



海藻酸钠凝胶固定化双酶快速检测葡萄糖 综合实验设计

刘艳红¹, 王娜², 李静^{1*}

(1. 四川大学基础化学实验教学中心, 成都 610064; 2. 四川大学化学学院, 成都 610064)

摘要: 通过海藻酸钠凝胶共固定葡萄糖氧化酶(GOx)和辣根过氧化物酶(HRP)构建了快速检测葡萄糖含量的双酶级联反应器。实验采用扫描电子显微镜和傅里叶红外光谱分析了海藻酸钠凝胶的微观形貌及化学组成。同时,对固定化双酶级联催化的葡萄糖反应体系进行优化并应用于饮料样本检测中。该实验以酶促反应为基础,利用双酶级联反应的机理建立了高效专一的葡萄糖检测方法,为酶催化的生物检测实验的设计提供了思路。

关键词: 海藻酸钠; 葡萄糖氧化酶; 辣根过氧化物酶; 级联反应; 固定化

中图分类号: G642.423

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20220146

Comprehensive Experimental Design of Immobilized Dual-enzymes in Sodium Alginate Hydrogel Beads for Rapid Detection of Glucose

LIU Yanhong¹, WANG Na², LI Jing^{1*}

(1. Experiment Teaching Center of Basic Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: To rapidly detect glucose, the immobilized dual-enzymes cascade reactor was designed by co-immobilizing glucose oxidase (GOx) and horseradish peroxidase (HRP). The micromorphology and chemical composition of sodium alginate hydrogel were analyzed by using the scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Meanwhile, the immobilized dual-enzymes co-catalytic system was optimized and applied for the detection of glucose in the beverage sample. Based on the enzyme-catalyzed reaction, an efficient and specific glucose detection method was established by using the cascade reaction of co-immobilized enzymes, which provides a promising strategy to design bio-detection experiments.

Key words: sodium alginate; glucose oxidase; horseradish peroxidase; cascade reaction; immobilization

双酶级联反应是指将催化核心反应的两种酶束缚在一定的空间内,顺序催化两步不同反应的连续进行^[1-2]。该反应通过酶催化的特异性和区域选择性,专一性地将反应体系中的初级底物转化为最终产物。两步反应环环相扣、互相促进,具有较高的原子经济性和可持续性,有效减少了副产物的产生,避免了中间产物的分离过程,反应效率明显提升,反应成本大幅降低^[3-5]。绿色、经

济、高效的反应特点促使双酶或多酶协同一锅串联反应广泛应用于生物反应器、生物传感器以及绿色合成中。

海藻酸钠(sodium alginate, SA)是具有溶胶-凝胶特性的天然聚阴离子多糖,由 β -(1,4)-D-甘露糖醛酸(β -D-mannuronic acid, 缩写 M)和 α -L-古洛糖醛酸(α -L-guluronic acid, 缩写 G)以(1 \rightarrow 4)糖苷键连接而成。海藻酸钠分子链中 G 单元与二价金

收稿日期: 2022-03-15; 修回日期: 2023-05-08

基金项目: 四川大学新世纪高等教育教学改革工程第十期项目资助(SCU10259); 四川大学教改项目(SCU8160); 四川大学研究生教育教学改革项目(GSSCU2021093); 国家自然科学基金联合基金(U21A20308)。

作者简介: 刘艳红(1982-), 女, 硕士, 实验师, 主要从事大型仪器设备管理与实验教学工作。

*通信作者: 李静(1981-), 女, 硕士, 高级实验师, 主要从事大型仪器运行管理与实验教学方面的研究。E-mail: jingli@scu.edu.cn

属离子(如 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 等)具有较高的亲和力,二者通过离子交联形成“蛋壳”模型的三维网状结构^[6]。由于海藻酸钠凝胶原料丰富、制备简便、成本低廉且具有良好的生物相容性、生物降解性和传质性能,常被作为稳定剂、增稠剂、乳化剂、助悬剂等应用于医用材料、食品加工、水果保鲜、药物生产等领域^[7-11]。

葡萄糖是动植物体内最重要的一类单糖分子,通过糖酵解和无氧呼吸等方式为生物体的生长和繁殖提供能量。建立简便、灵敏、高效的葡萄糖含量检测方法对于临床、生命科学及食品领域都具有重要的意义^[12]。

实验采用海藻酸钠微球共固定葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOx)和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP),构建了高选择、高灵敏、可视化的葡萄糖含量检测方法,检测过程如图1所示。双酶级联反应的原理为GOx作用于 β -D-葡萄糖生成葡萄糖酸和过氧化氢,随后,HRP催化反应产物过氧化氢和底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)产生颜色反应,且颜色的深浅与葡萄糖的含量呈正相关^[13-14]。

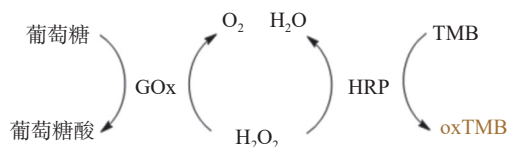


图1 GOx和HRP共固定检测葡萄糖含量的原理

1 实验试剂和仪器

1.1 实验试剂

葡萄糖氧化酶、辣根过氧化物酶、海藻酸钠和3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)(北京索莱宝科技有限公司);葡萄糖、麦芽糖、甘露糖、蔗糖、半乳糖、乳糖、果糖、 CaCl_2 (成都金山化学试剂公司);氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钾,均为分析纯(国产)。

1.2 实验仪器

SPARK多功能酶标仪(帝肯(上海)贸易有限公司),IT-09A5型磁力搅拌器(上海一恒仪器有限公司),XW-80A型涡旋振荡器(上海青浦泸西仪器厂),IQ7003型Milli-Q纯水仪(美国密理博有限公司),F12型移液器(艾本德中国有限公司),FA2105型电子分析天平(美国华志电子天平有限

公司),Quanta型扫描电子显微镜(美国FEI公司),Nicolet iS5型傅里叶红外光谱仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

2 实验方法

2.1 海藻酸钠微球的制备

称取2g海藻酸钠溶于100mL蒸馏水中,磁力搅拌器温和搅拌过夜。然后使用1mL注射器将海藻酸钠溶液缓慢滴加至4%的 CaCl_2 溶液中,边滴加边轻轻晃动,使海藻酸钠微球与 CaCl_2 溶液充分接触,室温静置30min后,吸去 CaCl_2 溶液,用蒸馏水洗涤3次,去除残余的钙离子,获得海藻酸钠微球。

2.2 海藻酸钠微球结构表征

利用扫描电子显微镜(SEM)分析海藻酸钠微球的微观形态。将冷冻干燥后的海藻酸钠微球经液氮脆断后,取部分截面置于圆形载物台的电胶片上,表面喷金处理后进行测试。

采用傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析海藻酸钠微球的表面官能团。将海藻酸钠微球在60℃烘干后,切成10mm×10mm的小块,按照要求设置参数进行检测。

2.3 海藻酸钠凝胶共固定GOx和HRP(SA/GOx-HRP)复合微球的制备

将0.05gGOx、0.15gHRP和0.2g海藻酸钠溶于10mL蒸馏水中,磁力搅拌器温和搅拌1h,得到含酶的海藻酸钠溶液。然后,用注射器逐滴加入 CaCl_2 溶液中,室温交联30min后,蒸馏水洗涤3次,得到GOx-HRP海藻酸钠复合微球。

2.4 双酶共固定检测葡萄糖反应体系的建立

2.4.1 SA/GOx-HRP酶活及工作曲线测定

用10mmol/L磷酸钠缓冲液(PBS,pH=7.2)配制浓度为1mmol/L的葡萄糖溶液,分别吸取5、10、20、40、60 μL 的葡萄糖溶液至96孔酶标板中,补充PBS至每孔反应液的体积为100 μL 。取GOx-HRP微球加入孔中,每孔一个,室温反应5min后,向上述反应液中加入50 μL TMB溶液,静置2min,每孔加入50 μL 终止液(2mol/L H_2SO_4)。以PBS为空白,利用多功能酶标仪检测450nm处的吸光值。然后以葡萄糖浓度为横坐标,OD₄₅₀值为纵坐标绘制工作曲线。

2.4.2 微球均一性检测

取40 μL 葡萄糖溶液(1mmol/L)和60 μL PBS

加入 96 孔酶标板中, 设置 10 个平行复孔。随机选取 10 个 GOx-HRP 复合微球分别加入到孔中, 每孔一个, 室温反应 5 min 后, 加入 50 μL TMB 溶液, 静置 2 min 后, 加入 50 μL 终止液(2 mol/L H_2SO_4), 检测 450 nm 处的吸光值。

2.4.3 微球固定化酶存储稳定性

将 SA/GOx-HRP 凝胶微球置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 每周取一个微球进行酶的稳定性测定, 连续检测 6 周, 检测方法同 2.4.1 节。然后, 以时间为横坐标, OD_{450} 值为纵坐标绘制曲线, 反映 SA/GOx-HRP 复合微球固定化酶在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 6 周后酶活性的变化。

2.4.4 固定化双酶反应选择性

分别配制浓度为 1 mmol/L 的甘露糖、半乳糖、果糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖和蔗糖溶液, 然后将不同的糖溶液作为底物, 考察 SA/GOx-HRP 凝胶微球对葡萄糖含量检测的选择性。SA/GODs-HRP 微球催化反应的检测方法同 2.4.1 节。

2.5 饮料样本检测

2.5.1 西瓜汁中葡萄糖含量的测定

将新鲜的西瓜汁分装于 1.5 mL EP 管中, 按 1500 r/min 离心 5 min 后取上清, 用 PBS 进行稀释, 得到系列稀释浓度。分别将不同浓度的西瓜

汁加入 96 孔酶标板中, 每孔 40 μL 。每孔加入一个 SA/GOx-HRP 复合微球, 通过固定化双酶催化的一锅串联反应检测饮料样本上清中的葡萄糖, 并根据工作曲线计算西瓜汁中葡萄糖的含量。

2.5.2 SA/GOx-HRP 复合微球的重复利用性

将稀释 256 倍的西瓜汁溶液, 加入 96 孔酶标板中, 每孔 40 μL , 实验平行设置 15 个孔。然后, 取 1 个微球加入到第一个孔中, 室温反应 5 min 后, 吸出微球, PBS 漂洗 3 次后, 加入到第二个孔中, 室温反应 5 min, 吸出微球, 以此类推, 该微球连续催化 15 次反应后丢弃, 在检测孔中加入 TMB 溶液和反应终止液, 检测 450 nm 处的吸光值。

3 实验结果

3.1 海藻酸钠微球结构表征

海藻酸钠溶液通过缓慢滴注的方式加入 CaCl_2 溶液后, 室温交联形成了规则的球形结构, 如图 2(a)所示, 微球表面光滑、大小均一、球体透明。经扫描电子显微镜分析显示, 冻干微球横截面具有不规则多孔洞的结构, 且孔洞三维交联, 孔径大小约为 50~200 μm , 如图 2(b)所示。海藻酸钠微球蓬松的孔洞结构可以用于蛋白或药物分子的装载。

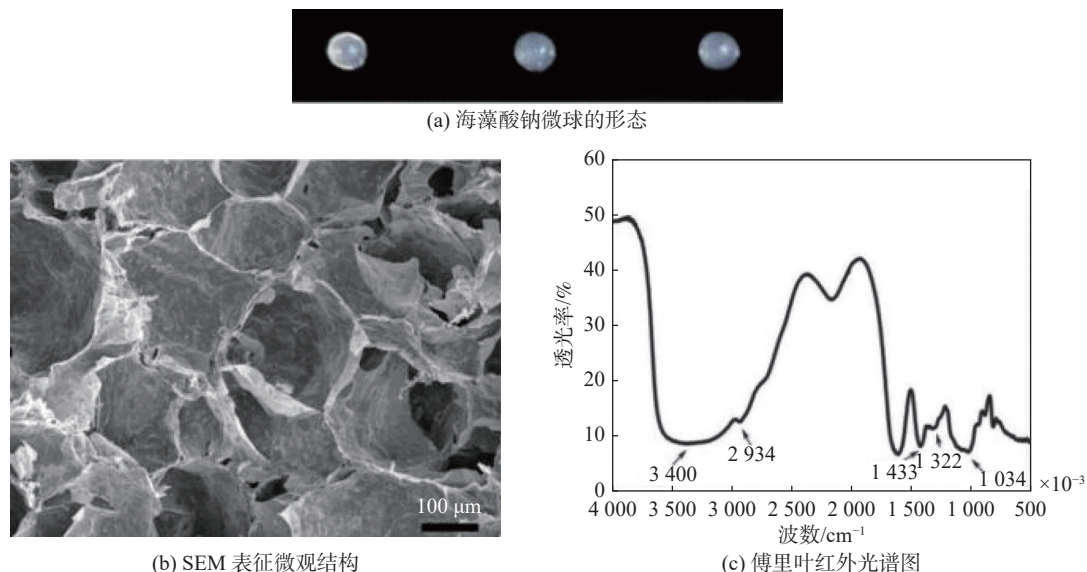


图 2 海藻酸钠微球结构表征

傅里叶红外光谱检测结果显示, 3 400 cm^{-1} 处宽吸收峰为羟基伸缩振动峰, 2 934 cm^{-1} 处弱的吸收峰属于 C—H 键的伸缩振动峰, 1 433 cm^{-1} 处为羧基的伸缩振动吸收峰, 而 1 034 cm^{-1} 处较强的吸

收峰为 C—O 键的伸缩振动峰, 如图 2(c)所示, 表明海藻酸钠微球结构中含有丰富的羟基和羧基, 这些阴离子的存在有利于蛋白质结构的稳定和活性的保持。

3.2 GOx 和 HRP 复合微球酶活测定

GOx 是一种具有高度专一性的需氧脱氢酶,在有氧的条件下,与 HRP 协同促进 D-葡萄糖的转化。反应过程中,GOx 催化生成的 H_2O_2 被 HRP 快速分解,有效降低了 H_2O_2 的过量积累对 GOx 的损害,提高了双酶的稳定性和催化反应的可持续性。实验考察了底物 D-葡萄糖浓度对 SA/GOx-HRP 固定化酶串联催化效率的影响,结果显示随着底物浓度的增加,吸光值逐渐增大。底物浓度为 10~60 nmol/L 时,反应速率逐渐变大,且葡萄糖的浓度与 OD_{450} 值呈线性相关性($R^2=0.996$)。当底物浓度为 60~100 nmol/L 时,反应速率变缓,吸光度值保持稳定,如图 3 所示,由此可知,当底物浓度为 60 nmol/L 时,SA/GOx-HRP 双酶级联催化的葡萄糖含量检测效果最佳。

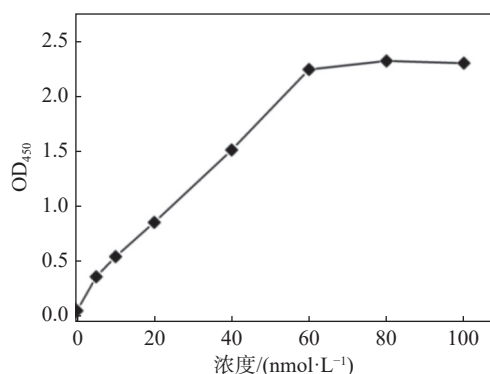


图3 底物浓度对酶活性的影响

3.3 SA/GOx-HRP 微球均一性检测

为了探讨 SA/GOx-HRP 催化活性的均一性,实验吸取 30 个微球,随机分为 10 组,每组 3 个。实验结果如图 4 所示,随机选取的 SA/GOx-HRP 微球在相同的反应条件下,反应效率几乎相同,表明实验制备的 SA/GOx-HRP 微球酶的催化活性相近,微球的载酶量基本相同。

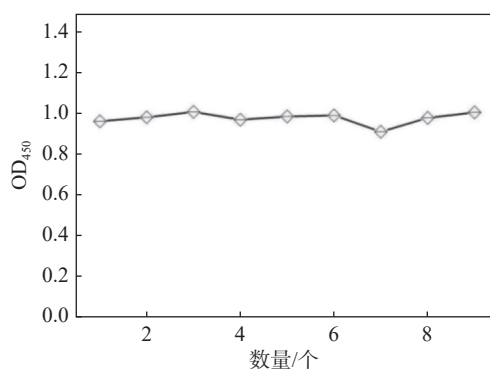


图4 SA/GOx-HRP 微球酶活的均一性

3.4 固定化酶的储藏稳定性

固定化酶的活性容易受储存环境、储存时间等因素的影响,实验对 GOx-HRP 固定化酶的储存稳定性进行分析,结果如图 5 所示,随着储存时间的延长,反应速率轻微下降,吸光度略有降低。

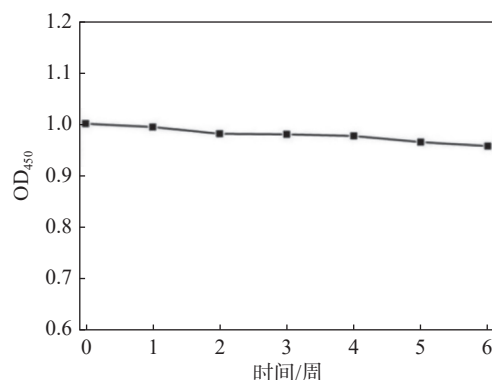


图5 储藏时间对双酶活性的影响

SA/GOx-HRP 固定化酶在 4 °C 放置 6 周后,酶的活性为储存前的 97.2%。该结果表明 GOx-HRP 经海藻酸钠固定后,蛋白质酶的活性稳定,在较长的储藏时间内仍然保持了较高的活性。

3.5 SA/GOx-HRP 固定化酶反应选择性

实验进一步探讨不同糖类化合物对双酶级联催化葡萄糖反应体系的影响,实验考察了甘露糖、半乳糖、果糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖和蔗糖对反应体系的影响,实验结果如图 6 所示。在检测的多种糖类化合物中,甘露糖、半乳糖、果糖、乳糖和蔗糖完全不反应;麦芽糖组检测到微弱的吸光值;而葡萄糖反应组,吸光值显著增加。该实验结果表明,SA/GOx-HRP 固定化酶检测体系对葡萄糖的检测具有高度选择性,检测过程不受其他糖类化合物的干扰,可以应用于食品、饮料、血液等样本中葡萄糖的测定。

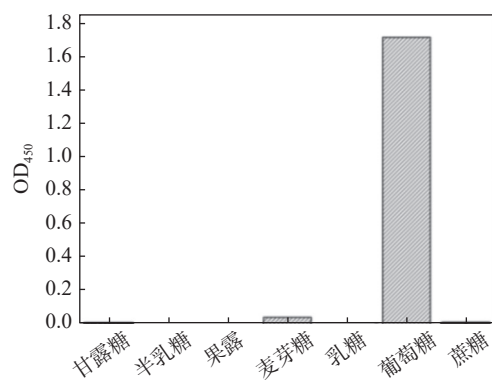


图6 不同糖类化合物对葡萄糖检测的影响

3.6 饮料样本中葡萄糖含量的检测

饮料样本西瓜汁中葡萄糖含量的检测结果如图 7 所示, 由于西瓜中含有大量的葡萄糖, 样本检测时, 需要将样本先进行稀释。随着葡萄糖稀释倍数的增加, 反应的颜色也由深绿色转变为浅黄绿色。当西瓜汁被稀释 256 倍时, 饮料中葡萄糖的含量为 7.9 nmol; 被稀释 512 倍时, 其葡萄糖的含量为 4.28 nmol。实验结果表明, SA/GOx-HRP 固定化酶葡萄糖检测体系在饮料样本葡萄糖检测中具有较高的灵敏性。

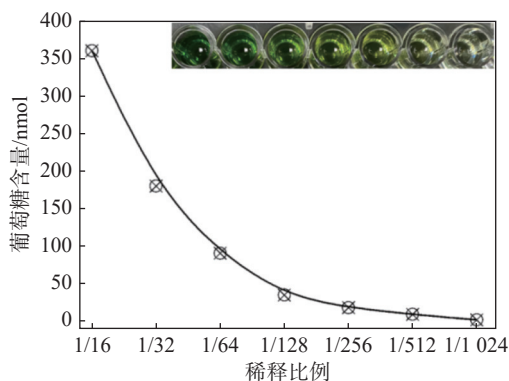


图 7 西瓜汁中葡萄糖含量测定

3.7 SA/GOx-HRP 固定化酶的重复利用性

固定化酶的回收再利用, 可以有效降低实验的成本。SA/GOx-HRP 微球在饮料样本检测中, 经多次回收利用, 反应效果如图 8 所示。在西瓜汁样本检测中, 固定化 GOx-HRP 酶的活性呈缓慢下降趋势, 在重复利用 15 次后, 酶的活性保持在 80% 左右, 表明 SA/GOx-HRP 固定化双酶可以多次回收再利用。这是由于 GOx 和 HRP 经海藻酸钠凝胶固定后, 降低了反应环境对蛋白质酶结构的影响, 提高了蛋白酶活性的稳定性。

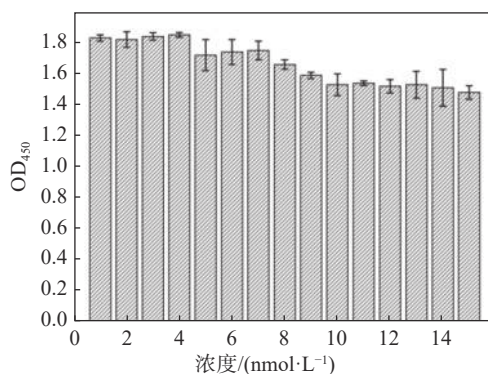


图 8 SA/GOx-HRP 微球的重复性检测

4 结束语

基于双酶级联催化的原理, 构建了 SA/GOx-HRP 高灵敏、高选择性、可视化葡萄糖检测体系。实验结果表明海藻酸钠凝胶具有蓬松孔洞结构且表面富含羟基和羧基基团。制备的 SA/GOx-HRP 双酶微球具有较高的稳定性和均一性。反应专一性检测结果显示 SA/GOx-HRP 双酶级联催化反应体系对底物具有高度选择性, 检测过程不受其他糖类化合物的干扰。SA/GOx-HRP 固定酶可以用于饮料样本中葡萄糖含量的检测。双酶固定化微球经多次回收再利用仍然保持较高的活性。

该实验将凝胶微球的制备、结构表征、双酶协同串联反应体系建立以及样本检测等多个知识点融为一体, 形成了内容系统完整、现象稳定、结果直观可视且富有趣味性的综合设计实验。在教学实践中, 有效激发了学生主动探究的兴趣和自主实践的积极性。

参考文献

- [1] 郭华, 张蕾, 董旭, 等. 固定化多酶级联反应器[J]. 化学进展, 2020, 32(4): 392-405.
- [2] CAO X Y, GUO Y M, ZHAO M, et al. An efficient multi-enzyme cascade platform based on mesoporous metal-organic frameworks for the detection of organophosphorus and glucose[J]. Food Chemistry, 2020, 381: 132282.
- [3] BILAL M, HUSSAIN N, AMERICO-PINHEIRO J H P, et al. Multi-enzyme co-immobilized nano-assemblies: Bringing enzymes together for expanding bio-catalysis scope to meet biotechnological challenges[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 186: 735-749.
- [4] CLAABEN C, GERLACH T, ROTHERA D. Stimulus-responsive regulation of enzyme activity for one-step and multi-step syntheses[J]. Advanced Synthesis Catalysis, 2019, 361: 2387-2401.
- [5] ZHANG H, HUA S F, ZHANG L. Co-immobilization of cellulase and glucose oxidase on graphene oxide by covalent bonds: A biocatalytic system for one-pot conversion of gluconic acid from carboxymethyl cellulose[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2020, 95(4): 1116-1125.
- [6] DHAMECHA D, MOVSAS R, SANO U, et al. Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future[J].

- International Journal of Pharmaceutics, 2019, 569: 118627.
- [7] COLEMAN R J, LAWRIE G, LAMBERT L K, et al. Phosphorylation of alginate: Synthesis, characterization, and evaluation of in vitro mineralization capacity[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(4): 889-897.
- [8] LEE K Y, MOONEY D. Alginate: Properties and biomedical applications[J]. *Journal of Polymer Science*, 2012, 37(1): 106-126.
- [9] CUADROS T R, SKURTYS O, AGUILERA J M. Mechanical properties of calcium alginate fibers produced with a microfluidic device[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 89(4): 1198-1206.
- [10] JOHNSON K A, MUZZIN N, TOUFANIAN S, et al. Drug-impregnated, pressurized gas expanded liquid-processed alginate hydrogel scaffolds for accelerated burn wound healing[J]. *Acta Biomaterial*, 2020, 112: 101-111.
- [11] GUPTA A, KOWLCZUK M, HEASELGRAVE W, et al. The production and application of hydrogels for wound management: A review[J]. *European Polymer Journal*, 2019, 111: 134-151.
- [12] 韩博林, 关桦楠, 龚德状, 等. 金磁微粒模拟酶检测食品中的葡萄糖[J]. *食品科学*, 2019, 40(22): 331-338.
- [13] 刘皓, 乔巨涛, 方纾, 等. 基于葡萄糖氧化酶的葡萄糖传感器的研究进展[J]. *天津工业大学学报*, 2021, 40(2): 43-51.
- [14] XU S, ZHANG Y, ZHU Y, et al. Facile one-step fabrication of glucose oxidase loaded polymeric nanoparticles decorating MWCNTs for constructing glucose biosensing platform: Structure matters[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 135: 153-159.

编辑 张俊

(上接第 26 页)

参考文献

- [1] 杜功焕, 朱哲民, 龚秀芳. 声学基础[M]. 3版. 南京: 南京大学出版社, 2012.
- [2] 薛啸天, 宋文韬, 崔淦维, 等. 超声波声速测量实验的拓展[J]. *大学物理实验*, 2021, 34(2): 30-32.
- [3] 沈玥, 周诗韵. 水中声速测量实验的模型修正[J]. *物理实验*, 2020, 40(8): 40-45.
- [4] 杨睿智, 李熹辰, 蔡昊君, 等. 声速测定实验中超声换能器的非线性行为[J]. *物理实验*, 2017, 37(4): 6-10.
- [5] 李乐天, 关键慧, 夏柱红, 等. 驻波法测声速实验中峰值强弱交替现象的研究[J]. *物理与工程*, 2016(S1): 84-87.
- [6] 李轩, 方锦江, 单桂晔, 等. 声波多次往返叠加对相位比较法测量声速的影响[J]. *物理实验*, 2018, 38(4): 47-51.
- [7] 檀世博, 黄继承, 童阳, 等. 一种超声波声速测量实验仿真软件的设计及实现[J]. *大学物理实验*. 2022, 35(1): 89-93.
- [8] 张军, 陈毅, 平自红. 水中声速测量方法分析[J]. *声学技术*. 2017, 36(4): 65-67.
- [9] 姜凤贤. 基于虚实结合的综合实训平台建设研究与设计[J]. *实验室科学*, 2021, 24(4): 176-178.
- [10] 赵西梅, 李向亭, 周红, 等. 超声波声速测量的拓展实验[J]. *物理实验*, 2014, 34(12): 33-35.
- [11] 张建, 周奇郑, 王德石. 水下低频球面声波近场与远场散射特性研究[J]. *水下无人系统学报*, 2020, 28(5): 487-495.
- [12] 佟昊阳, 易燕, 李水, 等. 变温变压环境中大面积水听器灵敏度低频校准方法[J]. *计量学报*, 2021, 42(9): 1187-1192.
- [13] 赵云飞, 邱成峰, 贾小文, 等. 基于 Excel 的直线拟合问题不确定度评定研究[J]. *大学物理实验*, 2022, 35(1): 110-114.
- [14] 马大猷, 沈山豪. 声学手册[M]. 北京: 科学出版社, 2004.

编辑 钟晓