

基于酪氨酸酶-氧化石墨烯的 生物传感器的制备及应用

王世娟, 朱超云, 宋伟, 李玉龙, 曹国庆, 倪超, 吴晓琼

(南京化工职业技术学院应用化学系, 江苏 南京 210048)

[摘要] 研制了基于酪氨酸酶和氧化石墨烯修饰丝网印刷电极的生物传感器,并用于水中邻苯二酚的测定。1-芘丁酸琥珀酰亚胺酯分子通过非共价的 $\pi-\pi$ 堆积作用吸附到氧化石墨烯上,酪氨酸酶与1-芘丁酸琥珀酰亚胺酯形成酰胺键,组装到氧化石墨烯上,制得纳米复合材料。该材料为酪氨酸酶的固定提供了有利的微环境,并且能很好地保持其生物活性。传感器对邻苯二酚响应灵敏、快速,达到稳态电流时间在9 s以内。实验结果表明,传感器的重现性、选择性和稳定性良好,检测线性范围为 8.1×10^{-8} mol/L ~ 2.2×10^{-5} mol/L,检出限为 4.7×10^{-8} mol/L。所研制的传感器可应用在水中酚类化合物的现场快速检测之中。

[关键词] 酪氨酸酶,氧化石墨烯,邻苯二酚,生物传感器

[中图分类号] O657.12 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2011)03-0079-05

Fabrication of Biosensor Based on Tyrosinase-Graphene Oxide and Its Application

Wang Shijuan, Zhu Chaoyun, Song Wei, Li Yulong, Cao Guoqing, Ni Chao, Wu Xiaoqiong

(Department of Applied Chemistry, Nanjing College of Chemical and Technology, Nanjing 210048, China)

Abstract: A disposable biosensor has been developed for the determination of catechol in water based on tyrosinase-graphene oxide modified screen printed electrode. Graphene oxide sheets (GS) were noncovalently-functionalized with 1-pyrenebutanoic acid and succinimidyl ester (PANHS). Subsequently, the tyrosinase could covalently bind with PANHS-functionalized GS by forming amide bond. The as-prepared biocompatible nanocomposite could provide a biocompatible microenvironment to protect the activity of tyrosinase effectively. This disposable biosensor exhibited a fast amperometric response (less than 9 s), and a high sensitivity for monitoring catechol with good repeatability, selectivity and stability. The method showed good linearity in the range from 8.1×10^{-8} mol/L to 2.2×10^{-5} mol/L catechol with a detection limit of 4.7×10^{-8} mol/L. The results showed that the as-prepared disposable biosensor could be used in the rapid and in-situ monitoring of phenolic compounds in water samples.

Key words: tyrosinase, graphene, catechol, biosensor

酚类化合物是一种重要的环境污染物,对人体具有毒性并且难以降解,因此酚类化合物的测定对公共健康和环境保护具有重大意义^[1,2]。目前,酚类化合物的主要检测方法有化学发光法、光度法、色谱法和电化学法等,其中电化学方法因为具有响应快、灵敏度高、操作简单、花费较少等优点而受到人们的广泛关注^[3]。酪氨酸酶(Tyrosinase, Tyr)是一种含铜蛋白,在氧气作用下能够将底物邻苯二酚(Catechol)催化氧化成为邻苯二醌^[4]。基于酪氨酸酶的生物传感器具有灵敏、快速、便捷、选择性高等特点,因此在电化学方法中逐渐成为研究的热点^[5]。丝网印刷电极(Screen-printed electrode, SPE)具有制作过程简单、价格低廉、便于携带、可一次性使用、易微型化和集成化等特点。制备基于丝网印刷技术的可抛式电化学生物传感器,对于解决污染物的现场、快速分析检测具有重要的意义^[6]。

收稿日期: 2010-11-28.

基金项目:南京化工职业技术学院科研基金重点项目(NHKY-2010-05)。

通讯联系人:朱超云,讲师,研究方向:生物传感器在环境监测中的应用。E-mail: zhuchaoyun120@gmail.com

在酪氨酸酶生物传感器的构制中,研究酶的新型固定技术,保持酶的高生物活性及延长传感器的使用寿命一直是研究者们关注的课题^[7]。近年来,纳米材料的发展极为迅猛,被广泛地应用于生物与化学分析领域。为了放大电流响应信号和增加酶的固定量,碳纳米管、纳米金、纳米氧化锌等纳米材料逐渐被应用在构建高灵敏度、高通量的酪氨酸酶生物传感器之中^[8-10]。另外,也有许多工作研究关于在丝网印刷电极表面固定酪氨酸酶分子来构建可抛式的电化学生物传感器^[8,11-13],这些传感器可以同便携式的电化学分析系统一起,用于邻苯二酚的测定。

石墨烯由于其独特的物理和化学性质,在电子学、能量存储转换、生物科学与技术、特别是电化学传感器等各方面得到大量的应用^[14]。氧化石墨烯片层(Graphene oxide sheets, GS)是具有含氧功能基团的单片层的石墨烯,具有良好的性能。单片层氧化石墨烯的原子平面成为固定蛋白等生物分子的理想材料^[15],并且由于它有独特电化学性质和生物兼容性,国内外研究者成功地将氧化石墨烯应用在生物传感器的构建中^[16]。

与共价功能化相比,一些通过超分子的相互作用如 $\pi-\pi$ 的堆积等简便的非共价功能化的方法,具有能保护氧化石墨烯独特的电子属性而不进行破坏的优点^[17]。通过这种方法,氧化石墨烯与含有苯环的分子相结合,而具有特定的设计属性。本工作中,我们采用1-萘丁酸琥珀酰亚胺酯作为非共价功能化分子,吸附在氧化石墨烯片层上,获得了酪氨酸酶和氧化石墨烯的复合纳米材料(Tyr-GS),并将其修饰在丝网印刷电极上,制得了一种新型的可抛式电化学生物传感器(Tyr-GS/SPE)。对制备的纳米材料和传感器进行了表征。研究了邻苯二酚在传感器上的循环伏安响应和计时电流响应。实验结果表明,所制备的Tyr-GS为保持酪氨酸酶的活性提供了一个合适的微环境,对邻苯二酚的测定呈现出较好的稳定性和灵敏度,可应用在水中酚类化合物的快速测定。

1 实验部分

1.1 实验材料与仪器

酪氨酸酶(3 900 U/mg, Sigma 公司);邻苯二酚、1-萘丁酸琥珀酰亚胺酯(PANHS,阿拉丁试剂有限公司);磷酸盐缓冲溶液(PBS)用0.2 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 配制;石墨粉(纯度99.99%);丝网印刷电极所用浆料(导电碳浆、银浆、银/氯化银浆、绝缘浆);其他试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

电化学工作站(CHI1232A,上海辰华公司);紫外可见吸收分光光度计(UV8453, Aglient 公司);原子力显微镜(NanoScope IIIa, Veeco 公司);扫描电子显微镜(JSM-6360LV, JEOL 公司)。

1.2 印刷电极制备

采用聚对苯二甲酸乙二酯(PET)板作为基底,底层印制银浆作为导电介质,工作电极和对电极区域印制碳浆,参比电极区域印制Ag/AgCl浆。每层浆料均需在120℃下烘干固化20 min,最后印上绝缘浆,在120℃下烘干3 h。制备的SPE工作电极区域面积约为3.0 mm²。

1.3 传感器的制备

传感器的制备示意过程见图1。氧化石墨烯的制备方法参考修改过的Hummers方法^[18],由石墨制备成氧化石墨,接着将氧化石墨在水浴中超声剥落1 h,便可制得单片层的氧化石墨烯(0.5 mg/mL)。取同体积2 mg/mL PANHS的DMF溶液与氧化石墨烯水溶液在磁力搅拌下混合2 h,离心后弃去悬浮液,将PANHS功能化的氧化石墨烯重新分散在0.02 mol/L的PBS缓冲溶液中(pH 7.0),制得PANHS-GS。

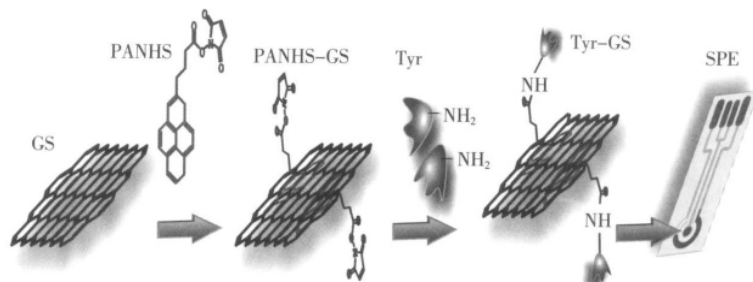


图1 生物传感器的制作过程示意图
Fig.1 Scheme of the process of fabricating the biosensor

将酪氨酸酶与 PANHS-GS 在 0.02 mol/L PBS 缓冲溶液中同体积混合, 4℃ 放置 18 h, 重新分散在 PBS 缓冲溶液中, 得到 Tyr-GS 纳米复合材料. 将印刷电极在 1.7 V 恒电位下活化 3 min, 用水冲洗干净, 取 5 μ L Tyr-GS 溶液滴涂至印刷电极工作电极表面, 室温晾干, 制得 Tyr-GS/SPE 生物传感器.

1.4 电化学测定

采用循环伏安法考察了邻苯二酚在传感器上的电化学反应. 在搅拌下用计时电流法对水样的邻苯二酚进行了定量测定, 并考察、优化了实验条件. 电化学实验均在 10 mL 的电化学池中进行, 实验温度均为室温.

2 结果与讨论

图 2 是纯 PANHS 及 PANHS-GS 的紫外可见吸收光谱图, 从图上可以看出 PANHS-GS 的吸收峰主要位于 283, 335 和 354 nm, 这与纯的 PANHS 的特征吸收峰位置相似. 由于 PANHS 分子中的茈基团与 GS 的平面存在比较强烈的 π - π 堆积作用, 使得 PANHS 分子能够牢固地吸附在 GS 上, 并且 PANHS 的吸收峰红移了约 7 nm.

图 3 是 GS 和 Tyr-GS 的原子力显微镜 (AFM) 图, 从图中可以看出制备的 GS 在溶液中呈单片层分散. 通过高度的测量, 发现单片层 GS 的厚度大约为 1 nm (图 3A), 而 Tyr-GS 的高度大约为 9 nm (图 3B), 可以验证 Tyr 酶分子组装到 GS 的表面. 通过对比修饰前后工作电极区域的扫面电子显微镜 (SEM) 图, 发现在 Tyr-GS 修饰的 SPE 电极表面形成了一种多孔的网状结构 (图 4), 该 3 维立体结构可以提高酶的负载量, 增加传感器的响应信号^[19].

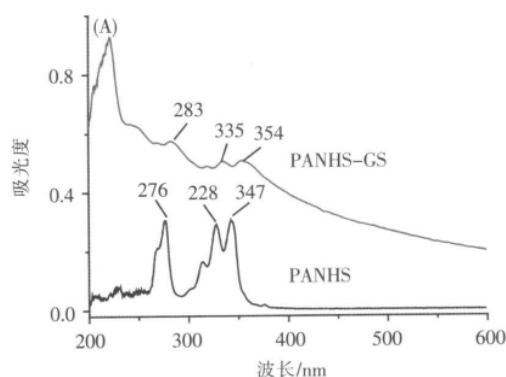


图 2 纯 PANHS 和 PANHS-GS 的紫外可见吸收光谱图
Fig.2 UV-Vis absorption spectra of pure PANHS and PANHS-GS

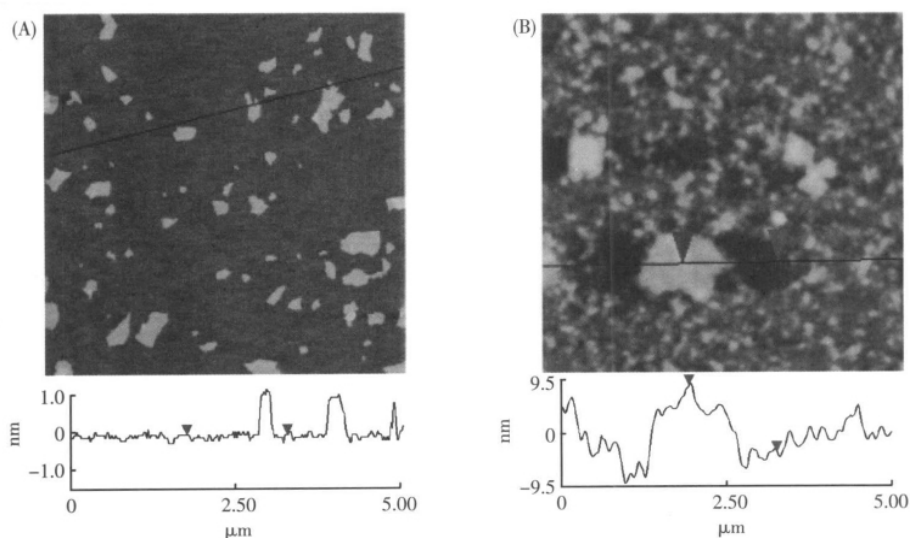


图 3 GS(A)和 Tyr-GS(B)原子力显微镜图
Fig.3 AFM images of GS (A) and Tyr-GS (B)

图 5 是邻苯二酚在 Tyr/SPE 和 Tyr-GS/SPE 修饰电极上的循环伏安曲线图. 实验结果表明, 相同浓度的邻苯二酚在 2 种电极上均出现了 1 个明显的还原峰, 这是由于电极表面固定的酪氨酸酶催化酚类物质产生的邻苯醌在电极上还原引起的. 图 5 中, Tyr-GS/SPE 电极的还原峰电流明显比 Tyr/SPE 增加, 说明酪氨酸酶在 Tyr-GS 复合材料上负载量增加, 且很好地保持了酶的活性. 同时, 由于氧化石墨烯的特殊电化学性质, 传感器的电流信号得到放大, 灵敏度也大大增加.

考察了工作电位和 pH 对传感器响应电流的影响, 结果如图 6 所示. 在含有 1.5×10^{-6} mol/L 邻苯二

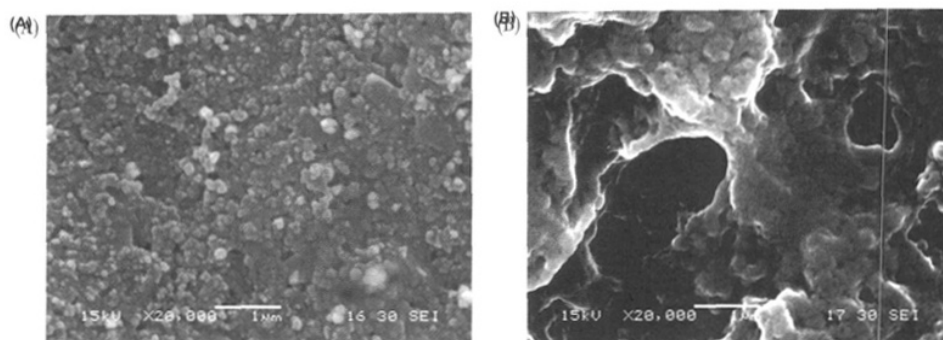


图 4 裸丝网印刷电极(A)和 Tyr-GS 修饰丝网印刷电极(B)扫描电子显微镜

Fig.4 SEM images of bare SPE (A) and Tyr-GS modified SPE (B)

酚的 PBS 溶液中(pH 7.0) , $-0.3\text{ V} \sim 0.1\text{ V}$ 的工作电位对传感器响应的影响如图 6A 所示, 当工作电位从 0.1 V 降低到 -0.2 V , 响应电流迅速增加, 达到最大值, 这是因为醌的还原在低的工作电位下更易发生, 然而, 更负的工作电位会产生较大的干扰, 因此 -0.2 V 的电压被选作最佳的工作电位. 图 6B 是溶液 pH 在 $5 \sim 8.5$ 范围内对响应电流的影响, 工作电位为 -0.2 V , 从图中可看出, 最大的响应电流出现在 pH 7.0. 这与文献报导的酪氨酸酶的最佳活性 pH 范围一致^[20]. 因此, 实验选取 pH 7.0 的 PBS 缓冲溶液为电解质溶液, 工作电位为 -0.2 V .

在优化的实验条件下研究了传感器的电流响应特性, 电流-时间响应曲线如图 7 所示. 随着 $1.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$ 邻苯二酚的加入, 传感器获得了快速、灵敏的生物电催化响应, 在 9 s 内即获得了稳定的稳态电流, 表明部分底物分子能迅速

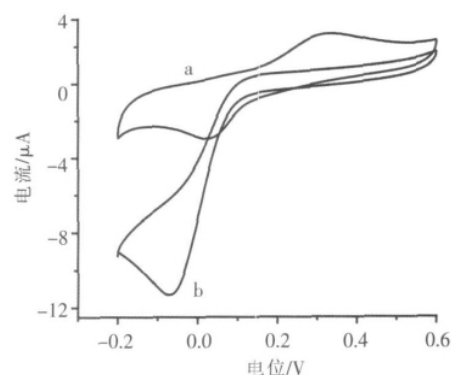

 图 5 Tyr/SPE(a)和 Tyr-GS/SPE(b)在 $1.0 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$ 邻苯二酚 PBS 缓冲溶液中的循环伏安曲线

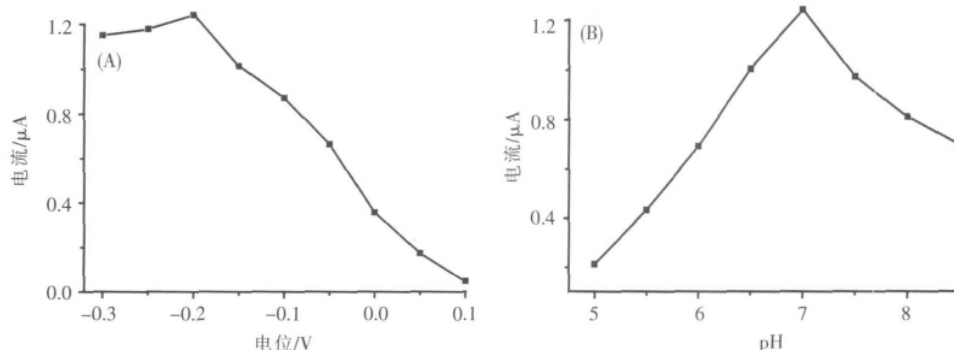
 Fig.5 Cyclic voltammograms of $1.0 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$ catechol in PBS at Tyr/SPE (a) and Tyr-GS/SPE (b)


图 6 工作电位(A)和 pH(B)对邻苯二酚的电流的影响

Fig.6 Effect of working potential (A) and pH (B) on the amperometric responses of catechol

地从溶液中扩散到工作电极表面修饰的生物复合纳米材料膜中. 传感器线性范围为 $8.1 \times 10^{-8} \sim 2.2 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$, 在 3 倍信噪比下, 传感器对邻苯二酚的检测限为 $4.7 \times 10^{-8}\text{ mol/L}$. 传感器的高灵敏度主要是归因于氧化石墨烯独特的电化学性能, 并且所制备的 Tyr-GS 纳米复合材料呈现多孔网状结构, 提高了酶分子的固载量.

所制备的基于 Tyr-GS/SPE 的生物传感器显示了较好的重现性. 通过测定浓度为 $1.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$ 的邻苯二酚的响应电流, 发现同一传感器连续测定 10 次的相对标准偏差(RSD) 为 3.9% , 按相同方法制备的同批次印制出的印刷电极, 其 RSD 为 5.3% , 不同批次 RSD 值为 7.1% . 修饰电极在 4°C 下存储 20 d 后响应值保留了原始值的 87% , 而在 2 个月之后电流值降低至 62% , 良好的稳定性表明, 制备的纳米材料复合物薄膜有效地提高了酶活性的长期稳定性. 干扰试验研究表明, 间苯二酚、硝基苯、乙醇、葡萄糖、乙酰

氨基苯酚、 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 Ac^- 、 NO_3^- 、 Cu^{2+} 不会引起明显的干扰; 对苯二酚响应良好; 10 倍浓度的硝基酚能引起较小的误差, 抗坏血酸干扰严重. 结果表明所制备的传感器能快速、灵敏、简便地检测水中酚类化合物.

3 结论

本文研制了基于酪氨酸酶和氧化石墨烯纳米复合材料的生物传感器, 能用于水中邻苯二酚的测定. 通过酪氨酸酶与非共价吸附在氧化石墨烯上的 1-萘丁酸琥珀酰亚胺酯共价反应得到该纳米复合材料, 将其修饰在丝网印刷电极上制成可抛式酪氨酸酶生物传感器. 该传感器对邻苯二酚响应快速、灵敏, 检测限低, 并且具有良好的重现性、选择性和稳定性. 所制备的传感器可应用于水中酚类化合物的现场快速检测.

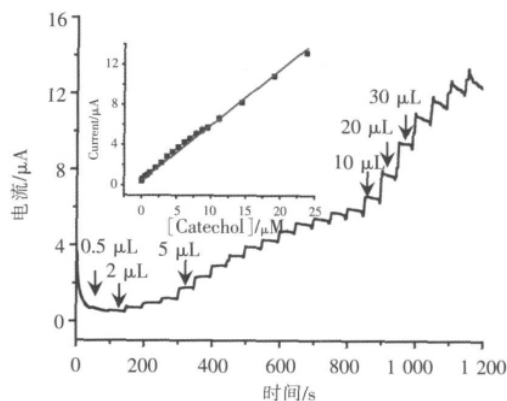


图7 Tyr/SPE 对连续加入 1.0×10^{-5} mol/L 邻苯二酚的计时电流响应曲线(内插图为工作曲线)

Fig.7 Current-time response curves for the successive addition of 1.0×10^{-5} mol/L catechol on Tyr-GS/SPE (Insert is the calibration curve)

【参考文献】

- [1] Jagetia G C, Menon K S L, Jain V. Genotoxic effect of hydroquinone on the cultured mouse splenocytes[J]. Toxicol Lett, 2001, 121(1): 15-20.
- [2] Shan D, Zhu M, Han E, et al. Calcium carbonate nanoparticles: a host matrix for the construction of highly sensitive amperometric phenol biosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 23(5): 648-654.
- [3] Yavuz Y, Koparal A S. Electrochemical oxidation of phenol in a parallel plate reactor using ruthenium mixed metal oxide electrode[J]. Journal of Hazardous Materials, 2006, 136(2): 296-302.
- [4] Ameer Q, Adeloju S B. Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009, 140(1): 5-11.
- [5] Liu Z, Liu Y, Yang H, et al. A Mediator-free tyrosinase biosensor based on ZnO Sol-Gel matrix[J]. Electroanal, 2005, 17(12): 1065-1070.
- [6] Kampouris D K, Kadara R O, Jenkinson N, et al. Screen printed electrochemical platforms for pH sensing[J]. Analytical Methods, 2009, 1(1): 25-28.
- [7] Arecchi A, Scampicchio M, Drusch S, et al. Nanofibrous membrane based tyrosinase-biosensor for the detection of phenolic compounds[J]. Anal Chim Acta, 2010, 659(1/2): 133-136.
- [8] Montareali M R, Seta L D, Vastarella W, et al. A disposable laccase-tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010, 64(3/4): 189-194.
- [9] Tan Y, Guo X, Zhang J, et al. Amperometric catechol biosensor based on polyaniline-polyphenol oxidase[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25(7): 1681-1687.
- [10] Wang S, Tan Y, Zhao D, et al. Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe_3O_4 nanoparticles-chitosan nanocomposite[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2008, 23(12): 1781-1787.
- [11] Chang S C, Rawson K, McNeil C J. Disposable tyrosinase-peroxidase bi-enzyme sensor for amperometric detection of phenols[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2002, 17(11/12): 1015-1023.
- [12] Sapelnikova S, Dock E, Ruzgas T, et al. Amperometric sensors based on tyrosinase-modified screen-printed arrays[J]. Talanta, 2003, 61(4): 473-483.
- [13] Solna R, Dock E, Christenson A, et al. Amperometric screen-printed biosensor arrays with co-immobilised oxidoreductases and cholinesterases[J]. Anal Chim Acta, 2005, 528(1): 9-19.
- [14] Dreyer D R, Park S, Bielawski C W, et al. The chemistry of graphene oxide[J]. Chem Soc Rev, 2010, 39(1): 228-240.
- [15] Zhang J, Zhang F, Yang H, et al. Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization[J]. Langmuir, 2010, 26(9): 6164-6166.

(下转第 89 页)

- [11] Normana P , Bishop D M , et al. Nonlinear response theory with relaxation: the first-order hyperpolarizability [J]. Chemical Physics 2005 ,123(19) : 194-103.
- [12] Frisch M J , Trucks G W , Schlegel H B , et al. Gaussian 09 , Revision A. 02 [M]. USA: Gaussian Inc Wallingford CT , 2009.
- [13] Yasuo Miyata ,Tohru Nishinaga ,Koichi Komatsu. Synthesis and structural , electronic , and optical properties of oligo(thienylfuran) s in comparison with oligothiophenes and oligofurans [J]. J Org Chem 2005 ,70 (4) : 1 147-1 153.
- [14] Li Z J ,Li Z R ,Wang F F ,et al. A dependence on the petal number of the static and dynamic first hyperpolarizability for electride molecules: many-petal-shaped li-doped cyclic polyamines [J]. J Phys Chem A , 2009 , 113(12) : 2 961-2 966.

[责任编辑:顾晓天]

(上接第 83 页)

- [16] Shao Y Y , Wang J , Wu H , et al. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: a review [J]. Electroanal , 2010 ,22(10) : 1 027-1 036.
- [17] Xu Y , Bai H , Lu G , et al. Flexible graphene films via the filtration of water-soluble noncovalent functionalized graphene sheets [J]. Journal of the American Chemical Society , 2008 ,130(18) : 5 856-5 857.
- [18] Kovtyukhova N I , Ollivier P J , Martin B R , et al. Layer-by-layer assembly of ultrathin composite films from micron-sized graphite oxide sheets and polycations [J]. Chemistry of Materials , 1999 ,11(3) : 771-778.
- [19] Ge B , Tan Y M , Xie Q J , et al. Preparation of chitosan-dopamine-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite for electro-catalytic oxidation and sensitive electroanalysis of NADH [J]. Sensor Actuat B-Chem , 2009 ,137(2) : 547-554.
- [20] Xue H , Shen Z. A highly stable biosensor for phenols prepared by immobilizing polyphenol oxidase into polyaniline-polyacrylonitrile composite matrix [J]. Talanta , 2002 ,57(2) : 289-295.

[责任编辑:顾晓天]