

研究简报 ·

文章编号: 1006-3471(2001)03-0372-05

生物电极的原位 FTIR 反射光谱研究

董飒英^{*1}, 赵广宇¹, 高玉柱¹, 陈光章¹, 吕鸣祥²

(1. 七二五研究所青岛分部, 山东 青岛 266071; 2. 天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要: 利用原位 FTIR 反射光谱对介体型酶电极、酶免疫电极进行了研究. 通过不同电极电位下的电位差谱和同一电位不同状态下的单光束光谱之差, 确定并解析了葡萄糖氧化酶(GOD)和葡萄糖的特征谱峰. 同时, 还初步研究了酶免疫电极的红外吸收特征.

关键词: 酶电极; 酶免疫电极; 原位 FTIR 反射光谱

中图分类号: O 646

文献标识码: A

原位光谱电化学是在保持研究体系原有环境的基础上, 从分子水平研究电极/溶液界面上吸附物、双电层以及邻近扩散层的物种的特征. 酶电极的研究历史悠久, 发展迅速, 但酶免疫电极的研究大多数局限于军事部门和机构, 它的主要困难在于抗原、抗体等生物大分子在电极表面固定化的量极少, 以致由于免疫反应引起的响应信号极其微弱而难以检测. 将酶促反应引入免疫测定而形成的酶免疫电极, 既具有酶的化学放大作用, 又具有免疫反应分子识别的特异性, 使电极的响应信号得以提高. 本文利用现场 FTIR 反射光谱, 对生物大分子活性物质 GOD 在电极表面的电化学过程进行了探讨, 评价了酶与电极之间的电荷传递过程, 同时也为原位 FTIR 反射光谱开辟了一个新的研究领域.

1 实验

1.1 仪器与电解池体系

采用 Nicolet 730 FTIR 仪进行原位 FTIR 反射光谱测定. 电极的电化学氧化在 Model 370 电化学系统上完成.

电解池为三电极体系. 研究电极为玻碳电极($\varnothing 5$ mm), 辅助电极为铂片, 参比电极为饱和甘汞电极(SCE). 文中所指电极电位均相对于 SCE. 所有实验均以 0.1 mol/L pH5.6 醋酸-醋酸钠缓冲溶液为支持电解质. 电解液通高纯氮除氧.

电解池的详细结构及实验程序见文献[1]. 所得谱图为电极表面附近物质的差谱, 即

$$R/R = [R(E_2) - R(E_1)] / R(E_1) \quad (1)$$

收稿日期: 2001-01-13; 修订日期: 2001-4-10

* 通讯联系人 Tel: 0532-5841120; Fax: 0532-5826553; E-mail: qdlysmri@public.qd.sd.cn.

基金项目: 厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室资助项目

$$\text{或} \quad R/R = [R'(E) - R(E)]/R(E) \quad (2)$$

式(1)表示在电位 E_1 和 E_2 下与电极相对应的单光束光谱 $R(E_1)$ 与 $R(E_2)$ 之差. 式(2)表示在同一电位 E 下, 该电极在两种不同状态下的单光束光谱 $R'(E)$ 与 $R(E)$ 之差. 差谱中负向谱峰表示在 E_2 或 R' 状态下对红外的吸收比在 E_1 或 R 状态下的吸收强; 正向谱峰则表示在 E_1 或 R 状态下的红外吸收比在 E_2 或 R' 状态下的吸收强. 本文中生物电极的红外测试均重复两遍, 以确保谱图的准确性.

1.2 实验试剂

葡萄糖氧化酶(GOD, E. C. 1. 1. 3. 4, 23800U/g) 为美国 Sigma 化学公司产品, 二甲氨基甲基金二茂铁(介体)为美国 Aldrich 化学公司产品, 人绒毛膜促性腺激素(HCG)抗原与抗体由中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所提供. 实验中所有试剂均为分析纯, 溶液均用二次蒸馏水配制.

1.3 生物电极的制备

玻碳电极经 3[#] ~ 6[#] 金相砂纸打磨, 再经 Al_2O_3 粉抛光, 于超声波清洗池中清洗 5 min 在 2.5 % $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 与 10 % HNO_3 混合液中于 +2.2 V 下阳极氧化 40 s, 并在支持电解质中于 -0.8 V ~ +0.8 V 范围内以 20 mV/s 速度电位扫描 30 min, 然后将电极浸入含 GOD 6 g/L 的支持电解质中 10 min, 即制得酶电极. 将酶电极浸入 2.5 % 戊二醛溶液中 10 min, 再置于 8 g/L HCG 抗体溶液中, 反应 30 min, 即制得酶免疫电极.

2 结果与讨论

图 1 是在 0.6 V 电位下, 电极表面耦联 GOD 前后的单光束光谱之差. 新峰的出现是 GOD 红外吸收的结果, 所以 GOD 的特征谱峰位于 $1\,248\text{ cm}^{-1}$, $1\,181\text{ cm}^{-1}$, $1\,152\text{ cm}^{-1}$. 由于 GOD 的分子量高达 15 万, 结构复杂, 含有多种官能团, 这对谱峰的指认有一定困难. 可以认为 $1\,248\text{ cm}^{-1}$ 是由于蛋白质中 OCN 和与 N-H 基团的混合振动的结果^[2]. $1\,181\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,152\text{ cm}^{-1}$ 是由于 C-O-C 链的面外弯曲振动所致. 图 2 示出了酶电极在不同电极电位下的单光束差谱, 由图可见, 随着电极电位的升高, 表征酶特征峰的 $1\,248\text{ cm}^{-1}$, $1\,181\text{ cm}^{-1}$, $1\,152\text{ cm}^{-1}$ 峰强度基本不变. 这说明在 -0.7 V ~ +0.6 V 范围内, 电极电位的变化并未改变 GOD 在电极表面的吸附状态及其构型, 也意味着共价结合在玻碳电极上的 GOD 很难与电极发生直接的电荷传递, 特别是在除氧的支持电解质中. 图 3 是酶电极于支持电解质中加入介体和底物(葡萄糖)前后的单光束光谱之差. 图中除 GOD 的特征峰外, 还有葡萄糖的特征峰: 即 $1\,106\text{ cm}^{-1}$, $1\,078\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,034\text{ cm}^{-1}$, 它们来自 C-OH 键的面外弯曲振动^[3]. 随着电极电位升高, 葡萄糖被氧化成葡萄糖酸内酯的量也增加, 从而特征谱峰强度降低. 谱图上的 $1\,728\text{ cm}^{-1}$ 峰是 C=O 伸缩振动所致. 这一谱峰的变化并不明显, 因为在反应物和产物中都有 C=O 的红外吸收, 而且葡萄糖酸内酯的特征吸收就在 $1\,730\text{ cm}^{-1}$ 附近^[4]. 图 3 中 GOD 特征峰的强度随电极电位的升高而降低, 这是因为支持电解质中含有介体和底物, 有酶促反应发生, 随着电极电位升高, 酶促反应加强, 因而改变了酶特征峰的强度. 而在图 1 的实验条件下, 没有酶促反应发生, 表征 GOD 特征峰的强度随电极电位不发生变化. 由此可见, 只要 GOD 发生了氧化还原反应, 其特征峰的强度就会发生变化, 这种变化可能是由于酶促反应导致酶构型改变引起的.

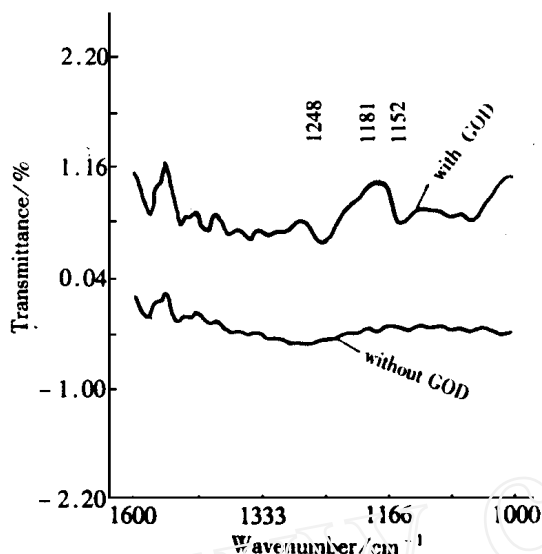


图 1 电极表面耦联 GOD 前后的差谱比较

Fig. 1 The comparison of subtractive spectra for with GOD and without GOD

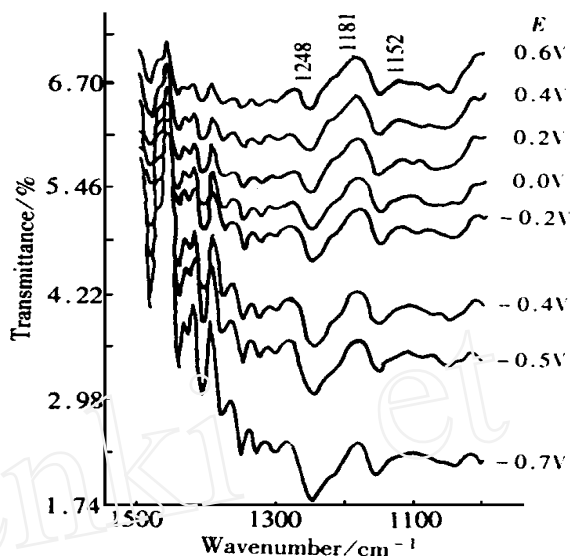


图 2 电极耦联 GOD 前后的光谱随电极电位的变化

Fig. 2 The electrode's spectra of pre- and post-conjunction with GOD at different potentials

为了对免疫反应的红外吸收有所了解,我们将酶免疫电极浸入含 50 IU/L HCG 抗原的支持电解质中,反应 30 min 后测其红外光谱,如图 4 所示.由于此时电极表面发生了免疫反应,形成了抗原-抗体络合物,这种分子量高达 20 万以上的生物大分子络合物,掩盖了电极表面耦联的其它物质的红外吸收,也掩盖了因酶促反应而引起的谱峰的变化,因而谱图上只反映出抗原-抗体络合物的红外吸收.而且,在 0.0 V ~ +0.6 V 范围内不受电极电位变化的影响,经电位差谱处理后,生物分子的特征谱峰消失,谱图中只剩下含介体的支持电解质的红外吸收.

为了证明上述观点,我们又测试了铂电极在含介体的支持电解质中的电位差谱,如图 5 所示,它与图 4 非常相似.根据文献[5,6],介体的特征谱峰应出现在如下位置:(1) 1 279 cm⁻¹ 附近,因 C - N 键伸缩振动所致;(2) 1 377 cm⁻¹ 附近,因 -CH₃ 的对称变形振动所致;(3) 1 418 cm⁻¹ 附近,因五元环上的 C - C 键伸缩振动所致;同时,支持电解质是由醋酸 - 醋酸盐的缓冲溶液构成,它的

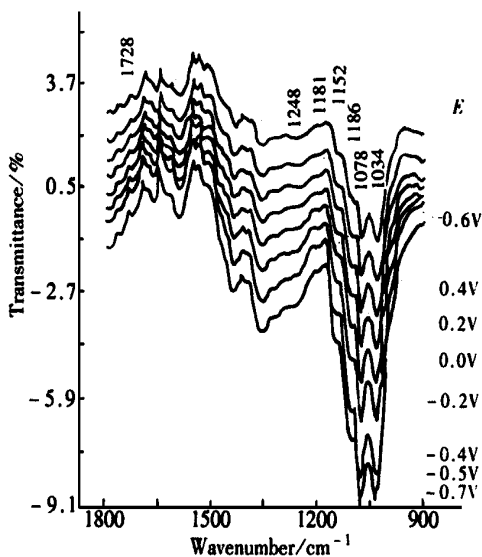


图 3 酶电极在加入介体和底物前后的差谱随电极电位的变化

Fig. 3 The GOD electrode's spectra of absence and presence of mediator and substrate at potentials

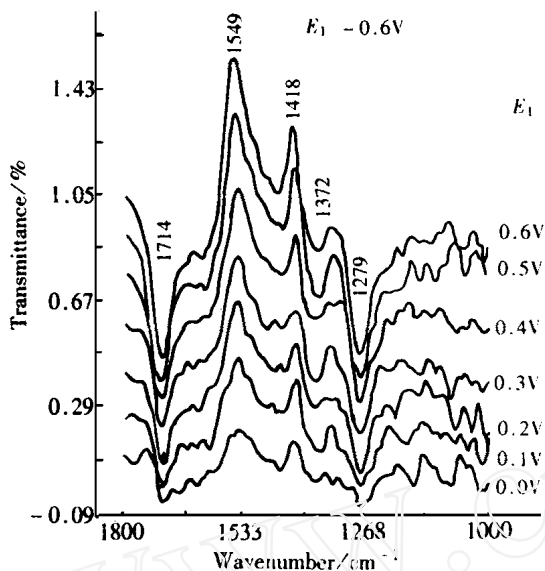


图4 酶免疫电极在介体底物和抗原的溶液中的差谱

Fig. 4 The enzyme-immunoelectrode's spectra in the solution of mediator, substrate, antigen

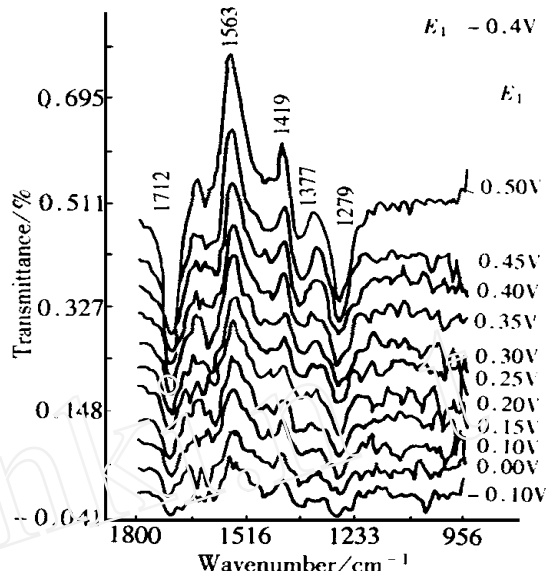


图5 铂电极在介体溶液中的差谱

Fig. 5 The electrode's subtractive in the solution of mediator

差谱吸收峰与介体谱峰有部分重叠^[7]:谱图中的 1553 cm^{-1} 是乙酸钠中 $-\text{COO}^-$ 基的反对称伸缩振动频率,而 $-\text{COO}^-$ 基的对称伸缩振动频率也位于 1418 cm^{-1} 附近; 1712 cm^{-1} 是乙酸中 $-\text{COOH}$ 的伸缩振动频率,乙酸中的 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩和 $\text{O}-\text{H}$ 面外弯曲振动的耦合频率也出现在 1279 cm^{-1} 附近。

3 结 论

共价耦联于玻碳电极表面的 GOD,在 $-0.7\text{ V} \sim +0.6\text{ V}$ 的电位范围内,很难与电极发生 GOD 直接电荷传递;在有介体和底物存在的情况下,酶促反应可能改变酶的构型,从而导致酶特征吸收峰强度的变化.抗原-抗体的络合物耦联于电极表面,当电极电位在 $0.0\text{ V} \sim +0.6\text{ V}$ 范围内变化时对其影响不大,这种络合物还会掩盖电极表面耦联的其他物种的红外特征吸收。

致谢:

本文是作者硕士论文中的部分工作,是在孙世刚教授的直接指导下完成的.作者衷心地感谢孙教授及国重室提供的帮助。

In Situ FTIR Reflection Spectroscopy of Bioelectrode

DONG Sa-ying^{*1}, ZHAO Guang-yu¹, GAO Yuzhu¹,
CHEN Guang-zhang¹, L ÜMing-xiang²

(1. 725 Research Institute Qingdao Branch, Qingdao, 266071 China;

2. Chemical Engineering College of Tianjin University 300072, China)

Abstract: In situ FTIR reflection spectroscopy was used to study mediated enzyme electrode and immunoelectrode. We determined and analyzed IR characteristic spectra of GOD and glucose by the use of potential difference spectra and single beam subtractive spectra. At last, we explored the IR absorption characters of enzyme-immunoelectrode.

Key words: Enzyme electrode, Immunoelectrode, In situ FTIR reflection spectroscopy

References:

- [1] Sun Shigang, Yang Dongfang, Tian Zhaowu. The Study of in situ FTIR reflection spectroscopy for electro-catalysis[J]. Natural Science Progress- The Correspondence of National Key Laboratory (in Chinese), 1991, 1:40.
- [2] Chris W,Brown, Yue Li, John A. Seelenbinder, et al. Immunoassays based on surface-enhanced infrared adsorption spectroscopy[J]. Anal. Chem, 1998, 70:2 991.
- [3] Xie Jingxi. The Application of IR Spectroscopy in Organic Chemistry and Pharmaceutical Chemistry[M]. Beijing:Science Press(in Chinese), 1987. 46 ~ 57, 76 ~ 93.
- [4] Wu Jinguang. Technology and application of modern FTIR[J]. Science Technique Literature Press (in Chinese), 1994:618.
- [5] Jing Xuying, Chen Shili, Yao Enyun. The Practical Guide for IR Spectroscopy[M]. Tianjin:Scientific Technology Press (in Chinese), 1992. 1 ~ 18, 49 ~ 58, 363 ~ 370.
- [6] Dong Qingnian. The IR Spectroscopy[M]. Beijing:Chemical Industry Press. (in Chinese) 1977. 202 ~ 205.
- [7] Cai Duochang, Zhang JiuJun, Lu Juntao, Zha Quanxing. The study of in situ FTIR adsorption spectroscopy for Kolbe reaction on the platinum electrode[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis (in Chinese), 1989, 9 (1):12.