糖蛋白 - 凝集素自组装构筑有序膜及在酶电极的应用*

李扬眉^{1,2} 江秀明¹ 陈志春¹ 傅水玉³ 林贤福¹(¹ 浙江大学化学系, 杭州 310027; ² 杭州职业技术学院化工系, 杭州 310018; ³ 杭州师范学院化学系, 杭州 310012)

摘要 利用糖蛋白 - 凝集素的识别作用交替沉积伴刀豆球蛋白 (Con A) 与辣根过氧化物酶 (HRP) 制备酶自组装多层膜, 用原子力显微镜 (AFM) 观测了自组装膜的表面形貌、表面粗糙度; AFM 和椭圆偏振研究测定了自组装膜的厚度. 结果表明, Con A 和 HRP 膜厚分别为 9.0 和 4.6 nm, 与两者的晶体衍射结果一致, 说明生物识别自组装方法能很好地保持分子的原有形态. 以亚甲蓝 (MB) 溶液为介体, 用循环伏安法测定了表面修饰了三层 (Con A/HRP) 自组装膜的金电极对 H_2O_2 的电化学催化还原作用, 在 H_2O_2 浓度为 $0.2 \sim 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 响应电流对 H_2O_2 浓度变化成线性, 酶电极灵敏度为 $24.0 \text{ mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, 表观米氏常数为 $4.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

关键词: 辣根过氧化物酶, 伴刀豆球蛋白, 表面形貌, 自组装膜, AFM, 酶电极

中图分类号: O647, O646

构造高度有序性和重复性的生物分子薄膜是提高生物传感器检测性能的关键. 有序膜制备包括 LB 膜技术、自组装单分子层膜 (SAMs) 技术、静电作用的分子沉积自组装法、抗体 - 抗原自组装等. 近年来有序膜的制备技术在传感器敏感膜应用研究中日渐广泛: Willner 等^[1]通过交联剂戊二醛与葡萄糖氧化酶 (GOD) 共价交联作用, 将葡萄糖氧化酶逐层固定在金电极表面; Hodak 等^[2]以葡萄糖氧化酶与氧化还原聚电解质聚烯丙基胺的二茂铁修饰分子的静电作用交替自组装构筑生物膜; Li 等^[3]以 DNA 为阴离子聚电解质与血红蛋白交替自组装在石墨电极表面构筑蛋白质膜; Hoshi 等^[4]通过生物素与抗生素蛋白的生物亲和作用, 以生物素标记的酶与抗生素蛋白交替自组装, 在固体表面构筑了酶多层膜.

伴刀豆球蛋白 (Con A) 是一种外源植物凝集素蛋白, pH = 7.0 时, Con A 是由四个相同亚基组成的四聚体, 每一个亚基含 237 个氨基酸残基, 具有结合 α -D-葡萄糖和 α -D-甘露糖的能力. 通过 Con A 与糖或含糖化合物的识别, 可以固定糖类或含糖蛋白, 如 GOD 等^[5]. 辣根过氧化物酶 (HRP) 分子内含有 α -D-葡萄糖和 α -D-甘露糖, 是一种糖蛋白, 能催化过氧化氢与氢供体间的氧化还原反应, 其单独或与其

它氧化酶一起共固定于电极表面能制备多种酶传感器, 是当今生物传感器研究的热点之一. 我们研究组已通过分子沉积自组装法制备了阳离子化 HRP 与阴离子聚电解质的多层自组装膜, 并进一步研究了其在酶电极上的应用^[6]. 本文通过 Con A 与 HRP 之间的识别作用构造酶多层自组装膜, 研究了自组装膜的表面形貌及自组装膜的厚度, 进一步探讨了 Con A 与 HRP 自组装过程生物分子形态, 讨论了金电极表面组装 HRP 后的电化学特征, 以及修饰电极对 H_2O_2 的电化学催化还原作用.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

辣根过氧化物酶 ($250 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 等电点为 7.2, RZ (Reinheit Zahl) > 3.0, 华美生物技术公司), 伴刀豆球蛋白 (Sigma 公司), 聚对苯乙烯磺酸钠 (PSS, poly(sodium-*p*-styrenesulfonate), 重均分子量 70000, ACROS 公司), 聚烯丙基胺盐酸盐 (PAH, poly(allylamine hydrochloride), 重均分子量 15000, Aldrich 公司), L-半胱氨酸 (L-cys, L-cysteine, 上海生物制剂厂). 其它试剂均为分析纯, 所有溶液采用超纯水 ($\kappa = 3.3 \times 10^{-5} \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$) 配制. 缓冲溶液为 pH = 7.0 的 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐. 不同浓度的

图1 500 nm × 500 nm PET/PAH/PSS/PAH 表面的 AFM 图

Fig. 1 AFM image of 500 nm × 500 nm film of PET/PAH/PSS/PAH

PSS: poly(sodium-*p*-styrenesulfonate);

PAH: poly(allylamine hydrochloride);

PET: polyethylene glycol terephthalate

H₂O₂ 溶液采用 30% 的 H₂O₂ 稀释而成。

原子力显微镜 (AFM) 为 Nanoscope A (Digital Instrument Inc.), 轻敲工作模式。椭圆偏振仪为 V-VASE with Auto Retarder (J. A. Woollam Inc.), 波长范围为 200 ~ 1700 nm, 聚焦光斑为 1 mm (直径), 入射角 74° 和 76°。

1.2 HRP 的组装

1.2.1 聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 上 HRP 的组装

PET 的预处理及表面阴离子化参见文献 [7]。25 °C 下, 将表面阴离子化 PET 膜分别在 1 g · L⁻¹ PAH、1 g · L⁻¹ PSS、1 g · L⁻¹ PAH 溶液中组装 20 min; 再分别在 0.5 g · L⁻¹ Con A (pH = 7.0)、0.5 g · L⁻¹ HRP (pH = 7.0) 中组装 40 min, 重复最后两步, 即制得单层及多层 HRP 的自组装膜 PET/PAH/PSS/PAH/(Con A/HRP)_n。

1.2.2 HRP 修饰电极的制备

金电极表面 (1 cm × 0.5 cm) 的 L-半胱氨酸自组装膜的制备见文献 [6]。超纯水冲洗后, 浸入 0.5

g · L⁻¹ Con A (pH = 7.0) 中组装 40 min, 缓冲溶液漂洗后再在 0.5 g · L⁻¹ HRP (pH = 7.0) 中组装 40 min, 重复最后两步, 即制得单层及多层 HRP 膜修饰电极。

1.3 电化学测量

电化学测定采用三电极系统 (天津兰力科 98A), 以饱和甘汞 (SCE) 为参比电极, 铂片电极为对电极, 修饰金电极为工作电极, 0.1 mmol · L⁻¹ 的亚甲蓝 (pH = 7.0) 为底液, 扫描电位在 0 ~ -0.4 V (vs SCE) 之间。

2 结果与讨论

2.1 自组装膜的表面形貌

原子力显微镜的轻敲模式 (tapping-mode (TM) AFM) 是常用的表面分析方法, 对固定化生物膜表面形貌及密度的分析尤其重要, 近年来, 用 TM-AFM 法对固定化生物膜表面分子的尺寸分析报导逐渐增多 [8-11]。AFM 进行表面分子尺寸分析时, 粒子的高度反映了真实值, 而粒子在水平方向的宽度与针尖放大效应有关。通过静电作用, 表面阴离子化的 PET 膜在带相反电荷的聚电解质溶液中交替沉积, 即得表面带正电荷的前体膜 PET/PAH/PSS/PAH, 膜表面的 AFM 图见图 1。Con A 分子的等电点 pI 为 4.5 ~ 5.5, 在 pH = 7.0 时带有负电荷, 通过静电作用组装于前体膜表面形成的 PET/PAH/PSS/PAH/Con A 的 AFM 图见图 2(a), 通过凝集素与糖基的生物识别作用继续组装 HRP 形成的 PET/PAH/PSS/PAH/Con A/HRP 膜表面的 AFM 图见图 2(b)。

比较聚电解质前体膜 (图 1)、Con A (图 2a) 及 HRP (图 2b) 自组装膜表面的 AFM 图可以看出, 聚电解质前体膜表面平整, 粗糙度分析表明其表面均

图2 500 nm × 500 nm 自组装膜 AFM 图

Fig. 2 AFM image of 500 nm × 500 nm films

(a) PET/PAH/PSS/PAH/Con A, (b) PET/PAH/PSS/PAH/Con A/HRP;

HRP: horseradish peroxidase; Con A: concanavalin A; PSS, PAH, PET are the same as Fig. 1.

图3 500 nm × 500 nm 组装膜表面区域分析图

Fig. 3 Section analysis of 500 nm × 500 nm assembly film

(a) PET/PAH/PSS/PAH/Con A, (b) PET/PAH/PSS/PAH/Con A/HRP

方根粗糙度 (RMS) 为 0.82 nm; 组装 Con A 后膜表面均匀、连续地分布着颗粒状的 Con A, 从 AFM 图可以看出, 表面 Con A 分子呈单分子层分布, 基本没有聚集现象, 其表面的 RMS 为 1.90 nm; 继续组装 HRP 后, 膜表面均匀分布的颗粒尺寸比 Con A 膜表面减小, RMS 为 1.40 nm.

2.2 Con A 及 HRP 自组装膜的表面厚度与分子形态

500 nm 的 Con A 自组装膜剖面图如图 3a 所示, 呈连续紧密分布的 Con A 颗粒高度为 (4.5 ± 0.5) nm, 分布均匀. 紧密堆积的表面粒子在 z 方向上高度可近似认为紧密堆积的粒子的半径, 由此可得表面组装 Con A 膜厚约 (9.0 ± 1.0) nm, 结果与 Con A 分子 X 射线衍射 (XRD) 数据 $6.14 \text{ nm} \times 8.55 \text{ nm} \times 9.15 \text{ nm}^{[12]}$ 的长轴一致. 组装膜表面粒子高度接近, 表明膜表面的 Con A 分子具有一致的取向. 图 3b 所示的在 HRP 自组装膜表面呈连续紧密分布的 HRP 颗粒高度为 (2.3 ± 0.5) nm, 则 HRP 膜厚度为 (4.6 ± 1.0) nm, 结果同样与 HRP 的 XRD 数据 $4.03 \text{ nm} \times 6.74 \text{ nm} \times 11.75 \text{ nm}^{[13]}$ 中 4.03 nm 轴基本相近. 剖面分析说明在单分子层组装膜表面分子取向一致, 且组装分子的形态在组装前后保持较好.

为了进一步证实上述结论, 本文以变角变波长椭圆偏振仪测定干燥金表面组装膜厚度. 椭圆偏振光谱是一种灵敏的表面无损分析方法, 在进行有机超薄膜的表征时, 已建立了一些基本的模型如 n -相模型 (n -phase mode)^[14]、EMA (effective medium approximation) 模型^[15-16]. 本文采用 Lorentz-EMA 模型进行薄膜厚度表征. 将修饰了单层 HRP 的金电极 Au/L-cys/Con A/HRP (简记为 h1) 及 Au/L-cys/Con A/HRP/Con A (简记为 c1) 组装膜, 采用两个不同的入射角 74° 和 76° , 对金表面自组装膜进行椭圆偏振测量, 用 Lorentz 模型进行拟合, 分别

得到 h1 的表面膜厚为 12.4 nm, c1 的表面膜厚为 21.1 nm. 两者之差 8.7 nm 为最外层 Con A 的厚度, 此值与 Con A 的晶体结构参数相符, 且与最外层为 Con A 时膜表面厚度的 AFM 数据一致.

AFM 及椭圆偏振分析的结果表明, 在生物识别自组装过程中, 生物分子的原有形态保持得较好, 自组装膜表面分子定向排列, 呈现了良好的有序性.

2.3 修饰电极电催化还原过氧化氢

三层修饰电极 Au-SAM/(Con A/HRP)₃ 在含 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚甲蓝的 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 ($\text{pH} = 7.0$) 中的循环伏安分析表明, 在 HRP 修饰电极上亚甲蓝有一对近似可逆的氧化还原峰, 氧化峰电位 E_{pa} 为 -0.164 V , 还原峰电位 E_{pc} 为 -0.208 V , 峰电位基本不随扫描速率而改变, 峰电流 (I_{pc}) 随扫描速率 (ν) 增大而增大, 并与扫描速率的平方根成线性关系, $I_{\text{pc}} = -0.6612 + 0.18625 \nu^{1/2}$, 相关系数为 0.99902. 说明此电化学过程为溶液中亚甲

图4 酶电极对过氧化氢的响应

Fig. 4 Cyclic voltammograms of modified electrode

(1) in the absence of H_2O_2 , (2) in the presence of $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ in $\text{pH} = 7.0$, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ methylene blue; scan rate: $15 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

图5 组装三层 (Con A/HRP)膜的酶电极在不同浓度 H_2O_2 时的电流响应

Fig. 5 Amperometric responses of modified electrode with three bilayers of (Con A/HRP) at different concentration of H_2O_2

蓝扩散控制的过程。

图4是三层HRP修饰电极在 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚甲蓝溶液 ($\text{pH} = 7.0$) 中,加入 H_2O_2 前后的循环伏安图。加入 H_2O_2 后,亚甲蓝的还原峰明显增大,说明溶液中的亚甲蓝能在酶的活性中心与电极表面有效地传递电子^[6]。组装不同层数辣根过氧化物酶的电极对 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 的电流响应随组装层数的增加,酶电极的响应电流逐步增大。证明通过 Con A 的分子识别作用能够成功实现 HRP 多层膜的自组装。

CV法测定组装三层 (Con A/HRP)的酶电极的还原峰电流,在 H_2O_2 浓度为 $0.1 \sim 6.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 中的电流响应见图5。此响应曲线与酶反应的米氏常数相似,在 H_2O_2 浓度为 $0.2 \sim 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内,峰电流与浓度成线性关系,酶电极灵敏度为 $24.0 \text{ mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$,应用 Michaelis-Menten 公式的电化学形式 Eadie-Hoffstee 方程 $I_{ss} = I_{\max} - K_m^{\text{app}} (I_{ss} / c)$ (式中, I_{ss} 为稳态电流, $I_{\max}$ 为底物饱和时的极限电流, K_m^{app} 为表观米氏常数, c 为底物浓度),对线性部分进行分析可得酶电极的表观米氏常数 K_m^{app} 为 $4.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,与其它文献报导一致^[17]。

酶电极干燥保存于 4°C 冰箱中一个月后,测定电极在 $4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 溶液中的还原电流、催化电流为初始的 89%,说明该酶电极具有较好的稳定性。

利用生物体系的分子识别作用,通过外源凝集素伴刀豆球蛋白与辣根过氧化物酶的交替沉积,可实现酶在 PET 和金表面的多层膜自组装,自组装过程中酶分子的原有形态保持较好,自组装膜表面分子定向有序排列。上述方法构筑电流型酶电极条件温和、制作简单,显示出其应用于制备生物传感器等功能器件的前景。

References

- Willner, I.; Riklin, A.; Shoham, B.; Rivenzon, D.; Katz, E. *Adv. Mater.*, **1993**, *5*: 912
- Hodak, J.; Etchenique, R.; Calvo, E. *Langmuir*, **1997**, *13*: 2708
- Shang, L. B.; Liu, X. J.; Zhong, J.; Fan, C. H.; Suzuki, I.; Li, G. X. *Chem. Lett.*, **2003**, *32*(3): 296
- Hoshi, T.; Saiki, H.; Anzai, J. I. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1999**, *2*: 1293
- Anzai, J. I.; Kobayashi, Y. *Langmuir*, **2000**, *16*: 2851
- Li, Y. M.; Chen, Z. C.; Lü, D. S.; Lin, X. F. *Acta Phys. - Chim. Sin.*, **2003**, *19*(5): 474 [李扬眉, 陈志春, 吕德水, 林贤福. 物理化学学报 (Wuli Huaxue Xuebao), **2003**, *19*(5): 474]
- He, L.; Lin, X. F.; Chen, Z. C.; Li, Y. M.; Xu, L. H. *Acta Chim. Sin.*, **2002**, *60*(2): 377 [何琳, 林贤福, 陈志春, 李扬眉, 徐立恒. 化学学报 (Huaxue Xuebao), **2002**, *60*(2): 377]
- Caruso, F.; Furlong, D. N.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T. *Langmuir*, **1998**, *14*: 4559
- Walivaata, B.; Warkentin, P.; Lundstrom, I.; Tengvall, P. *J. Colloid Interface Sci.*, **1995**, *174*: 53
- Fritz, M.; Radmacger, M.; Cleveland, J. P.; Allersma, M. W.; Stewart, R. J.; Gieselmann, R.; Janmey, P.; Schmidt, F. C.; Hansma, P. K. *Langmuir*, **1995**, *11*: 3529
- Nonogaki, T.; Xu, S.-H.; Kuginiya, S. I.; Sato, S.; Miyata, I.; Yonese, M. *Langmuir*, **2000**, *16*: 4272
- Bouckaert, J.; Loris, R.; Poortmans, F.; Wyns, L. *Proteins*, **1995**, *23*(4): 510
- Berglund, G. I.; Carlsson, G. H.; Smith, A. T.; Szoke, H.; Henriksen, A.; Hajdu, J. *Nature*, **2002**, *417*(6887): 463
- Arwin, H. *Thin Solid Films*, **2000**, *377-378*: 48
- Goates, S. R.; Schofield, D. A.; Bain, C. D. *Langmuir*, **1999**, *15*: 1400
- Heimey, P. A.; Griimeberg, K.; Famg, J.; Dulcey, C.; Shashidgar, S. *Langmuir*, **2000**, *16*: 2651
- Wang, B. Q.; Zhang, J. Z.; Cheng, G. J.; Dong, S. J. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, *407*: 111

Construction of Ordered Films of Horseradish Peroxidase through Lectin-glycogen Reaction and Its Application in Enzyme Electrode*

Li Yang-Mei^{1,2} Jiang Xiu-Ming¹ Chen Zhi-Chun¹ Fu Shui-Yu³ Lin Xian-Fu¹

(¹Chemistry Department of Zhejiang University, Hangzhou 310027;

²Chemical Engineering Department of Hangzhou Professional Technical College, Hangzhou 310018;

³Chemistry Department of Hangzhou Teachers College, Hangzhou 310012)

Abstract The multilayer films of horseradish peroxidase (HRP) were fabricated by layer-by-layer assembly of HRP and concanavalin A (Con A) through lectin-glycogen reaction. The surface topography and roughness were characterized by AFM. The thickness of the films was studied by AFM and ellipsometry. The thicknesses of the Con A and the HRP film are about 9.0 and 4.6 nm, respectively, which correspond to their X-ray diffraction data. It is demonstrated that the shape of Con A and HRP molecule was well retained during the assembly process. Cyclic voltammetry (CV) was used to test the electrochemical properties of the films. The enzyme electrode of three bilayers of (Con A/HRP) films was sensitive for the reduction of hydrogen peroxide in the methylene blue (MB) solution. The response current is proportional to the concentration of H₂O₂ within the range of 0.2 ~ 1.0 mmol · L⁻¹. The sensitivity of the enzyme electrode is 24.0 mA · mol⁻¹ · L and the apparent Michaelis constant is 4.2 mmol · L⁻¹.

Keywords: HRP, Con A, Surface topography, Assembly film, AFM, Enzyme electrode

Received: August 5, 2003; Revised: September 19, 2003. Correspondent: Lin Xian-Fu (E-mail: llc123@css.zju.edu.cn; Tel:

0571-87952618). *The Project Supported by International Cooperation Project of Zhejiang Science and Technology Bureau (021106132)