

细胞色素 c 在 *L*-半胱氨酸自组装膜电极上的电化学行为

孙一新 王升富*

(湖北大学化学与材料科学学院 武汉 430062)

摘 要 采用循环伏安法、交流阻抗谱探讨了 *L*-半胱氨酸自组装膜修饰金电极表面细胞色素 c (Cyt c) 的电化学行为。Cyt c 在该电极表面的平均吸附量 $\Gamma = 1.366 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ 。紫外-可见吸收光谱法和电化学方法证实, 通过静电作用固定在 *L*-半胱氨酸自组装膜电极上的 Cyt c 保持了良好的生物活性和电化学活性。在低扫速时峰电流与扫速呈线性关系, 表明 Cyt c 与电极之间是表面过程。通过交流阻抗谱求得在细胞色素 c/*L*-半胱氨酸膜修饰金电极上的标准异相电子迁移速率常数 k_s^0 为 $7.529 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ 。吸附到 *L*-半胱氨酸自组装膜电极表面的 Cyt c 对 H_2O_2 的还原表现出良好的电催化效应, 初步研究了电催化机理。Michaelis-Menten 常数为 $K_m^{\text{app}} = 1.21 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 与其它蛋白质相比, 吸附在 *L*-Cys/Au 膜电极上的 Cyt c 对 H_2O_2 有较好的亲和力。

关键词 细胞色素 c *L*-半胱氨酸 H_2O_2 金电极

中图分类号: O657.1; O652.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2005)03-0295-05

细胞色素 c (Cyt c) 是一种氧化还原蛋白质, 在真核细胞的生物氧化还原过程中起传递电子的作用。自 1977 年 Hill 等^[1]和 Kuwana 等^[2]分别报道了 Cyt c 在 4- μ -联吡啶修饰金电极和掺锡氧化铟电极上的可逆的电化学行为之后, 这一领域的研究方兴未艾^[3~5]。由于 Cyt c 在金电极上难以实现氧化还原, 因此, 加速 Cyt c 与电极之间的电子传递, 电极的修饰至关重要。最近, Pang 等^[6]报道了 DNA 膜修饰金电极上的 Cyt c 直接电化学行为, 并探讨了 DNA 修饰金电极定量测定 Cyt c 的条件。自组装膜类似生物膜结构, 具有良好的生物兼容性, 能保持 Cyt c 的原始构象和生物活性, 同时可以调节 Cyt c 的活性位点与电极表面的相对位置, 使 Cyt c 处于有利于电子传递的环境。利用自组装膜电极实现 Cyt c 与电极之间的直接电子传递已见文献报道^[7~9]。*L*-半胱氨酸 (*L*-Cys) 既含有巯基, 又是一种重要的氨基酸, 利用其特殊的生物兼容性和化学活性, 将其自组装到电极表面, 实现 Cyt c 直接电子转移意义很大。目前, Cyt c 在 *L*-Cys 上的直接电化学研究少见文献报道。本文在前期研究工作^[10~12]的基础上, 采用循环伏安法、交流阻抗谱探讨了吸附在 *L*-Cys 自组装膜修饰金电极 (*L*-Cys/Au SAMs) 上的 Cyt c 的电化学行为。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

CHI660 电化学系统 (CHI 公司, 美国), 三电极电解池: Au 盘 ($\phi = 2 \text{ mm}$) 或 *L*-Cys/Au SAMs 为工作电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝为对电极, 320-S 酸度/离子计 (METTLER-TOLEDO, 瑞士); Lambda17 紫外-可见分光光度计 (Perkin Elmer 公司)。

马心细胞色素 c (Sigma 公司, 美国), 其它试剂均为分析纯, 实验用水为石英二次蒸馏水。

1.2 Cyt c/*L*-Cys/Au 膜修饰电极的制备

按文献 [10] 方法制备 *L*-Cys/Au SAMs。将此电极插入 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ Cyt c 的 0.030 mol/L 磷酸盐缓冲液中 12 h (冰箱中 4°C) 后, 取出用磷酸盐缓冲液冲洗, 置于 $\text{pH} = 7.0$ 的 PBS 缓冲液中待用。

1.3 实验方法

将三电极体系插入 0.030 mol/L PBS 缓冲溶液 ($\text{pH} = 7.0$) 中组成化学电池, 在 $+0.4 \sim -0.3 \text{ V}$ 间记录循环伏安 (CV) 图, 扫描速度为 100 mV/s , 所有实验均在室温条件下进行。

交流阻抗谱测试在 0.030 mol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 + 0.010 \text{ mol/L}$ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($\text{pH} = 7.5$) PBS 溶液中进行。

行。交流极化振幅:10 mV, 频率:1 Hz~100 000 Hz。

2 结果与讨论

2.1 Cyt c 与 L-Cys 之间相互作用的紫外-可见吸收光谱

血红素蛋白质在 410 nm 左右 Soret 吸收峰位置的改变可作为蛋白质是否变性的重要标志,它对在血红素辅基附近的多肽链构象的改变十分敏感^[13]。从图 1 紫外-可见吸收光谱看出, Cyt c 溶液和 Cyt c 与 L-Cys 的混合溶液的最大吸收波长分别为 408 和 412 nm。Soret 带稍有红移,可能是由于 L-Cys 的加入,使 Cyt c 中血红素暴露程度有一些增加引起的。

2.2 膜电极的电化学表征

2.2.1 膜电极在 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 中的循环伏安行为

由图 2 可知 L-Cys/Au 在 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 溶液中的峰电流明显小于裸金电极,说明 L-Cys 在金电极表面形成了一层较致密的薄膜,由于 L-Cys 的等电点为 5.02,在 pH = 7.0 的 PBS 缓冲溶液中, L-Cys/Au 膜带负电荷,对荷负电的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 探针分子起排斥作用,故峰电流减小。当荷正电的 Cyt c 吸附在 L-Cys/Au 修饰电极上时,形成 Cyt c/L-Cys/Au 膜电极,进一步增大了薄膜的厚度,从而加大了电子在溶液和电极表面之间的传递阻力,因而使峰电流继续减小,氧化还原的可逆性亦变坏。

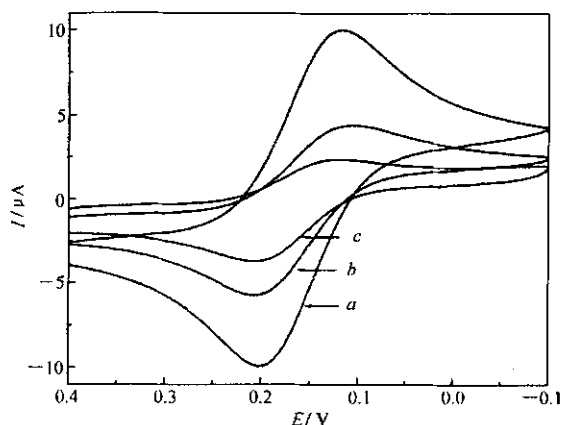


图 2 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 中的循环伏安图

Fig. 2 Cyclic voltammograms of (a) bare gold, (b) L-Cys/Au SAM and (c) Cyt c/L-Cys/Au in a solution of 1.0×10^{-3} mol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0.10 mol/L PBS (pH = 7.0)

2.2.2 电化学交流阻抗谱 由图 3 可见,在 pH = 7.0 的 PBS 中, L-Cys 中带负电荷的羧基排斥 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 阻抗明显增大, L-Cys 修饰层对电荷传输有阻碍作用。当吸附 Cyt c 后,荷正电的 Cyt c 与 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 相吸引, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 容易到达 Cyt c 表面,但由于 Cyt c 是生物大分子,阻碍了 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 到达金电极表面,因而阻抗继续加大。根据方程 $R_{ct} = (RT/n^2 F^2 A k_s^0 \chi) \{1/c_0^{(1-\alpha)} c_R^\alpha\}^{1/4}$ ^[14] 求得标准异相电子迁移速率常数 k_s^0 如表 1。其中 α 为电子转移系数,根据 Laviron 方程式^[15] 计算 $\alpha = 0.54$ (c_0 和 c_R 分别是铁氰根和亚铁氰根离子的浓度 (mol/cm³), n 为氧化还原电对的电子转移数, F 为法拉第常

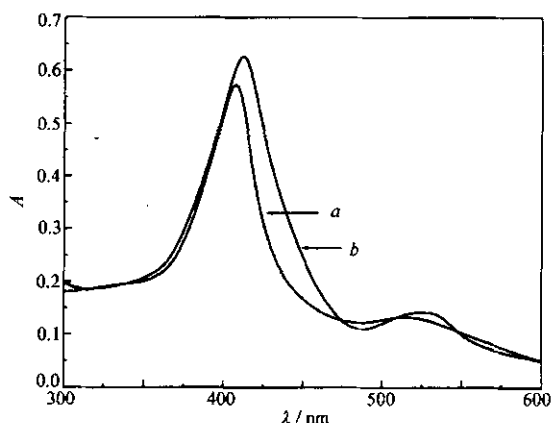


图 1 紫外光谱图

Fig. 1 UV-vis absorption spectra of (a) Cyt c (6.5×10^{-6} mol/L) and (b) L-Cys (1.0×10^{-3} mol/L) + Cyt c (6.5×10^{-6} mol/L) in PBS (pH = 7.0)

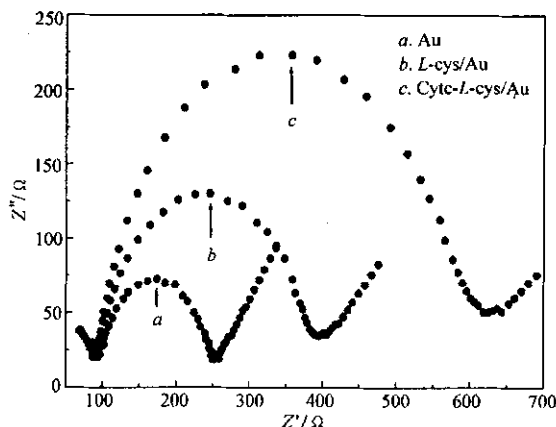


图 3 交流阻抗谱

Fig. 3 Control of modification steps of gold electrodes by the impedance measurement in a mixture of 0.030 mol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ + 0.010 mol/L $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ + pH = 7.5 PBS, Nyquist-plot

数 T 为室温 (298 K) , A 为电极面积)。从表 1 可以看出 , 在 $L\text{-Cys}/\text{Au}$ 修饰电极上 , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 的电荷传递电阻 R_{ct} 明显增大 , 标准异相电子转移速率常数 k_s^0 也降低了 , 说明形成的 $L\text{-Cys}/\text{Au}$ 膜电极表面的负电荷阻碍了探针分子的电荷传输 , 从而引起 R_{ct} 的增大和 k_s^0 的减小。Cyt c 静电结合在 $L\text{-Cys}/\text{Au}$ 膜电极上 , 探针分子的电荷传输进一步受阻 , R_{ct} 继续加大 , k_s^0 进一步减小。

2.3 膜电极的电化学行为

2.3.1 Cyt c 在 $L\text{-Cys}/\text{Au}$ SAMs 上的循环伏安行为 从图 4 可以看出 , $L\text{-Cys}/\text{Au}$ 膜电极在 Cyt c 溶液中出现了 1 对稳定的氧化还原峰 (图 4 曲线 a) , 氧化峰电位和还原峰电位分别为 0.092 和 -0.138 V , 峰电位差为 0.230 V , 式电位为 -0.023 V , 与 Cyt c 血红素 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 电对的值接近^[16] , 且氧化峰和还原峰峰电流基本相等 , 是一个准可逆的电化学过程。由于 $L\text{-Cys}/\text{Au}$ 膜电极在底液中于研究的电位范围内无氧化还原峰出现 , 这表明该氧化还原峰源于 Cyt c 中的血红素基团。

将 Cyt c/ $L\text{-Cys}/\text{Au}$ 电极置于 pH = 7.0 的 PBS 空白底液中也出现稳定的伏安峰 (图 4 曲线 b) 。氧化峰电位和还原峰电位分别为 0.101 和 -0.111 V , 峰电位差为 0.212 V , 式电位为 -0.005 V。而裸金电极在空白底液和 Cyt c 溶液中均未出现氧化还原峰。说明 Cyt c 在 $L\text{-Cys}/\text{Au}$ 膜电极上发生了准可逆的电化学反应。这是由于在 pH = 7.0 的 PBS 中 $L\text{-Cys}$ 带负电 , Cyt c 以带正电荷的一端与之静电结合 , 而带正电荷的氨基酸残基分布在 Cyt c 分子的反应活性区域附近^[17] , 故 $L\text{-Cys}$ 和 Cyt c 通过静电作用结合后 , 缩短了 Cyt c 血红素与电极之间的距离 , 加速了电子传递过程 , 从而实现其准可逆的电化学反应。

2.3.2 扫速的影响 图 5 表明 , Cyt c/ $L\text{-Cys}/\text{Au}$ 电极在 pH = 7.0 的 PBS 中 , 改变扫速 , 峰电位基本不变 , 在 5 ~ 200 mV/s 范围内 , 峰电流随扫速的增加而增大 , 且与扫速呈良好的线性关系。线性关系为 : $I_{\text{pc}} = 9.117 \times 10^{-9} + 4.992 \times 10^{-6}v$, 线性相关系数 $R = 0.9996$ 。这表明 Cyt c 的电化学反应具有表面电化学特征。根据 Laviron 方程式^[15] $I_p = n^2 F^2 A \Gamma v / 4RT = nFQv / 4RT$, 计算 Cyt c 在 $L\text{-Cys}/\text{Au}$ 表面的平均吸附量 $\Gamma = 1.366 \times 10^{-10}$ mol/cm²。若 Cyt c 的直径按 3.4 nm 计算^[17] , 则电极表面 Cyt c 的理论吸附量 $\Gamma_0 = 1.43 \times 10^{-11}$ mol/cm² , 很明显吸附在 $L\text{-Cys}/\text{Au}$ 电极上的 Cyt c 的量大于单分子层^[18,19] , 这说明吸附到 $L\text{-Cys}$ 上的 Cyt c 量得到了明显的增加。

2.3.3 pH 值和离子强度的影响 图 6 显示了 Cyt c/ $L\text{-Cys}/\text{Au}$ 膜电极在不同 pH 值 (5.0 ~ 9.0) 的缓冲溶液中峰电流的变化。结果表明 , Cyt c/ $L\text{-Cys}/\text{Au}$ 在不同的 pH 条件下 , 其式电位基本不变 , 但峰电流变化较大 , 且在 pH = 7.0 的 PBS 中 , 氧化还原峰电流最大。可能是由于在不同 pH 条件下 , Cyt c 分子的表面电荷分布发生了改变 , 影响其与 $L\text{-Cys}$ 的静电作用的结果。

通常氧化还原蛋白质的电子传递过程受离子强度的影响较大 , 特别是在以长链化合物为修饰剂的自组装膜修饰电极表面。改变离子强度 , 使缓冲溶液的浓度在 0.03 ~ 0.20 mol/L 范围内变化。实验结果表明 , 在该浓度范围内 , Cyt c 在 $L\text{-Cys}/\text{Au}$ 膜电极上的电化学行为受离子强度的影响不大 , 其式电位和峰电流变化很小。当缓冲溶液的浓度大于 0.20 mol/L 时 , 峰电流明显下降 , 而且离子强度越大 , 氧化还原峰的可逆性越差。可能的原因是高离子强度影响了 Cyt c 中赖氨酸残基与半胱氨酸的羧基之间的结合位点 , 削弱了它们之间的静电作用力 , 使电子传递不可逆^[5]。

表 1 电极的电化学参数
Table 1 Electrochemical parameters of Au electrodes

Electrode	R_{ct}/Ω	$k_s^0/(\text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$
Au	150	2.761×10^{-3}
$L\text{-Cys}/\text{Au}$	300	1.380×10^{-3}
Cyt c/ $L\text{-Cys}/\text{Au}$	550	7.529×10^{-4}

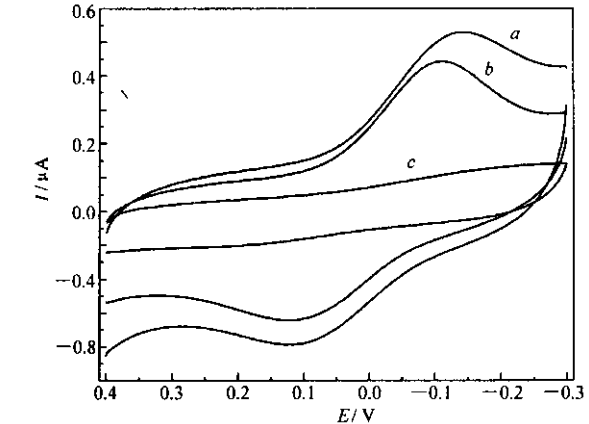


图 4 磷酸盐缓冲溶液中的循环伏安图
Fig. 4 Cyclic voltammograms in PBS (pH = 7.0)
a. $L\text{-Cys}/\text{Au}$ (5.0×10^{-5} mol/L Cyt c) ,
b. Cyt c/ $L\text{-Cys}/\text{Au}$ and c. $L\text{-Cys}/\text{Au}$

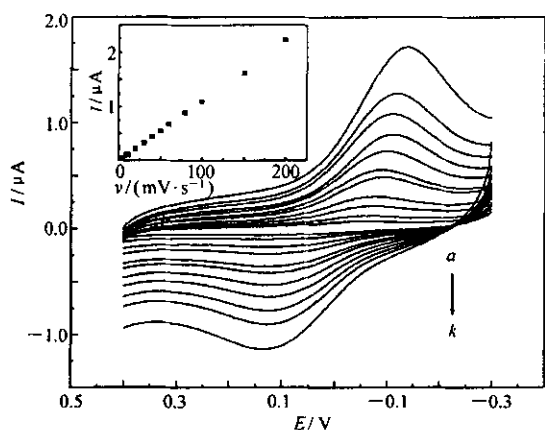


图5 Cyt c/L-Cys/Au 电极上的扫速与峰电流的关系曲线

Fig. 5 Cyclic voltammograms of Cyt c/L-Cys/Au in 0.10 mol/L PBS (pH = 7.0)

Scan rate/($\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$) a→k 5, 10, 20, 30, 50, 60, 80, 100, 125, 150, 200

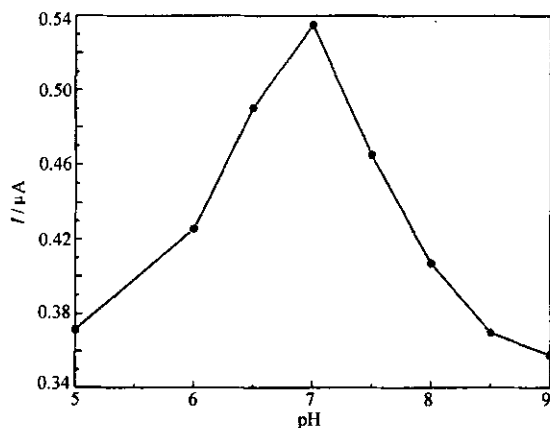
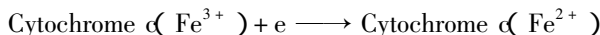
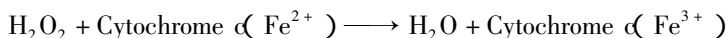


图6 pH 值对细胞色素 c 还原峰电流的影响

Fig. 6 Influence of pH on the cathodic peak current of cytochrome c ($5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)

2.4 Cyt c/L-Cys/Au 膜电极对 H_2O_2 的电催化效应

在 pH = 7.0 的 PBS 中加入 $1.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ H_2O_2 , 发现阴极峰电流明显增加, 而且峰电流随 H_2O_2 浓度的增加而增大, 阳极峰电流相应降低, 表明 Cyt c/L-Cys/Au 膜电极对 H_2O_2 的还原有电催化作用 (图 7A)。其电催化反应机理如下:



在 $6 \times 10^{-4} \sim 4.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 范围内, H_2O_2 浓度与催化电流呈线性关系 ($R = 0.9992$)。根据 Lineweaver-Burk 方程式^[20] 结果见图 7B, 求得 Michaelis-Menten 常数 $K_m^{\text{app}} = 1.21 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 说明吸附在 L-Cys/Au 膜电极上的细胞色素 c 对 H_2O_2 有较好的亲和力。

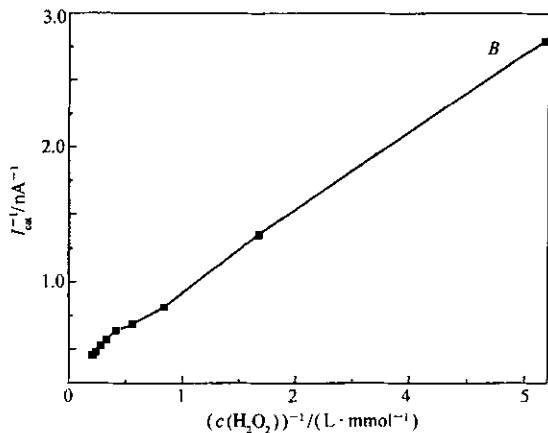
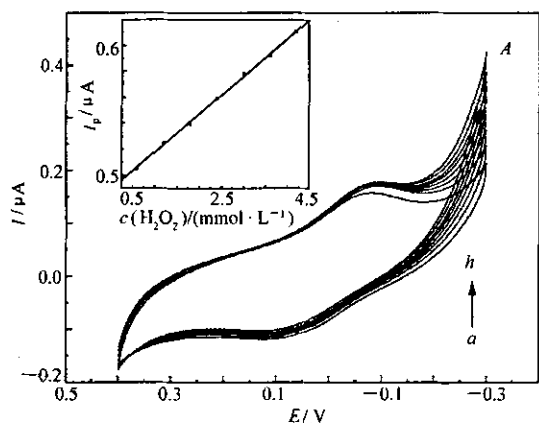


图7 H_2O_2 在 Cyt c/L-Cys/Au 电极上的循环伏安曲线 (A) 和催化电流按 Lineweaver-Burk 方程式处理的结果 (B)

Fig. 7 (A) Cyclic voltammograms of hydrogen peroxide at Cyt c/L-Cys/Au electrode in 0.1 mol/L PBS (pH = 7.0) at a scan rate of 10 mV/s without H_2O_2 and with $0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ H_2O_2 (a→h)

(B) Data analysis of electrocatalytic currents according to Lineweaver-Burk equation

因此, Cyt c 在 L-Cys/Au 膜电极上表现为表面控制的准可逆的电化学行为。L-Cys/Au 膜电极一方面加快了 Cyt c 与电极间的电子传递速度, 另一方面, 避免了 Cyt c 在裸金电极表面的吸附变性。固定在 L-Cys/Au 膜电极上的 Cyt c 对 H_2O_2 有电催化还原作用。

参 考 文 献

- 1 Eddowes M J ,Hill H A O. *J Chem Soc Commun*[J] ,1977 771
- 2 Yeh P ,Kuwana T. *Chem Lett*[J] ,1977 145
- 3 Szucs A ,Novak M. *J Electroanal Chem*[J] ,1995 383 75
- 4 Wu Z Y ,Wang B Q ,Cheng Z L , *et al.* *Biosensors Bioelectronics*[J] 2001 16 47
- 5 Avila A ,Gregory B W ,Niki K. *J Phys Chem H*[J] 2000 104 2 759
- 6 Liu H H ,Lu J L ,Zhang M , *et al.* *J Electroanal Chem*[J] 2003 544 93
- 7 QU Xiao-Gang(曲晓刚) ,SUN Gong-Quan(孙公权) ,YANG Hu(杨辉) , *et al.* *Electrochemistry*(电化学) [J] ,1998 , 4(3) 260
- 8 GU Ren-Ao(顾仁敖) ,QIAO Zhuan-Hong(乔专虹) ,QU Xiao-Gang(曲晓刚) , *et al.* *Chin J Chem Phys*(物理化学学报) [J] ,1996 12(7) 654
- 9 Ruzgas T ,Wong L ,Gaigalas A K , *et al.* *Langmuir*[J] ,1998 14 7 298
- 10 WANG Sheng-Fu(王升富) ,DU Dar(牡丹) ,CAI Huo-Cao(蔡火操) , *et al.* *Chin J Anal Chem*(分析化学) [J] 2001 , 29(11) 1 288
- 11 WANG Sheng-Fu(王升富) ,Du Dar(牡丹) ,ZOU Qi-Chao(邹其超) . *Chin J Chem Phys*(物理化学学报) [J] 2001 , 17(12) 1 102
- 12 Wang S F ,Du D ,Zou Q C. *Talanta*[J] 2002 57(4) 687
- 13 Irace G ,Bismuto E ,Savy F , *et al.* *Arch Biochem Biophys*[J] ,1986 244 459
- 14 Bard A J ,Faulkner W R ,Edrs. *Electrochemical Methods :Fundamentals and Applications*[M]. New York :Wiley ,1980
- 15 Laviron E. *J Electroanal Chem*[J] ,1979 100 263
- 16 Hawkridge F M ,Kuwana T. *Anal Chem*[J] ,1973 45 1 021
- 17 QU Xiao-Gang(曲晓刚) ,QIAO Zhuan-Hong(乔专虹) ,LU Tian-Hong(陆天虹) , *et al.* *Chin J Anal Chem*(分析化学) [J] ,1994 22(12) 1 267
- 18 Ju H X ,Liu S Q ,Ge B X , *et al.* *Electroanalysis*[J] 2002 14(2) 141
- 19 Xiao Y ,Ju H X ,Chen H Y. *Anal Biochem*[J] 2000 278 22
- 20 Kamin R A ,Willson G S. *Anal Chem*[J] ,1980 52 1 198

Electrochemical Behavior of Cytochrome c at L-Cysteine Self-assembled Membrane Electrode

SUN Yi-Xin , WANG Sheng-Fu *

(College of Chemistry and Material Science ,Hubei University ,Wuhan 430062)

Abstract The electrochemical behavior of horse-heart cytochrome c (Cyt c) adsorbed on L-cys/Au electrode surface was investigated by means of cyclic voltammetry , ac impedance and ultraviolet spectrometric measurements. The average adsorbance of Cytochrome c on the membrane electrode surface is 1.366×10^{-10} mol/cm². Cyt c immobilized on L-Cys/Au SAMs by electrostatic interaction maintains biological activity and electrochemical activity. The voltammetric peak current is in linear relation with the potential sweep rate at a low scan rate. Cyt showed a surface-controlled electrode process. The standard heterogeneous electron transfer rate constant calculated *via* ac impedance spectrum is 7.529×10^{-4} cm/s. The adsorbed Cyt c could electrocatalyze the reduction of hydrogen peroxide. The relationship between the catalytic current and H₂O₂ concentration exhibits a Michaelis-Menten kinetic mechanism for the electrocatalytic process and the constant K_m^{app} value was found to be 1.21×10^{-3} mol/L. The cytochrome c adsorbed on L-Cys/Au SAMs exhibits a comparably high affinity for H₂O₂.

Keywords cytochrome c L-Cysteine H₂O₂ gold electrode