

基于印迹聚吡咯膜电化学传感器检测 S-卵白蛋白的研究

马美湖, 曾齐

(国家蛋品加工技术研发分中心, 华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430070)

摘要: 鉴于蛋清中 S-卵白蛋白的含量与鸡蛋新鲜度和品质有较大相关性, 将 S-卵白蛋白含量作为评价鸡蛋新鲜度和品质的指标具有较大的前景和意义。本文通过循环伏安法和差分脉冲伏安法对传感器制备的扫描圈数、扫描速率、模板洗脱时间和孵化时间进行了优化, 确定最佳扫描圈数为 18, 扫描速率为 100 mV/s, 模板洗脱时间为 1.5 h, 孵化时间为 40 min, 成功制备了能特异性识别 S-卵白蛋白的印迹聚吡咯膜电化学传感器。采用场发射扫描电镜对印迹和非印迹传感器的微观结构进行了表征。通过差分脉冲伏安法, 探讨了不同 S-卵白蛋白浓度与峰电流变化的依赖关系, 确定 S-卵白蛋白浓度在 10^{-6} ~ 10^{-3} mg/mL 范围内时, 浓度与峰电流变化值具有良好线性关系, 并得出检出限为 6.75×10^{-7} mg/mL。该印迹传感器对 S-卵白蛋白具有良好特异性响应, 可用于定量检测 S-卵白蛋白。

关键词: 蛋清; S-卵白蛋白; 聚吡咯; 分子印迹; 电化学传感器

文章编号: 1673-9078(2016)12-329-336

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.050

Electrochemical Sensor Based on Molecularly Imprinted Polypyrrole Film for Detection of S-ovalbumin

MA Mei-hu, ZENG Qi

(National Research and Development Center for Egg Processing, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Since the S-ovalbumin content in egg white has a significant correlation with the freshness and quality of chicken eggs, S-ovalbumin can be considered as a useful indicator for the same. Conditions were optimized using cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) to prepare a molecularly-imprinted polypyrrole (MIPs) sensor that selectively recognizes S-ovalbumin. The optimal scan cycles, scan rate, template extraction time, and incubation time were 18 cycles, 100 mV/s, 1.5 h, and 40 min, respectively. The micro-structure of MIPs and non-MIPs were characterized by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM). DPV was used to evaluate the dependency between different concentrations of S-ovalbumin and changes in peak current. The results showed that the linear response range of MIPs was from 10^{-6} to 10^{-3} mg/mL with a detection limit of 6.75×10^{-7} mg/mL. The MIPs exhibited a selective response to S-ovalbumin, and can therefore be used in the detection of S-ovalbumin.

Key words: egg white; S-ovalbumin; polypyrrole; molecular imprinting; electrochemical sensor

在鸡蛋贮藏过程中蛋清中 N-卵白蛋白(nature ovalbumin)会转化为更加稳定的 S-卵白蛋白(stability ovalbumin), 蛋清在经过 6 个月冷藏后, S-卵白蛋白含量会从 18% 增加到 86%。S-卵白蛋白含量与哈夫单位和蛋黄指数有较高负相关性, 通过 S-卵白蛋白含量增加的程度能评定鸡蛋产出后在特定流通环境下的贮藏时间(等价日龄), 从而对鸡蛋新鲜度与品质给予定性与定量评价。此外, 随着 S-卵白蛋白含量增加, 蛋清

收稿日期: 2016-01-01

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-41-K23); 公益性行业(农业)科研专项(201303)

作者简介: 马美湖(1957-), 男, 教授, 研究方向: 肉类蛋品科学研究

的乳化稳定性、起泡性和凝胶性会有所下降。因此, 将 S-卵白蛋白含量作为评价鸡蛋品质的指标有较好的前景和重大意义^[1,2]。

分子印迹电化学传感器是在电极表面聚合产生分子印迹聚合物, 随后通过电化学信号的变化来监测传感器的特异性识别性能, 此传感器具有响应速度快, 灵敏度高等优点^[3]。在众多的导电聚合物中, 聚吡咯是建立分子印迹体系的最好基质之一, 因为它具有很好的生物兼容性和便捷通道, 以利于多种生物活性物质的固定; 另一方面, 由于引入了含氧基团(如羧基)使正电荷移出聚吡咯骨架, 过氧化聚吡咯能展现更好的选择性^[4,5]。具有电活性物质的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}$

(CN)₆⁴⁺已经普遍地作为电化学检测的探针,模板蛋白去除后,电极表面的聚合物会形成印迹位点,这些位点可以作为通道,允许[Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻从网状聚合物中进出,[Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻在进出过程中会发生氧化或还原,从而产生电化学信号^[6]。通过电化学信号的响应值与蛋白浓度建立线性关系以达到定量目的。

Almira R 和 Arunas R 以牛白血病病毒糖蛋白为模板,以吡咯为单体,通过电聚合在铂黑电极表面形成对病毒糖蛋白具有特异性结合的印迹传感器。随后,通过脉冲安培法(PAD)对含有病毒糖蛋白的样品进行检测,验证分析信号的产生是基于印迹聚吡咯的印迹作用,以光谱光度测量法作为对比。实验证实吡咯可有效用于蛋白质印迹电化学传感器的制备^[7]。Xianwen Kan et al 以牛血红蛋白为模板,以吡咯为单体,在金电极表面形成对牛血红蛋白具有特异性响应的印迹传感器。通过差分脉冲伏安法(DPV)和交流阻抗(EIS),以[Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻为电活性探针,以电流响应值变化为指标,对聚合和洗脱条件进行优化,对传感器结合动力学和特异性识别进行了测定,结果表明传感器有很好的特异性识别能力^[8]。因此,利用分子印迹技术和电化学方法制备出能特异性识别 S-卵白蛋白的印迹聚吡咯传感器是可行的。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 原 料

鸡蛋,海兰褐,武汉市九峰山养鸡场;盐酸、聚乙二醇 8000、氢氧化钠、氯化钾和硫酸亚铁/铁氰化钾(均为 AR,国药集团化学试剂有限公司);三羟甲基氨基甲烷(Tris)(BC,美国 Amresco 公司);SDS-PAGE 试剂盒(武汉谷歌生物科技有限公司);吡咯(GC,上海谱振生物科技有限公司)。

1.1.2 主要仪器与设备

分析天平(AR2140,上海梅特勒-托利多仪器有限公司);磁力搅拌器(85-2,常州国华电器有限公司);电泳仪(DYY-12,北京六一仪器厂);恒温水浴锅(R301,巩义市英峪高科仪器厂);电脑核酸蛋白检测仪和恒流泵(HD-3000 和 HL-2,上海嘉鹏科技公司);差示扫描量热仪(DSC 204 F1,德国耐驰仪器制造有限公司);圆二色谱仪(J-1500 日本 JASCO);Autolab 电化学工作站(PGSTAT204,瑞士万通中国有限公司);玻碳电极(ϕ 3 mm,武汉高仕睿联科技有限公司);铂丝电极(Chi115,上海辰华仪器有限公司);

饱和甘汞电极(232 型,武汉高仕睿联科技有限公司);真空冷冻干燥机(Alpha 1-4 LSC,德国 Christ);日立场发射扫描电镜(SU-8010,日立高新技术公司)。

1.2 试 验 方 法

1.2.1 聚乙二醇沉淀法粗提卵白蛋白

将 250 mL 蛋清与 3 倍体积 0.05 mol/L NaCl 溶液于 4 °C 搅拌 2 h,混合均匀。用 1 mol/L HCl 调节稀释液 pH 值至 6.0 后,向蛋清稀释液中添加 10% (m/m) 的 PEG-8000,磁力搅拌 2 h,使 PEG-8000 充分扩散。然后在 4 °C、15000 r/min 条件下离心 10 min,分别收集沉淀和上清液(4 °C 贮存备用)。

1.2.2 阴离子交换层析法纯化卵白蛋白粗提液

将 Q-Sepharose FF 填料装入层析柱,先将流速调至 3 mL/min,待填料压实后,再调为 2 mL/min,用 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 8.0,含 0.05 mol/L NaCl)缓冲液冲洗 2 h,使填料充分平衡。先使用平衡缓冲液洗去未结合的部分,再依次使用含有 0.08 mol/L、0.18 mol/L 和 0.30 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)进行洗脱。将每个洗脱峰收集,于 4 °C 下蒸馏水透析四次(每次 10 h),然后冷冻干燥,所得样品-20 °C 储存^[9]。通过 SDS 电泳鉴定卵白蛋白纯度。

1.2.3 SDS-PAGE 电泳分析

1.2.3.1 溶液配制

电极缓冲液:称取 Tris 3.03 g,甘氨酸 14.41 g,用双蒸水溶解后,加浓度为 10% 的十二烷基磺酸钠(SDS)溶液 10 mL,定容至 1000 mL,混匀。

固定液:乙醇 250 mL,冰醋酸 50 mL,加蒸馏水至 500 mL。

染色液:0.2 g 考马斯亮蓝 R-250 溶解于 200 mL 脱色液中,使用前摇匀。

脱色液:乙醇 250 mL,冰醋酸 80 mL,加蒸馏水至 1000 mL,混匀。

1.2.3.2 电泳方法

浓缩胶浓度 5%,分离胶浓度 12%,蛋白上样量 5~10 μ g,浓缩胶电压 80 V,分离胶电压 120 V。电泳完成后,先将凝胶在固定液中固定 30 min,然后转移到染色液中染色 30~40 min,最后将凝胶转移至脱色液中,至背景颜色退去。

1.2.4 S-卵白蛋白的制备

将 2.5 g 卵白蛋白溶解于 60 mL 的去离子水中,滴加 1 mol/L NaOH 调整 pH 值为 9.9。溶液置于 55 °C 的恒温水浴锅中,诱导 72 h。诱导后溶液用 0.1 mol/L HCl 中和到 pH=7.0,将上述溶液于 4 °C 进行透析 40 h。蛋白冷冻干燥,置于-20 °C 备用^[10]。

1.2.5 差示扫描量热 (DSC) 分析

将经 0 h 和 72 h 诱导处理的卵白蛋白粉末溶于 0.05 mol/L、pH 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 配制成浓度为 40 mg/mL 的样品, 随后将一定量的卵白蛋白样品加入到低压铝坩埚中, 并压盖封合。分别从 25 °C 加热至 120 °C, 加热速度为 10 °C/min。在进行量热计分析前降低气压进行脱气处理 10 min^[11]。

1.2.6 圆二色谱 (CD) 分析

将经过体外诱导的卵白蛋白溶于 pH=7 的(0.05 mol/L)磷酸缓冲液中, 准确称取一定量的蛋白样品配制成 0.25 mg/mL 蛋白质溶液, 采用 CD 在 190~250 nm 之间扫描, 实验温度 25 °C, 样品池光程为 0.1 mm, 灵敏度为 100 mdeg/cm, 扫描速率为 100 nm/min, 分辨率 0.1 nm, 实验值为 3 次扫描的均值。

1.2.7 S-卵白蛋白印迹膜传感器的制备

电化学聚合采用三电极系统, 玻碳电极作为工作电极, 铂电极作为辅助电极, 饱和甘汞作为参比电极。将玻碳电极用氧化铝粉末 (0.05~1.0 μm) 进行磨光处理, 并在乙醇和蒸馏水中依次超声处理 1 min。随后, 将电极置于含 0.01 mol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 和 0.1 mol/L KCl 的溶液中, 在 -0.2V~+0.6V 电位和 100 mV/s 速率下进行循环扫描, 直至出现稳定的响应曲线, 且峰电位差不高于 80 mV, 即得清洁的玻碳电极。所得玻碳电极用纯氮气吹干以备。

将玻碳电极置于含有 0.05 mol/L 吡咯, 0.1 mol/L KCl 和 1 mg/mL S-卵白蛋白的脱氧水溶液中, 通过循环伏安法, 在扫描电位范围为 -0.20~+1.20 V、扫描速率为 100 mV/s、扫描圈数为 18 的条件下进行电聚合。聚合完成后, 将经聚合物修饰的电极置于 1 mol/L H_2SO_4 溶液中, 在恒温(45 °C)器蒸气浴振荡器里浸泡 1.5 h 以移除模板蛋白。随后将修饰电极置于磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)中, 在电位范围为 -0.6 V~+1.00 V 下扫描 6 圈以使电极上的聚吡咯电化学过氧化, 从而获得 S-卵白蛋白印迹膜传感器。作为对照, 除了在电聚合过程中不加入 S-卵白蛋白之外, 非印迹膜传感器按照同样的处理和制备方法获得。

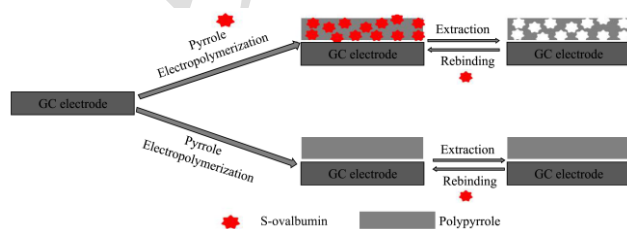


图 1 非/印迹聚吡咯膜电化学传感器制备示意图

Fig.1 Schematic diagram for the preparation of MIPs and non-MIPs

1.2.8 聚合和洗脱条件的优化

1.2.8.1 扫描速率和圈数

扫描速率和圈数分别会影响印迹膜的紧密度和厚度。扫描速率过快会使印迹膜松散和粗糙, 过慢会使印迹膜过于紧密, 影响模板蛋白进入印迹位点。扫描圈数越大, 印迹膜越厚, 厚薄对印迹膜的稳定性和印迹位点的产生有着重要影响。选取扫描速率 40、60、80、100 和 120 mV/s, 扫描圈数 10、13、18、23 和 28 圈, 分别研究它们的变化对电流响应值的影响。

1.2.8.2 模板蛋白洗脱时间

模板蛋白在印迹膜中的残留会对传感器的吸附能力产生影响。在温度 45 °C, H_2SO_4 浓度 1 mol/L, 选取洗脱时间 0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 h, 研究它们的变化对电流响应值的影响。

1.2.8.3 孵化时间

S-卵白蛋白和传感器表面的印迹位点相互作用的时间会影响传感器的电流响应值, 选取孵化时间 0、20、40 和 60 min, 研究孵化时间对电流响应值的影响。其中 S-卵白蛋白浓度为 1.0×10^{-3} mg/mL。

1.2.9 传感器的电化学性能测定和表征

1.2.9.1 形态表征

采用场发射电镜对修饰有印迹膜和非印迹膜的电极表面进行形貌扫描, 并通过 SU-8000 分析器对图像进行分析。

1.2.9.2 电化学性能测定

检测非电活性物质时, 可在测试底液中加入电化学探针如铁氰化钾, 铁氰化钾与目标分子在聚合物膜中存在竞争性识别, 目标分子浓度越大, 铁氰化钾进入膜中的机会越少, 铁氰化钾的峰电流越小, 因此通过铁氰化钾峰电流的大小可间接检测目标分子^[12]。鉴于 S-卵白蛋白电活性较弱, 于是选择 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 电化学活性探针以测定传感器的吸附性能。电极表面聚合物所形成的孔穴能提供 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 从印迹聚合物基质中进出的通道, 从而在电极上发生氧化还原反应, 产生电化学信号。而当传感器吸附了模板蛋白后会堵塞通道, 抑制 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 进入, 从而减弱电化学信号。因此, 所有电化学实验均在含有 0.01 mol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 的磷酸缓冲液 (PB) 中进行, 其中 S-卵白蛋白浓度为 1.0×10^{-3} mg/mL, 采用循环伏安法(CV)、差示脉冲伏安法(DPV)和线性扫描伏安法 (LSV) 来研究传感器在 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 溶液中所产生的电化学信号变化。

2 结果与讨论

2.1 SDS-PAGE 电泳分析

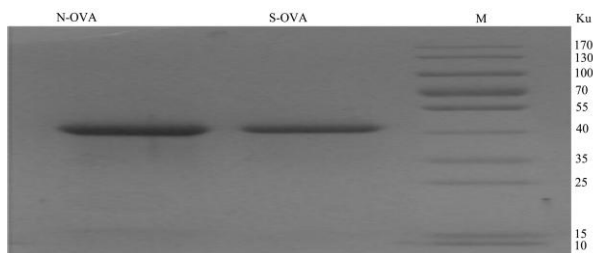


图2 卵白蛋白电泳图

Fig.2 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profile of ovalbumin

图2为所制备的N-卵白蛋白和S-卵白蛋白的电泳纯度鉴定结果，从图中可以看出两种卵白蛋白均为单一条带且分子量约为45ku，即证实获得了较高纯度的卵白蛋白。

2.2 差示扫描量热 (DSC) 分析

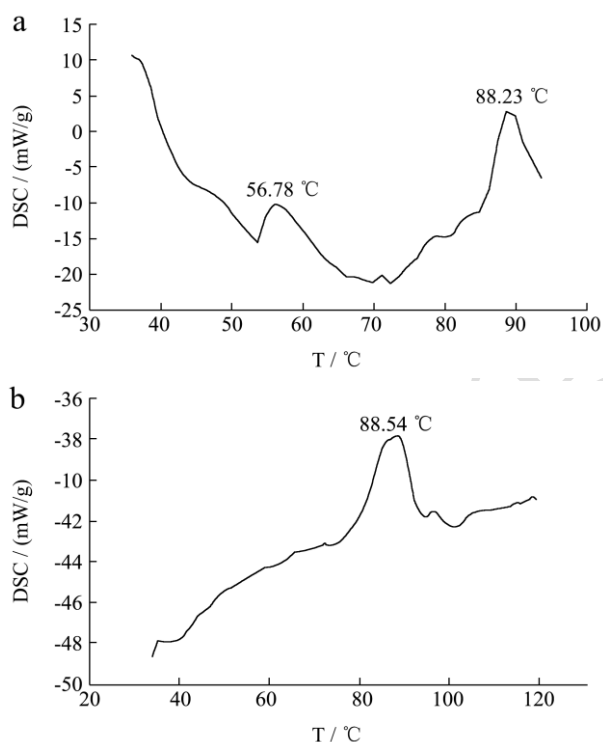


图3 卵白蛋白经0 h (a)和72 h (b)诱导后的DSC图

Fig.3 DSC profiles of ovalbumin after 0 h (a) and 72 h (b) induction

刚产出的新鲜鸡蛋蛋清中的N-卵白蛋白和S-卵白蛋白是共存的，新鲜蛋清的S-卵白蛋白含量约为18%。这两种蛋白的变性温度有一定差异，S-卵白蛋白热稳定性较好，变性温度会更高一些。从图3a可以看出，在56.87 °C和88.23 °C出现了两个吸热峰，分别对应N-卵白蛋白和S-卵白蛋白的变性温度；从图3b可以看出，在88.54 °C出现了一个吸热峰，对应于

S-卵白蛋白的变性温度，证实经72 h诱导后N-卵白蛋白完全转化为S-卵白蛋白。

2.3 圆二色谱 (CD) 分析

表1 卵白蛋白经0 h和72 h诱导后的二级结构含量

Table 1 Secondary structure of ovalbumin after 0 h and 72 h induction

二级结构	α -螺旋/%	β -折叠/%	β -转角/%	无规卷曲/%
0 h	56.10 \pm 3.54	4.10 \pm 1.98	12.90 \pm 0.78	26.90 \pm 0.78
72 h	41.70 \pm 3.87	17.30 \pm 2.33	15.40 \pm 2.89	25.70 \pm 0.78

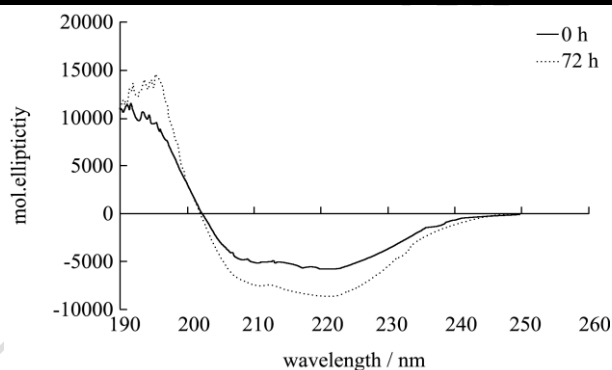


图4 卵白蛋白经0 h(a)和72 h(b)诱导后的CD图

Fig.4 CD profile of ovalbumin after 0 h (a) and 72 h (b) induction

通过紫外可见，圆二色谱，拉曼光谱测定表明，N-S构象的转变会引起 α -螺旋含量的减少和 β -折叠含量的增加，而 β -转角和无规卷曲含量变化不大。从表1中可以看出，二级结构含量基本与前人研究相符^[13]；从图4可以看出两种蛋白的圆二色谱图有较大差异，这也进一步证实72 h诱导后产生了S-卵白蛋白。

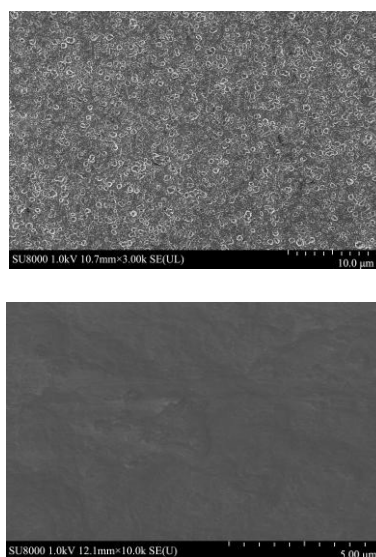


图5 印迹传感器 (a) 和非印迹传感器 (b) 的场发射扫描电镜图

Fig.5 FE-SEM profiles of MIPs (a) and non-MIPs (b)

2.4 传感器形态表征

一般来说,吡咯在电聚合过程中会形成平整、光滑且致密的薄膜^[14]。从图 5 中可以看出印迹膜和非印迹膜形貌图有很大差异,在制备印迹膜的过程中,吡咯电聚合时由于掺杂了 S-卵白蛋白,膜表面会相当粗糙,说明产生了多孔结构,这有利于印迹位点的形成,而非印迹膜表面则光滑无孔穴。

2.5 聚合和洗脱条件的优化

为了获得更有效的电化学印迹传感器,本实验对电聚合扫描圈数、扫描速率、移除模板时间和孵化时间进行了优化。

扫描圈数和扫描速率是影响印迹聚合膜形成的两个重要因素,主要影响膜的厚度和紧密度。从图 6a 可以看出,随着扫描圈数的增加,电流变化值(不存在模板蛋白质和存在模板蛋白质所引起电流的差值)逐渐增加,这归因于刚开始圈数的增加会促进更多印迹位点的形成。在第 18 圈达到最大值,之后逐渐下降,这是由于印迹膜变厚使得内部的蛋白质无法洗脱下来,从而减少了印迹位点的产生,于是本实验选择 18 圈作为电聚合时的扫描圈数。从图 6b 可以看出,随着扫描速率的增加,电流变化值在逐渐下降,在扫描速率达到 100 mV/s 时出现最大电流变化值。这是由于低扫描速率会使得形成的聚合膜过于紧密,不利于模板蛋白的洗脱,而高扫描速率会使得形成的聚合膜较薄且松散,故选择 100 mV/s 作为最合适扫描速率。对于形成与待测蛋白能特异性结合的印迹位点来说,从印迹膜表面移除模板蛋白显得至关重要。

模板蛋白作为脆弱的大分子,在较为极端的条件下很容易变性,如高温,酸性和碱性都会引起蛋白质构象的变化。本实验将印迹聚合膜置于 1 mol/L H₂SO₄ 溶液中,45 °C 下搅拌一段时间,可使得蛋白质因变性而与聚吡咯的结合能力减弱,从而脱落下来。从图 6c 可以看出,洗脱时间在 1.5 h 时电流值达最大,可作为最合适洗脱时间。所制备的印迹传感器因形成了印迹位点而具有多孔结构,正是由于这些多孔结构使得传感器对待测蛋白具有特异性响应。鉴于蛋白质作为大分子,传质速度会相对小分子来说比较慢,于是进行了印迹传感器对待测蛋白的吸附动力学实验。从图 6d 可以看出,在前 40 min,随着蛋白质吸附在传感器上,引起了传感器电流响应值的下降,这是由于蛋白质具有较弱的电活性且阻碍了电活性探针 [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ 进入传感器表面的离子转移通道,从而减弱了传感器的导电性;在 40 min 时,传感器对蛋白质

的吸附基本达到饱和。

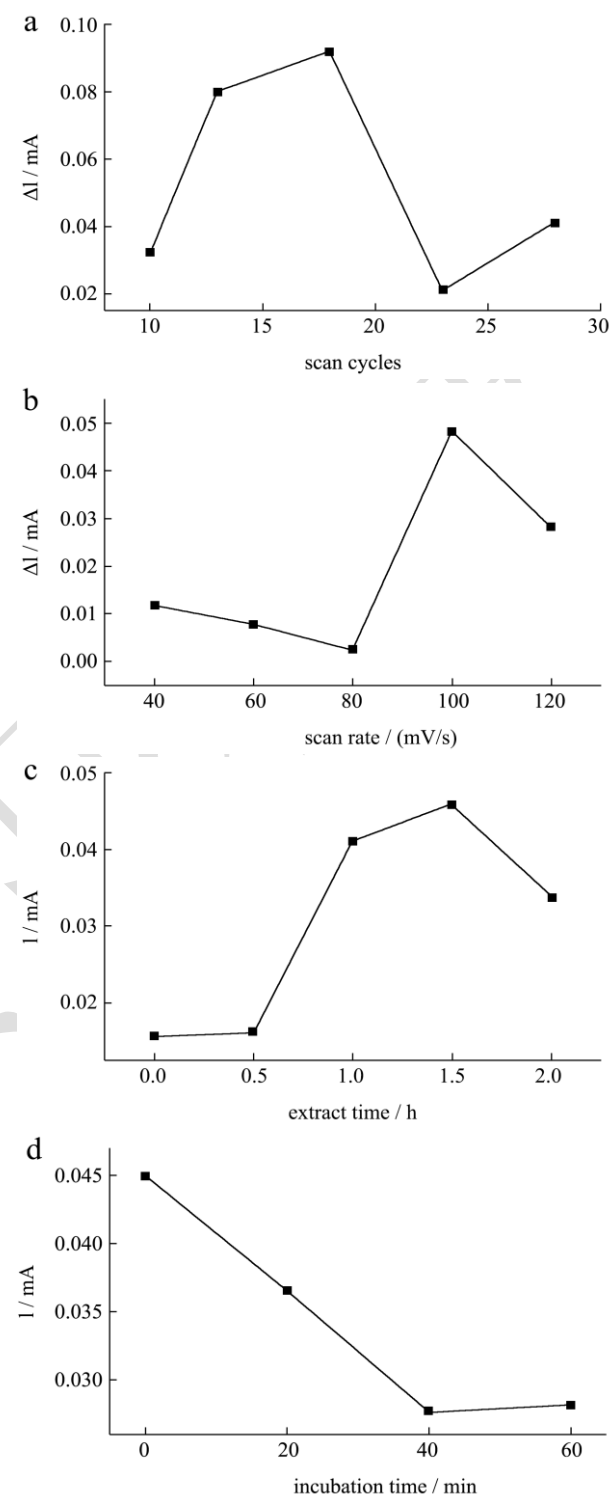


图 6 扫描圈数 (a)、扫描速率 (b)、模板洗脱时间 (c) 及孵化时间 (d)

Fig.6 Scan cycles (a), Scan rate (b), Template extraction time (c), Incubation time (d)

2.6 吡咯的聚合和过氧化特性

电化学聚合法能将聚合物薄膜直接修饰在电极表面,膜附着牢固而均匀,聚合膜的结构稳定,与模

板分子结构匹配的印迹孔穴不易变形，能够在任何导电基质上获得重现性优良的均匀超薄膜，并且，膜的厚度可以通过调节聚合圈数和速率来进行控制。吡咯是一种电活性物质，能够通过电聚合在电极表面形成电活性聚吡咯，在聚合过程中峰电流会随着扫描周期的增加而增大，聚吡咯可与蛋白质通过共价键结合，其孔穴的立体构象对糖蛋白的选择性结合有重要作用。

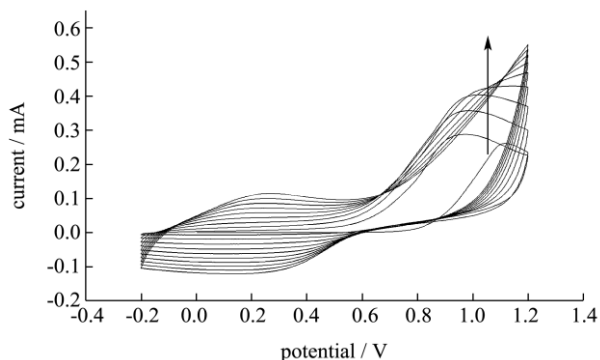


图7 吡咯电聚合的循环伏安图

Fig.7 CV profile for the electropolymerization of pyrrole

图7为吡咯在电极表面的电聚合过程，从图中可以看出随着扫描圈数的增加，电极表面的峰电流在逐渐增大，这是由于电极表面修饰了电活性物质聚吡咯，增强了电极的导电性能；鉴于溶液中的吡咯在不断聚合，吡咯浓度在不断减小，所以峰电流的增大幅度是在逐渐减弱，并在第10圈基本保持恒定。吡咯的初始浓度不宜过大，否则会使聚合膜变厚且不均匀，不利于后期过氧化和印迹位点的形成。

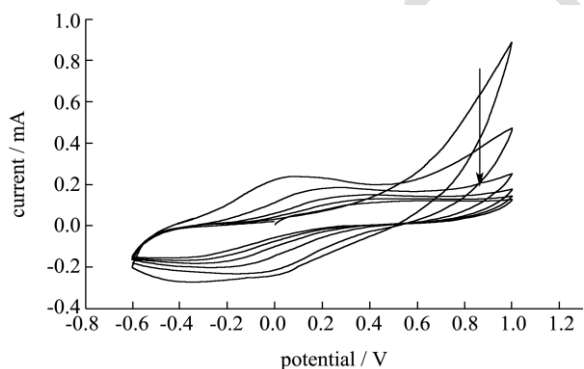


图8 聚吡咯过氧化的循环伏安图

Fig.8 CV profile for the overoxidation of polypyrrole

鉴于聚吡咯的疏水性质，聚吡咯在过氧化过程中形成的亲水性羧基和醛基，羧基基团与蛋白质带正电基团有着静电相互作用，聚吡咯中的氮原子、羧基、醛基和羟基形成的氢键也可与蛋白质的配体相互作用，从而提高选择性。聚吡咯在过氧化时会失去 π 键共轭结构且其中掺杂的离子也会被移除，这样就会使聚合膜的导电性大幅度下降^[15]。从图8中可以看出，

随着过氧化扫描圈数的增加，电极表面电流逐渐下降，在第6圈时电流基本稳定，表明聚吡咯过氧化完全。

2.7 传感器的性能测定

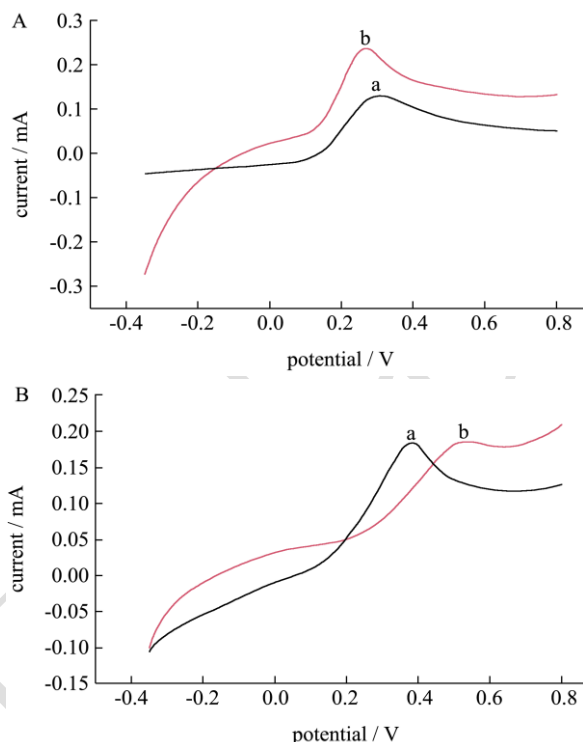


图9 线性扫描伏安图

Fig.9 LSV profile

注：A，裸电极(a)和印迹聚吡咯膜电极(b)；B，裸电极(a)和非印迹聚吡咯膜电极(b)。

由于聚吡咯为电活性物质，裸电极表面在修饰了聚吡咯膜后峰电流会有一定程度的增加，从图9A和9B中可以看出，修饰电极的峰电流相比裸电极增大约0.15 mA，且由于印迹聚吡咯膜中掺杂了电活性弱的S-卵白蛋白，所以峰电流增大幅度会相对小一些。

当蛋白质从聚吡咯膜表面洗脱下来后就会形成多孔结构，而这种结构可以作为离子通道，有利于电活性探针 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 到达电极界面发生氧化反应。从图10A可以看出，当蛋白质被洗脱后，峰电流相比洗脱前有明显的增大， ΔI 约为0.05 mA；而图10B可以看出洗脱前后峰电流基本无变化。其中发生了电位的偏移，可能原因是经酸和高温洗脱时对膜的微观结构有一定影响，从而使氧化反应所需电位发生了改变。

本实验利用差分脉冲伏安法对印迹和非印迹传感器所引起的电流响应值变化进一步证实。从图11中可以看出，相比非印迹传感器，印迹传感器在移除模板蛋白后峰电流显著增大， ΔI 约为0.03 mA，且在 1.0×10^{-3} mg/mL S-卵白蛋白溶液中孵化后，由于S-

卵白蛋白阻碍了电活性探针 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 进入电极界面,所以峰电流显著减小, ΔI 约为 0.04 mA。而非印迹传感器所引起的电流响应值变化不够显著。

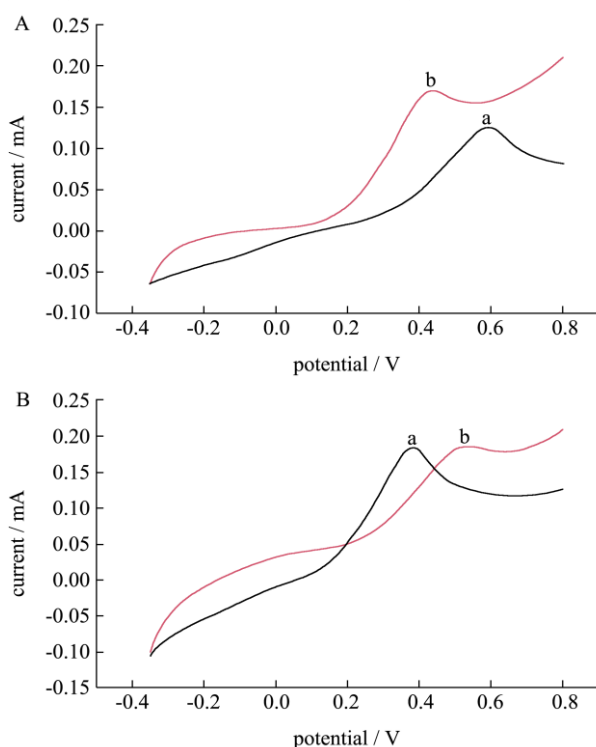


图 10 线性扫描伏安图

Fig.10 LSV profile

注: A, 印迹传感器洗脱 S-卵白蛋白前(a)和后(b); B, 非印迹传感器洗脱 S-卵白蛋白前(a)和后(b)。

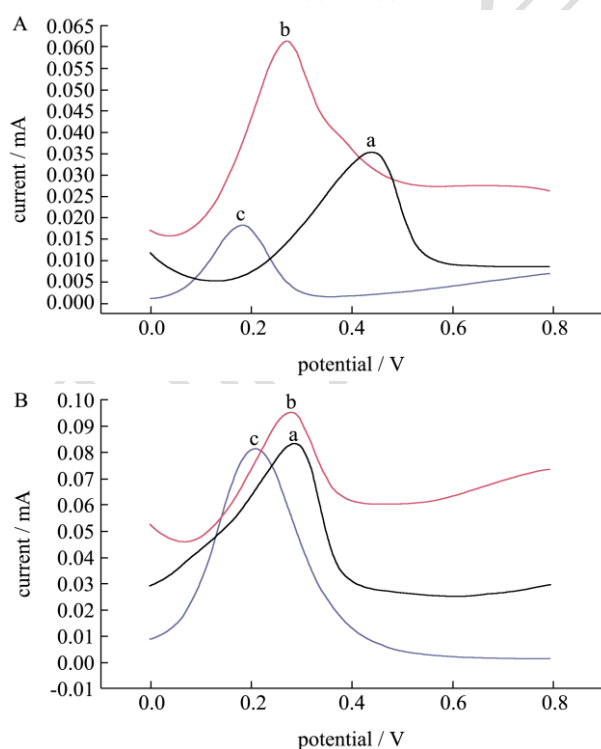


图 11 差分脉冲伏安图

Fig.11 DPV profile

注: A, 印迹传感器洗脱 S-卵白蛋白前(a)和后(b), 以及随后在 1.0×10^{-3} mg/mL S-卵白蛋白溶液中孵化(c); B, 非印迹传感器洗脱 S-卵白蛋白前(a)和后(b), 以及随后在 1.0×10^{-3} mg/mL S-卵白蛋白溶液中孵化(c)。

2.8 S-卵白蛋白的电化学检测

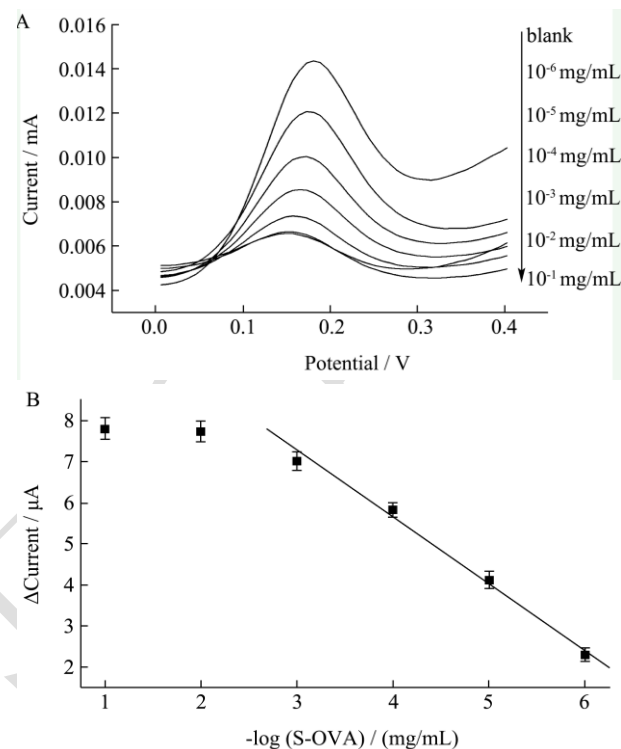


图 12 (A) 印迹传感器在不同浓度 S-卵白蛋白溶液 ($10^{-6} \sim 10^{-1}$ mg/mL) 中孵化后的差分脉冲伏安图, (B) 峰电流变化值对应不同 S-卵白蛋白浓度的标准曲线图

Fig.12 (A) DPV profile of MIPs after incubating in different concentrations of S-ovalbumin solution ($10^{-6} \sim 10^{-1}$ mg/mL), (B) Calibration curve of changes in peak current versus the concentrations of S-ovalbumin

由于印迹传感器形成了能与 S-卵白蛋白特异性结合的印迹孔穴,随着目标蛋白浓度的升高,传感器表面的蛋白吸附量会逐渐增大,最终因达最大载量而饱和^[16]。从图 12A 可以看出,随着 S-卵白蛋白初始浓度的增加,峰电流逐渐下降;当初始浓度为 10^{-2} mg/mL 时,基本达到 S-卵白蛋白的最大载量。从图 12B 可以看出, S-卵白蛋白初始浓度 $10^{-6} \sim 10^{-2}$ mg/mL 范围内时,随着浓度的增加,峰电流变化值逐渐增大,且在 $10^{-6} \sim 10^{-3}$ mg/mL 范围内具有良好的线性关系,其中线性方程为 $\Delta I = 1.62 \log[C_{\text{S-OVA}}] + 12.14$ ($R^2 = 0.9959$)。此外,通过 11 组空白实验得出检出限为 6.75×10^{-7} mg/mL。

3 结论

3.1 本实验首先通过聚乙二醇沉淀法和阴离子交换层析法从鸡蛋蛋清中得到具有电泳纯度的卵白蛋白,然后在 55 °C、pH 9.9 条件下经 72 h 诱导制备 S-卵白蛋白,采用圆二色谱和差示扫描量热分析证明成功制备了 S-卵白蛋白。

3.2 其次,首次利用分子印迹技术和电化学方法制备出能与 S-卵白蛋白具有特异性结合的电化学印迹传感器。采用了场发射扫描电镜对印迹和非印迹传感器进行了形态表征,印迹传感器表面因掺杂了 S-卵白蛋白而比较粗糙,说明有印迹孔穴形成,而非印迹传感器表面光滑无孔穴。并通过循环伏安法、线性伏安扫描法和差分脉冲伏安法对传感器制备的扫描圈数、扫描速率、模板洗脱时间和孵化时间进行了优化,对裸电极修饰聚吡咯膜前后的峰电流变化,非/印迹传感器洗脱模板蛋白前后以及孵化前后的峰电流变化,进行了测定。结果表明在扫描圈数为 18,扫描速率为 100 mV/s 时有最大电流变化值;模板洗脱时间为 1.5 h 时电流响应值达最大且之后基本保持不变,孵化时间为 40 min 时电流值下降到最小值且之后基本保持不变;裸电极在修饰了聚吡咯膜后峰电流显著增大,印迹传感器在洗脱模板蛋白后峰电流显著增大,于 1.0×10^{-3} mg/mL S-卵白蛋白溶液中孵化后峰电流显著减小,而非印迹传感器的峰电流变化则不够显著。通过差分脉冲伏安法,探讨了不同 S-卵白蛋白浓度与峰电流变化的依赖关系,确定 S-卵白蛋白浓度在 $10^{-6} \sim 10^{-3}$ mg/mL 范围内时,浓度与峰电流变化值具有良好线性关系,并得出检出限为 6.75×10^{-7} mg/mL。

3.3 最后,本实验成功制备了 S-卵白蛋白印迹聚吡咯膜电化学传感器,性能测定表明印迹传感器对 S-卵白蛋白有特异性识别能力,且在一定浓度范围内能定量检测 S-卵白蛋白。若期望印迹传感器能更好地准确定量 S-卵白蛋白,还需要进一步提高传感器性能,包括它的特异性、结合容量和重复利用性等。之后可考虑加入一些新型纳米材料与聚吡咯联合制备印迹传感器,如碳纳米管和纳米金等。

参考文献

- [1] Alleoni A C, Antunes A J. Albumen foam stability and s-ovalbumin contents in eggs coated with whey protein concentrate [J]. *Revista Brasileira de Ci ência Av ócola*, 2004, 6(2): 105-110
- [2] Huang Q, Qiu N, Ma M H, et al. Estimation of egg freshness using S-ovalbumin as an indicator [J]. *Poultry Science*, 2012, 91(3): 739-743
- [3] Suryanarayanan V, Wu C T, Ho K C. Molecularly imprinted electrochemical sensors [J]. *Electroanalysis*, 2010, 22(16): 1795-1811
- [4] GAO Z, Minxian Z, Beshen C. The influence of overoxidation treatment on the permeability of polypyrrole films [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1994, 373(1): 141-148
- [5] Ramanavičius A, Ramanavičienė A, Malinauskas A. Electrochemical sensors based on conducting polymer-polypyrrole [J]. *Electrochimica Acta*, 2006, 51(27): 6025-6037
- [6] Wu S, Tan W, Xu H. Protein molecularly imprinted polyacrylamide membrane: for hemoglobin sensing [J]. *Analyst*, 2010, 135(10): 2523-2527
- [7] Ramanaviciene A, Ramanavicius A. Molecularly imprinted polypyrrole-based synthetic receptor for direct detection of bovine leukemia virus glycoproteins [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 20(6): 1076-1082
- [8] Kan X, Xing Z, Zhu A, et al. Molecularly imprinted polymers based electrochemical sensor for bovine hemoglobin recognition [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, 168: 395-401
- [9] Geng F, Huang Q, Wu X, et al. Co-purification of chicken egg white proteins using polyethylene glycol precipitation and anion-exchange chromatography [J]. *Separation and Purification Technology*, 2012, 96: 75-80
- [10] 黄群.S-卵白蛋白与鸡蛋鲜度相关性及其纯化、性质研究 [D]. 武汉:华中农业大学,2012
HUANG Qun. Study on the correlation between S-ovalbumin and egg freshness, and the purification and characteristics of S-ovalbumin [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012
- [11] Jiménez-Saiz R, Pineda-Vadillo C, López-Fandiño R, et al. Human IgE binding and *in vitro* digestion of S-OVA [J]. *Food chemistry*, 2012, 135(3): 1842-1847
- [12] 刘瑛.基于电聚合技术的新型分子印迹传感器的研究和应用 [D]. 无锡:江南大学,2013
LIU Ying. Molecularly imprinted electrochemical sensor prepared by electropolymerization method and its analytical application [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013
- [13] Yamasaki M, Takahashi N, Hirose M. Crystal structure of S-ovalbumin as a non-loop-inserted thermostabilized serpin form [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(37): 35524-35530
- [14] 张秀花,万凯,梁振兴,等.基于聚吡咯的胆固醇电化学传感器的制备及性能研究 [J]. *现代食品科技*, 2015, 4: 170-

174

ZHANG Xiu-hua, WAN Kai, LIANG Zhen-xing, et al. Development and properties of a polypyrrole-based electrochemical biosensor for cholesterol detection [J]. Modern Food Science and Technology, 2015,4: 170- 174

- [15] Shiigi H, Okamura K, Kijima D, et al. An overoxidized polypyrrole/dodecylsulfonate micelle composite film for amperometric serotonin sensing [J]. Journal of the

Electrochemical Society, 2003, 150(5): H119-H123

- [16] 袁士芳,王硕,邓启良等.牛血清蛋白分子印迹聚合物的制备及分子识别性能[J].现代食品科技,2013,1:134-137

YUAN Shi-fang, WANG Shuo, DENG Qi-liang, et al. Fabrication of bovine serum albumin in imprinted polymer on silica surface and its molecular recognition function [J]. Modern Food Science and Technology, 2013,1: 134-137

现代食品科技