

细胞色素 c 在微带金电极上的直接电化学

蔡称心 陈洪渊* 鞠焜先

(南京大学化学系 南京 210093)

摘要 报道了一种新的促进剂 4,6-二甲基-2-巯基嘧啶 (DMMP) 对细胞色素 c (Cyt. c) 电化学反应的促进作用. 用红外光谱和光电子能谱对 DMMP 在金电极表面形成的单分子膜进行了表征. 循环伏安实验表明 Cyt. c 在 DMMP 修饰微带金电极上能发生准可逆的电化学反应, 异相电子传递速率常数 k_s 为 $6.6 \times 10^{-3} \text{cm/s}$. 对 DMMP 修饰膜的稳定性进行了考察; 讨论了 Cyt. c 发生电化学反应的异相电子传递速率常数 k_s 受电极表面促进剂的修饰量以及空气中氧影响的机理.

关键词 微带金电极, 细胞色素 c, 4,6-二甲基-2-巯基嘧啶, 促进剂, 化学修饰电极

细胞色素 c (Cyt. c) 是一种重要的生物电子载体, 它在 Cyt. c 还原酶和 Cyt. c 氧化酶之间起电子传递的作用, 能发生可逆的氧化还原反应. 在体外, 已用 Au^[1]、Pt^[2]、汞^[3]、银^[4], 掺杂 Sn 的 In₂O₃ 半导体^[5]、RuO₂^[6]、热解石墨^[7]以及玻碳^[8]等电极对 Cyt. c 进行过广泛研究, 但由于其庞大的结构使其在电极的界面上电子传递速率很慢, 甚至没有电化学反应. 自从 Hill^[9]等发现在 4,4'-联吡啶存在时, Cyt. c 在金电极上能发生准可逆的电化学反应以来, 人们已找到许多 Cyt. c 的促进剂如氨基酸^[10~12]、嘌呤^[13]等生物小分子, 导电高分子^[14], 单糖类化合物^[15], 某些杂环化合物^[16]等, 最近又发现某些有机硫化物对 Cyt. c 电化学反应具有良好的促进作用^[17,18], 它通过化合物中末端硫原子和金原子之间强烈的化学吸附作用而在金电极表面形成单分子膜, 能促进 Cyt. c 发生电化学反应的基团如吡啶基团、羧基或羟基等暴露在外面从而达到促进其发生氧化还原反应的目的. 这类化合物在金电极表面形成的修饰膜由于有 Au-S 键的存在, 不易从电极上发生脱附, 因而具有良好的稳定性. 为了说明促进剂与 Cyt. c 之间的相互作用, 必须寻找新的促进剂以加快 Cyt. c 的电化学反应速率. 本文报道 Cyt. c 在一种新的促进剂 4,6-二甲基-2-巯基嘧啶 (DMMP) 修饰金膜微带电极上的电化学反应行为, 并用红外光谱和光电子能谱对 DMMP 单分子膜进行了表征. 这对研制微型的生物传感器, 了解蛋白质在微电极上的电化学反应行为, 实现对蛋白质在微小环境下和进行在体分析具有科学意义.

1 实验

1.1 仪器、材料和试剂

M273 恒电位仪及 M270 电化学分析系统 (EG&G, PAR 公司, 美国), FX-850 打印机 (EPSON 公司, 美国), 170SX-FTIR 光谱仪 (Nicolet 公司, 美国), VG ESCALAB MKII

1994年1月10日收到. 修改稿于1994年4月8日收到. 国家自然科学基金及青年基金资助课题.

型多功能光电子能谱仪 (VG 公司, 英国), 501 型超级恒温槽 (上海实验仪器厂), EPON 812 型环氧树脂 (New York, 美国), 马心细胞色素 c (VI 型, Sigma 公司, 美国), DMMP 由南京大学配位化学研究所提供 (经红外光谱及核磁共振谱确定为纯品), 其它试剂均为 A.R. 试剂, 实验用水为二次亚沸蒸馏水。

1.2 实验方法

电化学实验均采用三电极体系在自制的电解槽中进行。微带金电极为工作电极 ($88\text{nm} \times 1.0\text{cm}$, 制备方法同前文[19]), 饱和甘汞电极 (SCE) 为参比电极, 铂丝电极为对电极。实验时将电解槽置于法拉第屏蔽箱中以消除外界的干扰。底液为 $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.0), 温度控制在 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$, 将测试液通 N_2 除氧 20min 后, 在 N_2 气氛下进行实验。

金电极表面的修饰膜用“膜转移”法^[20]制备, 将金电极置于含 $5 \times 10^{-3}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMMP 的磷酸盐缓冲溶液 ($1 \times 10^{-2}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中一段时间, 取出用 $1 \times 10^{-2}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液冲洗, 再置于含 $3.4 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cyt. c 的 $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液中在 $-0.15 \sim +0.3\text{V}$ 电位范围内进行循环伏安实验。红外光谱和光电子能谱实验均在一块金片 (约 $1.0\text{cm} \times 1.5\text{cm}$) 上进行, 将表面已形成 DMMP 修饰膜的金片分别用缓冲溶液和二次蒸馏水冲洗, 然后再进行光谱实验。

2 结果与讨论

2.1 金电极表面修饰膜的表征

DMMP 能通过 2 位巯基上的 S 原子和金形成 Au—S 键而在金电极表面形成单分子膜, 其红外光谱图如图 1 所示。可以看出对应于 $\text{C}=\text{N}$ 和 $\text{C}=\text{C}$ 的伸缩振动 (1625cm^{-1} , 1569cm^{-1})、 CH_3 面外弯曲振动 (1033cm^{-1})、嘧啶环的呼吸振动 (1235cm^{-1} , 1188cm^{-1}) 以及 $\text{C}-\text{S}$ 的弯曲振动 (980cm^{-1} , 853cm^{-1}) 等有较强的吸收。另外, 光电子能谱实验表明, 吸附在金电极表面的 DMMP 分子中的 C、N 的结合能均向低能量方向移动 (图 2)。它们分别移动了 2.3eV 和 2.6eV , 而 S 原子由于紧靠金表面, 上面被嘧啶环所掩蔽, 未测出其结合能。DMMP 不但在金电极表面形成了修饰膜, 而且和金表面之间有化学键的存在, 从而降低了其分子中原子的结合能。循环伏安实验表明, $-0.15 \sim +0.3\text{V}$ 电位范围内在

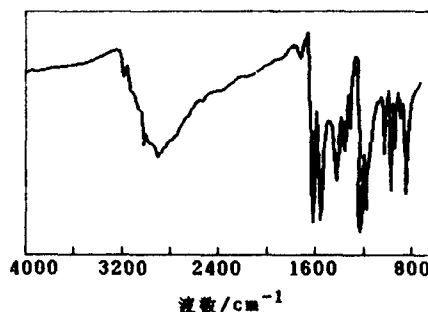


图 1 吸附在金电极表面的 DMMP 的红外光谱图

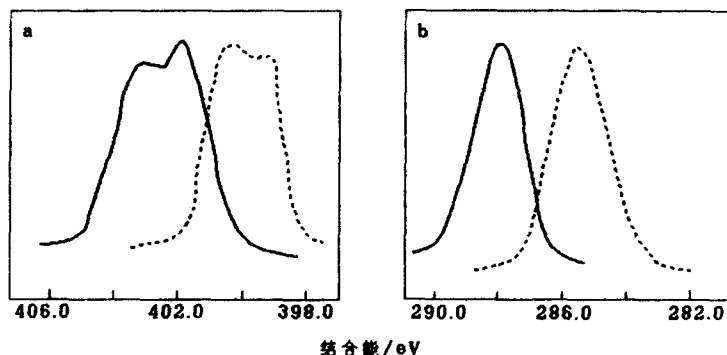


图 2 DMMP 分子中 N1s(a) 和 C1s(b) 的 XPS 图

实线: 粉末样品; 虚线: 吸附在金电极表面的样品

0.2 mol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲溶液中 DMMP 不发生任何氧化还原反应.

2.2 4,6-二甲基-2-巯基嘧啶对 Cyt. c 电化学反应的促进作用

图 3 是 Cyt. c 在裸露及经 DMMP 修饰的金电极上的循环伏安图. 在裸露的金电极上, Cyt. c 没有明显的电化学反应 (图 3a), 把金电极放在含 $5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMMP 的磷酸盐缓冲溶液中浸泡 2h 后, 在同样条件下, Cyt. c 出现一对非常明显的氧化还原峰 (图 3b). 峰电位分别为 $E_{pa} = 70 \text{ mV}$, $E_{pc} = 2 \text{ mV}$ ($v = 20 \text{ mV/s}$), $E^0 = 36 \text{ mV}$, 与 Cyt. c 的式量电位基本一致^[9]. 在不同扫描速率 (20~100 mV/s) 下的峰电流比 i_{pa}/i_{pc} 都接近 1, 且均与扫描速率的平方根之间成线性关系 (图 4), 说明电极过程是受扩散控制的. 当扫速为 20 mV/s 时, 氧化峰电位和还原峰电位之差 ΔE_p 为 68 mV, 比可逆电子传递反应的 ΔE_p 值稍大; 扫速增加时, ΔE_p 也增加. 当扫速为 100 mV/s 时, 氧化峰电位和还原峰电位之差 ΔE_p 为 94 mV. 从峰电位差与扫速的关系, 用 Nicholson 的方法可算得 Cyt. c 在 DMMP 修饰金电极上的异相电子传递速率常数 k_s 为 $6.6 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$, 此值约相当于其他促进剂修饰金电极上的 k_s ($k_s = 1 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ ^[13]) 值的七倍. 因而 Cyt. c 在 DMMP 修饰金电极上的可逆性变得更好. DMMP 是 Cyt. c 发生电化学反应的良好促进剂.

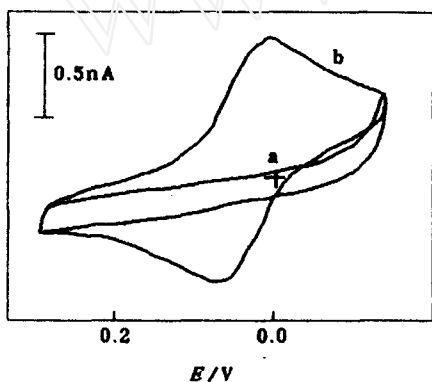


图 3 Cyt. c 在裸露的 (a) 及经 DMMP 修饰的 (b) 微带金电极上的循环伏安图 ($v = 20 \text{ mV/s}$)

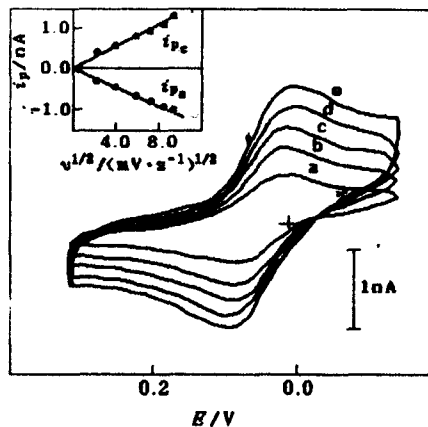


图 4 Cyt. c 在 DMMP 修饰微带金电极上不同扫速时的循环伏安图及 i_p 与 $V^{1/2}$ 的关系
扫速 (mV/s): a—20; b—40; c—60; d—80; e—100

2.3 表面修饰量对细胞色素 c 电化学反应 k_s 的影响

实验发现, DMMP 对细胞色素 c 的促进作用与金电极在 DMMP 溶液中的浸泡时间有关. 短时间的浸泡, 虽然也可观察到促进作用, 但 ΔE_p 较大, k_s 较小; 随着浸泡时间的变长, ΔE_p 值变小, k_s 变大; 当浸泡时间超过 2h 后, ΔE_p 和 k_s 分别达到一个稳定值 (图 5a). 这可能是由于 DMMP 对 Cyt. c 电化学反应促进作用与其在电极表面的吸附量以及吸附层排列的规则性有关. 浸泡时间短, 不仅吸附量不足, 而且还可能因强烈吸附夹带杂质和分子取向不规则, 因而 ΔE_p 值大, k_s 小; 浸泡时间长, 单层吸附的覆盖度增大, ΔE_p 值减小, k_s 值增大. 浸泡时间足够长, 不仅达到饱和的单分子覆盖, 且有充分的平衡, 自组装时间, 使吸附层“纯化”达到稳定的规则排列, 从而 ΔE_p 相对稳定, k_s 也基本不再变化.

2.4 表面修饰膜的稳定性

实验结果表明, 金电极表面 DMMP 修饰膜对 Cyt. c 电化学反应的促进作用是相当稳定的. 将浸泡 2h 制得的修饰金电极在 Cyt. c 溶液中以 50 mV/s 的扫速连续扫描 1.5h 后, 仍

能看出 Cyt. c 良好的氧化还原峰. 在前 120 次连续扫描中, 几乎看不出 Cyt. c 氧化还原峰有任何变化. 在这以后, 其氧化还原峰电位差慢慢变大. 这可能是由于在溶液中, 电极表面 DMMP 被 Cyt. c 所取代, 使之在电极表面的吸附量变小, 因而对 Cyt. c 电化学反应的促进作用也变小. 图 6 示出了 Cyt. c 在 DMMP 修饰电极上连续扫描时第 10 次和第 300 次的循环伏安曲线. 若将 DMMP 修饰电极在空气中放置一段时间, 再考察其对 Cyt. c 电化学反应的促进作用. 实验发现, 随电极在空气中放置时间延长, Cyt. c 电化学反应的 ΔE_p 值变大, 即 k_s 变小 (图 5b). 这可能由于空气中氧的作用, 使 DMMP 在电极表面慢慢氧化变性, 使之对 Cyt. c 促进作用变小. 电极在空气中连续放置 4h 后, 其对 Cyt. c 电化学反应的促进作用才基本消失. 所有这些都表明金电极表面 DMMP 修饰膜对 Cyt. c 电化学反应促进作用是相当稳定的.

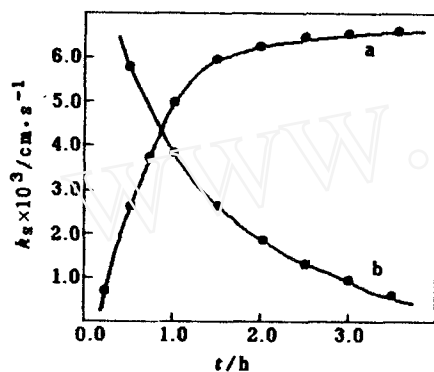


图 5 DMMP 修饰微带金电极上 Cyt. c 电化学反应的 k_s 与电极修饰时间 (a) 及在空气中的暴露时间 (b) 的关系

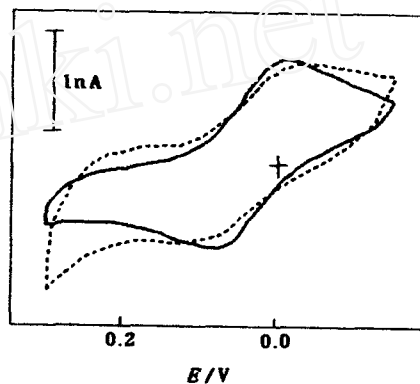


图 6 Cyt. c 在修饰微带金电极上连续扫描时的循环伏安图 (50mV/s)
实线: 第 10 次扫描; 虚线: 第 300 次扫描

参考文献

- Eddowes, M.J.; Hill, J.A.O.; Uosaki, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, *101*, 7114.
- Tarasevich, M.R.; Bogdanovskaya, V.A., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1976**, *3*, 89.
- Scheller, F., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1977**, *4*, 490.
- Heineman, W.R.; Norris, B.J.; Goelz, J.F., *Anal. Chem.*, **1975**, *47*, 79.
- Yeh, P.; Kuwana, T., *Chem. Lett.*, **1977**, *10*, 1145.
- Harmer, M.A.; Hill, H.A.O., *J. Electroanal. Chem. and Interfacial Electrochem.*, **1985**, *189*, 229.
- Armstrong, F.A.; Hill, H.A.O.; Oliver, B.N., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1984**, *15*, 976.
- Dong, S.; Chi, Q., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1992**, *29*, 237.
- Eddowes, M.J.; Hill, H.A.O., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1977**, *21*, 771.
- Digleria, K.; Hill, H.A.O.; Lowe, V.J.; Page, D.J., *J. Electroanal. Chem. and Interfacial Electrochem.*, **1986**, *213*, 333.
- Jonathan, M.C.; Katharine, R.G.; Calum, J.M., *J. Electroanal. Chem. and Interfacial Electrochem.*, **1993**, *347*, 267.
- Roberto, S.; Mauizio, B., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1992**, *29*, 177.
- Isao, T.; Masahiro, I.; Kenji, T.; Hiroko, Y.; Kazuo, Y., *J. Electroanal. Chem. and Interfacial Electrochem.*, **1984**, *164*, 385.
- Philip, N.B.; Jonathan, F., *J. Electroanal. Chem. and Interfacial Electrochem.*, **1989**, *261*, 471.
- 乔专红, 顾仁放, 曲晓刚, 陆天虹, 董绍俊, *高等学校化学学报*, **1993**, *14*, 1377.
- 周成立, 曲晓刚, 陆天虹, 董绍俊, *应用化学*, **1993**, *10*(4), 82.
- Sagara, T.; Niwa, K.; Sone, A.; Hinnen, C.; Niki, K., *Langmuir*, **1990**, *6*, 254.
- Michael, J.T.; Edmond, F.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 1847.
- 蔡称心, 鞠熾先, 陈洪渊, *高等学校化学学报*, (待发表).
- Allen, P.M.; Hill, H.A.O.; Walton, N.J., *J. Electroanal. Chem. and Interfacial Electrochem.*, **1984**, *178*, 69.

Direct Electrochemistry of Cytochrome c at a Microband Gold Electrode Modified with 4,6-Dimethyl-2-mercaptopyrimidine

Cai, Chen-Xin Chen, Hong-Yuan* Ju, Huang-Xian

(Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing, 210093)

Abstract The direct electrochemistry of cytochrome c at microband gold electrode modified with a new promoter 4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine was investigated. The self-assembly monolayer of 4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine on the surface of gold electrode was characterized by IR spectrum and XPS. Cyclic voltammetric experiments indicated that the electrochemistry of cytochrome c at gold electrode modified with this promoter was quasi-reversible with one-electron transfer reaction. The heterogeneous electron-transfer rate constant, k_s , of cytochrome c was evaluated to be ca. 6.6×10^{-3} cm/s. The effects of the immersion time and the oxygen in air on the promoter to promote the direct electrochemistry of cytochrome c were discussed.