

2014-06-28

## Horseradish Peroxidase-Attapulgite Clay Nanocomposites: Fabrication and Application to Sensing the Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Released from Cells

Ping WU

Chen-xin CAI

*Jiangsu Key Laboratory of New Power Batteries, College of Chemistry and Materials Science, Nanjing  
Normal University, Nanjing 210046, China;* cxcai@njnu.edu.cn

---

### Recommended Citation

Ping WU, Chen-xin CAI. Horseradish Peroxidase-Attapulgite Clay Nanocomposites: Fabrication and Application to Sensing the Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Released from Cells[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2014, 20(3): 260-265.

DOI: 10.13208/j.electrochem.130883

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol20/iss3/7>

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.

DOI: 10.13208/j.electrochem.130883

Artical ID:1006-3471(2014)03-0260-06

Cite this: *J. Electrochem.* 2014, 20(3): 260-265

Http://electrochem.xmu.edu.cn

# 凹土-辣根过氧化物酶复合材料制备及其细胞过氧化氢检测

吴萍, 蔡称心\*

(南京师范大学 化学与材料科学学院, 江苏省新型动力电池重点实验室, 江苏 南京 210023)

**摘要:** 将辣根过氧化物酶(HRP)固定到凹凸棒石粘土(Attapulgit, 简称凹土)表面, 制得HRP-凹土纳米复合物(HRP-Attapulgit), 并采用电化学阻抗、紫外光谱和红外光谱技术表征了HRP固定化过程. HRP-Attapulgit电化学性质测试表明, 凹土能促进HRP的直接电子转移, 其循环伏安曲线有一对良好的氧化还原峰, 峰电位分别为 $E_{pc} = -370$  mV,  $E_{pa} = -300$  mV, 式量电位 $E^0 = -335$  mV. 凹土表面HRP的 $H_2O_2$ 响应电流与浓度( $0.3 \sim 75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )呈线性关系. 该电极可用于巨噬细胞中微量 $H_2O_2$ 的测定.

**关键词:** 辣根过氧化物酶; 凹土; 过氧化氢; 巨噬细胞

**中图分类号:** O657.1

**文献标识码:** A

活性氧分子作为细胞信号分子在细胞的信号转导过程中起着重要作用, 参与多种因子细胞生物学效应的启动<sup>[1-2]</sup>. 过氧化氢( $H_2O_2$ )是活性氧的重要代表, 其浓度和超氧阴离子、羟基自由基等活性氧分子密切相关.  $H_2O_2$ 在生命体系的细胞代谢过程中扮演着重要的调节作用, 低浓度 $H_2O_2$ 分子可作为信号转导和扩大的第二信使, 而高浓度的 $H_2O_2$ 分子却对细胞的组成及有机体造成损害, 引起氧化应激, 从而引发多种疾病和生理系统紊乱等. 因此,  $H_2O_2$ 分子可视为调节细胞凋亡过程的关键因素. 细胞中可靠、灵敏的 $H_2O_2$ 检测在生理学和病理生理学领域至关重要. 但细胞水平的 $H_2O_2$ 检测仍受到较多因素的制约, 如细胞尺度小、胞内超氧自由基的半衰期非常短、稳态浓度极低以及缺乏有效捕获 $H_2O_2$ 的探针等. 酶传感电化学技术因灵敏度高、响应快、样品消耗量小、专一性强等优点而备受关注. HRP结构已知、来源广泛, 是研究催化 $H_2O_2$ 氧化还原反应的重要模型酶分子之一. 凹土化学稳定性好, 离子交换性强, 分散性好, 且吸附能力较高, 有利于促进蛋白质/酶的直接电子转移并提高其电催化活性<sup>[4-14]</sup>, 是固定酶合适载体. Mousty等<sup>[10]</sup>报

道, 凹土中的铁元素对血红素类蛋白质/酶的直接电子转移和电催化有尤为积极的作用.

本文制得凹土-辣根过氧化物酶复合材料(HRP-Attapulgit)并研究HRP-Attapulgit/GC电极的电催化活性, 以期建立酶电催化 $H_2O_2$ 的检测平台.

## 1 实验

### 1.1 试剂与仪器

辣根过氧化物酶(HRP, EC 1.11.1.7, MW 40 000, Sigma)和佛波醇12-十四酸酯13-乙酸酯(PMA, Sigma)未经处理直接使用. 凹土(江苏玖川)使用前经如下步骤纯化: 将1 g研细的凹土分散在100 mL HCl溶液( $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )中并搅拌12 h, 冷却至室温后过滤, 并用去离子水洗涤至无 $\text{Cl}^-$ 离子,  $80^\circ\text{C}$ 烘干. 将该预处理样品先于水中超声分散24 h (浓度约5%, by mass), 磁力搅拌24 h, 再超声分散3 h, 离心分离, 重复操作3次. 而后真空晾干, 研磨, 可得纯化凹土. 其它试剂均为分析纯, 溶液均用二次水配制.  $H_2O_2$ 溶液由30%  $H_2O_2$ 稀释配得, 浓度经标准 $\text{KMnO}_4$ 溶液标定. 磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.0,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )由 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 配制.

收稿日期: 2013-08-26, 修订日期: 2013-09-23 \* 通讯作者, Tel: (86-592)85891780, E-mail: cxcai@njnu.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 21175067, No. 21273117)、江苏省自然科学基金(No. BK2011779)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20103207110004)、江苏省高校优秀科研创新团队和江苏省高校优势学科建设工程项目资助

使用JEOL JSM-5610LV扫描电子显微镜和JEOL-2010透射电子显微镜观察凹土形貌. 用Nexus 670 FT-IR红外光谱仪测试样品红外光谱图(KBr压片法). 三电极系统由玻碳基底修饰工作电极、铂对电极及饱和甘汞参比电极与电解液组成. 通氮除氧20 min以上, 并通氮气饱和. CHI 760C电化学工作站测试电极循环伏安曲线, 电化学交流阻抗(EIS)谱图频率范围0.01 ~ 105 Hz, 正弦波电位振幅5 mV.

## 1.2 HRP-Attapulgite/GC电极

将2 mg凹土超声分散于1 mL PBS溶液中, 将该凹土悬浮液与2 mg·mL<sup>-1</sup> HRP溶液(pH 7.0)等体积混合, 磁力搅拌0.5 h. 凹土的等电点4 ~ 5.5, 在pH 7.0的PBS溶液中带负电荷, HRP等电点9.1, 在pH 7.0的PBS中带正电荷, 依其正负电荷静电作用将HRP吸附于凹土表面. 该混合液在18000 r·min<sup>-1</sup>离心30 min, 二次水洗涤3次, 真空晾干, 即得HRP-Attapulgite复合物.

将玻碳电极(GC,  $\phi=3$  mm)分别用6号砂纸、0.3和0.05  $\mu\text{m}$ 氧化铝粉抛光至镜面, 二次水和乙醇中超声清洗1 min, 晾干. 将HRP-Attapulgite复合物配制成2 mg·mL<sup>-1</sup>的悬浮液, 超声分散30 min. 用微量加样器将5  $\mu\text{L}$ 该复合物悬浮液滴涂至GC电极表面, 在干燥器中干燥, 挥发溶剂后即得HRP-Attapulgite/GC电极, 4  $^{\circ}\text{C}$ 保存. 同样可得Attapulgite/GC电极.

## 1.3 细胞培养

将冷冻的小鼠腹膜巨噬细胞(RAW 264.7)迅速置于37 ~ 40  $^{\circ}\text{C}$ 快速溶解, 1000 r·min<sup>-1</sup>下离心10 min, 去除上清液. 加入PBS溶液继续离心10 min, 经洗涤后加入DMEM培养液(含10%(by volume)牛胚胎血清、100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素、100  $\mu\text{g}$ ·mL<sup>-1</sup>链霉素)混合均匀, 移入细胞培养皿并置于培养箱培养(5% CO<sub>2</sub>, 37  $^{\circ}\text{C}$ ). 细胞长满90%(细胞数约 $2 \times 10^6$ ), 经无血清的培养液冲洗(以除去未贴壁的细胞), 再经PBS溶液洗涤3次. 将细胞培养液在1000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min, 吸除上层清液, 再经PBS溶液洗涤3次即可.

## 2 结果与讨论

### 2.1 表征

图1示出凹土的TEM(A)和SEM(B)照片. 从TEM照片看出, 凹土为纳米尺寸的棒状材料, 直径

20 ~ 50 nm之间, 长度约0.5 ~ 1  $\mu\text{m}$ , 且呈现出三维网状结构. 该结构利于增大有效吸附面积, 吸附大量的蛋白质/酶分子, 增多酶电催化位点.

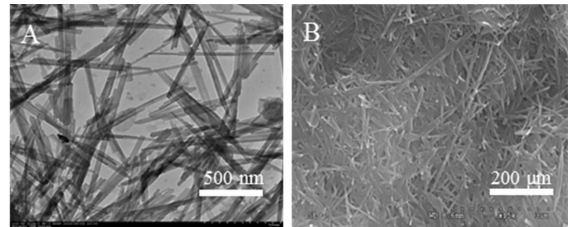


图1 凹土的TEM(A)和SEM(B)照片

Fig. 1 Typical TEM (A) and SEM (B) images of attapulgite

图2A曲线a和b分别对应于Attapulgite/GC和HRP-Attapulgite/GC电极在5.0 mmol·L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>溶液中的交流阻抗谱图. 从图中可以看出, 曲线b半圆较曲线a中半圆明显增大, 说明蛋白质分子已固定于凹土表面.

为进一步说明HRP分子在凹土表面的固定, 作者还采用紫外光谱对HRP分子的固定化过程进行了研究. HRP-Attapulgite复合物的紫外光谱曲线在410 nm处出现1个吸收峰(图2B, 曲线c), 其位置与HRP的Soret带一致(图2B, 曲线b, 410 nm), 且凹土在该处没有任何吸收峰(图2B, 曲线a). 这些结果说明, HRP不仅固定到凹土表面, 并且在固定过程中HRP的二级结构未发生变化. 通过分析HRP-Attapulgite复合物的红外光谱图(谱图略), 发现除保留了凹土本身的特征吸收峰外, 在1546 cm<sup>-1</sup>处还出现了1个小的吸收峰, 该峰的位置与纯HRP的酰胺II的特征峰位置(1544 cm<sup>-1</sup>)几乎一致, 说明HRP分子已经固定于凹土表面.

### 2.2 HRP-Attapulgite/GC电极的电化学性质

Attapulgite/GC电极在-0.7 ~ 0.1 V电位范围内的循环伏安曲线没有氧化还原峰(图3a), 而HRP-Attapulgite/GC电极的循环伏安曲线呈现1对氧化还原峰(图3b), 其氧化还原峰电位分别为 $E_{pc} = -370$  mV,  $E_{pa} = -300$  mV, 式量电位 $E^{\theta} = -335$  mV, 与HRP在其它材料表面的氧化还原峰电位相似<sup>[9]</sup>, 吸附在凹土表面的HRP的电化学反应引起的氧化还原峰对应于HRP铁卟啉的Fe(III)/Fe(II)电对的氧化还原.

图4考察了不同扫描速率HRP-Attapulgite/GC

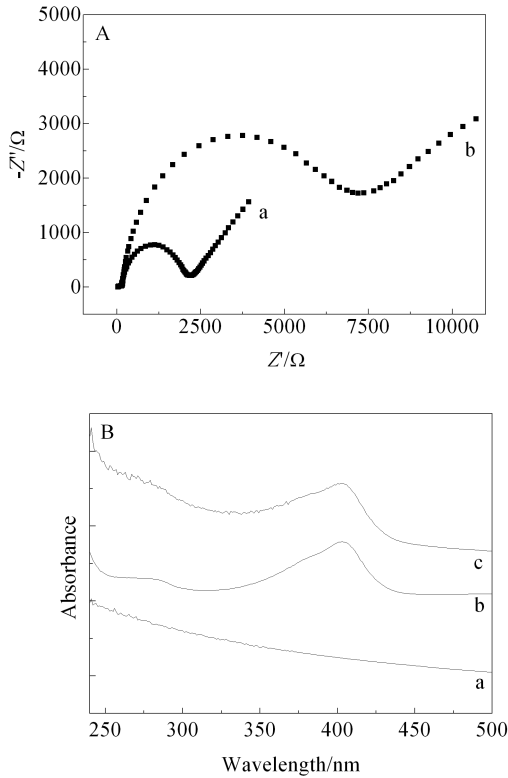


图2 Attapulгите/GC(a)和HRP-Attapulгите/GC(b)电极的交流阻抗图(A)和Attapulгите(a)、HRP(b, 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>)和HRP-Attapulгите复合物(c)的紫外光谱图(B)

Fig. 2 EIS date of Attapulгите/GC (a) and HRP-Attapulгите/GC (b) electrodes in 5.0 mmol·L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] containing 0.1 mol·L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub> (A) and UV-Vis spectra of attapulгите (a), HRP in solution (b, 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>), and the HRP-Attapulгите nanohybrids (c)(B)

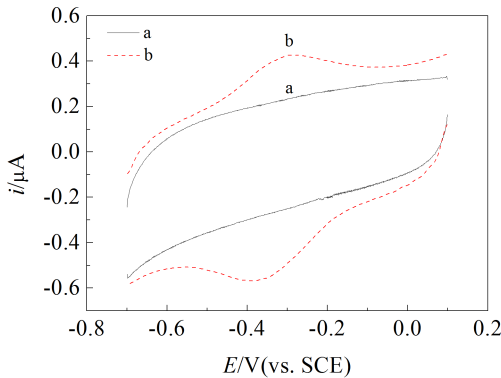


图3 Attapulгите/GC (a) 和HRP-Attapulгите/GC (b) 电极在PBS溶液 (pH 7.0, 0.1 mol·L<sup>-1</sup>) 中的循环伏安曲线扫描速率100 mV·s<sup>-1</sup>

Fig. 3 Voltammetric responses of the Attapulгите/GC (a) and HRP-Attapulгите/GC (b) electrodes at a scan rate of 100 mV·s<sup>-1</sup> in PBS solution (pH 7.0, 0.1 mol·L<sup>-1</sup>)

电极的循环伏安曲线. 在各扫速下, 氧化还原电位几乎相同, 而峰电流逐渐增大, 与扫速 (20 ~ 1000 mV·s<sup>-1</sup>) 呈线性关系, 说明HRP在电极表面的直接电子转移受表面控制. 可以观察到式量电位E<sup>0</sup>几乎保持不变, HRP直接电子转移可逆性较好.

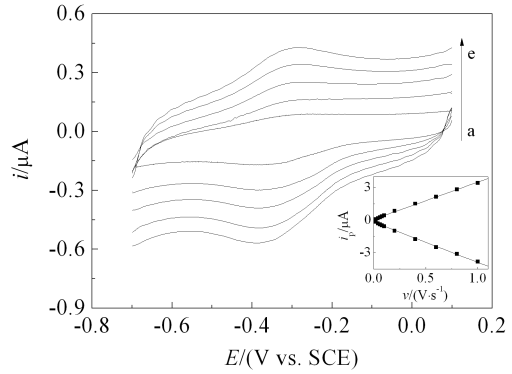


图4 HRP-Attapulгите/GC电极在PBS溶液中不同扫描速率的循环伏安曲线(插图显示峰电流与扫描速率的关系)

Fig. 4 Cyclic voltammograms of the HRP-Attapulгите/GC electrode at scan rates of 20, 40, 60, 80 and 100 mV·s<sup>-1</sup> (from a to e) in oxygen-free PBS (pH 7.0, 0.1 mol·L<sup>-1</sup>) (the inset shows dependence of peak currents on scan rates)

图5示出HRP-Attapulгите/GC电极在pH值5 ~ 9的PBS溶液中的循环伏安曲线. 随着pH值的升高, 其氧化峰和还原峰电位负移, 式量电位E<sup>0</sup>随pH值呈线性变化, 斜率-50.3 mV·pH<sup>-1</sup>, 接近于1质子1电子传递(理论值-58.5 mV·pH<sup>-1</sup>, 22 °C)<sup>[6]</sup>.

HRP-Attapulгите/GC电极在PBS (pH 7.0, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup>) 中10 mV·s<sup>-1</sup>连续扫描50周期循环, 其氧化还原峰的形状保持不变, 其峰电流约为初始电流的91%, 说明该电极表面形成的薄膜均匀, 可牢固地吸附于电极表面不易脱落.

### 2.3 HRP-Attapulгите/GC 电极的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 电催化还原

图6示出HRP-Attapulгите/GC电极在不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的PBS中(0, 0.05, 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>)的循环伏安曲线. 结果表明, 该电极在无H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的PBS中有1对很好的、几乎对称的氧化还原峰(图6a); 在0.05 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的PBS中, HRP-Attapulгите/GC电极的还原峰电流增大, 氧化峰电流减小(图6b); 在0.2 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的PBS中, 其还原峰电流大幅增加, 而氧化峰

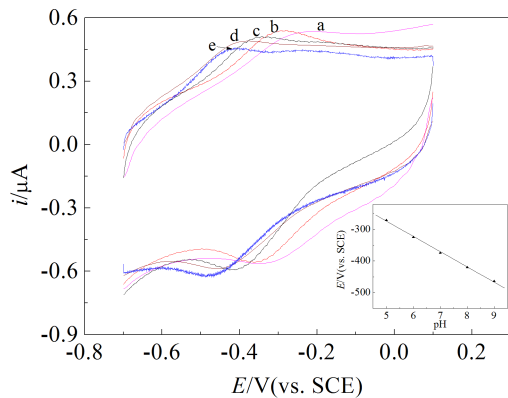


图5 HRP-Attapulgit/GC电极在不同pH值PBS中的循环伏安曲线 扫描速率:  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

Fig. 5 Cyclic voltammograms of the HRP-attapulgit/GC electrode in PBS with different pH values (from a to e) of 5, 6, 7, 8 and 9 at a scan rate of  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

消失 (图6c), 这种电催化反应的典型特征说明 HRP-Attapulgit复合材料对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的还原有良好的电催化活性, 所构建的凹土薄膜具有良好的生物相容性, 提供了一种生物环境的微环境, 从而保持了吸附在其表面的HRP分子的生物活性。

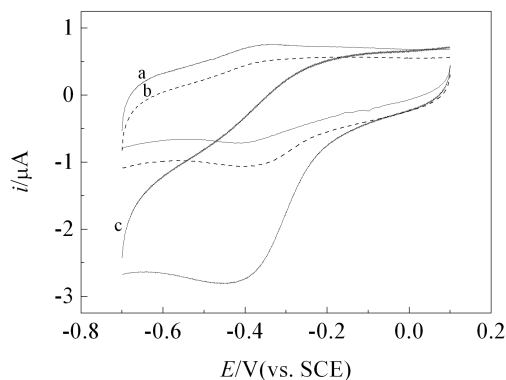


图6 HRP-Attapulgit/GC电极分别在含不同浓度 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的PBS溶液中的循环伏安曲线 扫描速率 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

Fig. 6 Cyclic voltammograms of the HRP-Attapulgit/GC electrode in blank PBS with 0 (a), 0.05 (b), and 0.2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (c)  $\text{H}_2\text{O}_2$  at the scan rate of  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

图7是恒定电位 $-340 \text{ mV}$ 下, HRP-Attapulgit/GC电极在不同浓度 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的PBS中的电流响应曲线. 加入 $\text{H}_2\text{O}_2$ 后, 其响应电流迅速增加, 约 $1.5 \text{ s}$ 内达到稳定值, 表明该电极可快速响应底物 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的浓度变化.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度较低时, 电流随 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度的升高而增大, 且其电流与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度在 $0.3 \sim 75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围

内呈线性关系, 斜率 $3.29 \mu\text{A} \cdot (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ , 灵敏度 $(53 \pm 2) \mu\text{A} \cdot (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 检测限 $(0.10 \pm 0.05) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (信噪比为3).  $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度较高时, 其电流趋于饱和, 显示为典型的Michaelis-Menten酶动力学特征, 表观Michaelis-Menten常数 $K_M^{\text{app}}$ 为 $10.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 该电极 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 每2 d检测其对 $0.02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 的电催化活性, 1个月其催化电流仍达初始响应的约90%; 连续使用一周 (每天4次), 其响应电流仍约为初始响应电流的85%; 连续使用1个月, 其电流响应下降至初始电流的75%. 这些结果说明 HRP-Attapulgit/GC电极有好的稳定性, 这归因于电极表面凹土的三维网状结构, 更有利于吸附大量的HRP分子, 提供较多的电催化位点和底物充分接触。

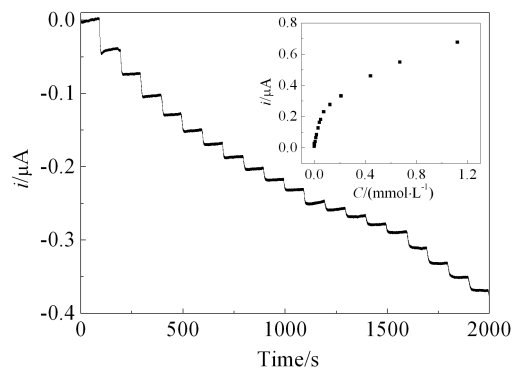


图7 HRP-Attapulgit/GC电极 $-340 \text{ mV}$ 恒电位下对不同浓度 $\text{H}_2\text{O}_2$ 电流响应曲线 (插图: 电流与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度关系曲线)

Fig. 7 Amperometric responses of the HRP-Attapulgit/GC electrode to the successive addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in PBS ( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.0) at an applied potential of  $-340 \text{ mV}$  (the inset shows the dependence of the response of the electrode on  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration)

## 2.4 RAW 264.7巨噬细胞中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的检测

巨噬细胞是一种免疫细胞, 在受到刺激或吞噬后, 通常会发生呼吸爆发, 并消耗大量氧气同时释放大量的活性氧 (ROS)<sup>[17]</sup>. PMA作为诱导巨噬细胞呼吸爆发、引发过氧化氢产生的刺激剂. HRP-Attapulgit/GC电极用于检测RAW 264.7巨噬细胞中释放出的 $\text{H}_2\text{O}_2$ . 图8b给出HRP-Attapulgit/GC电极响应RAW 264.7细胞 ( $2 \times 10^6$ 个细胞) $\text{H}_2\text{O}_2$ 释放过程的电流-时间曲线. 基线稳定后, 加入 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PMA, 其响应电流 $15 \text{ s}$ 内达到最大, 说明电极可快

速、灵敏地响应细胞释放的 $H_2O_2$ 。而后电流逐渐减小,这是由于 $H_2O_2$ 的外逸引起的。根据响应电流可算出RAW 264.7巨噬细胞中的 $H_2O_2$ 浓度约 $1.96 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,这与文献报道的一致<sup>[18]</sup>。为验证曲线b出现的还原电流信号对应于 $H_2O_2$ 的电化学还原,在细胞经PMA刺激前加入过氧化氢酶(一种 $H_2O_2$ 的清除剂)。清除剂加入后, $H_2O_2$ 还原电流信号消失(曲线a),表明曲线b中的还原电流确由巨噬细胞经PMA刺激后产生的 $H_2O_2$ 引起的。将3份已知浓度的 $H_2O_2$ 标准溶液加入于细胞样品中,回收率分别为98.5%、97.5%和102.0%(见表1),表明测量细胞中的 $H_2O_2$ 获得的数据是准确可靠的,有望为检测细胞中 $H_2O_2$ 含量建立一个新的生物传感器平台,也为进一步开展相关生理和病理学的研究打下了基础。

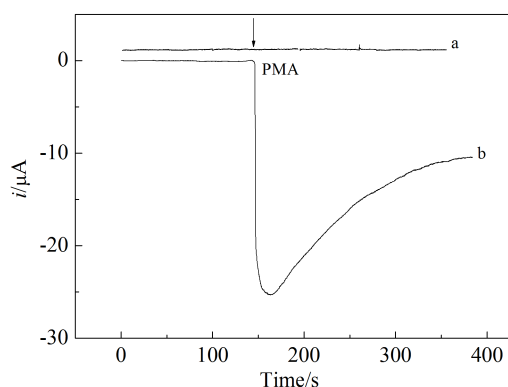


图8 HRP-Attapulgit/GC电极在有(a)和无过氧化氢酶(b)的PMA刺激的巨噬细胞的电流响应

Fig. 8 Amperometric responses obtained at the HRP-Attapulgit/GC electrode for the electrocatalytic reduction of extracellular  $H_2O_2$  with (curve a) and without (curve b) catalysts upon the addition of PMA (the electrodes were biased at a potential of  $-0.34 \text{ V}$  (vs. SCE))

表1 巨噬细胞中 $H_2O_2$ 的回收率

Tab. 1 Recovery measurement of  $H_2O_2$  released from RAW264.7 macrophages samples

Sample No.	Added amounts / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Measured amounts / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Recovery/%
1	2	1.97	98.5
2	2	1.95	97.5
3	2	2.04	102.0

### 3 结 论

本文将HRP吸附在凹土表面制得了

HRP-Attapulgit复合物,该复合物对 $H_2O_2$ 的电流响应与浓度( $0.3 \sim 75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )呈线性关系,斜率为 $3.29 \mu\text{A} \cdot (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ ,灵敏度为 $(53 \pm 2) \mu\text{A} \cdot (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,检测限为 $(0.10 \pm 0.05) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (信噪比为3),可用于巨噬细胞中 $H_2O_2$ 浓度的灵敏快速检测。

### 参考文献(References):

- [1] Finkel T. Redox-dependent signal transduction [J]. FEBS Letters, 2000, 476(1): 52-54.
- [2] Wu X M, Hu Y J, Jin J, et al. Electrochemical approach for detection of extracellular oxygen released from Erythrocytes based on graphene film integrated with Laccase and 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(9): 3588-3596.
- [3] Tate R M, Repine J E. Phagocytes, oxygen radicals and lung injury[M]//Pryer W A. Free Radicals in Biology. New York: Academic Press, 1984(VI): 199-209.
- [4] Chen D X, Wang Q, Jin J, et al. Low-potential detection of endogenous and physiological uric acid at uricase-thionine-single-walled carbon nanotube modified electrodes [J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(6): 2448-2455.
- [5] Lei C H, Lisdaf F, Wollenberger U, et al. Cytochrome c/clay-modified electrode[J]. Electroanalysis, 1999, 11(4): 274-276.
- [6] Lei C H, Wollenberger U, Jung C, et al. Clay-bridged electron transfer between cytochrome P450cam and electrode [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 268(3): 740-744.
- [7] Chen X L, Hu N F, Zeng Y H, et al. Ordered electrochemically active films of hemoglobin, didodecyldimethylammonium ions, and clay[J]. Langmuir, 1999, 15(20): 7022-7030.
- [8] Zhou Y L, Hu N F, Zeng Y H, et al. Heme protein-clay films: Direct electrochemistry and electrochemical catalysis[J]. Langmuir, 2002, 18(1): 211-219.
- [9] Zhou Y L, Li Z, Hu N F, et al. Layer-by-layer assembly of ultrathin films of Hemoglobin and clay nanoparticles with electrochemical and catalytic activity[J]. Langmuir, 2002, 18(22): 8573-8579.
- [10] Charradi K, Forano C, Prevot V, et al. Characterization of hemoglobin immobilized in MgAl-Layered double hydroxides by the coprecipitation method[J]. Langmuir, 2010, 26(12): 9997-10004.
- [11] Charradi K, Forano C, Prevot V, et al. Direct electron transfer and enhanced electrocatalytic activity of hemoglobin at iron-rich clay modified electrodes[J]. Langmuir, 2009, 25(17): 10376-10383.
- [12] Xu J M, Li W, Yin Q F, et al. Direct electrochemistry of

- cytochrome c on natural nano-attapulgite clay modified electrode and its electrocatalytic reduction for  $\text{H}_2\text{O}_2$  [J]. *Electrochimica Acta*, 2007, 52(11): 3601-3606.
- [13] Xu J M, Li W, Yin Q F, et al. Direct electron transfer and bioelectrocatalysis of hemoglobin on nano-structural attapulgite clay-modified glassy carbon electrode [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, 315(1): 170-176.
- [14] Xu J M(徐继明), Han W X(韩文霞), Yin Q F(尹起范), et al. Direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on nano-structural attapulgite clay matrix[J]. *Chinese Journal of Chemistry (中国化学)*, 2009, 27(11): 2197-2202.
- [15] Huang J L, Tsai Y C. Direct electrochemistry and biosensing of hydrogen peroxide of horseradish peroxidase immobilized at multiwalled carbon nanotube/alumina-coated silica nanocomposite modified glassy carbon electrode [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009, 140(1): 267-272.
- [16] Yin Y J, Lv Y F, Wu P, et al. Direct electrochemistry of redox proteins and enzymes promoted by carbon nanotubes[J]. *Sensors*, 2005, 5(4): 220-234.
- [17] Szymczyk N H, Kerr B A E, Freeman T A. Involvement of hydrogen peroxide in the differentiation and apoptosis of preosteoclastic cells exposed to arsenite [J]. *Biochemical pharmacology*, 2006, 72(6): 761-769.
- [18] Winterbourn C C, Hampton M B, Livesey J H, et al. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome - Implications for microbial killing[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(52): 39860-39869.

## Horseradish Peroxidase-Attapulgite Clay Nanocomposites: Fabrication and Application to Sensing the Extracellular $\text{H}_2\text{O}_2$ Released from Cells

WU Ping, CAI Chen-xin\*

(*Jiangsu Key Laboratory of New Power Batteries, College of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China*)

**Abstract:** The nanostructured attapulgite clay was employed as a support matrix for immobilizing horseradish peroxidase (HRP). FTIR and electrochemical methods demonstrated that HRP had been effectively assembled on attapulgite surface with the formation of HRP-Attapulgite nanocomposites. The HRP-Attapulgite hybrid was deposited on the glassy carbon (GC) electrode forming the HRP-Attapulgite/GC electrode. Cyclic voltammetric results showed a pair of well-defined redox peaks, which were ascribed to direct electron transfer (DET) of HRP, with the formal potential  $E^0 = -335$  mV (vs. SCE) in the phosphate buffer solution (PBS, pH 7.0). The dependence of  $E^0$  on solution pH indicated that DET reaction of HRP was coupled with proton transfer. The developed electrode revealed a good electrocatalytic activity toward the reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The electrocatalytic current was linear to the concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the concentration range of 0.3 to 75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  with high sensitivity ( $(53 \pm 2) \mu\text{A}\cdot(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) and low detection limit ( $(0.10 \pm 0.05) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Moreover, the HRP-Attapulgite/GC electrode was used to detect the level cellular  $\text{H}_2\text{O}_2$  released from the Macrophages cells (RAW 264.7). Therefore, an electrochemical approach for detection of cellular  $\text{H}_2\text{O}_2$  based on HRP-Attapulgite hybrid was developed. This study has not only established a novel approach to detect cellular  $\text{H}_2\text{O}_2$ , but also provided a general route for fabricating attapulgite-based biosensing platform via assembling enzymes/proteins on attapulgite surface, expanded the scope of attapulgite applications to the field of bioelectroanalytical chemistry and cellular biology.

**Key words:** horseradish peroxidase; attapulgite; hydrogen peroxide; macrophages cell