

磁性碳纳米管修饰 POD—GOD 双酶系统葡萄糖传感器的研究

常 波^{a,b}, 叶 丹^a, 王 敏^a, 傅小红^{a,b}, 徐 坤^a, 梅 丽^{a,b}

(成都师范学院 a.化学与生命科学学院;b.功能分子研究所,成都 611130)*

摘要:采用自组装的方式将过氧化物酶(POD)和葡萄糖氧化酶(GOD)组成的双酶修饰到戊二醛(CA)/壳聚糖(CS)/Fe₃O₄-MWNTs 复合材料的两种不同规格玻碳电极表面,形成 POD—GOD/CA/CS/Fe₃O₄-MWNTs 生物传感器。利用循环伏安法(CV)对两种规格的生物传感器进行表征,并对其制备条件及电化学性质进行了详细的研究。结果表明:Fe₃O₄的磁性和碳纳米管较好的导电性以及传感器较大的比表面积大大地改善了双酶(POD—GOD)的生物活性。在最优条件下(t=28℃,pH=6.0),电极表面直径为 1mm 和 5mm 的生物传感器在葡萄糖浓度分别在 3.33×10⁻¹⁰~3.32×10⁻⁹mol/L 范围内呈良好线性,检测限为 1.67×10⁻¹⁰mol/L。

关键词:过氧化物酶(POD);葡萄糖氧化酶(GOD);Fe₃O₄;碳纳米管;壳聚糖;生物传感器;葡萄糖检测

doi:10.3969/j.issn.2095-5642.2018.09.096

中图分类号:TP212.3 文献标志码:A 文章编号:2095-5642(2018)09-0096-08

1 引言

近年来,葡萄糖生物传感器不仅在临床医学中的血糖检测领域发挥着重要作用,还在化工、食品、环境监控和生物分析等领域有着广泛的应用^[1]。研究人员正在针对传感器的检测速度、灵敏度、成本等因素进行越来越深入的研究^[2]。

电极表面固定酶的活性位点居于酶蛋白质的内部,因为活性基团接触几率减小,从而影响电子传递。研究表明,利用磁性材料的特性可以将酶蛋白的活性位点翻转裸露出来,增加活性基团的接触机会,提高电子的传递效率^[3]。本文通过构建 Fe₃O₄-MWNTs 磁性纳米复合材料有望解决反应基团的特殊性,增大反应量,加大反应电流,同时复合材料的构建特性增强生物传感器的稳定性^[4-7]。

随着纳米技术的高速发展,纳米材料在生产、生活尤其是传感器中的应用得到了极大地促进^[8]。纳米材料不仅具有较大的比表面积、小尺寸效应、较高的包裹效率、高灵敏度等特性,还具有高导电性、强机械性等特点^[9-10]。选用碳纳米管作为纳米复合材料中的高分子聚合物与 Fe₃O₄的结合,有望令原本的生物兼容性和吸附能力等优势得到增强。

壳聚糖是天然高分子化合物,具有良好的生物相容性,成膜性和机械稳定性等优良性能,是一种无毒、生物可降解的多糖类物质^[11-13]。壳聚糖分子中含有大量游离的氨基^[14],可作为优良的固定化酶载体^[15],通过

* 收稿日期:2018-04-16

基金项目:2017 年地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目“石墨烯多层自组装过氧化氢生物传感器”(201714389023)

作者简介:常 波(1987—),男,四川巴中人,助教,学士,研究方向:精细化学品及分析;
叶 丹(1994—),女,四川宜宾人,学士,研究方向:葡萄糖电化学传感器研究;
王 敏(1994—),女,四川绵阳人,学士,研究方向:电化学分析;
傅小红(1974—),女,重庆长寿人,教授,硕士,研究方向:电分析化学;
徐 坤(1968—),女,四川西昌人,教授,学士,研究方向:食品科学与工程;
梅 丽(1980—),女,贵州遵义人,副教授,博士,研究方向:功能材料。

戊二醛的交联可使酶更加牢固地固定在壳聚糖分子上^[16-17]。综上所述,本研究采用自组装的方式将过氧化物酶(POD)和葡萄糖氧化酶(GOD)组成的双酶修饰到戊二醛(CA)/壳聚糖(CS)/Fe₃O₄-MWNTs 生物传感器。利用循环伏安法(CV)对两种规格的生物传感器进行表征,并对其制备条件及电化学性质进行详细的研究。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

550 型电化学工作站(武汉高士睿连有限公司);10 微升微量进样器(上海安亭微量进样器厂);PHS-3CW 型 pH 计(上海班特仪器制造有限公司);玻碳电极(1mm 和 5 mm,武汉高士睿连科技有限公司)。

葡萄糖氧化酶(AR,上海源叶生物科技有限公司);过氧化氢酶(AR,国药集团化学试剂有限公司);壳聚糖(AR,Sigma-Aldrich 化学试剂公司);无水葡萄糖、铁氰化钾、戊二醛、磷酸氢二钾(AR,天津市科密欧化学试剂有限公司);碳纳米管(中国科学院成都有机化学有限公司中科时代纳米实验部);冰乙酸(AR,天津博迪化工股份有限公司);氯化亚铁、三氯化铁(六水)(AR,天津市大茂化学试剂厂);L-半胱氨酸(BR,成都市科龙化工试剂厂);氨水,95%乙醇(AR,成都金山化学试剂有限公司);氯化钾、磷酸二氢钠、氢氧化钠、柠檬酸钠(AR,天津市瑞金特化学品有限公司);维生素 C(郑州博研生物科技有限公司)。

2.2 四氧化三铁(Fe₃O₄)的制备

按照质量比为 mFeCl₃:mFeCl₂=4:3 进行计算并称量[无水 FeCl₃ 质量为 15.0156g,(FeCl₃·6H₂O 质量为 25.0134g),FeCl₂ 质量为 8.6841g],分别加入 60℃ 的超纯水中,在氮气保护条件下,用玻璃棒充分搅拌使其分散。加入浓氨水调节 pH 至 10.0 以上,继续搅拌至圆底烧瓶中出现黑色沉淀。水浴锅加热使其温度保持在 60℃,反应 40min 直到沉淀完全。降至室温后用磁铁分离,依次用超纯水、无水乙醇洗涤三次,干燥后得磁性 Fe₃O₄ 粉末。

2.3 磷酸缓冲盐溶液(PBS)的配制

分别称取 K₂HPO₄(2.2677g)、NaH₂PO₄(0.4413g)、KCl(10.8683g)加入烧杯中,溶解、转移并定容至 1000mL 容量瓶中,配制成 pH=7.33 的 PBS 溶液。

2.4 构建 POD-GOD/CA/CS/Fe₃O₄-MWNTs 生物传感器

(1)玻碳电极的预处理

玻碳电极利用 Al₂O₃ 抛光粉将玻碳电极进行抛光至镜面的预处理,放置在超声波清洗仪中分别用无水乙醇和超纯水清洗 3 次,每次清洗 15 分钟,将清洗好的裸玻碳电极放入 PBS(5mL PBS+1mL K₃[Fe(CN)₆])在 -0.05~0.65V 范围内用循环伏安法进一步对裸玻碳电极进行清理和活化。

(2)Fe₃O₄-MWNTs 复合物的合成

称取制备好的 Fe₃O₄ 粉末少量,充分碾磨,将其添加到碳纳米管分散液中,用搅拌器持续搅拌 10h 令两者混合均匀,分散充分得到最终产品磁性碳纳米管。

(3)制备复合电极

实验采用滴涂法^[18]制备电极:将磁性碳纳米管修饰在已经预处理好的玻碳电极表面。磁性碳纳米管干燥固定好后,将 1% 的壳聚糖滴涂在 Fe₃O₄-MWNTs 玻碳电极上,形成 CS/Fe₃O₄-MWNTs 复合材料玻碳电极,少量戊二醛(2.5%)一并修饰在其表面,组合形成 CA/CS/Fe₃O₄-MWNTs 复合材料玻碳电极(每一层修饰后均储存在 4℃ 的环境中 4 小时,待固定好后继续修饰下一层)。最后,以 PBS 作溶剂形成的过氧化物酶^[19]和葡萄糖氧化酶双酶饱和溶液滴涂在改性的玻碳电极上,构建成 POD-GOD/CA/CS/Fe₃O₄-MWNTs 复合材料玻碳电极。

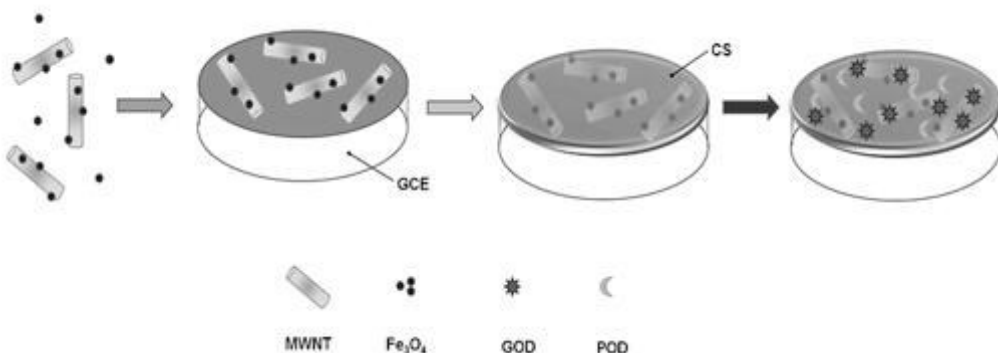


图 1 POD-GOD/CA/CS/Fe₃O₄-MWNTs 玻碳电极的制备过程

2.5 电化学特性的测定

本文采用三电极体系(POD-GOD/CA/CS/Fe₃O₄-MWNTs 复合材料玻碳电极为工作电极, Hg/Hg₂Cl₂电极为参比电极, 铂电极为对电极), 以 5 mL PBS(pH=7.33)和 1 mL K₃[Fe(CN)₆](0.1 mol/L)为测试底液借助循环伏安法分别测定直径不同的电极两个生物传感器的电化学特性。(规格为 5 mm, 1 mm 的电极电压范围分别为 -0.05~0.65 V, -0.05~0.80 V)

3 结果与讨论

3.1 生物传感器的电化学表征

循环伏安法(CV)考察 5 mm 规格的裸玻碳电极以及每修饰固定一层后的电极的电化学性质。结果如图 2 所示, (a)有一组较好的氧化还原峰。相比于(a), (b)有明显的变化, 其氧化还原峰的电流大小出现了激增。表明磁性碳纳米管具有高效的导电能力, 有效地增加了电子传递效率。(c)的峰值在(a)和(b)峰值之间。可以看出 CS 已经固定在电极表面。峰值较(b)减小的原因可能是修饰的 CS 膜本身较厚, 具有较大的阻抗, 以及 CS 的导电能力较差。但在本研究中, 因玻碳电极经过了磁性碳纳米管的改性, 其较强的导电性使得 CS 固定后电流峰值的减少不太明显。(d)的氧化还原峰值大小和(a)比较明显降低。说明电极表面固定上了葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶组成的氧化还原酶系统。因为酶是非导电物质, 阻碍电极表面的电子传递, 导致电流峰值明显减小。

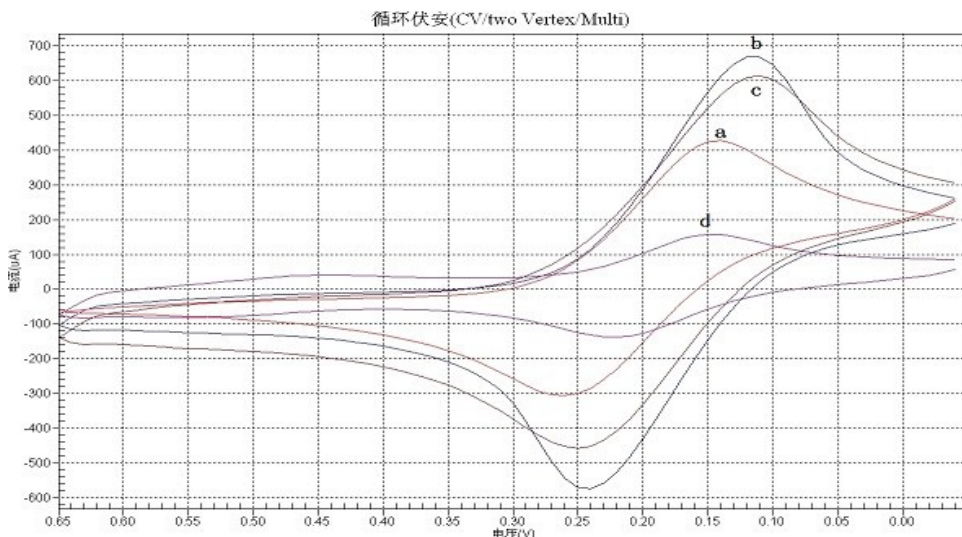


图 2 在 PBS 溶液中不同阶段电极修饰的循环伏安图

(a)GCE (Bare glass carbonelectrode);(b) Fe_3O_4 -MWNTs/GCE;
(c)CS/ Fe_3O_4 -MWNTs/GCE ;(d) POD-GOD/CA/CS/ Fe_3O_4 -MWNTs/GCE.

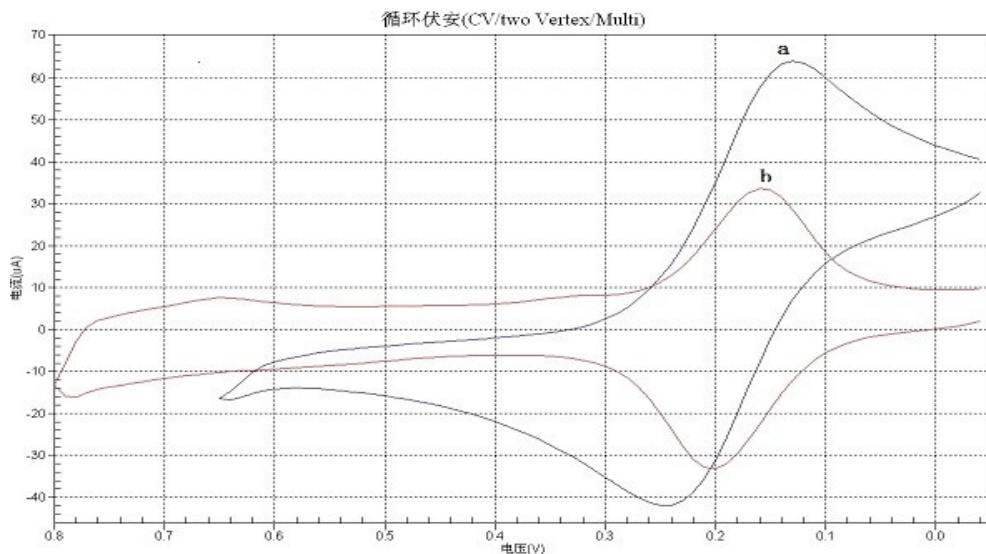


图 3 在最适葡萄糖浓度(9.88×10^{-8} mol/L)不同规格的生物传感器的循环伏安图

(a)5mmPOD-GOD/CA/CS/ Fe_3O_4 -MWNTs/GCE

(b)1mmPOD-GOD/CA/CS/ Fe_3O_4 -MWNTs/GCE

3.2 Fe_3O_4 -MWNTs 的电流响应

经研究表明,规格较大的电极越不易固定上氧化酶。因为覆盖面积越大,它的表面张力越大,氧化酶容易聚合一起,阻抗增大,电子转移越慢。如图 3,将直径分别为 5mm 和 1mm 的 POD-GOD/CA/CS/ Fe_3O_4 -MWNTs/GCE 电极分别放入 9.88×10^{-3} mol/L 葡萄糖溶液中,用循环伏安法(CV)进行扫描。由图可知电极表面直径的大小与氧化还原峰值大小成正比。这表明,复合而成的磁性碳纳米管(Fe_3O_4 -MWNTs)不仅具有较高的导电性,而且能够有效地提高对氧化还原酶系统吸附能力。

3.3 实验条件的优化

3.3.1 测定底液 pH 的选择

在 pH 范围为 3.5~7.5 的 PBS 溶液中,控制温度、溶液浓度保持一致,采用循环伏安法检测峰电流的变化(以 0.5 为 pH 检测梯度)。如图 4,pH 不同,氧化峰的电流大小有明显的变化。当 pH=6.0 时,电流呈现最大值,在该 pH 值之下 POD-GOD/CA/CS/ Fe_3O_4 -MWNTs/GCE 生物传感器的响应最好。所以,该生物传感器的最适 pH 为 6.0。

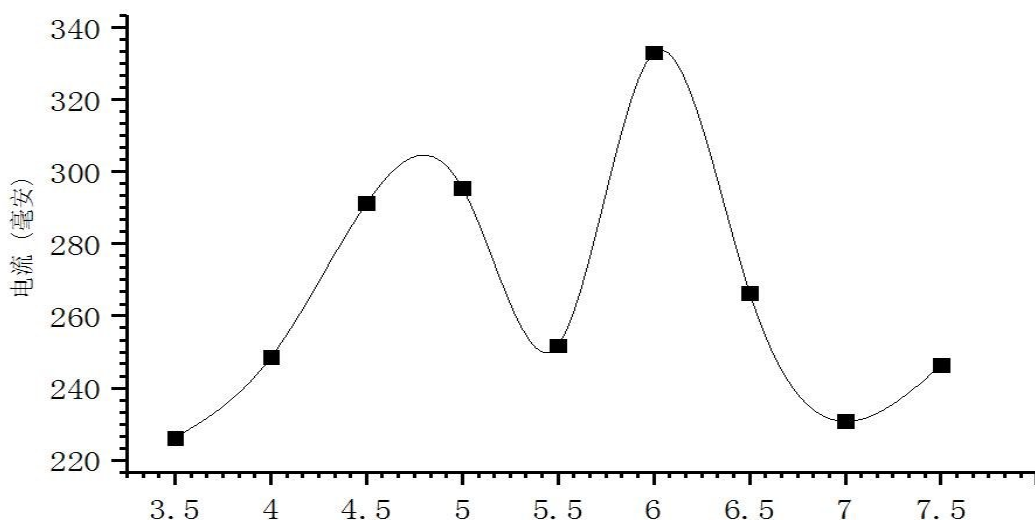


图4. 电极表面直径为5mm的生物传感器的pH与电流响应的关系 (t=25°C)
—■— 电流

3.3.2 测定底液温度的选择

根据文献,选定温度范围为20~33°C。我们通过调节恒温水浴锅中溶液的温度来改变以及稳定反应池中检测液的温度,待反应池中温度稳定后连接各电极,用上述方法进行探究(以1°C为温度梯度,pH=6.0)。得到每个温度中的最大电流值,将该电流值和相应温度作图。从图5中可以看出当温度为28°C时,电流是该温度范围内的最大值。可得最适温度为28°C。该温度与室温基本一致,说明POD-GOD/CA/CS/Fe₃O₄-MWNTs/GCE电极的反应条件温和,适用范围广。

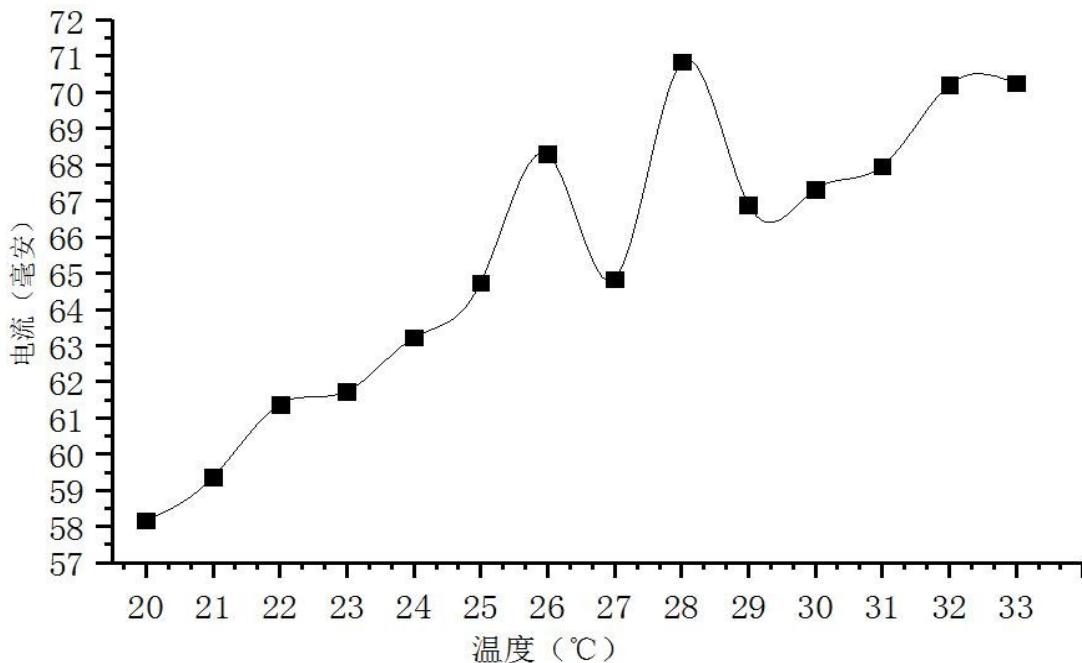


图5. 温度与生物传感器电流响应的关系 (pH=6.0)
—■— 电流

3.4 干扰的测定

在最适条件下,选用葡萄糖浓度为 1×10^{-5} mol/L ($6 \mu\text{L}$),然后分别加入同等浓度的干扰物质 L-半胱氨酸、柠檬酸钠、维生素 C。根据图 4 和图 5 数据发现,干扰物质的循环伏安图中的氧化还原峰与没有加入干扰物质中的氧化还原峰的位置基本没有变化,电流峰值大小也基本没有变化。表明该电极的抗干扰能力较强,POD-GOD/CA/CS/ Fe_3O_4 -MWNTs/GCE 生物传感器对葡萄糖具有选择性。

3.5 所制传感器的重现性和稳定性

3.5.1 重现性

该生物传感器在最优条件下测定传感器对 1×10^{-5} mol/L ($6 \mu\text{L}$) 的葡萄糖溶液的电流响应,连续扫描 30 次。如图 6 所示。从图中的数据可以得到,最后一次与第一次的重合度为 98%,说明该生物传感器的重现性良好。

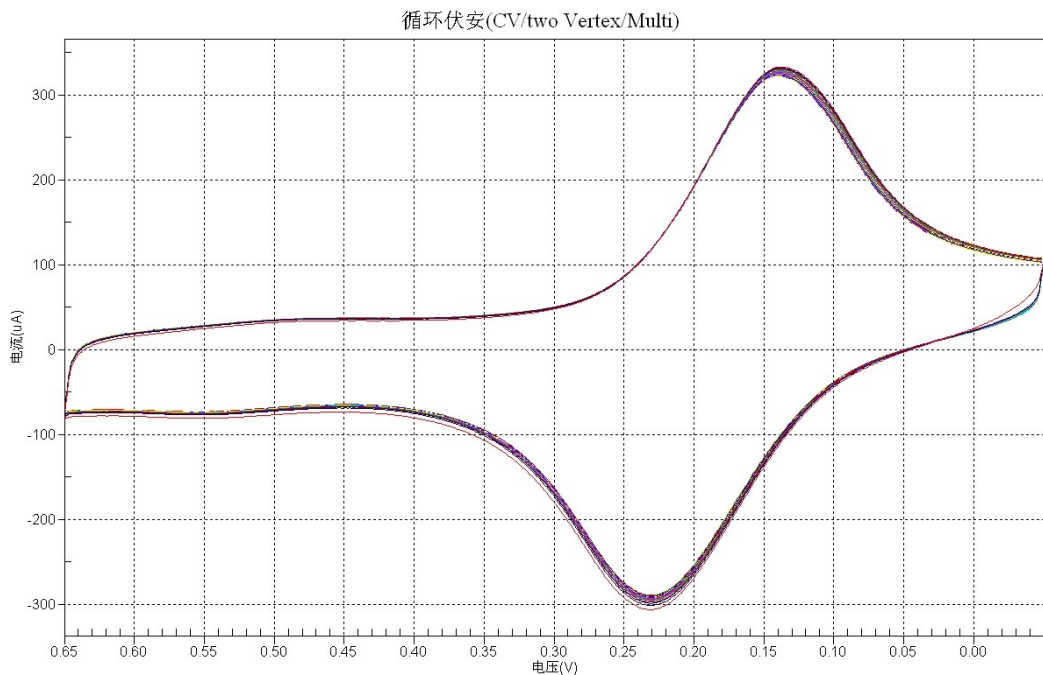


图 6 5 mm 电极的重现性的循环伏安图

3.5.2 稳定性

将制备的 POD-GOD/CA/CS/ Fe_3O_4 -MWNTs/GCE 生物传感器在 4°C 的条件下进行保存,开始每隔一天测定一次,测定三次后;每隔一周测定一次,测定了五次,如图 7 所示,可以观察到在隔了一周后测定时,电流有明显下降,但是数值变化不大。在后面的测定中数据基本不变,说明稳定性较好。

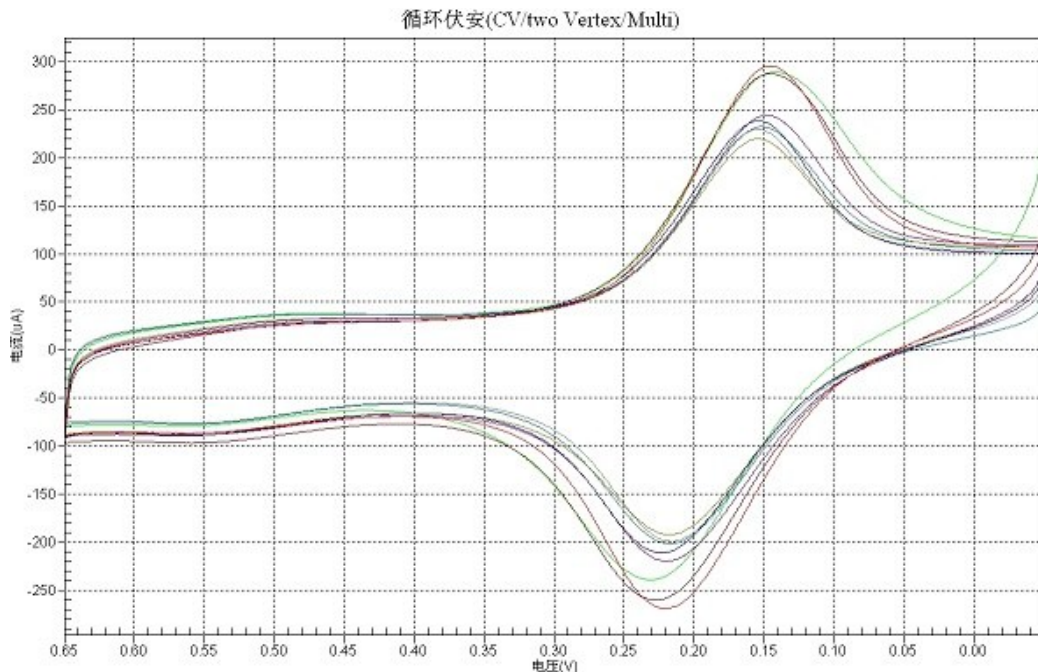


图7 5mm 电极的稳定性的循环伏安图

4 结论

本实验采用玻碳电极作为基体电极,将 Fe_3O_4 -MWNTs,CS,CA,POD-GOD 依次自组装在电极表面,制备得到 POD-GOD/CA/CS/ Fe_3O_4 -MWNTs/GCE 型生物传感器,从而构建了一种新型的葡萄糖生物传感器。通过循环伏安法的测定,该生物传感器能够有效提高电子传递速率和增加酶修饰量,因此能够检测更微量的葡萄糖。此外它还具有高灵敏度,良好的稳定性以及重现性,响应速度快的特点。

参考文献:

- [1] 韩红彦,崔立山.基于 MnO_2 -MWNT 纳米复合物的葡萄糖生物传感器的制备及其性能研究[J].化工新型材料,2015,43(8):115-118.
- [2] 郑雯.几种新型纳米材料修饰电极的制备及其在电化学生物传感器中的应用[D].青岛:青岛科技大学,2017.
- [3] 胡敬芳,高国伟,夏善红.基于固定化电子媒介体的介体型 BOD 生物电化学传感器研究[J].传感器世界,2015,21(10):15-19.
- [4] 彭花萍,查代君,黄郑隼,等.二茂铁功能化四氧化三铁/碳纳米管/壳聚糖复合膜葡萄糖生物传感电极的研究[J].电化学,2014,20(1):33-38.
- [5] 吴爱坪.电化学葡萄糖传感器研究进展[J].科技创新与应用,2015,(23):63.
- [6] 王伟.介体型电流式酶传感器中电子媒介体的研究进展[J].信息记录材料,2017,4(18):13-14.
- [7] 张献英.基于电子媒介体二茂铁羧酸电化学生物传感器的研究[D].吉林大学,2016.
- [8] 万广财,张泽,于洪伟.纳米材料在传感器中的进展及临床应用[J].医学综述,2016,13(22):2512-2516.
- [9] 李瑞雪.新型磁性纳米功能材料的制备与性能研究[D].广州:华南理工大学,2010.
- [10] 钟霞.几种复合纳米材料的合成及其在葡萄糖生物传感器中的应用研究[D].重庆:西南大学,2013.
- [11] 谢惠英.壳聚糖复合材料的制备及其在生物传感器中的应用[D].南昌:南昌大学,2007.
- [12] 陈雄.壳聚糖溶液行为研究[D].北京:北京服装学院,2008.
- [13] 吴述平.半纤维-壳聚糖生物功能材料研究及其应用[D].武汉:武汉大学,2014.
- [14] 李婷婷.壳聚糖衍生材料制备及其对水中铅和酸性橙 7 的吸附机理研究[D].长沙:湖南大学,2016.
- [15] 段玮.壳聚糖微球的制备及其固定化酶的研究[D].长沙:湖南师范大学,2012.
- [16] 赵蕊,周浩然,张晶宇,等.戊二醛与甲醛交联壳聚糖微球的比较研究[J].化学与黏合,2012.

- [17] 王宇, 高建峰, 胡拖平, 等. 戊二醛交联壳聚糖印迹材料对稀土中 Cu(II) 的选择吸附性能研究[J]. 离子交换与吸附, 2015, 06(31): 562-568.
- [18] 黄维, 朱家艺, 李浩, 等. 滴涂法制备石墨烯/碳纳米管复合薄膜及其表征[J]. 无机材料学报, 2017, 32(2): 203-208.
- [19] 蒋颖, 李春梅, 刘婷, 路静, 杨倩, 傅小红, 等. 碳纳米管纳米金自组装过氧化氢酶生物传感器研究[J]. 成都师范学院学报, 2017, 33(5): 106-110.

On Magnetic Carbon Nanotubes Modifying Glucose Sensors with POD-GOD System

CHANG Bo^{a,b}, YE Dan^a, WANG Min^a, FU Xiaohong^{a,b}, XU Kun^a, MEI Li^{a,b}

(a. Institute of Functional Molecules, b. School of Chemistry and Life Science, Chengdu Normal University, Chengdu 611130, China)

Abstract: Double enzyme composed by the self-assembly of peroxidase(POD) and glucose oxidase(GOD) was modified on the surface of two different specifications of glassy carbon electrode of glutaraldehyde(CA)/chitosan(CS)/Fe₃O₄-MWNTs composites, which formed POD-GOD/CA/CS/Fe₃O₄-MWNTs biosensor. The two specifications of biological sensors were characterized by cyclic voltammetry(CV), and the preparation conditions and electrochemical properties were studied in detail. The results showed that the magnetism Fe₃O₄, a better electrical conductivity of carbon nanotubes and the specific surface area of the sensor significantly improved the bioactivity of the bi-enzyme(POD-GOD). Under the optimal conditions ($t=28^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=6.0$), the biosensors with the electrode surface diameters of 1mm and 5mm show good linearity respectively when the range of glucose concentration is from 3.33×10^{-10} to $3.32 \times 10^{-9}\text{mol/L}$ and from 3.33×10^{-10} to $1.66 \times 10^{-9}\text{mol/L}$, and the detection limit was $1.67 \times 10^{-10}\text{mol/L}$.

Key words: peroxidase; glucose oxidase; Fe₃O₄; carbon nanotubes; chitosan; biosensor; detection of glucose

(实习编辑:杨晓玲 责任校对:曲 比)