

## • 生物技术与方法 •

# 葡萄糖氧化酶在枯草芽孢杆菌芽孢表面的展示及其酶电极制备

林平<sup>1,2</sup>, 宋龙祥<sup>1,2</sup>, 常德军<sup>1,2</sup>, 马耀宏<sup>3</sup>, 王腾飞<sup>1,2</sup>

1 齐鲁工业大学 (山东省科学院) 生物基材料与绿色造纸国家重点实验室, 山东 济南 250353

2 齐鲁工业大学 (山东省科学院) 山东省微生物工程重点实验室, 山东 济南 250353

3 齐鲁工业大学 (山东省科学院) 生物研究所山东省生物传感器重点实验室, 山东 济南 250103

林平, 宋龙祥, 常德军, 等. 葡萄糖氧化酶在枯草芽孢杆菌芽孢表面的展示及其酶电极制备. 生物工程学报, 2020, 36(9): 1908–1917.

Lin P, Song LX, Chang DJ, et al. Display of glucose oxidase on *Bacillus subtilis* spore surface and preparation for enzyme electrode. Chin J Biotech, 2020, 36(9): 1908–1917.

**摘 要:** 葡萄糖生物传感器是目前最为常见的电化学生物传感器, 绝大多数葡萄糖生物传感器采用在电极表面修饰葡萄糖氧化酶的方法来制备, 但是, 在电极的固定化过程中需要酶的纯化, 使得成本增加, 已成为固定化酶电极开发领域的瓶颈。文中主要以芽孢衣壳蛋白 CotX 为锚定蛋白将葡萄糖氧化酶 (Glucose oxidase, GOD) 展示到枯草芽孢杆菌芽孢表面, 通过 Western blotting 分析、免疫荧光分析以及酶活检测均证明 GOD 在芽孢表面有效表达, 发酵获得重组芽孢 (Spore-GOD)。再采用滴涂法和电沉积法制备了氧化石墨烯/普鲁士蓝沉积膜修饰玻碳电极, 将 Spore-GOD 固定在修饰电极表面, 最后滴加一层 Nafion 溶液, 制成了电化学生物传感器, 用于葡萄糖的灵敏测定。葡萄糖在该酶电极传感器上的循环伏安图表明, 该反应在 0.42 V 处出现明显的氧化峰, 并且氧化还原峰电流与葡萄糖浓度在 0.1–7.0 mmol/L 之间具有良好的线性关系, 校正曲线方程为:  $I = 1.304 \cdot 7C_{\text{glucose}} + 3.639$  ( $R^2 = 0.9929$ ), 其检测限为 7.5  $\mu\text{mol/L}$  ( $S/N=3$ )。此修饰电极具有良好的导电性能、稳定性和重现性, 可用于葡萄糖的分析测定。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌, 表面展示, 葡萄糖氧化酶, 氧化石墨烯, 普鲁士蓝沉积, 生物传感器

**Received:** January 25, 2020; **Accepted:** March 23, 2020

**Supported by:** Key Research and Development Plan of Shandong Province, China (No. 2017GSF221019), Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences) Youth Doctor Cooperation Fund Project (No. 2017BSH2021).

**Corresponding authors:** Tengfei Wang. Tel: +86-531-89631901; E-mail: wangtengfei1981@163.com

Yaohong Ma. Tel: +86-531-82605742; E-mail: mayaohong@126.com

山东省重点研发计划 (No. 2017GSF221019), 齐鲁工业大学 (山东省科学院) 青年博士合作基金项目 (No. 2017BSH2021) 资助。

网络出版时间: 2020-04-08

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200407.1637.006.html>

# Display of glucose oxidase on *Bacillus subtilis* spore surface and preparation for enzyme electrode

Ping Lin<sup>1,2</sup>, Longxiang Song<sup>1,2</sup>, Dejun Chang<sup>1,2</sup>, Yaohong Ma<sup>3</sup>, and Tengfei Wang<sup>1,2</sup>

1 State Key Laboratory of Bio-based Materials and Green Papermaking, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250353, Shandong, China

2 Shandong Key Laboratory of Microbial Engineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250353, Shandong, China

3 Shandong Provincial Key Laboratory of Biosensors, Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, Shandong, China

**Abstract:** Glucose biosensor is currently the most common electrochemical biosensor. Most glucose biosensors are prepared by modifying glucose oxidase on the electrode surface. However, in the process of electrode immobilization, enzyme purification is required, which increases the cost and has become a bottleneck in the field of development of immobilized enzyme electrodes. In this study, glucose oxidase (GOD) was displayed on the surface of *Bacillus subtilis* using the spore capsid protein CotX as an anchor protein. By Western blotting analysis, immunofluorescence analysis and enzyme activity detection, GOD was effectively expressed on the surface of spores, and recombinant spores (Spore-GOD) were obtained by fermentation. The graphene oxide/prussian blue deposition film modified glassy carbon electrode was prepared by the drop coating method and the electrodeposition method. The surface of the modified electrode was fixed with Spore-GOD, and finally covered with a layer of Nafion solution to make an electrochemical biosensor for sensitive determination of glucose. The cyclic voltammogram of glucose on the enzyme electrode sensor showed a well-defined oxidation peak at 0.42 V, and the redox peak current has a good linear relationship with the glucose concentration in the range of 0.1–7.0 mmol/L. The calibration curve equation is:  $I = 1.305C_{\text{glucose}} + 3.639$  ( $R^2 = 0.9929$ ), and its detection limit is 7.5  $\mu\text{mol/L}$  ( $S/N = 3$ ). This modified electrode has good conductivity, stability and reproducibility, and can be used for the analysis and determination of glucose.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, surface display, glucose oxidase, graphene oxide, Prussian blue deposition, biosensor

葡萄糖-1-氧化酶 (Glucose oxidase, GOD) ( $\beta$ -D-葡萄糖氧化还原酶, EC 1.1.3.4) 是一种重要的糖蛋白,由 2 个相同的 80 kDa 亚基和 2 个黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 辅酶组成。在有氧条件下,能够以分子氧为电子受体,将葡萄糖氧化为葡萄糖酸和过氧化氢。GOD 主要生产菌株为黑曲霉和青霉,由于其氧化能力,显示出较高的酶稳定性,因此与其他酶相比, GOD 在酶电极中起着主导作用<sup>[1-2]</sup>。但是,在电极的固定化过程中需要酶的纯化,这增加了成本,并且已成为固定化酶电极开发领域的瓶颈<sup>[3]</sup>。另外,常规的物理或化学固定方法经常导致酶活性损失、酶泄漏和传质阻抗<sup>[4]</sup>。

近几年,随着微生物表面展示技术的不断发展,实现了微生物表面展示酶与酶电化学生物传感器的结合。在传感器的发展中,纯度较高的商品酶应用较多,但由于其制备和提取工艺极其繁

琐,使得酶的成本增加,这也就限制了商品酶生物传感器的使用范围。通过微生物表面展示技术,将外源蛋白展示在微生物表面,有利于提高酶的热稳定性和 pH 耐受性<sup>[5-8]</sup>。相比于商品酶,展示在微生物表面的酶不需要复杂的制备工艺,容易获取,节约成本。因此,微生物表面展示技术与酶电化学生物传感器的结合是一种必然趋势。随着完成枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 基因组的测序工作, *B. subtilis* 芽孢表面已成功展示了多种外源蛋白,并因该菌株为安全菌株,无内毒素,在许多生产领域备受认可,如食品与医药、水质净化、饲料生产等领域<sup>[9-11]</sup>。构建 *B. subtilis* 芽孢表面表达体系时,以芽孢衣壳蛋白为锚定蛋白,将外源蛋白融合展示在芽孢表面,因为芽孢是在细菌细胞质中合成的,所以外源蛋白的表达都不需要穿过任何膜,并且芽孢能抵抗恶劣的环境条件,

有利于提高外源蛋白质在复杂环境中的使用稳定性<sup>[12-14]</sup>。发酵得到的重组芽孢可以直接用于电极修饰,避免因细胞破碎、杂质分离造成的成本增加。

氧化石墨烯(Graphene oxide, GO)是石墨烯的氧化物,其片层上有大量的羟基和羧基活性基团<sup>[15]</sup>,含氧官能团隔开了石墨烯共轭自由基团,使氧化石墨烯具有良好的亲水性和机械性能<sup>[16]</sup>,而且为固定生物分子提供表面修饰活性位置和较大的比表面积,在电化学传感器中还起到了信号放大的作用<sup>[17]</sup>。普鲁士蓝(Prussian blue, PB)在低电位下可以迅速催化还原 $H_2O_2$ ,因此,又被称为“人工过氧化物酶”<sup>[18-19]</sup>。同时使用GO材料和PB电子媒介体构建葡萄糖酶生物传感器,有利于增强生物传感器的灵敏度,这是因为GOD催化葡萄糖产生的 $H_2O_2$ 能接着被PB还原<sup>[19-20]</sup>。聚四氟乙烯(Nafion)能将酶包埋在聚合物材料的网格或微胶囊结构中,防止酶的渗漏,而对应的底物可以通过网格与Nafion内部包埋的酶接触使催化反应正常进行,这样几乎不改变活性物质的高级结构,因而不破坏酶的生物活性<sup>[21]</sup>。

本研究以枯草芽孢杆菌为宿主菌,构建了芽孢展示GOD的重组菌,利用GO材料、PB电子媒介体构筑了一种新型葡萄糖电化学生物传感器。通过Western blotting、免疫荧光分析以及酶活检测等手段证明GOD成功在芽孢表面展示并有效表达,同时还研究了所制备的基于芽孢表面展示GOD构筑的葡萄糖电化学生物传感器的各种影响因素、传感器的检测方法以及性能参数。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

pDG1730质粒(含 $amyE$ 基因上下游同源臂)购自山东沃森生物科技有限公司。pET28a- $god$ 质粒实验室保存。感受态细胞大肠杆菌*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。*B. subtilis* WB800n为实验室保存菌株,为 $cotX$ 基

因的来源菌株,也是外源蛋白的表达宿主菌。

#### 1.1.2 培养基与实验试剂

SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒、DNA纯化回收试剂盒、细菌基因组抽提试剂盒、质粒提取试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司。限制性核酸内切酶*Bam*H I和*Hind* III、2 $\times$ Phanta Max Master Mix等工具酶购自赛默飞公司。无缝克隆试剂盒、核酸分子量Marker(DL5000)、蛋白分子量Marker购自南京诺唯赞生物科技有限公司。BSA、山羊血清、BCA蛋白浓度测定试剂盒、FITC-羊抗兔IgG、辣根酶标记山羊抗兔IgG购自博士德生物工程有限公司。Anti-GODZ antibody购自英国Abcam公司。5 wt% Nafion购自Sigma-Aldrich公司。氧化石墨烯(GO)购自南京吉仓纳米科技有限公司。D-(+)-葡萄糖购买于国药集团化学试剂有限公司。0.1 mol/L PBS (pH 7.0)实验室自制。

LB (Luria-Bertani medium) 培养基(W/V): 1% NaCl、0.5%酵母浸粉、1%蛋白胨; LB固体培养基在液体培养基中加入1.5%–2%琼脂粉即可; LB淀粉培养基在LB培养基中添加1%淀粉即可,用于检测淀粉酶酶活。

DSM (Difco sporulation medium): 0.8% (W/V) 营养肉汤, 0.1% KCl, 0.025%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 mmol/L  $Ca(NO_3)_2$ , 0.01 mmol/L  $MnCl_2$ , 0.01 mmol/L  $FeSO_4$ 。

普鲁士蓝沉积液配制方法: 用二次蒸馏水配制2.5 mmol/L  $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液, 记为A液; 2.5 mmol/L  $FeCl_3$ , 0.1 mol/L KCl, 0.2 mol/L HCl溶液, 记为B液; 以及0.1 mol/L EDTA- $Na_2$ 溶液, 记为C液。使用时4.5 mL的A液、4.5 mL的B液和1 mL的C液混合。

#### 1.1.3 主要仪器

DNA扩增仪(美国ABI); 水平电泳槽、蛋白电泳仪(北京六一仪器厂); 湿式转印槽(北京君意); 超声波破碎仪(新芝生物科技股份有限公司); 高速冷冻离心机(Eppendorf); 生物电泳凝

胶成像分析系统 (北京赛智创业科技有限公司); 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica) 等。电化学测量法是在 CHI760D 电化学分析仪 (中国上海辰华仪器有限公司) 完成的。台式扫描电子显微镜; 高速冷冻离心机 (Eppendorf); 电子分析天平; KQ3200DE 型数控超声波清洗器。

## 1.2 方法

### 1.2.1 重组质粒的构建

使用特异性引物 *cotX-BamH I* -F 和 *cotX-R* 从 *B. subtilis* WB800n 菌株基因组 DNA 中扩增克隆芽孢衣壳蛋白基因 *cotX*; 使用特异性引物 *god-F* 和 *god-Hind III* -R, 以 pET28a-*god* 质粒为模板扩增目的基因 *god* (序列见表 1)。将得到的 PCR 产物通过多片段无缝克隆技术连入经 *BamH I* 和 *Hind III* 双酶切的 pDG1730 质粒中, 得到重组质粒 pDG730-*cotX-god*, 通过化学转化法转入 *B. subtilis* WB800n 感受态细胞, 构建重组菌 *B. subtilis* WB800n-*cotX-god*。

### 1.2.2 重组芽孢的制备

利用饥饿法在 DSM (Difco sporulation medium) 培养基上诱导重组菌产生芽孢。取重组菌落点接 5 mL LB (含壮观霉素, 工作浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ ) 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养, 然后在含壮观霉素 (工作浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ ) 的 50 mL DSM 中接入 1% (V/V) 的菌液, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养 96 h。培养结束后的菌体 8 000 r/min 离心 20 min, 除去上清, 用无菌去离子水将沉淀洗涤 2 次, 最后得到重组芽孢<sup>[22]</sup>。

表 1 本研究中所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>cotX-BamH I</i> -F	AAACTGGTCTGATCGGATCCCC AATCATAAAAAATAGGGTTCTTCA
<i>cotX-R</i>	GTCTGCATGAGGACAAGAGTGAT AACTAGGATGG
<i>god-F</i>	ACTCTTGTCCTCATGCAGACGCTT CTGGTTAGCT
<i>god-Hind III</i> -R	CTGCAGGAATTCGATAAGCTTTTA ATGGTGATGATGATGGTGC

### 1.2.3 重组芽孢 Western blotting 分析

提取重组菌 *B. subtilis* WB800n-*cotX-god* 芽孢表面总蛋白, 采用 SDS-PAGE 分离蛋白质样品<sup>[23]</sup>, 分离后的蛋白用湿转法从凝胶上转移到 PVDF 膜上, 再用封闭液室温下封闭 1 h, 将膜上封闭液洗净后, 把膜置于一抗 (Anti-GODZ antibody) 中, 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 12 h, 将一抗回收, 用 TBST 把膜洗 3 次, 每一次振荡洗涤 5 min。再用对应的二抗稀释液与膜接触, 于室温下孵育 1 h, 同样回收二抗, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 化学发光反应后扫描<sup>[24]</sup>。

### 1.2.4 重组芽孢免疫荧光分析

将制得的重组芽孢加入适量一抗 (Anti-GODZ antibody), 置于冰上 2 h, 用抗体结合缓冲液洗涤离心尽量除去上清, 再向其中加入由 PBS 适当稀释的 FITC 标记的羊抗兔 IgG (二抗), 置于冰上 2 h, 反应结束后, 再用抗体结合缓冲液洗涤离心, 将适量芽孢悬液滴涂在载玻片上, 盖上盖玻片, 在室温避光的环境中将其吹干, 用荧光显微镜观察<sup>[25]</sup>。

### 1.2.5 芽孢表面展示 GOD 的酶活分析<sup>[26]</sup>

一个酶活力单位为: 30  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.0 的磷酸盐缓冲体系下, 每分钟催化 1  $\mu\text{mol/L}$  葡萄糖转化为葡萄糖酸的酶的量。

取 20 g/L 的葡萄糖磷酸缓冲溶液 25 mL 于锥形瓶中, 在 30  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中预热 3 min, 加入样品, 混匀后立即计时反应, 准确反应 60 min 后立即加入 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液 20 mL, 混匀终止反应, 加入 1 滴酚酞, 用 0.1 mol/L 的 HCl 标准溶液进行滴定, 记录消耗 HCl 的体积  $V$ 。

空白对照: 用水代替酶液, 其余步骤相同, 消耗 HCl 标准溶液体积为  $V_0$ 。

计算:  $\text{GOD}(\text{U/g}) = (V_0 - V) \times C \times N \times 1\,000 / (60 \times m)$ 。

式中,  $C$  为 HCl 标准溶液的准确反应浓度;  $N$  为酶液的稀释倍数; 1 000 为换算系数; 60 为反应时间, 单位为 min;  $m$  为菌体干重。

### 1.2.6 Nafion/Spore-GOD/PB/GO/GCE 修饰电极的制备

将预处理玻碳电极表面快速晾干, 向电极工

作面滴涂 5  $\mu\text{L}$  氧化石墨烯溶胶, 电极记作 GO/GCE。晾干后浸入 PB 沉积储备溶液中进行 PB 沉积, 沉积方法为循环伏安法, 沉积条件为电压  $-0.2\sim-0.6\text{ V}$ , 扫描速度  $50\text{ mV/s}$ , 扫描圈数 50 圈。以去离子水充分清洗工作电极表面, 晾干后向工作面滴涂 5  $\mu\text{L}$  的 Spore-GOD 悬液, 置于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱晾干, 最后滴加 5  $\mu\text{L}$  的 0.5 wt% Nafion 溶液, 晾干, 修饰电极记作 Nafion/Spore-GOD/PB/GO/GCE, 其制作方法和原理如图 1 所示。

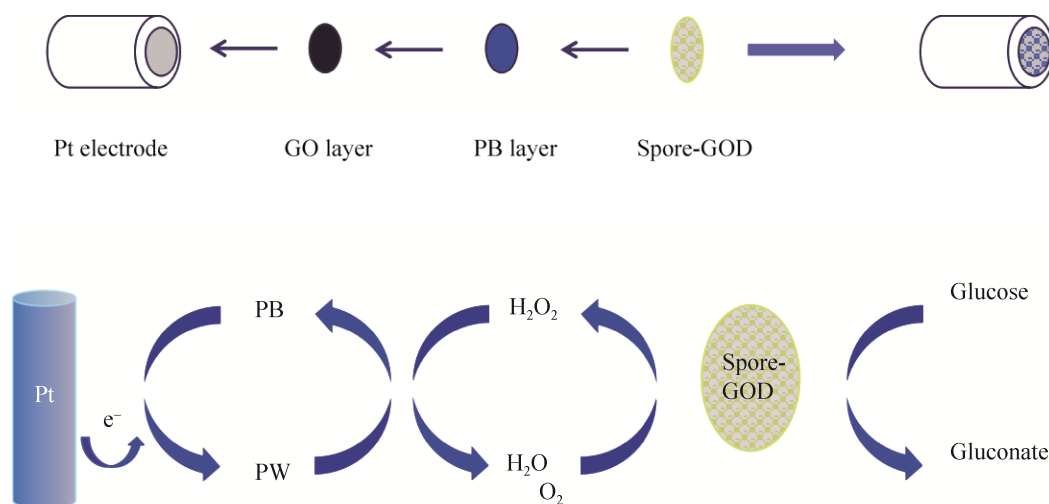


图 1 电极的制作过程及作用原理示意图<sup>[27]</sup>

Fig. 1 Schematic diagram of electrode fabrication process and catalytic reaction mechanism<sup>[27]</sup>.

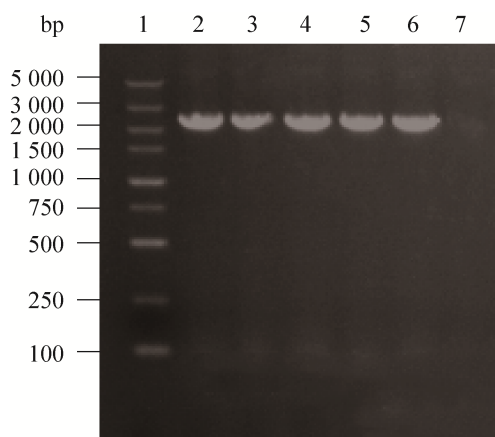


图 2 重组菌 *B. subtilis* WB800n-*cotX-god* 的 PCR 验证  
Fig. 2 PCR validation of recombinant *B. subtilis* WB800n-*cotX-god*. 1: 5 000 bp DNA marker; 2-6: *B. subtilis* WB800n-*cotX-god*; 7: *B. subtilis* WB800n.

## 2 结果与分析

### 2.1 重组枯草芽孢杆菌的 PCR 验证

将重组质粒 pDG1730-*cotX-god* 转入 *B. subtilis* WB800n 感受态细胞中, 得到可以表达 GOD 的转化子。PCR 验证表明扩增得到 2 500 bp 左右的目的片段 (图 2), 与理论值相同。未转质粒的 *B. subtilis* WB800n 没有出现相应的条带, 说明重组质粒已经成功转入。

### 2.2 芽孢表面展示 GOD 的 Western blotting 分析

提取 *B. subtilis* WB800n-*cotX-god* 芽孢衣壳总蛋白后, Western blotting 分析结果见图 3。图中得到的 82 kDa 左右的特异性条带表明重组芽孢表面成功展示了葡萄糖氧化酶。

### 2.3 芽孢表面展示 GOD 的 IF 分析

取阳性转化子 *B. subtilis* WB800n-*cotX-god* 的芽孢以及 *B. subtilis* WB800n 的芽孢进行了 IF 分析, 图 4A 中可以看到, 对照菌 *B. subtilis* WB800n 的芽孢在紫外光的激发下没有出现荧光, 而图 4B 中 *B. subtilis* WB800n-*cotX-god* 的芽孢表面可以看到红色荧光, 表明外源蛋白 GOD 已经成功展示在芽孢表面。

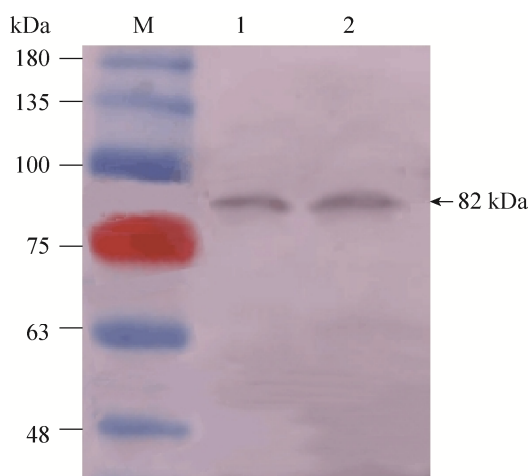


图3 重组菌 *B. subtilis* WB800n-*cotX-god* 的芽孢表面融合蛋白 Western blotting 分析图

Fig. 3 Western blotting analysis of spore surface fusion enzyme of recombinant *B. subtilis* WB800n-*cotX-god*.

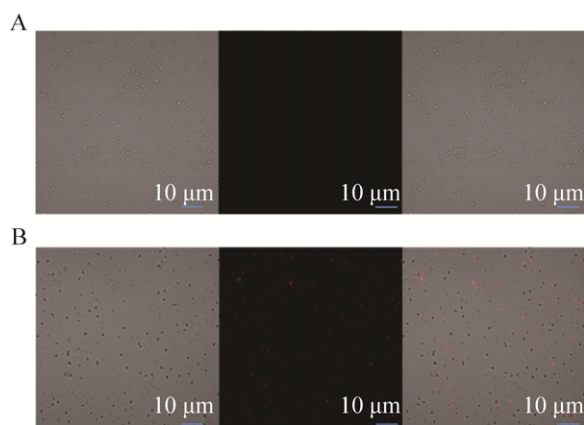


图4 免疫荧光分析图 (A: *B. subtilis* WB800n 免疫荧光分析; B: *B. subtilis* WB800n-*cotX-god* 免疫荧光分析)

Fig. 4 Immunofluorescence analysis of *B. subtilis* WB800n (A) and *B. subtilis* WB800n-*cotX-god* (B).

## 2.4 Nafion/Spore-GOD/PB/GO/GCE 修饰电极的表征

SEM 被用于表征 GO, GO/PB 和 Spore-GOD/GO/PB 等材料的形态和分散情况。图 5A 中 GO 表面具有褶皱, 这种自然的褶皱对保持 GO 具有高的比表面积非常有利, 有利于生物材料的吸附。图 5B 为芽孢包埋在 GO/PB 复合材料表面的 SEM, 图中可观察到 PB 纳米颗粒自由分散在 GO 表面, 且 GO 表面的褶皱使芽孢更稳定存在电极表面。

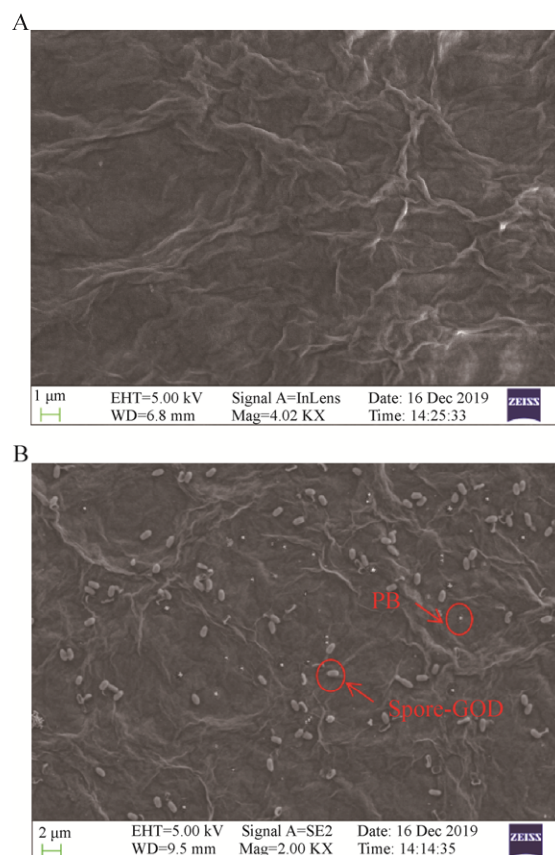


图5 电极 SEM 表征图 (A: GO; B: Spore-GOD/PB/GO)

Fig. 5 SEM characterizations of GO (A) and Spore-GOD/PB/GO (B).

## 2.5 修饰电极的电化学表征

循环伏安法 (CV) 被用以表征 Nafion/Spore-GOD/PB/GO/GCE 电极的修饰过程, 裸玻碳电极、GO/GCE 电极和 Nafion/Spore-GOD/PB/GO/GCE 电极都是在 0.20 mol/L 的  $\text{KNO}_3$  溶液中记录  $10^{-3}$  mol/L  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  溶液的循环伏安曲线。如图 6A 所示, 将 GO 滴在裸玻碳电极表面后, 峰电流有所增加, 这是因为 GO 具有导电能力, 可促进电子传递。但是修饰电极 Nafion/Spore-GOD/PB/GO/GCE 的峰电流较 GO/GCE 的降低了, 这是由于 Spore-GOD 不导电, 阻止了电子向电极表面的传递。

交流阻抗法 (EIS) 也是表征修饰电极的方法之一。如图 6B 所示, 图谱中的半圆大小表明



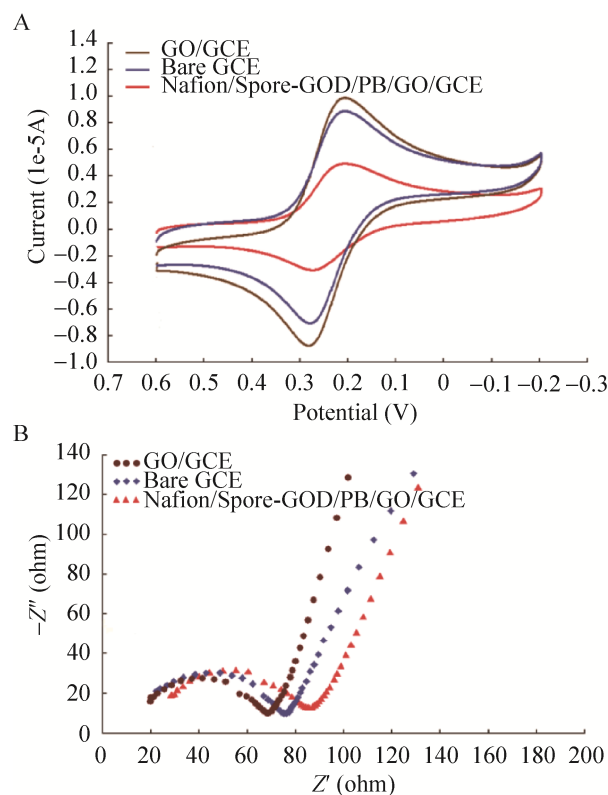


图6 不同修饰电极的 CV 图和 EIS 图 (A: 不同修饰电极的 CV 图; B: 不同修饰电极的 EIS 图)  
Fig. 6 CVs (A) and EIS (B) of different modified electrodes.

了电极的阻抗大小, 其中 GO/GCE 修饰电极的半圆最小, 阻抗最低, 因为电极表面的 GO 可以促进电子传递, 使该电极的阻抗小于裸玻碳电极; 而修饰电极 Nafion/Spore-GOD/PB/GO/GCE 的阻抗值最大, 这是因为大量芽孢阻碍了电子的传递。由 EIS 得到的结论与 CV 一致。

## 2.6 pH 和温度对传感器的影响

影响生物传感器响应特性的因素主要有测试溶液的 pH 值和温度。考察 Nafion/Spore-GOD/PB/GO/GCE 传感器在 pH 2.5–10 范围内对 1 mmol/L 葡萄糖溶液的电流响应, 结果如图 7 所示。在 pH 小于 7 范围内, 随着 pH 的增大电流值也增大; 在 pH 为 7 时, 电流响应最大; pH 大于 7.0 时, 电流响应呈下降趋势。所以本研究选择 pH 7.0 的 PBS 作为检测溶液。

实验还考察了测试温度 (在 20–70 °C 范围内) 对传感器的影响。结果如图 8 所示, 温度在 20–40 °C 范围内时, 随着温度的升高, 传感器的电流响应值也会增大; 温度在 40 °C 时, 电流值达到最大; 温度大于 40 °C 时, 电流值开始下降。因为考虑到过高的温度会使酶失去活性而影响实验的准确性和实验过程中操作的方便性, 所以选择室温 25 °C 作为检测温度。

## 2.7 传感器的性能研究

为了进一步检测 Nafion/Spore-GOD/PB/GO/GCE 修饰电极的工作性能, 采用循环伏安法研究了修饰电极的检测线性范围。

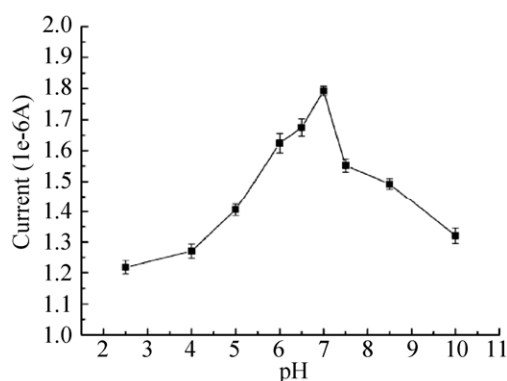


图7 溶液 pH 值对电流响应的影响  
Fig. 7 Effect of solution pH on current response.

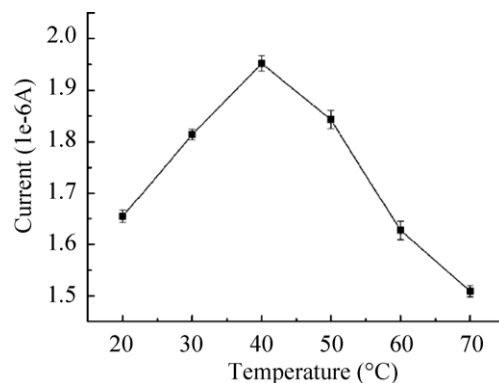


图8 溶液温度对电流响应的影响  
Fig. 8 Effect of solution temperature on current response.

如图 9 所示, Nafion/Spore-GOD/PB/GO/GCE 电极对葡萄糖的响应良好, 电极峰电流随着底物浓度的增加而逐渐增大, 在 0.1–7.0 mmol/L 的葡萄糖浓度范围内线性关系良好, 相关系数为 0.992 9。信噪比为 3 时 ( $S/N=3$ ), 根据  $3\sigma$  规则计算可得葡萄糖的检测下限为 7.5  $\mu\text{mol/L}$ , 灵敏度为  $41.55\text{ }\mu\text{A}\cdot\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm}^2)$ 。因此, 人体的空腹血糖浓度 (空腹血糖的正常范围为 3.89–6.11 mmol/L) 在酶电极的线性范围内, 可适用于人体血液中葡萄糖的直接检测。该生物传感器性能优于其他文献报道的用于葡萄糖检测的传感器, Zhang 等<sup>[28]</sup>通过将  $\text{MnO}_2$  纳米线修饰玻碳电极, 并将 GOD 固定在其表面制得葡萄糖生物传感器, 线性范围为 0.2–3.8 mmol/L, 检出限为 25.56  $\mu\text{mol/L}$ , 灵敏度为  $38.2\text{ }\mu\text{A}\cdot\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm}^2)$ ; Zhao<sup>[29]</sup>在聚苯胺修饰的玻碳电极 (PANI/GCE) 上进行了 GOD 的固载, 制得的传感器线性范围为 0.5–2.25 mmol/L; Wang 等<sup>[30]</sup>制备的用于葡萄糖检测的  $\text{ZnO}$  纳米梳生物传感器其检测限为 20  $\mu\text{mol/L}$ , 灵敏度为  $15.33\text{ }\mu\text{A}\cdot\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm}^2)$ 。

2.8 传感器的抗干扰性、重现性和稳定性

实验主要考察了抗坏血酸 (AA) 和尿酸 (UA) 是否会对传感器 Nafion/Spore-GOD/PB/GO/GCE 产生干扰, 在待检测的 1.0 mmol/L 葡萄糖溶液里加入 1.0 mmol/L 抗坏血酸, 1.0 mmol/L

尿酸, 葡萄糖的电流响应没有明显的变化。说明该传感器的抗干扰能力良好。

Nafion/Spore-GOD/PB/GO/GCE 传感器的稳定性和重复性。通过将 Nafion/Spore-GOD/PB/GO/GCE 置于 0.1 mmol/L 葡萄糖溶液中进行循环伏安扫描 50 圈, 比较氧化峰电流, 考察传感器的稳定性, 得到电流值比最初电流增加了约 5%, 说明传感器具有很好的稳定性和可重复性。用同样的方法分别制备了 5 根 Nafion/Spore-GOD/PB/GO/GCE 传感器, 测定同一份 0.1 mmol/L 葡萄糖溶液, 电流值的相对标准偏差 (Relative standard deviation, RSD) 为 4.2%, 这表明传感器的制备方法具有较好的重现性。不使用时将该电极保存在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱内, 用该电极每天测定 0.1 mmol/L 葡萄糖溶液, 在 1–10 d 内电流强度保持平稳, 未出现大幅度波动情况, 10 d 后电峰电流强度有所下降, 这表明所制备的电极在 10 d 内具有一定的稳定性。

2.9 传感器在实际样品中的应用

为描述该传感器在实际分析中的可行性, 将该传感器用于实际血清中的葡萄糖检测。为适应该生物传感器的检测范围, 提高检测准确度, 在检测前将血样用 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 适当稀释, 每个样品同时检测 3 次。从表 2 可知, 传感器的回收率好, 这表明构建的电极具有实际应用的可能性。

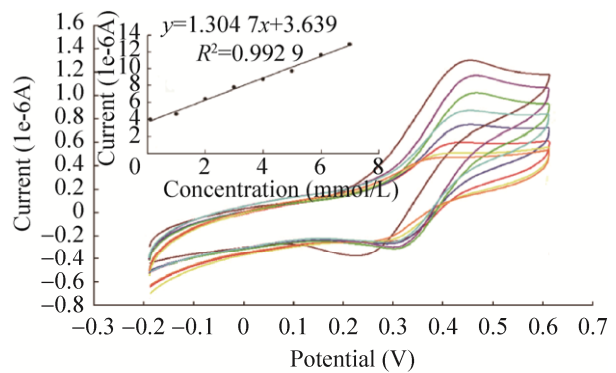


图 9 传感器对不同浓度葡萄糖溶液的催化响应图  
Fig. 9 Catalytic response of the sensor to glucose solutions with different concentrations.

表 2 实际样品中葡萄糖含量的检测  
Table 2 Determination of glucose content in actual samples

Sample	Glucose conc (mmol/L) <sup>a</sup>			RSD	Recovery
	Detected	Added	Found		
1	5.93±0.12	1.00	6.94±0.11	4.2%	104%
2	5.51±0.11	1.00	6.52±0.11	3.8%	102%
3	4.34±0.07	1.00	5.28±0.08	4.1%	98%
4	5.26±0.09	1.00	6.21±0.10	3.6%	101%
5	4.68±0.08	1.00	5.59±0.09	3.4%	99%

<sup>a</sup>All values were obtained as the average of three repetitive measurements plus-minus standard deviation.



### 3 总结

利用重组芽孢以及 GO 材料和 PB 电子媒介体构筑的新型葡萄糖电化学生物传感器性能优良, 主要原因可能是: 通过枯草芽孢杆菌芽孢表面展示 GOD, 芽孢优良的抗逆性可有效提高外源蛋白 GOD 的稳定性, 从而有利于修饰电极的应用和稳定储存; 在电极构建过程中引入 Nafion 溶液可以改善检测过程中酶的渗漏问题, 使得传感器的稳定性提高; GO-PB 中的 PB 可以和 Spore-GOD 形成拟双酶体系, 使得信号放大, 从而增强了生物传感器的灵敏度; 电极制备过程温和, 具有很好的生物兼容性, 可以有效地保持酶的构型和活性。

葡萄糖参与生命体代谢, 是生命体能量的重要来源, 对人体内血糖含量的测定有利于疾病的诊断和预防。葡萄糖氧化酶是工业生产和医学检测中的一种重要用酶, 但是由于酶分子的活性中心深埋其内部、直接吸附在电极表面容易变形和污染等原因, 大大限制了葡萄糖氧化酶电极的进一步发展。本研究利用枯草芽孢杆菌芽孢表面展示技术将 GOD 展示到芽孢表面, 可直接发酵获取大量重组芽孢, 避免了细胞破碎引起的污染及酶的纯化成本问题, 具有一定的应用价值。将 GO/PB 复合膜修饰玻碳电极制成电化学传感器用于葡萄糖的灵敏测定。此修饰电极具有良好的导电性能、催化性能、稳定性和重现性, 适合于检测人体血糖浓度。

### REFERENCES

- [1] Wong CM, Wong KH, Chen XD. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(6): 927–938.
- [2] Wang J. Electrochemical glucose biosensors. *Chem Rev*, 2008, 108(2): 814–825.
- [3] Liang B, Li L, Mascin M, et al. Construction of xylose dehydrogenase displayed on the surface of bacteria using ice nucleation protein for sensitive D-xylose detection. *Anal Chem*, 2012, 84(1): 275–282.
- [4] Hanefeld U, Gardossi L, Magner E. Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev*, 2009, 38(2): 453–468.
- [5] Yang C, Freudl R, Qiao CL, et al. Cotranslocation of methyl parathion hydrolase to the periplasm and of organophosphorus hydrolase to the cell surface of *Escherichia coli* by the Tat pathway and ice nucleation protein display system. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(2): 434–440.
- [6] Han SY, Li HZ, Jin Z, et al. Yeast cell surface display and its application of enzymatic synthesis in non-aqueous phase. *Chin J Biotech*, 2009, 25(12): 1784–1788 (in Chinese).  
韩双艳, 李华珍, 金子, 等. 酵母细胞表面展示技术及其在非水相酶催化合成中的应用. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 1784–1788.
- [7] Yang F, Cao M, Jin Y, et al. Development and application of *Saccharomyces cerevisiae* cell-surface display for bioethanol production. *Chin J Biotech*, 2012, 28(8): 901–911 (in Chinese).  
杨非, 曹萌, 金怡, 等. 酿酒酵母细胞表面展示技术在燃料乙醇生产中的应用及研究进展. *生物工程学报*, 2012, 28(8): 901–911.
- [8] Xu XM, Wang XC, Ma CQ. Recent progress of the research on spore surface display. *Chin J Biotech*, 2010, 26(10): 1404–1409 (in Chinese).  
徐小曼, 王啸辰, 马翠卿. 芽孢表面展示技术研究进展. *生物工程学报*, 2010, 26(10): 1404–1409.
- [9] Fang CY, Xie FL, Fu W, et al. Construction of recombinant rhizobial strains with enhanced tolerance to cadmium using bacterial cell surface display. *Chin J Appl Environ Biol*, 2011, 17(1): 82–86 (in Chinese).  
方彩云, 谢福莉, 付玮, 等. 利用细菌表面展示技术构建镉耐受性的重组根瘤菌. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(1): 82–86.
- [10] Yu XX, Tian J, Wu NF. Research progress on *Bacillus subtilis* spore display of recombinant proteins. *J Agric Sci Technol*, 2013, 15(5): 31–38 (in Chinese).  
余小霞, 田健, 伍宁丰. 枯草芽孢杆菌芽孢表面展示外源蛋白的研究进展. *中国农业科技导报*, 2013, 15(5): 31–38.
- [11] Chen YH, Ullah J, Jia JN. Progress in *Bacillus subtilis* spore surface display technology towards

- environment, vaccine development, and biocatalysis. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2017, 27(3): 159–167.
- [12] Li Q, Ning DG, Wu CD. Surface display of GFP using CotX as a molecular vector on *Bacillus subtilis* spores. *Chin J Biotech*, 2010, 26(2): 264–269 (in Chinese).  
李倩, 宁德刚, 吴春笃. 以 CotX 为分子载体在枯草芽孢杆菌芽孢表面展示绿色荧光蛋白. *生物工程学报*, 2010, 26(2): 264–269.
- [13] Wang N, Chang C, Yao Q, et al. Display of *Bombyx mori* alcohol dehydrogenases on the *Bacillus subtilis* spore surface to enhance enzymatic activity under adverse conditions. *PLoS ONE*, 2011, 6(6): e21454.
- [14] Muller JP, Ozegowski J, Vettermann S, et al. Interaction of *Bacillus subtilis* CsaA with SecA and precursor proteins. *Biochem J*, 2000, 348 Pt 2: 367–373.
- [15] Eda G, Chhowalla M. Chemically derived graphene oxide: towards large-area thin-film electronics and optoelectronics. *Adv Mater*, 2010, 22(22): 2392–2415.
- [16] Sivashankari PR, Prabakaran M. Three-dimensional porous scaffolds based on agarose/chitosan/graphene oxide composite for tissue engineering. *Int J Biol Macromol*, 2019, 146: 222–231.
- [17] Zhu YW, Murali S, Cai WW, et al. Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. *Adv Mater*, 2010, 22(35): 3906–3924.
- [18] Ricci F, Palleschi G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosens Bioelectron*, 2005, 21(3): 389–407.
- [19] Huang JL, Lu SY, Fang XF, et al. Optimized deposition time boosts the performance of Prussian blue modified nanoporous gold electrodes for hydrogen peroxide monitoring. *Nanotechnology*, 2020, 31(4): 045501.
- [20] Zhang MW, Hou CY, Halder A, et al. Interlocked graphene-Prussian blue hybrid composites enable multifunctional electrochemical applications. *Biosens Bioelectron*, 2017, 89(1): 570–577.
- [21] Li L, Liang B, Shi JG, et al. A selective and sensitive D-xylose electrochemical biosensor based on xylose dehydrogenase displayed on the surface of bacteria and multi-walled carbon nanotubes modified electrode. *Biosens Bioelectron*, 2012, 33(1): 100–105.
- [22] Nicholson WL, Setlow P. Dramatic increase in negative superhelicity of plasmid DNA in the forespore compartment of sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1990, 172(1): 7–14.
- [23] Monroe A, Setlow P. Localization of the transglutaminase cross-linking sites in the *Bacillus subtilis* spore coat protein GerQ. *J Bacteriol*, 2006, 188(21): 7609–7616.
- [24] Mingmongkolchai S, Panbangred W. Display of *Escherichia coli* Phytase on the Surface of *Bacillus subtilis* Spore Using CotG as an Anchor Protein. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 187(3): 838–855.
- [25] Harry EJ, Pogliano K, Losick R. Use of immunofluorescence to visualize cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1995, 177(12): 3386–3393.
- [26] Li PW, Liu Y, Li RR, et al. Comparison of two kinds of glucose oxidase activity determination methods. *Sci Technol Food Ind*, 2013, 34(12): 71–75, 80 (in Chinese).  
李丕武, 刘瑜, 李瑞瑞, 等. 两种葡萄糖氧化酶活力测定方法的比较. *食品工业科技*, 2013, 34(12): 71–75, 80.
- [27] Wang CL, Lin M. Microporous Prussian Blue/gold composite material based enzyme electrochemical sensor. *Shandong Sci*, 2015, 28(2): 53–57 (in Chinese).  
王春蕾, 林猛. 基于多孔普鲁士蓝/金复合材料的酶电化学传感器的研究. *山东科学*, 2015, 28(2): 53–57.
- [28] Zhang L, Yuan SM, Yang LM, et al. An enzymatic glucose biosensor based on a glassy carbon electrode modified with manganese dioxide nanowires. *Microchim Acta*, 2013, 180(7/8): 627–633.
- [29] Zhao ZM. Study on electrochemical sensor based on glucose oxidase/polyaniline modified glassy carbon electrode. *J Anhui Vocat College Metall Technol*, 2016, 26(1): 32–34 (in Chinese).  
赵宗明. 基于葡萄糖氧化酶-聚苯胺修饰电极的电化学传感器的研究. *安徽冶金科技职业学院学报*, 2016, 26(1): 32–34.
- [30] Wang JX, Sun XW, Wei A, et al. Zinc oxide nanocomposite biosensor for glucose detection. *Appl Phys Lett*, 2006, 88(23): 233106.

(本文责编 郝丽芳)