

• 研究简报 •

## 基于自组装多层膜的葡萄糖表面等离子体共振传感器

羊小海 黎振华 王青 王柯敏\*

(湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室 生物医学工程中心  
生物纳米与分子工程湖南省重点实验室 长沙 410082)

**摘要** 利用伴刀豆球蛋白A和糖类的特异性相互作用, 研制了葡萄糖表面等离子体共振传感器. 传感器的敏感膜是构建于金膜表面的伴刀豆球蛋白A/葡聚糖自组装多层膜. 在葡萄糖的存在下, 该自组装多层膜被分解, 引起表面等离子体共振信号的显著变化, 信号变化的大小与葡萄糖的浓度相关. 结果表明, 利用该传感器可以选择性地检测  $0.1\sim 50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度范围内的葡萄糖, 且敏感膜可以多次再生使用.

**关键词** 表面等离子体共振; 伴刀豆球蛋白A; 葡聚糖; 葡萄糖

## A Glucose-Selective Surface Plasmon Resonance Sensor Based on Self-assembled Multilayers

YANG, Xiao-Hai LI, Zhen-Hua WANG, Qing WANG, Ke-Min\*

(State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, Biomedical Engineering Center, Hunan University;  
Key Laboratory for Bio-Nanotechnology and Molecular Engineering of Hunan Province, Changsha 410082)

**Abstract** A glucose-selective surface plasmon resonance sensor was constructed by using specific interaction between concanavalin A and sugars. The sensing element was self-assembled multilayers of concanavalin A and dextran formed on gold film. In the presence of glucose, the self-assembled multilayers were disintegrated. As a result, the surface plasmon resonance signal was changed evidently. The signal changes were correlative to the concentration of glucose. The results showed that this sensor could detect the glucose selectively in the range of  $0.1\sim 50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , and the sensing element could be regenerated for several times.

**Keywords** surface plasmon resonance; concanavalin A; dextran; glucose

表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)传感技术是一种对金属薄膜表面介电常数(或折射率)变化非常敏感的分析方法, 能够实时、灵敏地获取分子间相互作用的信息, 已经在生物分子相互作用分析、高灵敏检测、药物筛选与研究等多个领域得到广泛应用<sup>[1~4]</sup>. 一般来说, 其工作过程是首先将探针固定在金膜表面, 然后捕捉样品中的目标物. 检测这一过程中金膜的 SPR 信号变化, 就可以获取探针和目标物相互作用的信息, 如结合常数、目标物浓度等. 然而, 这一方法在检测低

分子量的目标物( $M_r < 1000$ )时遇到了困难, 因为小分子引起的 SPR 信号变化较小<sup>[5,6]</sup>.

提高仪器的信噪比是解决这个问题最为直接的方法, 如 BIAcore 2000 型 SPR 仪可以检测分子量低至 180 的分析物<sup>[5]</sup>, 然而仪器价格比较昂贵. 更多的是改进传感体系来提高小分子与探针相互作用时的 SPR 信号变化. 例如, Pitner 等<sup>[7]</sup>利用金膜表面固定化蛋白质的构象变化来检测钙离子; Matsui 等<sup>[8]</sup>通过胶体金的信号放大作用检测了多巴胺. 利用竞争反应是提高小分子检测灵

\* E-mail: kmwang@hnu.cn; Tel.: 0731-8821566; Fax: 0731-8821566.

Received October 9, 2006; revised January 14, 2007; accepted February 27, 2007.

国家重点基础研究发展规划(No. 2002CB513110)、科技部国际合作重点项目(No. 2003DF000039)、国家科技攻关计划(No. 2005EP090026)、国家自然科学基金重大国际合作项目(No. 20620120107)、国家自然科学基金(No. 20475015)资助项目.

敏度的有效方法,常利用高分子量的配体与小分子分析物竞争固定化受体,使高分子量配体在金膜表面浓度发生变化,从而产生较强的 SPR 信号变化<sup>[9,10]</sup>. 还有一种竞争法是首先在金膜上铺一层伴刀豆球蛋白 A-葡聚糖凝胶,当葡萄糖存在时凝胶就会分解,引起 SPR 信号的显著变化<sup>[11]</sup>.

自组装多层膜是一种利用分子自组装技术得到的纳米级多层分子膜,由于其制备简单、性能稳定,并且可以按照预先设计来获得具有特定功能的薄膜,因此在生物传感技术的研究中受到重视<sup>[12-14]</sup>. 在一定条件下,如 pH 值变化,或者是溶液含有能与膜组分结合的物质时,自组装多层膜有可能被分解<sup>[15-17]</sup>. 本文利用自组装多层膜的这些特点,通过伴刀豆球蛋白 A (Concanavalin A, Con A)和糖类的特异性相互作用,研制了一种新的葡萄糖 SPR 传感器. 该传感器的敏感膜是铺展在金膜表面的伴刀豆球蛋白 A/葡聚糖自组装多层膜. 在葡萄糖的存在下,由于葡萄糖与葡聚糖竞争结合 Con A 分子,膜结构被破坏分解. 这一过程可以引起 SPR 信号的显著变化,从而间接地得到葡萄糖的浓度. 结果表明,利用该传感器可以选择性地检测 0.1~50 mmol·L<sup>-1</sup> 浓度范围内的葡萄糖,且敏感膜可以多次再生使用.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

试剂: 脘胺盐酸盐(Aldrich), 伴刀豆球蛋白 A (Con A, Sigma), 葡聚糖 T500 (Dextran, Pharmacia), 16-巯基十六酸(16-MHDA, Aldrich), 环氧氯丙烷(Aldrich), 二甘醇胺(AEE, Aldrich), 二乙二醇二甲醚(diglyme, Fluka), *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS, Acros organics), [*N*-乙基-*N*-(3-二氨基丙基)]碳二亚胺(EDC, Nacalai Tesque INC), 其他试剂如无特别说明则为国产分析纯试剂. 实验用水均为二次蒸馏水; 缓冲溶液为 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的 Tris-HCl (pH=7.4).

仪器: SPR 光谱由本实验室组装的基于波长调制的 SPR 传感装置测得<sup>[18]</sup>. 该传感装置主要由卤钨灯、平行光管、偏振片、光阑、等腰直角棱镜(BK7 玻璃)、微流通池、光栅和 CCD 组成, 波长范围为 300~760 nm, 波长分辨率为 0.1 nm. 实验所用金膜厚 50 nm, 真空蒸镀于 1 mm 厚 BK7 玻片表面, 通过折射率匹配油固定在棱镜底面上. 在该 SPR 传感装置中, 卤钨灯发出的光经平行光管及偏振片之后成为 *p* 偏振光, 然后以一定的角度入射棱镜, 经金膜反射后通过光栅分光, 再被 CCD 接受, 经计算机处理之后即成 SPR 光谱.

### 1.2 敏感膜——Con A/葡聚糖自组装多层膜的制备

金膜在表面修饰前依次用 Pirahan 溶液(体积比为

3 : 1 的浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的混合溶液, 具有强腐蚀性, 取用时应注意安全)、丙酮、无水乙醇和二次水清洗.

#### 1.2.1 共价固定 Con A 制备自组装多层膜

金膜洗净安装在 SPR 仪上, 先通入 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 脘胺盐酸盐溶液反应 2 h, 然后用 2.5% 戊二醛溶液活化 1 h, 再通入 0.84 mg/mL 的 Con A 溶液反应 1 h, 最后用 1 mol·L<sup>-1</sup> 甘氨酸反应 30 min 以封闭残余的醛基, 即得 Con A 单层膜(图 1A). 在此基础上, 交替通入 32 mg/mL 葡聚糖和 0.84 mg/mL 的 Con A 溶液(均反应 30 min, 每次更换溶液前均用缓冲液冲洗), 即得 Con A/葡聚糖多层膜(图 1B, C).

#### 1.2.2 共价固定葡聚糖制备自组装多层膜

按文献[19,20]方法将葡聚糖共价固定于金膜表面: 在洁净的金膜表面, 先加入 5 mmol·L<sup>-1</sup> 16-MHDA 反应 12 h, 然后用 1 : 1 的 50 mmol·L<sup>-1</sup> 的 NHS 和 200 mmol·L<sup>-1</sup> 的 EDC 混合液活化 10 min, 加入 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 二甘醇胺反应 4 h, 再加入 0.6 mol·L<sup>-1</sup> 环氧氯丙烷反应 4 h, 最后加入 300 mg/mL 的葡聚糖反应 20 h, 即得葡聚糖单层膜. 把制得的膜安装在 SPR 仪上, 交替通入 0.84 mg/mL 的 Con A 和 32 mg/mL 葡聚糖溶液(均反应 30 min, 每次更换溶液前均用缓冲液冲洗), 即得 Con A/葡聚糖多层膜(图 1D).

### 1.3 葡萄糖的检测

将修饰好的金膜安装在 SPR 仪上, 通入不同浓度的葡萄糖溶液反应 15 min, 记录 SPR 光谱.

### 1.4 选择性的考察

将修饰好的金膜安装在 SPR 仪上, 通入不同浓度的 *L*-阿拉伯糖、蔗糖、果糖和甘露糖, 记录 SPR 光谱.

### 1.5 敏感膜的再生

检测完毕后, 通入 100 mmol·L<sup>-1</sup> 的葡萄糖反应 30 min, 除去残留的非共价结合的 Con A 和葡聚糖, 然后再交替通入 32 mg/mL 葡聚糖和 0.84 mg/mL 的 Con A 溶液(均反应 30 min), 即重新得 Con A/葡聚糖多层膜.

如无特别说明, 以上操作均在 23 °C 下进行.

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测原理

Con A 是一种植物凝集素蛋白, 在中性 pH 条件下以四聚体的形式存在, 分子量为 104000. Con A 中每一个亚单位含有一个糖残基(如  $\alpha$ -D-甘露糖和  $\alpha$ -D-葡萄糖)的结合位点, Con A 的四聚体结构为糖的结合提供了 4 个结合位点, 蛋白质的两侧各有 2 个. 糖可以通过蛋白

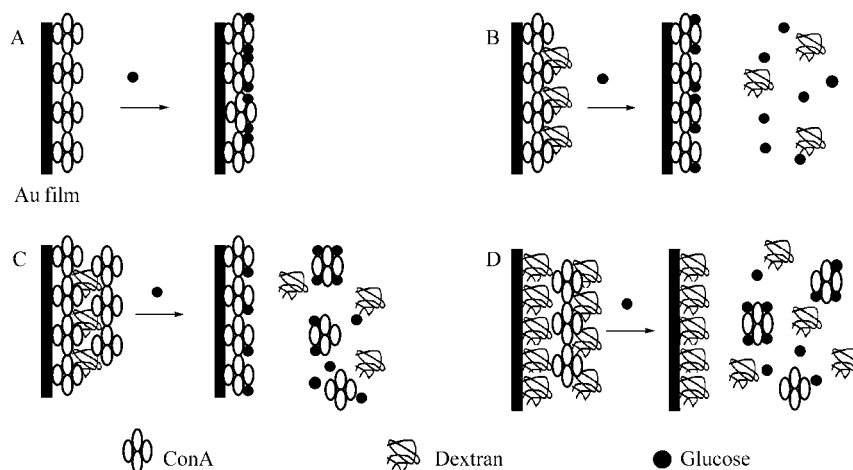


图1 自组装多层膜检测葡萄糖的原理图

(A) Con A 膜; (B) Con A/葡聚糖膜; (C) Con A/葡聚糖/Con A 膜; (D) 葡聚糖/Con A/葡聚糖膜

Figure 1 The scheme of glucose determination based on self-assembled multilayers

(A) Con A layer; (B) Con A/dextran layers; (C) Con A/dextran/Con A layers; (D) dextran/Con A/dextran layers

质一侧的 1 个或 2 个结合位点与 Con A 结合. 葡聚糖是  $\alpha$ -D-葡萄糖通过  $\alpha$ -1,6-苷键相连接形成的多聚物. 因此, 可以通过 Con A 与葡聚糖之间的特异性识别作用来构建自组装多层膜. 样品溶液中的葡萄糖渗入膜中, 与葡聚糖竞争 Con A 上的结合位点, 使得多层膜结构被破坏, 金膜表面结合的物质减少, SPR 光谱发生变化, 从而间接得到样品中葡萄糖的浓度(图 1).

## 2.2 敏感膜的制备

通过在金膜表面共价固定 Con A 和共价固定葡聚糖两种方法制备了图 1 所示的 4 种膜. 在 SPR 仪上监测了组装过程中共振波长的变化(图 2).

共价固定了 Con A 的金膜共振波长为 632.4 nm, 接着组装葡聚糖, 所得 Con A/葡聚糖膜的共振波长为 632.8 nm; 然后再次组装 Con A, 所得 Con A/葡聚糖/Con A 膜的共振波长为 638.4 nm, 在不含葡萄糖的缓冲液中, 30 min 后共振波长仍然稳定(图 2A).

共价固定了葡聚糖的金膜共振波长为 632.0 nm, Con A 在葡聚糖上组装成膜后, 共振波长为 637.4 nm; 然后再组装葡聚糖, 所得葡聚糖/Con A/葡聚糖膜的共振波长为 637.9 nm, 在不含葡萄糖的缓冲液中, 30 min 后共振波长仍然稳定(图 2B).

## 2.3 葡萄糖在不同自组装膜上的检测结果

考察了图 1 所示的 4 种膜在不同浓度葡萄糖存在下的 SPR 光谱变化, 结果如图 3 和 4 所示. 除 A 膜(即 Con A 膜)外, 随着葡萄糖浓度的增加, 共振峰明显向短波方向移动, 说明金膜表面的自组装多层膜被破坏.

A 膜对葡萄糖的响应很小, 这是由于葡萄糖分子量较小, 而且没有任何物质解离下来, 对 SPR 信号的影响小(图 3A).

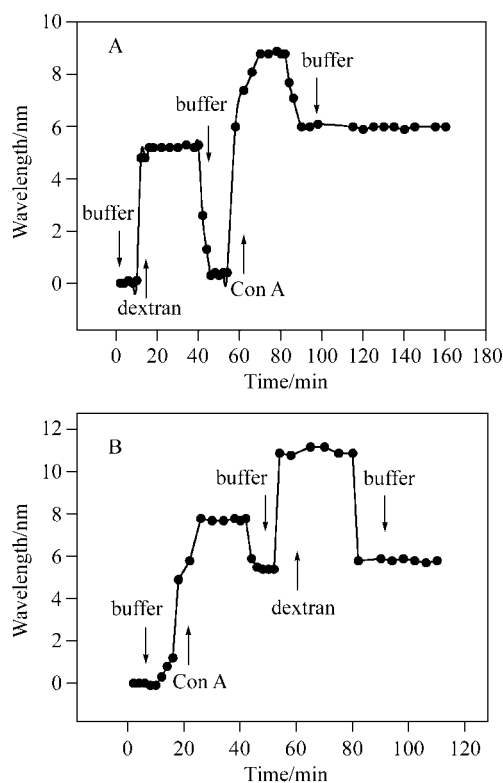


图2 自组装多层膜制备过程中共振波长的变化

(A) 金膜表面共价固定 Con A; (B) 金膜表面共价固定葡聚糖

Figure 2 The change of wavelength shift monitored during the preparation of the self-assembled multilayers

(A) Con A immobilized on Au film; (B) dextran immobilized on Au film

C 膜(即 Con A/葡聚糖/Con A 膜)对葡萄糖的响应大于 B 膜(Con A/葡聚糖膜), 这可能是因为 C 膜中可以分解离开金膜表面的物质更多(图 3B, C).

C 膜和 D 膜(即葡聚糖/Con A/葡聚糖膜), 可以分解

离开金膜表面的物质相同,但是二者对葡萄糖的响应相差较大(图 3C, D). 可能是由于(1)葡聚糖支链比较多,水合半径比较大,空间位阻也较大,影响了葡萄糖与 Con A 的结合;(2)一个葡聚糖分子可以结合很多个 Con A 分子,且多个葡聚糖分子之间交互形成网格结构,使其难以被葡萄糖竞争下来.

葡萄糖浓度在  $0.1 \sim 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内时, C 膜对葡萄糖的响应最为灵敏,后面的实验都是基于这种膜上进行的.

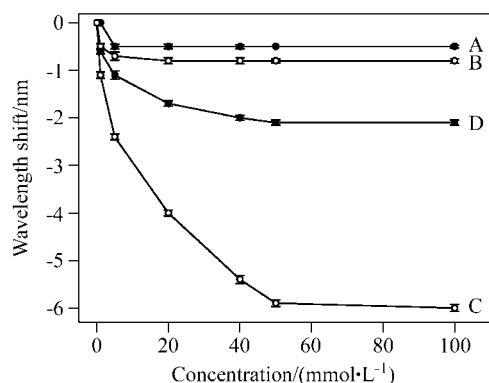


图 3 不同浓度的葡萄糖在自组装膜上的响应曲线

(A) Con A 膜; (B) Con A/葡聚糖膜; (C) Con A/葡聚糖/Con A 膜; (D) 葡聚糖/Con A/葡聚糖膜

Figure 3 The response curves of self-assembled layers to glucose

(A) Con A layer; (B) Con A/dextran layers; (C) Con A/dextran/Con A layers; (D) dextran/Con A/dextran layers

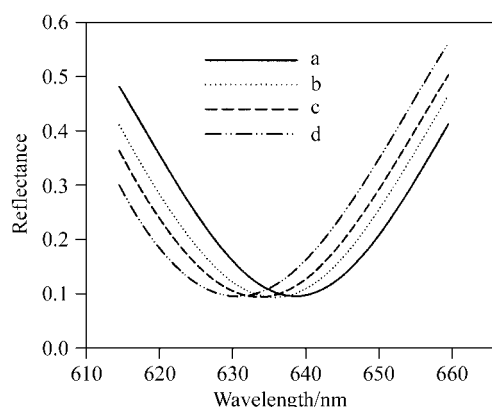


图 4 Con A/葡聚糖/Con A 膜与不同浓度葡萄糖反应后的 SPR 光谱

a~d 分别表示 0, 5, 20, 50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的葡萄糖

Figure 4 The SPR spectra of Con A/dextran/Con A layers under different glucose concentrations

(a) 0; (b) 5; (c) 20; (d) 50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  glucose

## 2.4 传感器的选择性

考察了共存物质的干扰情况,结果表明: L-阿拉伯糖、蔗糖和果糖存在时有微弱的响应信号,而甘露糖产

生的信号与葡萄糖相当(图 5). 这与 Con A 的特异性结合能力是一致的<sup>[21]</sup>,表明传感器的选择性取决于敏感膜中的 Con A.

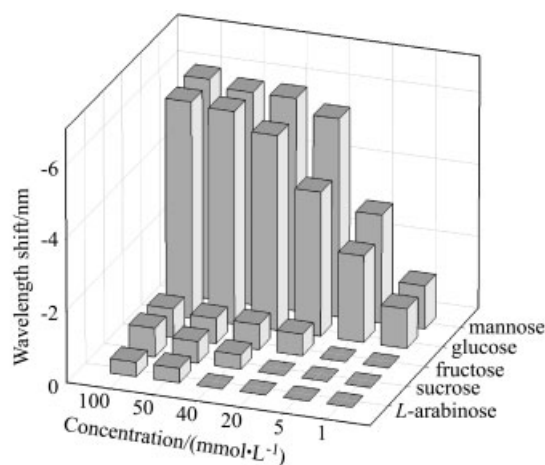


图 5 传感器的选择性

Figure 5 Selectivity of the SPR sensor

## 2.5 敏感膜的再生

敏感膜的重复使用是体现其实用性的重要指标之一. 虽然一定浓度的酸、碱以及高离子强度的溶液可以使敏感膜上吸附的蛋白变性脱落,但是再生后传感器的检测灵敏度下降较快. 本文直接采用  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的葡萄糖实现敏感膜的再生,再生后,我们采用高浓度的葡聚糖进行在线连续组装. 结果表明,按此方法再生使用 14 次,其检测信号仍能达到最初值的 90%,说明这种再生方法能有效保持共价固定的 Con A 的活性,且没有明显的记忆效应.

## 3 结论

本文利用自组装多层膜和竞争反应,制备了能选择性检测葡萄糖的 SPR 传感器,可用于含葡萄糖样品的检测,如医用葡萄糖注射液等. 自组装多层膜的制备简单,经多次再生后膜中的蛋白质(Con A)仍然保持了其生物活性. 如果选择合适的多层膜材料,类似的原理还可以用于构建其它小分子的 SPR 传感器.

## References

- 1 Pei, R.-J.; Cui, X.-Q.; Yang, X.-R.; Wang, E.-K. *Chem. J. Chin. Univ.* **2002**, *23*, 195 (in Chinese). (裴仁军, 崔小强, 杨秀荣, 汪尔康, 高等学校化学学报, **2002**, *23*, 195.)
- 2 Li, Y.; Wark, A. W.; Lee, H. J.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3158.

- 3 Arnell, R.; Ferraz, N.; Fornstedt, T. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1682.
- 4 Lin, A.-H.; Qin, Y.-M.; Zou, G.-L. *Acta Chim. Sinica* **2005**, *63*, 153 (in Chinese).  
(林爱华, 秦艺旻, 邹国林, 化学学报, **2005**, *63*, 153.)
- 5 Karlsson, R.; Stahlberg, R. *Anal. Biochem.* **1995**, *228*, 274.
- 6 Homola, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 528.
- 7 Gestwicki, J. E.; Hsieh, H. V.; Pitner, J. B. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5732.
- 8 Matsui, J.; Akamatsu, K.; Hara, N.; Miyoshi, D.; Nawafune, H.; Tamaki, K.; Sugimoto, N. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4282.
- 9 Chen, S.-H.; Cui, X.-Q.; Yang, F.; Ni, Y.-N.; Yang, X.-R. *Chem. J. Chin. Univ.* **2003**, *24*, 1770 (in Chinese).  
(陈受惠, 崔小强, 杨帆, 倪永年, 杨秀荣, 高等学校化学学报, **2003**, *24*, 1770.)
- 10 Shankaran, D. R.; Gobi, K. V.; Matsumoto, K.; Imato, T.; Toko, K.; Miura, N. *Sens. Actuators B* **2004**, *100*, 450.
- 11 Ballerstadt, R.; Schultz, J. S. *Sens. Actuators B* **1998**, *46*, 50.
- 12 Pieczonka, N. P. W.; Goulet, P. J. G.; Aroca, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12626.
- 13 Dubas, S. T.; Iamsamai, C.; Potiyaraj, P. *Sens. Actuators B* **2006**, *113*, 370.
- 14 Yang, M.-H.; Li, C.-X.; Yang, Y.-H.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. *Acta Chim. Sinica* **2004**, *62*, 502 (in Chinese).  
(阳明辉, 李春香, 杨云慧, 沈国励, 俞汝勤, 化学学报, **2004**, *62*, 502.)
- 15 Inoue, H.; Sato, K.; Anzai, J. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 27.
- 16 Sato, K.; Imoto, Y.; Sugama, J.; Seki, S.; Inoue, H.; Odagiri, T.; Hoshi, T.; Anzai, J. *Langmuir* **2005**, *21*, 797.
- 17 Inoue, H.; Anzai, J. *Langmuir* **2005**, *21*, 8354.
- 18 Yang, X.; Wang, Q.; Wang, K.; Tan, W.; Yao, J.; Li, H. *Langmuir* **2006**, *22*, 5654.
- 19 Löfås, S.; Johnsson, B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1526.
- 20 Sunmook, L.; Victor, H. P. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7204.
- 21 Cai, W.-Q.; Wang, B. *Practical Techniques for Immunocells and Nucleic Acid Hybridization*, Sichuan Science and Technology Press, Chengdu, **1994** (in Chinese).  
(蔡文琴, 王伯, 实用免疫细胞与核酸分子杂交技术, 四川科学技术出版社, 成都, **1994**.)

(A0610097 PAN, B. F.; ZHENG, G. C.)