

含氨基和环氧基双功能基的聚合物刷磁性微球的制备及 对青霉素 G 酰化酶的固定化*

李秀涛 黄军生 张 勇 郭 淼 阎虎生**

(功能高分子材料教育部重点实验室 南开大学高分子化学研究所 天津 300071)

摘 要 在内部分散超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子的二乙烯苯交联聚丙烯酸微球表面引入原子转移自由基聚合(ATRP)引发剂,引发聚合向微球表面分别引入 $\text{P}(\text{GMMA}-r\text{-DMAEMA}-r\text{-GMA})$ 、 $\text{P}(\text{GMMA}-r\text{-DMAEMA})$ 和 $\text{P}(\text{GMMA}-r\text{-GMA})$ 无规共聚物刷(GMMA 为甲基丙烯酸甘油单酯,DMAEMA 为甲基丙烯酸- N,N -二甲氨基乙酯,GMA 为甲基丙烯酸缩水甘油酯),聚合物刷中 GMMA 链节的作用是使聚合物刷具有亲水性,DMAEMA 引入氨基,GMA 引入环氧基.研究了青霉素 G 酰化酶在这些载体上的固定化和其酶活性.结果表明,同时引入环氧基和氨基的 $\text{P}(\text{GMMA}-r\text{-DMAEMA}-r\text{-GMA})$ 刷磁性微球固定化青霉素 G 酰化酶的活性和活性收率都最高,其固定化动力学比只含环氧基 $\text{P}(\text{GMMA}-r\text{-GMA})$ 刷磁性微球的好.固定化酶比自由酶更耐热,固定化酶的最佳 pH 值比自由酶的略高,固定化酶重复使用 10 次后其活性保留 70%.

关键词 酶固定化,磁性微球,聚合物刷,青霉素 G 酰化酶

超顺磁性粒子材料广泛应用于药物控释、免疫试验、磁共振成像、肿瘤热疗、医疗诊断、酶固定化以及生物分离(如蛋白质、DNA、细胞、病毒和细菌的分离)等方面^[1~4].磁性纳米粒子由于尺寸小,可以很容易通过血液循环系统被传输到目标组织,同时又有很高的比表面积,应用于药物控释、作为磁共振成像对比度增强剂和热疗等体内应用方面.磁性纳米粒子的缺点是,通过外磁场捕集磁性纳米粒子需要特殊的强磁场仪器^[5].磁性微球($0.1 \sim 5 \mu\text{m}$)则凭借着其通过磁场与体系快速分离、磁场强度要求低、所用产生磁场的设备简单等优势在体外的磁分离等应用方面深受青睐^[1,6~8].前文我们制备了单分散交联聚丙烯酸微球,并通过微球内羧基络合 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 然后碱性共沉淀,得到微球内分散超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子的磁性微球^[9].相对于磁性纳米粒子,磁性微球的缺点是其比表面积较低,因而负载生物分子或配体的容量低.为了克服这一缺点,我们在上述的交联聚丙烯酸- Fe_3O_4 微球的表面通过原子转移自由基聚合(ATRP)引入聚合物刷^[10],如果使用含有活性功能基团的单体制备聚合物刷,则其磁性微球上可带有大量的功能基,如在聚合物刷带有环氧基的磁性微球上共价固载蛋白质^[10,11].共价固载蛋白质的优点是固载的蛋白质不易流失,缺点

是固载速度较慢,易造成蛋白质的活性(如酶活性)的失活.本文制备了在聚合物刷中同时含有环氧基和氨基的磁性微球,蛋白质(用青霉素 G 酰化酶作为模型)首先通过其羧基与微球上的氨基的离子作用使蛋白质快速结合于载体上,已通过离子作用固载的蛋白质通过其氨基、巯基与载体上的环氧基作用使其共价固载,既有离子作用固载的快速固载的优点,又保持了共价固载的固载牢固、不易流失的优点.

1 实验部分

1.1 原料与试剂

甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA,天津南开和成有限公司提供),甲基丙烯酸- N,N -二甲氨基乙酯(DMAEMA,ACROS),上述两单体用前要减压蒸馏脱阻聚剂.溴化亚铜(CuBr ,上海试剂一厂),在冰醋酸中搅拌过夜后,先用冰醋酸洗涤数次,再用无水乙醇洗至上清液无色,真空干燥备用.青霉素 G 酰化酶原酶液(浙江顺风海德尔有限公司),其催化活性测定为 1103 U/mL (U 为酶活性单位,1 U/mL 定义为 1 min 内 1 mL 酶液转化 1 μmol 底物),蛋白含量为 33 mg/mL (原酶液中除含有青霉素 G 酰化酶外,还含有其它蛋白质).D201 强碱型离子交换树脂(天津南开大学化工厂),使用前先

* 纪念何炳林院士逝世 1 周年约稿 2008-03-10 收稿,2008-03-25 修稿; ** 通讯联系人, E-mail: yanhns@nankai.edu.cn

用乙醇抽提,晾干后再真空干燥;青霉素 G 钾盐(华北制药集团有限责任公司),考马斯亮蓝 G-250(ACROS);1,1,4,7,7-五甲基二亚乙基三胺(PMDETA, ACROS),2-溴代异丁酰溴(ACROS),苯并三氮唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU, 吉尔生化有限公司),1-羟基苯并三氮唑(HOBT, 吉尔生化有限公司),二异丙基乙基胺(DIEA, ACROS)等均无需进一步处理,直接使用;其他试剂如无特殊说明均无需处理直接使用. 甲基丙烯酸甘油单酯(GMMA)根据文献[12]的方法通过 GMA 的水解制备,¹H-NMR 表明 GMA 的水解程度为 96% 左右.

1.2 磁性微球引发剂的制备

二乙烯苯交联聚丙烯酸-Fe₃O₄ 复合微球(80% 二乙烯苯与丙烯酸投料的质量比为 15:85)的制备见文献[9],下面简称磁性微球.将分散于水中的磁性微球用磁铁捕集而去掉游离的水,用丙酮多次置换去掉微球中所含的水分,然后再用二氯甲烷置换.将分散磁性微球的二氯甲烷中加入乙醇胺、HBTU、HOBT 和 DIEA,室温搅拌反应 24 h.微球用预热的 DMF 反复洗涤,再用无水乙醇,丙酮洗涤,真空干燥.所得磁性微球分散于 THF 中,加入三乙胺,在冰盐浴冷却和剧烈搅拌下滴加 2-溴代异丁酰溴/THF 溶液,然后室温搅拌过夜,依次用丙酮、水和甲醇洗涤多次,真空干燥,得磁性微球引发剂.

1.3 磁性微球表面接枝聚合

1.3.1 接枝 GMMA 和 GMA 无规共聚物刷(P(GMMA-*r*-GMA)) 在 25 mL 圆底烧瓶中加入 CuBr(0.14 mmol)、磁性微球引发剂(0.1 g),GMMA(1.1 mmol)、GMA(0.85 mmol),胶塞密封,通氮气排氧 0.5 h 后加入除氧甲醇(1.5 mL)和除氧 PMDETA(0.14 mmol),磁力搅拌,30℃ 油浴加热反应 90 min,用气相色谱测定上清液中各单体的比例.所得微球依次用乙醇、丙酮洗涤,真空干燥.通过接枝增重和各单体的转化的比例估算磁性微球的聚合物刷中各单元的比例和含量,下同.

1.3.2 接枝 GMMA 和 DMAEMA 无规共聚物刷(P(GMMA-*r*-DMAEMA)) 在 25 mL 圆底烧瓶(A)中加入 CuBr(0.14 mmol),在 25 mL 圆底烧瓶(B)中加入磁性微球引发剂(0.1 g)、GMMA(1.1 mmol)和 DMAEMA(0.70 mmol),磁力搅拌.将瓶(A)和(B)用胶塞密封,分别通氮气排氧 0.5 h.用注射器向瓶(A)中加入除氧甲醇(1.5 mL)和除氧

PMDETA(0.14 mmol),磁力搅拌,待瓶(A)中的 CuBr 全部溶解后将其溶液转移到瓶(B)中,磁力搅拌下在 50℃ 油浴中加热反应 90 min,用气相色谱测定上清液中各单体的比例.所得微球依次用乙醇、丙酮洗涤,真空干燥.

1.3.3 接枝 GMMA、DMAEMA 和 GMA 无规共聚物刷(P(GMMA-*r*-DMAEMA-*r*-GMA)) 接枝方法与 1.3.2 节的方法类似,所用原料及其用量为 CuBr(0.14 mmol)、磁性微球引发剂(0.1 g)、GMMA(1.1 mmol)、DMAEMA(0.18 mmol)、GMA(0.63 mmol)、除氧甲醇(1.5 mL)和除氧 PMDETA(0.14 mmol),反应温度为 30℃.

1.4 青霉素 G 酰化酶在聚合物刷磁性微球上的固定

固定方法与以前文^[11]方法类似.0.25 mL 青霉素 G 酰化酶原酶液用磷酸盐缓冲液(1.5 mol/L, pH = 8)稀释至 2.7 mL,加入 0.05 g 聚合物刷磁性微球,超声分散后,在 25℃ 搅拌下反应 24 h,用水洗涤除去未固定的自由酶.用 Bradford 法^[13]测定合并的洗涤液的蛋白质的浓度及总量,换算固定蛋白质的量.

1.5 酶活性的测定

固载酶活性的测定采用 pH-stat 法,详细步骤是将上述固定化酶的磁性微球分散于 10% 的青霉素 G 钾盐溶液(0.5 g 溶于 5 mL 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH = 7.8)中,在 37℃ 下用稀 NaOH 溶液滴定青霉素 G 钾盐水解释放出来的苯乙酸,使 pH 值维持在 7.8.记录 5 min 内消耗掉的 NaOH 溶液的体积数.固载酶的活性可用下面公式计算:

$$A = (c_{\text{NaOH}} V_{\text{NaOH}}) / WH$$

其中 A (U/g) 为固载酶的活性, c_{NaOH} ($\mu\text{mol/mL}$) 为 NaOH 溶液的浓度; V_{NaOH} (mL) 为滴定消耗掉的 NaOH 溶液的体积; W (g) 为用于催化水解的固载酶微球的质量; H (min) 为水解反应所用时间.

1.6 固定化动力学的测定

青霉素 G 酰化酶在聚合物刷微球上的固定速率测定如下所述.0.5 mL 原酶液用 1.5 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH = 8)稀释至 5.4 mL,取 30 μL 样品,然后加入 0.1 g 干燥的聚合物刷磁性微球,超声分散后于恒温摇床上在 25℃ 下振荡,每隔 1 h 取出 30 μL 上清液,测定所有取出的样品的蛋白质的浓度.

1.7 扫描电镜测定

将分散于水中的样品涂于玻璃片上,干燥,喷金后用 Shimadzu SS-550 扫描电镜测定.

2 结果与讨论

2.1 聚合物刷磁性微球的制备

本文对前文制备磁性微球引发剂的过程做了一些改进.前文^[10]在向磁性微球引入 ATRP 引发剂的 2 步反应中分别用 DMF 和 THF 作为溶剂,由于这二种溶剂对微球都有一定的溶胀作用,所以不仅在微球的表面引入 ATRP 引发剂,在微球的内部也引入了 ATRP 引发剂,虽然表面引入的更多^[10].这样向微球表面引入聚合物刷的同时,在微球内部也引入了大量的聚合物,而内部引入的

这些聚合物是基本上不可利用的,而这些聚合物会使微球的体积和质量大大增加,如增重可高达 300% 以上.这种增加会显著降低单位质量微球的磁性和表面聚合物刷的量.为了在向磁性微球引入聚合物刷时尽量在微球内部少引入聚合物,本文在交联聚丙烯酸-Fe₃O₄ 微球与乙醇胺的缩合反应中采用对微球不溶胀的溶剂二氯甲烷,使缩合反应尽量在表面进行,从而使引入的 ATRP 引发剂及随后引入的聚合物刷主要分别在微球的表面.表 1 列出了 3 种接枝聚合物刷的磁性微球的接枝情况.与前文^[10]的结果相比,在类似的条件下,接枝增重明显比前文的接枝增重小.由于单体间的竞聚率不同,因而接枝聚合物刷中不同单体形成的链节比例与单体的投料比有所不同.

Table 1 Grafting polymerization from magnetic microspheres

Entry	Monomer	Content of brush (%)	Content of PGMA (mmol/g)	Content of PGMA (mmol/g)	Content of PDMA-EMA (mmol/g)
1	GMMA/GMA	61.9	1.7	2.4	—
2	GMMA/DMAEMA	46.1	2.2	—	0.7
3	GMMA/DMAEMA/GMA	59.9	1.8	1.9	0.4

聚合物刷中 PGMA 链节的作用是使聚合物刷具有亲水性,使微球在水中有好的分散性能,同时使聚合物刷在水介质中伸展. PGMA 链节的作用是引入活性的环氧基功能基,PDMAEMA 的作用是引入氨基,氨基与酶分子中的羧基形成离子键而使酶通过离子作用固载.图 1 是磁性微球引发剂和 3 # 载体的扫描电镜照片,直径分别为约 300 nm 和约 400 nm,从照片上可以看出,引入聚合物刷后,微球体积仍然有较大增长.部分聚合物刷可能被接枝于微球内部,或者说聚合物刷接枝于微球一定厚度的表面层内.这可能是,在引入 ATRP 引发剂的第一步反应中尽管用微球的非良溶剂二氯甲烷作为溶剂,但由于乙醇胺易扩散到微球内部,使微球内部也引入一定的引发剂.图 1 还表明,引入聚合物刷后,微球仍保持很好的球形.

2.2 聚合物刷磁性微球固定化酶

用所制备的 3 种聚合物刷磁性微球进行青霉素 G 酰化酶的固定化,固定蛋白总量与固载酶的催化活性如表 2 所示.聚合物刷中的 PGMA 链节含有环氧基,环氧基可以与酶分子中的氨基、巯基等反应使酶共价固载于微球上.聚合物刷中的 PDMAEMA 则通过其氨基与酶分子中的羧基的离子作用使酶固定化.从表中可以看出,1 # 载体的

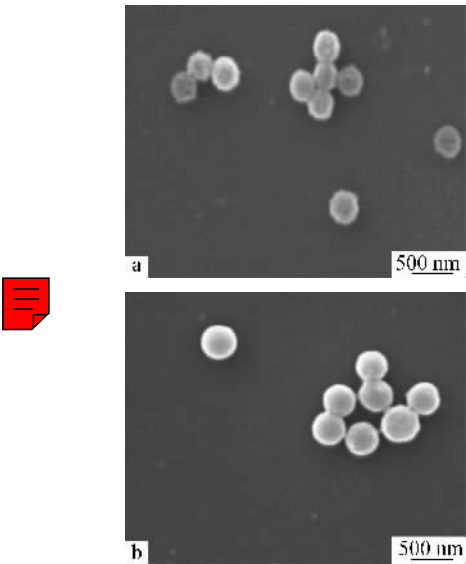


Fig. 1 TEM images of (a) magnetic microsphere initiator and (b) magnetic microspheres with P(GMMA-*r*-DMAEMA-*r*-GMA) brushes

环氧基含量最高,其固载蛋白质的量也最高.只含有氨基的 2 # 载体的蛋白质固载量最少.既含有环氧基团、又含有氨基的 3 # 载体的蛋白质固载量居中,但其单位环氧基的固载量高于 1 # 载体,说明此载体中氨基对固载有贡献.而从固定化酶的活性看,3 # 载体固定化酶的活性和活性收率(固定化单位质量总蛋白质的酶活与液相单位质

Table 2 Immobilization of penicillin G acylase on magnetic microspheres with copolymer brushes

Microbead	Immobilized protein (mg/g)	Activity of immobilized enzyme		Activity yield (%)
		(U/g) ^a	(U/mg) ^b	
1	55.1	671 ± 10	12.2	36.5
2	31.3	333 ± 13	10.1	30.2
3	51.3	767 ± 62	15.0	44.9

^a Unit of the enzyme activity per gram of the enzyme-immobilized beads ; ^b Unit of the enzyme activity per milligram of the immobilized protein

量总蛋白质的酶活的比)都最高,而 2 # 载体的固定化酶的活性和活性收率最低.说明环氧基和氨基双功能基团的引入对于固定化青霉素 G 酰化酶是有益的.

交联聚丙烯酸-Fe₃O₄ 复合微球、微球引发剂、接枝聚合物刷的微球和固载青霉素 G 酰化酶的微球都带有磁性,很容易被普通磁铁捕集.图 2 为固载青霉素 G 酰化酶的 3 # 载体被磁铁捕集的照片.



图 2 Photograph indicating the attraction of penicillin G acylase-immobilized magnetic microspheres dispersed in water by a magnet

图 3 是 3 种聚合物刷磁性微球固载青霉素 G 酰化酶的动力学曲线,可以看出,只含环氧基而不含氨基的 1 # 载体的固载速率最小,而含氨基的两种载体 2 # 载体和 3 # 载体的固载速率相似.前者通过共价键固载,因此固载速率小,而后者通过离子作用先将酶固载在载体上,固载速率较高,然后酶与载体上邻近的环氧基作用形成共价键(3 # 载体).

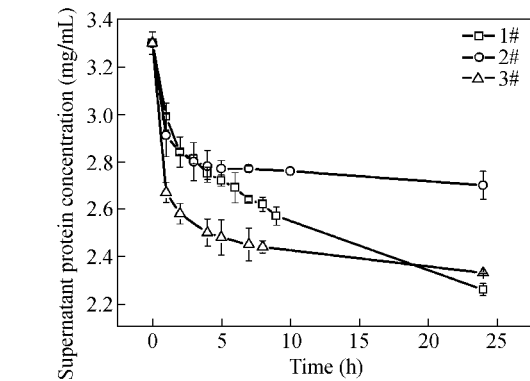


Fig. 3 Kinetics of penicillin G acylase immobilization on magnetic microspheres with copolymer brushes

上述结果表明,氨基的引入可以较大幅度地提高环氧载体对酶的共价固定化速率,同时对酶的催化活性有一定的提高,因此同时含有环氧基团和氨基的 3 # 载体是一种比较理想的固定材料.下面将研究温度、pH 对该磁性微球固定化酶活性的影响,以及其重复操作稳定性.

2.3 温度对酶活性的影响

在不同温度下的自由青霉素 G 酰化酶和其固载于 3 # 载体上的固载酶的活性如图 4(a) 所示,自由酶和固载酶的最大活性温度都在 45℃ 左右.随着温度从 45℃ 升至 55℃,固载酶活性有轻微的降低,而自由酶的活性则显著降低了将近 70%.随着温度升高至 65℃,自由酶几乎完全失活,而固载酶直到 75℃ 时仍能维持约 15% 的活性.这些结果表明,固载酶的热稳定性要比自由酶好得多,这将有 利于酶的存储和运输,以及在较高温度下进行酶催化反应.

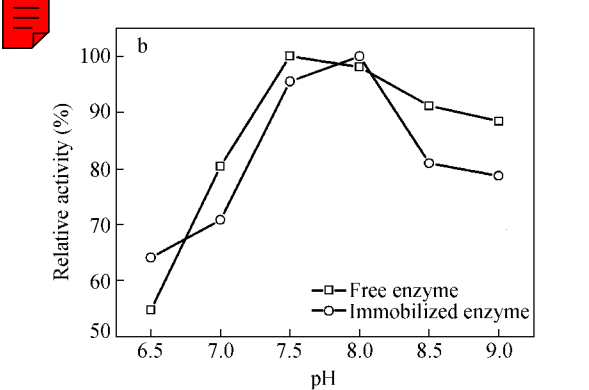
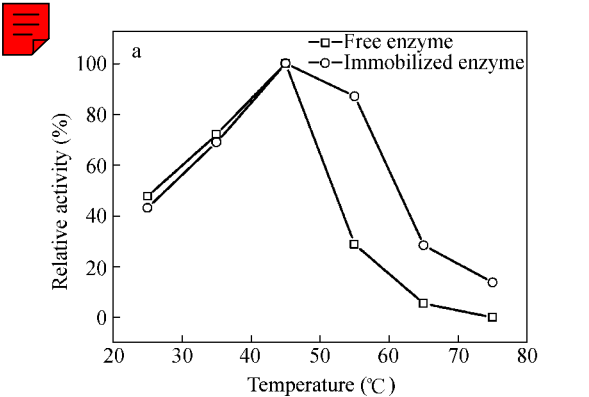


图 4 Effects of temperature (a) and pH (b) on the activity of penicillin G acylase

2.4 pH 值对固定化酶活性的影响

当缓冲溶液的 pH 从 6.5 变化至 9.0 时自由青霉素 G 酰化酶和其固载于 3 # 载体上的固载酶的活性变化如图 4(b) 所示,自由酶活性的最高点出现在 pH 7.5 左右,而固载酶活性的最高点则出现在 pH 8.0 左右. 前文^[10]的结果表明,固定化于 P(GMMA-*r*-GMA) 刷磁球上的青霉素 G 酰化酶的最优 pH 在 8.5 左右. 与之相比,氨基的引入导致最优 pH 值降低,这可能是因为氨基显碱性,因而使得催化微环境的碱性相对于无氨基聚合物刷要高,从而导致最优催化 pH 往酸性端偏移.

2.5 重复使用

通过重复催化水解 10% 的青霉素 G 钾盐的方法研究固载于 3 # 载体上的青霉素 G 酰化酶的重复使用稳定性. 催化用缓冲溶液为 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.8),温度为 37℃,每批次催化时间为 5 min,每次催化完成后,用 0.02 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)洗涤 8 次,每次 25 mL,完毕后加入新的底物开始下一轮催化. 固载酶活性与

催化次数关系图如图 5 所示. 从图中可以看出,在最初的 3 次循环中,固载酶的催化活性降低得较快,然后降低速率逐渐降低,经过 10 次催化后,仍然有 70% 左右的活性.

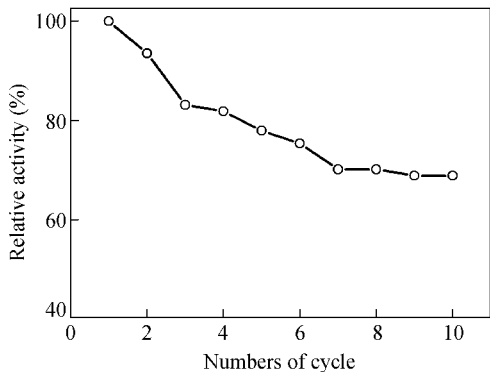


Fig. 5 Operational stability of immobilized penicillin G acylase

综上所述,通过在聚合物刷磁性微球的刷中引入环氧基和氨基,其固定化青霉素 G 酰化酶的速度快、酶活高、重复使用性能好,是一种理想的酶固定材料.

REFERENCES

1 Na m J M,Thaxton C S,Mirkin C A. Science,2003,301 1884 ~ 1886

2 Gehring A G,Irwin P L,Reed S A,Tua S I,Andreotti P E,Akhavan-Tafti H,Handley R S. J Immunol Methods,2004,293 97 ~ 106

3 Berry C C. J Mater Chem,2005,15 543 ~ 547

4 Jeong U,Teng X W,Wang Y,Yang H,Xia Y N. Adv Mater,2007,19 33 ~ 60

5 Pankhurst Q A,Connolly J,Jones S K,Dobson J. J Phys D :Appl Phys,2003,36 R167 ~ R181

6 Safarik I,Safarikova M. J Chromatogr B,1999,722 33 ~ 53

7 Patolsky F,Weizmann Y,Katz E,Willner I. Angew Chem Int Ed,2003,42 2372 ~ 2376

8 Tudorache M,Co M,Lifgren H,Emneus J. Anal Chem,2005,77 7156 ~ 7162

9 Huang J,Wan S,Guo M,Yan H. J Mater Chem,2006,16 4535 ~ 4541

10 Huang J,Han B,Yue W,Yan H. J Mater Chem,2007,17 3812 ~ 3818

11 Huang J,Li X,Zheng Y,Zhang Y,Zhao R,Gao,X,Yan H. Macromol Biosci,2008,8 508 ~ 515

12 Kamogawa H,Haramoto Y,Nakazawa T,Sugiura H,Nanasawa M. Bull Chem Soc Jpn,1981,54 1577 ~ 1578

13 Bradford M M. Anal Biochem,1976,72 248 ~ 254

PREPARATION OF MAGNETIC MICROSPHERES WITH POLYMER BRUSHES CONTAINING EPOXIDE AND AMINO GROUPS AND IMMOBILIZATION OF PENICILLIN G ACYLASE ON THEM

LI Xiutao, HUANG Junsheng, ZHANG Yong, GUO Miao, YAN Husheng

(Key Laboratory of Functional Polymer Materials, Ministry of Education; Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract Magnetic microspheres with polymer brushes containing epoxide and amino groups were prepared and used as the support for immobilization of penicillin G acylase. The introduction of the amino group would accelerate the adsorption of enzyme to the support by ionic interaction, and then the adsorbed enzyme was immobilized covalently by reacting with the epoxide group. Magnetic microspheres with atom transfer radical polymerization (ATRP) initiators were first prepared from crosslinked poly(acrylic acid) microspheres in which superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles were dispersed. Random copolymer P(GMMA-*r*-DMAEMA-*r*-GMA) (GMMA, glycerol monomethacrylate, DMAEMA, *N,N*-dimethylamino) ethyl methacrylate, GMA, glycidyl methacrylate) was grafted onto the magnetic microspheres by ATRP initiated from the magnetic microsphere initiators. For comparison, magnetic microspheres with P(GMMA-*r*-DMAEMA) or P(GMMA-*r*-GMA) brushes were also prepared. The GMMA units in the brushes made the brushes to be hydrophilic; DMAEMA units introduced amine groups and GMA units introduced epoxide groups. Immobilization of penicillin G acylase on these brush-grafted magnetic microspheres showed that both of the activity and activity yield of immobilized penicillin G acylase on P(GMMA-*r*-DMAEMA-*r*-GMA) brush-grafted magnetic microspheres were the highest, and the immobilization on them was faster than that on P(GMMA-*r*-GMA) brush-grafted magnetic microspheres. The immobilized enzyme possessed much higher thermal stability than the free enzyme. The optimal pH value for the immobilized enzyme was slightly higher. After ten cycles of repeated use, 70% of the activity still remained.

Keywords Enzyme immobilization, Magnetic microbeads, Polymer brushes, Penicillin G acylase