

学校编码: 10384

分类号 密级

学 号: 20620121151403

UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

用 PEDOT(BSA)复合膜构建新型过氧化氢生物感测器
的技术及其性质研究

The techniques and characterizations of a new H₂O₂ biosensor
prepared with poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/BSA complex film

任 帅 斌

指导教师姓名: 徐方成 副教授

顾野松 教授

企业导师: 黄全佳 高级工程师

专业名称: 化 学 工 程

论文提交日期: 2015 年 月

论文答辩日期: 2015 年 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

() 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

() 2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。

声明人(签名)：

年 月 日

摘要

在现代医学领域，疾病的预防与诊断方法的研究对人体健康至关重要。传统的临床诊断通常依赖化学和生化手段，操作过程复杂且耗时；有时由于所需程序繁杂以及不可避免的人为错误，使得结果缺少准确性。目前为止，人们正在研究构建生物检测器用于未来的临床诊断，希望一种好的生物检测器应该具有简单、便宜、持久可用甚至易于植入人体等方面的潜力。虽然近年来该领域有了很大的发展，但是在稳定性、灵敏度、可靠性等方面，生物检测器依然在实际应用中面临关键性的技术挑战。因此，构建稳定性好、灵敏度高、持久耐用且具有生物相容性的生物检测器，对人体疾病的预防与诊断具有重要意义。

本论文中，我们利用电化学方法将导电高分子聚二氧乙烯噻吩(PEDOT)聚合在 Pt 表面，同时研究了 BSA 的添加对 PEDOT 膜稳定性的影响。然后，将柠檬酸钠还原法制备的纳米金(AuNPs)粒子修饰在 PEDOT(BSA)复合膜上，进而以 AuNPs 对蛋白质的相互作用固定辣根过氧化物酶 HRP，完成生物检测器的构建。

首先，在聚合 PEDOT 时添加 BSA，由于 BSA 在聚合过程中的模板作用以及对 Pt 亲疏水性的影响，使得 PEDOT(BSA)复合膜比 PEDOT 膜具有更好的稳定性；而 SEM 观察结果表明，在正电压条件下，PEDOT(BSA)/Pt 对 AuNPs 的吸附效果较好，最佳吸附电压为+1.0 V，此时的最佳吸附时间为 1 hour。此外，HRP 的固定化方法是在室温下将 AuNPs/PEDOT(BSA)/Pt 电极浸入 5 g/L 的 HRP 溶液中 30 min，持续轻微搅拌。

其次，我们以循环伏安法，用构建好的 HRP/AuNPs/PEDOT(BSA)/Pt 电极在磷酸缓冲液(0.1 M, pH 6.2)中检测不同浓度过氧化氢。结果表明，当扫描范围为-0.2~0.8V，扫描速度为 50mV，在电压+0.1V 附近有明显的还原峰；且所得阳极电流与对应的过氧化氢浓度之间有良好的线性关系，线性范围为 8 μM ~ 15 mM，检测灵敏度为 719.4 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。

再者，当我们向检测溶液中添加 50 μM 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)时，NAD⁺作为电子传递介体能够显著增强生物检测器的检测灵敏度，使其提高 35.5%，达到 974.84 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。有趣的是，PEDOT(BSA)/Pt 和 AuNPs/PEDOT(BSA)/Pt 两种电极也对过氧化氢表现出一定的电化学活性，不过 NAD⁺对这两种电极检测灵敏度的促进作用较为微弱。

另外，为了探讨 Au 与 PEDOT 中 S 的成键方式，我们用 FTIR、XPS 以及 Raman 原位检测 PEDOT、PEDOT(BSA)、Au/PEDOT(BSA)三种膜表面化学键组成及变化。结果表明，PEDOT 中 S 是以配位键形式与 Au 结合，而 BSA 中 S 则是以共价键形式与 Au 结合。

总之，本实验制得的 HRP/AuNPs/PEDOT(BSA)/Pt 生物检测器稳定性好、灵敏度高、可靠性强、具有生物相容性。

关键词：牛血清蛋白；聚二氧乙烯噻吩；纳米金颗粒；循环伏安；辣根过氧化物酶生物检测器

Abstract

Upon great progress has been made in modern medicine, the development of a variety of pre-diagnostic methods is becoming extremely important to save the lives of human beings. Traditional clinical diagnostic tools often rely on the chemical and biochemical approaches that are often complicated and tiresome, and sometimes may lack precision due to the multiple procedures required and inevitable human errors. So far, researchers are working on constructing biosensors with less preparation stages for future clinical diagnosis. In addition, a good biosensor is expected to provide great promise to achieve good prospects in simplicity, cheapness, long shelflife, and even be implanted in human body. Even though an increasing number of publications have been issued recently, there are still some key technical barriers to bring the fruitful laboratory researches into the marker of biosensor, such as stability, detection sensitivity, and reliability.

In this study, we have investigated the contribution of bovine serum albumin (BSA) to the stability of electrochemically synthesized PEDOT film on a platinum (Pt) electrode. After that, the gold nanoparticles (AuNPs) prepared by sodium citrate reduction were used to modify the PEDOT (BSA) film. HRP molecules were then immobilized to the complex film through the interactions with AuNPs in order to fabricate the HRP/AuNPs/PEDOT (BSA)/Pt electrode.

First of all, to the addition of BSA into the reaction solution during the electrochemical polymerization of PEDOT, the newly synthesized PEDOT (BSA) film showed the better stability than that of PEDOT film, in which BSA might neutralize the surface properties of Pt electrode and also serve as the template for the polymerization of PEDOT. Based on the SEM images, we noticed that the positive charged PEDOT film could immobilize much more AuNPs than that of negative charged PEDOT film, therefore the most suitable potential and time applied for AuNPs adsorption were +1.0 V and one hour, respectively. After that, the AuNPs/PEDOT(BSA)/Pt electrode was soaked in a PBS buffer solution (pH 6.2) containing 5 mg/ml HRP for 30 min under the room temperature with gentle agitating and the HRP/AuNPs/PEDOT(BSA)/Pt electrode was successfully constructed.

Thereafter, cyclic voltammetry (CV) was employed to evaluate the performance of the biosensor through the measurement of hydrogen peroxide (H_2O_2). A sharply reduction peak appeared at about +0.1V within the potential window of -0.2~0.8V

and a scan rate of 50 mV/s. Moreover, our results revealed a satisfied linear correlation between the cathodic current and the concentration of H₂O₂ in the range of 8 μM ~ 15 mM, and the detection sensitivity was 719.4 μA•mM⁻¹•cm⁻¹.

Furthermore, the addition of oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), or NAD⁺, as the electron transfer mediator in the detection solution could dramatically enhance the sensitivity of detection by about 35.5%. Interestingly, both AuNPs/PEDOT (BSA)/Pt and PEDOT (BSA)/Pt have also shown the electrochemical activity towards H₂O₂, but their performances were only slightly enhanced by NAD⁺.

In addition, in order to understand the mechanism of the bond formation between Au and S elements in this study, we employed the FTIR, XPS and Raman to detect the surface composition of PEDOT, PEDOT(BSA), AuNPs /PEDOT(BSA) film. The results revealed the possible covalent binding for the interaction between Au and the S of PEDOT, whereas a potential coordination bond formed between Au and S of BSA.

In conclusion, the HRP/AuNPs/PEDOT (BSA)/Pt electrode constructed in the study has the good stability, competitive sensitivity, high reliability, and biocompatibility.

Key words: bovine serum albumin; poly (3, 4-ethylenedioxythiophene); gold nanoparticle; HRP biosensor; electron transfer mediator; cyclic voltammograms;

目 录	
摘 要	I
1 绪论	1
1.1 过氧化氢	1
1.1.1 概述	1
1.1.2 过氧化氢的性质与结构	1
1.1.3 过氧化氢的检测	2
1.2 生物检测器	3
1.2.1 生物检测器的定义	4
1.2.2 生物检测器的分类	5
1.3 过氧化氢生物检测器	8
1.4 辣根过氧化酶 HRP	9
1.4.1 辣根过氧化酶(HRP).....	10
1.4.2 HRP 的结构与性质.....	11
1.4.3 HRP 的应用.....	13
1.4.4 酶固定化方法	14
1.5 导电高分子 PEDOT	15
1.5.1 PEDOT 简介.....	15
1.5.2 PEDOT 的聚合方法.....	16
1.6 纳米金	18
1.6.1 纳米材料性质	18
1.6.2 纳米金性质与合成方法	20
1.7 研究目的及内容	24
1.7.1 研究目的	24
1.7.2 研究内容	24
1.7.3 实验技术路线	25
2 材料与方法	26
2.1 实验材料	26
2.1.1 主要实验试剂	26
2.1.2 仪器设备	27
2.1.3 溶液配制	29
2.2 实验方法	30

2.2.1	纳米金 AuNPs 的制备	30
2.2.2	蛋白质定性分析	31
2.2.3	HRP 活性分析	32
2.2.4	Ag/AgCl (3M NaCl) 参比电极的制备	33
2.2.5	工作电极的制备	34
2.2.6	过氧化氢的 CV 检测	36
2.3	分析方法	37
2.3.1	扫描式电子显微镜 SEM	37
2.3.2	穿透式电子显微镜 TEM	37
2.3.3	表面电位仪 Zeta-potential	38
2.3.4	傅里叶转换红外光谱 (FTIR)	38
2.3.5	化学分析电子能谱仪 (XPS)	39
2.3.6	拉曼光谱仪 (Raman)	41
3	纳米金的制备	42
3.1	粒径为 16nm 的 AuNPs 制备	42
3.2	AuNPs 溶液的 UV-VIS 扫描	44
3.3	TEM 观察	45
3.4	不同粒径 AuNPs 粒子的制备	46
3.5	小结	47
4	HRP 活性分析	48
4.1	HRP 标准曲线	48
4.2	HRP 生物活性的检测	49
4.3	小结	51
5	电极制备与检测性质分析	52
5.1	PEDOT/Pt 制备	52
5.1.1	PEDOT 膜 CV 聚合及机理分析	52
5.1.2	PEDOT 膜对 Pt 电极的修饰	53
5.1.3	Raman 分析	55
5.2	BSA 的添加对 PEDOT/Pt 电极的影响	57
5.2.1	Pt 电极与 BSA 的亲水性	57
5.2.2	BSA 的添加对 PEDOT 膜稳定性的影响	58
5.2.3	最佳 BSA 添加量	58
5.3	Au/PEDOT(BSA)/Pt 电极的制备	59

5.4	HRP 固定化	61
5.5	用修饰过的电极检测过氧化氢	63
5.5.1	扫描范围的选择	63
5.5.2	循环伏安法 CV 检测过氧化氢	64
5.6	NAD ⁺ 的添加	65
5.6.1	最佳 NAD ⁺ 添加量的选择	65
5.6.2	NAD ⁺ 的添加对 HRP/AuNPs/PEDOT(BSA)/Pt 电极的促进	67
5.6.3	与 NADH 的对比	70
5.6.4	DPV 检测	71
5.7	反应过程扩散类型	72
5.8	小结	74
6	对 Au-S 键结合情况的探讨	76
6.1	Au-S 键结初步讨论	76
6.2	FTIR 分析	77
6.2.1	样品准备过程	77
6.2.2	FTIR 图谱	78
6.3	XPS 分析	80
6.3.1	样品准备过程	80
6.3.2	XPS 图谱分析	80
6.4	Raman 分析	88
6.4.1	样品准备过程	88
6.4.2	Raman 图谱分析	88
6.5	小结	90
7	总结与展望	91
	参考文献	94
	硕士在读期间发表成果	100
	致 谢	101

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
1 Introduction	1
1.1 Hydrogen peroxide	1
1.1.1 Overview.....	1
1.1.2 The property and structure of H ₂ O ₂	1
1.1.3 The detection of H ₂ O ₂	2
1.2 Biosensors	3
1.2.1 The definition of biosensors	4
1.2.2 The classification of biosensors.....	5
1.3 The biosensors of hydrogen peroxide	8
1.4 Horseradish peroxidase	9
1.4.1 Overview.....	10
1.4.2 The property and structure of HRP.....	11
1.4.3 The function of HRP.....	13
1.4.4 The methods of enzyme immobilization	14
1.5 The conducting polymer PEDOT	15
1.5.1 PEDOT	15
1.5.2 The polymerization methods of PEDOT.....	16
1.6 Gold nanoparticles	18
1.6.1 Properties of nano materials	18
1.6.2 The synthetic methods of gold nanoparticles.....	20
1.7 Research purpose and contents	24
1.7.1 Research purpose	24
1.7.2 Research contents	24
1.7.3 Technique route	25
2 Materials and methods	26
2.1 Materials	26
2.1.1 The main labrotary reagents	26
2.1.2 Instruments	27
2.1.3 The preparation of solution.....	29
2.2 Experimental Methods	30
2.2.1 Preparation of AuNPs.....	30

2.2.2	The detection of protein.....	31
2.2.3	The activity analysis of HRP.....	32
2.2.4	Construction of reference electrode.....	33
2.2.5	Construction of working electrode.....	34
2.2.6	The detection of H ₂ O ₂ with biosensors.....	36
2.3	Analytical methods.....	37
2.3.1	SEM.....	37
2.3.2	TEM.....	37
2.3.3	Zeta-potential.....	38
2.3.4	FTIR.....	38
2.3.5	XPS.....	39
2.3.6	Raman.....	41
3	Preparation of gold nanoparticles.....	42
3.1	Manufacturing process of 16nm AuNPs.....	42
3.2	UV-VIS of AuNPs solution.....	44
3.3	TEM observation.....	45
3.4	Preparation of AuNPs with different sizes.....	46
3.5	Summary.....	47
4	The activity analysis of HRP.....	48
4.1	Standard curve of HRP.....	48
4.2	Activity detection of HRP-AuNPs.....	49
4.3	Summary.....	51
5	Results of CV detection.....	52
5.1	Analysis of PEDOT/Pt electrode.....	52
5.1.1	Polymerization method and mechanism of PEDOT.....	52
5.1.2	Modification of platinum with PEDOT film.....	53
5.1.3	Raman analysis.....	55
5.2	The effect of BSA to PEDOT film.....	57
5.2.1	Compatibility between BSA solution and Pt.....	57
5.2.2	Stability of PEDOT(BSA) film.....	58
5.2.3	The suitable BSA concentration.....	58
5.3	Construction of AuNPs/PEDOT(BSA)/Pt.....	59
5.4	The immobilization of HRP.....	61
5.5	Detection of H ₂ O ₂ with HRP/AuNPs/PEDOT(BSA)/Pt.....	63
5.5.1	Selection of scan range.....	63
5.5.2	CV detection of H ₂ O ₂ solution.....	64

5.6	The effect of NAD⁺	65
5.6.1	Option of NAD ⁺ concentration	65
5.6.2	The function of NAD ⁺ in ET	67
5.6.3	Comparison of NADH and NAD ⁺	70
5.6.4	DPV	71
5.7	The diffusive type of reaction process	72
5.8	Summary	74
6	Research on Au-S bond type	76
6.1	Preliminary discussion	76
6.2	FTIR analysis	77
6.2.1	Sample preparation	77
6.2.2	FTIR spectrogram	78
6.3	XPS analysis	80
6.3.1	Sample preparation	80
6.3.2	XPS spectrogram	80
6.4	Raman analysis	88
6.4.1	Sample preparation	88
6.4.2	Raman spectrogram	88
6.5	Summary	90
7	Summarization and outlook	91
	References	94
	Published results	100
	Acknowledgments	101

1 绪论

1.1 过氧化氢

1.1.1 概述

自由基(free radical), 又称游离基, 是指化合物的分子在光热等外界条件下, 共价键发生均裂而导致外层轨道上形成的具有不成对电子的原子或基团。自由基极易发生反应(如二聚反应、氧化反应、歧化反应等)。集体氧化反应中产生的有害化合物, 具有强氧化性, 可损害机体的组织和细胞, 进而引起慢性疾病及衰老效应^[1-3]。自由基可以是带正电荷、负电荷、或者不带电荷。除了极个别情况下, 大多数的未成对电子形成的自由基都具有较高的化学活性。如果体内含有自由基, 被认为会导致退化性疾病和癌症。在化学生物学当中, 过氧化氢和一氧化氮调节着许多生物过程比如控制血管张力。这样的自由基可以作为一种称为氧化还原信号当中的信使。自由基反应机理如图 1-1 所示。

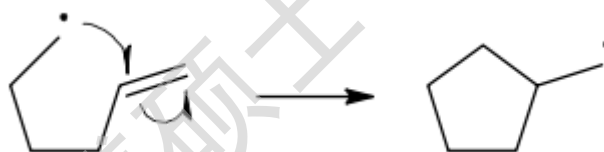


图 1-1 自由基反应机理

Fig. 1-1 Radical reaction mechanism

生物体内的有氧代谢过程, 可形成众多种类的自由基, 最常见的为含氧自由基, 包括超氧阴离子、过氧化氢、氢氧自由基、单重态氧等, 这类带有不稳定电子的含氧自由基, 又称为活性氧^[4]。

生物体中存在各种可代谢自由基的抗氧化酶, 如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSHPx), 并偶联特定的代谢途径清除过剩的代谢自由基, 维持生物体内自由基的动态平衡。

1.1.2 过氧化氢的性质与结构

纯过氧化氢是淡蓝色的粘稠液体, 熔点 $-0.43\text{ }^{\circ}\text{C}$, 沸点 $105.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。它的缔合程度比 H_2O 大, 所以它的介电系数和沸点比水高。纯过氧化氢比较稳定, 若加热到 $153\text{ }^{\circ}\text{C}$ 便可猛烈的分解为水和氧气。过氧化氢可与水以任意比例互溶, 因

其可以发生微弱电力解离释放出质子，所以溶液呈弱酸性。过氧化氢分子为椅型结构，如图 1-2 所示。左图为气态时的结构，右图为固态晶体时的结构。

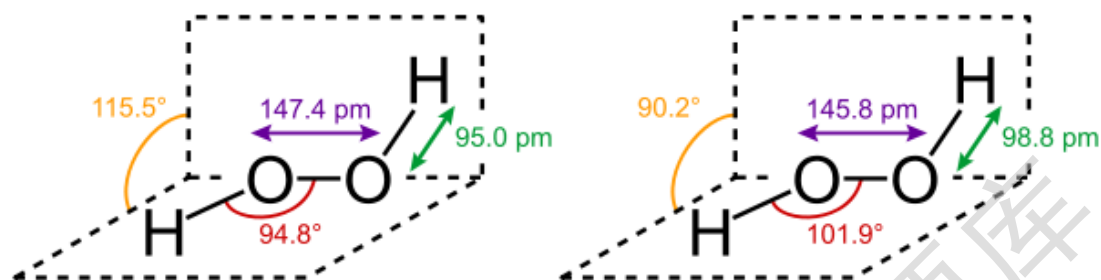


图 1-2 过氧化氢分子结构

Fig. 1-2 The molecular structure of H_2O_2

1.1.3 过氧化氢的检测

当超氧阴离子自由基生成后，会被生物体内用于消除超氧阴离子自由基的 SOD 作用而转化成过氧化氢，为了防止细胞中过氧化氢的大量积累，所产生的过氧化氢会被 CAT 与 GSHPx 进一步代谢成水，未及时被代谢的过氧化氢可经由尿液排出生物体，因此通过尿液中过氧化氢浓度的测定，可以得知生物体内自由基浓度指标^[5-7]。根据 Long 等人的研究结果指出，当尿液中过氧化氢浓度高于 $100 \mu\text{M}$ 时，会与癌症、脑神经与心血管疾病产生有直接的关系^[8]。

在临床生化检验项目中，过氧化氢也是众多生化物质经过酶催化反应的产物，通过对过氧化氢浓度的测定，可间接得知生化待测物质的浓度，例如：血糖^[9,10]、尿素^[11,12]、尿酸^[12]、胆固醇^[13]与胆碱^[14]。

过氧化氢的检测非常重要，被广泛应用于临床医疗、食品、工业制程、环境监测等领域上，常见的检测方法有滴定法、酶法、光谱法与化学发光法，但这些方法存在容易有干扰、检测时间长、容易造成环境污染及分析所使用的试剂昂贵等缺点^[15,16]。而使用生物检测器检测过氧化氢，具有价格低廉、检测速度快与高灵敏度等优点，是近年来被大量研究发展的方法^[17,18]。

1.2 生物检测器

生物检测器是能够使用生物辨识元件结合换能器，用来提供体内或体外检测对象的定量或者半定量分析信息的独立集成装置^[19, 20]。

生物传感器主要由两个关键部分构成。第一部分为具有特异性的生物辨识元件(例如：核酸、蛋白质、抗体与细胞)，主要包含具有检测待测物质能力的生物分子，这是生物检测器的信号接收或产生部分；第二部分为信号转换器，可以将生化性讯号转变成可以用来处理及显示的讯号。生物检测器的构成与检测原理如图 1-3 所示。

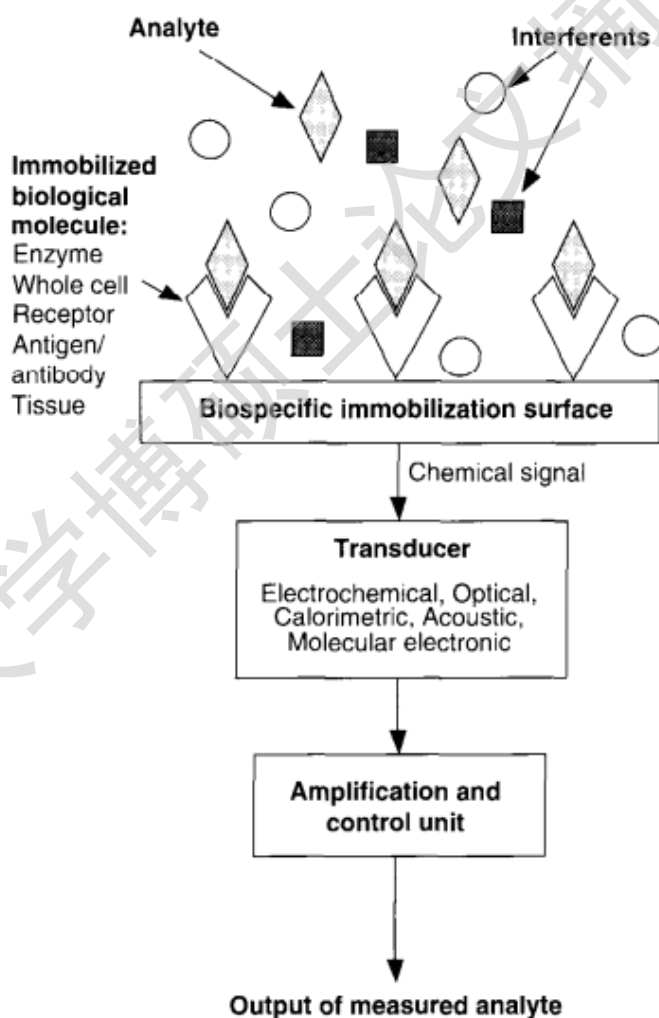


图 1-3 生物检测器检测原理^[21]

Fig. 1-3 The operating principle of biosensor

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库