

纳米二氧化钛对尿素酶活性的增强效应

司士辉, 李 赛, 杨政鹏, 谢亚林

(中南大学 化学化工学院, 湖南 长沙, 410083)

摘 要: 分别用粒径为 5 nm, 25 nm 和 2.4 μm 的 TiO_2 吸附尿素酶。在 35 $^\circ\text{C}$, pH 为 7 的条件下采用电位法测定吸附在 TiO_2 上的尿素酶的活性变化。基于纳米 TiO_2 膜的 pH 响应, 制备尿素酶/纳米 TiO_2 复合膜电极。研究结果表明: 纳米 TiO_2 对尿素酶的活性有明显的增强效应, 其游离酶及 TiO_2 (粒径分别为 5 nm, 25 nm 和 2.4 μm) 固载酶的米氏常数分别为 0.45, 0.22, 0.28 和 0.31 mol/L。该复合电极对尿素的检测范围为 8.5×10^{-5} ~0.15 mol/L, 相关系数为 0.993 73, 检出限为 5×10^{-6} mol/L, 其使用寿命在 35 d 后仍能维持 38%。

关键词: 纳米 TiO_2 ; 酶吸附; 尿素酶; 复合电极

中图分类号: O614.41⁺¹

文献标识码: A

文章编号: 1672-7207(2007)04-0692-04

Enhancement of urease activity by TiO_2 nanoparticles

SI Shi-hui, LI Sai, YANG Zheng-peng, XIE Ya-lin

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: The urease was adsorbed on TiO_2 with different particle sizes(5 nm, 25 nm, 2.4 μm). Under conditions of 35 $^\circ\text{C}$ and pH=7, the activity of urease adsorbed on TiO_2 particles was measured by potentiometry. Based on the pH response of nano- TiO_2 film, a urease/nano- TiO_2 complex films electrode was developed. The results show that the activity of urease can be enhanced by being adsorbed on nanostructure materials, and the Michaelis-Menton constant of free and urease adsorbed on different particles sizes of TiO_2 (5 nm, 25 nm, 2.4 μm) are 0.45, 0.22, 0.28 and 0.31 mol/L, respectively. The complex films electrode is sensitive to urea in the linear range 8.5×10^{-5} ~0.15 mol/L, the correlation coefficient and the detection limit are 0.993 73 and 6×10^{-5} mol/L, respectively. The lifetime of the urease/nano- TiO_2 complex films electrode can remain 38% after 35 d.

Key words: nano-titanium oxide; enzyme adsorption; urease; complex films electrode

纳米材料由于其尺寸很小, 结构特殊, 因此具有许多独特的物理化学特性, 如小尺寸效应, 比表面积大, 反应活性高, 量子效应等^[1-3]。近年来, 随着纳米技术的发展, 纳米材料的生物效应引起了人们的关注^[4-7]。目前, 人们已对纳米 TiO_2 , SiO_2 , 碳纳米管和纳米铁粉等的生物效应进行了研究^[8-11]。

纳米 TiO_2 具有比表面积大, 化学稳定性好等优点一直受到人们的关注。目前, 纳米 TiO_2 的应用十分广

泛, 例如: 在环境科学中, 将纳米 TiO_2 作为光催化剂用于废水处理和饮用水处理^[12]; 在医疗领域中, 利用 TiO_2 自身的半导体光催化特性, 进行杀菌消毒和癌症治疗^[13]; 在科学研究中, 将 TiO_2 作为传感材料应用于传感器的制备^[14]。近期研究表明, TiO_2 纳米材料的生物效应与尺寸效应有关^[11]。为此, 本文作者以纳米 TiO_2 为基体吸附尿素酶, 研究不同尺寸纳米 TiO_2 对尿素酶活性的影响; 此外, 采用纳米 TiO_2 作为 pH 敏感

收稿日期: 2006-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20475065)

作者简介: 司士辉(1967-), 男, 河南固始人, 教授, 博士, 从事纳米材料及生物传感器的研究

通讯作者: 司士辉, 男, 教授; 电话: 0731-8836993; E-mail: sishihui@mail.csu.edu.cn

膜制备尿素酶/纳米 TiO₂ 复合膜电极, 用于测定尿素的浓度。

1 实验

1.1 仪器与试剂

主要仪器有: PHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂制造); 超级恒温水浴(上海宝联仪器厂制造); 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司制造); 78HW-3 恒温磁力搅拌器(杭州仪器电机有限公司制造); 800B 离心机(上海安亭科学仪器厂制造)。

主要试剂有: 尿素酶(EC.3.5.1.5 type III, Sigma 公司生产); TiO₂(粒径分别为 5 nm, 25 nm 和 2.4 μm, 广州门德纳米科技有限公司生产); 钛丝(直径为 1 mm); 无水乙醇; 甲醇; 1 mmol/L Na₂HPO₄-1 mmol/L NaH₂PO₄ 缓冲溶液(PBS)。所用试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 吸附在纳米 TiO₂ 表面的尿素酶活性的测定

避光下, 分别将 2 mg 粒径为 5 nm, 25 nm 和 2.4 μm 的 TiO₂ 粒子溶于 3 mL 含 0.125 mg/mL 的尿素酶溶液中, 在 4 °C 吸附作用 12 h, 测定时, 于 35 °C, 以 0.1 mol/L 的尿素溶液为酶底物, 首先将待测液 pH 值与酶底物 pH 值调至相同, 测定酶反应的 pH 值响应变化, 记录电位-时间(*E-t*) 曲线。

1.3 尿素酶/纳米 TiO₂ 复合电极测定尿素

首先用细砂纸将钛丝表面打磨干净, 然后, 分别用 1 mol/L NaOH 溶液和蒸馏水清洗 3 次, 晾干。将纳米 TiO₂ 凝胶超声 15 min, 将处理好的钛丝电极在纳米 TiO₂ 凝胶中浸渍 1 min 后, 取出, 晾干, 重复浸渍数次, 获得不同厚度的 TiO₂ 膜电极。

将 2 mg 尿素酶溶于 0.4 mL 磷酸盐缓冲溶液中(1 mmol/L, pH=7.0), 使用前保存于 4 °C 冰箱中。TiO₂ 膜电极浸泡于去离子水中用紫外灯照射 15 min, 清洗后将其浸渍于尿素酶溶液中 24 h(4 °C)。电极不用时, 将其保存于 4 °C 的磷酸盐缓冲溶液中。

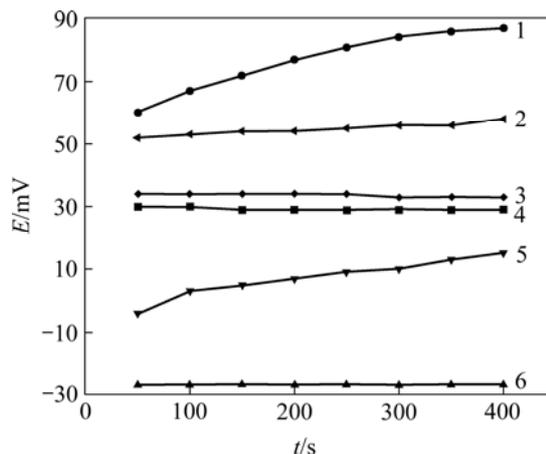
室温下, 用不同浓度的尿素作为酶底物, 根据电位法用尿素酶/纳米 TiO₂ 复合电极测定尿素的浓度。

2 结果与分析

2.1 TiO₂ 纳米粒对酶活性的影响

图 1 所示为不同粒径的 TiO₂ 对尿素酶活性的影响。可见, 没有 TiO₂ 时, 游离酶的 pH 值响应变化很

小, 分别加入 3 种不同粒径的 TiO₂ 后, 固定化尿素酶的 pH 值响应迅速提高, 并且粒径为 25 nm 和 5 nm 的 TiO₂ 吸附的酶其 pH 值响应增大显著。这是由于纳米颗粒比表面积大, 表面自由能高, 吸附能力较高, 使更多的酶分子吸附在纳米 TiO₂ 表面。另外, 由于纳米颗粒尺寸很小, 可以与酶内部的亲水基团发生作用, 从而引起酶构型上的变化, 这种变化使得酶得活性中心更易接近底物, 提高了酶的催化效率。



1—尿素酶吸附在粒径为 25 nm 的 TiO₂ 表面; 2—尿素酶吸附在粒径为 2.4 μm 的 TiO₂ 表面; 3—粒径为 2.4 μm 的 TiO₂ 溶胶; 4—粒径为 25 nm 的 TiO₂ 溶胶; 5—尿素酶吸附在粒径为 5 nm 的 TiO₂ 表面; 6—粒径为 5 nm 的 TiO₂ 溶胶

图 1 不同粒径纳米 TiO₂ 对尿素酶活性的影响

Fig.1 Effect of difference size nano-TiO₂ on activity of urease

对纳米 TiO₂ 的浓度对尿素酶活性的影响进行研究, 结果表明, 在 35 °C, pH 值一定的条件下, 以 0.1 mol/L 尿素溶液为底液, 在含 0.125 g/L 的尿素酶溶液中将纳米 TiO₂(粒径 25 nm) 的浓度从 6×10^{-2} g/L 改变至 0.5 g/L, 酶反应的 pH 值响应迅速增加, 继续增加纳米 TiO₂ 的浓度, pH 值响应逐渐下降。

2.2 米氏常数的测定

分别测定游离酶与吸附在不同粒径 TiO₂ 表面的尿素酶的米氏常数。实验表明, 尿素酶反应表现出 Michaelis-Menton 动力学机理特征, 其表观米氏常数 (K_m) 是酶-底物动力学的特征, 其值可由 Lineweaver-Burk 方程求得^[15]:

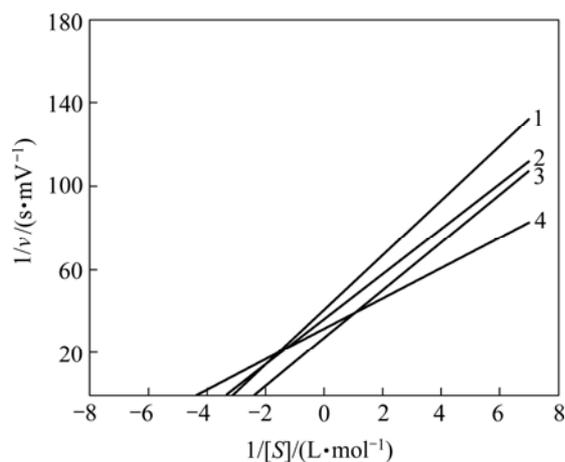
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V} \quad (1)$$

式中: v 为反应初速度; V 为最大反应速度; S 为底物浓度。

根据双倒数作图法, 以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/v$ 为纵

坐标作图, 绘出一条直线, 由其斜率 K_m/V , 纵轴截距 $1/V$, 可求得 K_m 。

计算求得游离尿素酶的米氏常数为 0.45 mol/L , 粒径分别为 5 nm , 25 nm 和 $2.4 \mu\text{m}$ 的 TiO_2 吸附的尿素酶米氏常数分别为 0.22 , 0.28 和 0.31 mol/L 。由计算结果可以看出: 由纳米 TiO_2 吸附的尿素酶米氏常数较低, 酶的活性大, 说明纳米 TiO_2 对尿素酶活性有增强效应。



1—尿素酶吸附在粒径为 $2.4 \mu\text{m}$ 的 TiO_2 表面;
2—尿素酶吸附在粒径为 25 nm 的 TiO_2 表面; 3—游离尿素酶;
4—尿素酶吸附在粒径为 5 nm 的 TiO_2 表面

图 2 底物浓度与尿素酶反应速度的关系

Fig.2 Relationship between urea concentration and urease reaction velocity

2.3 尿素酶/纳米 TiO_2 复合膜电极测定尿素

尿素酶是生物系统中一种重要的酶, 它将尿素催化为 CO_2 和 NH_3 , 反应式如下:



以纳米多孔 TiO_2 做固态氧化物膜制备尿素酶/纳米 TiO_2 复合膜电极, 并将其用于尿素的浓度测定。图 3 所示为尿素酶/ TiO_2 复合膜电极测定尿素浓度的响应曲线。当 $8 \text{ mL } 5 \text{ mmol/L}$ 尿素加入到 $15 \text{ mL } 1 \text{ mmol/L}$ PBS 溶液后, 电极电位随时间逐渐下降最后趋于稳定。实验中还研究了不同膜厚度对电极电位响应的影响, 结果表明, 膜厚度对于复合电极对尿素的响应没有影响。这是因为, 本实验采用直接吸附法固定尿素酶, 酶主要固定在 TiO_2 膜电极的最外层, 膜的厚度对尿素酶的固载量没有很大的影响。另一方面, 由于纳米多孔膜具有良好的透性, 尿素酶可在短时间内与 TiO_2 多孔膜结合。实验中 $50\sim 300 \text{ s}$ 内的 ΔE 为检测信号。

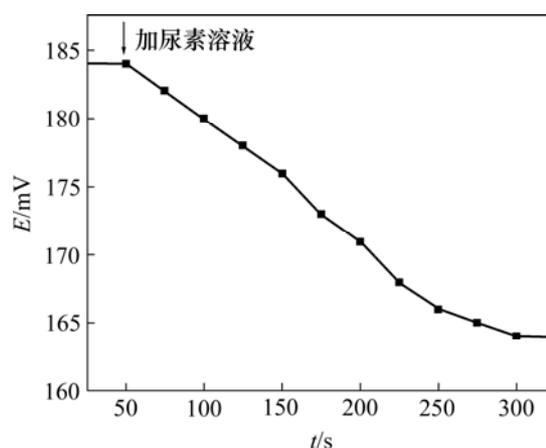


图 3 尿素溶液加入后电极电位响应

Fig.3 Potential response of urease/ TiO_2 electrode after addition of urea

改变 pH 值能影响酶活性中心上基团的离解度, 同时也影响底物的离解度, 从而影响酶分子对底物分子的结合和催化。实验中优化了 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液的 pH 值, 发现该电极在 pH 值为 $7\sim 8$ 时, 尿素酶 pH 值响应最大。

在 $25\sim 45 \text{ }^\circ\text{C}$ 范围内测定了温度对电极响应的影响, 结果发现, 随着温度的升高, 电极响应逐渐增大, 但当温度大于 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, 酶发生热变性, 电极响应反而随温度升高而降低。因此, 电极工作条件为: pH 值为 $7\sim 8$ 的 PBS 缓冲溶液, 温度为 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。此时响应最大。

在最佳工作条件下测定尿素浓度对电极电位的影响, 结果如图 4 所示。可见, 电极电位与尿素浓度呈线性关系, 由线性回归方程求得相关系数为 0.99373 , 尿素的检测范围为 $8.5 \times 10^{-5}\sim 0.15 \text{ mol/L}$, 以信噪比为

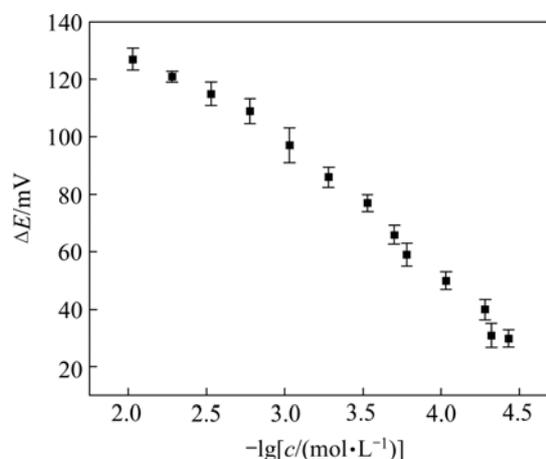


图 4 电极响应与尿素浓度 c 关系

Fig.4 Dependence of potential response of urease/ TiO_2 electrode on concentration of urea

3 时(pH 计的误差为 ± 1 mV), 求得该方法对于尿素的检出限为 5×10^{-6} mol/L。

在 35°C , pH=7.0 的 PBS 缓冲溶液中, 测定尿素酶/纳米 TiO_2 复合膜电极的使用寿命(见图 5), 结果表明, 该电极电位响应可持续 35 d, 35 d 后电极响应仍然维持尿素酶固有活性的 38%; 电极不用时, 浸泡于 PBS 中, 并避光保存于 4°C 冰箱中。

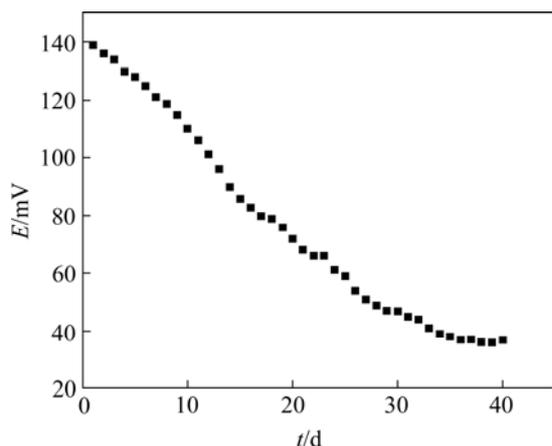


图 5 尿素酶/ TiO_2 复合膜电极的使用寿命

Fig.5 Lifetime of urease/ TiO_2 complex films electrode

3 结 论

a. 纳米 TiO_2 颗粒能够有效地提高尿素酶的催化活性。以纳米 TiO_2 为固载基体制备的尿素酶/纳米 TiO_2 复合膜电极与以往的尿素酶电极相比, 在测定尿素浓度时有一定的改进。

b. 该尿素酶/纳米 TiO_2 复合电极制作方法简单, 灵敏度高, 使用寿命长, 无需化学修饰。

参考文献:

- [1] Agheli H, Malmstrom J, Hanarp P, et al. Nanostructured biointerfaces[J]. *Materials Science and Engineering C*, 2006, 26: 911-917.
- [2] Keller N, Pietruszka B, Keller V. A new one-dimensional tungsten carbide nanostructured material[J]. *Materials Letters*, 2006, 60: 1774-1777.
- [3] Yakovlev N, Kaveev A, Sokolov N, et al. Novel magnetic nanostructures: Epitaxial cobalt films in transparent fluoride

matrix[J]. *Current Applied Physics*, 2006, 6: 575-578.

- [4] Service R F. Nanomaterials show signs of toxicity[J]. *Science*, 2003, 300: 243.
- [5] Brumfiel G. A little knowledge[J]. *Nature*, 2003, 424: 246-248.
- [6] Teixeira A I, Mckie G A, Foley J D, et al. The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(21): 3945-3954.
- [7] Kim J, Grate J W, Wang P. Nanostructures for enzyme stabilization[J]. *Chemical Engineering Science*, 2006, 61: 1017-1026.
- [8] Yeates T O, Padilla J E. Designing supramolecular protein assemblies[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2002, 12(4): 464-470.
- [9] Woolley A T, Cheung C L, Hafner J H, et al. Structural biology with carbon nanotube AFM probes[J]. *Chemistry & Biology*, 2000, 7(11): R193-R204.
- [10] Hafner J H, Cheung C L, Woolley A T, et al. Structural and functional imaging with carbon nanotube AFM probes[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2001, 77(1): 73-110.
- [11] Oberdorster G, Finkelstein J N, Johnston C. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice[J]. *Res Rep Health Eff Inst*, 2000, 96: 5-74.
- [12] 张 焯. 纳米二氧化钛光催化技术在环境科学中的应用[J]. *大理学院学报*, 2006, 5(4): 57-60
ZHANG Ye. Application of nanometer TiO_2 photocatalysis technique in environmental science[J]. *Journal of Dali University*, 2006, 5(4): 57-60.
- [13] 张青龙, 沈 毅, 吴国友, 等. 纳米 TiO_2 的掺杂改性及应用进展研究[J]. *稀有金属快报*, 2005, 24(12): 6-10.
ZHANG Qing-long, SHEN Yi, WU Guo-you, et al. Modification of TiO_2 photocatalyst and application[J]. *Rare Metals Letters*, 2005, 24(12): 6-10.
- [14] 翟 琳, 仲 飞, 刘彭义. TiO_2 气敏传感器研究进展[J]. *传感器世界*, 2005, 10(12): 6-9.
ZHAI Lin, ZHONG Fei, LIU Peng-yi. Advances in research of TiO_2 gas sensors[J]. *Sensor World*, 2005, 10(12): 6-9.
- [15] 张 娟, 徐静娟, 陈洪渊. 基于 SiO_2 纳米粒子固定辣根过氧化物酶的生物传感器[J]. *高等学校化学学报*, 2004, 25(4): 614-617.
ZHANG Juan, XU Jing-juan, CHEN Hong-yuan. A biosensor based on immobilizing horseradish peroxidase on SiO_2 nanoparticles[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2004, 25(4): 614-617.