

碳纳米管纳米金自组装过氧化氢酶生物传感器研究

蒋 颖,李春梅,刘 婷,路 静,杨 倩,傅小红

(, 611130) *

摘 要:通过在玻碳电极(GCE)上自组装一层多壁碳纳米管(MWNTs)DMF 分散液,形成负电荷的界面,再由共价键作用自组装一层纳米金(GNPs)溶液的复合薄膜,通过静电吸附辣根过氧化物酶(HRP)制得碳纳米管—纳米金自组装过氧化氢(H_2O_2)生物传感器。使用循环伏安法(CV/Two vertex/Multi)对该传感器在酶催化反应条件下进行了优化。结果表明:在 $pH=6.80$ 且温度为 $28^\circ C$ 时,该生物传感器对过氧化氢有很好的催化特性;在优化条件下,当过氧化氢的浓度在 $4.00 \times 10^{-8} \sim 5.96 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 之间时与电流的相关系数可达到 0.9993。

关键词:辣根过氧化物酶;多壁碳纳米管;纳米金;生物传感器

doi: 10.3969/j.issn.2095-5642.2017.05.106

中图分类号: TP212

文献标志码: A

文章编号: 2095-5642(2017)05-0106-05

碳纳米管(MWCNTs)自从 1991 年被发现以来,因有着独特的几何和物理结构,其具有较好的化学稳定性、大的比表面积、优异的表面化学性能和良好的电化学性能^[1],是制作生物传感器的理想材料^[2],MWCNTs 能增强电化学反应活性及促进电活性物质与电极间的电子转移^[3]。目前,碳纳米管作为电极材料和电活性材料的载体已广泛应用于制备化学或生物传感器中^[4]。

纳米金(GNPs)材料除了具备纳米材料共有的比表面大、表面反应活性高、有宏观量子隧道效应等良好催化性质外,还具有独特的亲水性,能与多种生物大分子结合,且能保留其生物活性,因而被广泛应用于生物传感器的制备。

H_2O_2 的检测方法有光谱法、分光光度法和电化学法等,但光谱法设备昂贵,操作复杂,分光光度法的操作方法简单,但干扰因素多,电化学分析法^[5-7]具有方法简单,选择性好,灵敏度高的优点,但易受干扰因素的影响。由于酶反应具有良好的专一性,近年来,国内外已经有了许多关于电化学技术与酶反应相结合而构建的电化学酶传感器研究报道^[8-9]。但是,研发能够实际用于测定过氧化氢含量的生物传感器仍是不少专家学者努力的目标^[10-12]。本研究使用碳纳米管—纳米金自组装过氧化氢(H_2O_2)生物传感器测定了过氧化氢(H_2O_2)浓度。

一、实验部分

1.1 仪器与试剂

所有电化学实验均在 EC550 电化学工作站(武汉高士睿连科技有限公司)中完成。实验采用三电极系统:MWNTs/GNPs/HRPs 修饰的玻碳电极(GCE)为工作电极,饱和 KCl—甘汞电极(SCE)为参比电极,铂电极为对电极。纳米金由氯金酸(国药集团化学试剂有限公司,分析纯)与柠檬酸(天津博迪化工股份有限公司,分析纯)制备,磷酸缓冲溶液(PBS)pH 为 4.00~8.00,实验用水为超纯水。实验中所用玻璃器皿先用王

* 收稿日期:2017-01-12

基金项目:2016 年地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(201614389011)

作者简介:蒋 颖(1995—),女,江西上饶人,研究方向:电化学传感器;

李春梅(1994—),女,四川眉山人,研究方向:电化学传感器。

水洗涤,再用超纯水洗至中性,晾干待用。

1.2 修饰电极的制备

电极修饰之前,先用 $0.05\mu\text{m}$ 氧化铝粉打磨玻碳电极(GCE),使电极表面抛光至镜面,然后用水冲洗;再将 GCE 先后置于水、95%的无水乙醇、水中超声清洗,再用水冲洗;在 $\text{pH}=7.00$ 的 PBS 缓冲溶液中,以 0.07V/s 扫速在 $-1.2\text{V}\sim 0.6\text{V}$ 间连续扫描,直到得到重复的循环伏安图;用蒸馏水冲洗;晾干,备用。在 GCE 上自组装一层 MWNTs/DMF 分散液,形成负电荷的界面,置于冰箱内 4°C 晾干。

1.3 辣根过氧化物酶的固定

袁若课题组^[13]制备了以 MWCNT 为基底, Nano-Au 为交联剂固定双层 HRP 的 H_2O_2 传感器(HRP/Nano-Au/HRP/MWCNT/GC)。在此基础上,本研究采用的是以 MWNTs 为基底固定单层 HRP 的过氧化氢(H_2O_2)生物传感器(HRP/Nano-Au/MWCNT/GC)。取 HRP 0.0020g 溶解于 GNPs 溶液中,将修饰电极浸泡于 HRP/GNPs 溶液中 4h,通过共价键作用自组装一层 HRP/GNPs 溶液的复合薄膜,取出,室温下晾干。由此制得碳纳米管纳米金自组装过氧化氢(H_2O_2)生物传感器。(如图 1 所示)

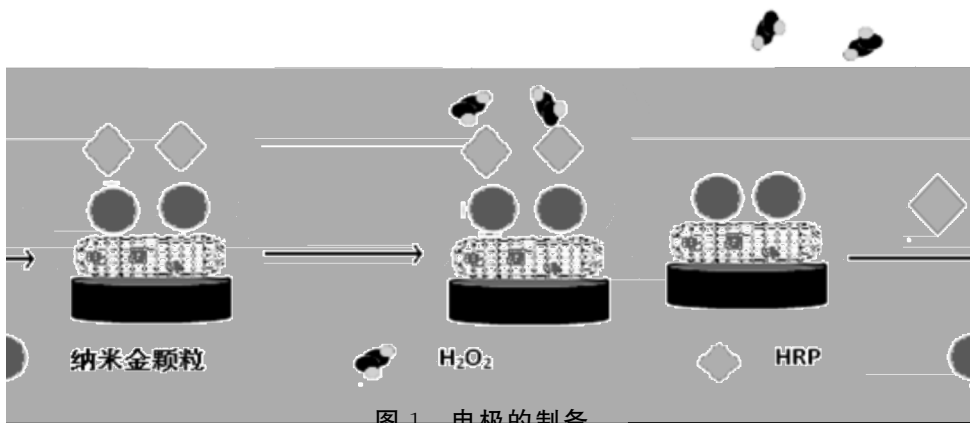


图 1 电极的制备

1.4 电化学测量

实验采用三电极系统: MWNTs/GNPs/HRP 修饰的玻碳电极(GCE)为工作电极,饱和 KCl-甘汞电极(SCE)为参比电极,铂电极为对电极。将 MWNTs/GNPs/HRP 修饰的玻碳电极(GCE)放在以磷酸缓冲溶液为底液的过氧化氢溶液,用循环伏安法检测其电流值,扫描速度为 0.07V/s 。扫描范围为 $-1.2\text{V}\sim 0.6\text{V}$ 。

二、结果与讨论

2.1 修饰电极在过氧化氢溶液中的响应行为

实验结果表明: MWNTs/GNPs/HRP 修饰的玻碳电极(GCE)对过氧化氢有较好的催化活性,在 $\text{pH}=7.00$, 温度为 28°C , 其 CV/Two vertex/Multi 如图 2 所示。因为 MWNTs 具有较大的表面积,在 GNPs 作用下,增大了 MWNTs 与 HRP 结合能力, MWNTs 优异的表面化学性能和良好的电化学性能有效促进 HRP 与 GCE 表面的电子传递,使该电极对过氧化氢具有良好、快速的响应性。

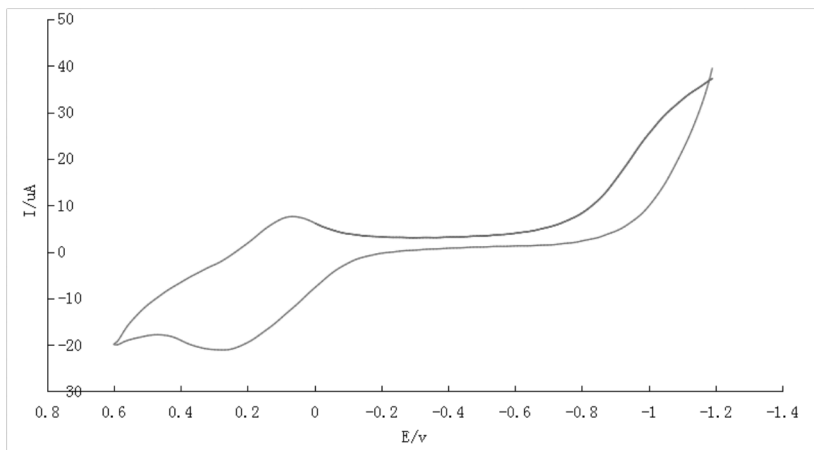


图2 温度为 28°C、pH=6.80 的 PBS 溶液中, CV/ Two vertex/Multi 图

2.2 介质温度对响应性的影响

本课题研究 MWNTs/GNPs/HRP 修饰的玻碳电极(GCE)在 $0.1000\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲溶液(PBS), 并在温度范围为 $15 \sim 33^\circ\text{C}$ 考察了温度对响应电流的影响, 实验结果表明: 峰电流随着温度的增大呈现先增大后减小; 当 $\text{pH}=6.80$, 过氧化氢浓度为 $3.98 \times 10^{-6}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 在温度为 28°C 和 18°C 时, 响应电流出现峰值, 28°C 的响应电流值大于 18°C 的响应电流值, 所以选择 28°C 作为优化后的实验温度。主要原因可能是酶的反应活性受温度的影响, 当温度低于最适温度时, 升高温度酶反应活性增强, 反应速率加快, 响应电流增大; 当温度高于最适温度时, 升高温度酶反应活性减弱, 反应速率减慢, 响应电流减小。(如图 3 所示)

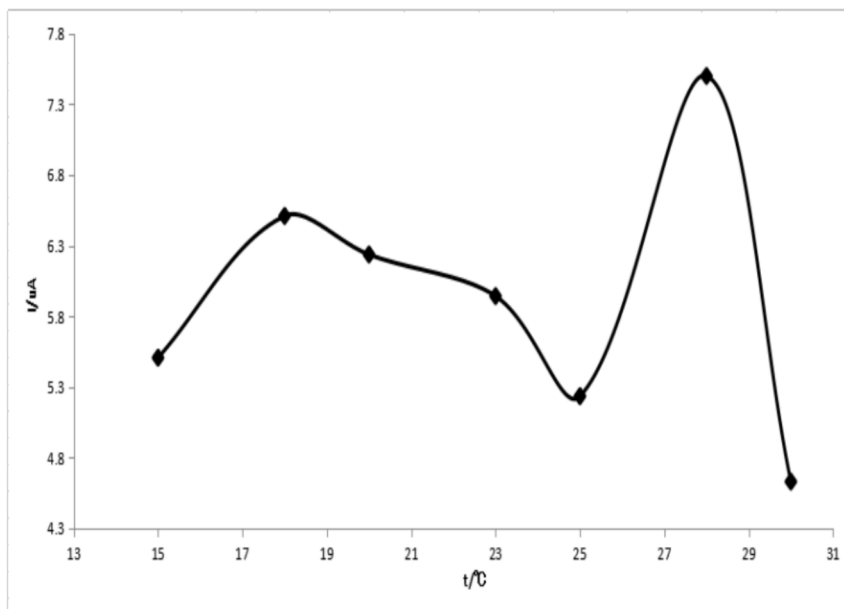


图3 pH=6.80, H_2O_2 浓度为 $3.98 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ 条件下, 温度与响应电流的关系

2.3 介质 pH 对响应性的影响

pH 影响 HRP 的催化活性和稳定性, 因此, pH 会影响反应的速率, 从而影响响应电流值的大小。MWNTs/GNPs/HRP 修饰的玻碳电极(GCE)置于 28°C , $0.1000\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液(PBS), 考察缓冲溶液 pH 在 $4.00 \sim 8.00$ 范围内变化时, pH 对响应电流的影响。结果表明, 峰电流随着 pH 的增大呈现先增大

后减小的趋势;当温度为 28°C ,过氧化氢浓度为 $3.98 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,在 $\text{pH}=6.80$ 时,响应电流出现峰值。(如图 4 所示)

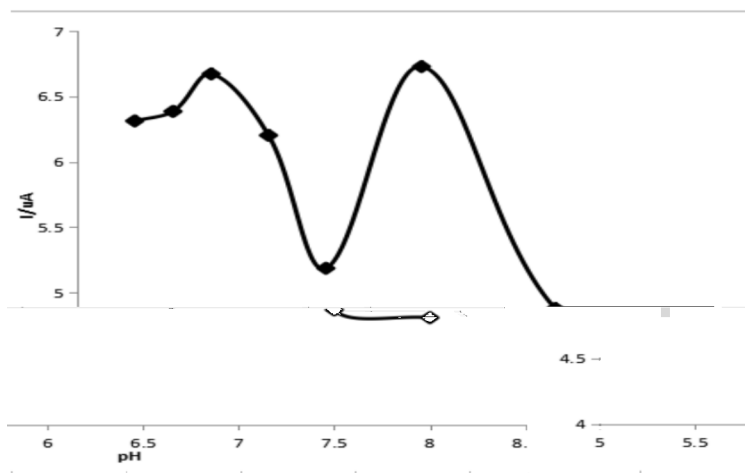


图 4 温度为 28°C , H_2O_2 浓度为 $3.98 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 条件下, pH 与响应电流的关系

2.4 优化条件下传感器对过氧化氢的响应性

利用 MWNTs/GNPs/HRP 修饰的玻碳电极(GCE)为工作电极,在温度为 28°C 、 $\text{pH}=6.80$ 条件下,记录浓度为 $4.00 \times 10^{-8} \sim 5.96 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的过氧化氢溶液中 MWNTs/GNPs/HRP 修饰的玻碳电极(GCE)对过氧化氢的 CV/ Two vertex/Multi 曲线图(图略),结果表明:该电极在优化条件下过氧化氢的浓度与响应电流相关线性可达 0.9993(如图 5),检出限为 $4.00 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,袁若课题组^[13]检出限为 $2.3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,与未优化之前相比,提高 MWNTs/GNPs/HRP 修饰的玻碳电极(GCE)对过氧化氢的响应,并缩短对其响应的的时间,表现出较好的稳定性、重现性、抗干扰性,且制作简单。

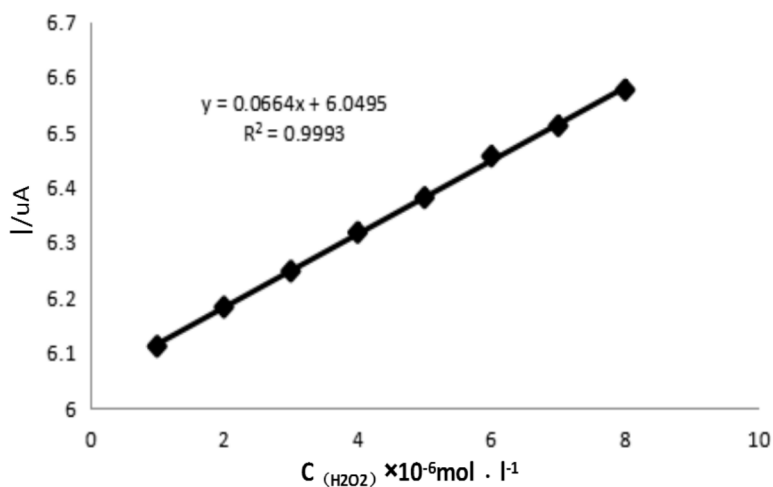


图 5 优化条件下浓度与响应电流的关系

三、结论

基于 MWNTs/GNPs 复合材料,成功地构建了一种新型的过氧化氢生物传感器。纳米金颗粒吸附在 CNTs 修饰电极表面有利于在 CNTs 表面过辣根氧化氢酶的静电吸附,从而有利于 HRP 的固定。另外,纳米金作为电子媒介体有利于电子在电极和 HRP 活性位点之间的传递。MWNTs/GNPs/HRP/GCE 电极对过氧化氢表现出优异的传感性能,其检出限低,响应时间短,抗干扰能力强,稳定性好。

参考文献:

- [1] Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon[J]. Nature, 1991, 354(7): 56-58.
- [2] Britto P J, K S V Santhanam, P M Ajayan. Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine, Bioelectrochem[J]. Bioelectrochem Bioenerg, 1996, 41(1): 121-125.
- [3] Musameh M, Wang J, Merkoci A, et al. Low potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes[J]. Electrochem, Commun. 2002, 4: 743-746.
- [4] Cui HF, Ye JS, Zhang WD, Wang J, et al. Electrocatalytic reduction of oxygen by a platinum nanoparticle/carbon nanotube composite electrode[J]. J Electroanal Chem, 2005, 577(2): 295-302.
- [5] , , . [J]. , 2012, 40(6): 909-914.
- [6] , , . [J]. , 2014, 4(3): 441-445.
- [7] , , . [M]. : , 2009: 365-400.
- [8] , , . [J]. , 2006, 23(4): 399-403.
- [9] FU Xiao-hong, YUAN Ruo, CHAI Yin. A Fast Potentiometric Immunosensor for Rubella Vaccine[J]. Journal of Southwest China Normal University, 2008, 33(2): 1-6.
- [10] , , . [J]. , 2006, 23(4): 399-103.
- [11] , . [J] , 2014, 34(3): 22-31.
- [12] , . [J]. - , 2007, 43(6): 433-153.
- [13] , , , . / / , / [J]. , 2006, 64(16): 1711-1715.

Research on Carbon Nanotube Nano gold Self-assembled Catalase Biosensor

JIANG Ying, LI Chun-mei, LIU Ting, LU Jing, YANG Qian, FU Xiao-hong

(School of Chemistry and Life science, Chengdu Normal University, Chengdu 611130, China)

Abstract: A layer of multi walled carbon nanotubes (MWNTs) DMF dispersion was self-assembled on a glassy carbon electrode (GCE) to form a negatively charged interface, and a self-assembled monolayer of nano gold (GNPs) solution was prepared by covalent bonding, and then a carbon nanotube nano gold self-assembled hydrogen peroxide (H_2O_2) biosensor was prepared by electrostatic adsorption of horseradish peroxidase (HRP). Cyclic voltammetry (CV/Two vertex/Multi) was used to optimize the conditions of the enzyme catalyzed reaction. The results showed that the biosensor had a good catalytic activity for hydrogen peroxide at pH=6.80 and a temperature of 28°C; under optimized conditions, the correlation coefficient of the current can reach 0.9993 when the concentration of hydrogen peroxide is between $4.00 \times 10^{-8} \sim 5.96 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: horseradish peroxidase; multi walled carbon nanotubes; nano-Au; biosensor

(实习编辑:杨晓玲 责任校对:曲 比)