

基于聚硫堇和纳米金共修饰的过氧化氢生物传感器的研究

高风仙, 袁 若, 柴雅琴, 张凌燕, 陈时洪,
黎雪莲, 王 娜

(西南大学 化学化工学院 重庆市现代分析重点实验室, 重庆 400715)

摘 要: 用循环伏安法将电子媒介体硫堇电聚合在铂电极上, 使其表面形成均匀的带负电的聚合膜层, 通过静电吸附作用固定表面带正电荷的辣根过氧化物酶, 接着吸附纳米金, 然后再利用纳米金吸附固定一层辣根过氧化物酶, 制成了新型过氧化氢生物传感器。实验发现, 该传感器增加了酶的吸附量, 响应快、灵敏度高、稳定性好, 对 H_2O_2 表现出良好的响应特性。检测范围为 $5.2 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 检出限为 $1.7 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, 并具有抗尿酸、抗坏血酸等干扰的特点。

关键词: 辣根过氧化物酶; 硫堇; 纳米金; 静电吸附; 生物传感器

中图分类号: O657.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2007)01-0081-04

Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Poly(thionine) and Au Colloid

GAO Feng-xian YUAN Ruq CHAI Ya-qin ZHANG Ling-yan CHEN Shi-hong
LIXue-lian WANG Na

(Chongqing Key Laboratory of Analytical Chemistry College of Chemistry and Chemical Engineering
Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract A novel method for the preparation of a hydrogen peroxide biosensor was described. Thionine was electropolymerized on the platinum electrode to form a negatively charged surface by cyclic voltammetry. Then horseradish peroxidase (HRP) / nano-Au / HRP were immobilized on the electrode modified by poly(thionine) via electrostatic adsorption to prepare the hydrogen peroxide biosensor. Experimental results showed that the biosensor exhibited fast response, high sensitivity and good stability. The linear response of the sensor to hydrogen peroxide was in the concentration range of $5.2 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ with a detection limit of $1.7 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$. In addition, the biosensor operated at low potential would be interference-free from ascorbic acid and uric acid.

Key words Horseradish peroxidase; Thionine; Nano-Au; Electrostatic adsorption; Biosensor

在工业、生物、环境、临床诊断和食品分析等领域, 过氧化氢的测定都具有重要的意义。迄今为止, 多种利用辣根过氧化物酶 (HRP) 或酶-媒介体修饰的电化学传感器已用于过氧化氢的测定^[1]。在过氧化氢生物传感器的研制中, 酶的固定化是影响其分析性能的关键步骤, 已报道的固定方法包括溶胶凝胶法^[2-3]、吸附法^[4]、包埋法^[5]等。导电聚合物作为修饰膜的使用日益增多, 是制备化学和电化学传感器的好材料, 它在聚合时形成带电荷的聚合物, 以静电吸附作用与生物分子组装^[4]。研究者对一些导电聚合物膜, 如聚邻氨基酚^[6]、聚中性红^[7]等的电化学特性进行了大量的研究工作, 董绍俊等^[8]对该领域的进展以及理论和应用研究做了详细概括。硫堇具有优良的电化学活性, 用其单体作为媒介体的酶传感器的电化学研究虽然已有报道^[9], 但电极稳定性不好。聚硫堇相对于单体而言, 不易流失, 比表面积大, 反应活性高, 催化效果好。纳米金颗粒具有比表面积大、吸附能力强、良好的生物相容性等优点, 可将生物分子强有力地固定在其表面制得的生物传感器^[9]上。

本文首先在铂电极上电聚合硫堇形成一层带负电荷的膜, 然后通过静电作用吸附带正电荷的 HRP (HRP 的等电点为 7.2, 在 pH 6.5 时, HRP 分子表面带正电荷), 再吸附一层带负电荷的纳米金,

收稿日期: 2005-11-19 修回日期: 2006-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20675064); 教育部优秀青年教师资助计划 (教人司 2002-40); 重庆市自然科学基金资助

(CSTC-2004BB4149 2005BB4100)

作者简介: 高风仙 (1981-), 女, 河南安阳人, 硕士研究生; 袁 若, 联系人, Tel: 023-68252277, E-mail: yuannr@swu.edu.cn

最后, 由纳米金再吸附一层 HRP, 即通过层层自组装技术实现了两层酶膜的固定, 研制成一种性能优良的过氧化氢生物传感器。与采用传统的共价交联与包埋等固酶法制得的过氧化氢生物传感器相比, 该传感器具有保持生物分子活性好、性能稳定和制作简便等优点。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI 660A 电化学工作站 (上海辰化仪器公司), H 600 型透射电子显微镜 (日本日立公司), BRANSON IC200 超声清洗仪 (德国), AB203-S 电子天平 (瑞士 Mettler & Toledo 公司)。

辣根过氧化物酶 (HRP, EC 1.11.1.7, type, Sigma 公司), H_2O_2 (30%, 水溶液), 硫堇 (Thionine, 简称 Th, 上海化学试剂公司), 氯金酸 (Sigma 公司) 为生化试剂, 其它试剂如 HAc 、 NaAc 、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 KCl 均为分析纯试剂。

纳米金的制备参照文献 [10] 制得, 其平均粒径为 16 nm。

1.2 酶电极的制备

铂电极 ($\Phi = 2 \text{ mm}$) 先用氧化铝粉末抛光, 使成镜面, 然后依次用无水乙醇和纯净水超声清洗, 将处理好的电极洗净后备用。然后按文献 [11] 电聚合硫堇在铂电极表面, 聚合后的电极用水洗净晾干后, 置于 HRP (2 g/L, pH 6.5 磷酸缓冲溶液) 中浸泡 12 h, 取出洗净晾干, 接着于纳米金胶中浸泡 12 h, 最后再于 2 g/L 的 HRP 溶液中浸泡 12 h, 即制得 PTh/HRP/nano-Au/HRP 修饰的酶生物传感器。

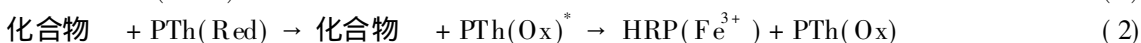
1.3 检测方法

采用三电极检测装置: 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为对电极, 酶电极为工作电极。在实验条件下, 于 5 mL pH 6.5 的醋酸缓冲溶液中, 进行循环伏安和计时电流测试。电位扫描速率为 50 mV/s, 扫描电位范围为 $-0.6 \sim +0.2 \text{ V}$ (vs. SCE), 记录酶电极对 H_2O_2 的安培响应。当酶电极不使用时, 将其于 4 °C 下贮存在 pH 7.0 磷酸缓冲液上方。

2 结果与讨论

2.1 电极过程原理

以硫堇为媒介体的过氧化氢生物传感器的过程原理 [12] 如下:



PTh(Ox) 在电极表面还原为 PTh(Red) 从而形成催化电流。

2.2 酶电极的电化学响应特征

图 1 是酶电极在不同条件下的循环伏安图。由图可知, 当未加入 H_2O_2 时, 呈现出硫堇的一对氧化还原峰 (图 1a), 当加入 H_2O_2 时, 还原峰急剧增大 (图 1b、c), 显示出明显的电催化特征, 说明固定在修饰膜上的 HRP 对 H_2O_2 有明显的电催化还原作用, Th 是该反应体系的有效电子转移介质。

2.3 酶电极的性能

2.3.1 pH 和温度对传感器的影响 溶液的 pH 值对酶的活性影响很大, 酶在一定的 pH 值范围内才表现出催化活性。在某一 pH 值时, 酶的催化活性最高, 此时的 pH 值为最适 pH 值, 一般最适 pH 值在中性 (pH = 7.0) 左右波动。考察酶电极在 pH 4.5 ~ 8.0 范围的醋酸盐缓冲液中对 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ H_2O_2 的响应 (图 2)。实验发现, 酶电极在 pH 6.5 时响应电流最大, 且随着 pH 的增大, 峰电位逐渐负移。故本实验选择 pH 为 6.5 的醋酸缓冲溶液。

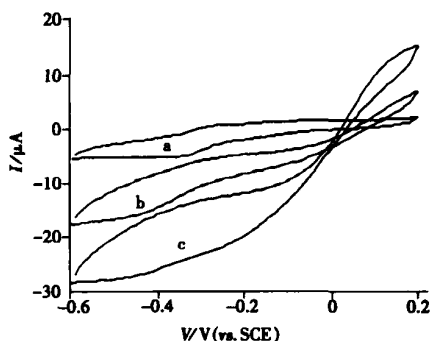


图 1 酶电极的循环伏安图

Fig. 1 Cyclic voltammograms of the enzyme electrode

a without H_2O_2 ; b with $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ H_2O_2 ; c with $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ H_2O_2 ; $v = 50 \text{ mV/s}$ 0.5 mol/L HAc - NaAc (pH 6.5)

温度是影响酶催化反应的一个重要因素。酶的活性也与温度有直接关系，温度升高时，酶催化反应速率增加，但高温会使酶蛋白变形而失活。在 pH 6.5 的醋酸盐缓冲溶液中，15 ℃ ~ 60 ℃ 范围内测定了酶电极对 1.0×10^{-5} mol/L H_2O_2 响应(图 3)。实验表明，随着温度的升高，催化电流增大，当温度达到 45 ℃ 时，催化电流达到最大值，当进一步升高温度，由于酶的变性导致催化电流下降，考虑到电极灵敏度和使用寿命，测定时底液温度选择为 25 ℃。

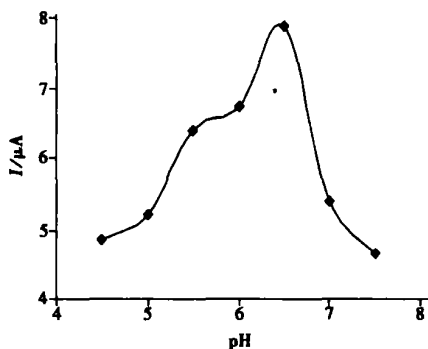


图 2 pH 值对电极响应的影响
Fig. 2 Effect of pH on the enzyme electrode response

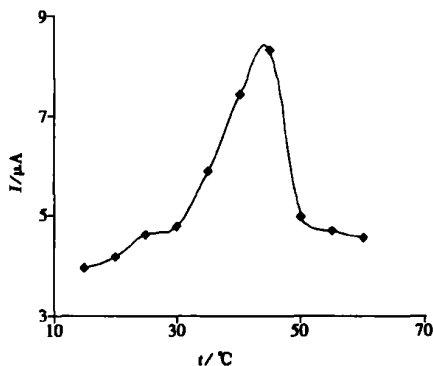


图 3 温度对电极响应的影响
Fig. 3 Effect of temperature on the enzyme electrode response

2.3.2 工作电位的确定 还原电流与工作电位的关系如图 4 所示，在 pH 6.5 的醋酸盐缓冲溶液中，测定了酶电极对 1.0×10^{-5} mol/L H_2O_2 响应。实验表明，随着工作电位向负方向移动，还原电流增大。表明工作电位负值越大，越能促进氧化态的聚硫堇的还原，因而在化合物和之间的电子传输能力增强^[12]。工作电位负值越大，传感器的灵敏度越大，但溶液中共存的其它电活性物质也容易在电极上被直接还原，造成对测定的干扰，所以工作电位选择 -0.35 V。

2.3.3 酶电极的线性范围、检出限、重复性及稳定性 根据电流值与 H_2O_2 浓度成正比进行定量测定。在最优的实验条件下，该传感器对不同浓度 H_2O_2 的计时电流响应曲线见图 5。从图中可以看出，达到稳态电流的 95% 所需时间约为 8 s。由不同浓度 H_2O_2 的计时电流响应曲线做出校准曲线。在 $5.2 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-3}$ mol/L 范围内，响应电流与 H_2O_2 浓度成线性关系 ($r = 0.9975$)，检出限为 1.7×10^{-7} mol/L ($S/N = 3$)。在最佳实验条件下，以酶电极对浓度为 1.0×10^{-5} mol/L 的 H_2O_2 平行测定 10 次，其相对标准偏差为 4.0%，说明酶电极重复性良好。该电极不使用时，置于 4 ℃ 的磷酸缓冲溶液 (pH 7.0) 中保存，20 天后，该电极的活性下降约 1%，说明该电极有较好的稳定性。

2.3.4 干扰试验 为了测定电极的抗干扰能力，在 1.0×10^{-5} mol/L H_2O_2 浓度下，分别加入 1.0×10^{-5} 、 2.0×10^{-5} 、 4.0×10^{-5} 、 6.0×10^{-5} mol/L 的抗坏血酸、葡萄糖、醋酸、柠檬酸等，发现添加物对电极均无干扰。说明该传感器具有较好的选择性和抗干扰能力。同时也证明了，通过聚合得到的硫堇膜层是一种选择透过性膜，能有效地减少多种干扰物质的干扰，具有较好的应用前景。

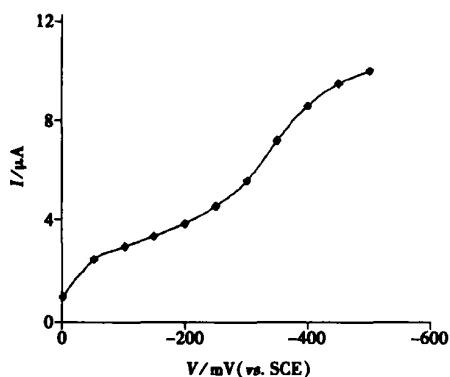


图 4 电位对电极响应的影响
Fig. 4 Effect of applied voltage on the enzyme electrode response

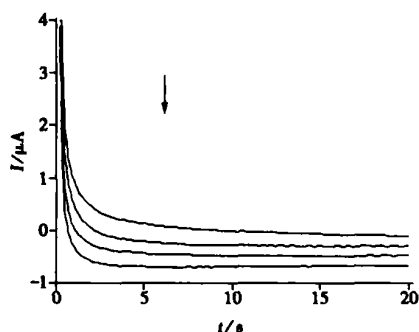


图 5 传感器对不同浓度 H_2O_2 计时电流响应曲线
Fig. 5 Plot of current vs. time for the sensor
 $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0, 8.1 \times 10^{-6}, 5.8 \times 10^{-4}, 1.0 \times 10^{-3}$ mol/L (from up to down); 0.5 mol/L HAc - NaAc (pH 6.5)

2.3.5 米氏常数的测定 米氏常数为酶促反应的特征动力学参数,是表征酶与底物之间亲和力大小的统计标准,可由米氏常数方程 $1/I_{ss} = 1/I_{max} + K_m/(I_{max} \cdot c)$, 得出 K_m , 其中 I_{ss} 为加入一定底物浓度的稳态电流, I_{max} 为底物达到饱和时的最大(极限)电流, c 为与 I_{ss} 对应的底物的浓度, 由 2.3.3 的实验结果可求得 K_m 为 1.9 mmol/L 。

3 结 论

以硫堇聚合膜为基底,利用静电吸附原理将辣根过氧化物酶和纳米金固定到电极表面,可制得多层酶膜修饰的过氧化氢生物传感器。该传感器固定酶的方法简单、易行,具有较高的稳定性,较低的检出限,制得的电极可多次重复使用,具有较好的实用价值。同时这种新方法适宜其它媒介体和酶体系,是一种有发展前途的方法,有望研制、开发灵敏度更高,抗干扰性更好的生物传感器。

参考文献:

- [1] LIU H Y, LIU Y C, QIAN J H, et al Fabrication and features of a methylene green-mediating sensor for hydrogen peroxide based on regenerated silk fibroin as immobilization matrix for peroxidase[J]. Talanta 1996 43(1): 111-118
- [2] LIU S Q, DA I Z H, CHEN H Y, et al Immobilization of hemoglobin on zirconium dioxide nanoparticles for preparation of a novel hydrogen peroxide biosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics 2004 19(9): 963-969
- [3] 谭学才, 黄婷婷, 徐健君, 等. 固定化辣根过氧化物酶的壳聚糖/二氧化硅杂化膜的制备及表征[J]. 分析测试学报, 2004 23(4): 9-12
- [4] 阳明辉, 李春香, 杨云慧, 等. 基于静电吸附多层膜固定酶的过氧化氢生物传感器的研究[J]. 化学学报, 2004 62(5): 502-507
- [5] YUAN R, LIU Y, LI Q F, et al Electrochemical characteristics of a platinum electrode modified with a matrix of polyvinyl butyral and colloidal Ag containing immobilized horseradish peroxidase[J]. Anal Bioanal Chem 2005 381: 762-768
- [6] ZHANG Z N, LIU H Y, DENG J Q. A glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized o-aminophenol film on platinumized glassy carbon electrode[J]. Anal Chem, 1996 68(9): 1632-1638
- [7] 孙元喜, 冶保献, 周性尧. 聚中性红膜修饰电极的电化学特性及其电催化性能[J]. 分析化学, 1998 26(2): 166-169
- [8] 董绍俊, 车广礼, 谢远武, 等. 化学修饰电极[M]. 北京: 科学出版社, 1995
- [9] ZHUO Y, YUAN R, CHAI Y Q, et al A reagentless amperometric immunosensor based on gold nanoparticles/thionine/Na on-membrane-modified gold electrode for determination of α -fetoprotein[J]. Electrochemistry Communications 2005 7(4): 355-360
- [10] GARBAR K C, GRFFITH FREEMAN R, HOMMER M B, et al Preparation and characterization of Au colloid monolayers[J]. Anal Chem, 1995 67(4): 735-743
- [11] 孔 泳, 穆绍林. 硫堇的电化学聚合及聚硫堇的性质[J]. 物理化学学报, 2001, 17(4): 295-299
- [12] XIAO Y, JU H X, CHEN H Y. A reagentless hydrogen peroxide sensor based on incorporation of horseradish peroxidase in poly(thionine) film on a monolayer modified electrode[J]. Anal Chim Acta 1999 391(3): 299-306

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

《分析测试学报》

国内刊号: CN 44-1318/TH

国际标准刊号: ISSN 1004-4957

国际刊名代码 CODEN: FCXES

邮发代号: 46-104

国外代号: BM 6013

广告经营许可证: 粤 010029

《分析测试学报》是由中国分析测试协会、中国广州分析测试中心共同主办的全国性学术刊物,中文核心期刊。刊登电子显微学、质谱学、光谱学、色谱学、波谱学及电化学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术的研究成果,介绍新仪器装置及在医药、化工、商检、食品检验等方面实用性强的实验技术。适合科研院所、大专院校、医疗、卫生、商检以及厂矿企业分析测试工作和管理人员阅读。

本刊一直列入中国科技期刊统计源,2004年继续入选为化学类核心期刊;1987年以来常年入选美国化学文摘千种表,入选俄罗斯《文摘杂志》;此外还被英国皇家化学学会《分析文摘》(AA)及《质谱公报》(MBS)系统摘录。

本刊为双月刊,国内外公开发行。大 16 开,单价: 12.00 元/册,全年 72 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。补订办法: 请从邮局汇款至广州市先烈中路 100 号《分析测试学报》编辑部,邮编: 510070,写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数(全年或某期),电话: (020) 87684776 或 37656606,

E-mail: fcxsxb@china.com, http://www.fcxsxb.com.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net