

乙酰胆碱酯酶电极反应机理

魏福祥, 韩 菊

(河北科技大学环境科学与工程学院, 河北石家庄 050018)

摘要: 在研究酶电极基础上探讨了电极上的反应机理。以乙酰胆碱酯酶催化活性为基础的抑制型酶电极的电极反应是: 1) 催化底物水解; 2) 底物中的 I^- 被氧化为 I_2 ; 3) 底物氯化硫代乙酰胆碱分解产生的硫代胆碱含有的 $-SH$ 基在银基汞膜电极上与汞生成硫醇汞盐。硫代胆碱在玻碳电极表面的氧化, 为具有吸附性的不可逆过程, 电极反应的电子转移数 $n=2$, 反应速率常数 $k=0.29\text{ s}^{-1}$ 。

关键词: 乙酰胆碱酯酶; 电极反应; 反应机理

中图分类号: Q814.2 文献标识码: A

Electrode reaction mechanism of acetylcholinesterase

WEI Fu-xiang, HAN Ju

(College of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018, China)

Abstract: The paper, based on catalytic activity of acetylcholinesterase, discusses the electrode reaction mechanism. Inhibitory enzyme electrode reaction process consists of hydrolyzation of catalyzes, I^- of the substrate oxidated to I_2 , and $-SH$ of thiocholine formed by acetylthiocholine hydrolysis reacting with mercury to form mercury nitrate thiol with thin-film mercury on silver electrode. The experimental data shows that thiocholine oxidation process at glassy carbon electrode is irreversible with adsorption characteristics, the number of electron transferred is 2, and the rate constant k of surface electrode reaction is 0.29 s^{-1} .

Key words: acetylcholinesterase; electrode reaction; reaction mechanism

乙酰胆碱酯酶(AChE)是与神经化学传递有关的乙酰胆碱(ACE)的水解酶^[1]。有机磷农药能与胆碱酯酶不可逆结合形成性质稳定的磷酰化胆碱酯酶^[2],使胆碱酯酶失去活性,难于发挥正常作用而引起中毒。过量的乙酰胆碱累积会造成神经功能紊乱。AChE生物传感器是用固定化胆碱酯酶片与基质电极组合制成的。以固定化酶为敏感膜的酶电极是生物电极的重要类型之一。酶是能选择性地催化特定底物反应的蛋白质,具有良好的分子识别作用。酶不仅对底物,而且对与之相应的辅酶、抑制剂也能选择性识别。随着新型信号转换器(如光导纤维、集成化微电子器件、压电晶体)的问世,生物传感器技术得到迅速发展,在环境检测与控制、化学化工、食品化工、生物过程、农药、药物等方面得到了广泛的应用。以乙酰胆碱酯酶的催化活性为基础的抑制型酶电极已大量用于有机磷检测^[3]。本文在研制酶电极的基础上探讨了电极上的反应机理、电极性能等。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

收稿日期: 2005-01-21; 修回日期: 2005-03-18; 责任编辑: 王士敏

基金项目: 国家“八六三”计划课题(2001AA635130)

作者简介: 魏福祥(1955),男,河北吴桥人,教授,主要从事生物传感器及天然植物有效成分提取与应用方面的研究。

LK98A 微机电化学分析系统(天津兰力科公司);三电极系统:将固定化酶片用橡胶环固定到玻碳电极($\Phi 2\text{ mm}$)上作工作电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,铂电极为对电极;SYG-15 超级恒温水浴,配 WCY-SJ 程序升温控制仪(南京桑力公司);恒温电解池(自制);乙酰胆碱酯酶(EC3.1.1.7, VFS 型,来自电鳗,500 U/mg,美国 Sigma 公司);戊二醛(分析纯,中国医药集团上海化学试剂公司);牛血清白蛋白(美国 Sigma 公司);甘氨酸(分析纯,中国医药集团上海化学试剂公司)。

1.2 酶电极的制备

1.2.1 AChE 的固定化 依次取 10 U ($1\text{U} = 0.01667 \times 10^{-6}\text{ mol/s}$) AChE, 2 μL 体积分数为 5% 的戊二醛和 10 μL 10 g/L 的 BSA 于 1 mL 塑料离心管中,离心管置于冰浴上,添加 0.1 mol/L pH 值为 8.5 的磷酸盐缓冲溶液至总体积 70 μL 。将上述物质在旋涡混合器中混匀,制成酶溶液。取 1 片活化好的载体浸入该酶溶液中,3 $^{\circ}\text{C}$ 下保持 8 h。取出酶片,用含质量浓度为 10 g/L 甘氨酸的 0.1 mol/L pH 值为 8.0 的磷酸盐缓冲溶液冲洗数次,将酶片浸泡在 pH 值为 8.5 的磷酸盐缓冲溶液中,3 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

1.2.2 电极制作

1) 以铂电极为基质电极与酶片组成工作电极,另一支铂电极作对电极,饱和甘汞电极作参比电极组成酶生物传感器 1,其工作原理见图 1。

2) 以银基汞膜电极为基质电极与酶片组成工作电极,与铂电极、饱和甘汞电极组成生物传感器 2,其工作原理同图 1。

3) 以玻碳电极为基质电极与酶片组成工作电极,铂电极作对电极,饱和甘汞电极为参比电极组成生物传感器 3,其工作原理同图 1。

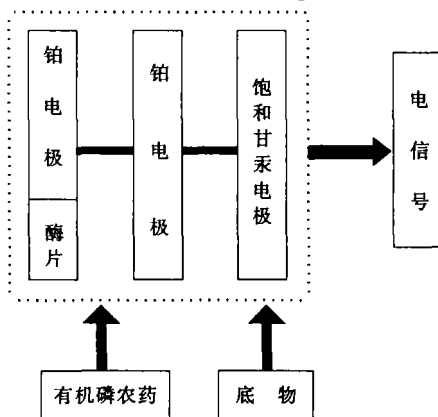


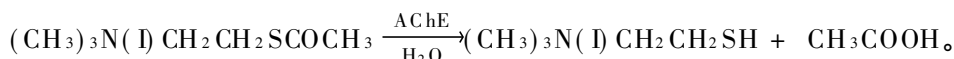
图 1 胆碱酯酶生物传感器工作原理图

Fig. 1 Work principle diagram of acetylcholinesterase biosensor

2 结果与讨论

2.1 酶催化反应

以碘化乙酰硫代胆碱作底物,将 1.2.2 中 1) 的三电极系统放入测量池,测定酶电极活性。酶催化底物分解,反应^[4]为



反应生成的乙酸可以电离,从而改变溶液的 pH 值,底物的水解会随 pH 值的升高而加剧。酶分子上有许多酸性、碱性氨基酸的侧链基团,这些侧链基团随 pH 值变化可处于不同解离状态,从而直接影响酶空间结构进而影响酶活性;所以大部分酶的活性受其环境 pH 值的影响。不同 pH 值条件下测定酶活性,可发现在某一 pH 值时,酶促反应速度最大,这一特定的 pH 值称为最适 pH 值。pH 值不仅影响酶的活性,同时也影响底物的稳定性。文献[5]表明,pH 值为 7.4 时底物较稳定。综合考虑酶的活性及底物的稳定性,一般测定时溶液 pH 值选择 7.4 为宜。

2.2 铂电极上的氧化还原反应

以碘化乙酰硫代胆碱作底物,将 1.2.2 中 1) 的三电极系统放入测量池,向电解池的 2 支铂电极上施加 1 个恒定的微电流进行电解。因底物中的 I^- 被氧化为 I_2 而获得 1 个稳定的电位(约 0.43 V)。当加入乙酰胆碱酯酶时,由于酶促水解所产生的硫醇比底物具有更大的电活性,能在较低电位(约 0.25 V)下氧化,于是形成电位

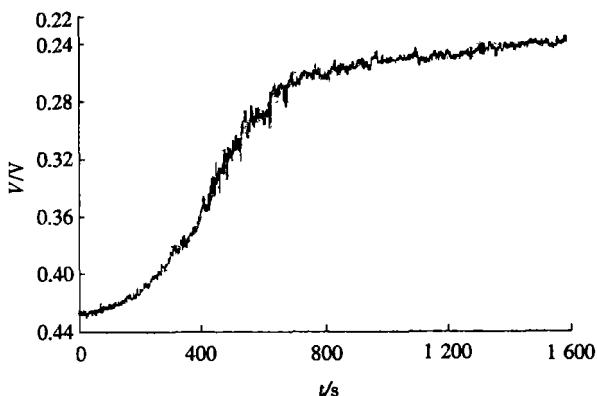


图 2 电位随时间变化曲线

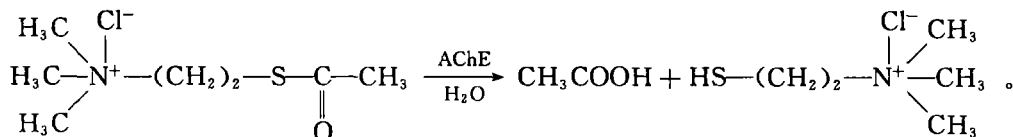
Fig. 2 Curve of the change in potential with time

的下降。记录电解过程中电位 V 随时间 t 的变化值, 得一典型的 S 型曲线。该去极化曲线的斜率 dV/dt 反映了水解速率, 即酶的催化速率。在一定条件下, 酶活性越强, 酶促反应越快, 去极化曲线的斜率 dV/dt 越大, 见图 2。

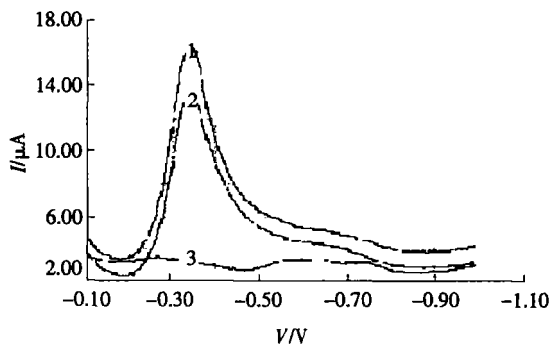
酶活力的测定参照文献[6]进行, 用恒电流计时电位法测 $V-t$ 曲线, 计算该曲线电位突跃部分的斜率 dV/dt 。

2.3 银基汞膜电极上的氧化还原反应

将固定化酶片用橡胶环固定到银基汞膜电极上作为工作电极, 与饱和甘汞电极、铂对电极组成三电极测试系统, 放入恒温电解池中, 电解池温度控制在 $(30 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 。向电解池中加入 15 mL 浓度为 0.05 mol/L pH 值为 7.0 的硼砂缓冲液, 以高纯氮除氧 15 min, 静置 2 min, 进行扫描, 测背景电流。加入 0.1 mL 浓度为 7.5 mmol/L 的氯化乙酰硫代胆碱, 搅拌、除氧、静置后, 测稳定的信号电流 I_s 。酶催化底物, 氯化乙酰硫代胆碱分解, 其反应为



分解产生的硫代胆碱 $[\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}]$ 因含 -SH 基团而具有活性。含 -SH 基团化合物在银基汞膜电极上与金属汞结合生成的硫醇汞盐还原后, 在硼砂缓冲溶液介质中于 -0.35 V 电位处形成可逆还原峰, 见图 3。峰高(即还原电流大小)不仅取决于基质溶液和酶的有效活性, 而且与酶反应体系中是否存在抑制剂有关, 当向反应体系中加入一定浓度的有机磷农药(抑制剂)时峰高降低即还原电流减小。通过比较酶被抑制前后的电信号大小, 可对有机磷农药进行定量测定^[7]。

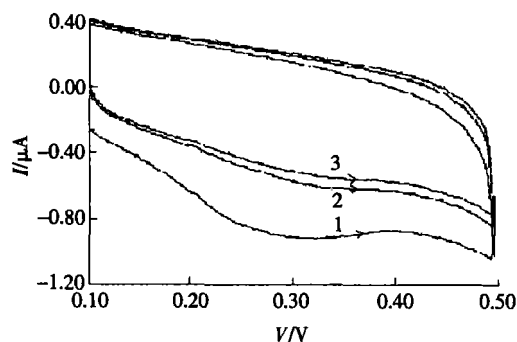


1—抑制前电流曲线; 2—抑制后电流曲线; 3—背景电流曲线

图 3 AChE 传感器测定的线性扫描伏安图
Fig. 3 Voltage-current curve determined by a AChE biosensor

2.4 酶电极电化学行为

2.4.1 循环伏安法 以玻碳电极为基质电极与酶片组成工作电极, 铂电极作对电极, 甘汞电极为指示电极, 采用循环伏安法扫描。乙酰硫代胆碱的催化水解产物 $[\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]$ 在 0.1 mol/L pH 值为 7.0 的 B-R 缓冲溶液中的连续循环伏安图见图 4。



1—第 1 周扫描曲线; 2—第 2 周扫描曲线; 3—第 3 周扫描曲线

图 4 连续循环伏安图

Fig. 4 Repetitive cyclic voltammograms

由图 4 可见, 阳极化扫描在 0.32 V 处有一个氧化峰出现, 而阴极化扫描无峰出现, 表明电极反应不可逆。第 2 周扫描氧化峰的峰高明显降低, 第 3 周扫描, 该峰趋于消失, 说明电活性物质在电极表面具有吸附性。由此可见, 硫代胆碱在玻碳电极表面的氧化为一具吸附性的不可逆过程。

2.4.2 电子转移数及电极反应速率常数的测定 对于反应物吸附的不可逆过程, 峰电位 V_p 与扫描速度 v 的关系式^[8]为

$$V_p = V^0 + (RT/\alpha nF) \ln(RT k / \alpha nF) - (RT/\alpha nF) \ln v$$

式中 V^0 为式电位, 可由低 v 的 V_p-v 曲线外推至 V_p 轴得到, 实验测得 $V^0 = 0.1969\text{ V}$ 。作 $V_p-\ln v$ 图, 得一直线($r = 0.9870$), 从直线斜率 $RT/\alpha nF = -0.0266$ 求得 $\alpha n = 0.9820(30^\circ\text{C})$ 。对于不可逆过程, $\alpha \approx 0.5$, 可求得 $n = 1.964 \approx 2$ 。直线 $\ln v = 0$ 时的截距为 0.3261 V, 故有 $0.3261 = 0.1969 + (RT/\alpha nF) \ln(RT k / \alpha nF)$,

代入有关数据,求得 $k=0.29\text{ s}^{-1}$ 。这是一个很小的值,表明反应不可逆^[9],由此确定该反应的电子转移数 $n=2$,反应速率常数 $k=0.29\text{ s}^{-1}$ 。

3 结 论

综上,乙酰胆碱酯酶电极反应是:1) 催化底物水解;2) 底物中的 I^- 被氧化为 I_2 ;3) 底物氯化硫代乙酰胆碱分解产生的硫代胆碱含有的 $-\text{SH}$ 基在银基汞膜电极上与汞生成硫醇汞盐。硫代胆碱在玻碳电极表面的氧化为具有吸附性的不可逆过程,反应的电子转移数 $n=2$,反应速率常数 $k=0.29\text{ s}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] 许翠玲,王改萍,胡胜水. 有机磷农药生物传感器的研究进展[J]. 分析科学学报,2002,18(6):502-505.
- [2] 陈 嘉,周志俊,顾祖维. 乙酰胆碱酯酶研究进展对更新有机磷毒作用的认识[J]. 劳动医学,2001,18(1):55-57.
- [3] 陈 俊,林祥钦. 乙酰胆碱/胆碱电化学生物传感器研究进展[J]. 分析科学学报,2001,17(6):515-519.
- [4] WILKINS E, CARTER M, VOSS J, et al. A quantitative determination of organophosphate pesticides in organic solvents[J]. Electrochemistry Communication, 2000, (2): 786-790.
- [5] 魏福祥,韩 菊,刘庆洲. 乙酰胆碱酯酶活性的计时电位法测定[J]. 分析测试学报,2004,23(2):9-11.
- [6] KRAMER D N, CANNON P L, GUILBAULT G G. Electrochemical determination of cholinesterase and thiocholine esters[J]. Anal Chem, 1962, 34(7): 842-845.
- [7] 魏福祥,韩 菊,刘庆洲. 胆碱酯酶生物传感器测定有机磷农药敌敌畏[J]. 河北科技大学学报,2003,24(4):92-94.
- [8] LAVIRON E. Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry[J]. Electroanal Chem, 1979, (101): 19-28.
- [9] 曹尔新,曾泳淮,高红艳. 洛美沙星的吸附伏安特性及其应用[J]. 北京师范大学学报(自然科学版),2001,37(2):237-241.

(上接第 105 页)

超声功率及反应温度是制备非晶态纳米氢氧化铜粉体的决定性因素,功率密度太小或反应温度低,造成反应速度慢,产物易团聚结晶。非晶态氢氧化铜是一种亚稳态结构,常态下氢氧化铜的化学性质也不稳定,在高温下发生分解反应而生成氧化铜或氧化亚铜^[5]。试验表明,反应过程中功率密度太大或反应温度超过 $50\text{ }^\circ\text{C}$,则造成产物结晶或分解生成氧化铜粉体,最佳功率密度为 0.85 W/cm^2 ,温度为 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 。

3 结 论

- 1) 在功率超声波作用下制备纳米氧化铜和氢氧化铜,关键因素是超声功率和反应温度。
- 2) 在制备非晶态氢氧化铜过程中,功率和温度的影响更为敏感。
- 3) 超声波影响化学反应生成纳米氧化铜、非晶态纳米氢氧化铜的细节还有待进一步研究。有研究表明,功率超声能够使水溶液中的水分子裂解,产生氢自由基和羟基自由基。这是否也是使反应加速和晶粒细化的原因,还需要进一步探讨。

参考文献:

- [1] 冯 若,李化茂. 声化学及其应用[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1992.
- [2] 冯 若. 超声手册[M]. 南京:南京大学出版社,2001.
- [3] 张立德,牟季美. 纳米材料和纳米结构[M]. 北京:科学技术出版社,2001. 76-92.
- [4] 吴新明,易求实,吴金平. 纳米氢氧化铜的均匀沉淀法制备及低温热容[J]. 材料科学与工艺,2001,9(1):71-74.
- [5] 天津化工研究院. 无机盐工业手册(下)[M]. 第3版. 北京:化学工业出版社,1988.
- [6] 程存第. 超声技术——功率超声及其应用[M]. 西安:陕西师范大学出版社,1993. 64-71.
- [7] 潘普林 B K. 晶体生长[M]. 刘如水,沈德中译. 北京:中国建筑工业出版社,1981. 76-81.
- [8] 应崇福. 超声学[M]. 北京:科学出版社,1990. 8-86, 456-527.

开拓进取,勇于创新