



论文

聚硫堇/过氧化氢光致电化学敏感界面的构建及其对葡萄糖氧化酶催化活性的测定

赵常志*, 俞佳, 赵改爽, 焦奎

青岛科技大学化学与分子工程学院, 青岛 266042

*通讯作者, E-mail: zhaocz@qust.edu.cn

收稿日期: 2010-11-09; 接受日期: 2010-12-03

doi: 10.1360/032010-828

摘要 将具有光电活性的硫堇电聚合在光透电极的表面, 制备了聚硫堇膜光电极, 利用该电极同时具有光敏和电子受体的性能, 使其与葡萄糖氧化酶对葡萄糖催化反应产生的电子供体(过氧化氢)发生光致电化学反应, 通过检测由此产生的光电流实现对蛋白质催化活性的检测. 本文探讨了聚硫堇/过氧化氢光致电化学敏感界面的响应机理, 讨论了偏压、电解质溶液 pH 和底物浓度对光致电化学反应和测定葡萄糖氧化酶催化活性的影响. 通过测定商品葡萄糖氧化酶的催化活性, 验证了方法的可行性. 应用该敏感界面检测蛋白质的催化活性不需要过氧化物酶, 比光度法经济、简便和快速.

关键词光致电化学
聚硫堇
过氧化氢
葡萄糖氧化酶
催化活性

1 引言

光致电化学分析方法是利用光能激发物质产生光电流, 通过直接或间接检测光电流的强弱实现检测的目的^[1-3]. 光电流的产生包括两种机理: (1) 如果溶液中存在还原剂分子, 反应后产生的氧化态受激分子被还原到基态, 继而再次参与光电化学反应, 因此产生的光电流不间断; (2) 如果溶液中存在猝灭剂分子(通常为电子供体或受体分子), 激发态分子可与其发生电子转移反应, 生成的氧化态或还原态分子能进一步从电极表面得到或失去电子, 从而产生光电流, 而光电活性分子重新回到基态继续参与反应. 光致电化学分析方法的激发与检测是分步进行的. 相对于光学方法而言, 具有设备简单、成本低廉、易于微型化和集成化的优点; 相对于电化学方法而言, 由于光电流产生的原理类似于电催化原理, 灵敏度较一般电化学方法要高, 可与电化学发光分析法相媲美.

近年来, 光致电化学分析方法的报道逐渐增多^[4-11]. 郭良宏等^[4-7]在利用光致电化学分析方法进行环境污染物对 DNA 损伤检测方面进行了一系列的研究工作, 采用联吡啶钌配合物等作为光电化学标记物和光敏指示剂, 使用二氧化锡纳米颗粒修饰导电玻璃电极作为半导体电极, 利用 DNA 损伤前后光电流的变化进行定性定量分析. 该研究组还利用光电化学分析法对牛血清蛋白和小牛胸腺 DNA 进行了检测, 检测限分别为 1 $\mu\text{g/mL}$ 和 1.8×10^{-10} mol/L. 刘宝红等^[8]在钢板上设计的一种多孔 TiO_2 光电极与加到样品中的电子受体或电子供体进行有效的电子转移反应, 在紫外光照射下建立了一种新的光致电化学氧化还原反应概念. 陈洪渊等^[9]将多层纳米 CdS 固定在 ITO 导电玻璃上, 与电子供体抗坏血酸构建了一个灵敏的光致电化学体系, 并利用该体系建立了一个非常灵敏的免疫传感器, 对 IgG 的检测限达到了 0.8 pg/mL .

本文将硫堇电聚合在光透电极的表面上, 制备

了聚硫堇膜光电极, 该电极同时具有光敏和电子受体的功能, 与电子供体过氧化氢(H_2O_2)组成了一个新的光致电化学系统. 利用葡萄糖氧化酶对葡萄糖的催化反应直接产生电子供体 H_2O_2 , 通过检测由此产生的光电流实现了对蛋白质活性的检测.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CHI 832B 型电化学工作站(上海辰华仪器有限公司); ITO 电极($20\ \Omega/\text{cm}^2$, 深圳南玻显示器件科技有限公司)及其修饰电极为工作电极, Ag/AgCl 电极($C_{\text{KCl}} = 3.0\ \text{mol/L}$)为参比电极, 铂丝为对电极组成三电极系统. pH S-3C 型 pH 计(上海三信仪表厂); SK1200H 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); TU1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); JSM-6700F 型场发射扫描电子显微镜(日本 JEOL 公司); LP-3B 光功率计(北京物科光电技术有限公司). 自制的光致电化学实验装置如图 1 所示, 电解池最大容积为 $4.0\ \text{mL}$. 温度由 501 型超级恒温水浴(重庆实验设备厂)通过电解池上的水套控制.

硫堇(Th, 99.8%)、葡萄糖氧化酶(GOD, EC 1.1.3.4)(日本和光制药公司, Sigma 公司, Serva 公司); 葡萄糖(上海化学试剂有限公司); 15%的 SnO_2 水溶胶(Alfa Aesar 公司), 用水稀释到 10%备用. 各种 pH 值的 $0.1\ \text{mol/L}$ 醋酸盐缓冲溶液(ABS)由 HAc 和 NaAc 按比例配制. H_2O_2 储备液由 30%的 H_2O_2 制备, 用碘量法确定其准确浓度; 不同浓度的 H_2O_2 溶液由储备液和缓冲溶液稀释制备. 其他试剂纯度均高于分析纯, 实验用水为超纯水($>17\ \text{M}\Omega$).

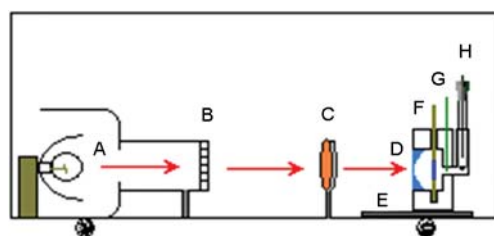


图1 光致电化学实验装置示意图. A: 碘钨灯; B: 光闸; C: 滤光片; D: 光窗; E: 滑动槽; F: 工作电极; G: 对极; H: 参比电极

2.2 聚硫堇膜光电极的制备与表征

将 ITO 导电玻璃切成 $5.0 \times 1.0\ \text{cm}$ 的长条, 依次用乙醇、丙酮、水超声清洗 $5\ \text{min}$, 干燥. 然后在一段留出 $1.0\ \text{cm}$ 的一段作为电极端子, 在另一段用绝缘漆封住并在表面留出直径为 $5.0\ \text{mm}$ 的空白作为 ITO 电极. 将 10%的 SnO_2 水溶胶均匀旋涂在洁净的 ITO 电极上以增加电极表面积和提高导电性. 干燥后将 ITO 电极置于含有 $1.30\ \text{mg/mL}$ Th 溶液的电解池中, 在 $1.20\ \text{V}$ 的电位沉积 $40\ \text{min}$ 后制得聚硫堇膜光电极 (PThE), 用水清洗掉表面吸附的 Th 单体后置于 pH 5.5 的缓冲溶液上方保存备用. 观察 PThE 表面有蓝色膜生成, 扫描电镜照片显示聚硫堇(PTh)呈块状均匀分布于电极表面(图 2). PThE 的循环伏安曲线显示其有一对对称的氧化还原峰, 阳极和阴极峰电位分别为 0.032 和 $-0.045\ \text{V}$, $\Delta E_p = 77\ \text{mV}$, 式电位 E^0 为 $-0.0065\ \text{V}$, 和文献[12]的酸性介质中聚硫堇两电子两质子过程的电极反应一致, 与 Th 具有相似的电化学活性. PThE 对可见光的最大吸收位于 $605\ \text{nm}$ 处, 与溶液中 Th 的 $598\ \text{nm}$ 非常接近, 表明其具有同样吸收光的性质.

2.3 光致电化学响应的测量

将一定浓度的底物和电解液置于电解池中, 插入 PThE 并使其工作表面对准光窗, 分别联接三电极至电化学工作站. 由光致电化学实验装置施加可见光作为激发光源, 其到达光窗处的能量为 $15\ \text{mW}/\text{cm}^2$. 电化学工作站检测光电流响应, 偏压设置为 $0.40\ \text{V}$. 向电解池中注入样品并同时启动电流检测, 待催化反应 $8\ \text{min}$ 时, 开启光闸, 光闸每 $20\ \text{s}$ 切换 1 次, $20\ \text{s}$ 形成 1 次光电流-时间图谱. 实验温度控

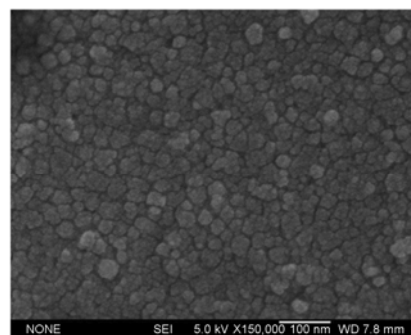


图2 光电界面的扫描电镜照片

制在 30 ± 0.2 °C.

3 结果与讨论

3.1 光电界面的光致电化学响应原理

Th 可与 $\text{Fe}^{3+/2+}$ 在酸性介质中组成光电池^[13], Th 与二茂铁组成的光致电化学体系也已被用于 DNA 分析^[14]. 在酸性介质中 $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ 的电极电位约为 0.65 V, 小于 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 的电极电位(0.77 V), 氧化态的 Th⁺在光照激发下, 其基态能级 E_0 由 -0.03 eV 变至单重态能级 $E_{0,0}$ 2.03 eV^[15], 可以氧化 H_2O_2 , 产生光致电化学效应. 而激发态的 Th⁺*被电子供体 H_2O_2 还原, 继而其还原态 Th 在电极上又被氧化, 再次参与光致电化学反应, 从而不间断地产生光电流. 在底物葡萄糖存在下, GOD 催化葡萄糖生成电子供体 H_2O_2 , 所以在不需要过氧化物酶的情况下可以简单、灵敏、快速地测定蛋白质的催化活性. 图 3 显示了 PThE 在蛋白质和相应底物存在下的光致电化学响应原理.

3.2 PThE 对 H_2O_2 的光致电化学响应

PThE 对 H_2O_2 的光电流响应如图 4 所示, 在实验中, 我们将光照交替开关 3 次, 获得的三组光电流响应依次略微减小但变化不大, 说明 PThE 对光照的响应重现性较好. 同时我们可以观察到, 光电流-时间曲线的电流值随着 H_2O_2 浓度的增加而增大, 线性响应(图 5)的方程为 $I = 20.1 + 212C$, 相关系数为 0.9986, 扣除空白后, 可得 $\Delta i/C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 211.9$. 当 H_2O_2 的浓度为 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ 时, 令 $\Delta i/C_{\text{H}_2\text{O}_2}$ 为 H_2O_2 的光电流响应系数, 即 $\delta = 212(\text{nA}/\mu\text{mol/mL})$. 光电流的时序变化曲线如图 6 所示, 每隔 50 s 连续 10 次光照

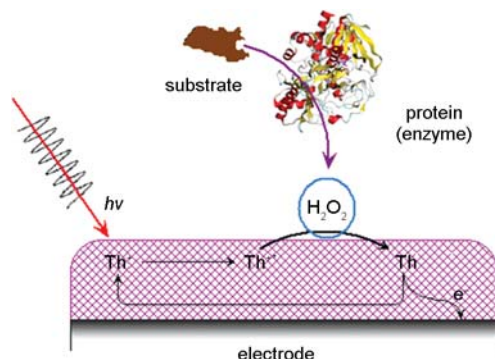


图 3 光电界面的光致电化学响应原理

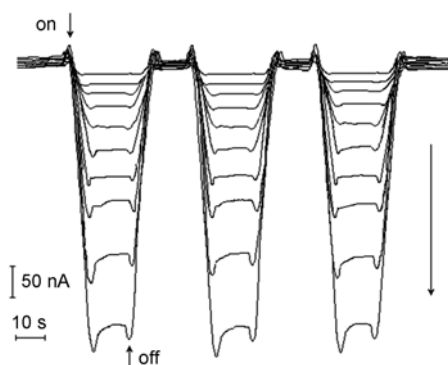


图 4 光电界面对 H_2O_2 的光电流响应. H_2O_2 的浓度(从上到下)分别为: 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.50, 2.00 mmol/L

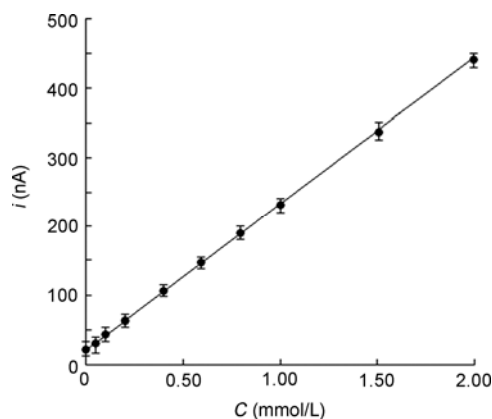


图 5 H_2O_2 的光电流线性响应曲线

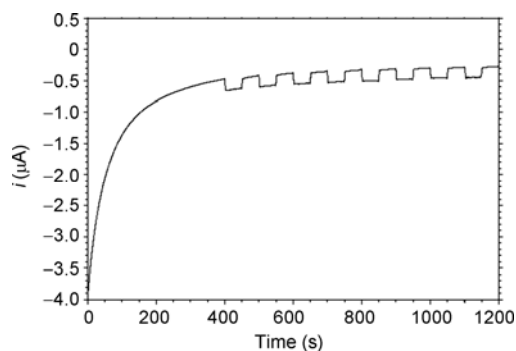


图 6 H_2O_2 光电流的时序变化曲线. $C_{\text{H}_2\text{O}_2}$: 0.60 mmol/L

后的光电流下降为 17.5 %, 显示光电流响应有较好的稳定性.

3.3 偏压的影响

当 H_2O_2 将 PThE 上的 Th^{+*} 还原后, 回到基态的

Th 必须被氧化为 Th^+ 才能再度吸收光能而成为激发态的 Th^{+*} , 再次与 H_2O_2 发生电子转移反应, 循环往复, 从而产生不间断的光电流. 所以, 需要在 PThE 上施加一个合适的偏压让 Th 失去电子, 同时该电位下测得的电流强度得以标度光电流的大小. 虽然 PThE 的循环伏安曲线表明其阳极峰电位为 0.032 V, 但考虑到超电位和电路阻抗的影响, 从实验获得一个合适的偏压是较好的选择. 在相同浓度电子供体的存在下, 当从 0.10 V 到 0.50 V 每隔 0.10 V 顺次调高偏压时, 观察到光电流随之增大. 当设定的偏压大于 0.40 V 时, 光电流强度没有明显的增加. 因此, 本文将 PThE 的偏压固定在 0.40 V.

3.4 电解质 pH 的影响

由于 PTh 的电化学氧化为加质子反应^[16], 而 Th 的 $\text{p}K_{\text{a}1}$ 和 $\text{p}K_{\text{a}2}$ 分别为 4.4 和 5.3^[17]. 因此, PTh 的电化学活性会随 pH 值的升高而下降. 图 7 的主图显示了不同 pH 条件下 PThE 的线性扫描伏安曲线, 可以清楚地观察到其峰电流在 pH 5.0~6.5 间随 pH 值的增加而减小, 而 pH 4.5~5.5 间峰电流则比较接近. PThE 的可见光谱如图 7 的左侧插图所示, 吸收光谱在 pH 4.5~6.5 间差别很小, 说明在此范围内 PThE 对光的吸收基本不受 pH 的影响. 图 7 的右侧插图显示的是 pH 4.5~6.5 间 PThE 对 H_2O_2 的光电流响应. 从中可以观察到, 最大的光电流响应是在 pH 5.5 获得的, 不同于在 pH 5.0 时 PThE 有最大峰电流的现象. 可能的原因是, 在光致电化学反应过程中 H_2O_2 是失质子反应, 而 H_2O_2 的 $\text{p}K_{\text{a}}$ 为 11.6, 反应中的协同效应产生

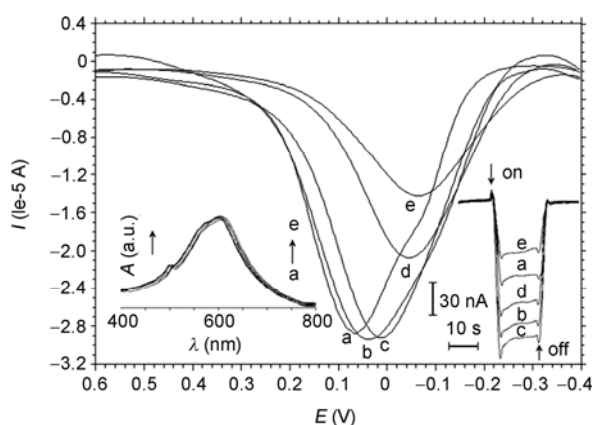


图 7 电解质 pH 的影响. pH 值: a, 4.5; b, 5.0; c, 5.5; d, 6.0; e, 6.5

了这一结果. 为了得到较大的光电流响应并兼顾葡萄糖氧化酶的活性 pH 范围, 本文控制电解质的 pH 值为 5.5.

3.5 催化反应底物浓度的选择

蛋白质的催化活性需要在相应的底物存在下测定, 底物的浓度必须充足, 以保证酶催化反应的进行. 另外底物的浓度也影响酶活性的检测灵敏度和测定范围. 本文在参考了酶催化活性光度测定法中底物与蛋白质浓度比的基础上^[18, 19], 试验了不同浓度的底物对酶催化反应的影响. 在一定量 GOD 存在下添加不同浓度葡萄糖的实验结果显示, 葡萄糖在葡萄糖氧化酶的催化下, 其光电流响应在 10.0~50.0 mmol/L 范围内呈线性增加, 然后趋于平稳. 据此, 选择底物葡萄糖的浓度为 50.0 mmol/L.

3.6 蛋白质催化活性的测定

诸多具有催化功能的蛋白质, 如葡萄糖、胆碱、尿酸氧化酶等, 在催化相应底物发生氧化反应时会释放出 H_2O_2 . 根据这一性质, 蛋白质催化活性被定义为: 每分钟能转化 1 μmol 底物或生成 1 μmol H_2O_2 的酶耗量为 1 U^[20]. 通过 PThE 与 H_2O_2 的光致电化学响应, 不需要过氧化氢酶即可测定蛋白质的催化活性. GOD 在葡萄糖存在下的光电流响应和线性范围如图 8 所示, 随酶浓度的增加, 其光电流响应在一定范围内呈线性增大. 所以在与 PThE 和 H_2O_2 反应的同样时间内, 蛋白质催化活性 A (U/mg) 可表示为:

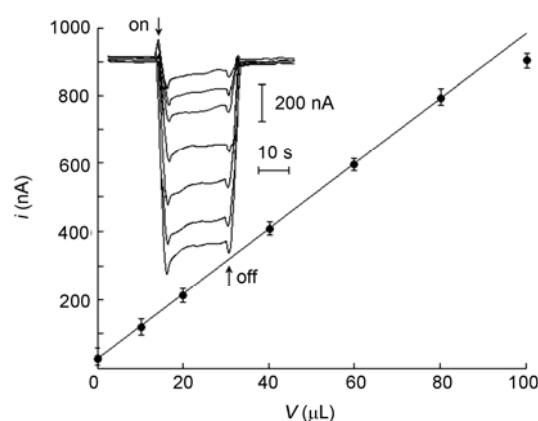


图 8 光电界面对 GOD 的光电流响应. 加入 GOD 溶液的体积(从上到下): 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μL . C_{GOD} : 24.5 mg/mL; $C_{\text{葡萄糖}}$: 50.0 mmol/L

$$A = \frac{\Delta i \times (V_0 + V_i)}{\delta \times 2 \times V_i \times C} \times f$$

式中, Δi 为扣除空白后的光电流强度, V_0 为底液体积(mL), V_i 为样品体积(mL), δ 为 H_2O_2 的光电流响应系数($\text{nA}/\mu\text{mol/mL}$), 2 为 H_2O_2 与 Th^{+*} 的反应系数, C 为样品浓度(mg/mL), f 为样品的稀释倍数. 表 1 是对标示值为 121 U/mg 的葡萄糖氧化酶催化活性的测定结果, 表 2 是对 3 种商品葡萄糖氧化酶催化活性的测定结果, 光度法测得值按商品说明书实验和计算.

表 1 葡萄糖氧化酶催化活性的测定结果(标示值: 121 U/mg)

$\Delta i(\text{nA})$	$V_0(\text{mL})$	$V_i(\mu\text{L})$	$C(\text{mg/mL})$	f	$A(\text{U/mg})$	RSD% ($n=5$)
106	3.00	20.0	49.2	151	116	6.05
328	3.00	50.0	24.5	61	117	3.42
790	3.00	80.0	24.5	38.5	112	4.38
492	3.00	80.0	15.6	38.5	110	5.20

表 2 商品葡萄糖氧化酶催化活性的测定结果

生产厂家	测得值 (U/mg)	相对标准偏差 (%)	光度法测得值 (U/mg)	商品标示值 (U/mg)
和光制药	114	3.90	112	121
Sigma 公司	47.4	4.66	45.8	50
Serva 公司	225	5.82	237	250

4 结论

本文电聚合 Th 于 ITO 电极的表面制备了 PTh/ITO 光电极, 利用该电极的光敏和接受电子的性质, 与电子供体 H_2O_2 构成了一个新的光致电化学系统, 实现了对葡萄糖氧化酶催化活性的光电流检测. 本文所建立的光致电化学系统有望成为新的光致电化学生物分析的平台, 为探索并建立新的检测方法和制备生物化学传感器提供新的理论或概念, 从而进一步促进光致电化学分析的发展.

致谢 本工作得到山东省自然科学基金项目(2009ZRB01393)和电分析化学国家重点实验室开放基金的资助, 特此一并致谢.

参考文献

- Willner I, Patolsky F, Wasserman J. Photoelectrochemistry with controlled DNA-cross-linked CdS nanoparticle arrays. *Angew Chem Int Ed*, 2001, 40(10): 1861–1864
- Okamoto A, Kamei T, Tanaka K, Saito I. Photostimulated hole transport through a DNA duplex immobilized on a gold electrode. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(45): 14732–14733
- Dong D, Zheng D, Wang FQ, Yang XQ, Wang N, Li YG, Guo LH, Cheng J. Quantitative photoelectrochemical detection of biological affinity reaction: Biotin-avidin interaction. *Anal Chem*, 2004, 76(2): 499–501
- Liang M, Liu S, Wei M, Guo LH. Photoelectrochemical oxidation of DNA by ruthenium tris(bipyridine) on a tin oxide nanoparticle electrode. *Anal Chem*, 2006, 78(2): 621–623
- Liang M, Guo LH. Photoelectrochemical DNA sensor for the rapid detection of DNA damage induced by styrene oxide and the fenton reaction. *Environ Sci Technol*, 2007, 41(2): 658–664
- Liang M, Jia S, Chao S, Guo LH. photoelectrochemical sensor for the rapid detection of *in situ* dna damage induced by enzyme-catalyzed fenton reaction. *Environ Sci Technol*, 2008, 42(2): 635–639
- Jia S, Liang M, Guo LH. Photoelectrochemical detection of oxidative DNA damage induced by fenton reaction with low concentration and DNA-associated Fe^{2+} . *J Phys Chem B*, 2008, 112(14): 4461–4464
- Qiao L, Roussel C, Wan J, Kong J, Yang P, Girault HH, Liu BH. MALDI in-source photooxidation reactions for online peptide tagging. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47(14): 2646–2648
- Wang GL, Yu PP, Xu JJ, Chen HY. A label-free photoelectrochemical immunosensor based on water-soluble cds quantum dots. *J Phys Chem C*, 2009, 113(25): 11142–11148
- Ikeda A, Nakasu M, Ogasawara S, Nakanishi H, Nakamura M, Kikuchi J. Photoelectrochemical sensor with porphyrin-deposited electrodes for determination of nucleotides in water. *Organ Lett*, 2009, 11(5): 1163–1166
- Chen D, Zhang H, Li X, Li J. Biofunctional titania nanotubes for visible-light-activated photoelectrochemical biosensing. *Anal Chem*, 2010, 82(6): 2253–2261
- Yang R, Ruan C, Dai W, Deng J. Electropolymerization of thionine in neutral aqueous media and H_2O_2 biosensor based on poly(thionine).

- Electrochim Acta*, 1999, 44(10): 1585–1596
- 13 Shigehara K, Tsuchida E. Mechanism of photogalvanic effect in thionine-ferrous salt systems. *J Phys Chem*, 1977, 81(19): 1883–1886
- 14 Dohno C, Stemp EDA, Barton JK. Fast back electron transfer prevents guanine damage by photoexcited thionine bound to DNA. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(32): 9586–9587
- 15 Reid GD, Whittaker DJ, Day MA, Turton DA, Kayser V, Kelly JM, Beddard GS. Femtosecond electron-transfer reactions in mono- and polynucleotides and in DNA. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(19): 5518–5527
- 16 Kong Y, Mu SL. Electrochemical polymerization of thionine and properties of polythionine. *Acta Phys Chim Sin*, 2001, 17(4): 295–299
- 17 张孙伟, 汤福隆, 张泰. 现代化学试剂手册(第二分册). 北京: 化学工业出版社, 1987. 185
- 18 Worthington CC. *Worthington enzyme manual: enzymes and related biochemical*. Worthington Biochem. Coop.; 1988. 155–158; 254–260
- 19 Man/vannan S, Kathiresan K. Effect of medium composition on glucose oxidase production by penicillium fellutanum isolated from mangrove rhizosphere soil. *Res J Microbiol*, 2007, 2(3): 294–298
- 20 Fiedurek J, Gromada A. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. *J Appl Microbiol*, 2000, 89: 85–89

Fabrication of poly(thionine)/H₂O₂ photoelectrochemical sensing platform and determination for catalytic activity of glucose oxidase

ZHAO ChangZhi, YU Jia, ZHAO GaiShuang & JIAO Kui

College of Chemistry & Molecular Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China

Abstract: A new photoelectrochemical sensing platform for H₂O₂ was fabricated by electropolymerization of thionine on ITO electrode. This photosensitive interface was employed as an electron acceptor, and H₂O₂ proceed from enzymatic catalysis was employed as an electron donor, developing a new determination method for catalytic activity of protein. In the paper, the photoelectrochemical response of poly(thionine) immobilized on ITO electrode to H₂O₂ was described. The effects of bias voltage, pH of electrolyte and concentration of substrate to the photoelectrochemical response were investigated. The feasibility of method was acknowledged through monitoring the catalytic activity of glucose oxidase. The present method is an economical, speedy, simple and convenient technique to detect the catalytic activity of protein without hydrogen peroxidase.

Keywords: photoelectrochemistry, poly(thionine), H₂O₂, glucose oxidase, catalytic activity