

α -胰凝乳蛋白酶在相转移 Fe_3O_4 纳米粒子表面的固定化

吴 侠^{1,2}, 韩玉顺^{1,2}, 曹敏花¹, 胡长文¹, 任 玲¹, 葛广路²
(1. 北京理工大学理学院, 北京 100081; 2. 国家纳米科学中心, 北京 100190)

摘要 采用高温热分解前驱体乙酰丙酮铁法合成了尺寸均一且分散性好的油溶性 Fe_3O_4 纳米粒子, 通过表面配体置换直接将其表面换为水溶性分子聚乙二醇二酸(PEG diacid), 形成了具有表面功能基的稳定无毒的水溶性磁性复合体系. TEM, *M-H* 曲线, FTIR 和 TGA 等表征结果表明, 油溶性 Fe_3O_4 纳米粒子已成功转移至水相, 且具有很好的顺磁性及生物相容性. 研究表明, α -胰凝乳蛋白酶(α -ChT)被成功地固载到水溶性 Fe_3O_4 纳米粒子表面, 与自由酶相比, 固定化酶的热稳定性明显提高, 并体现出良好的可重复利用性.

关键词 磁性 Fe_3O_4 纳米粒子; 表面配体置换; 固定化酶

中图分类号 O614

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2010)01-0011-05

超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子在磁分离、磁性液体和磁存储等方面具有广泛的应用前景^[1]. 同时, Fe_3O_4 纳米粒子在生物医学领域也有重要应用, 即可用于 DNA 检测^[2]、免疫分析测定、磁流体热疗技术^[3]、生物探针^[4]和固定化酶^[5]等方面. 因此, Fe_3O_4 纳米粒子的制备和表面修饰一直是研究热点.

制备 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的方法很多, 有共沉淀法^[6,7]、微乳液法^[8]、热分解法^[9,10]和生物辅助合成法^[11]等, 其中以高温热分解法合成的粒子尺寸形貌均一性最好^[12], 但因其表面包覆了一层有机分子, 所以无法应用于生物领域. 本文首先用高温热解法合成高质量磁性 Fe_3O_4 纳米粒子, 为了满足 Fe_3O_4 纳米粒子的水溶性和功能化要求, 对 Fe_3O_4 纳米粒子表面用 PEG diacid 进行了配体置换, 由于不再引入多巴胺^[13,14], 所以该体系具有很好的稳定性与生物相容性. 最后, 将得到的水溶性 Fe_3O_4 纳米粒子应用于对固定化酶的研究, 结果表明, 相对于自由酶, 固定化酶的热稳定性和重复利用性得到了较大提高.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

乙酰丙酮铁 [$\text{Fe}(\text{acac})_3$, 97%]、1,2-十六烷二醇 ($\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}_2$, 90%)、苯甲基醚 [$(\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2)_2\text{O}$, 99%]、油胺 ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}$, 70%)、油酸 ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$, 90%)、聚乙二醇二酸 ($M_n = 600$, PEG diacid, 96%)、 α -胰凝乳蛋白酶 (α -Chymotrypsin, α -ChT, $M_r \approx 25000$, 99%)、*N*-羟基丁二酰亚胺 (NHS, $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$, 98%)、Tris 碱 [$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, 99%]和苯甲酰基-*L*-酪氨酸乙酯 (BTEE, 98%)均购自 Sigma-Aldrich 公司. 乙醇胺 ($\text{H}_2\text{NC}_2\text{H}_4\text{OH}$, 98%)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC · HCl, 98%)购自 Alfa Aesar 公司.

XRD-6000 X 射线粉末衍射(日本 Shimadzu 公司); Tecnai G² 20 S-TWIN 透射电子显微镜(美国 FEI 公司, 200 kV); 综合物理性质测量系统(美国 Quantum Design 公司, VSM 磁性测量系统); Spectrum One FTIR 光谱仪(美国 Pekin-Elmer 公司); TG/DTA 热分析仪(美国 Pekin-Elmer 公司); Lambda 950 紫

收稿日期: 2009-07-03.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20871016, 20673031)和中国科学院知识创新工程重点方向项目(批准号: KSCX2-YW-G-019)资助.

联系人简介: 任 玲, 女, 副教授, 主要从事纳米粒子的合成及应用研究. E-mail: rl@bit.edu.cn

葛广路, 男, 博士, 副研究员, 主要从事量子点及磁性纳米粒子的应用研究. E-mail: gegl@nanoctr.cn

外-可见近红外光谱仪(美国 Perkin-Elmer 公司).

1.2 Fe₃O₄ 纳米粒子的合成

以 Fe(acac)₃ 为前驱体, 通过高温油相热解法制备 Fe₃O₄ 纳米粒子^[15]. 在氩气保护下, 将 0.7604 g Fe(acac)₃ 和 2.5825 g 1,2-十六烷二醇溶于 20 mL 苯甲基醚中, 加入 1.9 mL 油酸和 2 mL 油胺, 搅拌并加热至 200 °C, 恒温 2 h, 将温度提升至 300 °C 并恒温 1 h, 停止加热, 搅拌下使反应液自然冷却至室温, 得到黑色溶液, 加入 40 mL 无水乙醇, 离心分离, 真空干燥, 产物保存在正己烷中待用.

1.3 Fe₃O₄ 纳米粒子的相转移

将 200 μL PEG diacid(分子量为 600)溶解于 10 mL 氯仿和 5 mL DMF 混合溶液中, 搅拌 30 min, 加入 25 mg Fe₃O₄ 纳米粒子, 在 N₂ 气保护下振荡 24 h, 磁铁分离, 用无水乙醇洗涤数次后干燥, 得到 PEG diacid 修饰的 Fe₃O₄ 纳米粒子, 将产物均匀分散在去离子水中待用.

采用差热-热重法测定 PEG diacid 修饰的 Fe₃O₄ 纳米粒子表面的有机分子含量. 对水溶性 Fe₃O₄ 纳米粒子分散溶液进行差热-热重测量.

1.4 α-胰凝乳蛋白酶的固定化

将 5 mg EDC · HCl 和 7 mg NHS 溶解于 3 mL 的 PBS 缓冲溶液(pH = 6.5)中, 然后加入 10 mg 配体置换后的水溶性 Fe₃O₄ 纳米粒子, 置于 0 °C 冰浴中, 搅拌 30 min, 磁铁分离, 用 PBS 缓冲溶液洗涤 3 次后分散于 3 mL PBS 中; 加入 5 mg α-ChT, 于室温振荡 24 h, 用 PBS 溶液洗涤 10 次以上至无游离 α-ChT, 加入 1 mL 10 mmol/L 乙醇胺, 于室温振荡 1 h, 磁铁分离, 将产物分散于 HCl 溶液(pH = 3)中.

1.4.1 固定化酶热稳定性测定 取 1.4 mL 1.18 mmol/L BTEE 底物溶液、1.42 mL Tris-HCl 缓冲液(80 mmol/L, pH = 7.8)和 0.08 mL 2 mol/L CaCl₂ 于 25 °C 恒温, 加入 0.1 mL 自由酶(0.5 mg/mL)或固定化酶, 反应 3 min 后, 立即进行分离, 测定上清液在 256 nm 处的吸光度变化值(ΔA).

1.4.2 固定化酶重复利用性测试 用固定化酶在 25 °C 下催化水解反应后, 经磁力分离回收固定化酶, 用三次水洗涤数次后再用于催化水解测比活力.

α-胰凝乳蛋白酶可催化 *N*-苯甲酰-*L*-酪氨酸乙酯(BTEE)水解:



采用改进的 Hummel 方法^[17~19]可分别测定 α-胰凝乳蛋白酶和固定化 α-胰凝乳蛋白酶的活力. 酶活力定义为每毫克蛋白 1 min 水解 1.0 μmol 的 BTEE 为一个活力单位.

在自由酶或固定化酶催化 BTEE 水解反应后, 立即进行分离, 测定上清液在 256 nm 吸光度的变化值 ΔA, 按下式计算酶比活力:

$$\text{Specific-activity} = \frac{\Delta A}{0.964 \times E_w \times V \times t}$$

式中, 0.964 为 *N*-Benzoyl-*L*-tyrosine 在 256 nm 的摩尔消光系数; *V* 代表所用体积; *t* 为反应时间; 而 *E_w* 为所取的 0.1 mL 自由酶或固定化酶中的酶含量.

2 结果与讨论

2.1 Fe₃O₄ 纳米粒子

采用 Tecnai G² 20 高分辨透射电子显微镜表征样品的形貌及晶格结构. 图 1 为所制备的 Fe₃O₄ 纳米粒子的 TEM 图像. 由图 1 可见, Fe₃O₄ 纳米粒子具有良好的分散性及尺寸均匀性, 粒子直径大约为 9 nm. 选区电子衍射[图 1 插图(C)]表明, 合成的 Fe₃O₄ 纳米粒子具有较高的结晶度. 此外, Fe₃O₄ 纳米粒子能均匀分散于非极性溶剂正己烷中[图 1 插图(A)], 放置数月未发生沉淀. 而且, 此分散体系具有良好的磁性[图 1 插图(B)]. 用 VSM 磁性测量系统(PPMS)对 Fe₃O₄ 纳米粒子在不同温度下磁化强度 *M* 与磁场强度 *H* 进行了表征. *M* 与 *H* 关系曲线如图 2 中的插图所示, 由图中的磁滞回线可以判断所得 Fe₃O₄ 纳米粒子具有较好的超顺磁性, 且在 10 K 时, 其饱和磁化强度约为 66.9 A · m²/kg, 大于

300 K 时的 $58.6 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$.

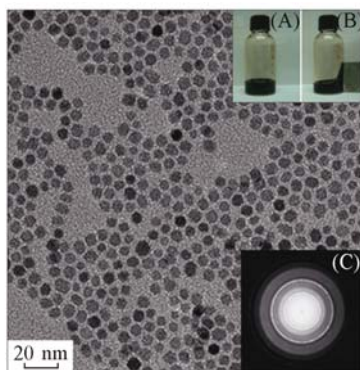


Fig. 1 TEM image of Fe_3O_4 nanoparticles

Insets: (A) dispersion in hexane; (B) response towards a magnet; (C) selected area electron diffraction pattern of Fe_3O_4 nanoparticles.

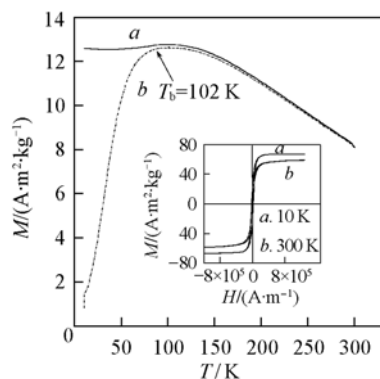


Fig. 2 Temperature dependence of magnetization, after zero field cooling (a) and field cooling (b), measured at $8 \times 10^3 \text{ A/m}$

Inset: magnetic hysteresis loop at different temperature of Fe_3O_4 nanoparticles.

Fe_3O_4 纳米粒子的磁感应强度与温度的关系如图 2 所示. 随着温度的降低, 场冷却曲线 $\text{FC}(8 \times 10^3 \text{ A/m})$ 逐渐上升, 然后趋于平缓, 说明产物具有顺磁性. 室温下, 产物的零场冷却曲线 ZFC 随温度的降低而逐渐上升, 表现出顺磁性, 在截止温度 T_b (Blocking temperature) = 102 K 时, 磁感应强度最大, 而后随温度的降低而降低, 呈现出铁磁性. 随温度变化发生由顺磁性到铁磁性的转变, 正是铁氧化物纳米材料的低温特质.

2.2 Fe_3O_4 纳米粒子表面的配体置换

利用 PEG diacid ($M_r = 600$) 直接进行 Fe_3O_4 纳米粒子表面的配体置换. 图 3(A) 为置换后 Fe_3O_4 纳米粒子的 TEM 图, 可见纳米粒子形貌与尺寸并没有明显变化, 而且配体置换后, 纳米粒子并未发生明显团聚. 经过配体置换后, 已将油溶性纳米粒子转移至水相[图 3(A) 中插图], 说明 Fe_3O_4 纳米粒子表面已经转化为亲水性表面.

使用差热-热重法测定了 Fe_3O_4 纳米粒子的表面活性有机分子含量[热重曲线见图 3(B)]. 油酸的失重峰在 $190 \sim 240 \text{ }^\circ\text{C}$ 之间^[16], 第一个失重峰为剩余油酸, 第二个失重峰为 PEG 二酸, 得出连接于 Fe_3O_4 粒子表面 PEG diacid 的质量比为 10.3%.

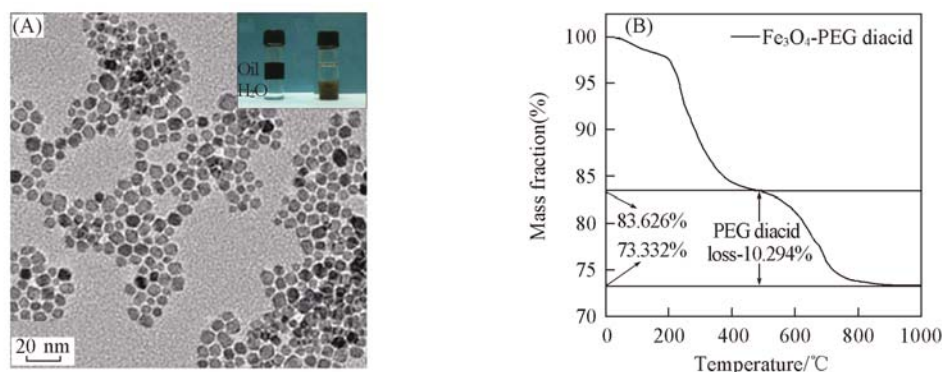


Fig. 3 TEM image of Fe_3O_4 nanoparticles after ligand exchange (A) and TG curve of Fe_3O_4 nanoparticles after PEG diacid ligand exchange (B)

Inset of (A): the dispersion in water and hexane before and after ligand exchange of Fe_3O_4 nanoparticles.

置换前后磁化强度 M 与磁场强度 H 的关系曲线见图 4, $M-H$ 关系曲线中依然存在磁滞回线和具有较小的矫顽力, 置换后的饱和磁化强度未发生明显减小, 说明置换后 Fe_3O_4 纳米粒子仍表现出较强的超顺磁性, 这有利于生物催化后样品的分离与回收. 如图 4 中插图所示, 进行配体置换后分散于水中的 Fe_3O_4 纳米粒子显示出了良好的磁响应性.

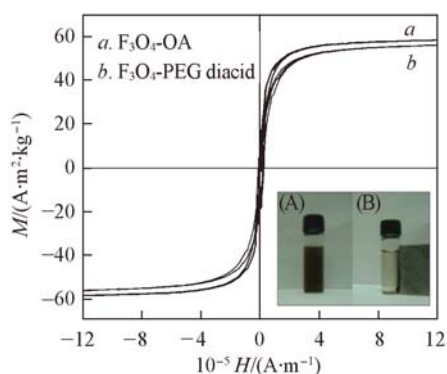


Fig. 4 Magnetic hysteresis loop before (a) and after (b) ligand exchange

Insets: Photos of dispersion (A) and magnetic response (B) of Fe_3O_4 nanoparticles after PEG-diacid ligand exchange.

2.3 α -胰凝乳蛋白酶在 Fe_3O_4 纳米粒子表面的固定

图 5 中的插图为蛋白酶固定化后 Fe_3O_4 纳米粒子的 TEM 图, 可见, 偶联后的 Fe_3O_4 纳米粒子彼此紧靠, 有交联现象, 局部有蛋白酶-纳米粒子交联形成网络的团簇. 分析造成团聚的原因有二: 一是所选用的水溶性 Fe_3O_4 纳米粒子体系偶联前就存在一定程度团聚, 在偶联条件不剧烈的条件下这种团聚难以克服; 二是水溶性 Fe_3O_4 体系的表面修饰分子 PEG-diacid 对 Fe_3O_4 粒子的修饰, 在水中存在动态平衡, 脱落的 PEG-diacid 可作为“桥梁”使蛋白酶分子之间产生交联. 以上这两种情况的出现, 直接导致了粒径分析时尺寸变大.

选取培养温度区间为 $35 \sim 85 \text{ }^\circ\text{C}$, 培养时间为 30 min, 用 UV-Vis 吸收光谱仪 (Lambda 950) 对纯 α -胰凝乳蛋白酶 (0.5 mg/mL) 和在 Fe_3O_4 纳米粒子表面固定化的 α -胰凝乳蛋白酶的热稳定性进行了测定, 其热稳定性曲线见图 5. 可见, 纯蛋白酶在培养温度达到 $85 \text{ }^\circ\text{C}$ 后, 活力值降低较为明显, 固定化后, 在整个培养温度区间都保持有较高的活力值 ($>70\%$), 即 α -胰凝乳蛋白酶经固定化后, 其热稳定性显著提高.

在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下, 对固定化的 α -胰凝乳蛋白酶的重复利用性进行了考察. 在反复催化 BTEE 水解后, 进行了比活力的测试, 得到图 6 中的重复利用性曲线, 可见重复使用 7 次后固定化酶仍保持高达 85% 以上的活性.

用 Diamond 热分析仪 (TG-DTA) 对蛋白酶在 Fe_3O_4 纳米粒子表面的固载量进行了测定. 固定化酶后 Fe_3O_4 纳米粒子的热重 (TG) 曲线如图 6 中的插图所示. 羧基修饰体系固定的 α -胰凝乳蛋白酶在约 $160 \text{ }^\circ\text{C}$ 开始分解, 直至约 $460 \text{ }^\circ\text{C}$ 分解完毕^[16]. 由 TG 曲线计算可知, α -胰凝乳蛋白酶在 Fe_3O_4 纳米粒子上的固载量 (即酶的质量分数) 小于 10% , 与文献中的蛋白酶固载量在同一个数量级^[17~19], 固定化酶的固载量仍有待进一步提高.

3 结 论

用简单的配体置换方法得到了水溶性的 Fe_3O_4 纳米粒子, 既保留高温热解法制备粒子尺寸均一的特点, 又在不引入其它杂质的条件下得到了稳定、无毒和具有生物相容性的 Fe_3O_4 纳米粒子. 将该粒子体系应用于蛋白酶的固定化, 实现了 α -胰凝乳蛋白酶热稳定性的明显提高, 以及重复利用多次后仍保持有较高的活性的目的, 并能方便地回收, 这对进一步研究固定化酶的应用具有指导意义.

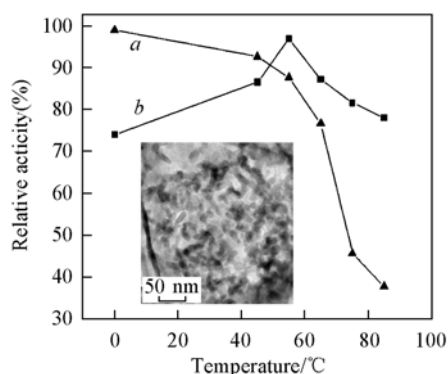


Fig. 5 Thermal stabilities of free ChT incubated and immobilized ChT

a. Free ChT; b. Fe_3O_4 -PEG diacid-ChT.
Inset: TEM image of immobilized ChT.

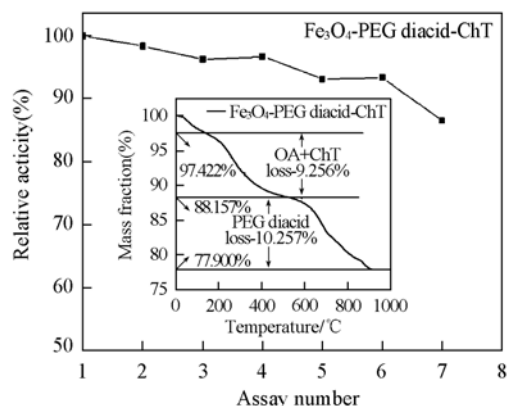


Fig. 6 Reusability of immobilized ChT

Inset: TG curve of immobilized ChT.

参 考 文 献

- [1] Hyeon T. . Chem. Commun. [J], 2003, (8): 927—934
- [2] Weizmann Y. , Patolsky F. , Katz E. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 2003, **125**(12): 3452—3454
- [3] Hamley I. W. . Angew. Chem. Int. Ed. [J], 2003, **42**(15): 1692—1712
- [4] SHEN Xia(沈霞), GUO Wei(郭薇). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2004, **25**(3): 445—447
- [5] HONG Jun(洪军), XU Dong-Mei(徐冬梅), SUN Han-Wen(孙汉文). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(1): 177—182
- [6] Gupta A. K. , Gupta M. . Biomaterials[J], 2005, **26**(18): 3995—4021
- [7] Iida H. , Takayanagi K. , Nakanishi T. , *et al.* . Journal of Colloid and Interface Science[J], 2007, **314**(1): 274—280
- [8] Xu H. , Cui L. L. , Tong N. H. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 2006, **128**(49): 15582—15583
- [9] Hyeon T. , Lee S. S. , Park J. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 2001, **123**(49): 12798—12801
- [10] Liu H. L. , Ko S. P. , Wu J. H. , *et al.* . Journal of Magnetism and Magnetic Materials[J], 2007, **310**(2): 815—817
- [11] Prozorov T. , Mallapragada S. K. , Narasimhan B. , *et al.* . Adv. Funct. Mater. [J], 2007, **17**(6): 951—957
- [12] ZHAO Zi-Lai(赵紫来), BIAN Zheng-Yun(卞征云), CHEN Lang-Xing(陈朗星), *et al.* . Chemistry Progress(化学进展)[J], 2006, **18**(10): 1288—1297
- [13] Xie J. , Xu C. J. , Kohler N. , *et al.* . Adv. Mater. [J], 2007, **19**(20): 3163—3166
- [14] Michael D. S. , Ulises Reveles J. , Shiv N. K. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 2007, **129**(9): 2482—2487
- [15] Sun S. H. , Zeng H. , Robinson D. B. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 2004, **126**(1): 273—279
- [16] CHEN Jing-Hong(陈镜泓), LI Chuan-Ru(李传儒). Thermal Analysis and Its Application(热分析及其应用)[M], Beijing: Science Press, 1985: 80—160
- [17] Hong J. , Gong P. J. , Yu J. H. , *et al.* . Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic[J], 2006, **42**(3): 99—105
- [18] Hong J. , Xu D. M. , Gong P. J. , *et al.* . Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic[J], 2007, **45**(3): 84—90
- [19] Hong J. , Gong P. J. , Xu D. M. , *et al.* . Journal of Biotechnology[J], 2007, **128**(3): 597—605

α -Chymotrypsin Immobilization on the Surface of Phase-transferred Fe_3O_4 Nanoparticles

WU Xia^{1,2}, HAN Yu-Shun^{1,2}, CAO Min-Hua¹, HU Chang-Wen^{1,2}, REN Ling^{1*}, GE Guang-Lu^{2*}

(1. College of Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;

2. National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China)

Abstract The oil-soluble magnetic Fe_3O_4 nanoparticles with uniform size and morphology were synthesized *via* thermal decomposition of $\text{Fe}(\text{acac})_3$ precursor. They were successfully transferred into aqueous phase through the ligand-exchange reaction with water-soluble PEG diacid molecule, forming water-soluble, stable, nontoxic, and magnetic composite with surface functional group. TEM, *M-H* curve, FTIR and TGA were used to characterize the as-synthesized composite and demonstrated that the nanoparticles maintained their superparamagnetism and biocompatibility. α -Chymotrypsin (α -ChT) was immobilized on the surface of the water-soluble nanoparticles. The immobilized α -ChT exhibited better thermal stability and high activity after repeated usage.

Keywords Magnetic Fe_3O_4 nanoparticle; Surface ligand exchange; Immobilized enzyme

(Ed. : F, G)