

ЕЛЕКТРОХИМИЯ НА МИОГЛОБИН ХЕМИСОРБИРАН ВЪРХУ ПОЗЛАТЕН ГРАФИТ

Д. Георгиева¹, Т. Додевска², Ел. Хорозова¹, Н. Димчева¹

*¹ катедра Физикохимия, ПУ „П. Хилендарски“,
ул. „Цар Асен“ № 24, гр. Пловдив 4000;
E-mail: ninadd@uni-plovdiv.bg*

*² катедра Неорганична химия и Физикохимия, УХТ – гр. Пловдив,
бул. „Марица“ №26, Пловдив 4002;
E-mail: dodevska@mail.bg*

ABSTRACT

Redox protein myoglobin was immobilized on gold-plated graphite through self-assembly process. Its redox behavior was probed with cyclic voltammetry. The experimental results suggest irreversible binding of the protein to the gold layer due to the interaction of sulfur-containing amino-acid cysteine from the protein shelf with gold: $2HS-R + 2Au \rightarrow 2Au-S-R + H_2$. In addition to that, two separate peaks appear on the cathodic part of the cyclic voltammetric curve one of which being assigned to the redox transformation of heme-prosthetic group. The efficiency of the electron exchange between the chemisorbed myoglobin was found to be much bigger as compared to the one of physically adsorbed myoglobin. It was hypothesized that upon chemisorption, most of the myoglobin molecules bind to the gold layer in an orientation superior for direct electron communication with the underlying electrode surface.

The immobilized protein was found capable to electrocatalytically reduce H_2O_2 and Cl_3CCOOH in neutral aqueous solutions at room temperature. The electroreduction of Cl_3CCOOH was found to occur at much lower overpotentials compared to bare graphite electrode.

Ключови думи: *миоглобин, хемисорбция, директен електронен пренос, позлатен графитов електрод*

ВЪВЕДЕНИЕ

Целенасоченото изграждане на сложна електродна архитектура чрез структурирането на електродни повърхности представлява принципно нов подход при имобилизиране на биокомпоненти, целящ постигане на директна електрическа комуникация между биокатализатор и електрод посредством: 1) скъсяване на дистанцията между електродната повърхност и активния център на първия; и 2) ориентиране на биокатализатора в благоприятна за директен електронен пренос-DET конформация. В тази връзка, модифицирането на електродни материали с нано-частици от ZrO_2 [1], със Au наночастици [2–4], въглеродни нанотръбички (CNT) [5–8] и титанови нанотръбички (TiNT) [9], предхождащо имобилизацията на миоглобина, във всички случаи е довело до наличие на директна биоелектрокатализа [10,11]. Възможностите на тези биоелектрокаталитични системи се определят от уникалните свойства на наночастиците. Те се отличават с голямо съотношение повърхност/обем, предоставят стабилна повърхност за ориентирана адсорбция на биомолекулите при запазване на биологичната им активност. В много от случаите, самите наночастици представляват своеобразни нано-проводници, улесняващи електронния обмен между електрода и протеина, които предоставят възможност размерът и повърхностната им морфология да бъдат контролирани чрез вариране условията на получаването им. Това мотивира изследванията ни върху електрохимичното поведение на миоглобин, имобилизиран върху позлатен графит.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

В настоящата работа беше използван миоглобин от конски сърдечен мускул (horse heartmyoglobine: Fluka Biochemika). Въглероден материал – спектрално-чист графит във вид на пръчки с диаметър 0,5 см

и дължина 8–10 см с надлъжна тефлонова изолация, беше използван като основа за ензимния електрод.

H_2O_2 и химикалите за приготвяне на буферните разтвори ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, лимонена киселина, конц. H_3PO_4 и Tris (hydroxymethyl – aminomethane), бяха закупени от Fluka. Разтвори на трихлороцетна киселина Cl_3CCOOH със спецификации чист за анализ (чза) и изходна концентрация 0,56 М бяха използвани като моделни нетипични субстрати на миоглобина, без допълнителна обработка. Останалите реактиви бяха с чистота над 98 % или със спецификация „спектрално чисти“ (Fluka) и не бяха подлагани на допълнителна обработка преди употреба. При получаването на водни и буферни разтвори беше използвана двойно дестилирана вода. Фосфатно-цитратен буфер с неутрално рН (7,0) и концентрация 0,1 М беше използван като работна среда, докато 0,1 М трис-буфер, рН= 7,0 се използваше за приготвянето на ензимните разтвори. Киселинността им беше контролирана с рН-метър Hanna Instruments, рН 211.

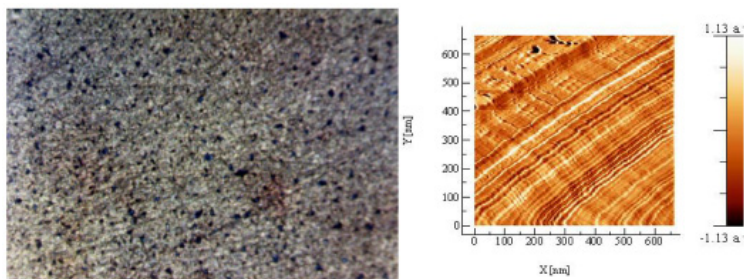
Стандартна, триелектродна стъклена клетка с неразделени електродни пространства и работен обем 10–20 cm^3 , сравнителен електрод – Ag / AgCl, 3 М KCl спомагателен електрод – платинов проводник и работен електрод от спектрално-чист графит, беше използвана при всички електрохимични изследвания. Измерванията бяха проведени с електрохимична работна станция Palm Sens с компютърен контрол и софтуер PS Trace 2.13 (Palm InstrumentsBV, Холандия). Отлагането на тънки филми от злато (дебелина до 1–2 μm) беше извършвано чрез кратковременна електролиза ($t=10$ s) от 2%-ен разтвор на HAuCl_4 в 0.1 М HCl при потенциал – 155 mV (vs. Ag/AgCl, 3М KCl).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Електрохимична активност на миоглобин, хемисорбиран върху позлатен графит

Върху микроскопските изображения (фиг. 1) се вижда, че при електрохимичното модифициране на графита на повърхността му се отлага тънък, но плътен слой от злато, който повтаря релефа на носителя с всичките му структурни дефекти. Атомно-силовото микроскопско изображение на модифицирания графит свидетелства, че при модифицирането се формират 3D структури от злато с височина до около 100

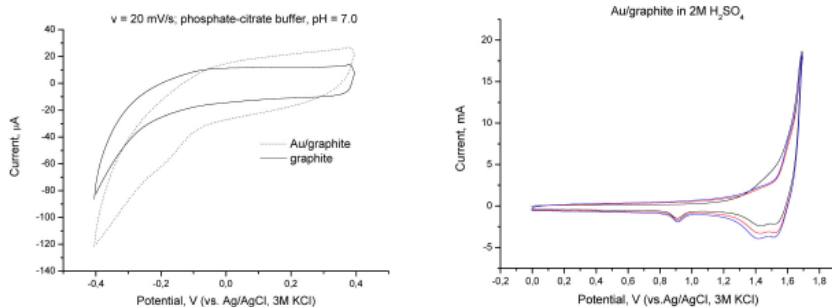
nm. Отлагането на тънък златен филм върху графита променя и вида на цикличните волтампереграми на електрода, заснети във фонов електролит ФЦБ, рН 7,0 (фиг. 2). Цикличните волтамперни криви на позлатения графитов електрод (фиг. 2, ляво) свидетелстват за по-развита електродна повърхност от тази на същия електрод, но преди модификацията. Тези резултати са в унисон с наблюденията от микроскопските изследвания – образуването на микро и нано-структури води до увеличаване на повърхността на електродите.



Фигура 1. *Ляво: Микроскопско изображение на филма от злато отложен потенциостатично върху графит при потенциал – 155 mV (vs. Ag/AgCl) за 10 s (металографски микроскоп, x 250); Дясно: 3D – топология на тънък филм злато отложен върху графит изследвана с AFM.*

Физичната и химичната сорбция (хемисорбция, при която енергията на връзките между сорбента и сорбата е от порядъка на енергията на химична връзка), са двата метода за имобилизация, при които се запазва напълно или в значителна степен каталитичната активност на биокатализатора като при тях в най-голяма степен се запазва както каталитичната им активност, така и пространствена конфигурация на молекулата най-близка до нативната. Освен това, хемисорбцията предлага и допълнително предимство – възможността обемистите протеинови глобули да се свързват винаги чрез точно определен фрагмент от макромолекулата си, като по този начин се постига точно определена еднотипна пространствена ориентация на биокатализатора. В тази връзка, хемисорбирането на миоглобина върху позлатен графит представлява един от най-удачните и прости в препаративно отношение подходи, при който се очаква запазване на каталитичната му активност

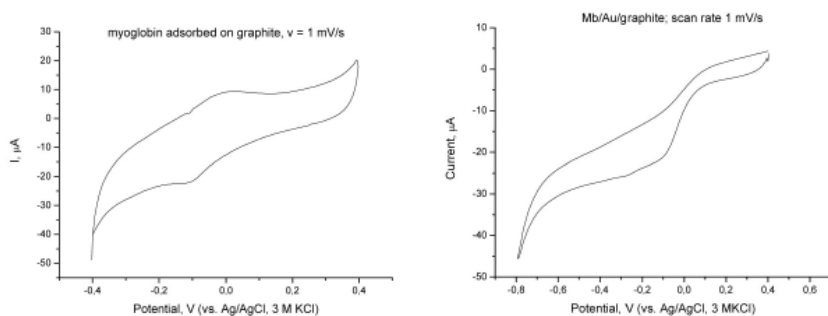
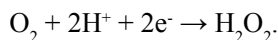
в значителна степен и за дълъг период от време. При предварителни експерименти беше установено, че хемисорбцията му върху позлатен графитов електрод завършва напълно за около 20 ч, и че процесът протича само върху предварително почистен електрохимично и промит с дестилирана вода електрод, който не е влизал в досег с въздух или буферни разтвори. В случаите, когато електродната повърхност е замърсена от адсорбирани газове или разтвори на соли, хемисорбцията на протеина или протича в незначителна степен, или изобщо не се наблюдава. Липсата или проявата на каталитичната активност при добавяне на водороден пероксид (т. е. отклика на ензимния електрод при добавяне на порции субстрат) беше приет като индикатор за степента на протичане на сорбцията.



Фигура 2. Ляво: Циклични волтамперни криви на спектрално чист графит (черно) и на графит с отложен тънък златен филм (сиво, пунктир) фонов електролит фосфатно-цитратен буфер, pH 7,0; скорост на сканиране $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; Ag/AgCl, 3M KCl; Дясно: електрохимично почистване: първите три циклични волтамперни криви на графит с отложен тънък златен филм в $2\text{M H}_2\text{SO}_4$; скорост на сканиране $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; Ag/AgCl, 3M KCl.

На фиг. 3 са сравнени циклични волтамперни криви на миоглобин, адсорбиран върху немодифициран и върху модифициран със златни отложения графит след електрохимично почистване на златния слой при много ниски скорости на изменение на потенциала. На показаните криви се наблюдават добре изразени максимуми както върху анодния, така и върху катодния ход на кривите, чиито потенциали на пика се изменят с изменение скоростта на сканиране. Волтамперограмите на

адсорбираня върху модифициран графит миоглобин се отличават с по-остри, ясно изразени максимуми (фиг. 3), в сравнение с кривите на миоглобин, адсорбиран върху немодифициран графит. С увеличаване скоростта на сканиране катодните пикове на редукция на адсорбираня върху модифициран графит миоглобин се изместват в отрицателна посока, както е и върху немодифициран графит. Видът на кривите подсказва, обаче, че процесите в случая са необратими. Анализът на данните показва, че окислително-редукционното превръщане на хемисорбираня върху модифицирания графит миоглобин протича с пренос на един електрон и е в резултат от протичането на реакцията:



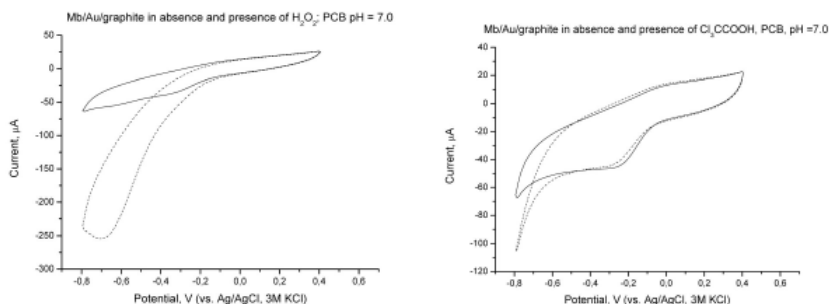
Фигура 3. Ляво: Циклични волтампетри криви на графитов електрод с адсорбиран миоглобин (ляво) и на миоглобин хемисорбиран върху позлатен графит (дясно) във фонов електролит фосфатно-цитратен буфер, pH 7,0; скорост на сканиране $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; Ag/AgCl, 3M KCl.

Възможността да се регистрират продължително възпроизводими циклични волтампетри криви свидетелства, че миоглобинът се адсорбира необратимо върху модифициран със злато графит. Златните частици, отличаващи се с висока биосъвместимост, не само улесняват електронния трансфер между протеиновите молекули и електродната повърхност, но и предполагат образуването на здрава хемисорбиционна връзка между сярна-съдържащите аминокиселини от белтъчната глобула на миоглобина и модифицирания графит, съгласно уравнението: $2\text{HS-R} + 2\text{Au} \rightarrow 2\text{Au-S-R} + \text{H}_2$. При скорости на сканиране над 10 mV/s

върху катодния ход на волтамперограмите се наблюдава появата на втори максимум, който има формален редокс-потенциал $E = -350 \pm 10$ mV и не се наблюдава върху немодифициран графит. Потенциалът му практически не се влияе от скоростта на сканиране и по всяка вероятност не се отнася до хемисорбиран миоглобин.

2. Електрокаталитична активност на хемисорбиран миоглобин

Каталитичната активност на адсорбиран миоглобин върху модифициран със златни наночастици графит беше изследвана при електроредукция на H_2O_2 и на трихлороцетна киселина (фиг.4). Сравнението на цикличните волтамперни криви на електрода с хемисорбиран миоглобин (фиг. 4) в отсъствие (плътна) и в присъствие на висока концентрация на водороден пероксид (пунктир) доказват, че електрохимичната редукция на пероксида започва още при потенциал около 0 V, като формата на кривите е характерна за практически необратими електрохимични реакции. Въз основа на тези криви беше заключено, че потенциали в диапазона от 0 до $-0,350$ V са подходящи за амперометрично определяне на пероксида в неутрална водна среда. При тези експериментални условия електроредукцията му протича със значителна скорост и не протичат странични реакции, които да влияят върху електродния сигнал.



Фигура 4. Циклични волтамперни криви на електрод от позлатен графит с хемисорбиран миоглобин: Ляво – в отсъствие (плътна) и в присъствие (пунктир) на водороден пероксид; Дясно – в отсъствие (плътна) и в присъствие (пунктир) на трихлороцетна к-на; фонов електролит фосфатно-цитратен буфер, pH 7,0; скорост на сканиране $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; Ag/AgCl, 3M KCl.

Съществуват литературни данни, че имобилизираният върху различни електродни материали миоглобин е ефективен редокс-катализатор на електрохимичната редукция на трихлорооцетна киселина [12,13]. При това редукционният процес протича при свръхнапрежение, което е поне с 0,8 V по-ниско, отколкото върху електродния материал без имобилизиран протеин.

В тази връзка, с помощта на метода циклична волтамперометрия беше изследвано поведението на миоглобина, хемисорбиран върху позлатен графит в отсъствие и в присъствие на трихлорооцетна киселина (фиг. 4). От представената фигура е видно, че върху цикличната волтамперограма, заснета в присъствие на трихлорното органично съединение, при потенциали по-отрицателни от $-0,5$ V се наблюдава рязко нарастване на тока в отрицателна посока, характерно за протичане на редукционни процеси. При това, изменението на тока спрямо фоновия сигнал е пропорционално на концентрацията на добавената трихлорооцетна киселина (не е показано).

Изследването на стабилността на ензимния електрод, получен при хемисорбция на редокс-протеина миоглобин върху тънък златен филм, отложен върху графит показва, че електродът може да бъде използван до 14 дни след приготвянето му, като запазва над 40 % от първоначалната си активност, при условие, че се съхранява в буферен разтвор и при ниски температури. Дискутираните дотук експериментални резултати показват, че избраният метод за закрепване на редокс-протеина към електродната повърхност позволява многократното му използване и предлага много по-дълъг живот на имобилизирания биокомпонент в сравнение с физичната адсорбция при значително съхранение на каталитична активност.

БЛАГОДАРНОСТ

Авторите изказват благодарност за финансовата подкрепа на Националния фонд „Научни изследвания“ (договор ДВУ – 02/38) и на фонд „Научни изследвания“ към ПУ (тема НИ11-ХФ-007).

ЛИТЕРАТУРА

1. G. Zhao, F. J.–Ju, X.J.–Juan, C. H.–Yuan: *Electrochem. Commun.*, 7, 724–729 (2005).
2. S. Liu, H. Ju: *Electroanalysis*, 15, 1488–1493 (2003).
3. L. S Duan, Q. Xu, F. Xil, S. F.Wang: *Int. J. Electrochem. Sci*, 3, 118–124 (2008).
4. S. Zhao, K. Zhang, Y. Bai, W. Yang, Sun C.: *Bioelectrochem.*, 69, 158–163, (2006).
5. S. Zhang, W. Yang, Y. Niu, Y. Li, M. Zhang, Sun C.: *Anal. Bioanal. Chem.*, 384, 736–741, (2006).
6. P. Yanez–Sedeno, J. M. Pingarron: *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 884–886 (2005).
7. W. Sun, X. Li, Y. Wang, X. Li, C. Zhao, K. Jiao: *Bioelectrochem.*, 75, 170–175 (2009).
8. M. G. Esplandiu, M. Pacios, L. Cydanek, J. Bartroli, M. del Valle: *Nanotechnology*, 20 (35), paper 355502 (2009).
9. A. Liu, M. Wei, I. Honma, H. Zhou, *Anal. Chem.* 77, 8068–8074 (2005).
10. G. K. Ahirwal, C. K. Mitra: *Sensors*, 9, 881 – 894 (2009).
11. A. Christenson, N. Dimcheva, E. Ferapontova, Lo Gorton, T. Ruzgas, L. Stoica, S. Shleev, A. Yaropolov, D. Haltrich, R. Thorneley, S. Aust: *Electroanalysis*, 16, 1074 (2004).
12. Y. Wang, J. Wu, T. R. Zhan, W. Sun, K. Jiao: *Sensor Letters* 7 (6), 1106–1112 (2009).
13. Yancai Li., Weiwei Yang, Yu Bai, Changqing Sun: *Electroanalysis* 18 (5) 499–506 (2006).

