

# 铁氧化还原蛋白的直接电化学

吕亚芬, 印亚静, 杜攀, 吴萍, 陆天虹, 蔡称心

(南京师范大学化学与环境科学学院, 江苏 南京 210097)

**[摘要]** 将来源于 *Spinacia oleracea* 的铁氧化还原蛋白(ferredoxin, SoFd)通过吸附的方法固定在碳纳米管(CNT)表面. 红外光谱表明 SoFd 固定在 CNT 表面后没有变性. 循环伏安结果表明, SoFd 在 CNT 表面能进行有效和稳定的直接电子转移反应, 伏安曲线上表现出一对良好的、几乎对称的氧化还原峰; 式量电位  $E'^0$  不随扫速(在 20—120 mV/s 的扫速范围内, 其平均值为  $(-571.7 \pm 1.9) \text{ mV (vs. SCE, pH 7.0)}$ ) 变化而变化; SoFd 直接电子转移的表现速率常数  $k_s$  为  $(0.73 \pm 0.04) \text{ s}^{-1}$ .

**[关键词]** 碳纳米管, 修饰电极, 直接电化学, 铁氧化还原蛋白

**[中图分类号]** O646 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)01-0053-03

## Direct Electrochemistry of Ferredoxin

Lü Yafen, Yin Yajing, Du Pan, Wu Ping, Lu Tianhong, Cai Chenxin

(School of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** It is for the first time that *Spinacia oleracea* ferredoxin (SoFd) immobilized on the surface of the carbon nanotube (CNT) modified glassy carbon (GC) electrode (SoFd-CNT/GC) can undergo effective and stable direct electron transfer reaction. The results of FTIR spectra indicate that the procedures of immobilization SoFd on the surface of CNT does not alter the integrate structure of SoFd or damage SoFd leading to a denatured state and SoFd retained the essential feature of its secondary structure on the surface of CNT. The cyclic voltammetric results indicate that the SoFd-CNT/GC electrode exhibits a pair of well-defined and nearly symmetrical redox peaks in 0.1 mol/L phosphate buffer solution (pH 7.0). Its formal redox potential,  $E'^0$ , is almost independent on the scan rates, the average value is  $(-571.7 \pm 1.9) \text{ mV (vs. SCE, pH 7.0)}$  in the phosphate buffer solution in the scan rate range of 20 to 120 mV/s. The apparent heterogeneous electron transfer rate constant ( $k_s$ ) of the direct electron transfer of SoFd is estimated to be  $(0.73 \pm 0.04) \text{ s}^{-1}$ .

**Key words:** carbon nanotube, chemically modified electrode, direct electrochemistry, ferredoxin

铁氧化还原蛋白<sup>[1-4]</sup>(ferredoxin, Fd)以 Fe-S 簇(iron-sulfur cluster)为活性中心, 广泛存在于植物以及一些具有光合和发酵功能的微生物中, 其生理功能是在光合作用过程中, 参与光合系统 I 与一些参与光合作用的酶(如亚硝酸根还原酶、谷氨酸盐合成酶等)之间的电子传递作用<sup>[5]</sup>. 随来源不同, Fd 所含 Fe-S 簇的个数及种类也不同, 如来源于植物(包括绿色植物、藻青菌类以及水藻类等)的 Fd 一般含 1 个[2Fe-2S]中心, 而来源于具有光合作用的微生物(如固氮菌、芽孢杆菌等)的 Fd 一般含 1 个[4Fe-4S]和 1 个[3Fe-4S]2 个中心, 或含 2 个[3Fe-4S]中心, 但也有比较特殊的只含[3Fe-4S]1 个中心(如来源于 *Pyrococcus fu-*

收稿日期: 2005-08-31.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20373027)、教育部留学回国人员启动基金资助项目(211090BH31)、江苏省自然科学基金资助项目(BK2005138)、分子医学生物技术江苏省重点实验室基金资助项目(MMBKF05001)、江苏省高校自然科学基金资助项目(03KJA150055)、江苏省教育厅研究生创新基金资助项目(1612005006)、江苏省南京市人事局回国人员择优项目(211090B531).

作者简介: 吕亚芬, 女, 1976—, 硕士研究生, 主要从事电化学方面的学习与研究. E-mail: lyayafen@hotmail.com

通讯联系人: 蔡称心, 1966—, 教授, 主要从事物理化学(电化学)的教学与研究. E-mail: cxcail@njnu.edu.cn, caichenxin@njnu.edu.cn

rius 的 Fd). Fe-S 簇的种类不同,其空间结构也不同,[2Fe-2S]具有四面体空间结构,而[4Fe-4S]和[3Fe-4S]具有类似立方烷的空间结构(图 1)<sup>[4,6,7]</sup>.

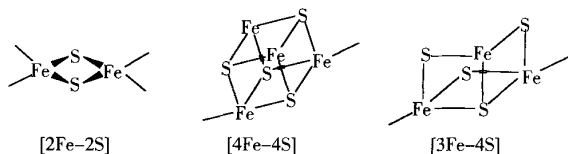
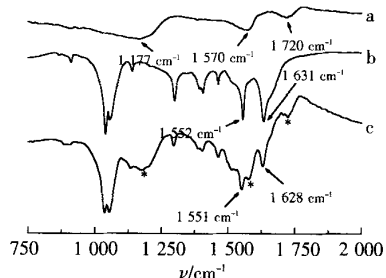


图 1 不同 Fe-S 簇的空间结构

虽然有关 Fd 直接电化学的研究有较多的报道,但能获得它们直接电子转移良好的伏安峰的报道不多,这是由于 Fe-S 中心深埋在其分子内部,溶剂分子一般较难达到所致.据我们对文献的掌握,Tominga 等<sup>[8,9]</sup>将来源于 *Chlorella* 的 Fd 固定在溴化二(十八烷基)二甲基铵修饰电极上,获得了以[2Fe-2S]为中心 Fd 的直接电子转移的伏安峰;Bianco 等<sup>[10]</sup>和 Nishiyama 等<sup>[11]</sup>分别用溴化二(十二烷基)二甲基铵修饰的热解石墨电极和  $\gamma$ -丙胺基三(乙氧基)硅烷及 N-(2-乙胺基)- $\gamma$ -丙胺基三(乙氧基)硅烷修饰的  $\text{In}_2\text{O}_3$  电极研究了溶解于溶液中的 Fd 的直接电子转移.本文报道来源于 *Spinach oleracea* (即 Spinach) 的 Fd (SoFd) 在碳纳米管(CNT)表面的吸附固定及直接电子转移. SoFd 的[2Fe-2S]中心被 19 种共 97 个氨基酸组成的肽链所包围,其中 1 个 Fe 与 2 个半胱氨酸配位,而另一个 Fe 则与 2 个组氨酸配位<sup>[1,2]</sup>,其等电点约为 4.0,因此在中性条件下,表面带净的负电荷.

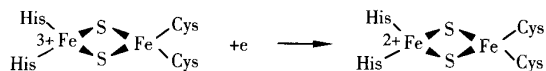
CNT 的红外光谱曲线(图 2 曲线 a)显示 CNT 表面含有羧基( $1720\text{ cm}^{-1}$ )、羧酸根基团( $1570\text{ cm}^{-1}$ )和 C—OH 键( $1177\text{ cm}^{-1}$ )等含氧功能基团,与文献中报道的基本一致<sup>[12]</sup>.图 2 曲线 b 是纯 SoFd 的红外光谱曲线,其酰胺 I 峰和酰胺 II 峰分别在  $1631\text{ cm}^{-1}$  和  $1552\text{ cm}^{-1}$ .曲线 c 是 SoFd 固定在 CNT 表面后的红外光谱曲线,图中显示,除了 CNT 本身的红外吸收(曲线带 \* 的峰)外,还出现了 SoFd 的吸收峰(曲线 c 是原信号放大 3 倍后的曲线),其酰胺 I 峰和酰胺 II 峰分别为  $1628\text{ cm}^{-1}$  和  $1551\text{ cm}^{-1}$ ,与自由状态 SoFd (曲线 b)相应的吸收峰几乎一致,分别只移动了 3 和  $1\text{ cm}^{-1}$ ,这是由于与 CNT 表面作用所致.而且曲线 b 中的所有红外吸收峰都在曲线 c 中出现,位置非常接近.这些都说明 SoFd 固定在 CNT 表面后,其二级结构没有改变,否则,酰胺 I 和酰胺 II 峰会发生很大的位移,而且峰形发生严重变形<sup>[13]</sup>.



(a) CNT, (b) 自由状态的 SoFd, (c) 固定在 CNT 表面的 SoFd(原信号放大 3 倍)

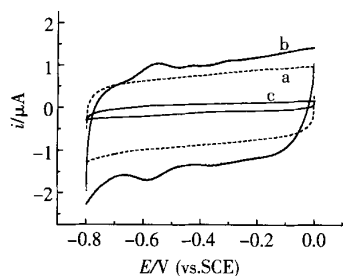
图 2 红外光谱图

图 3a 是 CNT 修饰玻碳(GC, CNT/GC)电极在  $0.1\text{ mol/L}$  磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.0)中于  $20\text{ mV/s}$  时的循环伏安曲线,从图中可以看出,在实验的电位扫描范围内,CNT/GC 电极上没有任何可观察到的电化学反应发生.图 3b 是 SoFd-CNT/GC 电极在  $0.1\text{ mol/L}$  PBS (pH 7.0)中于相同扫速时的循环伏安曲线,它有一对很好的、几乎对称的氧化还原峰,这对伏安峰经长时间扫描后不变化,说明其稳定性较好.图 3c 是将 SoFd 和十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)固定在 GC 电极表面(SoFd-CTAB/GC 表示)所得的循环伏安曲线,未见任何氧化还原峰.由曲线 a, b 和 c 所显示的结果可以得出,图 3b 中的一对氧化还原峰是由 CNT 促进 SoFd 发生直接电子转移反应所产生的伏安峰,对应的反应为<sup>[6,14]</sup>:



(1)

在  $20\text{ mV/s}$  时, SoFd 直接电子转移反应的氧化还原峰分别为  $E_{\text{pa}} = -550.2\text{ mV}$ ,  $E_{\text{pc}} = -588.2\text{ mV}$ , 式量电位为  $E^0 = -569.2\text{ mV}$ , 峰电位差  $\Delta E_p = 38\text{ mV}$ . 式量电位  $E^0$  的值与 Tominga 等<sup>[8]</sup> ( $-510\text{ mV}$ , vs.  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Sat. KCl}$ , pH 7.2), Bianco 等<sup>[10]</sup> ( $-535\text{ mV}$ , vs.  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Sat. KCl}$ , pH 7.2) 和 Nishiyama



(a) CNT/GC 电极, (b) SoFd-CNT/GC 电极, (c) SoFd-CTAB/GC 电极

图 3 电极在  $0.1\text{ mol/L}$  PBS (pH 7.0) 中于  $20\text{ mV/s}$  时的循环伏安曲线

等<sup>[11]</sup> (−600 mV, vs. Ag/AgCl/Sat. KCl, pH 7.2) 得到的溶解于溶液中 Fd 的直接电子转移的式量电位相似。

不同扫描速率下的伏安结果表明 SoFd 直接电子转移反应的氧化与还原峰电流几乎相等, 即  $i_{pa}/i_{pc} = 1$ , 并且氧化还原峰电流  $i_p$  与扫描速率  $v$  之间有线形关系, 说明整个电极过程是受表面过程控制的<sup>[15]</sup>。随着扫描速率的增加, 其氧化峰电位  $E_{pa}$  向正方向移动, 还原峰电位  $E_{pc}$  向负方向移动, 峰电位差  $\Delta E_p$  增加, 并且与扫速几乎成线性关系, 说明 SoFd 在 CNT/GC 电极表面的直接电子转移遵循 Butler-Volmer 电子转移理论<sup>[3,5]</sup>。但式量电位  $E'^0$  几乎不随扫速的增加而发生变化 (在 20—120 mV/s 的扫速范围内, 式量电位  $E'^0$  的平均值为  $(-571.7 \pm 1.9)$  mV)。根据扫速与峰电位差的关系, 利用 Laviron<sup>[16]</sup> 关于电极表面反应异相动力学常数的计算方法, 可以得到 SoFd 直接电子转移反应的表现速率常数  $k$ , 为  $(0.73 \pm 0.04)$  s<sup>−1</sup>, 说明 CNT 能有效地促进 SoFd 的直接电子转移。

### [参考文献]

- [1] Binda C, Coda A, Aliverti A, et al. Structure of the mutant E92K of [2Fe-2S] ferredoxin I from *Spinacia oleracea* at 1.7 angstroms resolution [J]. Acta Crystallogr, 1998, D54(10): 1353—1358.
- [2] Mastubara H, Sasaki R M. Spinach ferredoxin [J]. J Biol Chem, 1968, 243(8): 1732—1757.
- [3] Hirst J, Armstrong F A. Fast-scan cyclic voltammetry of protein films on pyrolytic graphite edge electrodes: Characteristics of electron exchange [J]. Anal Chem, 1998, 70(23): 5062—5071.
- [4] Bes M T, Parisini E, Inda L A, et al. Crystal structure determination at 1.4 Å resolution of ferredoxin from the green alga *Chlorella fusca* [J]. Structure, 1999, 7(10): 1201—1210.
- [5] Munge B, Das S K, Ilagan R, et al. Electron transfer reaction of redox cofactors in Spinach photosystem I reaction center protein in lipid films on electrodes [J]. J Am Chem Soc, 2003, 125(41): 12457—12463.
- [6] Zu Y, Fee J A, Hirst J. Breaking and re-forming the disulfide bond at the high-potential, respiratory-type rieske [2Fe-2S] center of *Thermus thermophilus*: Characterization of the sulfhydryl state by protein-film voltammetry [J]. Biochem, 2002, 41(47): 14054—14065.
- [7] Jameson G N L, Walters E M, Manieri W, et al. Spectroscopic evidence for site specific chemistry at a unique iron site of the [4Fe-4S] cluster in ferredoxin: Thioredoxin reductase [J]. J Am Chem Soc, 2003, 125(5): 1146—1147.
- [8] Tominaga M, Hashimoto S, Nakashima N. Effect of phase transition on the electrochemical behavior of ferredoxin embedded in an artificial lipid membrane film [J]. J Electroanal Chem, 2004, 561(1): 13—20.
- [9] Tominaga M, Hashimoto S, Nassar A E F, et al. Thermal stability and electrode reaction of chlorella ferredoxin embedded in artificial lipid bilayer membrane films on a graphite electrode [J]. Anal Chem, 1999, 71(14): 2790—2796.
- [10] Bianco P, Haladjian J. Electrochemistry of ferredoxin and c-type cytochromes at surfactant film-modified pyrolytic graphite electrodes [J]. Electrochim Acta, 1997, 42(4): 587—594.
- [11] Nishiyama K, Ishida H, Yanoguchi I. Aminosilane modified indium oxide electrodes for direct electron transfer of ferredoxin [J]. J Electroanal Chem, 1994, 373(1/2): 255—258.
- [12] Chen J, Hamon M A, Hu H, et al. Solution properties of single-walled carbon nanotubes [J]. Science, 1998, 282(1): 95—98.
- [13] Sun D M, Cai C X, Li X G, et al. Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized on active carbon [J]. J Electroanal Chem, 2004, 566(2): 415—421.
- [14] Leggett E J, Hirst J. Roles of the disulfide bond and adjacent residues in determining the reduction potential and stabilities of respiratory-type rieske clusters [J]. Biochem, 2005, 44(18): 7048—7058.
- [15] Bard A J, Faulkner L R. Electrochemical Methods, Fundamental and Applications [M]. 2nd ed. New York: Wiley, 2001: 594.
- [16] Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems [J]. J Electroanal Chem, 1979, 101(1): 19—28.

[责任编辑: 丁蓉]