

介孔二氧化硅薄膜固定乙酰胆碱酯酶生物传感器

张学骛^①, 贾红辉^①, 王晓峰^①, 张海良^①, 尹红伟^①, 常胜利^①, 王建方^②, 吴文健^②

① 国防科技大学理学院, 长沙 410073;

② 国防科技大学航天与材料工程学院, 长沙 410073

E-mail: xazhang@nudt.edu.cn

2008-10-24 收稿, 2009-03-25 接受

国防科技大学校预研项目资助(批准号: JC08-02-08)

摘要 酸性条件下, 以表面活性剂 F127 为模板剂, 正硅酸乙酯和 3-氨丙基三乙氧基硅烷为硅源, 在 ITO 导电玻璃上制备出三维立方结构的氨基功能化介孔二氧化硅薄膜, 然后采用浸渍的方式将乙酰胆碱酯酶和细胞色素 c 组装固定到介孔薄膜的孔道中, 制备了一种电流型生物传感器. 研究表明, 组装后的介孔薄膜具有很好的三维立方结构, 且固定在介孔孔道中的蛋白质和酶分子保持很好的生物活性和电化学活性. 以碘化硫代乙酰胆碱为底物, 细胞色素 c 为电子传递酶介体, 对该生物传感器的传感性能进行了研究. 当有机磷毒剂敌敌畏浓度在 $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-3}$ mol/L 范围时, 抑制率与其浓度的对数值呈线性关系, 检测下限可达 3.1×10^{-9} mol/L.

关键词

生物传感器

介孔二氧化硅薄膜

乙酰胆碱酯酶

电子介体

生物传感器借助特定的信号装置对特定气体、液体、生物体与化学毒剂等物质迅速作出反应, 可准确地判断出毒性物质和病原体的种类和浓度. 其探测速度快, 分析准确, 是一种物质分子水平的快速、微量分析方法. 生物活性分子(酶、蛋白质、DNA、抗体、抗原等)是生物传感器的核心, 但其本身一般不稳定, 受 pH、离子强度、环境温度影响大, 需要固定在合适的载体上, 这就是活性单元的固定化技术, 它是传感器功能化和实用化的关键, 决定着传感器的稳定性、灵敏度和选择性等主要性能. 因此, 探索可行的生物活性分子固定化方式已经成为生物传感器发展的一个重要方向. 最近, 一些研究小组相继报道了利用有序介孔二氧化硅材料为主体, 在其孔道中组装酶或蛋白质等生物活性分子, 取得了较好的固定化效果^[1~7].

有序介孔材料是一类孔径在 2~50 nm 之间、孔径均一且孔道排列有序的多孔固体材料. 自从 1992 年报道了硅基 M41S 系列介孔材料以来^[8], 这类纳米

无机材料因具有均一有序的孔道、高比表面积及相对良好的热稳定性, 广泛应用于催化、吸附分离、传感器、微反应器和功能组装材料的主体等领域^[9~14]. 由于具有硅酸盐无机骨架, 介孔二氧化硅材料有着很好的热、化学和力学稳定性, 并能够抵挡环境中微生物的侵蚀, 是一种理想的生物活性分子载体^[15]. 由此可见, 在介孔孔道中组装化学活性物质或蛋白质、酶等生物活性分子, 并以此材料构建对特定物质具有响应的生物传感器, 有望在环保、医学、农业等方面得到很好的应用, 解决生物活性分子封装固定、活性保持的关键问题.

我们曾经将细胞色素 c (Cyt c) 分子组装到一种功能化介孔二氧化硅薄膜中, 发现细胞色素 c 能够在介孔薄膜中长久保持活性, 并对一些特定的氧化还原物质具有很好的传感特性^[16]. 本文在先前的研究基础上, 以三维立方结构的氨基功能化介孔二氧化硅薄膜为固定化载体, 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 为识别单元, Cyt c 为电子传递酶介体, 碘化硫代乙酰胆碱为底

引用格式: 张学骛, 贾红辉, 王晓峰, 等. 介孔二氧化硅薄膜固定乙酰胆碱酯酶生物传感器. 科学通报, 2009, 54: 1701~1705

Zhang X A, Jia H H, Wang X F, et al. Biosensor based on acetylcholinesterase immobilized on mesoporous silica thin films. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0441-7

物,构建出对有机磷毒剂具有检测性能的电流型生物传感器.

1 实验

(i) 试剂与仪器. 所有试剂均为分析纯. 正硅酸乙酯(TEOS), 汕头光华化学厂; 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)和碘化硫代乙酰胆碱(ACh), Acros 产品; 聚环氧乙烷-聚环氧丙烷-聚环氧乙烷三嵌段共聚物(EO₂₀PO₇₀EO₂₀, F127), BASF 产品; 乙酰胆碱酯酶(AChE), Sigma 产品; 猪心细胞色素 c(Cyt c), 马鞍山兴科生化有限公司; 敌敌畏(DDVP), 保定星火技术研究所; 其他试剂均由湖南汇虹试剂有限公司生产. X 射线衍射(XRD)谱图由日本 Rigaku D/MAX2200 X 射线衍射仪(Cu 靶 K α 射线)测定. 高分辨率透射电子显微镜(HRTEM)照片由美国 FEI Tecnal G² 20 S-Twin 透射电子显微镜观测得到, 加速电压 200 kV. 紫外-可见(UV-Vis)光谱在北京瑞利 UV-1100 型紫外-可见分光光度计上绘制. 电化学测试在上海辰华 CHI660A 型电化学工作站上进行.

(ii) 氨基功能化介孔二氧化硅薄膜的制备. 将 TEOS、乙醇、去离子水以及稀盐酸所组成的混合溶液加热至 60°C 回流水解 1 h, 其中各组分摩尔比为: 0.6 TEOS:3.8 C₂H₅OH:5 $\times$ 10⁻⁵ HCl:1 H₂O. 冷却后加入乙醇将溶液稀释, 然后加入适量的去离子水和浓盐酸, 室温下搅拌 10 min, 在冰水混合物水浴条件下, 缓慢加入 APTES, 并快速搅拌, 最后加入 F127 乙醇溶液, 混合均匀, 使其中各组分的摩尔比达到 0.6 TEOS:0.4 APTES:22 C₂H₅OH:0.45 HCl:5 H₂O:0.06 F127. 配制好的溶液于室温下连续搅拌 1 h, 然后在洁净的 ITO 导电玻璃(日本 NSG 公司, 方阻约为 10 Ω /cm, 3 cm $\times$ 1 cm)上提拉成膜, 提拉速度 16 cm/min. 制备好的薄膜在空气中自然干燥 1 d 后, 于 120°C(升温速度 0.5°C/min)条件下热处理 12 h, 最后置于装有乙醇的索氏提取器中萃取 24 h, 得到氨基功能化介孔二氧化硅薄膜.

(iii) 生物活性分子的固定. 将一定量的 Cyt c 和 AChE 溶于 0.01 mol/L 的磷酸氢二钠/磷酸二氢钠缓冲液(pH 7.0), 其中 Cyt c 的含量为 50 μ mol/L, 酶的活性含量为 10 u/mL. 将萃取后的氨基功能化介孔二氧化硅薄膜置于该标准溶液中, 于 4°C 下浸渍 4 d, 使得生物分子在介孔薄膜上达到吸附平衡. 浸渍后的薄膜取出后用磷酸盐缓冲溶液冲洗, 室温下干燥, 得到 Cyt c/AChE/二氧化硅介孔复合薄膜修饰的 ITO 电极.

(iv) 电化学测试. 以沉积在 ITO 导电玻璃上的 Cyt c/AChE/二氧化硅复合薄膜为工作电极, 工作面积 1 cm²; 铂电极为对电极; 饱和甘汞电极(SCE)作为参比电极. 电化学行为测试在 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0)中进行, 加入底物 ACh, 使其浓度达到 5 $\times$ 10⁻⁴ mol/L. 工作电极插入被测底液后静止 15 min, 在静止的溶液中记录所产生的稳态电流 i_0 . 在另一份同样浓度的磷酸盐缓冲溶液中加入一定量的 DDVP, 加入同样量的 ACh, 温育 15 min, 测得稳态电流 i_n . 计算出各种浓度 DDVP 相对应的稳态电流的衰减值, 并根据下式计算抑制率:

$$I(\%) = \frac{i_0 - i_n}{i_0} \times 100\%. \quad (1)$$

2 结果与讨论

2.1 薄膜表征

氨基功能化介孔二氧化硅薄膜的孔道表面, 具有高密度分布的、容易带正电荷的氨基基团, 易于无机阴离子的固定^[13,14]. 此外, 氨基又是一个碱性基团, 非常适合于蛋白质和酶分子的组装和固定. AChE 和 Cyt c 分子具有较小的尺寸, 通过与孔壁上的氨基发生强烈的氢键作用和静电力而自组装于介孔薄膜的孔道中.

图 1 给出了氨基功能化介孔二氧化硅薄膜组装生物活性分子前后的 XRD 图谱. 比较两条谱线可见, 两者均为三维立方结构(Im3m)^[17], 其衍射峰可指认

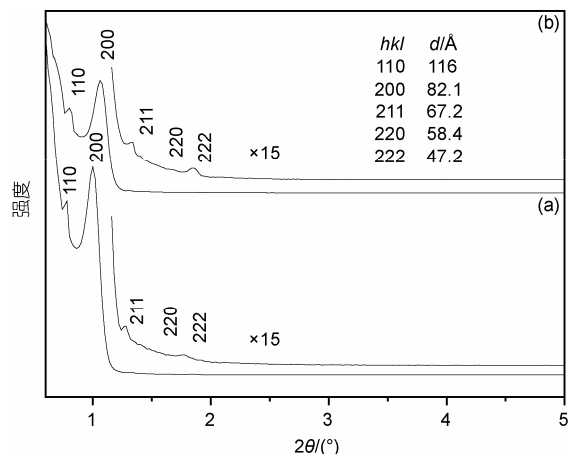


图 1 氨基功能化介孔二氧化硅薄膜组装生物活性分子前后的 XRD 图谱
(a) 组装前; (b) 组装后

为(110)、(200)、(211)、(220)和(222),并可计算出吸附后的介孔薄膜的结构参数 $a=164\text{ \AA}$.由此说明生物分子的引入并未破坏薄膜的有序介孔结构,这也被TEM分析所证实.图2是组装后介孔薄膜的TEM照片(沿[100]和[110]入射方向)和对应的快速傅里叶变换(FFT)图谱.从图中可以看出,所制备的Cyt c/AChE/二氧化硅复合薄膜具有高度有序、规整排列的3D立方结构.同时,从TEM照片可以直观地得出介孔薄膜的孔径尺寸约为 8.4 nm ,大于AChE和Cyt c的分子尺度^[18],利于生物分子的组装固定.

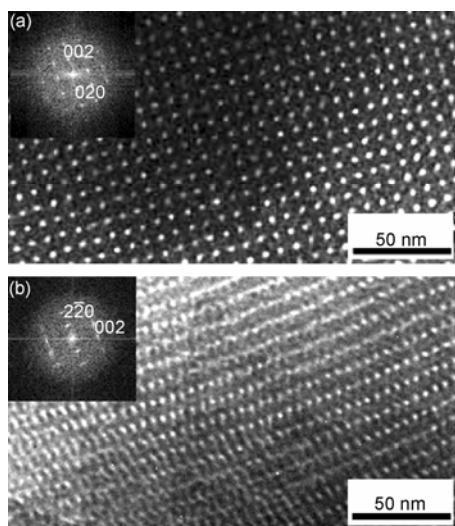


图2 组装后介孔薄膜的TEM照片及对应的FFT图谱
(a) [100]; (b) [110]

目前报道的利用介孔二氧化硅材料固定电化学活性分子构建修饰电极的多为粉体材料^[19,20],其原因在于,一般的介孔二氧化硅薄膜具有二维六方结构($p6mm$),其孔道是平行于基片平面的,不利于物质传输,电子难以通过绝缘的二氧化硅骨架到达电极表面.不过,具有三维立方结构、孔道相互连通的介孔二氧化硅薄膜可以解决这个问题.当然,如果介孔薄膜的骨架本身具有半导体性质也是可行的^[21,22].此外,在修饰电极方面,薄膜材料比较粉体材料还具有一个优点,粉体材料在修饰电极的时候需要一些黏合剂或导电的基质去分散和涂敷在电极表面,而薄膜材料则可以直接在电极上沉积.这是本文为什么采用三维立方结构介孔二氧化硅薄膜的原因.

图3给出了AChE, Cyt c稀溶液以及固定生物活性分子后的氨基功能化介孔薄膜的UV-Vis吸收光谱.固定生物活性分子后的氨基功能化介孔复合薄膜在 407 nm 处均出现较强的吸收峰,在 $275, 361$ 和 527 nm

处出现3个弱峰. $407, 361$ 和 527 nm 吸收峰均为Cyt c的特征吸收峰^[4], 407 nm 的强峰归属于Cyt c的Soret特征峰,两个弱峰属于Q特征峰,和溶液中Cyt c在 $409, 363$ 和 529 nm 处出现的特征吸收峰相比有少许蓝移,但3个峰的吸收强度的比值基本保持不变.微弱位移说明介孔薄膜和Cyt c之间存在相互作用,该相互作用可能是介孔薄膜的吸附性能和表面势能引起的,并导致Cyt c分子在介孔中紧密排列.在 275 nm 处出现吸收峰,属于酶的特征峰,与AChE稀溶液的UV-Vis吸收峰类似.以上结果表明,AChE和Cyt c已经成功组装进入了氨基功能化介孔二氧化硅,并且固定的生物活性分子保持原有的空间结构,没有发生变性.

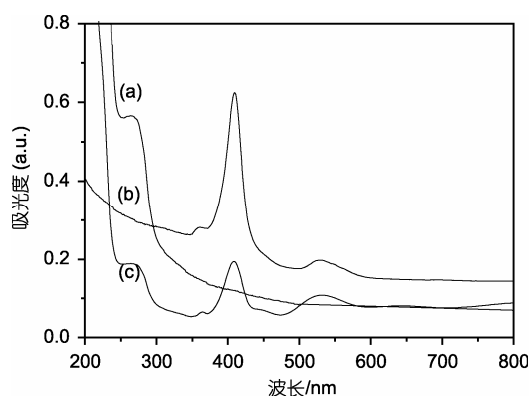


图3 生物分子稀溶液和介孔复合薄膜的UV-Vis光谱
(a) AChE稀溶液(1 u/mL); (b) Cyt c稀溶液($5\text{ }\mu\text{mol/L}$);
(c) 复合薄膜

2.2 乙酰胆碱酯酶生物传感器的电化学生物行为

DDVP是一种有机磷毒剂,被人体吸收后,与神经递质AChE反应,抑制AChE并降低其活性,使之不能正常催化ACh的分解,ACh将会过量积累,造成神经系统的紊乱,形成生理毒害效果.因此,利用DDVP可以抑制神经系统中AChE的活性、破坏神经的正常传导这一原理,将AChE与样品反应,根据AChE活性受到抑制的情况,可判断出样品中是否含有DDVP等有机磷毒剂.本文中,Cyt c是作为电子传递酶介体存在的,用以提高生物传感系统的稳定性和测量精度,而这也是目前该类传感器的主要发展方向,如Suprun^[23]与Ivanov^[24]等人分别以普鲁士蓝和 $7, 7, 8, 8$ -四氰基醌二甲烷(TCNQ)为电子传递酶介体制备了检测有机磷毒剂的生物传感器.而且Cyt c本身就是一种生物蛋白,与乙酰胆碱酯酶具有较好的生物相容性,利于保持该传感器的活性.

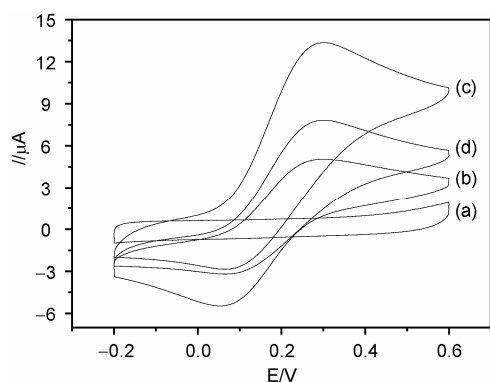
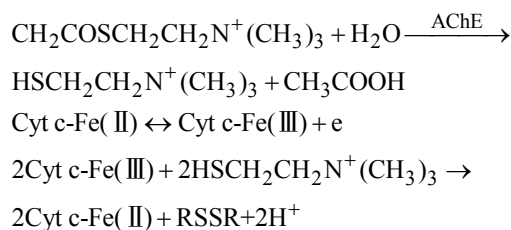


图4 裸ITO电极和修饰ITO电极在不同底液中的循环伏安(CV)曲线

(a) 裸ITO电极; (b) 修饰电极在不含ACh的底液中; (c) 修饰电极在含ACh的底液中; (d) 修饰电极在含ACh和DDVP的底液中

图4给出了裸ITO电极和Cyt c/AChE/二氧化硅复合薄膜修饰ITO电极的循环伏安(CV)曲线, 扫描速度30 mV/s. 在-0.2~0.6 V的扫描范围内, 裸ITO电极的CV曲线是平坦的(图4(a)), 没有任何特征峰出现, 而Cyt c/AChE/二氧化硅介孔复合薄膜修饰电极的CV曲线出现一对准可逆的氧化还原峰. 这再次表明AChE和Cyt c成功地固定在介孔薄膜的孔道中, 并能发生电子转移反应, 保持很好的生物和电化学活性. 当底液中不含ACh的时候, 修饰电极的CV曲线出现两个对称的准可逆峰(图4(b)), 可以归属于Cyt c的氧化还原峰, 与我们先前在介孔薄膜中单独固定Cyt c的结果一致^[16]. 位于+0.31 V的阳极峰是Cyt c失去1电子的氧化峰. 从图4可以看出, 当被测底物中含有ACh的时候, 位于+0.31 V氧化峰的电流值明显增大(图4(c)). 这是因为AChE催化ACh水解, 生成的硫代胆碱具有很强的还原性, 与Cyt c中的Fe(III)发生了反应, 使得氧化电流迅速增大. 其电催化机理可表示为:

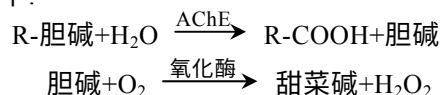


反应式中的RSSR代表二硫代胆碱. 如果在底物溶液中含有一定量的DDVP, 它将与电极上的AChE反应, 抑制了AChE的活性, 使得AChE酶催化底物硫代乙酰胆碱生成的硫代胆碱的量减少, 与Cyt c中的Fe(III)发生反应的硫代胆碱的量就减少了, 在

CV曲线上则表现出Cyt c的氧化电流值降低(图4(d)), 因此可以通过测量电流信号大小来测定DDVP的浓度.

我们按照实验要求配制含有不同浓度DDVP的被测溶液, 测定其位于+0.31 V氧化峰的电流值的变化. 对每一浓度的DDVP样品反复测定4次, 标准偏差在2.13%~4.24%之间. 由于有机磷毒剂对乙酰胆碱酯酶具有抑制作用, 导致在含DDVP的底液中所产生的氧化电流小于在不含DDVP的底液中产生的氧化电流, 电流衰减与农药的浓度有一定的关系. 以抑制率 $I(\%)$ 对DDVP浓度对数作图, 发现当DDVP浓度在 $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-3}$ mol/L范围时, 抑制率 $I(\%)$ 与DDVP浓度对数值具有很好的线性关系, 线性方程为 $I(\%) = 0.15 \lg C_{\text{DDVP}} + 1.38$, 相关系数达0.996. 按抑制率为10%时的DDVP浓度为最低检测限^[25], 其检测下限可达 3.1×10^{-9} mol/L. 检测下限与Suprun^[23]与Ivanov^[24]等人的结果相近(10^{-9} 级), 但检测线性范围有所扩大.

上述方法简单方便, 灵敏度高, 在有机磷毒剂的快速检测中有着较好的应用前景. 此外, 还可以将上述方法与胆碱氧化酶联用, 进一步放大检测信号. 其原理如下:



从上式可以看出, 胆碱在氧化酶的作用下会生成过氧化氢. 在先前研究中, 我们知道Cyt c/二氧化硅复合薄膜修饰电极对过氧化氢具有很好的传感特性^[16]. 因此, 可以通过采用Cyt c/二氧化硅复合薄膜修饰电极检测过氧化氢的电流信号变化, 来检测被测底物中有机磷毒剂的含量.

3 结论

采用溶液浸渍的方式, 成功制备了Cyt c/AChE/二氧化硅介孔复合薄膜. 该复合薄膜具有高度有序的三维立方结构, 且固定在介孔孔道中的蛋白质和酶分子保持很好的生物和电化学活性. 以此复合薄膜修饰电极构建的电流型生物传感器, 对有机磷毒剂DDVP具有很好的传感特性, 测量的浓度范围为 $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-3}$ mol/L, 检测下限可达 3.1×10^{-9} mol/L. 该制备方法可以延伸到其他蛋白质、酶等生物分子在功能化介孔二氧化硅薄膜中的固定, 这将大大扩展生物分子和介孔材料在生物传感器方面的应用.

参考文献

- 1 Hartmann M. Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis. *Chem Mater*, 2005, 17: 4577—4593[[doi](#)]
- 2 Yiu H H P, Wright P A, Botting N P. Enzyme immobilization using siliceous mesoporous molecular. *Micropor Mesopor Mater*, 2001, 44/45: 763—769[[doi](#)]
- 3 Deere J, Magner E, Wall J G, et al. Adsorption and activity of proteins onto mesoporous silica. *Catal Lett*, 2003, 85: 19—23[[doi](#)]
- 4 Vinu A, Murugesan V, Tangermann O, et al. Adsorption of cytochrome c on mesoporous molecular sieves: influence of pH, pore diameter, and aluminum incorporation. *Chem Mater*, 2004, 16: 3056—3065[[doi](#)]
- 5 Moelans D, Cool P, Baeyens J, et al. Immobilisation behaviour of biomolecules in mesoporous silica materials. *Cata Commun*, 2005, 6: 591—595[[doi](#)]
- 6 Qiao S Z, Djojoputro H, Hu Q, et al. Synthesis and lysozyme adsorption of rod-like large-pore periodic mesoporous organosilica. *Prog Solid State Ch*, 2006, 34: 249—256[[doi](#)]
- 7 Miyahara M, Vinu A, Hossain K Z, et al. Adsorption study of heme proteins on SBA-15 mesoporous silica with pore-filling models. *Thin Solid Films*, 2006, 499: 13—18[[doi](#)]
- 8 Kresge C T, Leonowicz M E, Roth W J, et al. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*, 1992, 359: 710—712[[doi](#)]
- 9 Xiao F S, Han Y, Yu Y, et al. Stable ordered mesoporous titanasilicates with highly active sites. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 888—889[[doi](#)]
- 10 Kisler J M, Dahler A, Stevens G W, et al. Separation of biological molecules using mesoporous molecular sieves. *Micropor Mesopor Mater*, 2001, 44/45: 769—774[[doi](#)]
- 11 Okada H, Nakajima N, Tanaka T, et al. Improvement in photocyclization efficiency of diaryl ethenes by adjusting the pore size of mesoporous silica. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 7233—7236[[doi](#)]
- 12 Pardo E, Burguete P, Ruiz-García R, et al. Ordered mesoporous silicas as host for the incorporation and aggregation of octanuclear nickel(II) single-molecule magnets: a bottom-up approach to new magnetic nanocomposite materials. *J Mater Chem*, 2006, 16: 2702—2714[[doi](#)]
- 13 张学鹭, 吴文健, 满亚辉, 等. Keggin 结构磷钼酸/二氧化硅介孔复合薄膜的制备及其光致变色性质. *中国科学B辑: 化学*, 2007, 37: 156—163
- 14 Rohlffing D F, Rathouský J, Rohlffing Y, et al. Functionalized mesoporous silica films as a matrix for anchoring electrochemically active guests. *Langmuir*, 2005, 21: 11320—11329[[doi](#)]
- 15 Deere J, Serantoni M, Edler K J, et al. Measurement of the adsorption of cytochrome c onto the external surface of a thin-film mesoporous silicate by ellipsometry. *Langmuir*, 2004, 20: 532—536[[doi](#)]
- 16 Zhang X A, Wu W J, Wang J F, et al. Immobilization and electrochemistry of cytochrome c on amino-functionalized mesoporous silica thin films. *Electrochem Commun*, 2007, 9: 2098—2104[[doi](#)]
- 17 Zhao D, Yang P, Melosh N, et al. Continuous mesoporous silica films with highly ordered large pore structures. *Adv Mater*, 1998, 10: 1380—1385[[doi](#)]
- 18 Washmon-Kriel L, Jimenez V L, Balkus K J Jr. Cytochrome c immobilization into mesoporous molecular sieves. *J Mol Catal B: Enzymatic*, 2000, 10: 453—469[[doi](#)]
- 19 Li L D, Li W J, Sun C Q, et al. Fabrication of carbon paste electrode containing 1:12 phosphomolybdic anions encapsulated in modified mesoporous molecular sieve MCM-41 and its electrochemistry. *Electroanalysis*, 2002, 14: 368—375[[doi](#)]
- 20 戴志晖, 鞠现先. 介孔分子筛上的蛋白质直接电化学. *物理化学学报*, 2004, 20: 1262—1266
- 21 Xu X, Tian B, Kong J, et al. Ordered mesoporous niobium oxide film: A novel matrix for assembling functional proteins for bioelectrochemical applications. *Adv Mater*, 2003, 15: 1932—1936[[doi](#)]
- 22 Fattakhova-Rohlffing D, Brezesinski T, Rathouský J, et al. Transparent conducting films of indium tin oxide with 3D mesopore architecture. *Adv Mater*, 2006, 18: 2980—2983[[doi](#)]
- 23 Suprun E, Evtugyn G, Budnikov H, et al. Acetylcholinesterase sensor based on screen-printed carbon electrode modified with Prussian blue. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383: 597—604[[doi](#)]
- 24 Ivanov A, Evtugyn G, Budnikov H, et al. Cholinesterase sensors based on screen-printed electrodes for detection of organophosphorus and carbamic pesticides. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 377: 624—631[[doi](#)]
- 25 Lee H S, Kin Y A, Chao Y A, et al. Oxidation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase-based biosensor. *Chemosphere*, 2002, 46: 571—576[[doi](#)]