

[化学年会·简报]

## LBL 分子沉积法制备葡萄糖氧化酶电极\*

陈志春 徐善浩 林汉枫 杨绍明 林贤福

(浙江大学化学系, 杭州 310027)

**摘要** 采用以静电力为主的逐层分子交替沉积技术制备葡萄糖氧化酶(GOD)电极. 通过带有正电荷的聚二甲基二烯丙基铵盐(PDDA)和带有负电荷的 GOD 交替沉积在修饰有 3- 巯基 -1- 丙基磺酸钠(MPS)的金电极表面. 以甲酸二茂铁为电子媒介体, 用循环伏安法检测 GOD 电极对葡萄糖的响应. 结果表明, 当 GOD 电极组装层数小于 4 时, 电流响应随着层数的增加而增大, 超过 4 层时电流响应减小. 其中 4 层 GOD 修饰电极的线性范围为 0.55 ~ 6.63 mmol · L<sup>-1</sup>, 当 pH 为 7.0 时, 响应最大. 同时电极的检测重现性能良好, 相对标准偏差为 2.4%.

**关键词:** LBL(layer-by-layer)自组装, 葡萄糖氧化酶, 生物传感器

**中图分类号:** O647, O646

生物传感器在医学检验和药物分析中具有很重要的作用, 其中葡萄糖生物传感器在众多生物传感器的研究中引人注目, 而含生物活性分子有机薄膜是实现新型生物传感器的要素之一, 因此构筑结构有序、活性良好的生物分子有序膜的研究很有意义. Wang 等<sup>[1]</sup>通过铈和葡萄糖氧化酶(GOD)沉积到碳纤维电极, 制备了葡萄糖微传感器; Entcheva 等<sup>[2]</sup>将 GOD 共价结合到乙酸纤维素用于测定血浆中的葡萄糖浓度; Shen 等<sup>[3]</sup>研究了 GOD、糖化酶(GA)的双酶分子沉积自组装膜, 并实现了自组装体系麦芽糖传感器的构造.

近年发展起来的 LBL 自组装(layer-by-layer assembly)技术实现了有序膜结构的构造<sup>[4]</sup>. 本文探讨了 LBL 分子沉积法在石英表面和金表面组装 PDDA(聚二甲基二烯丙基铵盐)/GOD 多层膜, 通过 UV-Vis 研究了石英表面 GOD 的交替自组装规律; 采用循环伏安法研究了金电极表面组装 GOD 后的电化学特征以及电极对葡萄糖的电化学催化氧化作用.

### 1 实验部分

#### 1.1 试剂和仪器

葡萄糖氧化酶(GOD, Amresco), 3- 巯基 -1- 丙

基磺酸钠盐(MPS, Aldrich), 聚二甲基二烯丙基铵盐(PDDA, 20% 水溶液, Aldrich), 聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET, 杭州大自然磁带厂), 甲酸二茂铁(ferrocenecarboxylic acid, FcCOOH, Fluka)等试剂均为分析纯. 所有溶液采用超纯水( $\kappa = 3.3 \times 10^{-5} \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ )配制, 不同 pH 的磷酸盐缓冲溶液(PBS, Phosphate buffer solution)由 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 调配而成.

SPECORD 200 紫外 - 可见光吸收光谱仪(德国 analytikjena 公司), 天津兰力科 98A 电化学分析测试系统.

#### 1.2 基材的处理与修饰

自制双面金片电极(1 cm × 0.5 cm)表面先用金相砂纸打磨, 再以平均粒径为 0.05 μm 的氧化铝砂浆打磨成镜面, 用蒸馏水冲洗干净后于 80 °C 的 Piranha 溶液(98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 7: 3, 体积比)中浸泡 30 min, 除去有机物等难以除去的杂质. 将电极取出后用蒸馏水反复冲洗干净, 在 0.1 mol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中反复进行循环伏安扫描, 扫描范围 1.4 ~ -0.2 V, 直至得到稳定的可重复的循环伏安曲线. 将经过清洁处理的金电极浸入 0.01 mol · L<sup>-1</sup> MPS 水溶液中浸泡 12 h<sup>[5]</sup>, 取出后用超纯水冲洗, 即形成表面带有负电荷的自组装膜(SAM, self

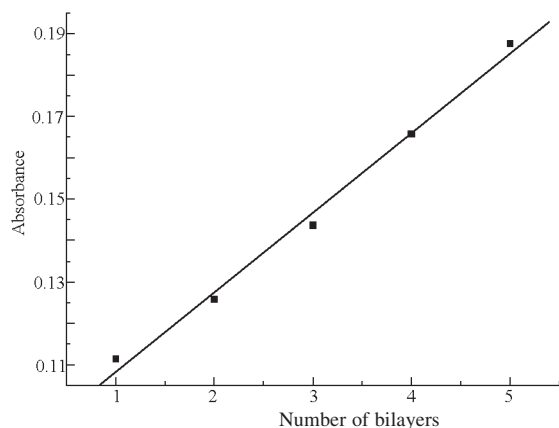


图 1 278 nm 处紫外 - 可见光吸收峰强度随着 (PDDA/GOD) 组装双层数的变化

Fig. 1 The UV-Vis absorbance of films with different assembly-number of (PDDA/GOD) at 278 nm

PDDA: poly (dimethyldiallylammonium) hydrochloride,  
GOD: glucose oxidase

assembled monolayer).

将石英晶片在 80 °C 的 Piranha 溶液中浸泡 30 min<sup>[6]</sup>, 取出后用超纯水冲洗干净, 用于多层膜的自组装.

### 1.3 GOD 自组装膜的制备

将经过预处理的表面带有负电荷的 Au/MPS (或石英晶片) 浸入 1.0 g · L<sup>-1</sup> 的 PDDA (pH = 6.47 PBS) 溶液中组装 20 min; 取出后用超纯水冲洗, 以洗去弱吸附的聚合物及其它小分子; 再浸入 0.5 g · L<sup>-1</sup> 的 GOD (pH = 6.47 PBS) 溶液中组装 30 min; 取出后用超纯水冲洗干净. 交替进行上述过程即得多层 PDDA/GOD 自组装沉积膜.

### 1.4 电化学测量

电化学测定采用三电极系统, 以 Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂片电极为对电极, 修饰金电极为工作电极. 实验在 25 °C 下进行.

## 2 结果与讨论

### 2.1 PDDA/GOD 的逐层自组装

采用 LBL 分子沉积法将 GOD 组装到石英晶片上, 通过对不同双层数 (PDDA/GOD) 的自组装膜的紫外 - 可见吸收光谱研究, 发现随着双层数的增加, 其 278 nm 处的吸收峰 (GOD 分子中色氨酸和酪氨酸的  $\pi$ - $\pi^*$  跃迁吸收峰) 的强度也线性增加 (图 1), 线性方程为  $A = 0.0192n + 0.0891$  ( $A$  为吸光度,  $n$  为双层数). 表明 GOD 和 PDDA 交替沉积在石英

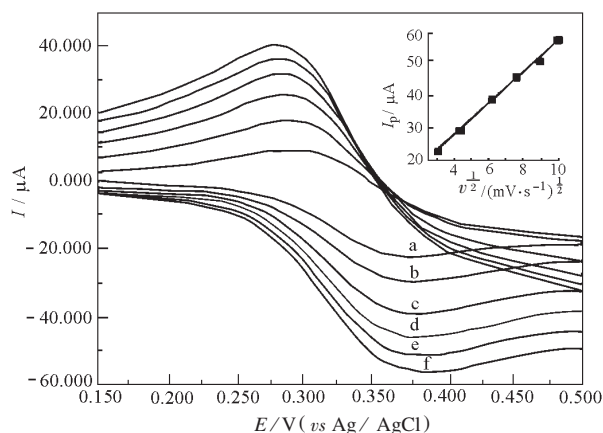


图 2 不同扫描速率时 FcCOOH 的循环伏安图

Fig. 2 Cyclic voltammograms of GOD modified electrode at different scan rates

(a) 10, (b) 20, (c) 40, (d) 60, (e) 80, (f) 100 mV · s<sup>-1</sup>.

The inset shows the plot of peak current vs square root of scan rate. condition: in 0.20 mol · L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.21 mmol · L<sup>-1</sup> FcCOOH; FcCOOH: ferrocenecarboxylic acid

晶体表面, 且单位面积上 GOD 的量是随着双层数而线性变化, 每层组装的量是均匀而且固定的<sup>[7]</sup>.

### 2.2 甲酸二茂铁的电化学性质

图 2 为不同扫描速率下 GOD 修饰电极在 FcCOOH 溶液中的循环伏安图. 在扫描速率为 10 ~ 100 mV · s<sup>-1</sup> 范围内, FcCOOH 氧化还原峰电位与扫描速率无关, 峰电流和扫描速率的平方根成正比 (见图 2 插图), 表明 FcCOOH 可以在 GOD 修饰电极上发生可逆的氧化还原反应, 其电化学过程受扩散控制.

组装不同双层数 GOD 修饰电极的循环伏安数据如表 1 所示. 可以看出, 随着 GOD 组装双层数的增加, 式电位  $E_{1/2}$  基本不随层数变化, 均约为 0.33 V, 但峰峰电位差  $\Delta E$  增大, 表明随组装层数增加, FcCOOH 溶液的电极反应可逆性减弱.

表 1 不同双层数 GOD 电极的峰电位

Table 1 The peak potential of GOD modified electrode with different number of bilayers

No. of bilayers	$E_{pa}/V$	$E_{pc}/V$	$\Delta E/V$	$E_{1/2}/V$
2	0.287	0.364	0.077	0.329
3	0.287	0.371	0.084	0.325
4	0.284	0.374	0.090	0.329
5	0.282	0.375	0.093	0.328

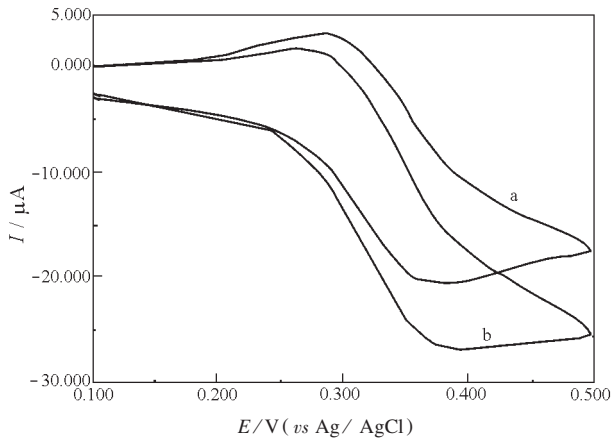


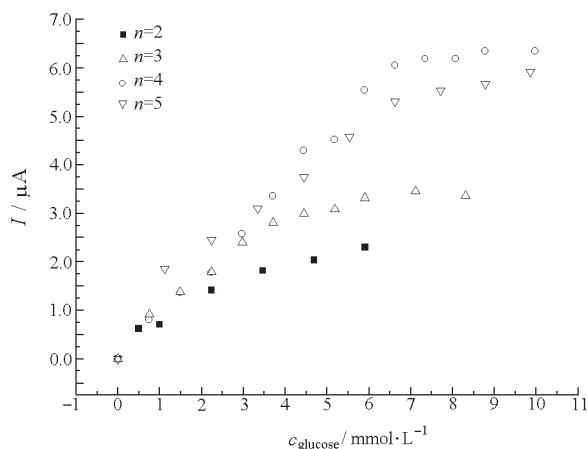
图3 加入葡萄糖前后 GOD 修饰电极的循环伏安图

**Fig. 3 Cyclic voltammograms of GOD modified electrode (a) in the absence of glucose and (b) in the presence of  $7.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  glucose**  
condition: in  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  phosphate buffer (pH 7.0) containing  $0.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  FcCOOH; scan rate:  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

### 2.3 GOD 电极的电化学研究

#### 2.3.1 GOD 电极对葡萄糖的响应

图3为加入葡萄糖前后 GOD 修饰电极在 FcCOOH 中的循环伏安图。从图中可以看出,加入葡萄糖后, FcCOOH 的氧化峰增加,还原峰减小。结果表明, FcCOOH 可以作为 GOD 电极的电子媒介体,在 GOD 和电极表面之间传递电子;采用 LBL 分子沉积法制备的 GOD 修饰电极对葡萄糖有响应。

图4 不同双层数 ( $n$ ) 的 (PDDA/GOD) 修饰电极对葡萄糖的响应

**Fig. 4 Amperometric responses of modified electrode with different number ( $n$ ) of bilayer (PDDA/GOD)**  
condition: in  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  phosphate buffer (pH 7.0) containing  $0.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  FcCOOH; scan rate:  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

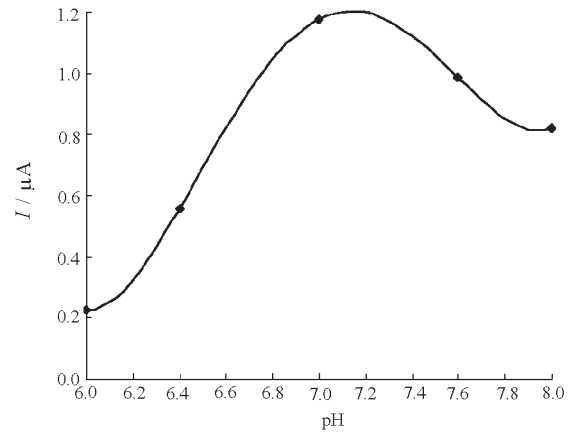


图5 不同 pH 时 GOD 电极对葡萄糖的响应

**Fig. 5 Effect of pH on amperometric responses of  $7.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  glucose**  
condition: in  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  phosphate buffer (pH 7.0) containing  $0.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  FcCOOH; scan rate:  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

#### 2.3.2 GOD 电极组装层数对葡萄糖响应的的影响

组装不同双层数的 GOD 修饰电极对底物的响应性能如图4所示。结果表明,当层数小于4时,电流响应随着层数的增加而增大;超过4层时,由于扩散的限制,电流响应反而随着层数的增加而减小。其中4层 GOD 修饰电极表现最佳,葡萄糖浓度的线性范围为  $0.55 \sim 6.63 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

#### 2.3.3 pH 对 GOD 电极响应的的影响

FcCOOH 和葡萄糖的浓度分别为  $0.21$  和  $7.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,组装4层 GOD 的修饰电极在不同的 pH 条件下,对葡萄糖的响应如图5所示。由图可见,溶液的 pH 对 GOD 电极的电流响应有显著的影响,当 pH 为 7.0 时,酶电极的响应最大,该 pH 为酶电极的最佳 pH。

#### 2.3.4 GOD 电极的重现性

4层 GOD 修饰电极对  $9.97 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的葡萄糖溶液进行 10 次平行测定,其相对标准偏差为 2.4%,表明该电极的重现性能良好。

## 3 结论

采用 LBL 分子沉积技术可以实现葡萄糖氧化酶在金和石英表面的多层膜自组装。该方法条件温和,膜层数可控,酶活性保持良好;用该方法制备的酶电极操作简单快捷,重现性好,响应信号强,显示出其在构筑生物传感器等功能器件方面具有一定的应用前景。

## References

- 1 Wang, J. ; Rivas, G. ; Chicharro, M. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1997**, **439**(1): 55
- 2 Entcheva, E. G. ; Yotova, L. K. *Analytica Chimica Acta*, **1994**, **299**(2): 171
- 3 Sun, Y. P. ; Zhang, X. ; Sun, C. Q. ; Wang, B. ; Shen, J. C. *Macromol. Chem. Phys.*, **1996**, **197**(1): 147
- 4 Decher, G. *Science*, **1997**, **277**(5330): 1232
- 5 Cui, A. L. ; Tang, J. ; Li, W. J. *Materials Chemistry and Physics*, **2001**, **71**(1): 23
- 6 Luo, L. Q. ; Liu, J. Y. ; Dong, S. J. *Biophysical Chemistry*, **2001**, **94**(1): 11
- 7 Frank, C. ; Dirk, G. K. ; Dirk, V. ; Michael, J. K. ; Achim, M. *Langmuir*, **1998**, **14**(13): 3462

## Glucose Oxidase Modified Electrode Fabricated by Layer-by-layer Molecular Deposition\*

Chen Zhi-Chun    Xu Shan-Hao    Lin Han-Feng    Yang Shao-Ming    Lin Xian-Fu  
(*Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027*)

**Abstract** In this paper, glucose oxidase(GOD) electrodes were fabricated by alternative adsorption of oppositely charged polycations (poly(dimethyldiallylammonium)hydrochloride, PDDA) and enzymes on Au modified by 3-mercaptopropylsulfonic acid, sodium salt (MPS). The concentration of glucose was detected by cyclic voltammetry *via* ferrocene monocarboxylic acid as mediator. A linear relationship existed between peak current and concentration of glucose in the range 0.55 ~ 6.63 mmol · L<sup>-1</sup>. The effect of pH on the response current of electrooxidation of glucose by GOD had been studied and the optimum pH was 7.0. In addition, the biosensor showed good reproducibility for the determination of glucose and the relative standard deviation was 2.4%.

**Keywords:** Layer-by-layer assembly, Glucose oxidase(GOD), Biosensor