

2000-05-28

## Determination of Kinetic Parameters of Enzyme-immunoelectrode for SEC Assay

Sa-Ying DONG

Xin-miao LIU

Yuan-zhi WANG

Guang-zhang CHEN

Ming-xiang LV

Bo-yi TIAN

---

### Recommended Citation

Sa-Ying DONG, Xin-miao LIU, Yuan-zhi WANG, Guang-zhang CHEN, Ming-xiang LV, Bo-yi TIAN. Determination of Kinetic Parameters of Enzyme-immunoelectrode for SEC Assay[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2000 , 6(2): 175-180.

DOI: 10.61558/2993-074X.1378

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol6/iss2/5>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

文章编号:1006-3471(2000)02-0175-06

# 检测肠毒素用酶免疫电极动力学参数的测定

董飒英<sup>\*1</sup>, 刘馨苗<sup>1</sup>, 王远志<sup>1</sup>, 陈光章<sup>1</sup>, 吕鸣祥<sup>2</sup>, 田波义<sup>2</sup>

(1 七二五研究所青岛分部, 山东青岛 266071; 2 天津大学化工学院, 天津 300072)

**摘要:** 应用恒电位极化法探讨了酶免疫电极的响应机理, 通过旋转圆盘电极确定了生物电极的速度控制步骤, 根据交流阻抗谱的分析, 计算了各种生物电极在不同电极电位下的动力学参数, 并进行了比较分析.

**关键词:** 酶免疫电极, 肠毒素, 动力学参数

**中图分类号:** O 657.1

**文献标识码:** A

生物化学和生物技术的发展为毒素的痕量检测提供了可能性, 毒素不仅(毒性大)威胁人体健康, 而且含量低, 难于探测. 肠毒素(Staphylococcal Enterotoxin)的检测具有重要的军事意义和临床应用价值, 肠毒素可导致严重的食物中毒, 它既是生化战剂的主要组成部分, 又是临床研究的重要课题, 它的微量(痕量)检测对于大面积烧(创)伤病人的早期诊治至关重要<sup>[1]</sup>. 近几年来, 毒素检测方法可以分为基于免疫测试的生物学方法和基于光谱技术的化学方法. 质谱法, 液相色谱法, 毛细管电泳法, 电喷雾技术, 压电石英晶体, 光导纤维等以及它们的相互结合均被应用于检测血样或唾液中毒素抗体(抗原)的含量<sup>[2-6]</sup>, 但这些方法均有样品预处理麻烦, 设备昂贵, 操作复杂等缺点. 近期报道的磁微盘化学荧光免疫测试是利用磁分离技术与免疫反应相结合的具有较高灵敏度的检测方法<sup>[7]</sup>, Gundersen 等已证明酶联磁场免疫测试与酶联免疫法具有相同的检测水平(但检测时间较短)<sup>[4]</sup>, 为此我们利用电化学方法和酶联免疫测试相结合对毒素进行检测, 电化学方法具有制样简单, 测试时间短, 成本低, 灵敏度高的优点. 作者曾先后利用循环伏安法、原位博里叶变换红外光谱法对酶免疫电极进行了研究<sup>[8,9]</sup>, 从分子水平上探讨了大分子生物活性物质在电极表面的性能. 本文主要通过交流阻抗谱的测试, 计算了各实验条件下的动力学参数, 对酶免疫电极的动力学过程有了进一步的认识.

## 1 实验

Model 273A恒电位/恒电流仪, Model352腐蚀测试及分析软件和Model398电化学阻抗

收稿日期:1999-09-12, 修订日期:1999-12-14

\* 通讯联系人

基金项目:国防科工委基金项目(JW04165)

测量系统,以及我所研制的 XYD-3 型旋转电极.

## 1.2 实验试剂

实验中所有试剂均为分析纯,溶液均用二次蒸馏水配制.葡萄糖氧化酶(Glucose Oxidase, 127U/mg)购自日本 TOYOBO 有限公司,牛血清白蛋白(BSA)由上海丽珠东风生物技术有限公司生产,二甲氨基甲基二茂铁(介体)购自美国 Aldrich 化学公司,肠毒素 SEC 的抗原和抗体由中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所提供.缓冲溶液为 pH5.6 的醋酸缓冲溶液和 pH7.0 的磷酸缓冲溶液.电极镀铂溶液为 10 g/L  $\text{H}_2\text{PtCl}_2 + 0.6 \text{ g/L Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} + 0.1 \text{ mol/L NaCl}$  溶液,电解质溶液由 100 mmol/L 葡萄糖 + 2 mmol/L 介体 + pH7.0 缓冲溶液组成.所有电化学测试均在电解质溶液中进行.

## 1.3 实验方法

### (1) 酶电极的制备

玻碳电极( $\text{O} 5.0 \text{ mm}$ )经打磨、抛光、清洗后,置于镀铂溶液中,在  $-250 \text{ mV}$  (vs. SCE) 下镀铂 15 min,然后浸入( $3.8 \times 10^5 \text{ U/L GOD} + 10 \text{ g/L BSA}$ )溶液,室温下反应 1 h,制得吸附酶电极;将镀铂玻碳电极于  $1.20 \text{ V}$  (vs. SCE) 电位下,阳极极化 1 h,使荷负电的 GOD 与 BSA 一起沉积于电极表面,由此制得沉积酶电极.

### (2) 酶免疫电极的制备

将吸附法和电沉积法制得的酶电极用二次水冲洗后,浸入 25 g/L 戊二醛溶液中反应 30 min,再浸入 400 mg/L SEC 抗体溶液中反应 30 min,即制得酶免疫电极.将酶免疫电极浸入  $80 \mu\text{g/L}$  SEC 抗原溶液中反应 30 min,制造了生物功能电极.

### (3) 电化学测试

文中所有电极电位均相对于饱和甘汞电极.采用经典三电极体系,对电极为铂片,参比电极是饱和甘汞电极,恒电位极化法和旋转电极试验均以铂盘( $\text{O} 3.5 \text{ mm}$ )作为研究电极.交流阻抗测试则以玻碳电极作为研究电极,在电极电位分别为  $0.2 \text{ V}$ ,  $0.308 \text{ V}$ ,  $0.392 \text{ V}$ ,  $0.5 \text{ V}$ ,  $0.6 \text{ V}$  下,测定了吸附酶电极,酶免疫电极和生物功能电极的阻抗谱,同时还测定了沉积法的生物电极在  $0.3 \text{ V}$ ,  $0.4 \text{ V}$  下的阻抗谱.电化学阻抗谱的测定是在  $0.01 \text{ Hz} \sim 100 \text{ kHz}$ ,正弦波幅值  $5 \text{ mV}$  的条件下进行的.

## 2 结果与讨论

根据循环伏安图的测定,介体的还原峰电位为  $0.308 \text{ V}$ ,在此电位下进行恒电位极化,图 1 示出由吸附法制得的酶电极、酶免疫电极和生物功能电极的  $I-t$  曲线.由图可见,酶电极的响应电流最大,酶免疫电极的最小,生物功能电极的居中.这是由于抗体与酶的耦联可能改变酶的结构或占据酶的活性中心,从而降低酶对底物的催化作用,而抗原与抗体的结合又部分地恢复了酶固有的构型或部分地释放了酶的活性中心,从而又部分地提高了酶的催化活性.可见抗原与抗体间的免疫反应对酶的活性有调制作用.这里我们通过具体的实验验证了 G. A. Robinson 的酶调制机理<sup>[10]</sup>.并以提高抗原的纯度,抗体的特异性,以及选择适合酶活性的底物

浓度,离子强度,pH值和温度等条件来增大响应电流间的差值,使这一调制机理对实际检测具有指导意义。

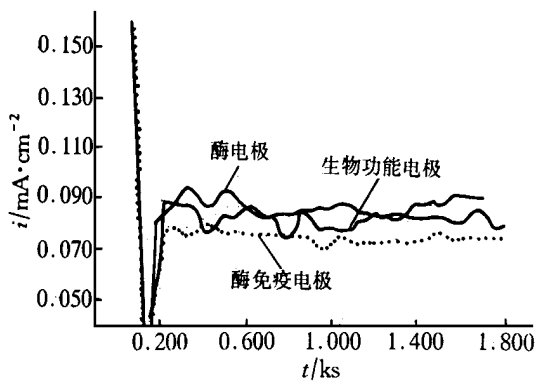


图 1 生物电极恒电位极化曲线  
Fig. 1 Potentiostatic curves of the bioelectrodes

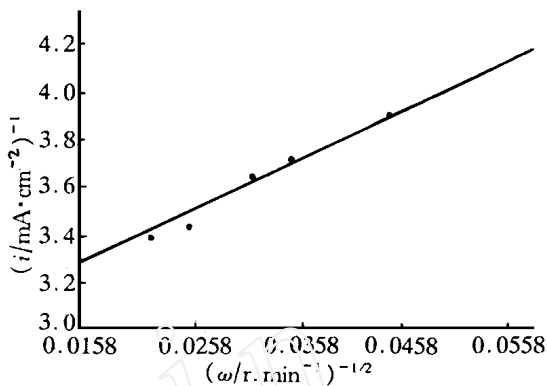


图 2 酶电极  $i^{-1/2}$  随  $i^{-1}$  变化关系  
Fig. 2 The Relation between  $i^{-1/2}$  and  $i^{-1}$  for GOD electrode

由于旋转圆盘电极具有达稳态时间短,灵敏度高,电极表面电流分布均匀的优点,我们在相同条件下,应用恒电位极化旋转圆盘电极(吸附法),测定其响应电流与转速间的关系,结果得到一条不通过坐标原点的直线(如图 2).可见,此时酶电极反应是由不饱和酶动力学和底物传质步骤联合控制的,且与按 W. J. Albery 理论的计算结果一致<sup>[11]</sup>. 转速为 1 500 r/min 时,响应电流达到最大值 2.9 A/m<sup>2</sup>,并且不再随转速的提高而增大,此时的电流值约为静态响应电流的(0.8 A/m<sup>2</sup>)3.6 倍。

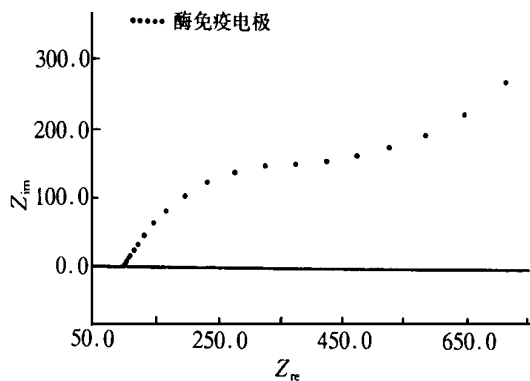


图 3 酶免疫电极 Nyquist 图  
Fig. 3 The Nyquist plot of enzyme immunoelectrode

图 3 是在 0.308 V 电位下酶免疫电极(吸附法)的复数阻抗图,此时电极表面虽然经镀铂黑处理后联有酶和抗体两层生物蛋白质,但其阻抗谱并不复杂,是典型的混合控制体系的复数阻抗图,表明生物分子对介体到达电极表面已有一定的空间阻碍作用.在此基础上,我们还测定了其它电位下(0.2 V,0.392 V,0.5 V,0.6 V)酶电极、酶免疫电极和生物功能电极的交流阻抗谱,为了比较,同时测出了沉积法制备的生物电极在 0.308 V,0.392 V 下的图谱,并计算了各实验条件下的溶液电阻、电化学反应电阻和电极的双电层电容值,如表 1 所列.从这些数据可得如下几点推论:

1) 电解质溶液电阻约为 100 ,基本不随实验条件改变,这主要是因为电解液中含有高浓度的粘稠性物质葡萄糖,导致溶液电阻较大,使得电极表面状态的变化(不同生物膜)对溶液电

阻的影响可被忽略.再者由电沉积法制得的生物电极的溶液电阻比吸附法的略有增大.这可能是因为电极表面耦联的酶量高于吸附法.电极表面生物膜比较致密,增加了还原性介体到达电极表面的阻力所致,又因酶在电极表面耦联得过于紧密牢固,使酶活性损失较大,从而表现为其电化学表面积小于相应电位下吸附法的表面积,而反应电阻却明显高于吸附法的反应电阻.

2)在 0.5 V,0.6 V 的高电位下,吸附法生物电极均表现为反应电阻增大,表面积减小.此时由于过电位较大,电化学反应易于进行.但酶、抗原、抗体等生物分子对介体的空间阻碍作用非常明显,以致于扩散成为速度控制步骤.

3)在相同电位下,三种生物电极的电化学表面积相差不大,这是由于电极表面抗原、抗体量并不多,所以对酶活性的调制作用不是特别明显.对于吸附法的生物电极,在 0.2 V,0.308 V,0.392 V 电位下,其电化学活性表面积有:酶电极 > 生物功能电极 > 酶免疫电极.这与图 1 中恒定电位极化的结果一致,从而也说明了免疫反应对酶活性的调制作用.最后,对于不同的极化电位,在 0.308 V 下,生物电极(吸附法和沉积法)的反应电阻最小,说明在此电位下,生物电极的电化学反应速度较快,所以,对于实用性的生物传感器,其极化电位宜选为 0.308 V.

表 1 不同电位下各种生物电极的动力学参数

Tab. 1 Kinetic parameters of various bioelectrodes with different potentials

Adsorption methods	0.2 V			0.308 V			0.392 V		
	C/ mF	Rr/ K	Rs/ K	C/ mF	Rr/ K	Rs/ K	C/ mF	Rr/ K	Rs/ K
Enzyme electrode	0.8678	0.6462	0.1163	0.6879	0.5813	0.1036	0.4451	1.2599	0.0957
Enzyme immuno-electrode	0.5487	0.7287	0.1138	0.4322	0.5412	0.0994	0.3355	1.6717	0.1148
Functional bioelectrode	0.5997	0.6668	0.1287	0.6435	0.6214	0.0704	0.3377	1.6607	0.1111
Adsorption methods	0.5 V			0.6 V					
	C/ mF	Rr/ K	Rs/ K	C/ mF	Rr/ K	Rs/ K			
Enzyme electrode	0.1822	3.8095	0.1255				5.2300	0.1000	
Enzyme immuno-electrode	0.1874	3.7036	0.1144				0.1329	3.0096	0.1394
Functional bioelectrode							0.1400	2.8568	0.0922
Electrodeposition methods	0.308 V			0.392 V					
	C/ mF	Rr/ K	Rs/ K	C/ mF	Rr/ K	Rs/ K			
Enzyme electrode	0.1350	4.1529	0.1501				0.0846	8.2089	0.1261
Enzyme immuno-electrode	0.1912	3.6301	0.1849				0.0867	8.0107	0.1493
Functional bioelectrode		0.8983	0.0560				0.0893	8.8950	0.1950

### 3 结 论

- 1) 恒电位极化法验证了酶免疫电极的调制机理.可通过酶活性的变化间接检测抗原浓度.
- 2) 生物电极反应是由不饱和酶的动力学步骤和底物传质联合控制的.
- 3) 利用吸附法在镀铂黑电极上制备酶免疫传感器,控制极化电位 0.308 V,将会获得较大的响

应电流和较高的检测灵敏度.

## Determination of Kinetic Parameters of Enzyme-immunoelectrode for SEC Assay

DONG Sa-Ying<sup>1</sup>, LIU Xin-miao<sup>1</sup>, WANG Yuan-zhi<sup>1</sup>, CHEN Guang-zhang<sup>1</sup>,  
LV Ming-xiang<sup>2</sup>, TIAN Bo-yi<sup>2</sup>

(1. 725 Research Institute Qingdao Branch, Qingdao 266071, China;

2. College of Chemical Engineering of Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract :** Reaction mechanism of enzyme immunoelectrode is studied by potentiostatic. Rotating disk electrode is used to determine the controlling step of bioelectrode. Under different potentials and different modifying conditions, kinetic parameters of bioelectrodes were measured on the base of electrochemical impedance spectra. At the same time, these parameters are compared and discussed.

**Key words :** Enzyme immunoelectrode, Staphylococcal Enterotoxin, kinetic parameters

### References :

- [1] Shi ZG, Yu Y, Yao YM, et al. The effect of the Staphylococcal enterotoxin B on rabbit's organ function [J]. J of Hygiene Research, 1998, Suppl. (27) :187.
- [2] Charles E. Kientz, Albert G Hulst, Eric RJ. Wils. Determination of staphylococcal enterotoxin B by on-line (micro) liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. Journal of chromatography A, 1997, 757 :51.
- [3] Ichiro Tajima, Osamu Asami, Eiko Sugiura. Monitor of antibodies in human saliva using a piezoelectric quartz crystal biosensor [J]. Analytica Chimica Acta, 1998, 365 :147.
- [4] Hao Yu, Hafiz Ahmed, Garado R. Vasta. Development of a magentic microplate chemifluorimmunoassay for rapid detection of bacteria and toxin in blood [J]. Analytical biochemistry, 1998, 261 :1.
- [5] F Garcia Sanchez, A Navas Diaz, A F Gonzalez Diaz, S A Eremin. Quantification of 2,4,5-trichlorophenocycetic acid by fluorescence enzyme-linked immunosorbent assay with secondary antibody [J]. Analytica Chimica Acta, 1999, 378 :219.
- [6] Randy M Wadkinst, Joel P Golden, Leo M Pritsiolas, Frances S Ligler. Detection of multiple toxic agents using a planar array immunosensor [J]. Biosensors & Bioelectronics, 1998, 13(3 - 4) :407.

- [7] Yu H. Use of an immunomagnetic separation-fluorescent immunoassay (IMS - FIA) for rapid and high throughput analysis of environmental water samples[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1998, 376:77.
- [8] Dong S Y, Lv M X. Spectroscopic analyses of bioelectrodes[J]. In: *Extended Abstracts of International Ecomaterials Conference: Part B*, Xi 'an: Chinese Materials research Society and Japan Ecomaterials Forum, 1995: PA - 536.
- [9] Dong SY, Lv MX, Huang ZC. In situ FTIR reflection spectroscopy of HCG enzyme immunoelectrode[J]. *Chinese journal of biomedical engineering*, 1995, 14(2):107.
- [10] Robinson GA, Cole VM, Forrest GC. Homogeneous electrode - based bioelectrochemical immunoassay for human chorionic gonadotrophin[J]. *Biosensors*, 1987/88, 3:147.
- [11] Tian By. Research report on enzyme immunoelectrode for SEC1:[Master 's Degree Paper][M]. Tianjin: The chemical engineering college of Tianjin University, 1999.

www.cnki.net