

电位控制血红蛋白(Hb)组装制备无媒介体过氧化氢生物传感器

谢轶¹, 袁若², 柴雅琴² (1. 中国热带农业科学院分析测试中心, 海南海口 571101; 2. 西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

摘要 通过电位控制的方法将血红蛋白 Hb 固定在由 L-半胱氨酸自组装修饰的金电极上制得过氧化氢传感器 Hb/L-cys/Au, 并通过电化学方法(CV)、原子力显微镜(AFM)等手段对电极的修饰过程进行了表征。试验显示, 该传感器对 H₂O₂ 催化还原性能优良、灵敏度高、稳定性好且非常易于制备。电极在(pH 值 5.5) 0.1 mol/L PBS 中对 H₂O₂ 催化还原响应良好, 线性可分为 2 段, 低浓度段为 $8.21 \times 10^{-8} \sim 4.83 \times 10^{-6}$ mol/L, 高浓度段为 $4.83 \times 10^{-6} \sim 8.22 \times 10^{-3}$ mol/L, 检测限为 8.24×10^{-9} mol/L。

关键词 生物传感器; 辣根过氧化物酶; 血红蛋白

中图分类号 Q946.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)33-16721-04

Preparation of Hydrogen Peroxide Biosensor without Intermedium by Electric Potential Controlling of Hb

XIE Yi et al (Analysis and Testing Center, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101)

Abstract Hemoglobin was immobilized on L-cysteine modified gold electrode by using the method of electric potential controlling to develop a new hydrogen peroxide biosensor Hb/L-cys/Au. The modified process of electrode was characterized by the means of CV and AFM. The results showed that the sensor had excellent catalysed reduction performance to H₂O₂, high sensitivity and good stability. And it was easy to be produced. This electrode presented an excellent electrochemical response for the determination of H₂O₂ concentration with high sensitivity in 0.1 mol/L PBS (pH value of 5.5). The linear scope could be divided into 2 sections of concentration section ($8.21 \times 10^{-8} - 4.83 \times 10^{-6}$ mol/L) and low concentration section ($4.83 \times 10^{-6} - 8.22 \times 10^{-3}$ mol/L). The detection limit was 8.24×10^{-9} mol/L.

Key words Biosensor; Horseradish peroxidase; Hemoglobin

蛋白质组装的方法主要有包埋法^[1-3]、静电吸附层层组装法^[4]、反束胶固定化法^[5]、交联法^[6]和表面旋涂法^[7]等。其中蛋白质自组装单层膜由于其改变电极的响应, 成为研究的热点。然而该方法经酶的修饰后降低了酶的活性且不能控制蛋白的组装量。在电化学研究中, 常用电位富集电极表面的待测分子, 以提高检测的灵敏度^[8-9]。利用电位控制带电分子的吸附也有报道, Yin 等在蛋白组装时引入电场增强人血清白蛋白(HAS)在聚砜微滤膜上的吸附^[10], Zapien 等曾用电场控制铁蛋白在巯基丙酸上吸附, 研究施加电位对蛋白的影响^[11]。葛存旺等以辣根过氧化物酶(HRP)为模型蛋白质, 系统研究了电位控制蛋白质分子的组装^[12], 从中得出结论: 控制电位不会改变酶的活性。

HRP 是含糖 18% 的蛋白糖, 铁卟啉是酶的活性基团^[13], HRP 分子中与酶活性无关的糖基可自氧化成带醛基的产物。自氧化过程与醛基和氨基的连接机理已由 Beswick 等^[14]和 Wolff 等^[15]详细研究过。血红蛋白(Hb)属天然大分子蛋白质, 分子量约为 67 000 g/mol, 结构如图 1。它有 4 个血红素亚基 hemo, 每个血红素亚基都有 1 个氧结合部位, Hb 与 HRP 的电活性中心是一致的^[16]。在过氧化氢存在时 Hb 可以呈现酶的活性, 且与 HRP 相比, Hb 便宜并且在溶液中更稳定^[17], 因此它被用作 HRP 的替代酶构建过氧化氢生物传感器。试验中用到的 Hb 已存放一定时间, 糖链中存在一定的醛基, 蛋白链中的羧基与糖链中的醛基分别与 L-cys 上的氨基发生静电结合和生成 Schiff 碱的反应。

笔者利用上述原理制备了过程简便、性能良好的过氧化氢生物传感器。首先, 在金表面自组装 L-半胱氨酸(L-cys)单分子层(SAMs), L-半胱氨酸溶液酸度为 pH 值 5.0。利用电位控制方法在 SAMs 上组装 Hb, 利用原子力显微镜(AFM)表征电位控制 Hb 修饰电极的过程。图 2 为电位控制

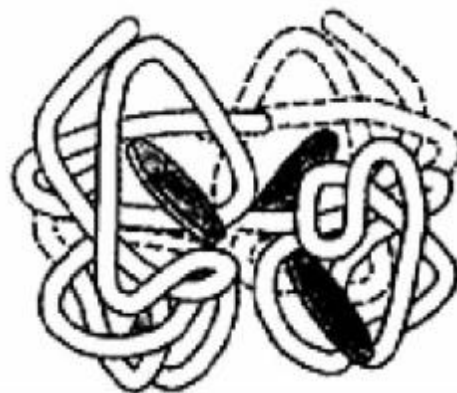


图 1 血红蛋白分子的三维结构

Fig.1 The three-dimensional structure of Hb

Hb 组装过程的示意图。

1 材料与实验方法

1.1 仪器与试剂 主要仪器: CHI 600 B 电化学工作站(上海辰华仪器公司), IM6e 交流阻抗仪(ZAHNER elektronik, 德国), 原子力显微镜(AFM)(Veeco, USA), CS 501-SP 型超级数显恒温器(重庆四达实验仪器厂), BRANSONIC200 超声清洗仪(德国), AB203-S 电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。主要试剂: 血红蛋白(Hb, 购于 Sigma, 用 pH 值 7.4, 0.01 mol/L PBS 配成 10 mg/ml), L-半胱氨酸(0.02 mol/L, 用 pH 值 5.0 的 HAc-NaAc 缓冲溶液配制), H₂O₂ (30% 水溶液); 其余试剂为分析纯, 试验用水均为二次蒸馏水。H₂O₂ 标准储备溶液放置过夜后使用, 保存于 4 °C 冰箱中。

1.2 Hb 在 L-半胱氨酸修饰金电极上的电位控制组装 将直径为 4 mm 的金电极作为基础电极, 用金相砂纸将其抛光再在绸布上分别用 3.0 和 0.3 μm 的 Al₂O₃ 进行打磨。打磨好的电极浸入 Piranha 溶液(7:3 的浓 H₂SO₄ 和 30% H₂O₂ 的混合溶液)中 5 min, 取出经二次蒸馏水洗净后分别在乙醇、二次水中各超声 5 min。将处理好的金电极放入 0.5 mol/L 的 H₂SO₄ 溶液中, 于 -0.3 ~ 1.5 V 循环伏安扫描直至电极稳定, 可得到稳定的循环伏安曲线^[8]。

作者简介 谢轶(1981-), 女, 山东烟台人, 硕士, 研究实习员, 从事生物传感器方面的研究。

收稿日期 2009-10-15

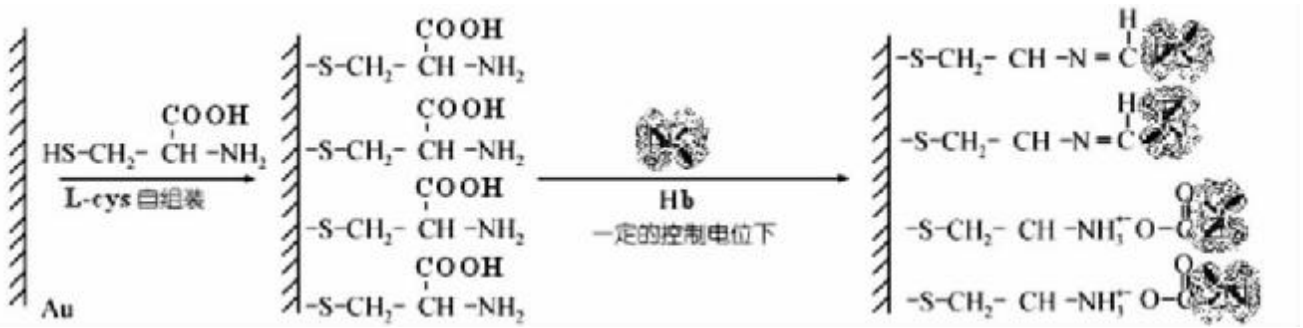


图2 电位控制 Hb 组装的步骤

Fig.2 The process of immobilizing hemoglobin by electric potential controlling

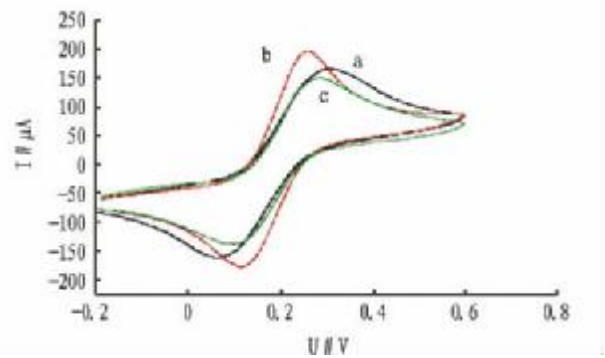
工作电极制备方法: 将处理过的金电极浸入含 0.02 mol/L L-半胱氨酸(L-cys)的 PBS 缓冲溶液(pH 值 5.0)中, 自组装 6 h, 取出用大量水淋洗电极表面^[6], 除去因物理吸附的 L-cys 分子, 在空气中晾干。然后, 将电极浸入含有 10 mg/ml Hb 的电解池中(pH 值 7.4), 控制在恒定电位 0.2 mV 保持 30 min, 取出并用水清洗电极表面, 自然晾干后即可得到控制电位组装的 Hb 修饰电极。Hb 的等电点为 7.4, 在恒电位控制模式下, 流经电极的总电荷接近零时 HRP 的组装量较大^[12]。该试验所用 Hb 为用 PBS 配制成 pH 值 7.4 的溶液。

1.3 检测方法 采用三电极检测装置: 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为对电极, Hb/L-cys/Au 电极为工作电极。测试底液为 5 ml pH 值 5.5、浓度为 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液 (KH₂PO₄-Na₂HPO₄, 含 0.1 mol/L KCl 作为支持电解质); 在室温条件下计时电流测试时, 测试时间为 30 s/次。在电磁搅拌下, 每隔 30 s 加入一定浓度的过氧化氢到测试底液中, 记录时间-电流曲线, 根据电流响应值与对应浓度的过氧化氢成正比的关系进行定量测定。电极不使用时, 于 4 °C 下将其置于 pH 值 7.0 的磷酸缓冲液上方贮存。

2 结果与分析

2.1 Hb/L-cys/Au 电极的循环伏安行为 图 3 为电极在铁氰化钾 (ferrocyanide/ferricyanide) 溶液中的循环伏安表征。由图 3 可见, 随着修饰过程的进行, 峰电流随之改变, 这个结果说明 L-cys 和 Hb/L-cys 分别固定到了 Au 和 L-cys/Au 电极上。L-cys/Au 电极的峰电流比裸金电极峰电流高说明 L-cys 自组装到电极上增强了电极的导电性, 而 Hb/L-cys/Au 电极峰电流低于 L-cys/Au 电极和裸金电极峰电流, 可能是

由 Hb 固定到电极上造成空间阻力太大, 阻碍了电子的传输。



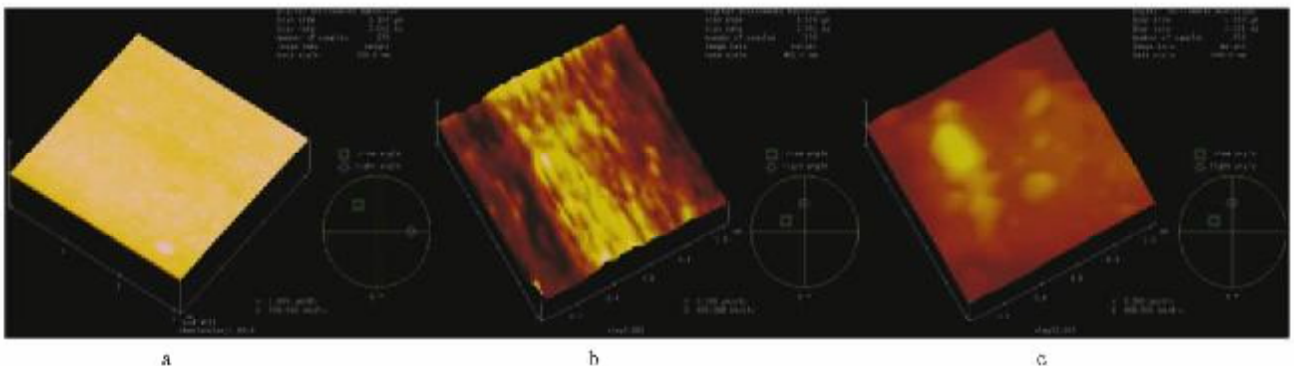
注: a. 裸金电极 (Au); b. 自组装了 L-cys 的电极 (L-cys/Au); c. 修饰了 Hb 的电极 (Hb/L-cys/Au)。扫速为 100 mV/s。

Note: a, Bare Au electrode; b, The electrode with self-assembly L-cys (L-cys/Au); c, The electrode with modified Hb (Hb/L-cys/Au). The sweep speed is 100 mV/s.

图3 电极制备过程中的循环伏安图

Fig.3 Cyclic voltammogram in the preparation process of electrode

2.2 电极制备过程的原子力显微镜表征 图 4 为电极修饰过程中的 AFM 形貌图。图 4 表明, 裸金电极表面非常光滑; 自组装了 L-cys 的金电极, 可以看到电极表面被一层均匀且粗糙的物质覆盖, 可定性判断半胱氨酸已经通过 HS-基结合到金电极表面; 电位控制 Hb 制得的 Hb/L-cys/Au 电极, 形貌较自组装了 L-cys 的金电极发生了很大的变化, 电极表面较为均匀且细致, 推测是电位控制下 Hb 均匀沉积到了 L-cys/Au 电极表面所致。



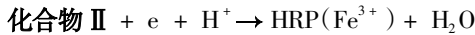
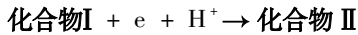
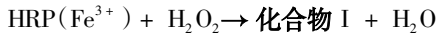
注: a. 裸金电极; b. L-cys/Au 电极; c. Hb/L-cys/Au 电极。

Note: a, Bare Au electrode; b, L-cys/Au electrode; c, Hb/L-cys/Au electrode.

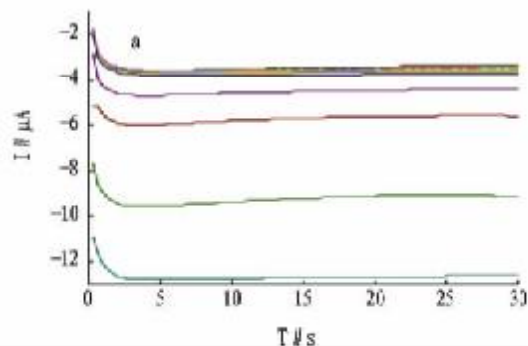
图4 电极制备过程中原子力显微镜表征图

Fig.4 The atomic force microscopic characteristics in the preparation process of electrode

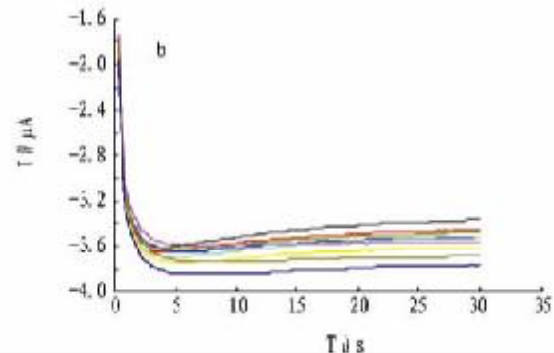
2.3 Hb/L-cys/Au 电极对过氧化氢的催化还原 HRP 对过氧化氢的还原原理为:



其中化合物 I (氧化价态 +5) 和 II (氧化价态 +4) 分别代表 HRP 的中间产物; 化合物 I 被还原为化合物 II, 再由化合物 II 变成 HRP(Fe^{3+}) 形式。化合物 II 比化合物 I 更稳定, 所以化合物 II 还原为 HRP 的过程是慢应。因此可知, 试验中化合物 II 还原过程是单电子还原过程。



由于 Hb 与 HRP 的电活性中心是一致的^[16], 并且血红蛋白(Hb)中的亚铁血红素结合氧后会使得 Hb 结构更加稳定。所以笔者推测, Hb/L-cys/Au 电极也能催化还原过氧化氢。图 5 是电极对过氧化氢的催化还原电流-时间曲线, 向 5 ml pH 值为 5.5 的 PBS 底液中加入不同浓度的 H_2O_2 , 由图 5 可以看到, H_2O_2 的浓度范围非常宽, 为查看方便起见, 用 a、b 2 张图来说明。图 5a 是电极对过氧化氢产生响应的全部浓度范围 ($8.24 \times 10^{-9} \sim 8.22 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$), 图 5b 是将低浓度段 ($8.24 \times 10^{-9} \sim 4.94 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) 放大的电流-时间曲线。



注: a. H_2O_2 浓度 $8.24 \times 10^{-9} \sim 8.22 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; b. H_2O_2 浓度 $8.24 \times 10^{-9} \sim 4.94 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。

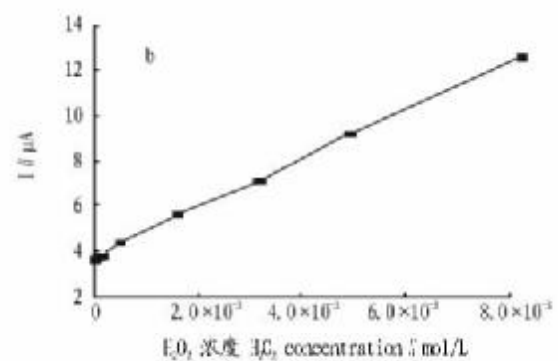
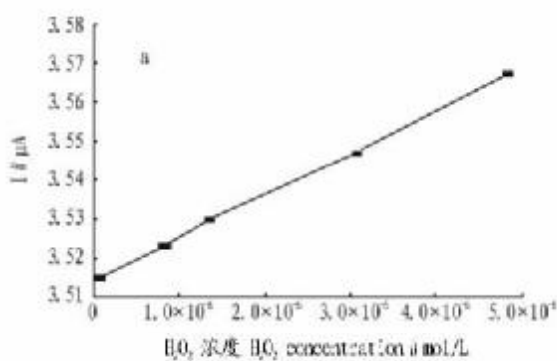
Note: a, H_2O_2 concentration of $8.24 \times 10^{-9} \sim 8.22 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; b, $8.24 \times 10^{-9} \sim 4.94 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。

图 5 电极在不同过氧化氢浓度下的响应时间-电流曲线

Fig.5 The response time-current curve of the electrode under different concentrations of H_2O_2

图 6 是工作电极对 H_2O_2 催化还原的线性曲线。经计算做图发现, 电极在催化还原 H_2O_2 的整个浓度范围内, 浓度-电流曲线呈现 2 段线性。图 6a 为电极对 H_2O_2 响应的低浓度段 ($8.21 \times 10^{-8} \sim 4.83 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$), 图 6b 是高浓度段

($4.83 \times 10^{-6} \sim 8.22 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$), 检测限为 $8.24 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 。a、b 2 条曲线的线性方程分别为: 低浓度 a: $y = 1084.8x + 3.5143, R = 0.9995$; 高浓度 b: $y = 1100.6x + 3.6663, R = 0.9993$ 。



注: a. H_2O_2 浓度为 $8.21 \times 10^{-8} \sim 4.83 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; b. H_2O_2 浓度为 $4.83 \times 10^{-6} \sim 8.22 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。

Note: a, H_2O_2 concentration of $8.21 \times 10^{-8} \sim 4.83 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; b, H_2O_2 concentration of $4.83 \times 10^{-6} \sim 8.22 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。

图 6 工作电极对 H_2O_2 催化还原的线性曲线

Fig.6 The linear curve of the catalysed reduction of working electrode to H_2O_2

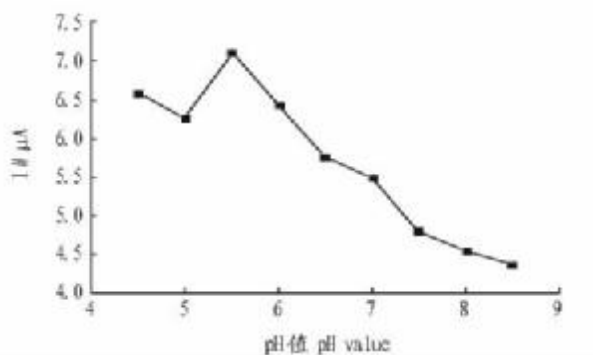
2.4 试验条件的优化 在该试验中, 笔者对测试底液的 pH 值、工作电位和温度进行了优化。图 7 为不同 pH 值下电极对 $3.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ H_2O_2 的还原电流。由图 7 可以看出, pH 值 5.5 时还原电流最大。图 8 为 pH 值 5.5 时, 工作电位与响应电流的关系曲线。还原电流随着电位的减小先减后增。综合考虑, 笔者选用的底液 pH 值为 5.5, 工作电位为 0.5 V。

除了 pH 值和电位, 笔者还考虑了温度的影响。试验中还原电流随温度升高达到最大值 40°C , 说明 Hb 的活性随温度升高而增强, 但考虑到电极寿命, 笔者仍采用常温 25°C 。

2.5 干扰物质的影响 试验研究了乙醇、乙酸、抗坏血酸、赖氨酸对该生物传感器响应的的影响, 当 H_2O_2 的浓度为 $2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时, 5 倍浓度的抗坏血酸和尿酸的存在对响应电流基本没有影响, 可见该生物传感器能有效抵抗抗坏血酸等还原性物质的干扰。

3 结论

利用控制电位的方法将 Hb 大量聚集到电极表面, 制得的电极方法简单、周期短、成本低, 检测限也非常低。但这种方法的可行性和机理问题还有待进一步研究, 该方法可能会

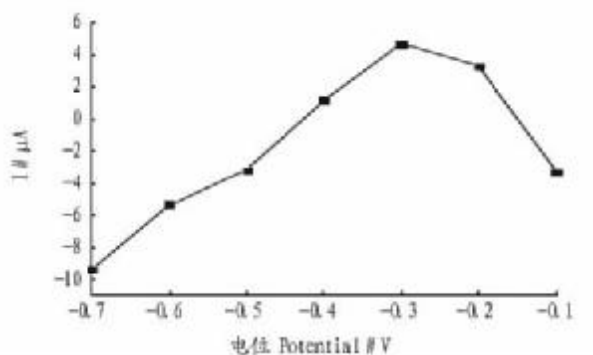


注:扫速 100 mV/s,工作电位 -0.5 V。

Note: The sweep speed is 100 mV/s and the working potential is -0.5 V.

图7 修饰电极在 3.5×10^{-4} mol/L H_2O_2 溶液中响应电流随 pH 值的变化曲线

Fig. 7 The changes of the response current of the modification electrode in 3.5×10^{-4} mol/L H_2O_2



注:溶液为 0.1 mol/L pH 值 5.5 的 PBS 溶液, H_2O_2 浓度为 3.5×10^{-4} mol/L。

Note: The solution is 0.1 mol/L PBS (pH of 5.5) and H_2O_2 concentration is 3.5×10^{-4} mol/L.

图8 所选工作电位对响应电流的影响

Fig. 8 Influence of applied working potential on the response current

为生物传感器的发展作出贡献。

参考文献

- [1] LIU Y, LIU H, DENG J, et al. Feature of an amperometric ferrocyanide mediating HO sensor for organic-phase assay based on regenerated silk fibroin as immobilization matrix for peroxidase [J]. *Electrochim Acta*, 1996, 41 (1): 77-82.
- [2] 姜弘海, 邹汉法, 汪海林, 等. 固定化酶微升反应器与 MALDI-TOF MS 联用技术用于蛋白质肽谱研究 [J]. *中国科学: B 辑*, 2000, 30 (5): 385-391.
- [3] XU J, DONG H, FENG Q, et al. Immobilization and activity assay of horseradish peroxidase in mesoporous silica sol-gel materials [J]. *Polym Prepr*, 2000, 41 (1): 1042-1043.
- [4] 李美玲, 李宝芳, 江龙, 等. 聚电解质/菌紫质交替沉积膜两种定向方式及光致变色特性 [J]. *中国科学: B 辑*, 2000, 30 (3): 275-282.
- [5] 唐芳琼, 江龙. 传感器与反胶束和酶敏感膜 [J]. *中国科学: B 辑*, 2000, 30 (6): 514-518.
- [6] GOUDA M D, THAKUR M S, KAND KARANATH N G. Stability studies on immobilized glucose oxidase using an amperometric biosensor [J]. *Electroanalysis*, 2001, 13 (10): 849-855.
- [7] VICKIE PAN Y, HANEIN Y, LEACH-SCAMPAVIA D, et al. A precision technology for controlling protein adsorption and cell adhesion in Biomems [C]. Interlaken, Switzerland: The 14th IEEE International Conference on Micro Elector Systems, 2001.
- [8] WANG J, CAI X, RIVAS G, et al. Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes [J]. *Anal Chim Acta*, 1996, 326: 141-147.
- [9] WU L, ZHOU J, LUO J, et al. Oxidation and adsorption of deoxyribonucleic acid at highly ordered pyrolytic graphite electrode [J]. *Electrochimica Acta*, 2000, 45: 2923-2927.
- [10] YIN G, JANSON J C, LIU Z. Characterization of protein adsorption on membrane surface by enzyme linked immunoassay [J]. *Membrane Sci*, 2000, 178: 99-105.
- [11] ZAPIEN D C, JOHNSON M A. Direct electron transfer of ferritin adsorbed at bare gold electrodes [J]. *Electroanal Chem*, 2000, 494: 114-120.
- [12] 葛存旺, 虞伟, 李昌安, 等. 电位控制辣根过氧化物酶在金电极上的组装 [J]. *中国科学: B 辑*, 2003, 33 (5): 441-448.
- [13] 沈关心, 周汝麟. 现在免疫学实验技术 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 114.
- [14] BESWICK H T, HARDING J J. Aldehydes or dicarbonyls in non-enzymic glycosylation of proteins [J]. *Biochemical*, 1985, 226 (2): 385-389.
- [15] WOIFF S P, DEAN R T. Aldehydes and dicarbonyls in non-enzymic glycosylation of proteins [J]. *Biochemical*, 1988, 249 (2): 618-619.
- [16] YU J H, JU H X. Rometric biosensor for hydrogen peroxide based on hemoglobin entrapped in titania sol-gel film [J]. *Anal Chim Acta*, 2003, 486: 209-216.
- [17] KAFI M, FAN YIN, HOON-KYU SHIN, et al. Hydrogen peroxide biosensor based on DNA-Hb modified gold electrode [J]. *Thin Solid Films*, 2006, 499 (1/2): 420-424.