

# 纳米二氧化钛对辣根过氧化物酶催化作用

朱亚琦, 武海, 刘辉, 马洁\*

(首都师范大学化学系 北京 100037)

**摘要:** 将辣根过氧化物酶(HRP)固定在二氧化钛( $\text{TiO}_2$ )纳米颗粒或纳米管修饰玻碳电极(GC)上,形成纳米 $\text{TiO}_2$ 微粒/HRP修饰GC电极和 $\text{TiO}_2$ 纳米管/HRP修饰GC电极.比较了HRP在纳米 $\text{TiO}_2$ 微粒、 $\text{TiO}_2$ 纳米管电极上的直接电子转移反应.实验表明,HRP在 $\text{TiO}_2$ 纳米管电极表面更能有效地促进它的电活性中心发生电子交换反应.此外,还测定了HRP标记抗体的电化学性能,为抗原抗体免疫反应信号的选择提供了参考依据.

**关键词:** 二氧化钛纳米管;电极修饰;直接电催化;辣根过氧化物酶

**中图分类号:** O 646

**文献标识码:** A

近年来电化学免疫传感器因其具有免疫反应的高选择性和电化学分析的高灵敏性等特点而广泛应用于医疗生物等领域<sup>[1-3]</sup>.然而,此类传感器大都是通过酶标氧化还原蛋白而产生免疫反应电流信号.而一般使用的HRP,其氧化还原活性中心都深埋在酶分子内部,通常情况下难以到达电极表面发生反应<sup>[4,6]</sup>.为了使酶能在电极表面发生可逆或准可逆的直接电子转移反应,探索合适的电极材料和修饰方法是非常重要的.近20年来,半导体纳米二氧化钛以其廉价无毒、抗腐蚀、催化活性高、氧化能力强、稳定性好等优势,受到人们的广泛关注<sup>[7-9]</sup>.已有文献报道将二氧化钛纳米微粒修饰到电极表面,用于研究血红蛋白和HRP的直接电化学行为<sup>[10-12]</sup>.而利用二氧化钛纳米管更强的吸附能力和管状结构的填充效应来固定HRP,研究其相关的直接电子转移反应还未见报道.

本文以AAO作模板,应用溶胶凝胶法制得管径均匀、可控的 $\text{TiO}_2$ 纳米管,再将 $\text{TiO}_2$ 纳米管修饰在玻碳电极表面.比较研究了HRP在纳米 $\text{TiO}_2$ 微粒、 $\text{TiO}_2$ 纳米管修饰的玻碳电极表面上的直接电子转移过程.同时初步研究了标记在抗体中的HRP在 $\text{TiO}_2$ 纳米管修饰电极表面的电化学性能,为抗原抗体的免疫反应信号的选择提供了参考依据.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器及试剂

M273恒电位仪(EG&G PARC公司,美国);KL-009型袖珍数字显示酸度计(科立龙电子有限公司).

辣根过氧化物酶(北京鼎国公司,进口分装),HRP标记羊抗小鼠抗体(北京鼎国公司,进口分装),纳米二氧化钛微粒(深圳忠正纳米科技有限公司),AAO模板(Whatman International Ltd,孔径100nm),0.1mol/L磷酸盐缓冲溶液(PBS)由 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 按不同比例配制,不同浓度的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液均由30%的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液用0.1mol/L PBS稀释得到,其他试剂均为分析纯.实验用水均为超纯水,电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ .

### 1.2 溶胶-凝胶法制备 $\text{TiO}_2$ 纳米管

将一定量的钛酸四丁酯与无水乙醇混合(混合液①),再量取一定量的无水乙醇、去离子水、盐酸和表面活性剂十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)混合(混合液②),在冰水浴中,磁力搅拌混合液①,10min后,将混合液②缓慢加入到混合液①,再搅拌10min,即为 $\text{TiO}_2$ 透明溶胶.将AAO模板浸入该溶胶,过一定时间后取出模板,置于马弗炉作后

期热处理, 得到含有纳米 TiO<sub>2</sub> 的模板, 再用 5% 的 NaOH 溶解 AAO 模板, 即得 TiO<sub>2</sub> 纳米管材料。

### 1.3 纳米 TiO<sub>2</sub>/HRP 电极制备

#### 1) 纳米 TiO<sub>2</sub> 微粒/HRP 修饰电极

取 10 mg 球磨 3 h 后的 TiO<sub>2</sub> 微粒溶于 10 mL 无水乙醇, 超声分散 20 min。取 5 μL 分散好的 TiO<sub>2</sub> 悬浊液滴在玻碳电极表面, 电极上罩一塑料管, 室温下缓慢晾干备用。将晾干的纳米 TiO<sub>2</sub> 微粒修饰电极浸于浓度为 5 mg/mL 的 HRP 溶液, 5 h 后, 得到纳米 TiO<sub>2</sub> 微粒/HRP 修饰电极。

#### 2) TiO<sub>2</sub> 纳米管/HRP 修饰电极

取适量上述制备的 TiO<sub>2</sub> 纳米管, 超声分散于无水乙醇中。用微量移液器移取一定量的该分散液滴于玻碳电极表面, 室温下晾干, 此时电极表面会形成一层 TiO<sub>2</sub> 纳米管涂层。然后将其浸于 5 mg/mL 的 HRP 溶液和 HRP 标记的抗体溶液中, 4℃ 下静置过夜, 经蒸馏水洗涤, 即为 TiO<sub>2</sub> 纳米管/HRP 修饰电极。

## 2 结果与讨论

### 2.1 TiO<sub>2</sub> 纳米管的 TEM 表征

图 1A 是 TiO<sub>2</sub> 纳米微粒经球磨超声分散后的 TEM 照片, 由图可见分散效果尚好, 颗粒直径约为 30 nm。图 1B 是以 AAO 为模板, 利用溶胶凝胶法制备的 TiO<sub>2</sub> 纳米管的 TEM 照片。该纳米管直径约 100nm, 与制作用的模板孔径一致, 且整管光滑均一。

### 2.2 HRP 在纳米 TiO<sub>2</sub> 上的直接电化学行为

#### 1) HRP 在纳米 TiO<sub>2</sub> 微粒上的直接电化学行为

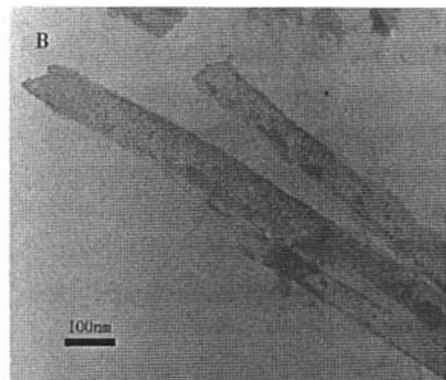
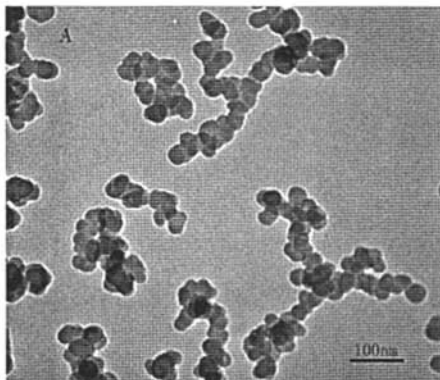


图 1 纳米 TiO<sub>2</sub> 微粒(A)和 AAO 模板制备的纳米管(B)的 TEM 照片

Fig. 1 TEM image of the nanoparticles(A) and nanotubes formed by AAO (B)

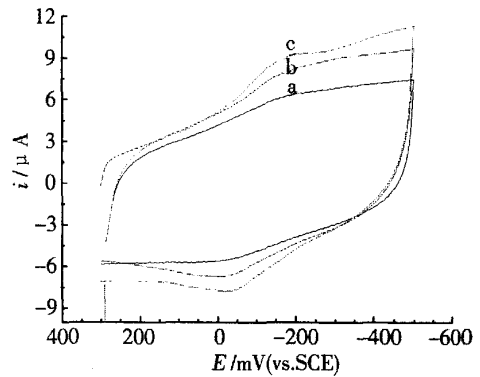


图 2 HRP/GC(a), HRP/纳米 TiO<sub>2</sub> 微粒/GC(b), HRP/TiO<sub>2</sub> 纳米管/GC(c) 电极在 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 中的循环伏安曲线

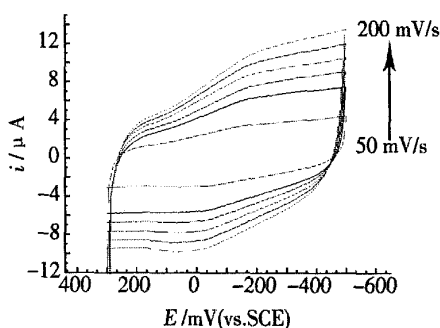
Fig. 2 Cyclic Voltammograms of the HRP modified GC electrode (a), HRP/TiO<sub>2</sub> nanoparticles/GC electrode (b) and HRP/TiO<sub>2</sub> nanotube/GC electrode (c) in PBS (pH 7.0)

图 2 给出纳米 TiO<sub>2</sub> 微粒/HRP 修饰电极和 TiO<sub>2</sub> 纳米管/HRP 修饰电极在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH = 7.0) 中测得的循环伏安曲线。图中显示一对氧化/还原峰, 表征 HRP 直接电子转移反应。在 100 mV/s 扫速下, 其氧化峰电位与还原峰电位分别为 HRP 修饰电极 (a)  $E_{pa} = -210$  mV (vs. SCE),  $E_{pc} = -45$  mV, 纳米 TiO<sub>2</sub> 微粒/HRP 修饰电极 (b)  $E_{pa} = -200$  mV,  $E_{pc} = -45$  mV, TiO<sub>2</sub> 纳米管/HRP 修饰电极 (c)  $E_{pa} = -195$  mV,  $E_{pc} = -50$  mV, 峰电位差各为: 纳米 TiO<sub>2</sub> 微粒/HRP 修饰电极 (b) 155 mV 和 TiO<sub>2</sub> 纳米管/HRP 修饰电极 (c) 140 mV。

但对应的氧化/还原峰电流却几乎相等,即  $i_{pa}/i_{pc} \approx 1$ . 较之仅含 HRP 修饰电极 (a), 后两者 (b)、(c) 峰电流明显增加, 由此可见纳米  $\text{TiO}_2$  确能促进 HRP 活性中心在电极上进行电子交换. 而在纳米管修饰电极上的 CV 曲线氧化峰还原峰电位差减小, 可逆性更好, 峰电流增加更多, 说明其可逆性比纳米  $\text{TiO}_2$  微粒/HRP 修饰电极好, 更能有效地促进 HRP 的催化作用.

实验同时表明, 如图 3 所示, 对纳米  $\text{TiO}_2$  微粒/HRP 修饰电极和  $\text{TiO}_2$  纳米管/HRP 修饰电极, 其于 0.1 mol/L PBS (pH = 7.0) 中循环伏安扫描的氧化/还原峰电流  $i_p$  皆与扫描速率  $v$  呈线性关系, 表明该电极反应是受表面过程控制的. 此外, 随着扫速的增加, 其氧化峰电位  $E_{pa}$  向正方向移动, 还原峰电位  $E_{pc}$  向负方向移动, 峰电位差  $\Delta E_p$  增加, 但式量电位  $E^0$  几乎不随扫速变化而变化. 根据扫速与峰电位的变化关系, 利用 Laviron 关于表面反应异相动力学常数的计算方法<sup>[13]</sup>, 得 HRP 在纳米  $\text{TiO}_2$  微粒/GC 电极和  $\text{TiO}_2$  纳米管/GC 电极上直接电子转移反应的表现速率常数  $K_s$  分别为  $0.736 \text{ s}^{-1}$  和  $1.32 \text{ s}^{-1}$ . 显然, 后者反应速率更快, 也就是  $\text{TiO}_2$  纳米管比纳米  $\text{TiO}_2$  微粒更能促进 HRP 的直接电子转移.

纳米  $\text{TiO}_2$  微粒直径约为 30nm, 而  $\text{TiO}_2$  纳米管除具有纳米颗粒的几何小尺寸效应外, 其管状结构能吸附更多蛋白, 并直接伸向氧化还原蛋白的活性中心, 这有利于蛋白与电极之间电子交换反应的发生. 文献[11]指出, Ti 原子与蛋白分子有特殊的螯合作用, 使得在含有  $\text{TiO}_2$  的电极上蛋白质分子能以一定的取向存在于电极表面.



2) 溶液 pH 对  $\text{TiO}_2$  纳米管/HRP 修饰电极的影响

图 4 是  $\text{TiO}_2$  纳米管/HRP 修饰电极在不同 pH 的 0.1 mol/L PBS 中的循环伏安曲线. 如图可见, 随着缓冲溶液 pH 值的增加, HRP 的氧化/还原峰电位均向负方向移动, 并且氧化峰电位  $E_{pa}$  和还原峰电位  $E_{pc}$  都与缓冲溶液 pH 呈线性变化关系, 对应的直线斜率分别为  $-60.9$  和  $-58.3 \text{ mV/pH}$ , 与理论的可逆 ( $1e + 1H^+$ ) 反应的斜率非常接近 ( $-58.5 \text{ mV/pH}, 22^\circ\text{C}$ ), 说明 HRP 在  $\text{TiO}_2$  纳米管/HRP 修饰电极表面直接电子转移的可逆性较好.

3)  $\text{TiO}_2$  纳米管/HRP 电极对  $\text{H}_2\text{O}_2$  电催化还原

图 5 示出 HRP/ $\text{TiO}_2$  纳米管/GC 电极对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的电催化还原作用. 可以看出, 对含有  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 PBS, 其 CV 曲线发生了很大的变化, 还原电流增加很多, 这说明当 HRP 固定在  $\text{TiO}_2$  纳米管/电极表面后, 不仅能够进行直接有效的电子转移, 而且仍然保持它对  $\text{H}_2\text{O}_2$  还原的生物电催化作用, 且电催化还原电流随  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的增加而增大.

4)  $\text{TiO}_2$  纳米管/HRP 电极稳定性

实验表明, 分散剂 pH 值、电极晾干挥发速率对电极的稳定性都有一定的影响. 分散剂 pH 值为 7.0 时, 有利于电极的稳定. 减慢挥发速率, 甚至降低挥发温度都有利于电极的稳定.

### 2.3 HRP 标记抗体修饰 $\text{TiO}_2$ 纳米管/GC 电极的免疫检测

在 HRP 标记抗体修饰  $\text{TiO}_2$  纳米管/GC 电极上, HRP 也同样表现出良好的直接电化学行为. 即如图 6 所示, 在 PBS 中, HRP 标记抗体修饰  $\text{TiO}_2$  纳米管/GC 电极 (a), 也同样出现一对氧化/还原峰.

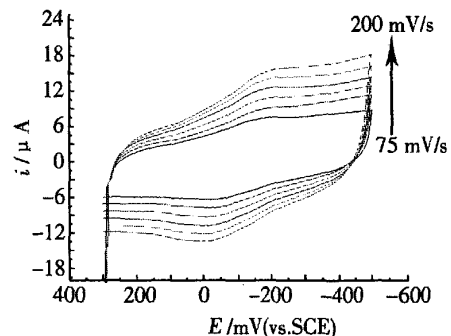


图 3 HRP/纳米  $\text{TiO}_2$  微粒/GC(A), HRP/ $\text{TiO}_2$  纳米管/GC(B) 电极于不同扫速下的循环伏安曲线

Fig. 3 Cyclic voltammograms of the HRP/ $\text{TiO}_2$  nanoparticles (A) and HRP/ $\text{TiO}_2$  nanotubes (B) modified GC electrode in 0.1 mol/L PBS at different scan rate

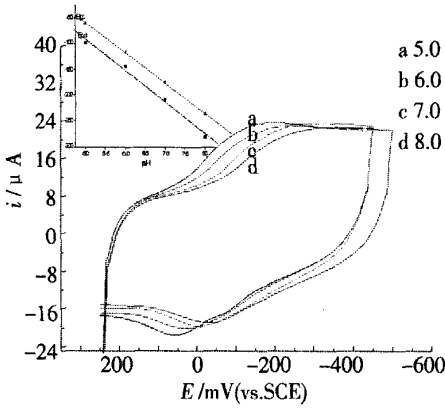


图 4 HRP/ TiO<sub>2</sub> 纳米管 /GC 电极在不同 pH 的 0.1 mol/L PBS 中的循环伏安曲线

Fig. 4 Cyclic Voltammograms of the HRP/TiO<sub>2</sub> nanotubes modified GC electrode in 0.1 mol/L PBS with different pH values  
 pH: a) 5.0, b) 6.0, c) 7.0 and d) 8.0  
 scan rate: 100 mV/s  
 the inset shows the dependence of  $E_{pa}$  (■),  $E_{pc}$  (●) on the solution pH

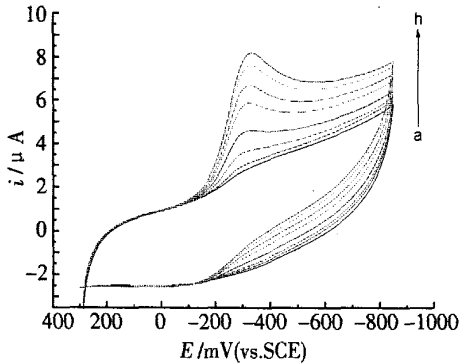


图 5 HRP/ TiO<sub>2</sub> 纳米管 /GC 电极在含不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 0.1 mol/L PBS 中的循环伏安曲线

Fig. 5 Cyclic Voltammograms of the HRP/TiO<sub>2</sub> nanotubes modified GC electrode in 0.1 mol/L PBS containing different concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 $C_{H_2O_2}/\mu\text{mol}$ : a) 0, b) 1.25, c) 3.75, d) 5.00, e) 6.25, f) 7.50, g) 8.75, h) 10.0

而经小鼠血清稀释液于 30 °C 浸泡 1 h 后的该电极则其氧化/还原峰电流较之前者下降. 这是因为固定在电极表面的抗体与溶液中血清抗原发生专一

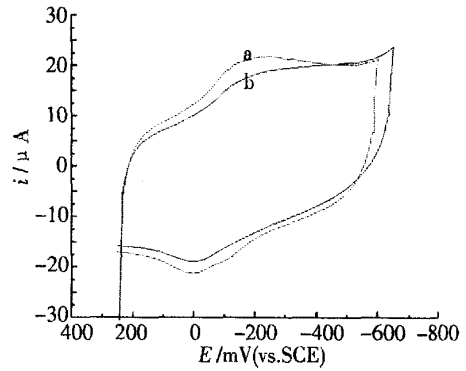


图 6 HRP 标记抗体 TiO<sub>2</sub> 纳米管/GC 电极 (a) 及其在 30 °C 下经小鼠血清中浸泡 1 h 后 (b) 于 0.1 mol/L PBS 中循环伏安曲线

Fig. 6 Cyclic Voltammograms of the antibody-HRP/TiO<sub>2</sub> nanotubes modified GC electrode (a) and which incubated in mouse serum at 30 °C after 1 h (b) in PBS

性的免疫反应形成免疫复合物, 阻碍了 HRP 内的 Fe(III)/Fe(II) 电对通过膜向电极表面的扩散, 从而使响应电流相应下降<sup>[14]</sup>. 据此, 可作为免疫反应检测的一种新方法.

### 3 结 论

1) HRP 在 TiO<sub>2</sub> 纳米管/GC 电极表面比在纳米 TiO<sub>2</sub> 微粒/GC 电极更能进行有效和稳定的直接电子转移反应, 氧化/还原峰对称性更好, 电位差减小, 峰电流增加, 可逆性更好.

2) 固定在 TiO<sub>2</sub> 纳米管/GC 电极表面的 HRP 能保持对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 还原的生物催化活性.

以上可为抗原抗体的免疫反应信号的选择提供参考依据.

### 参考文献 (References):

[1] Ruping Liang, Jianding Qiu, Peixing Cai. A novel amperometric immunosensor based on three-dimensional sol-gel network and nanoparticle self-assemble technique [J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 534: 223-229.  
 [2] Farzana Darain, Doeg Su Park, Jang-Su Park, et al. A separation-free amperometric immunosensor for vitellogenin based on screen-printed carbon arrays modified with a conductive polymer [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2005, 20: 1780-1787.

- [3] Rodica E Ionescu, Chantal Gondran, Serge Cosnier, et al. Comparison between the performances of amperometric immunosensors for cholera antitoxin based on three enzyme markers [J]. *Talanta*, 2005, 66: 15-20.
- [4] Yan Liu, Ruo Yuan, Yaqin Chai, et al. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on gold colloid/cysteine/nafion-modified platinum disk electrode [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005, 115 (1): 109-115.
- [5] Xianbo Lu, Qian Zhang, Ling Zhang, et al. Direct electron transfer of horseradish peroxidase and its biosensor based on chitosan and room temperature ionic liquid [J]. *Electrochemistry Communications*, 2006, 8 (5): 874-878.
- [6] Cai Cheng-Xin(蔡称心), Cheng Jing(陈静). Direct electrochemistry of horseradish peroxidase at a carbon nanotube electrode [J]. *Acta Chimica Sinica (in Chinese)*, 2004, 62(3): 335-360.
- [7] The-Vinh Nguyen, Hyun-Cheol Lee, O-Bong Yang. The effect of pre-thermal treatment of TiO<sub>2</sub> nano-particles on the performances of dye-sensitized solar cells [J]. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 2006, 90 (7-8): 967-981.
- [8] Thammanoon, Sreethawong, Susumu Yoshikawa. Enhanced photocatalytic hydrogen evolution over Pt supported on mesoporous TiO<sub>2</sub> prepared by single-step sol gel process with surfactant template [J]. *International Journal of Hydro-gen Energy*, 2006, 31 (6): 786-796.
- [9] Songqin Liu, Aicheng Chen. Coadsorption of horseradish peroxidase with thionine on TiO<sub>2</sub> nanotubes for biosensing [J]. *Langmuir*, 2005, 21: 8409-8413.
- [10] Zhou hui, Gan xin, Wang jin, et al. Hemoglobin-based hydrogen peroxide biosensor tuned by the photovoltaic effect of nano titanium dioxide [J]. *Anal. Chem*, 2005, 77: 6102-6104.
- [11] Lindomar R D Da Silva, Yoshitaka Gushikem, Lauro T Kubota. Horseradish peroxidase enzyme immobilized on titanium (IV) oxide coated cellulose microfibers: study of the enzymatic activity by flow injection system [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerface*, 1996, 6: 309-315.
- [12] Yan Zhang, Pingli He, Naifei Hu. Horseradish peroxidase immobilized in TiO<sub>2</sub> nanoparticle films on pyrolytic graphite electrodes: direct electrochemistry and bioelectrocatalysis [J]. *Electrochemical Acta*, 2004, 49(12): 1981-1988.
- [13] Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems [J]. *Journal of Electroanal Chem*, 1979, 101: 29-38.
- [14] Xu Xiao-Xing(徐肖邢), Wang Sheng-Fu(王升富). Preparation and application of colloidal gold modified amperometric CA 19-9 immunosensor [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory (in Chinese)*, 2005, 24 (12): 68-71.

## Catalysis of Nano TiO<sub>2</sub> for Horseradish Peroxidase

ZHU Ya-qi, WU Hai, Liu HIU, MA Jie\*

(Department of Chemistry, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

**Abstract:** Horseradish peroxidase immobilized on the surface of titanium dioxide nanoparticles and nanotube modified glassy carbon electrode. The HRP direct electron transfer reaction was compared between TiO<sub>2</sub> nanoparticles and nanotube GC electrode. The results demonstrated that the HRP on TiO<sub>2</sub> nanotube /GC electrode could catalyze electron exchange reaction between electroactivity center of HRP and electrode. And the research of antibody labeled HRP provides a selected signal for antibody-antigen immunoassay.

**Key words:** titanium dioxide nanotube; chemically modified electrode; direct electrochemistry; horseradish peroxidase