



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101054574 B

(45) 授权公告日 2010.05.19

(21) 申请号 200710008762.6

(22) 申请日 2007.03.30

(73) 专利权人 福州大学

地址 350002 福建省福州市工业路 523 号

(72) 发明人 陈曦 王旭东 邱彬 陈国南

谢增鸿

(74) 专利代理机构 福州元创专利商标代理有限

公司 35100

代理人 蔡学俊

(51) Int. Cl.

C12N 11/04 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1396264 A, 2003.02.12, 说明书第 2 页实施例 1, 说明书第 2 页第 5 段倒数第 1-2 行, .

王旭东等. 葡萄糖氧化酶有机改性溶胶-凝胶包埋及传感测定. 第四届海峡两岸分析化学学术会议论文集. 2006, 第 22 页第 3 段.

审查员 朱晓乐

权利要求书 1 页 说明书 2 页

(54) 发明名称

有机改性溶胶-凝胶固定葡萄糖氧化酶的方法

(57) 摘要

本发明提供一种有机改性溶胶-凝胶固定葡萄糖氧化酶的方法, 将四甲氧基硅烷与二甲基二甲氧基硅烷混匀后加入与四甲基硅烷同体积的 HCl 水溶液; 将混合液置于小瓶中, 加带小孔的盖子于水浴中搅拌水解; 静置 3~5 分钟, 留下层凝胶液备用; 将聚乙烯醇水溶液和制备的凝胶液混合, 静置 3~5 分钟后, 取静置分层后的上清液与溶解有葡萄糖氧化酶的磷酸缓冲液混合, 在所需基质表面均匀涂膜, 干燥成型。本发明成功的解决了单纯使用 PVA 包埋存在的溶胀性问题; 葡萄糖氧化酶被物理地包埋在凝胶液与 PVA 杂化形成的多孔基质中, 不易发生流失; 保持了葡萄糖氧化酶的活性和稳定性, 在冰箱中能长期保存。

1. 一种有机改性溶胶-凝胶固定葡萄糖氧化酶的方法,其特征在于:

1) 将四甲氧基硅烷与二甲基二甲氧基硅烷按体积比 1 : 1.2 混匀;再加入与四甲氧基硅烷同体积的 0.01mol/L 的 HCl 水溶液,在超声振荡下逐滴加入 HCl 水溶液;将混合液置于小瓶中,加带小孔的盖子,于 60 ~ 70°C 水浴中搅拌水解;静置 3 ~ 5 分钟,留下层凝胶液备用;

2) 将 5% (W/V) 的聚乙烯醇水溶液和步骤 1) 制备的凝胶液按 1 : 1 体积比混合,聚乙烯醇水溶液与凝胶液的混合顺序为先加入 5% (W/V) 的聚乙烯醇水溶液,后在搅拌情况下逐滴加入凝胶液;静置 3 ~ 5 分钟后,取静置分层后的上清液与溶解有葡萄糖氧化酶的磷酸缓冲液按 1 : 1 体积比混合,在所需基质表面均匀涂膜,干燥成型;

所述的溶解有葡萄糖氧化酶的磷酸缓冲液中酶的浓度为 12.50mg/mL,所述磷酸缓冲液的 pH 值为 5 ~ 8。

2. 根据权利要求 1 所述的有机改性溶胶-凝胶固定葡萄糖氧化酶的方法,其特征在于:所述二甲基二甲氧基硅烷作为有机改性剂。

3. 根据权利要求 1 所述的有机改性溶胶-凝胶固定葡萄糖氧化酶的方法,其特征在于:所述的聚乙烯醇为 PVA-124。

有机改性溶胶 - 凝胶固定葡萄糖氧化酶的方法

技术领域

[0001] 本发明属于有机改性溶胶 - 凝胶包埋酶制备酶传感器的方法,更具体涉及一种有机改性溶胶 - 凝胶固定葡萄糖氧化酶的方法。

背景技术

[0002] 酶催化反应具有高效、快速、高度选择性等特点,因此受到了广泛的关注。但是未固定化的酶通常不稳定,难以重复使用,所以固定化酶技术显得十分必要。目前国内外常见的酶固定化技术主要有:物理吸附法(Liu et al., Biosensors & Bioelectronics 14(2000)883 ~ 893; Niculescu et al., Biosensors & Bioelectronics 19(2004)1175 ~ 1184)、共价键合法(Doretta et al., Biosensors & Bioelectronics 11(1996)365 ~ 373; Li et al., Biomaterials 19(1998)45 ~ 53)、包埋法(Peter et al., Biosensors & Bioelectronics 11(1996)1215 ~ 1219; Schmidt et al., Biosensors & Bioelectronics 11(1996)1139 ~ 1145; Tag et al., Sensors and Actuators B 67(2000)142 ~ 148; Yang et al., Analytica Chimica Acta 357(1997)41 ~ 49 Kwan et al., Biosensors & Bioelectronics 19(2004)1745-1752;)和交联法(Yang et al., Sensors and Actuators B 509(2004)151 ~ 157; Chiu et al., Food Research International 37(2004)212 ~ 223)。物理吸附法固定酶虽然操作简单,但稳定性较差,酶易流失,使用寿命较短;共价键合和交联法固定酶较复杂、费时,有时由于被固定的酶与基质之间较强的化学键合作用使被固定的酶活性降低、甚至失去活性;由于以上的缺点使得包埋法成为迄今为止应用研究最为广泛的固定化技术,该法的优点是对酶活性影响较小,酶不易流失,膜的孔径和几何形状可以控制,稳定性高,可长期储存。

[0003] 溶胶 - 凝胶包埋法能保持被固定试剂或微生物的液相性质,很适合于生物分子或者有生物活性的物质如细菌等的固定,但是溶胶 - 凝胶法也存在泄漏和稳定性差等问题。因此,探索酶的有效包埋方法,制备响应灵敏、稳定和活性保持高的葡萄糖氧化酶固定化膜,仍有待于进一步研究。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种采用有机改性溶胶 - 凝胶固定葡萄糖氧化酶的方法,通过固定条件的优化,获得了响应迅速、灵敏、稳定、使用寿命长、线性范围宽的葡萄糖氧化酶传感膜。

[0005] 本发明有机改性溶胶 - 凝胶固定葡萄糖氧化酶的方法是:

[0006] 1) 将四甲氧基硅烷与二甲基二甲氧基硅烷按体积比 1 : 1.2 混匀;再加入与四甲氧基硅烷同体积的 0.01mol/L 的 HCl 水溶液;将混合液置于小瓶中,加带小孔的盖子,于 60 ~ 70°C 水浴中搅拌水解;静置 3 ~ 5 分钟,留下层凝胶液备用;

[0007] 2) 将 5% (W/V) 的聚乙烯醇水溶液和步骤 1) 制备的凝胶液按 1 : 1 体积比混合,静置 3 ~ 5 分钟后,取静置分层后的上清液与溶解有葡萄糖氧化酶的磷酸缓冲液按 1 : 1

体积比混合,在所需基质表面均匀涂膜,干燥成型。

[0008] 本发明与现有的其他方法相比,采用有机改性溶胶-凝胶杂化 PVA 包埋葡萄糖氧化酶的方法具有以下显著优点:

[0009] (1) 通过有机改性溶胶-凝胶过程,以凝胶液掺杂 PVA 的方法包埋葡萄糖氧化酶,成功的解决了单纯采用 PVA 包埋的溶胀问题;葡萄糖氧化酶被物理地包埋在凝胶液与 PVA 杂化形成的多孔基质中,不易发生流失;制备的传感膜同玻璃、光纤等载体有很好的粘合作用,长期浸泡存放也未发现有脱落、溶解或溶胀现象。

[0010] (2) 制备的传感膜具有良好的通透性,能保持葡萄糖氧化酶处于液体的微环境中。

[0011] (3) 能保持葡萄糖氧化酶的活性和稳定性,能在冰箱中长期存放。

具体实施方式

[0012] 根据本发明内容所述步骤进行固定葡萄糖氧化酶,其中溶解有葡萄糖氧化酶的磷酸缓冲液中酶的浓度为 0 ~ 12.50mg/mL 磷酸缓冲液的 pH 值为 5 ~ 8;二甲基二甲氧基硅烷作为有机改性剂;在超声振荡下逐滴加入 HCl 水溶液;步骤 2) 中聚乙烯醇水溶液与凝胶液的混合顺序为先加入 5% (W/V) 的聚乙烯醇水溶液,后在搅拌情况下逐滴加入凝胶液。

[0013] 所采用的聚乙烯醇为 PVA-124。

[0014] 以下实施实例将对本发明作进一步的说明:

[0015] 实施例 1

[0016] 将四甲氧基硅烷 (TMOS) 与二甲基二甲氧基硅烷 (DiMe-DMOS) 按 1 : 1.2 体积比混匀;在超声振荡下逐滴加入与四甲氧基硅烷同体积的 0.01mol/L 的 HCl 水溶液;将混合液置于小瓶中,加带小孔的盖子,于 60°C 水浴中搅拌水解;反应后溶液下层呈乳白胶状;静置 3 分钟,留下层凝胶液备用;将 5% (W/V) 的 PVA-124 水溶液和上述凝胶液按 1 : 1 体积比混合(先加入 5% (W/V) 的 PVA-124 水溶液,后在搅拌情况下逐滴加入凝胶液),静置 3 分钟后,取上清液与溶解有葡萄糖氧化酶的磷酸缓冲液按 1 : 1 体积比混合,可在玻璃、氧传感探头等表面铺成不同厚度的膜,室温干燥成型。

[0017] 采用上述制备方法固定葡萄糖氧化酶,制备葡萄糖氧化酶传感膜,并将此传感膜直接固化于氧传感膜表面,利用氧传感膜进行二次传感检测溶解氧浓度的变化。所使用的氧传感膜以 4,7-二苯基-1,10-邻菲咯啉钌为荧光探针,以有机改性硅酸盐凝胶为基质,基于荧光猝灭原理检测溶解氧,溶解氧浓度的改变间接反应葡萄糖的浓度变化,从而考察固定化的葡萄糖氧化酶催化氧化葡萄糖的能力。