

[Article]

doi: 10.3866/PKU.WHXB201203073

www.whxb.pku.edu.cn

电化学和紫外-可见吸收光谱法研究pH和金纳米粒子对细胞色素c的影响

王艳艳¹ 姜艳霞^{1,*} 沙德礼² 罗德礼² 孙世刚¹¹厦门大学化学化工学院化学系, 固体表面物理化学国家重点实验室, 福建 厦门 361005;²香港城市大学物理与材料科学系, 香港)

摘要: 制备了粒径均匀、平均粒子尺寸为(4.7±0.6) nm, 表面修饰3-巯基丙酸(MPA)的金纳米粒子(Au NPs). 利用电化学和紫外-可见(UV-Vis)吸收光谱研究了pH和Au NPs对细胞色素c(Cyt c)结构的影响. UV-Vis吸收光谱结果表明, pH为7.5–3.0时, Cyt c和Cyt c-Au NPs复合物的结构没有发生明显变化. 当pH=2.0时, Cyt c和Cyt c-Au NPs复合物的Soret谱峰位置均发生明显移动, 说明pH诱导其构象发生变化. 循环伏安(CV)结果表明, 表面修饰了MPA的Au NPs能促进Cyt c和电极之间的电子传输, 与修饰了柠檬酸根的Au NPs相比, 其生物兼容性更好. pH的变化会引起CV中Cyt c峰电流的改变和峰电位的移动. 随着pH值的降低, Cyt c电活性的量逐渐减小, 并且pH诱导Cyt c发生不可逆变性. Au NPs的引入使自由态的Cyt c耐酸性增强, 而使得吸附态的Cyt c耐酸能力减弱.

关键词: 金纳米粒子; 细胞色素c; pH值; 循环伏安法; 紫外-可见吸收光谱

中图分类号: O646

Effect of pH and Au Nanoparticles on Cytochrome c Investigated by Electrochemistry and UV-Vis Absorption Spectroscopy

WANG Yan-Yan¹ JIANG Yan-Xia^{1,*} SUSHA Andrei² ROGACH Andrey² SUN Shi-Gang¹¹Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surface, Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemistry Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, P. R. China;²Department of Physics and Materials Science, City University of Hong Kong, Hong Kong, P. R. China)

Abstract: In this paper, gold nanoparticles (NPs) with an average size of (4.7 ± 0.6) nm, capped with mercaptopropionic acid (MPA) ligand, are prepared. The effect of pH and Au NPs on cytochrome c (Cyt c) is investigated by electrochemistry and UV-Vis absorption spectroscopy. UV-Vis absorption spectra indicate that the structures of Cyt c and Cyt c-Au NPs complex do not change appreciably between pH=7.5 and pH=3.0, but their Soret band positions change markedly at pH=2.0, indicating that low pH value induces a conformational change in Cyt c. Cyclic voltammetry (CV) result shows that Au NPs capped with MPA enhance electron transfer between Cyt c and the electrode. The data also reveals that the biocompatibility of Au NPs is improved when citric acid ligand is replaced with MPA. The change in pH value causes a change of peak currents in CV and a shift of peak potential. When pH value deviates from 7.0, levels of electroactive Cyt c decrease. Significant pH change induces irreversible denaturing of Cyt c. The pH at which Cyt c-Au NPs complex denatures completely is one unit higher than that of Cyt c. Combining the results from UV-Vis spectroscopy and CV, we find that addition of Au NPs makes adsorbing state Cyt c more vulnerable to pH.

Received: January 13, 2012; Revised: February 29, 2012; Published on Web: March 7, 2012.

*Corresponding author. Email: yxjiang@xmu.edu.cn; Tel: +86-592-2180181.

The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (20833005, 20873116, 60936003, 21021002).

国家自然科学基金(20833005, 20873116, 60936003, 21021002)资助项目

© Editorial office of Acta Physico-Chimica Sinica

Key Words: Au nanoparticle; Cytochrome c; pH value; Cyclic voltammetry; UV-Vis absorption spectroscopy

1 引言

金纳米粒子(Au NPs)具有易于制备、导电性高、生物兼容性好等优点而被广泛应用于生物医学领域,如DNA检测、^{1,2}酶的固定、^{3,4}信号放大^{5,6}等。但也有研究表明,生物分子和Au NPs长时间接触会导致生物分子构象变化、部分解折叠、甚至变性。⁷⁻⁹一个有效的改进方法是进行Au NPs的表面修饰,如在Au NPs表面修饰一些有效的“阻挡层”,避免Au NPs和生物分子直接接触,从而减小生物分子变性的可能性。¹⁰⁻¹²

pH值对生物分子的结构有很大影响,研究不同pH值下生物分子的物理化学性质将帮助人们认识生物分子随着pH值变化的规律,从而对生物分子的应用提供一定的参考。细胞色素c(Cyt c)在线粒体呼吸链中起着非常重要的作用,对它的研究备受关注。¹³⁻¹⁶最近研究表明,pH诱导Cyt c变性后,Cyt c表现出过氧化物酶的性质,即Cyt c的活性随着pH值的减小而降低,但对过氧化氢的氧化活性增加。¹⁷普遍认为Au NPs的生物兼容性好而被广泛引入到Cyt c体系,然而Au NPs对吸附态Cyt c随pH变化产生怎样的影响,这是一个值得关注的问题。

本文采用UV-Vis吸收光谱法研究了溶液中的Cyt c以及Cyt c-Au NPs复合物随着pH值的变化规律。以共价键合的方法将Cyt c固定在了混合自组装层上,采用循环伏安(CV)法检测了引入3-巯基丙酸(MPA)修饰的Au NPs前后Cyt c活性随pH值的变化规律,同时分析了Au NPs在Cyt c电子转移中所起的作用。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

11-巯基十一烷酸(MUA, 95%), 11-巯基十一烷醇(MU, 97%), 3-巯基丙酸(99%), 马心Cyt c(纯度>95%, $M_w=12384$)购自于美国Sigma公司。1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)购自于美国Thermo Scientific公司。将50 mmol·L⁻¹的KH₂PO₄和50 mmol·L⁻¹的K₂HPO₄溶液混合制备不同pH值的磷酸盐缓冲溶液(PBS), pH值分别为2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、7.5。Cyt c储备液的浓度为5 mg·mL⁻¹,溶解在pH=7.0的PBS溶液中,4 °C下保

存。Au NPs采用相转移法¹⁸在香港城市大学制备。其它试剂均为分析纯,实验用水均为超纯水。

电化学工作站采用上海辰华CHI-660A。三电极体系,工作电极为柱状金电极($\Phi=5$ mm),辅助电极为铂电极,参比电极为饱和甘汞电极(SCE)。UV-Vis吸收光谱用日本岛津公司Carry-5000 UV-Vis吸收光谱仪测量,以超纯水作为参比溶液。透射电镜(TEM)照片由日本JEM2100仪器得到。pH计为美国单佛UB-7系列。

2.2 实验过程

电极的制备:金电极分别采用1、0.3和0.05 μm 的氧化铝研磨粉研磨,超纯水超声清洗,再在0.1 mol·L⁻¹ H₂SO₄溶液中于-0.20 V到1.45 V电位区间循环扫描,直至获得Au电极的标准特征峰,表明已获得洁净的Au电极。然后依次用大量的超纯水和无水乙醇清洗电极。将电极放置于20 mmol·L⁻¹的MU和MUA的乙醇溶液($n(\text{MU}):n(\text{MUA})=3:1$)中室温自组装24 h,得到组装有MU和MUA的混合单层(Au-SAMs)。用无水乙醇和PBS(pH=7.0)清洗电极除去电极表面吸附的过量的MU和MUA。将Au-SAMs电极浸入5 mg·mL⁻¹的Cyt c溶液中4 °C下保存1 h,此时Cyt c静电吸附在电极表面。接着将电极浸泡在5 mmol·L⁻¹的EDC溶液中30 min,共价固定Cyt c,得到Au-SAMs-Cyt c电极。Au NPs的吸附是将Au-SAMs-Cyt c电极浸泡于纳米金的PBS溶液中,浸泡时间为30 min,得到Au-SAMs-Cyt c-Au NPs。由于EDC的作用,Cyt c共价固定在自组装分子层上,¹⁹所以该种固定方法能使Cyt c牢固地固定在电极表面;当pH从12.0变化到4.0的过程中,11-巯基烷酸自组装层从金电极表面脱附的电压范围是-1.0到-0.9 V,²⁰因此该自组装膜在电化学研究条件下仍然是稳定的。

UV-Vis吸收光谱样品的制备:加入5 mg·mL⁻¹,150 μL 的Cyt c分别于3 mL, pH为2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、7.5的PBS溶液中得到Cyt c在不同pH值下的样品。Cyt c-Au NPs复合物的制备是将50 μL 约0.05 mg·mL⁻¹的Au NPs加入到1 mL的5 mg·mL⁻¹ Cyt c储备液中。加入上述Cyt c-Au NPs复合物各150 μL 于3 mL, pH值为2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、7.5的PBS溶液中即得到不同pH值的Cyt c-Au

NPs样品.

3 结果与讨论

3.1 Au NPs的TEM和UV-Vis吸收光谱表征

图1A是表面修饰MPA的Au NPs的TEM图,从图中可以看出,Au NPs粒径均匀,大多数为球形.粒径统计结果(图1B)显示,Au NPs平均粒径为 (4.7 ± 0.6) nm (用于粒径统计的Au NPs数目为255个).图1C是表面修饰MPA的Au NPs的UV-Vis吸收光谱,从图中可以看出,Au NPs的吸收峰约为517 nm.

3.2 中性pH下Au NPs对Cyt c电子传输的影响

图2是组装到金电极上的Cyt c吸附Au NPs前后的CV曲线.对比发现,吸附了Au NPs之后的Cyt c仍然表现出明显的氧化还原反应特征:吸附Au NPs前,Cyt c的氧化还原峰电流分别为 -0.6364 和 0.6971 μA ;吸附Au NPs之后,Cyt c的氧化还原峰电流为 -0.6353 和 0.6353 μA .电活性的Cyt c的量利用公式(1)进行计算.

$$\Gamma = Q / (nFA) \quad (1)$$

其中, Γ 是Cyt c的表面覆盖度, Q 是Cyt c氧化还原峰积分电量的平均值, n 是反应电子数, F 是法拉第常数, A 是电极的实际面积.吸附Au NPs之前,电活性的Cyt c的量是 3.03 $\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-2}$,说明Cyt c是亚单层吸附.¹⁹ 吸附Au NPs之后,电活性的Cyt c的量没有发生明显变化.有研究表明,²⁰ Cyt c显示电活性的量和吸附Au NPs的尺寸(如5和20 nm)以及吸附时间(如40 min和18 h对比)都有关系.对不同粒径的Au NPs,吸附的时间越长,显示电活性的Cyt c的量越少;对于相同的吸附时间,Au NPs的粒径越大,显示电活性的Cyt c的量越少.对比文献结果,在粒径尺寸和吸附时间相当的情况下,本实验体系Au NPs的加入使Cyt c的变质量相对较少,主要是由于使用的Au NPs表面修饰有MPA分子,避免Cyt c和Au

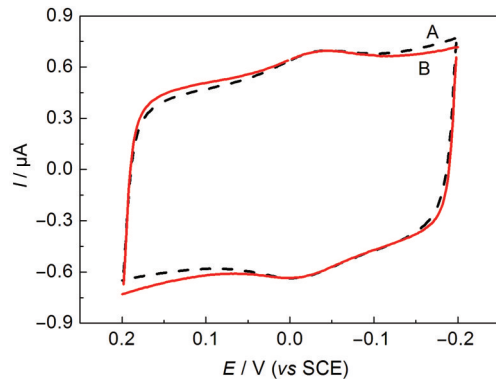


图2 (A) Au-SAMs-Cyt c和(B) Au-SAMs-Cyt c-Au NPs在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS中的CV曲线

Fig.2 CV curves of (A) Au-SAMs-Cyt c and (B) Au-SAMs-Cyt c-Au NPs in $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS

pH=7.0, scan rate: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; PBS: phosphate buffered solution

NPs直接接触,降低其变性几率.

表1为加入Au NPs前后Cyt c氧化还原的峰电位和峰电流.从表1数据可以看出,Au NPs加入前,Cyt c对应的氧化还原峰电位分别是 -0.002 和 -0.048 V,Au NPs加入之后,Cyt c对应的氧化还原峰电位分别是 -0.002 和 -0.042 V,从而其对应的氧化还原峰电位之差分别是 0.046 和 0.04 V,说明Au NPs的加入使得Cyt c氧化还原反应的可逆性提高.根据Laviron理论,²¹ 计算出吸附Au NPs前后的电子转移速率常数分别为 2.6 和 3.9 s^{-1} ,说明Au NPs的吸附促进了Cyt c和电极之间的电子转移.

Au NPs常被用于生物体系.²²⁻²⁶ 当构筑成Au-SAMs-Au NPs-Cyt c结构时,Au NPs起到了协助

表1 加入Au NPs前后Cyt c氧化还原的峰电位和峰电流

Table 1 Peak potentials and peak currents of Cyt c before and after incorporation of Au NPs

	E_{pa}/V	$I_{pa}/\mu\text{A}$	E_{pc}/V	$I_{pc}/\mu\text{A}$	$\Delta E_p/\text{V}$
Au-SAMs-Cyt c	-0.002	-0.6364	-0.048	0.6971	0.046
Au-SAMs-Cyt c Au NPs	-0.002	-0.6353	-0.042	0.6353	0.040

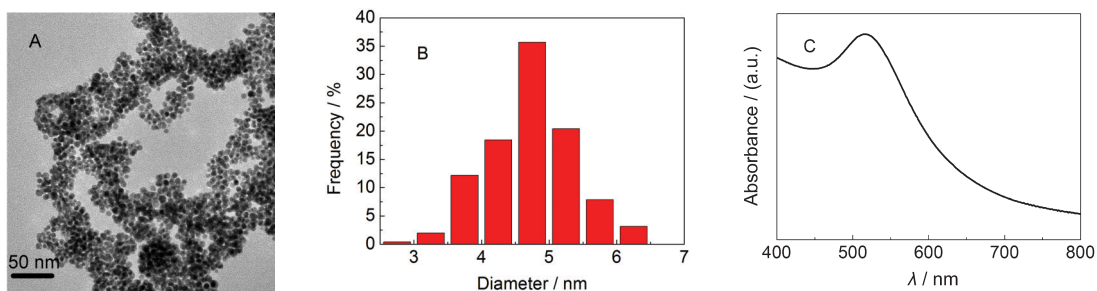


图1 Au NPs的透射电镜(TEM)图(A),对应的粒径统计图(B)及UV-Vis吸收光谱(C)

Fig.1 Transmission electron microscopy (TEM) image (A), the corresponding histogram of cross-sectional diameter (B), and UV-Vis absorption spectrum (C) of Au NPs

Cyt c和电极之间的长程电子传递的作用;当构筑成Au-SAMs-Cyt c-Au NPs结构时,Au NPs增强了Cyt c膜层的导电性.对比Au-SAMs-Cyt c体系,Au-SAMs-Cyt c-Au NPs体系的电子传输路径将发生变化.电子从电极通过SAMs传递到Cyt c之后会在Au NPs之间传输,从而使那些因吸附取向而电子传递受阻的Cyt c(约占吸附在电极表面Cyt c总量的72%)²⁷将有可能表现出电活性,从理论上讲,加入了Au NPs之后,体系电活性的Cyt c的量将增大.但报道结果^{20,28}表明,Au NPs的引入使得电活性Cyt c的量减小,这说明Au NPs对Cyt c有毒化作用.我们的实验结果也表明,和没有修饰MPA的Au NPs相比,Cyt c失活的程度有所降低,但是电活性Cyt c的量并没有增加,所以,Au NPs的表面优化仍是一个十分重要的问题.

3.3 Cyt c和Cyt c-Au NPs的UV-Vis吸收光谱表征

我们用UV-Vis吸收光谱法研究了溶液中的Cyt c以及Cyt c-Au NPs复合物的Soret和Q吸收谱带随着pH的变化关系.图3A为氧化型Cyt c在pH=7.0的PBS中的UV-Vis吸收光谱,408和530 nm的吸收谱峰分别对应于Cyt c的Soret谱带和Q谱带.图3A中的插图为Cyt c和Cyt c-Au NPs复合物在pH=5.0的PBS中的UV-Vis吸收光谱.由于Au NPs的UV-Vis吸收峰(517 nm)和Cyt c的Q谱带吸收峰(530 nm)位置接近,两个峰之间存在交叠.而Au NPs的吸收峰对Cyt c的Soret谱带(408 nm)没有影响,因此我们用Soret谱带吸收峰面积为标准,对

Cyt c和Cyt c-Au NPs复合物的吸收谱带进行归一化.从插图归一化结果可以看到,pH=5.0时Cyt c的Q谱带在530 nm,当加入Au NPs子后,该峰移到527 nm,且峰宽增加,表明Au NPs和Cyt c混合后,530 nm处归属于Cyt c的谱峰受到了Au NPs的干扰,使得谱峰蓝移.

图3B为Cyt c的Soret谱带和Q谱带随pH值的变化关系曲线.从图3B可以看出,pH在3.0-7.5范围内,Cyt c的Soret吸收谱带在408 nm;在pH=2.5附近,Cyt c的Soret吸收谱带位置发生明显移动,pH为2.5和2.0的Soret谱带分别在406和395 nm.在相同的pH变化区间,Soret吸收谱带随着pH值的变化趋势与文献²⁹报道结果一致.Cyt c-Au NPs复合物的Soret吸收谱带变化趋势与Cyt c一致.在pH为2.5-7.5范围内,Cyt c的Q吸收谱带在530 nm附近,当pH为2.0时,Q谱带位置移动到495 nm,较pH=7.0时Cyt c的标准谱峰位置(530 nm)移动了35 nm.对于Cyt c-Au NPs复合体系,在整个pH变化区间,其谱峰位置均在527-533 nm内变化,当pH=2.0时,仍没有观察到谱峰位置的明显变化,表明Au NPs的加入对Cyt c的Q谱带的结构具有稳定化作用.

Cyt c的Soret谱带和Q谱带来源于卟啉环和金属 $\pi-\pi^*$ 之间的转变, $a_{2u}-b_{1u}$ 和 $a_{2u}-e_g$ 轨道过渡偶极矩之间的累加效应分别影响Soret谱带和Q谱带.²¹因此,Soret谱带和Q谱带位置的移动说明pH诱导Cyt c的结构发生了变化.对于Cyt c-Au NPs复合体系,pH从7.5到2.0变化时,530 nm附近吸收谱峰没有发生明显的位置移动,即Cyt c的结构没有发生明

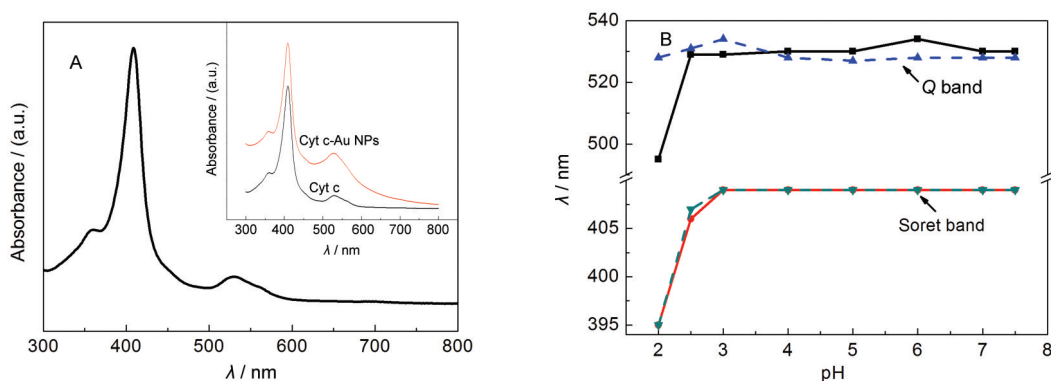


图3 (A) Cyt c在pH=7.0的PBS中的紫外吸收谱;(B) Cyt c(实线)和Cyt c-Au NPs复合物(虚线)的Soret谱带和Q谱带的UV-Vis吸收峰随着pH值的变化关系

Fig.3 (A) UV-Vis absorption spectrum of Cyt c in PBS at pH=7.0;(B) UV-Vis absorption peaks of Soret band and Q band of Cyt c (solid line) and Cyt c-Au NPs complex (dotted line) as a function of pH value

The insert in figure A shows the UV-Vis absorption spectra of Cyt c and Cyt c-Au NPs complex in PBS at pH=5.0, which is normalized by the spectrum of Soret band.

显的变化. 从而可以说明, Au NPs的加入使溶液相Cyt c耐酸能力增强. 我们推测, 这可能是由于Au NPs在Cyt c表面的吸附阻碍了溶剂和Cyt c的直接接触所致.

3.4 pH和Au NPs对吸附态Cyt c的影响

图4A和4B分别是Cyt c在不同pH下的CV曲线及对应的还原峰电流, 图4C和4D是Cyt c吸附Au NPs后在不同pH下的CV曲线及对应的还原峰电流, 其中的插图是对应的局部放大图. Cyt c的氧化还原是指血红素中心卟啉铁二价和三价之间的转换. 对于Au-SAMs-Cyt c体系(图4A), 当pH从7.5变化到2.0时, 氧化还原峰变宽, 峰电流变小(图4B). 当pH为3.0时, Cyt c氧化还原峰消失, 峰电流几乎为零. 根据CV结果, 积分电活性Cyt c的量, 对应pH值分别为6.0、5.0、4.0、3.0的电活性的Cyt c的比例分别为93.6%、67.4%、37.7%、5.8%. 当溶液的pH值从2.0回复到7.5时, 仍然观察不到Cyt c的氧化还原峰, 说明pH值诱导Cyt c的变性是不可逆的,

Waldeck小组¹⁷的报道也支持了这一结论.

图4C是吸附了Au NPs后的Cyt c在不同pH下的CV曲线, 从图中可以看出, pH值为7.0时, Cyt c显示电活性的量最大. 随着pH值的减小, Cyt c的峰电流呈现减小趋势; pH值为4.0时, 氧化还原峰电流几乎消失(图4D). 对比没有吸附Au NPs的体系, 吸附Au NPs之后的Cyt c完全变性的pH值提前了一个单位. 积分不同pH值下电活性Cyt c的量, 对应pH值6.0、5.0、4.0的电活性Cyt c的比例分别为90.3%、65.4%、6.0%, 相比没有吸附Au NPs的体系, 相同pH值时电活性的Cyt c的比例减小, 说明吸附Au NPs之后的Cyt c抵抗pH值保持自身结构的能力降低. 同时发现, pH值恢复到中性范围的时候, 变性后的Cyt c在CV扫描的时候不显示电活性, 说明吸附了Au NPs的Cyt c由pH诱导的变性也是不可逆的.

由于该自组装膜在研究条件下是稳定的, 因此我们推断构象变化引起失活是Cyt c不显示电活性

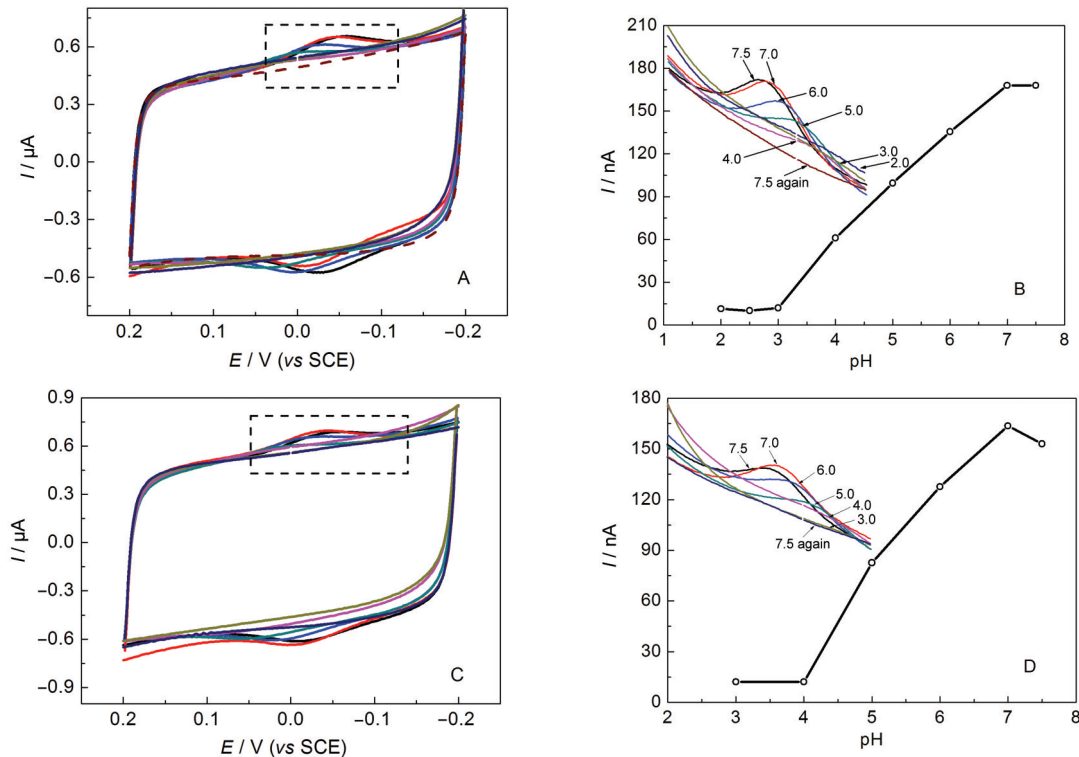


图4 (A) Au-SAMs-Cyt c体系不同pH下的CV曲线, (B) 相应还原峰电流(扣除了双电层后的净电流)及对应(A)的局部放大图, (C) Au-SAMs-Cyt c-Au NPs体系不同pH下的CV曲线, (D) 相应还原峰电流(扣除了双电层后的净电流)及对应(C)的局部放大图

Fig.4 (A) CV curves of Au-SAMs-Cyt c for different pH values; (B) the cathodic peak currents (double-layer current is deducted) of CV curves in (A) as a function of pH and the insert is partial enlarged view of (A); (C) CV curves of Au-SAMs-Cyt c-Au NPs for different pH values; (D) the cathodic peak currents (double-layer current is deducted) of CV curves in (C) as a function of pH and the insert is partial enlarged view of (C)

的一个主要原因. Cyt c 活性中心和电极之间的距离是影响 Cyt c 电活性的关键因素. 文献³²表明, 采用以羧基为末端的自组装分子($\text{HS}(\text{CH}_2)_x\text{COOH}$)将 Cyt c 固定到电极表面, 当 $x \geq 8$ 时, 标准电子转移速率常数随着电活性中心和电极之间距离的增大呈指数衰减. 本工作中采用 $x=10$ 的自组装分子, 所以当电活性中心和电极之间的距离增大时, 其电流将呈指数衰减. pH 降低诱导 Cyt c 解折叠, 肽链打开, 血红素暴露出来, 血红素缝隙的打开可以促进 Cyt c 和电极之间的电子传输, 但是在循环伏安中并没有观察到电流增大的现象. 我们推测, Cyt c 在解折叠和稳定化过程中, 其血红素中心和电极之间的距离增大, 所以, 在 CV 中观察不到其明显的氧化还原电流. 解折叠的蛋白质和自组装双分子之间的相互作用可能使 Cyt c 发生了不可逆变性. 疏水的肽链部分可以与自组装分子层的烷基链结合,³³ 血红素部分可以与水分子配合.²¹ 这些稳定化作用将抑制 Cyt c 恢复到自然状态. 此外通过对比 UV-Vis 和 CV 的结果发现, 吸附在电极表面的吸附态 Cyt c 的稳定性低于其在溶液中的自由态 Cyt c: 溶液中的 Cyt c 在 pH=2.5 附近发生结构的明显变化, 吸附态 Cyt c 以及吸附了 Au NPs 的 Cyt c 在 pH 分别为 3.0 和 4.0 时, 几乎完全失活. 我们推测可能与 Cyt c 结构变化的灵活性有关, 当 Cyt c 吸附在电极表面时, 其肽链部分和自组装分子层之间发生化学键合, 限制了 Cyt c 在电极表面的流动, 从而其稳定性下降.

4 结论

Cyt c 以亚单层共价固定在电极表面. CV 结果显示, pH 为中性时, Au NPs 使得 Cyt c 和电极之间的电子传输能力增强; 但电活性 Cyt c 的量没有明显变化, 表明 Au NPs 的加入使得 Cyt c 部分失活. UV-Vis 和 CV 结果表明, pH 能诱导 Cyt c 变性, Au NPs 的加入使得自由态 Cyt c 耐酸能力增强, 吸附态 Cyt c 耐酸能力减弱. 变性的主要原因是 pH 使 Cyt c 的构象发生了变化, 而且这种变性是不可逆的. Au NPs 的加入使得吸附态 Cyt c 完全变性的 pH 值提前一个单位.

References

- (1) Verdoold, R.; Gill, R.; Ungureanu, F.; Molenaar, R.; Kooyman, R. P. H. *Biosensors. Bioelectron.* **2011**, *27*, 77.
- (2) Zhang, H.; Wang, L.; Jiang, W. *Talanta* **2011**, *85*, 725.
- (3) Wang, W.; Zhang, T. J.; Zhang, D. W.; Li, H. Y.; Ma, Y. R.; Qi, L. M.; Zhou, Y. L.; Zhang, X. X. *Talanta* **2011**, *84*, 71.
- (4) Sule, N.; Singh, R.; Srivastava, D. K. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2008**, *4*, 463.
- (5) Liu, Z.; Luo, L.; Dong, Y.; Weng, G.; Li, J. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *363*, 182.
- (6) Zhang, J.; Pearce, M. C.; Ting, B. P.; Ying, J. Y. *Biosensors Bioelectron.* **2011**, *27*, 53.
- (7) Peled, D.; Naaman, R.; Daube, S. S. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 8581.
- (8) Ramallo-Lopez, J. M.; Giovanetti, L. J.; Requejo, F. G.; Lsaacs, S. R.; Shon, Y. S.; Salmeron, M. *Phys. Rev. B* **2006**, *74*, 073410.
- (9) Wang, L.; Dang, Y. Q.; Zhang, M.; Sun, J.; Wu, Y. Q. *Chemical Journal of Chinese Universities* **2009**, *30*, 135. [王磊, 党永强, 张敏, 孙健, 吴玉清. 高等学校化学学报, **2009**, *30*, 135.]
- (10) Loftus, A. F.; Reighard, K. P.; Kapourales, S. A.; Leopold, M. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1649.
- (11) Doan, T. T.; Vargo, M. L.; Gerig, J. K.; Gulka, C. P.; Trawick, M. L.; Dattelbaum, J. D.; Leopold, M. C. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *352*, 50.
- (12) Hicks, J. F.; Seok-Shon, Y.; Murray, R. W. *Langmuir* **2002**, *18*, 2288.
- (13) Han, N. N.; Wang, H.; Li, N.; Zhou, J. Z.; Lin, Z. H.; Wu, D.; Wan, G. J. *Acta Phys. -Chim. Sin.* **2011**, *27*, 468. [韩楠楠, 王慧, 栗娜, 周剑章, 林仲华, 吴迪, 万国江. 物理化学学报, **2011**, *27*, 468.]
- (14) Li, N.; Zhou, J. Z.; Lin, L. L.; Han, N. N.; Lin, Z. H. *Acta Phys. -Chim. Sin.* **2010**, *26*, 2468. [栗娜, 周剑章, 林玲玲, 韩楠楠, 林仲华. 物理化学学报, **2010**, *26*, 2468.]
- (15) Wan, P.; Wang, Y.; Jiang, Y.; Xu, H.; Zhang, X. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4362.
- (16) Liu, H. Q.; Tian, Y.; Deng, Z. F. *Langmuir* **2007**, *23*, 9487.
- (17) Wang, W.; Waldeck, D. H. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 1351.
- (18) Abad, J. M.; Mertens, S. F. L.; Pita, M.; Fernandez, V. M.; Schiffrin, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5689.
- (19) Beissenhirtz, M. K.; Scheller, F. W.; Lisdat, F. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4665.
- (20) Munakata, H.; Oyamatsu, D.; Kuwabata, S. *Langmuir* **2004**, *20*, 10123.
- (21) Petrovic, J.; Clark, R. A. *Langmuir* **2005**, *21*, 6308.
- (22) Caban, K.; Offenhäusser, A.; Mayer, D. *Phys. Status Solidi A* **2009**, *206*, 489.
- (23) Laviron, E. *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *100*, 263.
- (24) Jensen, P. S.; Chi, Q. J.; Grummen, F. B.; Abad, J. M.; Horsewell, A.; Schiffrin, D. J.; Ulstrup, J. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 6124.
- (25) Xiang, C.; Zou, Y.; Sun, L.; Xu, F. *Talanta* **2007**, *74*, 206.
- (26) Keating, C. D.; Kovaleski, K. K.; Natan, M. J. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9414.

- (27) Xiang, C.; Zou, Y.; Sun, L. X.; Xu, F. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10*, 38.
- (28) Wang, L.; Wang, E. *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 49.
- (29) Nakano, K.; Yoshitake, T.; Yamashita, Y.; Bowden, E. F. *Langmuir* **2007**, *23*, 6270.
- (30) Jiang, X.; Shang, L.; Wang, Y. L.; Dong, S. J. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3030.
- (31) Cheng, Y. Y.; Chang, H. C.; Hoops, G.; Su, M. C. *J. Am. Soc. Chem.* **2004**, *126*, 10828.
- (32) Kasmir, A. E.; Wallace, J. M.; Bowden, E. F.; Binet, S. M.; Linderman, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 225.
- (33) Murgida, D. H.; Hildebrandt, P.; Wei, J.; He, Y. F.; Liu, H.; Waldeck, D. H. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 2261.