

文章编号: 1001-3555(2018)06-0574-07

甲烷氧化菌素功能化纳米金修饰电极模拟 SOD 的电化学性能研究

陈林林^{1*}, 王振兴¹, 窦博鑫¹, 韩 可¹, 辛嘉英^{1,2}

(1. 哈尔滨商业大学 省高校食品科学与工程重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076;

2. 中国科学院兰州化学物理研究所 羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 利用混合自组装的方式, 将 Mb 功能化纳米金 (Mb-AuNPs-MUA) 修饰在金电极表面, 以制备出检测超氧阴离子无电子媒介体生物传感器. 采用 UV-Vis 考察修饰纳米团簇的相关特征, 利用修饰电极检测 DMSO/NaOH 体系产生的超氧阴离子. 试验结果表明: 该修饰电极对超氧阴离子的歧化反应具有显著的催化活性, 计算出异相电子传递速率常数 (K_s) 为 0.041 cm/s, 电子转移系数 (α) 为 0.435. 在 0.06~0.2 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 超氧阴离子浓度与峰电流呈良好的线性关系, 相关系数 R^2 为 0.9719, 方法检出限 (LOD) 为 $1.129 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ ($S/N=3$)、 $3.683 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ ($S/N=10$), 精密度的测定得相对标准偏差 (RSD, $n=9$) 为 3.83%.

关键词: 甲烷氧化菌素; 纳米金; 电化学; 超氧阴离子

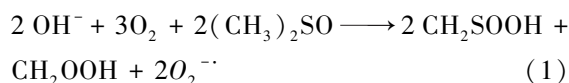
中图分类号: O643.32

文献标志码: A

甲烷氧化菌能够向周围环境中释放一种小分子荧光肽甲烷氧化菌素 (Methanobactin, Mb) 用来捕捉周围微量的铜, Mb 与铜结合会被甲烷氧化菌重新识别吸收并将铜富集在菌体中供颗粒性甲烷单加氧酶 (particulate methane monooxygenase, pMMO) 表达^[1]. Mb 在 pMMO 催化甲烷氧化中起到促进由 NADH 等电子供体向 pMMO 传递的作用, 同时 Mb 还具有歧化超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 转变为 H_2O_2 的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性^[2]. 我们^[3]的前期工作还发现 *M. trichosporium* 3011 释放出的 Mb 只有与铜离子结合时才能表现出 SOD 活性. Grabar 等^[4-5] 研究发现纳米金 (gold nanoparticles, AuNPs) 与有机物分子中的巯基可以形成作用力较强的共价配位键, 为酶分子以纳米金为载体用 Mb 对其修饰提供了有效的途径. 我们采用铜离子配位的甲烷氧化菌素功能化纳米金模拟 SOD 就可以从非天然酶角度获得新型高效模拟 SOD 金属配合物结构信息, 设计合成出高效的 SOD 模拟酶. 借助 11-巯基十一烷酸 (11-mercaptoundecanoic acid,

MUA) 在 AuNPs 颗粒表面修饰上具有生物活性物质 Mb, 在纳米金上引入了某些特定的功能团如-SH、-COOH 等, 均会维持生物分子的空间构型, 从而降低了非特异性的结合, 由于自组装膜使纳米金均匀分散, 当将纳米金修饰到电极表面后, 也会均匀分散, 有效降低了纳米金的团聚.

目前, 超氧阴离子检测的方法包括黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶法^[6]、邻苯三酚自氧化法^[7]、核黄素-NBT 法^[8] 和细胞色素 C 还原法^[9] 等. 但是由于 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的不稳定及产物浓度的不确定性, 为寻找能够稳定产生超氧阴离子的体系, 本实验通过二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 在低水分含量的碱性条件下可以产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ^[10], 其产生的过程为:



利用甲基弯菌 *M. trichosporium* IMV 3011 作为实验菌种进行发酵培养, 获得 Mb, 并将其与 Cu^{2+} 和 AuNPs 结合所形成团簇修饰到裸金电极上, 从而

收稿日期: 2018-08-24; **修回日期:** 2018-09-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21573055); 哈尔滨市应用技术与开发项目 (2014RFQXJ115); 哈尔滨商业大学校级科研项目 (18XN079) (NNSF of China (21573055); Harbin Applied Technology Research and Development Project (2014RFQXJ115); Scientific research project in school-level of Harbin University of Commerce (18XN079)).

作者简介: 陈林林 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学 (Chen Lin-lin (1979-), female, PhD degree, associate professor, engages in biocatalysis).

* 通讯联系人, chenlinl2013@126.com.

制备出具甲烷氧化菌素功能化纳米金修饰电极, 通过考察修饰电极在 DMSO 条件下歧化 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的电化学行为.

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

11-巯基十一烷酸购自阿拉丁试剂公司, 分析纯; 四氯金酸 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 购自国药集团化学试剂有限公司, 分析纯; 二甲基亚砷购自北京索莱科技有限公司, 其余所有试剂均为分析纯. 实验用水为双蒸水.

12-CHI630 电化学工作站, 上海辰华仪器公司; UV-2550 型全波长紫外可见分光光度计, 日本岛津

公司. 电化学测试中, 电化学体系均为三电极体系, 其中对电极为铂丝电极, 参比电极为 Ag/AgCl 电极, 工作电极为直径 3 mm 金盘电极(以上电极均购自天津艾达恒晟工贸有限公司).

1.2 不同纳米金团簇的制备

根据文献[11–12]进行 Mb 的制备和分离纯化, 通过冷冻干燥后, 得到 Mb 固体. 在加水复溶通过铬天青 S 法测得 Mb 溶液^[13]浓度为 0.025 mol/L. 并利用 Frens 法制备出酒红色的 AuNPs 溶液^[14]. 然后, 向 AuNPs 溶液中分别滴加配制好的 Mb 溶液和 5 mmol/L MUA 溶液. 所制备好的纳米团簇利用 UV-Vis 进行结构表征并用于电化学测试. 其制备方法如表 1 所示.

表 1 不同纳米团簇的制备
Table 1 Preparation of different nano-clusters

Nano-cluster	AuNPs/mL	Mb/ μL	MUA/ μL	Water/ μL
AuNPs	2.0	500	90	1000
AuNPs-Mb				910
AuNPs-MUA		500	90	410
AuNPs-Mb-MUA				

1.3 修饰电极制备与电化学表征

1.3.1 修饰电极的制备 一般在纳米金表面组装的是长链巯基化合物, 当长链巯基化合物在纳米金表面组装的时候可能发生弯曲缠绕的现象. 我们利用混合自组装方式制备的修饰电极就可防止这种现象的产生^[15–16]. 将金电极($\Phi=3\text{ mm}$)分别利用 0.25 和 0.05 μm 粒径的氧化铝悬浊液抛光裸金电极($\Phi=3\text{ mm}$)成镜面, 再依次通过甲醇、水超声清洗 0.5 min. 将打磨好的裸金电极在电位为 $-0.3\sim+1.5\text{ V}$ 的范围 1 mol/L H_2SO_4 溶液中于循环伏安扫直至稳定, 从而得到预处理好的裸金电极.

向预处理好的裸金电极表面滴加 20 μL Mb-AuNPs-MUA 溶液, 避光, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 环境下进行组装 18 h. 测试前用双蒸水冲洗并用 N_2 吹干, 从而得到制备好的修饰电极以进行电化学测定.

1.3.2 修饰电极表面配位 Cu^{2+} 将上述制备好的修饰电极用双蒸水冲洗后再用 N_2 吹干. 并将其分别浸泡在 0.1 mol/L CuSO_4 溶液中, 在 4 $^\circ\text{C}$ 环境下修饰 20 h. 同样通过电化学方法对被 Cu^{2+} 配位后的修饰电极进行测试.

1.3.3 修饰电极的电化学测定 采用 $5\times 10^{-3}\text{ mol/L K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] + 5\times 10^{-3}\text{ mol/L K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] + 0.1\text{ mol/L KCl}$ 溶液作为电化学测定的交流阻抗法 (AC impedance method, EIS) 与循环伏安法 (Cyclic Voltammetry, CV) 的测定用溶液. 以用来表征所制备修饰电极的电化学行为.

利用 DMSO (4 $\text{\AA}$ 分子筛除水) 中通 30 min 氧气的溶液作为修饰电极 ($\text{Cu}^{2+}/\text{Mb-AuNPs-MUA}/\text{Au}$) 歧化超氧阴离子的电化学测定溶液, 通过添加 NaOH 水溶液或是改变扫速, 利用循环伏安法对该反应体系的动力学进行测定.

2 结果与讨论

2.1 纳米团簇的紫外-可见光谱

实验表明纳米金在 520 nm 处有最强等离子共振峰. 如图 1 所示, Mb-AuNPs 的等离子振动峰发生微弱的红移, 吸收波长变为 525 nm, 此时是由于 Mb 的加入 AuNPs 与 Mb 表面上的二硫键结合, 进而纳米金稍有团聚发生微弱红移. 然而随着 MUA 与 Mb 的加入, 金纳米在 520 nm 的等离子振动峰发

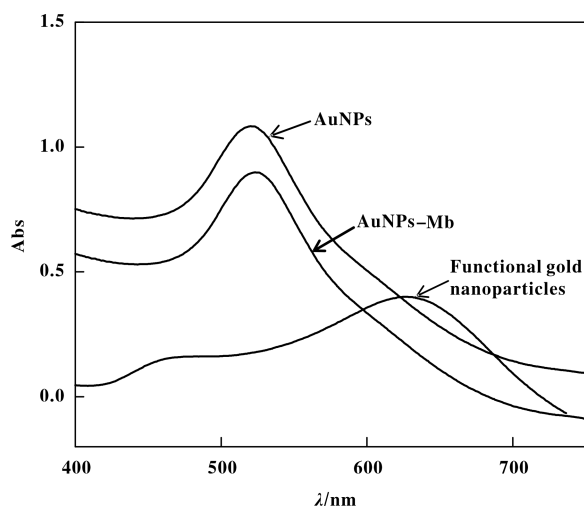


图 1 不同纳米金团簇紫外光谱

Fig.1 UV Spectra of different nano-gold cluster

生明显减小并发生明显红移, 最终 MUA-AuNPs-Mb 的纳米团簇吸收波长由纯金纳米溶胶的 520 nm 红移至 624 nm 处^[17-18]. 这可能是由于 Mb 与 MUA 结构中的巯基与金属发生配位后产生电子迁移所导致的红移现象发生, 也有可能是由于个别邻近的金纳米颗粒间发生团聚现象所导致的吸收峰值减小.

2.2 修饰电极的电化学性质

为弄清修饰电极上的组装行为, 以 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 为探针溶液, 研究 Mb-AuNPs、Mb-MUA、Mb-AuNPs-MUA 修饰电极的电化学行为. 图 2 分别为 Mb-AuNPs、Mb-MUA、Mb-AuNPs-MUA 修饰电极的

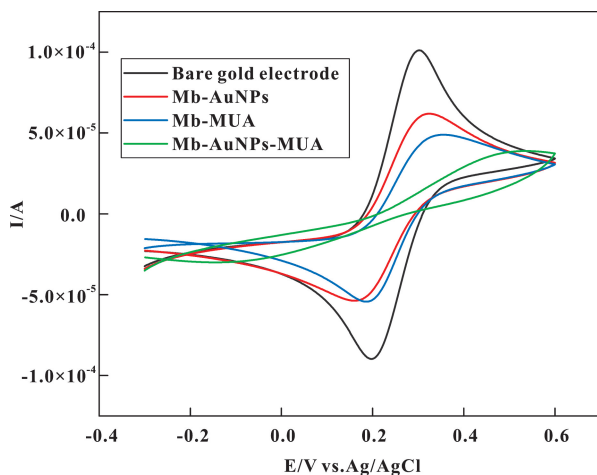


图 2 修饰电极在 0.1 KCl 和 5 mmol/L

 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 水溶液中的循环伏安

Fig.2 Cyclic voltammetry of modified electrode in 0.1 mol/L

KCl and 5 mmol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ solution

循环伏安曲线. 通过 CV 曲线可以看出, 氧化还原峰电流与裸金电极相比变小, 这是由于当纳米团簇修饰到电极, 会降低探针溶液氧化还原反应物在电极上的氧化还原反应.

同时从图 3 (EIS 图) 可以看出, 当修饰上纳米粒子后, 高频区半圆直径明显增大. 裸金电极、

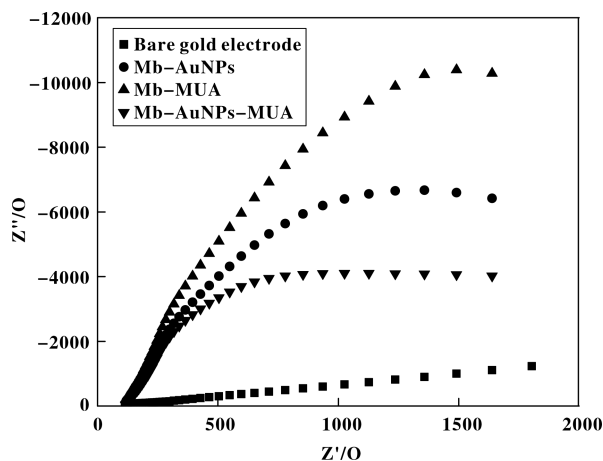


图 3 修饰电极在 0.1 mol/L KCl 和 5 mmol/L

 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 溶液中的交流阻抗

Fig.3 AC impedance of modified electrode in 0.1 mol/L

KCl and 5 mmol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ solution

Mb-MUA、Mb-AuNPs、Mb-AuNPs-MUA 这 4 种电极的电子传递电阻 R_{ct} 分别为 740、1984、1342 和 $4522 \Omega \cdot \text{cm}^2$. 结果显示, 当功能性纳米金修饰到电极上时, 电子传递电阻明显增大, 这可以表明纳米粒子对跨膜电子传递阻力作用增强, 也表示了纳米粒子修饰到了裸金电极, 同时与 Liu 等^[19] 利用纳米银制备出的修饰电极 ($\text{AgNPs}/\text{SDS-MWCNTs}$), Braik 等^[20] 利用碳纳米管与 3,4-亚乙二氧基噻吩制备的修饰电极所测定结果一致.

2.3 修饰电极对超氧阴离子的电化学行为

修饰电极在 DMSO/NaOH 体系中对超氧阴离子的循环伏安曲线如图 4 所示.

从图 4 可知, 在加入 NaOH 液与未加入 NaOH 溶液的反应体系中的循环伏安曲线有着明显变化. 加入 NaOH 后看到了明显的氧化还原峰, 峰电流由 $1.072 \times 10^{-7} \text{ A}$ 增加到 $5.69 \times 10^{-5} \text{ A}$. 试验结果表明, 修饰电极 $\text{Cu}^{2+}/\text{Mb-MUA-AuNPs}/\text{Au}$ 在 DMSO/NaOH 体系中对超氧阴离子有明显的催化歧化作用. 这可能是由于修饰电极中的纳米粒子高的比表面积大大提高 Mb 的固定量, 提高了电极表面电信号^[21].

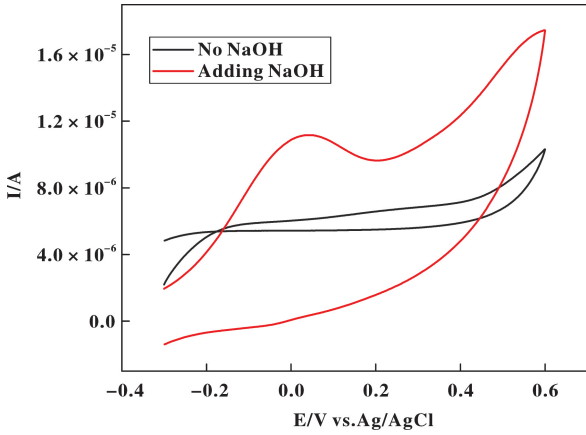


图 4 修饰电极在 DMSO 体系中对 $O_2^{\cdot -}$ 循环伏安图
Fig.4 Cyclic voltammetry of modified electrode in DMSO system for $O_2^{\cdot -}$

2.4 修饰电极歧化 $O_2^{\cdot -}$ 的动力学

2.4.1 电子转移系数 α 的测定 修饰电极 $Cu^{2+}/Mb-MUA-AuNPs/Au$ 在不同扫速下对加有 $5\ \mu L$ $5\ mmol/L$ 氢氧化钠的 DMSO 溶液中进行循环伏安扫描, 随着扫速的增大发现氧化峰电位 E_{pa} 增大还原峰电位 E_{pc} 减小, 进而可得到 E_{pa} 与 E_{pc} 随着 $\log v$ 变化的直线关系图(如图 5). 并对其直线进行线性

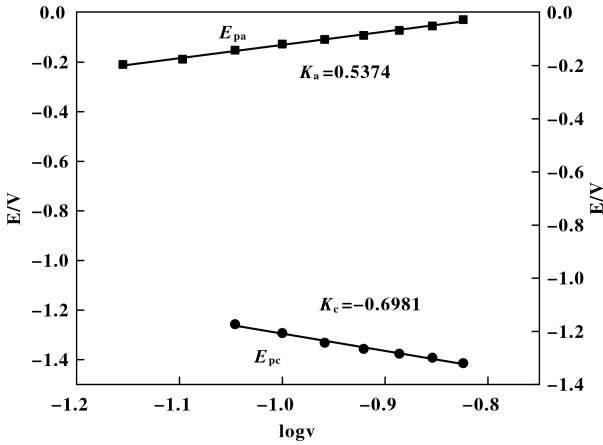


图 5 修饰电极 $Cu^{2+}/Mb-MUA-AuNPs/Au$ 在 DMSO/NaOH 体系中的 E_{pa} 、 E_{pc} 与 $\log v$ 的关系
Fig.5 Relationship between E_{pa} , E_{pc} and $\log v$ of modified electrode $Cu^{2+}/Mb-MUA-AuNPs/Au$ in DMSO/NaOH system

拟合得到线性回归方程, 其直线斜率分别为 $k_a = 0.5374$, $k_c = -0.6981$, 并根据公式(2)、(3)求得修饰电极 $Cu^{2+}/Mb-MUA-AuNPs/Au$ 在 DMSO/NaOH 体系中的电子转移速率系数 α 为 $0.435^{[22]}$.

$$E_{pa} = constant + \frac{2.3RT}{(1 - \alpha)nF} \log v \quad (2)$$

$$E_{pc} = constant + \frac{2.3RT}{\alpha nF} \log v \quad (3)$$

其中 F 为法拉第常数 $964\ 84\ C/mol$, α 为表速率控制步骤中的电子转移系数, R 为摩尔气体常数 $8.3145\ J/(mol \cdot K)$, T 为反应温度 $298\ K$, v 为扫描速度.

2.4.2 异相电子传递速率常数 (K_s) 异相电荷传递过程指的是电荷在电极与溶液间的传递过程. 当物质在电极上发生电子转移的氧化还原反应时, 电子是在电极与电解质溶液间进行传递, 由于该氧化还原反应发生在两相界面上, 故称为异相反应^[24]. 若电子在两相间的电阻很小, 传递速率快速, 说明该电极过程是可逆的; 反之, 电极过程则为不可逆. 我们可以通过异相电子传递速率常数 k_s 来衡量反应难易程度. 当 k_s 越大, 体系达到平衡所需时间越短, 氧化还原反应越易进行; 反之, 越难进行^[22]. 由于修饰电极 $Cu^{2+}/Mb-MUA-AuNPs/Au$ 在 DMSO/NaOH 体系中反应是一个准可逆过程, 则根据公式(2)-(4)计算^[22]求出异相电子传递速率常数 k_s 为 $0.041\ cm/s$.

$$\Delta E_p = \frac{\alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log K_s - \log(RT/nF)}{\alpha(1 - \alpha)nF/23RT} + \frac{2.3RT \log v}{\alpha(1 - \alpha)nF} \quad (4)$$

其中 F 为法拉第常数 $964\ 84\ C/mol$, α 为表速率控制步骤中的电子转移系数, R 为摩尔气体常数 $8.3145\ J/(mol \cdot K)$, T 为反应温度 $298\ K$, v 为扫描速度.

2.4.3 $O_2^{\cdot -}$ 与峰电流积分面积的线性关系 利用循环伏安法将修饰有铜离子的修饰电极 ($Cu^{2+}/Mb-AuNPs-MUA/Au$) 在通有氧气的 DMSO 溶液中进行测定, 通过 $O_2^{\cdot -}$ 的不同浓度所对应的峰面积, 根据修饰电极在通有氧气的 DMSO 溶液中于 $-0.3 \sim +0.6\ V$ CV 扫描稳定后的曲线, 根据 i_p 与有效积分面积 A 的关系^[22-23] 如式 5 所示.

$$i_p = (2.69 \times 10^5) \times n^{3/2} \times A D_0^{1/2} v^{1/2} C_0^* \quad (5)$$

式中, i_p 为峰电流, A ; A 为电极面积 cm^2 ; D_0 为扩散系数, $5.7 \times 10^{-6}\ cm^2/s$; C_0^* 为溶液浓度 mol/L ; v 为扫速 V/s . 绘制得到以超氧阴离子浓度 (X) 为横坐标, 峰电流 (Y) 为纵坐标标准曲线, 结果如图 6 所示.

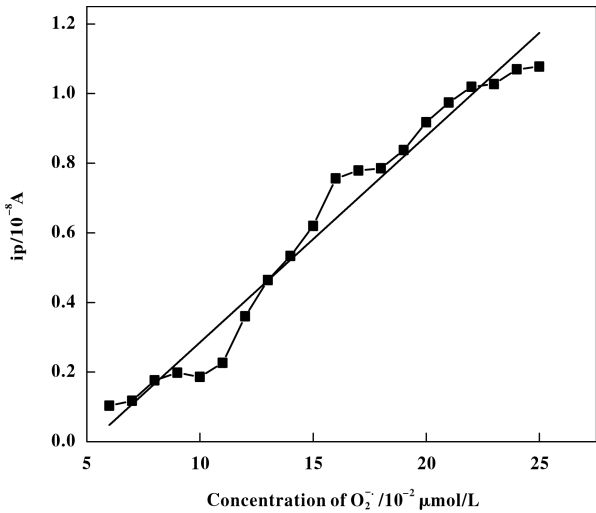


图 6 超氧阴离子标准曲线
Fig.6 Standard curve of superoxide anion

利用 Origin 软件拟合得到标准曲线为 $Y = 0.05928X - 0.30748$, 相关系数 R^2 为 0.9719, 说明在此范围内超氧阴离子浓度与其峰电流呈现出良好的线性关系, 满足分析要求。

2.5 检出限与精密度

评价一种分析方法有很多指标, 但其中检出限与精密度是评价分析方法的最主要技术指标. 其中检出限 (detection limit, LOD) 即检测下限, 是指某一分析方法在给定的置信度能够被检出待测物质的最低量^[26]. 我们利用 Mb 功能化纳米金所制备出的修饰电极以信噪比 $S/N = 3$ 确定该方法的检出限为 $1.129 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$, 以信噪比 $S/N = 10$ 确定该方法的检出限为 $3.683 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$. 远低于武聪^[27] 制备 Mn-SOD 模拟物、诸晓晨^[28] 制备多空纳米金膜 SOD 模拟物、Tang 等^[29] 利用合成的 Pt-Pd 纳米颗粒并修饰到涂有聚多巴胺的石墨烯上所制备的 SOD 模拟物修饰电极对超氧阴离子的检出限, 其检出限分别为 1.27、0.8 和 $2 \mu\text{mol/L}$. 但稍高于 Liu 等^[17] 利用纳米银制备的修饰电极 ($\text{AgNPs}/\text{SDS-MWCNTs}$) 对超氧阴离子的检出限 0.0897 nmol/L .

相同的检测条件的 DMSO 体系中, 不滴加氢氧化钠溶液时进行测定, 并重复 9 次, 计算检测结果的相对标准偏差, 结果如表 2 所示.

表 2 精密度试验结果
Table 2 Results of precision tests

	Groups									RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Peak currents/ 10^{-10} A	5.6870	5.7244	5.7130	5.6724	6.1213	5.9342	6.0021	5.4142	5.5733	3.83

由表 2 可知, 实验测得结果的相对标准偏差 (RSD) 为 $3.83\% < 5\%$, 由此表明该方法具有良好的精密度.

3 结论

通过修饰电极 $\text{Cu}^{2+}/\text{Mb-MUA-AuNPs}/\text{Au}$ 在 DMSO/NaOH 体系中反应, 研究了修饰电极在该反应体系的直接电化学行为, 该反应体系的检测限在 $S/N = 3$ 时为 $1.129 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$, 在 $S/N = 10$ 时为 $3.683 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$. 精密度试验相对标准偏差 (RSD) 为 3.83% . 并通过实验计算得到修饰电极 $\text{Cu}^{2+}/\text{Mb-MUA-AuNPs}/\text{Au}$ 在 DMSO/NaOH 体系中电子转移系数 α 为 0.435、异相电子传递速率常数 K_s 为 0.041 s^{-1} .

参考文献:

[1] a. Hakemian A S, Rosenzweig A C. The biochemistry of

methane oxidation. [J]. *Annu Rev Biochem*, 2007, **76** (1): 233-241.
b. Lin Hui-ying (林惠颖), Xin Jia-ying (辛嘉英), Li Chun-yu (李春雨), *et al.* Progress on isolation and purification of particulate methane monooxygenase (颗粒性甲烷单加氧酶分离纯化方法的研究进展) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2018, **32** (1): 90-98.
c. Zheng Li-na (郑丽娜), Xin Jia-ying (辛嘉英), Wang Yan (王艳), *et al.* Research progress on the influence of microwave on enzyme-catalyzed reactions and the microwave effect (微波对酶催化反应的影响及其微波效应的研究进展) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2017, **31** (6): 567-574.
d. Li Chun-yu (李春雨), Xin Jia-ying (辛嘉英), Lin Hui-ying (林惠颖), *et al.* Study on functionalized gold nanoparticles of methanobactin by copper ion coordination used as simulated peroxidase (铜离子配位甲烷氧化菌素功能化纳米金模拟过氧化物酶的研究) [J]. *J Mol*

- Catal (China)* (分子催化), 2017, **31**(5): 480-485.
- [2] a. Choi D W, Semrau J D, Antholine W E, *et al.* Oxidase, superoxide dismutase, and hydrogen peroxide reductase activities of methanobactin from types I and II methanotrophs [J]. *J Inorg Biochem*, 2008, **102**(8): 1571-1580.
- b. Hua Shao-feng(华绍烽), Fan Yun-chang(范云场), Zhang Lei(张磊), *et al.* Reconstitution of an active methane monooxygenase complex from the recombination subunits in vitro(甲烷单加氧酶活性化合物的体外重构) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2016, **30**(6): 594-598.
- [3] Xin J Y, Zhang Y X, Dong J, *et al.* Production, purification and SOD-like activity of methanobactin from *M. trichosporium* 3011 [J]. *Adv Mater Res*, 2011, **160/162**: 19-23.
- [4] Grabar K C, Freeman R G, Hommer M B, *et al.* Preparation and characterization of Au colloid monolayers [J]. *Anal Chem*, 1995, **67**(4): 735-743.
- [5] Grabar K C, Smith P C, Musick M D, *et al.* Kinetic control of interparticle spacing in au colloid-based surfaces; rational nanometer-scale architecture [J]. *J Am Chem Soc*, 1996, **118**(5): 1148-1153.
- [6] Chen Dong(徐东), Zhao Jian(赵建), Huang Han-chang(黄汉昌), *et al.* Determination of SOD specific activity in animal and plant tissues by improved xanthine oxidase method(改良的黄嘌呤氧化酶法测定动植物组织中 SOD 比活力) [J]. *Food Sci* (食品科学), 2011, **32**(6): 237-241.
- [7] Chen Lin-lin(陈林林), Zhang Wei(张伟), Wang Zhen-xing(王振兴), *et al.* Determination of superoxide dismutase activity in methanobactin-copper complexes by pyrogallol autoxidation(邻苯三酚自氧化法测定甲烷氧化菌素-铜配合物的超氧化物歧化酶活性) [J]. *J Food Saf Qual* (食品安全质量检测学报), 2017, **8**(9): 3438-3444.
- [8] Wu Lin(伍林), Yan Mi(严敏), Wang Jian-guo(王建国), *et al.* Synthesis, characterization and simulation of SOD of $M(M; Fe(III), Cr(III), Cu(II))$ -propyl gallate complexes(没食子酸丙酯 $Fe(III)$ 、 $Cr(III)$ 、 $Cu(II)$ 配合物的合成、表征及模拟超氧化物歧化酶) [J]. *Chin J Appl Chem* (应用化学), 2010, **27**(3): 328-332.
- [9] Gao Xiao-hui(高晓慧), Tang Jing-jing(唐晶晶), Liu Hao-ran(刘浩然), *et al.* Improved nitroblue tetrazolium colorimetric method applied to the screening of xanthine oxidase inhibitors(改进硝基四氮唑蓝比色法用于黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选) [J]. *J Hunan Normal Univer (Med Sci)* (湖南师范大学学报(医学版)), 2016, **13**(3): 142-144.
- [10] Chen Shi-ming(陈士明), Lu Ya-meng(陆亚蒙), Yan Xiao-min(严小敏), *et al.* Studies on production of superoxide radical and its interaction with natural medicine(超氧阴离子自由基的产生及其与天然药物的作用) [J]. *J FuDan Univer (Nat Sci)* (复旦学报: 自然科学版), 1991, **1991**(1): 31-36.
- [11] Xin Jia-ying(辛嘉英), Dong Jing(董静), Yan Chao-ze(闫超泽), *et al.* Production and copper acquisition ability of methanobactin(甲烷氧化菌素的产生和铜捕获作用) [J]. *Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2011, **31**(8): 40-46.
- [12] Behling L A, Hartsel S C, Lewis D E, *et al.* NMR, mass spectrometry and chemical evidence reveal a different chemical structure for methanobactin that contains oxazolone rings. [J]. *J Amer Chem Soc*, 2011, **130**(38): 12604-12605.
- [13] Yan Chao-ze(闫超泽), Zhang Shuai(张帅), Xin Jia-ying(辛嘉英), *et al.* Study on determination of methanobactin by spectrophotometry using chrome azure S(铬天青 S 分光光度法测定甲烷氧化菌素的研究) [J]. *Anal Test Technol Instrum* (分析测试技术与仪器), 2011, **17**(2): 69-73.
- [14] Zhou Rui-lu(周睿璐), Fu Da-you(付大友), Yuan Dong(袁东), *et al.* Preparation, characterization and application of gold nanoparticles(纳米金的制备、表征及应用研究) [J]. *J Sichuan Univer Sci Eng (Nat Sci Ed)* (四川理工学院学报(自科版)), 2016, **29**(3): 14-18.
- [15] Youssef H, Lucia L A, Rojas O J. Cellulose nano crystals: chemistry, self-assembly, and applications [J]. *Chem Rev*, 2010, **110**(6): 3479-3500.
- [16] Liu Li(刘丽). The research on piezoelectric immunosensors based on mixed self-assembled and hyperbranched polymers(基于混合自组装和超支化化合物膜的压电免疫传感器) [D]. Changsha: Hunan University(长沙: 湖南大学), 2007.
- [17] Vasak M, Kaegi J H R, Hill H A O. Zinc(II), cadmium(II), and mercury(II) thiolate transitions in metallothionein [J]. *Biochem*, 1981, **20**(10): 2852-2856.
- [18] Nielson K B, Winge D R. Order of metal binding in metallothionein [J]. *J Biol Chem*, 1983, **258**(21): 13063.
- [19] Liu X, Liu X, Wei H, *et al.* Sensitive detection of superoxide anion released from living cells using silver nanoparticles and functionalized multiwalled carbon nanotube

- composite[J]. *Sensors & Actuators B Chemical*, 2017, **252**: 503–510.
- [20] Braik M, Barsan M M, Dridi C, *et al.* Highly sensitive amperometric enzyme biosensor for detection of superoxide based on conducting polymer/CNT modified electrodes and superoxide dismutase [J]. *Sens & Actu B Chem*, 2016, **236**: 574–582.
- [21] Dou Bo-xin(窦博鑫), Xin Jia-ying(辛嘉英), Fan Hong-chen(范洪臣), *et al.* Functional self-assembly gold nanoparticle modified electrodes and application in the field of biosensors with enzyme immobilization(功能化金纳米修饰电极自组装及其在固定化酶生物传感器中应用)[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2016, **30**(4): 391–400.
- [22] Bi Yan-hua(毕艳华). Electron transfer of biomolecules at bionic interface and spectrofluoro-electrochemistry(仿生界面上生物分子的电子传递和荧光光谱电化学)[D]. Hu-bei: Huazhong University Of Science And Technology(湖北: 华中科技大学), 2006.
- [23] Yao Hui-qin(姚慧琴). Studies on electrochemistry, catalytic kinetics and electroanalytical method of small bio/pharmaceutical(生物/药物小分子的电化学、电催化动力学及电分析方法研究)[D]. Ning-xia: Ning Xia university(宁夏: 宁夏大学), 2005.
- [24] Iyer R N, Schmidt W E. Observations on the direct electrochemistry of bovine copper-zinc superoxide dismutase [J]. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1992, **27**(3): 393–404.
- [25] Tu Yi(涂毅), Zhao Yuan-di(赵元弟). Electron transfer of biomolecules at nano-materials modified interface(左旋多巴在纳米材料修饰界面上的电子传递)[J]. *J HuaZhong normal univer (Nat Sci)* (华中师范大学学报(自然科学版)), 2010, **44**(1): 86–91.
- [26] Liu Yu-quan(刘约权). Modern Instrument Analysis(现代仪器分析)[M]. Beijing: Higher Education Press(北京: 高等教育出版社), 2009.6.
- [27] Wu Cong(武聪). Construction and performance study of a novel superoxide anion electrochemical sensor based on Mn-SOD mimic enzyme(基于Mn-SOD模拟酶的新型超氧阴离子电化学传感器的构建及性能研究)[D]. Hebei: Hebei University of Science and Technology(河北: 河北科技大学), 2017.
- [28] Chu Xiao-chen(褚晓晨). Glucose and superoxide anion electrochemical biosensor research(葡萄糖和超氧阴离子电化学传感器研究)[D]. Hu-nan: Hunan university(湖南: 湖南大学), 2011.
- [29] Tang J, Zhu X, Niu X, *et al.* Anamperometric superoxide anion radical biosensor based on SOD/PtPd-PDAR-GO modified electrode[J]. *Talanta*, 2015, **137**: 18–24.

Electrochemical Performance of Modified Electrode by Methanobaction Functionalized Gold Nanoparticle for SOD Simulation

CHEN Lin-lin^{1*}, WANG Zhen-xing¹, DOU Bo-xin¹, HAN Ke¹, XIN Jia-ying^{1,2}

(1. Key Laboratory for Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. State Key Laboratory for Oxo Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Mb-functionalized gold nanoparticles (Mb-AuNPs-MPA) was modified on the gold electrode surface by a mixed self-assembly method to prepare a biosensor that detects superoxide anion mediators of free electron. UV-Vis were used to investigate the characteristics of the modified nanoclusters. Superoxide anions were determined by the modified electrodes in the basic DMSO system. The experimental results demonstrated that the modified electrodes had remarkable ability to catalyze the dismutation of the superoxide anion. The electron transfer coefficient (α) and the heterogeneous rate constant (K_s) were calculated to be 0.435 and 0.041 cm/s, respectively. The linear relationship between the superoxide anions content and peak current was better in the range of 0.06 ~ 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0.9719$). The detection limit were $1.129 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ ($S/N = 3$) and $3.683 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ ($S/N = 10$). Relative standard deviation (RSD) determined by precision test ($n = 9$) was 4.26%.

Key words: methanobactin; gold nanoparticles; electrochemical; superoxide anion