



论文

PAOAA 修饰金电极固定过氧化氢酶的电化学研究

张志军^①, 李曦^{①*}, 肖亮泓^①, 邹传亮^①, 张超灿^{②*}^① 武汉理工大学理学院, 武汉 430070^② 武汉理工大学材料科学与工程学院, 武汉 430070

*通讯作者, E-mail: lixi682004@yahoo.com.cn; polymers@whut.edu.cn

谨以本文祝贺卓仁禧先生 80 华诞

收稿日期: 2010-11-18; 接受日期: 2011-03-21

doi: 10.1360/032010-848

摘要 设计了一种基于金属离子螯合法固定蛋白质的新方法. 首先电化学聚合苯胺(ANI)/邻氨基苯甲酸(OAA)得到在中性溶液中具有导电性的聚(苯胺-邻氨基苯甲酸)(PAOAA)共聚物膜, 并对膜进行了 SEM、EDS 表征. 随后膜负载 Cu^{2+} , Cu^{2+} 作为螯合离子通过配位作用固定过氧化氢酶(Cat). 用 EDS 测量了铜的负载量为 0.49%. 脉冲伏安法(DPV)研究了 Cat 在金电极表面的固定过程, 显示随着 ANI/OAA 在电极表面聚合成膜, Cat 在修饰电极表面固定, 电极在 10 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) 溶液中的扫描峰电流由裸电极的 121 μA 依次降到 92.6、71.8 μA , 表明电极表面修饰的 PAOAA 膜和固定的 Cat 阻碍了电荷的传递. 电化学阻抗法(EIS)对固定过程中电极表面阻抗变化的研究也得到同样结论. 用线性扫描伏安法(LSV)研究了固定到电极表面后 Cat 对 H_2O_2 的催化还原活性. 最后以计时电流法(CA)作为检测手段, Cat 修饰电极作为探针实现了对 H_2O_2 的定量检测, 同时该电极显示出良好的重建性.

关键词聚(苯胺-邻氨基苯甲酸)
电化学聚合
蛋白质固定
金属离子螯合
过氧化氢酶

1 引言

蛋白质作为生物大分子, 具有选择性、催化活性、生物亲和性和其他特异功能. 利用蛋白质的特殊功能可制备出各种分子器件, 如生物传感器、生物材料及蛋白质阵列等^[1, 2]. 这些蛋白质分子器件在对有关抗原抗体检测、药物开发、疾病诊断、食品安全、环境监测等方面的研究发挥了极其重要的作用^[3, 4].

电化学方法由于具有快速、便捷、简单、易操作等优点而被广泛应用于蛋白质分子器件的研究中^[5]. 蛋白质在电极表面固定是蛋白质电化学器件构造过程中的一个关键步骤, 固定的效果直接影响器件的功能、灵敏度以及稳定性等性能. 传统的固定方法主要有物理吸附法和共价键合法. 其中物理吸附法是通过静电作用力、疏水作用力、氢键作用力等弱作用

力吸附在电极表面, 这种固定方法易导致蛋白质位置的无规整性且附着能力较低. 共价键合法, 是将蛋白质分子中的某些基团与电极表面的反应性基团以化学键结合, 它虽然克服了物理吸附中生物活性分子不能长期作用于电极表面、易脱落的缺点, 但这种方法通常要求电极表面修饰有 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 等反应性基团, 同时容易引起蛋白质活性的改变.

近年来, 金属离子螯合法固定蛋白质进入了科研人员的视线, 各种基于金属离子螯合法固定蛋白质的方法被设计出来, 极大促进了蛋白质分子器件的制备^[6], 并广泛应用于分子检测^[7]、膜蛋白作用的研究^[8]等领域. 金属离子螯合法是利用金属离子与含有多个羧基及其他较强配位基团的分子如氨三乙酸(NTA)等进行配位, 未达到配位饱和的金属离子可进一步与富含咪唑、巯基等配位基团的蛋白质进行配位

以起到固定蛋白质的作用^[9]。分子链桥连法是目前基于金属离子螯合法固定蛋白质最常用的策略,分子链一端以 NTA 分子作为螯合配体来吸附金属离子,另一端为 $-\text{SH}$ ^[10]、 $-\text{NH}_2$ ^[11]等可以键合在电极表面的活泼基团,或者是可形成导电聚合物而沉积在电极表面的单体^[12, 13]。分子链桥连法固定蛋白质具有固定牢固、表面密度大、有导向性且能保留蛋白质的原有活性不被破坏等优点。但桥连分子链最常用的合成原料 *Nα,Nα*-二(羧甲基)-L-赖氨酸水合物(ANTA)的制备条件较苛刻且产量较低^[14],这在一定程度上限制了该法的应用。

苯胺类导电聚合物因为具有价格低廉、易于制备等优点,被广泛应用于各种电化学分子器件的研制中,以起到信号传导、信号扩增的作用^[15, 16]。而这些电化学分子器件的制备中,将导电聚合物电沉积修饰到电极表面的过程尤为重要^[17]。聚合物膜的导电性将会影响到器件的适用性及灵敏度,因而得到导电性良好的聚合物膜是构建高性能生物器件的必要条件。但聚苯胺(PANI)在中性条件下的不导电性在一定程度上限制了其在生物相关领域的应用,因而出现了许多改性 PANI 导电性的策略^[18]。其中质子酸自掺杂法是最为常用的一种方法,共聚物内的质子酸组分作为质子给予体可以提高苯胺聚合物在中性条件下的导电性^[19]。

本文设计了一种基于金属离子螯合法固定蛋白质的新方法,固定过程如图 1 所示。是以在中性环境中具有导电性的聚(苯胺-邻氨基苯甲酸)(PAOAA)修饰膜作为载体, Cu^{2+} 作为螯合离子,通过配位作用实现对过氧化氢酶(Cat)的固定。该方法与目前常用的分子链桥连法相比,更为简捷、成本低廉且具有增大电极有效固定面积的优点,为蛋白质在电极表面的固定以制备出各种分子器件提供了一种新途径。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Cat 购自 Sigma(C9322, 2000~5000 U/mg); ANI 购自国药集团化学试剂有限公司,实验前进行减压蒸馏处理;其他常用试剂均为国产分析纯,实验前未做进一步处理,实验用水均为去离子双蒸水。

CHI660b 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)进行电化学实验,采用单池电解池、三电极体系:工作电极为 2 mm 金盘电极,对电极为 0.5 mm 铂丝电极,参比电极为饱和甘汞电极(所有电位均相对于此电极);SEM 表征采用 S-4800 型 FE-SEM (Hitachi),加速电压为 10 kV,样品未做喷金属处理;EDS 表征采用 EDAX 公司生产的 Phoenix 型能谱仪。

2.2 CV 法共聚 ANI/OAA 及 PAOAA 电化学性质研究

工作电极使用前依次用 1、0.3 和 0.05 μm Al_2O_3 粉抛光,随后依次在丙酮、去离子双蒸水中超声 5 min,最后用双蒸水冲洗待用。

循环伏安法(CV)共聚 ANI/OAA,聚合液为 0.1 mol/L ANI、0.04 mol/L OAA 的 1 mol/L H_2SO_4 溶液,扫描 20 周,电位范围为 $-0.2\sim 0.8$ V,扫描速度为 50 mV/s。

聚合物膜在不同 pH (1、3、7)溶液中的电化学行为用 CV 法进行研究,电位范围为 $-0.4\sim 0.6$ V,扫描速度为 70 mV/s。

2.3 Cat 在 PAOAA 修饰电极表面固定及固定过程的 DPV 和 EIS 法研究

Cat 的固定,在 PAOAA 膜修饰电极表面滴加 50 μL 0.5 mol/L CuSO_4 ,放置 20 min 后用双蒸水冲洗,

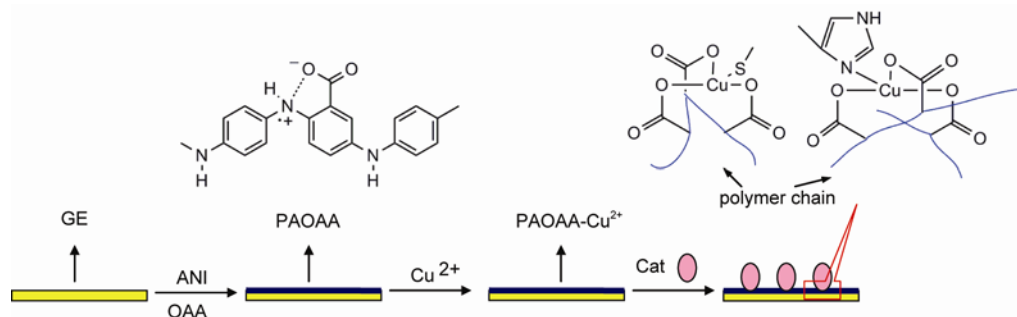


图 1 Cat 在电极表面固定过程示意图

接着再滴加 50 μL 1 mg/mL Cat (pH 6.8 PBS 缓冲溶液), 放置 20 min, 最后用双蒸水冲洗干净.

在 10 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) (0.1 M KCl, pH 6.8 PBS) 溶液中对裸金电极(bare GE)、浸泡 CuSO_4 的 PAOAA 膜修饰电极(GE/PAOAA- Cu^{2+})及固定有 Cat 的修饰电极(GE/PAOAA- Cu^{2+} -Cat) 进行 DPV、EIS 测量. DPV 电位范围为 $-0.4 \sim 0.6$ V, EIS 在开路电位(0.194 V)下进行, 频率范围为 0.1~100 kHz, 振幅为 5 mV.

2.4 Cat 修饰电极对 H_2O_2 催化还原作用研究

分别对裸金电极在 20 mmol/L H_2O_2 、5 mg/mL Cat, Cat 修饰电极在 0.1 M KCl pH 6.8 的 PBS 溶液中及 20 mmol/L H_2O_2 溶液中进行线性扫描伏安法(LSV) 扫描, 电位为 $0 \sim -0.8$ V.

2.5 Cat 修饰电极对 H_2O_2 定量检测

用 2.3 中实验方法构建 Cat 修饰电极作为探针, 用计时电流法(CA)对 H_2O_2 进行滴定检测, 电位为 -0.3 V, 1 (mmol/L)/次; 探针在 1 M H_2SO_4 中浸泡 30 min 后再次进行 H_2O_2 滴定检测; 探针经 H_2SO_4 浸泡后重新制备并对 H_2O_2 进行滴定检测.

3 结果与讨论

3.1 PAOAA 膜修饰电极的制备及膜性质表征

3.1.1 CV 法共聚 ANI/OAA

本文参照文献[20]方法, 采用电化学方法研究了 ANI/OAA 的共聚合. 通过改变原料配比得到 ANI/OAA 聚合最佳原料配比为 2.5:1, 与文献[20]选择原料配比值相同. 图 2 是 ANI、OAA(2.5:1)在金电极表面 1 mol/L H_2SO_4 中共聚合过程的 CV 图. 从图中可以看到, 随着扫描周数的增加, 电化学氧化还原峰电位基本保持不变, 峰电流增大, 表明 ANI/OAA 共聚物(PAOAA)在电极表面形成. 图 2 中插图为聚合的第一个氧化峰(0.19 V)峰电流随扫描周数的变化情况, 在第 11~20 周时扫描峰电流随扫描周数的增加线性增加, 表明聚合物膜厚度随着扫描周数的增加而增长[21].

我们对 PAOAA 的组成进行了研究, 通过 EDS 谱中各元素摩尔比计算得到 PAOAA 中 ANI/OAA 的

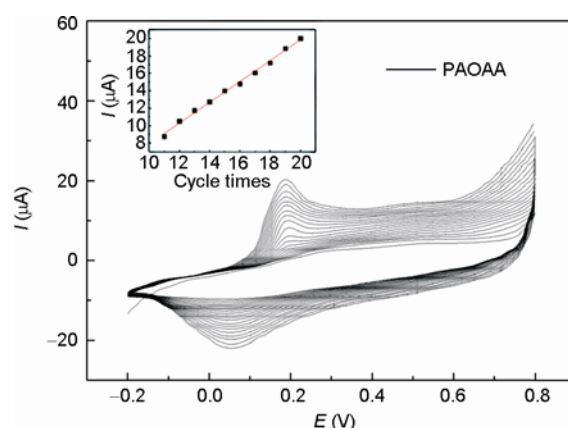


图 2 0.1 mol/L ANI、0.04 mol/L OAA 在 1 mol/L H_2SO_4 中 CV 聚合, 电位为 $-0.2 \sim 0.8$ V, 扫速为 50 mV/s, 扫描 20 周; 插图为第一个氧化峰(0.19 V)峰电流随扫描周数(11~20 周)的变化曲线

摩尔比为 6.8: 1(图 3), 这一比值大于聚合液中的 ANI/OAA 的摩尔比(2.5:1), 表明 OAA 的电化学聚合活性较小, 这一研究结果与文献[22]报道一致. 而在 PAOAA 的化学聚合中 OAA 同样显示出较弱的活性[23].

3.1.2 PAOAA 膜电化学性质研究

聚合物膜的导电性常用 CV 法来研究, 导电性膜进行 CV 扫描会出现氧化还原峰. 通常未掺杂的聚苯胺在中性溶液下, 其 CV 曲线中不出现氧化还原峰[24]. 我们用 CV 法研究了制备的 PAOAA 膜在不同 pH 溶液中的导电性能, 实验结果见图 4. 当 pH 1 时 CV 曲线出现三对氧化还原峰, 其中 I、II 与苯胺在 1 mol/L H_2SO_4 中电化学聚合出现的两对氧化还原峰($E_1^\circ =$

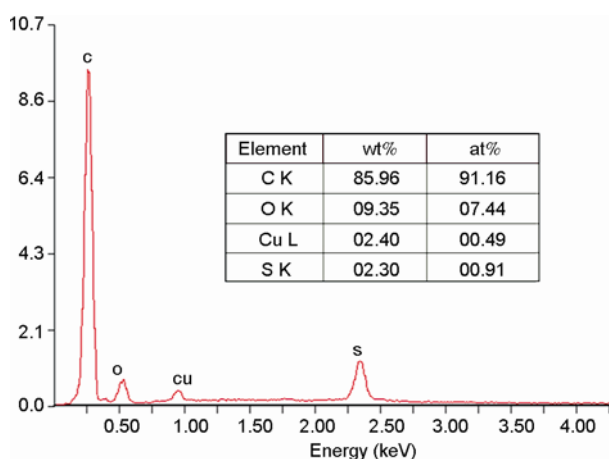


图 3 PAOAA 膜的 EDS 谱图(负载 Cu^{2+})

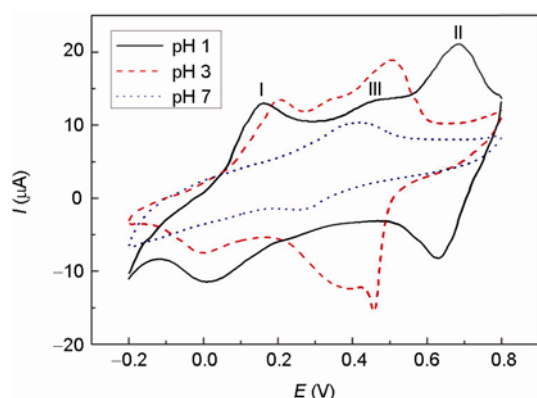


图 4 PAOAA 修饰电极分别在 pH 1、3、7 溶液中的 CV 曲线, 扫速为 70 mV/s

0.13 V, $E_2^\circ = 0.70$ V)相似, 归属于还原态/中间氧化态(leucoemeraldine/emeraldine)及中间氧化态/高氧化态(emeraldine/pernigraniline)氧化还原过程^[25], 而峰 III 的出现则与苯胺聚合不同, 只有在高电位聚合苯胺时才会出现峰 III^[26], 通常被认为是吩嗪的氧化还原峰, 而峰 III 也是掺杂苯胺聚合物能在中性溶液中导电的一个原因^[20]. 随着 pH 的增大, 三对氧化还原峰逐渐聚拢, pH=7 时完全重叠, 出现一对氧化还原峰. 该结果显示 PAOAA 在中性溶液中具有导电性, 表明 OAA 掺杂起到了提高苯胺中性条件下导电性的作用.

3.1.3 PAOAA 膜的结构表征

电化学共聚合得到 PAOAA 修饰膜, PAOAA 膜的形貌如图 5 所示. SEM 图中显示 PAOAA 膜呈珊瑚状结构, 径粗 250 nm 左右. 该结构与 Peng 等^[27]报道的在强酸性条件下电化学聚合得到的 PANI 结构较为类似, 但要较在 ITO 电极表面聚合 ANI/OAA(1:2)得到的 PAOAA 膜结构更为均匀^[28]. 同时, SEM 图中显

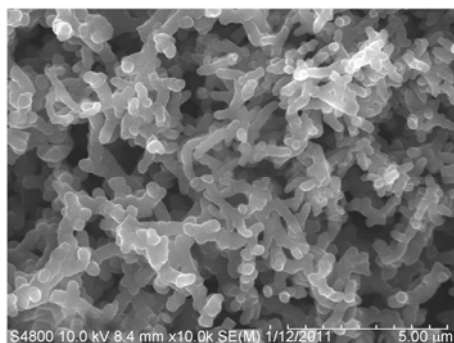


图 5 PAOAA 膜的 SEM 图

示 PAOAA 膜中存在许多空腔, 空腔的大小要远大于蛋白质分子的尺寸. 这种结构可有效的增大电极表面积, 便于固定更多的蛋白质.

3.2 PAOAA 膜修饰电极固定 Cat 的研究

3.2.1 PAOAA 膜负载 Cu^{2+} 的研究

金属离子螯合法中, 金属离子通过配位键合起到连接的作用. 因而金属离子的选择较为重要, 在运用金属离子螯合法对蛋白质的固定中, 配位能力较强的 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 是较为常用的螯合离子^[6, 12]. Rivas BL 等^[29]研究发现化学共聚 PAOAA 时 Cu^{2+} 可以更多的掺杂到聚合物中, 这表明 Cu^{2+} 与 PAOAA 之间存在较强的作用. 因而本实验采用 Cu^{2+} 作为螯合离子.

实验中我们对 Cu^{2+} 的固定时间进行了探讨, 通过测量不同 CuSO_4 浸泡时间下固定得到的 Cat 修饰电极在 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 溶液中 CV 曲线(见图 6), 依据峰电流的变化情况, 可判断 Cu^{2+} 的适宜固定时间约为 20 min. 此时 Cu^{2+} 的负载量为 0.49%(见图 3).

3.2.2 Cat 在金电极表面固定过程的 DPV 法研究

裸金电极、PAOAA- Cu^{2+} 、PAOAA- Cu^{2+} -Cat 修饰电极在 10 mmol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 溶液中的 DPV 曲线如图 7 所示. 裸金电极在溶液中的 DPV 峰电位为 0.168 V, 峰电流为 121 μA . 当 ANI/OAA 在电极表面电化学沉积形成膜后, 聚合物膜阻碍了 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 与电极间的接触, 使得 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 与电极间的直接电子传递受阻; 同时, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 通过聚合物与电极进行的间接电荷交换速度受聚合物自身电阻的影响

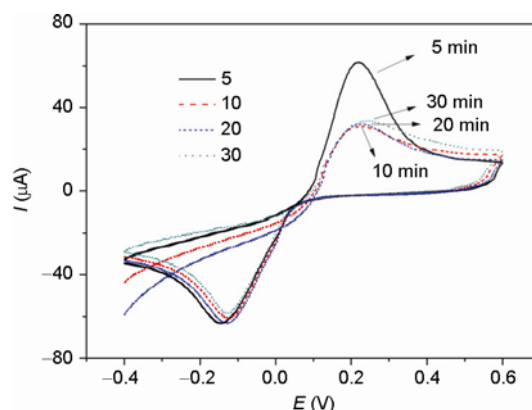


图 6 不同 CuSO_4 浸泡时长的 Cat 修饰电极在 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 溶液中 CV 曲线, 扫速为 70 mV/s

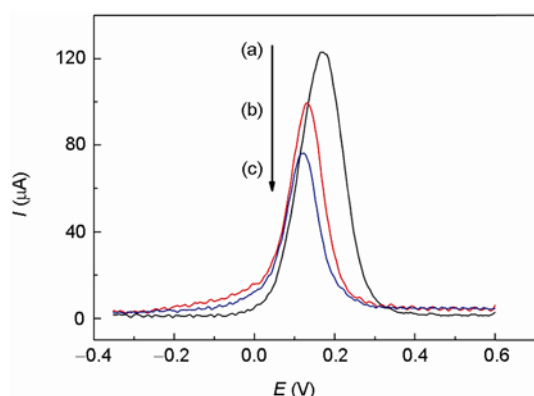


图 7 10 mmol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/4-$ (0.1 M KCl, pH 6.8 PBS) 溶液中的 DPV 曲线: 裸金电极 (a); PAOAA- Cu^{2+} 修饰电极 (b); PAOAA- Cu^{2+} -Cat 修饰电极 (c)

变慢, 使得 PAOAA- Cu^{2+} 修饰电极在 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/4-$ 溶液中的 DPV 扫描峰电流下降, 较裸金电极低 23.5%。PAOAA- Cu^{2+} -Cat 修饰电极在溶液中的 DPV 扫描峰电流进一步下降, 降到 71.8 μA 为 PAOAA- Cu^{2+} 修饰电极的 77.6%, 表明固定到修饰电极表面的 Cat, 进一步阻碍了电荷的传递, 出现 DPV 扫描峰电流降低的现象。而电极经修饰后出现峰电位位移现象, 这可能是受 PAOAA 自身电活性影响造成^[30]。

3.2.3 EIS 法研究金电极固定 Cat 的电化学过程

EIS 是一种有效的研究电极表面状态的电化学手段, 可以提供电极过程的许多重要参数。图 8 (a)、(b)、(c) 依次为 bare GE、GE/PAOAA- Cu^{2+} 、GE/PAOAA- Cu^{2+} -Cat 在 10 mmol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/4-$ 溶液中的电化学阻抗 Nyquist 图。图中方点线为实测值, 圆点线为以等效电路为模型通过 Zsimpwin 软件计算得到的值, 插图为 EIS 等效电路。图 8(a) 等效电路中 R_s 为溶液电阻、 R_{ct} 为电荷传递电阻、 C_{dl} 为双电层电容、 Z_w 为 Warburg 阻抗, 图 8 (b)、(c) 等效电路中 R_s 为溶液电阻、 Q_f 为膜电容 (考虑到弥散效应, 以常相位角元件代替电容元件)、 R_f 为膜电阻、 Q_{dl} 为双电层电容、 R_{ct} 为电荷传递电阻。表 1 中列出了计算得到的各电路元件数值。

裸金电极在 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/4-$ 溶液中的 EIS 谱在高频区呈半圆形, 半圆的直径代表电荷传递电阻 R_{ct} 为 296.9 Ω (图 8 (a)), 在低频区呈一直线。而 PAOAA- Cu^{2+} 、PAOAA- Cu^{2+} -Cat 修饰电极的 EIS 谱与裸电极不同, 前者在整个频率范围内均呈现出两个半圆形

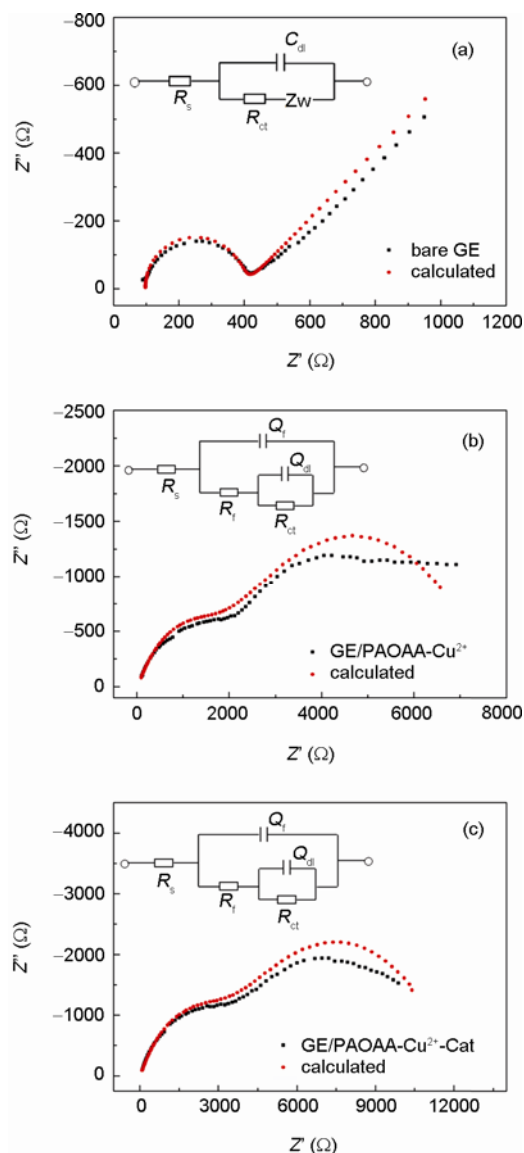


图 8 裸金电极 (a)、PAOAA- Cu^{2+} 修饰电极 (b)、PAOAA- Cu^{2+} -Cat 修饰电极 (c) 在 10 mmol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/4-$ (0.1 M KCl, pH 6.8 PBS) 溶液中的电化学阻抗 Nyquist 图, 方点为实测值, 圆点为模拟计算值, 插图为等效电路图; 实验电位为 0.194 V, 频率范围为 0.1~100 kHz, 振幅为 5 mV

EIS 谱, 这归属于电极表面膜的形, 膜表面的不光滑造成弥散效应使得半圆扁平。比较修饰电极 EIS 参数发现, PAOAA- Cu^{2+} -Cat 修饰电极的膜电阻 R_f 和电荷传递电阻 R_{ct} 分别为 4156、7894 Ω , 均大于 PAOAA- Cu^{2+} 修饰电极 (分别为 2225、5432 Ω), 表明 Cat 在 PAOAA- Cu^{2+} 修饰电极表面成功固定。Cat 的固定增加了聚合物膜的电阻同时阻碍了电荷的传递, 这于

表 1 电极在 10 mmol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 溶液中电化学阻抗谱的拟合参数

	Bare GE	GE/PAOAA- Cu^{2+}	GE/PAOAA- Cu^{2+} -Cat
$R_s (\Omega)$	97.79	28.78	23.80
$Q_f (\text{F})$		4.46×10^{-6}	3.50×10^{-6}
n_f		0.572	0.587
$R_f (\Omega)$		2225	4156
$Q_{dl} (\text{F})$		6.05×10^{-5}	4.12×10^{-5}
n_{dl}		0.546	0.577
$R_{ct} (\Omega)$	296.9	5432	7894
$C_{dl} (\text{F})$	4.72×10^{-7}		
Zw (Ω)	4.72×10^{-7}		

DPV 法研究结果一致.

3.2.4 LSV 法研究 Cat 修饰电极对 H_2O_2 的催化还原作用

Cat 催化 H_2O_2 还原反应存在电荷传递过程, 反应过程中产生电化学信号, 通过对电化学信号的探测可制备出用于 H_2O_2 检测的电化学传感器^[31]. 本文通过研究固定到电极表面的 Cat 对 H_2O_2 仍具有催化作用来说明此固定方法可以保留蛋白质的生物活性.

裸金电极在 20 mmol/L H_2O_2 、5 $\mu\text{g/mL}$ Cat 的 PBS 缓冲液中 LSV 曲线如图 9(a)所示, 从图中可以看出 Cat 催化 H_2O_2 反应在裸金电极上进行 LSV 扫描时出现一还原峰, 还原峰电位为 -0.272 V, 峰电流为 -149.2 μA . PAOAA- Cu^{2+} -Cat 修饰电极在 PBS 缓冲液中 LSV 扫描, 在 -0.272 V 左右并未出现峰(图 9c); 当在溶液中加入 H_2O_2 (浓度为 20 mmol/L) 后 LSV 扫描在 -0.293 V 处出现 H_2O_2 的催化还原峰, 峰电流为

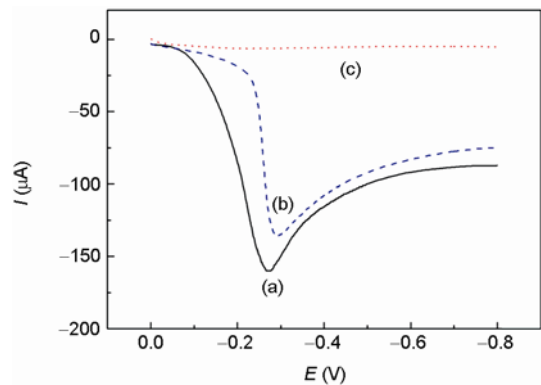


图 9 电极在含 0.1 M KCl, pH 6.8 的 PBS 缓冲液中 LSV 曲线(0 ~ -0.8 V): 裸金电极, 溶液中含 20 mmol/L H_2O_2 、5 $\mu\text{g/mL}$ Cat (a); PAOAA- Cu^{2+} -Cat 修饰电极, 溶液中含 20 mmol/L H_2O_2 (b); PAOAA- Cu^{2+} -Cat 修饰电极 (c)

-117.9 μA (图 9(b)). 表明 Cat 有效的固定到 PAOAA- Cu^{2+} 修饰电极表面, 并保留了对 H_2O_2 的催化还原活性.

本文制备的 Cat 修饰电极对 H_2O_2 的催化还原产生较强的电化学信号^[32], 这为将修饰电极作为探针, 对 H_2O_2 进行电化学检测提供了可检测的信号.

3.3 Cat 修饰电极对 H_2O_2 定量检测

我们以上述固定方法得到的 Cat 修饰电极作为探针, CA 法作为检测手段对 H_2O_2 进行滴定检测, 得到 $I-t$ 及相应的 $I-c$ 曲线如图 10(a)所示. 0~23 mmol/L 范围内随着 H_2O_2 浓度的增大, 电流随之变大. 用 origin 8.0 对 $I-c$ 曲线进行多项式拟合, 得到方程为: $I = 0.17555 + 2.70752c + 0.21020c^2 - 0.00557c^3$ (I : μA , c : mmol/L), $R^2 = 0.9997$. 表明以 Cat 修饰电极作为探针, CA 法作为电化学信号检测手段的电化学传感器可实现对 H_2O_2 定量检测.

同时我们对该固定方法得到的探针的可重复利用性进行了研究. 将构建好的探针用 1 M H_2SO_4 浸泡, 洗去 Cat. 酸洗之后的电极对 H_2O_2 进行滴定检测, 得到很弱的电流响应信号(图 10(b)). 酸洗后的修饰电极重新浸泡 CuSO_4 、Cat 以重新构建探针, 并再次对 H_2O_2 进行滴定检测, 得到的 $I-t$ 及相应的 $I-c$ 曲线如图 10(c)所示. 从图中可以看出其 $I-c$ 曲线基本和原始滴定值重合. 表明该法固定 Cat 得到的电化学探针不仅可对 H_2O_2 进行定量检测, 同时具有重建便捷、可重复使用的优点, 这一优点是许多 H_2O_2 电化学传感器所不具备的.

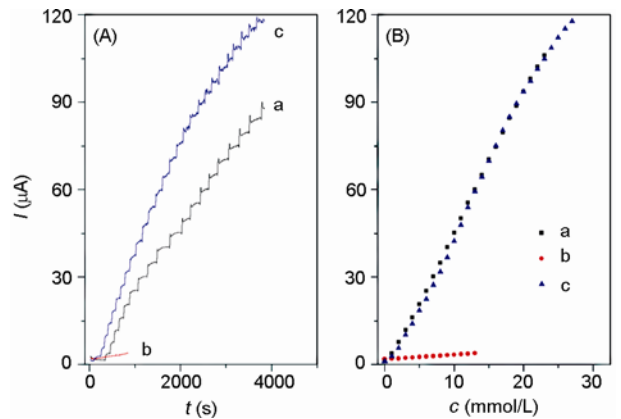


图 10 CA 法研究 H_2O_2 滴定的 $I-t$ 曲线(A): PAOAA- Cu^{2+} -Cat 修饰电极(a)、(a)中电极经 1M H_2SO_4 浸泡处理(b)、(b)中电极重新固定 Cat (c); H_2O_2 滴定的 $i-c$ 曲线 (B)

4 结论

本文采用电化学方法对 ANI/OAA 进行共聚合, 得到 PAOAA 修饰膜, 同时研究了膜的导电性. pH 7 时, 膜修饰电极 CV 扫描出现氧化还原峰, 表明中性溶液中共聚物膜具有导电性. 计算 EDS 数据得聚合物 PAOAA 中 ANI/OAA 的摩尔比 6.8:1, SEM 显示 PAOAA 膜呈珊瑚状结构, 并有许多空腔存在, 可有效的增大电极的表面积.

在 10 mmol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (0.1 M KCl, pH 6.8 PBS) 溶液中 DPV、EIS 法研究了 Cat 的固定过程. DPV 峰电流及 EIS 相关参数随着固定过程的规律性变化,

表明聚合物修饰膜的形成及 Cat 的成功固定. LSV 法研究 Cat 修饰电极对 H_2O_2 催化还原作用, 发现 Cat 修饰到电极表面后仍对 H_2O_2 有催化还原活性, 表明本文采用的固定方法可有效固定蛋白质并保留蛋白质的活性.

以构建的 Cat 修饰电极作为探针, 以计时电流法作为检测手段实现了对 H_2O_2 的定量检测, 同时该探针显示出良好的可重建性.

本文制备的 Cat 修饰电极作为探针可用于对 H_2O_2 进行定量检测, 同时为蛋白质在电极表面的简便快速固定以制备出各种分子器件提供了一种新途径.

参考文献

- Robert L, David AT. Designing materials for biology and medicine. *Nature*, 2004, 28: 487–492
- Figeys D, Pinto D. Proteomics on a chip: Promising developments. *Electrophoresis*, 2001, 22: 208–216
- Ioan MC, Petra MK, Cristina MW, Gunther K, David T, Stefan W, Ines F, Antonius AK. A new, versatile field immunosensor for environmental pollutants: Development and proof of principle with TNT, diuron, and atrazine. *Biosens Bioelectron*, 2005, 21: 354–364
- Javier RA, Enrique V, Ángel R, Alejandro B, Begoña A, Francisco SB, Marco MP. An impedimetric immunosensor based on interdigitated microelectrodes (IDμE) for the determination of atrazine residues in food samples. *Biosens Bioelectron*, 2008, 23: 1367–1373
- Noemí D, María JL, Arturo JM, Paulino TB. Aptamers as recognition elements for label-free analytical devices. *TrAC Trends Anal Chem*, 2008, 27: 437–446
- Johnson DL, Martin LL. Controlling protein orientation at interfaces using histidine tags: An alternative to Ni/NTA. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(7): 2018–2019
- Suman L, Martynas G, Robert T, Jacob P. Specific and stable fluorescence labeling of histidine-tagged proteins for dissecting multi-protein complex formation. *J Am Chem Soc*, 2006, 128, 17: 2365–2372
- Kenichi A, Frank G, Wolfgang K, Renate N, Sabina HP, Björn R, Joachim H. Oriented attachment and membrane reconstitution of his-tagged cytochrome c oxidase to a gold electrode: *In situ* monitoring by surface-enhanced infrared absorption spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(49): 16199–16206
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage GP. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 1975, 258(18): 598–599
- Vallina-García R, García-Suárez MdM, Fernández-Abedul MT, Javier Méndez F, Costa-García A. Oriented immobilisation of anti-pneumolysin fab through a histidine-tag for electrochemical immunosensors. *Biosens Bioelectron*, 2007, 23: 210–217
- Chen L, Chen ZT, Wang J, Xiao SJ, Lu ZH, Gu ZZ, Kang L, Chen J, Wu PH, Tang YC, Liu JN. Gel-pad microarrays templated by patterned porous silicon for dual-mode detection of proteins. *Lab Chip*, 2009, 9: 756–760
- Naoufel H, Serge C, Chantal G. Electrogeneration of a poly(pyrrole)-NTA chelator film for a reversible oriented immobilization of histidine-tagged proteins. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 5752–5753
- Imen H, Syrine C, Hafsa KY. Effect of electrical conditions on an impedimetric immunosensor based on a modified conducting polypyrrole. *Sens Actuators B*, 2010, 144: 323–331
- Schmitt L, Dietrich C, Tampé R. Synthesis and characterization of chelator-lipids for reversible immobilization of engineered proteins at self-assembled lipid interfaces. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 8485–8491
- Xi LL, Ren DD, Luo JW, Zhu Y. Electrochemical analysis of ascorbic acid using copper nanoparticles/polyaniline modified glassy carbon electrode. *J Electroanal Chem*, 2010, 650(1): 127–134
- Kausaite-Minkstimiene A, Mazeiko V, Ramanaviciene A, Ramanavicius A. Enzymatically synthesized polyaniline layer for extension of linear detection region of amperometric glucose biosensor. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26(2): 790–797
- Tian SJ, Liu, JY, Wang ZH, Knoll W, Park MK, Advincula R. Electroactivity of polyaniline multilayer films in neutral solution and their

- electrocatalyzed oxidation of β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide. *Adv Funct Mater*, 2003, 13(6): 473–479
- 18 Ngamna O, Morrin A, Moulton SE, Killard AJ, Smyth MR, Wallace GG. An HRP based biosensor using sulphonated polyaniline. *Synthetic Met*, 2005, 153: 1–3
- 19 Karyakin AA, Maltsev IA, Lukachova LV. The influence of defects in polyaniline structure on its electroactivity: Optimization of 'self-doped' polyaniline synthesis. *J Electroanal Chem*, 1996, 402: 217–219
- 20 Xu JJ, Zhou DM, Chen HY. Amperometric determination of ascorbic acid at a novel 'self-doped' polyaniline modified microelectrode. *Fresenius J Anal Chem*, 1998, 362: 234–238
- 21 Stilwell DE, Park SM. Electrochemistry of conductive Polymers III. Some physical and electrochemical properties observed from electrochemically grown polyaniline. *J Electrochem Soc*, 1988, 135: 2491–2496
- 22 Benyoucef A, Boussalem S, Ferrahi MI, Belbachir M. Electrochemical polymerization and *in situ* FTIRS study of conducting polymers obtained from o-aminobenzoic with aniline at platinum electrodes. *Synthetic Met*, 2010, 160: 1591–1597
- 23 Salavagione HJ, Acevedo DF, Miras MC, Motheo AJ, Barbero CA. Comparative study of 2-amino and 3-aminobenzoic acid copolymerization with aniline synthesis and copolymer properties. *J Polymer Sci Polymer Chem*, 2004, 42: 5587–5599
- 24 Brett CMA, Thiemann C. Conducting polymers from aminobenzoic acids and amino benzenesulphonic acids: Influence of pH on electrochemical behaviour. *J Electroanal Chem*, 2002, 538–539: 215–222
- 25 Huang WS, Humphrey BD, MacDiarmid AG. Polyaniline, a novel conducting polymer. Morphology and chemistry of its oxidation and reduction in aqueous electrolytes. *J Chem Soc, Faraday Trans 1*, 1986, 82: 2385–2400
- 26 Desilverstro J, Scheifele W. Morphology of electrochemically prepared polyaniline. Influence of polymerization parameters. *J Mater Chem*, 1993, 3: 263–272
- 27 Peng XY, Luan F, Liu XX, Dianond D, Lau KT. pH-Controlled morphological structure of polyaniline during electrochemical deposition. *Electrochim Acta*, 2009, 54: 6173–6177
- 28 Thiemann C, Brett CMA. Electrosynthesis and properties of conducting polymers derived from aninobenzoic acids and from aminobenzoic acids. *Synthetic Met*, 2001, 123: 1–9
- 29 Rivas BL, Sánchez CO. Poly(2-) and (3-aminobenzoic acids) and their copolymers with aniline: Synthesis, characterization, and properties. *J Appl Polym Sci*, 2003, 89: 2641–2648
- 30 Zhang W, Yang T, Li X, Wang DB, Jiao K. Conductive architecture of Fe_2O_3 microspheres/self-doped polyaniline nanofibers on carbon ionic liquid electrode for impedance sensing of DNA hybridization. *Biosens Bioelectron*, 2009, 25: 428–434
- 31 Gao YY, Shi GQ. Highly sensitive catalase electrode based on polypyrrole films with microcontainers. *Chin J Polymer Sci*, 2006, 24: 579–584
- 32 Jiang HJ, Yang H, Akins DL. Direct electrochemistry and electrocatalysis of catalase immobilized on a SWNT-nanocomposite film. *J Electroanal Chem*, 2008, 623: 181–186

Electrochemical study of Catalase immobilized on PAOAA-modified gold electrode

ZHANG ZhiJun¹, LI Xi¹, XIAO LiangHong¹, ZOU ChuanLiang¹ & ZHANG ChaoCan²

¹ School of Science, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China

² School of Materials Science and Engineering, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China

Abstract: A new method for protein immobilization based on metal-ion chelation was reported in this paper. First, conductivity film poly(aniline-*co*-2-aminobenzoic acid) (PAOAA), which is able to conductive in neutral solution, was prepared by electrochemical deposition. The film was characterized by scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray (EDS). Then Cu^{2+} ions were adsorbed on the film as the chelating ion to immobilize catalase (Cat). The molar amount of Cu^{2+} ions in the polymer was 0.49% measured by EDS. Differential pulse voltammetry (DPV) was used to research the immobilization of Cat. The results showed that as PAOAA film forming and Cat immobilizing on the electrode surface, the peak current in 10 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) decreased from 121 μA (bare GE) to 92.6 and 71.8 μA respectively. This indicated that PAOAA film and Cat on the electrode could impede the charge transfer. This conclusion is same as the result of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) studying in the process of Cat immobilization. The catalytic activity of immobilized Cat for hydrogen peroxide was studied by linear sweep voltammetry (LSV) method. Finally, chronoamperometry (CA) as the detection method, the Cat-modified electrode was able to quantitatively detect hydrogen peroxide. Moreover the Cat-modified electrode could be reuseable.

Keywords: poly(aniline-*co*-2-aminobenzoic acid), electrochemical polymerization, protein immobilization, metal ion chelation, Catalase