

血红蛋白在磷脂-月桂酸修饰的玻碳电极上的 电化学行为及其分析应用

金松子 王 韬 张春煦 沈含熙^{* *}

(南开大学化学学院 天津 300071)

摘要 报道了血红蛋白(Hb)在磷脂-月桂酸修饰的玻碳电极上的电化学行为,在+0.8~-0.7 V (vs. Ag/AgCl)电位范围内,于pH 6.0的0.01 mol/L的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 底液中,血红蛋白产生不可逆的还原电流峰.还原峰电流与血红蛋白浓度在 $1.25 \times 10^{-8} \sim 4.31 \times 10^{-7}$ mol/L范围内呈良好线性关系.该电极可作为检测血红蛋白的新型的高灵敏度电化学生物传感器.

关键词 血红蛋白,双层类脂膜,磷脂-月桂酸修饰的玻碳电极,静电吸附作用

Electrochemical Behavior of Hemoglobin at a Lipid-Lauric Acid Modified GC Electrode and Its Application to the Determination of Proteins

JIN, Song-Zi WANG, Tao ZHANG, Chun-Xu SHEN, Han-Xi^{*}

(Chemical School, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract The electrochemical behavior of hemoglobin at a lipid-lauric acid modified glassy carbon electrode (GC) is reported. In the potential range of +0.8~-0.7 V (vs. Ag/AgCl), an irreversible cathodic peak was observed at -0.4 V at the scan rate of 20 mV/s. In the medium of 0.01 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 6.0), the cathodic peak current shows linear relationship with the concentration of hemoglobin in the range of $1.25 \times 10^{-8} \sim 4.31 \times 10^{-7}$ mol/L. The electrode can be used as an approach for determining hemoglobin with high sensitivity.

Key words hemoglobin, bilayer lipid membranes, lipid-lauric acid modified glassy carbon electrode (GC), electrostatic adsorption

血红蛋白有约67000的相对分子质量,而且分子中含有四个电活性的铁血红素辅基^[1].它是由两个 α 和两个 β 亚单位组成的四聚体,每个亚单位各有一个血红素.尽管血红蛋白有电活性中心,但由于其分子空间结构庞大,电活性中心不容易暴露;另一方面因它在电极表面强烈吸附造成电极的钝化,因此它在电极上的电子转移速率很慢,得不到有效的电流响应.因此人们借助于电子媒介体来提高血红蛋白的电子传递速率^[2~8].

近年来,生物模拟膜体系被广泛应用于蛋白质的电化学行为研究.这种生物模拟膜模型有双层类脂膜(BLMs)^[9,10]、层状表面活性剂液晶态膜^[11,12]、Langmuir-Blodgett膜^[13]等. Bianco及其合作者^[14,15]在以自组装双层类脂修饰的热解石墨电极(PG)上获得了灵敏的细胞色素C、细胞色素C₃的电化学响应,显著提高了电极与蛋白质分子之间直接电子传递速率. Rusling等^[11,12]则在以层状液晶表面活性剂膜修饰的热解石墨电极(PG)上得到了血红蛋白、

* E-mail: hxshen@eyou.com

Received October 16, 2001; revised March 12, 2002; accepted April 18, 2002.

国家自然科学基金(No. 29875011)资助项目.

肌红蛋白、细胞色素 P450 的电化学响应. 这种在电极表面形成的自组装生物模拟膜体系为蛋白质提供了类似生物磷脂双层膜的微环境, 有利于蛋白质分子与电极之间的直接电子交换, 避免了蛋白质分子的变性. 过去人们采用 Langmuir-Blodgett 技术在玻碳电极表面上修饰双层类脂膜^[13], 但最近 Nikolelis 等^[16]的研究结果表明双层类脂膜在玻碳电极表面上也能自发形成, 但尚未见到应用自组装双层类脂膜修饰的玻碳电极测定血红蛋白的报道. 本文研究了在修饰天然卵磷脂 - 月桂酸膜的玻碳电极上, 血红蛋白的电化学行为及其作用机理. 此电极对血红蛋白响应灵敏, 检测限低, 受干扰少, 可应用于血红蛋白的测定.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

AXIP8219(B) 极谱分析仪 (江苏电分析仪器厂), 3036 型 X-Y 记录仪 (四川仪表四厂), PHS-2C 型酸度计 (雷磁仪器厂). 电化学测量采用三电极体系, 玻碳 (GC) 电极 4 mm (江苏电分析仪器厂), Pt 电极作为辅助电极, Ag/AgCl 为参比电极.

10^{-4} mol/L 的牛血红蛋白 (Hb) (上海生工生物工程技术服务公司) 溶液, 5 mg/mL 溶菌酶 (上海生工生物工程技术服务公司) 溶液, 大豆卵磷脂 (PC) (上海伯奥生物科技有限公司, 进口分装), 月桂酸 (LA) (天津化学试剂一厂, 分析纯), 胆固醇 (CH) (广州化学试剂公司). 缓冲溶液由 0.02 mol/L 的 KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 组成 (pH 5 ~ 8). 氯仿作为成膜液的溶剂, 其他试剂均为分析纯. 所有溶液均用重蒸去离子水配制. 生化试剂固体和溶液均在 5 °C 以下保存. 每次测定前支持电解液均用高纯氮除氧 20 min, 测定过程中溶液上面保持氮气氛. 实验均在 (25 ± 1) °C 下进行.

1.2 实验方法

成膜液的组成: 将 50 mg PC, 100 mg CH, 300 mg LA 溶于 10 mL 氯仿, 配制后充氮放入冰箱冷藏. 每次实验取 1 mL.

工作电极: 修饰前用研细的 Al_2O_3 粉末悬浮液把玻碳电极表面抛光至镜面, 然后用超声波清洗 30 min, 再用重蒸去离子水彻底清洗, 此为空白电极. 用微量注射器取 6 μL 的 (PC + CH + LA) 的成膜液均匀滴加在干燥的玻碳电极表面, 盖上玻璃罩待溶剂挥发, 工作电极修饰完毕.

支持电解液由 2 mL 的 pH 6.0 的缓冲溶液, 1.5

mL 的 0.1 mol/L 的 KCl 溶液, 0.5 mL 的重蒸去离子水混合而成.

将修饰磷脂的玻碳电极浸入通氮除氧后的电解液中, 约 30 min 后磷脂液晶层膜自发形成. 接通电极, 进行循环伏安扫描, 即可获得稳定的基线电流. 加入一定量的血红蛋白, 轻轻搅匀, 接通仪器再次扫描, 得到血红蛋白的还原峰电流, 峰电流大小与溶液中血红蛋白浓度成线性关系, 由此可以测定血红蛋白的浓度.

2 结果与讨论

2.1 磷脂修饰的 GC 电极上的血红蛋白的电化学行为

血红蛋白是目前研究较多的氧化还原蛋白质之一. 但在裸 PG^[12], GC^[6] 电极上, 观察不到它的氧化还原峰. 如图 1 所示, 血红蛋白在裸 GC 电极 (a) 上和 (PC + CH) 修饰膜电极 (b) 上均没有出现氧化还原峰. 而当玻碳电极被修饰以 (PC + CH + LA) 时, 如 (c), 血红蛋白在 -0.4 V (vs. Ag/AgCl) 附近出现了很灵敏的还原峰, 而且随着扫描次数的增加逐渐增高, 最后达到稳态. 这与在滴汞电极^[17]上所得到的

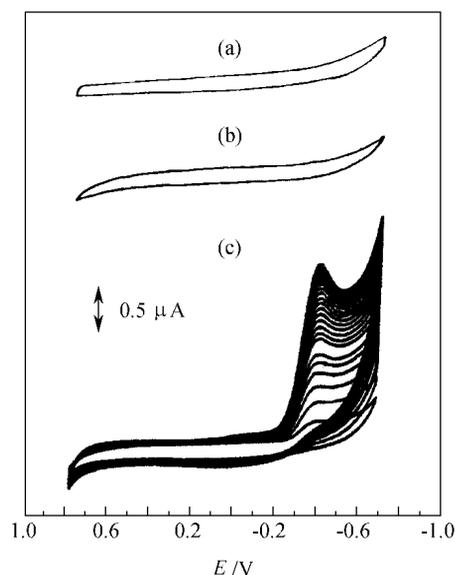


图 1 血红蛋白在 GC 电极上的循环伏安图

(a) 裸 GC 电极; (b) (PC + CH) 修饰的 GC 电极; (c) (PC + CH + LA) 修饰的 GC 电极

Figure 1 Repetitive cyclic voltammograms of hemoglobin in the bulk solution of pH 6.0, at the GC electrodes, $c_{\text{Hb}}: 3.8 \times 10^{-7}$ mol/L

(a) bare; (b) (PC + CH) modified; (c) (PC + CH + LA) modified. : 20 mV/s

-0.4 V (vs. SCE) 处的不可逆还原峰相吻合. 实验现象表明: (1) (PC+CH+LA) 修饰的 GC 电极促进血红蛋白的电子转移速率; (2) 血红蛋白与磷脂层相互结合. 这种对电子转移的促进作用和结合应归功于带正电荷的血红蛋白 (Hb 等电点为 6.7) 与带月桂酸阴离子的磷脂层之间的静电吸附作用.

为进一步证明血红蛋白与带月桂酸阴离子的磷脂层之间的静电吸附作用, 我们将电极浸入富含溶菌酶的溶液中. 溶菌酶是一种无氧化还原中心的蛋白质, 有很高的等电点 10.5 ~ 11, 在 pH 6.0 的支持电解液中, 它带有正电荷. 结果如图 2 所示, 血红蛋白的还原峰电流在溶菌酶的存在下降低了许多, 表明带正电荷的溶菌酶先静电吸附于磷脂层, 从而使血红蛋白在电极上的吸附量减少.

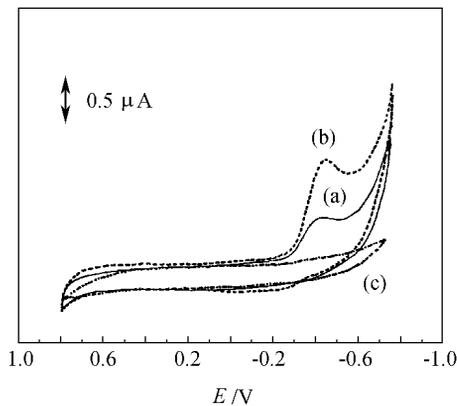


图 2 不同底液中血红蛋白在 (PC+CH+LA) 修饰的玻璃碳电极上的循环伏安图

(a) 含溶菌酶和血红蛋白; (b) 含血红蛋白; (c) 只含溶菌酶

Figure 2 Steady-state cyclic voltammograms of hemoglobin at the (PC+CH+LA) modified GC electrode

$c_{\text{Hb}}: 2.5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$. (a) in the presence of lysozyme; (b) in the absence of lysozyme; (c) lysozyme in the same solution. $\nu: 20 \text{ mV/s}$

为进一步了解电极反应过程, 考察了峰电流大小与扫描速率的关系. 图 3 表明, 当扫描速率为 10 ~ 100 mV/s 时, 血红蛋白的还原峰电流与扫描速率的平方根呈线性关系, 说明电极反应受扩散控制^[18].

2.2 成膜液的组成及其影响

成膜液中月桂酸的浓度直接影响血红蛋白的还原峰电流, 在 pH 6.0 的缓冲溶液中, 当 [CH]/[PC] 浓度比为 6 时, 阴极峰电流最大, 这就意味着该比例下的液晶态磷脂膜的导电性最好. 这可能与 (卵磷脂 + 胆固醇 + 月桂酸) 所形成的相结构有关.

在制备双层类脂膜成膜液时, 通常加入胆固醇来稳定双层类脂膜^[19]. 成膜液中不同浓度的胆固醇, 明显影响还原峰电流大小. 在成膜液中 [CH]/

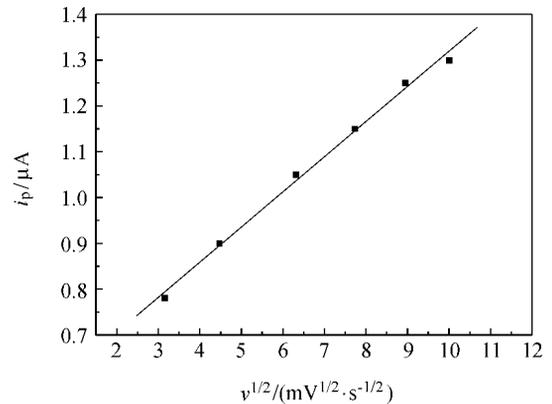


图 3 血红蛋白阴极峰电流与扫描速率平方根的关系曲线

Figure 3 Relationship between cathodic peak current of hemoglobin and square root of scan rate

[PC] 浓度比为 2 时, 血红蛋白的还原峰电流信号最大. 故我们选择卵磷脂 胆固醇 月桂酸浓度比为 5 10 30 (mg/mL) 的氯仿溶液作为电极的成膜液.

我们还考察了成膜液的不同滴加量对峰电流的影响, 结果发现当滴加量为 6 μL 时峰电流最大.

2.3 酸度的影响

如图 4 所示, 血红蛋白的还原峰电流在 pH 6.0 时最大. 溶液酸度对峰电流的影响应从两方面考虑: 一方面, 双层磷脂膜作为生物膜的基本结构, 构成这种双分子层结构主要靠的是磷脂分子中电离的磷酸头基之间及脂分子之间的氢键作用、静电作用、疏水作用及范德华作用力^[20]. 其中前两者是磷脂双层形成稳定相结构的主要作用力^[21]. 溶液酸度的改变直接影响磷脂分子之间的氢键作用和静电相互作用, 从而引起磷脂双分子层的液晶相结构的改变. 带有

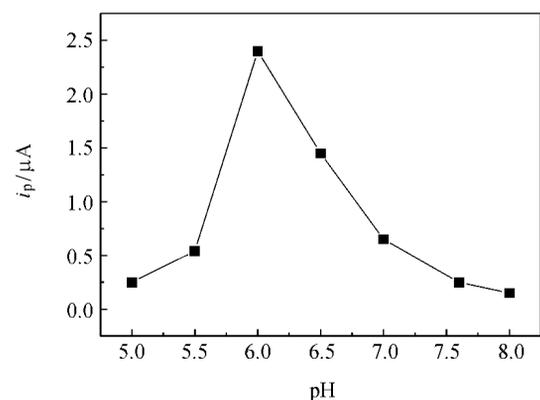


图 4 pH 对血红蛋白阴极峰电流的影响

Figure 4 Influence of pH on the cathodic peak current of hemoglobin

$c_{\text{Hb}}: 7.5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $\nu: 20 \text{ mV/s}$

阴离子位点的磷脂双层结构的稳定存在是双层脂膜作为良好导体的主要因素. 另一方面, pH 6.0 也是血红蛋白保持最佳生物活性的酸度^[22]. 以上两方面的因素决定了该修饰膜电极上获得血红蛋白的最大的阴极峰电流.

2.4 离子强度的影响

离子强度会改变磷脂双分子层表面电荷的分布, 影响磷脂膜分子间的静电相互作用, 从而影响双层磷脂的相结构^[21]. 实验表明, 当 KCl 的浓度约为 38 mmol/L 时, 阴极峰电流最大, 表明此时膜的相结构可能最有利于血红蛋白电极反应进行.

2.5 共存物质的影响

共存物质的干扰影响列在表 1 上. 从表中可看出, 大部分共存物质如常见氨基酸、碱基以及一些金属离子, 没有产生明显的干扰, 引起的误差都小于 6%. 还有大量血清白蛋白存在也不干扰血红蛋白的检测, 这可能是由于白蛋白分子(等电点为 4.6 ~ 4.7)带负电荷, 它和带有阴离子位点的磷脂膜之间不存在静电吸附作用. 实验表明, 其它金属离子的加入可引起溶液离子强度的增加, 导致峰电流的降低,

表 1 体系中共存物质的影响

Table 1 Influence of co-existing substances on the system ($c_{\text{Hb}}: 2.5 \times 10^{-7}$ mol/L)

Substance	Concentration/ (10^{-6} mol L ⁻¹)	i_p / %
L-Val	25.0	4.5
L-Ga	25.0	4.0
Gly	25.0	- 5.6
L-Ala	50.0	1.0
L-Thr	40.0	2.2
L-Try	40.0	4.9
L-Arg	70.0	- 1.3
L-Ser	40.0	0.9
L-Pro	55.0	- 1.7
L-Leu	35.0	- 2.1
L-His	50.0	- 5.3
Cytosine	28.0	3.1
Adenine	12.0	0.9
Guanine	12.0	- 4.3
Thymine	28.0	1.3
Zn ²⁺ , Cl ⁻	500.0	- 5.2
Mg ²⁺ , Cl ⁻	200.0	- 0.5
Ni ²⁺ , NO ₃ ⁻	200.0	- 2.6
Cd ²⁺ , Cl ⁻	500.0	- 5.4
Co ²⁺ , Cl ⁻	500.0	- 2.5
Ca ²⁺ , Cl ⁻	6.2	5.9
BSA	24.3 ^a	- 2.9

^a Concentration in $\mu\text{g}/\text{mL}$.

而微量 Ca²⁺ 却使血红蛋白的还原峰电流增加很多, 这可能与 Ca²⁺ 与磷酸头基的静电结合而提高膜的导电性^[23]有关.

2.6 线性范围和检出限

在所选定实验条件下, 血红蛋白的浓度与阴极峰电流在 $1.25 \times 10^{-8} \sim 4.31 \times 10^{-7}$ mol/L 范围内呈良好线性关系, 线性回归方程为: $i_p = -0.015 + 0.274 c_{\text{Hb}}$. 线性回归系数 $R(18)$ 为 0.996, 最低检测限为 1.25×10^{-8} mol/L. 以 2.50×10^{-7} mol/L 的血红蛋白溶液进行了精密度试验, 连续测定 6 次, 相对标准偏差(RSD)为 2.6%.

2.7 合成样品的测定

根据共存物质的干扰情况合成了样品, 并用该方法测定了其中的血红蛋白, 结果见表 2.

表 2 合成样品的检测结果

Table 2 Determination results for synthetic samples ($n = 4$)

c_{Hb} / (mol L ⁻¹)	Co-existing species ^a	Found/ (mol L ⁻¹)	Recovery/ %	RSD/ %
0.50×10^{-7}	Gly, Ala, Thr, Try, C, G, Zn ²⁺ , Ni ²⁺ , Co ²⁺ , Cd ²⁺	0.48×10^{-7}	96 ~ 100	2.1 %
1.50×10^{-7}	Pro, Arg, A, T, C, G, BSA	1.48×10^{-7}	95.3 ~ 104	7.8 %

^aA: Adenine, G: Guanine, T: Thymine, C: Cytosine; concentration: Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, 10^{-4} mol/L; A, G, C, T, 10^{-6} mol/L; BSA, 4.86 mg/L; Pro, Arg, Gly, Ala, Thr, Try, 2.0×10^{-6} mol/L.

3 结论

在不加任何电子传递媒介体的情况下, Hb 在(卵磷脂 + 胆固醇 + 月桂酸)形成的液晶态膜修饰的玻碳电极上有稳定的电流响应. 这种生物模拟膜电极具有很好的生物相容性, 这是其它电极所不具备的独特的优点. 而且液晶态膜的组分是安全的天然物质, 生物分子在检测过程中不会发生变性. 此电极对血红蛋白有很好的选择性, 有较低检测限, 反应灵敏, 是一种有发展前途的血红蛋白电化学生物传感器.

References

- Weissbluth, M. *Molecular Biology: Biochemistry and Biophysics*, Vol. 15, Springer, New York, 1974.
- Ye, J.; Baldwin, R. P. *Anal. Chem.* **1988**, 6, 2263.

- 3 Song, S. ; Dong, S. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1988**, *19*, 337.
- 4 Zhou, J.-X. ; Wang, E.-K. *Chin. Sci. Bull.* **1991**, *36*, 24.
- 5 Han, J.-L. ; Chen, H.-Y. ; Gao, H. *Acta Chim. Sinica* **1993**, *51*, 683 (in Chinese).
(韩吉林, 陈洪渊, 高鸿, 化学学报, **1993**, *51*, 683.)
- 6 Han, J.-L. ; Chen, H.-Y. ; Gao, H. *Acta Chim. Sinica* **1993**, *51*, 568 (in Chinese).
(韩吉林, 陈洪渊, 高鸿, 化学学报, **1993**, *51*, 568.)
- 7 Hao, C.-X. ; Yu, A.-M. ; Han, J.-L. ; Chen, H.-Y. *Chem. J. Chin. Univ.* **1996**, *17*, 12 (in Chinese).
(赫春香, 俞爱民, 韩吉林, 陈洪渊, 高等学校化学学报, **1996**, *17*, 12.)
- 8 Deng, Z.-F. ; Wu, X.-L. *Chin. J. Anal. Chem.* **1991**, *19*, 949 (in Chinese).
(邓子峰, 吴性良, 分析化学, **1991**, *19*, 949.)
- 9 Tien, H. T. ; Salamon, Z. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1989**, *22*, 211.
- 10 Zviman, M. ; Tien, H. T. *Biosens. Bioelectron.* **1991**, *6*, 37.
- 11 Rusling, J. F. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 363.
- 12 Lu, Z. Q. ; Huang, Q. D. ; Rusling, J. F. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *423*, 59.
- 13 Nagasa, S. ; Kataoka, M. ; Nakanawa, R. ; Komatsu, R. ; Odashima, K. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1252.
- 14 Bianco, P. ; Haladjian, J. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *367*, 79.
- 15 Bianco, P. ; Haladjian, J. *Electrochim. Acta* **1994**, *39*(7), 911.
- 16 Siontorou, C. G. ; Oliveira Brett, A. M. ; Nikolelis, D. P. *Talanta* **1996**, *43*, 1137.
- 17 Scheller, F. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1977**, *4*, 490.
- 18 Tien, H. T. *Artificial Bilayer Lipid Membrane*, tr. by Xiao, K., Advanced Education Press, Beijing, **1987** (in Chinese).
(田心棣著, 人造双层类脂膜, 肖科译, 高等教育出版社, 北京, **1987**.)
- 19 Ptak, M. ; Egret-Charlier, M. ; Sanson, A. ; Bouloussa, O. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *600*, 387.
- 20 Lin, Q.-W. *Structure and Function of Biomembrane*, Science Press, Beijing, **1982** (in Chinese).
(林其唯, 生物膜的结构与功能, 科学出版社, 北京, **1982**.)
- 21 Boggs, J. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *906*, 353.
- 22 Blank, M. *J. Electrochem. Soc.* **1975**, *123*, 1653.
- 23 Nikolelis, D. P. ; Krull, U. J. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *257*, 239.

(A0110167 PAN, B. F. ; HUANG, W. Q.)