

[ 研究快报 ]

# 金电极表面植物原生质体的固定化

张红平<sup>1</sup>, 祁玉兰<sup>1</sup>, 严曼明<sup>1</sup>, 韦毅<sup>2</sup>, 林仲华<sup>3</sup>, 江志裕<sup>1</sup>

(1. 复旦大学化学系; 2. 复旦大学生命科学院, 上海, 200433;

3. 厦门大学化学系, 固体表面物理化学国家重点实验室, 厦门 361005)

关键词 聚电解质; 大麦细胞; 固定化

中图分类号 O646

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2002)07-1392-03

近年来, 基于聚电解质同携带相反电荷的基团之间的静电吸引作用组装超薄复合膜的研究受到广泛的关注<sup>[1-7]</sup>. 但是, 利用聚电解质来固定生物活细胞的研究尚不多见. Wen 等<sup>[8]</sup>曾在水溶液中利用聚电解质复合物构成的微囊来固定人体肿瘤活细胞. 本文将该技术应用于生物活细胞在电极表面的固定化. 利用吸附在金电极上的荷正电的聚二烯丙基二甲基氯化铵 [Poly(diallyldimethylammonium chloride), PDADMAC] 将携带负电荷的大麦细胞固定在金电极表面, 运用扫描隧道显微镜 (STM)、石英晶体微天平 (QCM) 及共焦激光扫描荧光显微镜对该过程进行了研究.

## 1 实验部分

PDADMAC (分子量为 200 000 ~ 350 000) 购自 Aldrich 公司, 细胞原生质体 (Protoplast) 取自大麦嫩叶, 其余试剂均为分析纯. 实验用水为二次蒸馏水或电导率大于  $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$  的超纯水.

QCM 实验在 CHI400 型 EQCM 系统上进行, 采用直径为 5 mm 的金电极. STM 实验在 Nanoscope a 系统上进行, 使用自制的 W 针尖, 电极为自制的金单晶球. 大麦细胞的荧光照片在 Leica TCS NT 型共焦激光扫描荧光显微镜上获得, 采用射频溅射法镀在云母基底上的金薄膜电极. 大麦细胞原生质体的提取方法同前文<sup>[9-11]</sup>所述. 将处理好的金电极放入 pH 为 6.8 的质量体积分数为 1% PDADMAC 水溶液中浸泡一段时间, 即得 PDADMAC/Au 膜电极, 取出, 用相同 pH 值的大量纯水淋洗, 并用高纯氮气吹干. 然后将 PDADMAC/Au 膜电极放入准备好的大麦细胞原生质体的甘露醇水溶液中浸泡一段时间, 即可得到 Protoplast/PDADMAC/Au 复合膜电极.

## 2 结果与讨论

当有微量物质吸附到电极表面后, 将引起石英晶体振动频率的变化, 该频率的变化和电极表面质量的变化之间遵从 Sauerbrey 方程<sup>[12]</sup>:

$$\Delta F = - 2F_0^2 \Delta m / A (\mu_Q \rho_Q)^{1/2} \quad (1)$$

式中,  $\Delta F$  为石英晶体频率的变化,  $F_0$  为石英晶体的基频 ( $F_0 = 8.0 \times 10^6 \text{ Hz}$ ),  $A$  为镀在石英晶体表面的金电极的面积 ( $A = 1.96 \times 10^{-5} \text{ m}^2$ ),  $\rho_Q$  为石英晶体的密度 ( $2.648 \times 10^6 \text{ g/m}^3$ ),  $\mu_Q$  为石英晶体的剪切模量 [ $2.947 \times 10^{13} \text{ g/(m} \cdot \text{s}^2)$ ],  $\Delta m$  为电极表面上的质量变化. 在液相中, 除了电极表面质量的变化引起的频率变化外, 还需考虑到溶液粘度 ( $\eta_L$ ) 和密度 ( $\rho_L$ ) 对频率变化的贡献<sup>[13]</sup>:

$$\Delta F_L = - F_0^{3/2} (\eta_L \rho_L)^{1/2} / (\pi \mu_Q \rho_Q)^{1/2} \quad (2)$$

因此, 在液相中, QCM 实验测定的频率变化值  $\Delta F_{\text{sol}} = \Delta F + \Delta F_L$ . 根据方程(2), 可导出:

$$\Delta F_P = \Delta F_H [(\eta_P / \eta_H) (\rho_P / \rho_H)]^{1/2} \quad (3)$$

式中下标 P 和 H 分别指 PDADMAC 溶液相和纯水相.

由加入纯水后 QCM 的频率响应随时间变化的曲线 [图 1(A)] 可知, 纯水对 QCM 频率变化的贡献

收稿日期: 2001-08-20.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 29773009 和 29833060) 资助.

联系人简介: 江志裕 (1940 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 从事电化学研究.

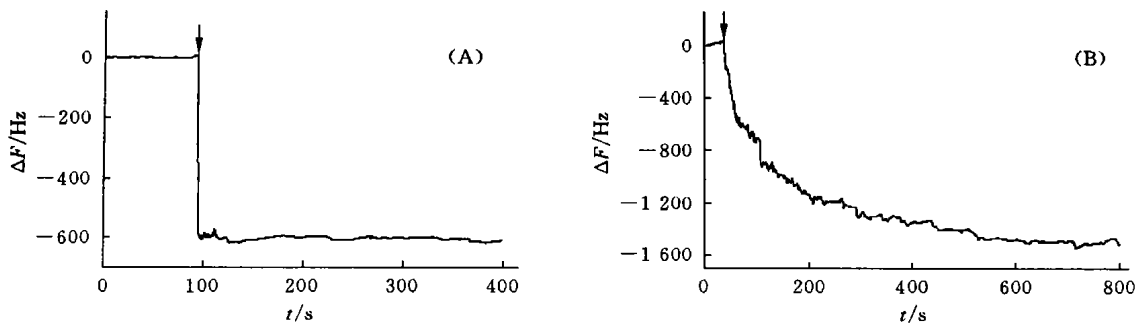


Fig. 1 Frequency-time profiles for gold QCM electrodes in distilled water(A) and PDADMAC aqueous solution(B)  
The arrow indicate the time at which the solutions were injected into EQCM cell.

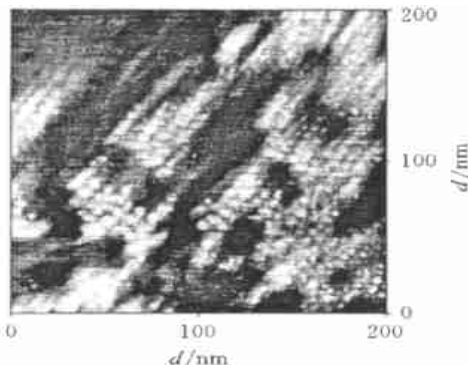


Fig. 2 STM image of a PDADMAC film adsorbed on Au(111) surface with constant-current mode

约为  $\Delta F_H = -600$  Hz. 由乌氏粘度计测得本文所用 PDADMAC 溶液相对于纯水的相对粘度  $\eta_r = \eta_p / \eta_H = 5.871$ , 在相同实验条件下测得  $\rho_p / \rho_H = 0.9973$ . 将以上数据代入式(3), 得 PDADMAC 的密度和粘度对频率变化的贡献  $\Delta F_P = -1452$  Hz. 图 1(B) 表明, 实验中加入 PDADMAC 溶液约 9 min 后 QCM 的频率变化趋于稳定,  $\Delta F_{sol} = -1494$  Hz. 由此得  $\Delta F = \Delta F_{sol} - \Delta F_P = -42$  Hz, 可见 PDADMAC 在金电极表面发生了吸附, 这是因为二者之间存在强烈的范德华力<sup>[3]</sup>. 假定 PDADMAC 在金电极表面是均匀吸附的, 设吸附层的厚度为  $d_{ad}$ , 密度为  $\rho_{ad}$ , 则根据方程(1), 可导出:

$$d_{ad} = - \Delta F (\mu_Q \rho_Q)^{1/2} / (2F_0^2 \rho_{ad}) \quad (4)$$

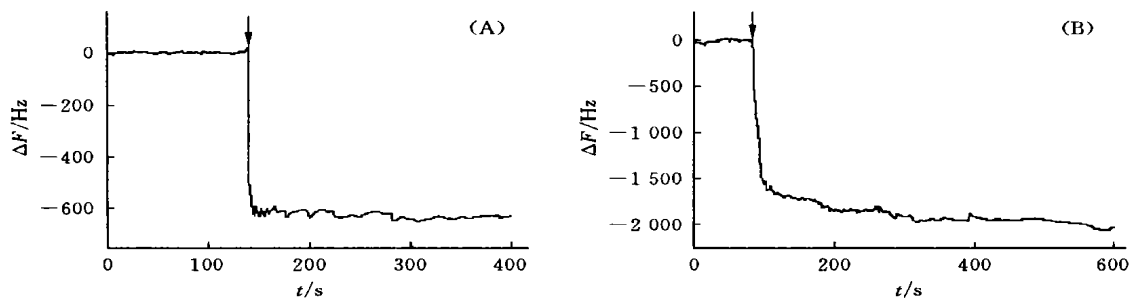


Fig. 3 QCM frequency-time profiles for the PDADMAC preadsorbed gold QCM electrode immersed into 0.5 mol/L mannitol solution(A) and 0.5 mol/L mannitol solution containing barley protoplast(B)  
The arrows indicate the time at which the solutions were injected into EQCM cell.

一般地, 聚电解质吸附层的密度为  $1.2 \times 10^6$  g/m<sup>3</sup><sup>[6]</sup>, 将数据代入式(4), 得  $d_{ad} = 2.4$  nm, 该值与

Fendler 等<sup>[3]</sup>用表面共振光谱测得的数据非常接近. 自制金单晶球在 PDADMAC 溶液中浸泡 15 min 后的 Au(111) 面的 STM 图像(图 2)表明, PDADMAC 的点均匀分布在 Au(111) 面上, 而且这些点的排列呈高度取向, 点的直径为 4~6 nm. 这与 Fendler 等<sup>[3]</sup>获得的无序的 PDADMAC 薄膜明显不同. 这种有序的荷电基体可用来固定生物细胞, 还有望用来组装有序纳米结构(多层)复合薄膜.

图 3 为预吸附 PDADMAC 的金晶振电极分别与 0.5 mol/L 甘露醇水溶液和分散有大麦细胞的甘露醇水溶液接触时 QCM 的频率响应随时间变化的曲线. 从图 3(A) 可知, 加

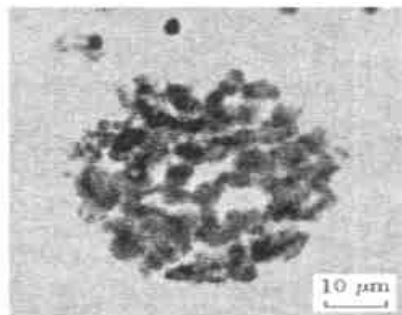


Fig. 4 Fluorescent microphotograph of a barley protoplast adsorbed on a PDADMAC modified Au electrode at 665 nm

入 0.5 mol/L 的甘露醇水溶液引起的 QCM 频率变化仅为  $\Delta F = -632$  Hz. 而图 3(B) 显示当加入含大麦原生质体的甘露醇水溶液后, QCM 的频率迅速发生变化, 并在约 4 min 后其  $\Delta F$  趋于稳定值  $-1946$  Hz, 说明大麦原生质体在 PDADMAC/Au 电极表面有吸附. 文献[5]曾报道可通过将吸附有蛋白质的金晶振电极用高纯氮气吹干, 然后测量 QCM 在空气相中的频率变化的方法来计算生物样品的吸附量. 但此法不适用于活体细胞的吸附研究, 因为吹干后植物细胞将失去活性或破裂. 将 PDADMAC/Au 薄膜在含大麦细胞的甘露醇水溶液中浸泡 15 min, 取出用纯水淋洗后, 立即在共聚焦扫描荧光显微镜下进行观察, 其实验条件<sup>[14]</sup>: 激发光波长为 480~568 nm, 拍摄荧光显微照片时的波长为 665 nm(大麦细胞中叶绿体所含叶绿素的红色荧光的波长). 从拍摄到的 Protoplast/PDADMAC/Au 电极上一个大麦细胞原生质体的荧光显微照片(图 4)可看到原生质体直径约为 40  $\mu\text{m}$  内有不少能发出桃红色荧光的叶绿体.

感谢厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室毛秉伟教授在 STM 实验中所给予的大力帮助.

### 参 考 文 献

- [1] Decher G. Science[J], 1997, 277: 1 232—1 237
- [2] Tedeschi C., Caruso F., Mohwald H. et al. J. Am. Chem. Soc.[J], 2000, 122: 5 841—5 848
- [3] Kotov N. A., Dekany L., Fendler J. H. J. Phys. Chem.[J], 1995, 99: 13 065—13 069
- [4] Caruso F., Niikura K., Furlong D. N. et al. Langmuir[J], 1997, 13: 3 422—3 426
- [5] Caruso F., Rodda E., Furlong D. N. Anal. Chem.[J], 1997, 69: 2 043—2 049
- [6] HOU Shi-Feng(侯士峰), FANG Hui-Qun(方惠群), CHEN Hong-Yuan(陈洪渊). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 1997, 18(12): 1 949—1 952
- [7] WU Tao(吴涛), ZHANG Xi(张希). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2001, 22(6): 1 057—1 065
- [8] Wen S., Alexander H., Inchikel A. et al. Biomaterials[J], 1995, 16: 325—335
- [9] Jiang Z. Y., Berg H. Bioelectrochem. Bioenerg.[J], 1995, 38: 383—387
- [10] Jiang Z. Y., Wang M. Y., Wang W. Bioelectrochem. Bioenerg.[J], 1999, 48: 447—451
- [11] WANG Wei(王伟), JIANG Zhi-Yu(江志裕). Electrochemistry(电化学)[J], 1997, 3(2): 215—218
- [12] Sauerbrey G. Z. Phys.[J], 1959, 155: 206—222
- [13] Kanazawa K. K., Gordon J. G. Anal. Chem.[J], 1985, 57: 1 770—1 771
- [14] WANG Ming-Yan(王明艳), GONG Ye-Fang(龚叶芳), JIANG Zhi-Yu(江志裕). Electrochemistry(电化学)[J], 2001, 7(1): 25—29

## Immobilization of Plant Protoplast on Gold Electrode Surface

ZHANG Hong-Ping<sup>1</sup>, QI Yu-Lan<sup>1</sup>, YAN Man-Ming<sup>1</sup>, WEI Yi<sup>2</sup>, LIN Zhong-Hua<sup>3</sup>, JIANG Zhi-Yu<sup>1\*</sup>

(1. Department of Chemistry; 2. Academy of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China;

3. Department of Chemistry, State Key Laboratory for Physical Chemistry of the Solid Surface, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** Barley protoplast was immobilized on poly(diallyl-dimethylammonium) (PDADMAC) modified gold electrode *via* the electrostatic attraction between the positively charged amine groups of PDADMAC and the negatively charged barley protoplast. STM image reveals that PDADMAC/Au (111) surface displays a nano-organized dot (4—6 nm) array structure. The processes of the PDADMAC adsorption and of the barley protoplast immobilization were monitored from the *in situ* QCM frequency change. The effects of the adsorbed mass and of the density and viscosity of medium on the frequency change of QCM were discussed, respectively. The QCM result shows that the thickness of the adsorbed PDADMAC layer is 2.4 nm.

**Keywords** Polyelectrolyte; Barley protoplast; Immobilization (Ed.: F, X)