

含超细 Au 颗粒的乳酸氧化酶和葡萄糖氧化酶生物传感器

孟宪伟, 高凤堂, 任湘菱, 韦正, 唐芳琼

(中国科学院理化技术研究所, 北京 100101)

摘要: 制备了小于 10 nm 的金颗粒, 并利用其进行固定化葡萄糖氧化酶和乳酸氧化酶的研究. 实验发现, 金纳米颗粒可以大幅度提高葡萄糖氧化酶电极和乳酸氧化酶电极的电流响应, 响应电流从相应浓度的几十纳安增强到几千纳安. 探讨了金纳米颗粒在固定化酶中所起的作用.

关键词: 固定化酶; 葡萄糖氧化酶; 乳酸氧化酶; 金纳米颗粒

中图分类号: O613.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2002)04-0351-04

1 前言

酶生物传感器最重要的部分是以高效率工作的分子识别反应生物传感器单元, 对此追求的目标是灵敏、价廉、微型化. 因此, 如何固定酶并保持其活性, 提高其响应灵敏度, 延长使用寿命是要解决的关键问题. 这方面的工作已有许多报道^[1,2], 例如: 酶膜中加入导电有机物质, 如二茂铁、吡咯等可以增大电流响应, 利用双官能团交联剂可以更好地固定酶, 提高其稳定性等. 本文介绍一种独特的技术, 在固定酶(选用乳酸氧化酶 LOD、葡萄糖氧化酶 GOD 作为酶模)时, 将超细 Au 颗粒引入酶膜制备电极. 这种技术不需要化学后处理, 可以保证酶分子无损伤地固定化, 具有非常快的响应性和高灵敏度.

近年来, 纳米颗粒奇特的物理特性引起人们的关注. Crumbliss 等^[3]研究了亲水 Au 颗粒对氧化酶的相容性, 但仅研究了 30~50 nm 的亲水 Au 颗粒, 未提及 Au 颗粒, 特别是憎水纳米 Au 颗粒对电流响应的增强效应. 本工作则使用小于 10 nm 的 Au 颗粒, 尤其是反胶束方法制备的憎水纳米 Au 颗粒进行固定化酶的研究. 利用纳米 Au 颗粒比表面积大、表面反应活性高、表面活性中心多、催化效率高、吸附能力强等优异性质, 进行固定化酶研究. 结果表明, 纳米颗粒可以显著提高 LOD、GOD 酶电极的响应灵敏度和使用寿命. 亲水 Au、憎水 Au 纳米颗粒均具较佳导电性并且粒径很小, 可以作为电极表面与 LOD 或 GOD 分子之间的电子传递媒质, 改善电极的电子传递过程. 同时憎水纳米颗粒所携带的反胶束可以为酶提供水溶性微环境, 减少与引入高分子固酶基质时带入的极性有机溶剂(如无水乙醇)的接触, 提高固定化酶的催化活性.

这种在无机纳米颗粒中固定酶的方法简单易行, 操作方便, 氧化酶用量少, 不需要昂贵的实验设备, 易于工业化. 制备的酶生物传感器响应迅速, 灵敏度高, 受溶解氧影响小, 线性范围宽, 为纳米生物传感器的组装提供了可能.

2 实验

2.1 试剂

葡萄糖氧化酶 GOD(100 U/mg, 日本生化试剂); 乳酸氧化酶(34 U/mg, Sigma Chem. Co.); β -D

收稿日期: 2001-12-14, 修回日期: 2002-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 69731010; 69971023)

作者简介: 孟宪伟(1974-), 男, 辽宁省法库县人, 博士, 助理研究员, 生物医学工程专业.

葡萄糖(Sigma Chem. Co.); 乳酸锂(Sigma Chem. Co.); 混合磷酸盐(KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 北京化学试剂二厂) 表面活性剂 AOT($\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{Sna}$, 日本 Nacalai Tesque Inc. Kyoto) 聚乙烯醇缩丁醛(PVB, 中国医药进出口公司进口分装); 其它试剂均为分析纯, 配制溶液的水均为二次蒸馏水.

2.2 仪器

Ag/AgCl 电极(自制); 透射电子显微镜: JEM-100 型, 日本 NEC 公司; 紫外光谱仪: 8451A 型, 美国惠普公司; 自动双重纯水蒸馏器: 石英管式, 上海玻璃仪器一厂; 数字多用仪 Thurlby 1905-a 型.

2.3 纳米颗粒的制备

亲水 Au 颗粒用柠檬酸钠还原氯金酸盐水溶液(1.0×10^{-4} mol/L)制备. 憎水 Au 颗粒在含有表面活性剂 AOT/环己烷体系形成的反胶束中制备, 具体方法见文献[4]. 其 TEM 照片如图 1 所示.

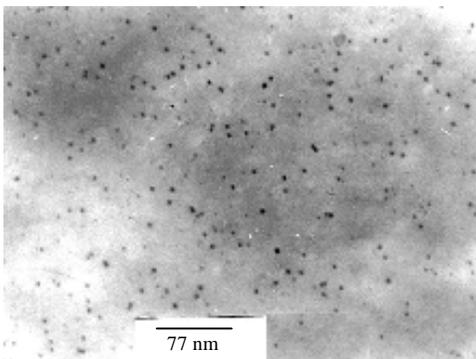


图 1(a) AOT/环己烷体系 Au 纳米颗粒 TEM 照片
Fig.1(a) Electron micrograph of hydrophobic Au particles in AOT/cyclohexane

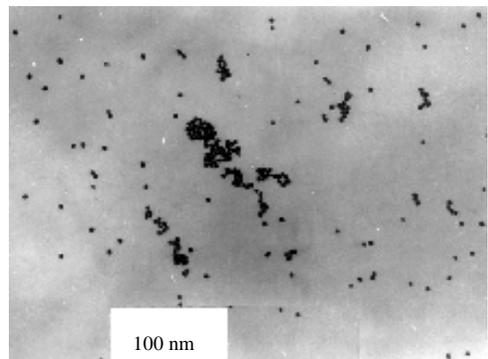


图 1(b) 水溶性 Au 纳米颗粒 TEM 镜照片
Fig.1(b) Electron micrograph of hydrophilic Au particles

2.4 乳酸、葡萄糖氧化酶电极的制备

葡萄糖氧化酶电极采用溶胶-凝胶法制备, 取一定量的 Au 溶胶与一定单位的 GOD 均匀混合后加入适量 PVB/乙醇溶液和戊二醛溶液, 用处理干净的铂丝($\phi=1$ mm)在混合物中浸涂. 待晾干后置于冰箱中 4°C 下干保存待用.

乳酸氧化酶电极的制备: 取 50 单位的乳酸氧化酶溶解于 pH 为 7.0 的磷酸缓冲液中, 然后与一定量的金纳米颗粒混合, 再加入羟丙级纤维素、戊二醛. 用处理干净的铂丝($\phi=1$ mm)在混合物中浸涂. 待晾干后置于冰箱中 4°C 下干保存待用.

2.5 酶电极响应电流的测量

采用二电极体系检测电极电流, 以氧化酶作为工作电极, Ag/AgCl 作为参比电极. 在反应池中加入 7 ml 磷酸缓冲溶液(葡萄糖氧化酶电极 pH=6.8, 乳酸氧化酶电极 pH=6.7), 控制温度为 35°C , 工作电压为 0.4 V. 记录加入反应物(β -D 葡萄糖或乳酸锂)后不同时间的酶电极的响应电流.

3 结果和讨论

图 2 为 0.4 V 工作电压下 Au 纳米颗粒对乳酸氧化酶电极电流响应的增强作用. 由图可见, 相同条件下, 未引入超微 Au 颗粒的 LOD 电极在检测 10 mmol 的乳酸锂盐时, 电极响应电流仅 525 nA, 而引入 Au 颗粒的 LOD 电极响应电流提高到 2450 nA. 图 3 为 0.4 V 工作电压下, Au 纳米颗粒对葡萄糖氧化酶电极电流响应的增强作用. 未引入 Au 颗粒的 GOD 电极的响应电流很低, 在 11.1

mmol 时仅 210 nA, 引入超微亲水 Au 颗粒的 GOD 电极响应电流为 863 nA, 而引入憎水超微 Au 颗粒的 GOD 电极的响应电流提高到约 7140 nA, 且电流的响应也较快, 在小于 30 s 时即可达到稳定。

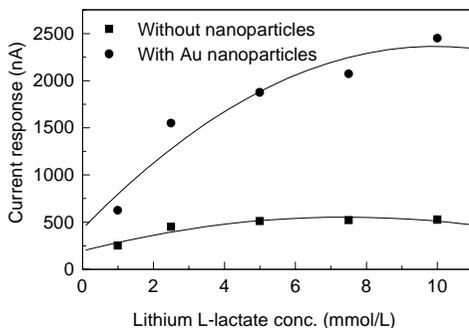


图 2 Au 纳米颗粒对 LOD 酶电极的增强作用
Fig.2 Enhancement effect of Au nanoparticles on the LOD enzyme electrode

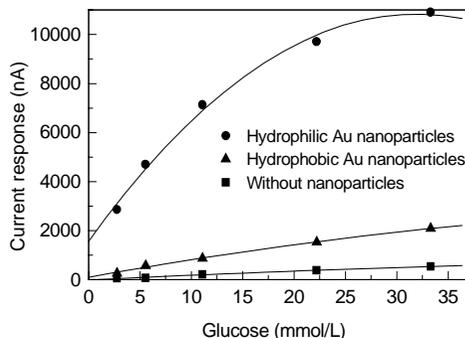


图 3 憎水、亲水金纳米颗粒对葡萄糖生物传感器的增强作用
Fig.3 Enhancement effects of hydrophobic, hydrophilic Au nanoparticles on glucose biosensor

实验说明, 将超细憎水 Au 颗粒引入酶膜中可以大大增强电极的响应电流. 这是由于, 首先纳米颗粒尺寸小, 比表面积大, 吸附能力强, 能吸附更多的酶; 其次, Au 纳米颗粒具有良好的生物相容性, 可以保持固定化酶的生物活性, 因此可以提高电极的电流响应; 第三, Au 纳米颗粒具有良好的导电性和宏观隧道效应, 因此可以作为固定化酶之间、固定化酶与电极之间有效的电子中介体, 从而促进酶的氧化还原中心与铂电极间通过金属颗粒电子转移, 酶与电极间可以近似看作是一种导线来联系的. 这样就有效地提高了传感器的电流响应。

此外还有其它的纳米效应. 金属纳米颗粒具有特殊的电子取出和注入效应. 江龙^[5]指出, 当颗粒变小时, 尤其在小于 10 nm (约 10^4 个原子) 时, 颗粒是一个能给电子和取电子的物体, 或者说变成了一个化学活性物质. 在大多数情况下, 金和银纳米颗粒是电子受体, 而只在由几个分子或原子组成时, 才是电子给体. 从纳米粒子化学的角度可以将金属纳米颗粒看作电子贮池. 金属胶粒可以暂时储存酶反应历程中酶再生这一步骤产生的电子, 同时胶粒的费米能级变负, 一个微颗粒可以收集和储藏大量 (约 500 个) 电子. 一定量的电子驻留在纳米粒子上, 使之具有足够高的负电位, 这样就形成电化学活性位点, 使一些还原电位较低的自由基无法直接还原的反应成为可能. 也就是说纳米 Au 颗粒可以作为酶的氧化还原中心产生电子的受体, 催化这一反应, 即还原态的酶可以迅速重新氧化, 这样可以有效改善酶电极的电流响应. 当金属纳米颗粒储藏大量电子后, 金属溶胶就可以催化如水还原等一些难以发生的反应. 以乳酸氧化酶为例, 酶反应过程有可能由反应 (1)~(3) 变为反应 (1), (4), (5). 在催化过程中, 金属纳米颗粒实际上充当了电子传递体的角色, 与电化学中的作用相似, 故它也被人们形象地称为微电极. 纳米颗粒的数目众多, 大量微电极就相当于矩阵电极对传感器的增强作用, 显著提高传感器电流响应。





憎水 Au 颗粒固定酶机理与亲水 Au 颗粒固定酶的机理不同. 憎水 Au 颗粒存在于反胶束体系之中, 反胶束为固定氧化酶提供了适宜的微环境. 在成膜的过程中, 反胶束使氧化酶与有机试剂处于互相分离的位置, 不发生直接接触, 这样就减少了对酶的损伤, 提高了固定化酶的活性. 因此憎水颗粒对葡萄糖氧化酶电流响应的增强作用强于亲水颗粒. 我们还研制了不同粒径的超微憎水 Au 颗粒, 并研究了其对 GOD 电极的影响. 当 R_{Au} 值一定时, 随着 R_w 值的增大, 颗粒的粒径也增大. 实验还表明, Au 颗粒粒径的大小是影响电极响应电流的重要因素, 粒径约为 8 nm 的 Au 颗粒对传感器的电流响应增强作用最为显著. 我们也正在进一步研究超微憎水 Au 颗粒对酶电极的稳定性、耐热性等性质及机理. 本课题的进一步研究不但具有很好的应用前景, 而且为设计新型的纳米生物传感器和在其它生物工程方面的应用提供了新的机遇, 具有较高的理论价值.

4 结论

通过对纳米颗粒固定葡萄糖氧化酶、乳酸氧化酶的研究得出以下结论:

(1) 亲水 Au 纳米颗粒制备的生物传感器的响应电流大大提高. 这主要是由于 Au 的良好导电性能, 亲水 Au 可能与 GOD, LOD 氧化还原中心 FAD 发生较好的联系, 减小电子在给体和受体间的距离, 提高了电极与 GOD, LOD 间的电子传递速率.

(2) 憎水 Au 纳米颗粒制备的葡萄糖传感器的电流响应与不含纳米颗粒的葡萄糖传感器的响应电流相比提高 30 倍. 这主要是由于金的良好导电性和憎水颗粒引入的反胶团对酶的保护作用.

(3) Au 纳米颗粒具有良好的化学活性和催化活性, 可以从被还原的 GOD(FADH_2)/LOD(FADH_2) 获取电子而使 GOD/LOD 重新具有氧化性, 这样就加速了酶的再生速度, 并且作为一种与阵列电极作用相似的“微电极”, 能够有效提高电极的电流响应.

参考文献:

- [1] Mercado R C, Moussy F. In Vitro and in Vivo Mineralization of Nafion Membrane Used for Implantable Glucose Sensors [J]. *Biosensor & Bioelectronics*, 1998, 13(2): 133–145.
- [2] Henry C. Getting under the Skin: Implantable Electrochemical Glucose Sensors are Moving Closer to Commercialization [J]. *Analytical Chemistry News & Features*, 1998, 1: 594A–598A.
- [3] Crumbliss A L, Perine S C, Stonehuerner J, et al. Colloidal Gold as a Biocompatible Immobilization Matrix Suitable for the Fabrication of Enzyme Electrodes by Electrodeposition [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, 40: 483–490.
- [4] TANG F Q, ZHANG L, JIANG L. Improvement of Enzymatic Activity and Lifetime of Langmuir–Blodgett Films by Using Submicron SiO_2 Particles [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 1992, 7: 503–507.
- [5] 江龙. 量子化尺寸纳米颗粒及其在生物体系中的应用 [J]. *无机化学学报*, 2000, 16(2): 185–193.

Lactate Oxidase and Glucose Oxidase Biosensor with Ultra-fine Au Particles

MENG Xian-wei, GAO Feng-tang, REN Xiang-ling, WEI Zheng, TANG Fang-qiong

(*Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*)

Abstract: Lactate oxidase and glucose oxidase are immobilized by gold nanoparticles with diameter of less than 10 nanometers. The experiments show that gold nanoparticles can increase the current response of the lactate oxidase electrode and glucose biosensor from tens nanoamperometer to thousands nanoamperometer. The function of gold nanoparticles to enzyme electrode is discussed.

Key words: immobilization enzyme; glucose oxidase; lactate oxidase; gold nanoparticles