

2002-05-28

Application of Electrochemical Techniques to the Researches in Life Science

Jian-tao PANG

Chun-hai FAN

Gen-xi LI

Recommended Citation

Jian-tao PANG, Chun-hai FAN, Gen-xi LI. Application of Electrochemical Techniques to the Researches in Life Science[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2002 , 8(2): 160-164.

DOI: 10.61558/2993-074X.1452

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol8/iss2/4>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

文章编号:1006-3471(2002)02-0160-05

电化学方法在生命科学研究中的应用

逢键涛,樊春海,李根喜*

(南京大学生物化学系,医药生物技术国家重点实验室,江苏 南京 210093)

摘要: 本文简要介绍作者近两年来采用电化学方法并结合其他现代生物、化学技术,在生命科学几个热点领域所开展的一些工作,主要包括:蛋白质的功能转换、生物信号分子及其与蛋白质的相互作用、生物分子的电子传递、基因检测、结构生物学、生化分析与第三代生物传感器等几个方面。

关键词: 电化学;生物化学;生物物理;生物医学工程

中图分类号: O 646

文献标识码: A

生命现象的许多过程皆伴随着电子传递反应,应用电化学方法研究生物体系的电子传递及其相关过程,是揭示生命本质的较好途径,而生命科学的飞速发展也需要借助更多的研究手段来实现,本文即就近两年来作者运用电化学方法研究生命科学中的一些热点问题,分几个方面作简要详述。

1 蛋白质的功能转换

基于分子生物学技术的基因工程和蛋白质工程是实现蛋白质功能转换的有效手段,但实验中却常常遇到蛋白质的变性、复性等难题。最近的一些研究表明,许多蛋白质通过与脂膜的非共价相互作用可以发生特定的“功能转换”,而膜蛋白则可能通过在膜内形成一些特定的有序分子结构来促进自身的电子传递过程,这意味着蛋白质的电子传递能力与其所处的环境有关。SP 葡聚糖凝胶是蛋白质纯化的一种层析介质,其表面带有很多磷酸基,它与蛋白质的生物相容性比较好。作者将 SP 葡聚糖凝胶固定到热解石墨表面以形成一个膜环境,然后用电化学方法、紫外—可见光谱、傅立叶红外光谱和扫描电子显微镜对包埋在膜内的血红蛋白进行研究^[1]。结果表明,血红蛋白在膜内的电子传递能力以及这种载氧蛋白的过氧化酶活性均有明显提高,实验测量的表观米氏常数为 1.9 mmol L^{-1} ,而此前报道的一种基于辣根过氧化物酶的过氧化氢传感器的表观米氏常数为 4.8 mmol L^{-1} ,说明经过功能转换的血红蛋白,其过氧化物酶活性是很强的。

血红蛋白在其他膜上的酶活性也被发现。作者将血红蛋白包埋于修饰在热解石墨电极上

收稿日期:2001-12-18

* 通讯联系人, Tel: (+86-25)-3593596

基金项目:国家自然科学基金(30070214)资助项目

的蒙脱土膜内,研究发现,它不仅对双氧水具有酶样的催化活性,而且对三氯醋酸(一种环境污染物)也表现出类似于酶的催化性质^[2]。在裸电极上三氯醋酸的直接电化学还原电位约 - 1.258 V(vs. NHE),而用血红蛋白-蒙脱土膜修饰的热解石墨电极在含有三氯醋酸的缓冲溶液中进行循环伏安测试,则于 0.027 V 处出现相应其催化峰,比三氯醋酸直接还原电位约移正 1.3 V,可见此时三氯醋酸电还原反应的活化能大大降低了。

另外血红蛋白在卵磷脂膜内,对一氧化氮的还原也具有类似酶的催化作用。一氧化氮在裸电极上的还原电位是 - 1.1 V(vs. NHE),而在血红蛋白-卵磷脂膜上,还原电位为 - 0.34 V,表观米氏常数 $0.255 \text{ mmol L}^{-1}$ ^[3]。

2 生物信号分子及其与蛋白质的相互作用

一氧化氮是研究得较多的一种生物信号分子,它参与许多生理过程,例如神经传导、血小板凝聚、巨噬细胞功能和血管扩张等。其中,一氧化氮与血红蛋白的相互作用尤为引人注目。例如:细胞外血红蛋白消耗一氧化氮及由此引起的血管扩张很可能导致轻微高血压。血红蛋白与一氧化氮之间的相互作用虽然已有许多光谱、动力学方面的研究,但其相互作用机制至今尚未清楚。作者应用电化学手段研究这一相互作用,得到许多有意义结果^[4,5]。将 DNA-血红蛋白修饰电极在含有一氧化氮的醋酸缓冲液中作电化学扫描,循环伏安图上除显示血红蛋白本身的一对氧化还原峰外,还出现两个新峰,分别位于血红蛋白氧化还原峰的前后。研究表明,一氧化氮可使亚铁血红蛋白在结合氧的状态下氧化,并进入亚铁血红蛋白的血红素环部分,使铁卟啉和氧之间的配位键断裂,从而产生了高铁血红蛋白。这一化学反应与电极上血红蛋白电子传递过程相偶联,从而产生了位于血红蛋白氧化还原峰之前的前峰(0.172 V(vs. NHE))。进一步研究证明,位于 - 0.442 V 的后峰乃为一氧化氮的电催化还原峰。随着一氧化氮浓度的增加,血红蛋白氧化还原峰峰高减少,而前、后峰高度增加,表现出一种明显的电催化特征。

这一方法还可应用于蛋白质与其它一些信号分子、蛋白质与配体以及蛋白质之间相互作用的研究。

3 生物分子的电子传递

生物体内蛋白质电子传递能力的调控是其电子传递过程的关键课题,实验表明,血红蛋白需要保持亚铁形式以维持其输氧生理功能。因此,尽管血红蛋白包含着四个可作为电子传递中心的血红素,但其电子传递活性在生理状态下是受抑制的。而在某些情况下,机体又要求激活其电子传递活性。由此而言,生物体对于血红蛋白是否进行或在何时发生氧化还原反应有着精确的调控机制。对此,作者应用电化学方法进行了探索^[6]。通过“溶剂工程”得知,生物体对血红蛋白电子传递能力的生理调节(激活或抑制),一部分是通过改变血红蛋白周围环境的介电常数来实现的。比如当生物体内需要血红蛋白电子传递能力增大的时候,血红蛋白分子的周围微环境在某种机制的调解下,介电常数增大,血红蛋白的三级结构发生轻微改变,从而促进了蛋白质对电子的传递作用,发挥一定的生物学功能。运用“溶剂工程”的理论,也可以进一步探索蛋白质直接电化学方法,研究如何通过改变介电常数来达到增强蛋白质在电极表面电子传递能力的目的。

4 基因检测

基因检测技术广泛地应用于疾病诊断和治疗、药物筛选、基因多态性分析及基因组研究、

给药个性化研究等等,它将为人类认识生命的起源、遗传、发育与进化,为人类疾病的诊断、治疗和防治开辟全新的途径,为生物大分子的全新设计、药物开发中先导化合物的快速筛选和药物基因组学研究提供技术支撑平台。

最常见的基因检测方法是 Southern Blotting,但该法采用放射性元素 ^{32}P 或 ^{125}I ,带有潜在的危险,虽可利用各种荧光标记探针解决这一问题,但标记过程单调,而且需要很高的分离技巧。PCR 扩增检测技术是另外一种方法,它具有很高的灵敏度,但常会出现假阳性或假阴性反应。至于光学、石英晶体微天平、化学力显微镜等这些方法也都各有优缺点。尽管目前电化学方法在基因检测的应用还比较少,但它的快速、精确、价廉、容易小型化等优点必定会在这一领域崭露头角。

电化学方法主要是依据所加电活性指示剂与 DNA 单、双链作用的不同进行识别。它能快速检测特定 DNA 序列及突变,成本低,易于集成化和自动化。根据检测方式的不同,分为伏安法、计时电位法及电致化学发光法。作者尝试用电化学方法对 Cecropin CM4 基因进行检测^[7]。利用示差脉冲伏安技术,结果表明,当 ssDNA/ cysteine/ Hoechst33258 修饰电极检测到 Cecropin CM4 基因后,电化学响应的峰电流可增加 46 nA,清楚地显示了对该基因的检测,是一种具有潜在应用价值的基因检测方法。另一方面,因为检测基因时,无需在检测样品中再加入其他试剂,真正做到电化学方法的简单、快速及灵敏。

5 结构生物学

结构生物学是生命科学的前沿领域之一,其研究手段主要是 X-ray 衍射和 NMR。鉴于这一领域的重要性,其发展极为迅速并吸引了越来越多研究者的注意,各种新手段被尝试应用到这一领域。

本小组用电化学方法,结合现代生物化学技术,对来源于好氧革兰氏阴性菌透明颤菌中的血红素类蛋白的结构与功能进行探索,取得了初步结果。此蛋白含有两个亚基,每个亚基带有一个血红素环。在不修饰的热解石墨上,可以得到蛋白质的一对氧化还原峰。这对于蛋白质电子传递机理和第三代生物传感器的研究研制具有潜在意义。另一方面,蛋白质折叠机制是远未解决的生物学重大课题。作者采用电化学方法,对血红蛋白、细胞色素 C 的去折叠过程进行研究,得到一些有价值的信息。并获得了有关蛋白质变性、变构以及电子传递能力、氧化还原性质与表面活性剂、各种变性剂之间关系的许多实验结果。

6 生化分析与第三代生物传感器

继第一、二代电化学生物传感器的飞速发展以后,生物大分子的直接电分析以及第三代生物传感器的研制早已引起广泛兴趣。

血红蛋白在铂电极上的吸附行为不利于蛋白质电化学及其结构、功能研究。但通过对循环伏安曲线积分,可得出表面电荷密度与蛋白质浓度之间的良好线性关系,从而实现了血红蛋白痕量测定的直接电化学分析^[8],这对于临床诊断具有重要意义。作者在银电极上观察到 DNA 的直接电化学响应,可用于检测 DNA、RNA 的含量,方法直接、简便、快速^[9]。本小组还制作了几种基于蛋白质-SDS、蛋白质-DNA、蛋白质-硅藻土、蛋白质-蒙脱土、蛋白质-葡聚糖凝胶、蛋白质-卵磷脂膜等无媒介体型 NO、H₂O₂ 传感器^[10~13]。这些传感器制作简便、生物相容性好、

检测范围和检测下限都较为满意. 比如, 基于血红蛋白-蒙脱土膜制作的 H_2O_2 传感器, H_2O_2 的检测下限达到 $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, 测量范围从 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 直到 $1.6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. 在血红蛋白-卵磷脂膜上, 一氧化氮的检测下限为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, 经过换算, 它完全可用于单个细胞内的一氧化氮浓度的检测.

总之, 电化学方法已应用在生命科学研究领域. 随着生命科学在 21 世纪的迅速发展以及生物学、医学、纳米技术、表面科学、超分子体系与电化学的交叉融合, 电化学将在生命科学研究中发挥更加积极的作用^[14~17].

Application of Electrochemical Techniques to the Researches in Life Science

PANG Jian-tao, FAN Chun-hai, LI Gen-xi *

(Dept. of Biochem. and National Key Lab. of Pharmaceutical Biotechnology,
Nanjing Univ., Nanjing 210093, China)

Abstract: The research work of our group in the last two years is briefly reviewed in this paper. By using electrochemical method, and combining some other chemical and biological techniques, lots of achievements have been obtained. And these researches are towards some hot topics in life science, such as function conversion, interaction between signal molecules and proteins, electron-transfer of biomolecules, gene detection, structural biology, biochemical analysis and the third generation biosensors.

Key words: Electrochemistry, Biochemistry, Biophysics, Biomedical engineering

References:

- [1] Fan C H, Wang H Y, Sun S, et al. Electron transfer reactivity and enzymatic activity of hemoglobin in a SP sephadex membrane[J]. Anal. Chem., 2001, 73: 2 850.
- [2] Fan C H, Zhuang Y, Li G X, et al. Direct electrochemistry and enhanced catalytic activity for hemoglobin in a sodium montmorillonite film[J]. Electroanalysis, 2000, 33(14): 1 156.
- [3] Fan C H, Pang J T, Shen P P, et al. Nitric oxide biosensors based on Hb/phosphatidylcholine films[J]. Analytical Science, 2002, 18: 129.
- [4] Fan C H, Chen X C, Li G X, et al. Direct electrochemical characterization of the interaction between haemoglobin and nitric oxide[J]. PCCP, 2000, 2: 4 409.
- [5] Fan C H, Li G X, Zhu J Q, et al. A reagentless nitric oxide biosensor based on hemoglobin-DNA films[J]. Analytica Chimica Acta, 2000, 423: 95.
- [6] Fan C H, Wagner G, Li G X. Effect of dimethyl sulfoxide on the electron transfer reactivity of hemoglobin[J].

Bioelectrochemistry, 2001, 54:49.

- [7] Fan C H, Li G X, Gu Q R, et al. Electrochemical detection of cecropin CM4 gene by single stranded probe and cysteine modified gold electrode[J]. Anal. Lett., 2000, 33(8): 1 479.
- [8] Fan C H, Hu X F, Li G X, et al. Adsorptive behavior of hemoglobin at a platinum electrode and its application to the determination of proteins[J]. Anal. Sci., 2000, 16:463.
- [9] Fan C H, Song H Y, Hu X F, et al. Voltammetric response and determination of DNA at a silver electrode[J]. Anal. Biochem., 1999, 271:1.
- [10] Fan C H, Suzuki I, Chen Q, et al. An unmediated hydrogen peroxide sensor based on a hemoglobin- SDS film modified electrode[J]. Anal. Lett., 2000, 33(13): 2 631.
- [11] Fan C H, Wang H Y, Zhu D X, et al. Incorporation of horseradish peroxidase in a kieselguhr membrane and the application to a mediator-free hydrogen peroxide sensor[J]. Anal. Sci., 2001, 17:273.
- [12] Wang H Y, Guan R, Fan C H, et al. A hydrogen peroxide biosensor based on the bioelectrocatalysis of hemoglobin incorporated in a kieselguhr film[J]. Sensors and Actuators, 2002, 84:204.
- [13] Fan C H, Gao Q X, Zhu D X, et al. An unmediated hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin incorporated in a montmorillonite membrane[J]. The Analyst, 2001, 126:1 086.
- [14] Li G X, Chen L, Zhu J Q, et al. Histidine modified electrode and its application to the electrochemical studies of hemeproteins[J]. Electroanalysis, 1999, 11(2):139.
- [15] Fan C H, Li G X, Zhu D X, et al. Redox reactions of cytochrome c facilitated by imidazole-silver complex[J]. Chinese J. Chem., 2000, 18(1):115.
- [16] Li G X, Gu Q R, Zhu J Q, et al. Preparation of polyaniline modified electrode for the electroanalysis of heme proteins[J]. Anal. Lett., 1999, 32(13): 2 545.
- [17] Fan C H, Li G X, Zhuang Y, et al. Iodide modified silver electrode and its application to the electroanalysis of hemoglobin[J]. Electroanalysis, 2000, 12(3):205