

自组装膜技术构筑电化学酶传感器

刘慧宏 李 俊 陈显堂

(襄樊学院化学系 湖北襄樊 441053)

摘 要 自组装膜以其制备简便、结构易控、重现性好、具有良好的生物兼容性、能设计和控制生物分子的取向等特点,用于构筑电化学酶传感器,引起了广泛的关注。本文阐明了自组装膜形成的机理,描述了自组装膜技术在电极表面固定酶的两种方法,即修饰电极法和修饰酶法,综述了自组装膜技术应用于构筑电化学酶传感器的最新进展,并展望了其发展趋势。

关键词 自组装膜 生物传感器 电化学 酶

Self-assembled Monolayers for Electrochemical Enzyme-sensors

Liu Huihong, Li Jun, Chen Xiantang

(Department of Chemistry, Xiangfan University, Xiangfan Hubei 441053)

Abstract The simplicity and adaptability of self-assembled monolayers (SAMs) and the control over biomolecule surface orientation have begun to receive attention as a method of constructing electrochemical enzyme-sensors. This review provides the mechanism of forming SAMs, highlights two immobilization methods, the modification of electrode surfaces and the engineering of the enzymes, which can be used for constructing enzyme electrodes, and describes the recent development of fabricating electrochemical enzyme-sensors using self-assembled monolayer technology. Further research directions are suggested.

Key words Self-assembled monolayer, Biosensor, Electrochemistry, Enzyme

电化学生物传感器是将电化学换能器(电极)与生物敏感物质有机组合在一起的装置。它利用生物物质的识别作用检测电信号的变化,从而对物质进行定量或半定量分析^[1]。电化学酶传感器结合了电化学方法的高灵敏性和酶的高选择性,因而受到广泛关注。其中在电极表面固定酶是构筑电化学酶传感器最关键的环节。自组装膜(Self-Assembled Monolayers, SAMs)技术为酶的固定提供了行之有效的办法。首先, SAMs 类似生物膜的结构,具有良好的生物兼容性,能保持酶的原始构象和催化活性;其次, SAMs 的有序结构能调节酶的活性位点与电极表面的相对位置,使酶处于有利于电子传递的环境;此外, SAMs 能阻止溶剂分子或离子接近电极表面,减小双电层的厚度,从而降低非法拉第电流的影响,提高检测底物的灵敏度。因此自组装膜技术倍受电分析化学工作者的青睐^[2~4]。本文介绍了近几年自组装膜技术制备酶修饰电极的方法及在电化学酶传感器中的应用。

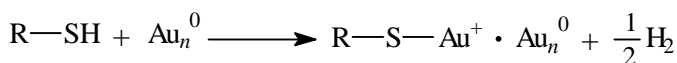
1 自组装膜的形成^[5]

刘慧宏 男, 38 岁, 副教授, 主要从事生物电化学和生物传感器的研究。

湖北省教育厅资助项目(2001B69002)

2002-06-06 收稿, 2002-10-15 修回

SAMs 是分子通过化学键相互作用自发吸附在固/液或气/液界面, 形成热力学稳定、能量最低的有序膜。长链的羧基化合物在金属氧化物表面、有机硅化物在羟基化的基体(如玻璃、石英和氧化铝等)表面以及巯基化合物在贵金属表面(如金、银、铂、铜等)都能形成 SAMs。其中研究和应用最为广泛是巯基化合物在金电极表面形成的 SAMs。因为该方法可靠、重现性好, SAMs 稳定有序, 末端基团可随意设计, 能用多种手段对 SAMs 进行表征; 更重要的是 SAMs 在较宽的电势范围内稳定(+0.8V~-1.4V)。其形成机理可表示如下:



巯基与金之间形成了共价键, 是 SAMs 稳定的主要因素。

2 自组装膜技术固定酶^[2,3,6]

采用自组装膜技术, 主要有两种方法可将酶共价固定于电极表面。一是修饰基体法: (1)在金电极表面形成末端带有-NH₂ 或-COOH 的 SAMs, 利用偶联的方式将酶共价结合在 SAMs 上(图 1A); (2)在金电极表面形成的 SAMs 末端带-NH₂ 或-SH, 可共价结合纳米金, 再吸附固定酶(图 1B)。二是修饰酶法: (1)通过化学修饰方法在酶分子表面引入巯基(图 2A); (2)将酶的辅基进行修饰, 自组装固定在电极表面, 再重组至酶蛋白中(图 2B); (3)通过蛋白质工程在酶分子表面引入半胱氨酸或组氨酸(图 2C), 然后利用 SAMs 技术将酶固定在电极表面。当然, 这两种方法不是绝对独立的, 有时需要同时使用这两种方法, 才能制备高效的酶修饰电极。

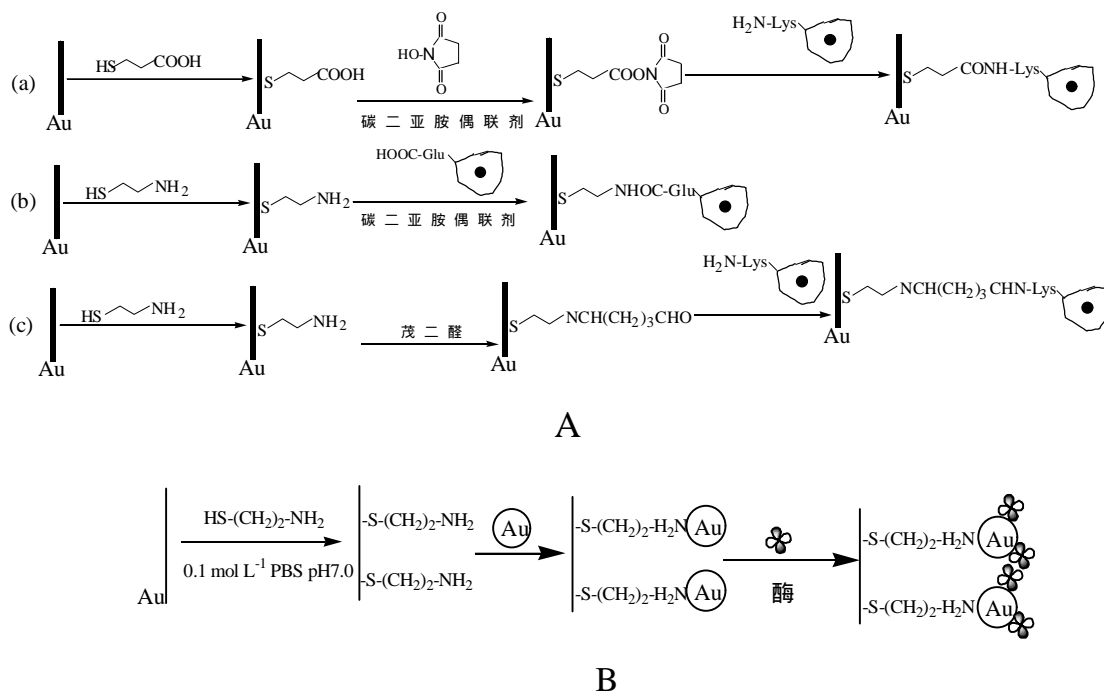


图 1 修饰基体法

Fig.1 The methods of modifying electrode surfaces

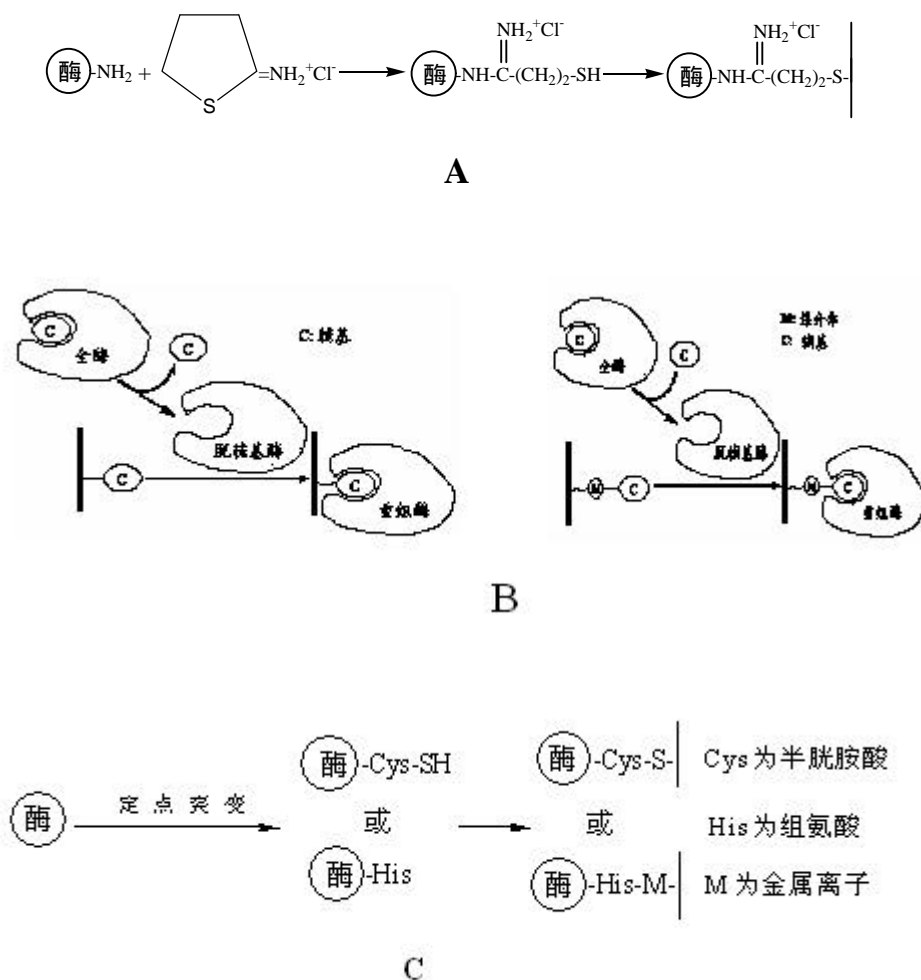


图 2 修饰酶法

Fig.2 The methods of engineering enzymes

3 自组装膜技术构筑电化学酶传感器的应用

3.1 修饰基体法

Gorton 等用 A(a)、A(b)和吸附法在自组装膜修饰电极表面固定微过氧化物酶-11 时,发现不同的固定方法,其电子传递速度相差较大,说明巯基化合物的末端基团影响酶在电极表面的覆盖量、决定了酶在电极表面的取向,从而影响酶与电极之间的电子传递^[7]。

利用不同的巯基化合物吸附烟草过氧化物酶(TOP)和辣根过氧化物酶(HRP),发现前者可直接与电极之间传递电子且能催化还原 H_2O_2 , 而后者则不能。使用荷不同电荷的自组装膜, TOP 还原 H_2O_2 的速度不相同,说明酶蛋白与膜的静电作用影响 TOP 在电极表面的取向^[8]。

Gooding 等利用自组装膜技术构筑了葡萄糖氧化酶(GOD)和葡萄糖脱氢酶(GDH)双酶传感器。在媒介体苯醌存在下, GOD 氧化葡萄糖为葡糖酸内酯;而在 NADH 存在下, GDH 还原葡

糖酸内酯为葡萄糖。通过酶促反应的循环,其检测电信号被加强,从而增加了检测葡萄糖的灵敏度,但线性范围变窄。另外他们利用自组装膜的可调控性,研究了 GOD 与 GDH 的相对位置对传感器性能的影响^[9]。

利用自组装方法在金电极表面模拟生物双层膜,将尿酸氧化酶和媒介体(1-甲氧基-5-甲基吩噻)固定于膜中,构成的尿酸传感器响应快,灵敏度高,干扰小^[10]。

以上例子说明自组装膜的性质决定了酶在电极表面的取向,从而影响酶与电极之间的电子传递效率,影响酶与底物作用的速度。因此应根据酶的特性,如酶辅基所处的环境、酶蛋白电荷的分布及氨基酸残基的性质等,选择带有适当功能基团的巯基化合物。此外电极表面的状态虽然并不影响自组装膜的性质、固定酶分子的数量及检测底物的灵敏度,但光滑表面的酶修饰电极具有较宽的检测线性范围^[11]。

纳米金能与-NH₂、-SH、-CN 等基团共价键合,在功能化的基体表面形成单层纳米金。而纳米金又与生物大分子具有良好的相容性,它能吸附蛋白质或酶,缩短其活性中心与电极之间的距离。将纳米金粒吸附在巯基乙胺自组装膜表面,HRP 与纳米金作用,从而固定 HRP 于电极表面。一对可逆的氧化还原峰表明,HRP 与电极之间直接传递电子,且能催化还原 H₂O₂^[12]。用该方法研究血红蛋白,可得相似的结果^[13]。巯基衍生的硅凝胶在金电极表面形成自组装膜,纳米金与巯基化学键合后,再吸附 HRP,从而将 HRP 固定在网状结构的凝胶之中。固定的 HRP 能直接电催化还原 H₂O₂,为制备稳定、灵敏、重现性好的第三代电化学酶传感器开辟了新的途径^[14]。

3.2 修饰酶法

利用化学方法重组酶分子,可将酶的氧化还原中心(辅基)直接与电极相联以加快酶与电极之间的电子传递速度。其方法是首先将全酶的辅基取出,得到无辅基的酶蛋白;然后将固定在电极表面的辅基分子重组至酶蛋白中。对于在电极上过电势较高的辅基,引入媒介体分子作为传输电子的分子导线。即将固定在电极表面连有媒介体的辅基重组至酶蛋白中,得到含有双功能氧化还原中心的辅基的酶(图 2B)。

Gorton 等重组了 HRP,重组 HRP 的辅基血红素直接与金电极相接。在金电极表面形成混合自组装膜:一种分子为 3-巯基丙酸,另外一种为 *N*-琥珀酰亚胺-3-巯基丙酸酯。二胺化合物的一个氨基与 3-巯基丙酸 *N*-琥珀酰亚胺酯反应相接,另一个氨基在碳二亚胺偶合剂的作用下与血红素交联,将此电极浸泡在含有脱辅基的 HRP 蛋白中,即得重组 HRP 的修饰电极。这种方法的优点是可以改变连接血红素的碳链长度。实验表明,碳链较短(C₄),不能形成重组产物,长碳链(C₁₂)形成重组 HRP 的电子传递速度较慢^[15]。

Willner 等重组了葡萄糖氧化酶和 *D*-氨基酸氧化酶,首先将酶的辅基(FAD)取出,得到无辅基的酶蛋白;然后将固定在电极表面接有媒介体(二茂铁、吡咯喹啉醌 PQQ)的辅基重组至酶蛋白中,得到含有双功能氧化还原中心的辅基的重组酶。该酶显示出生物电催化氧化葡萄糖或 *D*-丙氨酸的特性。重组酶既保持了对底物催化的专一性和高的催化效率,又避免了氧、抗坏血酸和尿酸等的干扰^[16,17]。在此基础上,他们利用酶与电极之间电子的流向不同,制备了(不需外加电源)的酶传感器,用于检测葡萄糖或乳酸。该传感系统由两电极组成,利用自组装膜技术固定

重组葡萄糖氧化酶或乳酸脱氢酶在金电极表面构成阳极, 其中吡咯喹啉醌(PQQ)为传输电子的媒介体; 阴极由细胞色素 *c*/细胞色素 *c* 氧化酶偶联至自组装膜表面而构成。两极间的电势差与葡萄糖或乳酸的浓度成正比^[18]。

利用蛋白质从头设计的原理, 结合自组装膜技术, 可在电极表面对蛋白质进行模拟。将含有两个血红素辅基的 4 肽螺旋束共价键合至自组装膜修饰金电极表面。两个血红素辅基由于与电极表面的距离不同, 其氧化还原电势也不同, 分别为-0.43V 和-0.36V(vs SCE)。这一性质可应用于制备生物电子整流器。另外这种模拟蛋白质可以作为硝酸根还原酶或 Co(II)原卟啉重组血红蛋白的电子媒介体, 催化还原 NO_3^- 或催化 2-炔-丁二酸加氢^[19]。

采用融合蛋白技术, 将具有特异亲合性的蛋白质模块与功能性(如生物催化)蛋白质模块融合, 再利用自组装膜技术固定融合蛋白于电极表面。Edrano 等将 β -半乳糖与能特异性结合胆碱分子的蛋白质融合, 其嵌合体则与金电极表面 SAMs 末端的胆碱分子结合, 从而将酶固定在电极表面。修饰有此融合蛋白的电极, 用于对氨基苯酚的检测, 具有性质稳定、响应快和重现性好的特点^[20]。

定点突变技术可以有目的地对蛋白质中的少数氨基酸残基进行替换, 蛋白质的结构和性能基本维持不变。HRP 的表面存在 8 个糖基化位点, 其碳水化合物的含量达 18%。这些碳水化合物尤如一道屏障, 阻碍了酶的氧化还原中心与电极的电子传递。Gorton 等利用基因工程手段, 制得不含糖基化位点的 HRP 突变体, 进而利用定点突变技术在 HRP 分子表面引入 6 个组氨酸分子, 由于组氨酸与金之间较强的亲和力, 使 HRP 定向固定于金电极表面。两种突变体的电子传递速度由 1s^{-1} 分别增加到 4.7s^{-1} 和 7.5s^{-1} ^[21]。利用组氨酸与金属离子间较强的亲和力定向固定蛋白质的原理也运用到铁蛋白: NADP^+ 还原酶。制得的两种突变体在金电极表面的覆盖量、电子传递的能力及氧化还原催化的动力学常数均有差异, 说明酶分子表面组氨酸位点决定了酶在电极表面的取向^[22]。

Hill 等将 Cyt P450cam 分子表面的 5 个半胱氨酸全部突变为丙氨酸, 而将与电子传递相关联的 4 个氨基酸残基分别独立地突变为半胱氨酸。半胱氨酸的-SH 与金电极表面键合, 定向固定蛋白质, 使电子传递通道与电极表面接近^[23], 且用扫描探针显微镜观察电极表面蛋白质的结构和形貌^[24]。

4 趋势和展望

SAMs 以其制备简便、结构易控、重现性好、具有良好的生物兼容性、能设计和控制生物分子的取向等特点, 用于构筑电化学酶传感器, 引起了广泛的关注。但用自组装膜技术构筑的电化学酶传感器应用于实际样品的检测, 还存在一些问题, 如酶在电极表面的取向难以控制, 降低了酶的使用效率; 固定在电极表面的酶的量不大, 影响检测的灵敏度; 多组分同时检测和极端条件下(如有机相, 较高温度, 较高酸碱度等)使用酶传感器有一定难度。为克服以上不足, 利用自组装膜技术构筑电化学酶传感器的研究应从以下几方面进行:

(1) 电化学酶传感器的制备, 关键在于酶的固定。而酶在电极表面的定向固定, 需满足以下几个条件: 结合专一性、温和的修饰条件、酶分子表面的结合位点易调控等。蛋白质工程技术与自组装膜技术结合能满足这些要求^[6]。

(2)利用自组装膜技术在电极表面固定酶, 结合扫描隧道电子显微和原子力显微方法, 可研究酶在电极表面的形貌和取向, 揭示酶直接电化学的机理^[25]。

(3)利用自组装膜技术对分子进行裁剪, 结合生物工程技术, 调控生物分子-电极界面的电学性质, 拓展生物电化学酶传感器的应用领域^[26]。

加强纳米科学与生命科学的结合^[27], 引入自组装膜技术和微加工技术的最新成果^[28], 开发和研制生物电化学酶传感器微阵列和芯片实验室, 满足复杂样品及多组分分析的要求。

参考文献

- [1] D R Thevenot, K T R A Durst, G S Wilson. *Biosen. Bioelectron.*, 2001, 16 (2): 121~131.
- [2] S Ferretti, S Paynter, D A Russell et al. *Trends Anal. Chem.*, 2000, 19 (9): 530~540.
- [3] J J Gooding, D B Hibbert. *Trends Anal. Chem.*, 1999, 18 (8): 525~533.
- [4] T Wink, S J VanZuilen, A Bult et al. *Analyst*, 1997, 122 (4): R43~R50.
- [5] A Ulman. *Chem. Rev.*, 1996, 96 (4): 1533~1554.
- [6] G Gilardi, A Fantuzzi, S J Sadeghi. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2001, 11 (4): 491~499.
- [7] T Ruzgas, A Gaigalas, L Gorton. *J. Electroanal. Chem.*, 1999, 469 (2): 123~131.
- [8] S Gaspar, H Zimmermann, I Gazaryan et al. *Electroanalysis*, 2001, 13 (4): 284~288.
- [9] J J Googing, L Pugliano, D B Hibbert et al. *Electrochem. Commun.*, 2000, 2 (4): 217~221.
- [10] T Nakaminami, S Ito, S Kuwabata et al. *Anal. Chem.*, 1999, 71 (19): 4278~4283.
- [11] D Losic, J J Gooding, J G Shapter et al. *Electroanalysis*, 2001, 13 (16): 1385~1393.
- [12] H Y Xiao, H X Lu, H Y Chen. *Anal. Biochem.*, 2000, 278: 22~28.
- [13] H Y Gu, A M Yu, H Y Chen. *J. Electroanal. Chem.*, 2001, 516 (2): 119~126.
- [14] J Jia, B Wang, A Wu et al. *Anal. Chem.*, 2002, 74(9): 2217~2223.
- [15] H Zimmermann, A Lindgren, W Schuhmann et al. *Chem. Eur. J.*, 2000, 6 (4): 592~599.
- [16] I Willner, V Heleg, R Blonder et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118 (42): 10321~10322.
- [17] E Katz, A Riklin, V Heleg et al. *Anal. Chim. Acta*, 1999, 385 (1): 45~58.
- [18] E Katz, A F Buckmann, I Willner. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123 (43): 10752~10753.
- [19] I Willner, V Heleg, E Katz et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121 (27): 6455~6468.
- [20] J Madoz, B A Kuznetsov, F J Edrano. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119 (5): 1043~1051.
- [21] G Presnova, V Grigorenko, A Egoreov et al. *Faraday Discuss*, 2000, 116: 281~289.
- [22] G J Madoz, J M Abad, R J Fernandez et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122 (40): 9808~9817.
- [23] K K W Lo, L L Wong, H A O Hill. *FEBS Lett.*, 1999, 451 (3): 342~346.
- [24] J J Davis, D Djuricic, K K W Lo et al. *Faraday Discuss*, 2000, 116: 15~22.
- [25] J J Davis, H A O Hill, A M Bond. *Coord. Chem. Rev.*, 2000, 200: 411~442.
- [26] I Willner, B Willner. *Trends Biotech.*, 2001, 19 (6): 222~230.
- [27] M Brust, C J Kiely. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2002, 202 (2): 175~186.
- [28] R S Kane, S Takayama, E Ostuni et al. *Biomaterials*, 1999, 20 (24): 2363~2376.