

## 镀金和碳纳米管修饰金电极上吸附态葡萄糖氧化酶 比活性的 EQCM 研究

陈 昕<sup>1,2</sup> 张漪丽<sup>2</sup> 苏育华<sup>1</sup> 孟文华<sup>3</sup> 谢青季<sup>1,\*</sup> 姚守拙<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 湖南师范大学化学化工学院, 化学生物学及中药分析省部共建教育部重点实验室, 长沙 410081;

<sup>2</sup> 湖南师范大学医学院, 长沙 410006; <sup>3</sup> 湖南师范大学医院, 长沙 410081)

**摘要:** 采用石英晶体微天平(EQCM)技术监测了裸金电极、镀金和碳纳米管修饰金电极上葡萄糖氧化酶(GOD)的吸附过程. 通过 EQCM 测量吸附固定的 GOD 质量, 并实时检测酶反应产物 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的氧化电量, 求算了各表面上吸附态 GOD 的比活性(ESA<sub>i</sub>). 结果表明, 各表面上均可吸附一定的 GOD, 且吸附态 GOD 均有一定的酶活性; 修饰 CNTs 可增大酶吸附量和酶电极对葡萄糖的响应电流, 但 ESA<sub>i</sub> 随 CNTs 修饰量的增大而降低; Au 电极上电镀金后, 酶吸附量和酶电极对葡萄糖的响应电流亦增大, 但 ESA<sub>i</sub> 与裸金电极上的基本一致.

**关键词:** 电化学石英晶体阻抗; 葡萄糖氧化酶吸附; 酶比活性(ESA); 碳纳米管; 电镀金  
中图分类号: O646

## EQCM Studies on Enzymatic Specific Activities of Glucose Oxidase Adsorbed on Au-electroplated and Carbon Nanotubes-modified Au Electrodes

CHEN Xin<sup>1,2</sup> ZHANG Yi-Li<sup>2</sup> SU Yu-Hua<sup>1</sup> MENG Wen-Hua<sup>3</sup>  
XIE Qing-Ji<sup>1,\*</sup> YAO Shou-Zhuo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research, Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Normal University, Changsha 410081, P. R. China; <sup>2</sup>Medical College, Hunan Normal University, Changsha 410006, P. R. China; <sup>3</sup>Hunan Normal University Hospital, Changsha 410081, P. R. China)

**Abstract:** The electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM) technique was employed to monitor *in situ* the adsorption of glucose oxidase (GOD) onto bare Au, Au-electroplated, and carbon nanotubes(CNTs)-modified Au electrodes. The enzymatic specific activities (ESA<sub>i</sub>) for GOD adsorbed on various surfaces were measured from the mass of adsorbed GOD obtained *via* EQCM characterization and the charge for oxidation of enzymatically generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The results showed that GOD could adsorb on the investigated surfaces with different adsorption amounts, and the adsorbed GOD was enzymatically active to some degree; the modification of CNTs increased the adsorption amount of GOD and the response current to glucose, but the ESA<sub>i</sub> decreased with the increase of the amount of modified CNTs; the Au electroplating on Au electrode also increased the response current to glucose, but the ESA<sub>i</sub> changed little after the electroplating.

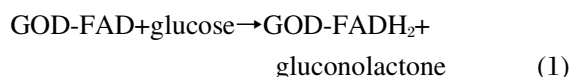
**Key Words:** Electrochemical quartz crystal impedance; GOD adsorption; Enzymatic specific activity(ESA); Carbon nanotubes; Au electroplating

葡萄糖氧化酶(GOD)可高选择性地催化葡萄糖的氧化. 在溶液中与氧气共存时, 氧气可氧化 GOD 的还原态而再生 GOD, 而氧气同时被还原成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 反应式如下<sup>[1-5]</sup>:

Received: February 5, 2007; Revised: April 7, 2007; Published on Web: June 12, 2007.

\*Corresponding author. Email: xieqj@hunnu.edu.cn; Tel: +86731-8865515.

国家自然科学基金(20675029, 20335020)和教育部基金(教人司[2000]26, 教技司[2000]65)及湖南省教育厅(04C383, 05A036)资助项目



这里, FAD和FADH<sub>2</sub>分别代表GOD中辅因子(cofactor)、黄素腺嘌呤二核苷酸(flavine adenine dinucleotid)的氧化和还原形式; gluconolactone为葡萄糖酸内酯. 通过检测酶反应产物H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的氧化或还原电流可检测葡萄糖. 自Hicks等人<sup>[6]</sup>于1967年首次报道葡萄糖氧化酶修饰电极检测葡萄糖以来, 因其重要的生物催化学科背景和血糖检测的临床意义, 其基础和应用研究一直非常活跃, 尤其是近年来采用纳米金和碳纳米管(CNTs)等纳米材料制作酶电极的研究报道甚多<sup>[2, 7-9]</sup>. 酶电极制作和酶固定过程通常难以避免酶的吸附, 故吸附酶的活性和比活性测量是生物催化和酶电极制作过程中一个重要的基础问题. 一般认为酶在金属电极表面吸附后而变性, 使电极上吸附酶基本失活, 但在纳米粒子上吸附酶的活性可增强<sup>[10-12]</sup>. 然而, 迄今GOD等酶的吸附动力学和吸附酶比活性的定量测量等方面的研究鲜见文献报道.

电化学石英晶体阻抗(EQCI)法是一种多参数电化学石英晶体微天平(EQCM)技术, 可在电化学反应现场动态检测电极表面低至ng级的质量、溶液粘密度及修饰膜粘弹性等参数的变化, 已广泛用于电化学和电分析化学等领域的研究<sup>[13-18]</sup>. 对于电极上均匀分布的刚性薄膜的沉积和溶出, 可用如下Sauerbrey方程描述石英晶体频移( $\Delta f_0$ )和质量变化( $\Delta m$ )之间的线性关系:

$$\Delta f_0 = -2f_0^2 \Delta m / (A \sqrt{\rho \mu}) = -2.264 \times 10^{-6} f_0^2 \Delta m / A \quad (3)$$

式中 $f_0$ 为晶体在气相中的基频;  $A$ 为电极的压电活性面积;  $\rho = 2.648 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ , 为石英晶体密度;  $\mu = 2.947 \times 10^{11} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$ , 为晶体剪切模量.

本文在裸金电极(Au)上直接吸附GOD, 通过QCI技术动态监测了GOD的吸附过程, 通过测量频率响应, 代入(3)式计算求得了酶的吸附量, 并实时检测酶反应产物H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的氧化电量, 求得了吸附酶的比活性(ESA<sub>i</sub>,  $i$ 表示吸附固定(immobilized)酶). 探讨了GOD的吸附动力学及催化氧化性能, 并进行吸附酶的定量评估.

## 1 实验

### 1.1 仪器和试剂

所有电化学实验均采用三电极系统在

CHI660C电化学工作站(上海辰华仪器公司)上进行, 饱和甘汞电极(SCE)为参比电极, 本文电位均相对于SCE参比电极. 自制的铅笔芯电极为对电极. EQCM实验采用计算机控制的HP4395A阻抗分析仪. 实验中采用AT切9-MHz压电石英晶体, 单面触液, 晶体直径12.5 mm, 电极直径6.00 mm.

镀金压电石英晶体(9 MHz, 北京707厂), GOD(300 U·mg<sup>-1</sup>, 昆明杰辉生物技术有限公司, U为酶活性的国际标准单位)、葡萄糖(上海化学试剂公司)、CNTs(多壁, 直径10-30 nm, 纯度大于95%, 深圳市纳米港有限公司)、氯金酸(国药集团化学试剂有限公司), 其它试剂均为分析纯试剂. 0.0670 mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲溶液(PBS)由KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>与Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>按不同比例配制而成, 内含0.100 mol·L<sup>-1</sup>的Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 所有溶液均由二次蒸馏水配制, 葡萄糖溶液在使用前至少放置24 h使达光学异构体平衡. 所有实验在室温((10±2) °C)下进行.

### 1.2 实验步骤

#### 1.2.1 Au、Au/Au和CNTs/Au电极的制备

**Au电极制备:** 以704硅橡胶将一原装镀金压电石英晶片密封在玻璃管的一端, 使电极单面触液. 在电极表面先后滴加浓HNO<sub>3</sub>及洗液各处理3次, 以除去电极表面上可能的污染物. 用二次蒸馏水彻底冲洗后吹干, 置于0.200 mol·L<sup>-1</sup> HClO<sub>4</sub>至水溶液中, 在0-1.50 V(*vs* SCE)间进行电位环扫直到得到可逐圈重现的循环伏安图. 然后, 将电极置于2.00 mmol·L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>+0.100 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>至水溶液中在-0.100 - 0.500 V(*vs* SCE)间进行电位环扫, 氧化还原峰峰电位宽一般在60-80 mV内, 表明Au电极已处理干净.

**Au/Au电极制备:** 将处理好的Au电极与参比电极及对电极插入含5.00 mmol·L<sup>-1</sup>氯金酸的PBS溶液中, 在0-0.800 V(*vs* SCE)间电位环扫(扫速30.0 mV·s<sup>-1</sup>)进行电镀. 在空气中测量电镀前后的干燥石英晶体的频率(干频), 据前后干频之差和式(3)计算所电镀的金颗粒总质量.

**CNTs/Au电极制备:** 将0.500 mg CNTs超声分散在1.00 mL水中, 得黑色悬浊液, 用移液枪分别取5.0、10.0和15.0 μL CNTs悬浊液滴到Au电极表面, 室温下静置待水分挥发后, 水洗, CNTs可牢固附着在Au表面形成CNTs/Au电极. 空气中测量滴加CNTs悬浊液前后的干燥石英晶体的频率, 据前后干频之差和式(3)计算所吸附的CNTs总质量.

将 Au、Au/Au 或 CNTs/Au 电极置于 3.00 mL PBS 溶液中, 搅拌溶液. 待谐振频率稳定后, 加入 0.500 mL 浓度为  $7.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 GOD 溶液, 继续实时记录压电石英晶体阻抗响应参数. 待吸附达到平衡后, 取出电极, 充分水洗并吹干. 在空气中测量吸附前后的干燥石英晶体的频率, 据前后干频之差代入式(3)计算所吸附的 GOD 质量  $\Delta m$ . 前后干频之差为吸附前后空气中干燥石英晶体的频率之差, 即  $\Delta f_0 = f_{0d2} - f_{0d1}$ ,  $f_{0d1}$ 、 $f_{0d2}$  分别为吸附前、后的晶体干频.

### 1.2.3 吸附态 GOD 用于催化氧化葡萄糖及 $\text{ESA}_1$ 的测量

将吸附 GOD 的电极置于盛有 10.0 mL PBS 溶液的 50 mL 烧杯中, 搅拌溶液, 连接电极, 待电流达稳态后, 加入  $10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的葡萄糖, 在优化电位 0.700 V (*vs* SCE) 下检测酶生  $\text{H}_2\text{O}_2$  的氧化电流.

## 2 结果与讨论

### 2.1 GOD 的吸附动力学研究

描述蛋白质吸附动力学过程最简单的方法是考虑在电极/溶液界面发生的如下串联反应过程:  $\text{A} \xrightarrow{k_1} \text{B} \xrightarrow{k_2} \text{C}$ , 其中第一个过程为直接吸附(速率和时间常数分别为  $k_1$  和  $\tau_1$ ); 第二个过程为吸附层中分子结构重组或后续第二层吸附(速率和时间常数分别为  $k_2$  和  $\tau_2$ ), 故蛋白质在电极表面吸附的频率响应 ( $\Delta f_0$ ) 可用 2 个指数函数之和来表示<sup>[13]</sup>, 即

$$\Delta f_0 = a_0 + a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2} \quad (4)$$

把  $a_0$ 、 $a_1$ 、 $a_2$ 、 $\tau_1$  和  $\tau_2$  当作待估算参数, 采用作图软件 SigmaPlot Scientific Graphing Software Version 2.0 的非线性最小二乘拟合算法, 拟合  $\Delta f_0$  响应. 为表征非线性拟合的质量, 定义相对残差平方和如下<sup>[13-18]</sup>:

$$q = \frac{\sum_1^N (\Delta f_{0\text{fit}} - \Delta f_{0\text{exp}})^2}{\sum_1^N \Delta f_{0\text{exp}}^2} \quad (5)$$

式中  $\Delta f_{0\text{fit}}$  和  $\Delta f_{0\text{exp}}$  分别代表拟合值和实验值,  $N$  代表响应信号的点数.

我们研究了 GOD 在 Au、CNTs/Au 及 Au/Au 电极上的吸附情况, 所得拟合参数列于表 1. 拟合结果与实验的频率响应非常一致, 见图 1. 图中  $\Delta R_1$  为石英晶体的动态电阻响应, 表示石英晶体谐振能量耗散情况的改变. 对刚性质量负载, 理论上  $\Delta R_1 = 0$ <sup>[13-18]</sup>. GOD 吸附过程的动态电阻响应均不大, 即使在 CNTs 上吸附后的  $-\Delta f_0/\Delta R_1$  亦达  $31 \text{ Hz} \cdot \Omega^{-1}$ , 明显大于纯粘密度效应的理论值 ( $-\Delta f_0/\Delta R_1 = 10 \text{ Hz} \cdot \Omega^{-1}$ )<sup>[13-18]</sup>,

表 1 按式(4)拟合图 1 实验中  $\Delta f_0$  响应所得参数

Table 1 Parameters obtained by fitting experimental  $\Delta f_0$  responses given in Fig.1 according to Eq.(4)

Electrode	$a_0/\text{Hz}$	$a_1/\text{Hz}$	$a_2/\text{Hz}$	$\tau_1/\text{s}$	$\tau_2/\text{s}$	$q$
Au	-114	78.9	36.4	3.69	84.8	$2.45 \times 10^{-3}$
CNTs/Au	-1412	1271	229	78	401	$3.87 \times 10^{-5}$
Au/Au	-250	187	60.2	49.1	659	$3.27 \times 10^{-5}$

表明频率响应主要为质量效应.

式(4)中  $a_0$  为吸附时间趋于  $\infty$  时的频移(对应于吸附量), 由表 1 中  $a_0$  数据可以看出, GOD 在 CNTs/Au 电极上吸附量最大, Au/Au 电极上次之, Au 电极上最少. 电极表面积、憎水性和荷电性质等因素可影响 GOD 在电极表面的吸附. 因 CNTs 修饰和电镀金均增大了电极表面积, 而 CNTs 疏水性大, 有利于蛋白质吸附<sup>[11]</sup>, 故不难解释上述实验现象.

### 2.2 吸附态 GOD 用于催化氧化葡萄糖

#### 2.2.1 电位和溶液 pH 值效应

图 2 为电极上吸附态 GOD 催化氧化葡萄糖产生的氧化电流随工作电位的变化曲线(曲线 a). 可见, 随着电位正移, 电流先增后降, 在 0.70 V 时电流达最大值, 且与相同实验条件下  $1.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化电流的变化趋势基本一致(曲线 b), 故选择 0.70 V 为工作电位.

在 Au 电极上滴 10.0  $\mu\text{L}$  浓度为  $5.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 GOD 溶液, 待其干燥后, 考察了该酶电极在不同 pH 值(4.5-8.0)的 PBS 溶液(优化电位 0.70 V)中, 对  $10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的葡萄糖溶液的响应情况, 如图 3 所示. 可见, pH 值为 6.5-7.0 时电流响应最大, 故选择 pH 值为 6.86 的 PBS 溶液为底液.

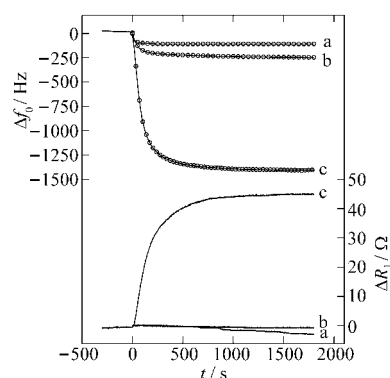


图 1 不同电极表面  $\Delta f_0$  和  $\Delta R_1$  对 GOD 吸附的响应  
Fig.1 Time courses of simultaneous  $\Delta f_0$  and  $\Delta R_1$  responses to the GOD adsorption on Au (a), 3.22 kHz Au/Au (b) and 2.01 kHz CNTs/Au (c) electrodes  
solid curves: experimental, circles: fitted according to Eq.(4).  $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  GOD was added into PBS (pH 6.86) at time of zero.

#### 1.2.2 GOD 的吸附

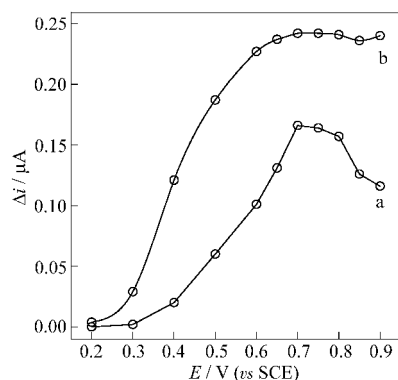


图2 不同电位下酶修饰金电极和裸金电极的电流响应  
Fig.2 Current-potential responses of a GOD/Au electrode at various potential

(a) GOD/Au electrode added 10.0 mmol·L<sup>-1</sup> glucose, (b) bare Au electrode added 1.00 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.0670 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 6.86)

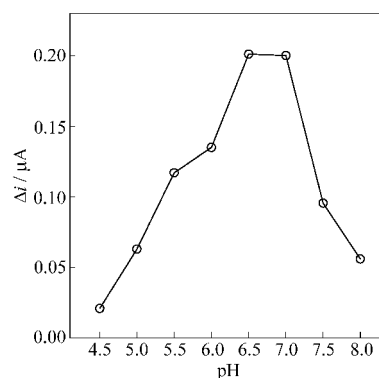


图3 不同 pH 值溶液中 GOD/Au 电极的电流响应  
Fig.3 Current response at different pH values

in 0.0670 mol·L<sup>-1</sup> phosphate buffer solution, containing 10.0 mmol·L<sup>-1</sup> glucose, potential applied: 0.700 V (vs SCE).

### 2.2.2 酶催化电流(浓度响应)

考察了7种不同电极表面(表2)吸附态GOD所产生的催化氧化电流,相对于空白稳态电流的电流增量  $\Delta i$  与葡萄糖浓度  $c$  的关系如图4所示.酶反应满足(6)式的 Michaelis-Menten 动力学特征<sup>[19]</sup>,

$$\Delta i = \Delta i_{\max} c / (K_M + c) \quad (6)$$

式中  $\Delta i_{\max}$  为最大响应电流,  $K_M$  为表观米氏常数.

采用 SigmaPlotR Scientific Graphing Software Version 2.0 软件,据式(6)非线性拟合的结果与实验结果很接近,求得  $K_M$  值列于表2.  $K_M$  值比文献值<sup>[1-5,12]</sup> (4-20 mmol·L<sup>-1</sup>) 大,说明吸附酶对葡萄糖的亲合性确实不高.

值得指出的是,文献中一般采用 Lineweaver-Burk 方程(即式(6)变换成  $1/\Delta i$  对  $1/c$  的线性函数),米氏常数按所得直线斜率与截距来计算<sup>[1-5,12]</sup>.然而,对本文实验数据,若按 Lineweaver-Burk 方程计算  $K_M$ ,在不舍点的情况下往往难以得到满意结果,如电镀了 5.16 μg 金的修饰电极,线性回归方程为

$1/\Delta i = 0.0535 + 48.5/c$ ,  $K_M$  计算值高达 907 mmol·L<sup>-1</sup>.这可能是因为非加权的普通线性回归法依然以残差平方和为目标函数,这样实验误差相对较大的低浓度、小响应数据点其倒数值大,对目标函数的贡献大,导致了不合理结果,而据式(6)的非线性拟合则无此问题.因此,本文方法应是 Lineweaver-Burk 方程求米氏常数可行的替代方法.

### 2.3 吸附酶 ESA<sub>i</sub> 的定量评估

采用 EQCM 技术,微量固定酶的 ESA<sub>i</sub> 值和相对比活性(ERA)可按式(7)计算<sup>[4,5]</sup>. ESA<sub>i</sub> 定义为每克固定酶的酶活性,即在 60.0 s 内产生 1.00 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对应的酶活性,由 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化电量评估,

$$ESA_i = n_{H_2O_2} / \Delta m_e = Q_{H_2O_2} / (zF \Delta m_{GOD}) \quad (7)$$

式中  $n_{H_2O_2}$  为葡萄糖浓度足够大时饱和状态下 60.0 s 酶反应生成的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量,  $\Delta m_e$  为固定 GOD 的质量,  $z$  为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化过程中电子转移数(此处  $z=2$ ),  $F$  为法拉第常数.吸附 GOD 的质量  $\Delta m_{GOD}$  可据式(3)和干频移计算得出.

表2 图4数据分析结果

Table 2 Data analyses for Fig.4

Electrode	Label in Fig. 4	$\Delta f_{OM}/\text{kHz}$	$\Delta m_M/\mu\text{g}$	$\Delta f_{iGOD}/\text{kHz}$	$\Delta m_{GOD}/\mu\text{g}$	$K_M/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$q_i$	ESA <sub>i</sub> (kU·g <sup>-1</sup> )	ERA(%)
Au	g	0	0	-0.072	0.120	45.4	1.59×10 <sup>-3</sup>	1.38	4.34
CNTs/Au	c	-1.38	2.22	-0.528	0.850	57.8	2.07×10 <sup>-3</sup>	0.588	1.86
	b	-2.01	3.23	-1.03	1.66	36.2	4.30×10 <sup>-5</sup>	0.282	0.89
	a	-3.12	5.01	-1.31	2.11	34.3	7.38×10 <sup>-5</sup>	0.251	0.79
	f	-1.90	3.04	-0.172	0.270	43.8	4.59×10 <sup>-4</sup>	1.28	4.04
Au/Au	e	-3.22	5.16	-0.183	0.291	61.6	4.43×10 <sup>-4</sup>	1.28	4.04
	d	-5.70	9.16	-0.197	0.320	72.5	1.30×10 <sup>-3</sup>	1.34	4.23

$\Delta m_M$  and  $\Delta f_{OM}$  denote the mass changes and "dry" frequency shifts after CNTs modification or Au-plating on the Au electrode surfaces, and  $\Delta m_{GOD}$  and  $\Delta f_{iGOD}$  denote the mass changes and "dry" frequency shifts after GOD adsorption on the bare and modified Au electrodes.

See the text for definitions of other symbols and nomenclatures.

溶液中游离酶的比活性( $ESA_n$ ,  $n$ 表示游离(native)酶)按(8)式计算. GOD的ERA定义为 $ERA=ESA_i/ESA_n \times 100\%$ . 配制一系列不同浓度的  $H_2O_2$  溶液, 在溶液搅拌条件下检测 Au 电极在 0.700 V 的  $H_2O_2$  氧化电流, 绘制出  $i_{H_2O_2}-c_{H_2O_2}$  工作曲线, 求得线性回归方程为  $i_{H_2O_2}=ac_{H_2O_2}+b$ ; 在含有 10.0  $\mu g$  GOD 的 10.0 mL PBS 溶液中, 加入能使酶反应完全的葡萄糖溶液, 在溶液搅拌条件下记录 60.0 s 时的电流响应为  $i_{H_2O_2(e)}$ .

$$ESA_n=V_s c_{H_2O_2} / \Delta m_{GOD} = V_s (i_{H_2O_2(e)} - b) / (a \Delta m_{GOD}) \quad (8)$$

本文测得  $a=0.0410$ ,  $b=0.265$ ,  $V_s=10.0$  mL,  $i_{H_2O_2}=1.56$   $\mu A$ ,  $\Delta m_{GOD}=10.0$   $\mu g$ , 由此可估算出游离 GOD 的比活性  $ESA_n$  为 31.7  $kU \cdot g^{-1}$ .

由图 4 得到的相关固定酶活性数据列于表 2. 由表 2 数据可知, (1) 随金电极上 CNTs 的修饰量由 2.22  $\mu g$  增大到 5.01  $\mu g$ , 吸附酶质量由 0.850  $\mu g$  增加到 2.11  $\mu g$ , 但吸附酶的  $ESA_i$  由 0.583  $kU \cdot g^{-1}$  降低到 0.251  $kU \cdot g^{-1}$ , 其 ERA 也从 1.86% 降低到 0.79%, 且均低于原始 Au 电极上的  $ESA_i$  (1.38  $kU \cdot g^{-1}$ ) 和 ERA (4.34%), 而响应电流则相应增大(图 4), 例如对 60  $mmol \cdot L^{-1}$  的葡萄糖溶液, 响应电流由 0.86  $\mu A$  (图 4 曲线 c) 增加到 1.38  $\mu A$  (曲线 a), 裸 Au 电极上仅为 0.32  $\mu A$  (图 4 曲线 g). (2) 随金电极上镀金量由 3.04  $\mu g$  增大到 9.16  $\mu g$ , 吸附酶的  $ESA_i$  和 ERA 基本不变, 且与裸 Au 电极结果大致相同, 而响应电流则相应增大(图 4), 例如对 60  $mmol \cdot L^{-1}$  的葡萄糖溶液, 响应电流由 0.54  $\mu A$  (图 4 曲线 f) 增加到 1.01  $\mu A$  (图 4 曲线 d). (3) Au 电极上镀金后  $ESA_i$  基本保持

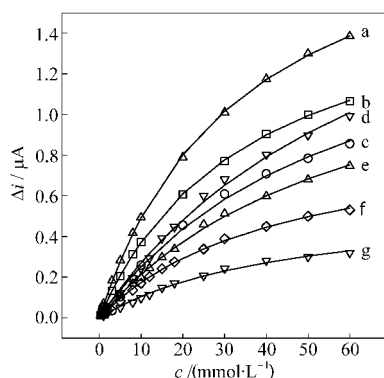


图 4 酶电极的电流-葡萄糖浓度关系曲线

**Fig.4 Current responses of enzyme electrodes as functions of glucose concentration in pH 6.86 PBS potential applied: 0.700 V (vs SCE), symbols: experimental, solid curves: fitted according to Eq.(6). The definitions for labels a-g are given in Table 2.**

不变, 说明吸附在微/纳米金颗粒上的 GOD 具有几乎不变的酶比活性. 而 CNTs 修饰的金电极上随修饰量增加而  $ESA_i$  下降, 说明 CNTs 与 GOD 发生了某种作用, 使吸附酶比活性降低, 且 CNTs 显然具有比金颗粒更小的电子导电性和不同的表面活性, 可能也相对地不利于酶反应产物  $H_2O_2$  的电化学氧化和检测. 金电极上 CNTs 修饰使固定酶量增加而酶比活性下降; 镀金修饰也使固定酶量增加, 但酶比活性保持基本不变, 我们不难从表 2 数据看出, 随 CNTs 和镀金修饰量增加, 酶电极的固定酶总活性 ( $ESA_i \times \Delta m_{GOD}$ ) 也有所增加, 故响应电流相应增大; (4) 所有 ERA 均  $< 4.5\%$ , 表明吸附后, 吸附酶确实丧失了绝大部分生物活性.

### 3 结论

本文采用 EQCI 技术监测了 GOD 在 Au、Au/Au 或 CNTs/Au 电极上 GOD 的吸附过程; 测算了吸附酶的比活性; 采用非线性拟合得到吸附酶的表现米氏常数. 结果表明, GOD 在各电极表面上均可快速吸附, 且吸附态 GOD 均有一定的酶活性; 随 CNTs 修饰量的增大, 酶吸附量和酶电极对葡萄糖的响应电流显著增大, 但  $ESA_i$  降低; 在 Au 电极上电镀金后, 酶吸附量和酶电极对葡萄糖的响应电流亦增大, 但  $ESA_i$  与裸金电极上的基本一致. 另外, 我们基于 Michaelis-Menten 动力学原始方程的非线性拟合法测算了酶的表现米氏常数, 与基于 Lineweaver-Burk 方程的常规线性回归法相比, 可得到更好的结果. 本文所提出的方法可用于其他微量酶体系相关问题的研究.

### References

- 1 Cecchet, F.; Marcaccio, M.; Margotti, M.; Paolucci, F.; Rapino, S.; Rudolf, P. *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*: 2241
- 2 Joshi, P. P.; Merchant, S. A.; Wang, Y.; Schmidtke, D. W. *Anal. Chem.*, **2005**, *77*: 3183
- 3 Shan, D.; He, Y.; Wang, S.; Xue, H.; Zheng, H. *Anal. Biochem.*, **2006**, *356*: 215
- 4 Deng, C. Y.; Li, M. R.; Xie, Q. J.; Liu, M. L.; Tan, Y. M.; Xu, X. H.; Yao, S. Z. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, *557*: 85
- 5 Li, M. R.; Deng, C. Y.; Xie, Q. J.; Yang, Y.; Yao, S. Z. *Electrochim. Acta*, **2006**, *51*: 5478
- 6 Updiks, S. J.; Hicks, G. P. *Nature*, **1967**, *214*: 986
- 7 Mandal, S.; Phadtare, S.; Sastry, M. *Current Applied Phys.*, **2005**, *5*: 118
- 8 Mashazi, P. N.; Ozoemena, K. I.; Nyokong, T. *Electrochim. Acta*,

- 2006, **52**: 177
- 9 Tang, D. P.; Yuan, R.; Chai, Y. Q. *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, **22**: 1116
- 10 Cai, C. X.; Chen, J.; Lu, T. H. *Science in China B*, **2003**, **33**: 511  
[蔡称心, 陈静, 陆天虹. 中国科学 B, **2003**, **33**:511]
- 11 Luo, G. A.; Wang, Z. H.; Wang, Y. M. Conformation and application of the bio-compatibility electrodes. Beijing: Science Press, 2006: 3-96 [罗国安, 王宗花, 王义明. 生物兼容性电极构置及应用. 北京: 科学出版社, 2006: 3-96]
- 12 Zhu, Y. N.; Peng, T. Z.; Li, J. P. *Chin. J. Anal. Chem.*, **2004**, **32**: 1299 [朱玉奴, 彭图治, 李建平. 分析化学, **2004**, **32**: 1299]
- 13 Xie, Q. J.; Zhang, Y. Y.; Xu, M. C.; Yao, S. Z. *J. Electroanal. Chem.*, **1999**, **478**: 1
- 14 Xie, Q. J.; Wang, J.; Zhou, A.; Zhang, Y. Y.; Liu, H.; Xu, Z.; Yuan, Y.; Deng, M.; Yao, S. Z. *Anal. Chem.*, **1999**, **71**: 4649
- 15 Xie, Q. J.; Xiang, C. H.; Yang, X. H.; Zhang, Y. Y.; Li, M.; Yao, S. Z. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, **533**: 213
- 16 Tu, X. M.; Xie, Q. J.; Xiang, C. H.; Zhang, Y. Y.; Yao, S. Z. *J. Phys. Chem. B*, **2005**, **109**: 4053
- 17 He, H.; Xie, Q. J.; Zhang, Y. Y.; Yao, S. Z. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2005**, **62**: 191
- 18 Li, Y. L.; Liu, M. L.; Xiang, C. H.; Xie, Q. J.; Yao, S. Z. *Thin Solid Films*, **2006**, **497**: 270
- 19 Fu, X. C. Physical chemistry. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2000: 862-866 [傅献彩. 物理化学. 第四版. 北京: 高等教育出版社, 2000: 862-866]