

文章编号:1008-1542(2017)02-0163-06

doi:10. 7535/hbkd. 2017yx02010

## 金属离子竞争结合钙调素的电化学反应研究

崔 敏,任聚杰,李俊新

(河北科技大学理学院,河北石家庄 050018)

**摘 要:**为了探讨金属离子与  $\text{Ca}^{2+}$  对钙调素(CaM)的竞争结合作用,在 pH 值为 6.5 含 2 mmol/L  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  的 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液中,用交流阻抗法研究了金属离子如  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  结合及竞争结合钙调素的电化学反应。结果表明:金属离子与 CaM 的结合能力可以通过溶液中  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  在钙调素自组装膜修饰金电极上的电化学反应电阻的变化来判断,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Al}^{3+}$  都能与 CaM 结合,  $\text{Fe}^{3+}$  不能与 CaM 结合,且  $\text{Ca}^{2+}$  与 CaM 结合能力要比  $\text{Al}^{3+}$  强;  $\text{Ca}^{2+}$  在 CaM 上的结合位点与  $\text{Cd}^{2+}$  相同,与  $\text{Al}^{3+}$  不同。交流阻抗法为研究金属离子与 CaM 的竞争结合行为提供了一个新方法。

**关键词:**电化学;自组装膜;钙调素;交流阻抗法;电化学反应电阻;构象变化

中图分类号:O657.1 文献标志码:A

## Study of the electrochemical behaviors of ion-binding to calmodulin

CUI Min, REN Jujie, LI Junxin

(School of Science, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China)

**Abstract:** In order to research the competitive binding with CaM between metal ions and  $\text{Ca}^{2+}$ , electrochemical impedance spectroscopy (EIS) of ion (such as  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ )-loaded CaM self-assembled membrane on Au electrode in 0.15 mol/L NaCl solution containing 2 mmol/L  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  at pH 6.5 is investigated. The results indicate that the ion-binding property of CaM can be detected by the change of the electrochemical reaction resistance.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  can combine with CaM, and  $\text{Fe}^{3+}$  can't combine with CaM. The binding ability of  $\text{Ca}^{2+}$  to CaM is stronger than that of  $\text{Al}^{3+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  binding site of CaM is different from that of  $\text{Al}^{3+}$  and same as that of  $\text{Cd}^{2+}$ . Electrochemical impedance spectroscopy provides a new method for the research of metal ions and CaM competition binding.

**Keywords:** electrochemistry; self-assembled membrane; calmodulin; electrochemical impedance spectroscopy; electrochemical reaction resistance; conformational change

钙调素(CaM)是普遍存在于真核细胞中的多功能钙依赖性调节蛋白,它由 148 个氨基酸组成,包括 4 个 EF-手性区域,可以与 4 个  $\text{Ca}^{2+}$  结合。钙调素只有和  $\text{Ca}^{2+}$  结合后才有活性,才能在生物体中发挥作用。CaM 与  $\text{Ca}^{2+}$  结合后形成  $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$  复合物,构象发生变化,从而使 CaM 活化,活化的  $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$  复合物可以通过与靶酶作用方式调控代谢过程,参与很多生化反应,在生物体中发挥重要作用<sup>[1-5]</sup>。鉴于生命环境

收稿日期:2016-11-24;修回日期:2016-12-19;责任编辑:张士莹

基金项目:河北科技大学校立基金(XL1181157, XL201253, XL201046)

第一作者简介:崔 敏(1971—),女,河北石家庄人,讲师,博士,主要从事电化学分析方面的研究。

E-mail:1335322868@qq.com

崔 敏,任聚杰,李俊新.金属离子竞争结合钙调素的电化学反应研究[J].河北科技大学学报,2017,38(2):163-168.

CUI Min, REN Jujie, LI Junxin. Study of the electrochemical behaviors of ion-binding to calmodulin[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2017, 38(2): 163-168.

中同时存在许多金属离子(如  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ )以及环境污染物(如  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  等)浸入生物体,这些离子也可能会与 CaM 结合,与  $Ca^{2+}$  产生竞争,影响 CaM 发挥作用。因此研究这些金属离子与  $Ca^{2+}$  的竞争结合作用具有重要的生物学意义。

关于离子的竞争行为在生物领域已有广泛研究,但用电化学方法进行研究还鲜有报道<sup>[5-10]</sup>。由于低成本、高灵敏、易操作等优点,电化学方法已成为环境及生物领域较受欢迎的分析手段之一<sup>[11-13]</sup>。通过研究生物分子如蛋白质、酶、核糖核酸等修饰到电极上的电化学行为,可以模拟这些生物分子在生物体内的电化学过程,从而了解它们在生物体内的功能,揭示生物活动机理<sup>[14]</sup>。自组装技术可以很方便地把含—SH 基团的分子修饰在金电极表面<sup>[15-19]</sup>。CaM 中存在—S—, —SH, —S—S—等键,可以直接键合到 Au 基底上形成自组装修饰电极(CaM/Au)。在之前的工作中,笔者摸索了 CaM 在 Au 基底的成膜条件,讨论了电极电势、pH 值对 CaM/Au 电化学行为的影响<sup>[20-22]</sup>。本研究利用交流阻抗方法研究了 pH 值为 6.5 的环境下,金属离子  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  和  $Fe^{3+}$  与 CaM 结合后的电化学行为,讨论了这些离子与 CaM 的结合能力以及这些离子之间的竞争行为。

## 1 实验部分

### 1.1 主要材料和仪器

CaM,由河北师范大学生命科学学院从土豆中提取、纯化、脱钙而得,分子质量为 16 670 D,质量浓度为 0.7 g/L;所有试剂均为分析纯,水溶液均用二次水配制,pH 值为 6.5。

本实验采用常规的三电极体系,参比电极为饱和甘汞电极(SCE),辅助电极为大面积的 Pt 片电极( $S=1\text{ cm}^2$ ),工作电极为 CaM 自组装修饰的 Au 电极(CaM/Au 电极, $\Phi=0.15\text{ cm}$ )或结合了金属离子的 CaM/Au 电极;所有的电位均相对于 SCE;电化学阻抗谱(EIS)是利用上海辰华公司生产的 CHI 660D 在开路电位下测定的,频率范围为 0.03 Hz ~ 100 kHz,溶液为含 2 mmol/L  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  的 0.15 mol/L NaCl 溶液。拟合电路图见图 1。

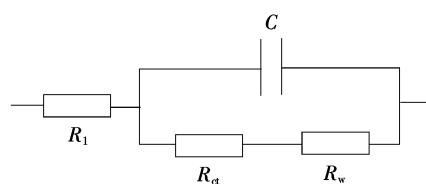


图 1 拟合电路图

Fig. 1 Fitting circuit diagram

### 1.2 工作电极的制备

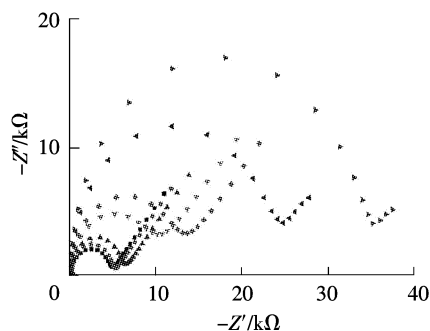
工作电极的制作采用滴涂法,即将 0.7 g/L 的 CaM 滴涂到处理好的 Au 电极上<sup>[23]</sup>,放进充满  $N_2$  气的试管中,密封,在室温下放置 24 h,然后浸入 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液中 8 h,制得 CaM/Au 电极备用。

将在含  $M^{x+}$  ( $M^{x+}$  代表  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  和  $Fe^{3+}$ ) 的溶液中浸泡足够时间(1 h)后的 CaM/Au 电极记作  $M^{x+}$ -CaM/Au 电极(如  $Ca^{2+}$ -CaM/Au,  $Al^{3+}$ -CaM/Au 等),浸泡溶液含  $M^{x+}$  的浓度不同(分别为  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  mol/L),得到的  $M^{x+}$ -CaM/Au 电极含  $M^{x+}$  的量也不相同。将在含  $10^{-5}$  mol/L  $CaCl_2$  溶液浸泡 1 h 得到的  $Ca^{2+}$ -CaM/Au 电极再在含  $10^{-5}$  mol/L  $Cd^{2+}$  的溶液中浸泡 1 h,得到的电极记作  $Cd^{2+} \cdot Ca^{2+}$ -CaM/Au;若再在含  $10^{-5}$  mol/L  $Al^{3+}$  的溶液中浸泡 1 h 后,电极记作  $Al^{3+} \cdot Ca^{2+}$ -CaM/Au。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $Ca^{2+}$ 结合 CaM/Au 的电化学行为

电化学反应电阻( $R_{ct}$ )可以反映电极表面的动力学性质。图 2 是在不同浓度的  $Ca^{2+}$  溶液中浸泡得到的  $Ca^{2+}$ -CaM/Au 的交流阻抗图,表 1 为  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  发生电化学反应的电阻  $R_{ct}$  与浸泡溶液中  $Ca^{2+}$  浓度的关系。从图 2 及表 1 可以看出,在  $Ca^{2+}$ -CaM/Au 电极上的  $R_{ct}$  明显小于在 CaM/Au 电极上的  $R_{ct}$ ,而且随着浸泡溶液中含  $Ca^{2+}$  浓度的增大, $R_{ct}$  逐渐降低直到趋于平稳。这是由于结合了  $Ca^{2+}$  的 CaM 空间构象会发生



浸泡溶液从外到里依次为含 0,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  mol/L  $CaCl_2$  的 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液。

图 2  $Ca^{2+}$ -CaM/Au 的交流阻抗图

Fig. 2 Nyquist plots for  $Ca^{2+}$ -CaM/Au

表 1 CaM/Au 在含不同浓度  $\text{Ca}^{2+}$  溶液中浸泡后得到的  $R_{ct}$  值Tab. 1  $R_{ct}$  obtained by CaM/Au soaking in solution with different  $\text{Ca}^{2+}$  concentration

$c(\text{Ca}^{2+})/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	0	$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
$R_{ct}/\text{k}\Omega$	33.46	22.58	11.72	8.858	6.382	4.833	4.563

变化<sup>[24]</sup>,使得 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 更易接近 Au 基底发生氧化还原反应,从而减小了  $R_{ct}$ 。因此,通过  $R_{ct}$  的减小可以判断  $\text{Ca}^{2+}$  与 CaM 的结合情况。刚开始在较稀溶液中浸泡时, $R_{ct}$  变化明显,说明少量  $\text{Ca}^{2+}$  结合到 CaM/Au 上就会使 CaM 空间构象发生明显的变化。随着浸泡溶液中  $\text{Ca}^{2+}$  的增加,结合的  $\text{Ca}^{2+}$  也增加, CaM 上的结合位点几乎被  $\text{Ca}^{2+}$  占据,达到饱和状态, CaM 空间构象不再发生变化,致使  $R_{ct}$  几乎不变而趋于平稳。

## 2.2 $\text{Al}^{3+}$ 结合 CaM 的电化学行为

图 3 是在含  $\text{Al}^{3+}$  浓度不同的溶液中浸泡足够长的时间后  $\text{Al}^{3+}$ -CaM/Au 的交流阻抗图,表 2 显示了  $R_{ct}$  与溶液中  $\text{Al}^{3+}$  浓度关系。从图 3、表 2 可以看出,与前面描述的结合  $\text{Ca}^{2+}$  的  $R_{ct}$  变化规律一样, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  在  $\text{Al}^{3+}$ -CaM/Au 电极上的  $R_{ct}$  比在 CaM/Au 电极上的  $R_{ct}$  要小,随着浸泡溶液中  $\text{Al}^{3+}$  的增多,在  $\text{Al}^{3+}$ -CaM/Au 电极上的  $R_{ct}$  进一步降低并趋于平稳。这说明 CaM 也能和  $\text{Al}^{3+}$  结合,而且结合了  $\text{Al}^{3+}$  后的 CaM 的空间构象也会发生变化,致使  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  在电极上的电化学反应电阻减小。与  $\text{Ca}^{2+}$  结合情况不同的是,在低浓度( $10^{-9}$  mol/L)时  $R_{ct}$  并没有变化,而是在  $10^{-8}$  mol/L 时才有所减小,这说明  $\text{Al}^{3+}$  含量低( $10^{-9}$  mol/L)时并不能与 CaM 结合(此浓度时  $\text{Ca}^{2+}$  能与 CaM 结合), $\text{Al}^{3+}$  结合 CaM 的能力比  $\text{Ca}^{2+}$  结合 CaM 的能力弱;且与  $\text{Ca}^{2+}$  相比, $\text{Al}^{3+}$  结合了 CaM 后, $R_{ct}$  的变化也没有那么明显,预测这有可能是  $\text{Al}^{3+}$  与  $\text{Ca}^{2+}$  的结合位点不同所致。

表 2 CaM/Au 在含不同浓度  $\text{Al}^{3+}$  溶液中浸泡后得到的  $R_{ct}$  值Tab. 2  $R_{ct}$  obtained by CaM/Au soaking in solution with different  $\text{Al}^{3+}$  concentration

$c(\text{Al}^{3+})/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	0	$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
$R_{ct}/\text{k}\Omega$	31.58	31.45	25.81	23.58	21.13	19.18	18.13

## 2.3 $\text{Cd}^{2+}$ 与 $\text{Fe}^{3+}$ 结合 CaM 的电化学行为

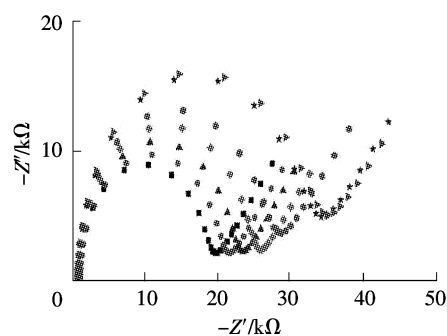
同样的方法又研究了  $\text{Cd}^{2+}$  与  $\text{Fe}^{3+}$  结合 CaM 的电化学行为。将 CaM/Au 电极在含不同浓度(分别为  $0, 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}$  mol/L)  $\text{CdCl}_2$  的  $0.15$  mol/L NaCl 溶液中浸泡足够时间后测定交流阻抗,得到的  $R_{ct}$  与浸泡溶液中所含的  $\text{Cd}^{2+}$  浓度之间的关系如表 3 所示。

表 3 CaM/Au 在含不同浓度  $\text{Cd}^{2+}$  溶液中浸泡后得到的  $R_{ct}$  值Tab. 3  $R_{ct}$  obtained by CaM/Au soaking in solution with different  $\text{Cd}^{2+}$  concentration

$c(\text{Cd}^{2+})/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	0	$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
$R_{ct}/\text{k}\Omega$	32.51	23.18	21.62	18.58	17.19	16.61	16.49

从表 3 可以看出,与结合  $\text{Ca}^{2+}$  后的变化规律一样, CaM 结合  $\text{Cd}^{2+}$  后,  $R_{ct}$  减小,随着结合  $\text{Cd}^{2+}$  的增多,  $\text{Cd}^{2+}$ -CaM/Au 的  $R_{ct}$  进一步降低并趋于平稳。这说明 CaM 也能和  $\text{Cd}^{2+}$  结合,结合后 CaM 的空间构象也会发生变化,从而使  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  在电极上的电化学反应电阻减小。

将 CaM/Au 电极分别依次在含浓度为  $0, 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}$  mol/L  $\text{FeCl}_3$  的  $0.15$  mol/L



浸泡溶液从外到里依次为含  $0, 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}$  mol/L  $\text{Al}^{3+}$  的  $0.15$  mol/L 的 NaCl 溶液。

图 3  $\text{Al}^{3+}$ -CaM/Au 电极的交流阻抗图Fig. 3 Nyquist plots for  $\text{Al}^{3+}$ -CaM/Au

NaCl 溶液中浸泡足够时间后测定交流阻抗,得到的  $R_{ct}$  与  $Fe^{3+}$  浓度的关系如表 4 所示。

表 4 CaM/Au 在含不同浓度  $Fe^{3+}$  溶液中浸泡后得到的  $R_{ct}$  值

Tab. 4  $R_{ct}$  obtained by CaM/Au soaking in solution with different  $Fe^{3+}$  concentration

$c(Fe^{3+})/(mol \cdot L^{-1})$	0	$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
$R_{ct}/k\Omega$	29.64	29.11	30.02	28.72	29.19	28.81	29.21

从表 4 可以看出,随着  $Fe^{3+}$  浓度的增加, $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  在修饰电极上的  $R_{ct}$  几乎没有发生变化,这表明  $Fe^{3+}$  不能引起 CaM 的空间构象改变,不能与 CaM 结合。

#### 2.4 金属离子与 $Ca^{2+}$ 竞争结合 CaM 的电化学行为

与  $Ca^{2+}$  的离子半径相近的金属离子都有可能与 CaM 结合,从而与  $Ca^{2+}$  产生竞争,影响 CaM 在生命体内发挥作用。所以研究金属离子与  $Ca^{2+}$  竞争结合 CaM 的行为很有必要。同样利用交流阻抗法,研究了  $Al^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$  与  $Ca^{2+}$  竞争结合 CaM 的电化学行为。

图 4 a) 是  $Ca^{2+}$ -CaM/Au 和  $Al^{3+} \cdot Ca^{2+}$ -CaM/Au 的交流阻抗谱比较图。其中  $Ca^{2+}$ -CaM/Au 是 CaM/Au 在含  $10^{-5} mol/L Ca^{2+}$  的  $0.15 mol/L NaCl$  溶液中浸泡足够时间得到的; $Al^{3+} \cdot Ca^{2+}$ -CaM/Au 是将得到的  $Ca^{2+}$ -CaM/Au 再在含  $10^{-5} mol/L Al^{3+}$  的  $0.15 mol/L NaCl$  溶液中浸泡足够时间得到的。从图 4 a) 可以看出, $Al^{3+} \cdot Ca^{2+}$ -CaM/Au 的  $R_{ct}$  比  $Ca^{2+}$ -CaM/Au 的还要小,说明有足够多的  $Ca^{2+}$  结合了 CaM 后,CaM 中的  $Ca^{2+}$  结合位点被占据,依然可以再结合  $Al^{3+}$ 。若顺序反过来,CaM/Au 先在含  $10^{-5} mol/L Al^{3+}$  的  $0.15 mol/L NaCl$  溶液中浸泡足够时间得到  $Al^{3+}$ -CaM/Au,然后再在含  $10^{-5} mol/L Ca^{2+}$  的  $0.15 mol/L NaCl$  溶液中浸泡足够时间得到  $Ca^{2+} \cdot Al^{3+}$ -CaM/Au,比较  $Al^{3+}$ -CaM/Au 和  $Ca^{2+} \cdot Al^{3+}$ -CaM/Au 的交流阻抗谱,如图 4 b) 所示。从图 4 b) 可以看出,与  $Al^{3+}$ -CaM/Au 相比, $Ca^{2+} \cdot Al^{3+}$ -CaM/Au 的  $R_{ct}$  进一步减小。说明结合了足够多的  $Al^{3+}$  后,CaM 还可以与  $Ca^{2+}$  进一步结合。图 4 a) 和图 4 b) 相互印证,从而可以推断在 CaM 中  $Al^{3+}$  的结合位点与  $Ca^{2+}$  结合位点不相同,这与生物领域关于 CaM 中的金属离子的结合位点的研究得到的结论是一致的<sup>[5]</sup>。

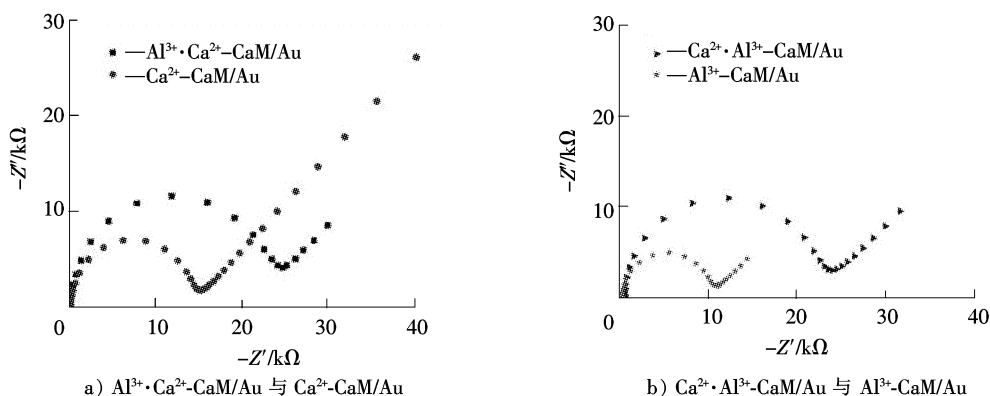


图 4 交流阻抗谱比较图

Fig. 4 Nyquist plots comparison diagram

同样的方法,研究了  $Cd^{2+}$  与  $Ca^{2+}$  竞争结合 CaM 的电化学行为。图 5 所示是  $Ca^{2+}$ -CaM/Au 和  $Cd^{2+} \cdot Ca^{2+}$ -CaM/Au 的交流阻抗谱,同样  $Ca^{2+}$ -CaM/Au 是 CaM/Au 在含  $10^{-5} mol/L Ca^{2+}$  的  $0.15 mol/L NaCl$  溶液中浸泡足够时间得到的; $Cd^{2+} \cdot Ca^{2+}$ -CaM/Au 是将得到的  $Ca^{2+}$ -CaM/Au 再在含  $10^{-5} mol/L Cd^{2+}$  的  $0.15 mol/L NaCl$  溶液中浸泡足够时间得到的。

从图 5 可以看出, $Cd^{2+} \cdot Ca^{2+}$ -CaM/Au 和  $Ca^{2+}$ -CaM/Au 两者的交流阻抗谱基本重合。这说明 CaM 中的  $Ca^{2+}$  结合位点被  $Ca^{2+}$  全部占据后,就不能再结合  $Cd^{2+}$ ,从而推断在 CaM 中  $Cd^{2+}$  的结合位点与  $Ca^{2+}$  结合位点相同,这与之前文献中得到的结论是一致的<sup>[25-26]</sup>。

### 3 结 语

金属离子与 CaM 结合会使 CaM 的空间构象发生变化,这一点可以通过电化学交流阻抗谱中电化学反应电阻  $R_{ct}$  的减小体现出来。因此可以通过  $R_{ct}$  的变化判断金属离子是否能与 CaM 结合,  $R_{ct}$  变小,说明能结合,否则不能结合。CaM 在含相同浓度的金属离子中浸泡足够时间后,能使  $R_{ct}$  减小更为明显的金属离子的结合能力更强。金属离子占据了与 CaM 的结合位点后,再与其他离子结合,若能使  $R_{ct}$  进一步减小,说明这 2 种金属离子的结合位点不同;若不能使  $R_{ct}$  进一步减小,说明这 2 种金属离子的结合位点相同。 $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  和  $Al^{3+}$  都能与 CaM 结合,而  $Fe^{3+}$  不能; $Al^{3+}$  与 CaM 的结合能力比  $Ca^{2+}$  弱,且结合位点也不相同; $Cd^{2+}$  与 CaM 的结合位点与  $Ca^{2+}$  相同。可见,交流阻抗法为研究离子与 CaM 的竞争结合行为提供了一个新方法。

### 参考文献/References:

- [1] KRETSINGER R H, NOCKOLDS C E. Carp muscle calcium-binding protein[J]. Journal of Biological Chemistry, 1973, 248 (9): 3313-3326.
- [2] ZHANG M, TANAKA T, IKURA M. Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin [J]. Nature Structural Biology, 1995, 2(9): 758-767.
- [3] KUBONIWA H, TJANDRA N, GRZESIEK S. Solution structure of calcium-free calmodulin[J]. Nature Structural Biology, 1995, 2(9): 768-776.
- [4] CARAFOLI E, KLEE C B. Calcium as a Cellular Regulator[M]. New York:Oxford University Press, 1999.
- [5] KURITA H, NAKATOMI A, SHIMAHARA H, et al.  $Al^{3+}$  interaction sites of calmodulin and the  $Al^{3+}$  effect on target binding of calmodulin[J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2005, 333(4): 1060-1065.
- [6] OUYANG H, VOGEL H. Metal ion binding to calmodulin: NMR and fluorescence studies[J]. Biometals, 1998, 11(3): 213-222.
- [7] OZAWA T, SASAKI K, UMEZAWA Y. Metal ion selectivity for formation of the calmodulin-metal-target peptide ternary complex studied by surface plasmon resonance spectroscopy[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1434 (2): 211-220.
- [8] LEVI R, WOLF T, FLEMINGER G, et al. Immuno-detection of aluminium induced conformational changes in calmodulin-implications in Alzheimer's disease[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 1998, 189 (1/2): 41-46.
- [9] SOLOMON B, KOPPEL R, JOSSIPHOV J. Immunostaining of calmodulin and aluminium in Alzheimer's disease-affected brains[J]. Brain Research Bulletin, 2001, 55(55): 253-256.
- [10] KIRBERGER M, WONG H C, JIANG J, et al. Metal toxicity and opportunistic binding of  $Pb^{2+}$  in proteins[J]. Journal Inorganic Biochemistry, 2013, 125(4): 40-49.
- [11] 任聚杰,李柳佳,崔敏,等. 酞酸电化学传感器的构建及其应用研究[J]. 河北科技大学学报, 2016, 37(1): 39-46.  
REN Jujie, LI Liujia, CUI Min, et al. Construction and application of electrochemical sensors for the detection of naphthol[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2016, 37(1): 39-46.
- [12] RONG Q, FENG F, MA Z. Metal ions doped chitosan-poly(acrylic acid) nanospheres: Synthesis and their application in simultaneously electrochemical detection of four markers of pancreatic cancer[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 75: 148-154.
- [13] TANG J, JIN B. Poly(crystal violet) -multi-walled carbon nanotubes modified electrode for electroanalytical determination of luteolin[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2016, 780: 46-52.
- [14] SHERVEDANI R K, FOROUSHANI M S. Comparative electrochemical behavior of proteins, cytochrome c, agaricus bisporus laccase, and glucose oxidase, immobilized onto gold-thiol self-assembled monolayer via electrostatic, covalent, and covalent coordinate bond methods[J]. Electrochimica Acta, 2016, 187: 646-654.
- [15] LOFTUS A F, REIGHARD K P, KAPOURALES S A, et al. Monolayer-protected nanoparticle film assemblies as platforms for controlling interfacial and adsorption properties in protein monolayer electrochemistry[J]. Journal of America Chemistry Society, 2008, 130 (5): 1649-1661.
- [16] SHAMSIPUR M, FARZIN L, TABRIZI M A. Ultrasensitive aptamer-based on-off assay for lysozyme using a glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles and electrochemically reduced graphene oxide[J]. Microchimica Acta, 2016, 183(10): 2733-2743.

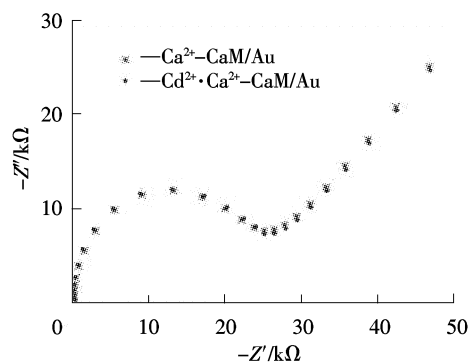


图 5  $Ca^{2+}$ -CaM/Au 与  $Cd^{2+} \cdot Ca^{2+}$ -CaM/Au 的交流阻抗谱比较图

Fig. 5 Nyquist plots of  $Ca^{2+}$ -CaM/Au and  $Cd^{2+} \cdot Ca^{2+}$ -CaM/Au

- [17] BAIN C D, TROUGHTON E B, TAO Y T, et al. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold[J]. *Journal of America Chemistry Society*, 1989, 20(15): 321-325.
- [18] SHEN Q, FAN M, YANG Y, et al. Electrochemical DNA sensor-based strategy for sensitive detection of DNA demethylation and DNA demethylase activity[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 934: 66-71.
- [19] 赵忠奎, 刘东葳. 离子液体中 ATRP 法合成 MCC-g-PGMA 分子及其组装研究[J]. *河北工业科技*, 2015, 32(5): 390-395.  
ZHAO Zhongkui, LIU Jianwei. Synthesis of MCC-g-PGMA by ATRP in ionic liquids and its self-assemble[J]. *Hebei Journal of Industrial Science and Technology*, 2015, 32(5): 390-395.
- [20] DING K, JIA Z, WANG Q, et al. Electrochemical behavior of the self-assembled membrane formed by calmodulin (CaM) on a Au substrate[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2001, 513(1): 67-71.
- [21] 崔敏, 王庆飞, 童汝亭. Au/CaM 自组装膜方波伏安法表征[J]. *河北科技大学学报*, 2006, 27(1): 33-36.  
CUI Min, WANG Qingfei, TONG Ruting. Token of Au/CaM self-assembled film by square wave voltammetry[J]. *Journal of Hebei University of Science and Technology*, 2006, 27(1): 33-36.
- [22] 崔敏, 王庆飞, 杨久义, 等. 不同 pH 值对 Au/CaM 膜结合  $Ca^{2+}$  的电化学行为研究[J]. *河北师范大学学报(自然科学版)*, 2006, 30(4): 437-439.  
CUI Min, WANG Qingfei, YANG Jiuyi, et al. The investigation of the electrochemistry behaviors at the gold electrode modified with calmodulin self-assembled monolayer combination with metal ion[J]. *Journal of Hebei Normal University(Natural Science Edition)*, 2006, 30(4): 437-439.
- [23] RON H, MATLIS S, RUBINSTEIN I. Self-assembled monolayers on oxidized metals: Gold surface oxidative pretreatment, monolayer properties, and depression formation[J]. *Langmuir*, 1998, 14(5): 1116-1121.
- [24] VIVIANO J, KRISHNAN A, WU H, et al. Electrophoretic mobility shift in native gels indicates calcium dependent structural changes of neuronal calcium sensor proteins[J]. *Analytical Biochemistry*, 2016, 494: 93-100.
- [25] LINSE S, DRAKENBERG T, FORSEN S. Mastoparan binding induces a structural change affecting both the N-terminal and C-terminal domains of calmodulin; A  $^{113}Cd$ -NMR study[J]. *FEBS Letters*, 1986, 199(1): 28-32.
- [26] IKURA M, HASEGAWA N, AIMOTO S, et al.  $^{113}Cd$ -NMR evidence for cooperative interaction between amino- and carboxy-terminal domains of calmodulin[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1989, 161(3): 1233-1238.