

辐射制备固定化葡萄糖氧化酶膜 及临床应用研究

俞 晔 曹 瑾 苏宗贤

(华东化工学院, 上海)

陈咨熊

(上海海员医院, 上海)

摘要 本文叙述了以甲基丙烯酸 β 羟乙酯为载体, 尼龙网为基材, 利用二次辐射法(辐射接枝、辐射包埋)制备了固定化葡萄糖氧化酶膜。测定了酶膜的一些性质, 制得的酶膜保留活力高、反应通透性好, 配以氧电极和CY-4型测氧仪, 用于临床诊断血糖测定, 准确性、重复性以及使用寿命均能满足医院临床检验要求。

关键词 辐射接枝, 辐射包埋, 甲基丙烯酸 β 羟乙酯, 固定化葡萄糖氧化酶膜, 血糖测定

前 言

由于临床诊断检测(生物传感元件)、体外循环去除有害毒物(过滤介质)以及缓释药物的实际需要, 生物活性物质的固定化, 制成膜状固定化产物的研究逐渐增多^[1-4]。固定化膜的特点是: (1) 固定化膜有效地增大了与反应底物的接触面, 加速了反应的进行; (2) 以高分子材料作为固定化膜的基材, 提高了膜的机械强度, 从而提高了使用的周期; (3) 有利于反应产物与固定化膜的分离, 便利固定化膜的清洗, 简化后处理过程。本文研究的目的有: (1) 利用低温辐射对酶减少损伤的优点, 运用二次辐射技术(辐射接枝、辐射包埋)制取保留活力高的酶膜, 作为生物传感元件, 为辐射利用开辟新的应用途径; (2) 选择葡萄糖氧化酶作为固定化对象, 实现葡萄糖氧化酶膜应用于临床诊断血糖的测定。

材 料 和 方 法

1. 材料

葡萄糖氧化酶: SIGMA(TYPE II), 国外进口分装, 购于上海生化试剂商店。甲基丙烯酸 β 羟乙酯(HEMA): 含量 $\geq 96\%$, 双酯 $\leq 4\%$, 酸度 $\leq 0.4\%$, 购于上海珊瑚化工厂。尼龙网: 厚度 $85-90\mu\text{m}$, 筛孔大小72目, 上海筛网厂生产。CY-4型测氧仪(配以测定恒温装置); 新安江分析仪器二厂生产, 氧电极自己设计改装。其他试剂均为分析纯。

$^{60}\text{Co}-\gamma$ 放射源: 华东化工学院辐化组。

2. 酶膜制备方法

(1) 尼龙网辐射接枝 HEMA 称取一定量的经洗涤干燥至恒重的尼龙网, 置于自制的辐射接枝管中, 加入含有10%的 HEMA 和0.2% CuCl_2 (均为重量百分浓度)的接枝水溶液, 在 20°C , 0.3 Gy/s 的剂量率下辐照2h, 取出已接枝 HEMA 的尼龙网, 用 DMF 浸洗除去均聚物, 烘干, 测定接枝率, 即成为固定化膜的基材。

(2) 酶膜的制备 经辐射接枝的尼龙网, 裁成一定大小, 置于自制的模具中, 以医用注射

器将已配好的酶液 0.2 ml(每毫升酶液中含葡萄糖氧化酶 60 mg, 0.3 ml 的 HEMA)缓慢地注入模具中,然后放入盛有干冰(-78°C)的杜瓦瓶中,在 1 Gy/s 的剂量率下辐照 1 h,取出,拆除模具,即得固定化葡萄糖氧化酶膜,洗涤后,置于 pH 5.6 的 0.06 mol/L 磷酸缓冲液中, 4°C 保存,使用时可按所需大小剪裁使用。

结果与讨论

1. 酶膜活力与米氏常数

将酶膜置于 2%葡萄糖 pH 5.6 的 0.06 mol/L 磷酸缓冲液中,于 35°C 下反应 1 h,以 3,5-二硝基水杨酸定糖法(比色法)测定其活力^[5]。活力定义为在 pH 5.6 的 0.06 mol/L 磷酸缓冲液中,反应温度为 35°C ,每分钟催化氧化 $1\text{ }\mu\text{mol}$ 的葡萄糖为一个活力单位。据此测定结果,酶膜的活力为 106.4 单位,保留活力为 40%。

在底物葡萄糖浓度为 $0.03\text{--}0.1\text{ mol/L}$ 下测得葡萄糖氧化酶的反应速度以 $1/V$ 对 $1/[S]$ 作图(见图 1),可得固定化的葡萄糖氧化酶的米氏常数 $K'_m = 1.42 \times 10^{-2}\text{ M}$,而游离酶的米氏常数 $K_m = 1.0 \times 10^{-2}\text{ M}$, $K'_m/K_m = 1.42$ 。固定化酶的表观米氏常数比游离酶的米氏常数要大,这是因为酶被包埋在聚合物内部,底物分子必须扩散入聚合物的内部与酶接触才能发生反应,而 HEMA 又是带电中性的单体,故反应主要受底物分子扩散的限制,其结果造成表观米氏常数比游离酶的米氏常数要来得大。

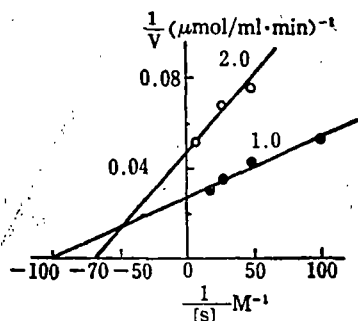


Fig 1. ● Natural enzyme,
○ Immobilized enzyme

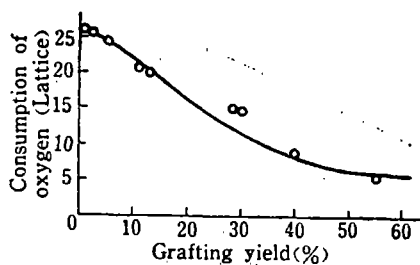


Fig 2. The relationship between the consumption of oxygen and the grafting yield.

2. 接枝率对耗氧量的影响

将酶膜配以氧电极及 CY-4 型测氧仪测定耗氧量。

接枝率的大小,对于酶从反应的底物扩散以及透氧均带来不同程度的影响,而且也对酶膜的机械强度有一定的影响。由于所采用的单体中含有一定量的双酯,故在辐照场内接枝过程中,除了单体的均聚和接枝反应外,同时也伴随有强烈的交联反应,接枝率小时,接枝和交联程度低,形成的接枝-交联膜机械强度不高,使固定化物易从基材上脱落;接枝率太大时,由于交联作用的提高,使接枝-交联膜变得致密,影响反应的通透性。故此,选择接枝率在 3—10% 左右为宜(见图 2)。

3. 辐照剂量对耗氧量及保留活力的影响

众所周知,辐照剂量的大小对生物活性物质包括酶是有一定影响的。剂量大,则可能造成酶的失活。葡萄糖氧化酶在 $1 \times 10^4\text{ Gy}$ 剂量下不会失活,而 HEMA 聚合所需剂量在 $1 \times 10^3\text{ Gy}$ 以上,

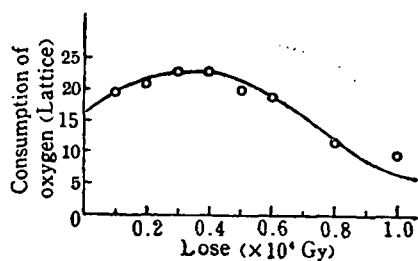


Fig 3. The influence of irradiation dose onto the consumption of oxygen.

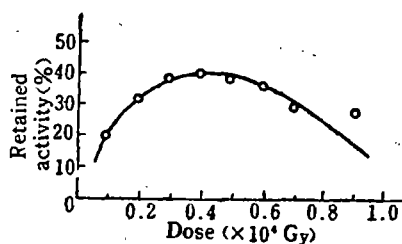


Fig 4. The influence of irradiation dose on the retained activity of glucose oxidase.

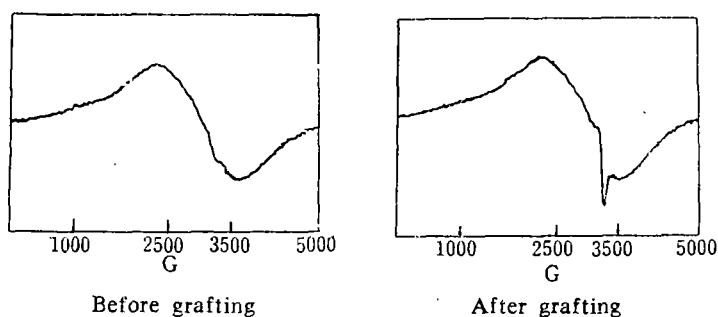


Fig 5 and 6. EPR-spectrum.

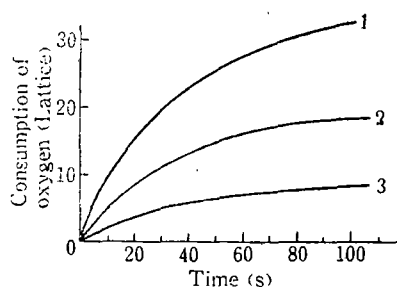


Fig 7. The curve of enzyme membrane reactive velocity.

1. 200 mg/dl; 2. 100mg/dl;
3. 50 mg/dl.

故本文在 1×10^3 — 1×10^4 Gy 的剂量范围内研究了剂量对酶膜性能的影响。

由图 3.4 可知, 剂量低时, 由于聚合过程中伴随着的交联反应程度低, 聚合物结构较疏松, 网络结构比较大, 包埋在聚合物内部的酶容易渗漏, 导致保留活力及反应耗氧量均不高。反之, 随着剂量的增大, 交联程度的不断提高, 聚合物结构中的网格变得致密, 故酶保留活力和耗氧量逐渐提高, 但达到一定的聚合剂量后, 由于通透性的影响, 保留活力和耗氧量又逐渐下降, 根据实验结果, 选择聚合时的剂量为 4×10^3 Gy 左右。

4. 辐射接枝后活性自由基的保留

尼龙辐射接枝 HEMA 后, 经用西德 Bruker-ER 200 D 电子自旋共振仪测定活性自由基, 表明

可能有 $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OC}_2\text{H}_4\text{OH} \end{array} \end{array}$ 自由基出现。由于活性自由基的存在, 后再经 HEMA 酶溶液辐

照包埋后, HEMA 单体分子与自由基结合, 形成交联网格状的聚合物结构, 致使固定化酶膜的机械强度提高, 保留活力增加。

5. 葡萄糖氧化酶膜临床应用试验

(1) 酶膜反应速度曲线 取 50 mg/dl、100 mg/d、1200 mg/dl 三种浓度的葡萄糖标准液, 利用 CY-4 型测氧仪, 记录 0—90 s 内反应耗氧量(小格), 结果见图 7, 表明反应在 10 s 后呈线性加速, 30—60 s 间渐趋平缓, 60 s 后明显减慢并渐趋结束。

(2) 线性范围 由于血糖的正常参考范围为 75—105 mg/dl, 病理状态下可能超过 200 mg/dl, 也可能低于 50 mg/dl, 故配制一组 25—400 mg/dl 的标准葡萄糖溶液, 按(1)步骤操作(见表 1)。

Tab 1. The relationship between the concentration of glucose and the consumption of oxygen.

Concentration of glucose (mg/dl)	25	50	100	200	300	400
Consumption of oxygen (Lattice)	3.5	6.5	12	25	38	52

(3) 使用寿命试验 取 100 mg/dl 葡萄糖标准液, 按(1)步骤反复操作 500 次, 结果第一次耗氧量为 14 小格, 第 500 次为 13 小格。

(4) 重复性试验 取 100 和 200 mg/dl 葡萄糖标准液, 按(1)方法反复操作 10 次, 记录其氧耗量(见表 2)。

Tab 2. Repeated test of the concentration of glucose on the consumption of oxygen

Concentration of glucose (mg/dl)	Consumption of oxygen (Lattice)										$\bar{X}$	(CV%)
100	12	11	12	12	12	11.5	11.5	11.5	11.5	12	11.70	2.98
200	23	24	24.5	23.5	23.5	24	24	24.5	23	23.5	23.75	2.27

(5) 回收试验 在 5 只试管中分别加入一定量的血浆样品(葡萄糖含量为 105 mg/dl), 再分别加入不同浓度的葡萄糖标准溶液, 同样按(1)方法操作, 测得其回收率为 96.5—102.4%。

(6) 与葡萄糖氧化酶比色法检测结果比较 用葡萄糖氧化酶比色法与酶电极法分别对 50 例临床血浆样本(以草酸钾、氟化钠抗凝)进行平衡检测, 结果两者相关系数 r 为 0.9612, 两者相关性较好。

结 论

(1) 以尼龙网为基材, 利用辐射接枝、辐射包埋法制得的葡萄糖氧化酶膜, 具有保留活力高、反应通透性好、使用寿命长等优点。配以氧电极和测氧仪可以用于临床诊断血糖测定, 具有重复性好、清洗容易、回复时间快等优点。

(2) 电子自旋共振谱图表明, 尼龙网辐射接枝 HEMA 后, 保留有活性自由基的存在, 后经辐射包埋酶后, 制成的酶膜强度好, 不易脱落, 大大地提高了酶膜的使用效率。

参 考 文 献

- [1] 日本, 公开特许公报, 昭 55-131392。
- [2] 日本, 公开特许公报, 昭 56-39788。
- [3] 日本, 公开特许公报, 昭 58-224688。
- [4] 日本, 公开特许公报, 昭 59-48078。
- [5] 张龙翔、张庭芳、李令媛主编, 生化实验方法和技术, 人民教育出版社, 1981 年, 第 9 页。

(稿件收到期: 1989 年 5 月 5 日)

STUDY ON THE PREPARATION OF IMMOBILIZED GLUCOSE OXIDASE MEMBRANE AND ITS APPLICATION IN CLINIC ANALYSIS

Yu Ye, Cao Jin and Su Zongxian

(East China University of Chemical Technology, Shanghai)

Chen Zhixiong

(Shanghai Seaman Hospital, Shanghai)

ABSTRACT The paper deals with the preparation of immobilized glucose oxidase membrane by using two steps irradiation (irradiation grafting, irradiation entrapping). Some properties of membrane were discussed. The immobilized glucose oxidase membrane with oxygen electrode and oxygen analyser can be satisfied with the clinic analysis for the determination of serum glucose.

KEY WORDS Immobilized enzyme membrane, Irradiation grafting, Irradiation entrapping, Nylon net, HEMA, Clinic analysis

(上接第162页)

INFLUENCE OF CAFFEINE ON FRACTIONATED IRRADIATION IN WHEAT AND BARLEY

Gu Ruiqi and Shen Huiming

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia, Sinica Shanghai)

ABSTRACT Fractionated irradiation is one of the important methods studying repair of radiation damage. Some authors reported that caffeine, a repair inhibitor, had no effects on fractionated irradiation in human cell, animal cell and *Vicia faba*. And they concluded that caffeine inhibited the repair of potentially lethal damage (PLD), but did not inhibit the repair of sub-lethal damage (SLD). In this study, the effect of caffeine on the repair of PLD and SLD were reexamined in wheat and barley systems. The germinating seeds of wheat or barley were pre-irradiation treated 3 h with 5×10^{-3} mol/L caffeine, then they were irradiated by single or fractionated X-ray doses. The results showed that after caffeine treatment the effect of fractionated irradiation was disappeared. In this case, caffeine not only inhibited the repair of PLD but also inhibited the repair SLD.

In previous fractionated radiation experiments, the repairs during interval were discussed in detail, but the repairs after whole irradiation were neglected. According to the results of this experiment and some early reports about fractionated irradiation, the repair efficiency during interval and the repair function after whole irradiation were discussed.

KEY WORDS Fractionated irradiation, Caffeine, Sub-lethal damage, Potentially lethal damage, Repair, Wheat and barley