

• 研究论文 •

CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子及其漆酶固定化研究

黄俊* 周菊英 肖海燕 龙胜亚 王军涛

(武汉理工大学光纤传感技术研究中心 光纤传感技术与信息处理教育部重点实验室 武汉 430070)

摘要 漆酶的固定化研究对基于漆酶催化的光纤生物传感器具有十分重要的意义. 制备了四氨基酞菁铜 (CuTAPc)-Fe₃O₄ 纳米复合粒子, 并用红外(IR)、场发射扫描电镜(FEG-SEM)、X射线衍射(XRD)、能谱、粒径仪等对其进行了表征. 结果表明形成了以 CuTAPc 包覆在 Fe₃O₄ 纳米粒子表面的纳米复合粒子, 粒子呈现不规则球形, 且分布均匀, 粒子平均粒径在 50 nm 左右. 用此纳米复合粒子通过戊二醛交联法固定了漆酶, 固定后的酶比游离酶具有更好的贮存稳定性及操作稳定性. 这为研制高性能的光纤生物传感器打下了较好的基础.

关键词 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子; 漆酶; 固定; 光纤生物传感器

Study of CuTAPc-Fe₃O₄ Nanoparticles and Their Laccase Immobilization

HUANG, Jun* ZHOU, Ju-Ying XIAO, Hai-Yan LONG, Sheng-Ya WANG, Jun-Tao

(Fiber Optic Sensing Technology Research Center, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070)

Abstract The immobilization of laccase is important for the fiber optic biosensor based on enzyme catalysis. Copper tetraaminophthalocyanine-ferroerric oxide [(CuTAPc)-Fe₃O₄] nanoparticle composites were prepared and characterized by IR, field emission gun scanning electron microscopy, XRD, X-ray photoelectron spectroscopy and particle size analyzer. It has been proved that the CuTAPc could disperse spontaneously onto the surface of Fe₃O₄ nanoparticles to form molecular dispersion layer and the Fe₃O₄ nanoparticles were encapsulated by CuTAPc. The nanoparticle composites took the shape of roundish spheres with their mean diameter of about 50 nm. The laccase was immobilized on the surface of the composite by crosslinking with glutaraldehyde, and the immobilized laccase has better stabilities in storage and operation than free laccase. This work provided good basis for developing the fiber optic biosensor with excellent properties.

Keywords CuTAPc-Fe₃O₄ nanoparticle composite; laccase; immobilization; fiber optic biosensor

漆酶(EC1.10.3.2)是一类含铜的多酚氧化酶, 在生物传感器、生物漂白、废水处理、芳香化合物转化等方面具有重要应用价值^[1]. 基于漆酶催化的光纤生物传感器在临床医学检测和疾病早期诊断等方面具有重要的应用前景. 这类传感器的原理是在漆酶的催化下, 待测物被溶液中的氧气氧化, 通过检测溶液中氧的变化量就可实现对待测物的检测. 传感器探头的传感材料主要由两部分组成, 一部分是对溶液中氧气含量敏感的材料,

另一部分是起催化作用的漆酶. 因此, 漆酶的催化性能直接影响传感器的性能.

酶的固定化是提高酶稳定性的一种有效方法, 同时克服了游离酶与底物、产物难以分离, 不能重复利用的缺点, 因此成为人们研究的热点. 很多有机、无机物质都可用作酶固定的载体材料, 在这些材料中磁性材料受到了广泛的关注. 它被广泛地应用于蛋白质和酶的固定、生物分离技术、免疫测定、药物定位及光纤生物传

* E-mail: fosrcwut@public.wh.hb.cn

Received November 30, 2004; revised January 25, 2005; accepted March 28, 2005.

国家自然科学基金(No. 60377032)资助项目.

感器等. 很多磁性材料的粒径通常在毫米和微米级, 最近随着生物技术和医药领域中纳米结构材料和纳米技术的迅速发展, 磁性纳米粒子得到了越来越多的关注^[2]. 用磁性纳米粒子作为酶固定载体有以下特点: 高的比表面积可固定大量的酶; 在磁场作用下, 固定化酶可从反应体系中迅速分离; 有利于回收和反复使用, 降低成本.

有机-无机纳米复合材料可以同时兼顾有机和无机纳米粒子的优点, 其研究近年来引起了人们极大的兴趣. Fe_3O_4 纳米粒子具有顺磁性和低毒性, 它在生物及医药方面的应用受到了极大的关注. 近年来报道过一些以 Fe_3O_4 为核的复合粒子的研究, 例如, 以高分子化合物为壳的微米级材料来固定酶等生物分子^[3,4], 以氨基硅烷- Fe_3O_4 纳米复合粒子固定辣根过氧化物酶(HRP)^[5]等.

由于四氨基酞菁铜(CuTAPc)价廉、稳定、制备简单、表面具有大量活性基团($-\text{NH}_2$), 可通过合适的交联剂与漆酶进行交联. 我们选择金属有机配合物 CuTAPc 与 Fe_3O_4 纳米粒子复合, 首次制备了 CuTAPc- Fe_3O_4 纳米复合粒子并对其进行了表征, 结果表明形成了以 CuTAPc 包覆在 Fe_3O_4 纳米粒子表面的球形纳米复合粒子, 平均粒径为 50 nm 左右, 分布均匀. 以这种复合粒子为载体并以戊二醛为交联剂固定漆酶尚未见文献报道. 固定化酶具有更好的贮存稳定性和操作稳定性. 这为研制高性能的光纤生物传感器打下了较好的基础.

1 实验部分

1.1 主要仪器及试剂

60SXB 型傅立叶变换红外光谱仪(美国 NICOLET 公司), 场发射扫描电子显微镜(FEI Sirion), QUANTA400 扫描电镜能谱仪(FEI Sirion), UV-2450 型紫外光度计(日本岛津公司), D/MAX-RB 型 X 射线衍射仪(日本理学), LB-550 粒径仪(HORIBA), SpectrAA-30 型原子吸收光谱仪(澳大利亚 Varian).

2,2'-连氮-双(3-乙基并噻-6-磺酸)(ABTS, Sigma)、漆酶(laccase, 中科院北京微生物研究所提供的血红密孔菌真菌漆酶), 其它试剂均为分析纯, 水为去离子水.

1.2 2,9,16,23-四氨基酞菁铜(CuTAPc)的制备

取自制的 4-硝基邻苯二甲酰亚胺^[6]、尿素、钼酸铵等按照文献[7]方法制备得墨绿色的 2,9,16,23-四氨基酞菁铜.

1.3 CuTAPc- Fe_3O_4 纳米复合粒子的制备

用液相法制备 0.97 g 平均尺寸为 10 nm 左右^[8,9]的 Fe_3O_4 纳米粒子. 用蒸馏水多次洗涤 Fe_3O_4 纳米粒子, 每次在强磁场下使其与水相分离, 水相中几乎不含有纳米粒子, 洗至中性后将 Fe_3O_4 纳米粒子转移到合适的有机

溶剂中, 超声使粒子分散. 在搅拌条件下将 DMF 充分溶解的 0.03 g CuTAPc 缓慢加入到 Fe_3O_4 纳米粒子中, 室温下搅拌使有机溶剂挥发, 置于 60 °C 的真空干燥箱中干燥得固体粒子. 用 DMF 洗涤固体粒子, 洗出液近似为无色, 表明未复合的 CuTAPc 非常少, 加入的 CuTAPc 几乎全部与 Fe_3O_4 纳米粒子复合. 将处理后的粒子在 60 °C 真空干燥即得 CuTAPc- Fe_3O_4 复合粒子(CuTAPc 的质量分数为 3%).

1.4 纳米复合粒子固定漆酶

将一定量 CuTAPc- Fe_3O_4 纳米复合粒子和戊二醛的水溶液混合反应, 用永久磁铁使粒子与溶液分离, 水洗除去未反应的戊二醛, 加入漆酶溶液, 在 4 °C 和中性条件下进行 24 h 的漆酶固定. 再依次用 pH 值为 7.00 的 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液、pH 值为 7.00 的 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐和 0.5 mol·L⁻¹ NaCl 的混合溶液、去离子水洗除去未固定的酶, 冷冻干燥得磁性固定化酶.

1.5 固定化漆酶载量测定

每个漆酶分子含有四个铜离子, 可以通过石墨炉原子吸收方法测定铜的含量, 计算漆酶的固定化率.

固定化率 = (加入酶的含铜量 - 未固定酶的含铜量) / 加入酶的含铜量 × 100%

1.6 酶活性测定

在 25 °C 时, 酒石酸缓冲体系中加入 ABTS 溶液, 混匀, 恒温 10 min, 加入漆酶液(或磁性固定化酶), 搅拌 10 s, 用 UV-2450 动力学程序追踪 420 nm 处吸光度的变化, 求出反应初速度, 以每分钟氧化 1 μmol 的 ABTS 所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位. 固定化酶的催化能力(酶活)以每克测试载体的酶活力单位(U/g)表示.

2 结果与讨论

2.1 IR 谱图分析

由 CuTAPc 的 IR 谱图(图 1A)可知, 1607, 1501, 1413, 1347, 1309, 1097, 746 cm⁻¹ 为酞菁大环的平面 C—C 或 C—N 伸缩振动带, 1607 cm⁻¹ 处为 C=N 键的伸缩振动带, 1501 cm⁻¹ 为芳环的骨架振动吸收, 3338 cm⁻¹ 为氢的伸缩振动吸收, 860, 823 cm⁻¹ 为苯环的 1,2,4-三取代的指纹吸收. 在紫外可见光谱中在 300 和 700 nm 附近有两个吸收带, 即 B 带和 Q 带, 与文献[10]结果基本相符.

从纳米复合粒子(CuTAPc 的质量分数为 3%)的 IR 图谱(图 1B)可看出, 复合粒子除具有 CuTAPc 的一些特征峰, 在 527 cm⁻¹ 处有 Fe—O 峰外, 同时还有一个新的吸收峰出现在 881 cm⁻¹, 这是 Cu—O 的振动吸收峰, 说

明 CuTAPc 与 Fe₃O₄ 形成了一定程度的化学键,使两者形成了有效的复合^[11].

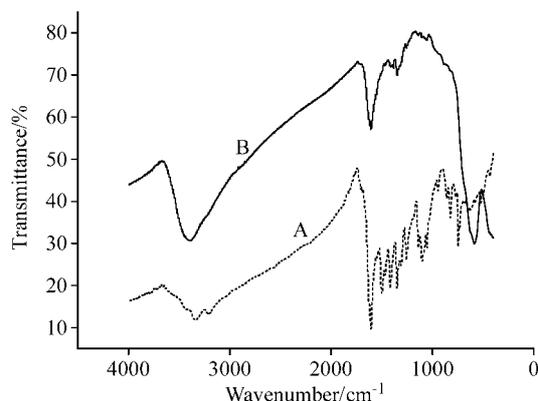


图1 CuTAPc 及其纳米复合粒子的红外谱图

其中 A 为 CuTAPc, B 为 CuTAPc-Fe₃O₄ 复合粒子

Figure 1 IR spectra of CuTAPc and its nanoparticles composite
A: CuTAPc, B: CuTAPc-Fe₃O₄ nanoparticles composite

2.2 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子的 XRD 谱图分析

图2为 CuTAPc (A)和 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子(B)的 XRD 谱图. 与 X 射线标准数据卡片相对照, 图2B 中带有标记的皆为 Fe₃O₄ 的特征衍射峰. 即当 CuTAPc 与 Fe₃O₄ 纳米粒子复合后, 主要以 Fe₃O₄ 的特征峰为主, CuTAPc 的特征衍射峰则消失了. 这说明在复合粒子表面 CuTAPc 是以分子分散层的形式与 Fe₃O₄ 纳米粒子复合^[11].

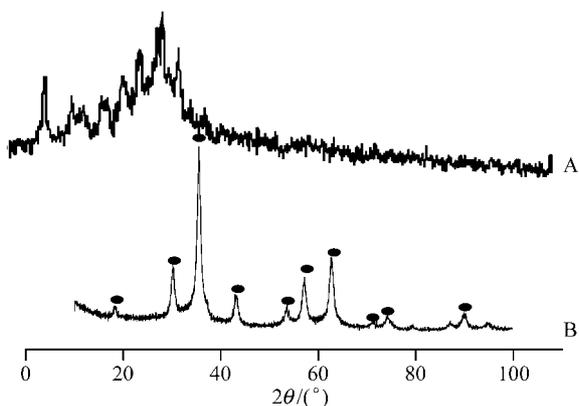


图2 CuTAPc 和 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子的 XRD 谱图

A 为 CuTAPc, B 为 CuTAPc-Fe₃O₄ 复合粒子

Figure 2 XRD pattern of CuTAPc and CuTAPc-Fe₃O₄ nanoparticles composite

A: CuTAPc, B: CuTAPc-Fe₃O₄ nanoparticles composite

2.3 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子的能谱谱图分析

图3为 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子扫描电镜 X 射线能谱谱图(XPS), 谱图中 C 对应的峰型十分明显, 说明复合物中含有 C 元素, 证实了纳米复合粒子中含有金

属有机配合物 CuTAPc. 当 CuTAPc 的含量为 3%时, CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子形成后再用 DMF 洗涤, 几乎无 CuTAPc 被洗出, 表明 CuTAPc 与 Fe₃O₄ 纳米粒子之间不是简单的吸附, 而是具有较强的结合作用, 形成了有效的复合.

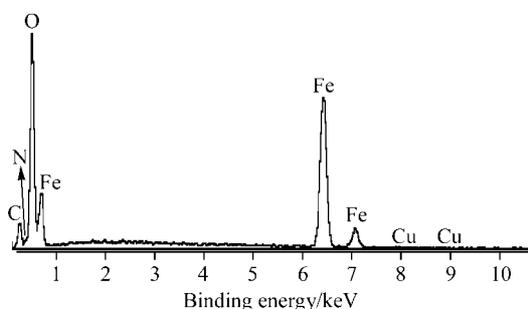


图3 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子的 XPS 图

Figure 3 XPS of CuTAPc-Fe₃O₄ nanoparticles composite

扫描电镜 X 射线能谱分析结果如表 1 所示.

表1 扫描电镜 X 射线能谱结果

Table 1 The result of XPS^a

	Fe/%	O/%	C/%	N/%	Cu/%
测定值	64.59	26.19	7.23	1.90	0.09
理论值	70.24	26.76	1.81	0.79	0.30

^aThe content by weight percent.

表中各元素含量的测定值与复合物的计算值之间存在差异是因为扫描电镜 X 射线能谱是材料表面微区成分分析, 材料表面的 CuTAPc 含量要比内部高一些, 复合材料中 C, N 的含量高说明 CuTAPc 主要是复合在 Fe₃O₄ 纳米粒子表面, 这与前面 XRD 谱图分析结果是一致的. 其中铜的含量低于理论值, 与低含量时能谱测试系统的计算机分析程序有关.

2.4 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子的形貌与结构模型

图4为 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子放大 10 万倍的 FEG-SEM 图像, 由图可见复合粒子呈现不很规则球形, 分布均匀, 粒子平均尺寸为 50 nm 左右. 这与粒径分布图(图5)所示的结果基本相符.

由于该复合粒子是通过缓慢除去 CuTAPc 和 Fe₃O₄ 纳米粒子混合体系中的有机溶剂而制备的, 与我们以前制备 NiPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子的复合过程相似. 我们曾对其复合机理和结构模型进行了研究和分析^[12], 故可认为在 CuTAPc 与 Fe₃O₄ 纳米粒子的复合过程中, 也有类似的复合机理和结构模型. 随着溶剂的蒸发, Fe₃O₄ 纳米粒子的浓度变大, 粒子之间的碰撞机会增多, 可形成一定尺寸的聚集体. 在这种聚集体中, Fe₃O₄ 纳米粒子不是直接接触, 而是通过与 CuTAPc 形成化学键而聚集, CuTAPc 分子将位于相互接触的 Fe₃O₄ 纳米粒子的接触

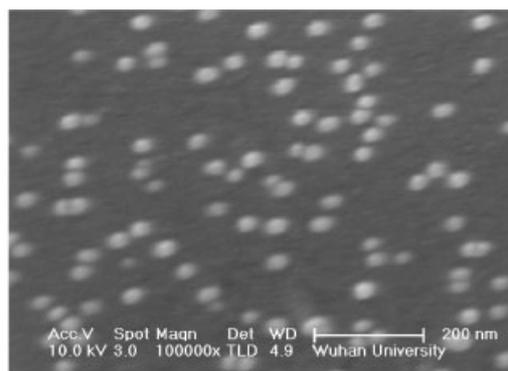


图4 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子的 FEG-SEM 图像

Figure 4 FEG-SEM micrograph of CuTAPc-Fe₃O₄ nanoparticles composite

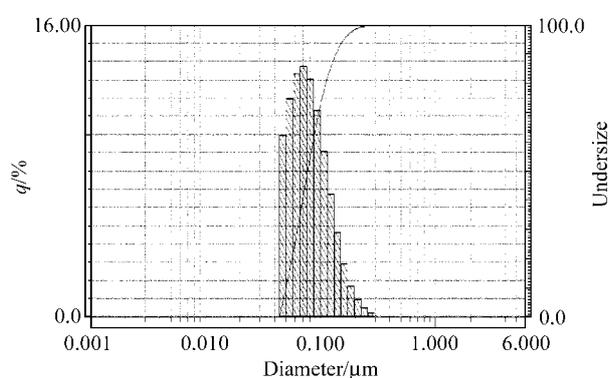


图5 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米粒子的粒径分布图

Figure 5 Particle size distribution of CuTAPc-Fe₃O₄ nanoparticles composite

部位之间. 由于体系中还存在相当一部分 CuTAPc, 而且此时体系还存在一部分溶剂, 溶剂中的 CuTAPc 将与聚集体表面的 Fe₃O₄ 纳米粒子复合, 最后形成球形的 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子. 以上过程都可使体系能量降低, 故均为热力学自发过程^[12]. 由于大部分 CuTAPc 都复合在 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子的表面, 故该复合粒子可认为是以 CuTAPc 包覆在 Fe₃O₄ 纳米粒子表面的纳米复合粒子.

2.5 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子固定漆酶的特性研究

2.5.1 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子固定漆酶

Fe₃O₄ 纳米粒子与 CuTAPc 复合后获得表面带有活性基团的纳米复合粒子, 由于其粒径小, 比表面积大, 表面有大量的氨基, 当它与交联剂戊二醛反应时能迅速形成碳氮双键, 戊二醛另一端的醛基与酶反应得固定化酶. 粒子的活化及漆酶的固定过程见图 6.

粒径仪测定显示磁性固定化漆酶的粒径为 50 nm 左右, 即复合粒子固定漆酶后其粒径基本保持不变. 实验中以 1 mg/mL 的漆酶溶液为应用液, 在 4 °C 和中性条件下对漆酶进行 24 h 的固定, 漆酶的固定化率可达到 28.3%.

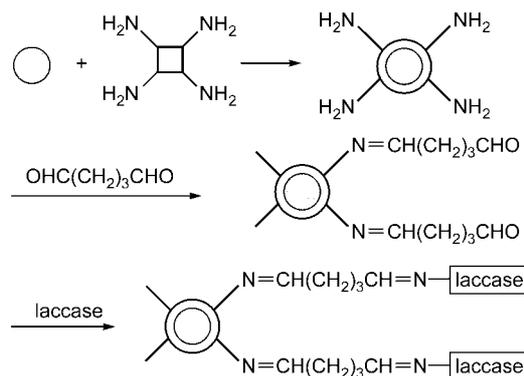


图6 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米粒子的制备及用于固定化酶

Figure 6 Preparation of CuTAPc-Fe₃O₄ nanoparticles composite and its use in laccase immobilization

2.5.2 固定化漆酶的贮存稳定性和操作稳定性

分别将固定化酶和游离酶在无底物条件下, 4 °C 下保存 1, 5, 11, 16 d 后, 测定酶活, 其结果见图 7. 为计算方便, 以第一次测定的漆酶的活性为 100%. 放置 11 d 后, 固定化漆酶其活力可保持在 90%, 而游离酶的活力只有 60%; 放置 16 d 后, 固定化漆酶其活力仍可保持在 70% 以上, 而游离酶的活力则下降到了 40%, 说明固定化漆酶有良好的贮存稳定性.

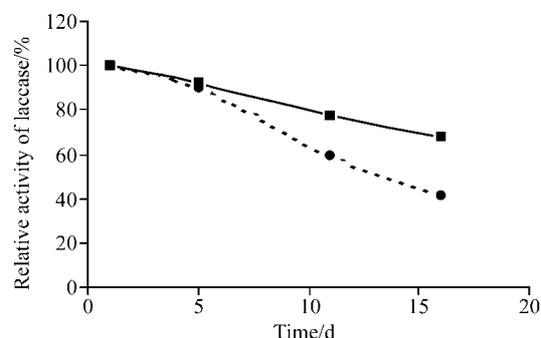


图7 固定化漆酶与游离酶的储存稳定性

Figure 7 Storage stability of immobilized and free laccase

■— immobilized laccase; ●— free laccase

操作稳定性是评价固定化酶是否具有实用性的重要指标, 固定化酶经五次重复使用后仍保持有 90% 以上的活性(见图 8), 而游离漆酶只能使用一次, 这使漆酶的使用效率明显提高. 固定化漆酶稳定性提高的原因可能有两方面: 固定化后漆酶分子与 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子多点连接, 可防止漆酶分子伸展变形而失活; 固定化抑制了漆酶的自降解导致的失活, 漆酶与 CuTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子结合后, 由于漆酶失去分子间相互作用的机会, 从而抑制了降解.

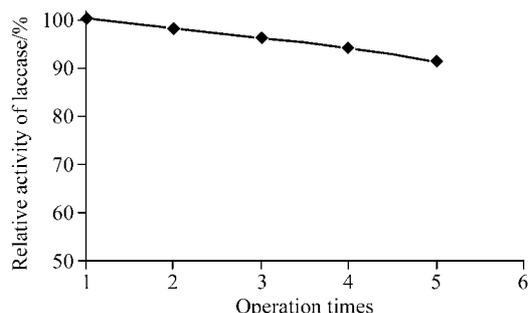


图8 固定化漆酶的操作稳定性

Figure 8 Operational stability of immobilized laccase during 5 operation times

References

- 1 Palonen, H.; Saloheimo, M.; Viikari, L.; Kruus, K. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 854.
- 2 Carpenter, E. E. *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, *225*, 17.
- 3 Ehab, T.; Mansoor, A. *Biomaterials* **2004**, *25*, 1937.
- 4 Ding, L.-L.; Weng, Y.; Zhang, Y.-R.; Ni, D.-W. *Prog. Biochem. Biophys.* **2001**, *28*(5), 691 (in Chinese).
(丁丽俐, 翁屹, 张阳荣, 倪大为, 生物化学与生物物理进展, **2001**, *28*(5), 691.)
- 5 Ma, M.; Zhang, Y.; Yu, W.; Shen, H.-Y.; Zhang, H.-Q.; Gu, N. *Colloids Surf., A* **2003**, *212*, 219.
- 6 Yu, M.-J.; Zhang, F. *Sci. Tech. Chem. Ind.* **2001**, *9*, 16 (in Chinese).
(俞马金, 张凡, 化工科技, **2001**, *9*, 16.)
- 7 Cong, F.-D.; Du, X.-G.; Zhao, B.-Z.; Liu, Q.; Chen, B. *J. Mol. Sci.* **2003**, *19*, 26 (in Chinese).
(丛方地, 杜锡光, 赵宝中, 刘群, 陈彬, 分子科学学报, **2003**, *19*, 26.)
- 8 Huang, J.; Guan, J.-G.; Yuan, R.-Z. *Acta Mater. Comp. Sinica* **1999**, *16*, 35 (in Chinese).
(黄俊, 官建国, 袁润章, 复合材料学报, **1999**, *16*, 35.)
- 9 Chang, Z.; Guo, C.-X.; Li, F.; Duan, X.; Zhang, M.-L. *Acta Chim. Sinica* **2002**, *60*, 298 (in Chinese).
(常铮, 郭灿雄, 李峰, 段雪, 张密林, 化学学报, **2002**, *60*, 298.)
- 10 Li, B.; Bao, C.; Shi, B.-X.; Kawakami, T.; Hiramatsu, M. *J. Infrared Millim. Waves* **2002**, *21*, 257 (in Chinese).
(李博, 鲍超, 施柏焯, 红外与毫米波学报, **2002**, *21*, 257.)
- 11 Huang, J.; Guan, J.-G.; Yuan, R.-Z. *J. Chin. Ceram. Soc.* **2000**, *28*, 432 (in Chinese).
(黄俊, 官建国, 袁润章, 硅酸盐学报, **2000**, *28*, 432.)
- 12 Huang, J.; Jiang, D.-S.; Guan, J.-G.; Yuan, R.-Z. *Acta Mater. Comp. Sinica* **2001**, *18*, 81 (in Chinese).
(黄俊, 姜德生, 官建国, 袁润章, 复合材料学报, **2001**, *18*, 81.)

(A0411307 ZHAO, C. H.; ZHENG, G. C.)