

酶-二氧化锰纳米片杂化探针自指示比色传感葡萄糖

李 莉¹, 许风国^{1,2*}, 陈金龙^{1,2,3**}

(¹中国药科大学药物分析学教研室,南京 210009; ²中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室,南京 210009;

³南开大学药物化学生物学国家重点实验室,天津 300071)

摘要 构建一种二氧化锰纳米片与葡萄糖氧化酶杂化自指示比色探针,在弱酸性条件下,葡萄糖氧化酶专属性催化氧化葡萄糖,定量产生葡萄糖酸和过氧化氢,生成的过氧化氢有效分解二氧化锰纳米片,探针体系特征吸收波长(374 nm)处吸收度降低。吸收度变化量与葡萄糖浓度呈线性相关,线性范围 1~20 μmol/L, 相关系数 $R^2 = 0.990\ 1$, 检测限低至 0.1 μmol/L。探针对葡萄糖具有高选择性和灵敏度, 血清样品中常见的氨基酸、阴离子、阳离子及蛋白质等小分子物质造成干扰均可忽略, 实际样品测定具有前处理简单、操作方便、快速等特点。此外, 鉴于二氧化锰的氧化还原特性以及酶催化体系的多样性, 酶-二氧化锰纳米片杂化探针平台具有普适性, 可设计构建多种分析物的比色传感器。

关键词 葡萄糖; 传感器; 比色法; 二氧化锰; 纳米片; 探针; 葡萄糖氧化酶

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2017)04-0453-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170410

引用本文 李莉,许风国,陈金龙. 酶-二氧化锰纳米片杂化探针自指示比色传感葡萄糖[J]. 中国药科大学学报,2017,48(4):453-460.
Cite this article as: LI Li, XU Fengguo, CHEN Jinlong. Exploration of enzyme-MnO₂ nanosheets hybridization probe for sensitively colorimetric self-indicating of glucose[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(4):453-460.

Exploration of enzyme-MnO₂ nanosheets hybridization probe for sensitively colorimetric self-indicating of glucose

LI Li¹, XU Fengguo^{1,2*}, CHEN Jinlong^{1,2,3**}

¹Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (Ministry of Education), China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ³State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract A colorimetric self-indicating probe for glucose was constructed by self-assembly of MnO₂ nanosheets (MnO₂ NSs) and glucose oxidase (GOD) in this paper. Under the weak acidic medium, glucose oxidase specifically catalyzes glucose into gluconic acid and hydrogen peroxide. The by-product of hydrogen peroxide could efficiently dissolve the MnO₂ nanosheets, resulting into a significant decrease of the characteristic absorbance at 374 nm assigned to MnO₂ NSs. Furthermore, the absorbance difference was linearly proportional to the concentration of glucose ranging from 1 to 20 μmol/L. The fitted curve could be used for quantification of glucose with a correlation coefficient of 0.990 1. And the detection limit as low as 0.1 μmol/L could be reached based on the definition of three times of the deviation of the blank signal (3σ) and there was negligible interference with other co-existing amino acids, anions, cations and protein, which indicated high sensitivity and selectivity of the hybrid probe. The construction strategy of designated probe is readily generalized in principle for detection of numerous analytes in view of reactive property of MnO₂ and the diversity of enzymes.

Key words glucose; sensor; colorimetry; MnO₂; nanosheets; probe; glucose oxidase

收稿日期 2016-12-16 通信作者 * Tel: 025-83271021 E-mail: fengguoxu@cpu.edu.cn

** Tel: 025-83271316 E-mail: chenjl_4@hotmail.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 21305161); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK20130643); 药物质量与安全预警教育部重点实验室开放课题资助项目(DQCP2015MS06); 药物化学生物学国家重点实验室(南开大学)开放基金资助项目(No. 20130404)

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21350161); the Natural Science Founding of Jiangsu Province (No. BK20130643); the Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (DQCP2015MS06) and Open Projects of State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology (No. 20130404).

糖尿病是常见的慢性疾病之一,患病人数多且逐年增加。截至2014年,世界范围内已有3.87亿糖尿病患者,预测到2035年,患者人数将增加至5.92亿^[1-2]。人体葡萄糖含量的准确检测对评估健康状况、指导患者用药具有重要的意义。如果糖尿病患者在血糖过高时未及时提供胰岛素,容易引起诸多并发症如失明、肾衰竭、截肢等;如果使用胰岛素过量,容易出现低血糖,导致认知障碍,大脑损害^[3]。因此,开发简单、高效、廉价血糖检测新技术和新方法具有十分重要的意义。

目前,传统检测血糖的方法主要有:比色法^[4-6]、荧光法^[7-9]、电化学法^[10-12]和化学发光法^[13]。其中,荧光法和电化学法原理复杂,需要昂贵的仪器设备和复杂的样品处理过程,而血液中内源性发光物质较多,化学发光选择性差。与这些方法比较,比色法具有仪器设备成本低、操作简单等特点,是检测人体液样品中葡萄糖的优选方法。

近年来,二氧化锰纳米片(MnO_2 NSs)作为一种新型二维纳米材料,具有比表面积大、氧化还原特性及结构多样等特点,被广泛应用于催化、分离、能源存储以及生物传感与检测等领域^[14-16]。此外,二氧化锰基本组成单元是正八面体结构,其中锰-氧元素间d-d跃迁使分子具有特征紫外吸收性质^[17]。本研究利用 MnO_2 NSs非共价固定化承载葡萄糖氧化酶(GOD)构建了一种自指示比色葡萄糖探针,考察了反应机制,优化了检测条件,分析选择性,并将此体系成功用于不同水平人血糖含量的检测,结果与商用仪器测试结果吻合。现有基于比色法原理的自动分析仪主要利用特定的显色剂在葡萄糖氧化酶与过氧化氢酶联用下显色实现血糖的定量测定^[18];本法灵敏度高,且不需要额外加入过氧化氢酶与其他显色剂,只需要葡萄糖氧化酶和价廉易得二氧化锰纳米片,具有所需试剂价格低廉、原理简单、仪器通用等优势。

1 材料

1.1 试剂和样品

过氧化氢(30%)、高锰酸钾、浓硫酸、醋酸钠、

冰醋酸(南京化学试剂有限公司);十二烷基硫酸钠[SDS,生兴生物技术(南京)有限公司];葡萄糖(西陇化工股份有限公司);葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD, 阿拉丁试剂有限公司);其他试剂均为市售分析纯;实验用水为二次蒸馏水。

1.2 仪器

UV-1700紫外分光光度计(日本岛津公司);F-4600荧光光谱仪(日本日立公司);FT/IR-4100傅里叶变换红外光谱仪、J-810圆二色谱(日本JAS-CD公司)。

2 方法

2.1 MnO_2 NSs的合成

称取十二烷基硫酸钠(SDS)粉末461.4 mg,置于250 mL圆底烧瓶中,加入去离子水160 mL溶解后,加入浓度为1.8 mol/L的 H_2SO_4 45 μL ,水浴95 °C加热搅拌15 min。然后水浴降温至85 °C,缓慢加入浓度为0.05 mol/L的 KMnO_4 溶液1.6 mL,加热搅拌35 min,溶液由紫红色变为均一棕色溶液,反应停止。所得反应液在4 °C条件下存放1周,溶液稳定。将反应液离心,得到黑色固体,弃去上清液,用去离子水和乙醇反复冲洗5~6次,所得沉淀即为 MnO_2 NSs固体。冷冻干燥后,备用。

2.2 溶液配制和检测

2.2.1 MnO_2 NSs储备液配制与检测 准确称取一定量 MnO_2 NSs固体,加去离子水溶解,超声,分散得均一的棕色溶液,作为储备液备用。

2.2.2 MnO_2 NSs过氧化氢溶液的配制与检测于10 mL量瓶中,依次加入 MnO_2 NSs储备液1 mL,NaAc-HAc缓冲液(pH 5.6, 0.1 mol/L)1 mL,不同浓度过氧化氢储备液50 μL ,加水定容至10 mL,摇匀,37 °C水浴30 min,检测扫描紫外吸收光谱,采集374 nm波长下的吸收度。

2.2.3 MnO_2 NSs葡萄糖溶液的配制与检测 于10 mL量瓶中,依次加入 MnO_2 NSs母液1 mL,NaAc-HAc缓冲液(pH 5.6, 0.1 mol/L)1 mL,葡萄糖氧化酶(0.05 mg/mL)300 μL ,不同浓度的葡萄

糖储备液 50 μL , 加水定容至 10 mL, 摆匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 检测扫描紫外吸收光谱, 采集 374 nm 波长下的吸收度。

2.3 人血糖含量检测

从东南大学中大医院获得 8 份全血样品, 室温静置 20 min 后, 用 1 500 r/min 转速离心, 析出血清, 不再需要其他预处理, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存, 备用。检测血清中葡萄糖含量溶液的配制:于 10 mL 量瓶中, 依次加入 MnO_2 NSs 母液 1 mL, NaAc-HAc 缓冲液 (pH 5.6, 0.1 mol/L) 1 mL, 葡萄糖氧化酶 (GOD, 0.05 mg/mL) 300 μL , 取各血清样品 10 μL , 加水定容至 10 mL, 摆匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 检测扫描紫外吸收光谱, 采集 374 nm 波长下的吸收度。

3 结果与讨论

3.1 MnO_2 NSs 的合成及表征

合成 MnO_2 NSs 的过程中, SDS 首先被 H_2SO_4 活化形成十二烷醇, 然后与 KMnO_4 发生氧化还原反应, 生成 MnO_2 与十二烷酸;此外, 反应中 SDS 作为表面活性剂, 起到结构诱导作用, 保证生成的二氧化锰以纳米片形态存在^[17]。

采用紫外-可见吸收光谱、TEM、AFM、Zeta 电势等手段对 MnO_2 NSs 进行表征。如图 1-A, 超声

分散后的 MnO_2 NSs 为均匀棕色的胶体溶液, 显现出明显的丁达尔效应。紫外可见吸收光谱图(图 1-B)表明, MnO_2 NSs 在 374 nm 处有独特的紫外吸收。TEM 结果(图 1-C)表明制备得到 MnO_2 NSs 呈现出透明的片层结构, 表面有石墨烯样部分褶皱, 直径约 200~300 nm。AFM 结果表明纳米片平均厚度约为 0.877 nm, 由于水化作用, 略高于 MnO_2 理论单层厚度 0.52 nm。因此, 本法合成的 MnO_2 NSs 是单层片状结构。

Zeta 电势是反映物质表面电荷种类和带电量的物理量, MnO_2 NSs 在 pH 5.6 的 NaAc-HAc 缓冲液中, Zeta 电势为 -23.0 eV, 表明 MnO_2 NSs 表面带有负电荷, 电荷斥力使纳米片溶液维持相对稳定的状态。不同浓度 MnO_2 NSs 紫外吸收光谱, 如图 2 所示, 随着 MnO_2 NSs 浓度的增加, 特征吸收度依次增加, 符合 Lambert-Beer 定律。 MnO_2 NSs 的浓度以锰离子物质的量浓度指示, 特定吸收度下的纳米片的锰离子浓度通过 ICP-OES 准确定量, 计算出 MnO_2 NSs 的摩尔吸光系数 $\varepsilon_{374 \text{ nm}}$ 为 8 890.17 L/(mol·cm), 结果与文献一致^[19]。综上所述, 表面带有负电荷的 MnO_2 NSs 分散均一, 在 374 nm 处有特征紫外吸收且具有较大的摩尔吸光系数, 具有比色传感应用潜力。

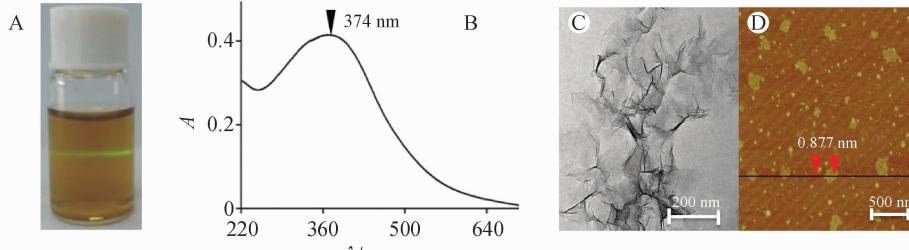


Figure 1 (A) Photograph of Tyndall effect for water-dispersion of MnO_2 nanosheets (NSs); (B) A respective UV-vis spectrum of the aqueous dispersion of MnO_2 NSs; (C) TEM image of MnO_2 NSs; (D) AFM image of MnO_2 NSs

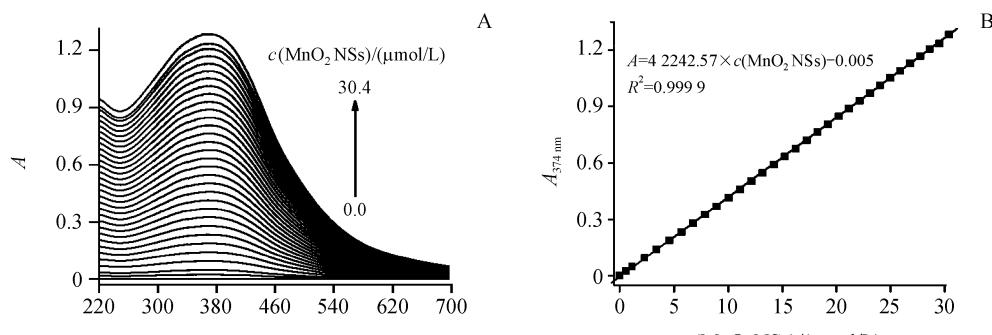
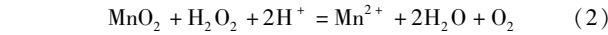
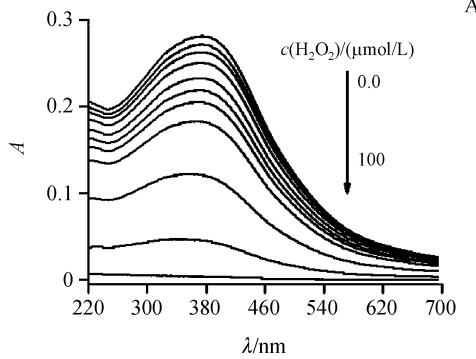
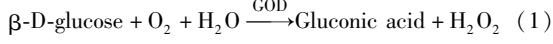


Figure 2 (A) UV-visible spectra for water-dispersions of various concentrations of MnO_2 NSs; (B) A linear calibration plot of the various concentrations of MnO_2 NSs

3.2 葡萄糖比色传感器的设计

在弱酸性条件下,GOD特异性催化葡萄糖定量产生过氧化氢(反应式1)^[20],过氧化氢有效降解MnO₂ NSs为可溶性锰离子(反应式2)^[21],MnO₂ NSs特征吸收光谱消失,吸收度降低。



为验证杂化探针传感的可行性,在pH 5.6的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中,不同浓度过氧化氢对MnO₂ NSs的降解效果如图3所示,374 nm波长处吸收度随着过氧化氢浓度的增大,而逐渐降低,直至分解完全,降低到缓慢接近零。

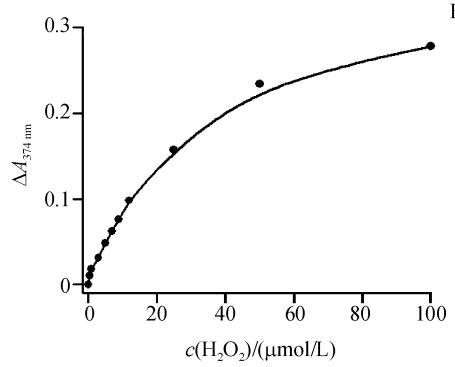


Figure 3 (A) A serial representative absorption spectra of 32 μmol/L MnO₂ NSs in addition of the different concentrations of H₂O₂; (B) Absorbance changes at 374 nm of MnO₂ NSs in the presence of different concentrations of H₂O₂

MnO₂ NSs-GOD杂化探针设计可行性如图4-A所示,相应浓度下各物质的紫外吸收光谱,只有MnO₂ NSs在220 nm到700 nm范围有独特的紫外吸收;GOD或者葡萄糖单独与MnO₂ NSs混合,MnO₂ NSs的374 nm处的吸收度值不发生改变,只

有二者同时存在时,由于产生过氧化氢,分解了MnO₂ NSs,特征吸收消失。据此,结合MnO₂ NSs反应特性和GOD催化特性,二者可构建出一种酶杂化纳米探针比色传感葡萄糖。

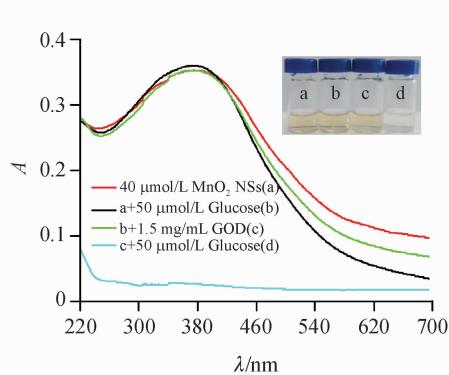
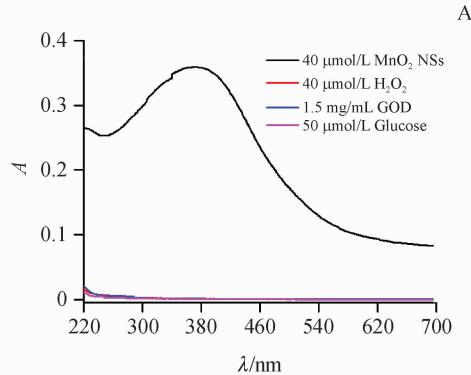


Figure 4 (A) Representative absorption spectra of MnO₂ NSs (40 μmol/L), H₂O₂ (50 μmol/L), glucose oxidase (GOD) (1.5 mg/mL) and glucose (50 μmol/L); (B) Absorption spectra of 40 μmol/L MnO₂ NSs (a) only, and in presence of glucose (50 μmol/L), GOD (1.5 mg/mL), glucose (50 μmol/L) and GOD (1.5 mg/mL), respectively. Inset: the images of corresponding solutions in sunlight

3.3 酶杂化纳米探针比色传感条件优化

GOD的催化活性与反应体系与pH、温度关系密切,同时pH与温度也会影响到过氧化氢分解纳米片的反应。首先考察pH对反应体系紫外吸收度差值变化影响,如图5-A,加入25 μmol/L葡萄糖后,当pH 5.6时,体系的吸收度变化达到最大,说明GOD在此条件下活性最高,因此,选择pH

5.6的NaAc-HAc缓冲液作为反应介质。在pH 5.6条件下,反应温度对酶活性的影响如图5-B,在温度为37 °C时左右时,GOD酶活力最大,过高或过低的温度都不利于GOD的催化反应。在pH 5.6酶杂化纳米探针反应体系中加入50 μmol/L的葡萄糖,温度为37 °C条件下,反应30 min后,吸收度基本趋于稳定。因此,酶杂化纳米探针比色传

感葡萄糖工作检测条件为:pH 5.6 的 NaAc-HAc 缓冲液(10 mmol/L)介质中,温度为 37 °C,反应时

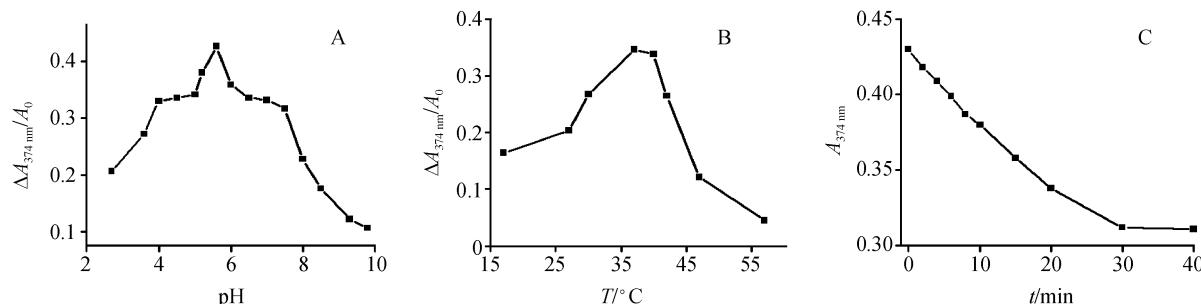


Figure 5 (A) pH-dependent glucose-decomposition of MnO_2 NSs; (B) Effect of temperature on the decreased absorbance of 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GOD with 35 $\mu\text{mol}/\text{L}$ MnO_2 NSs system in the presence of 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ glucose; (C) The time-dependent absorbance changes at 374 nm

3.4 酶杂化纳米探针检测葡萄糖的分析特征量

在最优工作条件下,酶杂化纳米探针与不同浓度葡萄糖反应后紫外吸收光谱曲线如图 6-A 所示。随着葡萄糖浓度增加,体系吸收度逐渐降低。以 374 nm 处吸收度变化值为纵坐标,葡萄糖浓度为横坐标绘制标准曲线,葡萄糖浓度在 1 ~ 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$

间为 30 min。

范围内与探针体系吸收度变化值($\Delta A = A_0 - A$)呈现良好线性依赖关系,线性方程为 $\Delta A = 0.0049c + 0.01161$ ($R^2 = 0.9901$)。根据 IUPAC 规定,由空白信号的标准偏差得出检测限低至 0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ($n = 10$)。

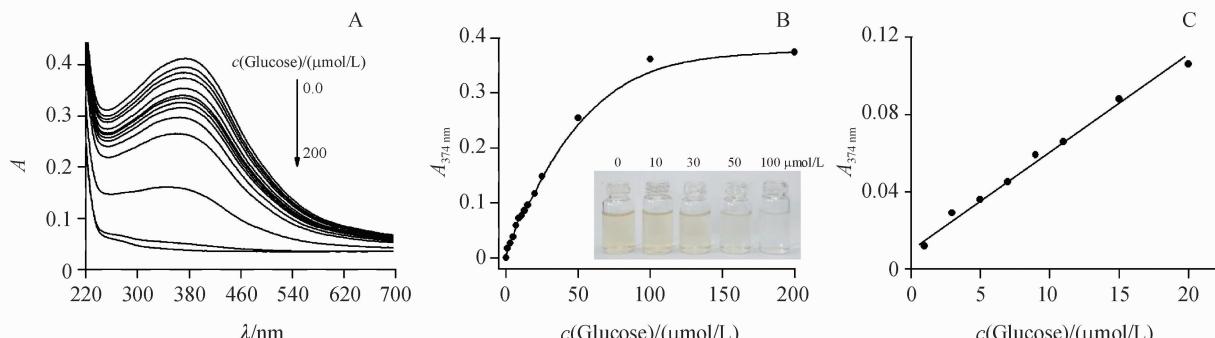


Figure 6 (A) Effect of the concentration of glucose on the absorption spectra of 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GOD-35 $\mu\text{mol}/\text{L}$ MnO_2 NSs based colorimetric biosensor; (B) Plots of the decreased absorbance at 374 nm (Inset: the images of MnO_2 NSs water solutions in the presence of various concentrations of glucose in sunlight); (C) A linear calibration plot of the decreased absorbance for glucose

3.5 葡萄糖氧化酶活力研究

酶杂化纳米探针的分析性能与酶活力密切相关,为研究 GOD 催化性能,在特定底物浓度范围内,酶催化反应遵循 Michaelis-Menten 动力学模型。

计算酶促反应双倒数方程: $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$, 结果如图 7 所示。其次,表征酶促反应的两个重要参数:米氏常数(K_m)与最大初试反应速率(V_{\max}),其中 K_m 反映了酶与底物亲和力,数值等于酶促反应达到最大速度 V_{\max} 一半时底物浓度,数值越低表示酶与底物的亲和力越高。经计算, MnO_2 NSs 非共价固定 GOD 后的 K_m 为 0.0298 mmol/L ,与 GOD

本征 K_m 5.85 mmol/L 相比提高了 196 倍。这与酶杂化纳米探针比色检测的高灵敏结果相吻合,纳米片与酶的非共价相互作用进一步通过红外光谱、圆二色光谱和荧光光谱进行分析。

3.5.1 红外光谱分析 傅里叶变换-红外光谱分析(FT-IR)是研究固态多肽或蛋白质构象一种实用分析手段。分别对单独 GOD、 MnO_2 NSs 及两者混合物进行 FT-IR 分析,结果如图 8 所示。518.758 cm^{-1} 是 Mn-O 八面体振动产生的特征吸收,669.178 cm^{-1} 为蛋白质中 N-H 的弯曲振动,与单独的物质比较,混合物在 575.647 cm^{-1} 吸收峰,可能是由于氢键作用导致峰位置发生移动。

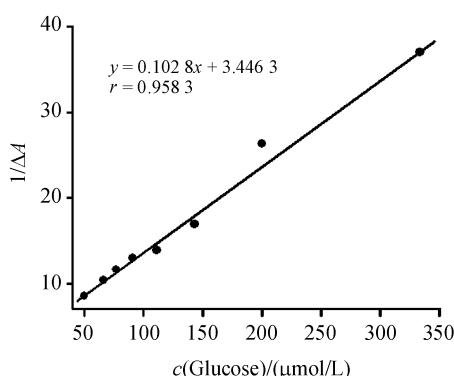


Figure 7 Lineweaver-Burk plot of the GOD-glucose reaction

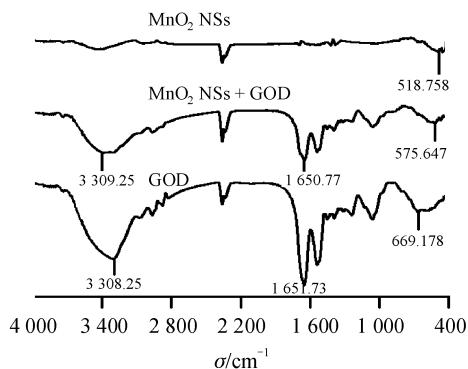


Figure 8 FT-IR spectra of MnO_2 NSs, GOD, GOD immobilization on MnO_2 NSs, respectively

3.5.2 圆二色光谱分析 圆二色光谱结果如图9所示。单独的 GOD 分别在 210 与 219 nm 处有两个特征峰,当与 MnO_2 NSs 溶液作用后,特征峰位置分别变为 208 与 216 nm;通过软件 CDpro 计算出 GOD 与 MnO_2 NSs 作用前后的二级结构变化,如表1 所示:与 MnO_2 NSs 作用后,GOD 的 α -螺旋降低, β -折叠与 β -转角增加,无规则卷曲的总体含量一定,表明与 MnO_2 NSs 与 GOD 主要通过柔性的非共价相互作用,二级结构变化后 GOD 与底物亲和力增加。

3.5.3 荧光光谱分析 GOD 分子是二聚体,每个单体包含一个活性中心黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD),FAD 包埋于 GOD 内部,在反应过程中起主要作用。FAD 周围有很多芳香族氨基酸相连,其中 3 个色氨酸与 FAD 相连,7 个色氨酸残基与其他部位相连^[22]。色氨酸在 280 nm 处有最大吸收峰,在水溶液中,色氨酸残基从疏水性内部向亲水性蛋白质表面移动,发射峰中心位置红移,是蛋白质解折叠的过程^[23]。在 280 nm 激发波长下,与

MnO_2 NSs 混合后,GOD 荧光发射中心发生了一定的红移,表明 FAD 周围微环境发生了变化,蛋白质发生了解折叠过程,暴露了内部活性中心,增加酶的催化活力(见图 10)。

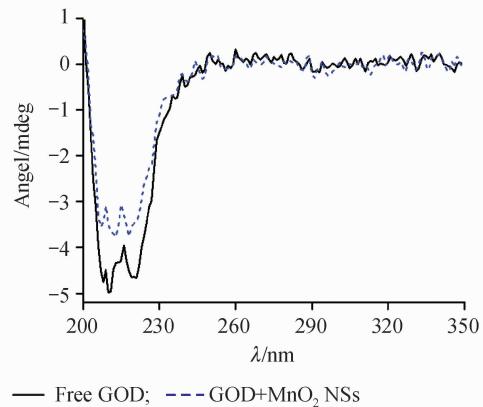


Figure 9 CD spectra of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ free GOD (black line) and their mixture (blue line), respectively

Table 1 Enzymatic conformation of free GOD and GOD with MnO_2 NSs by use of CDpro software

Enzymatic conformation	Free GOD/%	Immobilized GOD/%
α -Helix	41.9	31.7
β -Sheet	13.1	19.1
β -Turns	16.9	20.5
Random coil	29.2	29.8
Total	101.1	101.1

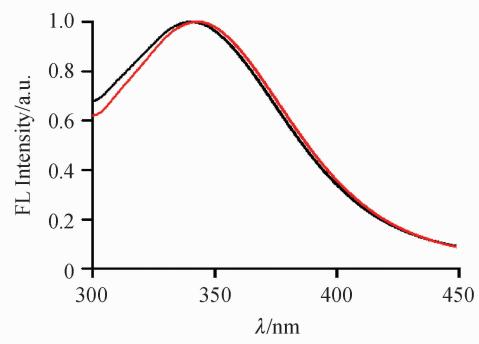


Figure 10 Fluorescence spectra of free 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GOD and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GOD+150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ MnO_2 NSs

综上所述,FT-IR、CD 光谱以及荧光光谱实验结果表明,GOD 与 MnO_2 NSs 通过非共价柔性作用,诱导 GOD 的二级结构发生部分改变,活性中心暴露,促使酶活力显著提升。

3.6 酶杂化纳米探针选择性研究

血清中可能共存的不同干扰离子、氨基酸及其他物质对酶杂化纳米探针的吸收度变化如图 11 所

示,向溶液中加入10倍于实际检测时血清中该物质的浓度,无论是常见的阴、阳离子,氨基酸或人血清白蛋白,干扰几乎可以忽略,说明该探针对葡萄糖具有很好的选择性。尤其可区分葡萄糖和其他糖类分子,相同条件下,浓度为30 mmol/L的果糖、麦芽糖、乳糖及浓度为50 μmol/L的葡萄糖作用酶杂化纳米探针后,只有葡萄糖可以引起探针体系吸

收度和溶液颜色改变。不同稀释倍数的血清样品紫外-可见吸收光谱图如图11-D所示,当样品被稀释1000倍后,374 nm处吸收度已降低至0.015以下,对探针体系吸收度影响几乎可以忽略。总之,酶杂化纳米探针具有高选择性检测葡萄糖的特性,可满足实际血样分析的要求。

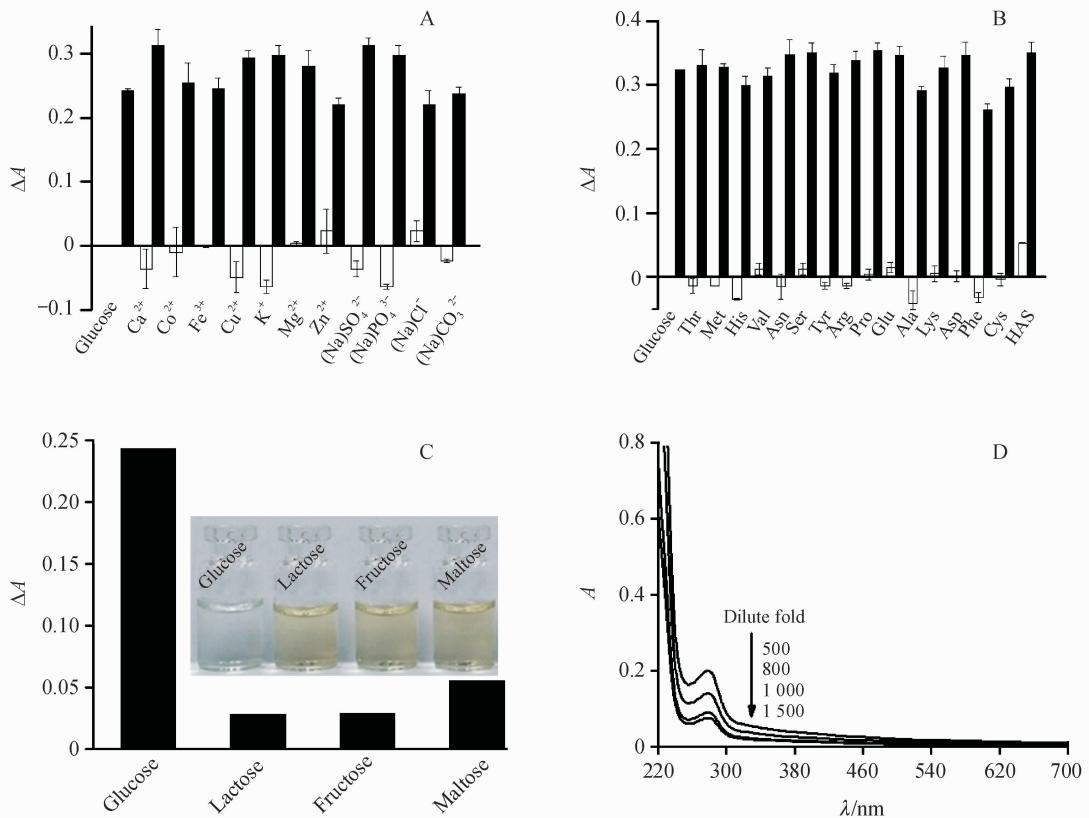


Figure 11 (A) Selectivity of glucometer composing of 1.5 μg/mL GOD and 35 μmol/L MnO₂ NSs. The white bars represent the addition of metal cation ions and anions. The black bars represent the subsequent addition of 50 μmol/L glucose to the solution; (B) The white bars represent the addition of an excess of amino acids (0.5 mmol/L for L-cysteine and 1 mmol/L for other amino acids, 20 μg/mL for human serum albumin (HSA)); The black bars represent the subsequent addition of 50 μmol/L glucose to the solution; (C) Selectivity analysis of glucometer for glucose; Inset: the color change with the corresponding solutions; (D) Spectra of human blood serum samples dilution by different folds

3.7 人血糖的检测

为了验证酶杂化纳米探针的实用性,本实验选取从中大医院获得8份已知血糖浓度的血浆样品(包括正常人与糖尿病患者)。血浆样品经1500 r/min转速离心,血清析出。将血清移出,用外标法检测血清中血糖的含量。以医院所用日立7060自动分析仪测得血糖浓度为X轴、本方法测试血糖浓度为Y轴分析,两者检验结果吻合,回归方程: $Y=0.98X+0.13, r=0.9894$,说明本研究所设计的酶杂化纳米探针具有较好的临床应用潜力。

4 结 论

本研究利用二氧化锰纳米片独特的结构与性质,与葡萄糖氧化酶杂化构建了一种新型自指示比色葡萄糖探针,非共价相互作用诱导酶结构和活性中心的柔性变化,显著地提高了酶活力,赋予了酶纳米杂化探针的高灵敏度,成功用于不同水平人血浆中血糖的含量检测。简单的原理,价格低廉的试剂、通用仪器预示酶纳米片杂化探针今后具有易于推广与使用的潜力。

參考文獻

- [1] Mo R, Jiang T, Di J, et al. Emerging micro- and nanotechnology based synthetic approaches for insulin delivery [J]. *Chem Soc Rev*, 2014, **43**(10):3595–3629.
- [2] Tabák AG, Herder C, Rathmann W, et al. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development [J]. *Lancet*, 2012, **379**(9833):2279–2290.
- [3] Ye YQ, Yu JC, Wang C, et al. Microneedles integrated with pancreatic cells and synthetic glucose-signal amplifiers for smart insulin delivery [J]. *Adv Mater*, 2016, **28**(16):3115–3121.
- [4] Chen S, Hai X, Chen XW, et al. *In situ* growth of silver nanoparticles on graphene quantum dots for ultrasensitive colorimetric detection of H_2O_2 and glucose [J]. *Anal Chem*, 2014, **86**(13):6689–6694.
- [5] Ornatska M, Sharpe E, Andreeescu D, et al. Paper bioassay based on ceria nanoparticles as colorimetric probes [J]. *Anal Chem*, 2011, **83**(11):4273–4280.
- [6] Wei H, Wang E. Fe_3O_4 magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H_2O_2 and glucose detection [J]. *Anal Chem*, 2008, **80**(6):2250–2254.
- [7] Shen P, Xia Y. Synthesis-modification integration: one-step fabrication of boronic acid functionalized carbon dots for fluorescent blood sugar sensing [J]. *Anal Chem*, 2014, **86**(11):5323–5329.
- [8] Li L, Gao F, Ye J, et al. FRET-based biofriendly Apo-Gox-modified gold nanoprobe for specific and sensitive glucose sensing and cellular imaging [J]. *Anal Chem*, 2013, **85**(20):9721–9727.
- [9] Wu P, He Y, Wang HF, et al. Conjugation of glucose oxidase onto Mn-doped ZnS quantum dots for phosphorescent sensing of glucose in biological fluids [J]. *Anal Chem*, 2010, **82**(4):1427–1433.
- [10] Lin L, Yan J, Li J. Small-molecule triggered cascade enzymatic catalysis in hour-glass shaped nanochannel reactor for glucose monitoring [J]. *Anal Chem*, 2014, **86**(21):10546–10551.
- [11] Song J, Xu L, Zhou C, et al. Synthesis of graphene oxide based CuO nanoparticles composite electrode for highly enhanced nonenzymatic glucose detection [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, **5**(24):12928–12934.
- [12] Wang J. Electrochemical glucose biosensors [J]. *Chem Rev*, 2008, **108**(2):4473–4491.
- [13] Lan D, Li B, Zhang Z. Chemiluminescence flow biosensor for glucose based on gold nanoparticle-enhanced activities of glucose oxidase and horseradish peroxidase [J]. *Biosens Bioelectron*, 2008, **24**(4):934–938.
- [14] Butler SZ, Hollen SM, Cao L, et al. Progress challenges and opportunities in two-dimensional materials beyond graphene [J]. *ACS Nano*, 2013, **7**(4):2898–2926.
- [15] Sakai N, Ebina Y, Takada K, et al. Electronic band structure of Titania semiconductor nanosheets revealed by electrochemical and photoelectrochemical studies [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(18):5851–5858.
- [16] Yang D, Lu Z, Rui X, et al. Synthesis of two-dimensional transition-metal phosphates with highly ordered mesoporous structures for lithium-ion battery applications [J]. *Angew Chem*, 2014, **53**(35):9352–9355.
- [17] Liu Z, Xu K, Sun H, et al. One-step synthesis of single-layer MnO_2 nanosheets with multi-role sodium dodecyl sulfate for high performance pseudocapacitors [J]. *Small*, 2015, **11**(18):2182–2191.
- [18] Barham D, Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system [J]. *Analyst*, 1972, **97**(151):142–145.
- [19] Omomo Y, Sasaki T, Watanabe M. Redoxable nanosheet crystallites of MnO_2 derived via delamination of a layered manganese oxide [J]. *Chem Inform*, 2003, **125**(24):3568–3575.
- [20] Gill R, Bahshi L, Freeman R, et al. Optical detection of glucose and acetylcholine esterase inhibitors by H_2O_2 -sensitive CdSe/ZnS quantum dots [J]. *Angew Chem*, 2008, **120**(9):1700–1703.
- [21] Nakayama M, Sato A, Yamaguchi R. Decomposition and detection of hydrogen peroxide using $\delta\text{-MnO}_2$ thin film electrode with self-healing property [J]. *Electroanalysis*, 2013, **25**(10):2283–2288.
- [22] Liu WQ. Preparation and properties of glucose oxidase biosensor (葡萄糖氧化酶传感器制备及性能研究) [D]. Beijing: Beijing Technology and Business University, 2014.
- [23] Burstein EA, Vedenkina NS, Ivkova MN. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules [J]. *Photochem Photobiol*, 1973, **18**(4):263–279.