



## 基于碳纳米管修饰电极的脱氢酶传感器研究进展

李一苇<sup>1,2</sup> 陈燕<sup>2</sup> 马耀宏<sup>2</sup> 史建国<sup>2</sup> 王元秀<sup>\*1</sup> 綦翠华<sup>1</sup> 李秋顺<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( 济南大学化学化工学院, 济南 250022)

<sup>2</sup>( 山东省科学院生物研究所, 山东省重点实验室, 济南 250014)

**摘 要** 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ )是目前已知 300 多种脱氢酶的辅酶,通过对  $\text{NADH}$  的检测,可以间接测定底物浓度或酶活力。如何利用电化学技术实现  $\text{NADH}$  的准确、快速、稳定检测,一直是电化学及生物传感领域的重要课题。碳纳米管(CNT)的发现为  $\text{NADH}$  的电化学检测注入新的生机。本文综述了近年来碳纳米管修饰电极在  $\text{NADH}$  电化学检测及脱氢酶生物传感器构建中的应用进展,并展望了其应用前景。

**关键词** 碳纳米管; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸; 电化学检测; 脱氢酶生物传感器; 综述

### 1 引 言

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(亦称还原态辅酶 I,  $\text{NADH}$ )在生物体内参与如能量代谢、基因表达及调控、氧化应激与抗氧化作用、免疫与抗癌等多种重要生理活动。烟酰胺辅酶( $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ )依赖型脱氢酶是所有氧化还原酶中数量最多的一类,其中 300 多种脱氢酶(Dehydrogenase)以  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  为辅酶,通过检测  $\text{NADH}$ ,可以间接测定底物浓度或酶活力,在生物传感领域具有广阔应用前景。目前,已有多种可用于  $\text{NADH}$  的检测方法,如紫外分光光度法<sup>[1]</sup>、色谱法<sup>[2]</sup>、酶法<sup>[3]</sup>等。虽然这些方法对  $\text{NADH}$  的分析检测都达到了较高的灵敏度水平,但往往需要对样品进行繁琐的处理,且测定时间长,测定成本高,不适合工业生产和科研工作中大批量、多批次样品测定的需求。电化学分析法因其灵敏度高、响应时间短、重现性好、操作简单、仪器成本低廉等,在  $\text{NADH}$  检测方面更具优势。然而,电子传递速率过慢、动力学特征不理想,在较高的电位下被测样品中的一些物质如抗坏血酸、多巴胺等易产生干扰,导致电极钝化的二聚体生成<sup>[4]</sup>,这是传统电极难以克服的问题。例如,石墨材料的多孔结构使得电极出现较大且重复性差的背景电流;玻碳电极(GCE)非有序排列的长碳素微纤维结构降低了其电催化能力;常规金属电极(如铂、金、银)不仅成本高,且对  $\text{NADH}$  的电催化能力较差( $\text{NADH}$  的氧化电位  $>1\text{ V}$ )<sup>[5]</sup>,从而使  $\text{NADH}$  的直接测定变得十分困难<sup>[6]</sup>。

将纳米材料应用于  $\text{NADH}$  的电化学检测,特别是脱氢酶生物传感器的构建,是  $\text{NADH}$  电化学传感器领域的一个突破。目前应用于  $\text{NADH}$  电化学检测的纳米材料主要有:金属纳米粒子<sup>[7,8]</sup>、金属/非金属氧化物纳米粒子<sup>[9]</sup>、碳系纳米材料等。由于碳纳米管(CNT)具备高导电性能、对生物分子的高电催化活性、高吸附能力及良好的生物相容性等特性,其发现与应用为  $\text{NADH}$  的电化学测定及脱氢酶生物传感器的构建在理论和实践上都开拓了全新的发展空间<sup>[10]</sup>。本文综述了近年来碳纳米管修饰电极在脱氢酶传感器构建及  $\text{NADH}$  电化学检测中的研究进展,并展望了其应用前景。

### 2 碳纳米管在脱氢酶传感器中的应用

#### 2.1 基于碳纳米管的化学修饰电极

研究表明 CNT 对于  $\text{NADH}$  具有良好的电催化能力,可以显著降低其氧化过电位、提高电极的电子转移速率、抗干扰能力、抗污染能力及信噪比等。其管状分子端部存在类似棱面热解石墨形态的活性位

2013-10-15 收稿; 2013-12-28 接受

本文科技部国家“863”计划项目(No. 2012AA021201)及国家自然科学基金(No. 61340032)资助

\* E-mail: chm\_wangyx@ujn.edu.cn

点, 以及其分子侧壁上存在的缺陷位点是 CNT 电催化活性的结构基础<sup>[11]</sup>。多壁碳纳米管(MWCNT)和单壁碳纳米管(SWCNT)是目前最主要的两种 CNT 形式, 两类碳纳米管虽然具备类似的理化性能, 但 SWCNT 的管壁缺陷部位相对较少<sup>[12]</sup>。因此, 当前研究中用于催化 NADH 电化学氧化的 CNT 材料以 MWCNT 居多。

单独应用 CNT 获得的修饰电极即可在一定程度上提高电极对 NADH 的电化学响应性能。Musameh 等<sup>[13]</sup>将酸处理后的 MWCNT 及 SWCNT 滴涂于玻碳电极(GCE)上, 用于检测游离态 NADH, 皆获得较理想电流响应。与常规电极相比, NADH 氧化过电位均降低约 490 mV。张仁彦等<sup>[14]</sup>采用羧基化 MWCNT(MWCNT-COOH)构建了可用于检测甲醛的甲醛脱氢酶(FDH)生物传感器。仅通过将 MWCNT-COOH 修饰于丝网印刷电极表面, 检测酶促反应生成的 NADH 即可间接测定样品中的甲醛浓度。该酶电极检出限可达 0.2  $\mu\text{mol/L}$ , 且电极的抗干扰能力强、检测灵敏度高。

此外, 由于 CNT 管壁存在高度离域化的大  $\pi$  键, NAD<sup>+</sup> 分子本身的环式结构可通过  $\pi$ - $\pi$  堆积作用吸附于 CNT 表面, 同时达到 CNT 分散及辅酶固定化的双重目的。Zhou 等<sup>[15]</sup>成功利用此原理制成了脱氢酶电极, Tominaga 等<sup>[6]</sup>的研究还为此提供了电化学及光谱学实验证据及更精细的解释。

## 2.2 基于碳纳米管复合材料的化学修饰电极

CNT 虽然能够在一定程度上提高电极的电催化效率, 但效果有限。一般而言, NADH 在 CNT 修饰的玻碳电极上于 500 mV 处产生氧化峰, 待测试样中氧化电位较低的物质可产生干扰。此外, CNT 对酶及辅酶的固定化效率较低。因此在已有研究报告中, 单纯应用 CNT 实现 NADH 电化学检测器及脱氢酶电极构建的实例仅占少数, 研究者将更多目光投向开发基于 CNT 复合材料的化学修饰电极。一方面, CNT 的独特性质允许其利用诸如  $\pi$ - $\pi$  堆积作用、静电力、疏水作用、范德华力、共价联接等多种理化原理对酶蛋白分子进行良好的固定化<sup>[16]</sup>。另一方面, CNT 与其它成分构建的复合材料可使多种非碳系材料发挥其特殊性能, 成为脱氢酶及辅酶 NAD<sup>+</sup> 的新型理想工具。正是这一特征, 使近年来无试剂型脱氢酶传感器的研究开发得到了迅速发展。此外, CNT 复合材料的强大功能也使其在物质分离领域方面到应用<sup>[17]</sup>。当前研究较多的碳纳米管复合材料修饰电极主要有以下几类。

### 2.2.1 电子媒介体/碳纳米管复合材料修饰电极

NADH 脱氢酶(又称“复合体 I”)的辅酶为含有醌式结构的辅酶 Q, 即作为 NADH 氧化再生 NAD<sup>+</sup> 时的电子受体<sup>[18]</sup>, 因而早期研究者猜想含醌式结构的物质可能是 NADH 体外电传导的优良电子媒介体<sup>[19]</sup>。Venarussoa 等<sup>[20]</sup>在无酶条件下探究了多种醌式结构物质对 NADH 的电子转移作用, 并指出苯醌类及萘醌类衍生物能够在水相中氧化 NADH, 但未观测到环式结构更大的醌类表现出类似活性。到目前为止已经发现了数十种可用于 NADH 电化学氧化的电子媒介体, 如吩噻嗪<sup>[21]</sup>、甲苯胺蓝<sup>[22]</sup>、亚甲基蓝<sup>[23]</sup>、麦尔多拉蓝<sup>[24]</sup>、二茂铁及其衍生物<sup>[25]</sup>等, 这些电子媒介体多是含 N—O, N—S 或 N—N 类的多芳环、杂环化合物及其衍生物。

但是, 多数媒介体在单独应用时存在诸如与 NADH 之间的电子转移速率慢、修饰电极线性范围窄、稳定性欠佳等缺陷。具有高比表面积、良好导电性能的 CNT 可以有效吸附电子媒介体, 提高电子媒介体的电子转移能力, 改善电极性能。Zhu 等<sup>[26]</sup>在 CNT 修饰的 GCE 上吸附了麦尔多拉蓝(MB)构成电极用于 NADH 检测, 经测试计算, 混合修饰电极比无 CNT 修饰的 MB/GCE 界面异相电子转移速率常数提高近 3 倍, 混合修饰电极对 NADH 的检测下限可达  $10^{-8}$  mol/L。Akhgar 等<sup>[25]</sup>将二茂铁二羧酸作为电子媒介体成分与 CNT、石墨粉混合构建糊电极, 该电极使 NADH 的氧化过电位降低至 300 mV 附近, 能够独立或同步测定 NADH、L-多巴胺及色氨酸。Ensafi 等<sup>[27]</sup>报道了采用苯甲酰胺衍生物与 MWCNT 共同修饰的碳糊电极, 该电极能够用于 NADH 与谷胱甘肽的同步测定, 在 5 ~ 600  $\mu\text{mol/L}$  范围内的循环伏安(CV)氧化峰电流值与 NADH 浓度呈线性关系, 检测下限为 1  $\mu\text{mol/L}$ 。

将酶或辅酶与电子媒介体一并与 CNT 分子整合, 不仅在一定程度上解决了媒介体易脱落的问题, 且其能够产生较游离态更明显的电流响应信号: Pereira 等<sup>[28]</sup>将乳酸脱氢酶(LDH)与 CNT 分子通过常规交联剂戊二醛交联形成复合物, 又在此基础上将麦尔多拉蓝及辅酶 NAD<sup>+</sup> 吸附于 CNT 表面, 以此复合材料制成糊电极后用于乳酸的检测, 在连续使用 300 次后依然保持 96.5% 的原始催化活力。Mazurenko 等利用电泳沉积原理将聚苯乙烯小球沉积在 GCE 表面, 并以此作为模板获得了具多孔结构的 CNT 修

饰表面。随后亚甲基蓝被吸附于 CNT 网格内,  $\text{NAD}^+$  及 *D*-山梨醇脱氢酶 (DSDH) 被固定于最外层的凝胶网格中成为无试剂型酶传感器, 可在 400 mV 下实现对 *D*-山梨醇的测定<sup>[29]</sup>。

**2.2.2 聚合物/碳纳米管复合材料修饰电极** 应用电化学沉积法<sup>[30]</sup>、电聚合<sup>[31]</sup>制备 CNT-导电聚合物复合材料构建修饰电极用于 NADH 电化学检测的方法, 已引起了普遍关注。Zeng 等<sup>[32]</sup>通过两步法将苯甲胺蓝 O 同 MWCNT 组成的纳米线复合物修饰在 GCE 上, 与裸 GCE 及 MWCNT/GCE 相比, 该电极能将 NADH 氧化过电位降低至 260 mV, 响应电流值也明显增大。电极体系可在数秒内达到稳定响应, 线性检测范围为 2.0  $\mu\text{mol/L}$  ~ 4.5 mmol/L, 检出限可达 0.5  $\mu\text{mol/L}$ 。Liu 等<sup>[33]</sup>通过层层自组装法制备了聚苯胺-聚对氨基苯磺酸与 SWCNT 的复合材料用以修饰电极, 该体系在约 50 mV 的低电位下就即以氧化 NADH, 线性范围为 5  $\mu\text{mol/L}$  ~ 1 mmol/L。此外, 该电极稳定性良好, 可用于连续检测<sup>[33]</sup>。利用一种羧基化的噻吩类物质, 将其单体与 CNT 混合分散后电聚合得到复合物, 修饰于金电极表面获得修饰电极, 再利用聚合物骨架上所带的游离羧基对  $\text{NAD}^+$  及 LDH 进行固定化。此电极对乙醇试样的检测限达 1  $\mu\text{mol/L}$ , 经历 30 d 的非连续使用依然能保留 98% 的初始检测灵敏度<sup>[34]</sup>。一些可作为媒介体的染料分子经过电聚合高分子化后也可作为催化 NADH 电化学氧化的电极修饰材料。杨怀成等<sup>[35]</sup>将 SWCNT 滴涂固定于 GCE 表面, 以 CV 法在电极表面形成聚亚甲基蓝修饰膜, 采用差分脉冲伏安法 (DPV) 可成功实现 NADH 检测, 在 2.0 ~ 500  $\mu\text{mol/L}$  范围内 NADH 浓度与峰电流值呈良好线性关系, 检出限为 0.6  $\mu\text{mol/L}$ 。另有报道将具有电子媒介体性质的含醌结构的物质进行电聚合并与 CNT 形成复合修饰物, 制成对 NADH 有电子转移能力的修饰电极, 其检出限可至亚微摩尔级<sup>[36]</sup>。

采用 CNT 与导电聚合物共同修饰电极制作脱氢酶传感器, 相比单独应用导电聚合物或 CNT 的修饰电极往往易获得增强数倍以上的电流响应信号。同时, 导电聚合物的稳定性有所提高, 因而修饰电极的使用寿命亦得以不同程度地延长。根据导电聚合物单体结构的特点, 可选择诸如吸附、电聚合、分子自组装等多种策略获得性质良好的 CNT-导电聚合物复合修饰电极。

除导电聚合物外, 天然高聚物、人工合成的非导电聚合物也通过与 CNT 的有机结合在脱氢酶电极中得到了广泛应用。Zhang 等<sup>[37]</sup>以壳聚糖 (CHIT) 为载体, 一方面利用其良好的分散能力获得了 CNT-CHIT 复合材料, 另一方面利用其单体所携带的氨基实现了对  $\text{NAD}^+$  及乙醇脱氢酶 (ADH) 的固定化, 制成的修饰电极可在低电位下实现对啤酒中乙醇的检测。研究还发现, 若修饰电极以 nafion 加固, 可将电极灵敏度提高逾 10 倍, 且电极选择性亦明显改善。与未利用 CHIT 对酶及辅酶实现固定化的早期做法<sup>[38, 39]</sup>相比, 复合物冷藏保存 5 年之久后制成电极依然显示一定生物活性。还有将类似方法成功应用于  $\text{NAD}^+$  依赖的还原酶传感器构建中的报道<sup>[40]</sup>。Filip 等<sup>[41]</sup>发现透明质酸对 SWCNT 有理想的分散效果, 其研究团队利用这一特点制成了用于在流动注射分析 (FIA) 系统中使用的脱氢酶传感器, 可检测 *D*-山梨醇含量在 29  $\mu\text{mol/L}$  以上的试样。若用于 NADH 检测, 该电极较利用由 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 或 CHIT 分散 CNT 后所获得的 CNT 修饰电极的电子转移能力更优良, 且稳定性、选择性更高。

将聚丙烯胺盐酸盐与 CNT 的复合物滴涂于丝网印刷电极 (SPE) 表面可获得均匀的复合材料修饰膜。该修饰膜的制作方法是首先通过合适的方法对电极进行电化学活化使其表面带有正电荷, 再通过静电力与复合物牢固结合形成修饰电极。差分脉冲伏安法 (DPV) 分析结果表明该电极具有突出的抗干扰能力及抗污染性能, 适合作为脱氢酶或 NADH 传感器的构建平台<sup>[42]</sup>。树枝状聚合物 (DD) 是近几十年内发展的一类功能性合成高分子材料, 其在结构上具有高度的对称性和分散性, 且表面拥有大量的官能团, 如羟基、氨基、羧基等在脱氢酶电化学生物传感器领域日益受到重视<sup>[43]</sup>。Tang 等<sup>[44]</sup>制备了聚酰胺-胺类树枝状分子包裹的铂纳米粒子 (Pt-PAMAM), 并利用其所带的活性氨基同羧基化的 CNT 共价联接, 谷氨酸脱氢酶 (GLDH) 通过自组装原理与 Pt-PAMAM 形成多层膜结构。将复合物修饰在 GCE 表面, 电极可在 200 mV 下检测谷氨酸, 灵敏度达 433  $\mu\text{A}/(\text{mmol/L cm}^2)$ , 电极稳定性良好。

此外, 也有研究将聚合物作为电子媒介体的载体, 制成 CNT-聚合物-电子媒介体复合物作为电极修饰界面: Urbanova 等<sup>[45]</sup>将二茂铁衍生物通过寡聚乙二醇链与 CNT 共价结合, 再将此复合材料以 CHIT 分散后滴涂于 GCE 表面制成修饰电极, 葡萄糖脱氢酶 (GDH) 及  $\text{NAD}^+$  则共同固定于凝胶成分中并与修饰电极整合。该方法可用于构建良好的无试剂型脱氢酶传感器。Antiochia 等<sup>[46]</sup>将含钨的氧化还原聚

合物作为电子媒介体及酶、辅酶的固定化载体,在 CNT 制成的糊电极表面形成具有电子媒介体特性的聚合物,并将 GDH 和  $\text{NAD}^+$  与聚合物载体交联固定。此方法获得的无试剂传感器可在 200 mV 电位下测定酒样中的葡萄糖含量。

将不止一类功能性材料整合后作为 NADH 电极修饰材料的做法并非从近几年才出现,例如将电子媒介体与高聚物、生物分子与高聚物、无机材料与凝胶等有机结合制成修饰电极的报道以不乏见于更早期的文献<sup>[47]</sup>,但 CNT-聚合物复合材料的应用使得更广泛的功能性材料品种可以被共同应用以利用其各自特有优势。同时,通过选择或设计 CNT-聚合材料能够很好地完成酶及辅酶的固定化,这是近年来脱氢酶传感器领域多材料复合修饰电极以及无试剂型酶电极研究快速发展的一个重要原因。

**2.2.3 无机纳米粒子/碳纳米管复合材料修饰电极** 近年来,利用无机纳米复合材料同 CNT 制作修饰电极的报道也很多。此类材料主要涉及金属、金属氧化物以及非金属、非金属氧化物的纳米粒子。金纳米粒子具有制备方法简单、表面电性可控、粒径及颗粒形状易控制、易与 CNT 进行整合等优点,已被应用于 CNT 修饰的脱氢酶电极的开发中。Manso 等<sup>[48]</sup>将胶体金粒子与 MWCNT 结合,以 Teflon 为黏合剂将纳米复合材料、辅酶及 ADH 混合后制成传感器,可用于测定微摩尔级的乙醇样品。研究发现胶体金粒子掺入的主要功能是使单纯由 CNT 构成的传感器灵敏度明显提高,同时相比于将酶固定于金电极表面的做法,其米氏常数得以大幅降低。Deng 等<sup>[49]</sup>利用层层自组装原理将 MWCNT 与硫堇、金纳米粒子沉积在铟掺杂氧化锡电极(ITOE)表面形成具有多层有序结构的复合电极。该电极对 NADH 的电化学响应与可见光强度有关。在无光条件下,0.5~237  $\mu\text{mol/L}$  范围内 NADH 浓度与阳极电流响应值成线性关系,检测下限为 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ,灵敏度 17 nA/( $\mu\text{mol/L}$ );而在光照条件下,电极灵敏度提高约 7 倍,但检出限升高约 2 倍。本研究组将 GDH 固定在电极表面,构建了葡萄糖脱氢酶传感器,同样得到了较理想的电流响应。

将 CNT- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米复合物滴涂于 GCE 表面可用于制备修饰电极。研究发现  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米粒子具有与电子媒介体类似的电子转移能力,与在裸 GCE 上的电化学反应结果相比 NADH 的氧化过电位降低约 650 mV<sup>[50]</sup>。Tsai 等<sup>[51]</sup>利用自组装原理将氧化铝包覆的  $\text{SiO}_2$ (ACS) 纳米粒子与 MWCNT 制成电极修饰界面覆盖于 GCE 表面,修饰电极可将 NADH 的氧化过电位降低至约 400 mV。此方法无须对 CNT 进行功能化处理,电极制作方法简便。

**2.2.4 离子液体/碳纳米管复合材料修饰电极** 离子液体(IL)是一类常温下全部由离子成分构成的液态新材料,具有高电导率、较宽的电化学窗口、分子结构可根据特定要求进行设计等优势,已在电极及电池技术中得到高度重视与实际应用。在制备碳纳米管离子液体复合材料方面,IL 由于其自身结构特点,能通过  $\pi$ - $\pi$  相互作用与 CNT 形成复合物,有效提高碳纳米管的分散效果,增强其电化性能<sup>[52]</sup>。文献<sup>[53]</sup>对 CNT-IL 复合材料的构建及应用进行了详尽叙述。

将甲基咪唑类 IL、MWCNT 以及壳聚糖形成的水溶性良好的复合材料修饰于 GCE 上,通过壳聚糖的空间特征完成 IL 与 CNT 的固载。该方法能有效降低 NADH 的氧化电位,对 NADH 的检出限可达 0.06  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[54]</sup>。Mundaca 等<sup>[55]</sup>将吡啶类离子液体 OPPF<sub>6</sub> 与 MWCNT、 $\text{NAD}^+$  混合以制成糊电极,并在其表面沉积一层 3 $\alpha$ -羟类固醇脱氢酶(3 $\alpha$ -HSD) 构成酶传感界面,可用于亚微摩尔级雄酮的测定。该方法简单,具有较理想的抗干扰性能,并可应用于血液的分析。也有研究表明<sup>[56]</sup>,IL 能够与石墨良好结合,对以二者混合物所制成的碳糊电极表面的显微观测结果表明二者在分子水平发生紧密的相互作用,所形成的电极表面均一、光滑,电化学反应特征理想。这对于开发可用于脱氢酶传感器的制作简易、成本低廉的 CNT 修饰基底电极有很好的借鉴意义。

**2.2.5 其它基于碳纳米管的修饰电极** 近年来,关于其它类型基于碳纳米管复合材料或修饰方法的修饰电极的报道也很多。例如,二苯丙氨酸肽-MWCNT 复合物修饰电极<sup>[57]</sup>、CNT 原位生长法修饰电极<sup>[58]</sup>等。这些电极用于 NADH 检测时均可大幅降低其氧化过电位,并具有较高的灵敏度。Hoshino 等<sup>[59]</sup>在喷镀金的玻璃薄片上等离子体聚合法获得乙腈沉积层,并将 CNT、GDH 负载于其中构成传感器。除测定电位低,线性范围宽外,相比于湿化学法构建的传感器,其突出特点是方法新颖,具备良好的批量生产前景。

除 CNT 外, 改性石墨<sup>[60]</sup>、石墨烯<sup>[61, 62]</sup>及其它一些与 CNT 在结构上较为近似的碳基材料也被应用于构建脱氢酶电极, 或游离态 NADH 的检测中。随着纳米技术和纳米材料领域的不断发展, 更多的碳基纳米材料及纳米复合材料亦将在 NADH 电化学检测及脱氢酶传感器构建方面发挥其应用潜质。

### 3 总结与展望

由于 CNT 具备强大的物质结合能力, 各种经过长期发展的用于构建脱氢酶电极的方法皆可与之结合。以 CNT 为平台发展出的高性能复合材料的报道与日俱增, 特别是聚合物/碳纳米管复合材料已成为一类极具发展前景的新型电极修饰材料。与传统电极修饰材料相比, 碳纳米管在诸多方面显示出其突出优势: (1) 为复合电极修饰材料的开发提供了理想平台。已发展出的电子媒介体、纳米粒子等用于构建脱氢酶电极的各类电极修饰材料可以借助 CNT 相互整合, 取长补短, 发挥其各自的电化性能、物质固载性能等。CNT 复合材料修饰电极较单纯由 CNT 修饰的电极的电化性能明显提高。(2) 为辅酶的固定化提供了新的途径。除可通过 CNT 本身对辅酶进行固定化以外, 碳二亚胺类、丙基三甲氧基硅烷甚至戊二醛等一些传统交联剂都已被用于 NAD<sup>+</sup> 的共价固定化。与较早期的做法相比, 固定于 CNT 复合材料上的 NAD<sup>+</sup> 既能够牢固存在, 又可保持长期的生物催化活力, 且此法辅酶消耗量少、分子改造要求低、操作难度小, 是辅酶固定化的理想手段。(3) CNT-复合物的出现给予了酶固定化技术更广阔的发挥空间。已报道的被成功固载于 CNT 修饰电极上的脱氢酶种类逐渐增多, 其很大程度上得益于新型复合材料的开发应用。CNT 复合材料对为酶分子提供更大的有效固载面积、更优越的催化微环境, 可有效提高酶的催化效率, 延缓其活性丧失。此外, 酶与辅酶分子在 CNT 复合材料上的共同固定化可有效缩短二者之间以及二者同换能器表面间的作用距离, 而这对于酶传感器是获得理想传感信号的必要条件之一。

在近年的研究中, 关于无试剂型脱氢酶传感器的报道逐渐增多。新型无试剂型传感器的多种性能皆有明显提高, 特别是在生物分子的固定化效率、传感器稳定性等方面。这一进步在克服脱氢酶传感器构建的两大技术瓶颈——辅酶的高效、稳定电化学再生系统构建以及辅酶的有效固定化方面意义重大<sup>[63]</sup>。建立成熟的无试剂型传感器构建技术方案, 是推动脱氢酶生物传感器步入实用阶段的第一步。

应用 CNT 开发的脱氢酶电极, 已能有效降低 NADH 氧化过电位、增强电流响应信号强度, 并在较大程度上有效解决电极表面污染、非目标测试成分干扰等问题。在今后的研究中, 可利用 CNT 在诸多方面深化脱氢酶传感器的开发、研制工作: (1) 利用 CNT 开发导电性、均一性良好的基底电极, 替代现行的造价昂贵、长时稳定性低的传统电极。(2) 开发基于 CNT 的复合材料用以制备性质均一稳定、导电性好、抗污染及抗干扰能力强、可固载酶及辅酶的修饰电极。(3) 虽然在长期研究中发展出的许多方法已可使诸多电极性能达到较理想的水平, 但进一步提高修饰电极的再现性 (Reproducibility)、重复性 (Repeatability) 及稳定性仍是为达到脱氢酶传感器实用化目的的重要工作。借助 CNT 复合材料有望在此方面取得新的突破。(4) 开发微型检测装置、集成化电极和生物相容性检测器。近年来, 包括 CNT 在内的多种碳纳米材料的研究及合成向结构更精细、应用更具针对性的方向发展, 会有更多新型 CNT 可为脱氢酶传感器的构建提供选择。同时, 极少量的 CNT 即可对 NADH 表现高效的电催化能力, 其本身已被广泛用作药物载体等特性, 将推动脱氢酶传感器向此方向发展。

在未来有望通过开发新的碳纳米管复合材料实现修饰电极性能的进一步提升, 为研制性能优越、成本低廉且使用方便的脱氢酶生物传感器奠定基础。

### References

- 1 YAO Yu-Xin, HAO Yu-Jin, LI Ming, PANG Ming-Li, LIU Zhi, ZHAI Heng. *Acta Horticulturae Sinica*, **2008**, 35(2): 181-188  
姚玉新, 郝玉金, 李明, 庞明利, 刘志, 翟衡. 园艺学报, **2008**, 35(2): 181-188
- 2 Yamada K, Hara N, Shibata T, Osago H, Tsuchiya M. *Anal. Biochem.*, **2006**, 352(2): 282-285
- 3 Gamella M, Campuzano S, Conzuelo F, Curiel J A, Muñoz R, Reviejo A J, Pingarrón J M. *Talanta*, **2010**, 81(3): 925-933

- 4 Sedeño P Y, Riu J, Pingarrón J M, Rius F X. *Trends. Anal. Chem.*, **2010**, 29(9): 939–953
- 5 Radoi A, Compagnone D. *Bioelectrochem.*, **2009**, (76): 126–134
- 6 Tominaga M, Iwaoka A, Kawai D, Sakamoto S. *Electrochem. Commun.*, **2013**, 31: 76–79
- 7 Hikosaka K, Kim J, Kajita M, Kanayama A, Miyamoto Y. *Colloids. Surf. B. Biointerfaces. B*, **2008**, 66(2): 195–200
- 8 Song H K, Lee S H, Won K, Park J H, Kim J K, Lee H, Moon S J, Kim D, Park C B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2008**, 47(9): 1749–1752
- 9 BAI Hong-Yan, BAO Jian-Chun, DAI Zhi-Hui, LIU Ke. *Acta Chimica Sinica*, **2008**, 66(15): 1786–1790  
白红艳, 包建春, 戴志晖, 刘可. *化学学报*, **2008**, 66(15): 1786–1790
- 10 ZHOU Jing-Li, NIE Ping-Ping, ZHENG Hai-Tao, ZHANG Ji-Mei. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2009**, 37(4): 617–623  
周敬丽, 聂萍萍, 郑海涛, 张纪梅. *分析化学*, **2009**, 37(4): 617–623
- 11 Banks C E, Moore R R, Davies T J, Compton R G. *Chem. Commun.*, **2004**: 1804–1805
- 12 Sloan J, Hammer J, Sibley M Z, Green M L H. *Chem. Commun.*, **1998**, (1): 347–348
- 13 Musameh M, Wang J, Merkoci A, Lin Y H. *Electrochem. Commun.*, **2002**, 4(10): 743–746
- 14 ZHANG Ren-Yan, ZHANG Xue-Ao, JIA Hong-Hui, LI Xin-Hua. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2012**, 40(6): 909–914  
张仁彦, 张学鹭, 贾红辉, 李新华. *分析化学*, **2012**, 40(6): 909–914
- 15 Zhou H J, Zhang Z P, Yu P, Su L, Ohsaka T, Mao L Q. *Langmuir*, **2010**, 26(8): 6028–6032
- 16 Zhang B T, Zheng X X, Li H F, Lin J M. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 784: 1–17
- 17 Aguíñ L, Sedeño P Y, Pingarrón J M. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 622(1–2): 11–47
- 18 Nelson D L, Cox M M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: WH Freeman, **2004**: 704
- 19 Kadish K M, Su C H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105: 177–180
- 20 Venarussoa L B, Tammeveski K, Maia G. *Electrochim. Acta*, **2011**, 56(24): 8926–8933
- 21 Yogeswaran U, Thiagarajan S, Chen S M. *Anal. Biochem.*, **2007**, 365(1): 122–131
- 22 Gligor D, Varodi C, Muresan L M. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **2010**, 24(2): 159–166
- 23 Wang S M, Cheng H H, Lai K F, Cheng S H. *Electrochim. Acta*, **2012**, (77): 330–338
- 24 Tsai Y C, Chen S Y, Liaw H W. *Sens. Actuators. B*, **2007**, 125(2): 474–481
- 25 Akhgar M R, Salari M, Zamani H. *J. Solid. State. Electrochem.*, **2011**, 15(4): 845–853
- 26 Zhu L, Zhai J, Yang R, Tian C, Guo L. *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, 22(11): 2768–2773
- 27 Ensafi A A, Karimi M H, Mallakpour S. *Colloids. Surf. B*, **2013**, 104: 186–193
- 28 Pereira A C, Aguiar M R, Kisner A, Macedo D V, Kubota L T. *Sens. Actuators. B*, **2007**, 124(1): 269–276
- 29 Mazurenko I, Etienne M, Tananaiko O, Urbanova V, Zaitsev V, Walcarius A. *Carbon*, **2013**, 53: 302–312
- 30 Luo X L, Xu J J, Wang J L, Chen H Y. *Chem. Commun.*, **2005**, (16): 2169–2171
- 31 Guo M L, Chen J H, Li J, Tao B, Yao S Z. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 532(1): 71–77
- 32 Zeng J X, Wei W Z, Wu L, Liu X Y, Liu K, Li Y. *J. Electroanal. Chem.*, **2006**, 595(2): 152–160
- 33 Liu J, Tian S, Knoll W. *Langmuir*, **2005**, 21(12): 5596–5599
- 34 Rahman M M, Shiddiky M J A, Rahman M A, Shim Y B. *Anal. Biochem.*, **2009**, 384(1): 159–165
- 35 YANG Huai-Cheng, WEI Wan-Zhi, ZENG Jin-Xiang, LIU Xiao-Ying, WANG Ying, YANG Ming-Hua. *Journal of Instrumental Analysis*, **2008**, 27(2): 135–138  
杨怀成, 魏万之, 曾金祥, 刘晓颖, 王莹, 杨明华. *分析测试学报*, **2008**, 27(2): 135–138
- 36 Liu S Q, Dai G P, Ling Y, Zhao Y P. *J. Chin. Chem. Soc.*, **2012**, (59): 1409–1414
- 37 Zhang M, Gorski W. *Electroanalysis*, **2011**, 23(8): 1856–1862
- 38 Tsai Y C, Chen S Y, Liaw H W. *Sens. Actuators. B. Chem.*, **2007**, 125(2): 474–481
- 39 Zhai X R, Wei W Z, Zeng J X, Gong S G, Yin J. *Microchim. Acta*, **2006**, 154(3–4): 315–320
- 40 Corrêa C C, Santhiago M, Formiga A B, Kubota L T. *Electrochim. Acta*, **2013**, 90: 309–316
- 41 Filip J, Šešćovićová J, Tomčík P, Gemeiner P, Tkáč J. *Talanta*, **2011**, 84(2): 355–361
- 42 Rotariu L, Istrate O M, Bala C. *Sens. Actuators. B. Chem.*, **2014**, 191: 491–497
- 43 FU Cong, LI Jian-Ping. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(11): 1762–1772  
付丛, 李建平. *分析化学*, **2013**, 41(11): 1762–1772
- 44 Tang L H, Zhu Y H, Xu L H, Yang X L, Li C Z. *Talanta*, **2007**, 73(3): 438–443

- 45 Urbanova V , Allali N , Ghach W , Mamane V , Etienne M , Dossot M , Walcarius A. *J. Electroanal. Chem.* , **2013** , 707: 129–133
- 46 Antiochia R , Gorton L. *Biosens. Bioelectron.* , **2007** , 22( 11) : 2611–2617
- 47 Kumar S A , Chen S M. *Sensors* , **2008** , 8( 2) : 739–766
- 48 Manso J , Luz M M , Sedeño P Y , Pingarron J Y. *Electrochimica. Acta* , **2008** , 53( 11) : 4007–4012
- 49 Deng L , Wang Y Z , Shang L , Wen D , Wang F , Dong S J. *Biosens. Bioelectron.* , **2008** , 24( 4) : 951–957
- 50 Teymourian H , Salimi A , Hallaj R. *Biosens. Bioelectron.* , **2012** , 33( 1) : 60–68
- 51 Tsai Y C , Tsai M C , Chiu C C. *Electrochem. Commun.* , **2008** , 10( 5) : 749–752
- 52 Bai L , Wen D , Yin J Y , Deng L , Zhu C Z , Dong S J. *Talanta* , **2012** , 91: 110–115
- 53 Tunckol M , Durand J , Serp P. *Carbon* , **2012** , 50( 4) : 4303–4334
- 54 Wang Q , Tang H , Xie Q J , Tan L , Zhang Y Y , Li B , Yao S. *Electrochim. Acta.* , **2007** , 52( 24) : 6630–6637
- 55 Mundaca R A , Guzmán M M , Eguílaz M , Sedeño P Y , Pingarron J M. *Talanta* , **2012** , 99: 697–702
- 56 Wei S , Wang Y H , Zhang Y Y , Ju X M , Li G J , Sun Z F. *Anal. Chim. Acta* , **2012** , 751: 59–65
- 57 Yuan J H , Chen J R , Wu X H , Fang K M , Niu L. *J. Electroanal. Chem.* , **2011** , 656( 1–2) : 120–124
- 58 Tominaga M , Nomura S , Taniguchi I. *Biosens. Bioelectron.* , **2009** , 24( 5) : 1184–1188
- 59 Hoshino T , Sekiguchi S I , Murguruma H. *Bioelectrochemistry.* , **2012** , 84: 1–5
- 60 Ramesh P , Sivakumar P Sampath S. *J. Electroanal. Chem.* , **2002** , 528( 1–2) : 82–92
- 61 Guo K , Qian K , Zhang S , Kong J L , Yu C Z , Liu B H. *Talanta* , **2011** , 85( 2) : 1174–1179
- 62 Li Z , Yi H , Li C , Qin X L , Huang Z , Zhou Y Q , Meng Y , Li J , Huang S , Liu Y , Wang W , Xie Q J , Yao S Z. *Sens. Actuators. B. Chem.* , **2013** , 181: 280–287
- 63 ZHENG Hui , LI Qiu-Shun , GAO Guang-Heng , ZHANG Li-Qun , MA Yao-Hong , SHI Jian-Guo. *China Biotechnology* , **2010** , 30( 9) : 118–123
- 郑 晖 , 李秋顺 , 高广恒 , 张利群 , 马耀宏 , 史建国. *中国生物工程杂志* , **2010** , 30( 9) : 118–123

## Recent Advances in Dehydrogenase Biosensors Based on Carbon Nanotube Modified Electrodes

LI Yi-Wei<sup>1,2</sup> , CHEN Yan<sup>2</sup> , MA Yao-Hong<sup>2</sup> , SHI Jian-Guo<sup>2</sup> , WANG Yuan-Xiu<sup>\*1</sup> , QI Cui-Hua<sup>1</sup> , LI Qiu-Shun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( School of Chemistry and Chemical Engineering , University of Jinan , Jinan 250022 , China)

<sup>2</sup>( Biology Institute of Shandong Academy of Sciences ,

Key Laboratory for Biosensors of Shandong Province , Jinan 250014 , China)

**Abstract** Nicotinamide adenine dinucleotide ( NADH) is involved as a cofactor in over 300 enzymatic reaction of NAD<sup>+</sup>/NADH dependent dehydrogenases. The application of amperometric NADH sensors has evolved to provide a promising measurement technique for detection of substrate or enzymatic activity. However , the direct oxidation of NADH at ordinary electrodes often requires high overpotential and suffers from low sensitivity and the fouling of the electrode surface by its oxidation products. In recent years , carbon nanotubes ( CNT) are attracting growing attention in decreasing the high overpotential for NADH oxidation and minimizing the surface fouling. This paper introduces the research progress of the NADH electrochemical sensors based on CNT-modified electrodes , and foretells its application prospect.

**Keywords** Carbon nanotube; Nicotinamide adenine dinucleotide; Electrochemical detection; Dehydrogenase biosensor; Review

( Received 15 October 2013; accepted 28 December 2013)

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China ( No. 2012AA021201) and the National Natural Science Foundation of China ( No. 61340032)