改善酶固定以增强葡萄糖传感器的生物电化学活性

王依婷[1]，俞 磊[1]，朱自强[2]，娄 蕾[2]，杜伟杰[2]，朱建中[2]

（1. 华东师范大学科学与技术跨学科高等研究院，上海 200062；
2. 华东师范大学信息学院，上海 200062）

摘要：研制了一种基于多壁碳纳米管（multi wall carbon nanotubes，MWCNTs）和ZnO纳米颗粒协同作用的高灵敏稳定的葡萄糖传感器。将ZnO颗粒淀积在带有负电荷的MWCNTs层上，由于等电点（isoelectric point，IEP）的差异，葡萄糖氧化酶（glucose oxidase，GOx）能够牢固地固定在ZnO颗粒表面，最后将一层带正电的聚二烯丙基二甲基氯化铵（polydiallyldimethylammonium chloride，PDDA）覆盖在GOx上。这种特殊的自组装三明治结构（PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs）能够很好地保持GOx的活性并防止酶泄漏。在0.05 mol/L的磷酸缓冲溶液（pH=6.8）中进行检测，电压为100 mV（vs. Ag/AgCl），用0.5 U GOx测得线性反应区域为0.1～16 mol/L，用2.0 U GOx测得灵敏度为50.2 mA·cm^{-2}·mol^{-1}·L^{-1}，检测下限为250 nmol/L（3σ）. 通过葡萄糖传感器直接检测100例人血清与临床光学检测的结果比较发现，相关系数达到0.997.

关键词：电化学；葡萄糖传感器；葡萄糖氧化酶；多壁碳纳米管；ZnO纳米颗粒；协同作用
中图分类号：O0657.1 **文献标识码**：A **文章编号**：1674-2850(2010)03-0482-6

Improved enzyme immobilization for enhanced bioelectrocatalytic activity of glucose sensor

WANG Yiting[1], YU Lei[1], ZHU Ziqiang[2], LOU Lei[2], DU Weijie[2], ZHU Jianzhong[2]

(1. *Advanced Research Centre of Interdisciplinary. Science and Technology, East China Normal University Development, Shanghai* 200062, *China*;
2. *Department of Information Science and Technology, East China Normal University, Shanghai* 200062, *China*)

Abstract: A highly sensitive and stable glucose sensor based on the synergic action of multi wall carbon nanotube (MWCNTs) and ZnO nanoparticles has been developed. Glucose oxidase (GOx) is firmly immobilized on the ZnO nanoparticles surface due to their large difference in the isoelectric point (IEP), while the ZnO nanoparticles were deposited on the negatively charged MWCNTs layer. A cationic polydiallyldimethylammonium chloride (PDDA) layer was coated on the GOx layer. The unique sandwich-like layer structure (PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs) formed by self-assembling provides a favorable microenvironment to keep the bioactivity of GOx and to prevent enzyme molecule leakage. Amperometric detection of glucose was carried out at 100 mV (vs. Ag/AgCl) in 0.05 mol/L phosphate buffer solution (pH=6.8) with a wide linear response range of 0.1 to 16 mmol/L by the sensor with 0.5 U GOx, with a sensitivity of 50.2 mA·cm^{-2}·mol^{-1}·L^{-1} and a detection limit of 250 nmol/L (3σ) by the sensor with 2.0 U GOx. Results obtained from the glucose sensor directly in human blood serum were compared with ones obtained by spectrometry by a local hospital. On testing 100 samples of serum, the correlation coefficient reaches 0.997.

Key words: electrochemistry; glucose sensor; glucose oxidase; MWCNTs; ZnO particles; synergic action

---

基金项目：国家自然科学基金（60976004）
作者简介：王依婷（1961—），女，教授，主要研究方向：现代生物分子组织工程与重大疾病治疗。
通信联系人：朱建中，教授，主要研究方向：敏感材料、传感技术. E-mail：jzzhu714@hotmail.com

0 引言

作为应用最广泛的生物传感器之一，葡萄糖传感器在临床、环境以及食品检验中起着重要作用。葡萄糖电流传感器通常使用 GOx 催化葡萄糖的氧化，通过流过电极的电流检测反应。1962 年，CLARK 等[1]研制了第一个葡萄糖传感器，之后人们在如何改良酶电极上做了大量的研究，其中不同结构修饰的电极引起了广泛的兴趣。纳米材料和生物技术为基于酶与电极直接电子转移的第三代生物传感器提供了良好的前景[2]。纳米材料在酶的固定上有独特的优势，能够保持酶的活性，加强酶活性区域与电极间的直接电子转移。至今为止，人们研究了大量的无机纳米材料作为信号传导和酶固定的平台，如金纳米粒子与纳米团簇[3~4]，聚苯胺-金纳米复合物[5]，碳纳米管（carbon nano tubes，CNTs）[6~7]，纳米晶金刚石[8]，碳酸钙纳米颗粒[9]和银纳米枝[10]。在基于 CNTs 的生物传感器中，CNTs 有多重功能：1）作为固定 GOx 的衬底；2）CNTs 表面 H_2O_2 的电催化氧化还原以减少过电压，避免其他共存电活性物质的影响；3）增强信号快速电子转移和增大工作表面积。ZnO 为直接能隙半导体，禁带宽度为3.37 eV，具有良好的电学和光学性能。纳米结构的 ZnO 同时具有仿生性和高的电子传输特性，在传感器结构应用中有很好的前景[11~12]。纳米多孔 ZnO 薄膜上固定细胞色素 C 已有报道。ZnO 有高的等电点（IEP = 9.5），适合吸附低等电点的蛋白质或酶[13]。带正电荷的 ZnO 纳米棒矩阵不仅能为带负电荷的 GOx（IEP=4.2～4.5）提供友好的微环境，以保持其活性，而且也在很大程度上有效推动了 GOx 和电极之间的直接电子转移。实验证实：ZnO 纳米棒的导电性和仿生性在酶的电化学反应中起到重要作用。ZHANG 等[14]报道了一种基于 ZnO 纳米棒的无试剂尿酸生物传感器。最近，固定在 ZnO 纳米梳和纳米棒上的 GOx 葡萄糖电化学生物传感器[10, 15~16]灵敏度能达到 13～23 $\mu A/(mA \cdot cm^2)$.

将 ZnO 颗粒淀积在带有负电荷的 MWCNTs 层上，由于 IEP 的差异，GOx 能够牢固地固定在 ZnO 颗粒表面，最后将一层带正电的 PDDA 覆盖在 GOx 上。这种特殊的自组装三明治结构（PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs）能够很好地保持 GOx 的活性并防止酶泄露。自制的 PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs 电极具有优异的电催化性能，证明多电极-蛋白质层和 ZnO 纳米颗粒不影响 MWCNTs 的电化学特性，为葡萄糖的灵敏检测提供可能，同时也实现了 MWCNTs 和 ZnO 纳米颗粒的协同作用。

1 实验

1.1 仪器

电化学实验使用 CHI630 工作站，室温下，3-电极系统。一个电极是经过 PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs（自制）修饰、直径为 3.0 mm 的热解石墨盘；一条铂金线作为辅助电极；Ag/AgCl 作为参比电极。扫描电子显微镜（scanning electron microscope，SEM）、透视电子显微镜（transmission electron microscope，TEM）和 X 射线衍射（X-ray diffraction，XRD）图像分别采用 JEOL JSM-6700F 电子显微镜（日本）、HRTEM（日立 H-9000）和 D/MAX 2550V Cu Kα 辐射。

1.2 试剂

GOx（EC1.1.3.4，25 U/1.5 mg，*Aspergillus niger*），尿酸，抗坏血酸，葡萄糖，PDDA（Sigma-Aldrich）. 其他反应物为分析纯级。所有溶液用双蒸馏水配制。

1.3 ZnO/MWCNTs/PG 电极的制备

热解石墨（pyrolytic graphite，PG）晶片（直径 3 mm，厚 1 mm）依次用金相砂纸（6 号）抛光，0.30 μm和 0.05 μm 氧化铝镜面抛光，然后依次在丙酮，NaOH（1 mol/L），HNO_3（体积比为 1∶1）和双蒸馏水中进行超声处理。在双蒸馏水中清洗过后，再分别在无水乙醇和双蒸馏水中超声处理1 min. MWCNTs 通过 CH_4 和 La_2NiO_4 催化剂的催化分解作用获得[17]。纯化的 MWCNTs（3 g）和由乙基纤维素与 $C_{10}H_{18}O$ 以 3∶97（质量比）配成的有机溶剂（2 g）混合成黑色膏剂。混合物用微量调节注射器转移到 PG 盘上，让溶剂（水）在室温蒸发。这样制成的厚度约为 8 μm 的 MWNT 薄膜放入 101.325 kPa 的氮

气中500℃退火10 min，以除去有机物和其他杂质。ZnO纳米结构在MWCNTs薄膜上的生长遵循气体-固体自我催化机理。等量的ZnO粉末和石墨粉末的混合物加入微量的高纯Zn粉末作为反应源，放置于长石英舟的尾部。同一个石英舟内，一个有MWNT薄膜的PG盘放置于气流方向的下游区，与反应源保持一定的距离，在一定的温度范围内收集产物。整个装置放入水平管状炉中加热到750℃. 保持15～30 min，在大气压下，通入恒定高纯氩气550 SCCM（SCCM表示标准温度和压力下立方厘米每分钟）。反应后样品从炉中取出，冷却到室温。将PG盘（几何面积：6.98×10^{-2} cm^2）放入玻璃管中用环氧树脂固定。通过伍德合金附一条铜线到PG盘上实现电接触，完成工作电极的制备。

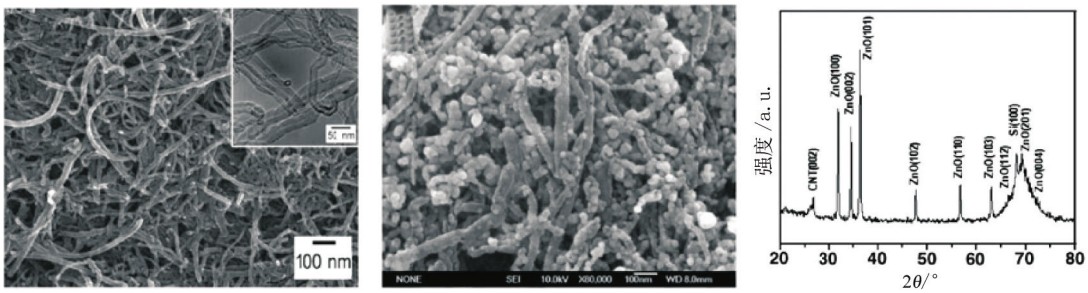
1.4 GOx的固定

溶解30.0 mg GOx在1.0 mL磷酸盐缓冲溶液（PB，0.1 mol/L，pH＝6.86）中制得GOx溶液。1.0，2.0，3.0，4.0 μL上述溶液用于ZnO/MWCNTs/PG电极表面，室温下风干。最后，4 μL 0.5% PDDA涂铺在酶电极以清除可能的污垢，并防止酶的沥滤，照此方法制备的4根电极酶含量分别为0.5，1.0，1.5，2.0 U. 酶电极不使用时保持干燥置于4°C冰箱中。

2 结果与讨论

2.1 MWCNTs和ZnO纳米颗粒的表征

图1为MWCNTs和ZnO纳米颗粒的表征图。图1a显示了丝网印刷的MWCNT层SEM图像。纳米管的外径分布范围为20～40 nm，纳米管典型长度约为5～20 μm. 纳米管表面光滑整齐。MWCNTs的TEM图像如图1a所示，表明原始材料是有效的MWCNT. 生长在MWNT薄膜上的ZnO纳米结构的SEM图像如图1b所示。大量的ZnO纳米颗粒稠密的附着在MWCNTs的管壁上。通过XRD观察生长在MWCNTs薄膜上的ZnO纳米结构的结晶度，如图1c所示。ZnO纳米结构高度结晶并表现出如块状ZnO一样的典型的六方结构，晶格常数a＝0.324 nm，c＝0.521 nm. 峰值2θ＝26°来自碳纳米管薄膜的石墨层。



a b c

图1 MWCNTs和ZnO纳米颗粒的表征

Fig. 1 Characterization of MWCNTs and ZnO nano-particles

a—热解石墨盘上丝网印刷MWCNTs薄膜的图，插图为TEM图；

b—MWCNTs上生长的高密度纳米结构ZnO的SEM图；

c—MWCNTs上生长纳米结构ZnO的XRD图

a-SEM image of MWCNT films, the inset is TEM image;

b-SEM image of the high density ZnO nanostructures grown on MWCNTs film;

c-XRD pattern of ZnO nanostructures grown on MWCNTs film

2.2 循环伏安谱

图2为分别在磷酸盐缓冲溶液（phosphate buffered saline，PBS）（曲线A）和加入1 mmol/L H_2O_2（曲线B）中测得的循环伏安谱，扫描速率为100 mV/s. PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs/PG电极从0 mV左右就开始显示了很好的对H_2O_2的氧化和还原的电催化作用，峰值分别在100 mV和－300 mV.

2.3 不同情况下的动态伏安研究

虽然图2给出了PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs电极在H_2O_2溶液中的循环伏安信息，但并不能通过它

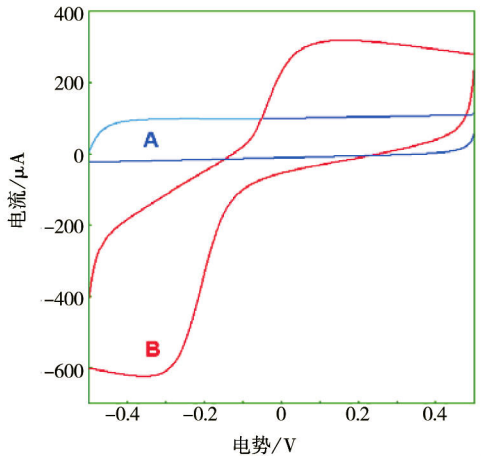
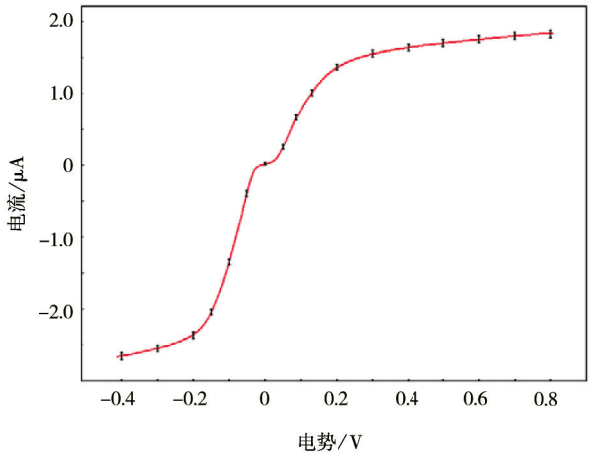


图 2 2.0 U GOx 修饰的 PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs/GC 电极分别在 0.05 mol/L PBS 中和加入 1 mmol/L H_2O_2 过氧化氢的循环伏安图

Fig. 2 Cyclic voltammograms of PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs/PG electrode with 2.0 U GOx in the absence and presence of 1 mmol/L of H_2O_2 in 0.05 mol/L PBS



注：测试条件：0.05 mol/L PBS，pH=6.86

图 3 2.0 U GOx 修饰的 PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs/GC 电极在 1.0 mmol/L 葡萄糖溶液中的动态伏安图

Fig. 3 Hydrodnnamic voltammogram for 1.0 mmol/L glucose at PDDA/GOx/ZnO/M-WCNTs/PG electrode with 2.0 U GOx

来确定精确的酶产生 H_2O_2 的电压。为确定传感器的最佳工作电压，研究了电极在1.0 mmol/L葡萄糖溶液中的不同电压下（−0.4～0.8 V，0.05 或0.10 电压间隔）的伏安特性。图 3 给出了 PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs/PG 电极在含0.1 mmol/L葡萄糖溶液的 PBS 中不同电压下的电流响应信号。可以看到酶产生的 H_2O_2 在大于 0 V 的时候开始氧化并在约 0.2～0.4 V 达到一个稳定的峰值，而还原在电压低于 0 V 时开始并在约−0.3 V 达到最大值。这表明 PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs/PG 电极对检测 H_2O_2 的氧化还原具有灵活的工作电压区间。由于背景电流的影响，在选定的电压窗口区域的响应电流中间，还原电流响应高于氧化电流响应。因此电极在较低的电压下工作可以明显地降低电化学的干扰，进而提高了灵敏度。综上所述，选择一个较低的电压（−100 mV）来证明传感器适用于葡萄糖的灵敏检测（如图 4 所示）。

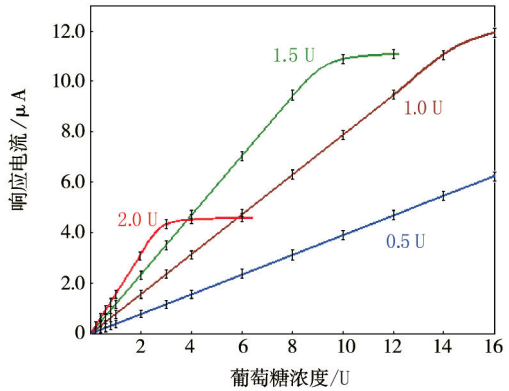


图 4 0.5，1.0，1.5，2.0 U GOx 传感器的校准曲线

Fig. 4 Calibration curves of the sensor with 0.5，1.0，1.5，2.0 U GOx

2.4 响应时间和精度

当浓度从 0～1 mmol/L 变化时，含 2.0 U GOx 的葡萄糖传感器的响应时间为 6 s，反向时间为 8 s.

含 2.0 U GOx 的传感器能够在 1.0 mmol/L葡萄糖标准溶液中连续检测 6 次。表 1 显示了含 2.0 单位 GOx 的传感器的测量精度，RSD=1.58%.

表 1 含 2.0 单位 GOx 的传感器在含有 1 mmol/L 葡萄糖浓度的缓冲溶液中的测量精度（n=6）

Tab. 1 The measurement precision for the sensor with 2.0 U GOx in PBS including 1 mmol/L of glucose concentration（n=6）

时间	响应值/μA	平均值/μA	RSD
1	3.57		
2	3.50		
3	3.43	3.49	1.58%
4	3.48		
5	3.52		
6	3.45		

2.5 校准曲线和检测限度

0.5，1.0，1.5，2.0 U GOx 葡萄糖传感器的校准曲线如图 4 所示，灵敏度分别为 50.2，37.6，

25.1，12.5 mA/cm²U，线性范围分别为 0 至<3.0，8.0，12.0 和>16.0 mmol/L. 随着 GOx 的固定，灵敏度增大，线性区域减小。因此，可以通过需要的灵敏度和线性区域选择 GOx 的含量。

测量 2.0 U GOx 的传感器检测限度。无葡萄糖的缓冲溶液和 1.0 μmol/L 葡萄糖反应电流分别为 ±0.13 nA 和 1.58 nA. 因此，2.0 U GOx 的检测限度为 250 nU.

2.6 Michaelis-Menten 常数

Michaelis-Menten K_M^{app} 常数通常用于衡量酶的生物活性，能通过 Lineweaver-Burk 方程进行计算：

$$1/i = (K_M^{app}/i_{max})(1/C) + 1/i_{max},$$

其中，i 为电流；i_{max} 为最大电流；C 为葡萄糖浓度。根据 Lineweaver-Burk 图，K_M^{app} 计算值为 3.05 mmol/L，比之前报道的金纳米颗粒[20]、TiO_2 纳米孔薄膜电极[18, 21]和 ZrO/聚壳糖薄膜[22]要低。这说明 ZnO/MWCNT 有更高的亲和力。

2.7 抗干扰能力

测试了抗坏血酸（ascorbic，AA）和尿酸（uric acid，UA）在 2.0 U GOx 葡萄糖传感器上的反应结果。1.0 mmol/L H_2O_2，1.0 mmol/L AA 和 1.0 mmol/L UA 混合溶液的峰高比 1.0 mmol/L H_2O_2 溶液高 40 nA. 差值在峰高的 1.1%范围内。这是由于 PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs 电极对 H_2O_2 具有良好的电催化作用，可以得到更低的工作电位，抗干扰能力增强。

2.8 长期稳定性

每天检测 2.0 U GOx 修饰的葡萄糖传感器在 1.0 mmol/L 葡萄糖溶液中的反应 10 次（冰箱保存），记录 10 次测量的平均值及对应的传感器制备日期。在最初几天能够观察到传感器的响应电流降低，这可能是由于未固定酶的丢失。观察到响应电流在 160 d 仅降低了初始值的 10%. 良好的长期稳定性来自于 MWCNTs 和 ZnO 纳米颗粒的协同作用。

2.9 精确度

在与人体血清相似的标准血清中检测 0.5 U GOx 的精确度。测量结果为 5.9 mmol/L，与标准值6.0 mmol/L 几乎一致。通过使用 0.5 U GOx 葡萄糖传感器直接检测 100 例人血清与临床光学检测的结果比较发现，相关系数达到 0.997. 如图 5 所示，结果显示了 2 种方式间良好的一致性和精度。但是文中的传感器不需要昂贵的器械和样品的预处理。因此，可以据此研制一种低耗费而又可靠的生物传感器。

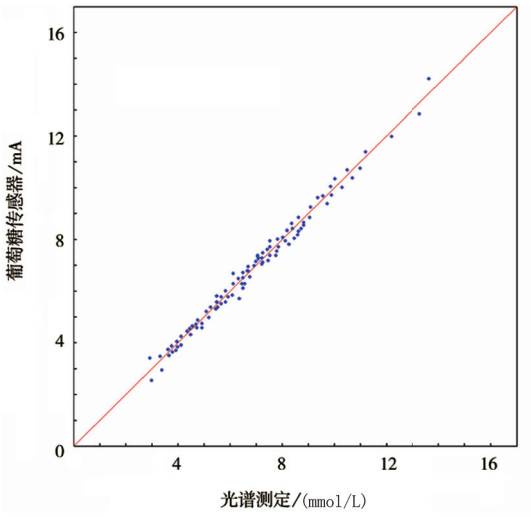


图 5 100 例人血清样本的 0.5 U GOx 传感器与光谱测定的相关与回归线

Fig. 5 Correlation and regression line for measurements of 100 human serum samples between spectrometry and the sensor with 0.5 U GOx

3 结论

成功制成了一种高灵敏稳定的基于 C 纳米管和 ZnO 联合作用的葡萄糖传感器。这种通过自组装形成的特殊的 PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs 夹心层结构为保持葡萄糖氧化酶生物活性和防止酶分子泄露提供了很好的微环境。PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs 电极对 H_2O_2 的良好催化活性表明聚合电解质-蛋白质层和纳米 ZnO 颗粒并不影响 MWCNTs 的电催化特性，使葡萄糖的灵敏检测成为可能。PDDA/GOx/ZnO/MWCNTs/GC 生物传感器在葡萄糖的灵敏检测上显示了良好的可重复性，显著的长期稳定性和抵抗其他同时存在的电活化粒种干扰的特性。

[参考文献] (References)

[1] CLARK L C Jr, LYONS C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery[J]. Annals the of New York Academy of Sciences, 1962, 102(1): 29～45.

[2] JIA J B, WANG B Q, WU A G, et al. A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network[J]. Analytical Chemistry, 2002, 74(9): 2217～2223.

[3] ZHANG S X, WANG N, NIU Y M, et al. Immobilization of glucose oxidase on gold nanoparticles modified Au electrode for the construction of biosensor[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2005, 109(2): 367～374.

[4] ZHAO S, ZHANG K, BAI Y, et al. Glucose oxidase/colloidal gold nanoparticles immobilized in Nafion film on glassy carbon electrode: direct electron transfer and electrocatalysis[J]. Bioelectrochemistry, 2006, 69(2): 158～163.

[5] XIAN Y Z, HU Y, LIU F, et al. Glucose biosensor based on Au nanoparticles-conductive polyaniline nanocomposite[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 21(10): 1996～2000.

[6] LIU G D, LIN Y H. Amperometric glucose biosensor based on self-assembling glucose oxidase on carbon nanotubes[J]. Electrochemistry Communications, 2006, 8(2): 251～256.

[7] LIU Y, WANG M K, ZHAO F, et al. The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2005, 21(6): 984～988.

[8] ZHAO W, XU J J, QIU Q Q, et al. Nanocrystalline diamond modified gold electrode for glucose biosensing[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 22(5): 649～655.

[9] SHAN D, ZHU M J, XUE H G, et al. Development of amperometric biosensor for glucose based on a novel attractive enzyme immobilization matrix: calcium carbonate nanoparticles[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 22(8): 1612～1617.

[10] WEI A, SUN X W, WANG J X, et al. Enzymatic glucose biosensor based on ZnO nanorod array grown by hydrothermal decomposition[J]. Applied Physics Letters, 2006, 89(12): 123902～123905.

[11] TIAN Z R R, VOIGT J A, LIU J, et al. Biominetic arrays of oriented helical ZnO nanorods and columns[J]. Journal of the American Chemical Society, 2002, 124(44): 12954～12955.

[12] RODRIGUEZ J A, JIRSAK T, DVORAK J, et al. Reaction of NO_2 with Zn and ZnO: photoemission, XANES, and density functional studies on the formation of NO_3[J]. Journal of Physical Chemistry B, 2000, 104(2): 319～328.

[13] TOPOGLIDIS E, CASS A E G, O'REGAN B, et al. Immobilisation and bioelectro-chemistry of proteins on nanoporous TiO_2 and ZnO films[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2001, 517(1～2): 20～27.

[14] ZHANG F F, WANG X L, AI S Y, et al. Immobilization of uricase on ZnO nanorods for a reagentless uric acid biosensor[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 519(2): 155～160.

[15] WANG J X, SUN X W, WEI A, et al. Zinc oxide nanocomb biosensor for glucose detection[J]. Applied Physics Letters, 2006, 88(23): 233106～233108.

[16] ZHAO Z W, CHEN X J, TAY B K, et al. A novel amperometric biosensor based on ZnO: Co nanoclusters for biosensing glucose[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 23(1): 135～139.

[17] LIANG Q, GAO L Z, LI Q, et al. Carbon nanotube growth on Ni-particles prepared in situ by reduction of La_2NiO_4[J]. Carbon, 2001, 39(6): 897～903.

[18] YU J H, LIU S Q, JU H X. Glucose sensor for flow injection analysis of serum glucose based on immobilization of glucose oxidase in titania sol-gel membrane[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2003, 19(4): 401～409.

[19] HRAPOVIC S, LIU Y L, MALE K B, et al. Electrochemical biosensing platforms using platinum nanoparticles and carbon nanotubes[J]. Analytical Chemistry, 2004, 76(4): 1083～1088.

[20] YANG J, LIN H J, HUANG H Y. Characterization of cyclodextrin modified infrared chemical sensors. Part II. selective and quantitative determination of aromatic acids[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 530(2): 213～220.

[21] OHARA T J, RAJAGOPALAN R, HELLER A. "Wired" enzyme electrodes for amperometric determination of glucose or lactate in the presence of interfering substances[J]. Analytical Chemistry, 1994, 66(15): 2451～2457.

[22] OGATA K, KOIKE K, TANITE T, et al. High resistive layers toward ZnO-based enzyme modified field effect transistor[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2004, 100(1～2): 209～211.