

硝酸还原酶在壳聚糖修饰石墨上的电化学行为

陈晓霞^{1,2} 胡劲波^{1,2} 屠淑洁 邵会波*

(¹首都师范大学化学系 北京 100037; ²北京师范大学化学系 北京 100875)

摘 要 将硝酸还原酶(NR)涂敷在壳聚糖(CS)薄膜修饰热解石墨(PG)电极的表面,得到 CS/NR 薄膜电极,在 pH 为 7.0 的缓冲溶液中的循环伏安(CV)图上,呈现一对可逆性良好的还原氧化峰,其峰电位在-4.30V(vs.SCE)左右。研究表明,该体系中的 NR 活性受溶液酸度影响很大,EDTA 有可能成为良好的电子转移促进剂。

关键词 硝酸还原酶 壳聚糖 循环伏安法 电化学性质

Electrochemical Behavior of Nitrate Reductase Incorporated on Pyrolytic Graphite in Chitosan Films

Chen Xiaoxia^{1,2}, Hu Jinbo^{1,2}, Tu Shujie, Shao Huibo*

(¹Department of Chemistry, Capital Normal University, Beijing 100037;)

(²Department of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875)

Abstract Nitrate reductase (NR) and chitosan (CS) were immobilized on pyrolytic graphite (PG) electrode, which gave direct electrochemistry response. Cyclic voltammetry (CV) of CS/NR films showed a pair of well-defined and nearly reversible redox peaks at about -0.430 V vs. SCE at pH 7.0 phosphate buffers. The pH of the solution strongly affected the direct electron transfer of CS/NR films. EDTA was proposed as a stimulant for the system.

Key words Nitrate reductase, Chitosan, Cyclic voltammetry, Electrochemical behavior

硝酸还原酶(NR)是植物整个代谢过程中最重要的限速酶之一,含有黄素(FAD)、血红素(Heme-Fe)、钼辅因子等电活性组分,已受到生物电化学家的关注^[1,2]。但因其分子量较大,结构复杂,还未见它的直接电化学性质的报道。壳聚糖(CS)是一种天然生物高分子,是甲壳素的部分脱乙酰基化产物,分子中既有亲水性和疏水性基团,又有-NH₂和-OH等具有配位能力的基团,化学稳定性良好,近年来也引起了人们的密切关注^[3-5]。由于它的生物相容性好,能被生物降解,降解产物无毒性,并且壳聚糖以及其衍生物具有许多独特的性质,如抗菌性、抗病毒性、促进伤口的愈合等。因此壳聚糖在药物、纺织、印染、日用化工方面得到广泛的应用。根据壳聚糖的生物活性和生物相容性,可以将壳聚糖与酶相结合,制备壳聚糖化学修饰电极,为 NR 的电子转移提供很好的微环境。本文报道了 CS/NR 薄膜电极的直接电化学响应,并对其影响因素进行了初步研究。

陈晓霞 女,25岁,硕士生,现从事分析化学研究。*联系人

国家自然科学基金(29973026)和北京市自然科学基金(2992007)资助项目

2003-11-20 收稿,2004-03-01 接受

1 实验

1.1 试剂仪器

NR(EC 1.6.6.2)和 CS(Sigma Chem.Co.)为市售化学品。超纯水由 Milli-Q 纯水机制得,其电阻率为 $18.2\text{M}\Omega/\text{cm}$;所用其它试剂皆为分析纯。PG 电极由北京师范大学提供,电极表面积 0.159cm^2 。

实验采用三电极工作体系,工作电极为 CS/NR/PG 薄膜电极,参比电极为饱和甘汞电极,对电极为铂丝。电化学测量使用 CHI832 电化学工作站(上海辰华仪器公司)。红外反射光谱使用 Avatar-360 傅立叶红外光谱仪(Nicolet 公司)。金基底在 Piranha 溶液(体积比为 30/70 的过氧化氢和浓硫酸)中于 90°C 下浸洗处理后,再把配制好的 NR 和 CS 溶液分别涂敷到金基底表面上,晾干,用于红外反射光谱测定。

1.2 电极制备

将基体 PG 电极在金相砂纸上磨平,用水冲净,在二次蒸馏水中超声处理 30s,晾干。将 $10\mu\text{L}$ 1mg/mL 的壳聚糖溶液涂敷到新磨光的 PG 电极表面,在室温下缓慢挥发 1 天至干,再将 6 mg/mL 的 NR 溶液 $10\mu\text{L}$ 涂敷到上述制得的 CS 薄膜电极表面,同样在室温下缓慢挥发 1 天至干,即制得 CS/NR 薄膜电极。

2 结果与讨论

2.1 CS/NR 薄膜状态的表征

将 CS 和 NR 的溶液涂敷于金基底表面,测其红外反射吸收光谱,如图 1 所示。在 $1600\sim 1700\text{cm}^{-1}$ 和 $1500\sim 1600\text{cm}^{-1}$ 位置的峰对应蛋白质多肽链的酰胺 I 和酰胺 II。结合谱图和样品结构式的分析,并与 CS、NR 和 CS/NR 干膜的红外谱图比较,确认吸附在 CS 模拟生物膜中的 NR 仍保持着原有的结构。

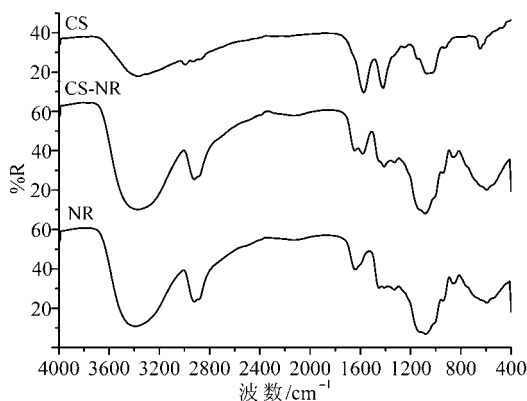


图 1 红外反射吸收红外光谱图

Fig.1 Reflectance absorption infrared spectra

a:NR 膜; b:CS/NR 膜; c:CS 膜

2.2 CS/NR 的电化学行为

将 CS/NR 薄膜电极放入 pH7.0 缓冲溶液(0.1mol/L KCl)中,在 $-0.1\sim -0.9\text{V}$ (vs. SCE)范围内进行循环伏安的电位扫描。如图 2 所示,在 -0.430V (vs. SCE)处可以观察到一对非常明显的可逆性

良好的氧化还原峰, 即 NR 的氧化还原电对的特征峰(图 2 中 a), 而将无 NR 的 CS 薄膜电极放入相同底液并在同样的电位范围进行扫描时, 没有观察到任何氧化还原信号(图 2 中 b)。这表明 CS 中的 NR 与 PG 电极之间发生了直接的电子转移, CS 薄膜对 NR 的电子传递起了很大的促进作用, 提供了适合 NR 与 PG 之间进行电子转移的微环境。当扫速(v)在 $0.01 \sim 0.5 \text{ V/s}$ 范围内时, 氧化还原峰间距(ΔE)与扫速无关, 氧化峰的峰高(i_{pa})和还原峰的峰高(i_{pc})比约为 1, i_{pc} 与 v 呈较好的线性关系, 表现出电极表面反应特性为典型的薄层电化学行为特征。当电位正向扫描过阳极氧化峰峰电位时, CS/NR 薄膜电极中 NR 被氧化, 而当电位反向扫描过阴极还原峰峰电位时, NR 被还原。

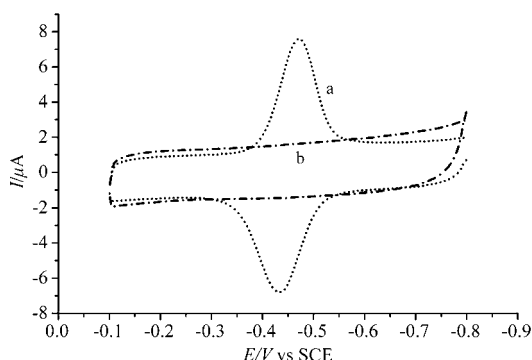


图 2 CS/NR 薄膜电极在磷酸缓冲溶液中的循环伏安曲线

Fig.2 Cyclic voltammograms at 0.1V/s in pH 7.0 buffers for CS/NR films (a) and CS films (b)

a: CS/NR 膜; b: CS 膜

NR 有三个电活性中心: FAD、Heme-Fe 和钼辅离子。理论上, CS/NR 薄膜电极应该出现三个不同的氧化(还原)峰, 但是实验结果只在 $-0.430 \text{ V (vs. SCE)}$ 出现一个对称性很好且可逆的峰。根据文献报道, FAD 的氧化还原峰电位在 $-0.495 \text{ V (vs. Ag/AgCl)}$ ^[6], 换算成相对饱和甘汞电极时应该为 -0.537 V , 而 Heme-Fe 的氧化还原峰电位应该出现在 $-0.33 \text{ V (vs. SCE)}$ ^[7]。实验结果的 $-0.43 \text{ V (vs. SCE)}$ 处于 $-0.33 \sim -0.537 \text{ V}$ 范围内, 因此, 可以认为该峰是 FAD 和 Heme-Fe 共同作用的结果, 而和钼辅离子无关。对于钼辅离子, 由于结构所致, 它镶嵌在氨基酸残基中, 在蛋白质的骨架中很难自由移动; 即使少量的钼辅离子从酶中释放出来, 也会由于缓冲溶液的影响而失去活性。而 FAD 和 Heme-Fe 可以很容易的从蛋白质骨架中释放出来, 并在缓冲溶液中保持其活性。

2.3 酸度对峰电位的影响

CS/NR 薄膜电极受缓冲溶液 pH 的影响很大。当缓冲溶液 pH 在 $2.0 \sim 12.0$ 时, CS/NR 薄膜电极的循环伏安曲线中阴、阳极峰电位随缓冲溶液 pH 的增加均发生负移, 图 3 示出了 pH 值分别为 5.0、7.0 和 9.0 的三个循环伏安曲线。同时实验还发现, 循环伏安峰电位和峰电流随溶液 pH 的变化是可逆的。例如, 将电极浸入 pH 为 9.0 的缓冲溶液之后, 取出并清洗, 再浸入 pH 为 5.0 的缓冲溶液中进行测试, 其结果与将该电极直接浸入 pH 为 5.0 的底液中进行循环伏安测试的结果基本一致。

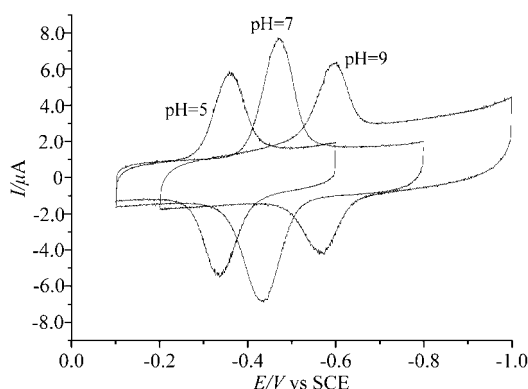


图 3 CS/NR 薄膜电极在 0.1mol/L pH 分别为 5.0、7.0、9.0 的缓冲溶液中扫速为 0.1V/s 的循环伏安图

Fig.3 Cyclic voltammograms of the CS/NR films at scan rate 0.1V/s in different 0.1mol/L pH 5.0, 7.0, 9.0 buffers

如果把循环伏安曲线中阴极峰电位与阳极峰电位的平均值看作 NR 活性中心物质氧化还原电对的式量电位(E^0), 可利用循环伏安理论来研究式量电位随 pH 变化的情况。实验结果表明, 在 pH 2.0 ~ 10.0 时, E^0 与 pH 呈直线关系, 其斜率为 -56.6 mV/pH, 这一数值近似于伴随有一个质子转移的单电子可逆电极反应的理论值 -57.7 mV/pH; 而当 pH 在 10.0 ~ 12.0 时, 斜率变为 -28 mV/pH, 对应有二个质子转移的可逆电极反应(如图 4)。因而, 推测在 pH 为 2.0 ~ 10.0 时, 反应表现为铁离子的单电子转移的反应; 而在 pH 为 10.0 ~ 12.0 时, 电极反应则为 FAD 的有二个电子转移的可逆反应。具体反应如下:

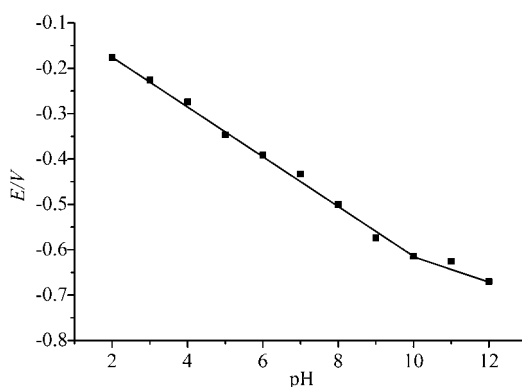
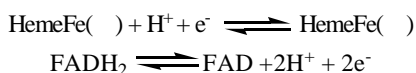


图 4 CS/NR 薄膜电极的式量电位与溶液不同 pH 的关系图

Fig.4 Influence of pH on formal potentials for CS/NR films from cyclic voltammograms at 0.1V/s
从扫速为 0.1V/s 循环伏安图得

2.4 不同电解质对 CS/NR 薄膜电极的影响

分别以 13mg/mL 的硫杂环芳烃四磺酸钠盐(TCAS)、0.1mol/L 的 NaCl、LiClO₄、Na₂SO₄、Na₂HPO₄ 和 EDTA 为电解质, 考察了 CS/NR 薄膜电极在不同电解液中的循环伏安行为的差异, 结果见表 1。

表 1 不同电解质溶液中阴离子对 CS/NR 薄膜电极的影响
Tab.1 Effect of different anions in solution on CS/NR films electrode

电解质	NaCl	LiClO ₄	Na ₂ SO ₄	Na ₂ HPO ₄	EDTA	TCAS
$\Delta E/\text{mV}$	63	47	43	41	19	43

由于电解液是用超纯水配制,不是在缓冲体系中,pH 的差异会影响式电位的值,所以本文只考察氧化还原峰间距(ΔE)的影响,因为 ΔE 的大小在一定程度上反映了电子转移速度的快慢。可以推测这是由于离子的大小影响了硝酸还原酶的微环境,或者特征吸附影响了电极表面的电子分布状态。从实验结果看,离子体积大,可以加速电子转移速度。由表 1 看出,在 EDTA 电解质溶液中 ΔE 最小,因此,它是能加速 CS/NR 薄膜电极电子转移的促进剂,但是准确的机理仍在研究中。

3 结论

循环伏安扫描结果表明,在壳聚糖模拟生物有序膜中的 NR,在 pH 为 7.0 的磷酸缓冲溶液中与石墨发生了直接的电子转移。CS/NR 薄膜电极在-0.430V(vs. SCE)处出现的一对非常明显的可逆性良好的氧化还原峰,可能是 NR 中 FAD 与 Heme-Fe 共同作用的结果。峰电流与扫速成直线关系,体现了薄层电化学的特征。CS/NR 薄膜电极平均式量电位随电解液的 pH 的增加而负移,表明 NR 中活性中心的电子转移过程伴随着质子的传递。用 EDTA 作电解液可使氧化还原峰间距明显减小,说明 EDTA 的引入可能有效地促进电子转移的速度。反射红外光谱表明 NR 在 CS 生物有序膜中基本保持了其原有的结构。

参考文献

- [1] W H Campbell. Plant Mol. Biol. 1999, 50: 77~303.
- [2] S A Glazier, E R Campbell, W H Campbell. Anal. Chem., 1998, 70: 1511~1515.
- [3] 鲁从华, 罗传秋, 曹维孝. 高分子通报, 2001, (6): 46~51.
- [4] 李 佳, 徐金瑞, 孙向英. 分析化学, 2002, 2: 206~209.
- [5] 姚 鑫, 陆光汉. 高等函授学报, 1999, 5: 31~33.
- [6] 董绍俊, 车广礼, 谢远武. 化学修饰电极(修订版). 北京: 科学出版社: 2003:476.
- [7] R Huang, N Hu. Bioelectrochem., 2001, 54: 75~81.