



## 酶定向固定化策略在生物传感器中应用\*

王兴保<sup>1,2)</sup> 马耀宏<sup>1,2)</sup> 薛云龙<sup>1,2)</sup> 黄晓珍<sup>1,2)</sup> 邵越<sup>1,2)</sup> 于毅<sup>1,2)</sup> 王丙莲<sup>1,2)</sup>  
刘庆艾<sup>1,2)</sup> 张立鹤<sup>1,2)</sup> 公维丽<sup>1,2)\*\*</sup><sup>(1)</sup> 齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省科学院生物研究所, 济南 250103; <sup>(2)</sup> 山东省生物传感器重点实验室, 济南 250103)

**摘要** 酶电极生物传感器具有灵敏、高效、特异性强以及器型小巧等特点, 在生命科学研究、疾病诊断和监控等领域展现出广阔的应用前景, 酶的固定化是决定酶电极生物传感器性能(稳定性、灵敏性、重现性)的关键步骤, 通过随机固定化(物理吸附、共价交联等)容易引起酶活力下降、固定化稳定性低等问题, 而利用氨基酸残基突变、亲和肽融合以及核苷酸特异结合等优化酶分子空间取向, 为解决随机固定化问题提供了新的可能。本文对基于定点突变引入带有官能团的特定氨基酸(赖氨酸、组氨酸、半胱氨酸、非天然氨基酸)、通过基因工程融合亲和肽(金结合肽、碳材料结合肽、碳水化合物结合结构域)及利用核苷酸与目标酶(蛋白质)之间的特异性结合等策略来实现酶分子传感元件定向固定化的原理、优缺点以及在酶电极生物传感器上的应用进展进行了系统综述, 并对多种传感界面固定化酶表征技术的应用领域、各方法的优点和应用局限性进行了探讨, 以期为高性能酶传感元件创制及酶电极传感器的制造提供理论和技术指导。

**关键词** 酶固定化, 酶电极, 生物传感器, 酶分子空间取向**中图分类号** Q55, Q55**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0256**CSTR:** 32369.14.pibb.20240256

随着物联网、大数据、大健康从概念走向实施, 合成生物学、人工智能、纳米技术等新兴学科领域的发展与融合, 生物传感器(biosensor)进入一个新的蓬勃发展阶段, 特别是以固定化酶为基础的电流型生物传感器发展迅速<sup>[1]</sup>。酶电极生物传感器以其分析速度快、反应特异性强、仪器操作简单等特点在生命科学研究、疾病诊断和监控、生物过程控制、农业与食品安全、环境质量监控等领域展现出广阔的应用前景。酶分子的固定化是酶生物传感器构建的重要步骤之一, 涉及酶分子和传感界面两个方面<sup>[2]</sup>。生物活性酶分子具有特定三维空间结构, 其活性中心需要保持特定取向才可以快速结合、催化底物并完成系列电子传递, 在传感界面上酶分子的固定化不同于酶分子在普通固体界面的固定化, 其电催化效率取决于酶分子与催化底物间、酶分子内以及酶分子与界面间电子传递效率<sup>[3-4]</sup>。因此, 酶电极生物传感器的灵敏度、响应时间、稳定性和重现性都高度依赖于固定化酶技术。

传统上, 酶分子通常通过疏水相互作用和/或范德华力、静电力的物理吸附固定在载体表面, 虽然这种吸附法具有操作简单、成本低的优势, 但固

定相对不稳定、容易解吸附且不可控, 非特异性物理吸附通常会导致高背景信号, 从而进一步降低灵敏度或导致错误阳性结果。共价交联法是另外一种比较流行的固定化方法, 酶分子之间通过共价键交联形成三维酶复合物, 例如酶分子中赖氨酸残基的游离氨基与戊二醛(GTA)等试剂的醛基反应形成Schiff碱使酶分子交联。由于酶之间的高强度和稳定的结合, 交联固定方法可以使酶分子有效、牢固的发挥作用。然而, 交联试剂的使用如GTA可因共价成键引起的酶的严重修饰而导致活性丧失<sup>[5-6]</sup>。包埋法是将酶和聚合物进行混合, 将酶分子包裹在聚合物中, 聚合物提供了底物和产物自由扩散的空间。此方法不是将酶直接共价结合固定, 因此操作简单、反应条件温和, 酶活保持率较高。但这种方法的缺点是凝胶基质可干扰底物向酶活性部位的深层扩散, 且对酶的负载能力较低

\* 国家自然科学基金(32101222), 国家重点研发计划(2021YFB3201200, 2021YFB3201203)和齐鲁工业大学(山东省科学院)重大创新工程(2022JBZ01-06)资助项目。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 15264110812, E-mail: 15264110812@163.com

收稿日期: 2024-06-17, 接受日期: 2024-08-27

(图 1a~c)。酶分子通过这些随机固定方法常导致酶分子活性中心隐藏或不能正确取向, 酶活力损失明显且不同元件酶活损失大小无法统一控制, 因而传感器的稳定性、灵敏度等性能受到严重影响<sup>[7-8]</sup>。

综上可知, 酶的固定化是决定酶电极生物传感器性能(稳定性、灵敏性、重现性)的关键步骤, 通过随机固定化(物理吸附、共价交联等)容易引起酶活力下降、固定化稳定性低等问题。本文通过对目前文献报道的多种酶分子定向固定化策略(基于氨基酸、亲和肽及核苷酸的固定化, 图 1d~f)的

原理、优缺点以及在酶电极生物传感器上的应用进展系统综述并结合研究团队在酶固定方式与传感器性能的对比评述, 认为通过酶与传感界面的一体化设计可通过非功能位点实现酶在传感界面的定向、可控固定, 控制酶分子空间取向可使酶分子之间、酶与传感界面间有一个可控的距离, 避免酶分子叠加聚集在表面, 最大程度地克服酶失活和活性中心隐藏的问题, 从而提高酶与电极间的电子传递效率。本文将为高性能酶电极传感器的制造提供理论和技术指导。

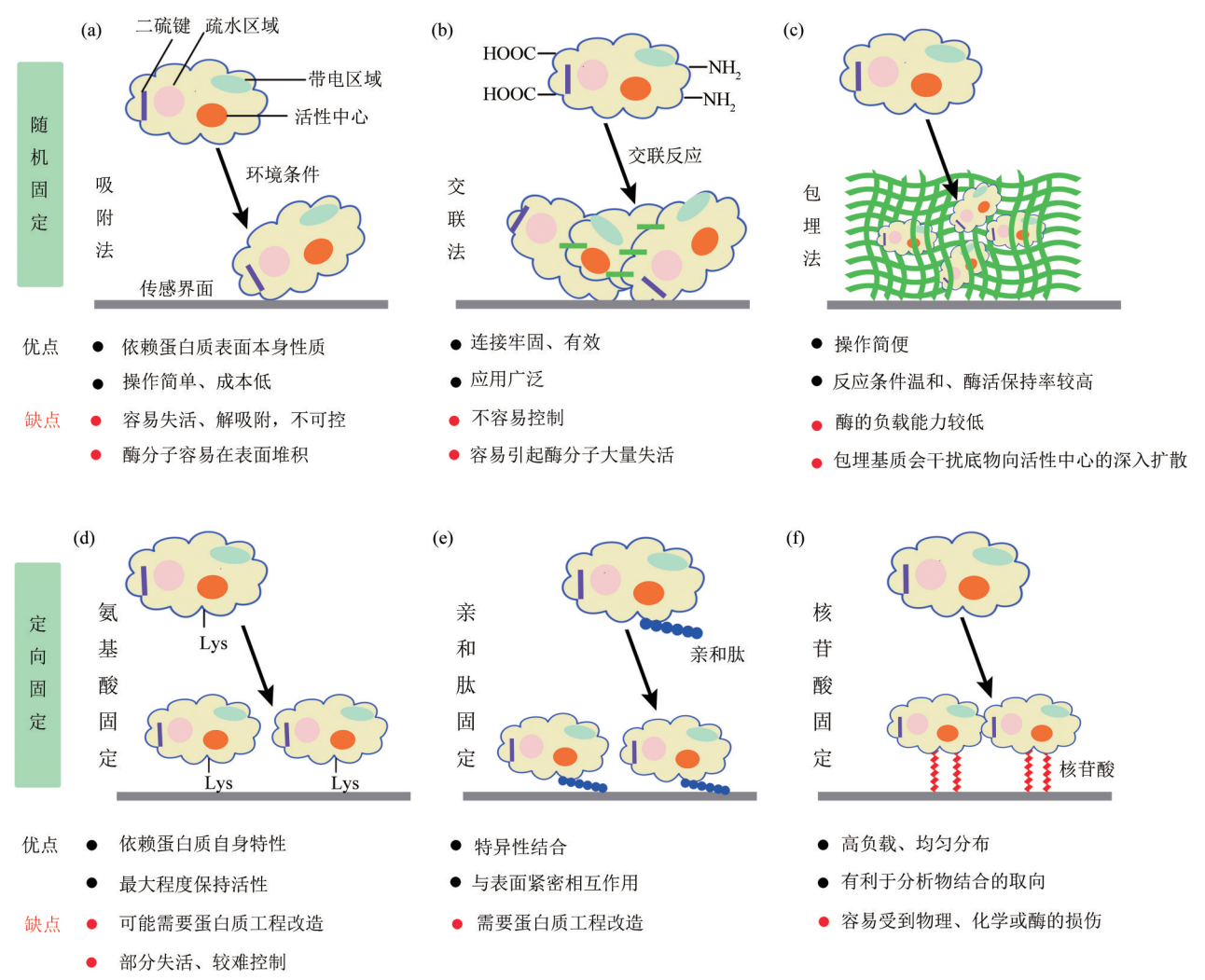


Fig. 1 Advantages and disadvantages of random and directed immobilization of enzyme molecules  
图1 酶分子随机固定化和定向固定化的优缺点

1 酶定向固定策略

1.1 基于氨基酸残基的定向固定

控制酶分子空间取向的最简单、最通用的方法是对酶进行定点诱变, 将带有官能团的特定氨基酸

残基引入酶分子表面, 使其可以与传感界面载体基质定向结合实现固定。最常见的连接方式是共价连接, 酶上引入的酶活性非必需的官能团, 如氨基、羧基、酚基、巯基、硫醇基、咪唑基、吡啶基和羟基, 可以与载体形成共价键, 此种连接提供了强结

合, 因此酶从载体基质中脱落的可能性较小。此外, 组氨酸残基 (His) 可与特定的金属界面通过亲和作用实现定向连接。

### 1.1.1 基于赖氨酸残基的定向固定

胺基是蛋白质中用于共价固定的最常见基团, 这些基团存在于大多数蛋白质中, 通常位于蛋白质表面, 在没有任何活化的情况下, 可与载体上的大多数基团如: 醛基、环氧基、溴化氰基、甲苯磺基等交联。赖氨酸包含一个 $\alpha$ 氨基 ( $-\text{NH}_2$ )、一个 $\alpha$ 羧酸基 ( $-\text{COOH}$ ) 和一个侧链 ( $(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ,  $\epsilon$ -氨基), 具有丰富的胺基基团。如果在酶分子表面本身赖氨酸较为丰富的特定区域进一步引入赖氨酸残基, 酶分子可通过这个区域定向结合至带有活性基团的传感界面 (图 2a)。Guisan 研究团队<sup>[9]</sup>将来源于大肠杆菌的青霉素 G 酰基化酶表面已经富含赖氨酸残基的区域通过基因工程手段引入了 3 个赖氨酸残基, 总体外部赖氨酸的数量没有显著改变 (约 10%), 这些突变没有改变可溶性酶的稳定性或动力学性质, 然而, 与野生型酶相比, 突变酶的固定化比率增加了 10 倍以上。这一发现证实了固定主要是通过赖氨酸残基引入的区域进行的。同时, 固定的突变酶在热或共溶剂诱导的失活中显示出更好的稳定性。Ryan 等<sup>[10]</sup>也用相似的策略对辣根过氧化物酶 (HRP) 进行了定向固定化, 通过替换位于活性中心另一侧的 Arg118、Arg159 和 Arg283 为 Lys, 与膜进行固定后, 使其活性中心朝向溶液。并且与野生型酶固定化后保留活性 50% 相比, 定向固定突变酶分子的固定化保留酶活性可达 86%。但由突变引起的酶的不稳定性需要进一步深入研究。

因此, 赖氨酸残基的增加可以实现定点固定化, 并提高最终固定化酶的稳定性或催化性能。然而, 这种策略需要在一个特定的区域进行若干个氨基酸的替换。此外, 这种策略可能对表面区域缺乏赖氨酸残基的蛋白质的固定没有用处, 因为它需要减少其他富含赖氨酸区域的赖氨酸数量, 并在需要的区域引入大量赖氨酸。因此, 这种方法虽然很有用, 但普适性不高。

### 1.1.2 基于组氨酸残基的定向固定

His 因尺寸小, 通常不会干扰蛋白质的结构和功能, 而且会与特定的金属离子 ( $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  等) 结合等性能, 通常被用于将蛋白质定向固定在金属螯合物 (IMAC) 或金属载体上<sup>[11]</sup>。野生型酶分子只能通过固定界面

上的几个螯合基团与分散在蛋白质表面的几个基团之间的相互作用而固定在 IMAC 载体上。然而, 融合聚 His 标签的蛋白质可通过标签的两个 His 基团与载体中的一个基团相互作用来实现定点固定<sup>[12]</sup>。这种固定是可逆的, 在加入竞争性配体 (如咪唑或 His) 或通过 EDTA 络合去除金属离子时可进行解吸附, 这种可逆性已经在酶纯化和生物传感器或生物催化剂中酶失活后昂贵载体的再利用中得到了利用。

例如, 研究者开发了一种用于检测有机磷杀虫剂的生物传感器, 其基础是将融合 6×His 标签的乙酰胆碱酯酶定向固定在氮三乙酸金属离子电极上。6×His 位于将野生型酶锚定到细胞质膜上的糖脂链处, 以保持酶的构象和活性。该生物传感器的灵敏度、线性范围和响应时间与基于聚合物包埋的生物传感器无显著差异, 但可能由于没有扩散障碍, 此种传感器对氧磷、敌敌畏和毒死蜱乙氧磷的检测水平分别为  $4.1 \times 10^{-9}$ 、 $0.5 \times 10^{-9}$  和  $0.1 \times 10^{-9}$ , 其检测限较低<sup>[13]</sup>。

HRP 是另一种常用于生物传感器的酶。电极吸附野生型 HRP 的直接电化学还原效率不高, 这可能是由于糖基化天然酶的活性位点距离表面的距离较长和/或酶分子空间取向不正确导致的。使用含有 6×His 标签的非糖基化重组 HRP, 通过 His 能额外增加酶与金之间的结合相互作用强度, 使 HRP 固定到金电极上。加速了电子转移动力学, 提高了金电极对过氧化氢的敏感性, 比天然 HRP 修饰的电极稳态电流高出 10 倍<sup>[14]</sup>, 这可能是由于: 一方面, HRP 的去糖基化减少了活性位点与电极之间的电子传递距离, 另一方面, 通过 6×His 标签的固定可能使酶定位在一个最优的构象中进行电子转移, 并且由于酶与金的结合强度更高, 因此传感器的稳定性也得到提升 (图 2b)。利用这一策略进行定向固定还有许多其他的例子, 例如铁氧化还原蛋白: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸还原酶、人类脑红蛋白、漆酶、纤维素酶、萤火虫荧光素酶、RNA 聚合酶和 D-木糖异构酶等。

### 1.1.3 基于半胱氨酸残基的定向固定

通过定点突变的方法将半胱氨酸 (Cys) 残基引入酶表面是控制酶取向最简单和最通用的方法。Cys 侧链上的具有硫醇基团, 它可以附着在硫醇反应性表面 (金或二硫键活化的载体)。如果野生型酶表面具有一些 Cys, 则需要先由丝氨酸或苏氨酸替换这些残基。利用金作为固定表面, 其固定是由

Cys 巯基 (sulfhydryl group, SH) (尽管卤素、羧醛功能也可能涉及) 和金表面之间的结合实现的。其主要优点是操作简单、反应条件温和和结合牢固。而使用二硫键激活的载体, 固定是通过巯基-二硫键交换产生的, 并且只有 Cys 中的 SH 会参与<sup>[15]</sup>。

例如, 研究者通过定点突变将 Cys 引入不含 Cys 的枯草溶菌素 (subtilisin) 中, 并选取离活性中心最远的丝氨酸残基作为引入 Cys 的突变位点, 这一突变对枯草溶菌素的结构和功能没有影响, 利用这个单一的 Cys 残基进行突变酶的固定, 由于此种位点特异性固定的枯草溶菌素活性位点远离聚氯乙烯 (polyvinyl chloride, PVC)-二氧化硅膜界面, 因此与常规固定化相比, 其活性回收率从 48% 增加到 83%<sup>[16]</sup>。同时, Al-Lolage 等<sup>[17]</sup> 通过定点突变在蛋白质表面的特定位置引入 Cys, 并用马来酰亚胺基团对碳纳米管电极进行共价修饰, 通过游离硫醇基团和附着在电极表面的马来酰亚胺基团之间的反应来固定突变酶。以纤维素二糖脱氢酶 (CDH) 为模型体系, 经过测试, 物理吸附 *Mt*CDH 的催化电流明显低于共价固定 CDH 的催化电流, 催化电流低 80%, 突变酶表现出高催化电流。

此外, Cys 残基被引入酶序列中可使酶在金表面形成自组装的单层。研究显示含有 1 或 2 个额外 Cys 残基的 6 种重组单体超氧化物歧化酶突变体可在金电极上自组装<sup>[18]</sup>。这种酶与金电极的一步固定法, 不仅简化了生物传感器的结构, 而且提供了更可靠的结果。与传统的细胞色素 C 单层电极相比, 该生物传感器对超氧自由基显示出更高的灵敏度。

高数量的 Cys 残基参与蛋白质与载体的相互作用, 可实现更强的固定, 减少酶脱落。Kalaji 等<sup>[19]</sup> 经过基因工程改造, 将硝基还原酶 (NTR) 的 N 端引入 6 个 Cys 序列, 能够在金电极表面形成强硫醇键, 而不会损失酶活性。该技术被用于开发一种安培生物传感器, 检测含硝基芳香族化合物的爆炸物, 检测水平可降至万亿分之一 (图 2c)。

一般来说, 将蛋白质表面的一个氨基酸替换为 Cys 对酶结构功能的影响可以忽略不计, 可以引入到酶的任何区域, 并且基于二硫键-硫醇作用原理可以实现对蛋白质的完全定点固定。因此, 通过 Cys 的定向固定可能是最有前途的一种控制酶固定取向的策略。

#### 1.1.4 基于非天然氨基酸的定向固定

近年来, 酶工程取得了巨大进步, 但传统的酶工程利用 20 种天然氨基酸来改变和改善蛋白质的功能特性, 例如稳定性和活性<sup>[20]</sup>, 随着遗传密码工程 (genetic code engineering, GCE) 技术的进步, 200 多种非天然氨基酸 (ncAA) 得到翻译并被纳入蛋白质的遗传密码<sup>[21]</sup>。Wolfenden 等<sup>[22-23]</sup> 基于遗传密码扩展开发了一种理想的蛋白质生物正交连接, 他们利用 GCE 技术分别将吡咯啉-酮依赖性葡萄糖脱氢酶 (PQQ-GDH) 的三个目标位置替换成四嗪氨基酸 (Tet2.0), 并将 Tet-蛋白质与连接到反式环烯 (sTCOs) 的标签反应, 这三个位置包括 125 位点、231 位点、323 位点。后经测试发现, 不同位点显示出不同的活性 (323 位点 6.6 mg/L、125 位点 6.2 mg/L、231 位点 5.8 mg/L)。这种反应的主要特点是: a. 可以加入到蛋白质表面的任何位置, 控制酶活性位点取向; b. 在活细胞内具有高度选择性, 只与对应的配体反应; c. 生物反应速率常数高, 在几秒到几分钟内就可以完成标记。基于这种反应, 研究者将非天然氨基酸掺入到蛋白质中并实现蛋白质的定向固定 (图 2d)。

Smith 等<sup>[24]</sup> 将非天然氨基酸 *P*-炔丙基-L-苯丙氨酸加入到绿色荧光蛋白 (GFP) 的特定位置 (pPaGFP), 修饰后的 GFP 通过共价连接至磁珠上, 在多种恶劣反应条件下, 与游离蛋白质相比, 固定化的 pPaGFP 表现出更好的稳定性、持久性和保留活性, 在四次冻融循环实验中固定化 pPaGFP 的酶活性变化不大, 游离酶的活性下降 68%。在尿酸/热孵育实验中固定化的 pPaGFP 的酶活性下降 17%, 游离酶的活性下降 97%。

#### 1.2 基于融合多肽的定向固定

多肽是由天然或合成的氨基酸通过肽键连接形成的长度比蛋白质短的聚合物, 通过表达和偶联重组融合多肽来固定蛋白质已经成为一种控制蛋白质取向的非常具有吸引力的方法, 它不仅使蛋白质空间取向更加明确而且可灵活微调蛋白质的共轭拓扑结构。目前已发现多种具有不同长度和亲和力的多肽可用于各种材料的结合, 如金结合肽、纤维素结合结构域、碳纳米管等碳材料结合肽等。下面将对这几种多肽的序列结构特点、结合原理以及在传感器中的应用进行详细论述 (图 3)。

##### 1.2.1 金结合肽

金单质电极是最普遍的电化学生物传感器基板材料之一, 其化学性质稳定, 具有良好耐腐蚀性、

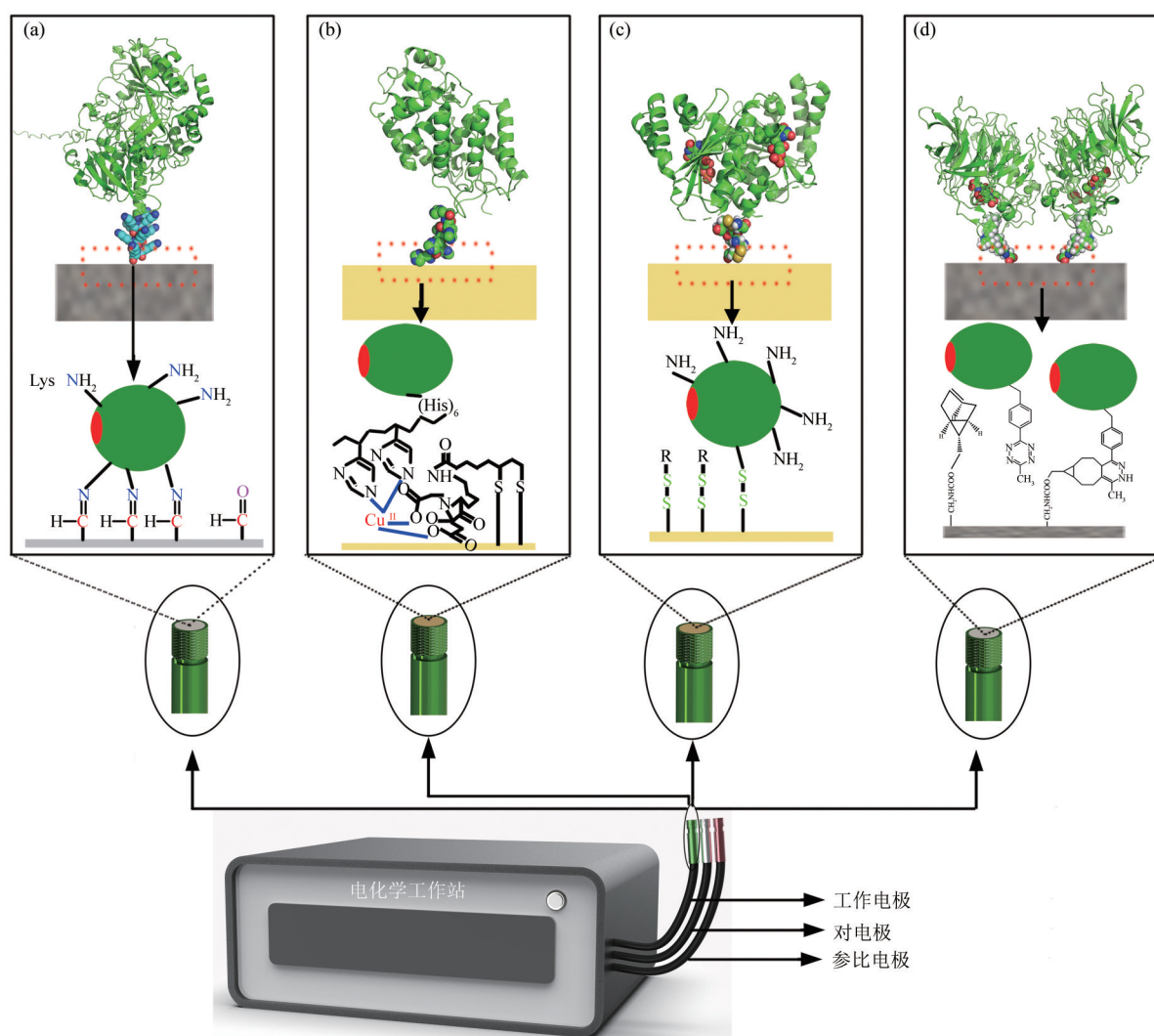


Fig. 2 Diagram of the directed fixation pattern based on four amino acid residues

图2 基于4种氨基酸残基的定向固定模式图

(a) 赖氨酸残基：葡萄糖氧化酶（GOD）通过在C端用聚赖氨酸链进行了基因修饰，进而固定到电子转移介质二茂铁甲酸上。(b) His标签：酶被组氨酸（His）残基修饰，以固定在特定的金属离子上，如 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 和 $\text{Fe}^{3+}$ ，以及供电子基团。(c) 半胱氨酸残基或半胱氨酸标签：二聚体NTR通过N端Cys6标签固定在金表面。(d) 非天然氨基酸固定：通过四嗪氨基酸（Tet2.0）修饰将吡咯啉-酮依赖性葡萄糖脱氢酶固定在碳纳米管电极表面。

导电性和生物相容性，又因其具有良好的延展性，故可以轻松的覆盖至电极表面。在金单质表面表现出一系列的结合亲和力和吸附动力的金结合肽就成为酶定向固定到金电极上的重要手段之一。通过上文可知，Cys结构中的硫醇基可通过共价键与金结合。随着基因工程技术的发展，越来越多具有金结合能力的多肽被发现，最初，金结合肽是由Brown<sup>[25]</sup>于1997年通过细胞展示技术筛选获得，它含有14个氨基酸残基，命名为GBP1（MHGKTQATSGTIQS， $pI=8.25$ ，净电荷+1）<sup>[26]</sup>。随后多种金结合肽，包括AuBP1

（WAGAKRLVLRRE， $pI=11.71$ ，净电荷+3）<sup>[27]</sup>、AuBP2（WALRRSIRRQSY， $pI=12$ ，净电荷+4）<sup>[28]</sup>、A3（AYSSGAPMPPF， $pI=6.09$ ，净电荷0）<sup>[29]</sup>、GBP（LKAHLPPSRLPS， $pI=11$ ，净电荷+2）<sup>[30]</sup>被相继报道。

尽管GBP不含Cys，但它可与金通过非共价相互作用谱引起从微到亚纳摩尔范围内的宏观解离常数变化，从而介导产生高亲和作用力。这种亲和力的大小与多种因素相关，一方面与氨基酸的种类相关，如高结合能力的肽段中精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸等氨基酸的比例较高，另一方面与肽的

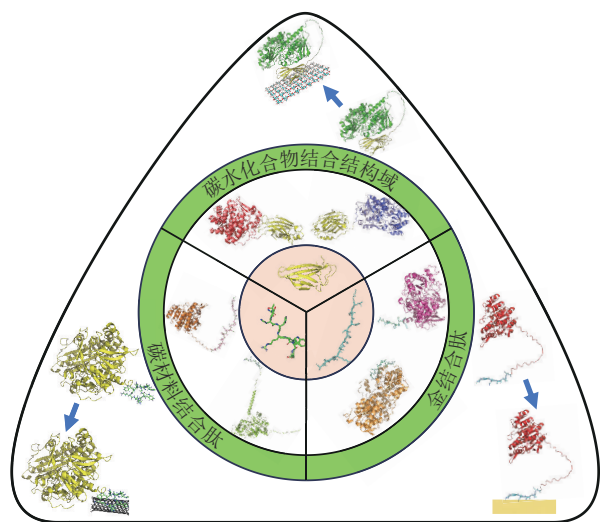


**Fig. 3** Fusing a gold-binding peptide, a cellulose-binding structural domain, or a carbon nanotube-binding peptide, enables the enzyme to form directed binding to gold, cellulose, and carbon nanotubes, respectively

图3 融合金结合肽、纤维素结合结构域或碳纳米管结合肽的酶, 能够分别与金、纤维素和碳纳米管形成定向结合

高级结构相关, 如 AuBP2 具有延长的螺旋聚脯氨酸 II 型 (PPII) 构象, 在金上的吸附自由能 ( $\Delta G_{\text{ads}}$ ) 约为  $-9.0 \text{ kcal/mol}$ 。通过在肽段两侧添加 Cys 形成二硫键桥, 该肽从线性形式转化为环状形式, 干扰了 PPII 结构的形成, 产生随机构象, 从而增加了与金的结合亲和力; 此外, 金表面晶体结构对结合力大小也有重要影响, Braun 等<sup>[31]</sup>发现 AuBP1 对 Au (111) 的亲和力高于 Au (100), 分子动力学 (molecular dynamics, MD) 模拟显示, 与 Au (111) 的结合是由肽的 12 个残基中的 10 个介导的, 但只有 4 个氨基酸与 Au (100) 表面接触。此外, 吸附到 Au (100) 表面的多肽平均排出  $(5 \pm 8)$  个水分子, 而 Au (111) 平均排出  $(35 \pm 10)$  个水分子, 表明界面水合层强度调节了多肽的间接结合机制。

利用基因工程技术表达含有金结合多肽的融合蛋白是实现敏感膜关键器件制备的一种方法<sup>[32]</sup>。Lee 等<sup>[33]</sup>利用金结合肽 (MHGKTQATSGTIQS) 构建融合蛋白, 开发了一种将蛋白质固定在金表面的有效策略。利用来自洋葱伯克霍尔德菌的金结合肽 (GBP) 融合黄素腺嘌呤二核苷酸依赖性葡萄糖脱氢酶 (FAD-GDH), 并通过 GBP 将 FAD-GDH 固定在金工作电极上, 开发出设计紧凑、传感能力良好的生物传感系统。FAD-GDH 融合 GBP (GDH-GBP) 后, 其在金表面的结合亲和力显著提高, 并

在  $30^\circ\text{C}$  条件下在金表面形成了均匀的单层, 在  $3 \sim 30 \text{ mmol/L}$  线性范围内显示出  $1.33 \mu\text{A} \cdot \text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  的高灵敏度, 并对干扰物具有良好的抵抗力。在贮存稳定性评价中, GDH-GBP/Au 的电流响应可保持 1 个月以上。

### 1.2.2 碳材料结合肽

碳纳米管 (CNTs)、氧化石墨烯 (GO)、还原氧化石墨烯 (rGO) 和石墨烯量子点 (GQDs) 等碳基材料由于其制备过程简单、背景电流低、表面再生能力强和成本低等优点<sup>[34]</sup>, 被广泛用于生物传感器的构建。自 2000 年一种针对富勒烯  $\text{C}_{60}$  的单克隆抗体被发现, 并且被证明与碳纳米管有一定的选择性结合以来, 多种与石墨、CNTs 和 GO 具有高度特异性结合能力的多肽被筛选报道 (表 1), 这也为开发基于碳材料的传感器开辟了新的途径<sup>[35]</sup>。

石墨烯具有比表面积高、电子传递速率快、室温下电子和热导率高、良好的生物相容性、高机械强度和高弹性等特性, 使其成为电化学和生物传感应用非常有前景的材料, 然而, 由于缺乏官能团和已建立的自组装单层化学物质, 石墨烯与生物分子的功能化很难实现。石墨烯的共价功能化会导致其结构的破坏和电子性能的丧失, 因此石墨烯结合肽介导的生物活性肽基序与石墨烯的非共价生物偶联在传感器中的应用非常有吸引力。通过基序设计, 多肽具有易于修饰、与石墨烯表面强结合且具有自组装的特点, 可形成石墨烯-肽单层 (石墨烯-PM)、石墨烯-肽超结构 (石墨烯-PS, 如纳米原纤维 (PNFs)、纳米线 (PNWs) 和纳米管 (PNTs)) 和石墨烯-肽-纳米颗粒 (NPs) 复合材料, 这介导了用于各种生物传感器的新型石墨烯基纳米材料的发展。研究者将石墨烯结合肽 (GrBP) 与抗菌肽 (AMP) 融合形成一种双功能肽, GrBP 端固定到印刷有石墨烯的水溶性丝的薄膜上, AMP 端可识别和结合病原菌, 如金黄色葡萄球菌和幽门螺杆菌, 这种丝状薄膜传感器很容易转移到各种表面、具有优异抗机械应力性能且检测限可达  $1 \text{ 个细菌}/\mu\text{l}$ <sup>[36]</sup>。So 等<sup>[37]</sup>结合动力学模拟和实验的方法研究了石墨烯 (石墨) 结合肽序列 (GrBP5-WT) IMVTESSDYSSY 以及它的突变体, M1 (IMVTESSDASSA)、M2 (IMVTESSDWSSW)、M3 (IMVTESSDFSSF)、M4 (TQSTESSDYSSY) 和 M5 (LIATESSDYSSY) 的吸附和表面自组装, 结果显示, 肽链在石墨烯表面的聚集是疏水和亲水

亚域之间的氢键和电荷-电荷相互作用的结果，而不是之前提出的疏水-疏水亚域相互作用。此外，Kim 等<sup>[38]</sup>发现，石墨烯结合多肽（GBP，EPLQLKM）和碳纳米管结合多肽（CBP，HSSYWYAFNNKT）与石墨烯边缘和面的结合具有偏好性，GBP通过带负电荷的谷氨酸（E）残基吸引到石墨烯边缘的氢末端，而CBP将其芳香氨基酸残基（-H-Y-W-Y-F-）扩展到最大限度以增加与石墨烯平面的 $\pi$ - $\pi$ 相互作用。

自1991年Ijima<sup>[39]</sup>报道了碳纳米管（CNTs）的制备以来，碳纳米管引起了科学界的极大关注。从广义上讲，它们可以分为单壁碳纳米管（SWNT）和多壁碳纳米管（MWNT）。CNTs具有高刚度、高强度以及金属或半导体导电性和导热性，在近红外区域表现出光致发光，使其成为应用于生物传感的合适候选材料。CNTs通常具有较高的表面能和疏水性，因此，碳纳米管的共价或非共价功能化通常是生物医学应用所必需的。但值得注意的是，共价功能化并不能保证碳纳米管的结构均匀性，基于碳纳米管结合肽的非共价功能化为碳纳米管的加工和操作提供了新的途径。Wang 等<sup>[40]</sup>利用噬菌体展示来鉴定对碳纳米管具有选择性亲和力的肽。通过证明直接附着在碳纳米管微球上的噬菌体和游离肽，证实了其结合特异性。

肽与碳纳米管的结合亲和力随着芳香族残基含量的增加而增加。此外，在芳香族残基中，与具有苯丙氨酸（Phe，F）或酪氨酸（Tyr，Y）残基的肽相比，含有色氨酸（Trp，W）残基的肽对碳纳米管具有更高的结合亲和力。Xie等<sup>[41]</sup>研究显示，在测试的三种芳香氨基酸（W、F、Y）中，含有W的序列对碳纳米管的亲和力最大，而Y对单壁碳纳米管选择性更高，F对碳纳米管的亲和力最低。并且肽序列中大的芳香族残基之间的空间位阻对肽与纳米管的结合具有负面影响。此外，与不结合的对照相比，结合肽序列的折叠更灵活，其中一些结合肽具有对称洗涤剂的疏水结构——中间疏水，末端亲水。因此在设计表面高结合活性肽时，应考虑芳香残基的数量、距离和极性。

Sakamoto 等<sup>[42]</sup>将纳米管结合肽（CBP）修饰至嗜嗜热菌 *Pyrobaculum aerophilum*（McoP）的多铜氧化酶C端上，进而定向固定在单壁碳纳米管（single-walled carbon nanotubes，SWCNT）上，提高了酶和电极之间的电子转移效率，从而提高了电流值。测试数据表明，当McoP-SWNT和（McoP-CBP）-SWNT复合物上的固定化酶量几乎相等时。进行循环伏安法（CV）测量，（McoP-CBP）-SWCNT/GC电极的催化反应中的电流密度是McoP-SWNT/GC电极的5.4倍。

Table 1 Carbon material binding peptides

表1 碳材料结合肽

|         | 名称  | 序列           | 氨基酸个数 | 文献   |
|---------|-----|--------------|-------|------|
| 碳纳米管结合肽 | B1  | HWKHPWGAWDTL | 12    | [43] |
|         | B2  | HHWHHWCMPhKT | 12    | [40] |
|         | B3  | HWSAWWIRSNGS | 12    | [44] |
|         | B4  | HNWYHWWMPHNT | 12    | [40] |
|         | NB1 | LPSPNASVADYS | 12    | [40] |
|         | NB2 | IDVESYKGTSMF | 12    | [40] |
|         | B1Y | HYKHYPGAYDTL | 12    | [45] |
|         | B1F | HFKHPPGAFDTL | 12    | [46] |
|         | B1  | HWKHPSGAWDTL | 12    | [40] |
|         | B3Y | HYSAYYIRSNGS | 12    | [46] |
|         | B3F | HFSAFFIRSNGS | 12    | [46] |
|         | B3  | HWSAWSIRSNGS | 12    | [40] |
|         | A1  | YFDLIWFAYSN  | 11    | [47] |
|         | A2  | IFRLSWGTYFS  | 11    | [48] |
|         | A3  | YSFWALWYPTP  | 11    | [47] |
|         | A4  | NFAWTLWYAAG  | 11    | [47] |
|         | A5  | DCIVNWTLYH   | 11    | [47] |
|         | A14 | RFFWISWSDDV  | 11    | [47] |

续表1

|        | 名称           | 序列                                     | 氨基酸个数 | 文献   |
|--------|--------------|----------------------------------------|-------|------|
| 石墨烯结合肽 | A16          | SHNYDWSLFFG                            | 11    | [47] |
|        | EFK16-II     | FEFEFKFKFEFEFKFK                       | 16    | [49] |
|        | EAK16-II     | AEAEAKAKAEAEAKAK                       | 16    | [50] |
|        | EK8          | EKEKEKEK                               | 8     | [51] |
|        | GrBP5        | IMVTESSDYSSY                           | 12    | [52] |
|        | 突变1          | IMVTESSDASSA                           | 12    | [37] |
|        | 突变2          | IMVTESSDWSSW                           | 12    | [37] |
|        | 突变3          | IMVTESSDFSSF                           | 12    | [37] |
|        | 突变4          | TQSTESSDYSSY                           | 12    | [53] |
|        | 突变5          | LIATESSDYSSY                           | 12    | [53] |
|        | 石墨烯/石墨-PM    | GAMHLPWHMGTL                           | 12    | [54] |
|        | 石墨烯-PM       | EPLQLKM                                | 7     | [55] |
|        | 石墨烯-PM       | HSSYWYAFNNKT                           | 12    | [56] |
|        | 石墨烯-PM       | DELERRIRELEARIK                        | 12    | [57] |
|        | GO-PM        | GGGRKRIHIGPGPAFYTT                     | 18    | [58] |
|        | GO-PM        | GGGSNWGCAFRQVC                         | 14    | [58] |
|        | rGO-PM       | SGVG(VPGVG) <sub>50</sub> VPGHNWYHWWPH | 266   | [59] |
|        | GO-PNF/PNT   | GSGLMVGGVVIAAAA                        | 15    | [60] |
|        | rGO-PNF/PNT  | FF                                     | 2     | [54] |
|        | rGO-PNF/PNT  | Fmoc-YD, Fmoc-FD                       | 2     | [61] |
|        | rGO-PNF/PNT  | Pyrene-FFA-OMe                         | 3     | [62] |
|        | GO-PNF-NPs   | AEAKAEAKYWYAFAEAKAEAK                  | 21    | [63] |
|        | rGO-PNF-NPs  | VIAGASLWWSEKLVA                        | 16    | [64] |
|        | GQDs-PNF-NPs | RGDAEAKAEAKYWYAFAEAKAEAKRGD            | 27    | [65] |

GO: 氧化石墨烯; rGO: 还原氧化石墨烯; PM: 肽单体; PNF: 纳米纤维; PNT: 碳纳米管; NPs: 纳米粒子。

### 1.2.3 碳水化合物结合结构域

碳水化合物结合结构域 (CBM) 为碳水化合物活性酶内的连续的氨基酸序列, 是一类具有独立折叠结构的非催化结构域。CBM 通过连接肽 (linker) 与催化结构域相连, 在酶分子底物识别和定向结合中发挥重要作用, 对不同类型的多糖尤其是纤维素具有结合特异性<sup>[66]</sup>。迄今为止已将 CBM 根据序列功能归入 99 个家族 (详细数据见 CAZy 数据库 (<http://www.cazy.org/Home.html>))。根据配体结合位点的拓扑结构, CBMs 可分为 A、B、C 型<sup>[67]</sup>。

A 型 CBMs 具有由芳香族残基组成的平坦疏水结合表面。能够通过酶的芳香氨基之间的熵驱动的 CH- $\pi$  相互作用结合不溶性碳水化合物, 但它们对可溶性多糖的亲和力很小甚至没有亲和力。B 型 CBMs 结合位点结构显示出具有容纳各个底物链的裂缝或凹槽的形状, 结合位点可以位于三维结构的

两个区域中。B 型 CBMs 一般不能与平面底物结合, 但可以与多种聚糖结合。芳香侧链在配体结合中发挥着关键作用, 芳香残基的方向是结合特异性的关键决定因素。C 型结合位点显示出能够识别暴露的或短链碳水化合物的口袋拓扑, 具有与单糖、二糖或三糖最佳结合的凝集素样特征位点, 缺乏 B 型 CBM 的扩展结合位点凹槽。一般来说, C 型 CBM 的鉴定和表征落后于 A 型和 B 型。

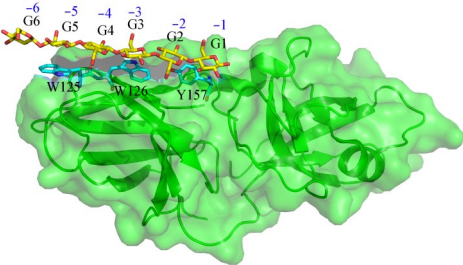
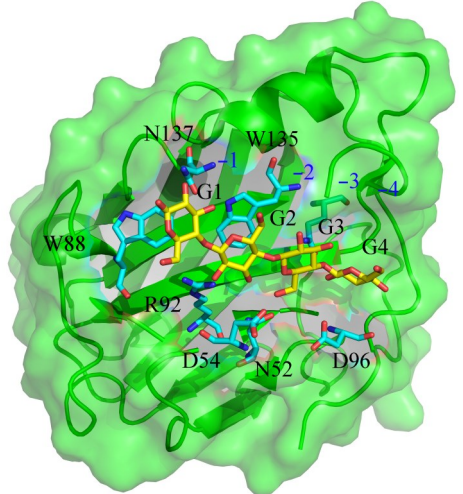
CBMs 已被发现对各种糖类具有广泛的亲和力, 如纤维素、淀粉、 $\alpha$  葡聚糖、 $\beta$  葡聚糖、木聚糖、甘露聚糖、几丁质、琼脂糖、半乳聚糖、葡甘露聚糖等<sup>[68]</sup>。纤维素等多糖具有储量丰富、无毒、可再生、对化学试剂稳定以及良好的生物相容性等特点, 已被证明是酶分子固定的理想载体。目前 CAZy 数据库中能结合纤维素的 CBM 家族统计如表 2 所示, CBMs 作为高效的固定重组融合蛋白的工具已被广泛应用 (图 4), 如在生物修复中, 一

些研究者报道了利用与纤维素结合的CBMs融合的去污酶降解有毒化合物，旨在开发有效的污染物去除系统，CBM和纤维素的这些特性为活性位点取向可控的酶分子传感元件设计提供了新的研究思路。

本实验室于1989年基于第一代酶传感器原理，自主研发并成功应用了SBA系列生物传感分析仪(图5)。是目前中国重要的商品化工业酶电极分析系统，在食品发酵、生物医药和科研教学等领域已广泛应用<sup>[69]</sup>。最近，本实验室通过融合酶表达技术，使目标酶修饰上CBM，实现酶分子在电极表面定向固定，以提高生物传感器的传感性能。首先以第一代传感器用酶-葡萄糖氧化酶(GOD)为模型酶，通过天然连接接头(NL)与CBM2连接，

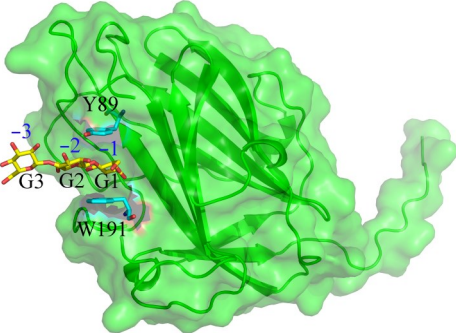
成功构建GOD-NL-CBM2融合酶，实现GOD在纤维素上的定向固定，使得酶活性中心朝向底物易于接近的适当位置，电化学检测结果显示此融合酶敏感元件灵敏度和检测限分别达到 $4.667\times 10^{-4}\text{A}\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ 和 $475\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。解决了传统固定化方法在特异性结合、活性保持、制作方法繁杂以及酶分子负载量的不可控等问题。并且还显示出快速的电流响应(<5 s)、高重现性(相对标准偏差, 相对标准偏差(RSD)<5%)和稳定性(在2个月后仍保持约80%的原始电流响应)<sup>[70]</sup>。此外，进一步将此种策略应用到新型葡萄糖传感检测用酶-真菌来源的FAD依赖性葡萄糖脱氢酶(FAD-GDH)的固定化方法优化<sup>[71]</sup>，显示出基于CBM定向固定化方法的优势及此种方法的普适性。此外，

Table 2 Statistics of CBM families that bind cellulose in the CAZy database  
表2 CAZy数据库中能结合纤维素的CBM家族统计

| 拓扑结构类型                                                                                                                                         | CBM家族序号 | 来源(典型代表)                         | 结合配体                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|----------------------------------|----------------------------------------------|
| <div>类型A</div>  <div>PDB: 4FER (CBM63)<sup>[72]</sup></div> | 1       | 纤维二糖水解酶I                         | 纤维素、半纤维素、几丁质                                 |
|                                                                                                                                                | 2       | 几丁质酶木聚糖酶                         | 纤维素、木聚糖、几丁质                                  |
|                                                                                                                                                | 3       | 内切-β-1、4-葡聚糖酶、内/外切-β-1、4-葡聚糖酶    | 纤维素、几丁质                                      |
|                                                                                                                                                | 5       | 几丁质酶; 内切-β-1、4-葡聚糖酶              | 纤维素、几丁质                                      |
|                                                                                                                                                | 10      | 纤维素酶、木聚糖酶、甘露聚糖酶、裂解性多糖单加氧酶(LPMO)  | 纤维素                                          |
|                                                                                                                                                | 63      | 膨胀蛋白                             | 纤维素                                          |
|                                                                                                                                                | 64      | 4-β-D-葡聚糖4-葡聚糖水解酶                | 纤维素                                          |
|                                                                                                                                                | 79      | 纤维小体                             | 纤维素、β葡聚糖、木葡聚糖                                |
|                                                                                                                                                | 4       | 纤维二糖水解酶、内切-β-1,4-葡聚糖酶、木聚糖酶、昆布多糖酶 | 木聚糖、β-1,3-葡聚糖、β-1,3-1,4-葡聚糖、β-1,6-葡聚糖、无定型纤维素 |
|                                                                                                                                                | 6       | 木聚糖酶、β-1,3-葡萄糖甙酶/昆布多糖酶           | 无定型纤维素、β-1,4-木聚糖、β-1,3-葡聚糖和β-1,4-葡聚糖         |
| <div>类型B</div>  <div>PDB: 1J84 (CBM17)<sup>[73]</sup></div> | 16      | β-甘露聚糖酶                          | 纤维素、葡甘露聚糖                                    |
|                                                                                                                                                | 17      | 内切-β-1,4-葡聚糖酶                    | 无定型纤维素、寡聚糖                                   |
|                                                                                                                                                | 28      | 内切-β-1,4-葡聚糖酶                    | 无定型纤维素、纤维寡糖、β-1,3-1,4-葡聚糖                    |
|                                                                                                                                                | 44      | 内切葡聚糖酶J                          | 纤维素、木葡聚糖                                     |
|                                                                                                                                                | 72      | 糖苷水解酶                            | 可溶性和不溶性纤维素、β-1,3/1,4-混合连接葡聚糖、木聚糖和β甘露聚糖       |
|                                                                                                                                                | 85      | 木聚糖酶                             | 无定型纤维素以及微晶纤维素、桦木葡糖醛酸聚糖、大麦β葡聚糖和魔芋葡甘露聚糖        |
|                                                                                                                                                | 80      | 纤维小体                             | 纤维素、β甘露聚糖                                    |
|                                                                                                                                                | 81      | 内切葡聚糖酶                           | β葡聚糖、木葡聚糖、非定型纤维素                             |

续表2

| 拓扑结构类型 | CBM家族序号 | 来源 (典型代表) | 结合配体           |
|--------|---------|-----------|----------------|
| 类型C    | 9       | 木聚糖酶A     | 木聚糖、纤维素 (只有1例) |



PDB: 7NWQ (CBM9)<sup>[74]</sup>

本表中图片通过PyMOL自行绘制, 其中纤维素结合位点根据引用文献标注。数据来自CAZy数据库 (<http://www.cazy.org/Home.html>)。

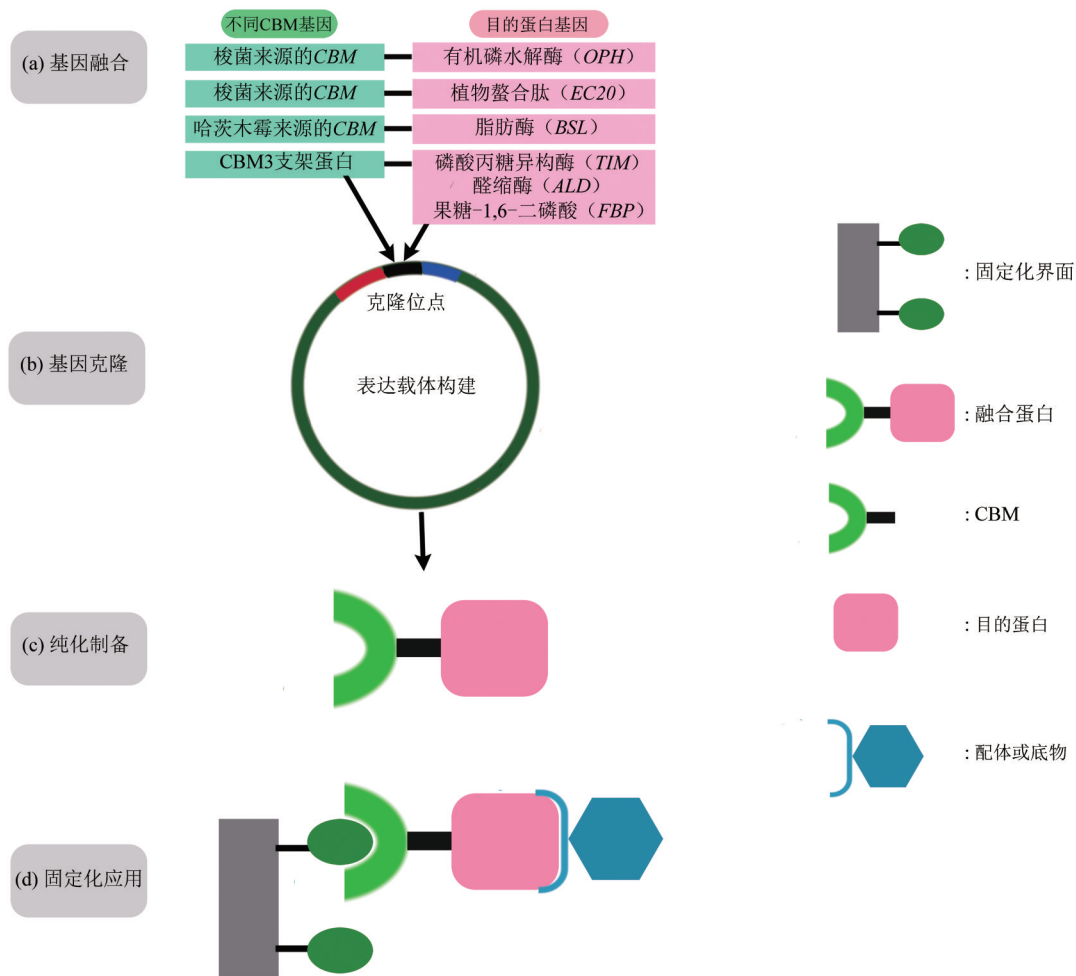


Fig. 4 Schematic representation of recombinant CBM-fusion technology from cloning to immobilization applications  
图4 重组CBM-融合技术从克隆到固定化应用的示意图

将融合葡萄糖氧化酶传感元件配套应用于研究团队自主研发的半自动SBA40E++型生物传感器、全自动SBA78型生物传感器及SBA66发酵在线分析系统, 检测性能达到甚至超过利用国外进口酶制剂制

备的酶传感元件及国外商品化葡萄糖传感器（表3），这些结果表明，在生物传感器的设计中，基底电极通过增加纤维素基材，利用CBM与纤维素的特异性结合，可以在复杂的生物样本中准确地检测特定的生物分子，不仅提供了稳定的电流通道，还为酶分子提供了理想的固定环境，使得传感器能够在多种环境条件下保持其性能，从而提高了其可靠性和使用寿命。CBMs作为亲和吸附标签在制备固定化酶生物传感器方面具有很大的潜力，有望成为生物传感器的商品化应用的重要方法。

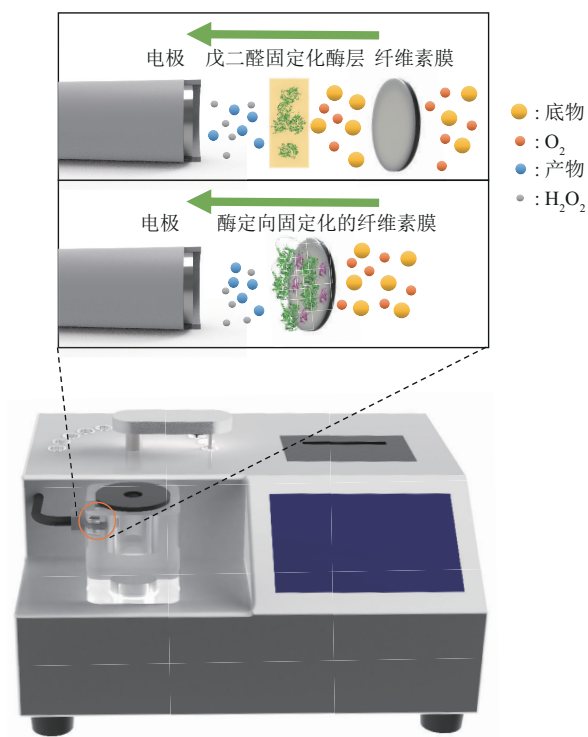


Fig. 5 Analytical model diagram of SBA series biosensing based on glutaraldehyde crosslinked random fixation and CBM directed fixation

图5 基于戊二醛交联随机固定和CBM定向固定的SBA系列生物传感分析模式图

Table 3 Comparison of immobilization methods and performance parameters of commercial glucose sensors for glucose determination

表3 用于葡萄糖测定的商用葡萄糖传感器固定化方式及性能参数对比

| 商用葡萄糖传感器类型      | 生产厂家  | 酶固定化方式   | 检测限/<br>(mmol·L <sup>-1</sup> ) | 分析<br>时间/s | 样本<br>体积/μl | 储存稳定性 | 线性范围/<br>(mmol·L <sup>-1</sup> ) |
|-----------------|-------|----------|---------------------------------|------------|-------------|-------|----------------------------------|
| YSI 2900 Series | 美国YSI | 戊二醛交联固定化 | 0.1                             | 60         | 10~50       | —     | 0~50                             |



<https://www.ysi.com/ysi-2900-nutrient-biochemistry-analyzer>

续表3

| 商用葡萄糖传感器类型                                                                                                                                                                                                                                                                         | 生产厂家                | 酶固定化方式                               | 检测限/<br>(mmo·L <sup>-1</sup> ) | 分析<br>时间/s | 样本<br>体积/μl | 储存稳定性                                                      | 线性范围/<br>(mmol·L <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------|------------|-------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <div>Biosen C-Line</div> <div></div> <div><a href="http://www.ekfdiagnostics.com.cn/zh/productdetail.aspx?detailid=9">http://www.ekfdiagnostics.com.cn/zh/productdetail.aspx?detailid=9</a></div> | 德国EKF               | 采用特殊半透膜作为电极膜, 夹心法包被葡萄糖氧化酶            | —                              | 20~45      | 20          | 7 500次葡萄糖检测<br>(或60 d)                                     | 0.5~50                           |
| <div>StatStrip®Glucose</div> <div></div> <div><a href="https://www.novabiomedical.com/statstrip-new-gen/index.php">https://www.novabiomedical.com/statstrip-new-gen/index.php</a></div>          | 美国Nova              | 物理吸附                                 | —                              | 6          | 1.2         | 一次性检测                                                      | 0.6~33.3                         |
| <div>SBA40E++</div> <div></div> <div><a href="http://www.zhigansw.com/cms/chanpinzhongxin/1.html">http://www.zhigansw.com/cms/chanpinzhongxin/1.html</a></div>                                  | 山东省<br>科学院<br>生物研究所 | 戊二醛交联采用Sigma等国外进口酶; 自主研发融合酶采用亲和吸附固定化 | 0.1                            | 20         | 25          | 从生产日期起24个月,<br>工作期大于30 d                                   | 0~50                             |
| <div>SBA78</div> <div></div> <div><a href="http://www.zhigansw.com/cms/chanpinzhongxin/4.html">http://www.zhigansw.com/cms/chanpinzhongxin/4.html</a></div>                                     | 山东省<br>科学院<br>生物研究所 | 同SBA40E++                            | 0.1                            | 20         | 40          | 从生产日期起24个月,<br>工作期大于30 d                                   | 0~50                             |
| <div>SBA66发酵在线分析系统</div> <div></div> <div><a href="http://www.zhigansw.com/cms/yiqishiyongshuomingshu/21.html">http://www.zhigansw.com/cms/yiqishiyongshuomingshu/21.html</a></div>             | 山东省<br>科学院<br>生物研究所 | 同SBA40E++                            | 0.1                            | 20         | 40          | 从生产日期起24个月,<br>戊二醛交联法固定酶膜<br>工作期大于30 d, 自主研发融合酶膜大于<br>40 d | 0~50                             |

数据来自仪器官方网站。

### 1.3 基于核酸适配体的定向固定

适配体是一种单链寡核苷酸序列，可以是短的单链DNA或RNA分子，具有与其靶标（蛋白质、核酸、小分子）特异结合的特性，相比RNA链，DNA链更加稳定<sup>[75]</sup>。自从1990年首次提出核酸适配体的概念<sup>[76]</sup>，核酸适配体作为多功能亲和试剂抗体替代品引起了人们的极大兴趣。核酸适配体具有高稳定性、高成本效益的批量合成、最小的批间差异、非免疫原性和对位点特异性化学修饰的适应性等特性<sup>[77]</sup>，因此，利用适配体和目标酶（蛋白质）传感元件之间的特异性亲和力来定位酶（蛋白质）分子为实现酶传感元件的定向固定提供了新的可能，在实时监测和可穿戴传感应用中显示出巨大潜力。

适配体介导的酶分子定向固定化具有许多优

势。首先，适配体热稳定高、pH值耐受范围广，可稳定应用多环境条件；其次，它们可以通过成熟的化学方法容易地以低成本合成，提高产业化应用的可行性；此外，适配体特异性结合的靶蛋白可通过基因工程手段与识别蛋白质融合，实现任何一种识别蛋白质的定向固定化。因此，这将是实现简单有效的酶分子在传感界面定向固定化的一个非常有前途的策略。同样的，Ge等<sup>[78]</sup>通过Au-S化学将单层DNA折纸锚定在金电极上，并将葡萄糖氧化酶（GOx）和HRP通过DNA蛋白共轭和双链杂交结合到DNA折纸上，通过调整锚定位点将GOx与HRP之间的距离从65 nm减小到10 nm，酶活性增加了20~30倍，这种定向固定策略给研究固定在电极表面的氧化还原酶级联途径提供了一种重要方法（图6）。

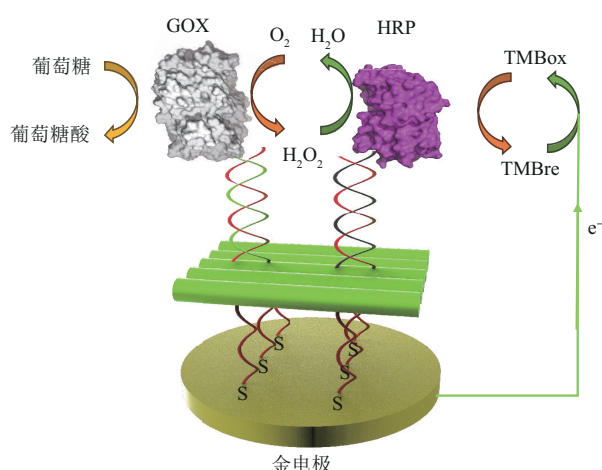


Fig. 6 Glucose oxidase and horseradish peroxidase enzyme cascade were assembled on gold electrode through thiol-modified DNA origami scaffold<sup>[78]</sup>

图6 葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶酶级联通过硫醇修饰的DNA折纸支架组装在金电极上<sup>[78]</sup>

GOX: 葡萄糖氧化酶; HRP: 辣根过氧化物酶; TMB: 3,3',5,5'-四甲基联苯胺; TMB<sub>ox</sub>: 氧化TMB; TMB<sub>re</sub>: 还原TMB。

## 2 传感界面固定化酶分子表征方法

虽然理想状态下通过酶分子设计可实现其在传感界面上的可控固定，然而，周围溶液中酶-固体界面的高度复杂性，导致酶分子识别、选择性和强结合亲和力的确切机制仍然非常不明确。为更有效地控制酶分子在传感界面上的固定化，提高固定化酶系统的利用效率，通过多种手段探究传感界面与固定化酶分子的结合动力学、亲和力、酶分子取向、结构以及表面密度等特性引起研究者的广泛关注<sup>[79]</sup>。目前已经建立了一系列实验和理论工具用

于深入分析传感界面固定化酶分子特性。表4系统总结了传感界面固定化酶分子表征方法。指出了每种方法可以表征的固定化酶性质、应用的优势和局限性<sup>[80]</sup>。

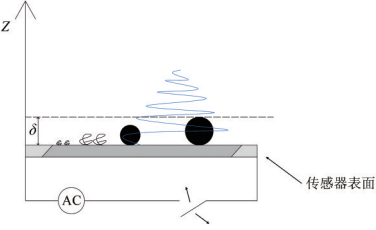
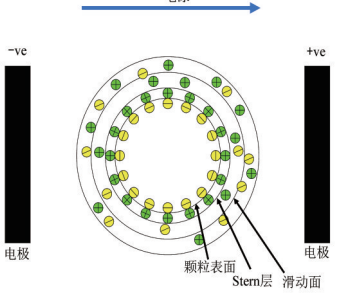
在传感界面酶分子定向固定化研究中，能够探测固定酶分子的结构和取向的技术对于理解表面固定化酶的性质、优化定向固定化方法至关重要。但由于用于固定化酶的界面通常都是不透明的，常规的单一检测手段无法有效检测酶的取向变化，因此，通常需要结合多种技术来获取有关酶在传感界面的取向信息。Gutierrez-Sanchez等<sup>[81]</sup>使用表面

等离子共振 (SPR) 结合电化学和偏振调制红外反射吸收光谱 (PMIRRAS) 分析了分别固定在正、负相反电荷的自组装单层 (SAMs) 的金电极上黑乳杆菌胆红素氧化酶 (Mv BOD) 的酶负载、构象和活性, 发现 Mv BOD 在负电荷界面上直接催化和在正电荷界面上介导催化与不同的酶取向有关, 而与不同的酶负载无关。Shen 等<sup>[82]</sup> 使用通过和频振动光谱 (SFG) 和傅里叶变换衰减全反射红外光谱法 (ATR-FTIR) 的组合方法对固定化的硝基还原酶 (NfsB) 进行测定。将硝基还原酶 (NfsB) 通过不同位点固定在自组装单分子层 (SAM) 表面, 利用 SFG 和 ATR-FTIR 光谱的拟合参数计算出了固定 NfsB 的表面取向。利用原子力显微镜 (AFM) 研究蛋白质取向的方法在很早已被提出, 这种方法主要利用蛋白质特定区域与相应抗体结合, 通过 AFM 的探针与酶分子在传感界面上的样品相互作用, 探针尖端的原子和样品表面的原子相互施加小的排斥力, 使得针尖在垂直于样品表面的方向上起伏。通过将此信号改变或放大, 可以获得样品表面在原子尺度上的三维形貌。这样可以分别测量蛋白质、蛋白质/抗体复合物的体积差异, 检测抗体是

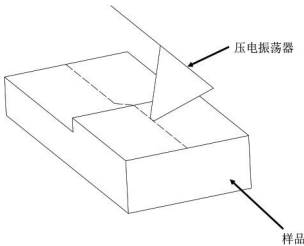
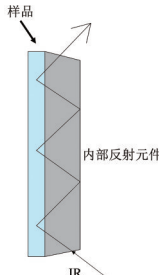
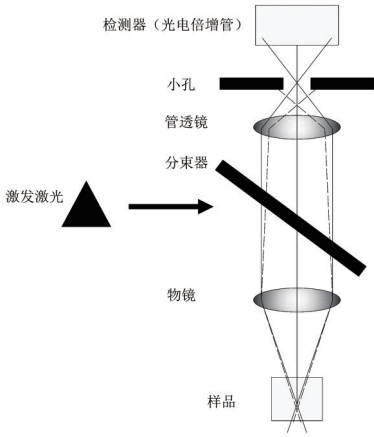
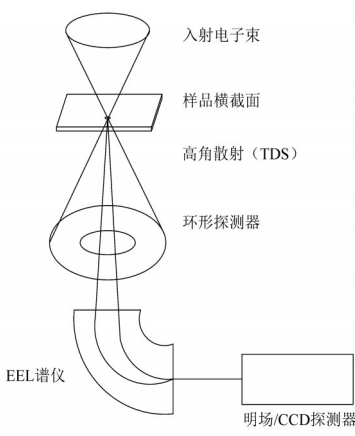
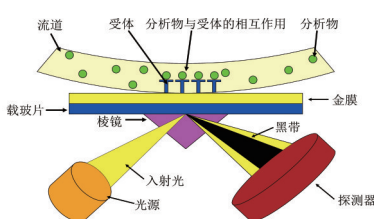
否存在, 从而间接推断蛋白质的取向。利用 AFM 研究蛋白质取向的方法在很早已被提出, 这种方法主要利用蛋白质特定区域与相应抗体结合, 分别测量蛋白质、蛋白质/抗体复合物的体积差异, 检测抗体是否存在, 从而间接推断蛋白质的取向。目前, 很少有研究报道使用显微镜直接确定酶的取向, 只有当酶的一个维度具有特征性时, 利用 AFM 直接测量酶的高度轮廓有一定取向测量价值, 例如来源于脱硫弧菌 (*Desulfovibrio vulgaris*) 的 Ni-Fe-Se 氢化酶可催化 H<sub>2</sub> 的可逆氧化, 并通过脂质尾巴与细胞质膜相连, Gutiérrez-Sánchez 等<sup>[83]</sup> 利用 AFM 和电化学方法对该酶和磷脂修饰的金表面进行了研究, 发现通过两步固定化过程, 氢化酶可以通过其脂质尾部插入到在金表面形成的磷脂双分子层上, 酶和电极之间仅能进行介体介导的电子转移, 而一步固定过程有利于在金表面形成氢化酶单层, 其脂质尾部插入在氢化酶分子顶部形成的磷脂双层中, 一步固定方法可实现天然构象的膜结合酶与电极之间的有效电子转移。但当研究球形酶时, AFM 测量无法获得有关其取向的信息。

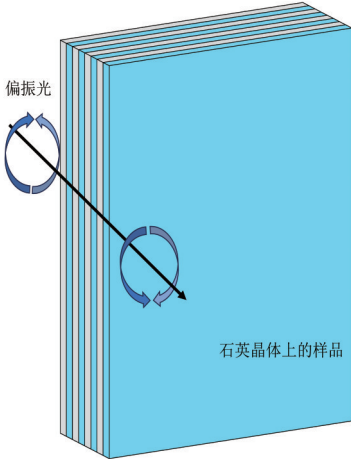
Table 4 Methods for molecular characterization of immobilized enzymes at the sensing interface

表4 传感界面固定化酶分子表征方法

| 方法              | 表征性质                    | 模式图                                                                                 | 优点                       | 缺点                                                             | 参考文献    |
|-----------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------|---------|
| 石英晶体微天平 (QCM-D) | 动力学、亲和力、黏弹性、质量、特异性、表面密度 |  | 高灵敏度、实时监控以及可用于不同类型的传感器表面 | 质量变化的测量是非选择性的、QCM 在环境研究中的应用遇到了具有不同大小和性质的吸附剂, 这些吸附剂产生复杂的 QCM 响应 | [84-85] |
| ZETA 电位         | 酶修饰界面表面电荷               |  | 确定颗粒大小和表面电荷的简单、容易和可重复的工具 | 无法处理高浓度样品                                                      | [86]    |

续表4

| 方法                | 表征性质                       | 模式图                                                                                 | 优点                                               | 缺点                        | 参考文献    |
|-------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------|---------|
| 原子力显微镜 (AFM)      | 取向、表面覆盖度、结合力、表面密度          |    | 高分辨率、高灵敏度，通常分辨率为低于10 nm的特征                       | 无法提供有关聚合物材料的化学成分或官能团分布的信息 | [87-88] |
| 傅里叶变换红外光谱 (FTIR)  | 结构、构像                      |    | 是一种无损技术、不需要外部校准的精确测量方法、速度快、灵敏度高                  | 在低波数区域，由于光学系统的限制，分辨率会变得较低 | [89]    |
| 激光扫描共聚焦显微镜 (CLSM) | 酶分子分布、吸附动力学                |   | 酶分布直接可视化，应用广泛                                    | 需要荧光标记；需要对（部分）不透明载体进行修正   | [90]    |
| 透射电子显微镜 (TEM)     | 酶分子分布、尺寸、形貌                |  | 高分辨率，对化学成分敏感，图像直观易解释                             | 制样过程复杂、困难，样品需要干燥          | [91]    |
| 表面等离子共振 (SPR)     | 动力学；亲和力；特异性；热力学；化学计量学；表面密度 |  | 非破坏性、非侵入性（取决于波长和功率），样品制备量少，无标签、无染料和有毒废物，特异性、灵敏度高 | 金是唯一优选的传感器表面，传质受到限制       | [92]    |

| 续表4           |      |                                                                                   |                  |                 |      |
|---------------|------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|------|
| 方法            | 表征性质 | 模式图                                                                               | 优点               | 缺点              | 参考文献 |
| 圆二色光谱<br>(CD) | 结构   |  | 数据收集和分析速度快, 样本量小 | 样品应高度纯净, 不形成聚集体 | [80] |

3 总结与展望

传感界面高活性的酶分子是酶电极生物传感器实现高效生物传感的核心要素。在过去的十几年中, 研究者建立了多种用于控制生物传感器中界面酶分子取向的固定化方法, 以最大限度保留酶活性。本文从利用蛋白质工程在酶分子中引入传感界面特异性结合的氨基酸、多肽等实现定向固定化的角度, 归纳综述了提高传感性能的相关研究。研究表明, 氧化还原酶在电化学界面上的取向控制是实现快速电子传递和提高酶负载量的重要途径。尤其是在实际应用中可以使生物传感器具有更高的灵敏度以及更强的电流密度, 对提高生物传感器的市场竞争力具有重要意义。

由于生物传感器涉及生物、材料、化学、物理和电子等多领域, 如果想要获得最佳的定向固定结果, 研究人员仍面临着许多挑战, 需要在以下几个方面实现突破。a. 需要对目标氧化还原酶参与电子传递的生理过程有全面、深入理解。使用多种建模工具来研究蛋白质-蛋白质相互作用, 特别是识别潜在的相互作用配体, 以确定界面上酶分子组装的结构以及这些复合物随时间的稳定性, 尤其是确定由蛋白质结合引起的构象变化可能对酶的生物学功能产生的显著影响, 由此推导出对酶分子空间取向进行一定程度控制的关键参数。b. 探索有利于酶与电极间电子传递所需的取向对固定化酶的构象和催化动力学的影响。酶与电极间的静电相互作用最常用于指导产生高电子传递速率常数的酶的适当方向, 但是这些相互作用是否会影响酶的天然构象,

甚至使其变性, 仍然是一个悬而未决的问题。从理论角度来看, 通过 SPR 和 QCM 测量等实验结果结合分子计算模拟、量子计算方法, 可以在分子水平上详细了解界面/酶相互作用如何控制酶的方向, 并最终影响它们的构象和内部动力学(底物结合、催化, 分子内/分子间电子传递)来提供指导。

c. 开发将实时电催化活性与酶负载、酶分配、酶构象和动力学联系起来的新方法, 以提高对蛋白质-电极界面相互作用中分子细节的理解和控制。目前仅有少量研究报道这种耦合方法, 例如将 SPR 和 QCM 与电化学耦合用于探究酶负载量与活性的相关性。此外, 采样问题仍然是探究酶-表面相互作用的瓶颈, 特别是当研究发生在大范围的空间和时间尺度上的过程时。因此, 开发增强抽样方法和多尺度方法是研究这类复杂系统的核心挑战。开发灵敏的电化学方法来寻找非催化信号也是需要重点突破的问题, 这可以使研究者获得真正有效参与催化的酶的数量。

d. 在平面电极上获得的特定酶取向的关键参数是否可以扩展到更复杂的电极中。目前研究酶与电极界面间的相互作用大部分还局限于比较简单的平面电极(金电极、铂电极), 然而, 在实际应用中可能需要碳纳米管、纳米多孔金等 3D 纳米结构电极。虽然最近有些报道证明了将平面电极与酶分子之间取向控制的理论基础平移到结构更复杂电极的能力, 但是真正通过酶在复杂电极界面的取向控制实现高效的生物电催化还需要对酶分子结构、表面特性以及界面物理化学性质进行一体化分析、设计, 以简化酶分子的固定模式且最有效的优化生物传感器性能。

e. 随着纳米技术和材料科学的

进步,通过固定化载体材料(有机-无机纳米晶体、金属-有机框架等)的设计可调控固定化酶分子取向、结合力大小,进而提高固定化酶分子催化剂活性、稳定性<sup>[93-94]</sup>,目前在工业绿色催化领域已展现出应用潜力。固定化酶传感元件的酶载体界面设计可借鉴这些新材料的设计理论和方法,以促进高性能生物传感器的发展。

### 参 考 文 献

- [1] Bollella P. Enzyme-based amperometric biosensors: 60 years later ... Quo Vadis?. *Anal Chim Acta*, 2022, **1234**: 340517
- [2] 陈彦儒,公维丽,马耀宏,等.基于酶电极的乳酸检测生物传感器. *生物化学与生物物理进展*, 2023, **50**(3): 529-546  
Chen Y R, Gong W L, Ma Y H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2023, **50**(3): 529-546
- [3] Yang F, Zuo X, Fan C, *et al.* Biomacromolecular nanostructures-based interfacial engineering: from precise assembly to precision biosensing. *Natl Sci Rev*, 2018, **5**(5): 740-755
- [4] 邵文海,张先恩,Anthony E.Cass. 固定化酶的空间取向控制策略. *生物技术通报*, 2000, **16**(3): 25-28  
Shao W H, Zhang X E, Cass A. *Biotechnol Inf*, 2000, **16**(3): 25-28
- [5] Sassolas A, Blum L J, Leca-Bouvier B D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol Adv*, 2012, **30**(3): 489-511
- [6] Maghraby Y R, El-Shabasy R M, Ibrahim A H, *et al.* Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS Omega*, 2023, **8**(6): 5184-5196
- [7] Liu Y, Yu J. Oriented immobilization of proteins on solid supports for use in biosensors and biochips: a review. *Microchim Acta*, 2016, **183**(1): 1-19
- [8] Zhu Z, Song H, Wang Y, *et al.* Protein engineering for electrochemical biosensors. *Curr Opin Biotechnol*, 2022, **76**: 102751
- [9] Abian O, Grazú V, Hermoso J, *et al.* Stabilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis of the protein surface to increase multipoint covalent attachment. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(2): 1249-1251
- [10] Ryan B J, O'Fágáin C. Arginine-to-lysine substitutions influence recombinant horseradish peroxidase stability and immobilisation effectiveness. *BMC Biotechnol*, 2007, **7**: 86
- [11] Hernandez K, Fernandez-Lafuente R. Control of protein immobilization: coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme Microb Technol*, 2011, **48**(2): 107-122
- [12] Zeballos N, Comino N, Andrés-Sanz D, *et al.* Region-directed enzyme immobilization through engineering protein surface with histidine clusters. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2024, **16**(1): 833-846
- [13] Andreescu S, Magearu V, Lougarre A, *et al.* Immobilization of enzymes on screen-printed sensors via an histidine tail. application to the detection of pesticides using modified cholinesterase. *Anal Lett*, 2001, **34**(4): 529-540
- [14] Ferapontova E E, Grigorenko V G, Egorov A M, *et al.* Mediatorless biosensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> based on recombinant forms of horseradish peroxidase directly adsorbed on polycrystalline gold. *Biosens Bioelectron*, 2001, **16**(3): 147-157
- [15] Ionescu R E. Use of cysteamine and glutaraldehyde chemicals for robust functionalization of substrates with protein biomarkers-an overview on the construction of biosensors with different transductions. *Biosensors*, 2022, **12**(8): 581
- [16] Viswanath S, Wang J, Bachas L G, *et al.* Site-directed and random immobilization of subtilisin on functionalized membranes: activity determination in aqueous and organic media. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **60**(5): 608-616
- [17] Al-Lolage F A, Meneghello M, Ma S, *et al.* A flexible method for the stable, covalent immobilization of enzymes at electrode surfaces. *ChemElectroChem*, 2017, **4**(6): 1528-1534
- [18] Beissenhirtz M K, Scheller F W, Viezzoli M S, *et al.* Engineered superoxide dismutase monomers for superoxide biosensor applications. *Anal Chem*, 2006, **78**(3): 928-935
- [19] Kalaji M, Gwenin C D, Williams P A. Nitroreductase biosensors for detecting nitro-compounds: Britain, World Intellectual Property Organization, WO 2005/056815 A1. 2005-06-23
- [20] Rahban M, Zolghadri S, Salehi N, *et al.* Thermal stability enhancement: Fundamental concepts of protein engineering strategies to manipulate the flexible structure. *Int J Biol Macromol*, 2022, **214**: 642-654
- [21] Kim S, Yi H, Kim Y T, *et al.* Engineering translation components for genetic code expansion. *J Mol Biol*, 2022, **434**(8): 167302
- [22] Sahin S, Milton R D. Evolving enzymatic electrochemistry with rare or unnatural amino acids. *Curr Opin Electrochem*, 2022, **35**: 101102
- [23] Wolfenden N. Site-Specific Modification of Glucose Proteins Enabling Precise Surface Orientation For Glucose Sensors[D]. Oregon: Oregon State University, 2016
- [24] Smith M T, Wu J C, Varner C T, *et al.* Enhanced protein stability through minimally invasive, direct, covalent, and site-specific immobilization. *Biotechnol Prog*, 2013, **29**(1): 247-254
- [25] Brown S. Metal-recognition by repeating polypeptides. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**(3): 269-272
- [26] Zheng C, Alvisi N, de Haas R J, *et al.* Modular design for proteins assembling into antifouling coatings: case of gold surfaces. *Langmuir*, 2023, **39**(27): 9290-9299
- [27] Lee R V, Zareie H M, Sarikaya M. Chimeric peptide-based biomolecular constructs for versatile nucleic acid biosensing. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, **14**(20): 23164-23181
- [28] Xie M, Slocik J M, Dennis P B, *et al.* Substrate effects on remote optical control of Pt nanoparticle-driven olefin hydrogenation. *ACS Appl Nano Mater*, 2024, **7**(11): 13251-13259
- [29] Zhu M, Chen J, Lin Y. Exploring chemical space and structural diversity of supramolecular peptide materials. *Supramol Mater*, 2023, **2**: 100030
- [30] Reginald S S, Lee H, Fazil N, *et al.* Control of carbon monoxide dehydrogenase orientation by site-specific immobilization

- enables direct electrical contact between enzyme cofactor and solid surface. *Commun Biol*, 2022, **5**(1): 390
- [31] Braun R, Sarikaya M, Schulten K. Genetically engineered gold-binding polypeptides: structure prediction and molecular dynamics. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2002, **13**(7): 747-757
- [32] Braz B A, Hospinal-Santiani M, Martins G, *et al.* Gold-binding peptide as a selective layer for electrochemical detection of SARS-CoV-2 antibodies. *Talanta*, 2023, **257**: 124348
- [33] Lee H, Lee Y S, Reginald S S, *et al.* Biosensing and electrochemical properties of flavin adenine dinucleotide (FAD)-Dependent glucose dehydrogenase (GDH) fused to a gold binding peptide. *Biosens Bioelectron*, 2020, **165**: 112427
- [34] Laraba S R, Luo W, Rezzoug A, *et al.* Graphene-based composites for biomedical applications. *Green Chem Lett Rev*, 2022, **15**(3): 724-748.
- [35] Bagyalakshmi S, Sivakami A, Pal K, *et al.* Manufacturing of electrochemical sensors via carbon nanomaterials novel applications: a systematic review. *J Nanopart Res*, 2022, **24**(10): 201
- [36] Bansal R. Probing The Binding Mechanism of a Solid-binding Peptide [D]. New South Wales :Macquarie University, 2022
- [37] So C R, Hayamizu Y, Yazici H, *et al.* Controlling self-assembly of engineered peptides on graphite by rational mutation. *ACS Nano*, 2012, **6**(2): 1648-1656
- [38] Kim S N, Kuang Z, Slocik J M, *et al.* Preferential binding of peptides to graphene edges and planes. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(37): 14480-14483
- [39] Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 1991, **354**: 56-58
- [40] Wang S, Humphreys E S, Chung S Y, *et al.* Peptides with selective affinity for carbon nanotubes. *Nat Mater*, 2003, **2**(3): 196-200
- [41] Xie H, Becraft E J, Baughman R H, *et al.* Ranking the affinity of aromatic residues for carbon nanotubes by using designed surfactant peptides. *J Pept Sci*, 2008, **14**(2): 139-151
- [42] Sakamoto H, Futamura R, Tonooka A, *et al.* Biocathode design with highly-oriented immobilization of multi-copper oxidase from *Pyrobaculum aerophilum* onto a single-walled carbon nanotube surface via a carbon nanotube-binding peptide. *Biotechnol Prog*, 2021, **37**(1): e3087
- [43] Jones H V, Joiner S K, Ojo I A, *et al.* Bifunctional peptide-assisted synthesis of magnetic carbon nanotubes for toluidine blue dye remediation in aqueous conditions. *ChemNanoMat*, 2023, **9**(1): e202200392
- [44] McWilliams A D S, Martínez-Jiménez C, Shumard K R, *et al.* Dispersion and individualization of boron nitride nanotubes. *J Mater Res*, 2022, **37**(24): 4459-4482
- [45] Tomásio S M, Walsh T R. Modeling the binding affinity of peptides for graphitic surfaces. influences of aromatic content and interfacial shape. *J Phys Chem C*, 2009, **113**(20): 8778-8785
- [46] de Miranda T S. Modelling of The Interaction Between Peptides and Graphitic Surfaces[D]. Coventry, West Midlands, UK: University of Warwick, 2010
- [47] Li Z, Uzawa T, Tanaka T, *et al.* *In vitro* selection of peptide aptamers with affinity to single-wall carbon nanotubes using a ribosome display. *Biotechnol Lett*, 2013, **35**: 39-45
- [48] Li Z, Kameda T, Isoshima T, *et al.* Solubilization of single-walled carbon nanotubes using a peptide aptamer in water below the critical micelle concentration. *Langmuir*, 2015, **31**(11): 3482-3488
- [49] Sahu I, Chakraborty P. A repertoire of nanoengineered short peptide-based hydrogels and their applications in biotechnology. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2024, **233**: 113654
- [50] Yang S. Stimuli-Responsive Peptide Self-Assembly for Therapeutic Delivery[D]. Texas: The University of Texas at Arlington, 2022
- [51] Keefe A J, Caldwell K B, Nowinski A K, *et al.* Screening nonspecific interactions of peptides without background interference. *Biomaterials*, 2013, **34**(8): 1871-1877
- [52] Tao F, Han Q, Yang P. Interface-mediated protein aggregation. *Chem Commun*, 2023, **59**(95): 14093-14109
- [53] Bansal R, Care A, Lord M S, *et al.* Experimental and theoretical tools to elucidate the binding mechanisms of solid-binding peptides. *N Biotechnol*, 2019, **52**: 9-18
- [54] Liu B, He P, Kong H, *et al.* Peptide-induced synthesis of graphene-supported Au/Pt bimetallic nanoparticles for electrochemical biosensor application. *Macromol Mater Eng*, 2022, **307**(5): 2100886
- [55] Braz B A, Hospinal-Santiani M, Martins G, *et al.* Graphene-binding peptide in fusion with SARS-CoV-2 antigen for electrochemical immunosensor construction. *Biosensors*, 2022, **12**(10): 885
- [56] Jin R, Brljak N, Slocik J M, *et al.* Graphene exfoliation using multidomain peptides. *J Mater Chem B*, 2024, **12**(20): 4824-4832
- [57] Forte G, Mendola D L, Satriano C. The hybrid nano-biointerface between proteins/peptides and two-dimensional nanomaterials. *Molecules*, 2023, **28**(20): 7064
- [58] Lu C H, Li J, Zhang X L, *et al.* General approach for monitoring peptide-protein interactions based on graphene-peptide complex. *Anal Chem*, 2011, **83**(19): 7276-7282
- [59] Wang E, Desai M S, Lee S W. Light-controlled graphene-elastin composite hydrogel actuators. *Nano Lett*, 2013, **13**(6): 2826-2830
- [60] Li Q, Liu L, Zhang S, *et al.* Modulating  $\alpha\beta 33-42$  peptide assembly by graphene oxide. *Chemistry*, 2014, **20**(24): 7236-7240
- [61] Adhikari B, Banerjee A. Short peptide based hydrogels: incorporation of graphene into the hydrogel. *Soft Matter*, 2011, **7**(19): 9259-9266
- [62] Adhikari B, Nanda J, Banerjee A. Pyrene-containing peptide-based fluorescent organogels: inclusion of graphene into the organogel. *Chemistry*, 2011, **17**(41): 11488-11496
- [63] Li Y, Zhang W, Zhang L, *et al.* Sequence-designed peptide nanofibers bridged conjugation of graphene quantum dots with graphene oxide for high performance electrochemical hydrogen peroxide biosensor. *Adv Mater Interfaces*, 2017, **4**(3): 1600895
- [64] Wang J, Zhao X, Li J, *et al.* Electrostatic assembly of peptide nanofiber-biomimetic silver nanowires onto graphene for electrochemical sensors. *ACS Macro Lett*, 2014, **3**(6): 529-533
- [65] Su Z, Shen H, Wang H, *et al.* Motif-designed peptide nanofibers

- decorated with graphene quantum dots for simultaneous targeting and imaging of tumor cells. *Adv Funct Materials*, 2015, **25**(34): 5472-5478
- [66] Liu Y, Wang P, Tian J, *et al.* Carbohydrate-binding modules of potential resources: occurrence in nature, function, and application in fiber recognition and treatment. *Polymers*, 2022, **14**(9): 1806
- [67] Shi Q, Abdel-Hamid A M, Sun Z, *et al.* Carbohydrate-binding modules facilitate the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: releasing reducing sugars and dissociative lignin available for producing biofuels and chemicals. *Biotechnol Adv*, 2023, **65**: 108126
- [68] You Y, Kong H, Li C, *et al.* Carbohydrate binding modules: Compact yet potent accessories in the specific substrate binding and performance evolution of carbohydrate-active enzymes. *Biotechnol Adv*, 2024, **73**: 108365
- [69] 张振宇, 公维丽, 马耀宏, 等. CAZy-AA3 家族酶及其在生物传感器中的应用研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(7): 1192-1207  
Zhang Z Y, Gong W L, Ma Y H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(7): 1192-1207
- [70] Gong W, Han Q, Chen Y, *et al.* A glucose biosensor based on glucose oxidase fused to a carbohydrate binding module family 2 tag that specifically binds to the cellulose-modified electrode. *Enzyme Microb Technol*, 2021, **150**: 109869
- [71] Han Q, Gong W, Zhang Z, *et al.* Orientated immobilization of FAD-dependent glucose dehydrogenase on electrode by carbohydrate-binding module fusion for efficient glucose assay. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(11): 5529
- [72] Georgelis N, Yennawar N H, Cosgrove D J. Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-a cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(37): 14830-14835
- [73] Notenboom V, Boraston A B, Chiu P, *et al.* Recognition of cello-oligosaccharides by a family 17 carbohydrate-binding module: an X-ray crystallographic, thermodynamic and mutagenic study 1 1 Edited by R. Huber. *J Mol Biol*, 2001, **314**(4): 797-806
- [74] Krska D, Mazurkewich S, Brown H A, *et al.* Structural and functional analysis of a multimodular hyperthermostable xylanase-glucuronoyl esterase from *Caldicellulosiruptor kristjansonii*. *Biochemistry*, 2021, **60**(27): 2206-2220
- [75] de Castro M A G, Rammner B, Opazo F. Aptamer stainings for super-resolution microscopy. //Günter M. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2016: 197-210
- [76] Zon G. Recent advances in aptamer applications for analytical biochemistry. *Anal Biochem*, 2022, **644**: 113894
- [77] Song P, Fan C. Selecting aptamers with programmed affinities. *Nat Chem*, 2023, **15**(6): 747-748
- [78] Ge Z, Fu J, Liu M, *et al.* Constructing submonolayer DNA origami scaffold on gold electrode for wiring of redox enzymatic cascade pathways. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, **11**(15): 13881-13887
- [79] Rodrigues R C, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, *et al.* Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem Soc Rev*, 2013, **42**(15): 6290-6307
- [80] Bolivar J M, Eisl I, Nidetzky B. Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts. *Catal Today*, 2016, **259**: 66-80
- [81] Gutierrez-Sanchez C, Ciaccavava A, Blanchard P Y, *et al.* Efficiency of enzymatic O-2 reduction by myrothecium verrucaria bilirubin oxidase probed by surface plasmon resonance, PMIRRAS, and electrochemistry. *ACS Catal*, 2016, **6**(8): 5482-5492
- [82] Shen L, Ulrich N W, Mello C M, *et al.* Determination of conformation and orientation of immobilized peptides and proteins at buried interfaces. *Chem Phys Lett*, 2015, **619**: 247-255
- [83] Gutiérrez-Sánchez C, Olea D, Marques M, *et al.* Oriented immobilization of a membrane-bound hydrogenase onto an electrode for direct electron transfer. *Langmuir*, 2011, **27**(10): 6449-6457
- [84] Huang R, Yi P, Tang Y. Probing the interactions of organic molecules, nanomaterials, and microbes with solid surfaces using quartz crystal microbalances: methodology, advantages, and limitations. *Environ Sci Process Impacts*, 2017, **19**(6): 793-811
- [85] Alanazi N, Almutairi M, Alodhayb A N. A review of quartz crystal microbalance for chemical and biological sensing applications. *Sens Imaging*, 2023, **24**(1): 10
- [86] Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not?. *J Control Release*, 2016, **235**: 337-351
- [87] Nguyen-Tri P, Ghassemi P, Carriere P, *et al.* Recent applications of advanced atomic force microscopy in polymer science: a review. *Polymers*, 2020, **12**(5): 1142
- [88] Lou Z, Zhang Y, Li Y, *et al.* Study on microscopic physical and chemical properties of biomass materials by AFM. *J Mater Res Technol*, 2023, **24**: 10005-10026
- [89] Sabu T, Raju T, Ajesh K Z, *et al.* Spectroscopic methods for nanomaterials characterization, Volume Two//Dutta A. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Chapter 4, Micro and Nano Technologies*. Amsterdam: Elsevier, 2017: 73-93
- [90] Yang K, Bai S, Sun Y. Protein adsorption dynamics in cation-exchange chromatography quantitatively studied by confocal laser scanning microscopy. *Chem Eng Sci*, 2008, **63**(16): 4045-4054
- [91] 贾志宏, 丁立鹏, 陈厚文. 高分辨扫描透射电子显微镜原理及其应用. *物理*, 2015, **44**(7): 446-452  
Jia Z H, Ding L P, Chen H W. *Physics*, 2015, **44**(7): 446-452
- [92] Ravindran N, Kumar S, Yashini M, *et al.* Recent advances in Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensors for food analysis: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2023, **63**(8): 1055-1077
- [93] Sriwong K T, Matsuda T. Recent advances in enzyme immobilization utilizing nanotechnology for biocatalysis. *Org Process Res Dev*, 2022, **26**(7): 1857-1877
- [94] Mirsalami S M, Mirsalami M, Ghodousian A. Techniques for immobilizing enzymes to create durable and effective biocatalysts. *Results Chem*, 2024, **7**: 101486

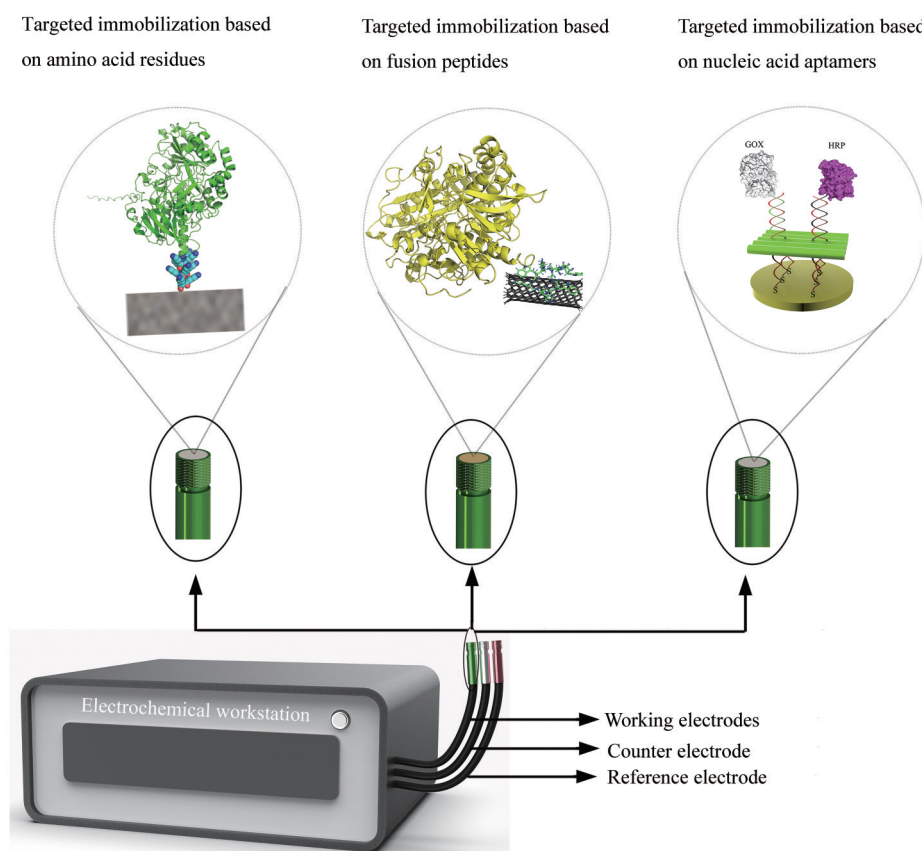
## Enzyme-directed Immobilization Strategies for Biosensor Applications\*

WANG Xing-Bao<sup>1,2)</sup>, MA Yao-Hong<sup>1,2)</sup>, XUE Yun-Long<sup>1,2)</sup>, HUANG Xiao-Zhen<sup>1,2)</sup>, SHAO Yue<sup>1,2)</sup>,  
YU Yi<sup>1,2)</sup>, WANG Bing-Lian<sup>1,2)</sup>, LIU Qing-Ai<sup>1,2)</sup>, ZHANG Li-He<sup>1,2)</sup>, GONG Wei-Li<sup>1,2)</sup>\*\*

<sup>(1)</sup>Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China;

<sup>(2)</sup>Key Laboratory of Biosensors of Shandong Province, Jinan 250103, China)

### Graphical abstract



**Abstract** Immobilized enzyme-based enzyme electrode biosensors, characterized by high sensitivity and efficiency, strong specificity, and compact size, demonstrate broad application prospects in life science research, disease diagnosis and monitoring, *etc.* Immobilization of enzyme is a critical step in determining the performance

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32101222), the National Key R&D Program of China (2021YFB3201200, 2021YFB3201203), and Key Innovation Project of Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences) (2022JBZ01-06).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-15264110812, E-mail: 15264110812@163.com

Received: June 17, 2024 Accepted: August 27, 2024

(stability, sensitivity, and reproducibility) of the biosensors. Random immobilization (physical adsorption, covalent cross-linking, *etc.*) can easily bring about problems, such as decreased enzyme activity and relatively unstable immobilization. Whereas, directional immobilization utilizing amino acid residue mutation, affinity peptide fusion, or nucleotide-specific binding to restrict the orientation of the enzymes provides new possibilities to solve the problems caused by random immobilization. In this paper, the principles, advantages and disadvantages and the application progress of enzyme electrode biosensors of different directional immobilization strategies for enzyme molecular sensing elements by specific amino acids (lysine, histidine, cysteine, unnatural amino acid) with functional groups introduced based on site-specific mutation, affinity peptides (gold binding peptides, carbon binding peptides, carbohydrate binding domains) fused through genetic engineering, and specific binding between nucleotides and target enzymes (proteins) were reviewed, and the application fields, advantages and limitations of various immobilized enzyme interface characterization techniques were discussed, hoping to provide theoretical and technical guidance for the creation of high-performance enzyme sensing elements and the manufacture of enzyme electrode sensors.

**Key words** enzyme immobilization, enzyme electrode, biosensor, spatial orientation of enzyme molecules

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0256

**CSTR:** 32369.14.pibb.20240256