂，而利用酶与电极间的直接电子转移，减少了操作步骤，是目前酶传感的重要发展方向之一。但酶通常具有较大分子量，其电活性中心深埋在分子的内部，且在电极表面吸附后易发生变形，所以酶与电极间难以直接进行电子转移。到目前为止，仅有少数相对分子量较小的酶如过氧化物酶^[10]、氧化酶^[11]、氢化酶^[12]和脱氢酶^[13]、超氧化物歧化酶^[14]等能够在电极上直接进行有效的电子转移。



三、酶传感器的应用

尽管常规检测方法气相及薄层色谱、HPLC与各种光谱联用等技术灵敏又准确,但这些方法需要对样品进行烦琐的预处理,耗时、成本高,而且所需仪器大都昂贵且庞大,不适合在野外及现场使用。

酶传感器技术弥补了上述技术的缺点,满足了医学、食品工业、环境监测、军事等领域快速检测的需要,在国民经济中的有着广泛的应用前景。

1、食品工业中的应用

酶传感器在食品分析中的应用包括食品成分、食品添加剂、有害毒物等的测定分析。在现代食品安全性分析中,这些项目都是进行食品安全性评价的重要依据^[15]。应用于食品领域的酶传感器,具有响应快、易操作的特点,这得益于基于电化学原理的换能系统。借助于酶电极对葡萄糖、乳酸、酒精、甘油等特定分析物有特定的响应,此类的电化学生物传感器在食品的过程控制、产品品质检测以及成分鉴别中得到了广泛的应用。

Niculescu等^[16]研究了一种安培生物传感器,它是将一种醌蛋白醇脱氢酶埋在聚乙烯中,根据酶和聚合物的比例不同影响该生物传感器的性能。可检测饮料中的乙醇,乙醇的测量极限为1nmol/L。

Carla等^[17]用络合沉淀凝胶法(CPG)将一种亚硝酸盐还原酶固定在光纤一端的可控微孔玻璃珠上,当亚硝酸盐与酶发生接触反应时,会发生一系列分光变化,这种光学变化与亚硝酸盐的浓度在一定范围内呈线性关系,通过检测这些光学变化即可对亚硝酸盐进行定量分析。这种光学生物传感器对亚硝酸盐的检测限为0.93mol/L,大大低于欧盟所要求的最大限量2.2mol/L。

Mazzei等^[18]通过多酶的传感器实现D,L-乳酸以及L-苹果酸的选择性检测,可应用于检测饮料中的D,L-乳酸以及L-苹果酸

2、在环境监测中的应用

酶传感器可用于环境毒物分析。某些化合物能与酶相互作用,使酶分子中的活性基团发生变化,从而影响酶与底物分子的结合或减小酶的再生速率,使酶的活性降低或丧失。许多毒性物质,往往就是因为它们能抑制机体中酶的活性而表现出毒性的。一般说来,酶和抑制剂之间的对应关系也是专一的,因此将抑制剂加到特定的完全的酶反应系统后,根据酶活性降低的程度就可以对抑制剂进行定量的测定。根据这个原理,酶传感器可以用于检测农药、重金属、氰化物等有毒有害污染物。

研究发现用戊二醛将适合检测金属离子的氧化酶固定在膜的表面,然后将膜放置在溶解氧传感器上做探头,可以用来测定重金属离子的浓度如 Hg^{2+} 和 Ag^+ 。以用丙酮酸氧化酶传感器为例,当溶液中 HgCl_2 浓度为1.0 $\mu\text{mol/L}$ 或者 AgNO_3 的浓度为0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时,响应基线会降低50% (酶活性降低50%)。当传感器的酶失活时,可以用10mol/L的EDTA进行清洗再生,实现重复使用^[19]。

Starodub等^[20]分别乙酰胆碱脂酶(AChE)和丁酰胆碱脂酶(BChE)为敏感材料,制作了离子敏场效应晶体管酶传感器,两种传感器均用于蔬菜等样品中有机磷农药DDVP和伏杀磷等的测定,检测限为 $10^{-7} \sim 10^{-6} \text{mol/L}$ 。

Palchetti等^[21]采用丝网印刷过氧化氢电极测定水果和蔬菜样品中农药碳呋喃。继10min的培养时间后,检测下限达到2.0 $\mu\text{g/L}$ 。将其用于实际样品有机磷和氨基甲酸酯农药的分析,较气相色谱法检测线性范围宽。

Rupesh^[22]将乙酰胆碱脂酶B394固定在丝网印刷碳电极上,成功地用于牛奶样品中三种有机磷农药(CPO, EPO_x , MO_x)的检测。整个分析检测的时间还不到15min,检测范围 $5 \times 10^{-6} \text{mol/L} \sim 5 \times 10^{-12} \text{mol/L}$ 。该方法具有价格低廉、敏感、便携式的和提供即时结果等特点,能够提供快速检测。

Soldatkin^[23]将转化糖酶、旋光酶、葡萄糖氧化酶修饰在电极上,用于检测 Hg^{2+} , Ag^+ 离子,具有较高的灵敏度。

Sanllorente^[24]将丝网印刷电极固定酸性磷酸酯酶用于检测砷,重现性好,该方法成功应用于检测地下水样品中砷的(V)含量。

3、在医学领域中应用

在医学领域,一些有临床诊断意义的基质(如血糖、乳酸、谷氨酰胺等)都可借助于酶传感器来检测。到目前为止,已形成产品和正在开发的临床诊断用酶传感器主要是电流型的酶传感器。如,葡萄糖酶传感器现已广泛应用于血液里葡萄糖的检测中;乳酸测定仪也是迄今成功的商品酶传感器之一。

王卓等^[25]将苯丙氨酸解氨酶固定到氨气敏电极上,研制出一种新型酶生物传感器用作临床苯丙酮尿证检验,检测效果好。

Lin^[26]制作了辣根过氧化物酶传感器,成功检测了急性早幼粒细胞白血病(APL)中前骨髓细胞癌/ α -甲酸受体(PML/RAR α)融合基因。另外,还可以检测83fm DNA而

不受人体血清干扰。应用该传感器也可直接检测 PCR 实际样本，结果令人满意。

Bareket^[27]制作了甲醛脱氢酶、碳纳米管修饰丝网印刷电极(SPE)，用于检测发现人类恶性胶质瘤 U251 细胞经含甲醛抗癌化合物治疗后释放的甲醛，检测快速灵敏价格低廉，制作与操作简单。

4、在军事领域中的应用

除了在食品工业、环境监测、医学领域方面的应用，酶传感器应用于军事领域中。近年来，美国陆军医学研究和发展部研制的酶免疫生物传感器具有初步鉴定多达 22 种不同生物战剂的能力。

在军事上使用最多的是乙酰胆碱酯酶传感器。Taylor 等^[28]成功研制了烟碱乙酰胆碱受体生物传感器和某种麻醉剂受体生物传感器，它们能在 10s 内检测 10 浓度级的生化战剂，包括委内瑞拉马脑炎病毒、黄热病毒、炭疽杆菌、流感病毒等。

四、酶传感器的发展趋势

近年来，酶传感器的研究取得了很大的发展，主要表现在载体材料从传统的有机合成材料扩展到无机材料和天然有机材料；高新技术如纳米科技、分子自组装技术、溶胶-凝胶技术、基因技术等开始应用到提高传感器响应电流中；加快电子传输的电子媒介体的种类迅速扩大，多媒介体/多酶传感器研究进一步深化。

然而，酶的提取成本高，活性受环境条件影响大，其存储和使用都会受到不同程度的限制。另外，一般传感器所检测的成分通常十分复杂，容易对酶电极检测造成干扰。这些仍是酶电极需要进一步研究和克服的问题。

酶传感器的应用要求其有快速、准确、高选择性、抗干扰能力好、稳定性好及成本低等特点。因此，可以预计未来酶传感器的研究热点为：

(1) 寻找具有更高电化学活性、生物相容性好的各种形式的无机或有机电极材料；

(2) 改进酶的固定化方法，提高生物相容性，最大程度地保持酶的生物活性，提高传感器的灵敏度和响应电流；

(3) 开发具有更稳定特性的酶，可以通过人工合成的方法合成具有象酶一样特异性的高分子材料或利用分子生物学和酶工程的新技术，通过对自然的酶进行改性，以开发出更稳定、更专一、使用条件更广泛的酶。

参考文献

- [1] Joseph Wang. Electrochemical Glucose Biosensors[J]. Chem.Rev.2008,108 (2):814-825.
- [2] Okkyoung Choi, Byung-Chun Kim, Ji-Hye An, et al. A biosensor based on the self-entrapment of glucose oxidase within bio-mimetic silica nanoparticles induced by a fusion enzyme[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011,49(5):441-445.
- [3] M.M. Barsan, C.M.A. Brett. Carbon Film modified electrodes for glucose determination in flow analysis[J]. Talanta, 2007, 71:1893-1900.
- [4] Padeste C, Grubelnik A, Tiefenauer L.. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose [J]. Biosens Bioelectron, 2000, 15(9-10):431.
- [5] Wang B Q, Zhang J Z, Cheng G J, et al. Amperometric Enzyme Electrode for the Determination of Hydrogen Peroxide Based on Sol-Gel/Hydrogel composite film[J]. Anal.Chim.Acta., 2000, 407: 111-118.
- [6] Ju H. X., Dong L., Chen H.Y. Amperometric determination of lactate dehydrogenase based on a carbon fiber micro-cylinder electrode modified covalently with Toluidine Blue O by acylation[J]. Talanta, 1996, 43(7):1177-1183.
- [7] McKenna K., Brajter-Toth A.. Tetrathiafulvalene tetracyanoquinodimethane-xanthine oxidase amperometric electrode for the determination of biological purines [J]. Anal.Chem., 1987, 59(7):954-958.
- [8] Lei C.H., Deng J.Q.. Studies on hydrogen peroxide sensor based on co-immobilized methylene green and HRP in the same montmorillonite-modified bovine serum albumin-glutaraldehyde matrix on a glassy carbon electrode surface[J]. Anal.Chem. 1996, 68(19):3344-334.
- [9] Jiuhong Yu, Huangxian Ju. Preparation of Porous Titania Sol-Gel Matrix for Immobilization of Horseradish Peroxidase by a Vapor Deposition Method [J]. Anal.Chem., 2002, 74 (14):3579-3583.
- [10] Richard Chong, Jee-Eun R. Rho, Hye Joo Yoon, et al. 1,1'-Oxalyldiimidazole chemiluminescent enzyme immunoassay capable of simultaneously sensing multiple markers[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 32(1):19-23.
- [11] T.B. Goriushkina, L.V. Shkotova, G.Z. Gayda, et al. Amperometric biosensor based on glycerol oxidase for glycerol determination[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2010, 144(2):361-367.
- [12] Dong-Jin Qian, Chikashi Nakamura, Stephan-Olav Wenk, et al. A hydrogen biosensor made of clay, poly(butylviologen), and hydrogenase sandwiched on a glass carbon electrode[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2002, 17(9):789-796.
- [13] Arnaldo C. Pereira, Marina R. Aguiar, Alexandre Kisner, et al. Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and Meldola Blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2007, 124(1):269-276.

传感器世界 2012.04
www.sensorworld.com.cn