

细胞色素 *c* 在单壁碳纳米管表面的固定、 直接电子转移及电催化

印亚静, 吕亚芬, 吴 萍, 杜 攀, 石彦茂, 蔡称心 *

(南京师范大学化学与环境科学学院, 分子医学生物技术江苏省重点实验室, 江苏 南京 210097)

摘要: 应用吸附法将细胞色素 *c* (Cyto *c*) 固定在单壁碳纳米管 (SWNT) 表面. 红外光谱 (IR) 显示被固定的 Cyto *c* 能保持原有的空间结构, 没有发生变性. 循环伏安测试表明, Cyto *c* 在 SWNT 表面能发生稳定的直接电子转移, 其 $i \sim E$ 曲线上出现一对良好的、几乎对称的氧化还原峰. 式量电位 E^0 基本不随扫速的增加而变化 (在 20 mV ~ 120 mV/s 的扫速范围内, E^0 平均值为 0.165 ± 0.001 V). 实验同时给出, 吸附在 SWNT 表面的 Cyto *c* 仍能保持其对 H_2O_2 电化学还原的生物电催化活性.

关键词: 碳纳米管; 修饰电极; 直接电化学; 细胞色素 *c*

中图分类号: O 646

文献标识码: A

氧化还原蛋白质和酶直接电子转移反应的研究对于开发新型生物电化学传感器^[1]及生物燃料电池^[2]等具有十分重要的意义, 因而引起了众多研究者的广泛关注^[3-13]. 细胞色素 *c* (Cyto *c*) 是一种水溶性的含血红素类氧化还原蛋白质, 存在于线粒体内外膜之间的细胞质中, 其生理功能是在 Cyto *c* 还原酶和 Cyto *c* 氧化酶之间传递电子, Cyto *c* 经常作为典型代表用于研究血红素类氧化还原蛋白质和酶的结构以及热力学、动力学和直接电子转移反应, 并以此揭示生物活细胞膜内外的电荷传递机理. Cyto *c* 在裸电极 (如 Au、Ag 和玻碳电极等) 表面的电子转移速率非常小, 往往表现不出可觉察的氧化还原峰. 为了能有效地实现 Cyto *c* 在电极表面的电子转移, 需在电极表面修饰一层或在溶液中加入能促进 Cyto *c* 直接电子转移的促进剂或采用新型的电极材料用于固定和促进其电子转移^[14-18].

碳纳米管 (CNT) 因其独特的几何尺寸、优良电子传导特性以及在生物传感和催化方面表现出

优良的性质等而受到广泛关注. 至今, 已被用于催化多巴胺、抗坏血酸、NAD(P)H、 H_2O_2 等多种重要生物小分子的氧化 (或还原) 反应和促进辣根过氧化物酶 (HRP)、血红蛋白 (Hb)、葡萄糖氧化酶 (GOx)、铁硫蛋白 (Fd) 等重要生物大分子的直接电子转移反应^[6, 19-29]. 本文报道 Cyto *c* 在单壁碳纳米管 (SWNT) 表面的吸附固定及直接电子转移反应. 红外光谱 (IR) 分析表明, 固定在 SWNT 表面的 Cyto *c* 能保持原有的空间结构, 没有发生变性; 循环伏安测试显示, Cyto *c* 在 SWNT 表面能进行稳定的直接电子转移并保持对 H_2O_2 电化学还原的生物电催化活性.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

马心细胞色素 *c* (Cyto *c*, type VI, Sigma) 未经进一步纯化直接使用. 单壁碳纳米管 (SWNT, 直径小于 2 nm, 长度为 5 ~ 500 μ m, 纯度 > 90%, 深

收稿日期: 2006-01-15, 修订日期: 2006-03-23 *通讯作者, Tel: (86-25) 83598031, E-mail: cxcai@njnu.edu.cn, caichenxin@njnu.edu.cn

国家自然科学基金 (20373027)、教育部留学回国人员启动基金 (211090BH31)、江苏省自然科学基金 (BK2005138)、分子医学生物技术江苏省重点实验室基金 (MMBK05001)、江苏省高校自然科学基金 (03KJA150055)、江苏省教育厅研究生创新基金、江苏省南京市人事局回国人员择优项目 (211090B531) 资助

圳纳米港有限公司)使用前经以下纯化处理:在 3 mol/L HNO_3 溶液中回流 3 h,经微孔膜(直径 0.22 μm , Anpel)过滤,二次蒸馏水冲洗,60 $^\circ\text{C}$ 下真空干燥得到纯化的 SWNT。IR 测试表明经纯化处理后的 SWNT 表面带有 $-\text{OH}$ 和 $-\text{COOH}$ 等含氧功能团(见结果与讨论部分)。其他试剂均为分析纯;溶液均用二次蒸馏水配制。0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS)由 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 按不同比例配制而成。5 mmol/L 的 H_2O_2 由 30% 的 H_2O_2 溶液用 0.1 mol/L PBS 稀释得到。

SWNT 在 GC 电极表面的 SEM 形貌用 LEO 1530VP(LEO, 德国)场发射扫描电子显微镜观察,红外光谱实验使用 NEXUS 670 FT-IR 分光光度计(美国),分辨率 4 cm^{-1} , KBr 压片。全部电化学实验均使用 CHI 600 电化学工作站(上海辰华),三电极系统。以螺旋状铂丝作辅助电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,室温下(22 ± 2)实验。实验前,溶液先经高纯氮除氧至少 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 SWNT/GC 电极制备及 Cyto *c* 的固定

将玻碳(GC, 直径为 3 mm)电极依次用 6 号砂纸、0.3 和 0.05 μm Al_2O_3 抛光至镜面,再用无水乙醇和二次蒸馏水各超声清洗 1 min。将 1 mg SWNT 超声分散在 2 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中,形成 0.5 mg/mL 的 SWNT 黑色悬浊液。用微量加样器取 2 μL SWNT 悬浊液滴加到 GC 电极表面;室温下待溶剂挥发后,即得 SWNT/GC 电极。

将制备好的 SWNT/GC 电极浸入含 5 mg/mL Cyto *c* 的 0.1 mol/L PBS(pH 7),于 4 $^\circ\text{C}$ 下放置 12 h,取出吸附有 Cyto *c* 的 SWNT/GC 电极,用二次蒸馏水充分冲洗,洗掉吸附不牢固的 Cyto *c* 分子,即得到 Cyto *c*-SWNT/GC。若不立即使用,可在 4 $^\circ\text{C}$ 下予以保存。

2 结果与讨论

图 1 显示, SWNT 在 GC 电极表面呈现相互缠绕的状态并形成了 SWNT 束。图 2 为 SWNT 的 IR 谱线。如图,谱线 a 显示 SWNT 表面含有羧基(1720 cm^{-1})、羧酸根基团(1570 cm^{-1})和 C—OH 键(1177 cm^{-1})等含氧功能基团。曲线 b 是纯 Cyto *c* 的 IR 谱线。一般情况下,蛋白质(或酶)肽链上的肽键($-\text{CO}-\text{NH}-$)有多个红外吸收,但最重

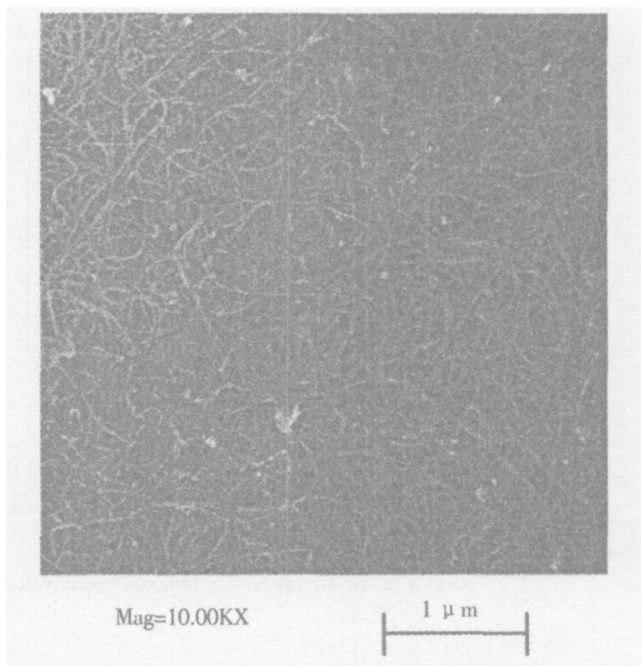


图 1 SWNT 在 GC 电极表面的 SEM 形貌

Fig 1 SEM image of SWNT on the surface of glassy carbon electrode

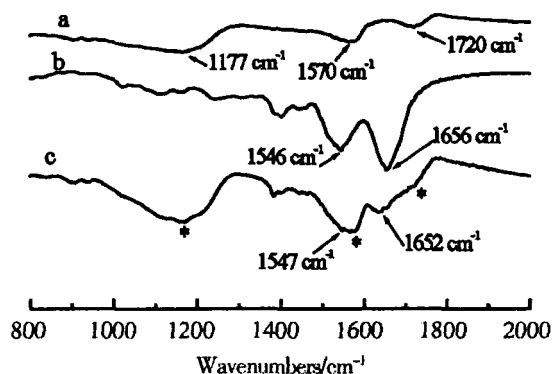


图 2 SWNT (a)、Cyto *c* (b) 及 Cyto *c*-SWNT (c) 的 IR 谱线

Fig 2 IR spectra of the SWNT (a), free Cyto *c* (b) and Cyto *c*-SWNT (c)

要的两个特征红外吸收是酰胺 I 峰(amide I, $1700 \sim 1600\text{ cm}^{-1}$, 肽链上 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动峰)和酰胺 II 峰(amide II, $1620 - 1500\text{ cm}^{-1}$, 由肽链上 C—N 的伸缩振动和 N—H 的面内弯曲振动相互耦合后产生的)^[30-31]。根据这两个特征峰的位置可判断蛋白质(或酶)的二级结构是否发生变化或变性。图 2c 显示,当 Cyto *c* 固定在 SWNT 表面后,除了 SWNT 本身的红外吸收(谱线带 * 的峰)外,还出现

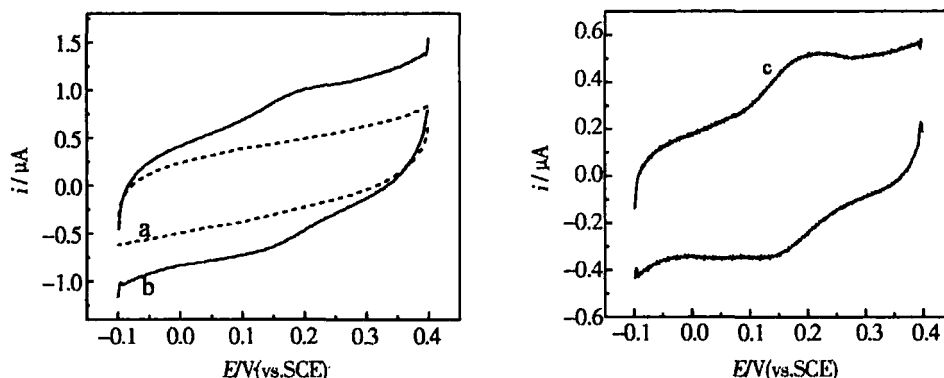


图 3 SWNT/GC (a) 和 Cyto c-SWNT/GC (b) 电极在 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 中的循环伏安曲线

Fig 3 Cyclic voltammograms of the SWNT/GC (a) and the Cyto c-SWNT/GC (b) electrode in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) at a scan rate of 60 mV/s

curve c is the background-subtracted cyclic voltammogram using the data presented in curve a and b

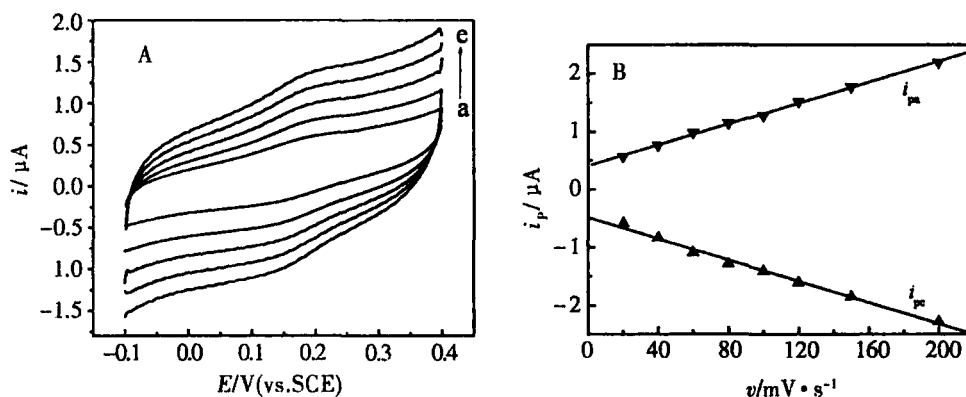


图 4 Cyto c-SWNT/GC 电极于不同扫速下的循环伏安曲线

Fig 4 Cyclic voltammograms of the Cyto c-SWNT/GC electrode in 0.1 mol/L PBS (pH 7) at different scan rate (A) and the dependence of peak currents on the scan rates (B)

scan rate/ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$: a) 20, b) 40, c) 60, d) 80 and e) 100

了 Cyto c 的吸收峰 (原信号放大 3 倍), 其酰胺 I 峰和酰胺 II 峰分别处在 1652 cm^{-1} 和 1547 cm^{-1} , 对照自由状态的 Cyto c 谱线 (见 b, 其酰胺 I 峰和酰胺 II 峰各为 1656 cm^{-1} 和 1546 cm^{-1}), 两者对应的吸收峰几乎一致, 此说明固定在 SWNT 表面的 Cyto c, 其二级结构没有改变^[30,31], 否则, 酰胺 I 和酰胺 II 峰会发生很大的位移, 而且峰形发生严重变形^[30,31].

图 3 示出 SWNT/GC 电极和 Cyto c-SWNT/GC 电极在 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 中的循环伏安扫描曲线. 如图, 于实验的扫描电位区间内, 前者不出现任何可观察到的电化学反应; 而 Cyto c-SWNT/GC 电极则显示一对氧化还原峰 (b, c, c 是

扣除空白后的 $i \sim E$ 曲线, 其峰形更加明显), 充分说明固定在 SWNT 表面的 Cyto c 能发生直接电子转移反应. 在 60 mV/s 扫速下, 该氧化/还原峰电位分别为 $E_{pa} = 0.191\text{ V}$, $E_{pc} = 0.139\text{ V}$, 式量电位 $E^0 = 0.165\text{ V}$, 峰电位差 $E_p = 52\text{ mV}$. 这里的 E^0 值与直接将 Cyto c 溶于溶液中的测定值很接近^[14-16], 但与固定在多壁碳纳米管 (MWNT) 上的 Cyto c 式量电位 (-0.3 V) 相比^[32], 发生了很大的正移, 这可能是由于两者之固定方法不同, 或者是固定在 MWNT 表面的 Cyto c 发生了变性, 相关实验表明 (结果未示出), 血红素在碳管表面发生电化学反应的式量电位 E^0 为 $3/0.41\text{ V}$, 因而推测由此而产生的氧化还原峰很可能是血红素发生电化

学反应引起的。

实验表明, Cyto *c* 直接电子转移的氧化/还原峰电流比, 即 i_{pa}/i_{pc} (1), 几乎与扫速无关 (图 4A), 并且 i_p 随扫速 v 变化呈线性关系 (图 4B)。还有峰电位几乎不随扫速的增加而移动, 从而 E^0 也不因扫速的增加而发生变化 (在 20 ~ 120 mV/s 的扫速范围内, 其平均值为 $E^0 = 0.165 \pm 0.001$ V)。

固定在 SWNT 表面的 Cyto *c* 是否也和含血红素类蛋白质 (酶), 如辣根过氧化物酶、血红蛋白等的一样, 都对 H_2O_2 的还原具有明显的电催化活性? 图 5 给出 Cyto *c*-SWNT/GC 电极在含有 5 mmol/L H_2O_2 的 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 中的循环伏安曲线。由图可见, 曲线 a 出现了很大的 H_2O_2 电化学还原电流, 而对 SWNT/GC 电极, 则不论在含 (b) 或不含 (c) H_2O_2 的 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 中, 其伏安曲线均无明显响应。由此可见, 固定在 SWNT 表面的 Cyto *c* 依然保持其生物活性, 对 H_2O_2 的电化学还原仍具有生物电催化作用。

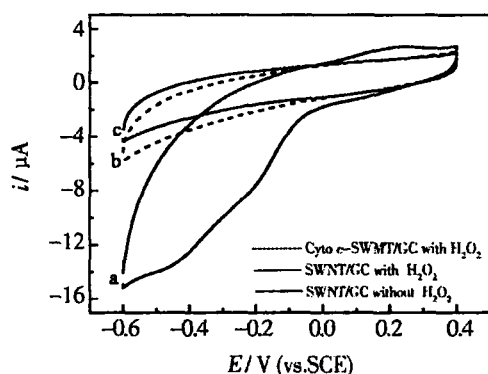


图 5 Cyto *c*-SWNT/GC 电极在含 5 mmol/L H_2O_2 的 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 循环伏安曲线 (a) 和 SWNT/GC 电极在含 (b) 与不含 (c) H_2O_2 的 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 的循环伏安曲线

Fig 5 Cyclic voltammograms of the Cyto *c*-SWNT/GC electrode in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) with 5 mmol/L H_2O_2 (a) and the SWNT/GC electrode in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) with (b) or without (c) H_2O_2 scan rate: 20 mV/s

3 结 论

1) 固定在 SWNT 表面的 Cyto *c* 能发生有效和稳定的直接电子转移, 其循环伏安曲线上显示一对几乎对称的氧化还原峰; 式量电位 E^0 基本不随扫

速的增加而变化。

2) Cyto *c*-SWNT 电极仍能保持其对 H_2O_2 电化学还原的生物电催化活性。

参考文献 (References):

- [1] Yu J H, Liu S Q, Ju H X. Mediator-free phenol sensor based on titania sol-gel encapsulation matrix for immobilization of tyrosinase by a vapor deposition method [J]. *Biosens Bioelectron*, 2003, 19: 509 ~ 514.
- [2] Barton S C, Gallaway J, Atanassov P. Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices [J]. *Chem. Rev*, 2004, 104: 4867 ~ 4886.
- [3] Cai Chen-xin (蔡称心), Chen Jing (陈静), Lu Tian-hong (陆天虹). Direct electron transfer of glucose oxidase at carbon nanotube modified electrode [J]. *Sci in China (Ser B)*, 2003, 33: 511 ~ 518.
- [4] Sun Dongmei (孙冬梅), Cai Chen-xin (蔡称心), Xing Wei (邢巍), et al. Immobilization and direct electrochemistry of Cu-contained oxidase on the surface of active carbon powder [J]. *Chinese Sci Bull*, 2004, 17: 1722 ~ 1724.
- [5] Hess C R, Juda G A, Dooley D M, et al. Gold electrodes wired for coupling with the deeply buried active site of *Arthrobacter globiformis* amine oxidase [J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2003, 125: 7156 ~ 7157.
- [6] Cai C X, Chen J. Direct electron transfer and biocatalysis of hemoglobin at a carbon nanotube electrode [J]. *Anal Biochem*, 2004, 325: 285 ~ 292.
- [7] 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.
- [8] Dong Shao-jun (董绍俊), Che Guang-li (车广礼), Xie Yuan-wu (谢远武). *Chemically Modified Electrode* [M]. 2nd Beijing: Science Press, 2003, 456 ~ 570.
- [9] Vincent K A, Armstrong F A. Investigating metalloenzyme reaction using electrochemical sweeps and steps: Fine control and measurements with reactants ranging from ions to gases [J]. *Inorg Chem*, 2005, 44: 798 ~ 809.
- [10] Leger C, Elliott S J, Hoke K R, et al. Enzyme electrokinetics: using protein film voltammetry to investigate redox enzyme and their mechanism [J]. *Biochem*, 2003, 42: 8653 ~ 8662.

- [11] Shumyantseva V V, Ivanov Y D, Bistolas N, et al Direct electron transfer of cytochrome P450 2B4 at electrodes modified with nonionic detergent and colloidal clay nanoparticles [J]. *Anal Chem.*, 2004, 76: 6046 ~ 6052
- [12] Fantuzzi A, Fairhead M, Gilard G Direct electrochemistry of immobilized human cytochrome P450 2E1 [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126: 5040 ~ 5041.
- [13] Cai Chen-xin (蔡称心), Chen Jing (陈静). Direct electron transfer of redox proteins and enzymes promoted by carbon nanotube [J]. *Electrochemistry (in Chinese)*, 2004, 10(2): 159 ~ 167.
- [14] Cai C X The direct electrochemistry of cytochrome *c* at a gold microband electrode modified with 4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine [J]. *J. Electroanal Chem.*, 1995, 393: 119 ~ 122
- [15] Wang J X, Li M X, Shi Z J, et al Direct electrochemistry of cytochrome *c* at a glassy electrode modified with single-wall carbon nanotubes [J]. *Anal Chem.*, 2002, 74: 1933 ~ 1997.
- [16] Cheng F L, Du S, Jin B K Electrochemical studies of cytochrome *c* on electrodes modified by single-wall carbon nanotubes [J]. *Chin. J. Chem.*, 2003, 21: 436 ~ 441.
- [17] Lojou É, Bianco P. Membrane electrodes can modulate the electrochemical response of redox proteins-direct electrochemistry of cytochrome *c* [J]. *J. Electroanal Chem.*, 2000, 485: 71 ~ 80
- [18] Lojou É, Giudici-Orticoni M T, Bianco P. Direct electrochemistry and enzymatic activity of bacterial polymeric cytochrome *c*₃ incorporated in clay films [J]. *J. Electroanal Chem.*, 2005, 579: 199 ~ 213.
- [19] Wang J, Musameh M, Lin Y H. Solubilization of carbon nanotubes by nafion toward the preparation of amperometric biosensors [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 2408 ~ 2409.
- [20] Chen J, Bao J, Cai C X, et al Electrocatalytic oxidation of NADH at an ordered carbon nanotubes modified glassy carbon electrode [J]. *Anal Chim. Acta*, 2004, 516: 29 ~ 34.
- [21] Chen J, Cai C X Direct electrochemical oxidation of NADPH at a low potential on the carbon nanotube modified glassy carbon electrode [J]. *Chin. J. Chem.*, 2004, 22: 167 ~ 171.
- [22] Musameh M, Wang J, Merkoci A, et al Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes [J]. *Electrochem. Commun.*, 2002, 4: 743 ~ 746
- [23] Britto P J, Santhanam K S V, Ajayan P M. Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine [J]. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1996, 41: 121 ~ 125.
- [24] Chen J, Bao J, Cai C X Fabrication, characterization and electro catalysis of an ordered carbon nanotube electrode [J]. *Chin. J. Chem.*, 2003, 21: 665 ~ 669.
- [25] Wang M, Shen Y, Liu Y, et al Direct electrochemistry of microperoxidase 11 using carbon nanotube modified electrodes [J]. *J. Electroanal Chem.*, 2005, 578: 121 ~ 127.
- [26] Yan Y, Zheng W, Zhang M, et al Bioelectrochemistry functional nanohybrids through co-assembling of proteins and surfactants onto carbon nanotubes: facilitated electron transfer of assembled proteins with enhanced faradic response [J]. *Langmuir*, 2005, 21: 6560 ~ 6566
- [27] Cai Chen-xin (蔡称心), Chen Jing (陈静). Direct electrochemistry of horseradish peroxidase at a carbon-nanotube electrode [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2004, 62: 335 ~ 340
- [28] Patolsky F, Weizmann Y, Willner I Long-range electrical contacting of redox enzymes by SWCNT connectors [J]. *Angew. Chem. Int Ed.*, 2004, 43: 2113 ~ 2117.
- [29] Cai Chen-xin (蔡称心), Chen Jing (陈静), Bao Jian-chun (包建春), et al Applications of carbon nanotubes in analytical chemistry [J]. *Chinese J. Anal Chem.*, 2004, 32: 381 ~ 387.
- [30] 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.
- [31] Li Y M, Liu H H, Pang D W. Direct electrochemistry and catalysis of heme-proteins entrapped in methyl cellulose films [J]. *J. Electroanal Chem.*, 2004, 574: 23 ~ 31.
- [32] Zhao G C, Yin Z Z, Zhang L, et al Direct electrochemistry of cytochrome *c* on a multi-walled carbon nanotubes modified electrode and its electrocatalytic activity for the reduction of H₂O₂ [J]. *Electrochem. Commun.*, 2005, 7: 256 ~ 260

Immobilization of Cytochrome *c* on the Surface of Single-wall Carbon Nanotube and Its Direct Electron Transfer and Electrocatalysis

YN Ya-jing, LV Ya-fen, WU Ping, DU Pan, SHI Yan-mao, CAI Chen-xin*

(Department of Chemistry, Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology,
Nanjing Normal University, Nanjing 210097, Jiangsu, China)

Abstract: Cytochrome *c* (Cyto *c*) was immobilized on the surface of the single-wall carbon nanotube (SWNT) by using the method of adsorption. Infrared spectroscopy indicated that the Cyto *c* remained in its original structure and did not undergo structural change after its immobilization on the SWNT. The direct electrochemistry of cyto *c*, which was adsorbed on the surface of the SWNT, was studied by cyclic voltammetry. The voltammetric results demonstrated that the SWNT had promoting effects on the direct electron transfer of Cyto *c* and also indicated that the immobilized Cyto *c* retained its bioelectrocatalytic activity to the reduction of H₂O₂. This modified electrode might be used in development of new biosensors and the biofuel cells.

Key words: Carbon nanotube, Chemically modified electrode, Direct electrochemistry, Cytochrome *c*