

功能化金纳米修饰电极自组装及其在 固定化酶生物传感器中应用

窦博鑫¹, 辛嘉英^{1,2*}, 范洪臣¹, 王艳¹, 夏春谷²

(1. 哈尔滨商业大学 食品科学与工程重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076;

2. 中国科学院兰州化学物理研究所 羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 功能化金纳米修饰电极是化学修饰电极, 不仅具有特定功能团性能, 且能提供电化学信号, 可用于与待测物的电子传递, 电子捕获, 判定某化学反应是否发生. 功能化金纳米修饰电极检测待测物, 具有灵敏度高、检测限低及长久使用的优势. 我们就功能化金纳米修饰电极自组装制备、电化学表征方法及其在固定化酶生物传感器方面的应用研究, 进行综述报道.

关键词: 金纳米颗粒; 自组装; 生物传感器; 酶固定化

中图分类号: O643.32

文献标志码: A

纳米材料(又称“超微颗粒材料”), 指颗粒尺度为纳米数量级(直径 1 ~ 100 nm), 处在原子簇和宏观物体交接区域内的粒子, 一般为人工合成产物. 纳米粒子由于表面原子占比大, 且表面原子是既无长程序、又无短程序的非晶层, 粒子表面层的实际状态更接近于气态, 而在粒子的内部存在结晶完好、周期排布的原子. 当粒子尺寸进入纳米数量级时, 就具有许多传统固体不具有的表面效应、体积效应和久保(Kubo)效应等特性^[1-3], 特殊结构也导致纳米粒子具有独特性质. 自 80 年代纳米材料概念形成后, 受纳米粒子表面积大、表面活性中心多、吸附能力强的表面效应影响, 纳米材料在催化、电化学、传感方面、医学和生物工程和超导等诸多方面, 具有一般材料不能比拟的优异性能, 被誉为“通往 21 世纪的新材料”.

纳米粒子较高的比表面积促使微型生物传感器表面的生物分子固定量呈指数倍增长, 有效扩大了电极表面电信号; 另一方面, 由于其尺寸效应造成的表面原子配位不足、亏电子严重, 使得纳米粒子对生物大分子有很强的吸附能力, 能高效地固定生物大分子, 在设计和制备各种具有特定功能的化学传感器方面具有重要意义^[4-7]. 我们就纳米金的制

备、功能化纳米金属修饰电极的自组装、如何运用电化学方法表征以及自组装电极在酶固定化方面的应用进行了报道.

1 纳米金的制备

金属纳米颗粒(Metal nanoparticles, MNP)由于其自身具有纳米材料的特殊光学、电学及催化性质, 已得到广泛关注. 金纳米颗粒, 又称金溶胶(Au Nanoparticles, AuNPs)是指直径在 1 ~ 100 nm 之间的金微粒, 能以稳定形式存在于溶液中, 具有比表面积大、表面反应活性高、表面活性中心多、催化效率高、吸附能力强等优越性能, 是纳米金属材料中最常用的一种^[8-11].

常见的合成纳米金的方法主要有物理法、化学法及生物介导法. 生物介导合成纳米金是课题组以往的关注焦点, 适用于合成纳米金的微生物主要包括细菌、真菌、放线菌和酵母菌等, 但不同的微生物种类、代谢类型都会影响合成纳米金的粒径, 进而影响其应用领域^[12]. 张铁男等^[13]将甲基弯菌 IMV 3011 产生的具有过氧化氢还原酶活性的荧光肽甲烷氧化菌素(methanobactin, mb)与纳米技术相结合, 催化合成了纳米金, 并且通过控制 mb 浓度

收稿日期: 2016-05-21; 修回日期: 2016-06-20.

基金项目: 国家自然科学基金(21073050; 21573055)(NNSF of China(21073050; 21573055)).

作者简介: 窦博鑫(1987-), 女, 讲师, 博士生, 研究方向: 生物催化. E-mail: 394831971@qq.com(DOU Bo-xin(1987-), Female, Lecture, Doctoral student, Research Area: Biocatalysis. E-mail: 394831971@qq.com).

* 通讯联系人, E-mail: xinjiaying@yahoo.com.cn.

催化苯二酚还原 HAuCl_4 合成不同粒径的 AuNPs. 辛嘉英等^[14]研究了 mb 介导一步合成纳米金颗粒, mb 能够螯合 Au(III) , 同时将其还原成 Au(0) . 红外光谱分析 mb 静态吸附在 AuNPs 表面形成 mb-AuNPs 复合物, mb 充当保护剂阻止二次成核的发生从而制备了粒径小的、具有长期稳定性的 AuNPs 颗粒.

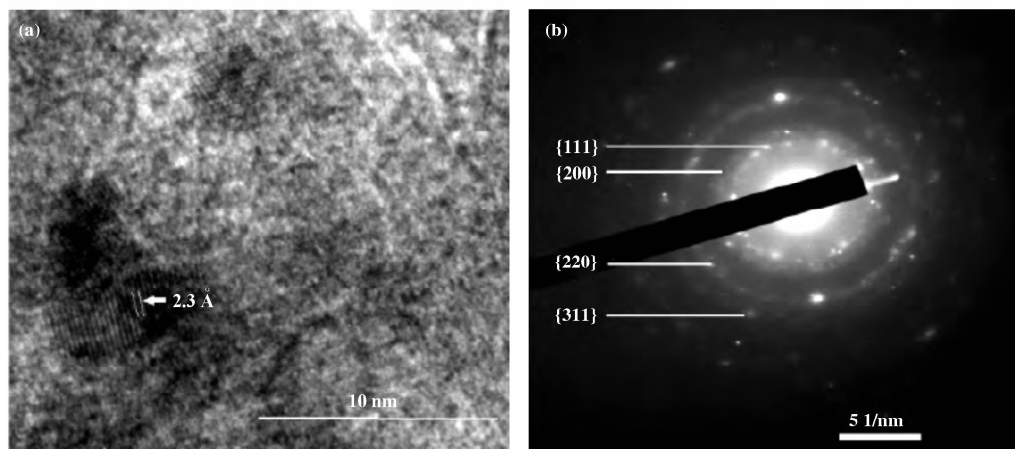


图1 AuNPs 高分辨率透射电镜图及其选区电子衍射

Fig. 1 High resolution transmission electron microscopy (HRTEM) image (a) and selected area of electron diffraction (SAED) pattern (b) of the AuNPs

然而, 近些年自组装合成 AuNPs 在医学、生物、食品领域的应用与研究逐渐增多, 我们^[13-19]在以往合成 AuNPs 研究工作的基础上, 开始研究自组装合成 AuNPs 等相关研究. 自组装技术通过分子间特殊的相互作用(例如静电吸引、氢键、疏水性缔合等), 组装成有序的高性能化和多功能化的纳米结构. 自组装过程是若干个体之间同时自发的发生关联并集合在一起, 形成紧密而有序的整体, 是一种整体的复杂的协同作用分子通过化学键作用自发吸附在固、液或气/固界面上, 形成热力学稳定和能量最低的紧密的有序的二维纳米级的超薄膜, 即为自组装膜(Self-assembled monolayers, SAMs), 如图2. 与传统的化学修饰方法相比, SAMs 有更好的稳定性和有序性, 特别是在控制由附着分子所造成的微结构和动力学性质方面有着无可比拟的优越性, 成为研究有关表面和界面各种复杂现象, 诸如膜的渗透性、摩擦、湿润、磨损、粘接、生物发酵和表面电荷分布、电子转移理论的理想模型^[20-23].

徐力等^[24]首先通过赖氨酸的氨基与金纳米粒子的作用将其固定在粒子表面, 然后过氨基酸的缩合将金纳米粒子连接成有序的纳米结构利用赖氨酸分子作为连接剂将金纳米粒子组装成有序的纳米结

构. 林凯等^[15-16]利用 Mb 原位还原制备了 1% $\text{Au}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ 催化剂, 通过 TEM 分析负载 AuNPs 粒径尺寸为 $3.48 \pm 0.881 \text{ nm}$ (图1), FTIR 分析 $\text{Au}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ 催化剂表面官能团发现具有与 Mb 一致的特征峰, 说明 Mb 既作为还原剂也充当了稳定剂而整合在 AuNPs 表面, 这是制备小粒径 AuNPs 的重要因素.

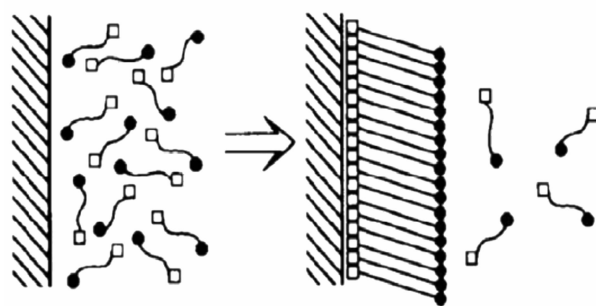


图2 自组装单层膜的紧密有序结构示意图

Fig. 2 Dense and ordered structure of the formation of SAMs

构. 透射电子显微镜观察表明形成的纳米粒子网络结构中, 相邻粒子之间的距离约为 $1.5 \mu\text{m}$, 与由两个赖氨酸缩合而成的二肽(Lys-Lys)长度相符.

Yang 等^[25]以铟锡氧化物和 AuNPs 修饰了电极, 制备了用于检测肉制品中多巴胺的生物微传感器. Huang 等^[26]以 SiO_2 玻璃片为基片, 借助溴化十六烷基三甲铵合成了高纯度的单分散性的 AuNPs, 粒径为 $20 \sim 150 \text{ nm}$.

在纳米金-DNA 自组装中, 常通过用巯基小分子(如巯基己醇 MCH)对 DNA 自组装的金进行封闭, 进而对 DNA 自组装进行优化^[27]. Salaita 等^[28]

系统地研究了 10-23 型 DNAzyme 在纳米金表面的催化活性以及组装密度、linker、固定位点等对酶活性的影响。他们发现 DNAzyme 在纳米界面上受到空间位阻及表面非特异性吸附的影响，酶活性降低。

由已发现的纳米结构自组装体系的形成要具备两个重要条件：其一，由于氢键和范德瓦耳斯键等非共价键很弱，所以要有足够的非共价键或氢键等弱键存在，才能通过协同作用构筑成稳定的纳米结构体系；其二，要求自组装体系能量低，否则很难形成稳定体系。将预处理过的基片浸泡在溶液中，经过一定的反应时间后，表面活性物质就可以在基片上形成排列致密有序的自组装膜。表面活性物质一般含有-COOH、-OH 和-NH₂ 活性基团，基片可以是非金属氧化物（如石英、玻璃等）、金属（如 Au、Ag）、金属氧化物（如 AgO、CuO）等。在成膜分子之间还存在范德华力，让所形成的膜更加致密和稳定。根据自组装成膜时的键型不同可分为：共价（或配位）自组装、氢键自组装、静电自组装，其中共价（或配位）键型自组装是研究最多的一个体系。

2 功能化金纳米修饰电极电化学界面

2.1 单分子层自组装制备金纳米修饰电极

自组装单分子层膜制备方法比较简单，只需将基体电极浸入含有适当的表面活性剂的有机溶剂中，成膜分子如硫醇在金表面进行自组装，一般约 24 h 后可形成自组装单分子膜。常见的自组装 SAMs 包括多种不同的体系：脂肪酸类在 Al₂O₃、Ag 表面的 SAMs；烃类在硅表面的 SAMs；有机硅烷衍生物在羟基化的表面的 SAMs；有机硫化合物在 Au、Ag、Cu 表面的 SAMs；醇和胺类在 Pt 表面的

SAMs；二磷酸自组装多层膜；有机锍烷类的自组装 SAMs 等，其中硫醇分子在金基底上的自组装是研究最多和最有代表性的体系。

有机硫族化合物以金属如 Au、Ag、Cu、Pt 等（尤其是 Au）为基底的自组装膜，是通过有机硫化物中硫原子与基片表面金属原子形成配位键而组成的。表面自组装单分子层修饰的金纳米粒子（Self-assembled monolayer protected gold nanoparticles, SAM-GNPs），自 1993 年 Mulvaney 和 Giersig 最早报道采用烷基硫醇在 GNPs 表面成功实现自组装以来，该方向成为金纳米粒子研究最活跃的领域之一。巯基能够跟金原子形成稳定的化学键，获得自组装单层膜紧密包裹的有序体系，比单纯的物理吸附获得的体系稳定性要高很多。

彭少华^[29]比较了自组装溶胶-凝胶酶修饰电极（SOD/Cys/sol-gel）、金溶胶自组装酶修饰电极（SOD/Cys/AuNP）和金溶胶自组装溶胶-凝胶酶多层修饰电极（SOD/Cys/AuNP/sol-gel），结果表明加入金溶胶后催化效果明显，且电极稳定性高。SOD/Cys/AuNP/sol-gel 酶电极阴阳极峰电流之比 $i_{pc}/i_{pa}=1.1$ ，阴阳极峰电位的差值 $\Delta E_p=0.24\text{ V}$ （ 100 mVs^{-1} ），式量电位为 110 mV（参比电极为饱和甘汞电极），呈现准可逆的电化学过程。电子转移速率常数 10.3 s^{-1} 。放置 60 d，活性保持 97%。2011 年，Manivannan 等^[30]结合纳米技术与自组合法，分别采用纳米金、纳米金银溶胶-凝胶对金电极进行了修饰，也得到了类似的结果。

袁若等^[31]利用自组装技术和静电吸附作用，将带正电荷的纳米金和带负电荷的血红蛋白层层自组装于 L-半胱氨酸修饰的金电极表面，制得了用于检测 H₂O₂ 的无电子媒介体的第三代电流型生物传感器（{Hb/nano-Au[⊕]}5/L-cys/gold），如图 3。此

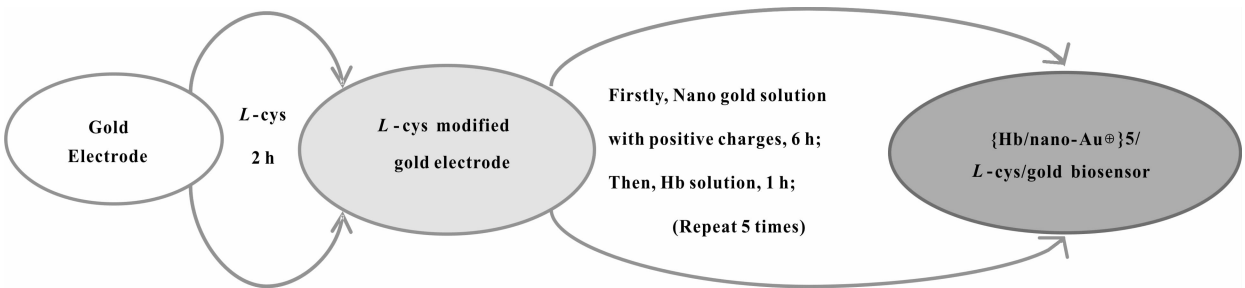


图 3 层层自组装修饰金电极制备微型生物传感器

Fig. 3 Scheme of biosensor by layer-layer self-assembly-monolayers technology to modify gold electrode

传感器提高了血红蛋白固定量,并能保持血红蛋白的生物活性,从而增强了传感器的灵敏度和稳定性,用计时电流法测得 H_2O_2 的线性范围为 $2.1 \times 10^{-8} \sim 1.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ($r=0.994$),检出限为 $1.1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$.

Cao 等^[32]将 Ru(II) 与二-(二-甲基-吡唑基)-巯基羧酸形成的配合物,层-层自组装于金电极上,可形成表面覆盖 4.15 pmol/cm^2 致密的膜,且高度有序,通过与 Ru 的可任意的配位点的配位,可用于 NO 检测. Cu 吡啶配合物也作为修饰纳米金与 Au 盘电极的连接体,以吡啶尾端巯基衍生物修饰的 Au 电极与 Cu(II) 配位,然后与混合的辛硫醇和尾端吡啶巯基衍生物自组装膜覆盖的 AuNP 相联系, Cu(II) 在这里是作为配位连接体^[33].

2.2 混合分子自组制备金纳米修饰电极

自组装单分子层与生物大分子以分子键结合,

性能稳定,生物相容性强并能抑制干扰信号.然而单一自组装分子层易造成较大的空间位阻,阻碍生物大分子的固定效率.二元混合自组装膜的二维空间结构能够显著降低电极表面固定化抗体的空间位阻,使抗体具有良好的空间分布,有助于抗体的固定,保持抗体的免疫活性^[34].

薛茜男等^[35]在纳米金溶胶溶液中加入 16-巯基十六酸和 3-巯基丙酸,纳米金颗粒表面修饰包裹二元混合自组装膜,共价键固定抗体形成生物敏感膜(图 4).修饰的自组装膜使纳米颗粒在液相中均匀分散,将纳米颗粒固化到电极表面后也能保持均匀分散,有效抑制了纳米颗粒的团聚.实现了抗体有效固定,制备了糖化血红蛋白免疫微传感器,用于同时检测血液中的糖化血红蛋白和血红蛋白含量,检测线分别为 $14 \sim 170 \text{ } \mu\text{g/L}$ 和 $167 \sim 570 \text{ } \mu\text{g/L}$.

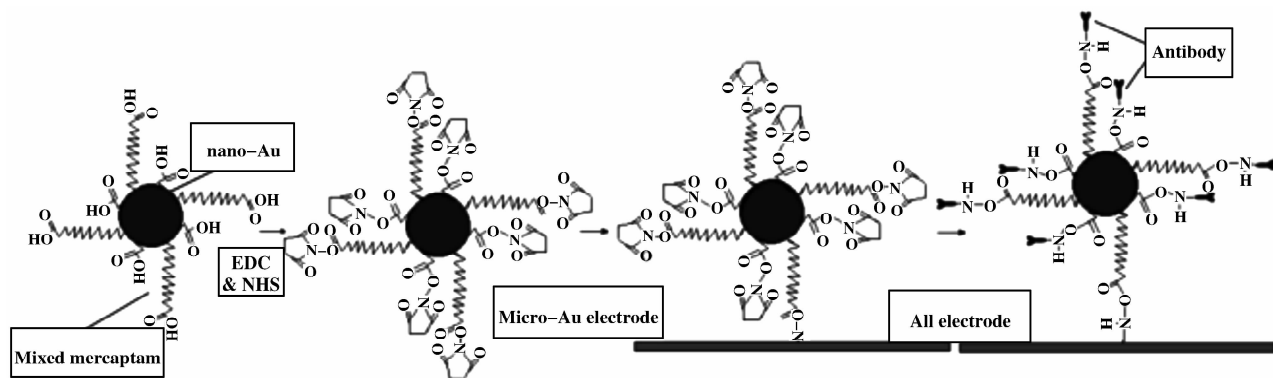


图4 混合自组制备微型金电极表面修饰过程

Fig. 4 Scheme of antibody immobilization progress by mixed self-assembly-monolayers technology

桂学琴等^[36]利用混合自组装方法,将 4,4'-二甲基巯基联苯和 1-巯基十八烷这两种不同巯基化合物修饰至金电极表面,在双巯基的另一个-SH 基团上吸附纳米金颗粒制备纳米金修饰电极,得到 MTP+C18SH/Au 电极、 MTP+TOA/Au 电极和 NG/MTP+C18SH/Au 电极.该研究发现制备出纳米金密度可控的修饰电极,并且其兼具纳米阵列电极特性.

2004 年, Su 等^[37]首先通过金-巯基的作用,在 AT 切向石英晶体的金电极表面上自组装修饰上一层 16-巯基十六烷羧酸膜,即自组装一个尾端为羧基的烷烃硫醇长链,然后用 N-羟基琥珀酰亚胺作为媒介对该膜进行活化,抗体通过酰胺键固定到电极表面.此传感器在固定抗体的数量和检测灵敏性方

面和基于蛋白固定抗体的压电免疫传感器是可以相媲美的,循环伏安法表征免疫传感器的逐步组装以及对目标菌的检测,检测范围为 $10^3 \sim 10^8 \text{ CFU/mL}$,检测时间为 $30 \sim 50 \text{ min}$.次年, Su 等^[38]在此基础上,对该传感器进行了改进和优化.

一般在纳米金表面组装的是长链巯基化合物,当长链巯基化合物在纳米金表面组装的时候可能发生弯曲、缠绕的现象;而且整个过程是通过层层自组装完成的,这些都会影响生物活性组分的固定.刘丽^[39]提出了先将纳米粒子表面组装一层短链巯基化合物的混合膜(半胱胺,巯基己醇),再将被混合膜修饰了的纳米金粒子组装到被巯基丙酸修饰的晶振金电极上,基于此方法研制了甲状腺素 T4 压电免疫传感器.

3 功能化金纳米修饰电极的表征

当在金属电极表面的制备 SAMs 时，电极预处理、固定技术、表面覆盖、表面活性电解质、溶剂以及温度等这些实验条件，均会影响功能化纳米金属修饰电极的 SAMs 电化学信号，所以控制以上这些实验条件非常重要^[20]。同时，也需要考虑配位金属离子之间的电子传递速率和机制，它们也会影响修饰电极的灵敏性。金属电极的配位化合物修饰一般分别对其进行结构表征和性能表征。

对于化学修饰电极的表征鉴定，首先要确认在电极表面上是否已介入目标功能团及其表面浓度，

然后确定表面功能团的电化学性质、结构以及状态等。即应用拉曼光谱、傅立叶变换红外光谱法能够有效地辨别功能团是否已修饰在电极上；光声光谱可对电极表面分子进行定性及定量分析；荧光光谱及紫外可见光谱可测定表面分子的浓度，特别是对染料修饰电极更有效；光电子能谱在研究表面功能团的元素、结合状态和组成分布等方面都很灵敏；电化学方法，如循环伏安法、交流伏安法、脉冲极谱法等适于研究表面电活性物质的氧化还原行为；电镜、扫描电镜等，可分别用于观察修饰过程的表面状态、结构及测定膜的电阻等。

表 1 金纳米修饰电极表面的表征方法
Table 1 Electrochemical characterizing methods of gold nanoparticle modified electrodes

Characterization	Methods	Factor research	Document
Electrochemistry	Cyclic voltammograms, call flow voltammetry, pulse polarography, chronoamperometry, quartz crystal micro balances;	Researching Long-term use of performance, Thermal stability, pH to catalytic current relationship to value oxygen biosensors; Electrochemical behavior and ability of oxygen reduction; Aaffinity of oxygen detection limit and determine nano gold.	[21]、[25]、[26]、[31 - 39]、[46-56]
	Raman spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, photoacoustic spectroscopy, fluorescence spectroscopy, uv-vis spectra, photoelectron spectroscopy;	Weather the Biological molecules modified on electrode or not; Qualitative and quantitative analysis of electrode surface molecules; Determination of the concentration of surface molecules; Surface functional groups of elements, combined with the state and composition distribution, etc.	
Electron microscope	Electron microscopy, scanning electron microscopy, atomic force microscopy;	To determine whether a microelectrode surface uniform distribution and effective fixations.	[26]、[28]、[31]、[35]

值得一提的是其他材质的电极也可以用以上方法表征修饰电极的特性。采用循环伏安法电化学聚合 PLL 修饰的 GC 电极能很好地固定 Hb 和 CPO，温度、pH 值、PLL 膜的厚度以及酶与交联剂的滴涂方式均对修饰电极性能有影响修饰电极电化学性能稳定，具有良好的耐热性，为进一步研究酶在高温条件下的催化奠定了基础^[23]。

4 基于金纳米固定化酶的生物传感器

传感器是对一种物理性质进行检测并记录，然后以某种方式作出响应的一种装置。传感器可分为三类：物理传感器、化学传感器和生物传感器^[41]。生物传感器是采用某种生物敏感元件 (Bioreceptor) 与转换器 (Transducer) 相连接包括两部分：敏感元

件和转换器^[42]. 敏感元件, 既分子识别元件, 常用的敏感元件有酶、DNA、细胞、抗体及微生物等; 转换器, 又称为换能器, 包括电化学电极、场效应

晶体管、光敏管、热敏电阻以及压电晶体等. 生物传感器可应用于大量不同的样品, 包括体液、食物样品、细胞培养物、环境样品的检测分析.

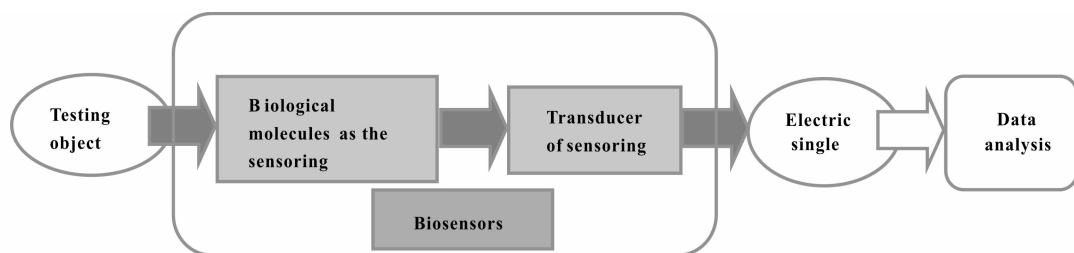


图5 电化学生物传感器结构

Fig. 5 Structure of electrochemical biosensor

绝大多数生物活性酶的氧化还原中心在分子内部, 其氧化还原中心与电极表面的距离超过了电子能以足够速率进行转移的距离, 很难在电极上实现直接电子传递. 但金属纳米颗粒可以作为电子导线, 实现酶的活性中心与电极之间的直接电子传递, 大幅度加快电子转移速率. 纳米金属固定化酶的修饰电极, 一方面研究了在界面上的生物活性酶直接电化学和电催化过程及其机理, 揭示酶某些生理功能; 另一方面也制备出具有高灵敏度和超高选择性的生物传感器及其分子器件. 纵观酶生物传感器的发展, 就是酶的固定化基质和固定化技术不断改进和完善进程.

1962年, Clark等^[43]用葡萄糖氧化酶与氧电极组合检测葡萄糖, 被认为是最早提出了酶生物传感器原理. 对于固定化酶修饰电极制备生物型传感器, 其固定的敏感元件酶主要集中在辣根过氧化物酶)、血红蛋白、过氧化氢酶及葡萄糖氧化酶等, 另外通过其他纳米材料对天然酶固定化制备生物传感器的研究也有大量报道^[44-45].

Kang等^[46]用金纳米颗粒固定辣根过氧化物酶, 将其吸附到由壳聚糖和巯基共价交联修饰的玻碳电极表面. 由于壳聚糖优异的成膜性使其在最后形成一层薄的生物敏感膜, 而金纳米颗粒的加入不仅增加了辣根过氧化物酶固定的量, 也极大地保持了酶自身的生物活性、提高了传感器对 H_2O_2 测定的灵敏度和稳定性, 最低检测限达到 5.0×10^{-8} mol/L.

此外, 固定辣根过氧化物酶的电极还可以用于检测生物指标. Bi等^[47]将一抗结合在功能化修饰过的磁性珠上, 将辣根过氧化物酶标记的二抗与纳米

金颗粒结合, 同时还引入了化学发光增强剂溴酚蓝. 实验结果表明, 改进后的方法对 α -甲胎蛋白的检测线性范围能达到 $0.1 \sim 5.0$ ng/mL ($R = 0.9997$), LOD为 0.01 ng/mL, 该结果比不使用纳米金时低了2个数量级, 而且远远低于由传统ELISA方法检测得到的结果. 袁若等^[48]等采用侧链带有磺酸根负离子的Nafion膜固定带正电荷的L-半胱氨酸, 吸附于电极表面的L-半胱氨酸的-SH吸附纳米金, 再重复吸附L-半胱氨酸和纳米金, 最后将辣根过氧化物酶吸附于纳米金表面, 通过分子自组制备出一种过氧化氢生物传感器, 用于检测 H_2O_2 .

李壮等^[49]将过氧化物酶直接在金纳米颗粒上固定化, 建立了检测奶粉和原料奶中三聚氰胺的生物传感系统; Sistani等^[50]也直接用金纳米颗粒固定化过氧化氢酶来修饰电极, 用此方法制备的 H_2O_2 传感器稳定性好, 37 d后仍具有97%的活性; 而Leili等^[51]则用氧化镁纳米颗粒和过氧化氢酶共同修饰电极, 这些报道都是将纳米技术、电化学与生物学技术相结合, 设计出更有效的过氧化氢生物传感器. 同时, 过氧化氢酶还以结合葡萄糖氧化酶的酶的活性, 用于检测葡萄糖的含量. 曲晓刚等^[52]结合金纳米颗粒的葡萄糖氧化酶样活性以及五氧化二钒纳米线的过氧化物酶样活性, 利用级联酶促反应实现了葡萄糖的含量测定.

细胞色素c常在金纳米上固定化, 研究其生物功能特性. Brown和Wang等^[53-54]研究者, 分别将金纳米自组装在半导体 SnO_2 电极上, 形成各粒子之间相互隔离的单层, 将细胞色素c吸附在金胶上, 用此电极对细胞色素C的直接电化学反应进行

了研究.

吴晓春等^[55]利用金@铂纳米棒偶联胆固醇氧化酶成功构建了胆固醇检测系统, 检测限为 30 $\mu\text{mol/L}$, 线性检测范围为 45 ~ 300 $\mu\text{mol/L}$, 异丙醇以及去垢剂 Triton X-100 对胆固醇的测定没有干扰.

金纳米也常与其他金属纳米颗粒结合, 固定化酶制备生物传感器. 金/银(Au/Ag)纳米颗粒偶联乙酰胆碱酯酶和胆碱氧化酶检测乙酰胆碱, 乙酰胆碱酯酶催化乙酰胆碱水解为胆碱和乙酸, 胆碱氧化酶催化氧气氧化胆碱并生成 H_2O_2 , Au/Ag 纳米颗粒的过氧化物酶活性催化 H_2O_2 氧化 AUR 生成带有荧光信号的产物, 荧光强度与乙酰胆碱的浓度在 1 ~ 100 nmol/L 范围内成正比^[56].

5 展望

在对活性生物酶固定化制备生物传感器的研究有很多, 都在为构建出灵敏度高和稳定性良好的传感器而不断探索, 而这两项性能也是过氧化氢生物传感器研究的重点和挑战, 固定化酶载体材料的选择则成为研究的核心. 具有良好导电和机械性能的纳米材料将更加得到研究者的青睐, 尤其以相对价廉的纳米金催化剂对 Pd 和 Pt 等传统贵金属催化剂的替代研究将成为纳米金属今后研究的重点. 仍有不少方面有待提升, 如精准控制颗粒尺寸大小及均匀程度、产业化研究以及简单、可靠和稳定的表征方法等. 这些需要多学科密切配合与协作, 逐步实现根据材料的性能和设计要求, 制备出理想稳定的生物传感器.

参考文献:

[1] a. Yaroslavov A A, Sinani V A, Efimova A A, *et al.* What is the effective charge of TGA-stabilized CdTe nanocolloids? [J] *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(20): 7322–7323.
b. Li Cao-long(李曹龙), Lei Zi-qiang(雷自强), Wang Qi-zhao(王其召), *et al.* Synthesis of $\text{TiO}_2(\text{B})$ nanobelts photocatalyst for water splitting to H_2 ($\text{TiO}_2(\text{B})$ 纳米带光催化剂的制备及分解水产氢性能) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2015, **29**(4): 382–389.
c. Zou Chong(邹冲), Dai Yong(戴勇), Fei Zhao-yang(费兆阳), *et al.* Synthesis of efficient CuO-CeO_2 catalysts in limited nanospace for HCl oxidation (限域纳米空间制备高效 HCl 氧化 CuO-CeO_2 催化剂) [J]. *J*

Mol Catal (China) (分子催化), 2015, **29**(3): 238–245.

- [2] a. Román-Velázquez C E, Noguez C, Garzón I L. Circular dichroism simulated spectra of chiral gold nanoclusters: a dipole approximation [J]. *J Phys Chem B*, 2003, **107**(44): 12035–12038.
b. Ren Hong-yan(任红艳), Liu Zheng-juan(刘郑娟), Xu Shan(许珊), *et al.* Rod-like ceria supported Pt as catalysts for methanol oxidation (棒状 CeO_2 负载 Pt 催化剂的合成及其电化学性能研究) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2015, **29**(2): 173–178.
c. Sun Fan(孙璠), Li Ze-long(李泽龙), Liu Pu(刘蒲), *et al.* Preparation of Pd nanoparticles supported on Mg-Al mixed metal oxide catalysts for one-pot synthesis imine from alcohol and primary amine (镁铝复合金属氧化物负载纳米 Pd 催化剂的制备及其在醇胺一步合成亚胺反应中的应用) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2014, **28**(5): 410–417.
- [3] Cyrille G, Thomas B. Chiral N-isobutyryl-cysteine protected gold nanoparticles: preparation, size selection, and optical activity in the UV-vis and infrared [J]. *J Amer Chem Soc*, 2006, **128**(34): 11079–11087.
- [4] Horvath U, Bentivoglio G, Hummel M, *et al.* A cytotoxic bis(carbene) gold(i) complex of ferrocenyl complexes: synthesis and structural characterisation [J]. *New J Chem*, 2008, **3**(32): 533–539.
- [5] Li Q, Li X, Yang J, *et al.* Synthesis and structural characterization of N-heterocyclic carbene silver complexes derived from N-ferrocenylmethyl-N'-(pyridylmethyl) imidazolium iodides [J]. *Polyhedron*, 2013, **59**: 29–37.
- [6] Majidi M R, Pournaghi-Azar M H, Saadati-rad A, *et al.* Simple and rapid amperometric monitoring of hydrogen peroxide at hemoglobin-modified pencil lead electrode as a novel biosensor: Application to the analysis of honey sample [J]. *Food Analy Meth*, 2014, **8**(4): 1–11.
- [7] Pournaghi-Azar M H, Ahour H, Pournaghi-Azar F. Simple and rapid amperometric monitoring of hydrogen peroxide in salivary samples of dentistry patients exploiting its electro-reduction on the modified/palladized aluminum electrode as an improved electrocatalyst [J]. *Sens & Actu B Chem*, 2010, **145**(1): 334–339.
- [8] Kang X B, Pang G C, Liang X Y, *et al.* Study on a hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase/GNPs-thionine/chitosan [J]. *Electrochim Acta*, 2012, **62**(1): 327–334.
- [9] Zhang L L, Han G Q, Liu Y, *et al.* Immobilizing haemoglobin on gold/graphene-chitosan nanocomposite as effi-

- cient hydrogen peroxide biosensor [J]. *Sens Actu B: Chem*, 2014, **197**(7): 164–171.
- [10] Sistani P, Noori A, Motlagh M F, *et al.* Manufacturing a modified carbon paste electrode with catalase enzyme-Au nanoparticles for electrochemical sensing of hydrogen peroxide and their electrocatalytic properties[J]. *Inter J Electrochem Sci*, 2014, **9**(7): 3680–3690.
- [11] Sarebanhassanabadi M. Designing a hydrogen peroxide biosensor using catalase and modified electrode with magnesium oxide nanoparticles[J]. *Inter J Electrochem Sci*, 2014, **9**: 257–271.
- [12] Zhang Lan-xuan (张兰轩), Xin Jia-ying (辛嘉英), Chen Dan-dan (陈丹丹), *et al.* Biological methods mediated synthesis of gold nanoparticles (生物法介导纳米金合成研究进展) [J]. *Chem Engin* (化学工程师), 2013, (6): 42–46.
- [13] Zhang Tie-nan (张铁男), Xin Jia-ying (辛嘉英), Zhang Xiu-feng (张秀凤), *et al.* Methanobactin-catalyzed synthesis of gold nanoparticles [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2013, **27**(2): 192–197.
- [14] Xin Jia-ying, Chen Dan-dan, Zhang Lan-xuan, *et al.* Methanobactin-mediated one-step synthesis of gold nanoparticles[J]. *Inter J Mol Sci*, 2013, **14**(11): 21676–21688.
- [15] Lin Kai (林凯), Xin Jia-ying (辛嘉英), Wang Yan (王艳), *et al.* Kinetics of D-glucose oxidation to D-gluconic acid with hydrogen peroxide over bio-reduced Au/ γ - Al_2O_3 Catalysts (生物还原制备 Au/ γ - Al_2O_3 催化葡萄糖氧化动力学研究) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2014, **28**(5): 427–435.
- [16] Lin Kai (林凯), Xin Jia-ying (辛嘉英), Chen Dan-dan (陈丹丹), *et al.* Progress of supported gold nanoparticles catalyzed oxidation of glucose [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2014, **28**(1): 89–95.
- [17] Xin J Y, Zhang L X, Chen D D, *et al.* Colorimetric detection of melamine based on Mb-mediated synthesis of gold nanoparticles[J]. *Food Chem*, 2015, **174**: 473–479.
- [18] Xin Jia-ying, Lin Kai, Wang Yan, *et al.* Methanobactin-mediated synthesis of gold nanoparticles supported over Al_2O_3 toward an efficient catalyst for glucose oxidation [J]. *J Mol Sci*, 2014, **15**(12): 21603–21620.
- [19] Xin Jia-ying, Chen Dan-dan, Zhang Lan-xuan, *et al.* Methanobactin-mediated one-step synthesis of gold nanoparticles[J]. *Inter J Mol Sci*, 2013, **14**(11): 7226–7236.
- [20] Habibi Y, Lucia L A, Rojas O J. Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications [J]. *Chem Rev*, 2010, **110**(6): 3479–3500.
- [21] He W N, Xu J T. Crystallization assisted self-assembly of semicrystalline block copolymers[J]. *Prog Pol Sci*, 2012, **37**(10): 1350–1400.
- [22] Choi D W, Do Y S, Zea C J, *et al.* Spectral and thermodynamic properties of Ag(I), Au(III), Cd(II), Co(II), Fe(III), Hg(II), Mn(II), Ni(II), Pb(II), U(IV), and Zn(II) binding by methanobactin from *M. trichosporium* OB3b [J]. *J Inorg Biochem*, 2006, **100**(12): 2150–2161.
- [23] ZHAO Wen (赵雯). Direct electrochemistry and its application for catalysis reaction of Chloroperoxidase at GC modified with SWNTs (CPO 在聚赖氨酸修饰电极上的电化学行为及其电催化研究) [D]. Shanghai: Shanghai Normal University (上海: 上海师范大学), 2010.
- [24] Xu Li (徐力), Guo Tie (郭轶), Jie Ren-guo (解仁国), *et al.* Assembly of Au Nanoparticles by Lysine2Lysine dipeptide (Lys-Lys 诱导的金纳米粒子组装) [J]. *ACTA Chim Sin* (化学学报), 2003, **61**(4): 469–472.
- [25] Yang J, Strickler J R, Gunasekaran S. Indium tin oxide-coated glass modified with reduced graphene oxide sheets and gold nanoparticles as disposable working electrodes for dopamine sensing in meat samples [J]. *Nanoscale*, 2012, **4**(4): 4594–4602.
- [26] Huang Y, Kim D H. Synthesis and self-assembly of highly monodispersed quasispherical gold nanoparticles [J]. *Langmuir*, 2011, **27**(22): 13861–13867.
- [27] Herne T M, Tarlov M J. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces [J]. *J Amer Chem Soc*, 1997, (119): 8916–8920.
- [28] Yehl K, Joshi J R, Greene B L, *et al.* Catalytic deoxyribozyme-modified nanoparticles for RNAi-independent gene regulation [J]. *ACS Nano*, 2012, (6): 9150–9157.
- [29] Peng Shao-hua (彭少华). Studies of biosensors based on superoxide dismutase (基于超氧化物歧化酶的生物传感器的研究) [D]. Suzhou: Suzhou University (苏州: 苏州大学), 2005.
- [30] Manivannan S, Ramaraj R. Polymer-embedded gold and gold/silver nanoparticle-modified electrodes and their applications in catalysis and sensors [J]. *Pure & Appl Chem*, 2011, **83**(11): 2041–2053.
- [31] Yuan Ruo (袁若), Cao Shu-rui (曹淑瑞), Cai Ya-qin (柴雅琴), *et al.* Layer-layer preparation of self-assem-

- bled film modified electrodes of hemoglobin/nanometer gold with positive charges and electric catalytic properties (血红蛋白/带正电的纳米金层层自组装膜修饰电极的制备及其电催化性能)[J]. *Sci Chin (中国科学)*, 2007, **37**(2): 170-177.
- [32] Cao R, Díaz-García A M, Cao R. Coordination compounds built on metal surfaces[J]. *Coord Chem Rev*, 2009, **253**(9/10): 1262-1275.
- [33] Chen S, Deng F. Rectifying nanoscale electron transfer by viologen moieties and hydrophobic electrolyte ions[J]. *Langmuir*, 2002, **18**(23): 8942-8948.
- [34] Youssef H, Lucia L A, Rojas O J. Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications[J]. *Chem Rev*, 2010, **110**(6): 3479-3500.
- [35] Xue Qian-nan (薛茜男), Bian Chao (边超), Tong Jian-hua (佟建华), et al. Micro biosensor antibody immobilization method based on mixed self-assembly-monolayers wrapped nano-particle (基于二元混合自组装包裹纳米颗粒的微传感器抗体固定方法)[J]. *Chin J Analy Chem*(分析化学), 2011, **39**(6): 804-808.
- [36] Gui Xue-qin (桂学琴), Wang Hai-yan (汪海燕), Wang Shi-jun (王世君), et al. The preparation and electrochemical behaviors of binary self-assembled gold nanoparticles interface (混合自组装层纳米金修饰电极制备及电化学行为)[J]. *J Anhui Univer Nat Sci Ed*(安徽大学学报(自然科学版)), 2006, **30**(5): 69-73.
- [37] Su X, Li Y. A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Bios Bioele*, 2004, **19**: 563-574.
- [38] Su X, Li Y. A QCM immunosensor for *Salmonella* detection with simultaneous measurements of resonant frequency and motional resistance[J]. *Bios Bioele*, 2005, **21**: 840-848.
- [39] Liu Li (刘丽). The research on piezoelectric immunosensors based on mixed self-assembled and hyperbranched polymers (基于混合自组装和超支化化合物膜的压电免疫传感器)[D]. Changsha: Hunan University (长沙: 湖南大学), 2007.
- [40] Shi Wen-bing (石文兵). Development of nanoparticle mimic enzyme-based analytical methods and applications (基于纳米微粒模拟酶的光分析方法构建及其应用研究)[D]. Chongqing: Southwest University (重庆: 西南大学), 2011.
- [41] Anthony P F T. Biosensors: sense and sensibility[J]. *Chem Soc Rev*, 2013, **42**(8): 3184-3196.
- [42] Mohanty S P, Kougiannos E. Biosensors: a tutorial review[J]. *IEEE Pote*, 2006, **25**(2): 35-40.
- [43] Clark L C, Sachs G. Bioelectrodes for tissue metabolism[J]. *Anna New York Acad Sci*, 1968, **148**(1): 133-153.
- [44] Wang Y L, Guan Y P, Yang Y, et al. Enhancing the stability of immobilized catalase on activated carbon with gelatin encapsulation[J]. *J Appl Poly Sci*, 2013, **130**(3): 1498-1502.
- [45] Wang Y L, Li T Y, Zhang W J, et al. A hydrogen peroxide biosensor with high stability based on gelatin-multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode[J]. *J Sol Sta Electrochem*, 2014, **18**(7): 1981-1987.
- [46] Kang X B, Pang G C, Liang X Y, et al. Study on a hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase/GNPs-thionine/chitosan[J]. *Electrochim Acta*, 2012, **62**(1): 327-334.
- [47] Bi S, Yan Y M, Yang X Y, et al. Gold nanolabels for new enhanced chemiluminescence immunoassay of α -fetoprotein based on magnetic beads[J]. *Chem Eur J*, 2009, **15**(18): 4704-4709.
- [48] Li Xue-lian (黎雪莲), Yuan Ruo (袁若), Chai Ya-qin (柴雅琴), et al. Hydrogen peroxide biosensor with HRP immobilized on a layer-by-layered L-cysteine / Au film with Nafion as a matrix (基于Nafion/双层L-半胱氨酸-纳米金固定辣根过氧化氢酶的生物传感器[J]. *Chem Sen* (化学传感器), 2005, **25**(3): 21-25.
- [49] Ni P, Dai H, Wang Y, et al. Visual detection of melamine based on the peroxidase-like activity enhancement of bare gold nanoparticles[J]. *Bios Bioele*, 2014, **60**(1): 286-291.
- [50] Parisa Sistani, Akram Noori, Masoom F M, et al. Manufacturing a modified carbon paste electrode with catalase enzyme-Au nanoparticles for electrochemical sensing of hydrogen peroxide and their electrocatalytic properties[J]. *Inter Jo Electrochem Sci*, 2014, **9**(7): 3680-3690.
- [51] Leili A M, Bahareh S, Rezvan B, et al. Designing a hydrogen peroxide biosensor using catalase and modified electrode with magnesium oxide nanoparticles[J]. *Inter J Electrochem Sci*, 2014, **9**: 257-271.
- [52] Qu K, Shi P, Ren J, et al. Nanocomposite incorporating V_2O_5 nanowires and gold nanoparticles for mimicking an enzyme cascade reaction and its application in the detection of biomolecules[J]. *Chem Eur J*, 2014, **20**(24): 7501-7506.
- [53] Brown K R, Fox A P, Natan M J. Morphology-dependent electrochemistry of cytochrome c Au colloid-modified

- SnO₂ electrodes [J]. *Amer Chem Soc*, 1996, **118**(5): 1154–1157.
- [54] Wang F, Hu S. Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles [J]. *Microchim Acta*, 2009, **165**(1): 1–22.
- [55] Liu J, Hu X, Hou S, *et al.* Au@Pt core/shell nanorods with peroxidase- and ascorbate oxidase-like activities for improved detection of glucose [J]. *Sens Act B-Chem*, 2012, **166/167**(6): 708–714.
- [56] Wang C, Chen W, Chang H. Enzyme mimics of Au/Ag nanoparticles for fluorescent detection of acetylcholine [J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(22): 9706–9712.

Functional Self-assembly Gold Nanoparticle Modified Electrodes and Application in the Field of Biosensors with Enzyme Immobilization

DOU Bo-xin¹, XIN Jia-ying^{1, 2 *}, FAN Hong-chen¹, WANG Yan¹, XIA Chun-gu²

(1. *Key Laboratory for Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, Heilongjiang province, China;*

2. *State Key Laboratory for Oxo Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, Gansu province, China)*

Abstract: Functional gold nanoparticle modified electrode is a kind of chemical modified electrodes, which not only has the function of a particular group's performances, but also can provide electrochemical signals. Functional gold nanoparticle modified electrode can be used for electron transfer of the object under test and electron capture, so as to determine whether a chemical reaction occurs or not. Currently, functional gold nanoparticle modified electrodes have advantages to detect objects, such as high sensitivity, low detection limit and can be used for a long time. In the paper, the self-assembly preparation of functional gold nanoparticle electrodes, electrochemical characterizing methods and properties are listed. In addition, its applications in the field of enzyme immobilization are also reviewed.

Key words: gold nanoparticles; self-assembly; biosensor; enzyme immobilization