

纳米金固定辣根过氧化物酶的碳纳米管 修饰第 3 代过氧化氢传感器的研究

许淑霞^{1,2}, 吴金生¹, 张 勇¹, 漆红兰², 张成孝²

(1 成都理工大学 材料与化学化工学院, 四川 成都 610059)

(2 陕西师范大学 化学与材料科学学院, 陕西 西安 710062)

摘 要: 将纳米金吸附辣根过氧化物酶(HRP)固定在多壁碳纳米管(MWNT)修饰的铂(Pt)电极上, 利用 MWNT 对 HRP 的直接电化学催化特性及纳米金对蛋白质的强吸附能力制备了第 3 代 H_2O_2 生物传感器。实验结果表明, HRP 在 MWNT/Pt 电极表面能进行有效和稳定的直接电子转移, HRP 保持了其对 H_2O_2 还原的生物电催化活性, 而且能快速(3 s)地响应 H_2O_2 浓度的变化。HRP 在修饰电极上的表观吸附量(Γ_T)为 $7.3 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$, 异相电子转移常数(k_s)为 1.23 s^{-1} 。该传感器在 -300 mV 时对 H_2O_2 响应的线性范围为 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ($r = 0.9968$, $n = 4$)。

关键词: 第 3 代生物传感器; 多壁碳纳米管; 辣根过氧化物酶; 纳米金

中图分类号: O657.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2008)10-1099-04

Study on the Third-generation H_2O_2 Biosensor Incorporating HRP Immobilizing by Nanoparticle Au and Carbon Nanotubes

XU Shu-xia^{1,2}, WU Jin-sheng¹, ZHANG Yong¹, QI Hong-lan², ZHANG Cheng-xiao²

(1. College of Materials and Chemistry & Chemical Engineering, Chengdu University of

Technology, Chengdu 610059, China; 2. School of Chemical and Materials Science,

Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract The third generation H_2O_2 sensor was developed based on immobilizing horseradish peroxidase(HRP) on a multi-walled carbon nanotubes(MWNT) modified Pt electrode by electrostatic adsorption of nano-Au for HRP. The experimental results demonstrated that HRP could process the direct electron transfer effectively on the electrode surface. The HRP displayed an excellent electrocatalytic response to the reduction of H_2O_2 . The average surface coverage(Γ_T) of HRP on the modified electrode was $7.3 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$. The apparent heterogeneous electron transfer rate constant k_s was 1.23 s^{-1} . The biosensor could rapidly respond(3 s) to the change of the concentration of H_2O_2 in the range $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ($r = 0.9968$, $n = 4$).

Key words the third generation biosensor; multi-walled carbon nanotube; horseradish peroxidase; nano-Au

电化学生物传感器由于响应快、灵敏度高、制作简单而被广泛研究和应用^[1]。利用酶直接电化学性质构建的第 3 代生物传感器^[2-3], 克服了使用介体的第 2 代生物传感器测定电位比较正、电活性物质干扰多、电极制作复杂、介体污染等缺点, 已成为电化学生物传感器的发展趋势。

碳纳米管(CNT)是 1991 年被发现的一种新型碳结构, 具有粒径小、比表面积大、表面反应活性高、催化效率高等优点。CNT 修饰电极对抗坏血酸、多巴胺等具有电催化作用^[4]; 作为固体促进剂, 可用于实现酶直接电化学反应^[5-6], 在电化学领域有着广泛的应用前景。

Zhao 等^[7]将纳米金吸附辣根过氧化物酶(HRP)直接吸附在 CNT 上, 制成 CNT 修饰电极, 并研究了 HRP 在电极上的直接电化学行为。但是用物理吸附的方法固定酶, 酶易从电极表面脱落。近年来发现, 在纳米金中可固定生物分子^[8-9], 纳米颗粒比表面积非常大, 表面自由能高, 通过静电吸附, 酶可在纳米金颗粒表面得到强有力的固定。

收稿日期: 2008-01-08 修回日期: 2008-05-07

基金项目: 国家地质调查项目(200314200015)

第一作者: 许淑霞(1977-), 女(蒙古族), 新疆昌吉人, 讲师, 博士研究生, Tel: 028-84079237 E-mail: xushux@cdut.edu.cn

将酶直接电化学性质用于第 3 代传感器的报道很少, 为克服物理吸附易造成酶泄漏的缺点, 本文通过静电吸附将带正电荷的 HRP 直接吸附在带负电的纳米金上, 然后固定在多壁碳纳米管 (MWNT) 修饰的 Pt 电极上, 利用碳纳米管、纳米金对电流的放大作用和纳米金对 HRP 的固定化作用, 研制出性能较好的第 3 代生物传感器。该传感器制备简单、灵敏度高、稳定性好。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

BAS 100 B/W 电化学工作站 (Bioanalytical system, NC, USA)。电化学测量采用三电极: Pt 片电极 (直径 3.0 mm) 为工作电极 (表观面积 0.0085 cm^2 , 通过 Pt 电极在 10 mmol/L 铁氰化钾溶液中不同扫速下的伏安响应计算); Ag/AgCl (3.0 mol/L NaCl) 电极为参比电极; 铂丝电极为对电极。氯金酸 (Sigma 公司), HRP (250 U/mg 华美生物制药有限公司)。多壁碳纳米管 (深圳市纳米港有限责任公司)。

H_2O_2 溶液 (体积分数 30%) 用高锰酸钾标准溶液标定, 每天新配, 实验所用溶液均用 0.10 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) ($\text{pH} = 7.0$) 配制。实验用水均为二次蒸馏水, 所用试剂均为分析纯。电化学测量前, 电解液通高纯氮气至少 20 min, 所有实验在室温下进行。

1.2 生物传感器的制备

工作电极用 $0.30 \mu\text{m Al}_2\text{O}_3$ 悬浊液打磨, 然后用二次蒸馏水冲洗干净。

MWNT 处理: MWNT 在浓硝酸和高氯酸 (体积比 7:3) 中超声 5 h, 离心并用二次蒸馏水洗至上清液 pH 为 7.0, 然后将沉淀于 200°C 烘干。称取 3.0 mg 处理过的 MWNT, 加入 1.0 mL 二甲基甲酰胺 (DMF), 超声约 10 min, MWNT 分散于 DMF, 形成棕色悬浮液, 滴 $10.0 \mu\text{L}$ 悬浮液于处理好的工作电极上, 待溶剂挥发完全即可。

纳米金的合成: 按文献 [10] 的方法合成纳米金, 所有玻璃容器使用前先在王水中浸泡过夜, 然后用二次蒸馏水清洗干净并烘干。取 4.8 mL 0.01% (体积分数) 的氯金酸溶液于 50 mL 烧瓶中, 加热并剧烈搅拌, 同时迅速滴加 2.4 mL 0.02 mol/L 柠檬酸三钠溶液, 回流加热 20 min, 继续搅拌, 至溶液冷至室温。合成的纳米金溶液为酒红色, 于 4°C 避光保存。

HRP 液的固定: 取 $30 \mu\text{L}$ 合成好的纳米金溶液滴于 MWNT 修饰 Pt 电极上, 放置 2 min, 然后取 $5 \mu\text{L}$ HRP 溶液 (30 g/L) 滴于 MWNT 修饰 Pt 电极上, 晾干备用。

修饰电极不用时置于 PBS 中保存 (4°C)。

2 结果与讨论

2.1 修饰电极在 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液中的伏安响应

图 1 为裸电极及修饰电极在 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液中的循环伏安图。从图中可以看出, 裸电极 Pt (a) 上修饰 MWNT (b) 后, 氧化电流和还原电流增大约 12 倍。滴涂纳米金后的 Au-MWNT-Pt (c) 电极, 氧化电流和还原电流也有增大, 主要是由于纳米金对电流的放大作用。Au-MWNT-Pt 电极上吸附 HRP (d) 后, 氧化电流和还原电流略有下降, 可能是因为, 虽然 HRP 和 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 溶液带相反电荷, HRP 吸附溶液中的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, 使铁氰化钾溶液的氧化还原电流有所增加, 但由于溶液中纳米金和铁氰化钾溶液都带负电荷, 又会使 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 在电极上增加扩散阻力, 所以氧化还原电流略微降低。

2.2 HRP 对 H_2O_2 的直接电催化

图 2 为 HRP-Au-MWNT-Pt 电极在 $0 \sim 80 \text{ mV}$ 范围内, 扫速分别为 $10 \text{ } 40 \text{ } 50 \text{ } 60 \text{ } 80 \text{ mV/s}$ 时的循环伏安图。如图所示, 修饰电极上的氧化还原电流随着扫描速率的增加而增加。

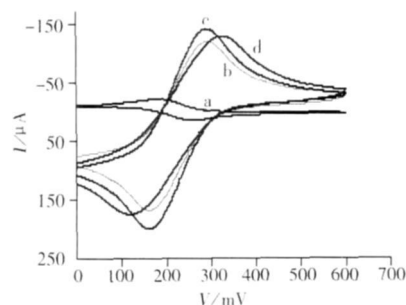


图 1 裸电极及修饰电极在 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液中的循环伏安图

Fig 1 Cyclic voltammograms of blank electrode and modified electrode at $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ in $1 \text{ mmol/L Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} - 0.10 \text{ mol/L PBS}$ a Pt b MWNT-Pt c Au-MWNT-Pt d HRP-Au-MWNT-Pt electrode

还原峰电位向负方向移动, 氧化峰电位向正方向移动, 其氧化还原峰电位差 ΔV 也随之增加, 当扫描速率大于 300 mV/s 时, 峰形扭曲, 电极反应变得不可逆。阴极峰电流 (I_{pc}) 与扫描速率 ($10 \sim 80 \text{ mV/s}$) 成正比 ($y = 0.0144x + 0.0852$ $r = 0.9980$), 说明在低扫描速率范围内, 电极反应受表面过程控制。

图 3 为 HRP-Au-MWNT-Pt 电极在 0.10 mol/L PBS (a) 中和含有 0.10 mmol/L H_2O_2 溶液的 PBS (b) 中的循环伏安图。当向 PBS 中加入 H_2O_2 溶液后, HRP 催化 H_2O_2 溶液的还原电流增大, 而氧化电流变化不大, 表明 HRP 直接催化还原 H_2O_2 。

根据 Laviron's 方程: $I_p = (n^2 F^2 A \Gamma_T v) / (4RT) = nFQv / (4RT)$, 式中 I_p 是峰电流 (mA), n 是电子转移数, F 是法拉第常数 (C/mol), A 是电极面积 (cm^2), Γ_T 是修饰电极上 HRP 的表观吸附量 (mol/cm^2), v 是扫描速率 (mV/s), Q 是电量 (C), R 是气体常数 ($\text{J} \cdot \text{K/mol}$)。得出 $Q = nF\Gamma_T$, 计算出 MWNT 修饰电极上 HRP 的表观吸附量 Γ_T 为 $7.3 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$, 比 HRP 固定在 DNA 膜上的表观吸附量 ($5.1 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$) 大, 接近于 HRP 固定于金溶胶中的表观吸附量 ($7.6 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$)^[3]。根据公式 $V_p = (-RT/F) \ln k_s$, 计算出异相电子转移常数为 1.23 s^{-1} , 接近于文献报道值 1.13 s^{-1} ^[11]。

HRP 与 H_2O_2 反应方程式如下: $\text{HRP}(\text{Fe}^{3+}) + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Compound I} (\text{Fe}^{4+} \parallel \text{O}) + \text{H}_2\text{O}$; $\text{Compound I} (\text{Fe}^{4+} \parallel \text{O}) + e + \text{H}^+ \rightarrow \text{Compound II}$; $\text{Compound II} + e + \text{H}^+ \rightarrow \text{HRP}(\text{Fe}^{3+}) + \text{H}_2\text{O}$ 。

2.3 工作电位的选择

考察了传感器响应电流随电位的变化, 实验发现, 当工作电位在 $-50 \sim -300 \text{ mV}$ 间变化时, 催化电流显著增大; 当工作电位小于 -300 mV 时, 催化电流变小。当工作电位为 -300 mV 时, 响应电流最大, 故选择工作电位为 -300 mV 。

2.4 传感器的性能

在选定的实验条件下, 采用计时电流法考察了峰电流与 H_2O_2 浓度之间的关系。峰电流与 H_2O_2 浓度在 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 范围内线性关系良好, 回归方程为 $I(\mu\text{A}) = 49.31c(\text{mmol/L}) + 2.89$ $r = 0.9968$ ($n = 4$)。传感器的灵敏度较高, 主要由于碳纳米管对 H_2O_2 催化氧化的增强作用, 使之能更有效地传递电子, 同时较大的亚微颗粒表面积也增强了电子传递速率。

由于碳纳米管修饰电极上固定的纳米金对酶有保护作用, 所以修饰电极上 HRP 的活性保持很好。在 30 d 内每 2 d 测定传感器在 0.10 mmol/L H_2O_2 中的响应电流, 响应电流减少低于 8% , 表明该传感器稳定性较好。该传感器对 H_2O_2 的响应时间为 3 s , 说明该传感器具有较快的响应速度。

3 结 论

将 HRP 用纳米金吸附的方法固定在 MWNT 修饰电极上并制成生物传感器, 其固定方法简单且有效, HRP 在纳米颗粒表面得到强有力的固定, 克服了物理吸附方法酶易从电极表面脱落的缺点。在 MWNT 修饰电极上固定的 HRP 实现了直接电子转移, 可直接电催化还原 H_2O_2 , 该传感器对 H_2O_2 响应灵敏, 且检测电位较低, 具有灵敏度高、响应快、性能稳定等特点。

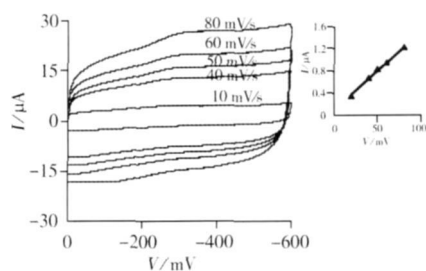


图 2 HRP-Au-MWNT-Pt 电极在 PBS 中不同扫速下循环伏安图

Fig. 2 Cyclic voltammograms of HRP-Au-MWNT-Pt electrode in 0.10 mol/L PBS ($\text{pH} = 7.0$) at 10, 40, 50, 60 and 80 mV/s (from bottom to top)

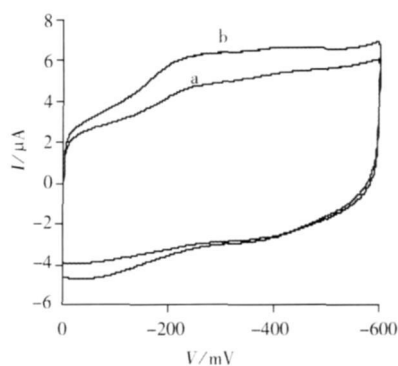


图 3 修饰电极在加入 H_2O_2 前后的循环伏安图

Fig. 3 Cyclic voltammograms of HRP-Au-MWNT-Pt electrode in 0.10 mol/L PBS ($\text{pH} = 7.0$) in the absence of H_2O_2 (a) and in the presence of 0.10 mmol/L H_2O_2 (b) at 20 mV/s

参考文献:

- [1] UPDIKE S J, HICKS G P. The enzyme electrode[J]. Nature, 1967, 214: 986–988
- [2] LINan, XU Jinzhong, YAO Hui, et al. The direct electron transfer of myoglobin based on the electron tunneling[J]. J Phys Chem: B, 2006, 110: 11561–11565
- [3] SHIE J W, YOGESWARAN U, CHEN Shenming, et al. Electroanalytical properties of cytochrome c by direct electrochemistry on multi-walled carbon nanotubes incorporated with DNA biocomposite film[J]. Talanta, 2008, 74(5): 1659–1669
- [4] 刘笑笑, 王立世, 张水峰, 等. 对苯二酚在多壁碳纳米管修饰电极上的电化学行为研究[J]. 分析测试学报, 2007, 26(1): 24–28
- [5] DENG Chunyan, CHEN Jinhua, CHEN Xiaoli, et al. Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on boron-doped carbon nanotubes modified electrode[J]. Biosens Bioelectron, 2008, 23(8): 1272–1277
- [6] SU Yuhua, XIE Qingji, CHEN Chao, et al. Electrochemical quartz crystal microbalance studies on enzymatic specific activity and direct electrochemistry of immobilized glucose oxidase in the presence of sodium dodecylbenzene sulfonate and multi-walled carbon nanotubes[J]. Biotechnol Prog, 2008, 24: 262–272
- [7] ZHAO Yuandj, ZHANG Weide, CHEN Hong, et al. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase at carbon nanotube powder microelectrode[J]. Sens Actuators B, 2002, 87: 168–172
- [8] 张凌燕, 袁若, 柴雅琴, 等. 基于辣根过氧化物酶/纳米金/辣根过氧化物酶/多壁纳米碳管修饰的过氧化氢生物传感器的研究[J]. 化学学报, 2006, 64(16): 1711–1715
- [9] 唐芳琼, 孟宪伟, 陈东, 等. 纳米颗粒增强的葡萄糖生物传感器[J]. 中国科学: B辑, 2000, 30(2): 119–124
- [10] RALPH A K, GEORGE S W. Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer[J]. Anal Chem, 1980, 52(8): 1198–1205
- [11] CHEN Xiaohong, RUAN Chuaming, KONG Jili, et al. Characterization of the direct electron transfer and biocatalysis of horseradish peroxidase in DNA film at pyrolytic graphite electrode[J]. Anal Chim Acta, 2000, 412: 89–98

欢迎订阅 欢迎投稿

《质谱学报》

国内刊号: CN 11-2979/TH

国际标准刊号: ISSN 1004-2997

邮发代号: 82-349

国外发行代号: Q 1717

《质谱学报》(双月刊), 是经国家科委批准, 由北京中科科仪技术发展有限责任公司和中国物理学会质谱分会共同主办, 中国原子能科学研究院承办的学术期刊, 中国科学院《核心期刊》之一。

本刊的宗旨是刊登物理、化学、生物化学、材料化学、核科学、地球科学、生命科学等基础学科中质谱法的新理论、新方法、新技术及其在各领域的应用研究成果; 介绍质谱学及其相关技术在上述前沿课题研究中的最新进展; 反映质谱技术广泛应用于农业、石油、地质、药物、化工、临床医学、生物工程、原子能、同位素分析、环境监测、食品质控、材料分析、公安司法、军事部门等国民经济多领域的研究成果。本刊栏目设置有“研究报告”、“研究简报”、“综述”、“讲座”、“技术交流”、“实用信息”等。读者主要对象为从事分析化学研究和测试的科技人员及大中专院校师生。

本刊先后被美国《化学文摘, CA》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国科学引文数据库》、《中国科技论文数据库》、《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、《中国学术期刊综合评价数据库 (CAJCED)》、《中国期刊全文数据库 (CJFD)》、《中国学术期刊 (光盘版)》、《中文科技期刊数据库》、《中国无机分析化学文摘》、《方正 Apabi 电子期刊》等收录, 并已入网“万方数据-数字化期刊群”。本刊介绍网址 <http://www.jmss.com.cn>

本刊国内外公开发行。大 16 开, 单价: 10.00 元/册, 全年 60 元。请在全国各地邮局订阅。未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。

银行汇款:

帐号: 02000266090088002-52

开户行: 工商银行北京房山支行二六六分理处

户名: 中国原子能科学研究院

邮局汇款: 北京 275 信箱 65 分箱《质谱学报》编辑部, 邮编 102413

汇款时请写明汇款用途: 订阅《质谱学报》杂志。

联系电话: 010-69357734 E-mail: jmss40@163.com; 网址: <http://www.jmss.com.cn>