

2002-08-28

## Electrochemical Properties of Nitrate Immobilized on Gold Electrodes with 2-aminoethanethiol SAMs

Ya-ru SONG

Hong WU

Hui-bo SHAO

---

### Recommended Citation

Ya-ru SONG, Hong WU, Hui-bo SHAO. Electrochemical Properties of Nitrate Immobilized on Gold Electrodes with 2-aminoethanethiol SAMs[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2002 , 8(3): Article 17.

DOI: 10.61558/2993-074X.3302

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol8/iss3/17>

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(2002)03-0333-04

# 硝酸还原酶在巯基自组装膜上的电化学性质

宋雅茹<sup>1</sup>, 吴红<sup>1</sup>, 邵会波<sup>2\*</sup>

(1. 北京师范大学化学系, 北京 100875; 2. 首都师范大学化学系, 北京 100037)

**摘要:**应用自组装技术将硝酸还原酶(NR)构筑在巯醇自组装单分子膜上,研究了 Au/半胱胺/NR 和 Au/半胱胺/NR/卵磷脂两种酶电极在磷酸缓冲液中的直接电化学行为。

**关键词:** 硝酸还原酶;卵磷脂;半胱胺自组装膜

**中图分类号:** O 646

**文献标识码:** A

硝酸还原酶(NR)具有较大的分子量(160000-500000),含有 FAD、血红素、钼辅因子等电活性组分。作为高等植物氮素同化过程中的限速酶,它对处理硝酸盐的污染问题以及更有效地利用氮肥有着潜在的重要作用,并已受到生物电化学家的关注。GLazier 等<sup>[1]</sup>制造了第一代基于 NR 的生物传感器,用于测定饮用水和化肥中的硝酸根,Barber 等<sup>[2]</sup>研究了同化 NR 中的黄素组分在玻碳电极上的直接电化学行为。巯醇-磷脂混合双层膜是新近发展的一种模拟细胞膜模型体系,由于优良的稳定性、重复性和简便性,使其被日益广泛地应用在生物大分子的固定化和酶电化学性质的研究上<sup>[3]</sup>。本文利用自组装技术将 NR 构筑在巯醇自组装单分子膜上,研究了 Au/半胱胺/NR 和 Au/半胱胺/NR/卵磷脂两种酶电极在磷酸缓冲液中的直接电化学行为。

## 1 实验

### 1.1 试剂

半胱胺(AET)盐,纯度 98%(Acros Organics 产品),NR(NADPH) EC 1. 6. 6. 2(Sigma Chem. CO. 生产)。大豆卵磷脂(北京双旋微生物培养基制品厂产)。超纯水由 Milli-Q 纯水机制得,其电阻率为 18.2 M /cm。其余所用试剂均为分析纯。

### 1.2 酶电极的制备

将干净的金电极浸入 10 mmol/L 半胱胺的超纯水溶液中自组装 24 h,得到 Au/半胱胺

收稿日期:2001-12-17,修订日期:2002-01-21

\* 通讯联系人, Tel: (86-10)68902491-801; E-mail: huiyishou@yahoo.com.cn

基金项目:国家自然科学基金(29973026),北京市自然科学基金(2992007),教育部高等学校骨干教师资助计划资助

(AET)修饰电极,再将溶于磷酸缓冲液(pH 7.4)中的硝酸还原酶吸附固定在 Au/半胱胺电极上,形成 Au/半胱胺/NR电极.用涂布-冷冻法于 Au/半胱胺/NR电极上再组装上卵磷脂双层膜.即得 Au/半胱胺/NR/卵磷脂(lipid)电极.

### 1.3 仪器及测试

使用三电极系统,以修饰酶电极作工作电极,面积  $0.138 \text{ cm}^2$ ,Pt 丝为对电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极.电化学测量使用 CHI832 电化学工作站(上海辰华仪器公司).

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶电极的循环伏安行为

图 1 为经半胱胺组装的金电极以及两种酶修饰电极在磷酸缓冲溶液(pH 7)中的循环伏安图.如图所见,Au/AET 电极的 CV 曲线(图 1a)不显示任何氧化还原电信号.但对 2 种酶修饰电极,如将其浸于 pH 7.4 的缓冲液中 5 d 后,则在相同的实验条件下,相应的循环伏安曲线(图 1-b,c)都出现了一对准可逆的氧化还原峰.这表明金半胱胺自组装单层膜为电极中 NR 与金电极之间直接的电子转移提供了适合于电子传递的微环境,从而对该电化学过程起了很大促进作用.

图 1b 给出,Au/AET/NR/酶电极在扫速  $0.1 \text{ V/s}$  时所显示的那对峰形不完全对称的氧化还原峰出现在  $0.323 \text{ V}$  和  $0.08 \text{ V}$  处.其峰间距  $E$  为  $0.243 \text{ V}$ ,且随扫速的增加而增加,若将峰-峰电位之半近似作为该反应氧化还原式电位  $E_{1/2}$ ,得  $E_{1/2}$  为  $0.202 \text{ V}$ .由上可知,酶在修饰电极上的电子转移行为相对较慢,故呈现出电化学的不可逆性.进一步的实验表明,该还原峰电流在  $20 \text{ mV s}^{-1} \sim 500 \text{ mV s}^{-1}$  范围内与扫速的一次方成正比,因而在 Au/AET 电极上 NR 的电化学反应过程当属表面电化学控制的过程.

在相同的实验条件下,Au/AET/NR/lipid 电极的氧化还原峰出现在  $0.255 \text{ V}$  和  $0.044 \text{ V}$  (图 1c), $E_{1/2}$  为  $0.149 \text{ V}$ , $E$  为  $0.211 \text{ V}$ ,与 Au/AET/NR 酶电极相比,用卵磷脂固定 NR 所表现出的式电位比无卵磷脂固定的负移了  $0.053 \text{ V}$ ,峰间距减少  $0.032 \text{ V}$ ,可见卵磷脂的引入使得 NR 与金电极之间的电子交换更易于进行,加速了电子的转移. Au/AET/NR/lipid 酶电极的还原峰电流在  $20 \text{ mV s}^{-1} \sim 500 \text{ mV s}^{-1}$  范围内却与扫速的  $1/2$  次方成正比,亦即该电极上 NR 的电化学行为是受扩散过程控制的,这可能是由于卵磷脂的引入增加了膜的厚度,产生了表面扩散所致.

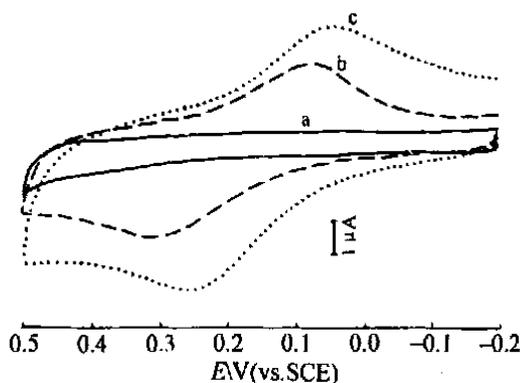


图 1 酶修饰电极在磷酸(pH 7)缓冲溶液中的循环伏安曲线

Fig. 1 Cyclic voltammograms of enzyme electrodes in phosphate buffer solution (pH 7). Scan rate  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , a) Au/AET, b) Au/AET/NR, c) Au/AET/NR/lipid

## 2.2 酶电极在磷酸缓冲液中的稳定性

鉴于实验中采用了半胱胺盐酸盐,使得金上自组装膜烷基链的末端出现带正电荷的  $\text{NH}_3^+$  基团.于是,当缓冲液的 pH 值大于酶的等电点时,膜与酶之间就可能通过静电作用而结合.因为在生命体内,生物细胞膜的基本结构单位是一种表面活性剂-由类脂分子形成的双分子层,具有典型的双亲结构,即既有疏水有碳氢长链,又有亲水的极性基团,蛋白质和酶等可吸附于双层表面或嵌入其内部.为此我们于半胱胺膜上再组装卵磷脂,其意即在改善酶的稳定性和活性(见图2).

实验发现,浸泡在缓冲液中的酶电极,其氧化还原峰电流会随浸泡时间而增加,但增加的程度不成线性,而且氧化峰和还原峰电流也不是同步增加的.大致而言,经1周左右浸泡,即可达到稳定,2周后峰电流明显下降,直至消失.同时峰电位不十分稳定,约有几十毫伏的正负偏移.这可能是由于修饰电极中的酶在浸泡过程中发生了酶分子的重组,分子密度增加,构型转变所致<sup>[4]</sup>.此外酶在修饰电极中并不能很稳定地存在,会因实验的进行而发生膜脱落或失去活性,导致峰电流下降.相比而言,涂布了卵磷脂的酶电极能在较短的时间里达到电流稳定,并且在酶取量相同的情况下,可获得较大的电流.

## 2.3 pH 值对酶电极电化学行为的影响

实验表明,酶电极活性受缓冲溶液 pH 值的影响很大.即如图3所示,在中性缓冲液(pH 7左右)中,酶电极能给出较稳定的氧化还原信号.在弱酸性溶液中(pH 6左右)中,酶电极的峰电流明显下降.而在弱碱性溶液中(pH 8左右),则无电信号.这可能是一方面由于酶在修饰电极上的电子传输受质子的影响,造成它在弱碱性环境下不产生电信号.另一方面则因为 NR 的生物活性以 pH 7.5 为佳<sup>[5]</sup>,所以固定在修饰电极上的 NR 于 pH 7 附近也表现出较好的电活性.

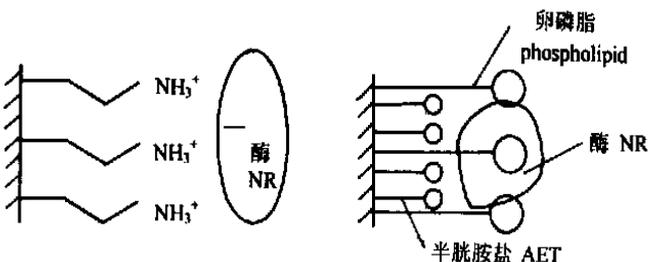


图2 Au/半胱胺/NR和Au/半胱胺/NR/卵磷脂体系模型示意

Fig. 2 Schematic illustration of the Au/AET/NR and Au/AET/NR/lipid systems

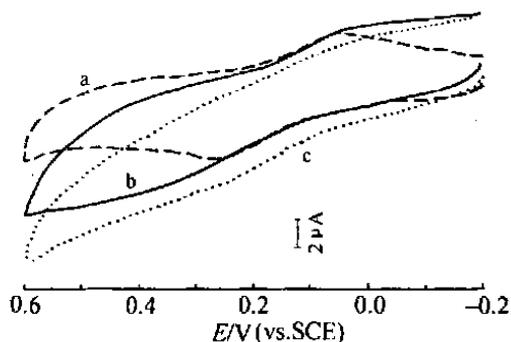


图3 溶液 pH 对酶电极的影响.

Fig. 3 The influence of Solution pH on the enzyme electrode. Scan rate  $100 \text{ mV s}^{-1}$  a) pH 7, b) pH 6, c) pH 8

## Electrochemical Properties of Nitrate Immobilized on Gold Electrodes with 2-aminoethanethiol SAMs

SONG Ya-ru<sup>1</sup>, WU Hong<sup>1</sup>, SHAO Hui-bo<sup>2\*</sup>

(1. Department of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

2. Department of Chemistry, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

**Abstract**: Nitrate reductase (NR) and phospholipids were immobilized on gold electrodes with 2-aminoethanethiol (AET) SAMs. After Au/AET/NR and Au/AET/NR/lipid were soaked in pH 7 phosphate buffers for days, a pair of pre-reversible peak appeared at around 0.202 V and 0.149 V, respectively, irregularly grew with soaking time in blank buffer. The cathodic peak current ( $i_{pc}$ ) of Au/AET/NR system had linear relationship with scan rate between 0.02 and 0.5 V·s<sup>-1</sup>, while  $i_{pc}$  was proportional to  $V^{1/2}$  in Au/AET/NR/lipid system. The direct electron transfer of enzyme electrodes was strongly affected by pH. Compared with Au/AET, NR exhibited a higher electrochemical activity in Au/AET/lipid system.

**Key words**: Nitrate reductase, Phospholipid, 2-aminoethanethiol SAMs

### References:

- [1] Gazier S A, Campbell E R, Campbell W H. Construction and characterization of nitrate reductase-based amperometric electrode and nitrate assay of fertilizers and drinking water[J]. Anal. Chem., 1998, 70:1 511 ~ 1 515.
- [2] Barber M J, Trimboli A J, et al. Direct electrochemistry of the flavin domain of assimilatory nitrate reductase: Effects of NAD<sup>+</sup> and NAD<sup>+</sup> analogs[J]. Arch. Biochem. Bioenergetics, 1997, 96:88 ~ 96.
- [3] Dong S J, Li J H. Self-assembled monolayers of thiols on gold electrodes for bioelectrochemistry and biosensors [J]. Arch. Biochem. Bioenergetics., 1997, 42:7 ~ 13.
- [4] Dong S J, et al. Chemically Modified Electrodes[M]. Beijing: Science Press, 1995.
- [5] Unden G, Schirawski J. The oxygen-responsive transcriptional regulator FNR of Escherichia coli: The search for signals and reactions[J]. Mol. Microbiol., 1997, 25:205 ~ 210.