



A Sodium Selective Electrochemical Biosensor Based on the Sodium Pump

Li Longjie, Zhao Hongshen, Ji Liangliang, Ma Baofu, Chen Deliang*

College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

Email address:

lilongjie13@mails.ucas.ac.cn (Li Longjie), zhaohongshen12@mails.ucas.ac.cn (Zhao Hongshen),

jiliangliang14@mails.ucas.ac.cn (Ji Liangliang), mabaofu15@mails.ucas.ac.cn (Ma Baofu), dlchen@ucas.ac.cn (Chen Deliang)

*Corresponding author

To cite this article:

Li Longjie, Zhao Hongshen, Ji Liangliang, Ma Baofu, Chen Deliang. A Sodium Selective Electrochemical Biosensor Based on the Sodium Pump. *Science Discovery*. Vol. 4, No. 4, 2016, pp. 238-242. doi: 10.11648/j.sd.20160404.16

Received: June 6, 2016; Accepted: July 5, 2016; Published: July 20, 2016

Abstract: Na^+ is one of the most abundant metal ions and plays critical physiological roles in biological systems, therefore development of new Na^+ sensors is becoming increasingly important. Currently many physical and chemical methods have been applied to detect Na^+ . In this paper, we developed a novel Na^+ electrode based on a biomaterial, light-driven Na^+ pump (NdR2). The photocurrent of the electrode upon excitation shows a characteristic positive polarity in Na^+ solution at neutral pH. The peak current shows Na^+ dependency within the concentration range from 1 to 200 mmol/L. The stability data show that the electrode is stable after being stored at 50°C for 90 min. As a novel biosensor, this Na^+ pump-based electrode is of great significance in the study of ion transport mechanism and application of ion detection.

Keywords: NdR2, NdR2-liposome-ITO Electrode, Na^+ Concentration, Biosensor

一种基于 Na^+ 泵的钠离子选择性电化学生物传感器

李龙杰, 赵宏深, 季亮亮, 马宝福, 陈德亮*

生命科学学院, 中国科学院大学, 北京, 中国

邮箱

lilongjie13@mails.ucas.ac.cn (李龙杰), zhaohongshen12@mails.ucas.ac.cn (赵宏深),

jiliangliang14@mails.ucas.ac.cn (季亮亮), mabaofu15@mails.ucas.ac.cn (马宝福), dlchen@ucas.ac.cn (陈德亮)

摘要: 钠离子作为人体生理代谢中非常重要的离子, 对其进行检测非常重要。目前国际上检测钠离子的方法有许多, 但主要是利用物理、化学方法。本文将一种光驱动的 Na^+ 转运蛋白(NdR2)与氧化铟锡导电玻璃(ITO)结合, 制备成生物电极, 对 Na^+ 进行检测。结果表明, 此电极对 Na^+ 有特征性的响应, 电流峰值呈现 Na^+ 浓度依赖性(1~200mM)。稳定性试验表明, 50°C处理90min, 不影响电极探测 Na^+ 浓度的功能。作为全新的钠离子探测生物传感器、 Na^+ 转运蛋白电极, 在理论和应用领域都具备重要的研究意义。

关键词: NdR2, NdR2-脂质体-ITO电极, Na^+ 浓度, 生物传感器

1. 前言

Na^+ 作为生命体中极为重要的离子,参与神经传导、肌肉运动、新陈代谢等生理活动。因此, Na^+ 的定量检测在基础理论及应用领域都具有非常重要的研究意义。目前国际上检测 Na^+ 的方法有许多,包括离子选择性电极、原子吸收光谱法[1]、荧光显微镜[2]、 ^{23}Na 核磁共振[3]等一系列物理、化学方法。2015年PNAS上首次报道了利用生物学原理探测 Na^+ 浓度的方法——Torabi等人[4]发现一种钠离子特异性DNAzyme,其结合 Na^+ 之后能够对DNA进行剪切,从而提出了一种基于生物材料的检测 Na^+ 浓度的方法。

本文的工作则首次提出将视紫红质家族中的一种全新蛋白——钠离子泵NdR2,与电化学的方法相结合,设计了一种基于蛋白质的稳定的钠离子选择性电化学生物传感器。

视紫红质是一种结合视黄醛配基的膜蛋白,以七次 α -螺旋结构插入细胞膜内。视黄醛位于七次跨膜螺旋结构的中心,通过希夫碱基与第七螺旋上的赖氨酸残基形成共价连接[5]。

视紫红质在光作用下能产生电信号,这一现象在早期研究细菌视紫红质BR光驱动质子转运特性时就已发现。视紫红质蛋白在传递离子时,内部构象的变化所导致的电荷分布变化以及离子在内部的定向传递,都会使蛋白质两侧产生电势变化[6, 7]。将视紫红质固定化处理于电极表面,可用于探测光驱动的电位信号。

基于这种光电响应的性质,视紫红质家族在信息探测、生物传感、太阳能电池[8]、人工视网膜[9, 10]等方面具有众多的实际应用与广阔的研究前景。Choi等[11]研究了由BR/黄素组成的电化学光电池,认为其可作为颜色识别的人工光感受器,能模仿人类视觉系统的信息处理。

Ahmadi等[12]设计制造出一种基于BR的传感器来检测X-射线辐射,通过辐射诱导的电流来监测X-射线辐射。Rao等[13, 14]利用变形菌视紫红质PR的pH依赖的光电特性,设计出了一种pH电化学生物传感器,与其他基于荧光、磷光、比色的方法比较,这种传感器能够快速、高敏感地实时探测溶液pH的变化。

NdR2是2013年在海洋黄杆菌*Nonlabens dokdonensis*的细胞膜上发现新的视紫红质[15],其功能目前没有报道,而本实验室的前期工作显示,NdR2是一个光驱动的钠离子泵。基于该家族蛋白的光电响应特性,本文通过将NdR2-脂质体与氧化铟锡导电玻璃结合制备成NdR2-脂质体-ITO电极,实验发现:该电极对 Na^+ 、 Li^+ 有特异性的正电流响应,并具有浓度依赖性(1mM~200mM);电极经过较高温度(50℃)处理90min后,仍然对 Na^+ 保持特异性响应并能检测 Na^+ 浓度。

2. 实验方法

2.1. NdR2的提取纯化

培养大肠杆菌表达NdR2,离心,收集细菌。用Lysis buffer (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA- Na_2 , 100mM KCl, 1mM DTT, pH8.0)重悬细菌,离心。用Lysis buffer充分悬浮

细菌,加入Lysozyme (~5mg/30ml)和PMSF,裂解细菌。再用超声继续破碎细菌,离心收集上清液(红色)。将上清液高速离心收集沉淀(红色)。用Solubilizing buffer (10mM Tris-HCl, 400mM KCl, pH8.0)洗涤1次,离心后再用含DDM的Solubilizing buffer (10mM Tris-HCl, 400mM KCl, 1%的DDM, pH8.0)溶解,4℃避光匀浆。高速离心,收集上清液(红色),加入imidazole (pH8.0),其浓度为20mM。用大量去离子水洗涤Ni-NTA,再用10倍柱体积Equilibrium buffer (10mM Tris-HCl, 400mM KCl, 0.05% DDM, 10mM imidazole, pH8.0)洗涤。将上述红色上清加入Ni-NTA中纯化。用20倍柱体积的Washing buffer (10mM Tris-HCl, 400mM KCl, 0.05% DDM, 20mM imidazole, pH8.0)洗涤。用Elution buffer (10mM Tris-HCl, 400mM KCl, 0.05% DDM, 500mM imidazole, pH8.0)洗脱,收集洗脱液,4℃浓缩、透析。透析液(5mM Tris-HCl, 200mM KCl, pH8.0)。光谱测定浓缩透析后的蛋白浓度。浓度计算方法:根据 $A = \epsilon \cdot l \cdot c$,A为特征吸收峰处的吸光值,一般 $l = 1\text{cm}$,对于NdR2 (520~530nm), $\epsilon = 50000$ 。

2.2. NdR2-脂质体的制备

称取大豆卵磷脂、胆固醇、维生素E(质量比550:50:1),加入乙醚充分溶解。旋转蒸发,真空泵抽气,得到薄层膜状磷脂贴于玻璃瓶内壁。用氮气吹薄膜表面,使乙醚完全挥发。加入buffer (0.1 M Tris-Cl, pH 8.0),使用超声仪超声,使磷脂清澈, $\text{OD}_{550} = 0.45$ 。向磷脂溶液中加入Triton X-100,混匀(最终Triton X-100的浓度为0.5%)。将NdR2蛋白(5 mM Tris-Cl, 200 mM KCl, 0.05% DDM, pH 8.0)与脂质体溶液混合,室温用混匀器震荡60 min。其中,蛋白:磷脂=8:10(质量比),即摩尔比为1:50。NdR2终浓度为2mg/ml。60min后加入bio-beads去除去垢剂。用水稀释样品,离心,用水重悬。NdR2终浓度为4mg/ml。

2.3. 光电流测定方法

将ITO导电玻璃裁剪成小块,先后用丙酮、乙醇、水进行超声清洗。清洗完毕后吹干,竖立保存待用。裁剪合适大小的硅胶,用打孔器打出圆孔,将硅胶吸附于ITO的导电侧。吸取样品滴加到圆孔中,避免出现气泡。置于暗处,待样品的水分蒸发完全电极即制备完成。调试好光电流检测系统,将制备完成的电极与一个不含蛋白样品的对电极分别放到三层聚四氟乙烯板的中间,通过中间的聚四氟乙烯板上的小孔将电解液(LiCl 、 NaCl 、 KCl 、 CsCl 、 CaCl_2 、 MgCl_2 、 NaF 、 Na_2SO_4 、 K_2SO_4)注射到两个电极之间,放置于光电流检测系统中检测。

3. 实验结果与讨论

3.1. NdR2, NdR2-脂质体及NdR2-脂质体-ITO电极的表征

中性的NdR2-DDM溶液为红色(1A),而制备成的电极,由于空气中 CO_2 存在等原因,导致电极表面的NdR2-脂质体呈酸性,颜色为蓝紫色(1B)。将电极置于中性溶液中平衡一段时间后,颜色恢复(1C)。

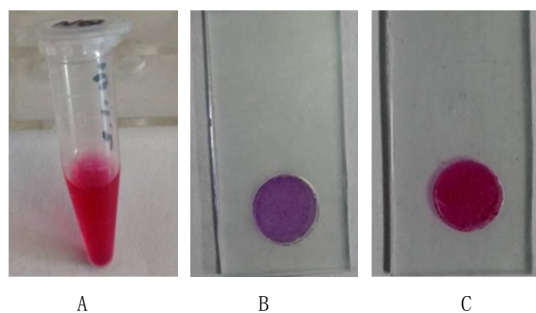


图1 NdR2和NdR2-脂质体-ITO电极的实物图 (A, B, C)。

采用负染色技术对NdR2进行染色,用透射电子显微镜(TEM)对蛋白进行观察发现,表面活性剂DDM包裹的NdR2尺寸大概在20nm左右,如图2A所示。

表面活性剂包裹的蛋白质相比于脂质重组状态,在溶液中更加稳定,不容易形成蛋白聚集或沉降。但表面活性剂渗透性较强,无法有效地维持离子浓度梯度。因此,为了有效利用NdR2的光驱动离子泵特性,需要将其组装到更利于离子浓度梯度形成的微环境中。另外,脂质重组蛋白与材料的结合力会增强,不易从ITO上脱落。因此,本实验选择了脂质体对NdR2进行重组。图2B显示,空脂质体的大小约为几十至几百纳米。

氧化铟锡导电玻璃(ITO)有透明、易裁剪、导电侧电阻小等优点,将制备好的NdR2-脂质体自然沉积到ITO上,作为工作电极,置于光电响应检测系统中进行光电流的检测。通过扫描电镜(SEM)可以观察到,沉积NdR2-脂质体后ITO表面具有尺寸几十至几百纳米大小的球状颗粒(Data no shown)。

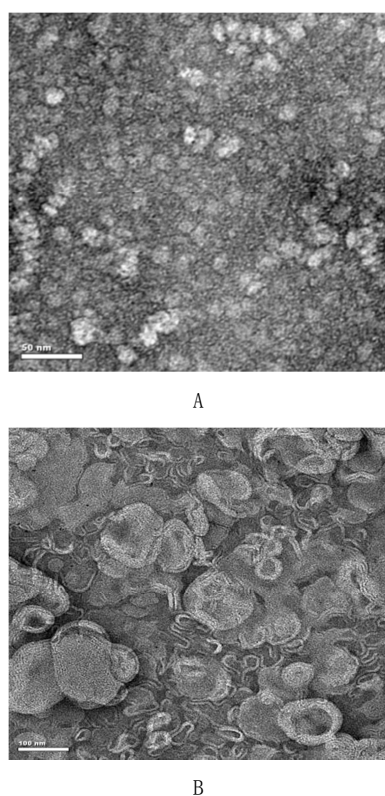


图2 透射电子显微镜(TEM)下的NdR2-DDM (A)及空脂质体(B)。

3.2. NdR2-脂质体-ITO电极的离子选择性与 Na^+ 浓度依赖性

Inoue等人[16, 17]曾报道一种NdR2的同源蛋白KR2,光照下在不同的阳离子溶液中行使不同的功能,在 Li^+ 或 Na^+ 溶液中,它将 Li^+ 或 Na^+ 从蛋白C端向N端传递,而在其他阳离子(K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+)溶液中,只进行 H^+ 的传递。

本实验室前期的工作也证实,NdR2也具有与KR2相似的功能——在 Li^+ 或 Na^+ 溶液中为 Li^+ 泵或 Na^+ 泵,而在其他溶液中为 H^+ 泵。

将NdR2-脂质体-ITO电极置于光电响应检测系统中,检测光电流信号。实验结果显示,当阳离子为 Na^+ (100mM)时,光电流信号的极性为正,如图3所示,且无论阴离子(Cl^- 、 F^- 、 SO_4^{2-})为何,保持 Na^+ 浓度相同时其电信号幅度基本一致;而光电流信号的极性在阳离子为 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cs^+ 时相同,均为负信号(Some data no shown)。因此我们认为,NdR2-脂质体-ITO电极对 Na^+ 有特异性的响应,这与本实验室之前利用pH测定证实NdR2具有 Na^+ 转运功能的观点一致。

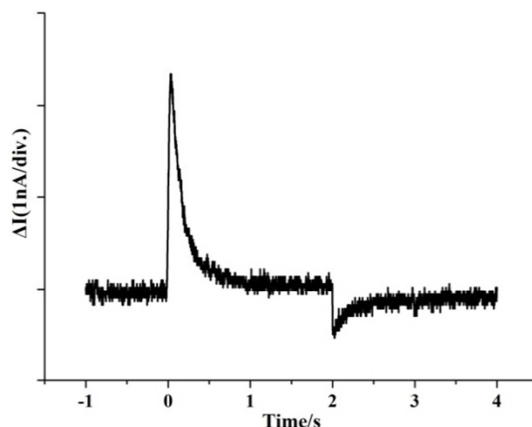


图3 NdR2-脂质体-ITO电极对 Na^+ 溶液(100mM)的特征性响应。0s时光照,2s时避光。

为了定量地评估NdR2-脂质体-ITO电极对 Na^+ 的响应,我们检测其在不同浓度的 Na^+ 溶液(1~200mM)中的光电流。由于每一个电极的光电流都不尽相同,所以在进行统计时,需要将光电流标准化,即以每个电极探测的光电流值除以本组最大光电流值,得到标准电流值。如图4所示,随着溶液中 Na^+ 浓度的增加,光电流具有显著的下降趋势。

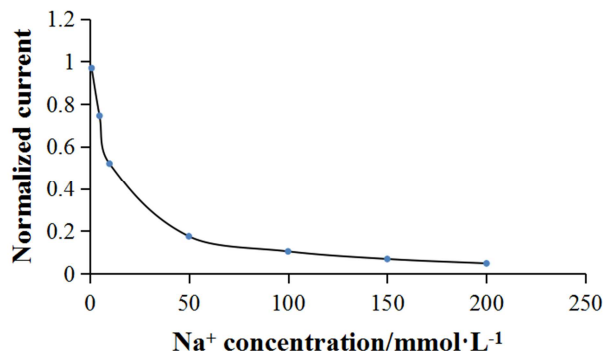


图4 NdR2-脂质体-ITO电极对不同浓度 Na^+ 溶液(pH7.5)的响应。

3.3. NdR2-脂质体-ITO电极的热稳定性

作为一个生物传感器，其稳定性受到广泛关注，因此本文对NdR2-脂质体-ITO电极的热稳定性作了一定的评估。

在热稳定性的实验中，将电极置于50℃的水浴中90分钟，水浴前后，光电流的变化很小，经过热处理之后的电极对Na⁺浓度具有依赖性，如图5所示。不仅如此，即使经过70℃的高温处理90分钟，电极仍然对Na⁺浓度具有依赖性 (Data no shown)。

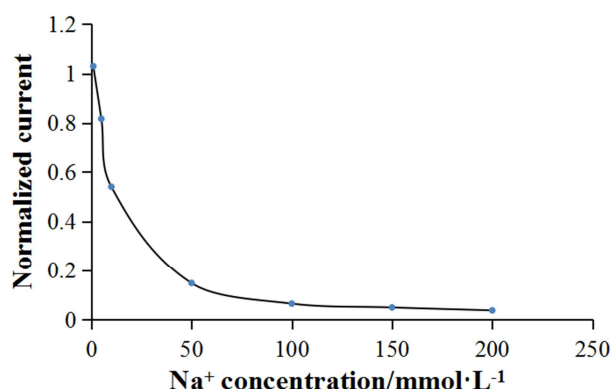


图5 50℃处理90min的NdR2-脂质体-ITO电极对不同浓度Na⁺溶液 (pH7.5) 的响应。

3.4. NdR2-脂质体-ITO电极对Na⁺溶液

利用经标准液标定过的电极来检测Na⁺溶液样品，通过对比检测值与实际值来分析电极的测定精确度。将检测得到的光电流值代入标准曲线，计算出这些试验溶液中的Na⁺浓度值，如表1所示。从表中可以看出，样品的Na⁺浓度检测值接近于实际值，其回收率为93%，表明已建立的生物传感电极能够检测Na⁺的实际浓度。此外，我们也检测了热处理后电极的测定精确度，回收率为从91%，这也进一步证明此电极具有良好的稳定性。

表1 Na⁺溶液样品的实际值与检测值。样品包含1mmol/L Tris-HCl, pH7.5。

Actual value / mmol · L ⁻¹	Test value / mmol · L ⁻¹		Correlation (%)	
	RT	50℃ 90min	RT	50℃ 90min
40	37.16 ±1.03	36.24 ±1.43	93	91

RT: room temperature, 室温。

4. 结束语

生物传感器是以具有生物活性的物质 (DNA、蛋白质、酶等) 作探测元件与一些物理或化学元件结合而组成的一种检测装置，它在临床医学诊断、环境监测、食品检测等方面都具有广泛的应用。

本文通过将一种新型的视紫红质——NdR2与氧化铟锡导电玻璃结合制备成生物电极，通过一系列实验得到以下结论：

(1) NdR2-脂质体-ITO电极对Na⁺有特异性的正电流响应。

(2) 随着Na⁺浓度的上升，NdR2-脂质体-ITO电极的光电流信号不断减小，并且在一定范围内 (1mM~200mM)，Na⁺浓度与光电流呈一定的函数关系。

(3) NdR2-脂质体-ITO电极经过较高温度 (50℃) 处理90min后，仍然对于Na⁺保持特异性响应并能检测Na⁺浓度。

本文尝试着对钠离子选择性电化学生物传感器进行了初步性的探索，工作仍有许多不完善的地方，有许多问题需要回答与解决，例如，如何提高对生物样品中钠离子检测的精确度，如何提升电极对钠离子浓度更大范围的响应，等等。期待利用更多的物理、化学手段和材料，与NdR2-脂质体-ITO电极相结合，创造出更加完善的电化学生物传感器。

致谢

本文为国家自然科学基金面上项目 (Y21101Q1A1, Y31101M1A1) 的阶段成果之一。

参考文献

- [1] Malloy, C. R. et al. Influence of Global-Ischemia on Intracellular Sodium in the Perfused Rat-Heart [J]. Magnet Reson Med, 1990, 15: 33-44.
- [2] Grubman, A. et al. X-ray fluorescence imaging reveals subcellular biometal disturbances in a childhood neurodegenerative disorder [J]. Chem Sci, 2014, 5: 2503-2516.
- [3] Ivanics, T., Blum, H., Wroblewski, K., Wang, D. J. & Osbakken, M. Intracellular Sodium in Cardiomyocytes Using Na-23 Nuclear-Magnetic-Resonance [J]. Bba-Mol Cell Res, 1994, 1221: 133-144.
- [4] Torabi, S. F. et al. In vitro selection of a sodium-specific DNzyme and its application in intracellular sensing [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112: 5903-5908.
- [5] Oesterhelt, D. & Stoekenius, W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium [J]. Nature: New biology, 1971, 233: 149-152.
- [6] Liu, S. Y. & Ebrey, T. G. Photocurrent measurements of the purple membrane oriented in a polyacrylamide gel [J]. Biophys J, 1988, 54: 321-329.
- [7] Cao, Y. et al. Water is required for proton transfer from aspartate-96 to the bacteriorhodopsin Schiff base [J]. Biochemistry, 1991, 30: 10972-10979.
- [8] Bertoncello, P., Nicolini, D., Paternolli, C., Bavastrello, V. & Nicolini, C. Bacteriorhodopsin-based Langmuir-Schaefer films for solar energy capture [J]. IEEE transactions on nanobioscience, 2003, 2: 124-132.

- [9] Hong, F. T. Molecular Sensors based on the photovoltaic effect of bacteriorhodopsin: origin of differential responsivity [J]. Materials Science and Engineering, 1997.
- [10] Miyasaka, T., Koyama, K. & Itoh, I. Quantum conversion and image detection by a bacteriorhodopsin-based artificial photoreceptor [J]. Science, 1992, 255: 342-344.
- [11] Choi, H. G., Jung, W. C., Min, J. H., Lee, W. H. & Choi, J. W. Color image detection by biomolecular photoreceptor using bacteriorhodopsin-based complex LB films [J]. Biosensors & bioelectronics, 2001, 16: 925-935.
- [12] Ahmadi, M. & Yeow, J. T. Fabrication and characterization of a radiation sensor based on bacteriorhodopsin [J]. Biosensors & bioelectronics, 2001, 26: 2171-2176.
- [13] Rao, S. et al. A proteorhodopsin-based biohybrid light-powering pH sensor [J]. Physical chemistry chemical physics, 2013, 15: 15821-15824.
- [14] Rao, S. et al. A light-powered bio-capacitor with nanochannel modulation [J]. Advanced materials, 2014, 26: 5846-5850.
- [15] Kwon, S. K. et al. Genomic makeup of the marine flavobacterium *Nonlabens (Donghaeana) dokdonensis* and identification of a novel class of rhodopsins [J]. Genome biology and evolution, 2013, 5: 187-199.
- [16] Inoue, K. et al. A light-driven sodium ion pump in marine bacteria [J]. Nature communications, 2013, 4: 1678.
- [17] Kato, H. E. et al. Structural basis for Na transport mechanism by a light-driven Na pump [J]. Nature, 2015.