

温度响应型 HRP 纳米胶囊用于酶的高效固定和回收*

魏 炜^{1,2} 杜娟娟² 阎 明² 于俊荣¹ 陈 蕾¹ 胡祖明^{1**}

(¹东华大学材料科学与工程学院 上海 201620)

(²加州大学洛杉矶分校化工与生物分子工程系 洛杉矶 90095)

摘 要 以辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)为目标蛋白, *N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)为单体, 采用原位沉淀聚合, 在 37 °C, NIPAM 和 HRP 质量比为 6:1 的条件下, 制备了粒径大小为 13.7 nm, zeta 电位是 (-3.7 ± 0.3) mV 的温度响应型辣根过氧化物酶纳米胶囊(nHRP). 采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS)、透射电镜(TEM)、动态光散射仪(DLS)和紫外-可见分光光度计(UV-Vis)等对 HRP 的修饰度, nHRP 的微观结构、粒径大小、催化活性、温度响应性能和热稳定性进行了表征. 研究表明, 制备的辣根过氧化物酶纳米胶囊单分散性较好; 在环境温度高于 33 °C 时, nHRP 出现响应变化, 其粒径大小变化显著, 且呈可逆性; nHRP 相比 HRP 原酶热稳定性显著提高; 50 °C 时, 将 nHRP 高速离心, 可使酶多次有效地分离和回收.

关键词 温度响应, 纳米胶囊, *N*-异丙基丙烯酰胺, 酶固定, 酶回收

辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, 简称 HRP)是一种复合酶, 由主酶(酶蛋白)和辅基(亚铁血红素)结合形成的一种卟啉蛋白质. 作为较早商品化的酶制剂之一, HRP 在酶联免疫分析和生物传感器的构筑等临床化学检测和生物分析领域具有广泛且成熟的应用^[1-3], 在新型酶前体药物治疗^[4]等生物医药领域^[1,5]也展现出新的应用潜力. 然而, 未经固定的 HRP 原酶, 容易因外界条件的变化而失活, 且不易重复使用和分离. 因此将 HRP 固定, 制备可以满足具体的催化需求(如生产率、稳定性和选择性)和非催化需求(如分离和调节控制)的“高效固定化酶”^[6], 一直以来都是研究人员的努力方向. 其中基于传统的酶固定化的方法, 实现 HRP 固定化的手段主要包括吸附固定^[7]和包埋固定^[8,9]. 采用物理吸附的方法将 HRP 固定在载体上是最简单常见的固定酶的方法之一^[10,11], 但是其主要缺陷是在一些反应条件下, 固定的酶会从载体上脱离, 且吸附于载体表面的 HRP 暴露于外界环境中较易失活, 固定酶的量也十分依赖载体的表面积. 与此相比, 包埋固定技术通过引入共价键^[12-14]或者非共价键作用^[15,16]将 HRP 包埋在某种载体之中, 则较好地提高了酶的固载量. 但是共价键的引入却容易使得被包埋

酶的催化活性显著降低. 所以, 传统的酶固定化的方法都在一定程度上改善了酶的催化活性和稳定性, 但是常常只能满足某一特定需求, 很难同时满足两种以上的需求达到高效固定化酶的要求^[17].

为了实现 HRP 的高效固定化, 满足酶的催化活性和稳定性的提高, 并尝试在小尺度上开发新的固定化形态以拓宽其应用领域, 研究人员将纳米技术引入设计, 优化制备了多种新型的固定化 HRP^[18-20]. 其中值得一提的是, 一种新型的基于原位纳米胶囊化技术来制备蛋白纳米胶囊的方法, 把酶的固定化首次精准到单个酶蛋白分子^[20]. 该方法首先将可聚合基团修饰于酶分子的表面, 然后在室温条件下进一步聚合反应, 在酶分子表面形成一层聚合物. 该聚合物层将酶蛋白分子包裹在其中形成酶纳米胶囊. 通过对反应条件的调控可以获得仅包裹一个酶分子的单蛋白纳米胶囊. 该方法所制备的 HRP 纳米胶囊其聚合物外层在有效固定核心 HRP 的同时, 还可以保证酶的底物顺利扩散通过其中, 实现酶的高效催化. 这类新型的酶纳米胶囊制备方法的提出, 为开发高效催化剂、细胞内转运体系、医学影像、诊断与治疗等多领域内的 HRP 实用体系提供了良好的平台.

在实现高效稳定的酶固定化的同时, 基于环

* 2012-09-14 收稿, 2012-11-12 修稿.

** 通讯联系人, E-mail: hzm@dhu.edu.cn

境响应型聚合物而开发出的可逆可溶固定化酶还赋予了固定化酶附加的新功能. 其中, 基于温敏聚合物的固定化酶因其独特的温度响应性能, 以及将其用于生物医药等领域的巨大潜力而成为新型酶固定化方法研究领域中的重要分支^[21]. 而聚 *N*-异丙基丙烯酰胺 (PNIPAM) 作为最有代表性的温敏聚合物, 其低临界转变温度 (LCST, 约 32 ℃) 可以通过多种方案进行调节, 在药物释放和蛋白质分离等领域具有很好的应用潜力^[22,23]. 结合以上研究背景, 本研究选取温敏单体 NIPAM, 采用原位沉淀聚合法, 首次制备了单分散性良好的, 粒径大小为十几纳米的温度响应型 HRP 纳米胶囊 (nHRP). 通过动态光散射仪 (DLS) 和紫外-可见分光光度计 (UV-Vis) 考察了 nHRP 的粒径-温度响应性能和热稳定性能, 并对所制备的温度响应型酶蛋白纳米胶囊的酶固定化和分离回收的效果进行了评估.

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

辣根过氧化物酶 (HRP), (RZ 2.5 ~ 4.0, 250 ~ 330 U/mg); *N*-羟基琥珀酰亚胺丙烯酸酯 (NAS), 纯度 ≥ 90%; *N*-异丙基丙烯酰胺 (NIPAM), 纯度 ≥ 99%; *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺 (BIS), 纯度 ≥ 99.5%; 过硫酸铵 (APS), 纯度 ≥ 98%; *N,N,N',N'*-四甲基乙二胺 (TEMED), 纯度约为 99%; 二甲基亚砷 (DMSO), 纯度 ≥ 99.9%; 4-(二甲氨基)吡啶 (DMAP), 纯度 ≥ 99%; 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB), 纯度 ≥ 99%; 过氧化氢, 体积浓度 30%; 芥子酸 (SPA), 纯度 ≥ 99%; 以上实验试剂均购于 Sigma Aldrich (美国) 公司. 磷酸盐缓冲溶液 (10 mmol/L, pH = 7.4); 硼酸盐缓冲溶液 (10 mmol/L, pH = 8.4), 采用标准缓冲物质, 实验室自行配置.

7X7 CER 型控温搅拌台 (美国 VWR 公司); Voyager DE-STR 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF, 美国 Applied Biosystems 公司); DU®730c 紫外-可见分光光度计 (美国 Bechman Coulter 公司); Biological LP 型液相色谱 (美国 Bio-Rad 公司); Nano-ZS 型纳米粒度和 zeta 电位分析仪 (英国 Malvern 公司); EM-120 型透射电镜 (美国 Philips 公司); Sorvall Legend 14 型离心机 (美国 Thermo scientific 公司); MaxQ 6000 型堆叠式恒温冷冻摇床 (美国 Thermo scientific 公

司); BAS-5000 型酶标仪 (日本 Fujifilm 公司).

1.2 蛋白的预处理

首先, 在沉淀聚合之前对 HRP 进行预处理. 称取一定量的 HRP 在 4 ℃ 温度条件下, 用 10 mmol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液透析纯化. 每 2 h 更换一次透析液, 透析过夜后, 更换 20 mmol/L pH = 8.5 的 HEPES 缓冲液透析 2 h 后, 测定其在特征波长 403 nm 下的吸收, 并根据其摩尔消光系数计算出 HRP 的浓度. 其次, 采用 NAS 对 HRP 进行修饰. 将 NAS 溶于 DMSO 配制成 1% 的溶液, 按照 HRP 和 NAS 的摩尔比是 1:50 投料. 并且在反应体系中, 按照 DMAP 和 HRP 质量比 1:10 加入 DMAP 作为 HRP 的保护剂, 以防止酶活性中心卟啉环中间的二价铁离子在修饰过程中被氧化而导致酶活性的降低. 室温条件下, 反应 2 h 后, 采用 10 mmol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液, 在 4 ℃ 条件下透析后, 再次用紫外分光光度法测算出预处理后 HRP 的浓度, 样品备用.

1.3 HRP 纳米胶囊的制备

在控温搅拌台上搭建恒温水浴, 反应过程中温度控制在 37 ℃. 将 NAS 修饰后的 HRP 和 NIPAM 混合后, 向溶液中缓慢通入氮气 10 min 除氧, 然后按照表 1 中投料比, 依次加入保护剂 DMAP, 交联剂 BIS, 引发剂 APS 和 TEMED, 引发反应, 可以观测到反应体系由透明转而呈现为白色乳浊液状态. 37 ℃ 条件下, 原位沉淀反应 1 h 后, 用液相色谱结合 Sephadex G-75 分离纯化, 去除未包裹上的 HRP 和溶液中过量的单体和交联剂等小分子, 得到 HRP 纳米胶囊.

Table 1 Mass ratio of reagents for preparing nHRP					
Mass ratio (reagent to protein)					
HRP	DMAP	NIPAM	BIS	APS	TEMED
1	0.1	6	0.3	1	2

以浓度已知的 HRP 作为对照, 采用 BCA 法确定所制备的 HRP 纳米胶囊的浓度. 在含有 25 mmol/L BCA, 3.2 mmol/L 硫酸铜的酒石酸盐缓冲溶液 (pH = 11.25) 中加入稀释的 nHRP, 在 60 ℃ 条件下孵育 30 min 后冷却至室温, 在酶标仪上测定其在 562 nm 的吸光度值, 计算 nHRP 的浓度.

1.4 测试与表征

1.4.1 HRP 的丙烯酰化程度的测试

将 HRP 原酶和采用 NAS 修饰后的 HRP, 在基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪上表征.

具体测试参数设定为加速电压是 25000 V, 延迟时间为 600 ns, 激光强度是 1202, 激光束 2000/spectrum, 校准基质为芥子酸。

1.4.2 粒径大小和 zeta 电位测试

将 HRP 原酶和所制备的 nHRP 用磷酸盐缓冲液 (10 mmol/L, pH = 7.4) 稀释到 0.1 mg/mL, 各取 500 μ L 装入一次性样品池中, 放入 Nano-ZS 型纳米粒度和 zeta 电位分析仪中进行粒径大小和分布, 以及 zeta 电位的测试。测试条件具体设置为温度 25 $^{\circ}$ C, 选择测试样品为蛋白模式, 采用系统默认最优化测试方式获取数据点, 粒径大小和分布测试 6 次, zeta 电位测试 3 次, 取平均值。

1.4.3 HRP 纳米胶囊的形貌表征

室温条件下, 采用 1% pH = 7.0 的磷钨酸 (PTA) 将 nHRP 染色后, 在 EM120 型透射电镜上, 放大倍率为 1×10^5 倍条件下, 观测 HRP 纳米胶囊的形貌。

1.4.4 酶催化活性的测试

HRP 的活性和 nHRP 的表观活性测试采用的是文献报道的检测方法^[24]。将紫外-可见光分光光度计设置为酶活性分析模式, 在固定波长为 655 nm 条件下进行检测。首先, 在比色皿中加入 0.9 mL 醋酸盐缓冲液 (100 mmol/L, pH 5.5), 然后加入 0.05 mL 过氧化氢 (0.02 mol/L) 和 0.05 mL TMB (0.02 mol/L), 将比色皿轻轻倒置一次混匀, 在 655 nm 条件下测试, 获得 HRP 底物的背景值 $B(\Delta A_{655}, \text{min})$ 。然后, 取另一个比色皿, 依次加入 0.9 mL 醋酸盐缓冲液 (100 mmol/L, pH 5.5), 0.05 mL 过氧化氢 (0.02 mol/L) 和 10 μ L HRP 或者 nHRP (0.2 μ g/mL), 0.05 mL TMB (0.02 mol/L), 在 655 nm 条件下测试获得测试值 $T(\Delta A_{655}, \text{min})$, 将测试值 T 与其底物背景值 B 相减获得所需结果。

1.4.5 nHRP 温度响应性能的测试

取 300 μ L 浓度为 0.1 mg/mL 的 nHRP 样品, 装入一次性样品池中, 放入纳米粒度仪中进行测试。测试条件具体为温度范围 25 ~ 45 $^{\circ}$ C, 升温/降温间隔为 2 $^{\circ}$ C, 每次温度变化后稳定 30 min 再采集数据, 采用系统默认最优化测试方式获取数据点, 每个温度下采集 6 次测试结果。首先测试升温条件下, 粒径大小变化, 在测试温度达到最高值后, 稳定 2 h 再测试降温条件下粒径随温度的变化情况。对采集的数据进行分析后, 绘制一个温度循环下的粒径变化曲线。

1.4.6 酶热稳定性的测试

首先, 将恒温水浴槽温度设置为 60 $^{\circ}$ C, 稳定 30 min, 将准备加样的离心管标记后在水浴中预热 5 min。然后, 将 HRP 原酶和 nHRP 分别用 100 mmol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液配制成 0.1 mg/mL 的浓度, 每个样品分装 6 个离心管, 放置于水浴中孵育。分别在 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h 时间点取样, 按照上述 HRP 的活性测定方法来检测 HRP 的活性, 以及 nHRP 的表观活性。将所采集数据分析后, 绘制出其热稳定性曲线。

1.4.7 温度响应分离回收酶的测试

测试前, 将离心机放置于控温箱中, 将控温箱的温度设置为 50 $^{\circ}$ C, 稳定 3 h。然后, 取 900 μ L 的 nHRP (1 mg/mL) 分装于 3 个 0.5 mL 离心管中, 300 μ L/管。将离心管放入离心机中稳定 5 min 后, 开始离心分离。离心机的转速设定为 14000 r/min, 离心时间 30 min。离心结束后, nHRP 沉淀于离心管底部, 吸弃上层液体, 重新加入等体积的磷酸盐缓冲溶液, 放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 待样品重新溶解后, 取样采用 BCA 法测定 nHRP 浓度, 采用上述活性测定方法对每次分离回收的样品的催化活性进行测定。在以上条件下, 重复分离回收 3 次, 比较 nHRP 浓度和活性变化, 评价所制备的温度响应型 HRP 纳米胶囊用于酶分离回收的效果。

2 结果与讨论

2.1 酶的修饰度及其活性

采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF MS) 对 HRP 原酶 (native HRP) 和经 NAS 修饰后的 HRP (HRP-NAS) 进行表征, 如图 1 所示。修饰后的酶 (HRP-NAS) 的分子量为 43613, 与未经修饰的 HRP 的分子量 43350 相比, 增加了 263。经推算平均每个 HRP 约有 4.9 个氨基被活化, 见表 2。而 HRP 的赖氨酸残基数量为 5 个 (4 个在表面, 1 个在内部)^[25], 所以图 1 的结果显示了对于 HRP 最大程度的丙烯酰化修饰。

对未经修饰的 HRP 原酶、经 NAS 修饰后的 HRP 和原位沉淀聚合制备的 HRP 纳米胶囊的催化活性分别进行了测试。由表 2 和图 2 可见, HRP 在经 NAS 修饰后可以保持约 98% 的相对活性。即使在 37 $^{\circ}$ C 条件下, 原位沉淀聚合 1 h 后, 制备所得的 HRP 纳米胶囊仍然很好地保留了约 90% 的相对活性。这种酶的活性损失较小的效果主要得

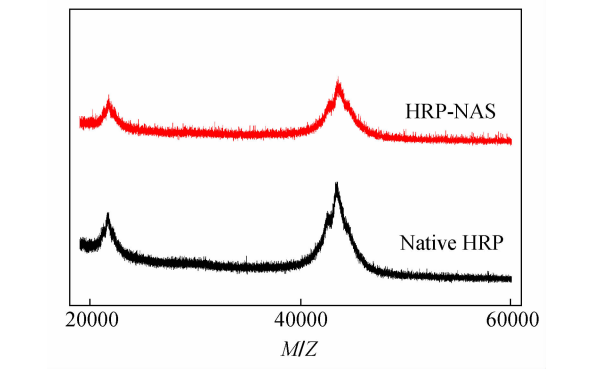


Fig. 1 MALDI-TOF mass spectra of HRP before and after modification with *N*-acryloxysuccinimide (NAS)

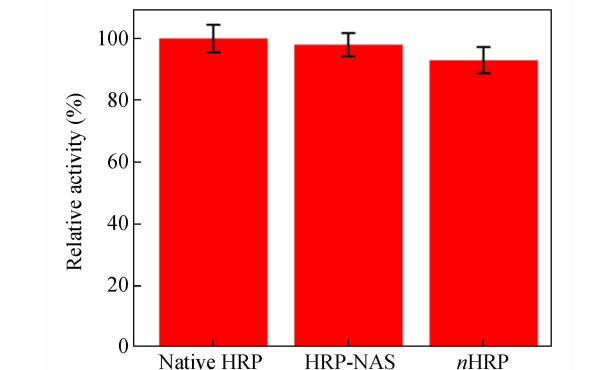


Fig. 2 Relative catalytic activity of the native HRP, HRP modified with NAS (HRP-NAS) and nHRP

益于反应体系中酶的保护剂 DMAP 的添加,有效的预防了 HRP 活性中心的卟啉环中间的二价铁

离子在丙烯酰化修饰和纳米胶囊的聚合反应过程中被氧化,从而较好的保存了其催化活性.

Table 2 Degree of modification of HRP with *N*-acryloxysuccinimide determined by MALDI-TOF MS

Name	Molecular weight (MALDI-TOF MS)	Mole ratio (reagent to protein)	Molecular weight increase	Number of vinyl groups	Relative activity (%)
Native HRP	43350	—	—	—	100
HRP modified with NAS	43613	50	263	4.9	98

2.2 HRP 纳米胶囊的形貌和结构

如图 3 所示,对比 HRP 原酶和 HRP 纳米胶囊,可以看出所制备的 nHRP 呈现单分散,其粒径大小从修饰前的 4.8 nm 增大到聚合后的 13.7 nm,zeta 电位由 -9.7 mV 提高到 -3.7 ± 0.3 mV. 这种粒径大小和表面 zeta 电位的变化主要是因为 HRP 外包裹了一层 PNIPAM. 进一步通过图 4 中 nHRP 的 TEM 照片可见所制备的 HRP 纳米胶囊呈现出球形的形貌特征. 基于相关报道,Yan 等^[20]曾采用自由基聚合制备了粒径在 15 nm 左

右的 HRP 纳米胶囊,并用粒径大小为 1.4 nm 的金量子点对单个 HRP 纳米胶囊进行标记后,TEM 照片显示平均每个纳米胶囊中只含有一个金量子点,一个 HRP 分子,证明了所制备的纳米胶囊为单核的蛋白纳米胶囊,简称单蛋白纳米胶囊. 而本研究采用原位沉淀聚合的方法制备的 HRP 纳米胶囊粒径为 13.7 nm,因此推测所制备的温度响应型的 HRP 纳米胶囊也应是仅包含一个 HRP 分子的单蛋白纳米胶囊.

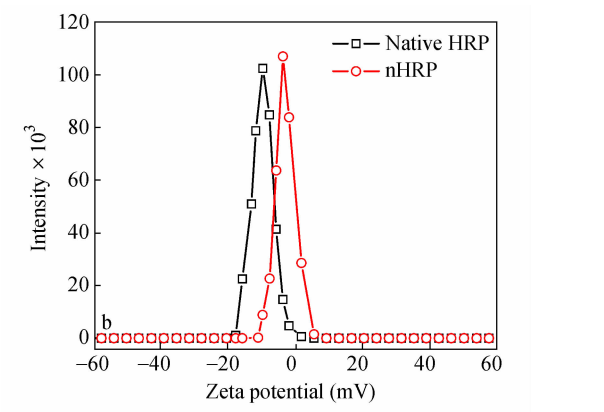
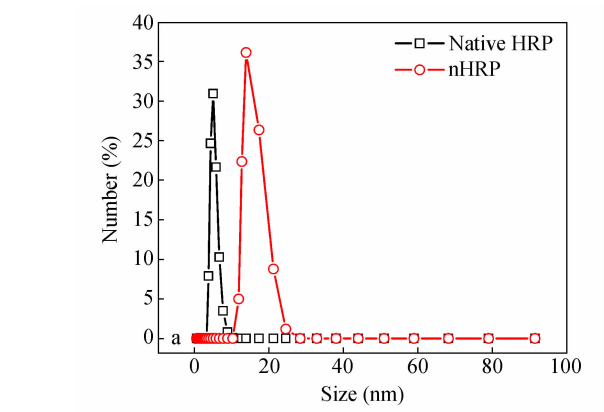


Fig. 3 Size and zeta potential distribution of HRP and nHRP determined with DLS

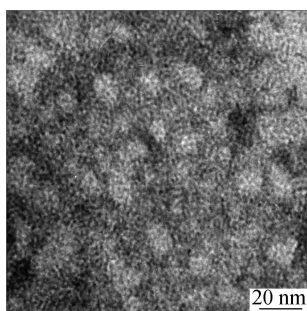


Fig. 4 TEM image of nHRP showing the formation of nanocapsules with spherical morphology

2.3 HRP 纳米胶囊的温度响应性能

为了对所制备的 HRP 纳米胶囊进行温度响应性能的评价,我们采用 DLS 对制备的 nHRP 样品进行温度-粒径变化追踪测试,考察了其在微观上的温度响应变化.如图 5 所示,在测试温度低于 33 °C 时,HRP 纳米胶囊的直径大小为 13.7 nm,当温度高于 33 °C 时,测得的数据显示会急剧升高至 250 nm 左右,而当进一步升温至 35 °C 时,会发现粒径大小稍有下降,且下降至 230 nm 左右时趋于稳定.出现这种温度高于某一特定值后,粒径观测值先迅速增大后减小,最后稳定在特定值的现象,主要是因为当温度高于 PNIPAM 的最低临界溶解温度 (LCST) 时,每一个 nHRP 外层的 PNIPAM 聚合物层都开始出现温度响应性变化,即由在水溶液中的无规则线团迅速向核心蛋白收缩成小球.与此同时,每个 HRP 纳米胶囊在疏水作用下彼此迅速靠近,团聚形成更大的聚集体.这就解释了当测试环境温度升高到 33 °C 时,DLS 测试结果显示的粒径剧增的现象.而当温度进一步升高,发现所显示的粒径大小下降了 20 nm 左右,然后保持在该值,不再有明显变化.出现这种现象可能是因为多个 nHRP 所形成的聚集体的外层 PNIPAM 在高温作用下进一步的收缩,当收缩达到稳定后便固定在一个数值不再改变.图 5 中显示,当进行高温到低温的降温测试时,nHRP 的粒径大小出现与升温过程中相反的反应变化,这说明了所制备的 HRP 纳米胶囊具有可逆的温度响应性.此外,通过 nHRP 在响应温度前后的照片对比(如图 6 所示),可以看到 nHRP 样品由响应前的透明澄清状态转变为响应后的乳白色浑浊状态,这种宏观上直接可见的明显变化,也证明了 nHRP 的温度响应性.

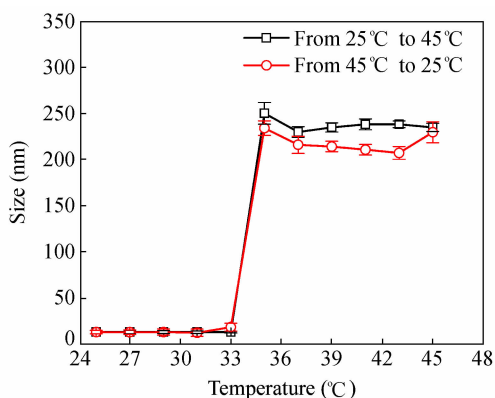


Fig. 5 Temperature responsive property study of nHRP by a temperature trending circle test

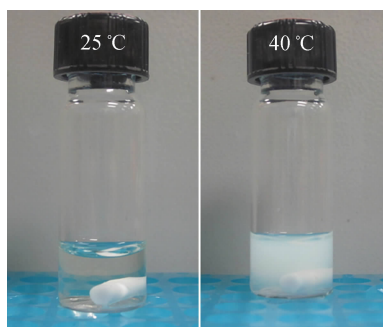


Fig. 6 Photos of nHRP sample at different temperatures, showing its thermal responsive property

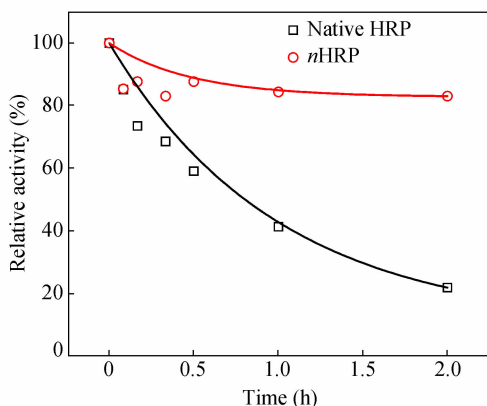


Fig. 7 Relative activities of native HRP and nHRP incubated at 60 °C, demonstrating nHRP with enhanced thermal stability

2.4 升温酶分离的效果

将制备的温度响应型 HRP 纳米胶囊进行酶的固定效果和分离回收效率的评估.将 HRP 纳米胶囊样品在 50 °C 条件下离心 30 min,利用其在高温条件下粒径增大的温度响应特性,对其进行分离和回收,实验结果如图 8 所示.在经过 3 次升温

高速离心分离处理后,依然可以回收大约 90% 的 nHRP 样品,并且回收到的 nHRP 仍可以保留大约 80% 的相对活性. 结合图 7 中 nHRP 在 60 ℃ 条件下,孵育 2 h 后保留了 85% 左右的相对活性,这里 nHRP 在 50 ℃ 条件下,3 次高速离心后,依然

较好地保存了其绝大部分的活性. 由此可见,HRP 在经过纳米胶囊固定化处理后,其稳定性获得显著的提高,即使在多次高速离心的条件下,也依然可以很好地保持其催化活性,且能够有效地被回收和再利用.

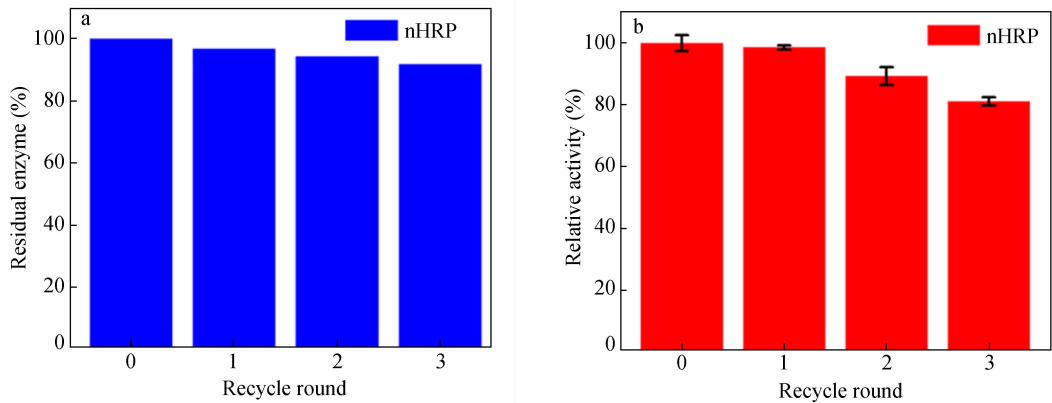


Fig. 8 Residual enzyme amount (a) and relative activity (b) of nHRP during three heat-up separation and recycling rounds

3 结论

采用原位沉淀聚合法制备了具有温度响应性的辣根过氧化物酶纳米胶囊. 研究表明,成功制备了粒径大小为 13.7 nm 单分散的 HRP 纳米胶囊;其在环境温度高于 33 ℃ 时,可以发生温度响应,表现出显著的温度响应粒径剧增的现象,DLS

结果显示其粒径大小从 13.7 nm 剧增到 250 nm 左右;这种 HRP 纳米胶囊与 HRP 原酶相比,其热稳定性明显提高;利用 HRP 纳米胶囊的温度响应特性,可以多次有效地分离和回收酶. 这种基于温度响应型蛋白纳米胶囊平台来实现酶的精细化固定、高效分离和回收的新技术,将进一步拓宽 HRP 在催化和生物医用领域的应用.

REFERENCES

- 1 Azevedo A M, Martins V C, Prazeres D M F, Vojinovic V, Cabral J M S, Fonseca L P. *Biotech Annu Rev*, 2003, 9: 199 ~ 247
- 2 Veitch N C. *Phytochemistry*, 2004, 65 (3) : 249 ~ 259
- 3 Lin T Y, Wu C H, Brennan J D. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22: 1861 ~ 1867
- 4 Tupper J, Tozer G M, Dachs G U. *Brit J Cancer*, 2004, 90 (9) : 1858 ~ 1862
- 5 Greco O, Rossiter S, Kanthou C, Folkes L K, Wardman P, Tozer G M, Dachs G U. *Mol Cancer Ther*, 2001, 1: 151 ~ 160
- 6 Linqiu Cao (曹林秋). *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design* (载体固定化酶—原理、应用和设计). Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2008. 1 ~ 20
- 7 Qiu H J, Lu L, Huang X R, Zhang Z H, Qu Y B. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 9415 ~ 9420
- 8 Wang Shanlin (王杉霖), Zhang Jianbo (张剑波), Wang Weijing (王维敬), Yang Yuxiang (杨宇翔). *Acta Sci Natur Univ Pekinensis* (北京大学学报(自然科学版)), 2006, 42 (6) : 762 ~ 766
- 9 Wu Binjie (吴斌杰), Sun Jianzhong (孙建中), Cai Zhiqi (蔡智奇), Zhou Qiyun (周其云). *J Fun Polym* (功能高分子学报) 2004, 17 (3) : 385 ~ 390
- 10 Zhang F, Zheng B, Zhang J L, Huang X L, Liu H, Guo S W, Zhang J Y. *J Phys Chem C*, 2010, 114 (18) : 8469 ~ 8473
- 11 Ma Guoxian (马国仙), Zhong Qingdong (钟庆东), Lu Xiong gang (鲁雄刚), Lu Tianhong (陆天虹). *Acta Phys-Chim Sin* (物理化学学报), 2009, 10: 2061 ~ 2067
- 12 Ali M, Tahir M N, Siwy Z, Neumann R, Tremel W, Ensinger W. *Anal Chem*, 2011, 83 (5) : 1673 ~ 1680
- 13 Lane S M, Kuang Z F, Yom J, Arifuzzaman S, Genzer J, Farmer B, Naik R, Vaia R A. *Biomacromolecules*, 2011, 12 (5) , 1822 ~ 1830
- 14 Calvente J J, Narvaez A, Dominguez E, Andreu R. *J Phys Chem B*, 2003, 107 (27) : 6629 ~ 6643
- 15 Ikemoto H, Chi Q J, Ulstrup J. *J Phys Chem C*, 2010, 114 (39) : 16174 ~ 16180

- 16 Liu S Q, Chen A C. *Langmuir*, 2005, 21 (18): 8409 ~ 8413
- 17 Zuo Peng (左鹏), Yu Shaoming (于少明), Yang Jieru (杨杰茹), Zhang Jingsong (章璟嵩), Zhang Chi (张迟). *Mater Rev (材料导报)*, 2007, 21 (11): 46 ~ 49
- 18 Kim J A, Lim J S, Kim H S. *Adv Mater Res*, 2012, 356-360: 1085 ~ 1088
- 19 Ansari S A, Husain Q. *Biotechnol Adv*, 2012, 30 (3): 512 ~ 523
- 20 Yan M, Du J J, Gu Z, Liang M, Hu Y F, Zhang W J, Priceman S, Wu L, Zhou Z H, Liu Z, Segura T, Tang Y, Lu Y F. *Nature Nanotech*, 2010, 5: 48 ~ 53
- 21 Nakayama M, Okano T. *React Funct Polym*, 2011, 71: 235 ~ 244
- 22 Schmaljohann D. *Adv Drug Deliver Rev*, 2006, 58 (15): 1655 ~ 1670
- 23 Shamim N, Hong L, Hidajat K, Uddin M S. *J Colloid Interf Sci*, 2006, 304 (1): 1 ~ 8
- 24 Davis J C, Averill B A. *J Biol Chem*, 1981, 256 (12): 5992 ~ 5996
- 25 Berglund G I, Carlsson G H, Hajdu J, Smith A T, Szoke H, Henriksen A. *Nature*, 2002, 417: 463 ~ 468

THERMOSENSITIVE NANOCAPSULES FOR EFFECTIVE IMMOBILIZATION AND RECYCLING OF HORSERADISH PEROXIDASE

Wei Wei^{1,2}, Juan-juan Du², Ming Yan², Jun-rong Yu¹, Lei Chen¹, Zu-ming Hu¹

(¹ College of Material Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620)

(² Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA)

Abstract Thermoresponsive horseradish peroxidase nanocapsules (nHRP) were prepared *via in situ* precipitation polymerization using *N*-isopropyl acrylamide (NIPAM) as the monomer. As an example, nHRP was prepared by a NIPAM/HRP mass ratio of 6, under the reaction temperature of 37 °C, it showed a monodispersed size distribution centered at 13.7 nm and a negative zeta potential centered at (−3.7 ± 0.3) mV. The modification degrees of HRP were characterized by MALDI-TOF mass spectrometer (MALDI-TOF MS), while the enzymatic activity of the free native HRP, modified HRP and encapsulated nHRP were determined by conducting a standard enzyme activity assay and followed by monitoring absorbance change through UV-Vis spectrometer. The particle size and morphology of nHRP were characterized using dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). The results showed a monodispersed nHRP was prepared successfully. Compared with the native HRP, nHRP exhibits significantly improved thermal stability, according to the HRP activity assay. Thermoresponsive behavior of nHRP was examined from 25 °C to 45 °C by DLS studies, where nHRP showed a responsive temperature at 33 °C and a reversible response property. Accordingly, high-speed centrifugation was applied to separate and recycle nHRP at 50 °C with a well-retained activity. This work provides a new delicate way to immobilize enzyme based on thermoresponsive enzyme nanocapsules, which is of great interest for effective enzyme separation and recycling and other applications.

Keywords Thermoresponsive, Nanocapsule, *N*-isopropylacrylamide, Enzyme immobilization, Enzyme recycling