

知识介绍

纳米管固定化生物分子及其应用

姜忠义 陆 杨 许松伟

(天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要: 综述了纳米管固定化生物分子的几种主要方法, 如交联法、吸附法、包埋法等, 并简要地介绍了纳米管固定化生物分子在生物传感、生物催化和生物分离等领域的应用。

关键词: 纳米管; 固定化; 生物传感器; 生物催化; 生物分离

中图分类号: TQ033

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2004)11-0062-03

Immobilization of biomolecule by nanotubes and its application

JIANG Zhong-yi, LU Yang, XU Song-wei

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Several methods, such as cross-linking, adsorption and encapsulation for biomolecule immobilization using carbon nanotubes as carriers are illustrated, the application of the nanotube-immobilized biomolecules in biosensor, biocatalysis and bioseparation is briefly introduced too.

Key words: nanotube; immobilization; biosensor; biocatalysis; bioseparation

纳米管是纳米科学中研究最多的纳米材料之一, 其类别包括碳纳米管(CNTs)、SiO₂ 纳米管、多肽纳米管等^[1-2], 其中以碳纳米管的应用最为广泛。近年来, 纳米管在生物技术领域的应用为人们所关注, 纳米管生物技术也应运而生。纳米管生物技术将纳米技术和生物技术相集成, 将成为现代生物工程的重要组成部分, 并将在生物医学、电子学、材料学、环境科学等诸多领域有良好的应用前景。纳米管在生物领域的应用主要包括生物医学和生物技术 2 个方面, 这里主要介绍纳米管在生物技术如生物催化和生物分离中的应用。要实现纳米管在生物技术中的应用, 首先要将生物分子固定化在纳米管上, 从而得到具有生物活性的纳米管。

1 固定化方法

碳纳米管固定化生物分子主要是指将酶、蛋白质等生物分子固定化在碳纳米管的表面或端口上, 并保持其反应活性, 得到碳纳米管-生物分子的复合物。目前纳米管固定化生物分子的方法主要可以分为 3 类: 交联法、吸附法和包埋法。

1.1 交联法

碳纳米管交联法固定化生物分子通常是指在有机交联剂的作用下, 利用蛋白质或酶分子中氨基酸

残基所含的氨基与碳纳米管表面的羧基发生酰胺化反应, 使生物分子通过共价键合作用固定化在碳纳米管外表面或顶端上; 或利用含有 π 电子的有机交联剂与碳纳米管侧壁上的高度离域化 π 电子通过 π - π 非共价键作用相结合, 得到功能化的碳纳米管, 再将蛋白质或酶与这种有机交联剂结合, 从而将生物分子固定化在碳纳米管的外表面上^[3]。根据交联剂在上述 2 种情况下所起的作用不同, 可将交联法分为有机共价交联法和有机非共价交联法, 常用的交联剂有 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDAC)和 1-苊丁酸琥珀酰亚胺酯等。

对有机共价交联法的研究首先是从对碳纳米管的化学切割开始的。由于碳纳米管端部有五元环的缺陷以及由缺陷引起的维度弯曲, 使其端部碳原子反应活性增加。管壁碳原子形成的化学键具有 sp^2 和 sp^3 混合杂化特征, 但以 sp^2 为主, 因此形成高度离域化的 π 电子复合体系, 从而使基面碳原子也具有一定的化学反应活性。适当的氧化反应可使碳纳米管脱帽、开口, 并得到分散性较好的切割纳米管段, 这种方法称之为“化学切割”。1994 年, Lago R. M. 等人^[4]首先发现, 利用强酸对碳纳米管进行化学切割, 可以得到开口的碳纳米管。在随后的研究中, Lago R. M. 等人发现, 开口的碳纳米管顶端含有一定

收稿日期: 2004-09-06; 修回日期: 2004-09-24

基金项目: 国家自然科学基金(20176039)、天津市应用基础研究重点项目(033802411)、教育部跨世纪优秀人才培养计划资助项目

作者简介: 姜忠义(1966-), 男, 博士, 教授, 主要从事蛋白质及酶工程研究, 022-27890882, zhyjiang@tju.edu.cn。

数量的活性基团(如羟基,羧基等),从而可以利用交联剂与含有活性基团的碳纳米管的共价交联作用来固定化蛋白质或酶。最常用的共价交联方法包括 2 种:①对氧化后的纳米管进行酯化和酰胺化;②利用纳米管侧壁发生 1,3-偶极环加成反应共价结合官能团。

有机非共价交联法不会对碳纳米管本身的结构造成破坏,因而可以得到结构完整的功能性碳纳米管。可以通过这种非共价的壁面修饰方法将一些蛋白质或酶固定化在碳纳米管上。Chem R. Z. 等人^[5]利用苊与单壁碳纳米管(SWNTs)的 $\pi-\pi$ 键相互作用,将苊的衍生物 1-苊丁酸琥珀酰亚胺酯不可逆吸附在 SWNTs 侧壁表面,并通过蛋白质或酶分子上的氨基与琥珀酰亚胺酯反应,得到了侧壁表面固定有蛋白质、DNA 以及生物小分子的 SWNTs。这种方法结合了碳纳米管的电性质和被固定生物分子的高度选择性,有可能获得理想的微型生物传感器。

1.2 吸附法

吸附法主要是利用纳米管对蛋白质等的物理吸附作用将生物分子固定在纳米管上。Star A 等^[6]将 SWNTs 分散在直链淀粉的水溶液中,形成非常稳定的可溶性 SWNTs-淀粉结合体。通过原子力显微镜可以清楚地发现,纳米管束被吸附在 SWNTs 侧壁上的无定型多糖所覆盖。Lin 等^[7]研究了纯化的 SWNTs 在水环境中对铁蛋白的亲合作用:先对分散在 KH_2PO_4 中的纯化的 SWNTs 进行超声处理,再加入铁蛋白溶液,然后搅拌、离心分离。对最后得到的均匀黑色上清液进行表征,结果发现,纳米管表面对铁蛋白具有显著的吸附作用。这种吸附作用可能有多种来源,如静电作用、氢键、疏水作用等,同时也与纳米管本身结构上的一些特性有关,例如碳纳米管具有很高的表面能。

1.3 包埋法

包埋法是固定化酶的一种常用方法,可分为网格型和微囊型。纳米管具有中空的准一维管状结构,当用强酸打开顶端后,可以将生物小分子吸附或填充进入管内,形成包埋,这属于微囊型。网格型包埋是利用杂化了 SWNTs 的聚合物包埋酶,形成具有生物活性的酶-聚合物-SWNTs 复合材料。研究表明,这种酶-聚合物-SWNTs 复合材料系统能作为一种独特的生物催化材料,如生物催化膜等。包埋法一般不需要与蛋白质或酶的氨基酸残基进行结合反应,因此很少改变蛋白质或酶的高级结构,酶活的回收率较高。

近来已经有许多研究将这种方法用于碳纳米管

对酶分子的固定化中。Rege Kaushal 等^[8]通过将 SWNTs 和 α -糜蛋白酶(CT)直接悬浮在聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)的甲苯溶液中,制备生物催化复合膜,并将得到的膜的酶活与 PMMA-CT 和 PMMA-石墨系统进行比较:分别在 1 h 和 48 h 后检测各自的泄漏物中的酶活并计算膜中的酶活,结果显示,SWNTs 的加入使得酶的泄漏量显著下降,固定化酶的活性和稳定性显著增强。他们还比较了不同 SWNTs 添加量下复合膜的酶活,发现随着 SWNTs 加入量的增加,复合膜的稳定性和酶活相应提高。这是由于 SWNTs 具有很高的表面能,在聚合物基质内酶分子较为牢固地吸附在 SWNTs 上,从而减少了酶的泄漏。

最近有研究表明,杂化了 SWNTs 的聚合物的扩散系数发生明显的增加,这有利于减小酶促反应中的内扩散限制,提高了反应效率。Wei 等^[9]比较了碳纳米管-聚乙烯复合材料与本体聚乙烯的扩散系数,结果发现,复合材料的扩散系数,尤其是平行于碳纳米管轴向方向上的基质扩散系数随着温度升高而增加量大大超过本体聚合物的扩散系数。因此,利用碳纳米管-聚合物复合材料来包埋酶是一种能有效减少酶泄漏并有利于酶促反应的固定化方法。

2 纳米管固定化生物分子的应用

迄今为止,纳米管固定化生物分子的应用主要集中在生物传感、生物分离、生物催化等方面,其中关于生物传感和生物分离的研究报道较多,而关于生物催化的研究报道则相对较少。

生物传感器的工作原理主要是将酶促反应过程中的化学、光学和热转换成电信号,目前碳纳米管固定化酶在这方面的应用比较多。Yu 等人^[10]将铁红素血红蛋白酶和山葵过氧化酶通过酰胺化反应固定于 SWNTs 上,用作生物传感器的电极,并通过测定 H_2O_2 的检测极限来评价固定化酶的酶活。结果显示,固定化酶的循环伏安曲线上的峰值很稳定,而且经过多次重复检测也不会衰减,酶电极在 4℃ 的缓冲溶液中可以保存数周,而酶活仅损失 20%。Davis 等^[11]成功地将葡萄糖氧化酶(GOD)物理性吸附在氧化和分散过的 SWNTs 上,并测试了经葡萄糖氧化酶-单壁碳纳米管(GOD-SWNTs)改性的玻璃碳电极的伏安特性,发现其催化响应信号比未用 SWNTs 修饰的玻璃碳电极大 10 倍。最近, Wang 等人^[12]利用 HNO_3 和 HF 的混合液打开多壁碳纳米管(MWNTs)的顶端,得到开端的碳纳米管,再将其浸在含 GOD 的缓冲溶液中,使 GOD 进入 MWNTs 的中空管内。

固定在 MWNTs 内的 GOD 能够作为电子转移到金传感器的中介物上而产生响应曲线,这样得到的 MWNTs 基传感器对葡萄糖显示了极强的灵敏度:10s 之内信号即可达到稳态值的 95%,而传统的玻璃碳基传感器达到相同的稳态值则至少需要 20s 左右。另外,固定化 GOD 具有很好的稳定性,在 4℃ 的磷酸盐缓冲溶液中储存 4 个月后,仍能够保持初始活性的 87%。

SiO₂ 纳米管易于制备,具有高度交联的结构,能够形成精确的识别位点,也是理想的固定化载体。可利用分子印迹技术制备具有分子识别功能的 SiO₂ 纳米管膜,利用其对目标分子具有高亲和力、高选择性和高位点可及性的优点,进行高效的生物分离。

最近, Lee 等^[13]将抗体基 SiO₂ 纳米管膜用于分离药物对映体,分离对象是具有 RS 和 SR 2 种对映体的手性药物 4-[3-(4-氟苯基)-2-羟基-1-(1,2,4)三唑-1-丙基]-苯基脒。利用抗体对 2 种对映体亲和力的差异,将 RS 抗体固定化在膜的内表面上,然后对药物对映体进行膜分离。利用氧化铝膜作为主体膜,然后通过溶胶-凝胶模板合成法将 SiO₂ 纳米管沉积在氧化铝膜的孔内, SiO₂ 纳米管的内壁与醛硅烷反应,醛基与抗体蛋白质的氨基反应,从而将 RS 抗体固定在 SiO₂ 纳米管的内壁上。经检测,最后得到的抗体基 SiO₂ 纳米管膜对 RS 对映体具有很高的选择性(2.0 ± 0.2)。

使用类似的方法, Mitchell 等还制备出内外表面被不同官能团修饰的纳米管,将其作为智能纳米相萃取器以除去溶液中的分子^[14]。外表面呈亲水性、内表面呈疏水性的纳米管是对水相中所含的脂溶性分子的理想萃取剂。疏水的苯喹啉(BQ)在辛醇/水中分配系数为 10^{3.8},其被用作纳米相萃取试验中的模型化合物。将 5 mg 内表面被 C₁₈ 修饰的纳米管悬浮在 5 mL 浓度为 1.0 × 10⁻⁵ mol/L 的水相 BQ 中。将悬浮液搅拌 5 min,然后过滤除去纳米管。用紫外分光光度法检测发现溶液中 82% 的 BQ 已经被除去。当再加入 5 mg 的这种纳米管时,90% 以上的 BQ 已经被除去。而控制纳米管内表面不含疏水性的 C₁₈ 化合物,则萃取出的 BQ 低于 10%。

3 结论与展望

本文介绍的几种主要固定化方法各有优点与不足。交联法中生物分子与纳米管结合力强,但要先对纳米管进行预处理:在强酸条件下进行化学切割或有机修饰,反应条件相对苛刻,操作步骤相对复

杂,且交联反应难以控制,酶容易因为活性位点被结合而失活。吸附法虽无需交联剂的参与,操作条件相对温和,在被吸附蛋白质或酶溶液中就可以发生反应,但生物分子与固体表面结合力较弱,容易发生脱附。而包埋法一般不需要与蛋白质或酶的氨基酸残基进行结合反应,因此很少改变蛋白质或酶的高级结构,酶活回收率较高。虽然传统的包埋法具有酶泄漏、扩散阻力大、不利于酶促反应等缺点,但在聚合物中加入纳米管对酶进行包埋,既能有效地控制酶泄漏,又提高了聚合物-CNTs 复合材料的扩散系数,对酶促反应有利。

纳米管固定化生物分子是近年来发展起来的一个新兴研究方向,现在的大多数研究者关心的还是在于能否将生物分子固定化在纳米管上,而对于固定化后的生物分子活性和稳定性的研究还不够彻底。另外目前关于交联法和吸附法在纳米管上固定化生物分子的研究较多,但是对包埋法的研究还处于起步阶段,而包埋法具有许多独特的优点,如低泄漏率、高稳定性、高酶活收率等,有望成为今后纳米管固定化生物分子研究的一个焦点。

参考文献

- [1] Charles R Martin, Punit Kohli. [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2: 29 - 37.
- [2] Iijima S. [J]. *Nature*, 1991, 354: 56 - 58.
- [3] 刘璐琪, 郭志新, 朱道本, 等. [J]. *科学通报*, 2001, 46 (19): 1590 - 1596.
- [4] Lago R M, Tsang S C, Green M L H, et al. [J]. *Nature*, 1994, 372: 159 - 162.
- [5] Chen R J, Zhang Y G, Dai H J, et al. [J]. *J Am Chem Soc*, 2001, 123 (16): 3838 - 3839.
- [6] Star A, Stewerman D W, Heath J R, et al. [J]. *Angew Chem*, 2002, 41 (14): 2508 - 2512.
- [7] Lin Yi, Allard Lawrence F, Sun Yaping. [J]. *J Phys Chem B*, 2004, 108 (12): 3760 - 3764.
- [8] Rege Kaushal, Raravikar Nachiket R, Dordick Jonathan S, et al. [J]. *Nano Lett*, 2003, 3(6): 829 - 832.
- [9] Wei Chenyu, Srivastava Deepak, Cho Kyeongjae. [J]. *Nano Lett*, 2002, 2(6): 647 - 650.
- [10] Yu Xin, Galeska Izabela, Rusling James F, et al. [J]. *Electrochemistry Communications*, 2003, 5(5): 408 - 411.
- [11] Davis Jason J, Coleman Karl S, Bagshaw Claire B, et al. [J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(43): 12664 - 12665.
- [12] Wang S G, Zhang Qing, Wang Ruili, et al. [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 311(3): 572 - 576.
- [13] Lee Sang Bok, Trofin Lacramioara, Martin Charles R, et al. [J]. *Science*, 2002, 296: 2198 - 2200.
- [14] Mitchell David T, Lee Sang Bok, Martin Charles R, et al. [J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(40): 11864 - 11865. ■