

DOI: 10.13208/j.electrochem.1311176

Artical ID:1006-3471(2014)05-0439-05

Cite this: *J. Electrochem.* 2014, 20(5): 439-443

Http://electrochem.xmu.edu.cn

孔蛋白-磷脂仿生膜的葡萄糖氧化酶电化学

王琨琦^{1,3}, 张作明^{2*}, 邢巍^{1*}, 刘长鹏¹, 周星³

(1. 中国科学院长春应用化学研究所先进能源实验室, 吉林 长春 130022;

2. 吉林大学分子酶学教育部重点实验室, 吉林 长春 130012; 3. 长春工程学院理学院, 吉林 长春 130012)

摘要: 采用孔蛋白(MspA)和双肉豆蔻磷脂酰胆碱(DMPC)在玻碳(GC)基底表面成功构建有仿生特性的纳米通道膜, 同时将葡萄糖氧化酶(GOD)修饰于膜上. 使用循环伏安法研究 GOD/MspA-DMPC/GC 电极的 GOD 直接电化学过程以及其对氧气和葡萄糖的响应. 研究发现, MspA 与 DMPC 形成的仿生纳米通道膜内, GOD 在接近生物体系 FAD/FADH₂ 标准电位处实现了自身两质子、两电子表面控制的电化学反应. MspA 与 DMPC 的仿生纳米通道膜体系为 GOD 提供了理想活性环境.

关键词: 孔蛋白; 仿生膜; 葡萄糖氧化酶; 电化学; 双肉豆蔻磷脂酰胆碱

中图分类号: O646

文献标识码: A

孔蛋白(MspA)是高脚杯型的八聚体通道蛋白,高脚杯内壁带负电荷外壁带正电荷,疏水与亲水部分高度分别是 3.7 nm 和 5.9 nm,大孔和小孔直径分别为 4.8 nm 和 1.0 nm,孔最狭窄处仅有 1.2 nm,具有耐温、耐 pH 变化及非水体系高稳定性的优点^[1]. 研究报道, MspA 可以修饰于人工 BLM 膜^[2]、云母片^[3]、金电极^[4]、二氧化钛电极^[5]和高温热解石墨电极^[6]等支撑载体上. 磷脂双层膜(BLM)是应用最广泛的细胞膜模拟膜,是固定生物活性物质的理想材料,不仅可保持生物分子的活性,还能有效抑制其它生物分子的非特异性吸附,在跨膜蛋白、仿生膜、水处理和生物传感器等研究领域有着广泛的应用前景^[7]. BLM 有类似于细胞膜的优良生物相容性,但其稳定性差,且电绝缘. 将 BLM 固定于支撑载体或对 BLM 进行修饰可有效改善上述缺点^[8-9]. 1991 年, Salamon 通过固体支撑的 BLM 实现了蛋白质的直接电化学反应^[10]. 目前已可将 GOD、细胞色素 C 氧化酶、脲酶等固定于 BLM 内构成酶传感器^[11]. 酶固定化过程中,自身性质改变的可能原因包括活性中心氨基酸残基的变化,二、三、四级结构及表面电荷的变化,周边环境的变化等等^[12]. 基于上述考虑,将 MspA 固定于 BLM 内,以期改变酶的

自身结构及周边环境,使酶的电催化性能在固体支撑 BLM 和 MspA 形成的纳米孔道膜内得以充分发挥. GOD 分子是由两条相同多肽链组成的二聚体分子,活性中心为 FAD,分子量为 150~180 kDa,直径约为 7 nm,等电点为 4.3,系生物电化学研究领域中的理想酶之一^[13-14]. 因此,本文在玻碳基底表面制得包含有 MspA 的 BLM,在其上形成了有仿生特性的纳米通道,而后又将 GOD 固定在上述膜内,研究 GOD 在该仿生电极上的直接电化学及对底物氧气和葡萄糖的电催化特性,以期为生物传感器酶的固定提供一个新思路.

1 实验

1.1 试剂与仪器

DMPC 和 GOD (Sigma-Aldrich); 孔蛋白 MspA (吉林大学酶工程实验室); 氯仿, 氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠和葡萄糖均为分析纯. 采用电化学工作站 (CHI602A, 上海辰华) 测试电极电化学性能. 三电极体系由 GOD/MspA-DMPC/GC 工作电极、铂片对电极和饱和甘汞参比电极组成.

1.2 基因工程菌的构建与 MspA 的表达

将 MspA 的基因序列提交序列处理在线软件, 进行密码子使用频率分析. 根据分析结果, 将稀有

密码子替换为大肠杆菌的高频密码子,进而确定最终的孔蛋白基因序列.委托生物技术公司合成上述孔蛋白基因,并将基因构建到质粒 pET22b 中,得到孔蛋白表达载体 pET22b/porin.将该载体转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中,获得基因工程菌 E. coliBL21-porin (DE3).将上述基因工程菌在 LB 培养基中培养至 OD600 为 0.8 时,加入异丙基 β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 至 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,继续培养 4 h,离心 ($8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 20 min) 收集菌体.将菌体悬浮于缓冲液中超声波破碎,然后离心收集上清液,得到 MsPA 的混合溶液.

1.3 GOD/MsPA-DMPC/GC 电极

称 2 mg DMPC 溶解于 1 mL 氯仿中配成 DMPC 膜液.取 $15 \mu\text{L}$ 膜液滴涂于打磨干净并极化的玻碳基底表面,待氯仿挥发后将电极浸于 KCl 溶液中自发形成支撑 BLM,空气干燥后,分别滴加 MsPA 溶液 ($15 \mu\text{L}$, $2 \text{ g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 和 GOD 溶液 ($5 \mu\text{L}$, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 于 DMPC 电极表面, GOD/MsPA-DMPC/GC 电极在冰箱中干燥即可,电极结构示意图如图 1.

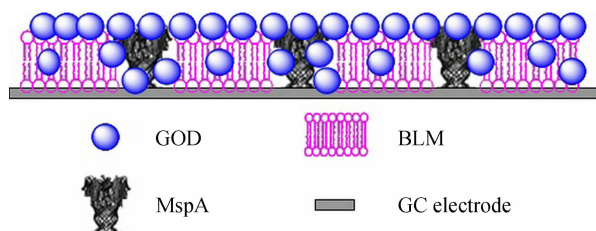


图 1 GOD/MsPA-DMPC/GC 电极结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the GOD/MsPA-DMPC/GC electrode

2 结果与讨论

2.1 MsPA-DMPC 膜的形成

图 2 示出 GC 电极 (a)、DMPC/GC 电极 (b) 和 MsPA-DMPC/GC 电极 (c) (扫描速率为 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$) 在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中的循环伏安曲线.曲线 a 呈现出对应于 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的可逆氧化还原峰,当 DMPC 覆盖于玻碳基底表面,其 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 氧化还原峰电流均明显降低,其电位差值 ΔE_p 大于 GC 电极的 ΔE_p (曲线 b). 这归因于季铵盐磷脂分子处于一种较致密且有序排列的形态,膜内通道关闭, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 难以穿透膜而达电极表面^[8]. MsPA 被

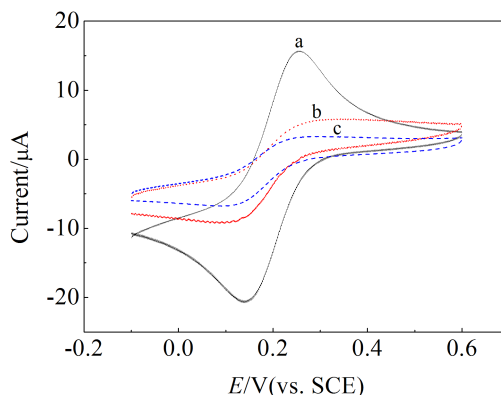


图 2 GC 电极 (a)、DMPC/GC 电极 (b) 和 MsPA-DMPC/GC 电极 (c) 在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中的循环伏安曲线,扫描速率: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

Fig. 2 The cyclic voltammograms of GC electrode (a), DMPC/GC electrode (b) and MsPA-DMPC/GC (c) electrode in $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ the $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ solution, scan rate: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

固定于 DMPC/GC 电极,其 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的氧化还原峰电流更低,其可逆程度介于 DMPC/GC 电极和 GC 电极之间 (曲线 c),表明孔蛋白已存在于 DMPC 膜内,可为电子穿过 DMPC 膜到达电极表面提供通道.

2.2 GOD/MsPA-DMPC/GC 电极的直接电化学

图 3 给出 GOD/MsPA-DMPC/GC 电极于 $20 \sim 200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 扫描速率范围内, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.0) 中的循环伏安曲线.由图可知,随扫描速率的增大, GOD 的氧化还原峰电流明显增加,其电位几乎不发生移动. $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, GOD 的氧化峰电位与还原峰电位分别位于 0.0385 V 与 -0.1290 V 处,电势差 $\Delta E_p = 0.1675 \text{ V}$, 式量电势 $E^0 = -0.0453 \text{ V}$ (0.1969 V , vs. NHE), 该式量电势接近生物体系黄素蛋白 (FAD/FADH_2) 的式量电势 (0 V , vs. NHE)^[15], 这可能是 GOD 与孔蛋白-磷脂仿生膜相互作用的结果. 在 $20 \sim 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 扫描速率范围内, GOD/MsPA-DMPC/GC 电极的氧化、还原峰电流均与扫描速率成正比 (线性方程: Pa: $y = 0.0324 + 0.0076x$, $r = 0.9948$; Pc: $y = -0.0462 - 0.0077x$, $r = 0.9984$), 该电极反应系典型的表面控制过程 (见图 3 内插图).

2.3 电解液 pH 值

图 4 是 GOD/MsPA-DMPC/GC 电极在 pH 2.00

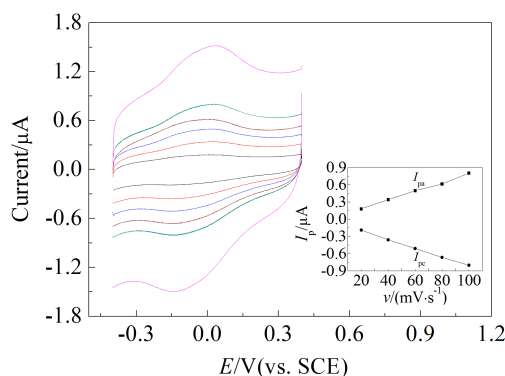


图 3 GOD/MspA-DMPC/GC 电极在 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液 (pH 7.0) 中的循环伏安曲线, 扫描速率 $20 \sim 200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (由内而外). 插图: 扫描速率 $20 \sim 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, 氧化峰电流 (I_{pa}) 和还原峰电流 (I_{pe}) 与扫描速率 (v) 的关系

Fig. 3 The cyclic voltammograms of the GOD/MspA-DMPC/GC electrode in $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.0), scan rate: $20 \sim 200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (from the inside out). Inset: during $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ to $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, oxidation peak current (I_{pa}), reduction peak current (I_{pe}) vs. scan rate (v)

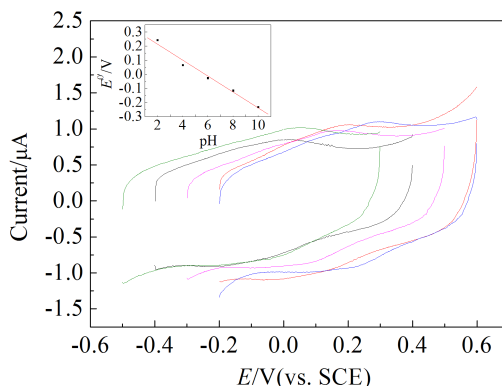


图 4 GOD/MspA-DMPC/GC 电极在 pH 2.00 (a)、4.00 (b)、6.00 (c)、8.00 (d) 和 10.00 (e) $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲溶液中的循环伏安曲线, 扫描速率: $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. 插图: 式量电位 (E^0) 与 pH 的关系

Fig. 4 The cyclic voltammograms of the GOD/MspA-DMPC/GC electrode in pH 2.00 (a), 4.00 (b), 6.00 (c), 8.00 (d) and 10.00 (e) $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS, respectively, scan rate: $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Inset: formal potential (E^0) vs. pH

(a)、4.00 (b)、6.00 (c)、8.00 (d) 和 10.00 (e) PBS 缓冲溶液 ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中的循环伏安曲线. 由图 4 可知, 在各种 pH 值的 PBS 缓冲溶液中, 均可观察到归属于 GOD/MspA-DMPC/GC 电极 GOD 的 1 对稳定氧化还原峰, 随 pH 值由 2.00 增至 10.00, 其氧化峰电位和还原峰电位均发生负移, 且其式量电位 E^0 与电解液 pH 值呈良好线性关系 (图 4 内插图), 其斜率为 $-56.39 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$, 此值与可逆电化学反应的理论值 ($-58.50 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$)^[16] 相近, 说明 GOD/MspA-DMPC/GC 电极的 GOD 发生直接电化学反应其包含着 2 个质子和 2 个电子的传递. 若将上述经循环伏安扫描后的 GOD/MspA-DMPC/GC 电极移置于另一 pH 值电解液中作循环伏安测试后, 再移回原 pH 值的电解液, 其循环伏安曲线与原来的相同, 表明该电极的阳极峰电位和阴极峰电位与电解液 pH 值变化也是可逆的.

2.4 GOD 电催化活性

图 5 示出 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 扫描速率时, GOD/MspA-DMPC/GC 电极在氧气饱和 (a)、空气饱和 (b) 以及氮气饱和 (c) $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.0) 缓冲溶液中的循环伏安曲线. 氮气饱和时, 曲线有 1 对清晰、几乎对称的氧化还原峰 (曲线 c), 这可归属于 GOD 活性中心的 FAD/FADH₂. 缓冲溶

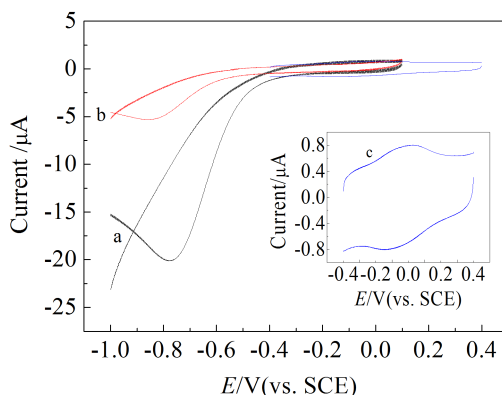


图 5 GOD/MspA-DMPC/GC 电极在被氧气饱和 (a)、空气饱和 (b) 以及氮气饱和 (c) $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.0) 缓冲溶液中的循环伏安曲线

Fig. 5 The cyclic voltammograms of the GOD/MspA-DMPC/GC electrode in $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.0) saturated with oxygen (a), air (b) and nitrogen (c), scan rate: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

液被空气饱和时, 曲线 b 氧化峰消失, 还原峰电流略有增大, 说明 GOD/MspA-DMPC/GC 电极的 GOD 电催化氧气还原生成水^[17]. 而缓冲溶液被氧气饱和时, 曲线出现巨大还原峰电流 (曲线 a), 氧气浓度的增大, GOD 电催化氧气还原生成的水量增加. 为了进一步证实 GOD/MspA-DMPC/GC 电极

GOD 的电催化活性, 还考察了该电极对葡萄糖响应. 图 6 是 GOD/MspA-DMPC/GC 电极在氧气饱和 和 0(a)、4.55(b) 和 $8.33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (c) 葡萄糖的 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.0) 缓冲溶液的循环伏安曲线. 由图 6 可知, 随葡萄糖浓度由 $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增至 $8.33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其还原峰电流明显减小, 与文献^[4] 报道相一致. GOD/MspA-DMPC/GC 电极上的 GOD 参与了葡萄糖酶促反应, 使得 GOD 与氧气的反应受到一定程度抑制. GOD/MspA-DMPC/GC 电极对氧气与葡萄糖的响应均表明在孔蛋白-磷脂仿生膜中 GOD 的电催化活性得以充分保持.

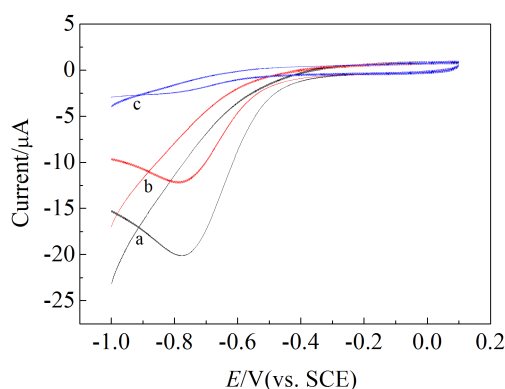


图 6 GOD/MspA-DMPC/GC 电极在氧气饱和 和 0(a)、4.55 (b) 和 $8.33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (c) 葡萄糖的 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.0) 缓冲溶液中的循环伏安曲线

Fig.6 The cyclic voltammety curves of the GOD/MspA-DMPC/GC electrode in $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.0) saturated with oxygen and contained 0 (a), 4.55 (b) and $8.33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (c) glucose, respectively

3 结 论

在破碳基底表面成功制得了孔蛋白-磷脂仿生膜, 与单纯的双层磷脂膜相比, 该仿生膜更有益于电子的传输. 孔蛋白-磷脂仿生膜内 GOD 于较正电势处 (vs. NHE) 完成其自身的直接电化学, 其归因于孔蛋白-磷脂仿生膜提供了有利于 GOD 发挥生物学功能的周围环境. 这种由 GOD 和孔蛋白-磷脂仿生膜共同修饰的电极有望拓宽酶生物传感器和酶生物燃料电池的应用.

参考文献(References):

[1] Perera A S, Wang H W, Shrestha T B, et al. Nanoscopic surfactant behavior of the porin MspA in aqueous media

[J]. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2013, 4: 278-284.
 [2] Engelhardt H, Heinz C, Niederweis M A. Tetrameric porin limits the cell wall permeability of mycobacterium smegmatis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(40): 37567-37572.
 [3] Basel M T, Dani R K, Kang M, et al. Direct observation of gold nanoparticle assemblies with the porin MspA on mica [J]. ACS Nano, 2009, 3(2): 462-466.
 [4] Worner M, Niebler S, Gogritchiani E, et al. Nanoarray-surfaces by reconstitution of the porin MspA into stabilized long-chain-lipid-monolayers at a gold-surface[J]. Electroanalysis, 2006, 18(19/20):1859-1870.
 [5] Perera A S, Subbaiyan N K, Kalita M, et al. A hybrid soft solar cell based on the mycobacterial porin MspA linked to a sensitizer-viologen diad[J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(18): 6842-6845.
 [6] Bossmann S H, Janik K, Pokhrel M R, et al. Reconstitution of a porin from mycobacterium smegmatis at HOPG covered with hydrophobic host layers[J]. Surface and Interface Analysis, 2004, 36(2):127-134.
 [7] Zhang Z L (张治磊), Wang Z N (王志宁), Gao X L (高学理), et al. Progress in supported phospholipid bilayers[J]. Progress in Chemistry (化学进展), 2012, 24(5): 852-861.
 [8] Tong Y H (佟月红). Electrochemistry study on mimetic biomembrane[D]. Changchun: Changchun Institute of Applied Chemistry Chinese Academy of Sciences, 2001.
 [9] Luo L Q (罗立强). Biomembrans and their application in electrochemical biosensor[D]. Changchun: Changchun Institute of Applied Chemistry Chinese Academy of Sciences, 2000.
 [10] Salamon Z, Tollin G. Cyclic voltammetric behavior of [2Fe-2S] ferredoxins at a lipid bilayer modified electrode [J]. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1992, 27(3): 381-391.
 [11] Gao H (高红), Luo G A (罗国安). Electrochemical properties of bilayer lipid membranes and their applications in biosensors[J]. Journal of Analytical Science (分子科学学报), 2002, 18(1): 70-73.
 [12] Li W J (李文娟), Yuan R (袁若), Chai Y Q (柴雅琴). Progress on immobilized technique of enzyme and nano-materials-based electrochemical enzyme biosensor [J]. Chemical Sensors (化学传感器), 2011, 31(2): 1-10.
 [13] Wang K, Yang H, Zhu L, et al. Direct electron transfer and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on glassy carbon electrode modified with Nafion and mesoporous carbon FDU-15[J]. Electrochimica Acta, 2009, 54 (20): 4626-4630.
 [14] Wang K, Yang H, Zhu L, et al. Direct electrochemistry

- and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on glassy carbon electrode modified by Nafion and ordered mesoporous silica-SBA-15[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 58(1/4): 194-198.
- [15] Wang J Y(王镜岩), Zhu S G(朱圣庚), Xu C F(徐长法). *Essential Biochemistry (生物化学教程)*[M]. Beijing: Higher Education Press (高等教育出版社), 2008: 348-349.
- [16] Liu S, Ju H. Reagentless glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized on colloidal gold modified carbon paste electrode[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, 19(3):177-183.
- [17] Hui J, Cui J, Xu G, et al. Direct electrochemistry of glucose oxidase based on nafion-graphene-GOD modified gold electrode and application to glucose detection [J]. *Materials Letters*, 2013, 108: 88-91.

Electrochemistry of Glucose Oxidase Modified on Porin-Phospholipid Biomimic Membrane

WANG Kun-qi^{1,3}, ZHANG Zuo-ming^{2*}, XING Wei^{1*}, LIU Chang-peng¹, ZHOU Xing³

(1. *Laboratory of Advanced Power Sources, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China*; 2. *Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering of Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130012, China*; 3. *School of Science, Changchun Institute of Technology, Changchun 130012, China*)

Abstract: Biomimic membrane with nano-channels, which is made up of porin MspA and 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) is constructed on glassy carbon substrate, and glucose oxidase(GOD) is modified on it. The direct electrochemical reaction and electrocatalytic behavior to oxygen and glucose of GOD on the GOD/MspA-DMPC/GC electrode are expounded by the cyclic voltammetric method. The study shows that GOD immobilized on MspA and DMPC biomimic membrane displays direct and surface-controlled electrochemical reaction nearby formal potential (E^0) of the flavoprotein active centre (FAD/FADH₂), and the electrochemical reaction contains two electrons and two protons exchange in 0.1 mmol·L⁻¹ phosphate buffer solution (PBS, pH 7.0). Furthermore, it is also discovered that, GOD immobilized on MspA and DMPC biomimic membrane possesses an excellent bioelectrocatalytic activity for the reduction of O₂ and the oxidation of glucose. That is to say, the biomimic nano-channels membrane formed by MspA and DMPC provides an ideal living environment for GOD. So, the GOD/MspA-DMPC/GC electrode can be utilized in biosensor and biofuel cell in the future.

Key words: porin; biomimic membrane; glucose oxidase; electrochemistry; 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine