

预混合自组装辣根过氧化物酶生物活性膜及其催化活性研究*

江秀明^{1,2} 陈志春¹ 杨绍明¹ 林贤福^{1**}

(¹浙江大学化学系 杭州 310027) (²河南工业大学化学化工系 郑州 450052)

摘要 以阳离子化的辣根过氧化物酶(HRP)和阴离子聚苯乙烯磺酸钠(PSS)的预混合溶液,与阳离子聚电解质聚二甲基烯丙基氯化铵(PDDA)通过逐层组装,在阴离子化聚对苯二甲酸乙二酯(PET)表面构建了多层生物活性膜.用紫外-可见光谱仪(UV-Vis)和原子力显微镜(AFM)研究了交替自组装膜的结构和表面形貌,并测定了自组装膜的生物催化活性.结果表明,预混合溶液中的PSS与HRP一起沉积在PDDA膜层上组装成(PSS+HRP)膜层,且每层中PSS和HRP的比例一致;(PSS+HRP)膜层呈条状分布,膜表面较为平整;多层膜中的HRP催化 H_2O_2 与4-氨基安替比林的显色反应的表现观米氏常数为 $9.7 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (相对于 H_2O_2 底物),较溶液中($1.52 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的小.

关键词 逐层自组装,辣根过氧化物酶,聚电解质,原子力显微镜,紫外-可见光谱

生物活性膜的制备及性能研究是生物传感器、生物反应器、生物医学材料等生物功能元器件的基础.在各类制膜技术中,分子自组合法^[1]以其制得的膜高度有序、膜性能可控、操作简单、实用等优点,而被应用于构建包括生物活性膜在内的各类超薄膜^[2-5],其中将生物大分子或有机小分子与聚电解质预混合,然后再与带相反电荷的另一聚电解质进行交替自组装的方法称预混合自组装.Kunitake等在研究酶的自组装时,首先提出了预混合自组装概念^[6],并用石英晶体微天平对葡萄糖氧化酶的预混合自组装进行了研究,结果显示预混合自组装能够提高膜中生物酶的表现活性;Caruso和Schuler在研究聚苯乙烯磺酸钠胶体颗粒表面GOD和POD与聚电解质的交替逐层自组装时,也对预混合自组装进行了研究^[7];Das和Pal则将预混合自组装应用于小分子有机化合物,以改善膜中小分子物质的流失问题^[8];张希等用此法构筑了含发光染料的多层膜,并对其受激发光性能进行了研究^[9].预混合自组合法是一种有效的生物活性物质和小分子化合物的组装成膜手段.

本文在以往研究的基础上^[10,11],用预混合静电自组合法,在经负离子化处理的PET薄膜表面,构建了辣根过氧化物酶(HRP)活性生物酶膜,利用UV-Vis、AFM(原子力显微镜)及其它表征手段,对其成膜过程、表面形貌以及膜的生物催化活

性等进行了全面研究.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

辣根过氧化物酶(HRP), $250 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,等电点 $\text{pI} = 7.2$,华美生物技术公司;聚苯乙烯磺酸钠(PSS), $M_w = 7.0 \times 10^4$,Acros,聚二甲基烯丙基氯化铵(PDDA),20 wt%水溶液, $M_w = 1.0 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$,Aldrich;4-氨基安替比林(4-AAP),华东师范大学化工厂;聚对苯二甲酸乙二酯薄膜(PET),杭州大自然磁带厂;石英圆片,其它试剂均为分析纯,所用水为二次蒸馏水.

Nanascopy III A型原子力显微镜(AFM),Digital Instrument Inc;TU-1800PC紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;微量黑体石英比色皿,光程1 cm,内宽2 mm,江苏宜兴晶科光学仪器有限公司.

1.2 实验方法

1.2.1 自组装膜的制备 PET薄膜按文献^[12]方法用NaOH溶液进行预处理使其表面阴离子化,石英圆片用3:7的 H_2O_2 -硫酸溶液煮30 min,超纯水反复清洗干净^[5].将阴离子化的PET薄膜或处理过的石英圆片,在室温条件下,浸没在 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的PDDA溶液($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{pH} = 6.5$ 的磷酸缓冲溶液,含 $\text{NaCl} 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)中组装10

* 2003-12-21 收稿,2004-02-16 修稿;浙江省科技厅国际重点项目(项目号 021106132)资助;**通讯联系人

min, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{pH} = 6.5$ 磷酸缓冲溶液浸洗 1 min; 然后再放入 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PSS 溶液 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{pH} = 6.5$ 的磷酸缓冲溶液, 含 $\text{NaCl} 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 或含有 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ HRP、 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PSS 的预混合组装溶液 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{pH} = 6.5$ 的磷酸缓冲溶液, 含 $\text{NaCl} 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中浸泡 10 min, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{pH} = 6.5$ 磷酸缓冲溶液浸洗 1 min. 反复进行上述组装操作, 直至所需双层数.

1.2.2 UV-Vis 及 AFM 测定 将组装后的石英圆片装入特制的样品袋中, 置于 TU-1800PC 紫外可见分光光度计的光路中, 扫描其 $200 \sim 400 \text{ nm}$ 的吸收光谱; 预混合组装膜 (HRP + PSS)/PDPA, 在大气环境、轻敲模式^[13] 下观察其表面形貌.

1.2.3 活性及反应动力学测定 采用 Worthington 法^[14] 对制备的 HRP/PET 自组装酶膜活性进行测试. 取 $1.5 \times 1.0 \text{ cm}^2$ 的酶膜片代替 HRP 溶液进行显色反应, 以 510 nm 处反应最初 5 min 内吸光度增大的平均值 [$A(5 \text{ min})$] 来表示酶的活性.

基于 Worthington 法的原理对自组装酶膜的反应动力学进行测定. 在微量比色皿中准确加入约 0.6 mL 新鲜配制的 H_2O_2 显色溶液 (含 $\text{H}_2\text{O}_2 8.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 4-氨基安替比林 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 苯酚 $16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{pH} = 6.8$ 的磷酸缓冲溶液), 在 37°C

水浴中预热 10 min, 将宽 0.9 cm 的自组装酶膜片插入比色皿中, 搅拌均匀, 在 37°C 下用分光光度计跟踪测定反应产物在 510 nm 处的吸光度值.

2 结果与讨论

2.1 HRP 在阴离子化改性的 PET 表面的预混合自组装

生物蛋白质分子中, 游离的碱性氨基和酸性羧基残基数量的有限性, 决定了其可能携带的阴离子或阳离子的数量相对于聚电解质而言是很少的. 因此, 在 $\text{pH} = 6.5$ 的含 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ HRP 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PSS 的溶液中, 椭圆形的 HRP 分子^[15] 所带正离子数量远小于 PSS 分子所带的负离子, 并被 PSS 分子所包围, 形成预混合组装溶液.

PET 薄膜经碱处理后, 表面部分酯键被水解形成羧基负离子. 当将其浸入 PDPA 溶液时, 在静电作用力的推动下, 含有氮正离子的 PDPA 分子首先在 PET 表面沉积, 形成一层带有正离子的 PDPA 沉积膜, 再将其与含 PSS 和 HRP 的预混合组装溶液作用时, 带有负离子的 PSS 夹带着 HRP (表面带有正离子) 一起靠静电力组装在 PDPA 层上, 形成带负离子的 (HRP + PSS) 新的外层. 反复进行以上两步操作, 就可以在 PET 表面形成 (HRP + PSS)/PDPA 的多层组装膜 (图 1)^[6].

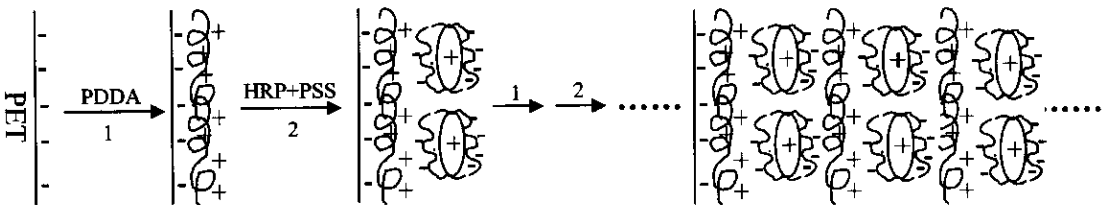


Fig. 1 Scheme of premixing self-assembly of HRP on the surface of negative ionized PET

从 PDPA/(PSS/PDPA)₃/PET 前体膜上的预混合自组装 (HRP + PSS) 膜的 AFM 图中可以看出 (图 2), 组装前后膜的表面形貌发生了变化. 与阴离子化 PET 表面直接组装带正离子的 HRP 对比, HRP 分子相互独立的沉积在 PET 表面形成颗粒状的膜表面形貌不同^[16], PET 表面预混合自组装的 HRP 膜层呈条状分布. 表明两种组装方式成膜对象的沉积方式不同. 在预混合组装成膜时, PSS 分子夹裹着与其相互作用的一组 HRP 酶分子一起沉积在了前体膜的表面, 并将其掩盖在自身分子形成的表层膜之下, 因此 AFM 无法区分预混合自组装的酶膜中的单个酶分子, 只能观察到条状

起伏, 且表面由于聚电解质的缘故而比较平整, 膜表面粗糙度变化较小 (从 0.744 nm 增加到 0.978 nm ; 而阴离子化 PET 表面直接组装 HRP 时, 表面粗糙度由基材的 0.645 nm 增加到组装膜的 2.580 nm).

2.2 HRP 预混合自组装多层膜的 UV 吸收光谱

通过预混合自组装多层膜的 UV-Vis 谱图 (图 3) 可以观察到自组装超薄膜的连续增长. 光谱曲线的吸收强度随着组装双层数的增多而连续增大, 表明运用逐层自组装方法已成功制备了多层 (HRP + PSS)/PDPA 膜. PSS 在 226 nm 处的吸收峰强度 [$A(226 \text{ nm})$] 于最初的 4 个双层增加较少, 之

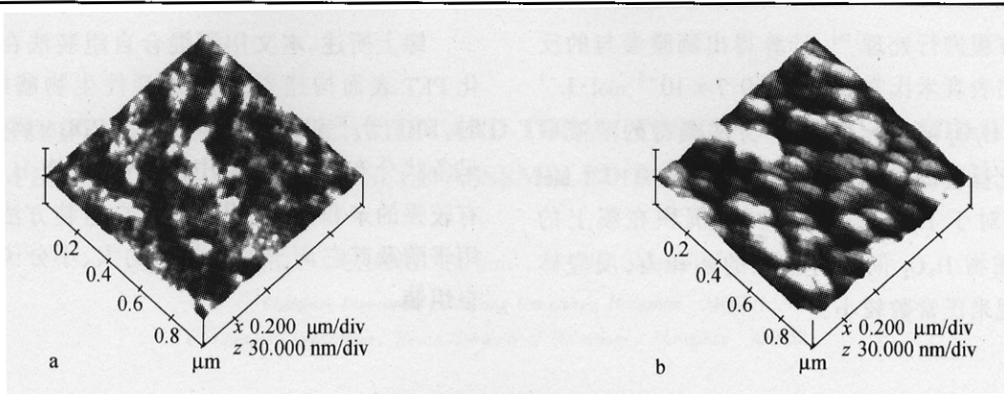


Fig. 2 AFM image of self-assembly film at surface

a) (PSS/PDDA)₃ precursor film on the surface of PET; b) (PSS + HRP)/PDDA layer on precursor film

后便随双层数的增多而线性增长^[17] (右上小图)。由于碱处理的 PET 表面离子数量较少,前 3 个组装双层的表面离子数量虽逐渐增多,但仍不能达到稳定组装所需的表面平衡离子密度,故而每一双层光学厚度均较小,且逐渐增大,直到 4 个双层以后,每个新的双层的厚度方才达到一稳定值。

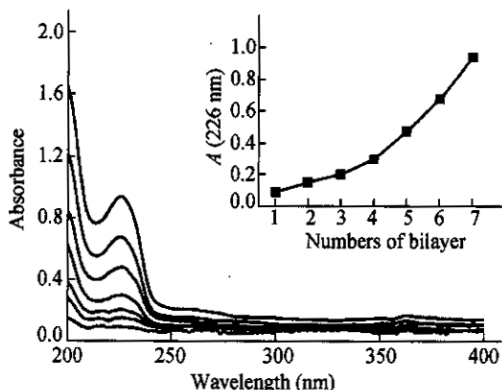


Fig. 3 UV-vis absorption spectra of (HRP + PSS)_n/PDDA multilayers on PET (From bottom to top, Numbers of bilayer are 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14, respectively)

2.3 HRP 预混合自组装多层膜的生物活性

采用 Worthington 法对具有不同双层数的预混合自组装 [(HRP + PSS)/PDDA]_n/PET 多层膜中 HRP 活性进行了测定,结果见图 4. 和自组装膜光学厚度随双层数的变化曲线(图 3, 右上小图)相同,在前 4 个双层内,膜中 HRP 的催化活性增大较慢,之后则与膜双层数成线性关系.表明在每个双层的预混组装膜中 HRP 与 PSS 具有相同比例,在形成沉积膜时,PSS 和 HRP 保持了其在溶液中的比例。

2.4 HRP 预混合自组装膜的催化动力学

自组装得到的酶膜片,由于酶能够充分的与反应底物直接接触,酶促催化反应过程中几乎不

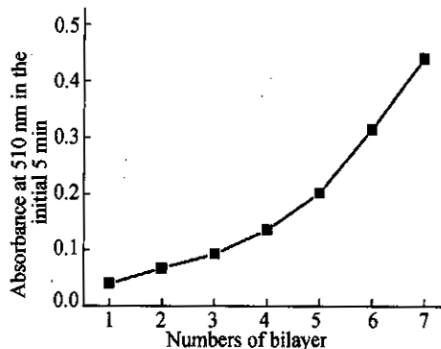


Fig. 4 Activity of (HRP + PSS)/PDDA multilayers on PET

存在传质阻力,而具有很高的催化活性。

本文在中性条件下,辣根过氧化物酶催化 H₂O₂ 与 4-氨基安替比林和苯酚的氧化还原反应体系,对在 (PSS/PDDA)₂/PET 前体膜上预混合自组装 (HRP + PSS)/PDDA 酶膜的催化反应动力学进行了研究.由于通过静电自组装沉积在 PET 表面的酶量有限,因此引入内宽 2 mm,吸光光程为 1 cm,最大容量仅 0.8mL 的微量比色皿作自组装酶膜的微反应器,以提高反应体系中 HRP 的相对浓度,从而能在较短的时间内记录到一个完整的催化反应动力学曲线(图 5).通过对 Henri-Michaelis-

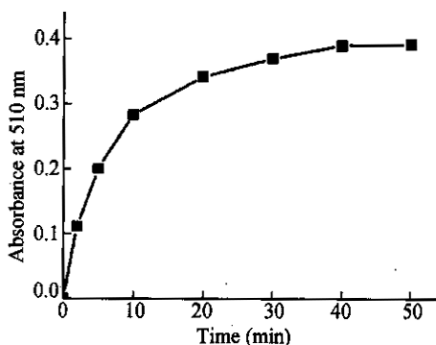


Fig. 5 Reaction kinetics curve of H₂O₂ with 4-AA catalyzed by (HRP + PSS)/PDDA multilayers on PET

Menten 方程进行处理^[18], 计算得出酶膜参与的反应体系的表观米氏常数 $K_m^{app} = 9.7 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (相对于 H_2O_2 底物), 用同样方法测得的溶液中 HRP 催化反应的表观米氏常数为 $1.52 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (相对于 H_2O_2 底物). 显然, 沉积在膜上的 HRP 与底物 H_2O_2 间具有较强的亲和力, 反应体系的表观米氏常数较小.

综上所述, 本文用预混合自组装法在阴离子化 PET 表面构建了 HRP 的活性生物酶膜; 成膜时, HRP 分子和 PSS 一起沉积于 PDDA 膜层上, 且呈条状分布; 自组装膜中 HRP 与底物 H_2O_2 间具有较强的亲和力. 说明预混合自组装方法能够应用于酶及其它离子数量较少的大、小分子的静电自组装.

REFERENCES

- 1 Decher G. *Science*, 1997, 277 (5330): 1232 ~ 1237
- 2 Zhang X, Wu T, Sun J Q, Shen J C. *Colloid Surface A*, 2002, 198: 439 ~ 442
- 3 Cheng Hao (成昊), Tuo Xinlin (庾新林), Gao Weiwei (高巍伟), Wang Xiaogong (王晓工). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2002, (1): 96 ~ 101
- 4 Khopade A J, Caruso F. *Langmuir*, 2003, 19 (15): 6219 ~ 6225
- 5 Lu Conghua (鲁从华), Luo Chuanqiu (罗传秋), Cao Weixiao (曹维孝). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2002, (1): 116 ~ 119
- 6 Onda M, Ariga K, Kunitake T. *J Biosci Bioeng*, 1999, 87(1): 69 ~ 75
- 7 Caruso F, Schuler C. *Langmuir*, 2000, 16 (24): 9595 ~ 9603
- 8 Das S, Pal A J. *Langmuir*, 2002, 18 (2): 458 ~ 461
- 9 Sun Junqi, Zou Shan, Wang Zhiqiang, Zhang Xi, Shen Jiacong. *Materials Science & Engineering C*, 1999, 10: 123 ~ 126
- 10 Lin Xianfu (林贤福), He Lin (何琳), Xu Liheng (徐立恒), Lü Deshui (吕德水), Chen Zhichun (陈志春). *Chem J Chinese U (高等学校化学学报)*, 2001, 22(4): 683 ~ 686
- 11 Li Yangmei (李扬眉), Chen Zhichun (陈志春), Lü Deshui (吕德水), Lin Xianfu (林贤福). *Acta Phys-Chim Sin (物理化学学报)*, 2003, 19(5): 474 ~ 477
- 12 He Lin (何琳), Lin Xianfu (林贤福), Chen Zhichun (陈志春), Li Yangmei (李扬眉), Xu Liheng (徐立恒). *Acta Chimica Sinica (化学学报)*, 2002, 60(2): 377 ~ 381
- 13 Wang Xiaoping (王晓平), Liu Lei (刘磊), Hu Hailong (胡海龙), Zhang Kun (张琨). *Acta Physica Sinica (物理学报)*, 2004, 53(4): 1008 ~ 1014
- 14 Stellmach B. *Bestimmungsmethoden Enzyme (酶的测定方法)*. Qian J Y, Trans (钱嘉渊译). Beijing (北京): Chinese Light Industry Press (中国轻工业出版社), 1992. 271 ~ 278
- 15 Berglund G I, Carlsson C H, Smith A T, Szoke H, Henriksen A, Hajdu J. *Nature*, 2002, 417: 463 ~ 468
- 16 Jiang X M, Chen Z C, Yang S M, Lin H F, Lin X F. *Chinese Chem Lett*, 2004, 15(5): 547 ~ 550
- 17 Serizawa T, Yamaguchi M, Arkashi M. *Biomacromolecules*, 2002, 3(4): 724 ~ 731
- 18 Yan Sixu (颜思旭), Cai Hongyu (蔡红玉). *Dynamic Theory and Method of Enzymatic Catalysis (酶催化动力学原理与方法)*. Xiamen (厦门): Xiamen University Press (厦门大学出版社), 1987. 53 ~ 55

STUDY ON THE FABRICATION AND THE ACTIVITY OF HORSE RADISH PEROXIDASE BIOFILMS SELF-ASSEMBLED BY PREMIXING METHOD

JIANG Xiuming^{1,2}, CHENG Zhichun¹, YANG Shaoming¹, LIN Xianfu¹

(¹ Chemistry Department, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

(² Chemistry Department, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052)

Abstract The premixing self-assembly solution of horseradish peroxidase with poly(sodium 4-styrenesulfonate) (HRP + PSS) is made by blending HRP and polyelectrolyte PSS, and the active [(HRP + PSS)/PDDA]_n enzyme multilayer biofilm is fabricated by alternate deposition of (HRP + PSS) and PDDA on the surface of negative ionized PET. The topography of films, the stepwise growth of layers and the activity of HRP in the film are measured with UV-Vis and AFM. HRP and PSS are assembled on the PDDA layer together from the premixing solution of (HRP + PSS), and the ratio of HRP to PSS in every layer of (HRP + PSS) is the same. The banded structure of HRP under the PSS is observed on the PDDA layer. The Michaelis Constant of the reaction of H₂O₂ and 4-amino-antipyrine (4-AAP) catalyzed by HRP in biofilm is $9.7 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and is lower than that of the reaction catalyzed by HRP in solution ($1.52 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). The affinity between H₂O₂ and HRP in biofilms is rather strong.

Key words Active biofilm, Horseradish peroxidase (HRP), Self-Assembly, Layer by layer, Polyelectrolyte, AFM, UV-Vis