

[Article]

www.whxb.pku.edu.cn

电沉积制备 ZnO 纳米棒修饰电极上氧化还原蛋白的电化学行为

韩楠楠² 王慧² 栗娜² 周剑章^{1,2,*} 林仲华^{1,2} 吴迪³ 万国江^{3,*}¹厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室, 福建 厦门 361005; ²厦门大学化学化工学院化学系, 福建 厦门 361005;³西南交通大学材料科学与工程学院, 成都 610031)

摘要: 采用恒电位阴极还原法在金电极表面一步修饰 ZnO 纳米棒, 制备成 ZnO 纳米棒修饰电极. 扫描电子显微镜(SEM)和 X 射线衍射(XRD)结果显示制得的 ZnO 为直径约 100 nm 的六棱柱状纤锌矿晶体纳米棒. 使用 ZnO 纳米棒修饰的金电极研究细胞色素 c 的直接电化学行为, 结果表明: ZnO 纳米棒修饰的金电极能有效探测到细胞色素 c 的铁卟啉辅基在不同价态下的电化学行为; 细胞色素 c 吸附后, ZnO 纳米棒修饰的金电极对过氧化氢的电流响应呈现良好的线性关系.

关键词: ZnO 纳米棒; 电沉积; 氧化还原蛋白; 细胞色素 c

中图分类号: O646

Electrochemical Behavior of Redox Proteins on ZnO Nanorod-Modified Electrodes Prepared by Electrodeposition

HAN Nan-Nan² WANG Hui² LI Na² ZHOU Jian-Zhang^{1,2,*} LIN Zhong-Hua^{1,2}
WU Di³ WAN Guo-Jiang^{3,*}

¹State Key Laboratory of Physical Chemistry of the Solid Surface, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, P. R. China; ²Department of Chemistry, College of Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, P. R. China; ³School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, P. R. China)

Abstract: We successfully prepared ZnO nanorod-modified Au (ZnO nanorod/Au) electrodes using one-step cathodic electrodeposition. Scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD) were used to characterize the morphology and crystal phase of the ZnO nanorods. The data showed that the ZnO nanorods were wurtzite type crystals with a hexagonal rod shape and a diameter of about 100 nm and that the ZnO nanorods were arranged well on the surface of electrodes. These ZnO nanorod-modified electrodes were able to detect direct electron transfer from cytochrome c (cyt c). Cyclic voltammograms showed that the direct electron transfer of cyt c with heme iron in different valence states was easily achieved by the ZnO nanorod/Au electrode. Data of amperometric responses demonstrated that a linear amperometric response to hydrogen peroxide was observed on the ZnO nanorod/Au electrodes after adsorbing cyt c.

Key Words: ZnO nanorod; Electrodeposition; Redox protein; Cytochrome c

1 引言

研究氧化还原蛋白在电极上的直接电化学行为

对于理解和认识它们在生命体内的电子转移机制和生理作用具有重要的理论和实际意义. 细胞色素 c

Received: September 26, 2010; Revised: November 12, 2010; Published on Web: December 22, 2010.

*Corresponding authors. ZHOU Jian-Zhang, Email: jzzhou@xmu.edu.cn; Tel: +86-592-2189663.

WAN Guo-Jiang, Email: superwgj@263.net; Tel: +86-28-87600728.

The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (20603027, 21021002, 20973134) and National High Technology Research and Development Program of China (2009AA03Z327)

国家自然科学基金(20603027, 21021002, 20973134)和国家高技术研究发展专项经费项目(2009AA03Z327)资助

© Editorial office of Acta Physico-Chimica Sinica

(cyt c)作为一种典型的氧化还原蛋白,是重要的生物电子传递体,兼具酶的特性,其直接电化学行为能够揭示生物体呼吸链上电子转移的机理,并且可为构建以细胞色素c为基础的H₂O₂传感器提供依据。¹但细胞色素c等氧化还原蛋白分子的卟啉铁辅基深埋在蛋白内部,不易探测到其直接电化学行为。于是,金纳米颗粒,脱氧核糖核酸(DNA),碳纳米管等材料修饰的电极便被用于研究细胞色素c等的直接电化学行为,²⁻⁷但这些修饰电极往往造价较高,或稳定性有待提高。ZnO纳米晶体作为宽禁带半导体在太阳能电池、发光二极管(LED)及激光等领域的研究得到人们的广泛关注,⁸⁻¹⁰并且ZnO晶体无毒无害,生物相容性好,价格低廉,且具有良好的电子传递性能,在生物领域的研究与应用已越来越广泛。¹¹⁻¹⁴近年来,ZnO等纳米修饰电极逐渐被用于细胞色素c等血红素蛋白的研究中,¹⁵⁻¹⁸最近已有文献报道ZnO纳米层修饰的ITO电极在细胞色素c的电化学研究和H₂O₂电化学传感器的构筑中展现很大的应用价值。¹⁹电沉积法制备纳米晶体修饰电极优点突出,其制备过程操作简单,条件温和,制备迅速,且能够制得结构较为均匀的纳米晶体阵列。²⁰本文在金电极表面采用电沉积法制取ZnO纳米棒修饰电极,并用该修饰电极研究氧化还原蛋白的电化学行为,发现该修饰电极对细胞色素c具有良好的电化学响应能力。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

电化学实验使用CHI660电化学系统(CH Instruments, 美国)分析测定。ZnO纳米棒及电极表面的形貌通过S-4800扫描电子显微镜(HITACHI公司, 日本)观察。X射线衍射谱由Panalytical X'pert PRO X射线衍射仪(PANalytical B.V., 荷兰)测定。实验中使用马心细胞色素c(纯度>99% M_w=12384, Sigma公司)。电化学实验工作电极用直径为2 mm的金电极;本文所涉及的三电极体系均采用饱和甘汞电极为参比电极,铂片为对电极。实验试剂有六水合硝酸锌(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司),及六次甲基四胺(化学纯, 广州化学试剂厂)。实验用水均为超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 ZnO纳米棒修饰电极的制备

金电极在电沉积前的预处理:依次用1000、

500、50 nm的Al₂O₃抛光粉抛光成镜面后用水冲洗干净,然后依次在水、乙醇、丙酮中超声洗涤5 min,洗涤三个循环,最后在1.0 mol·L⁻¹ H₂SO₄中电化学清洗,取出用水冲洗,氮气吹干。ZnO纳米棒的制备方法是在本实验室已有的制备方法基础上,²¹通过优化电解液浓度、电位、沉积温度及沉积时间等条件,采用两电极体系在金电极和玻碳电极表面进行制备(铂片为对电极):电解液为2.5 mmol·L⁻¹六水合硝酸锌和2.5 mmol·L⁻¹六次甲基四胺的混合液(实验前预热电解液);控制电位于-0.900 V,恒温81 °C的条件下生长400 s。

2.2.2 细胞色素c在ZnO纳米棒修饰电极上的电化学行为研究

实验采用三电极体系,用ZnO纳米棒修饰的金电极(ZnO nanorod/Au)作为工作电极。以2.0 g·L⁻¹细胞色素c溶液(以pH=7.4的PBS缓冲液配制)为研究对象,在0 V附近寻找最佳电位范围进行循环伏安扫描。

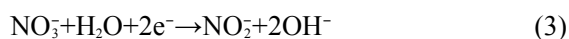
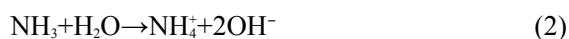
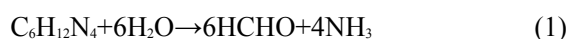
2.2.3 细胞色素c修饰电极对H₂O₂的电流响应

用ZnO纳米棒修饰的金电极浸泡在2.0 g·L⁻¹细胞色素c溶液中20 min得到细胞色素c修饰电极。实验采用三电极体系,以细胞色素c吸附的ZnO纳米棒/金电极为工作电极,控电位0 V,在不断搅拌的条件下等时间间隔连续向PBS溶液(pH=7.4)中注入100 μmol·L⁻¹过氧化氢溶液,测定电流响应曲线。

3 结果与讨论

3.1 ZnO纳米棒修饰电极的制备与表征

本实验分别以金电极为基底,采用恒电位阴极还原法以硝酸锌和六次甲基四胺为电解液沉积ZnO纳米棒,反应机理如下:^{22,23}



六次甲基四胺在溶液中不但起到调节pH值的作用,而且为ZnO的生成提供OH⁻(式(1)、(2)).²² ZnO的生成与电位有着密切的关系(式(3)):部分OH⁻是由NO₃⁻的还原过程产生,随着电量累积,OH⁻浓度在工作电极表面增加,OH⁻与Zn²⁺结合生成了ZnO。此外,ZnO纳米棒的成核密度以及生长速度也与电位相关。Zn²⁺是四配位的阳离子,能与OH⁻结合,生成四面体的络合物离子Zn(OH)₄²⁻,是ZnO的前驱物(式

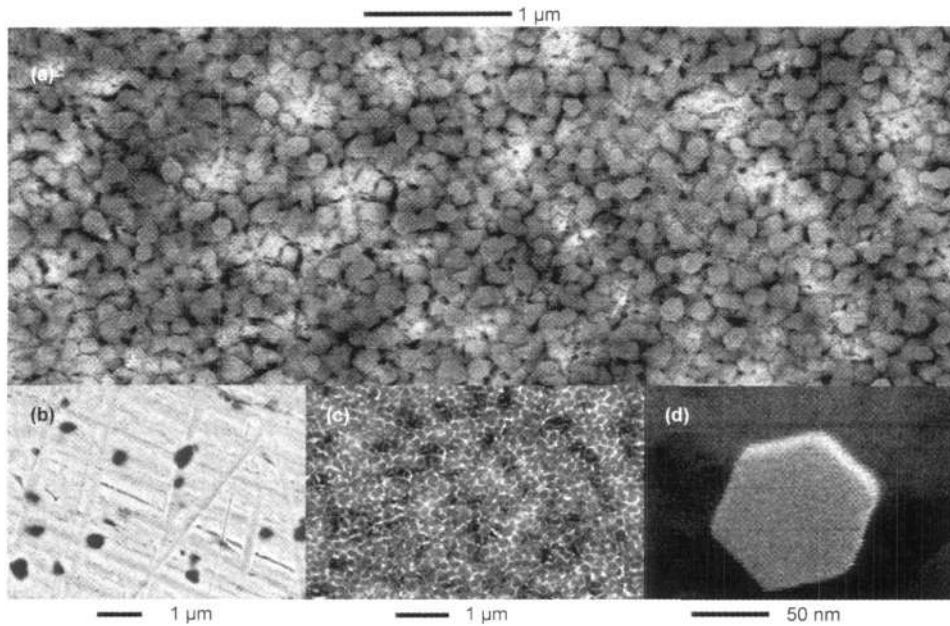


图1 ZnO纳米棒修饰金电极的SEM图

Fig.1 SEM images of ZnO nanorods modified Au electrode

(a) ZnO nanorod/Au electrode; (b) naked Au electrode; (c) reduced view of ZnO nanorods; (d) magnification of ZnO nanorods

(4). 实验中 81 °C 的高温为前躯体与基底的吸附提供活化能.²³

对比电沉积前金电极(图 1(b))和表面生长 ZnO 纳米棒后金电极的 SEM 图(图 1(a)), 可以观察到金电极表面紧密地生长了一层 ZnO 纳米棒, 从 ZnO 纳米棒放大的局部图(图 1(d))中可见电沉积得到的 ZnO 是直径约为(100±10) nm 的六棱柱形 ZnO 纳米棒. 从 ZnO 纳米棒电极的整体图(图 1(c))中可以看到 ZnO 纳米棒在电极表面的分布较为密集, 且有一定的均匀性.

为表征 ZnO 纳米棒的晶型, 在锡铟氧化物(ITO)基底上以同样的方法电沉积 ZnO 纳米棒, 测 X 射线衍射谱, 见图 2. 各衍射峰与标准卡片(PDF No.00-036-1451)较好的匹配, 说明电沉积制备的 ZnO 纳米棒具有六方纤锌矿晶体结构. (002)晶面衍射峰强度很大, 说明电沉积的 ZnO 晶体主要沿 *c* 轴生长,²⁴ XRD 分析结果与 SEM 观察到的图 1(d)六棱柱形 ZnO 纳米棒状结构相佐证. 电沉积法制备的 ZnO 纳米结构与基底结合紧密不易脱落, 与 ZnO 纳米片相比,¹⁸ 纳米棒直径更小, 规整度较好.

3.2 氧化还原蛋白在 ZnO 纳米棒修饰电极上的直接电化学行为

细胞色素 *c* 在光滑平整的裸金电极表面只能进行不可逆电子传递或者不能进行电子传递,²⁵ 但在 ZnO 纳米棒修饰电极上细胞色素 *c* 较容易体现出良

好的直接电化学行为. 如图 3(a)所示, 细胞色素 *c* 在 ZnO 纳米棒修饰的金电极上, 不同扫描速率下做循环伏安图 (扫描速率 v 依次为 0.800, 0.700, 0.600, 0.500, 0.400, 0.300, 0.200, 0.100, 0.050, 0.010 V · s⁻¹), 从图中分析发现细胞色素 *c* 的氧化峰高与扫描速度一次方成正比(见图 3(b)), 且峰位随扫描速率的变化有所偏移, 说明细胞色素 *c* 在电极表面的伏安行为是表面吸附态所控制, 细胞色素 *c* 不可逆地吸附在电极表面. 根据细胞色素 *c* 直接电子传递机理, 细胞色素 *c* 主要是通过血红素暴露于外界一面进行直接电子传递,²⁶ 一般首先发生细胞色素 *c* 在电极表面的吸附过程, ZnO 纳米棒修饰后电极的比表面积

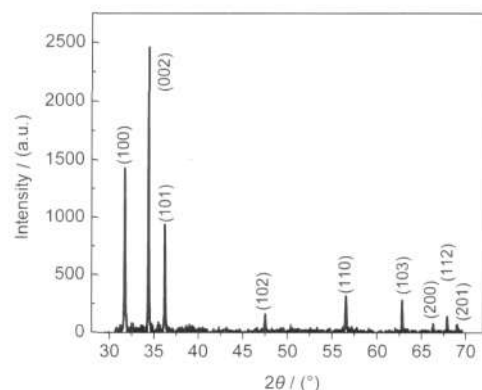


图2 ZnO纳米棒在ITO电极上的X射线衍射谱图

Fig.2 XRD pattern of ZnO nanorods on ITO electrode
ITO: indium tin oxide

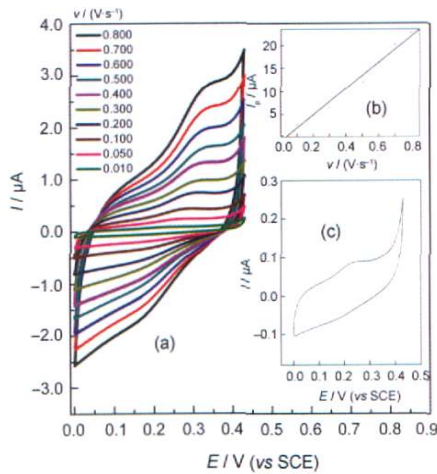


图3 ZnO nanorod/Au 电极上 2.0 g·L⁻¹ 细胞色素 c 的循环伏安图

Fig.3 Cyclic voltammograms of 2.0 g·L⁻¹ cyt c on ZnO nanorod/Au electrode

(a) CVs with various scan rate; (b) calibration plot of the anodic peak current against scan rate, (c) CV at 0.010 V·s⁻¹

大大增加,有效增大了细胞色素c的吸附,血红素上的活性位点与氧化锌纳米棒的接触几率增大,有利于发生直接电子传递;并且与ZnO纳米层修饰金电极相比,¹⁹ ZnO纳米棒的有序性更强,相对晶界减少,电子在沿ZnO纳米棒c轴传递途中损失的概率减小,从而促进细胞色素c与电极基底间的有效电子传递.图3(c)为0.01 V·s⁻¹下ZnO纳米棒修饰的金电极在2.0 g·L⁻¹的细胞色素c溶液中的循环伏安图的放大图,从该图中可明显观察到细胞色素c的氧化峰,但其氧化还原行为可逆性较差.ZnO纳米棒修饰的金电极上细胞色素c的氧化和还原峰电位约在

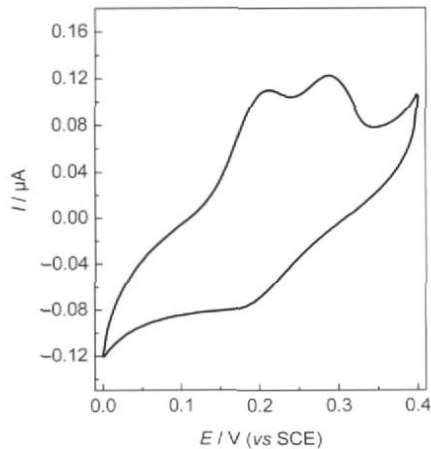


图4 Fe(IV)细胞色素c在ZnO nanorods/Au电极上在0.005 V·s⁻¹扫描速度下的循环伏安图

Fig.4 Cyclic Voltammogram of Fe(IV) cyt c on ZnO nanorods/Au electrode at the scan rate of 0.005 V·s⁻¹

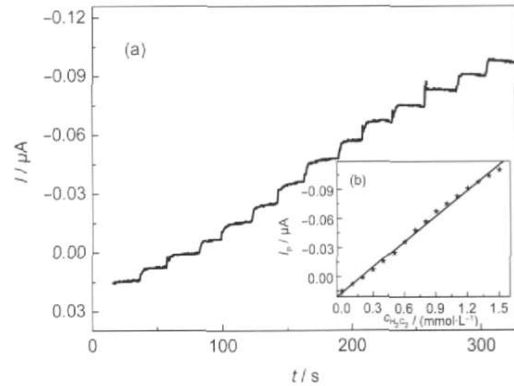


图5 吸附细胞色素c的ZnO纳米棒/金电极对H₂O₂的电流响应曲线

Fig.5 Amperometric responses curve of the cyt c absorbed ZnO nanorods/Au electrode to H₂O₂

(a) I-t curves of successive additions of 100 μmol·L⁻¹ H₂O₂; (b) calibration plot of steady-state currents against concentrations of H₂O₂.

0.338–0.166 V附近(0.800 V·s⁻¹).细胞色素c经过反复氧化还原后,从单纯的Fe(III)变到混有Fe(II)和Fe(IV)的,在循环伏安图中表现为出现双氧化峰现象,如图4所示,双氧化峰是由Fe(II)细胞色素c到Fe(III)细胞色素c的氧化峰和Fe(III)细胞色素c到Fe(IV)细胞色素c的氧化峰组成.³ ZnO纳米棒修饰的金电极较容易检测到细胞色素c不同价态下的直接电子传递.

3.3 细胞色素c修饰电极对H₂O₂的电流响应

实验在PBS溶液中等时间间隔(20 s)连续注入100 μmol·L⁻¹ H₂O₂,测定细胞色素c修饰的ZnO纳米棒修饰的金电极对过氧化氢溶液的电流响应,²⁷如图5(a)所示,从I-t曲线上可以发现,电流对H₂O₂的浓度变化响应快速且较稳定,每间隔响应约7–10 nA.图5(b)中修饰电极的响应峰电流与溶液中H₂O₂浓度在0–1.5 mmol·L⁻¹范围内呈良好的线性关系.从细胞色素c的直接电化学行为增强现象可以推断ZnO纳米棒修饰的金电极能够促进细胞色素c在电极表面的吸附并有利于其氧化还原行为的发生,细胞色素c对H₂O₂的催化作用使得吸附了细胞色素c的修饰电极对H₂O₂表现出快速而稳定的电流响应.

4 结论

实验通过恒电位阴极还原法一步制取ZnO纳米棒修饰的金电极和玻碳电极.制得的ZnO纳米棒粒径均匀(约100 nm),排列紧密.ZnO纳米棒修饰电极稳定性好,比表面积较大,更容易吸附生物大分子,有利于生物大分子的固定及电化学研究.结果显

示: ZnO 纳米棒修饰电极上, 细胞色素 c 较容易被探测到直接电化学反应, ZnO 修饰的金电极能够检测到细胞色素 c 在不同价态下的直接电化学反应. 细胞色素 c 吸附后 ZnO 纳米棒修饰的金电极对 H₂O₂ 的电流响应灵敏且稳定.

References

- (1) Ghindilis, A. L.; Atanasov, P.; Wilkins, E. *Electroanalysis* **1997**, *9*, 661.
- (2) Feng, J. J.; Zhao, G.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. *Anal. Biochem.* **2005**, *342*, 280.
- (3) Chen, S. M.; Chen, S. V. *Electrochim. Acta* **2003**, *48*, 513.
- (4) Liang, M. S.; Bai, Y.; Liu, M.; Zheng, W. J. *Acta Phys. -Chim. Sin.* **2009**, *25*, 457. [梁敏思, 白燕, 刘敏, 郑文杰. 物理化学学报, **2009**, *25*, 457.]
- (5) Zhao, G. C.; Yin, Z. Z.; Zhang, L.; Wei, X. W. *Electrochem. Commun.* **2005**, *7*, 256.
- (6) Ma, G. X.; Zhong, Q. D.; Lu, X. G.; Lu, T. H. *Acta Phys. -Chim. Sin.* **2009**, *25*, 2061. [马国仙, 钟庆东, 鲁雄刚, 陆天虹. 物理化学学报, **2009**, *25*, 2061.]
- (7) Sun, D. M.; Cai, C. X.; Li, X. G.; Xing, W.; Lu, T. H. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *566*, 415.
- (8) Zhang, Q. F.; Dandeneau, C. S.; Zhou, X. Y.; Cao, G. Z. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4087.
- (9) Sun, H.; Zhang, Q. F.; Wu, J. L. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 2271.
- (10) Huang, M. H.; Mao, S.; Feick, H.; Yan, H. Q.; Wu, Y. Y.; Kind, H.; Weber, E.; Russo, R.; Yang, P. D. *Science* **2001**, *292*, 1897.
- (11) Liu, J. P.; Guo, C. X.; Li, C. M.; Li, Y. Y.; Chi, Q. B.; Huang, X. T.; Liao, L.; Yu, T. *Electrochem. Commun.* **2009**, *11*, 202.
- (12) Li, Y. F.; Liu, Z. M.; Liu, Y. L.; Yang, Y. H.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. *Anal. Biochem.* **2006**, *349*, 33.
- (13) Umar, A.; Rahman, M. M.; Vaseem, M.; Hahn, Y. B. *Electrochem. Commun.* **2009**, *11*, 118.
- (14) Zhang, F. F.; Wang, X. L.; Ai, S. Y.; Sun, Z. D.; Wan, Q.; Zhu, Z. Q.; Xian, Y. Z.; Jin, L. T.; Yamamoto, K. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *519*, 155.
- (15) Zhao, Z. W.; Lei, W.; Zhang, X. B.; Wang, B. P.; Jiang, H. L. *Sensors* **2010**, *10*, 1216.
- (16) Lu, X. B.; Zhang, H.; Ni, Y. W.; Zhang, Q.; Chen, J. P. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 93.
- (17) Kumar, S. A.; Chen, S. M. *Anal. Lett.* **2008**, *41*, 141.
- (18) Zhu, X. L.; Yuri, I.; Gan, X.; Suzuki, I.; Li, G. X. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1600.
- (19) Rui, Q.; Komori, K.; Tian, Y.; Liu, H.; Luo, Y.; Sakai, Y. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *670*, 57.
- (20) Willander, M.; Nur, O.; Zhao, Q. X.; Yang, L. L.; Lorenz, M.; Cao, B. Q.; Perez, J. Z.; Czekalla, C.; Zimmermann, G.; Grundmann, M.; Bakin, A.; Behrends, A.; Al-Suleiman, M.; El-Shaer, A.; Mofor, A. C.; Postels, B.; Waag, A.; Boukos, N.; Travlos, A.; Kwack, H. S.; Guinard, J.; Dang, D. L. *Nanotechnology* **2009**, *20*, 332001.
- (21) Guo, H. H.; Zhou, J. Z.; Lin, Z. H. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10*, 146.
- (22) Li, Q.; Kumar, V.; Li, Y.; Zhang, H. T.; Marks, T. J.; Chang, R. P. H. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 1001.
- (23) Cui, J. B.; Gibson, U. J. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 22074.
- (24) Zhang, Q. B.; Guo, H. H.; Feng, Z. F.; Lin, L. L.; Zhou, J. Z.; Lin, Z. H. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 4889.
- (25) Szucs, A.; Hitchens, G. D.; Bockris, J. O. M. *Electrochim. Acta* **1992**, *37*, 403.
- (26) Wang, K. *Bioinorganic Chemistry*; Tsinghua University Press: Beijing, 1988; pp 121–131. [王夔. 生物无机化学. 北京: 清华大学出版社, 1988: 121–131.]
- (27) Prakash, P. A.; Yogeswaran, U.; Chen, S. M. *Sensors* **2009**, *9*, 1821.