

基于蛋白质直接电子转移的全胆固醇传感器

万莉, 赵常志, 徐华筠, 王钦, 焦奎

(青岛科技大学化学与分子工程学院, 生态化工教育部重点实验室, 青岛 266042)

摘要 以壳聚糖为载体, 将血红蛋白、胆固醇氧化酶及胆固醇酯酶固定在玻碳电极表面, 在不使用任何电子媒介体的条件下, 利用血红蛋白和电极之间的直接电子转移, 制备出高选择性的全胆固醇生物传感器, 并用于测定血清中总胆固醇含量. 利用循环伏安法和恒电位法研究了该传感器的电化学特性. 在优化的实验条件下, 该传感器对胆固醇响应的线性范围为 10 ~ 110 mg/dL, 检出限为 5 mg/dL (信噪比的 3 倍), 响应时间为 60 s. 对人血清中总胆固醇的测定表明, RSD 小于 6.2%, 回收率为 95% ~ 106%.

关键词 胆固醇传感器; 胆固醇氧化酶; 胆固醇酯酶; 血红蛋白; 壳聚糖

中图分类号 O657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)04-0670-05

生物传感器是当今十分引人注目的一项生物技术, 具有传统化学传感器不可比拟的优势, 如特异性高、灵敏度高、选择性好、价格低廉以及能在复杂体系中进行快速在线连续检测等^[1]. 因而生物传感器在生物医学、环境监测、食品检验及农业等领域展现出十分广阔的应用前景.

胆固醇是人体中最丰富的类固醇, 包括游离胆固醇和胆固醇酯两种形式(合称为总胆固醇^[2]). 血液中胆固醇的检测在临床诊断上十分重要. 血清中正常胆固醇浓度范围是 120 ~ 260 mg/dL (3.1 ~ 6.7 mmol/L). 医学研究表明, 血清高胆固醇水平与心脏病、糖尿病、动脉粥样硬化、肾病综合症及肝胆系统疾病等人类多发病有关^[3], 因而测定血清胆固醇含量已成为临床诊断中一项重要的参考指标, 研究高灵敏、高选择性的胆固醇传感器具有重要的学术意义和应用价值.

血清中总胆固醇的传统测定方法均以分光光度法为基础, 其中包含一些复杂和细致的实验程序, 虽然测试结果稳定可靠, 但测定时间较长, 消耗样品剂量较多且存在测试速度慢、需要专业操作等缺点^[4]. 因此, 发展一种经济、简单、快速、准确测定胆固醇含量的方法是十分必要的. 电化学生物传感器因具有灵敏、迅速、简便等优点而受到越来越多的关注.

在电流型胆固醇传感器中, 一般是通过检测胆固醇氧化酶(ChOx)催化氧化胆固醇生成的 H₂O₂ 来测定胆固醇. 为了在较低电位下选择性地测定 H₂O₂, 人们采用了加入氧化还原媒介体、偶联过氧化歧化酶或利用酶的直接电化学等方法^[5]. 血红蛋白具有过氧化物酶的活性, 对于 H₂O₂ 的还原具有高灵敏度和高选择性, 其直接电化学行为稳定^[6~13]. 壳聚糖具有天然高分子网状结构和良好的生物相容性, 能有效地保持酶的生物活性而不泄漏^[14, 15], 可提高测定的灵敏度、重现性和稳定性. 本文基于血红蛋白的直接电化学, 以壳聚糖为包埋材料, 分别把胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶固定在玻碳电极上, 成功地制备了三酶修饰的全胆固醇传感器. 由于采用较低的测定电位(-0.325 V vs. Ag/AgCl), 能很好地避免抗坏血酸、尿酸等还原性物质的影响. 所制备的全胆固醇传感器已被成功地应用于对血清样品中胆固醇含量的测定.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI 832B 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司); 三电极系统: 以修饰玻碳电极(直径 3.0 mm)

收稿日期: 2008-10-13.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20635020)资助.

联系人简介: 赵常志, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事电化学分析研究. E-mail: zhaocz@qust.edu.cn

为工作电极, Ag/AgCl 电极(3.0 mol/L KCl)为参比电极, 铂丝电极为辅助电极; RT-1904C 半自动生化分析仪(Rayto Life, Analytical Sciences 公司); KLUP-III 型水处理系统(中国康宁仪器公司).

胆固醇氧化酶(ChOx, 650 U/mL, Sigma 公司), 胆固醇酯酶(ChE, 422 U/g, Sigma 公司), 血红蛋白(Hb, $M_w = 66000$, Sigma 公司), 壳聚糖(CS, 脱乙酰度 92%, 大连新碟有限公司), TritonX-100(Sigma 公司); 胆固醇及胆固醇油酸酯(Sigma 公司), 总胆固醇试剂盒(北化康泰公司).

测试底液为含有 0.1 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS). 除氧和保持氮气气氛时均使用高纯氮气. 其它化学试剂均为分析纯, 实验用水为二次去离子水. 所有测定均在 $(25 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 下进行. 血清样品由青岛市某医院提供.

1.2 溶液的配制

壳聚糖溶液的配制: 将一定量的壳聚糖溶于 0.05 mol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液(pH = 4.5)中, 于室温下搅拌 1 h, 得到壳聚糖溶液.

胆固醇油酸酯储备液(200 mg/dL)的配制: 称取 0.05 g 胆固醇油酸酯, 溶解在 1 mL TritonX-100 和 1 mL 异丙醇中, 在约 60°C 下加热溶解, 直到变为透明清澈溶液, 转至 25 mL 容量瓶中, 用磷酸盐缓冲液稀释至刻度, 储存于 4°C 的冰箱中. 工作液为临用前将储备液用底液稀释而成.

1.3 酶电极的制备

(1) 将玻碳电极依次用金相砂纸、 $0.1\ \mu\text{m}$ 和 $0.05\ \mu\text{m}$ Al_2O_3 抛光至镜面, 然后分别在 1:1(体积比)的硝酸、无水乙醇和二次蒸馏水中超声清洗, 干燥备用.

(2) 在 $100\ \mu\text{L}$ 3% 壳聚糖溶液中, 加入 4.0 mg 血红蛋白, 搅拌溶解. 用微量注射器移取 $4\ \mu\text{L}$ 涂膜液滴涂在玻碳电极表面, 将电极垂直放置, 自然干燥后得血红蛋白修饰电极.

(3) 将 $20\ \mu\text{L}$ 胆固醇氧化酶与 $10\ \mu\text{L}$ 的壳聚糖溶液混和搅拌, 用微量注射器移取 $5\ \mu\text{L}$ 混和液滴涂在上述血红蛋白修饰的电极表面, 自然干燥 4 h.

(4) 将 10 mg 胆固醇酯酶溶于 $100\ \mu\text{L}$ 2% 的壳聚糖溶液中, 搅拌溶解. 取 $10\ \mu\text{L}$ 混合液滴涂在上述血红蛋白和胆固醇氧化酶修饰的电极表面, 自然干燥 2 h, 即制得三酶修饰电极. 将该电极置于 4°C 冰箱中保存备用.

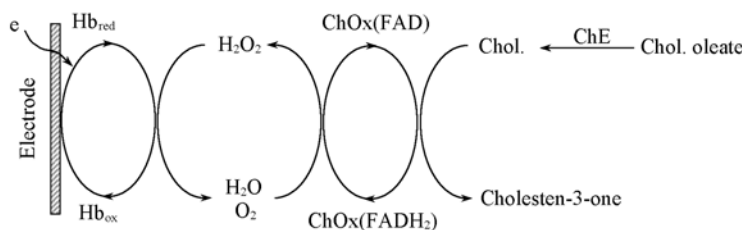
1.4 实验过程

取适量测试样品于电解池中, 插入电极, 控制酶反应时间 1 min, 在一定电位间记录循环伏安曲线, 测量不同样品的伏安特征; 或控制工作电极的极化电位, 记录样品的计时安培曲线, 测量不同样品的电流响应. 对比实验按照试剂盒的说明操作.

2 结果与讨论

2.1 酶电极的检测机理

该传感器的酶反应与电极反应的多步骤反应系统如 Scheme 1 所示. 酯化的胆固醇在 ChE 的作用下水解, 生成游离胆固醇, 游离胆固醇在胆固醇氧化酶的作用下与氧发生氧化还原反应生成 H_2O_2 ^[16,17], 生成的 H_2O_2 被还原态的血红蛋白催化还原, 最后氧化态的血红蛋白(Hb_{ox})在电极上还原, 产生还原电流. 其还原峰电流的大小与溶液中的胆固醇含量成正比, 从而可测量溶液中全胆固醇的含量. 由 Scheme 1 可见, Hb 在整个体系中不仅作为 H_2O_2 的催化剂, 而且还充当了电极反应与酶反应的氧化还原媒介体.



Scheme 1 Scheme of multi-step reaction at biosensor

2.2 酶电极的电化学响应

图1曲线 *a* 和曲线 *b* 分别是在除氧后和溶解氧存在下的 Hb 修饰电极(HE)的循环伏安响应, 对比壳聚糖修饰电极(CSE, 未观察到电化学响应, 曲线 *c*), 曲线 *a* 显示 HE 在 -0.260 和 -0.325 V 处有一对可逆的氧化还原峰, 说明 Hb 被包埋在壳聚糖膜中, 可进行直接电子转移. 在溶解氧存在下(曲线 *b*), HE 只在 -0.325 V 有一个明显的阴极峰, 而阳极峰仅留下一点痕迹, 这是 Hb 催化还原氧的结果, 与文献[18]的结果相同. 图1曲线 *d* 是三酶修饰电极(HCCE)的循环伏安曲线, 阴极峰与 HE 的相同, 而阳极峰在 0.100 V 附近能观察到明显的电流增加. 经除氧后, 该电流值逐渐减少, 最后恢复到除氧后 HE 的状态, 说明该电流是由氧的吸附所引起. 图1曲线 *e* 是在缓冲溶液中加入 H_2O_2 后 HCCE 的电化学响应, 可观察到还原峰电流明显增加, 这是 Hb 催化 H_2O_2 的结果, 显示出典型的酶催化反应的特征.

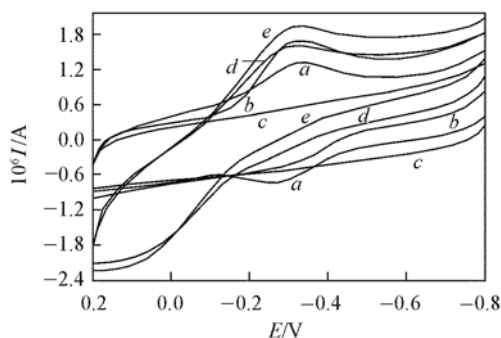


Fig. 1 Cyclic voltammograms at 0.100 V/s in PBS (pH 7.0)

a. HE without oxygen present; *b.* HE; *c.* CSE; *d.* HCCE in the presence of dissolved oxygen; *e.* *d* in the presence of 3.50×10^{-6} mol/L H_2O_2 .

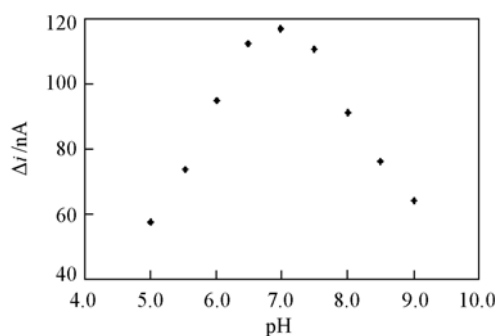


Fig. 2 Current responses of HCCE at various pH values

c (Cholesterol) = 2.50×10^{-4} mol/L. The other experimental conditions are the same as in Fig. 1.

2.3 酶的最佳固载量和 pH 的影响

考察了电极表面壳聚糖负载不同的酶量对胆固醇生物传感器电流响应的影响. 实验结果表明, 固定壳聚糖浓度和涂膜液的量, 增加酶的用量, 电极响应增强. 但当酶的用量超过一定值后, 电流响应基本不变, 这主要是由于敏感膜上酶量过多时, 固载作用弱的酶的相对量增多, 比较容易泄露. 由此可得到酶的最佳用量.

此外, 酶电极的催化活性、测定的灵敏度和稳定性与溶液的 pH、反应温度及测定电位等因素有关. 由于在酶反应体系中存在 3 种酶, 为了最大程度地保持酶的反应速度和活性, 必须确定测定的最佳 pH 值. 实验将 HCCE 放在同浓度的胆固醇标准溶液中, 分别调节 pH 值为 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 和 9.0, 在 -0.325 V 测其响应电流, 结果表明(图2), 缓冲液的 pH 值在 6.5 到 8.5 的范围内具有较高的响应值, 显示在此 pH 范围内酶的活力最高, 稳定性最好; 当 pH 值上升或下降时, 响应变小. 考虑到血液的 pH 呈微碱性, 所以选用 pH 值 7.0 的缓冲溶液. 另外酶的催化活性受温度的影响较大, 使用传感器需要考虑温度的影响. 由于生物传感器一般在室温下使用, 所以实验温度控制为 25 °C.

2.4 酶电极对胆固醇的响应

经上述条件优化得到的胆固醇传感器, 对胆固醇和胆固醇酯有着灵敏快速的响应. 图3(A)为向缓冲溶液中加入不同浓度胆固醇酯获得的 HCCE 伏安曲线, 可见催化电流随着胆固醇酯浓度的增加而增大. 图3(B)是在 -0.325 V 下, HCCE 在加入相同浓度胆固醇后的稳态电流-时间曲线, 可见在加入不同浓度的胆固醇后, 电流在 60 s 后进入相对稳定状态, 且催化电流随着胆固醇浓度的增加而增大. 表明生物酶在壳聚糖包埋的天然网状结构和生物相容性环境中, 能有效地保持和发挥其生物活性. 酶电极的动态响应如图4(A)所示, 电流随着胆固醇酯浓度的增加而增大. 图4(B)为校正曲线, 电流与胆固醇浓度在 $10.0 \sim 110$ mg/dL 的范围内呈线性关系, 相关系数为 0.9965, 检出限为 5.0 mg/dL ($S/N=3$).

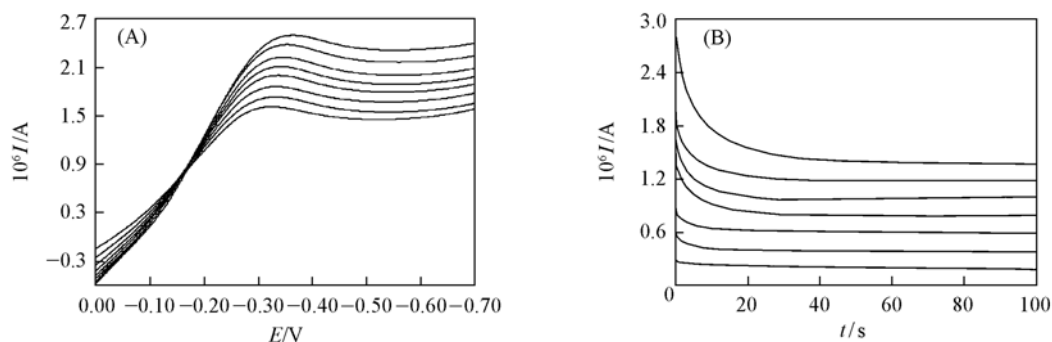


Fig. 3 Linear sweep voltammograms of HCCE in PBS at 0.100 V/s scan rate (A) and the $I-t$ curves (B)

$10^4 c(\text{Cholesterol})/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ from bottom to top: 0, 2.50, 5.00, 7.50, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5.

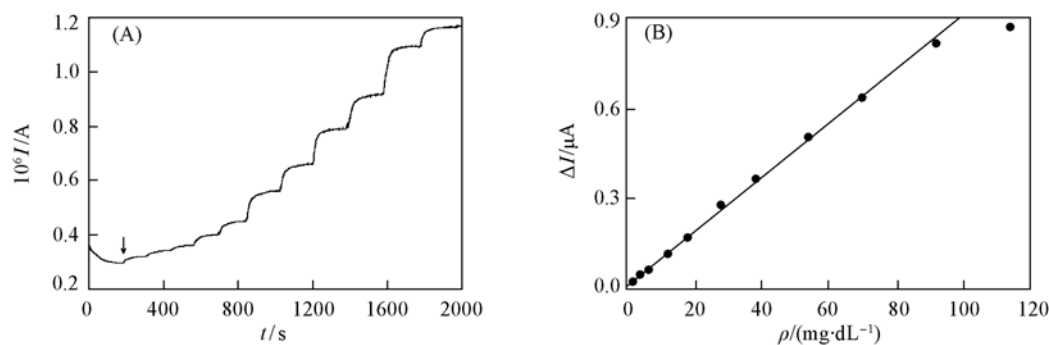


Fig. 4 Typical amperometric response of the biosensor to successive additions of 2, 2, 2, 6, 6, 10, 10, 16, 16, 22 and 22 mg/dL cholesterol ester in PBS (A) and the calibration curve (B)

Applied potential were controlled at -0.325 V .

2.5 传感器的选择性、重现性和稳定性

由于胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶对反应具有较好的特异性, 胆固醇氧化酶对底物的特异性来自于具有 3B 羟基胆固醇的整个支链以及不饱和的甾体。血清中具有类似结构的物质含量很少, 可以忽略不计。而血液中最容易对电极产生干扰的是尿酸和抗坏血酸, 它们的正常含量分别是 $4 \sim 7 \text{ mg/dL}$ 和 $0.4 \sim 0.59 \text{ mg/dL}$ 。配制该范围内的抗坏血酸和尿酸进行试验, 它们分别可以引起 2.3% 和 1.5% 的电流变化, 不干扰对胆固醇的定量检测。

实验还考察了所制备传感器的重现性和稳定性, 结果表明, 对 5.00 mg/dL 胆固醇酯标准溶液进行 5 次平行测定的 RSD 小于 3.5%。在同样条件下用 5 根电极对 5.00 mg/dL 胆固醇酯进行了测定, RSD 为 6.2%。将 HCCE 电极放在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中储存 7 d 后, 其电流为初始测定电流的 96%, 21 d 后电流仍保留了 85%。

2.6 传感器对人血清中全胆固醇的测定

用本法对 6 份人血清样品总胆固醇含量进行的测量结果见表 1。为了避免样品的变质, 在使用前必须用含有 1.0% 的异丙醇和 0.8% 的 TritonX-100 的 $\text{pH} = 7.0$ 的磷酸盐缓冲溶液将样品稀释 5 倍, 在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中加热 5 min, 然后冷却至室温下进行测定, 记录时间-电流曲线, 计算血液样品中胆固醇含量, 同时用标准加入法做回收率实验。结果显示, RSD 小于 6.2%, 回收率为 95%~106%。酶法的对比测定表明, 传感器与其结果的相关性较好。

Table 1 Determination of total cholesterol in human serum sample

Serum sample	Total cholesterol/ $(\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1})$	RSD (%) ($n=7$)	Recovery (%)	Contrasted method/ $(\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1})$
1	196	2.2	103	188
2	203	2.5	95	198
3	155	5.3	106	150
4	169	3.8	101	166
5	244	2.6	98	239
6	147	6.2	105	137

参 考 文 献

- [1] Wilson G. S. , Hu Y. . Chem. Rev. [J], 2000, **100**: 2693—2704
- [2] MacLachlan J. , Wotherspoon A. T. L. , Ansell R. O. , *et al.* . J. Steroid Biochem. Mol. Biol. [J], 2000, **72**: 169—195
- [3] Aravamudhan S. , Ramgir N. S. , Bhansali S. . Sens. Actuators B [J], 2007, **127**(1): 29—35
- [4] Brahim S. , Narinesingh D. , Guiseppi-Elie A. . Anal. Chim. Acta [J], 2001, **448**: 27—36
- [5] Sunil K. A. , Monika D. , Bansi D. . Malhotra. Biosens. Bioelectron. [J], 2008, **23**: 1083—1100
- [6] LI Jian-Ping(李建平), PENG Tu-Zhi(彭图治). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2003, **24**(5): 798—802
- [7] Zhang L. , Jiang X. , Wang E. , *et al.* . Biosens. Bioelectron. [J], 2005, **21**: 337—345
- [8] Qi H. L. , Zhang C. X. , Li X. R. . Sens. Actuators B [J], 2006, **114**: 364—370
- [9] Chen S. , Yuan R. , Chai Y. , *et al.* . Biosens. Bioelectron. [J], 2007, **22**: 1268—1274
- [10] Wang G. X. , Lu H. Y. , Hu N. F. . J. Electroanal. Chem. [J], 2007, **599**: 91—99
- [11] Feng J. J. , Xu J. J. , Chen H. Y. . Biosens. Bioelectron. [J], 2007, **22**: 1618—1624
- [12] Ma G. X. , Lu T H. , Xia Y. Y. . Bioelectrochemistry [J], 2007, **71**: 180—185
- [13] Zhang R. Y. , Wang X. M. , Shiu K. K. . J. Colloid Interface Sci. [J], 2007, **316**: 517—522
- [14] Soga T. T. , Serwe M. M. . Food Chemistry [J], 2000, **69**: 339—344
- [15] WANG Xin(王鑫), WU Zhong-Ming(毋中明), ZHANG Xin-Ge(张新歌), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2008, **29**(4): 851—857
- [16] Allain C. C. , Poon L. S. , Chan C. S. G. , *et al.* . Clin. Chem. [J], 1974, **20**: 470—474
- [17] Fernandez-Romero J. M. , Luque de Castro M. D. , Valcarea M. . Clin. Chim. Acta [J], 1987, **167**: 97—104
- [18] Huang H. , Hu N. , Zeng Y. , *et al.* . Anal. Biochem. [J], 2002, **308**: 141—151

Total Cholesterol Biosensor Based on Direct Electrochemistry of Proteins

WAN Li, ZHAO Chang-Zhi^{*}, XU Hua-Jun, WANG Qin, JIAO Kui

(Key Laboratory of Eco-chemical Engineering, Ministry of Education, College of Chemistry & Molecular Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China)

Abstract A highly selective cholesterol biosensor based on the direct electron transfer of hemoglobin-encapsulated chitosan-modified glassy carbon electrode was developed for the determination of total cholesterol in human serum samples. The enzyme electrode was prepared by immobilization of hemoglobin, cholesterol oxidase and cholesterol esterase in chitosan matrix. The H₂O₂ produced from the catalytic oxidation of cholesterol by cholesterol oxidase was reduced electrocatalytically by immobilized hemoglobin and used for the achievement of sensitive amperometric response to cholesterol. The linear response of cholesterol concentrations was from 10.0 to 110 mg/dL with the correlation of 0.9965, and the detection limit of cholesterol was estimated to be 5.0 mg/dL at a signal/noise ratio of 3. The cholesterol biosensor can efficiently exclude the interference of commonly coexisted ascorbic acid and uric acid. The relative standard deviation was under 6.2% ($n=7$) for the determination of real samples. The biosensor is satisfactory to the determination of human serum samples in comparison with the GPO-PAP method.

Keywords Cholesterol biosensor; Cholesterol oxidase; Cholesterol esterase; Hemoglobin; Chitosan

(Ed. : A, G)