

细胞色素 C₅₅₁ 在 ITO 电极上的直接电化学

严捷 李经建 张波 蔡生民

(北京大学化学与分子工程学院现代物理化学研究中心, 北京 100871)

摘要 在不加任何电子转移促进剂的条件下, 用循环伏安法 (CV) 和微分脉冲伏安法 (DPV) 观察到细胞色素 C₅₅₁ 在 ITO 导电玻璃上的直接电化学行为. 结果显示电极反应过程为准可逆性质, 计算得到细胞色素 C₅₅₁ 的扩散系数、式电位和异相电子转移标准速率常数, 并对其在 ITO 导电玻璃电极上的电子转移机制进行了初步分析.

关键词: 细胞色素 C₅₅₁, ITO 电极, 直接电化学

由于细胞色素 C 类蛋白质在线粒体呼吸链中传递电子的重要作用, 近二十多年来一直受到人们的广泛重视^[1-4], 它在各种类型电极上的直接电化学至今仍是当前生物电化学中的一个热点^[5, 6]. 细胞色素 C 是伴随着生物氧化过程出现而产生的广泛存在于生物界的古老蛋白质. 不同生物的细胞色素 C 的一级结构存在着差异, 这些差异反映了生物从原核到真核, 从单细胞到多细胞, 从低等动物到高等动物的进化规律. 从绿脓菌 (*pseudomonas aeruginosa*) 中提取的细胞色素 C₅₅₁ 则属于细胞色素 C 进化的早期分子. 它是一种含有 82 个氨基酸的紧密球状蛋白, 比一般哺乳动物的氨基酸数 (103 ~ 104 个) 少. 细胞色素 C₅₅₁ 在结构上与哺乳动物蛋白马心肌细胞色素 C 较相似, 都含有一个血红素基, 但两种细胞色素在总电荷及表面电荷分布上存在较大差异. 在中性条件下, C₅₅₁ 分子总电荷为 -1, 细胞色素 C 总电荷为 +9, 后者含有带 18 个正电荷的赖氨酸残基. 而细胞色素 C₅₅₁ 只有一个赖氨酸残基 (Lys21) 分布在血红素裂口处, 另外六个分布在分子中部. C₅₅₁ 分子后部还有 8 个带负电的残基, 导致分子带负电, 但分子中电荷取向与细胞色素 C 一致.

由于提取上的困难, 对细胞色素 C₅₅₁ 的电化学研究很少, 只有 Hill^[7] 等采用金电极在蛋白质溶液中加入 4-4' 联吡啶等促进剂进行过研究. 据我们所知, 关于细胞色素 C₅₅₁ 在其它电极上的电化学行为

至今未见报导. 本文在不加任何电子转移促进剂、也未对电极进行刻意修饰的条件下, 用循环伏安和微分脉冲伏安法研究了细胞色素 C₅₅₁ 在钢掺杂氧化锡 (ITO) 导电玻璃电极上的直接电子转移.

1 实验部分

1.1 试剂

细胞色素 C₅₅₁ (纯度 $w > 99\%$, $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 含 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Ac}$, $0.02\% \text{ NaN}_3$, $\text{pH} = 4.5$) 购自 Sigma 公司. ITO (indium-doped tin oxide) 导电玻璃, 购自日本 Asahi glass. 实验用水为超纯水, 电阻率为 $16.8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, 其余试剂为分析纯.

1.2 ITO 导电玻璃的预处理

将 ITO 导电玻璃切割成约 $0.8 \text{ cm} \times 0.8 \text{ cm}$ 的方片, 按文献 [4] 的方法依次在 Alconox 溶液 (含 $3.95\% \text{ KOH}$ 的乙醇溶液), $95\% \text{ 乙醇}$, 超纯水中超声清洗 5 min (每种溶剂重复一次), 取出后用超纯水充分淋洗, 高纯氮气吹干.

1.3 电化学测定

循环伏安和微分脉冲伏安测试在 CHI706A 恒电位仪 (美国 CHI 公司) 上进行. 预处理后的 ITO 导电玻璃作为工作电极, 与电解液接触面的直径为 4 mm , 参比电极为 Ag/AgCl ($\text{KCl } 3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (购自 CHI), Pt 片为对电极. 实验中所有的电势值均相对于 Ag/AgCl 参比电极. 电解池为单室三电极体系. 原装细胞色素 C₅₅₁ 溶液加适量 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

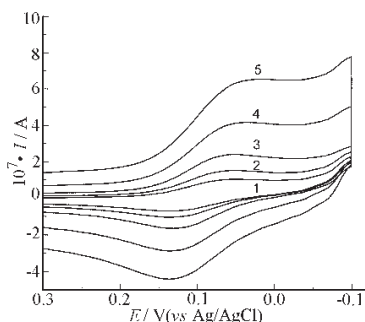


图 1 细胞色素 C₅₅₁ 在 ITO 电极上的循环伏安图

Fig. 1 Cyclic voltammetry of pseudomonas aeruginosa cytochrome C₅₅₁ at an ITO electrode solution contained $38 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cytochrome C₅₅₁, $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaClO₄, $0.025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH₄Ac, 0.01% NaN₃, pH = 6. scan rate in $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$: 1)5, 2)10, 3)20, 4)50, 5)100

NaClO₄ 溶液或超纯水稀释后作为电解液,测量前通入高纯氮气 5 min 以除去溶解氧. 所有电化学实验均在室温下进行.

2 结果与讨论

2.1 循环伏安法

图 1 为细胞色素 C₅₅₁ 在清洁的 ITO 导电玻璃电极上的循环伏安图. 由阴极和阳极峰电势计算得到细胞色素 C₅₅₁ 的标准氧化还原式电位 E° 为 $(0.088 \pm 0.006) \text{ V}(\text{vs Ag/AgCl})$, 这与文献^[8]报导的值 (0.28 V vs NHE.) 很接近. 以扣除背底充电电流后的阴极峰电流对扫速的平方根作图 (图 2), 在实验扫速的范围内呈现出很好的线性关系. 由直线斜率求得细胞色素 C₅₅₁ 的扩散系数为 $13.1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$, 比 Hill^[7] 所得 $10 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ 略大, 而

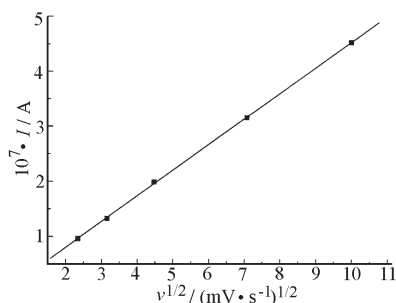


图 2 峰电流对扫速的平方根作图

Fig. 2 Plot of peak reduction current versus the square root of the scan rate

与文献^[8]的值 $14.7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ 比较接近. 从图 1 还可看出, 氧化还原峰电势分离 ΔE_p 随扫速增加逐步增大, 反映出细胞色素 C₅₅₁ 在 ITO 电极上的反应过程为准可逆, 按照 Nicholson 方法^[9], 求得其标准异相电子转移的速率常数 k° 为 $1.36 \times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$.

由于细胞色素 C₅₅₁ 表面所带总电荷为 -1, 而不是马心肌细胞色素 C 的 +9, 所以其电子转移机理与细胞色素 C 并不完全一致. 对于细胞色素 C 一般认为是前侧带正电荷的赖氨酸残基与电极表面带负电的官能团发生键合, 而 ITO 表面带有羟基负电荷, 所以可以促进电子转移的发生. 但对于细胞色素 C₅₅₁, 由于静电排斥作用, ITO 表面的羟基负电荷并非有利, 只有当 ITO 表面部分质子化, 即溶液 pH 稍低 (pH = 4.5) 时才有利于电子的转移. 可以认为细胞色素 C₅₅₁ 是通过其血红素前侧的天冬氨酸残基上的羧基和赖氨酸残基与电极表面形成氢键, 来促进电子在溶液/电极间的转移^[7].

2.2 微分脉冲伏安法

图 3 为细胞色素 C₅₅₁ 在 ITO 导电玻璃电极上的微分脉冲伏安图 (DPV), 由于 DPV 法具有很高的灵敏度, 故常用来进一步确证循环伏安图的结果. 由图可见 DPV 峰电流高度与浓度成正比, 且峰电势随 pH 值的变化发生移动. 曲线 2 的峰电势为 0.112 V , 由 $E_p = E^{\circ} + \Delta E/2$ 得标准氧化还原式电位为 0.087 V , 与前面循环伏安图的结果

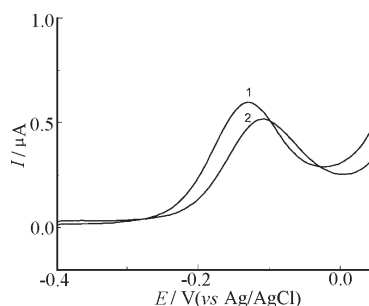


图 3 细胞色素 C₅₅₁ 的微分脉冲伏安图

Fig. 3 Differential pulse I-E curve of cytochrome C₅₅₁ at $2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ scan rate, 50 mV pulse height and 0.5 s pulse width

1) Solution contained $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cytochrome C₅₅₁, $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaClO₄, $0.033 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH₄Ac, 0.013% NaN₃, pH = 5
2) Solution contained $38 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cytochrome C₅₅₁, $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaClO₄, $0.025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH₄Ac, 0.01% NaN₃, pH = 6

(0.088 V) 基本相符. 曲线 1 的峰电势为 0.132 V, 比曲线 2 向正方向移动了约 20 mV, 这与文献 [10] 通过其它方法得出的 C_{551} 分子 E° 随 pH 值变化的规律相一致. 关于 pH 值对电子转移动力学的影响以及电子转移的详细机制的研究正在进行中.

3 结 论

在不加任何电子转移促进剂、也未对电极进行刻意修饰的条件下, 用循环伏安法 (CV) 和微分脉冲伏安法 (DPV) 观察到细胞色素 C_{551} 在 ITO 导电玻璃上的直接电化学行为. 循环伏安图显示细胞色素 C_{551} 的电极反应过程具有准可逆性质, 计算得到细胞色素 C_{551} 的扩散系数、式电位和异相电子转移标准速率常数, 并对其在 ITO 导电玻璃电极上的电子转移机制进行了初步分析.

致谢: 感谢刘忠范教授为本实验提供细胞色素 C_{551} 样品.

References

- 1 Eddowes M J, Hill H A O. *J. C. S. Chem. Comm.*, **1977**: 771
- 2 Peter Y E H, Theodore Kuwana. *Chem. Lett.*, **1977**: 1145
- 3 Koller K B, Hawkrige F M, Fauque G, Legall J. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **1987**, **145**: 619
- 4 Bowden E F, Hawkrige F M, Chlebowski J F, Bancroft E E, Thorpe C, Blount H N. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, **104**: 7641
- 5 Fedurco M. *Coordination. Chem. Rev.*, **2000**, **209**: 263
- 6 Armstrong F A, Wilson G S. *Electrochim. Acta*, **2000**, **45**: 2623
- 7 Hill HAO, Page D J, Walton N J. *J. Electroanal. Chem.*, **1987**, **217**: 129
- 8 Horio T, Higashi T, Sasagawa M, Kusai K, Nakai M, Okunuki K. *Biochem. J.*, **1960**, **77**: 194
- 9 Nicholson R S. *Anal. Chem.*, **1965**, **37**: 1351
- 10 Moore G R, Pettigrew G W, Pitt R C, Williams R J P. *Biochim. Biophys. Acta*, **1980**, **590**: 261

Direct Electrochemistry of Cytochrome C_{551} from *Pseudomonas Aeruginosa* at ITO Electrodes

Yan Jie Li Jing-Jian Zhang Bo Cai Sheng-Min

(College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871)

Abstract The direct electrochemistry of cytochrome C_{551} from *pseudomonas aeruginosa* has been investigated at indium-doped tin oxide (ITO) optically transparent electrodes without any surface promoters or mediators. The cyclic voltammograms show a quasi-reversible electrode reaction. Plots of peak reduction current against square root of scan rate are linear over the range $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ to $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. The diffusion coefficient of C_{551} is calculated from the slope of the line. The rate constant for heterogeneous electron transfer is determined by measuring cyclic voltammetry peak separation as a function of scan rate.

Keywords: Cytochrome C_{551} , ITO electrode, Direct electrochemistry