

辣根过氧化物酶在海藻酸钠水凝胶中的电化学和电催化特性

李业梅^{a,b,*} 刘光东^a 张志凌^b

(^a 鄱阳师范高等专科学校化学系 丹江口 442700; ^b 武汉大学化学系 武汉)

摘 要 用海藻酸钠(SA)将辣根过氧化物酶(HRP)固定到热裂解石墨电极表面,制备了HRP-SA膜修饰电极。研究表明,包埋在SA膜中的辣根过氧化物酶可与电极直接传递电子,在磷酸盐缓冲溶液和磷酸盐/乙醇混合溶液中均可得到1对辣根过氧化物酶辅基血红素Fe(Ⅲ)/Fe(Ⅱ)电对的可逆氧化还原峰。其式电势随溶液pH值增加而负移,呈线性关系,这说明辣根过氧化物酶的电子传递过程伴有质子的转移。考察了HRP-SA膜修饰电极对O₂气、H₂O₂、NO和六氯乙烷的电催化性质。

关键词 辣根过氧化物酶 海藻酸钠 直接电化学 电催化

中图分类号:O646

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2006)04-0399-05

电化学酶传感器的研制在临床医学^[1]、食品饮料工业、化学和医药工业、农业、环境监测及军事等领域受到广泛关注。这些领域中所需检测的物质大多为不溶于水或在水中溶解度较小的有机物,这种检测往往需要在有机溶剂或水/有机混合溶剂中进行。研究表明,在有机溶剂或水/有机混合溶剂中,一些酶仍具有较强的催化活性^[2,3],甚至有的酶表现出更高的催化效率或新的催化活性。依此可构筑有机相电化学酶传感器,用于某些水溶性较差的物质的测定。有机相电化学酶电极的操作条件要求较高^[4]。一是有机溶剂会改变酶的构象,导致酶催化活性的降低;二是有机溶剂的导电性能差,影响测定的灵敏度。而水/有机混合溶剂却可在一定程度上解决上述问题,一方面可为保持酶的活性提供所需水环境,溶解适宜的支持电解质;另一方面有机溶剂能增加疏水性物质的溶解度,提高酶对疏水性物质的催化效率^[5]。因此研究酶电极在水/有机混合溶剂中的电化学行为和电催化性质,具有理论和实际应用价值。

辣根过氧化物酶(HRP, E. C. 1. 11. 1. 7)是一种含铁卟啉作为强键合辅基的分子量约为44 000的糖蛋白。室温下很稳定,且容易得到,价格便宜,是商品化较早、应用较为广泛的一种酶制剂。随着酶固定化技术的发展和检测方法的应用,HRP已被广泛地应用于酶联免疫分析和生物传感器的构筑。目前已有多种方法将HRP固定在不同的电极上,用于检测H₂O₂、酚类化合物、胺类化合物以及HRP抑制剂等^[6-9],但用海藻酸钠水凝胶将辣根过氧化物酶固定到热裂解石墨电极表面,并研究其电化学和电催化特性还未见报道。多糖是一类重要的生物大分子,在酶的活性保持方面起着重要作用。海藻酸钠(Sodium Alginate, SA)是由L-葡萄糖醛酸与D-甘露糖醛酸组成的高分子线性糖醛酸。在酶或细胞固定技术中,海藻酸钠因其操作过程简单、无毒、安全、价格低廉和材料易得,常作为包埋材料。本文研究了海藻酸钠水凝胶膜中的辣根过氧化物酶在缓冲溶液和缓冲溶液/有机混合溶液中的直接电化学和酶催化行为,探讨了HRP-SA膜修饰电极用于O₂气、H₂O₂、亚硝酸根和六氯乙烷测定的可能性。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

CHI 660型电化学工作站(上海辰华仪器公司),SY 1200型超声仪(上海声源超声波仪器设备有限公司)。

辣根过氧化物酶(HRP, $A_{403\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}, R_z = 3.1$, 上海东风生物制品公司)溶于10 mmol/L pH = 7.0

2005-05-08 收稿, 2005-10-08 修回

湖北省教育厅重点科研项目[2005560002]

通讯联系人: 李业梅, 女, 1964年生, 副教授; E-mail: yemeil66@126.com; 研究方向: 生物电化学

的磷酸盐缓冲溶液中,制成 7.82×10^{-5} mol/L 的 HRP 溶液(用紫外-可见光谱测定)。缓冲溶液:酒石酸盐 pH 值为 3.0~6.0,磷酸盐 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ (PBS) pH 值为 6.0~8.0,硼砂 pH 值为 8.0~10.0(离子强度 I 均为 0.1 mol/L)。海藻酸钠(SA, Sigma, 0.2 g)溶解于 100 mL 沸水中配成质量分数为 0.2% 的水凝胶,与 HRP 溶液混合前,加入 N,N -二甲基甲酰胺(DMF, 分析纯),加速凝胶化过程。 H_2O_2 浓度用 KMnO_4 法标定, H_2O_2 贮备液在 4 °C 条件下保存,每次使用前用水稀释。水/有机混合溶液为 0.1 mol/L 的 $V(\text{PBS}):V(\text{无水乙醇}) = 1:1$ 的混合液。其它试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 HRP-SA 膜修饰电极的制备 热裂解石墨电极(EPG)在 6# 金相砂纸上打磨后,再用 0.05 μm 粒度的 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 悬浊液在抛光布上抛光,洗去表面污物,在二次水浴中超声清洗 3 次,每次 2~3 min。将 $V(\text{SA}):V(\text{DMF}) = 4:1$ 的混合液与 HRP 溶液等体积混合,取 10 μL 混合溶液均匀涂布在新处理的电极表面,罩上有孔的小管,室温干燥约 8 h。制备的修饰电极表示为 HRP-SA/EPG。

1.2.2 电化学测量 电解池由参比电极腔和电化学反应腔(体积约为 400 μL) 2 部分构成,中间由鲁金(luggin)毛细管连接。实验采用三电极体系,参比电极为饱和甘汞电极(SCE),辅助电极为铂丝网,工作电极为 HRP-SA/EPG 电极。实验前在支持电解质溶液中通高纯 N_2 气除 O_2 ,测量在 N_2 气气氛中进行。

2 结果与讨论

2.1 直接电化学行为

裸热裂解石墨的棱面(EPG)电极和 SA/EPG 电极在磷酸盐缓冲溶液、磷酸盐/乙醇混合溶液和 HRP 溶液中均没有出现循环伏安峰。而磷酸盐缓冲溶液和磷酸盐/乙醇混合溶液中,在 HRP-SA/EPG 上均可得到 1 对可逆的氧化还原峰(图 1)。由式电势的值可知,此对氧化还原峰可归属于 HRP 中血红素 $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ 电对^[10]。其氧化峰电流和还原峰电流的比值约为 1,且氧化峰电流和还原峰电流均与扫描速度成正比,而改变扫描速度,氧化峰和还原峰的电量(Q)基本没有变化。实验结果表明,此电极过程是固定在电极表面的 HRP 与电极之间的电子交换过程。

根据循环伏安法(CV)和方波伏安法(SWV)^[11,12]的实验数据可计算得到电化学反应的热力学和动力学参数(如表 1 所列)。

在磷酸盐/乙醇混合溶液(pH = 7.0)中,HRP 的峰电势差(ΔE)较小,电子传递速率常数(k)较大,说明降低溶液的极性可以提高 HRP 与电极间的电子传递速度。这是因为血红素蛋白质的氧化还原过程伴随着水分子与 $\text{Fe}(\text{III})$ 的结合和离解,表现为电化学-化学(EC)过程^[13],制约了电子传递的速度。降低溶液的极性,能削弱 $\text{HRPFe}^{\text{III}}$ 及 HRPFe^{II} 的水合效应和氨基酸残基与血红素间的氢键,从而降低 HRP 电子传递的重组能。

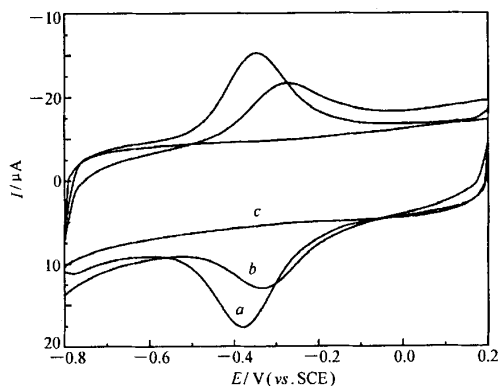


图 1 HRP-SA/EPG 在不同溶液中的 CV 图
Fig. 1 Cyclic voltammograms of HRP-SA/EPG in
(a) PBS/Ethanol solution(1:1, pH = 7.0),
(b) PBS (pH = 7.0) and (c) SA/EPG in PBS
(pH = 7.0), at a scan rate of 0.5 V/s

表 1 辣根过氧化物酶在海藻酸钠膜中的电化学参数

Table 1 Electrochemical parameters for horseradish peroxidase in sodium alginate films

PBS, 0.1 mol/L pH = 7.0					PBS/Ethanol, pH = 7.0				
CV		SWV			CV		SWV		
$E^{\circ'}/\text{V}$	$\Delta E/\text{mV}$	$E^{\circ'}/\text{V}$	k/s^{-1}	α	$E^{\circ'}/\text{V}$	$\Delta E/\text{mV}$	$E^{\circ'}/\text{V}$	k/s^{-1}	α
-0.364	83	-0.340	42 ± 3	0.48	-0.356	58	-0.340	46 ± 2	0.56

与其它蛋白质-膜修饰电极的实验结果相比较^[14],可知固定蛋白质的膜材料不同,氧化还原的式电势和电子传递速率常数也不同,即蛋白质所处的微环境对其电子传递有较大的影响。蛋白质电子传递过程与蛋白质在电极表面的取向有关。由于蛋白质分子表面的电荷分布不均匀,可通过改变电极表面的电荷属性调节蛋白质的取向^[15]。另外,膜与蛋白质的疏水作用也是促进电子传递的重要因素。这些相互作用降低蛋白质的重组能,从而提高电子传递速度。

2.2 pH 的影响

在 pH 值约为 3.0~9.0 较宽范围内,均可得到可逆、重现性良好的循环伏安图(图 2)。式电势随溶液 pH 值增加而负移,且呈线性关系 $E^{\circ'} = 0.002 - 0.053\text{pH}$, $R = -0.994$,说明 HRP 在氧化还原过程中伴随着质子转移。此现象与水分子以及血红素周围氨基酸的质子化作用有关,称为氧化还原玻尔效应(Redox Bohr Effect)。在 HRP 分子中同时存在氧化还原中心和质子化位点,电子传递伴随质子转移的反应,会涉及氧化态或还原态中心离子与质子化过程的静电作用,表现形式为氧化还原峰电势随溶液 pH 值增加而负移。直线斜率(43 mV/pH)比理论计算值(59 mV/pH, 1 个电子和 1 个质子的电化学反应)要小,原因可能是 HRPFe^{II} 的水合作用以及氨基酸残基与血红素形成的氢键影响 HRP 的电位值。

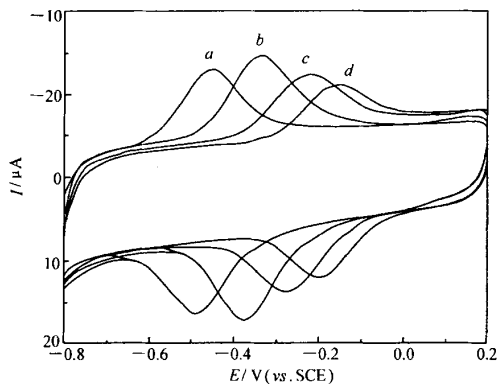


图 2 HRP-SA/EPG 在 0.1 mol/L 不同 pH 值的缓冲溶液/乙醇(体积比为 1:1)溶液中的循环伏安图

Fig. 2 Cyclic voltammograms of HRP-SA/EPG in 0.1 mol/L buffer solution/Ethanol solution (1:1) at different pHs
Scan rate: 0.5 V/s
pH: a. 9.0; b. 7.0; c. 5.0; d. 3.0

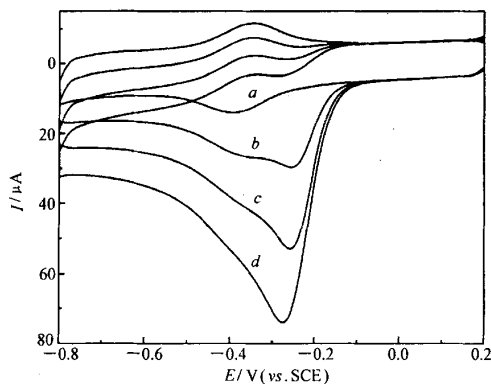


图 3 HRP-SA/EPG 在 0.1 mol/L pH=7.0 的 V(PBS):V(乙醇)=1:1 混合溶液中

加入空气的循环伏安图
Fig. 3 Cyclic voltammograms of HRP-SA/EPG in 0.1 mol/L V(PBS):V(Ethanol) = 1:1 (pH=7.0) after injecting different volumes of air
a. 0; b. 1 mL; c. 2 mL; d. 3 mL

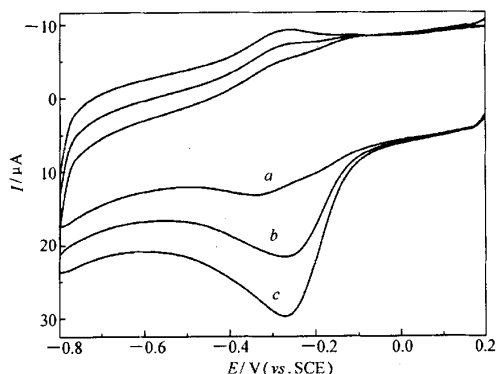
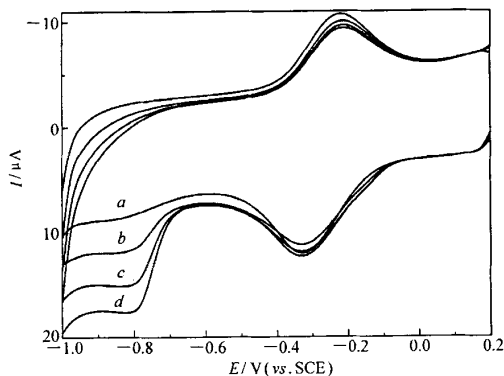
2.3 电催化特性

2.3.1 催化还原氧气 在 pH=7.0 的 V(PBS):V(乙醇)=1:1 的除氧混合溶液中,HRP-SA/EPG 的循环伏安图只出现了 $\text{HRPFe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ 电对的氧化还原峰。在混合溶液中通入一定量的空气时,出现了 1 明显还原峰,其峰电势值比 $\text{HRPFe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ 电对还原峰的值正移了约 120 mV。随着通入空气量的增加,还原峰电流增加,同时伴随着氧化峰的减小,直至消失(图 3)。这是典型的电催化行为。 O_2 气能可逆地与 HRP 的血红素键合,形成 $\text{HRPFe}^{\text{II}}-\text{O}_2$,即氧合辣根过氧化物酶。当 $\text{HRPFe}^{\text{II}}-\text{O}_2$ 还原为 HRPFe^{II} 时, Fe^{II} 又能快速地结合 O_2 ,便产生了较大的催化电流。在此过程中, O_2 被还原为 H_2O_2 ^[16]。

2.3.2 催化还原 H_2O_2 HRP-SA/EPG 在 pH=7.0 的 V(PBS):V(乙醇)=1:1 的除氧混合溶液中,加入 H_2O_2 后,还原峰电流明显增大(图 4),且随 H_2O_2 浓度的增大而增大。而在同样条件下,裸电极和海藻酸钠修饰电极在 H_2O_2 溶液中均未观察到 H_2O_2 的还原峰,说明固定在电极表面的 HRP 能够催化还原 H_2O_2 。在一定的浓度范围内,催化电流与 H_2O_2 浓度呈线性关系(表 2)。逐渐增加 H_2O_2 的浓度,电流-浓度曲线趋于平坦,当 H_2O_2 的浓度较大时,电流反而下降。这是由于较高 H_2O_2 浓度,会使 HRP 部分失去活性。HRP 失活的程度与 H_2O_2 浓度及电极在 H_2O_2 溶液中放置的时间有关^[17]。

表2 催化电流与 H_2O_2 、 NO_2^- 和六氯乙烷(HCE)浓度的关系Table 2 Relationship between catalytic current and concentrations of H_2O_2 , NO_2^- and HCE

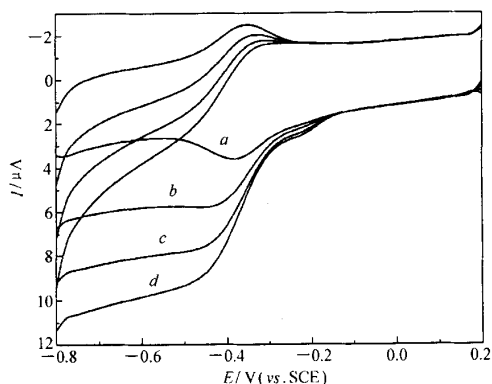
Solution	Analytes	Range of concentration	Linear regression equations	Correlation coefficients	Number of measurements
PBS (pH = 7.0)	H_2O_2	16.46 ~ 135.00 ($\mu\text{mol/L}$)	$I(\mu\text{A}) = 5.18 + 0.22C$	0.999	10
Tartrate/Ethanol (pH = 5.0)	NO_2^-	3.28 ~ 19.58 (mmol/L)	$I(\mu\text{A}) = 3.59 + 0.22C$	0.999	7
PBS/Ethanol (pH = 7.0)	HCE	0.242 ~ 1.103 (mmol/L)	$I(\mu\text{A}) = 3.16 + 6.92C$	0.986	5
Tartrate (pH = 5.0)	NO_2^-	2.75 ~ 32.23 (mmol/L)	$I(\mu\text{A}) = 1.61 + 0.58C$	0.999	16

图4 HRP-SA/EPG 在 0.1 mol/L pH = 7.0 的 $V(\text{PBS}):V(\text{乙醇}) = 1:1$ 溶液中
加有 H_2O_2 的循环伏安图Fig. 4 Cyclic voltammograms of HRP-SA/EPG in
0.1 mol/L $V(\text{PBS}):V(\text{Ethanol}) = 1:1$ (pH = 7.0)
containing H_2O_2 of (a) 0 $\mu\text{mol/L}$;
(b) 32.14 $\mu\text{mol/L}$; (c) 61.36 $\mu\text{mol/L}$ 图5 HRP-SA/EPG 在 0.1 mol/L pH = 5.0 的
 $V(\text{酒石酸}):V(\text{乙醇}) = 1:1$ 溶液中的循环伏安图Fig. 5 Cyclic voltammograms of HRP-SA/EPG in 0.1 mol/L
 $V(\text{Tartrate}):V(\text{Ethanol}) = 1:1$ (pH = 5.0)
containing NO_2^- of (a) 0 mmol/L ;
(b) 5.37 mmol/L , (c) 10.25 mmol/L
and (d) 14.71 mmol/L

2.3.3 亚硝酸根的测定 在酸性条件下, NO_2^- 发生歧化反应, 产物之一是 NO。NO 分子能与 HRP 活性中心的 Fe 配位形成配合物 $\text{HRPFe}^{\text{II}}\text{-NO}$ 。在 pH = 5.0 的 $V(\text{酒石酸}):V(\text{乙醇}) = 1:1$ 溶液中加入 NO_2^- , 在 +0.2 ~ -1.0 V 电位范围内扫描, HRP-SA/EPG 在 -0.80 V 处出现 1 不可逆的还原峰(图 5)。这是 $\text{HRPFe}^{\text{II}}\text{-NO}$ 在电极表面还原的结果^[18]。利用这一性质, 可以间接测定 NO_2^- 。此还原峰电流随 NO_2^- 浓度的增大而增大, 在一定的浓度范围内, 催化电流与 NO_2^- 浓度呈线性关系(表 2)。当缓冲溶液的 pH 值在 6.0 以上时, 没有观察到此还原峰。因为当溶液 pH 值较高时, NO_2^- 不能发生歧化反应。

与水溶液比较, 在缓冲溶液/乙醇混合溶液中, HRP 的催化效率较高。表现为随着 H_2O_2 浓度的增加, 催化电流增加的幅度较大, 而且检测的灵敏度较高, 线性范围较宽, 说明有机溶剂对蛋白质的酶促作用有影响。

2.3.4 催化有机氯化物脱氯 有机卤化物常被用作溶剂或合成工业的原料, 是一类对环境和人类有害的物质。检测这类物质主要是气相色谱法和液相色谱法, 检测过程繁琐, 费用较高。有机卤化物不溶于水, 在非水体系或水/有机混合溶液中, 使用电化学酶传感器对这类物质的检测, 具有实际应用价值。

图6 HRP-SA/EPG 在 pH = 7.0 的 PBS/乙醇混合溶液中
加有六氯乙烷的循环伏安图Fig. 6 Cyclic voltammograms of HRP-SA/EPG in
PBS/Ethanol solution (pH = 7.0) containing
Hexachloroethane of different concentration
 $c/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$: a. 0; b. 0.242; c. 0.473; d. 0.693

HRP-SA/EPG 在除氧 PBS/乙醇混合溶液中,在扫描电位范围 0.2 ~ -0.8 V 内,呈现 1 对可逆的 $\text{HRPFe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ 电对的氧化还原峰。当向溶液中加入 HCE 的乙醇溶液时,其还原峰电流增大,氧化峰电流减小,而且随着 HCE 的加入,还原峰电流逐渐增加,峰电势稍微负移,这是典型的催化电流的特征(图 6)。而在溶液中加入乙醇时,没有发现催化电流的产生,说明还原电流的增加不是由乙醇或溶解氧产生的,而是 HRP 催化 HCE 脱氯的结果^[19]。在一定的浓度范围内,催化电流与 HCE 浓度呈线性关系(表 2)。该电极较稳定,使用 1 周,电流只减少 10%。

参 考 文 献

- 1 Liang J F, Li Y T, Yang V C. *J Pharm Sci*[J], 2000, **89**:979
- 2 Klibanov A M. *Trends Biochem Sci*[J], 1989, **14**:141
- 3 LI Ye-Mei(李业梅), LIU Hui-Hong(刘慧宏). *Chin J Anal Chem*(分析化学)[J], 2005, **33**:262
- 4 Iwuoha E I, Smyth M R. *Biosens Bioelectron*[J], 1997, **12**:53
- 5 Azevedo A M, Prazeres D M F, Cabral J M S, et al. *J Mol Catal B:Enzymatic*[J], 2001, **15**:147
- 6 Gorton L, Lingren A, Larsson T, et al. *Anal Chim Acta*[J], 1999, **400**:91
- 7 Fan C, Wang H, Zhu D, et al. *Anal Sci*[J], 2001, **17**:273
- 8 Liu X, Zhang W, Huang Y, et al. *J Biotech*[J], 2004, **108**:145
- 9 Zhang W, Li G. *Anal Sci*[J], 2004, **20**:603
- 10 O'Dea J J, Osteryoung J G. *Anal Chem*[J], 1993, **65**:3 090
- 11 Faulkner K M, Bonaventura C, Crumbliss A L. *J Biol Chem*[J], 1995, **270**:13 604
- 12 King B C, Hawkridge F M, Hoffman B M. *J Am Chem Soc*[J], 1992, **114**:10 603
- 13 Nassar A E F, Zhang Z, Hu N, et al. *J Phys Chem B*[J], 1997, **101**:2 224
- 14 ZHOU Ying-Lin(周颖琳), HU Yu-Jiao(胡玉娇), ZENG Yong-Huai(曾泳淮). *Chin J Anal Chem*(分析化学)[J], 2002, **30**:262
- 15 LIU Hui-Hong(刘慧宏), CHEN Xian-Tang(陈显堂), LI Jun(李俊), et al. *Chin J Anal Chem*(分析化学)[J], 2001, **29**:511
- 16 Onuoha A C, Zu X, Rusling J F. *J Am Chem Soc*[J], 1997, **119**:3 979
- 17 Schmidt A, Schumacher J T, Reichelt J, et al. *Anal Chem*[J], 2002, **74**:3 037
- 18 Bayachou M, Lin R, Cho W. *J Am Chem Soc*[J], 1998, **120**:9 888
- 19 Wright M, Honeychurch M J, Hill H A O. *Electrochem Commun*[J], 1999, **1**:609

Electrochemical Characteristics and Electrocatalysis Behavior of Horseradish Peroxidase Entrapped in Sodium Alginate Hydrogel Films

LI Ye-Mei^{a, b*}, LIU Guang-Dong^a, ZHANG Zhi-Ling^b

(^aDepartment of Chemistry, Teachers' College of Yuyang, Danjiangkou 442700;

^bDepartment of Chemistry, Wuhan University, Wuhan)

Abstract A stable enzyme-modified electrode was made by immobilizing horseradish peroxidase (HRP) on edge-plane pyrolytic graphite (EPG) electrode with sodium alginate hydrogel. The entrapped HRP underwent a fast direct electron-transfer reaction in both phosphate buffer and phosphate-ethanol buffer. The formal potential (-0.364 V vs SCE) indicates the redox of $\text{HRPFe}(\text{III})/(\text{II})$ couple. The $E^{\circ'}$ is linearly dependent on solution pH, suggesting that electron transfer is proton-coupled. The catalytic reductions of oxygen, hydrogen peroxide, nitric oxide and the dehalogenation of hexachloroethane by HRP were also explored.

Keywords horseradish peroxidase, sodium alginate, electrochemistry, electrocatalysis