

## 乙酰胆碱和胆碱化学发光生物传感器的研究

宋正华\*\* 章竹君\* 范文哲

(陕西师范大学化学系 西安 710062)

**摘要** 将具有分子识别功能的乙酰胆碱酯酶和胆碱氧化酶及进行换能反应的 luminol 和  $\text{Cu}^{2+}$  分别固定在多孔玻璃和离子交换剂的柱中,组成流动注射式胆碱和乙酰胆碱化学发光传感器,让传感器分子识别反应和换能反应在各自最佳 pH 值下进行.这一新型生物传感器优化了发光量子产率,避免了在传感元件上直接发光所产生的散射干扰.测定乙酰胆碱和胆碱的线性范围达到  $1 \sim 1000$  pmol,检测限为 500 fmol,每次测定时间为 2 min,寿命为 6 个月,已用于鼠脑及人血清中乙酰胆碱和胆碱的测定.

**关键词** 生物传感器,化学发光,乙酰胆碱,胆碱

乙酰胆碱(ACh)是动物和人中枢神经系统内传递神经冲动的重要化学物质.它在神经突触中的合成、贮存和释放存在着动态平衡,乙酰胆碱酯酶(AChE)能将 ACh 水解成胆碱(Ch)和乙酸,某些疾病(如恶性贫血和白血病等)能使 AChE 活性下降,有机磷神经性战争毒剂或农药更是 AChE 的不可逆抑制剂,使 ACh 在神经末梢突触部位大量积蓄,引起严重的生理功能紊乱.因此,ACh 和 Ch 的测定在临床诊断、药理毒理研究、军事防化及环保等方面均有重要的实用意义.

测定 ACh 和 Ch 方法很多,常见的有荧光法<sup>[1]</sup>、HPLC 法<sup>[2]</sup>、GC-MS 法<sup>[3]</sup>和化学发光法<sup>[4]</sup>等,以酶电极为基础的 ACh 和 Ch 生物传感器或探针也有文献记录<sup>[5,6]</sup>.以上所有方法或者灵敏度不高,或设备复杂、可逆性差,不适合于在线或在体分析.光学传感器由于具有探头直径小(可小至同探测波长属同一数量级)、信息传输容量大、能量损耗低和抗干扰能力强等重要优点,已成为传感技术的一个重要分支.然而,关于 ACh 和 Ch 光学传感器的设计,却至今未见报道.

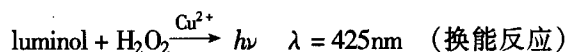
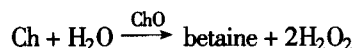
我们曾提出消耗型化学发光传感器的新概念,即将涉及分子识别反应和换能反应的全部试剂都固定在柱中,组成一个流动注射系统,被分析物质通过分子识别柱所产生的化学量(或生物量)能够与直接从换能器柱中洗脱下来的一定量化学发光试剂起反应,并将这一化学量(或生物量)转换为化学发光信号进行检测.这类传感器利用化学发光分析高灵敏度的特点,优化了发光量子产率并避免了在传感元件上直接发光所产生的散射光干扰.这一传感器的换能反应虽然是不可逆的,但由于固定化发光试剂柱的试剂固定量大,每次洗脱量又很少,每个固定化化学发光试剂柱可使用 200 次以上,且制作和更换都很简单,配合微渗析技术,能进行在线或在体连续检测.沿着这一思路,我们已经报道了铜、锰<sup>[7]</sup>,氰化物<sup>[8]</sup>,铬<sup>[9]</sup>,次氯酸盐<sup>[10]</sup>,抗坏血酸<sup>[11]</sup>等化学传感器的研究和应用.

\* 男,60岁,教授,博士生导师,\*\* 现在西北大学分析测试研究中心工作

收稿日期:1997-10-27,修回日期:1997-12-23,国家自然科学基金(39730160)资助课题

本文首次报道一种消耗型化学发光生物传感器,并用于测定鼠脑和人血清中乙酰胆碱和胆碱的含量.该传感器具有高灵敏度和高选择性,特别是在稳定性和使用寿命方面优于现今报道过的所有乙酰胆碱和胆碱传感器.该系统易于同微渗技术结合实现在线或在体连续测定.分子识别单元为固定化乙酰胆碱酯酶(AChE)和胆碱氧化酶(ChO)柱,换能器单元为固定化 luminol 和固定化铜盐混合柱.

其反应为:



在 AChE 存在时测定的是 ACh 和 Ch 的含量,无 AChE 时测定的是 Ch 的含量,两者之差即为 ACh 的含量.

## 1 材料和方法

### 1.1 传感器设计及操作

乙酰胆碱和胆碱化学发光生物传感器的设计和操作如图 1 所示,蠕动泵 p1 以  $3\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速输送  $\text{H}_2\text{O}$  (a) 和  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (b) 溶液,通过六通阀(V1)将  $200\mu\text{L}$   $6 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$  注入固定化 luminol 和  $\text{CuSO}_4$  的阴阳离子交换剂混合柱中(L1),并洗脱下一定量 luminol 和  $\text{Cu}^{2+}$ .蠕动泵 p2 以  $0.5\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速输送试样溶液,在固定化 AChE 柱中(L2)将 ACh 催化水解为 Ch,再经过固定化 ChO 柱(L3)使 Ch 催化氧化产生  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,并通过六通阀(V2)取样.在 NaOH 介质中被洗脱下的 luminol 在  $\text{Cu}^{2+}$  催化下与酶反应产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  进行反应,产生化学发光.通过 R456 光电倍增管转化为电信号并被 XWT-204 自动记录仪记录,全部程序由一单片机控制,以实现在线测定.

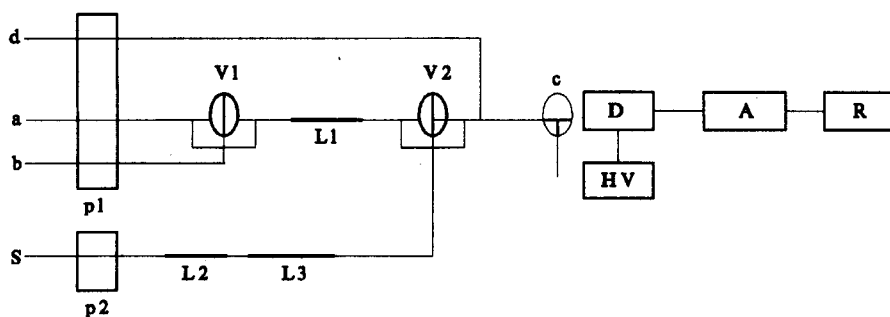


图 1 传感器的设计

p1, p2—蠕动泵, a—载流, b— $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶液, V1, V2—六通阀, L1—固定化 luminol 和  $\text{CuSO}_4$  柱,  
L2—固定化 AChE 柱, L3—固定化 ChO 柱, c—盘管, d—NaOH 溶液, s—试样溶液,  
D—光电倍增管, HV—负高压, A—放大器, R—记录器

### 1.2 试剂

AChE(EC 3.1.1.7, type V-S, 750u/mL)购自 Electric Organ 公司; ChO(EC 1.3.17, type V1, 10.6u/mg)购自 Fluka 公司; 多孔玻璃(CGP-240-200)购自 Sigma 公司; D201 阴离子交换树脂来自南开大学, 732 阳离子交换树脂来自上海树脂厂.

氯化乙酰胆碱和胆碱标准液均用 0.01% HOAc 配制, 贮备液浓度均为  $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , 使用前再用  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Tris 缓冲液(pH8.0)逐级稀释成所需分析浓度.

除生化试剂外, 其它试剂均为分析纯, 水为去离子水再经一次蒸馏.

### 1.3 固定化酶柱的制备

按前文所述方法<sup>[12]</sup>先用氨基硅烷化试剂将多孔玻璃表面的羟基转化为氨基, 然后用戊二醛以两步法将 AChE 和 ChO 键合到载体表面, 并用赖氨酸溶液处理载体, 以封闭残余醛基. 最后将 AChE 和 ChO 固定化酶分别装入 30mm × 2mm i.d. 两端塞有玻璃棉的玻璃管中. 测试表明, 固定化后的酶活性为固定化前的 70% ~ 90%, 而稳定性确大大增强, 在固定化状态下于 4℃ 贮存 3 个月, 两种酶的活性仍能保持 60%. 而在相同的情况下, 在溶液中的这两种酶, 半寿期只有几天.

### 1.4 固定化试剂柱的制备

称取 0.5g D201 或 732 离子交换树脂, 加入 25mL  $0.25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  luminol 或  $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$   $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  溶液, 搅拌 2h, 过滤、洗涤, 干燥后备用. 溶液中 luminol 和  $\text{Cu}^{2+}$  的浓度用可见-紫外吸收光度法检测, 其波长分别为 360nm 和 790nm. 树脂上固定的 luminol 或  $\text{Cu}^{2+}$  的量可从测定固定化前后溶液中 luminol 或  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的变化来计算. 本文制备的固定化试剂柱, 即固定化 luminol 和  $\text{Cu}^{2+}$  的量分别为  $2.6 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$  和  $1.9 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ .

将 0.2g 固定化 luminol 和 0.2 固定化  $\text{Cu}^{2+}$  盐树脂混合, 装入 50mm × 3mm i.d. 两端塞有玻璃棉的玻璃管中.

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶促反应的介质和酸度

酶促反应的介质和 pH 值影响酶的稳定性及酶促反应速度, 我们试验了磷酸缓冲液和 Tris 缓冲液两种体系, 结果如图 2 所示. 用 Ch 作为底物, 酶促氧化反应的最佳 pH 值为 7.5; 用 ACh 作为底物, 反映出来的是酶促水解反应和氧化反应的共同效应, 最佳 pH 值为 8.0. 用 Tris 缓冲液时无论 ChO 或 AChE 的活性 pH 值范围均较磷酸缓冲液宽约 0.5.

### 2.2 流速的影响

底物流速决定底物在酶柱中停留的时间, 流速越慢, 底物在酶柱中停留时间越长, 酶促反应越完全, 转化率越高. 但流速太小, 又会限制分析速度, 根据试样中分析物含量的水平, 选择底物流速为  $0.5 \sim 1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . 载液( $\text{H}_2\text{O}$ )的流速直接影响试剂溶液和酶促反应产物相互混合和反应程度, 由于

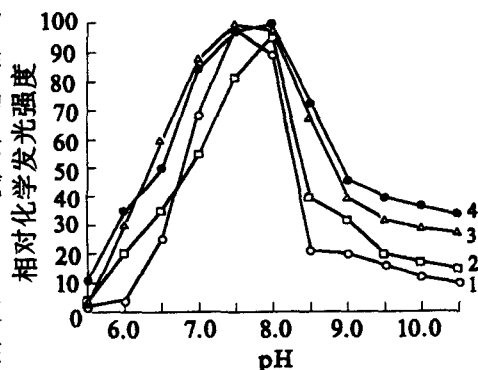


图 2 酸度的影响

1—Ch 在磷酸缓冲液中, 2—ACh 在磷酸缓冲液中,  
3—Ch 在 Tris 缓冲液中, 4—ACh 在 Tris 缓冲液中

$\text{Cu}^{2+}$  催化 luminol 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  的反应为一快速化学发光反应, 为保证能捕捉到在反应盘管中发生的最大化学发光强度, 选择载液流速为  $3.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

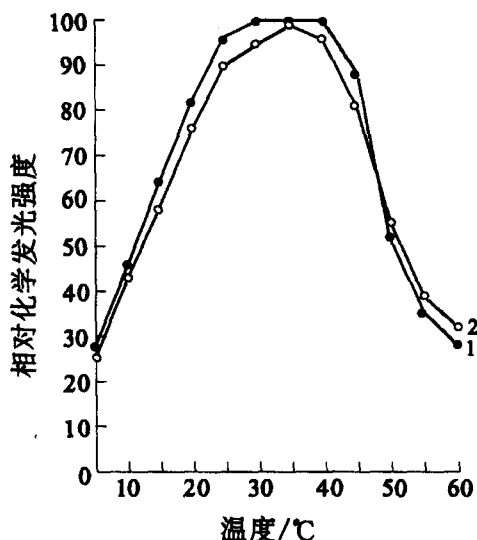


图3 温度的影响  
1—ACh, 2—Ch

### 2.3 温度的影响

温度不但影响固定化酶的催化活性、稳定性和寿命, 也影响酶促反应的速率常数和平衡常数, 将传感器流路中两个固定化酶柱都置于恒温水浴中进行试验, 结果示于图3. 两种酶在  $25\sim 40^\circ\text{C}$  范围内底物转化率最大. 这一特点使传感器特别适合于在室温下进行操作而无需恒温装置.

### 2.4 试剂洗脱液及其浓度

几种对树脂具有不同亲合力的无机盐溶液被用于从固定化试剂柱上洗脱出一定量 luminol 和  $\text{Cu}^{2+}$ , 进行换能反应. 很显然, 那些碱性的洗脱液如  $\text{NaOH}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  是不适宜的, 因为它们在洗脱试剂的同时会使  $\text{Cu}^{2+}$  沉淀为  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  并覆盖在树脂表面. 几种中性盐 (如:  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ) 都具有很好的洗脱能力, 其中  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶液洗脱效果最好. 当两种固定化试剂的树脂按

1:1 混合时, 每次注入  $200\mu\text{L } 6\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 并以  $3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  流速通过固定化试剂柱, 被洗脱下来的 luminol 和  $\text{Cu}^{2+}$  的量分别为  $2\times 10^{-7}\text{ mol}$  和  $1.1\times 10^{-8}\text{ mol}$ .  $\text{NaOH}$  溶液的导入是为了创造发光反应的最佳 pH 值, 以提高该测定体系的灵敏度. 实验表明, 在传感器设定的操作条件下,  $\text{NaOH}$  的浓度以  $0.01\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  最佳 (图4).

### 2.5 传感器的选择性

传感器的选择性决定于分子识别反应和换能反应的选择性, 表1列出了在神经细胞组织和血清中可能存在的各种物质及胆碱代谢产物干扰情况. 实验表明此传感器具有较好的选择性. 血清中  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  及包括  $\text{Cu}^{2+}$  (含量水平最大为  $2\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) 在内的所有微量元素均不干扰测定.

### 2.6 线性范围和检测限

如表2所示, 本法测定 ACh 和 Ch 校正曲线的范围均为  $1\sim 1000\text{ pmol}$ , 检测限 ( $3\sigma$ ) 分别为  $500\text{ fmol}$  ACh 和  $400\text{ fmol}$  Ch.

### 2.7 传感器的稳定性和寿命

传感器在两周内每天使用 1h, 测定 6 次, 两周后每隔 5 天使用 6 次, 每次使用后都将固定化酶柱取下, 于冰箱中  $4^\circ\text{C}$  保存. 传感器在一个月是很稳定的, 一个月以上灵敏度稍有下降, 三个月后灵敏度下降一半, 但仍能满足试样分析要求. 固定化试剂柱是消耗性的, 每根柱可使

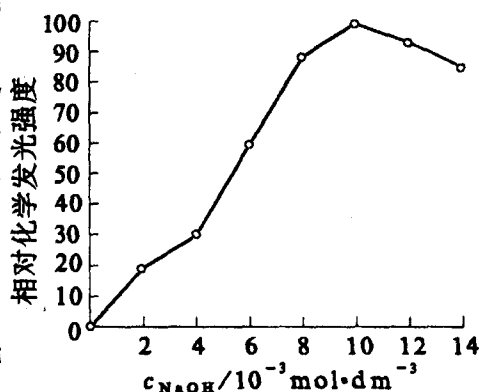


图4  $\text{NaOH}$  浓度对化学发光强度的影响

用 200 次以上.

表 1 干扰试验

物 质	浓度( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )	物质/ACh	干扰水平(%)
乙酰胆碱	$1 \times 10^{-6}$		100
luminol	$1 \times 10^{-4}$	100	4.0
尿 酸	$1 \times 10^{-6}$	1	5.6
尿	$1 \times 10^{-4}$	100	0.0
多巴胺	$1 \times 10^{-4}$	100	0.0
胆固醇	$1 \times 10^{-5}$	10	1.6
抗坏血酸	$1 \times 10^{-4}$	100	4.0
葡萄糖	$1 \times 10^{-4}$	100	0.0
乙 醇	$1 \times 10^{-3}$	1000	1.4
甲 醛	$1 \times 10^{-4}$	100	2.3
丙 醛	$1 \times 10^{-4}$	100	1.9
乙醇胺	$1 \times 10^{-5}$	10	0.0
二乙醇胺	$1 \times 10^{-5}$	10	0.8
二乙基胺	$1 \times 10^{-5}$	10	0.0
三乙基胺	$1 \times 10^{-5}$	10	0.0
肾上腺素	$1 \times 10^{-5}$	10	0.6
去甲肾上腺素	$1 \times 10^{-5}$	10	0.9
阿托品	$1 \times 10^{-5}$	10	0.0

表 2 测定线性范围

化合物	线性范围	回归方程 $y = bx + a$	校正系数	标准偏差	
				$S_b$	$S_a$
ACh	1 pmol ~ 1 nmol	$2.30x - 0.32$	0.9979	0.092	0.214
Ch	1 pmol ~ 1 nmol	$3.14x - 0.53$	0.9963	0.214	0.961

$y$  为相对化学发光强度,  $x$  为 ACh 和 Ch 的 pmol 数,  $S_b$  为斜率的标准偏差,  
 $S_a$  为截距的标准偏差.

## 2.8 鼠脑和人血清中 ACh 和 Ch 的测定

小白鼠直接断头后取出全脑,称取湿重约 0.2g,将脑放在玻璃研钵中,迅速加入 2mL  $0.6\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  的  $\text{HClO}_4$ ,置冰浴中磨成匀浆,放置 30 min 后离心 15min.取上清液用  $2\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$   $\text{K}_2\text{CO}_3$  中和,生成的  $\text{KClO}_4$  沉淀离心除去.然后用  $0.05\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Tris 缓冲液 (pH8) 稀释至 5mL.人血清则可直接取样 100 $\mu\text{L}$ ,用  $0.05\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Tris 缓冲液 (pH8) 稀释至 5mL 进行测定,结果列于表 3 和表 4.

对  $0.24\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$  ACh 含量的血清进行 11 次测定,相对标准偏差为 4.8%.

表 3 鼠脑中 ACh 和 Ch 测定结果

样品	ACh 含量 ( $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Ch 含量 ( $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ )	ACh 加入量 ( $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Ch 加入量 ( $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ )	测得总量 ( $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ )		回收(%)	
					ACh	Ch	ACh	Ch
1	20.4	10.3	20.0	10.0	39.1	19.2	96.8	94.6
2	23.6	16.1	20.0	10.0	44.5	25.1	102.1	96.2
3	18.2	14.0	20.0	10.0	37.6	23.1	98.4	96.3

表4 人血清中 ACh 和 Ch 测定结果

样品	样品类型	ACh 含量 (nmol·g <sup>-1</sup> )	Ch 含量 (nmol·g <sup>-1</sup> )	ACh 加入量 (nmol·g <sup>-1</sup> )	ACh 测得总量 (nmol·g <sup>-1</sup> )	ACh 回收 (%)
1	C.S.	0.0	0.0			
2	C.S.	0.0	0.0			
3	M.D.	0.24	0.18	0.10	0.32	94.1
4	M.D.	0.10	0.04	0.10	0.18	90.0
5	M.D.	0.28	0.24	0.10	0.36	94.7
6	M.D.	0.12	0.90			
7	M.P.	0.36	0.06			
8	M.P.	0.56	0.08			
9	M.P.	0.40	0.14			
10	M.P.	0.32	0.24			
11	H.P.	0.70	0.30			
12	H.P.	1.00	0.59			
13	B.D.	1.66		1.00	2.54	95.4
14	B.D.	1.25		1.00	2.29	101.8

\* 所有血样均来自西安精神病医院检验科和西安传染病医院检验科。

C.S.为正常人控制血清,M.D.为癫痫病患者血清,M.P.为狂躁精神病患者血清,

H.P.为乙型肝炎病人血清,B.D.为血液病患者血清。

## References

- 1 R. C. Macdonald, *J. Neurosci. Methods*, **1989**, 29(1), 73.
- 2 S. Murai, H. Miyate, H. Saito, H. Nagahama, Y. Masuda, T. Iton, *J. Pharmacol. Methods*, **1989**, 21(4), 255.
- 3 M. Watanabe, A. Kimura, K. Akasaka, S. Hayashi, *Biochem. Med. Matab. Biol.*, **1986**, 36(3), 355.
- 4 Wenzhe Fan, Zhujun Zhang, *Microchem. J.*, **1996**, 53, 290.
- 5 U. Loeffler, U. Wollenberger, F. Scheller, W. Goepel, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **1989**, 335(3), 295.
- 6 J. L. Marty, K. Sode, I. Karube, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 228(1), 49.
- 7 Jianzhong Lu, Zhujun Zhang, *Acta Chimica Sinica*, **1996**, 54(1), 71(in Chinese).
- 8 Jianzhong Lu, Wei Qin, Zhujun Zhang, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 304, 71.
- 9 Zhujun Zhang, Wei Qin, Shuna Liu, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 318, 369.
- 10 Wei Qin, Zhujun Zhang, Shuna Liu, *Anal. Lett.*, **1997**, 30, 11.
- 11 Zhujun Zhang, Wei Qin, *Talanta*, **1996**, 43, 119.

## A Chemoluminescence Biosensor for Determination of Acetylcholine and Choline

SONG Zheng - Hua      ZHANG Zhu - Jun \*      FAN Wen - Zhe

(*Department of Chemistry, Shanxi Normal University, Xi'an, 710062*)

**Abstract** A chemluminescence (CL) biosensor responding to acetylcholine (ACh) and choline (Ch) was prepared by covalently coupling acetylcholinesterase (AChE) and choline oxidase (ChO) to the controlled pore glass as a molecular recognition element, using electrostatically immobilizing luminol and copper ion exchange resin as a transduction element in a flow injection system. The analytes were injected into a continuous stream of simple medium flowing through a sequence of enzyme reactors containing AChE and ChO to produce hydrogen peroxide. The luminol and  $\text{Cu}^{2+}$  were eluted by  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  from the ion exchange resin column, then reacted with hydrogen peroxide to produce CL. The linear range for both the ACh and Ch was 1 ~ 1000 pmol, The detection limit was 500 fmol. A complete analysis can be finished within 2 min. The sensor was stable for 6 months and has been applied successfully to the analysis of ACh and Ch in human serum and rat brain.

**Keywords** biosensor, chemoluminescence, acethylcholine, choline