

无定形硒纳米粒子的交联酶模板法合成及其在生物传感器中的应用

张 娟^{1,2} 张胜义^{1,3} 徐静娟¹ 陈洪渊^{*,1}

(¹ 南京大学化学系, 生命分析化学重点实验室, 南京 210093)

(² 中国疾病预防控制中心改水中心, 北京 102200)

(³ 安徽大学化学化工学院, 合肥 230039)

摘要: 本文以戊二醛交联的辣根过氧化物酶(HRP)为模板合成了均匀分散的无定形硒纳米粒子(粒径 10~20 nm), 以所得合成产物为载体构建了 HRP 生物传感器。研究表明, 无定形硒纳米粒子具有良好的生物相容性和吸附性, 所得传感器灵敏度高, 对测定底物的生物亲和性好。

关键词: 硒纳米粒子; 辣根过氧化物酶; 生物传感器

中图分类号: O613.52; O611.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2006)03-0431-04

Amorphous Selenium Nanoparticles: Synthesis in Horseradish Peroxidase Cross-linked and Application in Biosensor

ZHANG Juan^{1,2} ZHANG Sheng-Yi^{1,3} XU Jing-Juan¹ CHEN Hong-Yuan^{*,1}

(¹Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Sciences, Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

(²National Centre for Rural Water Supply Technical Guidance, China CDC, Beijing 102200)

(³Department of Chemistry, Anhui University, Hefei 230039)

Abstract: Well-distributed amorphous selenium nanoparticles (10~20 nm) were synthesized by using the horseradish peroxidase (HRP) cross-linked with glutaraldehyde as template. The selenium nanoparticles as-prepared have been used to construct HRP biosensor. The results show that the HRP biosensor as-constructed has high sensitivity and affinity for H₂O₂ due to the good adhesive ability and biocompatibility of selenium nanoparticles.

Key words: selenium nanoparticles; horseradish peroxidase; biosensor

单质硒是重要的半导体材料, 具有优良的光导性、压电效应和热电效应等, 已广泛用于生产光电池、压力传感器、复印机、整流计和曝光计等^[1]。硒又是人体必需的重要微量元素, 具有增强免疫能力、抗癌和防病等多种功能^[2]。近年来的研究表明, 单质纳米硒材料具有更好的光电特性^[3], 其生物功能也更加优异^[4]。因此, 单质纳米硒的合成和应用研究引起人们的极大兴趣, 已有许多关于制备晶态纳米

硒的报道, 如硒纳米线^[5,6]、硒纳米棒^[7,8]、硒纳米管^[9,10]等。对于无定形硒纳米粒子, 尽管早在 1990 年就有免疫分析方面的应用研究^[11], 但合成方面的报道很少^[12]。无定形硒纳米粒子具有光催化分解能力^[13], 可用于有机污染物的处理。无定形硒纳米粒子具有高的生物活性^[14], 可消除人体中自由基^[15], 在生物医药领域也有广阔的应用前景。本课题组曾在多糖生物分子介质中合成了无定形硒纳米粒子^[16,17]。本文利用

收稿日期: 2005-08-22。收修改稿日期: 2005-12-20。

国家自然科学基金资助项目(No.90206037, 20475025)。

*通讯联系人。E-mail: hychen@nju.edu.cn

第一作者: 张 娟, 女, 40 岁, 博士; 研究方向: 纳米分析化学。

交联辣根过氧化物酶(HRP)为模板制备无定形硒纳米粒子,并以所得产物为载体构建了性能优良的 HRP 生物传感器。

1 实验部分

1.1 试剂

辣根过氧化物酶 (HRP,E.C.1.11.1.7,RZ>3.0 250 U·mg⁻¹)购于 Sigma 公司;抗坏血酸:江苏华康科技公司化学试剂厂;二氧化硒:北京市中联特化工有限公司;戊二醛:江苏华康科技公司化学试剂厂。不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液(PBS)由 K₂HPO₄ 和 NaH₂PO₄ 储备液混合得到。其他试剂均为分析纯试剂。

1.2 无定形硒纳米粒子的制备及表征

典型的制备方法:取 HRP 溶液(pH=6.2,2 mg·mL⁻¹)50 μL 与 50 μL 质量分数为 1.0%的戊二醛溶液充分混匀后,进行交联,室温下放置过夜。在交联后的上述混合溶液中,加入 0.5 mol·L⁻¹ 的亚硒酸溶液 25 μL(二氧化硒水溶液),混匀,在不断振摇下加

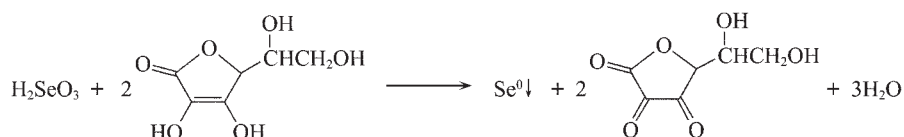
入 1 mol·L⁻¹ 的抗坏血酸溶液 25 μL 溶液,颜色立即由无色变为红色,40 min 后反应完成。所得产物用透射电子显微镜(TEM,JEM-100S,日本电子公司)及 X-粉末衍射仪(X'PERT,飞利浦公司)表征。

1.3 HRP 生物传感器的构建及性能测试

用微量注射器滴涂 10 μL 上述方法制备的硒纳米粒子溶液于光洁的热解石墨电极表面,室温晾干后形成致密的硒纳米粒子层。然后将 10 μL HRP 溶液(pH=7.8,2 mg·mL⁻¹)滴涂在硒纳米粒子层上,贮存于 4 ℃冰箱中晾干备用。所得传感器的表面形貌用扫描电子显微镜(SEM,1530VP,德国 LEO 公司)表征,传感器的电化学测试实验在 CHI630A 电化学工作站(上海辰华公司)上进行(恒温 24 ℃,氮气气氛),采用的三电极系统由铂丝对电极、饱和甘汞参比电极以及制备的 HRP 传感器工作电极构成。

2 结果与讨论

在分散有亚硒酸的交联 HRP 介质中加入抗坏血酸,发生的氧化还原反应可表示如下^[18]:



由于交联 HRP 网状结构的限制,反应生成的单质硒粒子只能在一定范围内生长,且不易发生团聚现象,所得最终产物的形貌见图 1a。从图中可以看出,产物为均匀分散的球形粒子,粒径很小(10~20 nm)。图 1b 显示了在不加交联剂的 HRP 介质中合成产物的形貌,由图可知,产物是粒径很大的空心球纳米粒子,且大小不均匀,球壳边界不规则,这是

由于没有交联的网状结构空间限制所致。对于空心结构的形成机理,我们认为由游离 HRP 分子诱导形成^[15];由于新生的硒微粒与蛋白质分子之间有较强的亲和力^[11],反应生成的单质硒将逐渐被吸附在 HRP 分子周围,最终形成以酶分子为核,以单质硒为壳的球形纳米粒子。

图 2 显示了以交联 HRP 为模板合成产物的

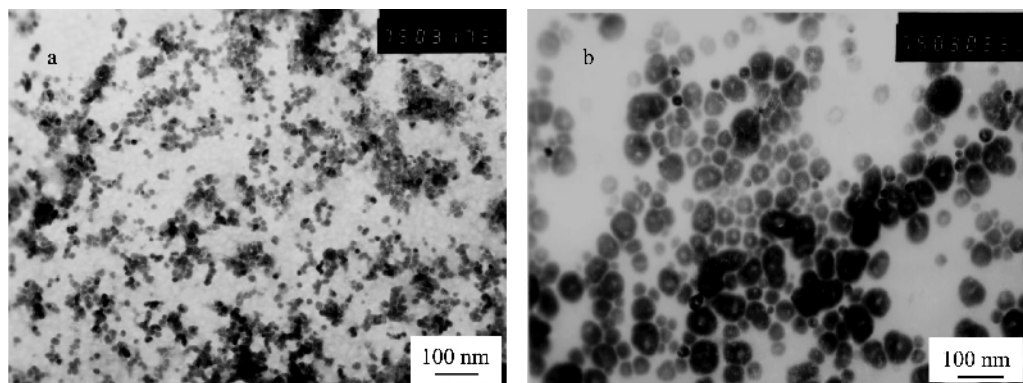


图 1 产物的 TEM 图

Fig.1 TEM photographs of the products synthesized in HRP cross-linked with glutaraldehyde (a) and in free HRP solution (b)

XRD图。由图可知,没有晶态硒的衍射峰出现,表明所得产物为无定形硒纳米粒子。

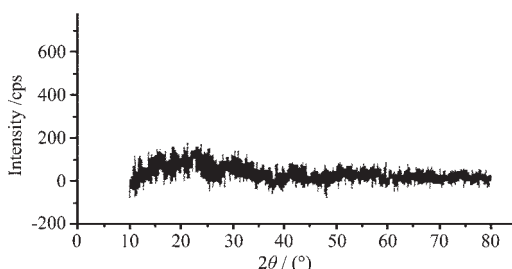
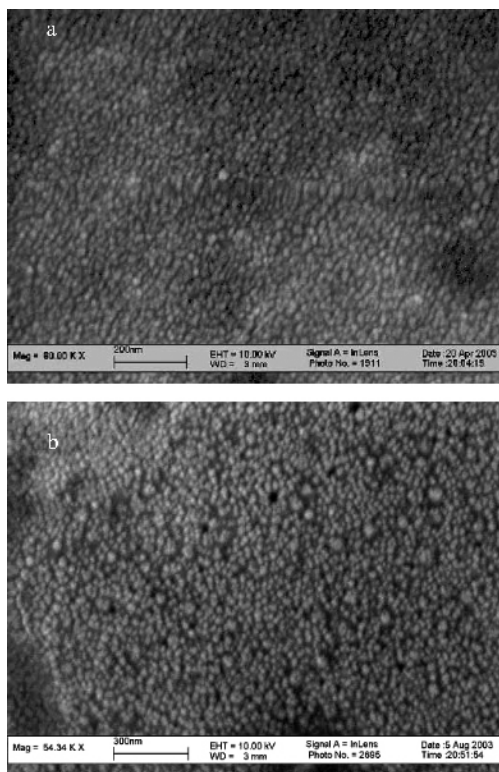


图2 产物的X射线衍射图
Fig.2 XRD pattern of the products

图3是用所得产物修饰的传感器表面的形貌图。由图3a可知,在热解石墨电极表面滴涂硒纳米粒子溶液后形成了均匀致密的硒纳米粒子层。由于硒纳米粒子对蛋白质(酶)分子有较强的吸附作用,所以在硒纳米粒子层上滴涂 HRP 溶液时,HRP 分子可以被有效地固载在电极表面,其形貌见图3b。比较图3a和3b可知,硒纳米粒子吸附了 HRP 分子后颗粒粒径几乎增大了一倍,这种形貌的变化表明 HRP 已成功地固定在电极上。



(a) before coating HRP; (b) after coating HRP

图3 生物传感器表面的SEM图

Fig.3 SEM photographs of biosensor

利用所得传感器测定 H_2O_2 时,选用邻苯二酚作

为电子媒介体。实验结果表明,当邻苯二酚的浓度从 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加至 $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,传感器的还原电流迅速增加,再继续增加邻苯二酚的浓度,响应电流基本不变,这是媒介体型传感器的典型特征^[19]。在含有 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的邻苯二酚溶液中,传感器对 H_2O_2 响应的循环伏安图见图4a。由图4a可知,随着 H_2O_2 的加入,传感器的还原电流明显增加,氧化电流明显减少,表现出典型的电催化特征。这一现象说明,固定在电极上的 HRP 保持着良好的生物活性,在邻苯二酚的作用下能可逆地进行氧化还原反应。图4b是传感器的电流-时间($i-t$)响应曲线(工作电压为 -120 mV)。从图中可以看出,传感器达到95%的稳态电流所需要的时间少于10 s,说明电极响应迅速。定量分析结果表明,在 $1.7 \times 10^{-6} \sim 5.8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 浓度范围内电流与浓度间呈良好的线性关系,检测限为 $8.7 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

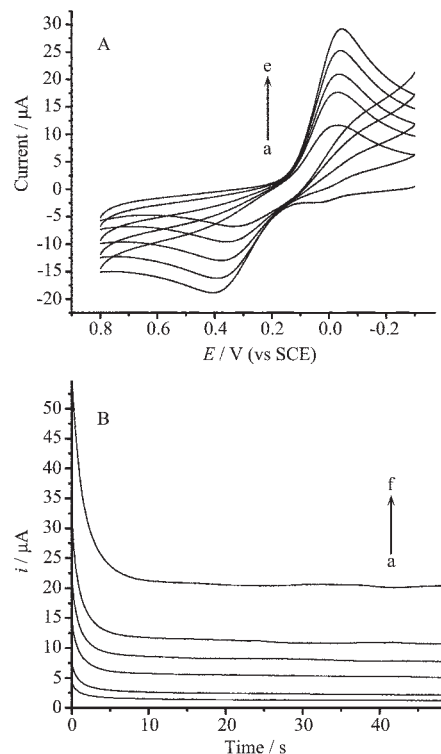


图4 (A)传感器对 H_2O_2 响应的循环伏安图,(B)传感器的电流时间($i-t$)响应曲线

Fig.4 (A) Cyclic voltammograms of the biosensor ($100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$): 0.00, 52.8, 106, 159 and $211 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 (curve from a to e); (B) The $i-t$ curve of the biosensor: 53, 106, 159, 211, 264 and $422 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 (curve from a to f)

酸度影响实验结果表明,在 pH 值为 7.0 的缓冲溶液中传感器出现最大的电流响应,同样的结果也

在 HRP 溶液中观察到,这表明硒纳米粒子的固定化没有改变 HRP 分子的催化行为^[20]。传感器在 H_2O_2 的浓度高于 $5.8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时出现一个电流响应平台,说明该电极反应具有典型的 Michaelis-Menten 酶反应动力学特性。由 Lineweaver-Burk 方程^[21]获得的传感器的表观米氏常数(K_m)为 $0.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,此值远低于用溶胶-凝胶^[22]($4.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和丝纤维^[23]($9.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)分子固载 HRP 构建的传感器的 K_m 值,说明固定在硒纳米粒子层上的 HRP 对 H_2O_2 有更好的生物亲和性。

3 结 论

本文设计了在戊二醛交联的 HRP 模板中合成单质纳米硒的方法,透射电子显微镜及 X-射线衍射测试结果表明,所得产物为均匀分散的球形或空心球形无定形硒纳米粒子。本文还以合成产物为载体构建了 HRP 生物传感器,用扫描电子显微镜表征了传感器的表面形貌,研究了所得传感器的电化学生物性能。结果表明,无定形硒纳米粒子生物相容性好、吸附性,所得生物传感器灵敏度高,对测定底物的生物亲和性好。

参考文献:

- [1] Johnson J A, Sabounji M L, Thiagarajan P, et al. *J. Phys. Chem. B*, **1999**,**103**:59~63
- [2] LUO Hai-Ji(罗海吉),JI Yan-Hong(吉雁鸿). *Weiliang Yuansu Yu Jiankang Yanjiu(Studies of Trace Elements and Health)*, **2000**,**17**(2):70~72
- [3] Gates B, Mayers B, Cattle B, et al. *Advanced Functional Materials*, **2002**,**12**:219~227
- [4] ZHANG Jin-Song(张劲松),GAO Xue-Yun(高学云),ZHANG Li-De(张立德). *Yingyang Xuebao(Acta Nutrimenta Sinica)*, **2001**,**23**(1):32~35
- [5] ZHANG Xu(张旭),XIE Yi(谢毅),XU Fen(徐芬), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chin. J. Inorg. Chem.)*, **2003**,**19**(1):77~80
- [6] An C, Tang K, Liu X, et al. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2003**:3250~3255
- [7] Jiang Z, Xie Z, Xie S, et al. *Chem. Phys. Lett.*, **2003**,**368**:425~429
- [8] Zhang J, Zhang S, Chen H. *Chemistry Letters*, **2004**,**33**:1054~1056
- [9] Zhang H, Yang D R, Ji Y J, et al. *J. Phys. Chem. B*, **2004**,**108**:1179~1182
- [10] Li X, Li Y, Li S, et al. *Crystal Growth & Design*, **2005**,**5**:911~916
- [11] Yost D A, Russell J C, Yang H. *Non-mental Colloidal Particle Immunoassay, U.S. Patent* 4, 954, 452, **1990**.
- [12] Mees D R, Pysto W, Tarcha P J. *J. of Colloid and Interface Science*, **1995**,**170**:254~260
- [13] Nath S, Ghosh S K, Panigahi S, et al. *Langmuir*, **2004**,**20**:7880~7883
- [14] Zhang J, Wang H, Bao Y, et al. *Life Sciences*, **2004**,**75**:237~244
- [15] Gao X, Zhang J, Zhang L. *Adv. Mater.*, **2002**,**14**:290~293
- [16] Zhang S, Zhang J, Wang H, et al. *Materials Letters*, **2004**,**58**:2590~2594
- [17] Zhang J, Zhang S, Xu J, et al. *Chin. Chem. Lett.*, **2004**,**15**(11):1345~1348
- [18] David R Mees, Pysto W. *J. Tarcha*, **1995**,**170**:254~259
- [19] Vreeke M, Maidam R, Heller A. *Anal. Chem.*, **1992**,**64**:3084~3090
- [20] Maehly A C, Colowick S P, Kaplan (Eds.), *Plant Peroxidase. Methods in Enzymology, Vol.11*. New York: Academic Press, **1995**.807
- [21] Rajalakshmi M, Arora A K. *Solid State Communications*, **1999**,**110**:75~80
- [22] Watillon A, Dauchot J. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1968**,**27**:507~510
- [23] Quintana M, Haro-Poniatowski E, Morales J. *App. Surf. Sci.*, **2002**,**195**:175~186