

辣根过氧化物酶在 MnO_2 纳米片薄膜中的 直接电化学与电催化行为

肖寒 吴金玲 陈旭 杨文胜*

(北京化工大学理学院, 化工资源有效利用国家重点实验室, 北京 100029. * 联系人, E-mail: yangws@mail.buct.edu.cn)

摘要 采用新型纳米材料 MnO_2 纳米片作为固定辣根过氧化物酶(HRP)的载体, 制备了 HRP/ MnO_2 纳米片修饰的玻碳电极(GCE). 在 MnO_2 纳米片薄膜中, HRP 能够实现有效的直接电子转移, 在 pH 6.5 的磷酸缓冲溶液中, 修饰电极的循环伏安曲线上显示出一对可逆的氧化还原峰, 式量电位为 -0.315 V (vs. Ag/AgCl). HRP 在 MnO_2 纳米片/GCE 表面的电子转移速率常数为 6.86 s^{-1} . HRP/ MnO_2 纳米片/GCE 的式量电位(mV)在 pH 4.0~8.0 范围内与溶液 pH 值成线性关系, 其斜率为 $-53.75 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$, 表明电极反应在发生一个电子转移的同时还伴随一个质子的转移. 修饰后的电极对 H_2O_2 有良好响应, 响应时间小于 3 s, 在信噪比为 3 时, 最低检出限为 $0.21 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

关键词 辣根过氧化物酶(HRP) MnO_2 纳米片 直接电化学 H_2O_2

近年来, 氧化还原蛋白质的直接电子转移反应引起了越来越多研究者的兴趣^[1-4], 这一研究具有重要的理论价值和广阔的应用前景. 研究氧化还原蛋白质的直接电子转移反应, 不仅对于探索生命体内的生理作用机理等理论研究具有重要意义, 而且为制备基于氧化还原蛋白质直接电化学行为的第三代生物传感器、开发生物燃料电池和生物芯片奠定了技术基础. 辣根过氧化物酶(HRP)是最常被用来研究和讨论的一种氧化还原酶, 它的电活性中心是血红素基团, 基于 HRP 的生物电化学传感器在 H_2O_2 、葡萄糖、酚类化合物和胺类化合物等物质的测定中发挥着很重要的作用. 然而, HRP 在电极表面的取向往往不利于其电活性基团与电极表面之间的电子传递; 而且 HRP 的电活性中心通常被深埋在其多肽链的内部, 不易暴露, 难于接近电极表面, 因此实现 HRP 与电极之间的直接电子转移通常比较困难^[5]. 为了实现其在电极表面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非常重要.

纳米材料所具有的独特物理化学性质为生物电化学的研究提供了一条崭新的途径. Xu 等人^[4]将 HRP 固定在纳米 Au 薄膜中, 实现了 HRP 的直接电化学. Liu 等人^[6]通过对肌红蛋白在钛酸盐纳米管与 TiO_2 纳米粒子薄膜中的电化学行为比较, 发现与传统的纳米粒子薄膜相比, 用新型的纳米管薄膜固定蛋白质

对提高生物传感器的性能指标发挥了重要的作用. Lvov 等人^[7]在 MnO_2 纳米粒子、PDDA 与肌红蛋白层组装形成的多层膜中, 得到了肌红蛋白可逆的氧化还原信号. 此外, MnO_2 纳米粒子还可以用于抗坏血酸^[8]与乳酸^[9]传感器的构筑. 作为一种新型的纳米材料, MnO_2 纳米片具有 1 纳米至几纳米的厚度和亚微米-微米级别的横向尺寸, 因此 MnO_2 纳米片有多种不同于传统纳米粒子的优异的物理化学性能, 如高各向异性、层板带负电荷、胶体形态及聚电解质性质等, 被广泛用于光化学电致变色等领域中^[10], 但是尚未见到将其应用于生物物质的固定方面的报道. 本文报道将 MnO_2 纳米片材料用于固定 HRP, 实现了 HRP 有效稳定的直接电子转移, 考察了 HRP/ MnO_2 纳米片/GCE 对 H_2O_2 的电催化行为.

1 实验

() 试剂. 辣根过氧化物酶(HRP, EC1.11.1.7, $250 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$)购自于上海丽珠东风生物技术公司, 聚乙烯醇缩丁醛(PVB)购自于 Sigma 公司, 实验中所采用试剂均为分析纯. $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同 pH 值的磷酸缓冲溶液(PBS)用 Na_2HPO_4 与 NaH_2PO_4 溶液按一定比例配制, 实验用水为二次蒸馏水.

层状 MnO_2 与 MnO_2 纳米片溶胶根据文献^[11]方法制备, 将层状 MnO_2 分散在四甲基氢氧化铵的水溶液

中,于室温下搅拌7 d.将混合液离心($5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)分离,上层离心液即为 MnO_2 纳米片溶胶,调整浓度为 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 备用.

() 电极的制备. 玻碳电极(直径3 mm)分别用1.0, 0.3, 0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光,在二次蒸馏水中超声清洗1 min后,用氮气吹干.将等体积的 MnO_2 纳米片溶胶与浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的HRP溶液(二次水配制)充分混合均匀,然后用微量加样器将 $10 \mu\text{L}$ 的上述混合物滴加在玻碳电极表面,4 $^\circ\text{C}$ 干燥后,将电极在2% (W/V) PVB乙醇溶液中浸泡1 min,干燥后用二次水冲洗,即得实验所用HRP/ MnO_2 纳米片/GCE.电极不用时,在4 $^\circ\text{C}$ 空气中保存.

() 测试仪器及方法. XRD测试采用日本岛津6000型X射线衍射仪.根据文献方法^[11],将 MnO_2 纳米片溶胶高速离心($10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)后所得到的 MnO_2 纳米片沉淀直接进行XRD测试,所得谱图即为湿态 MnO_2 纳米片的XRD谱图.

电化学测试在CHI660B电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)上进行.所有电化学实验均采用三电极体系,以修饰玻碳电极为工作电极,铂丝作为辅助电极,Ag/AgCl ($3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl)电极为参比电极,在进行电化学实验前,溶液用高纯氮气除氧至少30 min.所有电化学实验均在室温(20 ± 2) $^\circ\text{C}$ 下进行.

2 结果与讨论

2.1 XRD 分析

从图1可以看到,剥离后层状 MnO_2 原有的有序结构被打乱,湿态 MnO_2 纳米片为无定型结构(图1曲线a),室温下干燥后 MnO_2 纳米片会发生有序重组,

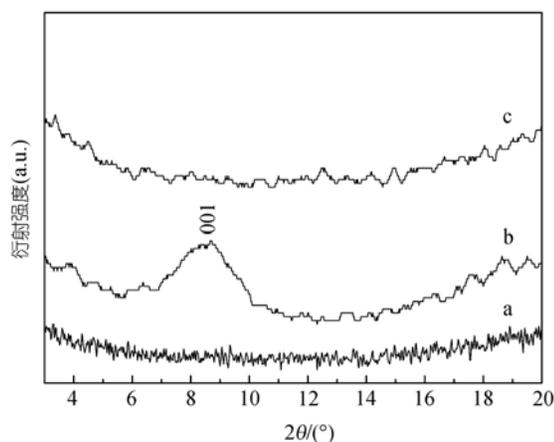


图1 湿态下 MnO_2 纳米片(a)、干态下 MnO_2 纳米片(b)及干态下HRP/ MnO_2 纳米片(c)的XRD谱图

其XRD谱图(图1曲线b)在 9° 出现了 MnO_2 层状结构的特征衍射峰(d 值为 0.96 nm).然而,如图1曲线c所示,将 MnO_2 纳米片与HRP混合并在4 $^\circ\text{C}$ 下干燥后, MnO_2 纳米片仍然保持了原来的无定型结构,其主要原因可能为HRP分子尺寸比较大($6.0 \text{ nm} \times 3.5 \text{ nm} \times 3.0 \text{ nm}$),其等电点为8.9,在二次水中带有正电荷,与带负电的 MnO_2 纳米片胶体粒子形成静电吸附,导致 MnO_2 纳米片层板不能重新堆积为层状 MnO_2 ,形成了无序排列的结构,其示意图如图2所示. MnO_2 纳米片层板表面存在一层水分子^[11],能为HRP提供良好的微水环境,利于保持其活性.

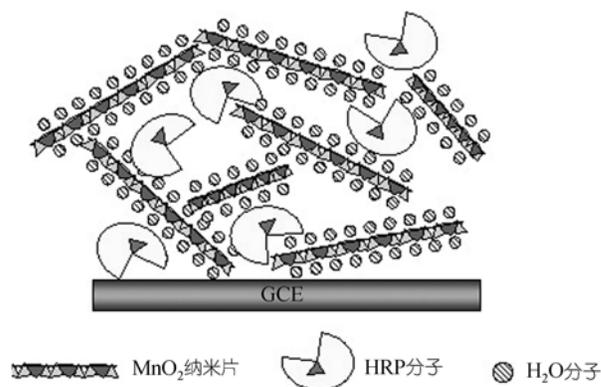


图2 MnO_2 纳米片溶胶与HRP混和示意图

2.2 HRP 的直接电化学

在pH 6.5的PBS中考察了 MnO_2 纳米片/GCE, HRP/GCE, HRP/ MnO_2 纳米片/GCE的循环伏安行为.如图3曲线a和b所示, MnO_2 纳米片/GCE与HRP/GCE在实验电位扫描范围内没有明显的电化学反应发生,而HRP/ MnO_2 纳米片/GCE的循环伏安图中出现了一对几乎对称的氧化还原峰(图3曲线c),氧化还原峰电位分别为 $E_{\text{pa}} = -0.29 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl), $E_{\text{pc}} = -0.34 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl),氧化还原峰电流基本相同,说明固定在 MnO_2 纳米片中的HRP能进行准可逆的直接电化学反应,其式量电位 $E^{0'} = -0.315 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl).

图4为HRP/ MnO_2 纳米片/GCE在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS中不同扫描速率下的循环伏安曲线.从图中可以看出,HRP直接电子转移反应的氧化峰电流与还原峰电流几乎相等,即 $i_{\text{pc}}/i_{\text{pa}} = 1$,并且氧化还原峰电流与扫描速率之间呈线性关系,说明整个电极反应是受表面过程控制的.随着扫描速度的增加,其氧化峰电位 E_{pa} 向正方向移动,还原峰电位 E_{pc} 负移,峰电位差

增加, 但均小于 200 mV, 而且式量电位 E^0 几乎不随扫描速度的增加而发生变化. 根据扫描速度与峰电位差的关系, 由Laviron模型 [12]得到HRP与电极之间的电子转移速率常数 k_s 为 6.86 s^{-1} , 该值略高于将HRP固定在碳纳米管膜中 [13]的电子转移速率常数 k_s 值(2.07 ± 0.56) s^{-1} , 说明 MnO_2 纳米片能有效而快速地促进HRP的直接电子转移.

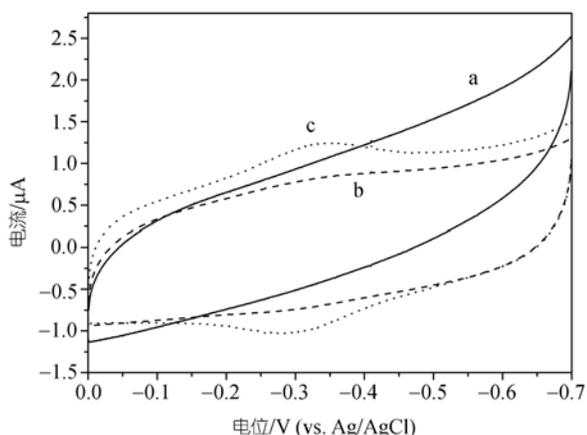


图 3 MnO_2 纳米片/GCE (a), HRP/GCE (b)和 HRP/ MnO_2 纳米片/GCE (c)的循环伏安曲线
0.1 mol·L⁻¹ pH 6.5 的 PBS, 扫描速度为 100 mV·s⁻¹

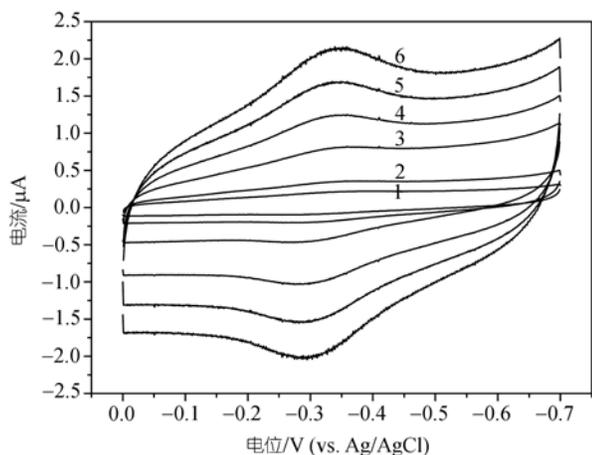


图 4 HRP/ MnO_2 纳米片/GCE 在不同扫描速度下的循环伏安曲线
0.1 mol·L⁻¹ pH 6.5 的 PBS, 曲线 1~6 扫描速度分别为 10, 20, 50, 100, 150, 200 mV·s⁻¹

2.3 pH 值对 HRP 直接电化学行为的影响

使用不同 pH 值(pH 4~8)的 PBS 测试时, HRP/ MnO_2 纳米片/GCE 的氧化还原峰电位差几乎不变, 但氧化还原峰电位发生负移, 这种变化是可逆的, 即在

重复调节到同一 pH 值时, 其循环伏安曲线能够复原. HRP 的式量电位 E^0 随着 pH 值的变化而线性变化, 斜率为 $-53.75 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$, 该数值与伴随有一个质子转移的单电子可逆电极反应的理论值 $-58 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$ (20) [14]基本一致, 这说明 HRP 在 MnO_2 纳米片/GCE 上的电化学氧化还原过程是伴随有一个质子转移的单电子过程.

2.4 HRP 对 H_2O_2 的电催化行为

图 5 为 HRP/ MnO_2 纳米片/GCE 在含有不同浓度 H_2O_2 的 PBS 中的循环伏安曲线. 从图中可以看出, HRP 对 H_2O_2 有明显的电催化还原作用, 随着 H_2O_2 浓度的增大, 在催化还原峰电流增大的同时, 氧化峰电流减少甚至消失. 作为对照, MnO_2 纳米片/GCE 对 H_2O_2 催化作用的循环伏安曲线如图 6 所示, H_2O_2 在 MnO_2 纳米片/GCE 上的还原电位为 -0.75 V (vs. Ag/AgCl), 而图 5 显示 H_2O_2 在 HRP/ MnO_2 纳米片/GCE 上的还原反应电位是 -0.25 V (vs. Ag/AgCl). 因此可认定图 5 中的电催化反应是在 HRP 的作用下进行的.

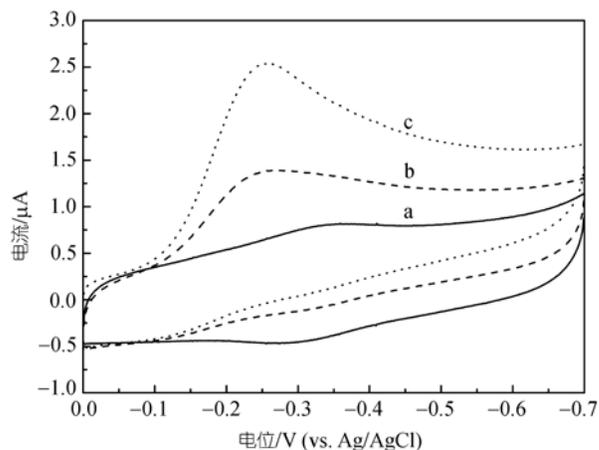


图 5 HRP/ MnO_2 纳米片/GCE 在含不同浓度 H_2O_2 的 PBS 中的循环伏安曲线
a, 0 mmol·L⁻¹; b, 0.02 mmol·L⁻¹; c, 0.05 mmol·L⁻¹ 0.1 mol·L⁻¹ pH 6.5 的 PBS, 扫描速度为 100 mV·s⁻¹

另外, 从图 5 中可以看到加入 H_2O_2 后, HRP 的还原峰电位稍有移动, 与文献 [15,16]报道的现象类似, 关于峰电位移动的具体原因及规律, 拟在下一步工作中深入研究.

图 7 描述了恒定电位为 -0.25 V (vs. Ag/AgCl)时, MnO_2 纳米片/GCE(图 7 曲线 a)与 HRP/ MnO_2 纳米片/GCE(图 7 曲线 b)对 H_2O_2 浓度变化的电流-时间响应情

况. 由图可以看出, MnO_2 纳米片/GCE对 H_2O_2 的响应十分微弱, 相对于HRP/ MnO_2 纳米片/GCE可以忽略. HRP/ MnO_2 纳米片/GCE对 H_2O_2 浓度变化的响应迅速, 每次加入 H_2O_2 后响应电流在3 s内达到最大. 电极在 H_2O_2 浓度为 $1\sim 430 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内有线性响应, 在信噪比为3时对 H_2O_2 的检测限为 $0.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 当浓度高于 $540 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 出现一个电流响应平台, 说明电极反应具有典型的Michaelis-Menten酶反应动力学特性. 通过Linweaver-Burk方程^[17]求表观米氏常数为 $0.127 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 较小的米氏常数值说明 MnO_2 纳米片固定的HRP对 H_2O_2 有较强的亲和力.

另外, 根据文献方法^[18]考察了硫化物对HRP的

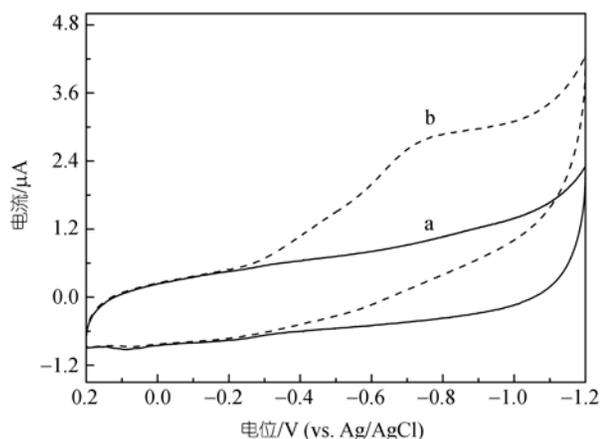


图6 MnO_2 纳米片/GCE 在含不同浓度 H_2O_2 的 PBS 中的循环伏安曲线

a, $0 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; b, $0.135 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. $0.1 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.5 的 PBS, 扫描速度为 $100 \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

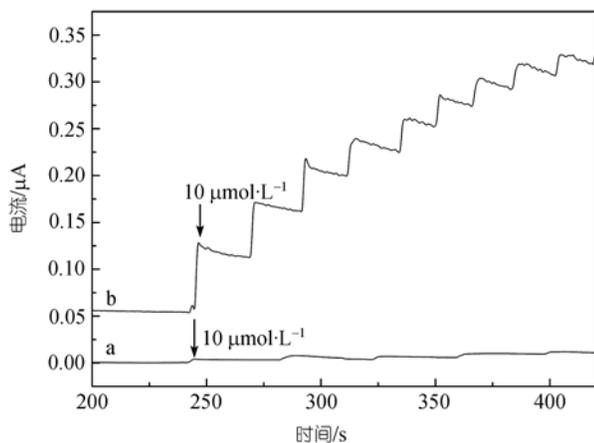


图7 MnO_2 纳米片/GCE (a)和 HRP/ MnO_2 纳米片/GCE (b) 对 H_2O_2 浓度变化的电流-时间响应曲线
 $0.1 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.5 的 PBS, 工作电位 -0.25V (vs. Ag/AgCl)

抑制作用, 从图8中可以看出, 加入 Na_2S 后, HRP/ MnO_2 纳米片/GCE 对 H_2O_2 的催化电流明显减小, 随着 Na_2S 浓度的增大电流持续下降, 说明 Na_2S 对 HRP 的催化活性有明显的抑制作用, 基于此原理用 HRP/ MnO_2 纳米片/GCE 可以检测污染物硫化物的浓度. 根据计时电流响应曲线可得出, 修饰电极对硫化物检测的线性范围为 $44\sim 134 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

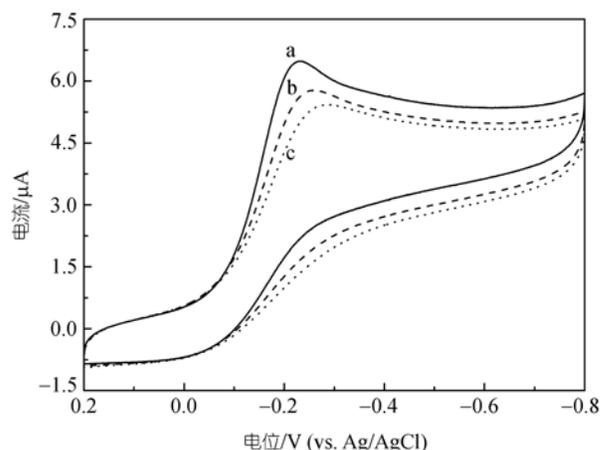


图8 硫化物对 HRP/ MnO_2 纳米片/GCE 抑制的循环伏安曲线

a, 未加入 Na_2S ; b, 加入 Na_2S $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; c, 加入 Na_2S $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. $0.1 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.5 的 PBS 含 H_2O_2 $0.5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 扫描速度为 $100 \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

2.5 修饰电极的稳定性和重现性

修饰电极干态保存在4℃下, 两周后对底物响应信号仍保持了90%. 用同一支 HRP/ MnO_2 纳米片/GCE 电极对 $0.01 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 进行5次测试, 得出标准偏差为1.8%, 测定同批制备的6支电极对 $0.01 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 的响应, 得出标准偏差为8.1%.

3 结论

本文报道了 HRP 在 MnO_2 纳米片/GCE 上的固定及直接电化学. 实验结果表明, HRP 在 MnO_2 纳米片/GCE 上能实现快速和有效的直接电子转移, 其直接电子转移的表观速率常数为 6.86s^{-1} . 进一步的实验结果显示, HRP 能够保持对 H_2O_2 电催化还原的生物活性, 而且能快速地对 H_2O_2 浓度的变化. 此外还考察了 HRP/ MnO_2 纳米片/GCE 在对硫化物检测中应用的可能性. 这些结果证明 MnO_2 纳米片是良好的生物物质固定材料. 本文所用固定 HRP 的方法简单且有效, 为其他纳米片材料在生物物质固定方面的研究提供了实验基础.

参 考 文 献

- 1 Armstrong F A, Hill H A O, Walton N J. Direct electrochemistry of redox proteins. *Acc Chem Res*, 1988, 21: 407—413 [DOI]
- 2 Zhang H, Lu H Y, Hu N F. Fabrication of electroactive layer-by-layer films of myoglobin with gold nanoparticles of different sizes. *J Phys Chem B*, 2006, 110(5): 2171—2179 [DOI]
- 3 Wu Y H, Shen Q C, Hua S S. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme- proteins in regenerated silk fibroin film. *Anal Chim Acta*, 2006, 558(1-2): 179—186 [DOI]
- 4 Xu Q, Mao C, Liu N N, et al. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase based on biocompatible carboxymethyl chitosan-gold nanoparticle nanocomposite. *Biosens Bioelectron*, 2006, 22(5): 768—773 [DOI]
- 5 Wang Q L, Lu G X, Yang B J. Myoglobin/sol-gel film modified electrode: direct electrochemistry and electrochemical catalysis. *Langmuir*, 2004, 20(4): 1342—1347 [DOI]
- 6 Liu A, Wei M, Honma I, et al. Direct electrochemistry of myoglobin in titanate nanotubes film. *Anal Chem*, 2005, 77(22): 8068—8074 [DOI]
- 7 Lvov Y, Munge B, Giraldo O, et al. Films of manganese oxide nanoparticles with polycations or myoglobin from alternate-layer adsorption. *Langmuir*, 2000, 16(23): 8850—8857 [DOI]
- 8 Luo X L, Xu J J, Zhao W, et al. Ascorbic acid sensor based on ion-sensitive field-effect transistor modified with MnO₂ nanoparticles. *Anal Chim Acta*, 2004, 512(1): 57—61 [DOI]
- 9 Xu J J, Zhao W, Luo X L, et al. A sensitive biosensor for lactate based on layer-by-layer assembling MnO₂ nanoparticles and lactate oxidase on ion-sensitive field-effect transistors. *Chem Comm*, 2005, 5(6): 792—794
- 10 Omomo Y, Sasaki T, Wang L Z, et al. Redoxable nanosheet crystallites of MnO₂ derived via delamination of a layered manganese oxide. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(12): 3568—3575 [DOI]
- 11 Liu Z H, Ooi K, Kanoh H, et al. Swelling and delamination behaviors of birnessite-type manganese oxide by intercalation of tetraalkylammonium ions. *Langmuir*, 2000, 16(9): 4154—4164 [DOI]
- 12 Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J Electroanal Chem*, 1979, 101: 19—28
- 13 蔡称心, 陈静. 碳纳米管电极上辣根过氧化物酶的直接电化学. *化学学报*, 2004, 62(3): 335—340
- 14 Meites L. *Polarographic techniques*. 2nd ed. New York: Wiley, 1965. 282
- 15 Chen H J, Wang Y L, Liu Y, et al. Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized in Nafion-RTIL composite film. *Electrochem. Commu.*, 2007, 9(3): 469—474 [DOI]
- 16 Zhao G G, Zhang L, Wei X W. An unmediated H₂O₂ biosensor based on the enzyme-like activity of myoglobin on multi-walled carbon nanotubes. *Anal. Biochem.*, 2004, 329(1): 160—161 [DOI]
- 17 Feng J J, Zhao G, Xu J J, et al. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins immobilized on gold nanoparticles stabilized by chitosan. *Anal Biochem*, 2005, 342(2): 280—286 [DOI]
- 18 Yang Y H, Yang M H, Wang H, et al. An amperometric horseradish peroxidase inhibition biosensor based on a cysteamine self-assembled monolayer for the determination of sulfides. *Sensor Actuat B*, 2004, 102(1): 162—168 [DOI]