

槲皮素修饰玻碳电极 (Qu/GCE) 的制备及铜离子-牛血清白蛋白结合反应机制研究*

郭明** 何玲 孙一新 关颖 李铭慧

(浙江农林大学化学系, 临安, 311300)

摘要 通过滴涂法制备槲皮素修饰玻碳电极 (Qu/GCE, Quercetin/Glassy Carbon Electrode), 并对修饰电极进行电化学性能表征; 利用槲皮素修饰电极研究了 Cu^{2+} 离子与牛血清白蛋白 (BSA, Bovine Serum Albumin) 的结合反应机制. 循环伏安法测试结果显示该修饰电极具有准可逆氧化还原反应; 将槲皮素修饰电极应用于测试重金属离子-血清白蛋白的结合反应机制, 在 pH 5.0 HAc-NaAc 缓冲溶液体系中, 使用槲皮素修饰电极测定 Cu^{2+} -BSA 相互作用, 显示出良好的线性响应关系. 根据文献报道结合实验数据, 本文建议了结合参数计算理论方程, 并利用建议的理论方程计算了 Cu^{2+} -BSA 的结合常数及结合位点数, 相关研究结果可为槲皮素修饰电极研究非共价相互作用提供有益参考.

关键词 修饰电极, 槲皮素, Cu^{2+} , 牛血清白蛋白, 结合反应机制.

金属离子在维持生物体正常生理功能中起着不可替代的作用, 相当部分金属离子为生物体必需微量元素^[1]. 但金属离子浓度过高会对蛋白质等生物分子的代谢活动产生负面影响, 尤其是重金属离子, 如体内铜离子浓度过高时会产生毒性, 引起胃肠紊乱, 导致溶血和贫血^[2-3]. 一般情况下, 金属离子需通过运输到达靶位而发挥作用, 而血清白蛋白作为血浆中含量最丰富的蛋白质, 能够与许多金属离子结合, 是运输内源性及外源性物质的重要载体^[4]. 重金属离子与血清白蛋白相互作用的研究对于理解重金属离子在生物体内的运输和分布, 阐释重金属离子生理功效机理与动力学机制具有重要意义^[5-6].

目前生物活性小分子/离子与蛋白质分子的相互作用机制研究是国内外的热点研究领域, 荧光光谱^[7-8]、紫外光谱^[9-10]、红外光谱^[11-12]、圆二色谱^[13]等诸多分析手段的应用促进了该研究领域的不断深入. 相对于这些经典方法而言, 电化学分析法有着简单、快捷、高灵敏度、高选择性和应用领域广泛等特点, 其是蛋白质生物电化学的重要研究方法之一^[14-17], 但是涉及相互作用研究的报道不多, 尤其是修饰电极研究相互作用机制的文献有限. 考虑到传统电极很难对蛋白质大分子 (如血清白蛋白) 表现出电化学活性^[18], 而重金属离子与血清白蛋白的相互作用主要表现形式之一为非共价相互作用, 结合作用相对较弱, 不能形成针对性强的电极反应体系, 所以其应用一直受到限制. 通过电极修饰可以将蛋白质等大分子与活性小分子/离子的非共价相互作用的电极反应放大, 进而可以针对反应体系的电化学行为特征变化来研究相互作用, 这是一种行之有效的新方法, 也是具有新意的研究工作. 作为天然多酚类黄酮化合物, 槲皮素 (Qu, Quercetin) 具有一定的生理和药理活性^[19], 其分子结构中的 5 个酚羟基都有一定的电化学活性, 其氧化还原反应路线清晰, 标准品易得, 将槲皮素修饰电极用于研究 Cu^{2+} 与 BSA 结合反应机制, 目前尚未见文献报道.

本文通过滴涂法制备槲皮素修饰玻碳电极, 利用循环伏安法考察修饰电极的电化学性能, 采用差分脉冲伏安法 (DPV, Difference Pulse Voltammetry) 研究 Cu^{2+} 与 BSA 相互作用的电化学行为, 探讨了 Cu^{2+} 与 BSA 结合反应的机理.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

牛血清白蛋白 (纯度 $\geq 98\%$) 购自上海华美生物工程公司, 槲皮素 (纯度 $\geq 98\%$) 和卡拉胶 (纯度 $\geq$

2011 年 11 月 13 日收稿.

* 国家自然科学基金 (20877072); 浙江省科技创新项目 (2010R412042) 资助.

** 通讯联系人, E-mail: guoming@zafu.edu.cn

98%)均购自上海萨恩化学技术有限公司,其它试剂均为分析纯试剂,实验用水为二次蒸馏水.配制 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 5.0 的 HAc-NaAc 缓冲溶液,用此缓冲液配制 $1\times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA 储备液,二次水配制 $1.0\times 10^{-2}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 溶液.槲皮素配制成 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙醇溶液,卡拉胶配制成 0.4% 的水凝胶,分别取等量的卡拉胶水凝胶和槲皮素溶液混合,配成槲皮素-卡拉胶混合溶液备用.

CHI660C 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司,中国);三电极系统:玻碳电极(GCE, Glassy Carbon Electrode, $\phi\ 3\text{ mm}$)作为工作电极,饱和甘汞电极(SCE, Saturated Calomel Electrode)作为参比电极,铂电极作为对电极;SK3210HP 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司,中国).

1.2 实验方法

1.2.1 修饰电极的制备及性能测试

玻碳电极分别用 $0.3\ \mu\text{m}$ 和 $0.05\ \mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 抛光粉抛光,在超声清洗仪中依次用二次水、无水乙醇、二次水超声清洗(5 min/次),室温晾干后,电极表面按文献[20]滴涂槲皮素-卡拉胶溶液形成膜,制成槲皮素修饰电极.

制备的槲皮素修饰电极采用循环伏安法进行电化学性能测试,以槲皮素修饰玻碳电极为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝为辅助电极, pH 5.0 HAc-NaAc 缓冲溶液中,在 0.6—0.0 V 电位范围内进行循环伏安扫描获取伏安图.

1.2.2 Cu^{2+} 与 BSA 相互作用的电化学行为特征测试

向已编号的电解池中分别加入 0.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、60.0 μL $1.0\times 10^{-2}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 溶液,然后依次加入 9.0 mL $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HAc-NaAc 缓冲液(pH 5.0)和 1.0 mL 浓度为 $1.0\times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA 储备液,混合均匀,溶液总体积为 10 mL.

差分脉冲伏安法测定上述混合溶液,以槲皮素修饰玻碳电极为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝为辅助电极,记录从 0.6 V 到 -0.4 V 的伏安图.根据文献并结合具体的实验数据,理论推导槲皮素修饰电极测定重金属离子-血清白蛋白结合的参数方程,进而由建议的理论方程求取结合常数 β 和结合位点数 n .

2 结果与讨论

2.1 槲皮素修饰电极的电化学性能及其反应机理

在影响因素实验中,缓冲溶液 pH 值对溶液体系的峰值存在一定影响,故配制系列 pH 3.5—6.5 的 HAc-NaAc 缓冲液,分别用循环伏安法测定槲皮素的氧化峰电流,其峰电流与 pH 的关系见图 1. 由图 1 可见,在缓冲溶液的 pH 值为 5.0 时,峰形最好,且峰电流绝对值最大.当缓冲溶液 $\text{pH} < 5.0$,氧化还原峰形较宽,当 pH 过大时,氧化还原峰形不明显.故后续实验所用缓冲溶液选用 pH 5.0 的 HAc-NaAc 溶液.

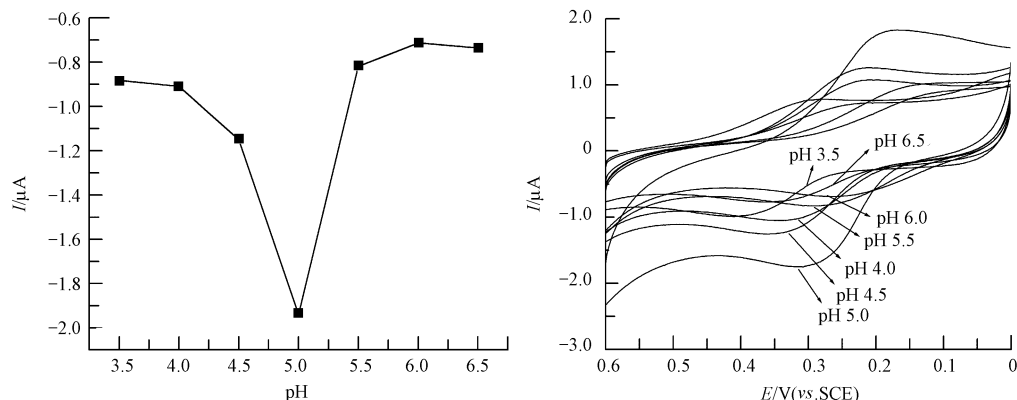


图 1 槲皮素的峰电流与 pH 的关系

Fig. 1 The relationship between Quercetin's peak current and solution pH

图 2 为槲皮素修饰电极在 pH 5.0 HAc-NaAc 缓冲液中的循环伏安图. 从图 2 可见, 在 0.6—0.0 V 范围内出现一对氧化还原峰, 峰电位为 $E_{pa}=0.334$ V, $E_{pc}=0.247$ V. 其峰电位差 $\Delta E_p=87.0$ mV, 峰电流之比 $I_{pc}/I_{pa}=0.85$. 文献报道^[21] 槲皮素的氧化还原反应为 2 电子反应, 则 $\Delta E_p > (59/n)$ mV, $I_{pc}/I_{pa} \approx 1$, 表明槲皮素修饰电极在选定缓冲溶液体系中的氧化还原反应为准可逆反应过程. 槲皮素为黄酮类化合物, 化学名为 3, 3', 4', 5, 7-五羟基黄酮, 它的基本结构是两个芳香环(A 和 B), 由含氧六元环(C)连接而成. 槲皮素分子中的五个羟基在一定条件下可被氧化, 但 5 个羟基的空间位置不同, 其氧化还原反应活性和电化学可逆性差异较大, 其中 B 环上两个邻位羟基的电活性最大, 是槲皮素起抗氧化作用的主要官能基团, 而 C 环上羟基的氧化还原反应表现为不可逆^[21]. 由此, 在本实验条件下, 图 2 中氧化还原峰为槲皮素 B 环上 3', 4' 位置羟基发生氧化还原反应得到. 电化学机理由图 3 所示. 槲皮素 B 环上 3', 4' 位置羟基脱氢, 失去的 2 电子通过共轭双键转移到 A 环上 5 羟基位置上, 通过 A 环上 5 羟基与玻碳电极表面的含氧基团相互作用, 成功将电子转移至电极表面, 得到图 2 中的氧化还原峰.

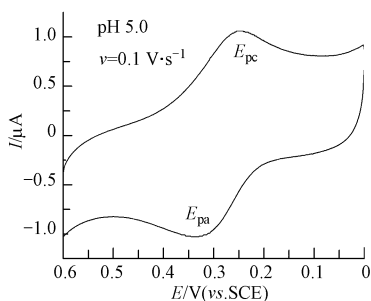


图 2 槲皮素修饰电极在 HAc-NaAc 缓冲溶液中的循环伏安图

Fig. 2 Cyclic voltammogram of Quercetin-modified electrode in the HAc-NaAc buffer solution

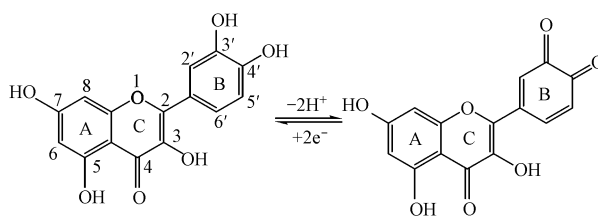


图 3 槲皮素的氧化还原反应机理

Fig. 3 The redox reaction mechanism of Quercetin

2.2 Cu^{2+} -BSA 相互作用体系中单一组分的电化学性能测定

为了考察 Cu^{2+} -BSA 的相互作用机制, 需要测定 Cu^{2+} -BSA 相互作用体系中单一组分在电极上的电化学性能. 利用槲皮素修饰电极和裸电极测定了 Cu^{2+} 和 BSA 的差分脉冲伏安(DPV)行为, 见图 4. 从图 4 中可见, $1.0 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 在裸电极上(曲线 c)的峰电位为 -0.096 V, 峰形不明显, 峰电流较小, 但 $1.0 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 在槲皮素修饰电极上(曲线 a)的峰电位为 -0.04 V, 峰形良好, 峰电流也明显增大, 通过实验结果比较发现还原峰电流比裸电极增大了约 10 倍. 表明槲皮素修饰电极对 Cu^{2+} 有较好的电化学响应, 同时该电极具有较强的抗干扰能力^[22].

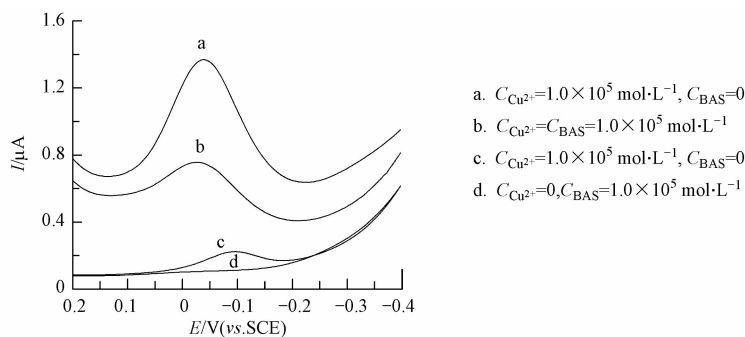


图 4 Cu^{2+} 与 BSA 在槲皮素修饰电极(a,b,d)和裸电极(c)上的差分脉冲伏安图

Fig. 4 Differential pulse voltammetric behavior of Cu^{2+} ion and BSA on the Quercetin-modified electrode(a,b,d) and bare electrode(c)

当 Cu^{2+} 浓度为 $1.0 \times 10^7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 大量的 NO_3^- 、 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} , 2000 倍的 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Al^{3+} 、 Cl^- , 500 倍的 Mn^{2+} 、 Co^{3+} , 50 倍的 Sn^{4+} 、 Fe^{3+} 等均不干扰测定.

槲皮素分子中的 B 环 3',4'-二羟基的活性最大,可以与 Cu²⁺ 发生配位反应使 Cu²⁺ 在电极上富集,这引起了 Cu²⁺ 的电化学信号在槲皮素修饰电极上得到较大提高. 在较低电位下 B 环上两个邻位羟基脱除两个氢,氧化成为槲皮素邻醌,同时在 0.0 V 左右 Cu²⁺ 可被还原而得到一个还原峰. 故 Cu²⁺ 存在条件下槲皮素修饰电极的可能电化学反应机理如图 5 所示.

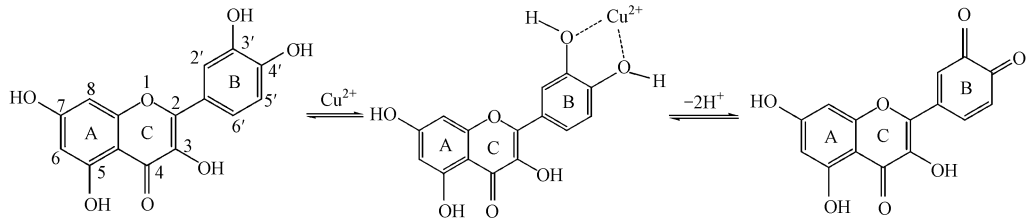


图 5 槲皮素-Cu²⁺ 的电化学反应机理

Fig. 5 Electrochemical reaction mechanism of Quercetin-Cu²⁺

槲皮素修饰电极测定 BSA 在缓冲溶液中的电化学行为,结果见图 4(d). 从图 4 中曲线 d 可见,1.0 × 10⁵ mol · L⁻¹ BSA 在缓冲溶液中没有出现任何峰. 进而利用槲皮素修饰电极测定含有 1.0 × 10⁵ mol · L⁻¹ Cu²⁺ 与 1.0 × 10⁵ mol · L⁻¹ BSA 的混合溶液体系的电化学行为,以分析 Cu²⁺-BSA 结合反应机理,结果见图 4(b). 从图 4 中曲线 b 可见,在电位为 -0.024 V 处存在一个还原峰,与图 4 曲线 a 比较,其还原峰电流明显降低,且峰电位略有正移,同时没有产生新的还原峰. 以上电化学现象表明,在 0.0 V 左右出现的峰为 Cu²⁺ 在电极上产生的还原峰,且 Cu²⁺ 与 BSA 之间发生了相互作用,使得 Cu²⁺ 的电化学行为发生了变化. 由峰电流值降低推断两者生成了一种不能在修饰电极上被还原的化合物,由于自由 Cu²⁺ 浓度的降低,导致 Cu²⁺ 的峰电流也随之降低.

为了进一步说明 Cu²⁺ 与 BSA 发生的相互作用,在 pH 5.0 HAc-NaAc 缓冲液中,固定 Cu²⁺ 浓度为 5.0 × 10⁵ mol · L⁻¹,对于存在和不存在 BSA 组分两种条件下,采用循环伏安法考察不同溶液体系的扫描速率对峰电流的影响,结果见图 6. 由图 6 可见,在 0.02—0.2 V · s⁻¹ 扫描范围内相应的还原峰电流与扫速平方根呈线性关系,线性方程分别为:

$$I_{pc} = 2.0876v^{1/2} - 0.2333, r = 0.9838 \quad (I_p: \mu A, v: V \cdot s^{-1}, \text{图 6a})$$

$$I_{pc} = 1.6744v^{1/2} - 0.1885, r = 0.9863 \quad (I_p: \mu A, v: V \cdot s^{-1}, \text{图 6b})$$

由结果可见,还原峰电流 I_{pc} 与扫速平方根 v^{1/2} 成一定的线性关系,同时由实验数据得知峰电位不随扫速而变化,说明无论 BSA 是否存在,Cu²⁺ 在槲皮素修饰电极上均受扩散控制^[23]. 比较图 6 中的线性 a 与 b,在不同的扫描速率条件下,BSA 存在时的峰电流低于 BSA 不存在时的峰电流值,由此得知 Cu²⁺ 与 BSA 存在相互作用.

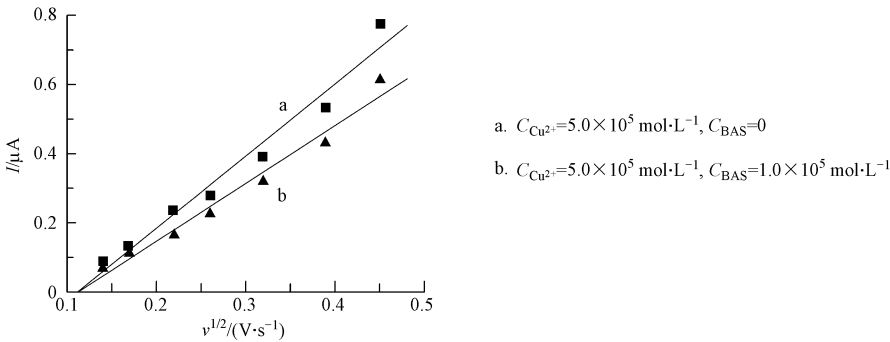


图 6 当溶液中不存在和存在 BSA 时 Cu²⁺ 峰电流与扫速 v 的线性关系

Fig. 6 The relationship between peak current of Cu²⁺ ions and scan rate in the absence(a) and presence(b) of BSA

2.3 Cu²⁺-BSA 相互作用体系的结合常数和结合位点数测定

生物大分子-活性小分子相互作用研究中,结合参数的求取具有重要意义,根据文献中提出的公式^[24-25],结合本工作的具体实验数据,合理建立 Cu²⁺ 与 BSA 相互作用的结合模型,进而理论推求结合

常数 β 和结合位点数 n .

设定 BSA 与 Cu^{2+} 生成复合物 $\text{BSA-}n\text{Cu}$,



则结合常数 β 可表示为:

$$\beta = [\text{BSA-}n\text{Cu}] / [\text{Cu}]^n [\text{BSA}] \tag{2}$$

其中, $[\text{BSA}]$ 、 $[\text{BSA-}n\text{Cu}]$ 、 $[\text{Cu}]$ 分别代表溶液中未结合 Cu 的 BSA 浓度、结合 Cu 的 BSA 浓度、自由 Cu^{2+} 浓度. 又根据物料平衡, 得到溶液中 BSA 的总浓度 C_{BSA} :

$$c_{\text{BSA}} = [\text{BSA}] + [\text{BSA-}n\text{Cu}] \tag{3}$$

同样可得到溶液中 Cu^{2+} 的总浓度 $[\text{Cu}]_0$:

$$[\text{Cu}]_0 = [\text{Cu}] + n[\text{BSA-}n\text{Cu}] \tag{4}$$

在实验条件下, 峰电流 I 与电极反应体系中的 Cu^{2+} 浓度呈正比, 其可表示为:

$$I = K[\text{Cu}] \tag{5}$$

其中, K 为比例常数, 当温度及反应条件确定时, 其为定值. $I_{[\text{Cu}]_0}$ 和 $I_{[\text{Cu}]}$ 分别表示不加入和加入 BSA 时 Cu^{2+} 峰电流值, 其差值可表示为:

$$\Delta I = I_{[\text{Cu}]_0} - I_{[\text{Cu}]} \tag{6}$$

将公式(4)和(5)带入公式(6)中:

$$\Delta I = K([\text{Cu}]_0 - [\text{Cu}]) = Kn[\text{BSA-}n\text{Cu}] \tag{7}$$

即 ΔI 与 $[\text{BSA-}n\text{Cu}]$ 呈正比. 当 $[\text{BSA-}n\text{Cu}]$ 达到最大值, 即形成复合物的浓度达到极值时, ΔI 达到峰值, 即 ΔI_{max} . 当复合物浓度达到极值时, $[\text{BSA-}n\text{Cu}]_{\text{max}}$ 应等于 C_{BSA} .

$$\Delta I_{\text{max}} = Kn[\text{BSA-}n\text{Cu}]_{\text{max}} = Knc_{\text{BSA}} \tag{8}$$

公式(8)和(7)相减, 得到:

$$\Delta I_{\text{max}} - \Delta I = Kn(C_{\text{BSA}} - [\text{BSA-}n\text{Cu}]) = Kn[\text{BSA}] \tag{9}$$

公式(7)和(9)带入公式(2)中, 得到:

$$\lg[\Delta I/(\Delta I_{\text{max}} - \Delta I)] = \lg\beta + n\lg[\text{Cu}] \tag{10}$$

由方程式(10)即可计算蛋白质大分子与重金属离子相互作用的结合常数及结合位点数. 为验证理论方程的正确性, 进行 Cu^{2+} 与 BSA 相互作用影响峰电流的实验, 结果见图 7. 由图 7 可见, a 为溶液中不存在 BSA 时峰电流 I_a 与 Cu^{2+} 浓度的关系, b 为溶液中存在 BSA, 且 BSA 浓度为定值时的峰电流 I_b 与 Cu^{2+} 浓度的关系, c 为 a、b 两种情况下峰电流差 ΔI 与 Cu^{2+} 浓度的关系. 依据图 7 中的实验数据, 以 $\lg[\Delta I/(\Delta I_{\text{max}} - \Delta I)]$ 对 $\lg[\text{Cu}]$ 作图, 见图 8. 由图 8 可说明 $\lg[\Delta I/(\Delta I_{\text{max}} - \Delta I)]$ 对 $\lg[\text{Cu}]$ 确实存在方程式(10)的关系, 实验结果验证了建议的理论方程. 同时根据该线性方程求得结合常数 $\beta = 1.93 \times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 和结合位点数 $n = 1.10$. 由 β 及 n 值可见, Cu^{2+} -BSA 的结合反应较强, 将该结果与其它传统仪器分析方法的结果进行比较^[26], 得到 β 与 n 基本相符的结果.

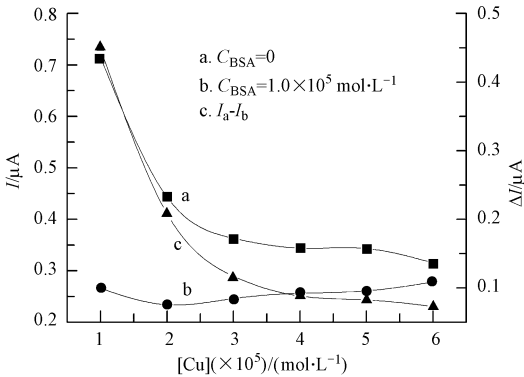


图 7 Cu^{2+} -BSA 体系中 I 与 $[\text{Cu}]$ (a,b), ΔI 与 $[\text{Cu}]$ (c) 的关系图

Fig. 7 Relationship between I and $[\text{Cu}]$ (a,b), and ΔI and $[\text{Cu}]$ (c) in Cu^{2+} -BSA solution system

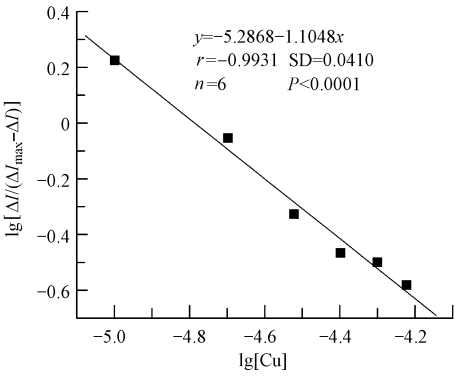


图 8 Cu^{2+} -BSA 体系中 $\lg[\Delta I/(\Delta I_{\text{max}} - \Delta I)]$ 与 $\lg[\text{Cu}]$ 的相关性

Fig. 8 The relationship between $\lg[\Delta I/(\Delta I_{\text{max}} - \Delta I)]$ and $\lg[\text{Cu}]$ in Cu^{2+} -BSA solution system

由此证明槲皮素修饰电极可用于研究 Cu^{2+} 离子与牛血清白蛋白相互作用,同时, β 与 n 的结果相符也成功验证了建议的理论方程可行.

2.4 Cu^{2+} -BSA 结合反应机理的探讨

在槲皮素分子中,有 3 个六元环, B 环上 3' 和 4' 位置羟基氧原子的超离域度最大,最易与金属离子配位,其次较易与金属离子发生配位作用的为 C 环的 3 和 4 位羟基, A 环配位活性最低. 因此,本实验条件下,修饰在电极表面的槲皮素,其分子上的 B 环可以和 Cu^{2+} 进行配位,将 Cu^{2+} 富集于电极表面. 当 BSA 与 Cu^{2+} 非共价作用时,相当于将发生的非共价相互作用固定在电极表面,这在一定程度上放大了非共价相互作用的电极反应,把非共价作用通过反应体系的电化学行为特征变化直接显现出来.

研究结果表明,BSA 的加入使得 Cu^{2+} 的峰电流降低,证明 Cu^{2+} 和 BSA 存在一定的相互作用. 其可能的电化学反应机理推断如下: 修饰电极插入溶液体系时,修饰电极上的槲皮素分子与 BSA 相互作用,王玲等^[27]指出槲皮素分子的部分结构片段会插入 BSA 分子内部,造成其活性基团被包埋于 BSA 的疏水腔内,因此 BSA 通过疏水作用固定于槲皮素修饰电极上. 小分子与蛋白质的相互作用力主要有范德华力、氢键、疏水作用力、静电引力等. 据文献报道^[28],BSA 的等电点 $\text{pI} = 4.7$,在本实验条件下, $\text{pH} 5.0$ 大于 BSA 的等电点,当 BSA 所在溶液的 pH 值高于 BSA 的等电点时,BSA 上的赖氨酸、精氨酸及其它氨基酸残基带负电,尤其在 BSA 结构域 I 上有最高的净电荷^[29],因此阳离子 Cu^{2+} 很容易通过静电作用与带负电的 BSA 结合形成复合物. 鉴于 BSA 与 Cu^{2+} 的结合使得自由 Cu^{2+} 浓度降低,导致 Cu^{2+} 还原峰电流降低,从而放大了 Cu^{2+} 与 BSA 的相互作用,说明槲皮素修饰电极可以放大相互作用的电极反应,用于研究金属离子与蛋白质的相互作用,进一步丰富金属离子与蛋白质分子相互作用的研究内容,具有实际参考意义.

3 结论

本文将槲皮素修饰电极成功用于研究 Cu^{2+} 与 BSA 相互作用机制. 结果显示,阳离子 Cu^{2+} 与带负电荷的 BSA 可能主要通过静电作用形成复合物. 本文所得结果说明修饰电极能放大重金属离子 (Cu^{2+}) 与血清蛋白质分子 (BSA) 非共价相互作用的电极反应,本文研究的是单一重金属离子与单一蛋白质的体外相互作用,在实际的体内血清蛋白质溶液体系中,含有多种金属离子,关于体内多种金属离子与血清蛋白质分子的相互作用以及其它金属离子对研究对象金属离子的干扰影响等相关研究,既是一项有意义的工作,也是一项工作量巨大的系统探索,有待于后续的深入研究. 而针对重金属离子组与血清白蛋白或者重金属离子与血清中高丰度蛋白质组,更甚至是重金属离子组与血清中高丰度蛋白质组的相互作用机理研究,虽已有少数研究者进行了前期阶段性的研究,但尚需进一步深入开展工作. 本研究的阶段性成果为生物活性小分子/离子与蛋白质分子的相互作用机制提供了一种快速、简单有效的方法,对探讨非共价相互作用具有一定的参考价值.

参 考 文 献

- [1] 王锐,白燕,梁志红,等. 硒代蛋氨酸与铜离子的相互作用[J]. 物理化学学报, 2010, 26(12): 3225-3229
- [2] Dongen E M, Klomp L W, Merks M. Copper-dependent protein-protein interactions studied by yeast two-hybrid analysis[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2004, 323(3): 789-795
- [3] Kepova K D, Stoilova L S, Stoyanova Z, et al. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese[J]. Environmental and Experimental Botany, 2004, 52(3): 253-266
- [4] 胡雪娇,李彦周,熊宇迪,等. 光谱学方法应用于小分子与牛血清白蛋白相互作用研究进展[J]. 理化检验(化学分册), 2010, 46(5): 583-588
- [5] Goumakos W, Laussac J P, Sarkar B. Binding of cadmium (II) and zinc (II) to human and dog serum albumins. An equilibrium dialysis and ^{113}Cd -NMR study[J]. Biochemistry & Cell Biology, 1991, 69(12): 809-814
- [6] Ohysli E, Hamada Y, Nakata K, et al. The interaction between human and bovine serum albumin and zinc studied by a competitive spectrophotometry[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 1999, 75(3): 213-218
- [7] 肖厚荣,盛良全,施春华,等. 胱氨酸与烟草多酚氧化酶相互作用的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(12): 1618-1622

- [8] 陈代武, 谢青季, 蒋雪琴, 等. 槲皮素与酪蛋白和牛血清白蛋白的相互作用及共存碳纳米管的影响[J]. 物理化学学报, 2008, 24(3): 379-387
- [9] 马静, 郑学仿, 唐乾, 等. 光谱法研究 Cu^{2+} 与肌红蛋白的相互作用[J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(2): 258-263
- [10] 张海蓉, 边贺东, 倪寿海, 等. 紫外照射下 $\text{Pb}(\text{II})$ 与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 无机化学学报, 2009, 25(2): 306-311
- [11] 叶青, 胡仁, 林种玉, 等. 羟基磷灰石与牛血清白蛋白相互作用的原位红外光谱研究[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(8): 1552-1554
- [12] 谢孟峡, 徐晓云, 王英典, 等. 4',5,7-三羟基二氢黄酮与人血清白蛋白相互作用的光谱学研究[J]. 化学学报, 2005, 63(22): 2055-2062
- [13] Anwesha B, Kaushik B, Pradeep K S. Interaction of 7-hydroxyflavone with human serum albumin: A spectroscopic study[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B, 2008, 90(1): 33-40
- [14] 张祖训, 汪尔康. 电化学原理和方法[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 81-93
- [15] 孙伟, 焦奎, 刘晓云. 电化学法研究蛋白质和茜素红 S 的相互作用[J]. 分析化学, 2002, 30(3): 312-314
- [16] 李玉平, 曹宏斌, 张懿. 血红蛋白在碳纳米管修饰碳糊电极上的直接电化学行为[J]. 物理化学学报, 2005, 21(2): 187-191
- [17] 吕亚芬, 印亚静, 吴萍, 等. 肌红蛋白在碳纳米管修饰电极上的直接电化学和电催化性能[J]. 物理化学学报, 2007, 23(1): 5-11
- [18] 张玉忠, 赵红, 袁伟斌. 大黄酸玻碳修饰电极对血红蛋白的催化还原[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(3): 391-393
- [19] Kang J W, Zhuo L, Lu X Q, et al. Electrochemical behavior of dopamine at a quercetin-SAM-modified gold electrode and analytical application[J]. Journal of Solid State Electrochemistry, 2005, 9(2): 114-120
- [20] Calfumán K, Aguirre M J, Villagra D, et al. Nafion/tetraruthenated porphyrin glassy carbon-modified electrode: characterization and voltammetric studies of sulfite oxidation in water-ethanol solutions[J]. Journal of Solid State Electrochemistry, 2010, 14(6): 1065-1072
- [21] Brett A M O, Ghica M E. Electrochemical oxidation of quercetin[J]. Electroanalysis, 2009, 15(22): 1745-1750
- [22] 费俊杰, 王俊芬, 黎拒难, 等. 槲皮素修饰碳糊电极吸附溶出伏安法测定人血清中铜[J]. 分析科学学报, 2001, 17(5): 375-378
- [23] 董绍俊, 车广礼, 谢远武. 化学修饰电极[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 52-72
- [24] 李南强, 闵静. 钕-胭脂红酸非电活性络合物的极谱研究[J]. 分析化学, 1989, 17(4): 346-348
- [25] Dong S Y, Xue C X, Huang T L. Electrochemical studies of the interaction of clarithromycin with bovine serum albumin[J]. Analytical Sciences, 2008, 24(9): 1087-1091
- [26] Masuoka J, Hegenauer J, Van Dyke B R, et al. Intrinsic stoichiometric equilibrium constants for the binding of zinc(II) and copper(II) to the high affinity site of serum albumin[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(29): 21533-21537
- [27] 王玲, 屈凌波, 杨冉, 等. 槲皮素和芦丁与牛血清白蛋白相互作用研究[J]. 分析科学学报, 2006, 22(6): 719-722
- [28] 马春琪, 李克安, 赵凤林, 等. 牛血清白蛋白与铬天青 S 作用机理的研究[J]. 化学学报, 1999, 59(4): 389-395
- [29] 邓斌. 几种小分子与血清白蛋白相互作用的研究[D]. 沈阳: 辽宁大学硕士学位论文, 2008

Investigation of the binding interaction between copper ions and bovine serum albumin on Quercetin-modified glassy carbon electrode

GUO Ming* HE Ling SUN Yixin GUAN Ying LI Minghui

(Department of Chemistry, Zhejiang Agricultural & Forestry University, Lin'an, 311300, China)

ABSTRACT

A Quercetin modified glassy carbon electrode was prepared by drop-dry method, and its electrochemical properties were characterized. The interaction between Cu^{2+} ions and bovine serum albumin (BSA) was studied on the Quercetin modified electrode. The results showed that the Quercetin modified electrode exhibited quasi-reversible redox reaction by cyclic voltammetry. The modified electrode was used to study the binding interaction between Cu^{2+} and BSA in pH 5.0 NaAc-HAc buffer solution. A theoretical treatment was proposed to calculate the binding parameters of the reaction. The binding constant and number of binding sites of the interactions were calculated to be $1.93 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ and 1.10, respectively. The results provide a method to study noncovalent interaction on the Quercetin modified electrode.

Keywords: modified electrode, Quercetin, Cu^{2+} , bovine serum albumin, binding interaction.