

2004-05-28

Direct Electron Transfer of Redox Proteins and Enzymes Promoted by Carbon Nanotube

Chen-xin CAI

Recommended Citation

Chen-xin CAI. Direct Electron Transfer of Redox Proteins and Enzymes Promoted by Carbon Nanotube[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2004 , 10(2): 159-167.

DOI: 10.61558/2993-074X.1561

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol10/iss2/7>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

文章编号: 1006-3471(2004)02-0159-09

碳纳米管促进氧化还原蛋白质和酶的直接电子转移

蔡称心*, 陈 静

(南京师范大学化学与环境科学学院, 江苏 南京 210097)

摘要: 将血红蛋白(Hb)、辣根过氧化物酶(HRP)和葡萄糖氧化酶(GOx)分别固定在经碳纳米管修饰的玻碳电极(CNT/GC)上,制成 Hb-CNT/GC、HRP-CNT/GC 和 GOx-CNT/GC 电极。Hb、HRP 和 GOx 在 CNT/GC 电极表面均能发生有效和稳定的直接电子转移反应,其相应的循环伏安曲线均显示出一对几近对称的氧化还原峰;在 60 mV/s 下,其式量电位 E^0 分别为 -0.343 V、-0.319 V 和 -0.456 V(vs. SCE, pH 6.9),且不随扫速而变;以上三者 in CNT/GC 电极表面直接电子转移的表现速率常数 k_s 依次为 1.25 ± 0.25 、 2.07 ± 0.56 和 $1.74 \pm 0.42 \text{ s}^{-1}$;根据式量电位 E^0 随缓冲溶液 pH 值的变化关系,确知在 CNT/GC 电极上, Hb 或 HRP 发生的直接电化学反应遵从 $(1e + 1H^+)$ 电极过程机理,而 GOx 发生的直接电化学反应则遵从 $(2e + 2H^+)$ 机理。此外,固定在 CNT/GC 电极表面的 Hb、HRP 和 GOx 也同时表现出对各自底物的生物电催化活性。由本文制备的碳纳米管修饰电极及其固定生物蛋白质(酶)的方法具有简单、易于操作等优点,并可用于对其它生物氧化还原蛋白质和酶的直接电子转移测试。

关键词: 碳纳米管;直接电化;血红蛋白;辣根过氧化物酶;葡萄糖氧化酶

中图分类号: O 646

文献标识码: A

生物氧化还原蛋白质和酶的直接电子转移反应已备受众多研究者关注^[1~6],这一研究对了解生命体系的能量转换和物质代谢、了解生物大分子的结构和物理化学性能的关系、以及探索蛋白质和酶等生物大分子在生命体内的生理作用和机制乃至对于开发新型的生物电化传感器及酶催化剂在生物燃料电池等方面的应用都具有十分重要的理论指导意义。

如果某一生物酶能在电极表面发生有效的直接电子转移并保持其生物电催化活性,则它就能在不需要向电极表面或于电解液中加入电子媒体或促进剂的情况下对其底物进行测定,从而可大大简化相关传感器的制作步骤。然而,由于大部分氧化还原蛋白质和酶在电极表面会发生强烈的吸附而伴随变性,变性后又将发生不可逆的化学反应并影响其它自由扩散分子直接电子转移;此外,由于蛋白质和酶分子大多具有庞大的空间结构,因其氧化还原中心被多

收稿日期:2004-01-05;修订日期:2004-02-13

* 通讯联系人, E-mail: cxcai@njnu.edu.cn, caichenxiin@njnu.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(20373027),教育部留学回国人员启动基金,江苏省高校自然科学基金(O3KJA150055),江苏省南京市人事局回国人员择优项目资助

肽链包围加之特有的高离子特性和表面电荷的非对称分布,从而阻碍了蛋白质和酶在电极表面直接电子转移反应的发生.为了实现蛋白质和酶能在电极表面发生可逆或准可逆的直接电子转移反应,探索合适的电极材料和固定方法确实非常重要.

自 1991 年 Iijima^[7]发现碳纳米管,1992 年 Ebbesen 等^[8]实现了批量生产以后,各国科学家纷纷对碳纳米管开展研究^[9~11].碳纳米管独特的原子结构使其表现出金属或半导体特性,而且由于纳米尺寸产生的表面效应,使其表面原子具有高的反应活性,易与周围其它物质发生电子传递作用.已有文献报道将碳纳米管修饰到电极表面制成碳纳米管电极,用于催化神经递质(如多巴胺、抗坏血酸、去肾上腺素及 5-羟色胺等)及 NAD(P)H 等生物小分子和 H_2O_2 、 NO_2^- 和 NO 等的电化学反应^[12~20].但至今,利用碳纳米管电极来固定并催化或促进生物大分子,特别是生物氧化还原蛋白或酶的直接电子转移反应报道不多^[21~23].本文研究了分别将血红蛋白(Hb)、辣根过氧化物酶(HRP)和葡萄糖氧化酶(GOx)固定在经碳纳米管(CNT)修饰的 GC 电极(CNT/GC 电极)上,考察其直接电化学反应特性,以及 Hb、HRP 和 GOx 固定在 CNT/GC 电极表面后其生物电催化活性的状态.

1 实 验

1.1 试剂与仪器

血红蛋白(Hb,来源于 bovine red cells,分子量 64 000 ~ 67 000 g/mol, Worthington Biochemical Corp.)、辣根过氧化物酶(HRP, EC 1.11.1.7, RZ > 3 250 U/mg, 分子量约 44 000 g/mol, Sigma)、葡萄糖氧化酶(GOx, EC 1.1.3.4, 111 U/mg, Type II, 来源于 Aspergillus niger, 南京生兴生物技术有限公司)、-D(+)-葡萄糖(Sigma)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD, Sigma)、单羧基二茂铁(97%, Aldrich)、Nafion(5%, 分散在甲醇中, EW 为 1100, Aldrich)、三氯化六氨基钌(III) ($Ru(NH_3)_6Cl_3$, 99%, Strem Chemicals), 以上试剂均未经纯化直接使用.碳纳米管(CNT, $\varnothing < 10$ nm, 长度 0.5 ~ 500 μm , 纯度 > 95%, 比表面积约 300 m^2/g , 深圳纳米港公司)使用前未作预处理;其它试剂均为分析纯试剂.0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS)由 KH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 按不同比例配制而成.所有溶液均用二次蒸馏水配制;不同浓度的 H_2O_2 溶液由 30% 的 H_2O_2 溶液用 0.1 mol/L PBS 稀释得之,葡萄糖溶液于使用前至少放置 24 h 以让不同异构体之间达到平衡.

CNT 的红外光谱实验使用 Nexus 670 FT-IR 分光光度计(美国),分辨率为 4 cm^{-1} , 采用 KBr 压片.所有电化学实验均使用三电极系统,设备为 CHI 660B 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司),辅助电极为螺旋状铂丝,饱和甘汞(SCE)电极为参比电极.所有实验均在室温(22 ± 2)下进行.此前,实验溶液先用高纯氮除氧至少 30 min.缓冲溶液的 pH 值由 PHS-4 智能酸度计(江苏江分电分析仪器有限公司)测定.

1.2 CNT/GC 电极的制备及氧化还原蛋白、酶的固定

首先,将 GC 电极(直径为 4 mm)分别用 6 号砂纸、0.3 和 0.05 μm Al_2O_3 抛光至镜面,再分别在水乙醇和二次蒸馏水中超声清洗各 1 min.然后,用超声分散法将 0.5 mg CNT 分散在 1 mL 浓度为 0.1% (wt/wt) 的溴化十六烷基三甲基铵(CTAB)水溶液中,形成浓度为 0.5 mg/mL 的 CNT 黑色悬浊液,这样制备的 CNT 的悬浊液能长时间稳定而不发生沉淀^[20,24].

其次,将等体积的 CNT 悬浊液与浓度为 5 mg/mL 的 Hb 溶液(溶解在 0.1 mol/L PBS 中, pH 6.9)充分混合均匀,然后用微量加样器将 2 μL 的这一混合物滴加并使之均匀地覆盖在 GC 电极表面,室温下待溶剂(水)挥发后,再将 1 μL Nafion 溶液滴在电极表面,溶剂挥发后, Nafion 就能将 Hb 和 CNT 牢固地固定在 GC 电极表面,形成 Hb-CNT/ GC 电极.该电极也可置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用.

同法,以等体积的 CNT 悬浊液与浓度各为 5 mg/mL 的 HRP 或 GOx 溶液混合,即可制成 HRP-CNT/ GC 或 GOx-CNT/ GC 电极.对 CNT/ GC 电极制备,则直接将 CNT 悬浊液均匀地涂敷到 GC 电极表面,待溶剂挥发后再用 Nafion 固定.

Hb、HRP 和 GOx 在 CNT/ GC 电极表面的表观覆盖量(Γ)可由以下算得:

$$\Gamma = Q / nFA \quad (1)$$

式中, Q 为扣去空白后直接电子转移的氧化或还原的电量, n 为每一氧化还原蛋白(酶)分子的电子转移数(按 Hb、HRP 和 GOx 分子 n 依次为 1、1 和 2), F 为 Faraday 常数. A 为 CNT/ GC 电极的表观面积,可从探针分子($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$)在 CNT/ GC 电极上的 CV 峰电流随扫速变化关系求得,计算时 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 在 Nafion 膜中的扩散系数 D 值取 $2.3 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ [25].

2 结果与讨论

2.1 Hb 和 HRP 的直接电子转移

图 1 分别给出 CNT/ GC 和 Hb-CNT/ GC 等电极在 0.1 mol/L PBS(pH 6.9)溶液中于 60 mV/s 下的 CV 曲线.如图,在实验的电位扫描范围内,CNT/ GC 电极没有任何可观察到的电化学反应发生(图 1 曲线 a);多次循环扫描后,其伏安曲线几乎不起变化,这说明 CNT 在 GC 电极表面是稳定的.但对 Hb-CNT/ GC 电极,则出现一对几近对称的氧化还原峰(图 1 曲线 b).实验同时表明,Hb 在裸的 GC 电极表面不能发生有效的直接电子转移(图 1 曲线 c).比较图 1 曲线 a、b 和 c 立可判断,曲线 b 显示的氧化还原峰必然是 Hb 在 CNT/ GC 电极上发生直接电子转移反应产生的.为探明这一氧化还原峰的来龙去脉,试拟以下实验:将 Hb 和 CTAB 的混合溶液均匀地覆盖在 GC 电极表面,溶液挥发后,再用 Nafion 使之固定不脱落.即如图 1 曲线 d 所见,在 0.1 mol/L PBS 溶液中此电极不出现 Hb 直接电子转移的氧化还原峰,而是在约 -0.35 V 处显示一个很不明显、既小又宽的不可逆还原峰.以上说明,与图 1 曲线 b 相对应的 Hb 直接电子转移反应乃由 CNT 的促进作用所产生的.

按图 1 曲线 b, Hb 直接电子转移的氧化还原峰电位分别为 $E_{\text{pa}} = -0.312 \text{ V}$, $E_{\text{pc}} = -0.372 \text{ V}$, 峰电位差 $E_{\text{p}} = 60 \text{ mV}$, 式量电位 $E^{0'} = -0.342 \text{ V}$. 此值与将 Hb 固定在 Eastam

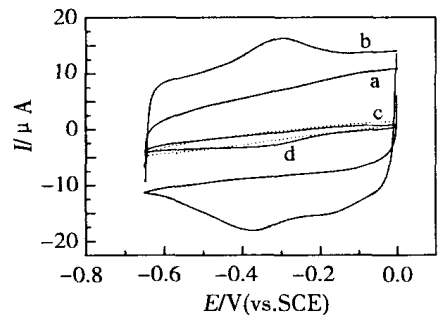


图 1 不同电极在 0.1 mol/L PBS(pH 6.9)中于 60 mV/s 下的循环伏安曲线

Fig. 1 Cyclic voltammograms of the CNT/ GC (a) and the Hb-CNT/ GC (b) electrode in 0.1 mol/L PBS (pH 6.9) scan rate: 60 mV/s curve c and d show the cyclic voltammograms of Hb and Hb + CTAB, respectively, on the bare GC electrode

AQ (-0.341 V, pH 7.0)^[26]或聚丙烯酰胺 (-0.32 V, pH 7.0)^[27]膜内所得到的 E^0 相近,也与细胞色素 P450_{cam} (-0.354 V, pH 7.0)^[28]等以血红素为氧化还原中心蛋白质的 E^0 值相近;但比将 Hb 固定在溴化二十二烷基二甲基铵 (-0.200 V, pH 7.4)^[29]膜上得到的 E^0 值负移了许多,这一差别可能是由于 Hb 在各电极表面的微环境不同所致.提高扫速,该氧化峰电位 E_{pa} 正向移动,还原峰电位 E_{pc} 负向移动,峰电位差 E_p 随之增大;但 E^0 几乎不随扫速而发生变化(在 20 ~ 120 mV/s 范围内, E^0 的平均值为 -0.343 ± 0.001 V).再者,对任一扫速, Hb 的氧化与还原峰电流都几乎相等,即 $i_{pa}/i_{pc} = 1$,并且峰电流 i_p 随扫速 v 变化呈线性关系,可见该电极反应是受表面过程控制的.根据峰电位差随扫速变化关系,参照 Laviron^[30]电极表面反应异相动力学常数计算方法,可得 Hb 直接电子转移反应的表观速率常数 $k_s = 1.25 \pm 0.25 \text{ s}^{-1}$.

由 CV 曲线 Hb 的氧化或还原峰电量,即可求得 Hb 在 CNT/GC 电极表面的表观覆盖量为 $(5.74 \pm 0.57) \times 10^{-12} \text{ mol/cm}^2$;而按实验制备的 Hb-CNT/GC 电极计算,则 Hb 在 CNT/GC 电极表面的总量为 $1.05 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$.依此,则在 CNT/GC 电极上约有 54.7% 的 Hb 是电活性的.通常,氧化还原蛋白或酶能在电极上表现出的电化学活性(指能有效地进行直接电子转移)仅为 5% ~ 12%^[31],可见 CNT 能更有效地促进蛋白质或酶的直接电子转移.

CNT 能有效地促进 Hb 的直接电子转移除与其小的几何尺寸以及特殊的电子结构和导电性能有关以外,但更可能的是在 CNT 表面存在许多含氧功能基团,如羧基、羟基及羰基等.故在 CNT 制备过程中,需要用强氧化性的浓 HNO_3 进行纯化并去除催化剂,这一步骤能在 CNT 表面引入一些含氧功能基团.红外光谱证实(图略),CNT 表面含有羧基(1715 cm^{-1})、羧酸根(1574 cm^{-1} ,这可能是水洗过程 CNT 表面的羧基发生了 H^+ 的电离而生成)、羟基(3426 cm^{-1})和 C-OH 键(1166 cm^{-1})等含氧功能基团,与文献^[15]报道的基本一致.已有文献指出,CNT 能促进细胞色素 *c* 的直接电子转移^[23]和儿茶酚胺^[14]及 NADH ^[16]的电化学氧化,这也与该表面的含氧基团有关.

HRP-CNT/GC 电极的 CV 曲线特性也和上述 Hb-CNT/GC 的相似,即如图 2 所见,在 60 mV/s 下,HRP 直接电子转移的氧化还原峰电位分别为 $E_{pa} = -0.300 \text{ V}$ 和 $E_{pc} = -0.339 \text{ V}$, $E^0 = -0.320 \text{ V}$, $E_p = 39 \text{ mV}$.在 20 ~ 100 mV/s 范围内, E^0 的平均值为 $-0.319 \pm 0.002 \text{ V}$, $k_s = 2.07 \pm 0.56 \text{ s}^{-1}$,此值与将 HRP 固定在活性碳上 ($3.4 \pm 0.69 \text{ s}^{-1}$)^[32]或 DNA 膜中 (1.13 s^{-1})^[33]得出的结果相当,说明 CNT 也能有效地促进 HRP 的直接电子转移.另据伏安峰电量得 HRP 在 CNT/GC 电极表面的表观覆盖量为 $(1.90 \pm 0.44) \times 10^{-12} \text{ mol/cm}^2$,而

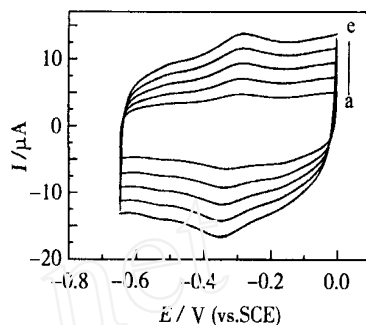


图 2 HRP-CNT/GC 电极在 0.1 mol/L PBS (pH 6.9) 中不同扫速下的循环伏安曲线

Fig. 2 Cyclic voltammograms of HRP-CNT/GC electrode in 0.1 mol/L PBS (pH 6.9) at various scan rates for curve a to e is 20, 40, 60, 80 and 100 mV/s, respectively

HRP 在 CNT/ GC 电极上的总量约为 $8.00 \times 10^{-12} \text{ mol/cm}^2$, 故知在 CNT/ GC 电极上约有 24 % 的 HRP 是电活性的。

2.2 GOx 的直接电子转移

图 3 为 GOx-CNT/ GC 电极在 0.1 mol/L PBS (pH 6.9) 溶液中的 CV 曲线。图中, 曲线 a 也呈现出一对几近对称的氧化还原峰。然而, 若将该电极浸在 3 mol/L 盐酸胍溶液经 24 h 后, 则原来的氧化还原峰便几乎消失 (图 3 曲线 b)。由此推想, 这一对氧化还原峰的出现当归属于 GOx 分子中的氧化还原活性中心 (FAD) 与电极表面发生直接电子转移所产生的, 即 GOx 分子在 CNT/ GC 电极表面的固定过程中, FAD 并没有从分子内部脱落出来。因为浓的盐溶液 (如 3 mol/L 盐酸胍溶液) 虽然能将 FAD 从 GOx 分子内部剥离出来并使固定在电极表面的 GOx 分子发生完全的脱附而失去电化学响应 (如图 3b), 但却不能使吸附在电极表面自由的 FAD 分子 (相对于 GOx 分子内部的 FAD 而言) 完全脱落^[34, 35]。当用 Nafion 将 FAD 固定在 CNT/ GC 电极表面形成的 FAD-CNT/ GC 电极在 3 mol/L 的盐酸胍溶液浸泡 48 h 后, 其伏安响应还能保持浸泡前的 68 %; 即使浸泡 12 d 后, 仍能保持 24 %。这进一步说明, GOx 分子吸附在 CNT/ GC 电极表面的过程中, 其氧化还原中心没有脱落, 分子没有变性。

据图 3 曲线 a, GOx 直接电子转移反应的氧化还原峰电位分别为 $E_{pa} = -0.438 \text{ V}$, $E_{pc} = -0.474 \text{ V}$, $E_p = 36 \text{ mV}$, $E^0 = -0.456 \text{ V}$ 。实验同时表明, 在扫速 $v < 200 \text{ mV/s}$ 条件下, 该氧化还原峰电流 i_p 与 v 呈线性关系, 说明该电极反应受表面过程控制的。其它有关 E_{pa} , E_{pc} , E_p 以及 E^0 随扫速的变化也和以上 Hb-CNT/ GC 或 HRP-CNT/ GC 的规律相似。在 $10 \sim 140 \text{ mV/s}$ 范围内, E^0 的平均值 $-0.456 \pm 0.001 \text{ V}$, $k_s = 1.74 \pm 0.42 \text{ s}^{-1}$, 较之 Jiang 等^[34] 在 DTSSP (DTSSP 为 3,3'-dithiobis-sulfocinnimidylpropionate 的缩写) 自组装单分子层修饰电极上得到的 k_s (0.026 s^{-1}) 大了数十倍, 说明 CNT 比 DTSSP 更能有效地促进 GOx 直接电子转移。

GOx 在 CNT/ GC 电极表面的表观吸附量为 $(1.38 \pm 0.12) \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$, 若设每一 GOx 与电极的接触面积为 60 nm^2 ^[36], 则其表观吸附量 将比单分子层吸附 (单层 $2.77 \times 10^{-12} \text{ mol/cm}^2$) 的大许多倍^[34]。以上结果皆与 DTSSP 自组装单分子层修饰电极上的结论一致。

2.3 pH 的影响

循环伏安测试表明, Hb、HRP 和 GOx 的氧化还原峰电位明显受缓冲溶液 pH 值影响, 即如图 4 所见, GOx 的氧化还原峰电位随缓冲溶液 pH 值增加而负移, 同时, 各 E_{pa} 、 E_{pc} 及 E^0 皆与缓冲溶液 pH 存在线性关系。其他 Hb 和 HRP 也表现出同样的规律 (图略)。三者的 E^0 随缓冲溶液 pH 线性变化的斜率依次为 -55.4 (Hb)、 -60.2 (HRP) 和 -52.2 (GOx) mV/pH , 各与理论值非常接近 (-58.5 mV/pH , 22), 可见在 CNT/ GC 电极上, 它们的直接电子转移可逆

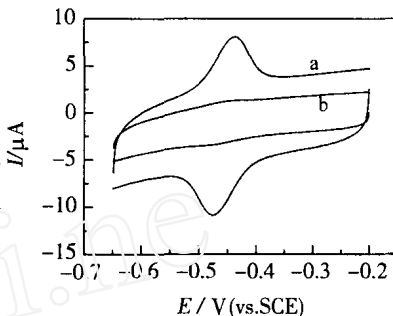


图 3 GOx-CNT/ GC 电极在 0.1 mol/L PBS (pH 6.9) 中的循环伏安曲线

Fig. 3 Cyclic voltammograms of the GOx-CNT/ GC electrode in 0.1 mol/L PBS (pH 6.9) with (b) and without (a) incubated in 3 mol/L guanidine hydrochloride for 24h scan rate: 60 mV/s

性均较好.

2.4 生物电催化

图 5 分别示出 Hb-CNT/ GC 电极在含有和不含有 H₂O₂ PBS 溶液中的循环伏安曲线. 如图, 对含有 H₂O₂ (28.0 mmol/L) 的溶液, 其 CV 曲线 (b) 较之原先不含 H₂O₂ 的 (a) 发生了很大的变化, 即还原峰电流明显增大, 而氧化峰几乎消失, 这说明被固定在 CNT/ GC 电极表面的 Hb, 不仅能有效发生直接电子转移, 而且对 H₂O₂ 的电化学还原仍然保持其生物电催化作用, 且电催化电流随 H₂O₂ 浓度的增加而变大 (图略). 实验同时表明, HRP-CNT/ GC 电极也具有相似的生物电催化作用.

图 6 示出 GOx-CNT/ GC 电极在含有单羧基二茂铁的 PBS 溶液中催化葡萄糖电化学氧化的 CV 曲线. 如图, 对不含单羧基二茂铁的溶液 (曲线 a), 在给定的电位扫描范围内不发生任何氧化还原反应; 加入单羧基二茂铁 (1.0 mmol/L) 后, 相应的循环伏安曲线上立即出现表征单羧基二茂铁的一对氧化还原峰 (曲线 b). 若于溶液中继续加入葡萄糖, 则显示出相应于葡萄糖电催化氧化的稳态伏安曲线 (曲线 c 和 d), 其电催化电流随葡萄糖浓度的增加而变大, 与扫速无关. 务须指出, 在 PBS 溶液中无论单羧基二茂铁

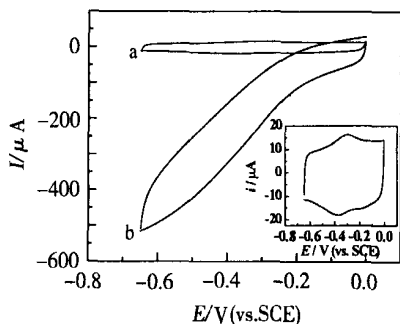


图 5 Hb-CNT/GC 电极在不含 H₂O₂ (a) 和含 28.0 mmol/L H₂O₂ (b) 0.1 mol/L PBS 溶液中的循环伏安曲线

Fig. 5 Cyclic voltammograms of the Hb-CNT/GC electrode in 0.1 mol/L PBS (pH 6.9) with absence (a) and presence (b) of 28.0 mmol/L H₂O₂ scan rate: 100 mV/s the inset shows the curve (a) in the different current scale

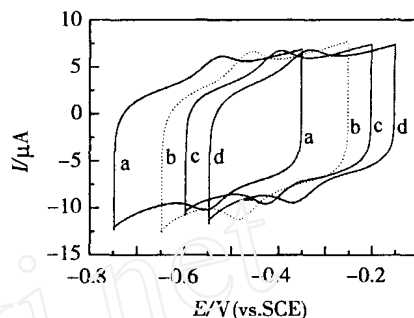


图 4 GOx-CNT/ GC 电极于不同 pH 值溶液中的循环伏安曲线

Fig. 4 The dependence of cyclic voltammograms of the GOx-CNT/ GC electrode in 0.1 mol/L PBS on solution pH The solution pH for curve a to d is 8.5, 7.0, 6.0 and 4.5, respectively scan rate: 20 mV/s

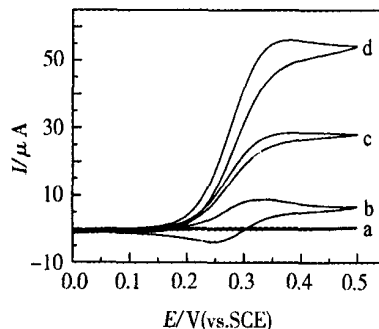


图 6 GO_x-CNT/GC 电极在含和不含有单羧基二茂铁和葡萄糖的 PBS 溶液 (pH 6.9) 中的循环伏安曲线

Fig. 6 Cyclic voltammograms of GOx-CNT/GC electrode in 0.1 mol/L PBS (pH 6.9, a) and with of 1.0 mmol/L ferrocene monocarboxylic acid (b), (c) and (d) are the bioelectrocatalytic responses of GOx-CNT/GC electrode to the oxidation of glucose in 0.1 mol/L PBS (pH 6.9) of 1.0 mmol/L ferrocene monocarboxylic acid containing 12.5 mmol/L or 25.0 mmol/L glucose, respectively scan rate: 1 mV/s

存在与否, CNT/ GC 电极对葡萄糖的氧化都不具有电催化作用. 由此足见, 固定在 CNT/ GC 电极表面的 GOx, 仍能保持其生物电催化活性. 这也再次佐证了上面提到的有关 GOx 分子中电活性中心(FAD)的氧化还原反应机制见(2. 2). 总之, 当 GOx 被固定在 CNT/ GC 电极表面时并没有发生变性, 否则就不能催化葡萄糖的电化学氧化.

3 结 论

1) Hb、HRP 和 GOx 在 CNT/ GC 电极表面均能进行有效和稳定的直接电子转移, 其循环伏安曲线上表现出一对几近对称的氧化还原峰; 式量电位 E^0' 几乎不随扫速而变化.

2) 固定在 CNT/ GC 电极表面的 Hb、HRP 和 GOx 均能保持对各自底物的生物电催化活性.

3) 本文应用的固定生物蛋白和酶的方法简单且有效, 可用于获得其它生物氧化还原蛋白质和酶的直接电子转移.

Direct Electron Transfer of Redox Proteins and Enzymes Promoted by Carbon Nanotube

CAI Chen-xin^{*}, CHEN Jing

(Department of Chemistry, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The redox proteins (enzymes), such as hemoglobin (Hb), horseradish peroxidase (HRP) and glucose oxidase (GOx) were immobilized on the surface of the carbon nanotube modified with glassy carbon (CNT/ GC) electrode, respectively. The experimental results showed that the redox proteins (enzymes) underwent effective and stable direct electron transfer reaction at the surface of CNT/ GC electrode with a pair of nearly symmetrical redox peaks in phosphate buffer solution. The formal redox potential, E^0' , is almost independent on the scan rates, the average value of E^0' for Hb, HRP and GOx is -0.343 ± 0.001 , -0.319 ± 0.002 and -0.456 ± 0.001 V (vs. SCE, pH 6.9), respectively. The dependence of E^0' on the pH of the buffer solution indicates that the direct electron transfer of Hb and HRP is a one-electron-transfer reaction process coupled with one-proton-transfer, while the GOx is a two-electron-transfer reaction process coupled with two-proton-transfer. The experimental results also demonstrated that the immobilized Hb and HRP retained their bioelectrocatalytic activity to the reduction of H_2O_2 , and immobilized GOx can catalyze the oxidation of glucose in the presence of ferrocene monocarboxylic acid. The method presented here can be easily extended to immobilize and obtain the direct electrochemistry of other redox enzymes or proteins.

Key words: Carbon nanotube, Direct electrochemistry, Hemoglobin, Horseradish peroxidase, Glucose oxidase

References :

- [1] Frew J E, Hill H A O. Direct and indirect electron transfer between electrodes and redoxproteins[J]. *Eur. J. Biochem.* , 1988 , 172 : 261 ~ 269.
- [2] Santucci R, Picciau A, Campanella L, et al. Electrochemistry of metalloproteins[J]. *Curr. Top Electrochem.* , 1994 , 3 : 313 ~ 328.
- [3] Armstrong F A, Hill H A O, Walton N J. Direct electrochemistry of redox proteins[J]. *Acc. Chem. Res.* , 1998 , 21 : 407 ~ 413.
- [4] Gorton L, Lindgren A, Larsson T, et al. Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrode as basis for third generation biosensors[J]. *Anal. Chim. Acta.* , 1999 , 400 : 91 ~ 108.
- [5] Aguey-Zinsou K F, Bernhardt P V, Kappler U, et al. Direct electrochemistry of a bacterial sulfite dehydrogenase[J]. *J. Am. Chem. Soc.* , 2003 , 125 : 530 ~ 535.
- [6] Elliott S J, McElhaney A E, Feng C, et al. A voltammetric study of interdomain electron transfer within sulfite oxidase[J]. *J. Am. Chem. Soc.* , 2002 , 124 : 11612 ~ 11613.
- [7] Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon [J]. *Nature* , 1991 , 354 : 56 ~ 58.
- [8] Ebbesen T W, Ajayan P M. Large-scale synthesis of carbon nanotubes[J]. *Nature* , 1992 , 358 : 220 ~ 222.
- [9] Ajayan P M. Nanotubes from carbon[J]. *Chem. Rev.* , 1999 , 99 : 1 787 ~ 1 799.
- [10] Dai H. Carbon nanotubes: opportunities and challenges[J]. *Surface Science* , 2002 , 500 : 218 ~ 241.
- [11] CAI Cherr-xin, CHEN Jing, Bao Jiar-chun, et al. The applications of carbon nanotubes in analytical chemistry[J]. *Chinese J. Anal. Chem.* , 2004 , 32 : 381 ~ 387.
- [12] CHEN Jing, Bao Jiar-Chun, CAI Cherr-xin. Fabrication, characterization and electrocatalysis of an ordered carbon nanotube electrode[J]. *Chinese J. Chem.* , 2003 , 21 : 665 ~ 669.
- [13] CHEN Jing, CAI Cherr-xin. Direct electrochemical oxidation of NADPH at a low potential on the carbon nanotube modified glassy carbon electrode[J]. *Chinese J. Chem.* , 2004 , 22 : 167 ~ 171.
- [14] CHEN Jing, Bao Jiar-chun, CAI Cherr-xin, et al. Direct electrochemical oxidation of dihydronicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at an ordered carbon nanotubes electrode[J]. *Chinese Chem. Lett.* , 2003 , 14 : 1171 ~ 1174.
- [15] Luo H, Shi Z, Li N, et al. Investigation of the electrochemical and electrocatalytic behavior of single-wall carbon nanotube film on a glassy carbon electrode[J]. *Anal. Chem.* , 2001 , 73 : 915 ~ 920.
- [16] Wang Z, Liang Q, Wang Y, et al. Carbon nanotube-intercalated graphite electrodes for simultaneous determination of dopamine and serotonin in the presence of ascorbic acid[J]. *J. Electroanal. Chem.* , 2003 , 540 : 129 ~ 134.
- [17] Liu P, Hu J. Carbon nanotube powder microelectrodes for nitrite detection[J]. *Sensors and Actuators B* , 2002 , 84 : 194 ~ 199.
- [18] Wang J, Li M, Shi Z, et al. Electrocatalytic oxidation of norepinephrine at a glassy carbon electrode modified with single wall carbon nanotubes[J]. *Electroanalysis* , 2002 , 14 : 225 ~ 230.
- [19] Wang J, Deo R P, Poulin P, et al. Carbon nanotube fiber microelectrodes[J]. *J. Am. Chem. Soc.* , 2003 , 125 : 14 706 ~ 14 707.
- [20] Wang J, Musameh M, Lin Y. Solubilization of carbon nanotubes by Nafion toward the preparation of amperometric biosensors[J]. *J. Am. Chem. Soc.* , 2003 , 125 : 2408 ~ 2409.

- [21] Azamian B R, Davis J J, Coleman K S, et al. Bioelectrochemical single-walled carbon nanotubes[J]. J. Am. Chem. Soc., 2002, 124: 12 664 ~ 12 665.
- [22] Davis J J, Cols R J, Hill A J O. Protein electrochemistry at carbon nanotubes electrodes[J]. J. Electroanal. Chem., 1997, 440: 279 ~ 282.
- [23] Wang J, Li M, Shi Z, et al. Direct electrochemistry of cytochrome c at a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes[J]. Anal. Chem., 2002, 74: 1 993 ~ 1 997.
- [24] Richard C, Balavoine F, Schultz P, et al. Supramolecular self-assembly of lipid derivatives on carbon nanotubes[J]. Science, 2003, 300: 775 ~ 778.
- [25] Martin C R, Dollard K A. Effect of hydrophobic interactions on the rates of ionic diffusion in Nafion films at electrodes surface[J]. J. Electroanal. Chem., 1983, 159: 127 ~ 135.
- [26] Yang J, Hu N, Rusling J F. Enhanced electron transfer for hemoglobin in poly(ester sulfonic acid) films on pyrolytic graphite electrodes[J]. J. Electroanal. Chem., 1999, 463: 53 ~ 62.
- [27] Sun H, Hu N, Ma H. Direct electrochemistry of hemoglobin in polyacrylamide hydrogel films on pyrolytic graphite electrodes[J]. Electroanalysis, 2000, 12: 1064 ~ 1070.
- [28] Zhang Z, Nassar A E F, Lu Z, et al. Direct electron injection from electrodes to cytochrome P450_{cam} in biomembrane-like films[J]. J. Chem. Soc., Faraday Trans., 1997, 93: 1 769 ~ 1 774.
- [29] Mimica D, Zagal J H, Bedioui F. Electrocatalysis of nitric oxide reduction by hemoglobin entrapped in surfactant films[J]. Electrochem. Commun., 2001, 3: 435 ~ 438.
- [30] Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems[J]. J. Electroanal. Chem., 1979, 101: 19 ~ 28.
- [31] Liu H, Hu N. Heme protein-gluten films: voltammetric studies and their electrocatalytic properties[J]. Anal. Chim. Acta, 2003, 481: 91 ~ 99.
- [32] Sun D M, Cai C X, Li X G, et al. Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized on active carbon[J]. J. Electroanal. Chem., 2004, 566: 415 ~ 421.
- [33] Chen X, Peng X, Kong J, et al. Characterization of the direct electron transfer and bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase in DNA film at pyrolytic graphite electrode[J]. Anal. Chim. Acta, 2000, 412: 89 ~ 98.
- [34] Jiang L, McNeil C J, Cooper J M. Direct electron transfer reaction of glucose oxidase immobilized at a self-assembled monolayer[J]. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1995, 1 293 ~ 1 295.
- [35] Ianniello R M, Lindsay T J, Yacynych A M. Differential pulse voltammetric study of direct electron transfer in glucose oxidase chemically modified graphite electrodes[J]. Anal. Chem., 1982, 54: 1 098 ~ 1 101.
- [36] Hecht H J, Kalisz H M, Hendle J, et al. Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 resolution[J]. J. Mol. Biol., 1993, 229: 153 ~ 172.