

基于超氧化物歧化酶/氧化锌的 超氧离子传感器

邓子峰, 徐伟, 杨晓
(同济大学化学系, 上海 200092)

摘要 利用物理气相沉积法制备了纳米氧化锌(Nano-ZnO)膜,通过扫描电子显微镜(SEM)、紫外-可见分光光度法(UV-Vis)、X射线衍射(XRD)及电化学等方法测定了其物理化学性质.实验结果表明,该Nano-ZnO膜是具有多晶六边形纤维状结构的多孔纳米膜,微粒直径在50~100 nm,室温禁带宽度3.37 eV.采用浸渍法将超氧化物歧化酶(SOD)直接修饰于Nano-ZnO膜上,制备了SOD修饰电极(SOD/ZnO).通过交流阻抗法(EIS)及循环伏安法(CV)证明了SOD能稳定地吸附在多孔ZnO膜上,并实现了直接电子传递;紫外-可见及红外光谱研究证明吸附在ZnO膜上的蛋白质保持了良好的生物催化活性,并成功地构建了第三代超氧离子(O_2^-)生物传感器.这种生物传感器有较宽的线性范围(氧化电流: $0.24 \sim 180 \times 10^{-6}$ mol/L,还原电流: $0.12 \sim 250 \times 10^{-6}$ mol/L)、较低检测限(氧化电流: 2×10^{-7} mol/L,还原电流: 1×10^{-7} mol/L)、较快的响应时间(4 s)以及较好的稳定性.

关键词 氧化锌;超氧化物歧化酶;超氧离子;生物传感器

中图分类号 O657.1

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)01-0037-05

基于酶蛋白与电极之间直接电子传递的第三代传感器的研制,是近年来生物传感器研究方面的前沿热点;而纳米材料由于其独特的电磁学、光学及电催化等特性,作为电极材料应用于生物传感器已引起研究者广泛的关注^[1~6].在生物体中,活性氧(ROS)被认为与人体老化、癌症及神经系统疾病等有密切的关系,其检测在生理学和病理学中都非常重要.多种检测技术如光谱法及化学发光法等都被用来检测活性氧的“出发物质” O_2^- 的浓度^[7,8],但这些方法受到 O_2^- 的短寿命及高活性的限制,仅能定性且非实时检测.基于超氧化物歧化酶(SOD)对于 O_2^- 的专一催化性能,构筑的 O_2^- 生物传感器实现了 O_2^- 的高选择性、高灵敏度以及实时检测,引起了许多研究者的广泛兴趣,目前已经实现了SOD在贵金属金电极上的直接电子传递^[9~13].纳米氧化锌具有比表面积大、生物兼容性好、易制备及价格低廉等优点,同时还具有较高的等电点^[14](有利于蛋白质的吸附)、较低的禁带宽度、良好的导电以及电化学特性^[15,16],但对于蛋白质或酶在其上实现直接电子传递的文献报道还较少^[17].

本文利用物理气相沉积法制备了ZnO纳米膜,利用电化学和光谱手段研究了膜表面性质;通过吸附固定SOD,制备出了基于直接电子传递的SOD/ZnO生物传感器,研究了其分析性能,为ROS的选择性高灵敏实时检测提供了一种新的电化学方法.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

Cu, Zn-SOD($M_w = 32000$, Sigma公司);ITO导电玻璃(深圳英宝高科技有限公司);锌片(纯度99.99%);其它均为分析纯试剂,实验用水为二次蒸馏水.

DM 220型高真空镀膜台(上海电子光学技术研究所);Agilent 8453型紫外-可见分光光度计(安捷伦公司,美国);傅里叶变换红外(FTIR)光谱仪(Thermo公司,美国);JSM-5510扫描电子显微镜(日

收稿日期:2008-07-27.

基金项目:国家自然科学基金(批准号:20643002)资助.

联系人简介:邓子峰,男,博士,副教授,主要从事电分析化学研究. E-mail: dengzf@tongji.edu.cn

本电子株式会社); X 射线衍射仪(Bruker AXS, 美国), CHI 660 电化学系统(CH Instruments 公司, 美国).

采用三电极体系: SOD/ZnO 修饰电极为工作电极, 饱和 Ag/AgCl 电极为参比电极, Pt 丝电极为对电极.

1.2 Nano-ZnO 膜的制备

1.2.1 导电玻璃(ITO)的清洗 将 ITO 依次用无水乙醇、氢氧化钠和二次蒸馏水在超声波清洗机中清洗, 最后用二次蒸馏水冲洗干净并吹干, 得到具有良好亲水性的 ITO.

1.2.2 ZnO 纳米膜电极的制备 将处理好的 Zn 片和 ITO 置于 DM 220 真空镀膜台中, 在真空及强电流(~ 15 A)条件下使锌片升华, 冷凝后在 ITO 导电面上形成厚度均匀的锌膜, 然后置于马弗炉中(600 °C), 烧结成透明的 ZnO 纳米膜.

1.3 SOD 修饰电极的制备

将制备的 ZnO 膜浸渍于 0.2 mmol/L 的 SOD 溶液中, 4 °C 条件下于冰箱中储存, 不用时置于 PBS 缓冲溶液中.

2 结果与讨论

2.1 Nano-ZnO 膜的表面特征

2.1.1 表面形貌表征 由物理气相沉积法制得的纳米微粒 ZnO 膜及 ITO 的 SEM 见图 1, 其中图 1(A)为 ITO 的 SEM 图, 图 1(B)为制备在 ITO 上的 ZnO 纳米膜的 SEM 图. 从图 1 中可以看出, 沉积在 ITO 上的多孔纳米氧化锌微粒聚集成 ZnO 膜, 其中 ZnO 纳米微粒直径在 $50 \sim 100$ nm 之间.

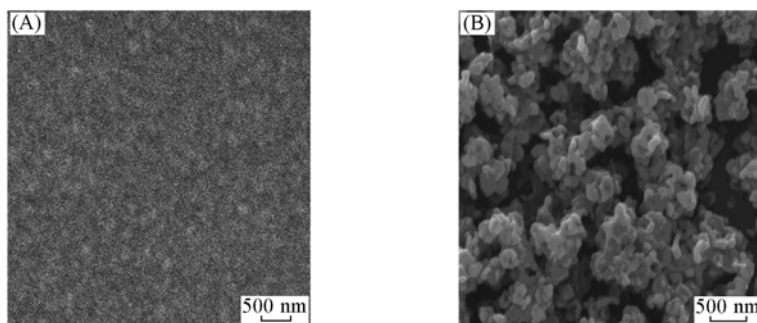


Fig. 1 SEM images of bare ITO(A) and nano-ZnO film(B)

2.1.2 紫外-可见吸收光谱表征 ZnO 纳米膜的紫外-可见吸收光谱(扣除 ITO 背景吸收)如图 2 所示. 可见 ZnO 纳米膜的最大吸收峰位于 368 nm 处. 根据公式 $E = hc/\lambda$, 计算得到 $E \approx 3.37$ eV, 这与 ZnO 的室温禁带宽度理论值相符, 进一步表明图 1(B)中的多孔纳米微粒是 ZnO.

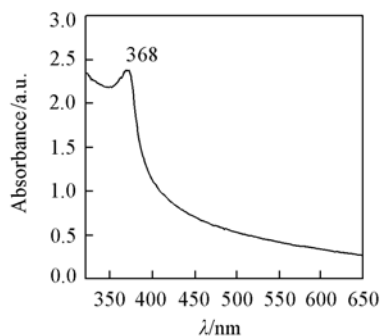


Fig. 2 UV-Vis absorption spectrum of nano-ZnO film

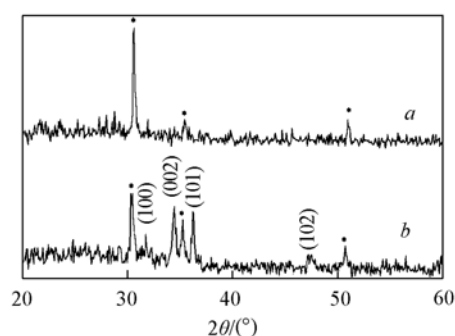


Fig. 3 XRD patterns of ITO(a) and nano-ZnO(b)

2.1.3 晶形表征 ZnO 纳米膜的 XRD 图谱见图 3, 其中谱线 *a* 为 ITO 的 X 射线衍射光谱, 谱线 *b* 为修饰 ZnO 纳米微粒后的 X 射线衍射光谱. 从谱线 *a* 和 *b* 的对比中可以看出, ZnO 膜和 ITO 基底相比出现了几个新的衍射峰, 其中 3 个强峰对应的 2θ 值分别为 34.447° , 36.259° 和 31.781° , 与 JCPDS(卡片号

36~1451)值非常相近, 3个强峰对应的晶面分别是(002), (101)和(100), 强度大小为(002) > (101) > (100). 以上实验结果表明, 制备的 ZnO 膜是沿着 c 轴优先生长的多晶六边形纤维锌矿结构, 与文献报道的结果一致^[18,19].

2.2 SOD/ZnO 修饰电极性能

2.2.1 SOD 在 Nano-ZnO 膜电极上的直接电子传递 在 25 $\mu\text{mol/L}$ PBS (pH 7.2) 中的循环伏安 (CV) 曲线分别见图 4 曲线 a 和 b (扫描速度为 100 mV/s). 从图 4 中可以看到, ZnO 纳米膜基体电极无响应, 而 SOD/ZnO 修饰电极出现了一对很好的氧化还原峰, SOD 的式量电位 $E^0 = 201 \text{ mV}$ (vs. Ag/AgCl), 说明 SOD 在 ZnO 电极膜表面实现了直接电子传递. 进一步实验结果表明, 氧化还原峰电流随着扫描速度 v 的增大而增大, 且呈线性关系, 说明该过程是一个吸附控制过程. 根据文献[20]方法计算得出的氧化还原电子传递系数 $\alpha_c = 0.56$, $\alpha_a = 0.44$, 电子转移速率常数 $k_s = (17 \pm 2) \text{ s}^{-1}$ ($n = 4$).

ZnO 纳米膜基体电极和修饰后的 SOD 修饰电极

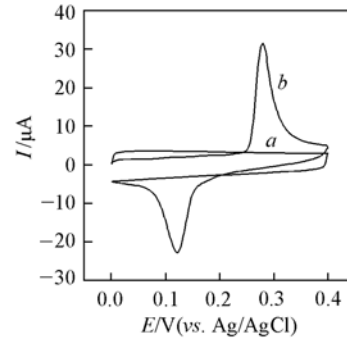


Fig. 4 CVs obtains at nano-ZnO film (a) and SOD/ZnO (b) in 25 $\mu\text{mol/L}$ PBS (pH 7.2)

Scan rate: 100 mV/s.

2.2.2 SOD 在 ZnO 膜上的吸附特性 SOD/ZnO 修饰的交流阻抗图谱见图 5, 图中圆弧所对应的直径为电子转移阻力, 简称为 R_{ct} . 未经修饰的 ZnO 膜电极的 R_{ct} 约为 174 Ω ; 而修饰 SOD 后, 电子传递阻力增大至约 9732 Ω , 说明修饰上的 SOD 蛋白质大分子阻碍了电极表面电子的传递, 进一步说明 SOD 已吸附在纳米 ZnO 膜电极上.

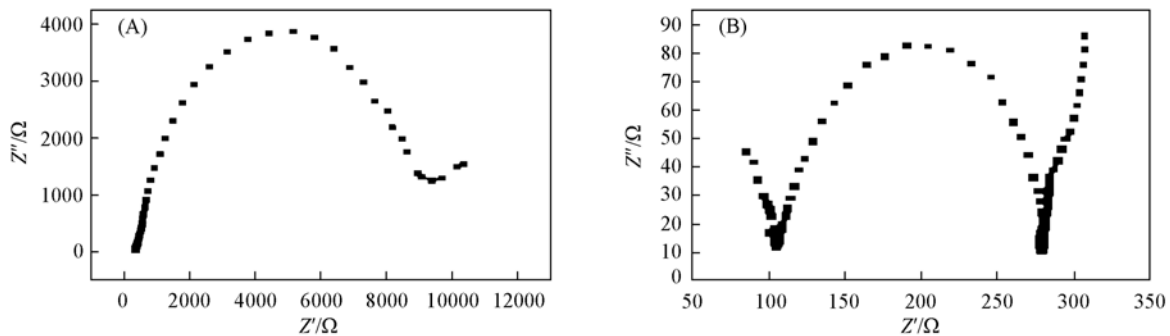


Fig. 5 Nyquist plot obtained at SOD/ZnO (A) and nano-ZnO film (B) in 0.1 mol/L KCl solution containing 1 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$

EIS conditions: potential 0.35 V; alternative voltage 5 mV; frequency range 0.01— 10^5 Hz.

根据下式可以计算出 SOD 在 ZnO 膜上的吸附量 (θ)^[21] 约为 98.21%.

$$\theta = \frac{R_{ct, \text{SOD/ZnO}} - R_{ct, \text{ZnO}}}{R_{ct, \text{SOD/ZnO}}} \times 100\%$$

式中, $R_{ct, \text{SOD/ZnO}}$ 为修饰 SOD 后的 ZnO 膜的电子转移阻抗, $R_{ct, \text{ZnO}}$ 为 ZnO 膜的电子转移阻抗.

2.2.3 吸附在 ZnO 膜上的 SOD 生物活性 由于 Cu^{2+} 的存在引起的 SOD 溶液的 UV-Vis 光谱的最大吸收峰位于 684 nm, 与文献[22]报道值一致; 修饰在 ZnO 膜电极上的 UV-Vis 光谱的最大吸收峰蓝移至 653 nm. 同时通过 FTIR 考察了 SOD 修饰前后氨基 I 吸收带 ($1700 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$) 和氨基 II 吸收带 ($1600 \sim 1500 \text{ cm}^{-1}$) 的变化情况. 在 SOD 溶液的红外光谱中, 蛋白质的 2 个氨基吸收带分别位于 1660 和 1546 cm^{-1} 处; 在 SOD/ZnO 修饰电极的红外光谱中蛋白质的两个氨基吸收带依然存在, 且分别位于 1647 和 1531 cm^{-1} 处. 以上结果说明, SOD 通过吸附修饰在 ZnO 膜电极上后, 虽然其构象有可能发生变化, 但未发生蛋白质的变性, SOD 仍然保持了相应的生物活性.

2.3 O_2^- 生物传感器

2.3.1 SOD 对 O_2^- 的电流响应及电极性能 在以 SOD/ZnO 修饰电极为工作电极的 PBS (25 $\mu\text{mol/L}$,

pH 7.2) 电解液中, 分别选取氧化电位 300 mV 和还原电位 0 V, 在恒电位条件下, 等时间间隔加入 4.0 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 KO_2 , 测定氧化电流和还原电流响应, 响应曲线见图 6. 实验结果表明, SOD/ZnO 电极对 O_2^- 有良好的线性稳态电流响应关系, 氧化电流与还原电流数值均随着 O_2^- 浓度的增加而递增. 相同条件下制备的 5 支 SOD/ZnO 修饰电极电流响应值偏差小于 4.8% ($n=4$).

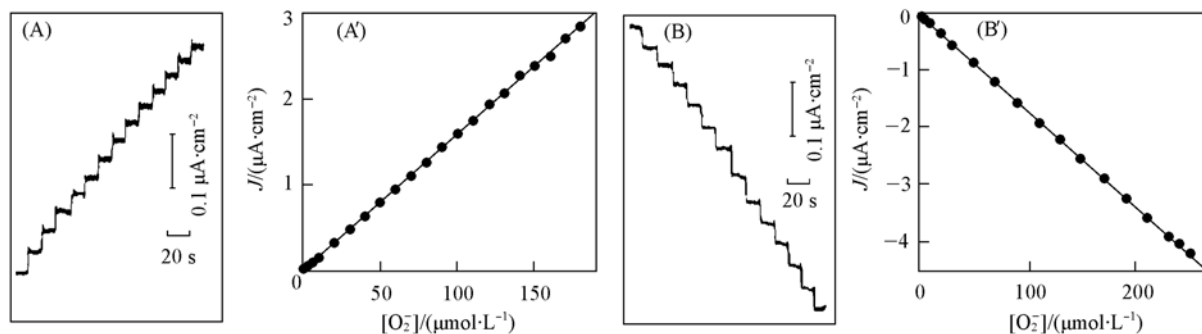


Fig. 6 Amperometric responses of the SOD/ZnO to successive additions of 4 μL of KO_2 (10 $\mu\text{mol/L}$) at applied potentials of 300 mV (A) and 0 mV (B) in 2 mL of PBS (25 mmol/L, pH 7.2) and calibration plots of anodic (A') and cathodic (B')

根据实验数据计算得到的 SOD/ZnO 修饰电极的安培响应特性如表 1 所示.

Table 1 Analytical properties of the O_2^- biosensor based on SOD/ZnO

Applied potential/mV	Sensitivity/($\text{nA} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$)	Linear range/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Response time/s	Detection limit/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
300	15.9 ± 0.6	0.24—180	4	0.2
0	17.1 ± 0.4	0.12—250	4	0.1

2.3.2 干扰实验 在所选测定电位条件下, 分别加入 2.0×10^{-6} mol/L 的抗坏血酸 (AA)、尿酸 (UA)、苦杏仁酸 (DOPAC) 和 H_2O_2 , 在 300 mV 条件下, AA 和 UA 产生的干扰电流分别占响应电流的 3.7% 和 5.5%, 但在 0 mV 条件下, AA 和 UA 则无干扰. 而 DOPAC, O_2 和 H_2O_2 在 300 和 0 mV 条件下均无干扰.

2.3.3 电极寿命 为考察 SOD/ZnO 修饰电极对 O_2^- 的电流响应的稳定性, 每天测定 3 次氧化还原电流响应曲线, 在 3 个月内, 响应电流变动幅度在 $\pm 5\%$.

3 结 论

将 SOD 修饰在具有多晶六边形纤维锌矿结构的多孔纳米 ZnO 膜上, 成功地制备了基于直接电子传递的超氧离子传感器, 该传感器具有线性范围广、灵敏度高、检测限低且寿命长等特点, 而且基底 Nano-ZnO 具有价格低廉、生物兼容性好、易制备和易微型化等性质, 具有较为广阔的应用前景.

参 考 文 献

- [1] Daniel M. C., Astruc D. Chem. Rev. [J], 2004, **104**: 293—346
- [2] Li D., Shlyahovsky B., Elbaz J., et al. J. Am. Chem. Soc. [J], 2007, **129**: 5804—5805
- [3] Liu Hai-qing, Tian Yan, Deng Zi-feng. Langmuir [J], 2007, **23**: 9487—9494
- [4] ZHAO Kun (赵琨), SONG Hai-Yan (宋海燕), CHANG Zhu (常竹). Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2007, **28**(7): 1251—1254
- [5] TU Yong-Hua (徒永华), CHENG Gui-Fang (程圭芳), LIN Li (林莉), et al. Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2006, **27**(12): 2266—2270
- [6] ZHANG Juan (张娟), XU Jing-Juan (徐静娟), CHEN Hong-Yuan (陈洪渊). Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2004, **25**(4): 614—617
- [7] Takao O., Masaki N., Takafumi K. Biochimica et Biophysica Acta [J], 1999, **1421**: 131—139
- [8] Zhang H., Joy J., Jeannette V., et al. FEBS Letters [J], 2000, **473**: 58—62
- [9] Tian Y., Mao L. Q., Okajima T. Anal. Chem. [J], 2004, **76**(14): 4162—4168

- [10] Tian Y. , Mao L. Q. , Okajima T. . Anal. Chem. [J], 2002, **74**(10): 2428—2434
- [11] Di J. W. , Peng S. H. , Shen C. P. . Biosens. Bioelectron. [J], 2007, **23**(1): 88—94
- [12] Di J. W. , Bi S. P. , Zhang M. . Biosens. Bioelectron. [J], 2004, **19**: 1479—1486
- [13] Moritz K. , Frieder W. , Maria S. , *et al.* . Analytical Chemistry[J], 2006, **78**: 928—935
- [14] Topoglidis E. , Cass A. E. G. , O'Regan B. , *et al.* . J. Electroanal. Chem. [J], 2001, **517**: 20—27
- [15] O'Regan B. , Gratzel M. . Nature[J], 1991, **353**: 737—739
- [16] Baughman R. H. , Zakhidov A. V. , De Heer W. A. . Science[J], 2002, **297**: 787—793
- [17] Zhu Xiao-li, Yuri I. , Xin Gan, *et al.* . Biosensors & Bioelectronics[J], 2007, **22**(8): 1600—1604
- [18] Zhang H. M. , Cui Y. , Men Y. G. . J. Luminescence[J], 2006, **121**(2): 601—605
- [19] Chakrabarti S. , Ganguli D. , Chaudhuri S. . Mater. Lett. [J], 2004, **58**(30): 3952—3957
- [20] Laviron E. . J. Electroanal. Chem. [J], 1979, **101**: 19—28
- [21] Wang C. H. , Yang C. , Song Y. Y. , *et al.* . Adv. Funct. Mater. [J], 2005, **15**: 1267—1235
- [22] Vedejs E. , Martinez G. R. . J. Am. Chem. Soc. [J], 1979, **101**: 6454—6456

Superoxide Biosensor Based on Superoxide Dismutase/Nano-ZnO

DENG Zi-Feng, XU Wei, YANG Xiao*

(Department of Chemistry, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract A nanoporous ZnO film (nano-ZnO) was prepared by physical vapor deposited method and its physical and chemical properties were studied by means of SEM, UV-Vis, XRD and electrochemical methods. The results show that nano-ZnO is a nanoporous film with a polycrystalline hexagonal wurtzite structure. The average diameter of the nanoparticles is about 50—100 nm and its band gap is 3.37 eV. A new superoxide dismutase (SOD) modified nano-ZnO electrode (SOD/ZnO) was prepared by dipping method. SOD was modified stably in the nano-ZnO film confirmed by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and the direct electron transfer could be achieved confirmed by cyclic voltammetry (CV). Spectrum studies indicated that SOD kept its bio-activities. A novel third-generation O_2^- biosensor with high selectivity, quick response time (4 s), large linear range (anodic current response: $0.24—180 \times 10^{-6}$ mol/L; cathodic current response: $0.12—250 \times 10^{-6}$ mol/L) and good sensitivity (anodic: 2×10^{-7} mol/L; cathodic: 1×10^{-7} mol/L) was constructed and its analytical properties were studied.

Keywords ZnO; Superoxide dismutase; Superoxide anion; Biosensor

(Ed. : A, G)