



酶催化诱导纳米通道内聚合物生长及酶动力学研究

戴煌¹, 黎玉晴¹, 傅迎春^{1,*}, 李延斌^{1,2,*}

¹生物系统工程与食品科学学院, 浙江大学, 杭州 310058

²Department of Biological and Agricultural Engineering, University of Arkansas, AR 72701, USA



摘要

纳米通道拥有内部空间可调的优势成为一种具有应用前景的平台。然而, 如何利用高效和快速地调节纳米通道空间仍然是一个挑战。我们将酶催化诱导聚合引入纳米通道内, 开发了一种新方法调节纳米通道的有效直径。采用辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)作为模型酶, 在纳米通道内固定HRP。在底物过氧化氢(H₂O₂)存在时, HRP催化邻苯二胺(*o*-phenylenediamine, *o*-PD)生成聚合物沉淀, 阻止离子传输, 导致离子电流降低。该系统阻挡离子电流的比率可达到初始的99.6%。结合“Michaelis-Menten”模型, 开发出一个新方法评估纳米限域空间中酶催化动力学。通过比较溶液中游离状态, 吸附在平面表面状态和固定在纳米空间内状态, 发现HRP对于底物H₂O₂在纳米通道表现出相似米氏常数(K_m)值, 但对于底物*o*-PD表现出更高的K_m值。推测原因是受到位阻和扩散抑制导致。酶催化诱导聚合纳米通道为纳米阻塞/转换提供新概念, 并为单分子分析和检测提供一个新的平台。

背景

- 离子运输活动是纳米通道的特点, 对通道直径和内壁表面属性(带电, 亲水/疏水性, 等等)高度敏感。通过收集通道离子电流可以容易探测这些变化。纳米通道中的反应可以改变通道直径和内壁性质, 利用这些改变, 很多刺激-响应装置被精心设计用于传感, 门控和分子筛。
- 酶转化具有很高的催化活性、选择性和绿色环保优势, 广泛应用于合成、传感、能源、生产领域。酶在纳米限制条件下的性能受到越来越多的关注。酶诱导催化聚合/沉积的动力学在纳米限域空间内很少研究。

创新点

- 本文将酶分子修饰到AAO孔内壁, 探索酶诱导催化聚合/沉积在纳米限域空间中的催化性能和特征。
- 通过检测通道离子电流对酶催化反应进行原位、直接检测, 相比目前荧光和电化学中不可避免的扩散和低效率, 本方法可以实时、高效收集游离产物信号。
- 本方法为生物大分子检测及纳米孔电化学检测提供了新的检测平台。

电化学检测方法平台构建

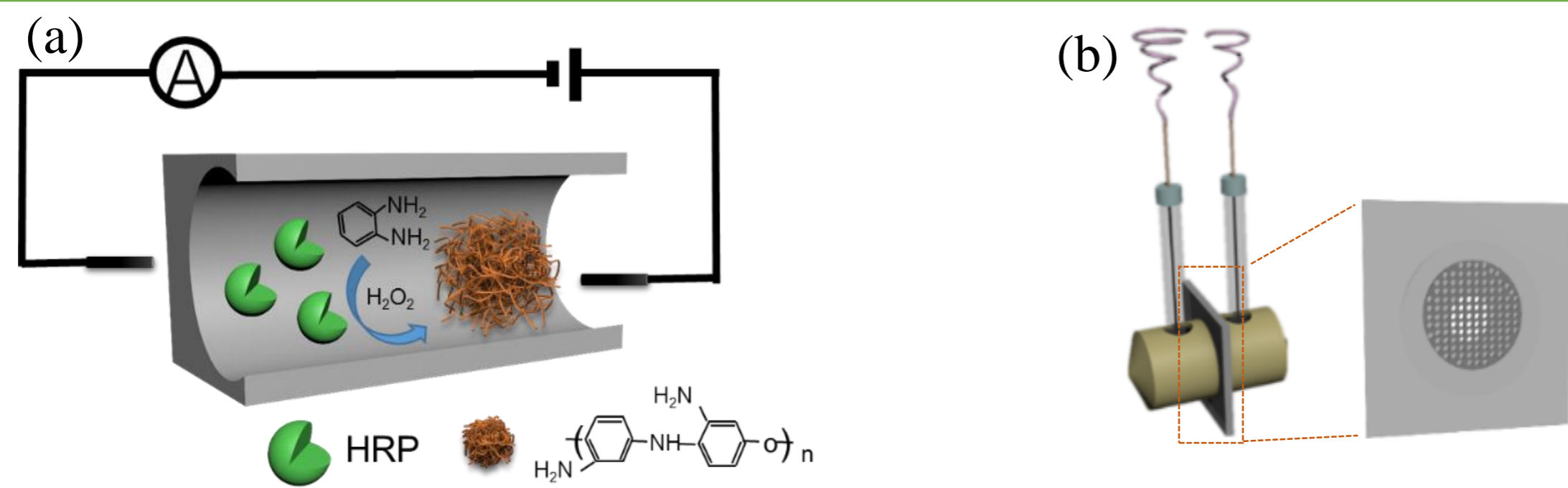


图1. 试验原理 (a)在纳米通道中酶催化诱导聚合物的生长过程; (b)检测池。

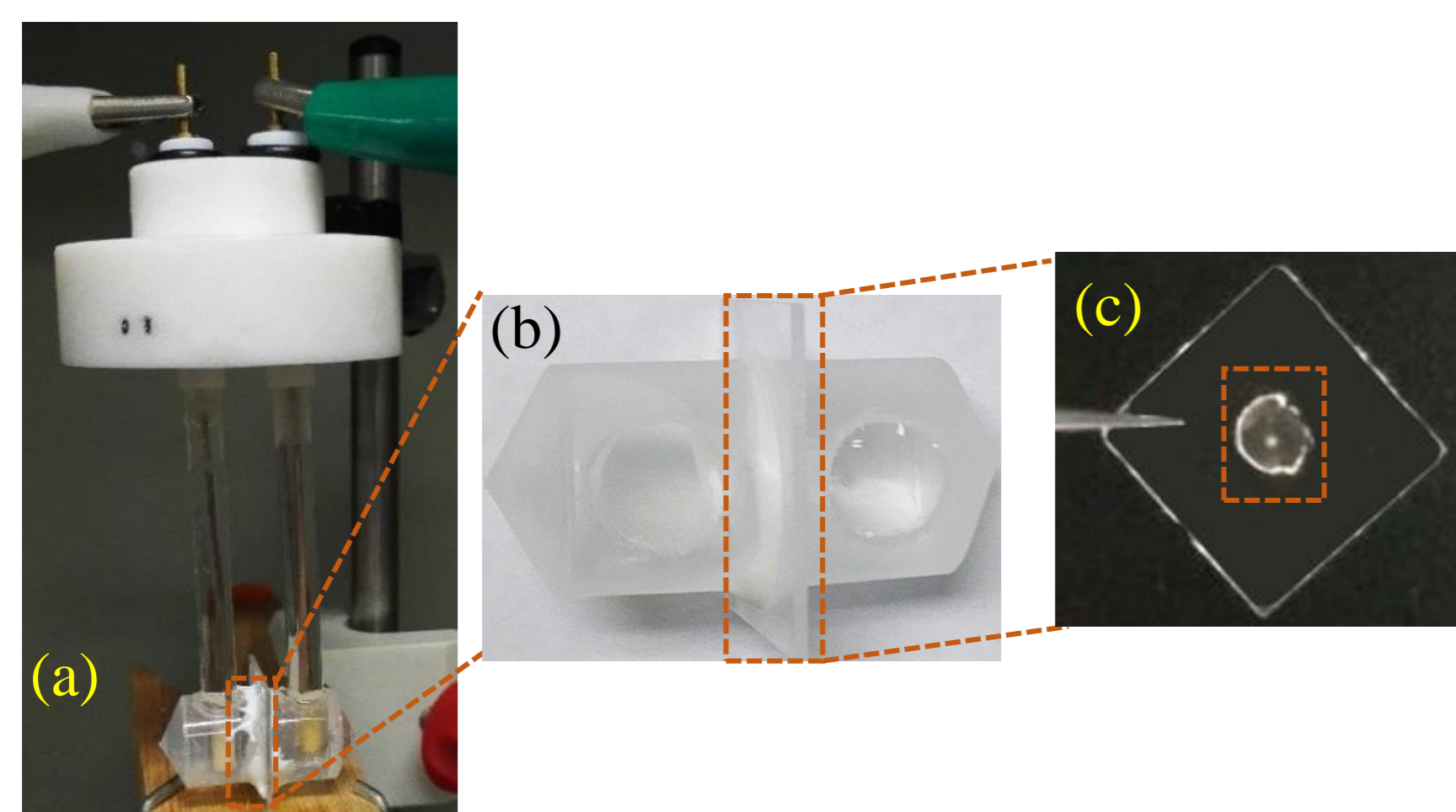


图2. (a)电化学检测平台; (b)自制的反应池; (c)载有HRP修饰的AAO石英片。

结果与讨论

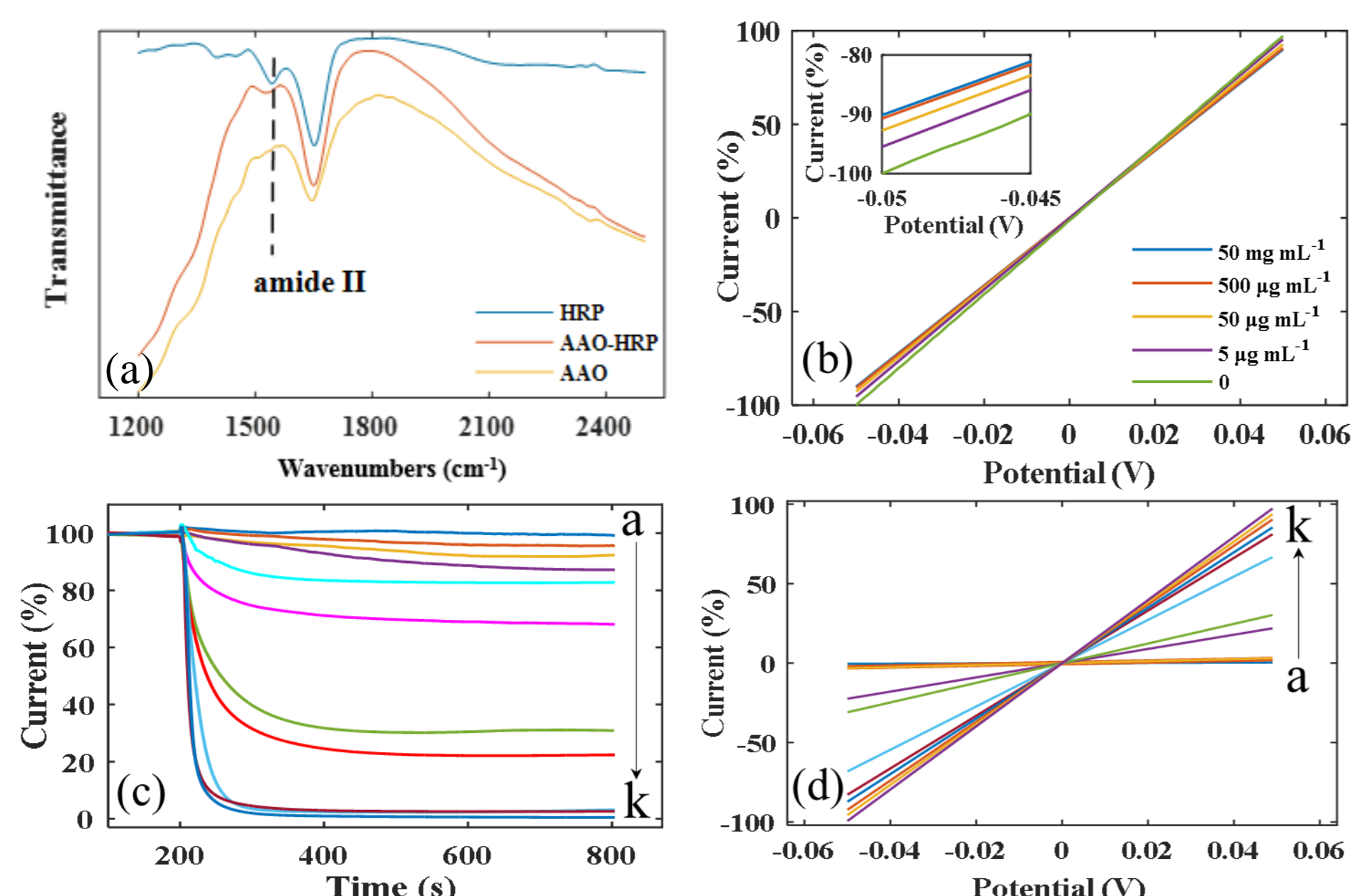


图3. (a)HRP以及AAO膜在固定HRP前和后的FT-IR光谱图。(b)固定HRP之前和之后AAO膜的LSV曲线。不同浓度HRP修饰AAO膜加入50 mM *o*-PD和20 mM H₂O₂的恒电位(a)和LSV曲线(b)。HRP浓度从上到下: 0, 0.002, 0.005, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 2, 5, 25 and 50 mg mL⁻¹(从a到k)。

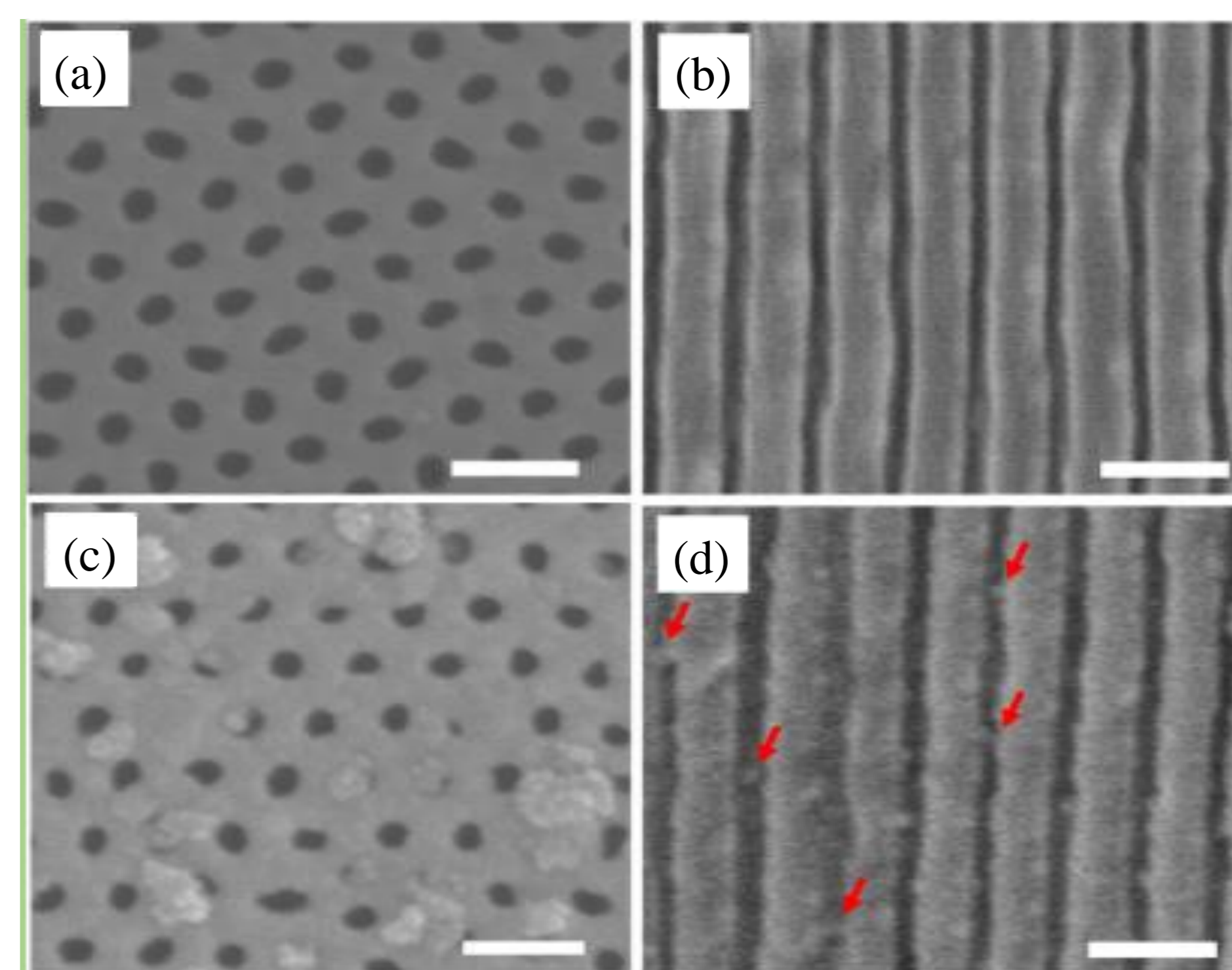


图5. 扫描电镜图, 从正面(a和c)截面(b和d)角度的AAO膜, 经过催化反应前(a和b)和反应后(c和d)。标尺: 100 nm。

表1. 修饰后的纳米通道内的HRP分子数量

HRP 浓度	纳米通道内固定的 HRP数量	10分钟反应后 电流下降(%)	电流减少80% 需要的时间(s)
50 mg mL ⁻¹	30000	99.6 ± 0.2	22
25 mg mL ⁻¹	15000	97.4 ± 0.8	20
5 mg mL ⁻¹	3000	96.8 ± 1.2	37
2 mg mL ⁻¹	1200	77.6 ± 1.7	66
500 μg mL ⁻¹	300	69.1 ± 4.5	65
200 μg mL ⁻¹	120	31.9 ± 3.4	94
100 μg mL ⁻¹	60	17.2 ± 6.9	96
50 μg mL ⁻¹	30	12.8 ± 1.0	325
5 μg mL ⁻¹	3	7.7 ± 0.5	300
2 μg mL ⁻¹	1	4.3 ± 2.3	342
0	0	0.7 ± 1.2	577

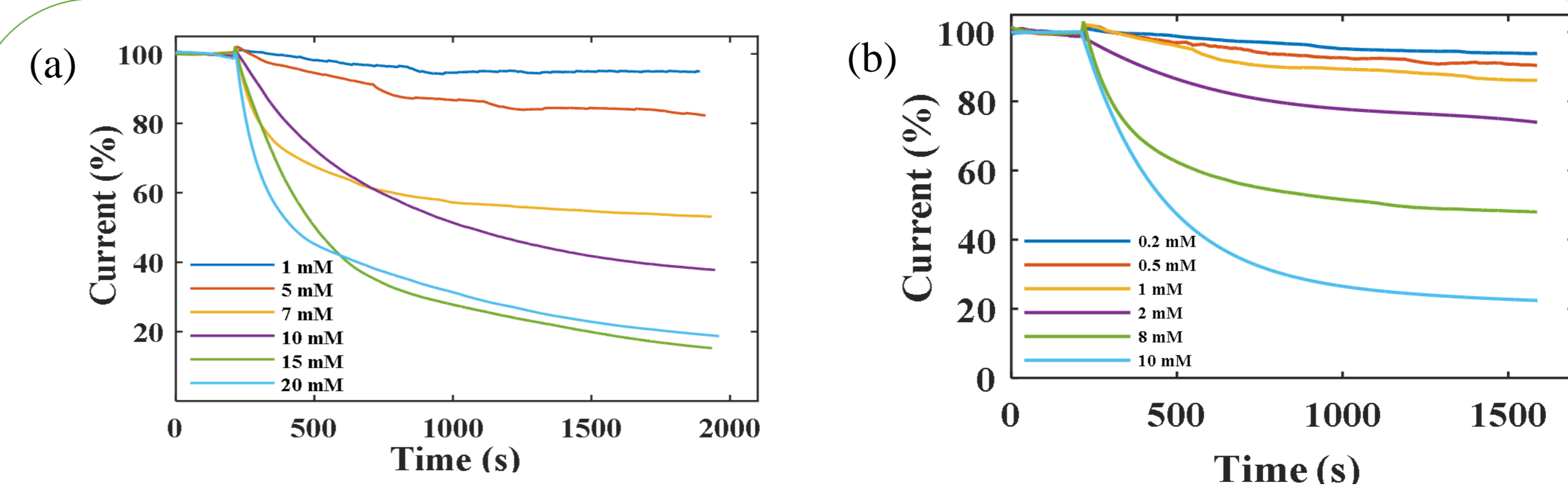


图6. 500 μg mL⁻¹ HRP修饰AAO膜的离子电流, (a)在6 mM H₂O₂中加入不同浓度的*o*-PD以及(b)在20 mM *o*-PD中加入不同浓度H₂O₂。

表2. *o*-PD或H₂O₂浓度变化时不同状态HRP的表现催化常数

HRP status	K _M (mM) for H ₂ O ₂	K _M (mM) for <i>o</i> -PD
free	1.75	2.19
plate surface-confined	4.11	39.30
nanochannel-confined	3.65	63.80

结论及展望

- 在纳米通道中引入酶催化诱导聚合物生长实现了离子传输的高效调控, 阻塞比可达最初的99.6%。甚至几个HRP分子也能引起可分辨的信号变化。
- 与自由状态和吸附在平面表面的HRP分子相比, 在纳米限域空间内的HRP对H₂O₂呈现类似的K_m值, 但对*o*-PD的K_m值要高。
- 这项研究为纳米通道调控提供新理念, 并为超敏分析和检测提供一种新方法。

致谢

“十二五”国家科技支撑计划(2013BAD19B02); 沃尔玛百货公司国际合作研究项目“优质优禽计划”(0402-70013-21-0000)

参考文献

1 Wei Guo, Fan Hong, Nannan Liu, et al. Advanced Materials. 2015, 27, 2090-2095.

通讯作者: 傅迎春 ycfu@zju.edu.cn
李延斌 yanbinli@zju.edu.cn