第 24 卷 第 1 期
2005 年 1 月

环 境 化 学
ENVIRONMENTAL CHEMISTRY

Vol. 24, No. 1
January 2005

聚苯胺修饰的辣根过氧化物酶电极的研究 *

蔡 强 * * 宋保栋 何 苗 施汉昌

(清华大学环境科学与工程系, 环境污染与模拟控制国家重点联合实验室, 北京, 100084)

摘 要 采用电化学聚合法制备聚苯胺膜, 并通过静电吸附固定辣根过氧化物酶, 形成聚苯胺修饰的辣根过氧化物酶电极. 聚苯胺在电极与酶分子之间传递电荷, 因此, 在没有额外的电子媒介体的条件下, 这种酶电极对 H_2O_2 的电流响应高达 25μA, 响应时间小于 15s. 酶电极与流动注射分析相结合构成实验系统, 可以测量 0.1mmol·l^{-1} H_2O_2, 表观米氏常数为 K_m = 9.51mmol·l^{-1}.

关键词 生物传感器, 聚苯胺, 辣根过氧化物酶, 流动注射分析.

辣根过氧化物酶 (简称 HRP, EC 1.11.1.7) 广泛用于 HRP 酶电极和以 HRP 为标记物的电化学免疫传感器, 其中, 固定化技术和电子传递效率是影响传感器性能的重要因素. 近年来, 采用电化学聚合导电高聚物膜的方法固定生物敏感分子, 这种固定化技术不仅具有重复性好、便于控制和微加工等特点, 薄膜的生物相容性优良, 膜内的电活性基团可以进行电子传递[1]. 目前已用于生物传感器的导电高聚物有聚苯胺 (简称 PAN)、聚吡咯、聚噻吩等[2~4].

本文采用两步法在 PAN 修饰电极上固定 HRP 酶, 探讨 HRP 酶电极的表征方法以及 H_2O_2 在 HRP 酶电极上的响应特性. 这种酶电极的制备、表征与分析测试方法, 同样也适用于基于 HRP 的免疫传感器[5].

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

苯胺 (Sigma 公司), HRP 酶 (Roche 公司), 聚乙烯磺酸钠盐 (PVS, Sigma 公司), 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH = 7.4), 底物溶液为邻苯二胺和过氧化氢.

CHI660A 电化学分析仪 (上海辰华仪器公司), 流动注射分析仪 (中国科学院通信所), 酶标仪 (BIORAD), 工作电极为玻碳电极 (圆盘电极, 直径 3mm), 参考电极为饱和甘汞电极 (SCE) 和 Ag/AgCl/3mol·l^{-1} KCl, 对电极为铂丝.

1.2 酶电极的电化学制备

首先用 1000 目金相砂纸研磨玻碳电极 (Φ3mm), 然后分别用 0.3μm, 0.1μm, 0.05μm 的 Al_2O_3 粉末在基板 (其中 0.3μm 和 0.1μm Al_2O_3 粉末的抛光基板为尼龙膜, 0.05μm Al_2O_3 粉末的抛光基板为绒布上抛光, 抛光后分别用去离子水和乙醇超声清洗 10min, 氮气吹干后备用.

把电极置于 0.2mol·l^{-1} 的硫酸溶液中进行循环伏安扫描, 电位范围 - 1200mV —1500mV *vs* SCE, 扫描速率为 100mV·s^{-1}.

把活化后的玻碳电极浸入含有苯胺的溶液 (0.2 mol·l^{-1} 苯胺溶于 1mol·l^{-1} HCl, 含 1%PVS) 中, 采用循环伏安法分析电极性能. 扫描电位 - 400mV —1200mV, 扫描速率为 100 mV·s^{-1}, 扫描次数 10.

将 PAN 修饰电极置于 pH 6.8 的 PBS 缓冲液中, 在恒电位 - 600mV 下还原 30min, 用超纯水漂洗数次后, 浸入含有 HRP 酶的 PBS 中, 浓度分别为 0.1mg·ml^{-1} 和 0.01mg·ml^{-1}; 恒电位 600mV, 氧化 30min.

2004 年 4 月 18 日收稿.

* 本课题由 863 (2002AA649160) 和 985 项目资助. * * 联系人, Tel: 13366152191, Email: caiq@mail.tsinghua.edu.cn

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3　酶电极的分析

采用阻抗谱分析酶在电极表面的固定量. 测量中采用 0.1mol·l^{-1} Na_2SO_4作为支持电解质，-200mV *vs* SCE，10mV 扫描峰峰值，扫描频率 0.05Hz—100kHz.

为了表征电极上的酶活性，可以在反应池中添加邻苯二胺作为共底物. 在 H_2O_2和 HRP 酶的作用下，邻苯二胺的催化产物为桔红色，这种氧化态的邻苯二胺可以采用色度法和循环伏安法进行分析. 把 HRP 酶电极放置在含 0.5mmol·l^{-1}邻苯二胺的 PBS 缓冲液中，反应 10min，取出酶电极，取 200μl 反应后的溶液置于酶标板中，用酶标仪测定 490nm 处的吸光度，对剩余溶液采用循环伏安法分析.

1.4　H_2O_2的测定

H_2O_2的测定采用流动注射分析，实验系统由恒流泵、注射阀、电化学流动池、电化学分析仪和计算机构成. 其中电化学流动池采用薄层结构，溶液通过薄层流经电极表面，薄层厚度为 1mm，容积 100μl. 流动池出液口处放置 Ag/AgCl/3mol·l^{-1} KCl 参比电极. 载流为 PBS 缓冲液，流速为 200 μl·min^{-1}，每次注射样本量为 150μl. 测量采用三电极结构，极化电位 -100mV.

2　结果与讨论

2.1　PAN 修饰电极的制备

PAN 膜在酸性溶液中电聚合形成，聚合过程中出现 A 和 B，C 和 D 两对氧化还原峰（图 1）. 这两对峰的半波电位分别是 0.13V 和 0.70V（*vs* SCE），其中 A 和 B 对应于完全还原态的 PAN 氧化为自由基正离子，C 和 D 相应于完全氧化态 PAN 的形成，电聚合溶液中掺杂 PVS 用于改善 PAN 膜的形态. 在 160 倍光学显微镜下观察，掺杂 PVS 的 PAN 膜更为致密，表面粗糙度增加，原来的苯胺粉末易于堆积形成比较厚的薄膜[7]. 电化学分析表明，由于 PVS 阻碍了导电基团的流失，掺杂 PVS 的 PAN 膜较稳定[8].

2.2　HRP 酶电极的制备与分析

HRP 酶的固定化是通过电位控制进行. 首先加还原电位，使 PAN 薄膜完全处于还原状态，在氧化过程中，加入 HRP 酶，利用蛋白质分子带负电的特性，用静电吸附的方法固定酶. 由于外部施加正电位，吸附效率高于自发吸附. 不同 HRP 酶的包被浓度影响酶电极的响应特性. 为优化固定效果，采用不同浓度的 HRP 酶包被电极，并用邻苯二胺的显色反应评估包被效果（见图 2）. 结果表明，在 HRP 酶浓度为 0.1mg·ml^{-1}时，包被效果最好.

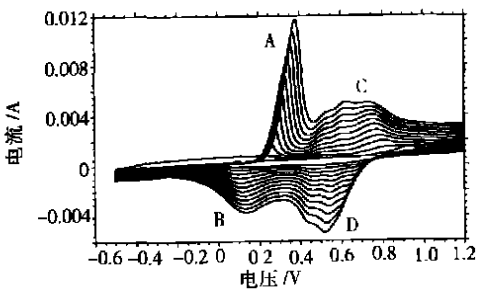

图 1　玻碳电极电聚合苯胺的循环伏安图

Fig. 1　Cyclic voltammogram of polyaniline of the glassy carbon electrode.

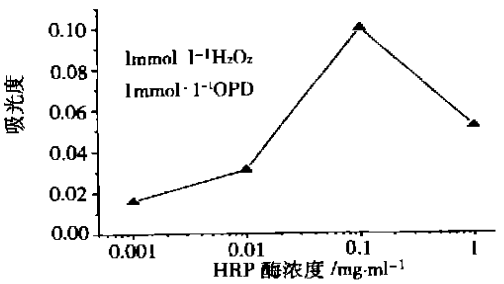

图 2　HRP 酶浓度对固定化效果的影响

Fig. 2　The Effect of HRP enzyme loading on glassy carbon electrode response

采用 0.1 mol·l^{-1} Na_2SO_4作为支持电解质进行阻抗谱分析，工作电位是 -200mV *vs* SCE，10mV 扫描峰峰值，扫描频率 0.05Hz—100kHz，阻抗谱如图 3 所示. 聚苯胺/HRP 酶电极和聚苯胺电极的阻抗谱明显不同，由于酶的静电吸附，在低频段，电极的表面阻抗由原来 $10^5\Omega$ 增加到 $10^6\Omega$，而不同的两支酶电极表面阻抗差异小于 2Ω. 结果表明，聚苯胺电极表面吸附了大量的 HRP 酶分子.

酶电极上固定化 HRP 酶的活性可以通过分析邻苯二胺的氧化还原性进行. 10mmol·l^{-1} H_2O_2 的

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

PBS 溶（扫描速率 150mV·s^{-1}）的循环伏安图，如图 4 所示，酶电极在 - 200mV 处出现邻苯二胺的氧化还原峰，还原峰电流 i_{pc} = 17.76μA，氧化峰电流 i_{pa} = 12.63μA，说明电极表面邻苯二胺的氧化态浓度高，这是 HRP 酶催化作用的结果.

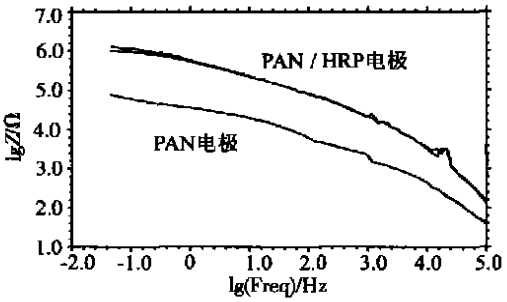

图 3 酶电极的阻抗谱

Fig. 3 Impedance spectrum of GC electrode covered by PAN and HRP

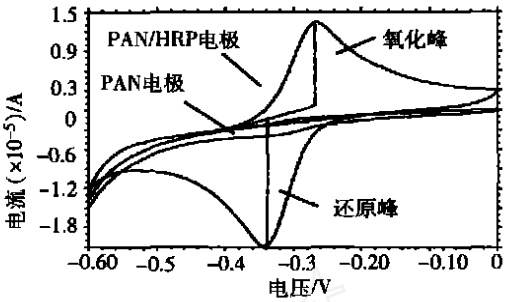

图 4 酶电极对 H_2O_2 响应的循环伏安图

Fig. 4 Cyclic voltammogram of PAN modified HRP electrode

2.3 HRP 酶电极对 H_2O_2 的响应特性

在 HRP 酶包被浓度为 0.1mg·ml^{-1}，电极对 H_2O_2 的响应特性如图 5 所示. 响应时间 < 15s，PAN/ HRP 酶电极具有快速响应能力，这是因为 PAN 膜内电活性基团的电子传递效率高. 不同包被浓度和底物浓度对酶电极的响应具有一定影响（如图 6 所示）.

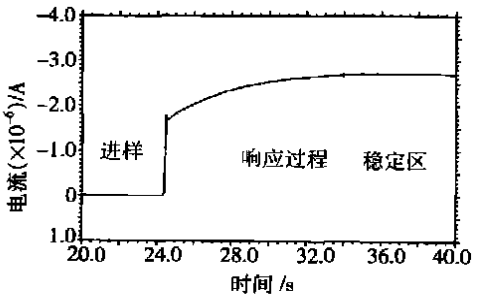

图 5 酶电极对 H_2O_2 响应的时间电流曲线

1mol·l^{-1} H_2O_2 的 PBS 溶液，- 100mV *vs* Ag/ AgCl

Fig. 5 Current response of PAN/ HRP modified electrode

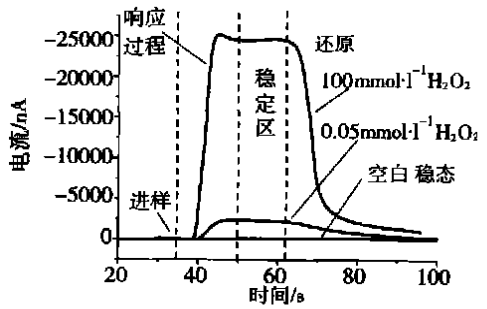

图 6 基于流动注射分析的酶电极催化电流

- 100mV *vs* Ag/ AgCl，流速 200μl·min^{-1}

Fig. 6 Flow injection analysis for determination of H_2O_2 by PAN/ HRP modified electrode

在还原电位下，根据不同的工作条件，PAN/ HRP 酶电极对 H_2O_2 的响应特性主要有四种表现：

(1) 电极表面 HRP 酶浓度高（包被浓度 0.1mg·ml^{-1}），溶液中 H_2O_2 浓度高，还原电流上升速率快（dI/dt 大），H_2O_2 在电极表面消耗迅速，电流曲线出现过冲，然后下降到平稳状态.

(2) 电极表面 HRP 酶浓度高，溶液中 H_2O_2 浓度低，还原电流上升速率慢（dI/dt 小），电流过冲减小，进一步降低 H_2O_2 浓度，电流过冲消失.

(3) 电极表面 HRP 酶浓度低（包被浓度 0.01mg·ml^{-1}），溶液中 H_2O_2 浓度高，电流缓慢增加，电流受到酶反应速率控制.

(4) 电极表面 HRP 酶浓度低，溶液中 H_2O_2 浓度低，H_2O_2 浓度低的时候，反应微弱，电流变化微弱.

酶电极对不同浓度 H_2O_2 的响应在流动注射分析系统中进行. H_2O_2 浓度为 0.1mmol·l^{-1} — 100mmol·l^{-1}. 还原电位为 - 100mV. 先通 PBS 载流，待基线稳定后，再注入 150μl 的 H_2O_2 溶液. 实验结果如图 7 所示.

根据 Michaelis - Mehten 方程的 Eadie - Hofstee 表达式：

$$I = I_{max} - K_m \frac{I}{C}$$

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

作 $I - I/C$ 图，可以得到一条直线，斜率为表观米氏常数 K_m，对图 7 (A) 的结果进行线性拟合，表观米氏常数 $K_m = 9.51\,mmol \cdot l^{-1}$. 由图 7 还可知道，酶电极的最大响应值可达到 25μA，考虑到电极直径为 3mm，单位面积的电流最大值为 88.5μA·cm^{-2}. 图 7 (B) 是 H_2O_2 浓度为米氏常数附近区域时的电流响应，酶电极的线性响应区间在 2.5—25 mmol·l^{-1}.

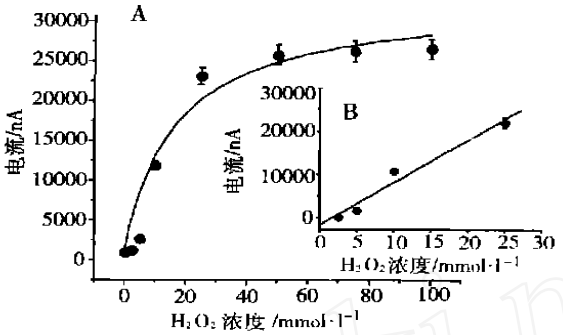

图 7　酶电极对不同浓度 H_2O_2 的响应特性

HRP 的包被浓度 0.1mg·ml^{-1}，还原电位 - 100mV *vs* Ag/AgCl

Fig. 7　Calibration curve for H_2O_2 of obtained from HRP enzyme electrode for H_2O_2

PAN/HRP 酶电极于 4 ℃条件避光保存. 保存过程中定期测量酶电极对 H_2O_2 的响应. 结果表明，酶电极 72h 后丧失 50 %活性.

3　结论

以聚苯胺修饰电极为基础的 HRP 酶电极，对 H_2O_2 响应快速，具有较高灵敏度. 结合流动注射分析，可以进行实时检测. 这种 PAN/HRP 酶电极是检测 H_2O_2 的生物传感器. 用 HRP 酶为标记物，以 ELISA 的方法试验免疫检测.

参　考　文　献

[1] Ramanaviciene A, Ramanavicius A, Application of Polypyrrole for the Creation of Immunosensors. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2002, **32** (3): 245—252

[2] Lian C, Neoh K G, Kang E T, Surface Functionalization of Polypyrrole Film with Glucose Oxidase and Viologen. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, **18**: 363—374

[3] Suan T, Nurdan P, Roberto P et al., Thick Film Sensors Based on Lactases from Different Sources Immobilized in Polyaniline Matrix. *Sensors and Actuators B*, 2004, **97**: 132—136

[4] Chistophe V, Silvia F, Canh T, Amperometric Tyrosinase Based Biosensor Using an Electrogenerated Polythiophene Film as Entrapment Support. *Talanta*, 2003, **59**: 535—544

[5] Mark P K, Miloslav P, Ciara K O et al., Novel Electrochemical Immunosensor for Seafood Toxin Analysis, *Toxicon*, 2002, **40** (9): 1267—1274

[6] Aoife M, Ailica G, Anthony J K et. al., Characterisation of Horseradish Peroxidase Immobilization on an Electrochemical Biosensor by Colormetric and Amperometric Techniques. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, **18**: 715—720

[7] 董绍俊，车广礼，谢远武，化学修饰电极. 第二版，北京：科学出版社，2003 年 2 月

[8] 查全兴，电极过程动力学导论，第三版，北京：科学出版社，2002 年 6 月

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

THE RESEARCH OF HORSERADISH PEROXIDASE ELECTRODE MODIFIED BY POLYANILINE

CAI Qiang SONG Bao-dong HE Miao SHI Han-chang
(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control,
Departmentof Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing, 100084)

ABSTRACT

This paper describes horseradish peroxidase electrode modified by polyaniline. Polyaniline film was fabricated by electrochemical deposition, and then horseradish peroxidase was immobilized by electrostatic interaction with polymer backbone. The mass of immobilized enzyme was characterized by impedance spectrum, while enzyme activity was analyzed by cyclic voltammogram. As conducting polymer, polyaniline can couple electrons directly from enzyme activity center to electrode surface. So the response of this enzyme electrode for H_2O_2 reach 25μA without additional mediators. Integrated with flow injection analysis, this biosensor can detect 0.1mmol·l^{-1} H_2O_2, while apparent Michaelis constant K_m is 9.51mmol·l^{-1}.

Keywords biosensor, polyaniline, horseradish peroxidase, flow injection analysis.

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net