

文章编号: 1000-5013(2007)04-0414-04

检测色氨酸的免标记生物传感器研制

何燕芳, 孙向英, 刘 斌

(华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 利用 Au-S 化学键的作用, 在金基底上组装 L-半胱氨酸(L-Cys), 通过铜离子的配位作用, 构建 $\text{Cu}^{2+}/\text{L-Cys}/\text{Au}$ 自组装膜. 考察该自组装膜的组装条件、电化学特征、重现性与稳定性, 研究不同浓度的 L-色氨酸中膜的识别能力和识别选择性. 结果表明, 自组装膜具有对 L-色氨酸识别的选择性, 在不同浓度的 L-色氨酸中, 膜的电化学阻抗会发生明显变化. 因此, 利用该膜对 L-色氨酸(L-Trp) 的选择性识别引起电化学阻抗变化的特性, 可构建一种新型的免标记电化学阻抗法色氨酸传感器.

关键词: 生物传感器; 自组装膜; 电化学阻抗谱; 铜离子; L-色氨酸

中图分类号: TP 212.3; O 657.1; Q 517

文献标识码: A

色氨酸是人体和动物生命活动中必需的氨基酸之一^[1-2], 目前, 色氨酸的测定方法以色谱法为主^[1-4], 但该法操作复杂、分析时间较长、成本较高. 自组装膜(Self-Assembled Monolayers, SAMs) 具有广泛的仿生及生物亲和特性, 它结合了 Langmuir-Blodgett(LB) 膜的分子有序性和化学吸附稳定性, 而其自身具有的针孔现象和离子门作用等特性, 使其成为具有独特优势的传感膜^[5-10]. 本文利用 Au-S 化学键, 将 L-半胱氨酸牢固结合在金表面, 形成 L-Cys/Au 膜, 通过 Cu^{2+} 与 L-半胱氨酸的配位作用^[11] 制备 $\text{Cu}^{2+}/\text{L-Cys}/\text{Au}$ 自组装膜. 该自组装膜识别不同浓度的 L-色氨酸后, 膜阻抗会发生变化, 从而可构建一种基于电化学阻抗法的色氨酸免标记生物传感器.

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

CHI 660B 型电化学工作站(上海辰华仪器有限公司), 金圆盘电极($\Phi=2\text{ mm}$, 上海辰华仪器有限公司), 超声清洗仪(上海超声波仪器公司); 实验用水由 Milli-Q 基础型(美国 Millipore 公司) 纯化水系统提供; 电化学实验采用三电极系统: 对电极为铂丝, 参比电极为饱和甘汞电极, 工作电极为金圆盘电极. L-半胱氨酸(上海曹杨第二中学化工厂), L-色氨酸、铁氰化钾、亚铁氰化钾(上海国药集团化学试剂有限公司), 氯化钾(中国医药集团上海化学试剂公司). 所用试剂均为分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 金电极的预处理 将金圆盘电极依次用 1.0, 0.3, 0.05 μm 的 Al_2O_3 粉末抛光打磨成镜面, 在超声清洗仪中分别用水、乙醇超声清洗 5 min. 取清洗干净的金电极为工作电极, 置于 $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸溶液中, 在电化学分析仪上进行循环伏安扫描($-0.5\sim+1.5\text{ V}$) 至稳定.

1.2.2 自组装膜电极的制备 将处理过的裸金电极用水冲洗干净后, 于 $\text{pH}=11$ 的 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 L-半胱氨酸溶液中浸泡 3 h, 制得 L-半胱氨酸自组装膜 L-Cys/Au. 取出 L-Cys/Au 自组装膜用水冲洗并经 N_2 吹干, 放入 $\text{pH}=6$ 的 $0.001\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cu^{2+} 离子溶液中浸泡 1 h, 制得 $\text{Cu}^{2+}/\text{L-Cys}/\text{Au}$ 膜.

收稿日期: 2007-01-28

作者简介: 何燕芳(1982), 女, 硕士研究生, 主要从事荧光分析与电化学分析的研究; 通信作者: 刘 斌(1963), 男, 教授, E-mail: liubym@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20575023); 福建省国际合作重点项目(200610021); 福建省自然科学基金资助项目(D0410019).

自组装膜的组装和识别 *L*-Try, 如图 1 所示.

2 结果与讨论

2.1 组装条件的选择

2.1.1 *L*-Cys/Au 膜的组装 在 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 *L*-半胱氨酸的溶液中, *L*-半胱氨酸的巯基迅速与 Au 结合生成稳定的 Au-S 键, 该组装过程只需 3 h 就可以完成. *L*-半胱氨酸具有 $-\text{NH}_2$ 及

$-\text{COOH}$ 官能团, 等电点为 5.7, 实验选择 *L*-半胱氨酸组装溶液的 pH 值为 11. 以 *L*-Cys/Au 膜为工作电极, 在 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH 溶液中进行循环伏安扫描, 如图 2 所示. 相比于裸金电极, *L*-Cys/Au 膜在 -0.77 V (vs. Ag/AgCl, 下同) 左右出现一个还原峰, 该峰是吸附于金表面的硫经还原脱附所致, 表明半胱氨酸已牢固地组装于金表面. 在底液 ($1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] + 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] + 1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$) 中, 以裸金、*L*-Cys/Au 膜电极为工作电极进行电化学阻抗谱实验, 通过 Zview 拟合求得电化学阻抗值. 根据文[12]可知, 金表面覆盖度 $\theta = 1 - R_a^0 / R_a$, 其中 R_a^0 为裸金表面的阻抗值, R_a 为 *L*-Cys/Au 膜的阻抗值. 由此可求得 *L*-半胱氨酸在金表面的覆盖度 θ 为 91.84%, 表明金表面已形成致密的 *L*-Cys/Au 膜.

2.1.2 $\text{Cu}^{2+} / \text{L-Cys/Au}$ 膜的组装 Cu^{2+} 是一种配位性很强的金属离子, 能与含有 $-\text{NH}_2$ 及 $-\text{COO}^-$ 的化合物配位. 将 *L*-Cys/Au 在 $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=6 的 Cu^{2+} 溶液中组装 1 h, 即可得到稳定的、重现性好的 $\text{Cu}^{2+} / \text{L-Cys/Au}$ 自组装膜.

2.1.3 $\text{Cu}^{2+} / \text{L-Cys/Au}$ 膜对 *L*-色氨酸的识别 *L*-色氨酸是含有吲哚基的中性芳香族氨基酸, 在碱液中较稳定, 它含有 $-\text{NH}_2$ 及 $-\text{COO}^-$ 基团, 易与铜配合. $\text{Cu}^{2+} / \text{L-Cys/Au}$ 自组装膜识别色氨酸后, 膜的电化学阻抗会发生变化, 本文利用其阻抗变化来检测色氨酸.

(1) 识别 *L*-色氨酸的 pH 值. pH 值为 8~10 最有利于 *L*-色氨酸与 Cu^{2+} 生成配合物^[13], 实验选择 *L*-色氨酸溶液的 pH 值为 8~9. (2) 作用时间对膜阻抗的影响. 在 pH 值为 8~9 的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 *L*-色氨酸溶液中, 不同作用时间所得到的膜的电化学阻抗谱图, 如图 3 所示. 从图 3 可看出, 随着作用时间的不断增长, 高频部分的阻抗增大, 这说明 *L*-色氨酸与 $\text{Cu}^{2+} / \text{L-Cys/Au}$ 作用后, 阻碍了探针分子 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 的氧化还原. $\text{Cu}^{2+} / \text{L-Cys/Au}$ 膜对 *L*-色氨酸的作用时间在 1.5 h 后, 阻抗趋于稳定.

2.2 自组装膜电极的电化学特征

分别以裸金电极和自组装膜电极为工作电极, 置于相同底液中, 在 $0 \sim +0.5 \text{ V}$ 下进行循环伏安实验, 扫描速度为 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, 结果如图 4 所示. 从图 4 可看出, 随着组装层数的增多, 循环伏安曲线的可逆性也不断变差, 膜对探针分子 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 的阻碍能力也不断增强. 这也可

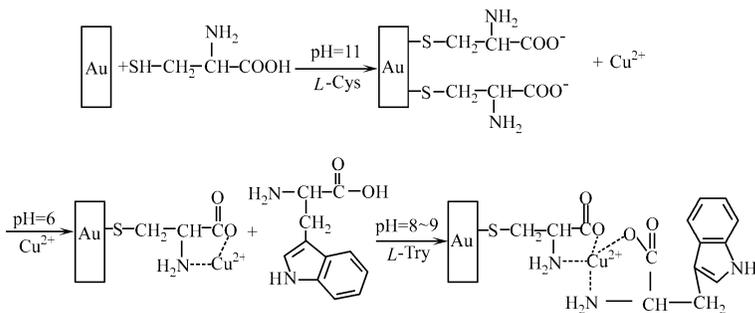


图 1 SAMs 的组装及识别 *L*-Try 示意图

Fig.1 The establishment mechanism of SAMs and recognition for *L*-Try

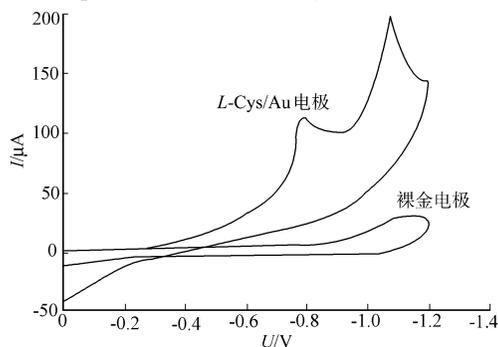


图 2 不同电极循环伏安曲线

Fig.2 Cyclic voltammograms of different electrodes

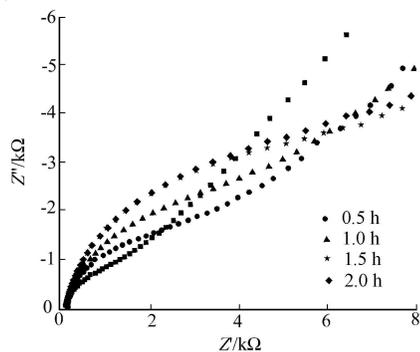


图 3 膜与 *L*-Try 作用在不同时间的电化学阻抗谱图

Fig.3 Nyquist plots of $\text{Cu}^{2+} / \text{L-Cys/Au}$ electrode acting with *L*-Try solution in different time

从电化学阻抗实验中得到验证. 在图 4(b) 中, 电化学阻抗随着组装层数变化, 阻抗发生变化, 在高频部分半圆的直径逐渐增大. 这表明膜层对电子的阻碍作用增强, 探针分子难以通过膜层孔隙到达电极表

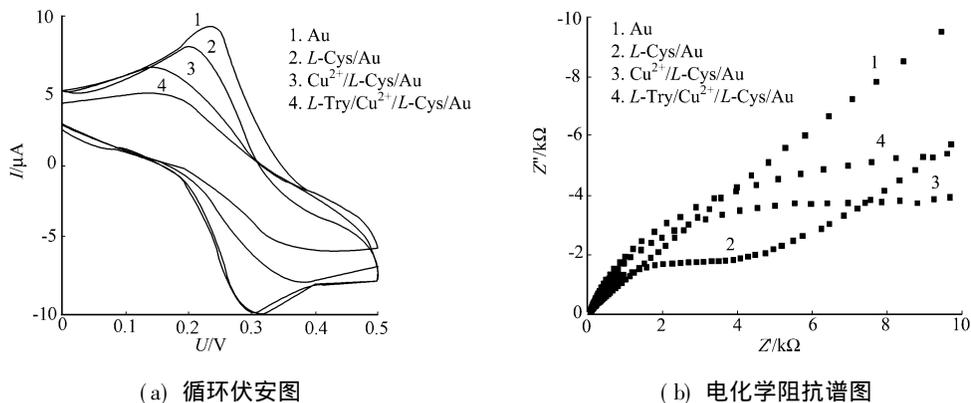


图 4 不同电极的电化学特征

Fig. 4 Electrochemical characteristic of different electrodes

面; 而在低频部分, Warburg 阻抗逐渐减小, 表明整个过程随组装层数增加逐渐为动力学所控制. 本实验的阻抗谱图是在电极反应接近于平衡状态下测得的, 因此得到的阻抗谱的复数平面图比较简单.

2.3 自组装膜电极的重现性与稳定性

不同时间组装的 $\text{Cu}^{2+}/\text{L-Cys}/\text{Au}$ 电极和 $\text{L-Try}/\text{Cu}^{2+}/\text{L-Cys}/\text{Au}$ 电极, 其交流阻抗谱图及循环伏安图都证实极稳定, 且重现性好. 组装电极在进行交流阻抗实验和循环伏安实验中都有同样规律, 即随着层数的增多, 膜阻抗也在不断增大, 循环伏安曲线的氧化还原的可逆性也变差. 将 $\text{Cu}^{2+}/\text{L-Cys}/\text{Au}$ 电极和 $\text{L-Try}/\text{Cu}^{2+}/\text{L-Cys}/\text{Au}$ 电极在水中浸泡 1 h 后, 发现膜的阻抗几乎不变, 表明两种电极很稳定.

2.4 自组装膜对 L-色氨酸的识别

将 $\text{Cu}^{2+}/\text{L-Cys}/\text{Au}$ 膜电极置于 $\text{pH} = 8\sim 9$ 的不同浓度的 L-色氨酸中各 1 h, 考察其识别不同浓度的 L-色氨酸电化学阻抗谱图及 L-色氨酸浓度 (C) 与膜的电化学阻抗值, 结果如图 5 所示. 图 5 中, 点线自上而下 L-色氨酸的浓度分别为 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 从图 5 可看出, 该膜识别不同浓度的 L-色氨酸时, 膜的电化学阻抗会发生明显变化. 因此, 利用 $\text{Cu}^{2+}/\text{L-Cys}/\text{Au}$ 识别不同浓度的 L-色氨酸, 引起阻抗的变化, 建立一种免标记电化学阻抗法的 L-色氨酸传感器. 图 5 中内插图为 L-色氨酸浓度负对数 $-\lg C$ 与电荷转移阻抗值 R_{ct} 间的关系. 将 $\text{Cu}^{2+}/\text{L-Cys}/\text{Au}$ 膜电极分别置于 $\text{pH} = 8\sim 9$, 浓度为 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 L-脯氨酸、L-苯丙氨酸、L-赖氨酸、L-色氨酸溶液中各 1.5 h 后, 在相同底液中, 进行电化学阻抗实验, 结果如图 6 所示. 图 6 中内插图为膜与不同氨基酸作用的电荷转移阻抗 R_{ct} 值. 从图 6 可以发现, 这几种氨基酸基本不干扰 L-色氨酸的测定, $\text{Cu}^{2+}/\text{L-Cys}/\text{Au}$ 自组装

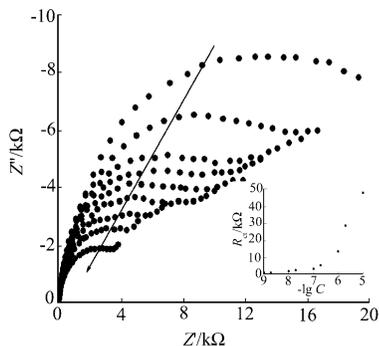


图 5 $\text{Cu}^{2+}/\text{L-Cys}/\text{Au}$ 膜电极与不同浓度 L-色氨酸作用的交流阻抗谱图

Fig. 5 Nyquist plots of $\text{Cu}^{2+}/\text{L-Cys}/\text{Au}$ electrode acting with L-Try solution of different concentration

膜对 L-色氨酸具有选择性识别.

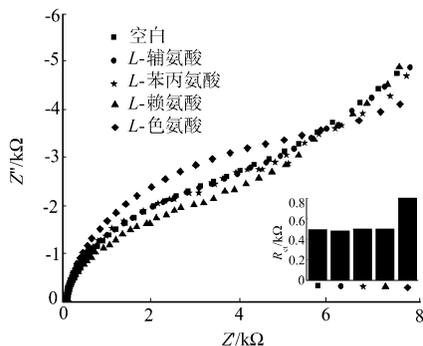


图 6 膜电极与不同氨基酸作用的阻抗谱图

Fig. 6 Nyquist plots of $\text{Cu}^{2+}/\text{L-Cys}/\text{Au}$ electrode acting with different amino acid

3 结束语

色氨酸是人和动物体内必需的一种氨基酸,建立一种快速准确测定色氨酸的方法非常必要.由于自组装膜的优越性能,近年来它已成为研究的热点.电化学阻抗法是表征和研究自组装膜一种常用的方法^[14].本文利用 Au-S 键的作用和 Cu^{2+} 的配位作用,构建了 $\text{Cu}^{2+}/L\text{-Cys}/\text{Au}$ 膜.该自组装膜识别 L -色氨酸后,膜电极电化学阻抗会发生变化,从而可构建一种检测色氨酸的免标记生物传感器.

参考文献:

- [1] 陈涛,陈宁. L -色氨酸的生产及其代谢控制育种[J]. 生物技术通讯, 2000, 11(2): 141-145.
- [2] 李予霞,王少珩. 色氨酸分析方法的筛选研究[J]. 石河子大学学报:自然科学版, 2001, 5(1): 41-44.
- [3] 易咏红,廖卫平,赵猗华,等. 色氨酸及其主要代谢产物的分离和在生物样品中的测定[J]. 色谱, 1999, 17(2): 158-161.
- [4] 王清平,唐爱国. 高效液相色谱-荧光检测法快速测定血清中的色氨酸[J]. 色谱, 2002, 20(1): 52-55.
- [5] 邵会波,宋雅茹,王宁,等. 自组装单分子膜在电化学电子转移过程中的应用[J]. 分析化学评述与进展, 2003, 13(7): 874-879.
- [6] 王俊,曾百肇,周性尧. 自组装膜技术在电分析化学中的应用[J]. 分析科学学报, 2000, 16(3): 253-258.
- [7] YANG W, GOODING JJ, HIBBERT D B. Characterisation of gold electrodes modified with self-assembled monolayers of L -cysteine for the adsorptive stripping analysis of copper[J]. J Electroanal Chem, 2001, 516: 10-16.
- [8] SUN Xiang-ying, LIU Bin, WENG Wei-ting, et al. A novel fluorometric detection of Cu^{2+} based on self-assembled bilayers[J]. Talanta, 2004, (62): 35-40.
- [9] SUN Xiang-ying, LIU Bin, JIANG Yun-bao, et al. An extremely sensitive monoboronic acid based fluorescent sensor for glucose[J]. Analytical Chimica Acta, 2004, 515: 285-290.
- [10] 孙向英,翁文婷. 荧光性自组装双层膜的制备及其性能研究[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26: 1030-1034.
- [11] 翁文婷,孙向英. Cu^{2+} 配位桥联作用组建荧光性多层膜[J]. 华侨大学学报:自然科学版, 2005, 26(3): 255-258.
- [12] MICHALKE A, JANSHOFF A, STEINEM C, et al. Quantification of the interaction between charged guest molecules and chemisorbed monothiolated β -cyclodextrins[J]. Analytical Chemistry, 1999, 71: 2528-2533.
- [13] 刘岩松,马培松. 铜色氨酸配合物的伏安特性研究[J]. 山东师范大学学报:自然科学版, 1999, 14(3): 344-346.
- [14] LI Chen-zhong, LIU Ya-li, JOHN H T. Impedance sensing of DNA binding drugs using gold substrates modified with gold nanoparticles[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77: 478-485.

A Novel L -Tryptophan Sensor Based on Electrochemical Impedance

HE Yan-fang, SUN Xiang-ying, LIU Bin

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: With the help of chemical bonding of Au-S, L -cysteine (L -Cys) was assembled onto the gold surface to form L -Cys/Au self-assembled monolayer. Taking advantage of coordinate action of Cu^{2+} with L -cysteine, the Cu^{2+}/L -Cys/Au self-assembled membrane was constructed. The films assembling conditions, electrochemical characteristics, reproducibility and stability are discussed, and the reorganization selectivity for L -tryptophan (L -Try) are also studied. The experimental results showed that the film Cu^{2+}/L -Cys/Au could selectively recognize for L -tryptophan. When Cu^{2+}/L -Cys/Au acted on L -tryptophan, the electrochemical impedance changed, and the self-assembled membrane could selectively recognize L -tryptophan. A novel L -tryptophan sensor based on electrochemical impedance was built up.

Keywords: biosensor; self-assembled membrane; electrochemical impedance; copper ion; L -tryptophan

(责任编辑: 黄仲一)