酶促水凝胶的合成及生物传感应用研究进展

苗向阳^{1,3*}, 潘佳³, 朱倩¹, 朱皓雨¹, 韦天香^{2*}

1. 苏州健雄职业技术学院生物医药学院, 太仓 215411

2. 南京师范大学环境学院, 南京 210023

3. 南京师范大学化学与材料科学学院, 南京 210023

*通讯作者, E-mail: jsnjxiazhi@163.com; weitian_xiang@126.com

收稿日期: 2020-12-18; 接受日期: 2021-02-02; 网络版发表日期: 2021-06-24

国家自然科学基金(编号: 21705079, 22074064)和江苏省自然科学基金(编号: BK20171033)资助项目

摘要 近年来, 聚合物基水凝胶材料已经成为一种独特的修饰材料, 为新型生物传感器的设计提供了新思路. 酶具有特异性高、毒性低、催化效率高等良好特性, 已被用于催化聚合各种新型水凝胶. 本文综述了几种酶促水凝胶的合成方法及其在细胞代谢物、组织工程、伤口愈合和癌症监测等方面的潜在应用, 并对基于酶促水凝胶反应的生物传感器的制备与应用进行了总结与展望.

关键词 水凝胶, 酶促聚合, 生物传感, 酶固定化, 生物分子检测

1 引言

水凝胶是具有三维交联结构的生物高分子材料^[1], 能够吸收大量的水和生物液体^[2]. 20世纪60年代, 科学家研制出一种生物用的疏水凝胶^[3], 此后水凝胶的研发和应用潜力逐渐引起人们的广泛关注. 在众多化学反应中, 酶是一种底物特异性高、选择性高、低毒性的生物催化剂^[4], 能够在温和的条件下(温度、常压、中性等)参与化学反应^[5]. 因此, 近年来许多基于酶促催化合成水凝胶聚合的新策略被提出.

由于水凝胶具有很多优良特性: 黏度可调节性、对外界刺激(pH、温度、光、磁场等)的高敏感性、可防污性、可结合各种生物受体^[6-9], 其生物传感的应用成为近年来的研究热点. 水凝胶生物传感器主要有以下两种类型来检测生物变化^[10,11]: (1) 直接固定靶向分

子的功能化水凝胶生物传感器, 其膨胀特性随特定的生物相互作用而改变(图1); (2) 共价结合生物受体的水凝胶生物传感器, 通过不同的抗体-抗原相互作用来检测不同生物分子(图2).

酶促聚合水凝胶结合了水凝胶与酶的优良特性, 且合成条件温和、操作简单、成胶时间快速可控^[12,13]. 开发酶促水凝胶生物传感器, 可应用于现场诊断、环境监测和食品分析, 可为按需制造诊断系统提供极大的帮助, 对生产下一代先进、灵活、便携、性能优良的生物传感器具有重要意义^[14,15].

本文介绍了酶促聚合水凝胶的合成方式、水凝胶的酶促策略, 讨论了酶促聚合水凝胶的表面修饰策略、聚合物性质对生物传感器性能的影响, 以及酶促聚合水凝胶与不同传感器联合用于检测多种分析物的应用. 通过生物传感领域应用实例, 分析了酶促聚合水

引用格式: Miao X, Pan J, Zhu Q, Zhu H, Wei T. Synthesis of enzymatic hydrogels and their application in biosensors. *Sci Sin Chim*, 2021, 51: 919–931, doi: 10.1360/SSC-2020-0231

图1 被分析物与功能化水凝胶之间的相互作用导致其构象的变化^[10] (网络版彩图)

Figure 1 The interaction between the analyte and the functionalized hydrogel leads to its conformational changes^[10] (color online).

图2 受体分子在水凝胶中的共价结合及检测原理图^[11] (网络版彩图)

Figure 2 Covalent binding of receptor molecules in hydrogels and its detection principle^[11] (color online).

凝胶的优点和局限性。最后对酶促聚合水凝胶在生物传感领域的挑战和前景进行了分析和展望。

2 凝胶化及酶促聚合反应

聚合物在水中通过物理或化学交联形成水凝胶^[16,17]。物理交联的水凝胶通常是由聚合物间的非共价相互作用形成,包括范德华力/静电力/偶极-偶极力、氢键、 π 物理键或聚合物的内部交联;而化学交联的水凝胶在聚合物单体间生成稳定的共价键,因此具有较高的机械强度^[18]。

共价交联水凝胶可由多种化学和酶交联剂合成^[19],如 β -二酮类、丙烯酸酯类、丙烯酰胺类化学交联剂和过氧化物酶、漆酶、酪氨酸酶等酶交联剂。影响凝胶合成的因素包括体系温度、pH、光、溶剂和离子强度等,最终的凝胶特性通常取决于引发自聚合的方法,即凝胶化动力学,通常较慢反应速率下形成的凝胶更均匀且具有更好的力学性能。通过添加无机酸或强碱来调节pH可促进凝胶快速形成,过程中pH的

变化会导致凝胶剂溶解度的降低,所以反应液与强酸或强碱的混合过程也会影响凝胶的均匀形成^[20]。光催化凝胶的快速形成成为改变交联密度以及选择性地结合生物分子提供了一种新的方法,但光引发剂的毒性、光照射使细胞活性降低、不同透光率使凝胶结构和厚度差异显著等缺陷限制了其进一步应用^[21,22]。酶促凝胶的聚合不仅可以在温和的反应条件下通过调节大分子组成来控制凝胶化,还可以通过调节酶动力学来控制凝胶化^[23]。

酶由长链多肽折叠而成,可在温和条件下缓慢催化生化反应。在典型的酶催化过程中,酶的几个氨基酸残基与底物的结合,可促进酶底物复合物的形成,生成稳定过渡态降低反应的活化能。底物的结合和酶底物复合物的形成通常是催化反应的先决条件,而酶的折叠状三维结构是其与底物结合的关键,保证了超分子的协同作用,并提供固定的结合空间位点^[24]。酶促聚合生成的水凝胶通常是无毒的、不影响酶活性,且聚合速率可以通过酶和底物的界面扩散来调节^[25,26]。1951年就有学者通过聚甲基丙烯酸甲酯的合成,报道了第一个酶促聚合反应的例子。然而,直到20世纪90年代,人们才进一步研究了酶促聚合。酶促聚合具有以下3个优点:(1)反应条件温和;(2)立体、区域和化学选择性高;(3)采用无毒、环保的天然催化剂^[27]。总之,酶促聚合是一种具有高化学选择性、区域选择性和立体选择性的环境友好型高分子合成方法^[28]。

3 酶促水凝胶的合成

水凝胶的物理化学性质(溶胀、机械强度和降解)取决于所用聚合物链的合成条件、交联密度、孔隙率、类型和分子量。水凝胶可由多种天然生物聚合物或合成聚合物制备,大多数天然水凝胶具有可调节的生物降解性、高生物相容性、可利用性、易于加工以及模仿组织细胞外基质的能力。但在其加工过程中由于天然交联的丢失、体内降解速度快、难以修饰和调控等缺陷,导致天然水凝胶的力学性能较差^[29~32]。相比之下,具有各种优良物理化学性质的合成水凝胶很容易大量生产。因此,通过酶促高分子的聚合,开发具有特性更优良、使用寿命更长、高生物相容性、可控生物降解性、低毒等特点的新型水凝胶成为许多研究者关注的重点。

3.1 有机聚合物水凝胶

过氧化物酶和漆酶等因在酶促循环体系中能产生自由基, 可用于许多单体的聚合, 从而生产各类新型水凝胶. 辣根过氧化物酶促体系一直是近年来学者们的研究热点. Wei等^[33]报道了一种双模模拟策略, 通过一种基于HRP/H₂O₂促进单型硫脲儿茶素(TU-Cat)凝胶聚合的酶促交联策略, 制备了具有理想性能的可注射改性水凝胶黏合剂. 极少量的氨基酸残基与TU-Cat进行功能化结合, 生成可注射明胶生物聚合物(Gel-TU-Cat), 可在温和、生物相容性良好的条件下快速愈合生物组织(图3). 这种新型双模模拟策略使可注射水凝胶在细胞传递和组织修复中具有巨大的应用潜力.

Chang等^[21]通过HRP/H₂O₂催化激活硫代聚(乙二醇)巯基(PEG)水凝胶的聚合反应, 使用小振幅振荡剪切(SAOS)将凝胶动力学作为一个反应函数来量化, 从而监测水凝胶的黏弹性质的变化. 这种方法量化了凝胶点发生的时间间隔. 此外, 这种交联反应不仅使左旋半胱氨酸快速分离细胞进行逆转(图4), 而且可以使用SAOS监测水凝胶的溶解速率.

Nguyen等^[22]基于HRP/H₂O₂酶促体系从两组去冰片烯大分子单体中制备了模块化水凝胶. 以双半胱氨酸为交联剂, 经酶促和正交聚合形成水凝胶, 通过在肽交联物上添加酪氨酸残基发现凝胶效率显著提高, 这些额外的酪氨酸残基在HRP诱导凝胶化后仍然可以用于酪氨酸酶介导的二次交联, 动态地增加了水凝胶的硬度. 此外, 本研究还发现水凝胶在动态三维细胞培养中表现出良好的细胞相容性, 酶促巯基去冰片烯凝胶体系为制备静态和动态交联的水凝胶提供了一种新的交联机制(图5).

Wang等^[34]在不加H₂O₂的情况下, 由HRP和乙酰丙

图3 TU-Cat凝胶的形成及相关的相互作用^[33] (网络版彩图)

Figure 3 Formation of TU-Cat gel and related interactions^[33] (color online).

酮(ACAC)引发丙烯酰胺(AM)聚合成聚丙烯酰胺(PMA)水凝胶. 实验证明ACAC/H₂O₂无法引发聚合, 说明HRP在水凝胶形成中的不可替代性. HRP是以Fe为中心的原卟啉环结构, 经部分结构分裂发生氧化还原反应后可产生两种自由基引发聚合反应. 这一发现与现有文献的结论不一致, HRP/ACAC的循环酶促机制有待进一步研究(图6).

此外, Liu等^[19]基于超分子复合物的动态组装/拆卸特性和聚吡咯(PPy)的导电特性, 开发了自修复和导

图4 PEG水凝胶的合成及降解原理图^[21] (网络版彩图)

Figure 4 Schematic diagram of synthesis and degradation of PEG hydrogel^[21] (color online).

图5 HRP/H₂O₂诱导巯基生成及巯基-去冰片烯交联的原理图^[22] (网络版彩图)

Figure 5 Schematic diagram of sulfhydryl formation and sulfhydryl norbornene crosslinking induced by HRP/H₂O₂^[22] (color online).

图6 HRP引发体系中中间体形成的循环机制^[34] (网络版彩图)

Figure 6 Cyclic mechanism of intermediate formation in HRP initiation system^[34] (color online).

电的丝素蛋白(SF)基水凝胶. 以过硫酸铵为氧化剂, 漆酶为催化剂, 吡咯原位聚合沉积PPy. PPy包覆的水凝胶为高弹体, 并显示出优异的电性能, 电导率可调范围从 0.8 ± 0.2 到 $(1.0 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$. 本研究显示水凝胶作为柔性自愈电极材料在电化学领域具有潜在的应用可能(图7).

German等^[35]用葡萄糖氧化酶(GOx)促进苯胺单体进行聚合, 制备了聚苯胺(PANI)纳米粒子水凝胶(图8), 并研究了苯胺和GOx浓度以及聚合时间对聚苯胺纳米颗粒形成的影响. 聚合溶液的紫外/可见光谱在325和436 nm处出现吸收峰. 利用吸光度在436 nm处的增加来监测PANI的变化. 聚苯胺纳米颗粒形成的最佳时间为100~115 h, 延长聚合时间并不会提高聚合效率. 在含有 0.50 mol L^{-1} 苯胺和 0.75 mg mL^{-1} GOx的溶液中, PANI纳米颗粒的产率最高.

3.2 DNA水凝胶

DNA水凝胶具有天然的生物相容性和生物降解性, 是一种极具应用前景的生物材料. Dehne等^[36]报道了一种基于RNA聚合和降解的酶促反应使微米级DNA包被胶体聚集成形结构的新方法. 该方法用T7聚合酶合成RNA聚合链, 诱导微米级胶体颗粒的特异性聚合, 用双链DNA序列作为RNA聚合链的模板链. 胶体的解体通过核糖核酸酶促反应实现, 一旦与DNA混合, 就会快速降解RNA聚合链. 基于RNA聚合酶促进合成RNA链及核糖核酸酶促进RNA链分解的竞争反应来控制胶体的聚合过程, 此方法不需要外部刺激, 通过调节酶的局部活性, 可实现对胶体凝聚和分解的定向时空控制(图9).

Xiang等^[37]提出了一种利用酶促DNA聚合实现DNA水凝胶的自组装的多功能、经济高效的新策略. X型DNA基序被末端转移酶(TdT)拉长形成构建块, 每两个构建块之间通过互补的TdT酶促DNA聚合链形成凝胶. TdT酶促聚合大大降低了原始DNA基序的需求量, 构建块的杂交介导交联使凝胶具有较高的机械强度, 形成的水凝胶具有酶促反应特性, 可用于蛋白质载体的包封和可控释放. 通过此通用的方法使类过氧化物酶的DNA酶与DNA基序结合, 本研究构建了功能性的DNA酶水凝胶. 此外, 还通过将葡萄糖氧化酶、半乳糖苷酶与DNA酶水凝胶结合, 构建了多级酶促反应系统. 这种高效的级联反应不仅为肉眼检测葡萄糖/

乳糖提供了一种潜在的方法, 而且为构建多酶或酶/DNA酶混合系统提供了有潜力的模块化平台(图10).

3.3 酶解交联水凝胶

Beer等^[38]利用纤维二糖水解酶(CBH)对壳聚糖(CTS)进行解聚, 使CTS的平均分子量(M_w)从140下降至15 kDa, 脱乙酰度(DD%)从91.3%下降到16%. 低聚

图7 基于SF的水凝胶网络结构示意图^[19] (网络版彩图)

Figure 7 Schematic diagram of hydrogel network structure based on SF [19] (color online).

图8 过氧化氢在酶促反应中引发聚苯胺形成的原理图^[35] (网络版彩图)

Figure 8 Schematic diagram of polyaniline formation induced by hydrogen peroxide in the enzymatic reaction [35] (color online).

图9 酶促DNA凝胶的合成与分解原理图^[36] (网络版彩图)

Figure 9 Synthesis and decomposition principle of enzymatic DNA gel [36] (color online).

图 10 (a) 酶促DNA水凝胶的形成; (b) 类过氧化物酶的DNA酶水凝胶、双酶级联、三酶级联原理图; (c) 三酶级联反应的激活^[37] (网络版彩图)

Figure 10 (a) Enzyme DNA hydrogel formation. (b) Schematic diagram of peroxidase-like DNA enzyme hydrogel, two-enzyme cascade and three-enzyme cascade. (c) Activation of the three-enzyme cascade^[37] (color online).

后的CTS完全溶于水, 与木质素磺酸盐混溶不会形成团聚体。

在木质素磺酸盐-CTS混合物中引入漆酶, 可导致木质素活性苯氧基氧化, 这些苯氧基与CTS-NH₂活性基团交联, 导致分子量从20 kDa增加到>500 kDa, 黏度从20 mPa增加到>500 mPa, 形成稳定的木质素交联水凝胶, 其断裂伸长率为111%, 拉伸强度为7 MPa, 在食品和生物医药工业中具备潜在应用(图11)。

对比有机聚合水凝胶和DNA凝胶, 木质素交联壳聚糖水凝胶是一种新型的全酶解水凝胶, 生物相容性更优、稳定性更强, 为拓展水凝胶绿色高效的合成方式提供了新思路。

4 酶促水凝胶在生物传感中的应用

生物传感系统一般由两个基本元件组成, 一个用于生物分子识别, 另一个用于信号读出。为了寻找高选择性识别、操作方便的信号转导途径用于敏感的目标生物标志物检测, 人们对生物传感器的研究日益深入。在信号读出技术中, 电化学方法具有灵敏度高、响应速度快、操作简单、制造成本低等先天优势^[39]。

将酶促聚合应用于生物传感器, 进行相应的条件优化后可提高其灵敏度和选择性。利用多酶系统开发传感器, 提高了酶的稳定性、降低了酶的成本。通过寻找合适的酶标志物, 开发超灵敏的生物传感器、检

图 11 酶交联CTS水凝胶的力学性能研究: 不同增塑剂对酶交联CTS水凝胶的拉力(a), 拉伸强度(b)和断裂伸长率(c)的影响^[38] (网络版彩图)

Figure 11 Study on the mechanical properties of enzyme crosslinked CTS hydrogel: effects of different plasticizers on (a) tensile force, (b) tensile strength and (c) elongation at break of CTS hydrogel^[38] (color online).

测超低浓度的生物标志物, 为生物医学的进步提供了高效快捷的新理念。同时也可以精准地检测出DNA/RNA, 这类人体中含量极低的生物标志物, 为疾病的诊断提供了更多的可能性。除此以外, 基于酶促聚合检测无机汞离子传感器和检测人尿液中的酶生物传感器都是目前最新的研究成果。

4.1 在生物传感条件优化中的应用

尽管生物传感器的发展取得了许多进展, 但为了提高其灵敏度和选择性, 需要新的生物传感器制备策略。近年来, 一些对酶促合成聚合物凝胶的生物性能研究为构建此类生物传感器提供了新思路。

Krikstolaityte等^[40]提出了一种绿色友好的酶促反应合成导电聚合物聚噻吩(PTP)的方法, 并成功应用于氧化石墨烯基电极动力学参数的调整。GOx是一种高效的催化剂, 在中性pH条件下与葡萄糖反应生成过氧化氢, 促进了噻吩的氧化聚合反应, 从而在氧化石墨烯棒电极(GRE)上形成了酶促PTP凝胶(图12)。该实验用原子力显微镜对氧化石墨烯和PTP凝胶修饰的GRE电极的表面形貌进行了表征, 结果表明, 随着聚合反应时间的延长, GOx/PTP改性GRE的表观动力学Michaelis常

图 12 用PTP凝胶修饰GRE电极原理图^[40] (网络版彩图)

Figure 12 Schematic diagram of modified GRE electrode with PTP gel^[40] (color online).

数增大. 因此, 酶促聚合可以应用于生物传感器设计中对氧化石墨烯基电极的Michaelis常数等动力学参数的调整.

Lucas等^[41]描述了一种适用于研制三明治型葡萄糖生物传感器的酶基质的分析和优化方法. GOx与黏蛋白和白蛋白混合, 然后与戊二醛交联反应形成夹在聚碳酸酯的两层膜之间的水凝胶, 即本研究中的酶基质, 并通过模拟结果与实验数据相比较, 确定了制备生物传感器所需的最大酶量. 该生物传感器对葡萄糖的检测性能良好, 平均响应时间为 35 ± 5 s, 且灵敏度高、稳定性好、再现性好、生产成本低. 但这种生物传感器的准确性可能会受到电话性干扰的影响, 这种干扰通常存在于样品中, 如血液或血清. 因此在未来的工作中讨论生物传感器在真实样品中的响应很有必要.

4.2 在酶固定化生物传感中的应用

小型生物酶生物传感器是近年来迅速发展起来的一种新型传感器, 广泛应用于精细化工、药物、生物治疗、生物燃料等领域. 利用多酶系统开发传感器具有提高酶的稳定性、降低酶的成本、不需要复杂的纯化过程就可以实现酶的重复利用等优点, 在各个领域都具有很大的应用潜力^[42]. 聚合物水凝胶膜在生物相容性、酶的吸收能力、热稳定性以及环境友好性方面都有显著优势^[43]. 该水凝胶材料可以在温和的条件下形成, 不需要使用潜在的有毒光引发剂或化学交联剂, 还可以为酶和电极等多种识别物种提供相对稳定的宿主环境, 特别适合于一些生物活性分子的固定. 近年来, 利用酶促水凝胶固定酶制备生物传感器受到了广泛的关注^[44].

Ma等^[44]构建了一种基于超分子水凝胶复合材料

合成的过氧化氢生物传感器, 并通过循环伏安法对包裹酶的电催化行为进行了评估. 因为辣根过氧化物酶(HRP)是制备酶基传感器的有效酶生物受体, 聚苯胺纳米颗粒具有良好的电化学活性, 本研究用一种两亲性三嵌段共聚物作为分散剂制得含有聚苯胺纳米粒子的稳定悬浮液, 然后在含有 α -环糊精与过氧化物酶的溶剂中合成超分子凝胶. 用该凝胶成功制备出对过氧化氢具有快速电流响应的安培生物传感器. 此外, 还研究了聚苯胺纳米粒子的含量对凝胶化时间、凝胶强度和循环伏安行为的影响.

Yang等^[42]报道了一种基于原位乙酰胆碱酯酶(AChE)介导的海藻酸盐水凝胶化和酶包封法的新型毛细管电泳一体化固定化酶反应器(CE-integrated IMER). 具有蛋盒结构的海藻酸盐通过改变溶胶溶液的pH在毛细管中释放 Ca^{2+} , 同时AChE催化水解反应生成乙酸, 从而促进海藻酸盐的凝胶化(图13). 随着水凝胶的形成, 溶液中的黄嘌呤氧化酶被有效包裹, 形成CE-integrated IMERs, 而不需要其他操作过程. 溶胶混合物中约68%的原酶被封装, 表明CE-integrated IMERs具有较高的负载能力, 并通过乙酰化酶催化反应成功地应用于苹果汁样品中有机磷农药的检测, 验证了该方法的可行性. 此方法是一种简单、高效、通用的固定化酶毛细管电泳测定法, 可广泛应用于生物分析.

Erfkamp等^[43]提出了一种基于聚丙烯酸-甲基丙烯酸二甲胺乙酯水凝胶和脲酶功能化水凝胶体系. 由于酶促反应, 导致pH敏感的水凝胶在依赖尿素浓度的情况下膨胀, 在1~20 mM范围内具有较高的灵敏度. 由于水凝胶体系可重复膨胀, 传感器可以多次循环使用. 酶功能化水凝胶具有良好的长期稳定性, 在8周内不会失去任何酶活性, 对尿素具有较高的选择性, 在0.5~2 kU mL⁻¹范围内, 溶胀行为基本一致. 被应用于传感装置, 膨胀产生的压力由压阻传感器测量.

Hasanah等^[45]研制了一种以果胶水凝胶膜为酶固定化基质, 以脂肪酶为催化剂检测甘油三酯(TGs)的光学生物传感器. 脂肪酶催化TGs释放氢离子的酶促反应体系会导致pH变化, 从而使凝胶中发色团质子化从粉红色变为蓝色(图14). 在磷酸盐缓冲液浓度为50 mM、pH为7、酶为60 g的条件下, TG生物传感器具有最佳的检测条件和灵敏度. 该生物传感器在甘油三酯浓度范围为100~400 mg dL⁻¹的工作条件中, 灵敏

图 13 乙酰胆碱酯酶介导的海藻酸盐凝胶化及其检测原理图^[42] (网络版彩图)

Figure 13 Acetylcholinesterase-mediated alginate gelation and its detection principle diagram ^[42] (color online).

图 14 甘油三酯光生物传感器构建原理图^[45] (网络版彩图)

Figure 14 Schematic diagram of the construction of a triglyceride photobiosensor ^[45] (color online).

度为 $0.001 \text{ (}\Delta A \text{ (mg dL}^{-1}\text{))}$, 5 min后生物传感器响应稳定, 检测限为 15 mg dL^{-1} , 相对标准偏差(RSD)为2.5%, 使用寿命为15天. 该研究使用基于光学计算的生物传感器来测定甘油三酯, 对后续的研究工作具有一定的启发意义.

4.3 在酶标志物生物传感中的应用

一些典型生物标志物的检测(如DNA)在癌症、传染病、遗传病等疾病的早期诊断和预后方面意义重大, 近年来由于生物标志物传感器具有良好的灵活性、快速的移植性和易于集成等优点^[39], 其研究越来越受到人们的重视. 然而, 各种生物标志物在人体中浓度非常低^[46], 这大大阻碍了很多实验室检测方法在真实样本中的进一步应用. 因此, 开发超灵敏的生物传感器来检测非常低浓度的生物标记物非常迫切.

Li等^[47]通过在脲酶功能化水凝胶表面埋入规则的二维聚苯乙烯阵列, 研制了一种无标签脲酶偶联胶体晶体水凝胶(UCCH)生物传感器, 用于脲酶抑制剂苯磷

酸二甲酯(PPD)的视觉监测. 当UCCH膜浸泡在尿素溶液中, 酶催化过程中产生铵根和碳酸氢根, 这些离子减少了水凝胶主链羧基之间的静电斥力, 减小了UCCH体积, 导致衍射波长出现明显的蓝移. 脲酶抑制剂一旦与尿素在水溶液中共存, 就会抑制尿素的水解, 降低波长蓝移程度. UCCH的体积变化也会改变德拜衍射环的直径, 因此可以通过测量德拜衍射环的直径来实现尿素和PPD的监测(图15), 尿素和PPD的检测限分别为 1 mM 和 5.8 nM . 此外, 由于UCCH膜的生物相容性和结构稳定性, 此UCCH生物传感器对尿素具有良好的选择性和重现性.

Ye等^[48]建立了一种无模板的酶促聚合法制备纳米铜粒子(Cu NPs)的方法, 并将其成功应用于多核苷酸激酶(PNK)的检测. 在存在2'-脱氧胸腺嘧啶-5'-三磷酸(dTTP)时, 末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)可以直接催化短寡核苷酸片段的5'-3'延伸形成聚胸腺嘧啶序列. 由于 Cu^{2+} 与胸腺嘧啶的相互作用, 在合成的DNA序列上可形成27个强红色荧光铜纳米颗粒, 在 600 nm 处有最大荧光发射强度. 为探究此方法的实际应用, 多核苷酸激酶(PNK)因其在DNA损伤修复、复制和重组中的重要作用而被选为靶点, 本研究提出了PNK检测策略. 在PNK存在的情况下, 底物DNA的 $3'\text{PO}_3$ 变为OH引发聚合, 从而促进Cu NPs的形成. 而在没有PNK的情况下, 端部为 $3'\text{PO}_3$ 的DNA底物处于钝化状态, 不会发生聚合反应. 本研究中, 当TdT的浓度为 10 U 时, 获得最佳的传感性能, 得到最大的荧光信号(图16).

He等^[49]提出了一种测定赭曲霉毒素A (OTA)的荧光方法. OTA与其适配体的相互作用可引起结构变化, 进而改变酶解生成的聚胸腺嘧啶包覆的铜纳米颗粒(Cu NPs)的荧光(激发/发射最大值为 $360/625 \text{ nm}$). 将OTA结合适配体固定在磁珠上, 当它与OTA结合时会有部分被释放, 并暴露一个带有部分互补DNA链(cDNA)的区域. 磁选分离后, cDNA作为引物触发末端脱氧核苷酸转移酶介导的聚合. 这个过程产生了聚胸腺嘧啶, 它作为合成Cu NPs的模板(图17). 该方法对OTA的检测限为 2.0 nM , 并成功应用于掺入稀释红酒中OTA的测定. 由于TdT介导的聚合物可以直接放大信号, 聚(胸腺嘧啶)-Cu NPs应用于小分子物质检测, 不仅操作简单, 超灵敏性也奠定了代替其他适配体检测靶标的潜力.

Wang等^[50]报道了一种基于末端脱氧核苷酸转移

图 15 UCCH 生物传感器检测尿素和脲酶抑制剂原理图^[47] (网络版彩图)

Figure 15 Schematic diagram of UCCH biosensor for detecting urea and urease inhibitors [47] (color online).

图 16 Cu NPs的合成及其PNK检测应用原理图^[48] (网络版彩图)

Figure 16 The synthesis of Cu NPs and the schematic diagram of its PNK detection application [48] (color online).

图 17 基于OTA适配体和TdT介导超长聚胸腺嘧啶转换的Cu NPs的OTA荧光测定示意图^[49] (网络版彩图)

Figure 17 Schematic diagram of OTA fluorescence determination based on OTA aptamer and TdT-mediated ultralong polythymidine conversion Cu NPs [49] (color online).

酶(TdT)的不依赖于模板的聚合活性, 结合含 Mg^{2+} 的DNA酶和氯化高铁血红素/G-螺旋DNA酶的级联反应, 简便、快速、灵敏地观察黄瓜绿色斑点花叶病毒的视觉检测方法. 该方法用限制性酶将杂交DNA在其5'-AA CG TT-3'位点切成两段, 较长的新生片段在其3'终端被鸟苷酸尾连, 形成了含 Mg^{2+} 的DNA酶完整的酶序

列. 发夹探针(HP)环段底物序列与新生酶序列杂交, 在 Mg^{2+} 存在下裂解成两部分. 在HP的茎段释放锁定的G-螺旋序列, 在过氧化氢存在下催化ABTS²⁻的氧化, 使溶液变成绿色(图18). 在0.1 pm~2 nM范围内, 得到了该片段的吸光度与浓度的相关性, 检出限为0.1 pM. 该方法不仅具有较低的检测限和较短的监测时间, 而且对单核苷酸或双核苷酸的变化也有很好的选择性. 因此, 此策略为病毒检测和植物保护提供了快速、高效的平台.

Li等^[51]基于近距离结扎法结合双酶切修复扩增法(BERA), 建立了一种用于超灵敏、高特异性检测三磷酸腺苷(ATP)的荧光检测新方法(图19). 该策略借助聚合酶和两个DNA修复酶(尿嘧啶-DNA糖基化酶(UDG)

图 18 末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)辅助扩增策略在黄瓜绿斑花叶病毒视觉检测中的应用原理图^[50] (网络版彩图)

Figure 18 Schematic diagram of the application of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assisted amplification strategy in the visual detection of cucumber green mottle mosaic virus [50] (color online).

图 19 基于近端双向酶修复扩增的ATP荧光检测原理图^[51] (网络版彩图)

Figure 19 Schematic diagram of ATP fluorescence detection based on proximal two-way enzyme repair amplification [51] (color online).

和核酸内切酶IV)启动双向循环酶修复放大反应. 基于放大策略, 该生物传感器对ATP检测具有良好的灵敏度和选择性, 检测限为0.81 pM. 本研究通过同时提高目标响应信号值和减少非特异性背景, 扣除背景效应, 具有较高的灵敏度和重现性. 此外, 该传感器在实际样品分析中也显示出良好的应用前景. 因此, 近距离启动的BERA策略确实为ATP识别、相关疾病诊断和生物医学研究创造了简单而有价值的荧光感应平台.

4.4 在DNA/RNA标志物生物传感中的应用

DNA和RNA是重要的生物标志物, 可用于遗传疾病的早期诊断和预后, 而人体中存在的DNA/RNA生物标志物水平非常微量, 使大多数实验室方法难于在真实样本中进行进一步的应用. 因此, 开发超灵敏的生物传感器来检测极低丰度的DNA/RNA生物标记物是非常必要的. Chen等^[46]提出了一种基于末端脱氧核糖核酸转移酶(TdTase)促凝胶聚合的新型电化学DNA生物传感器. 该传感器将目标DNA在均相溶液中聚合, 然后在基于牛血清蛋白的DNA载体平台上与DNA探针杂交, 其检测背景几乎不受所使用的TdTase的干扰, 大大提高了该传感器的检测性能(图20).

Wan等^[52]提出了一种基于纳米探针引发的酶聚合(NIEP)策略的E-DNA传感器. 在该传感器中, DNA捕获探针的3'-末端被硫化并固定在金电极上, 纳米探针由5'-巯基末端的DNA信号探针偶联金纳米颗粒(Au NPs)制成. 两种探针都可以同时与目标DNA杂交, 形成三明治结构, 然后末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)催化3'-末端DNA自由基在纳米探针上聚合(图21). 在DNA延伸过程中, 生物素标签与酶促生成的长链DNA结合, 使抗生物素蛋白与修饰过的HRP产生特异性结合, 同时HRP催化过氧化氢的还原, 使其电化学信号急剧增加. 该传感器的检测限为10 fM, 并能很好地识别单碱基不匹配的目标. 本研究为超敏和选择性检测目标DNA提供了一种新方法, 且可以应用于复杂样品如血清的检测. 该方法在疾病相关DNA、miRNA和疾病相关蛋白的现场和即时定量测试中的应用有待研究者进一步开发.

Wu等^[53]基于双发夹分子信标(DHMB)研制了一种无标签比色等温级联放大技术, 用于第12密码子K-Ras点突变的超敏特异性检测. 该生物传感器由DHMB探针和引物聚合模板(PPT)组成, PPT设计部分

为DHMB的补充物. 在聚合酶存在下, 设计靶DNA通过促进PPT与DHMB的杂交, 触发链置换扩增(SDA), 然后启动级联扩增过程. 在杂交和酶促反应过程中, 生成氯化高铁血红素/G-螺旋DNA酶, 催化氧化ABTS²⁻(图22). 利用所提出的简便比色方案, 目标DNA可以定量到4 pM, 动态响应范围为5个数量级, 该方法大大提高了检测能力. 此外, K-Ras基因的点突变可以很容易地用肉眼观察到, 不需要标签或昂贵的设备. 由于

图 20 基于TdTase的电化学DNA传感器工作原理图^[46] (网络版彩图)

Figure 20 Working principle diagram of electrochemical DNA sensor based on TdTase ^[46] (color online).

图 21 基于NIEP的E-DNA生物传感原理^[52] (网络版彩图)

Figure 21 Principle of E-DNA biosensing based on NIEP ^[52] (color online).

图 22 基于双发夹分子信标(DHMB)的比色生物传感器用于K-Ras DNA扩增检测的原理图^[53] (网络版彩图)

Figure 22 Schematic diagram of a colorimetric biosensor based on double hairpin molecular beacons (DHMB) for K-Ras DNA amplification detection ^[53] (color online).

K-Ras分析的高性能,与DHMB的双发夹结构相关的转导能力的增强为筛选生物标志物提供了新的途径,此比色生物传感器在遗传疾病的诊断应用中有很大的希望。

Zhao等^[54]开发了一种基于金纳米颗粒(GNPs)的链转移扩增反应检测癌症抑制基因(p53)的新技术。该方法使用FAM标记的发夹探针(HPP)与GNP约束的链结杂交,且FAM标记的绿色荧光被GNPs淬灭。在p53基因存在的情况下,它会与HPP杂交,从而导致荧光恢复。然后引物与打开的HPP杂交,诱导聚合/置换反应,从而使杂交的p53基因被释放,反过来与另一个HPP在GNPs表面杂交,引发新一轮杂交/酶聚合/置换反应,并产生一个大大放大的信号(图23)。该方法被称为GNP-HPP法,可将目标DNA(p53)定量至1.6 pM,并在5 pM~1 nM的浓度范围内产生线性响应。此外,p53突变基因可以很容易地从野生型基因中区分出来,且具有灵敏度高、选择性好、背景信号低的特点。

Kumar等^[55]报道了一种基于单宁酸HRP加速聚合的新方法,并成功进行了生物活性小分子的电化学检测应用。该研究以HRP为催化剂,催化单宁酸(TA)的聚合反应,并利用p(TA)作为生物分子在不同电极表面的共价固定平台,可实现p(TA)的电化学氧化及与生物分子的氧化偶联反应(图24)。此外,作者还使用这种方法连接叶酸来捕获癌细胞,同时证明了p(TA)修饰表面增强的电催化活性可以用于同时电化学测定具有重要生物活性的电活性分子,如抗坏血酸、多巴胺和尿酸。此HRP催化的TA聚合和基于p(TA)的表面修饰方法为构建生物分子共价附着的多功能平台和开发灵敏的电化学传感器提供了简单、新颖的框架。

4.5 在其他生物传感中的应用

在总结上述基于酶促凝聚反应的生物传感在修饰电极、固定化酶、检测生物标志物的应用外,还有研究者研发了两种具有创新性应用的生物传感器,分别是基于酶促凝聚检测无机汞离子和基于酶促凝胶降解检测人尿液中的酶生物传感器。Mei等^[56]通过高选择性表面酶促聚合反应耦合胸腺嘧啶-Hg²⁺-胸腺嘧啶碱基对(T-Hg²⁺-T),设计了一个新型无机汞离子生物传感器,并将其成功应用于饮用水的分析。首先巯基标记的DNA捕获探针在金电极上共价结合,然后溶液中的Hg²⁺使DNA发生杂交,互补的DNA被捕获到生物传感

器表面,接着末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)催化含有生物素化的2'-脱氧腺苷5'-三磷酸的脱氧核苷酸。该生物素与附着了大量功能化银纳米粒子的链霉亲和素结合,从而产生电化学信号,达到电化学检测氯化钾溶液中汞离子的目的(图25)。利用T-Hg²⁺-T的选择性和酶促凝胶聚合放大电化学信号,具有扩增效率高、选择

图23 基于金纳米粒子作为淬灭源的p53基因检测GNP-HPP传感系统原理图^[54](网络版彩图)

Figure 23 Schematic diagram of the GNP-HPP sensing system for p53 gene detection based on gold nanoparticles as the quenching source ^[54] (color online).

图24 酶促单宁酸聚合及其修饰多种电极表面应用原理图^[55](网络版彩图)

Figure 24 Schematic diagram of enzymatic Tannin polymerization and its modification on the surface of various electrodes ^[55] (color online).

图25 汞离子生物传感器的制备原理和酶促凝胶聚合信号放大策略^[56](网络版彩图)

Figure 25 Preparation principle of mercury ion biosensor and signal amplification strategy of enzymatic gel polymerization ^[56] (color online).

性高、非特异性吸附低、背景信号低的特点. 用这种分析方法构建的生物传感器可以有效检测水中的 Hg^{2+} , 线性范围为 $0.05\sim 100\text{ nM}$, 检出限为 0.024 nM . 本研究为真实样品中低水平汞离子的检测提供了有效的方法.

Li等^[57]制备了以电子天平为读出器、水凝胶为载体的透明质酸酶生物传感器, 并成功应用于人类尿液样本中透明质酸酶(HAase)的检测. 在以聚四氟乙烯(Pt@SiO_2)纳米粒子(NPs)嵌入聚乙烯亚胺(PEI)和透明质酸(HA)构建的水凝胶中, HAase的存在可以催化HA降解, 水凝胶被分解, 从而释放了水凝胶中的 Pt@SiO_2 NPs. Pt@SiO_2 NPs在一个排水装置中与过氧化氢溶液混合, 催化过氧化氢分解产生氧气和水, 由于氧气在水中溶解度较低, 使装置中的压力增强, 内外产生压差使一定量的水从中流出, 流入试管中收集, 用电子秤称量即可(图26). 产物水的质量与HAase的浓度在 $1\sim 60\text{ U mL}^{-1}$ (120 min 酶解时间)和 $0.2\sim 10\text{ U mL}^{-1}$ (240 min 酶解时

间)范围内呈良好的线性关系. 本研究利用电子天平高精度地检测了排水装置产生和放大的信号重量, 增加酶解时间和催化时间可以提高其灵敏度, 检测过程方便, 用户友好. 本研究报道了在没有背景信号的水凝胶生物传感器中, 使用电子天平作为读数器来检测人类尿液样本中的HAase. 该新型生物传感器巧妙地将水凝胶的酶促降解与低成本、准确的电子天平结合起来, 为发展中地区更广泛地检测某些生物标志物提供了新思路.

表1中列举了6种酶促水凝胶生物传感器的性能, 展示了较高的灵敏度、良好的选择性和重现性等优异性能.

5 总结与展望

迄今为止, 各种基于水凝胶的化学传感器和生物传感器已经可通过合适的固定化/封装/交联方法将不同的纳米材料或生物分子加入到聚合物基质中. 可产生化学信号的合成水凝胶具有良好的三维膨胀性、可渗透性, 与不同溶胀介质间几乎不产生相互作用, 对不同生物分子具有极佳的固定能力, 这些特性都表明它们在未来生物传感器制造中具有巨大应用潜力.

本文综述了近10年来酶促凝胶反应的具体应用, 经研究发现, 虽然水凝胶的生物传感器研究已经趋于深入, 但酶促凝胶合成与生物传感相结合的技术是近5年才发展起来的. 基于HRP/ H_2O_2 酶促凝胶体系, 已有学者开发了可实现实时控制凝胶凝聚与分解的技术, 合成了可用于愈合生物组织、构建多酶级联系统、制备柔性自愈电极材料等功能性水凝胶, 但酶促凝胶动力学与循环酶促机制还有待进一步研究.

图 26 检测HAase的水凝胶生物传感器原理图^[57] (网络版彩图)

Figure 26 Schematic diagram of the hydrogel biosensor for HAase detection ^[57] (color online).

表 1 6种酶促水凝胶生物传感器性能比较

Table 1 Performance comparison of six kinds of enzymatic hydrogel biosensors

生物酶类型	聚合方式	检测物质	检出限	性能
TdT ^[52]	纳米探针	DNA	10 fM	适合复杂样品
脲酶 ^[47]	物理嵌入	尿素	1 mM	良好的生物相容性、选择性和重现性
		PPD	5.8 nM	
	TdT介导 ^[49]	OTA	2.0 nM	直接放大信号
TdT	无模版酶促聚合 ^[48]	PNK	600 nM	性价比高、通用性强
	酶序列杂交 ^[50]	黄瓜绿色斑点花叶病毒	0.1 pM	监测时间短、良好的选择性
UDG和核酸内切酶IV ^[51]	双向酶修复扩增	ATP	0.81 pM	灵敏度高、操作简单

此外, 酶促凝胶聚合修饰电极还能调整电极动力学参数, 与不同生物分子结合后能选择性地检测目标分析物, 如葡萄糖、尿酸、脲酶抑制剂、透明质酸酶、甘油三酯、DNA, 开发这些酶促合成的可响应水

凝胶在现场诊断、环境监测和食品分析中的应用, 将为按需制造诊断系统提供极大的帮助, 对生产下一代先进、灵活、便携、传感性能优良的生物电子器件具有重要意义。

参考文献

- 1 Peppas N, Hilt J, Khademhosseini A, Langer R. *Adv Mater*, 2006, 18: 1365–1360
- 2 Bhatia M, Rajulapati SB, Sonawane S, Girdhar A. *Sci Rep*, 2017, 7: 16413
- 3 Hasanzadeh M, Shadjou N, de la Guardia M. *TrAC Trends Anal Chem*, 2018, 102: 210–224
- 4 Wang H, Gu H, Chen Z, Shang L, Zhao Z, Gu Z, Zhao Y. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 12914–12918
- 5 Decarpigny C, Bleta R, Ponchel A, Monflier E. *ACS Appl Bio Mater*, 2019, 2: 5568–5581
- 6 Gao F, Teng H, Song J, Xu G, Luo X. *Anal Methods*, 2020, 12: 604–610
- 7 George SM, Tandon S, Kandasubramanian B. *ACS Omega*, 2020, 5: 2060–2068
- 8 Manickam P, Vashist A, Madhu S, Sadasivam M, Sakthivel A, Kaushik A, Nair M. *Bioelectrochemistry*, 2020, 131: 107373
- 9 Shi Q, Liu H, Tang D, Li Y, Li XJ, Xu F. *NPG Asia Mater*, 2019, 11: 64
- 10 Culver HR, Clegg JR, Peppas NA. *Acc Chem Res*, 2017, 50: 170–178
- 11 Qin J, Li X, Cao L, Du S, Wang W, Yao SQ. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 417–423
- 12 Lee S, Lee Y, Kim EM, Nam KW, Choi I. *ACS Appl Polym Mater*, 2020, 2: 362–350
- 13 Nele V, Schutt CE, Wojciechowski JP, Kit-Anan W, Douth JJ, Armstrong JPK, Stevens MM. *Adv Mater*, 2020, 32: 1905914
- 14 Mirabelli V, Majidi Salehi S, Angiolillo L, Belviso BD, Conte A, Del Nobile MA, Di Profio G, Caliendo R. *Glob Challenges*, 2018, 2: 1700089
- 15 Kobayashi Y, Kohara K, Kiuchi Y, Onoda H, Shoji O, Yamaguchi H. *Chem Commun*, 2020, 56: 6723–6726
- 16 Zhao L, Ma Z. *Anal Chim Acta*, 2018, 997: 60–66
- 17 Wei P, Chen T, Chen G, Liu H, Mugaanire IT, Hou K, Zhu M. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 3068–3079
- 18 Liu Z, Wei J, Faraj Y, Ju XJ, Xie R, Wang W, Chu LY. *Can J Chem Eng*, 2018, 96: 2100–2114
- 19 Liu L, Han Y, Lv S. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 20394–20403
- 20 Xia B, Zhang Y, Zhu Q, Lin X, Wu Q. *Biomacromolecules*, 2019, 20: 3584–3591
- 21 Chang RSH, Lee JCW, Pedron S, Harley BAC, Rogers SA. *Biomacromolecules*, 2019, 20: 2198–2206
- 22 Nguyen HD, Liu HY, Hudson BN, Lin CC. *ACS Biomater Sci Eng*, 2019, 5: 1247–1256
- 23 Song Z, Fu H, Baumgartner R, Zhu L, Shih KC, Xia Y, Zheng X, Yin L, Chipot C, Lin Y, Cheng J. *Nat Commun*, 2019, 10: 5470
- 24 Pan H, Zheng B, Shen H, Qi M, Shang Y, Wu C, Zhu R, Cheng L, Wang Q. *Chem Commun*, 2020, 56: 3657–3660
- 25 Permana D, Minamihata K, Sato R, Wakabayashi R, Goto M, Kamiya N. *ACS Omega*, 2020, 5: 5160–5169
- 26 Kohri M. *Polym J*, 2014, 46: 373–380
- 27 Wang P, Qi C, Yu Y, Yuan J, Cui L, Tang G, Wang Q, Fan X. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 177: 472–485
- 28 Panja S, Adams DJ. *Chem Commun*, 2019, 55: 47–50
- 29 Ooi HW, Hafeez S, van Blitterswijk CA, Moroni L, Baker MB. *Mater Horiz*, 2017, 4: 1020–1040
- 30 Ozcelik B. *Biosynth Polym Med Appl*, 2016, doi: 10.1016/B978-1-78242-105-4.00007-9
- 31 Chai Q, Jiao Y, Yu X. *Gels*, 2017, 3: 6
- 32 Vadala ML, Thompson MS, Ashworth MA, Lin Y, Vadala TP, Ragheb R, Riffle JS. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 1035–1043
- 33 Wei K, Senturk B, Matter MT, Wu X, Herrmann IK, Rottmar M, Toncelli C. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 47707–47719
- 34 Wang W, Fan X, Wang Q, Xu J, Wang L, Liu L, Bao X. *New J Chem*, 2020, 44: 194–199
- 35 German N, Popov A, Ramanaviciene A, Ramanavicius A. *Polymer*, 2017, 115: 211–216
- 36 Dehne H, Reitenbach A, Bausch AR. *Sci Rep*, 2019, 9: 1–9
- 37 Xiang B, He K, Zhu R, Liu Z, Zeng S, Huang Y, Nie Z, Yao S. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 22801–22807
- 38 Beer B, Bartolome MJ, Berndorfer L, Bochmann G, Guebitz GM, Nyanhongo GS. *Int J Biol Macromol*, 2020, 161: 1440–1446

- 39 Zhao J, Shu D, Ma Z. *Biosens Bioelectron*, 2019, 127: 161–166
- 40 Krikstolaityte V, Kuliesius J, Ramanaviciene A, Mikoliunaite L, Kausaite-Minkstiniene A, Oztekin Y, Ramanavicius A. *Polymer*, 2014, 55: 1613–1620
- 41 Colombo L, Baruzzi AM, Garay FS. *Sens Actuat B-Chem*, 2015, 211: 125–130
- 42 Yang J, Hu X, Xu J, Liu X, Yang L. *Anal Chem*, 2018, 90: 4071–4078
- 43 Erfkamp J, Guenther M, Gerlach G. *Sensors*, 2019, 19: 2858
- 44 Ma D, Zhang LM. *Mater Sci Eng-C*, 2013, 33: 2632–2638
- 45 Hasanah U, Sani NDM, Heng LY, Idroes R, Safitri E. *Biosensors*, 2019, 9: 135
- 46 Chen J, Liu Z, Peng H, Zheng Y, Lin Z, Liu A, Chen W, Lin X. *Biosens Bioelectron*, 2017, 98: 365–369
- 47 Li G, Xiao F, Liao S, Chen Q, Zhou J, Wu Z, Yu R. *Sens Actuat B-Chem*, 2018, 277: 591–597
- 48 Ye T, Li C, Su C, Ji X, Zheng J, Tinnefeld P, He Z. *Chem Commun*, 2015, 51: 8644–8647
- 49 He Y, Tian F, Zhou J, Jiao B. *Microchim Acta*, 2019, 186: 199
- 50 Wang Y, Liu J, Zhou H. *Sensors*, 2019, 19: 1298
- 51 Li S, Liu S, Wang J, Zhao Y, Zhang R, Qu X, Wang Y, Huang J, Yu J. *Anal Chim Acta*, 2020, 1104: 156–163
- 52 Wan Y, Wang P, Su Y, Wang L, Pan D, Aldalbahi A, Yang S, Zuo X. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 25618–25623
- 53 Wu D, Xu H, Shi H, Li W, Sun M, Wu ZS. *Anal Chim Acta*, 2017, 957: 55–62
- 54 Zhao W, Li H, Tang Y, Liu M, Wang S, Yu R. *Microchim Acta*, 2019, 186: 517
- 55 Kumar S, Haque AMJ, Sabaté Del Río J, Gautam S, Cho YK. *Biosens Bioelectron*, 2019, 127: 50–56
- 56 Mei C, Lin D, Fan C, Liu A, Wang S, Wang J. *Biosens Bioelectron*, 2016, 80: 105–110
- 57 Li Z, Tang C, Huang D, Qin W, Luo F, Wang J, Guo L, Qiu B, Lin Z. *Anal Chem*, 2019, 91: 11821–11826

Synthesis of enzymatic hydrogels and their application in biosensors

Xiangyang Miao^{1,3*}, Jia Pan³, Qian Zhu¹, Haoyu Zhu¹, Tianxiang Wei^{2*}

¹ Department of Medical Science and Technology, Suzhou Chien-shiung Institute of Technology, Taicang 215411, China

² School of Environment, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China

³ School of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China

*Corresponding authors (email: jsnjxiazhi@163.com; weitian_xiang@126.com)

Abstract: In recent years, polymer-based hydrogels have become the unique electrode modification material, which provides a new idea for the design of new biosensors. Furthermore, enzymes have been used to catalyze the polymerization of various hydrogels due to their high specificity, low toxicity and high catalytic efficiency. In this paper, we discussed several synthesis methods of enzymatic hydrogels and their potential application in cell metabolites, tissue engineering, wound healing, and cancer surveillance. Concluding remarks and future prospects regarding preparation and application of biosensor based on enzymatic gel reaction were provided at the end.

Keywords: hydrogel, enzymatic polymerization, biosensor, enzyme immobilization, biomolecular detection

doi: [10.1360/SSC-2020-0231](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0231)