

文章编号: 1006-3471 (2006) 02-0214-04

# 酪氨酸酶在硼掺杂金刚石薄膜电极上的固定及酚类化合物的检测

周艳丽, 只金芳 \*

(中国科学院理化技术研究所, 北京, 100080)

**摘要:** 以硼掺杂金刚石 (boron-doped diamond, BDD) 薄膜作基底, 利用光化学反应将含有碳碳双键的烯丙胺化合物修饰在 BDD 表面, 形成氨基单分子层, 再经过酰胺键的连接使酪氨酸酶固定在氨基化的金刚石表面, 从而制得酪氨酸酶修饰的电极. 应用循环伏安法研究该电极用于酚类化合物 (包括苯酚、对甲基苯酚和对苯二酚等) 检测的灵敏度、线性范围及其稳定性.

**关键词:** 硼掺杂金刚石薄膜; 烯丙胺; 酪氨酸酶; 酚类化合物

**中图分类号:** O 646

**文献标识码:** A

酚类化合物是工业废水主要污染物之一, 其检测和消除一直是环境治理研究的热点. 近年来, 酪氨酸酶生物传感器因其灵敏度高、分析速率快、选择性好等优点, 已被广泛用于酚类化合物的检测<sup>[1-3]</sup>. 该法的依据是测定酪氨酸酶催化氧化酚类化合物而后生成醌类化合物的还原电流, 避免了由于直接电化学氧化生成的中间产物发生聚合沉积<sup>[4]</sup>, 从而极大地提高了检测灵敏度.

目前, 用于固定酪氨酸酶的基底材料大多为玻碳、金、硅片等, 但都存在一定的缺点, 诸如表面在水溶液中发生水解反应、电极表面易玷污以及与生物分子结合界面不够稳定等. 金刚石之结构含有很强的 C—C 共价键合, 其物理、化学性质非常稳定. 而对掺杂硼的金刚石薄膜 (BDD), 除了保有金刚石本身的物理、化学性质外, 作为新型碳素功能电极材料还具有以下优异的电化学性能<sup>[5-6]</sup>: 1) 宽电化学势窗, 2) 低背景电流, 3) 高电化学稳定性及抗玷污能力等. 然而, 金刚石薄膜表面  $sp^3$  结构的高稳定性又导致其表面的可再造性和可加工性差, 无法满足各种功能性表面的需求, 致使它在生物技术方面的应用至今未能完全打开局面. 研究表明,

如在金刚石薄膜的表面引入有机 (生物) 分子, 将会大大扩展金刚石薄膜的可应用领域. 这里不妨将金刚石表面看成是由碳碳二聚体 (Dimers)<sup>[7]</sup> 组成的, 且能与含 C=C 的有机分子发生 [2+2] 环加成反应. 基于此, Hamers 研究组<sup>[8]</sup> 已经成功地利用含有 C=C 的氨基化合物经过环加成反应而将金刚石表面功能化, 而且由于它具备生物兼容性, 有望作为新型生物芯片而被广泛应用. 本文以硼掺杂金刚石薄膜 (BDD) 作基底材料, 应用光化学方法将含有双键的烯丙胺化合物键合到 BDD 表面并形成氨基单分子层. 再利用共价键合法将酪氨酸酶固定在氨基化的金刚石表面, 由循环伏安法研究经酪氨酸酶修饰的 BDD 电极在检测酚类化合物方面的应用.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

酪氨酸酶 (PPO, 来自 mushroom, EC 1.14.18.1, 3216 units · mg<sup>-1</sup>, Fluka)、苯酚和对甲基苯酚 (Wako Chemical Co. Japan)、对苯二酚及其它化学试剂均为分析纯 (韦斯实验用品有限公司), 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 6.5)

由  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  配成. 实验用水均为二次纯水 ( $R > 18 \text{ M} \cdot \text{cm}$ , Milli-Q 纯水仪制备).

X 射线光电子能谱 (XPS) 数据由 ESCAL-ab220 FXL 检测器收集 (激发源 Al K- $\alpha$ ). 电化学测量使用 Princeton Applied Research 263A 恒电位/恒电流测定仪 (EG&G 公司). 三电极体系装置如图 1 所示. 以酪氨酸酶修饰的金刚石电极 (PPO/BDD, 电极面积  $0.07 \text{ cm}^2$ ) 作工作电极, 铂电极作对电极, 饱和甘汞电极 (SCE) 作参比电极, 电解液即上述缓冲溶液 (PBS), 循环伏安测试扫描速率为  $25 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . 室温下实验, 测定前溶液先经高纯氮除氧至少 15 min.

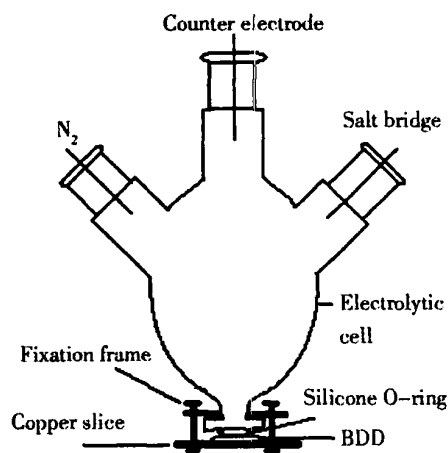


图 1 电化学测定体系示意图

Fig 1 Schematic illustration of the electrochemical measuring system (copper slice was used to connect the working electrode)

## 1.2 PPO/BDD 电极的制备

1) BDD 薄膜: 应用微波等离子体法 (MPCVD) 于硅基板上沉积金刚石复合多晶薄膜 (BDD 薄膜) [9].

2) BDD 表面的氨基化: 将 BDD 电极分别经异丙醇和二次纯水超声清洗 15 min, 氮气吹干. 为防止烯丙胺活性的氨基与金刚石表面的 C 直接键合, 实验时须用叔丁氧基酰基 (tBOC) 加以保护. 取  $20 \mu\text{L}$  tBOC 基团保护的烯丙胺化合物滴到清洗干净的 BDD 表面 ( $1 \text{ cm}^2$ ), 接着将其置于氮气鼓泡的带有石英皿盖的 Teflon 反应器中, 在 254 nm 的紫外光照下反应 12 h, 得到带有保护基的氨基终

端的 BDD 片. 然后依次经 25% 三氟乙酸 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  为溶剂) 浸泡 1 h 和 10% 氨水浸泡 3 min 脱去保护基, 即得活性氨基终端的 BDD 表面.

3) PPO 的固定: 将氨基化的 BDD 片用 O 型橡胶圈 (胶圈面积  $0.07 \text{ cm}^2$ ) 固定在电解池中, 取 0.3 mg 酪氨酸酶溶解于  $50 \mu\text{L}$  纯水, 之后滴到氨基化的 BDD 电极表面, 接着滴上  $10 \mu\text{L}$  2.5% 戊二醛水溶液, 即得 PPO/BDD 电极. 放在冰箱中干燥条件下 4 保存备用.

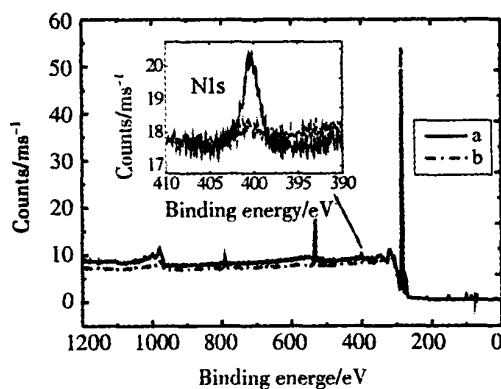


图 2 原生和氨基化 BDD 表面的 XPS 图谱

Fig 2 XPS spectra of the as-grown BDD (b) and the aminated BDD surfaces (a)

## 2 结果与讨论

### 2.1 氨基终端的 BDD 电极表面的表征

图 2 示出原生的和表面氨基化了的 BDD 电极的 XPS 分析谱线. 两者相比, 氨基化后的 BDD 表面在  $400.3 \text{ eV}$  (以  $\text{C} 1\text{s}$   $284.8 \text{ eV}$  为标准) 处的  $\text{N}(1\text{s})$  峰明显增大, 表明烯丙基胺已经键合到 BDD 表面并形成了氨基单分子层, 从而产生了与生物分子作用的位点.

### 2.2 PPO/BDD 电极定性检测酚类

图 3 分别示出对甲基苯酚在酪氨酸酶修饰的、原生的和氨基化了的 BDD 电极上的循环伏安曲线. 如图, 未经酶修饰的电极, 除了溶解氧外, 不出现其它物质的还原峰, 而在酪氨酸酶修饰的 BDD 电极上, 则于  $-0.1 \text{ V}$  (vs SCE) 附近出现明显的还原峰 (曲线 3), 这是酶触反应产物在电极表面的还原. 其反应机理如下:

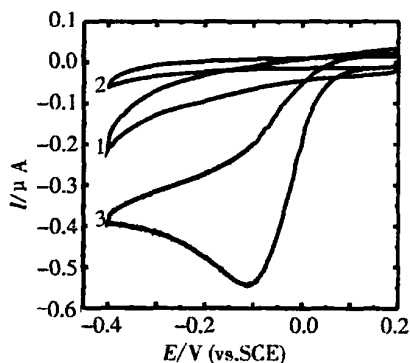
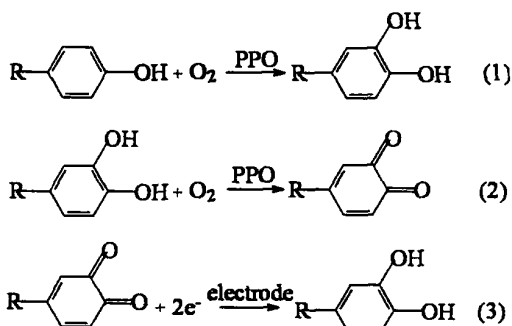


图 3 0.1 mmol · L<sup>-1</sup>对甲基苯酚在原生 BDD (1), 氨基化 BDD (2)和 PPO/BDD (3)电极上的循环伏安曲线

Fig 3 Cyclic voltammograms of 0.1 mmol · L<sup>-1</sup> *p*-cresol at as-grown BDD (1), aminated BDD (2) and PPO/BDD (3) electrodes  
scan rate 25 mV · s<sup>-1</sup>, supporting electrolyte: 0.1 mol · L<sup>-1</sup> PBS (pH 6.5)



在同一实验条件下,苯酚、对苯二酚等酚类化合物也给出类似的结果,而对硝基苯酚及双酚 A 则响应电流很小,还原峰不明显。

### 2.3 PPO/BDD 电极定量检测酚类

图 4 示出不同浓度的对甲基苯酚于酪氨酸酶修饰的 BDD 电极上的循环伏安曲线。如图,其还原峰电流随着浓度的增加而增大。实验同时表明,苯酚、对甲基苯酚和对苯二酚等 3 种酚类化合物的还原峰电流皆与其浓度呈很好的线性关系,即如图 5 所示,3 者的线性浓度范围依次为 1 ~ 100、1 ~ 75、1 ~ 100 μmol · L<sup>-1</sup> ( $r > 0.999$ )。

据图 5,算得苯酚、对甲基苯酚和对苯二酚的检测灵敏度分别为 14.56、90.44、22.61 mA/mol · L<sup>-1</sup> · cm<sup>2</sup>。此较高之灵敏度可归因于金刚石基底良好的生物相容性以及酪氨酸酶与氨基化金刚石

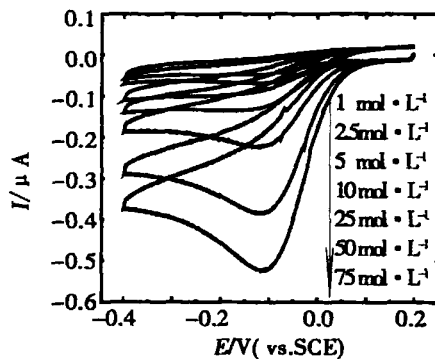


图 4 PPO/BDD 电极上不同浓度对甲基苯酚的 CV 曲线

Fig 4 Cyclic voltammograms of the *p*-cresol with different concentration at PPO/BDD electrodes  
scan rate: 25 mV · s<sup>-1</sup>, supporting electrolyte: 0.1 mol · L<sup>-1</sup> PBS (pH 6.5)

表面酰胺键的共价键合。但由于酪氨酸酶对不同底物分子选择性的差异,以致以上 3 者的检测灵敏度也大有不同,原因是酪氨酸酶对含有供电子基的酚类分子催化氧化能力比含有吸电子基的强<sup>[10]</sup>,于是对甲基苯酚的检测灵敏度必高于苯酚;虽然一个对苯二酚分子含两个酚羟基,但当一个酚羟基被氧化后,其形成的邻苯二醌类中间体由于空间位阻的影响<sup>[11]</sup>,使得另一个酚羟基不能再被有效的氧化,故其检测灵敏度亦仅稍高于苯酚。诚如上述,对硝基苯酚和双酚 A 于 PPO/BDD 电极上的响应电流很小,这是因为前者含有强吸电子基团而后者则存在结构上的空间位阻效应,所以酪氨酸酶对此二者的催化氧化能力均很低。

### 2.4 PPO/BDD 电极的稳定性

使用上述 PPO/BDD 电极,每隔一日测定一次 0.1 mmol · L<sup>-1</sup> 对甲基苯酚的响应电流 (该电极不使用于干燥条件下 4 保存)。结果表明,经一个月后其活性仍可保持原来的 90%,但如使用由硅烷化试剂 (ATPES) 固定酪氨酸酶的 BDD 电极<sup>[12]</sup>,则其活性只有几天而已。PPO/BDD 电极高的稳定性首先是由于金刚石基底良好的生物相容性 (表现在为酶分子提供良好的生物微环境) 及其高电化学稳定性和表面强抗污染能力,此外还包括酪氨酸酶与 BDD 稳定的共价键合。

## 3 结 论

使用 PPO/BDD 电极检测苯酚、对甲基苯酚和

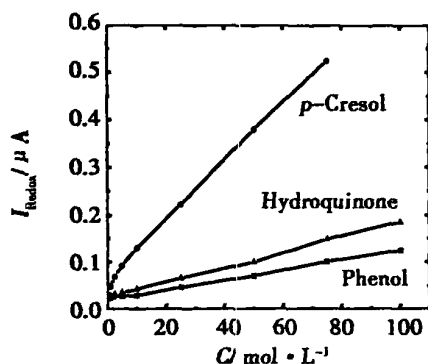


图 5 PPO/BDD 电极对 3 种酚类化合物响应电流随其浓度变化关系

Fig 5 Variation of the responsive current with its concentration for three phenolic compounds at PPO/BDD electrodes

scan rate:  $25 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , supporting electrolyte:  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS (pH 6.5)

对苯二酚等 3 种酚类化合物均显示较宽的线性响应范围 (依次为  $1 \sim 100$ 、 $1 \sim 75$ 、 $1 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 和较高的灵敏度 (依次为  $14.56$ 、 $90.44$ 、 $22.61 \text{ mA} / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ ) 及较高的稳定性 (30 d 活性可保持原来的 90%)。酪氨酸酶在 BDD 基底上成功的固定说明了其在生物传感器方面的应用的可行性, BDD 表面的修饰工作有待进一步深入研究, 使它能够作为理想的生物基底材料得到广泛的应用。

## 参考文献 (References):

[1] Besombes J L, Cosnier S, Labbl  P, et al A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides[J]. Anal Chim. Acta, 1995, 311: 255 ~ 263.

[2] Dempsey E, Diamond D, Collier A. Development of a biosensor for endocrine disrupting compounds based on tyrosinase entrapped within a poly (thionine) film [J]. Biosens Bioelectron, 2004, 20: 367 ~ 377.

[3] Rajesh, Kaneto K A new tyrosinase biosensor based on covalent immobilization of enzyme on N-(3-aminopropyl) pyrrole polymer film [J]. Curr Appl Phys, 2005, 5: 178 ~ 183.

[4] Koile R C, Johnson D C Electrochemical removal of phenolic films from a platinum anode [J]. Anal Chem, 1979, 51: 741 ~ 744.

[5] Perret A, Haenni W, Skinner N, et al Electrochemical behavior of synthetic diamond thin film electrodes [J]. Diamond Relat Mater, 1999, 8: 820 ~ 823.

[6] Zhi J F, Tian R H. Electrochemistry of diamond thin film [J]. Prog Chem, 2005, 17(1): 55 ~ 63.

[7] Yang Y L, D'Evelyn M P. Structure and energetics of clean and hydrogenated diamond (100) surfaces by molecular mechanics [J]. J. Am. Chem. Soc, 1992, 114: 2796 ~ 2801.

[8] Knickerbocker T, Strother T, Schwartz M P. DNA modified diamond Surfaces [J]. Langmuir, 2003, 19: 1938 ~ 1942.

[9] Zhi J F, Wang H B, Nakashima T, et al Electrochemical incineration of organic pollutants on boron-doped diamond electrode: evidence for direct electrochemical oxidation pathway [J]. J. Phys Chem. B, 2003, 107: 13389 ~ 13395.

[10] Seo S Y, Shama V K, Shama N. Mushroom tyrosinase: recent prospects [J]. J. Agric Food chem, 2003, 51: 2837 ~ 2853.

[11] Yoshida M, Ono H, Mori Y, et al Oxidation of bisphenol A and Related compounds [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(6): 1444 ~ 1446.

[12] Notsu H, Tatsuma T, Fujishima A. Tyrosinase-modified boron-doped diamond electrodes for the determination of phenol derivatives [J]. J. Electroanal Chem, 2002, 523: 86 ~ 92.

## Tyrosinase Immobilization on Boron-doped Diamond Electrodes and the Determination of Phenolic Compounds

ZHOU Yan-li, ZH I J in-fang\*

(Technical Institute of Physics and Chemistry of CAS, Beijing 100080, China)

**Abstract:** As-grown BDD surfaces were first functionalized by photochemically linking vinyl groups of allylamine, producing covalently linked amine-terminated active BDD surfaces. Then the tyrosinase was immobilized onto the BDD surface through peptide linking. Cyclic voltammograms of phenol, *p*-cresol and hydroquinone were measured using the tyrosinase-modified BDD electrode and amperometric characteristics such as sensitivity, linear response range and stability were studied.

**Key words:** Boron-doped diamond, Allylamine, Tyrosinase, Phenolic compounds