

DOI: 10.13208/j.electrochem.140434

Article ID:1006-3471(2014)06-0515-06

Cite this: *J. Electrochem.* 2014, 20(6): 515-520

Http://electrochem.xmu.edu.cn

酶法合成的葡萄糖氧化酶-纳米金复合物的直接电化学与生物传感

何 芳¹, 覃晓丽¹, 傅迎春², 陈 超¹, 谢青季^{1*}, 姚守拙¹

(1. 湖南师范大学 化学化工学院, 化学生物学及中药分析教育部重点实验室, 湖南 长沙 410081;

2. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310029)

摘要: 将 NaAuCl₄、葡萄糖氧化酶(GOx)和葡萄糖混合, 借一步酶促反应制得吸附 GOx 的金纳米颗粒(AuNPs), 再通过滴干修饰法研制了 Nafion/GOx-AuNPs 修饰的玻碳(GC)电极, 并考察了该酶电极上 GOx 的直接电化学和生物传感性能. 这种酶法合成的 GOx-AuNPs 复合物有良好的酶直接电化学活性, 也保持了 GOx 的生物活性, 似可归因于酶法合成的纳米金更接近酶氧化还原活性中心的缘故. 该酶电极在 -0.4 V(vs. SCE)电位下, 其稳态电流下降与葡萄糖浓度(0.5 ~ 4 mmol·L⁻¹)成正比, 检测下限 0.2 μmol·L⁻¹.

关键词: 葡萄糖氧化酶; 酶法合成; 葡萄糖氧化酶-纳米金复合物; 直接电化学; 生物传感

中图分类号: O646

文献标识码: A

研究酶氧化还原活性中心与电极之间的直接电子转移, 有助于深入了解有氧化还原活性的蛋白质的结构和功能^[1-2]. 然而, 大多数氧化还原蛋白质或酶的活性中心深埋于庞大的蛋白质分子内部, 很难靠近电极表面, 阻碍了其电极间的电子转移, 且氧化还原酶在电极表面的吸附常导致其生物活性有一定程度的下降. 因此要同时实现固定化氧化还原酶的高酶活性和高电活性, 用于第三代安培生物传感器研制, 依然是一个富有挑战性的课题^[3-12]. 作者课题组曾提出了定量检测固定酶生物活性和电活性的电化学石英晶体微天平新方法, 依此发现多壁碳纳米管表面吸附的葡萄糖氧化酶(GOx)有很好的电活性, 但有电活性的那部分吸附酶却基本丧失了酶活性^[4-5]. Wang 和 Gorski 等的研究也得出了类似结论^[6-7]. 酶法合成的金属纳米颗粒在电化学和生物传感方面有其优越性, 已有不少研究^[13-14]. 如 GOx 在溶解氧存在下, 可催化底物葡萄糖的氧化, GOx 转变为其还原态, 随后被溶解氧氧化而再生, 同时产生过氧化氢. 这种酶促反应产生的过氧化氢, 以及酶的还原态, 还可还原 AuCl₄⁻ 得到纳米金, 该原理可用于定量检测 GOx 活性和构筑葡萄糖光学传感器^[15-16]. 本文采用

这种酶法合成的方法制得 GOx-AuNPs 复合物, 将其修饰于玻碳(GC)电极上, 并研究固定化 GOx 的直接电化学和生物电催化性能.

1 实验

1.1 试剂与仪器

GOx(EC 1.1.3.4, 源于黑曲霉, 活性 150 kU·g⁻¹, Sigma)、氯金酸(HAuCl₄)、柠檬酸钠和 Nafion(5%, by mass, Aldrich), 以上均未经进一步纯化. 其他试剂为分析纯. pH 7.0 的磷酸缓冲液(PBS, 0.1 mol·L⁻¹ KH₂PO₄-Na₂HPO₄). Milli-Q 超纯水(Millipore, ≥18 MΩ·cm). 所有实验在室温(约 25 °C)下进行. 用 0.1 mol·L⁻¹ 的 PBS 配制 1.00 mol·L⁻¹ 葡萄糖溶液, 并经 24 h 静置使葡萄糖的光学异构体达到平衡后再稀释使用.

电化学实验仪器为 CHI660A 电化学工作站(上海辰华). 常规三电极系统由玻璃碳工作电极($\phi = 3$ mm)、饱和甘汞参比电极(SCE)、碳棒对电极组成. 使用岛津 UV2450 紫外分光光度计进行紫外-可见光谱表征. 使用日立 800 型透射电子显微镜采集透射电镜图片.

1.2 Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极的制备

收稿日期: 2014-05-27, 修订日期: 2014-07-21 * 通讯作者, Tel: (86-731)88865515, E-mail: xieqj@hunnu.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 21175042, No. 21075036)资助

将 GC 电极依次用 #6 砂纸、 $0.3\ \mu\text{m}\ \alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 和 $0.05\ \mu\text{m}\ \alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 悬浊液抛光,再依次用水、乙醇和水超声清洗(各 5 min),氮气吹干,用浓硫酸滴洗 3 次.将该玻碳电极置于 $0.5\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸溶液中进行电位环扫(电位区间 $-1.0\sim 1.0\ \text{V vs. SCE}$,扫描速率 $100\ \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$),直至循环伏安曲线重现.然后,将该电极置于 $2.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 + 0.10\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Na}_2\text{SO}_4$ 水溶液中进行电位环扫,其氧化还原峰峰电位宽一般在 $75\ \text{mV}$ 以内,可视为 GC 电极表面已处理干净.

取 $100\ \mu\text{L}$ PBS($0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0) 配制的 $10\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ GOx 溶液,与 $100\ \mu\text{L}\ \text{NaAuCl}_4$ ($10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 混合均匀,加入 $100\ \mu\text{L}$ 葡萄糖($1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)溶液,室温下反应.待该混合液颜色由黄色变成稳定的深红色后(图 1A 插图),取 $10\ \mu\text{L}$ 这种含 GOx-AuNPs 复合物的混合溶液,滴于处理干净的 GC 电极表面,室温风干,PBS 清洗 3 min 以除去 GOx、葡萄糖、 NaAuCl_4 、 H_2O_2 和吸附不牢的物质等组分.再将 $2.0\ \mu\text{L}$ Nafion(0.25%, by mass)滴涂于该电极上,即得 Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极.电极 $4\ ^\circ\text{C}$ 下干态保存. Nafion/GC 和 Nafion/GOx/GC 电极按相同方法制得.生物传感实验中,在搅拌的、空气饱和的 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.0) 中,待 Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极的恒电位 ($-0.4\ \text{V}$) 计时电流曲线达到稳定后,连续加入葡萄糖,记录传传感器对葡萄糖响应的计时安培响应曲线.

2 结果与讨论

2.1 GOx-AuNPs 复合物表征

图 1A 为 GOx-AuNPs 复合物溶液的照片和紫外吸收光谱图.由图可知,酶法合成的 GOx-AuNPs 复合物溶液呈深红色(插图),在 $542\ \text{nm}$ 处有 AuNPs 的吸收峰,且与 GOx 和 NaAuCl_4 的混合溶液一样,在 $280\ \text{nm}$ 处呈现 GOx 的特征吸收峰,说明已合成了 GOx-AuNPs 复合物^[17].图 1B 为 GOx-AuNPs 复合物的 TEM 图.由图可知,所得 GOx-AuNPs 纳米复合物尺寸较均一,约为 $20\ \text{nm}$.

图 2 为不同修饰电极在 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 溶液中的循环伏安曲线 (N_2 除氧 30 min 后).由图可见,Nafion/GC 电极上无明显的氧化还原峰(曲线 a),Nafion/GOx/GC 电极上仅有一对较小的氧化还原峰(曲线 b).而 Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极上则有一对明显的氧化还原峰(曲线 c),氧化峰电位(E_{pa})为 $-0.485\ \text{V}$,还原峰电位(E_{pc})为 $-0.497\ \text{V}$,式量电位(E^0)为 $-0.491\ \text{V}$.该氧化还原峰应来源于 GOx 氧化还原活性中心黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)与电极的直接电子传递^[18].众所周知,GOx 氧化还原中心被深埋于较厚的不导电蛋白质“外壳”中,较难与电极表面发生直接电子传递.作者推测,GOx-AuNPs 复合物的 AuNPs 系酶法合成,离酶活中心近,起到了酶与电极间直接电子转移的桥梁作用,更利于酶的直接电化学.

Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极在 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 溶液中、不同扫描速率下的循环伏安曲线如图 3 所示.由图可见,在 $0.05\sim 0.5\ \text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ 的扫速范围,GOx 氧化、还原峰电流均与扫速成正比(插图),其氧化、还原峰电位基本不变,表明 GOx 在电

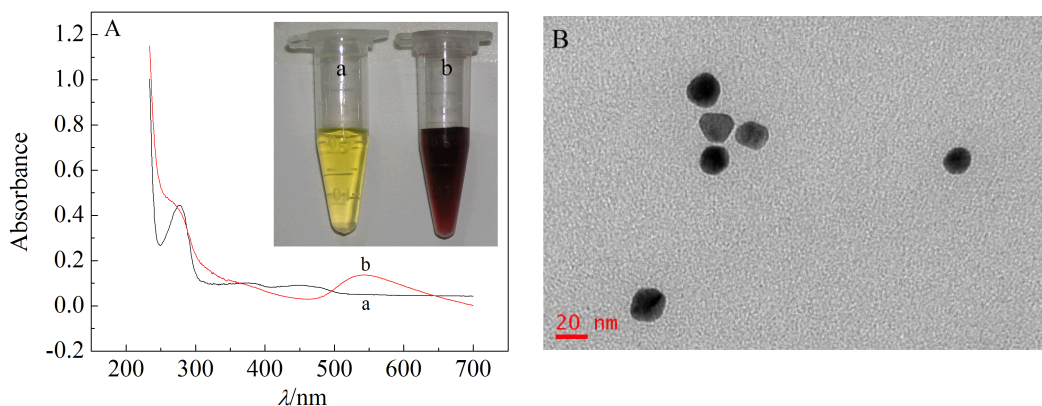


图 1 A. GOx 和 NaAuCl_4 的混合溶液(a)和 GOx-AuNPs 复合物溶液(b)的照片和紫外可见吸收光谱图;B. GOx-AuNPs 复合物的 TEM 图

Fig. 1 A. UV-Vis absorption spectra and digital image (Inset) of the mixed solution of GOx and NaAuCl_4 (a) and the GOx-AuNPs composite solution (b); B. TEM image of GOx-AuNPs composites

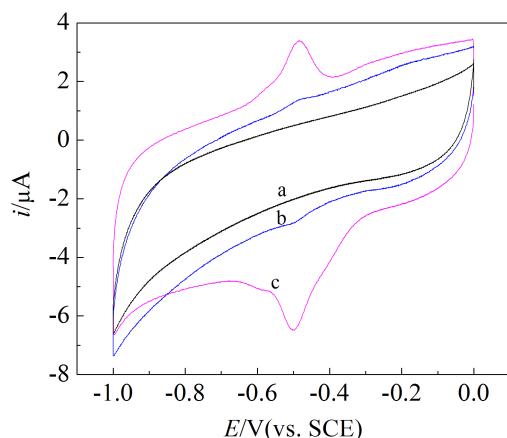


图2 Nafion/GC (a)、Nafion/GOx/GC (b) 和 Nafion/GOx-AuNPs/GC (c) 电极在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.0) 中的循环伏安曲线

Fig. 2 Cyclic voltammograms of Nafion/GC (a), Nafion/GOx/GC (b) and Nafion/GOx-AuNPs/GC (c) electrodes in $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.0) Scan rate: $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$

极表面的直接电化学速率很快,系表面控制^[12]. 据 Laviron 方程 $\lg k_s = \alpha \lg(1-\alpha) + (1-\alpha) \lg \alpha - \lg(RT/nFv) - \alpha(1-\alpha)nF\Delta E_p/2.3RT$, 可估算出 GOx 异相电子转移速率常数 k_s 约为 3.09 s^{-1} , 大于文献报道的常规 GOx-AuNPs (1.30 s^{-1} , 扫描速率 $0.02 \sim 0.25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$)^[17] 和 GOx-AuNPs-DHP (1.73 s^{-1} , 扫描速率 $0.05 \sim 5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$)^[19] 中 GOx 的 k_s .

图4为 Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极在不同 pH 值 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 溶液的循环伏安曲线. 由图可见, 溶液 pH 增大, GOx 阳、阴极峰电位均负移, 且其式量电位 E^0 与溶液 pH 值呈良好的线性关系 (插图), 其斜率 $-51.9 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$, 与文献所报道的相近^[12], 说明含两个 FAD 中心的 GOx 分子的直接电化学过程符合电子-质子转移数相等的机理.

2.2 Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极的生物传感性能

图5为 Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极在氧气饱和 (图5A) 和氮气饱和 (图5B) 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH = 7.0, 含不同浓度葡萄糖) 的循环伏安曲线. 由图可见, 在氧气饱和情况下加入葡萄糖, Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极的阴极峰电流减小. 这是因为 GOx 电催化葡萄糖氧化时, 会消耗溶解氧, 故 O_2 的还原峰降低. 在一定的浓度范围内, 氧气的还原峰电流降低与葡萄糖浓度成正比. 因此, Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极上的 GOx 仍保持较好

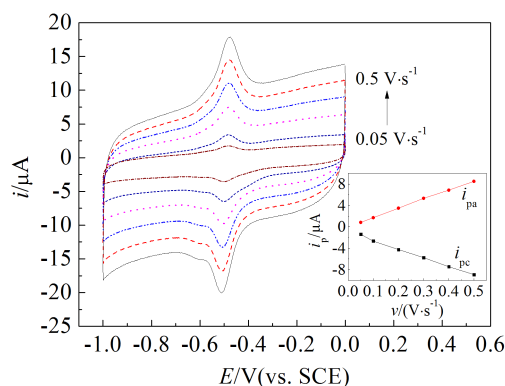


图3 Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.0) 中、不同扫描速率 ($0.05 \sim 0.5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$) 下的循环伏安曲线, 插图为氧化、还原峰电流与扫速的关系曲线

Fig. 3 Cyclic voltammograms of the Nafion/GOx-AuNPs/GC electrode in $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.0) at various scan rates from inner to outer: $0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4$, and $0.5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ (Inset: cathodic and anodic peak currents versus scan rate)

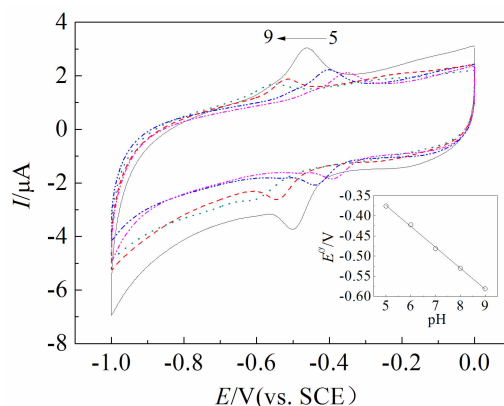


图4 Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极在不同 pH 值 (5~9) 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 溶液中的循环伏安曲线, 插图为式量电位与 pH 的关系曲线

Fig. 4 Cyclic voltammograms of the Nafion/GOx-AuNPs/GC electrode in $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS with different pH values from 5 to 9 (Inset: A plot of E^0 versus pH)

的酶活性, 且可根据氧气还原峰降低的现象来检测溶液葡萄糖浓度. 然而, 在氮气饱和情况下加入葡萄糖, Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极的 GOx 氧化还原峰几乎没有变化, 故 GOx 直接电化学活性对葡萄糖的生物电催化氧化效果仍不明显.

据文献报道^[7], 可推测 GOx 在 Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极可能发生如下电化学过程:

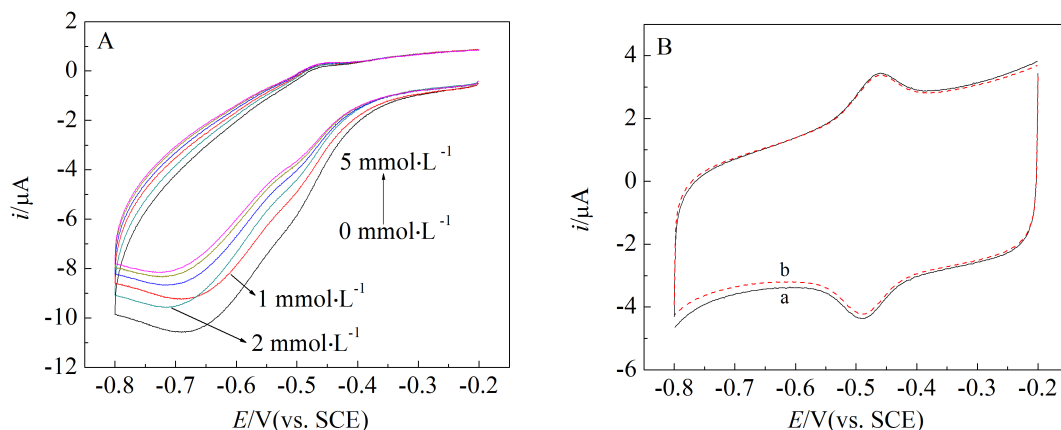
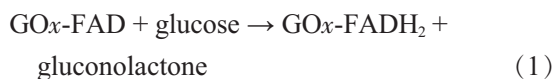


图 5 Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极在氧气饱和且含有葡萄糖(0~5 mmol·L⁻¹)的 0.1 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.0)溶液(A)和氮气饱和的无葡萄糖(a)或含 1 mmol·L⁻¹ 葡萄糖(b)的 0.1 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.0)溶液(B)中的循环伏安曲线

Fig 5 Cyclic voltammograms on GOx-AuNPs/GC electrode in O₂-saturated 0.1 mol·L⁻¹ PBS (pH 7.0) containing glucose at various concentrations (A) and N₂-saturated 0.1 mol·L⁻¹ PBS (pH 7.0) without (a) and with (b) 1 mmol·L⁻¹ glucose (B)

Glucose concentrations: 0, 1, 2, 3, 4 and 5 mmol·L⁻¹, scan rate: 0.1 V·s⁻¹



在氧气饱和且含有葡萄糖的 0.1 mol·L⁻¹ PBS 溶液中,反应(1)和(2)同时发生,故氧气的还原峰电流随葡萄糖浓度增加而减小. 这样,溶液葡萄糖浓度可通过氧气的还原峰电流值的降低来估算. 在氮气饱和的 0.1 mol·L⁻¹ PBS 溶液中,有葡萄糖时具有生物活性的 GOx 发生反应(1),具有电活性的 GOx 在修饰电极上发生直接电子转移反应(反应(3)).

图 6 为在空气饱和的 0.1 mol·L⁻¹ PBS (pH 7.0) 中, Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极在恒电位 (-0.4 V) 计时电流曲线达到稳定后,再连续加入 0.5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖,电极响应葡萄糖的计时电流曲线. 这里选择 -0.4 V 为检测电位,主要是在此电位处,抗干扰能力强(例如,此时抗坏血酸不氧化). 由图可见,该电极对葡萄糖的响应较快,约在每次加入葡萄糖 5 s 后,溶解氧的还原电流改变值基本达到稳定. 在 0.5~4.0 mmol·L⁻¹ 浓度范围内,稳态电流增量与葡萄糖浓度成正比,线性回归方程为 $i(\mu\text{A}) = 0.199c(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}) - 0.0367$, $R^2 = 0.988$. 该电极的检测下限为 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($S/N = 3$), 检测灵敏度为 2.82 $\mu\text{A}\cdot\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, 优于文献报道的 GOx-CS/AgNWs/GC 电极(线性范围 0.01~0.8 mmol·L⁻¹, 检测下限 2.83 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[20]和 GOx-PDA-Au-Fe₃O₄/MGC

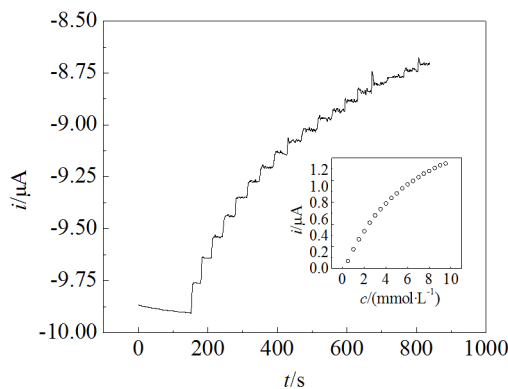


图 6 Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极在空气饱和的 0.1 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.0,施加电位 -0.4 V)中连续加入 0.5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖的电流-时间曲线

Fig. 6 Amperometric responses of Nafion/GOx-AuNPs/GC electrode at -0.4 V (vs. SCE) upon successive additions of 0.5 mmol·L⁻¹ glucose to air-saturated PBS (0.1 mol·L⁻¹, pH 7.0) Inset: steady-state current increment versus glucose concentration curve

电极(线性范围 0.02~1.88 mmol·L⁻¹, 检测下限 6.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[21].

在氧气饱和的 PBS 溶液中加入 1 mmol·L⁻¹ 葡萄糖, Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极上 10 次平行实验的相对标准偏差为 3.95%. Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极在 4℃ 下搁置 3 周,其生物传感信号基本不变. 另外, GOx-AuNPs 复合物溶液 4℃ 搁置 3 个月,再制得 Nafion/GOx-AuNPs/GC 电极,其生物传

感信号也基本无变化. 这些说明本文酶电极有较好的稳定性, 可能是因为酶法制备的 $\text{GO}_x\text{-AuNPs}$ 具有较稳定的结构和活性.

3 结论

采用酶法一步合成了 $\text{GO}_x\text{-AuNPs}$ 复合物, 并制备了 $\text{Nafion}/\text{GO}_x\text{-AuNPs}/\text{GC}$ 电极. 酶法合成的金纳米颗粒可能较接近酶活中心, 有助于直接电子转移, 且较好地保持了酶活性. $\text{Nafion}/\text{GO}_x\text{-AuNPs}/\text{GC}$ 电极在 $0.5 \sim 4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围, 稳态电流的改变与葡萄糖浓度成正比, 线性回归方程 $i(\mu\text{A}) = 0.199c(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}) - 0.0367$, $R^2 = 0.988$. 该电极的检测下限 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 灵敏度 $2.82 \mu\text{A} \cdot \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. 实验条件下该电极对葡萄糖检测有良好的稳定性.

参考文献(References):

- [1] Nöll T, Nöll G. Strategies for “wiring” redox-active proteins to electrodes and applications in biosensors, biofuel cells, and nanotechnology[J]. *Chemical Society Reviews*, 2011, 4(7): 3564-3576.
- [2] Yehezkeili O, Raichlin S, Willner I, et al. Biocatalytic implant of Pt nanoclusters into glucose oxidase: A method to electrically wire the enzyme and to transform it from an oxidase to a hydrogenase[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2010, 1(4): 2816-2819.
- [3] Xu J, Shang, F J, Razeed K M, et al. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on a monolayer modified nanowire array electrode[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25(6): 1313-1318.
- [4] Su Y H, Xie Q J, Yao S Z, et al. Electrochemical quartz crystal microbalance studies on enzymatic specific activity and direct electrochemistry of immobilized glucose oxidase in the presence of sodium dodecyl benzene sulfonate and multiwalled carbon nanotubes[J]. *Biotechnology Progress*, 2008, 24(1): 262-272.
- [5] Chen C, Xie Q J, Yao S Z, et al. Recent advances in electrochemical glucose biosensors: A review[J]. *RSC Advances*, 2013, 3(14): 4473-4491.
- [6] Wang Y, Yao Y J. Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes is without value in certain mediator-free applications[J]. *Microchimica Acta*, 2012, 176(3): 271-277.
- [7] Wooten M, Karra, S, Gorski, W, et al. On the direct electron transfer, sensing, and enzyme activity in the glucose oxidase/carbon nanotubes system[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(1): 752-757.
- [8] Wang J W, Wang L P, Tu Y F, et al. Disposable biosensor based on immobilization of glucose oxidase at gold nanoparticles electrodeposited on indium tin oxide electrode[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008, 135(1): 283-288.
- [9] Xiao X L, Xie Q J, Yao S Z, et al. A reagentless glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on poly(methylene blue) doped silica nanocomposites[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, 165(1): 126-132.
- [10] Wang Z Y, Liu S, Cai C X, et al. Detection of glucose based on direct electron transfer reaction of glucose oxidase immobilized on highly ordered polyaniline nanotubes[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(4): 1638-1645.
- [11] Cao Z J, Xie Q J, Yao S Z, et al. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized in a tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane/multiwalled carbon nanotubes film[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 24(2): 222-227.
- [12] Unnikrishnan B, Palanisamy S, Chen S M. A simple electrochemical approach to fabricate a glucose biosensor based on graphene-glucose oxidase biocomposite[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 39(1): 70-75.
- [13] Willner I, Baron R, Willner B. Growing metal nanoparticles by enzymes[J]. *Advanced Materials*, 2006, 18(9): 1109-1120.
- [14] Fu Y C, Xie Q J, Yao S Z, et al. Chemical/biochemical preparation of new polymeric bionanocomposites with enzyme labels immobilized at high load and activity for high-performance electrochemical immunoassay[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2010, 114(3): 1472-1480.
- [15] He H L, Xu X L, Jin, Y D, et al. *In situ* nanoplasmonic probing of enzymatic activity of monolayer-confined glucose oxidase on colloidal nanoparticles[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(9): 4546-4553.
- [16] Zayats M, Baron R, Willner I, et al. Biocatalytic growth of Au nanoparticles: From mechanistic aspects to biosensors design[J]. *Nano Letters*, 2005, 5(1): 21-25.
- [17] Zhao S, Zhang K, Sun C, et al. Glucose oxidase/colloidal gold nanoparticles immobilized in Nafion film on glassy carbon electrode: Direct electron transfer and electrocatalysis[J]. *Bioelectrochemistry*, 2006, 69(2): 158-163.
- [18] Shan C S, Yang H F, Niu L, et al. Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on graphene[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(6): 2378-2382.
- [19] Wu Y H, Hu S S. Direct electrochemistry of glucose oxidase in a colloid Au-dihexadecylphosphate composite film and its application to develop a glucose biosensor[J].

- Bioelectrochemistry, 2007, 70(2): 335-341.
- [20] Wang L S, Gao X, Lin X F, et al. Amperometric glucose biosensor based on silver nanowires and glucose oxidase [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013, 176(2): 9-14.
- [21] Peng H P, Liang R P, Qiu J D, et al. Facile preparation of novel core-shell enzyme-Au-polydopamine-Fe₃O₄ magnetic bionanoparticles for glucose sensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 42(4): 293-299.

Direct Electrochemistry and Glucose Biosensing of Glucose Oxidase-Gold Nanoparticles Composite Synthesized by Enzyme Method

HE Fang¹, QIN Xiao-li¹, FU Ying-chun², CHEN Chao¹, XIE Qing-ji^{1*}, YAO Shou-zhuo¹

(1. *Key Laboratory of Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research (Ministry of Education), College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Normal University, Changsha 410081, China;*
2. *College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Abstract: Glucose oxidase (GOx)-gold nanoparticles (AuNPs) composite was synthesized by the one-pot enzyme reaction in the mixture solution of NaAuCl₄, GOx and glucose, and a Nafion/GOx-AuNPs/glassy carbon electrode was fabricated by the cast-coating method to examine the direct electrochemistry of GOx and the biosensing performance on this electrode. Such a GOx-AuNPs composite showed good direct-electrochemistry activity and bioactivity of GOx, probably because the enzyme-mediated AuNPs are close to the redox active centers of GOx. This enzyme electrode exhibited a linear amperometric response to glucose concentration (0.5 ~ 4 mmol·L⁻¹) at -0.4 V (vs. SCE), and a detection limit of 0.2 μmol·L⁻¹ was obtained.

Key words: glucose oxidase; enzymatic synthesis; glucose oxidase-Au nanoparticles composite; direct electrochemistry; biosensing