

氨基磁性纳米粒子对 α -胰凝乳蛋白酶固定过程的研究

李 静¹, 钟国伦², 夏海平^{3*}

(1. 宁波大学 理学院, 浙江 宁波 315211; 2. 浙江大学宁波理工学院 生物与化学工程学院, 浙江 宁波 315100;
3. 宁波大学 光电子功能材料研究所, 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用分子自组装技术制备氨基功能化磁性纳米粒子, 并通过碳二亚胺偶联剂将 α -胰凝乳蛋白酶固定在其表面. 利用红外光谱及热失重分析等方法表征固定酶的纳米粒子, 研究了固定过程中酶浓度和反应时间对载酶量的影响, 得到最佳固定条件. 在固定过程用 Langmuir 等温式拟合优于用 Freundlich 等温式, 功能化纳米粒子的载酶量达到 $127 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 与一级反应动力学模型相比, 二级反应动力学模型能够更好地拟合该固定过程.

关键词: 氨基功能化磁性纳米粒子; α -胰凝乳蛋白酶; 载酶量; 等温式; 动力学

中图分类号: O648.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2016) 01-0077-05

酶的固定化过程是指通过物理或者化学方法, 将酶束缚在一定区域内, 限制酶分子在此区域内的催化作用^[1]. 由于固定化酶有助于和产物及底物分离, 同时可以实现酶的重复使用, 因此在生物医药^[2]、环境保护^[3]等众多领域得到广泛应用. 近年来, 功能化磁性纳米粒子逐渐发展起来, 并应用在选择性富集^[4]、药物输送^[5]和生物传感^[6]等领域. 这些纳米粒子具有良好的磁响应性、生物相容性、比表面积大等优点, 同时表面携带能与生物分子结合的活性基团, 成为理想的固定化酶载体. 据文献^[7]报道, 表面带正电荷的纳米粒子与生物分子结合的优势远远大于表面带负电荷和中性电荷的纳米粒子, 而氨基功能化纳米粒子就是带正电荷的一种. 因此, 氨基功能化纳米粒子在生酶固定领域有重要意义. 洪军等^[8]使用光化学法制备氨基纳米凝胶用于吸附 α -胰凝乳蛋白酶, 吸附量达到 $61 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 但此种方法制备机理复杂且载酶量较低, 因此限制了其在实践中的应用.

本研究小组通过利用分子自组装原理已经制备出多种带有功能化基团的磁性纳米粒子, 如羧基、氨基、硼酸基等功能化磁性纳米粒子^[9]. 文中采用制备的氨基功能化纳米粒子固定 α -胰凝乳蛋

白酶, 并研究各个工艺参数对固定酶过程的影响, 确定固定过程的条件, 建立固定过程的等温式和动力学模型.

1 实验

1.1 试剂与仪器

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、氨水、油酸(OA)、无水乙醇(99.7%)、过硫酸钾($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)均为分析纯试剂, 购自上海国药集团化学试剂有限公司; 4-乙烯基苯胺、碳二亚胺(EDC)、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、 α -胰凝乳蛋白酶购自 Aldrich 公司. DDS-11A 型电导率仪(上海雷磁新泾有限公司); S-450D 超声细胞粉碎仪(美国 BRANSON 公司); 407 型傅立叶变换红外光谱仪(美国尼高力仪器公司); 209F1 型热重分析仪(德国耐驰公司); UV-1800 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司).

1.2 氨基功能化磁性纳米粒子制备

称 $0.78 \text{ g FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $2.19 \text{ g Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 溶解在去离子水中, 于 70°C 水浴和 N_2 氛围下强力搅拌, 然后加入 1.7 mL 的氨水, 再加入 1.5 mL 油酸(溶于 30 mL 乙醇), 反应 1 h . 完成后, 用无水乙醇和蒸馏水分别清洗 6~10 次得到表面疏水的油酸包

收稿日期: 2014-02-28.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY12B03002).

第一作者: 李静(1987-), 男, 江苏淮安人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 磁性纳米材料. E-mail: salvationhope@163.com

*通信作者: 夏海平(1967-), 男, 浙江舟山人, 博士/研究员, 主要研究方向: 功能材料. E-mail: hpxcm@nbu.edu.cn

覆的 Fe_3O_4 纳米粒子.

15 mg 油酸包覆 Fe_3O_4 纳米粒子和 100 mg 4-乙烯基苯胺溶解在 400 mL 水-乙醇分散体系中, 超声分散 20 min, 在室温下静置 3 h 后加入 5 mg(溶于 20 mL 水中)的过硫酸钾引发剂, 静置 1 h, 再升温至 70 $^{\circ}\text{C}$, 反应 2 h 后, 用无水乙醇和蒸馏水分别清洗纳米粒子 3 次. 制得带氨基的功能化磁性纳米粒子.

1.3 α -胰凝乳蛋白酶的标准曲线的绘制

准确配置不同浓度的 α -胰凝乳蛋白酶 PBS 标准溶液, 用紫外分光光度计测定其吸收光谱, 在 λ_{max} 处测定系列溶液的吸光度. 以吸光度为纵坐标, α -胰凝乳蛋白酶的浓度为横坐标, 绘制出浓度—吸光度关系曲线, 并计算标准曲线方程.

1.4 α -胰凝乳蛋白酶的固定

准确称取 10 mg 氨基功能化磁性纳米粒子、5 mg EDC 于 pH 值 6.86 的 PBS 溶液中, 超声 10 min 后, 平衡 6 h, 磁分离, 用 PBS 溶液洗去过量的 EDC. 再向磁性纳米粒子中加入一定浓度的 α -胰凝乳蛋白酶 50 mL, 室温下反应 24 h. 磁分离, 用 PBS 反复清洗除去未固定的酶, 洗液定容到 100 mL 容量瓶中. 用紫外分光光度计测定洗液的吸光度, 计算载酶量. 载酶量通过下列公式计算:

$$q_e = \frac{C_0V_0 - C_eV_e}{w},$$

式中, q_e 为载酶量, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; C_0 为 α -胰凝乳蛋白酶的初始质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; V_0 为初始体积, L; C_e 为固定后洗液中 α -胰凝乳蛋白酶的质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; V_e 为洗液体积, L; w 为氨基功能化纳米粒子的质量, g.

2 结果与讨论

2.1 氨基功能化磁性纳米粒子稳定性和磁响应性

首先通过化学共沉淀法^[10]制备表面疏水的油酸包覆 Fe_3O_4 纳米粒子, 这种纳米粒子经超声分散后, 在极性介质中可诱导 4-乙烯基苯胺分子在其周围自组装, 形成氨基指向极性介质, 乙烯基指向纳米粒子中心的自组装聚集体. 再加入引发剂引发双键聚合, 从而将氨基功能聚合物包覆在 Fe_3O_4 纳米粒子上. 这种方法制备的氨基功能化磁性纳米粒子经电导法^[11]测定, 表面氨基含量达到 0.848 $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$. 将制得的氨基功能化纳米粒子分散在

PBS 溶液中, 观察纳米粒子的稳定性情况. 开始时, 氨基功能化纳米粒子经超声处理 20 min 后稳定地分散在 PBS 溶液中. 2 d 后, 纳米粒子没有发生沉降, 体系依旧呈均一稳定的状态, 具体如图 1(a)所示. 超声分散后的功能化纳米粒子在强磁场作用下, 约 15 min 即可实现纳米粒子的富集, 具体如图 1(b)所示. 综上所述, 功能化纳米粒子在 PBS 溶液中具有一定的稳定性, 可以用于 α -胰凝乳蛋白酶的固定; 同时具有良好的磁响应性, 便于固定过程中的分离和洗涤.



(a) 稳定性

(b) 磁响应性

图 1 氨基功能化纳米粒子在 PBS 溶液中的状态

2.2 α -胰凝乳蛋白酶的固定化

通过偶联剂 EDC 将 α -胰凝乳蛋白酶固定在氨基功能化纳米粒子上. 开始时, 氨基功能化纳米粒子与碳二亚胺反应, 生成胍中间体^[12], 带有胍基的中间体可以在较大范围内保持正电性, 容易与 α -胰凝乳蛋白酶分子上的羧基形成强的两亲性离子氢键^[13], 从而将带有羧基的酶固定在氨基功能化纳米粒子表面.

图 2(a)与图 2(b)分别为 α -胰凝乳蛋白酶和固定化酶纳米粒子的 FTIR 光谱图. 在图 2(a)中, α -胰凝乳蛋白酶在 1 640, 1 540 和 1 394 cm^{-1} 处有 3 个特征吸收峰, 这些吸收峰同时也存在于固定化酶纳米粒子红外光谱上, 充分表面 α -胰凝乳蛋白酶被成

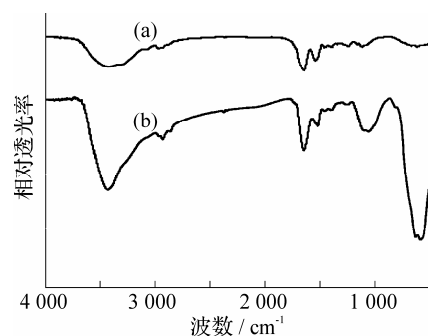


图 2 α -胰凝乳蛋白酶(a)和固定化酶纳米粒子(b)的红外吸收光谱

功地固定在氨基功能化纳米粒子上. 图 2(b)中, 在 607 cm^{-1} 处有 1 个强吸收峰, 则是纳米粒子上 Fe-O 键的吸收峰.

图 3(a)与图 3(b)分别为氨基功能化纳米粒子和固定化酶纳米粒子的热失重曲线图. 为避免氧化带来误差, 样品热失重曲线在 N_2 氛围下测定. 从图中可知, 两者均在 $500\text{ }^\circ\text{C}$ 左右分解完全. 在曲线 (a) 中, 纳米粒子失重约为 13.7%, 因此, 其磁含量约为 86.3%. 以氨基功能化纳米粒子为对照, 测得固定化酶纳米粒子上酶含量为 11.2%, 计算出氨基功能化纳米粒子载酶量为 $126\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

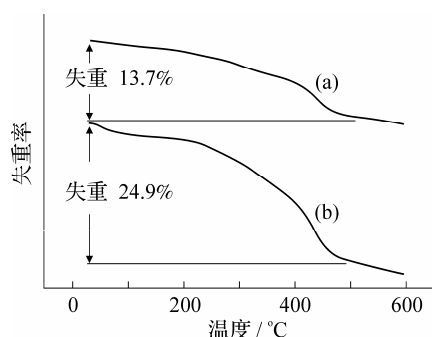


图 3 氨基功能化纳米粒子(a)和固定化酶纳米粒子(b)的热失重曲线

2.3 固定过程的等温式

图 4 是 α -胰凝乳蛋白酶溶液的标准曲线图. 根据其插图中紫外吸收光谱图可见, α -胰凝乳蛋白酶在 282 nm 处有最大吸收峰, 因此可以确定 $\lambda_{\text{max}} = 282\text{ nm}$ 为测定波长.

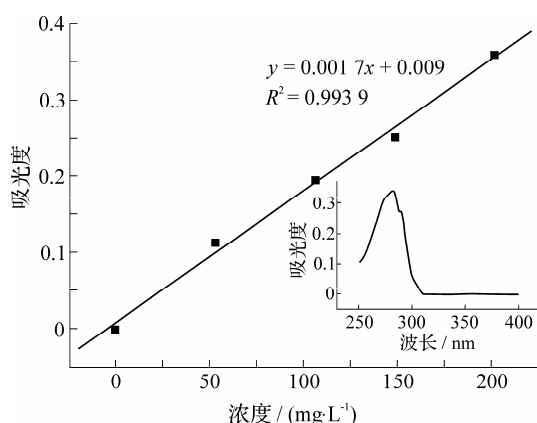


图 4 α -胰凝乳蛋白酶的标准曲线
(插图为 α -胰凝乳蛋白酶的紫外吸收光谱)

图 5 是氨基功能化纳米粒子固定在不同质量浓度情况下 α -胰凝乳蛋白酶溶液的曲线图. 从图

中可知, 氨基功能化纳米粒子载酶量随着酶浓度的增加而增加, 当酶质量浓度达到 $149\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 载酶量渐渐趋于饱和, 可达到 $127\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. 这与 TGA 测试结果基本一致.

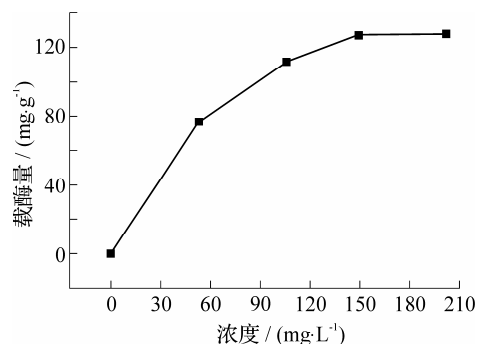


图 5 氨基功能化纳米粒子固定不同浓度的 α -胰凝乳蛋白酶溶液的曲线

采用 Langmuir 和 Freundlich 等温式对图 6 数据进行拟合^[14].

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_{\text{max}}} + \frac{1}{q_{\text{max}} b} \cdot \frac{1}{C_e}, \quad (2)$$

$$\ln q_e = 1/n + \ln K_F, \quad (3)$$

式中, q_{max} 为模拟计算所得最大载酶量, b 为 Lang-

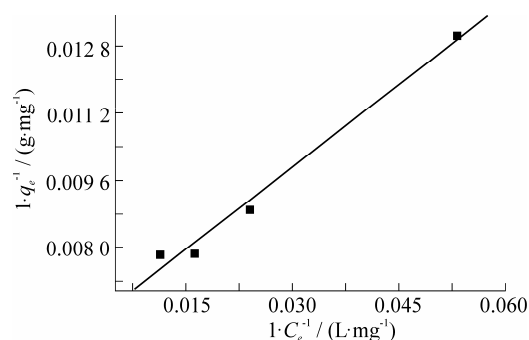


图 6 氨基功能化纳米粒子固定 α -胰凝乳蛋白酶的 Langmuir 等温线

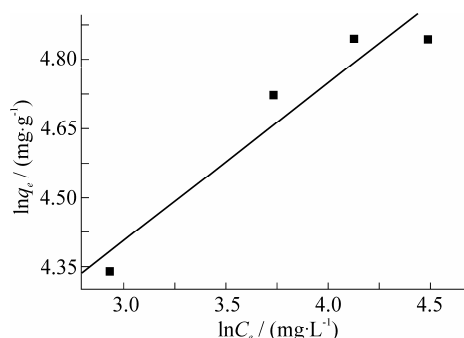


图 7 氨基功能化纳米粒子固定 α -胰凝乳蛋白酶的 Freundlich 等温线

muir 固定过程平衡常数, $1/n$ 和 K_F 均为 Freundlich 固定过程的平衡常数.

拟合结果如图 6 和图 7 所示. Langmuir 等温方程参数如下: $q_{\max} = 166.67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $b = 0.046$, $R^2 = 0.9862$; Freundlich 等温方程参数: $1/n = 0.3482$, $K_F = 28.804$, $R^2 = 0.9238$. 从以上数据可知, 氨基功能化纳米粒子固定 α -胰凝乳蛋白酶的过程同时满足 Langmuir 和 Freundlich 模型(Langmuir 的 $R^2 = 0.9862$, Freundlich 的 $R^2 = 0.9238$), 但是 Langmuir 模型能更好地拟合实验数据. 充分说明 α -胰凝乳蛋白酶是以单分子层形式被固定在氨基功能化纳米粒子上.

2.4 固定过程中的动力学研究

图 8 是氨基功能化纳米粒子在不同的时间固定 α -胰凝乳蛋白酶溶液曲线. 从图中可知, 氨基功能化纳米粒子载酶量随反应时间的增加而增加, 但当反应时间达到 8 h 时, 固定过程渐渐趋于平衡, 整个过程符合初期速率快, 后期速率缓慢的特点.

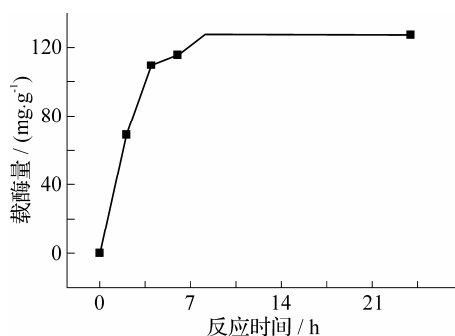


图 8 氨基功能化纳米粒子在不同时间固定的 α -胰凝乳蛋白酶溶液曲线

为研究固定过程的动力学, 分别采用一级动力学模型和二级动力学模型对图 8 数据进行拟合.

$$\ln(q_e - q_t) = -k_1 t + \ln q_e, \quad (4)$$

$$t/q_t = t/q_e + 1/k_2 q_e^2, \quad (5)$$

式中, q_t 为 t 时刻的载酶量; t 为反应时间; k_1 为一级反应速率常数; k_2 为二级反应速率常数; q_e 为模拟计算得到的平衡载酶量. 拟合结果如图 9 和 10 所示. 一级动力学模型参数如下: $q_e = 124 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $k_1 = 0.4178$, $R^2 = 0.9696$; 二级动力学模型参数如下: $q_e = 135$, $k_2 = 0.0066$, $R^2 = 0.9961$. 从以上数据可知, 氨基功能化纳米粒子固定 α -胰凝乳蛋白酶的过程用二级动力学方程($R^2 = 0.9961$)拟合优于用一级动力学方程($R^2 = 0.9696$).

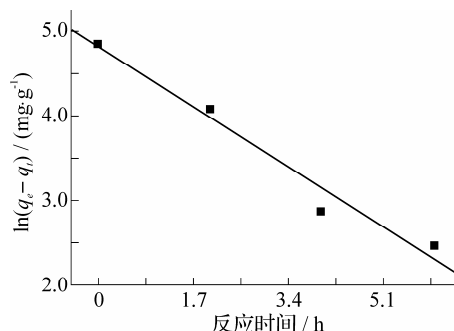


图 9 氨基功能化纳米粒子固定 α -胰凝乳蛋白酶的一级反应动力学

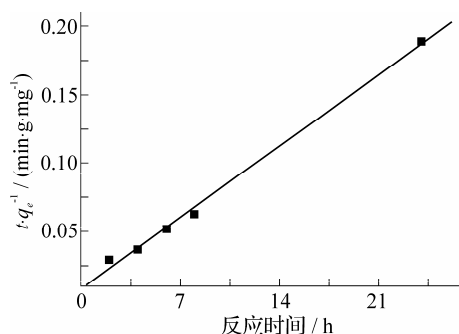


图 10 氨基功能化纳米粒子固定 α -胰凝乳蛋白酶的二级反应动力学

3 结论

利用分子自组装和原位聚合的方法制备的氨基功能化磁性纳米粒子在溶液中具有稳定的磁响应性, 可以有效地固定 α -胰凝乳蛋白酶. 纳米粒子的载酶量通过 TGA 测试达到 $126 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 与标准曲线法测试结果($127 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)基本一致. 固定过程用 Langmuir 等温式优于用 Freundlich 等温式拟合, 二级反应动力学方程可以较好地描述氨基功能化纳米粒子固定酶的动力学过程.

参考文献:

- [1] LU A H, SALABAS E L, SCHÜTH F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2007, 46(8):1222-1244.
- [2] CAO L. Immobilised enzymes: Science or art?[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2005, 9(2):217-226.
- [3] HORST F, RUEDA E H, FERREIRA M L. Activity of magnetite-immobilized catalase in hydrogen peroxide decomposition[J]. Enzyme and microbial technology, 2006, 38(7):1005-1012.
- [4] LU J, QI D W, DENG C H, et al. Hydrothermal synthesis

- of α -Fe₂O₃@SnO₂ core-shell nanotubes for highly selective enrichment of phosphopeptides for mass spectrometry analysis[J]. *Nanoscale*, 2010, 2(10):1892-1900.
- [5] CHEN M L, HE Y J, CHEN X W, et al. Quantum dots conjugated with Fe₃O₄-filled carbon nanotubes for cancer-targeted imaging and magnetically guided drug delivery[J]. *Langmuir*, 2012, 28(47):16469-16476.
- [6] TONG L Z, SHI J H, LIU D M, et al. Luminescent and magnetic properties of Fe₃O₄@SiO₂@Y₂O₃:Eu³⁺ composites with core-shell structure[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2012, 116(12):7153-7157.
- [7] CHERTOK B, DAVID A E, YANG V C. Polyethylenimine-modified iron oxide nanoparticles for brain tumor drug delivery using magnetic targeting and intra-carotid administration[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(24):6317-6324.
- [8] 洪军, 徐冬梅, 孙汉文, 等. 用于 α -胰凝乳蛋白酶固定化的氨基超顺磁纳米凝胶的光化学合成与表征[J]. *高等学校化学学报*, 2007, 28(1):177-182.
- [9] ZHONG G L, BI R Y, MAO H L, et al. Self-assembly of 4-vinylbenzoic acid layer on the magnetic nanoparticles and in-situ polymerization[J]. *Adv Mater Res*, 2012, 391/392:1427-1430.
- [10] SHEN X C, FANG X Z, ZHOU Y H, et al. Synthesis and characterization of 3-Aminopropyltriethoxysilane-modified superpara-magnetic magnetite nanoparticles[J]. *Chemistry Letter*, 2004, 33(11):1468-1469.
- [11] KAWAGUCHI S, YEKTA A, WINNIK M A. Surface characterization and dissociation properties of carboxylic acid core-shell latex particle by potentiometric and conductometric Titration[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1995, 176(2):362-369.
- [12] 孙绍发, 毛艳平, 古文杰. 2-烷氨基噻吩并[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮的合成[J]. *咸宁学院学报*, 2008, 28(3):92-94.
- [13] ECHAVARREN A, GALAN A, LEHN J M, et al. Chiral recognition of aromatic carboxylate anions by an optically active abiotic receptor containing a rigid guanidinium binding subunit[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1989, 111(13):4994-4995.
- [14] LUO X G, LIU S L, ZHOU J P, et al. In situ synthesis of Fe₃O₄ Acid/cellulose microspheres with magnetic induced protein delivery[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2009, 19(21):3538-3545.

Process of α -chymotrypsin Immobilized on Amino-functionalized Magnetic Nanoparticles: Research

LI Jing¹, ZHONG Guo-lun², XIA Hai-ping^{3*}

(1.Faculty of Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2.School of Biotechnology and Chemical Engineering, Ningbo Institute of Technology of Zhejiang University, Ningbo 315100, China; 3.Key Laboratory of Photo-electronic Materials, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In this paper, a novel amino-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles is presented by molecular self-assembly and bound to α -chymotrypsin in presence of carbodiimide. The immobilized α -chymotrypsin NPs are characterized by IR and TGA. The effect of parameters such as the initial concentration and reaction time on the process of immobilization is investigated. The Langmuir isotherm model is in agreement with the experimental data better than Freundlich isotherm model in the process of immobilization. The binding capacity of functional nanoparticles is measured for being 127 mg·g⁻¹. The immobilization kinetic data correlate better with the second order equation than with the first order equation.

Key words: amino-functionalized magnetic nanoparticles; α -chymotrypsin; binding capacity; isotherm; kinetic

(责任编辑 章践立)