



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109234263 A

(43)申请公布日 2019.01.18

(21)申请号 201811127745.9

(22)申请日 2018.09.27

(71)申请人 福建海峡石墨烯产业技术研究院有限公司

地址 362000 福建省泉州市晋江市罗山街道世纪大道南段3001号创新创业产业园

(72)发明人 钟勇 林本慧 曹桂兰

(51)Int.Cl.

C12N 11/14(2006.01)

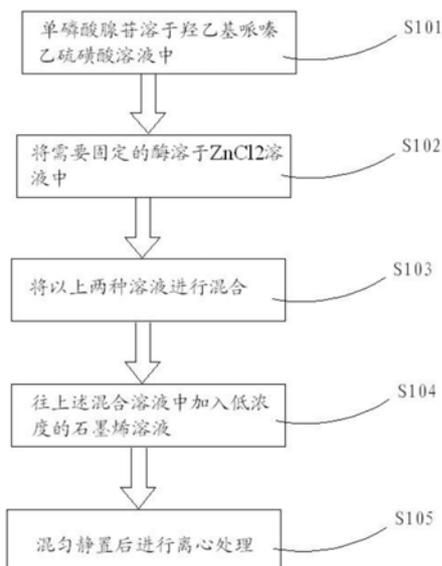
权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54)发明名称

一种基于单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法,其包括以下步骤:(1)将单磷酸腺苷溶于羟乙基哌嗪乙硫磺酸溶液中;(2)将需要固定的酶溶于ZnCl₂溶液中;(3)将步骤(1)和(2)两种溶液进行混合;(4)往步骤(3)的混合溶液中加入低浓度的石墨烯溶液,石墨烯与单磷酸腺苷通过交联作用力形成稳定的凝胶结构;(5)混匀静置后进行离心处理,最后得到固定在凝胶结构上的酶。本发明通过单磷酸腺苷与石墨烯形成的凝胶结构其能够高效的将酶固定住,本发明在固定葡萄糖氧化酶,假丝酵母脂肪酶,辣根过氧化物酶以及α-淀粉酶的过程中,能够高效的将酶固定住,同时保持酶的生物活性,提高其灵敏度。



1. 一种基于单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将单磷酸腺苷溶于羟乙基哌嗪乙硫磺酸溶液中;

(2) 将需要固定的酶溶于 $ZnCl_2$ 溶液中;

(3) 将步骤(1)和(2)两种溶液进行混合;

(4) 往步骤(3)的混合溶液中加入低浓度的石墨烯溶液,石墨烯与单磷酸腺苷通过交联作用力形成稳定的凝胶结构;

(5) 混匀静置后进行离心处理,最后得到固定在凝胶结构上的酶。

2. 根据权利要求1所述的单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法,其特征在于:所述酶为葡萄糖氧化酶、假丝酵母脂肪酶、辣根过氧化物酶或者 α -淀粉酶。

3. 根据权利要求1所述的单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法,其特征在于:所述将单磷酸腺苷溶于羟乙基哌嗪乙硫磺酸溶液中具体为将浓度为10-35mM的单磷酸腺苷溶于浓度为10-30mM,PH值为7-7.5的羟乙基哌嗪乙硫磺酸溶液中。

4. 根据权利要求1所述的单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法,其特征在于:将需要固定的酶溶于 $ZnCl_2$ 溶液中具体为将浓度为0.01-0.2mM的酶溶于浓度10-75mM的 $ZnCl_2$ 溶液中。

5. 根据权利要求1所述的单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法,其特征在于:所述低浓度的石墨烯溶液其浓度为0.01-0.1mg/mL。

6. 根据权利要求1所述的单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法,其特征在于:所述混匀静置后进行离心处理具体为混匀后静置1-2小时,再以6000-8000rpm的转速离心处理10-20min。

7. 根据权利要求1所述的单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法,其特征在于:所述单磷酸腺苷为磷酸及核苷腺苷形成的酯,其由磷酸盐官能团、戊糖核酸糖及碱基腺嘌呤所组成。

8. 根据权利要求1所述的单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法,其特征在于:所述石墨烯为氧化石墨烯,其可以通过将可膨胀石墨放置在坩埚内进行微波处理后加入到分散剂中进行超声处理得到浆料,然后对浆料进行离心处理,浆料分为上下两层,去掉上层清液,制备得到氧化石墨烯。

9. 根据权利要求1所述的单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法,其特征在于:所述由单磷酸腺苷由腺嘌呤核苷三磷酸经过两次水解制得。

一种基于单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及催化材料合成领域,尤其涉及一种基于单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法。

背景技术

[0002] 酶的固定化技术研究始于1910年,正式研究于20世纪60年代,70年代已在全世界普遍开展。酶的固定化(Immobilization of enzymes)是用固体材料将酶束缚或限制于一定区域内,仍能进行其特有的催化反应、并可回收及重复利用的一类技术。与游离酶相比,固定化酶在保持其高效专一及温和的酶催化反应特性的同时,又克服了游离酶的不足之处,呈现贮存稳定性高、分离回收容易、可多次重复使用、操作连续可控、工艺简便等一系列优点。固定酶不仅在化学、生物学及生物工程、医学及生命科学等学科领域的研究异常活跃,得到迅速发展和广泛的应用,而且因为具有节省能源、减少或防治污染的生态环境效应而符合可持续发展的战略要求。经固定化的酶与游离酶相比具有稳定性高,回收方便。易于控制、可反复使用、成本低廉等优点。在生物工业、医学及临床诊断、化学分析、环境保护、能源开发以及基础研究等方面发挥了重要作用。

[0003] 酶的固定方法有物理法和化学法两大类。物理方法包括物理吸附法、包埋法等。物理法固定酶的优点在于酶不参加化学反应,整体结构保持不变,酶的催化活性得到很好保留。但是,由于包埋物或半透膜具有一定的空间或立体阻碍作用,因此对一些反应不适用。化学法是将酶通过化学键连接到天然的或合成的高分子载体上,使用偶联剂通过酶表面的基团将酶交联起来,而形成相对分子里更大、不溶性的固定化酶的方法。

[0004] 但是现有固定酶的制备工艺复杂繁琐,且制备成本较高,不利于固定酶的大规模生产及商业化,且现有吸附固定酶的介质材料的稳定性较低,不利于提高酶的活性。

发明内容

[0005] 为解决现有技术中的缺陷,本发明提供一种基于单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法,其能够高效的将酶固定住,同时保持酶的生物活性,提高酶的活性和灵敏度。

[0006] 具体其包括以下步骤:

[0007] (1) 将单磷酸腺苷溶于羟乙基哌嗪乙硫磺酸溶液中;

[0008] (2) 将需要固定的酶溶于ZnCl₂溶液中;

[0009] (3) 将步骤(1)和(2)两种溶液进行混合;

[0010] (4) 往步骤(3)的混合溶液中加入低浓度的石墨烯溶液,石墨烯与单磷酸腺苷通过交联作用力形成稳定的凝胶结构;

[0011] (5) 混匀静置后进行离心处理,最后得到固定在凝胶结构上的酶。

[0012] 优选的,所述酶为葡萄糖氧化酶、假丝酵母脂肪酶、辣根过氧化物酶或者 α -淀粉酶。

[0013] 优选的,所述将单磷酸腺苷溶于羟乙基哌嗪乙硫磺酸溶液中具体为将浓度为10-35mM的单磷酸腺苷溶于浓度为10-30mM,PH值为7-7.5的羟乙基哌嗪乙硫磺酸溶液中。

[0014] 优选的,将需要固定的酶溶于ZnCl₂溶液中具体为将浓度为0.01-0.2mM的酶溶于浓度10-75mM的ZnCl₂溶液中。

[0015] 优选的,所述低浓度的石墨烯溶液其浓度为0.01-0.1mg/mL。

[0016] 优选的,所述混匀静置后进行离心处理具体为混匀后静置1-2小时,再以6000-8000rpm的转速离心处理10-20min。

[0017] 优选的,所述单磷酸腺苷为磷酸及核苷腺苷形成的酯,其由磷酸盐官能团、戊糖核糖及碱基腺嘌呤所组成。

[0018] 优选的,所述石墨烯为氧化石墨烯,其可以通过将可膨胀石墨放置在坩埚内进行微波处理后加入到分散剂中进行超声处理得到浆料,然后对浆料进行离心处理,浆料分为上下两层,去掉上层清液,制备得到氧化石墨烯。

[0019] 优选的,所述由单磷酸腺苷由腺嘌呤核苷三磷酸经过两次水解制得。

[0020] 本发明采用以上技术方案,通过单磷酸腺苷与石墨烯形成的凝胶结构其能够高效的将酶固定住,单磷酸腺苷是一种生物小分子,在固定酶的过程中不会影响酶的活性,石墨烯也是一种生物相容性极佳的无机材料,因此本发明在固定葡萄糖氧化酶,假丝酵母脂肪酶,辣根过氧化物酶以及 α -淀粉酶的过程中,能够高效的将酶固定住,同时保持酶的生物活性,提高其灵敏度。

附图说明

[0021] 下面结合附图对本发明进行进一步说明:

[0022] 图1为本发明的方法流程示意图;

[0023] 图2为本发明单磷酸腺苷的化学结构示意图;

[0024] 图3为本发明单磷酸腺苷与石墨烯之间交联形成的凝胶三维结构微观示意图。

具体实施方式

[0025] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0026] 如图1所示,本发明公开了一种基于单磷酸腺苷与石墨烯的交联作用固定酶的方法,其包括以下步骤:

[0027] S101:将单磷酸腺苷溶于羟乙基哌嗪乙硫磺酸溶液中;

[0028] S102:将需要固定的酶溶于ZnCl₂溶液中;

[0029] S103:将以上两种溶液进行混合;

[0030] S104:往上述混合溶液中加入低浓度的石墨烯溶液,石墨烯与单磷酸腺苷通过交联作用力形成稳定的凝胶结构;

[0031] S105:混匀静置后进行离心处理,最后得到固定在凝胶结构上的酶。

[0032] 具体的可以通过以下实施例实现:

[0033] 实施例1

[0034] 将10mM的单磷酸腺苷溶于浓度为10mM,PH值为7的羟乙基哌嗪乙硫磺酸溶液中,如图2所示,所述单磷酸腺苷为磷酸及核苷腺苷形成的酯,其由磷酸盐官能团、戊糖核酸糖及碱基腺嘌呤所组成;将需要固定的酶溶于ZnCl₂溶液中具体为将浓度为0.01mM的酶溶于浓度10mM的ZnCl₂溶液中。往上述混合溶液中加入浓度为0.01mg/mL的石墨烯溶液,石墨烯与单磷酸腺苷通过交联作用力形成稳定的凝胶结构,其结构如图3所示;将混合液混匀后静置1小时,再以6000rpm的转速离心处理20min,最后得到固定在凝胶结构上的酶。

[0035] 其中,所述酶为假丝酵母脂肪酶,所述石墨烯为氧化石墨烯,其可以通过将可膨胀石墨放置在坩埚内进行微波处理后加入到分散剂中进行超声处理得到浆料,然后对浆料进行离心处理,浆料分为上下两层,去掉上层清液,制备得到氧化石墨烯。所述由单磷酸腺苷由腺嘌呤核苷三磷酸经过两次水解制得。

[0036] 实施例2

[0037] 与实施例1不同的是,本实施例中是将35mM的单磷酸腺苷溶于浓度为30mM,PH值为7.5的羟乙基哌嗪乙硫磺酸溶液中。将需要固定的酶溶于ZnCl₂溶液中具体为将浓度为0.2mM的酶溶于浓度75mM的ZnCl₂溶液中。往上述混合溶液中加入浓度为0.1mg/mL的石墨烯溶液,石墨烯与单磷酸腺苷通过交联作用力形成稳定的凝胶结构;将混合液混匀后静置2小时,再以8000rpm的转速离心处理10min,最后得到固定在凝胶结构上的酶。其中,所述酶为辣根过氧化物酶。

[0038] 本发明采用以上技术方案,单磷酸腺苷又名一磷腺苷酸,5'-腺嘌呤核苷酸,是一种在核糖核酸(RNA)中发现的核苷酸。它是一种磷酸及核苷腺苷的酯,并由磷酸盐官能团、戊糖核酸糖及碱基腺嘌呤所组成,是由腺嘌呤核苷三磷酸两次水解得到的。单磷酸腺苷与无机纳米材料,金属阳离子在水溶液中能够自组装形成稳定的凝胶结构,可以用于固定蛋白酶辣根过氧化物酶。

[0039] 而石墨烯具有优异的导电性,可将其应用于电化学生物传感器中,加速电子在电极表面的传导速率,提高修饰电极的导电性,从而增强电化学的响应信号,提高检测灵敏度;另一方面,与其他常用的纳米材料相比,石墨烯片层大的比表面积,为生物分子的吸附提供更多的结合位点,并且能够通过 π - π 作用或者其他疏水相互作用,结合多种生物分子修饰电极。

[0040] 本发明通过单磷酸腺苷与石墨烯形成的凝胶结构其能够高效的将酶固定住,单磷酸腺苷是一种生物小分子,在固定酶的过程中不会影响酶的活性,石墨烯也是一种生物相容性极佳的无机材料,因此本发明在固定葡萄糖氧化酶,假丝酵母脂肪酶,辣根过氧化物酶以及 α -淀粉酶的过程中,能够高效的将酶固定住,同时保持酶的生物活性,提高其灵敏度。

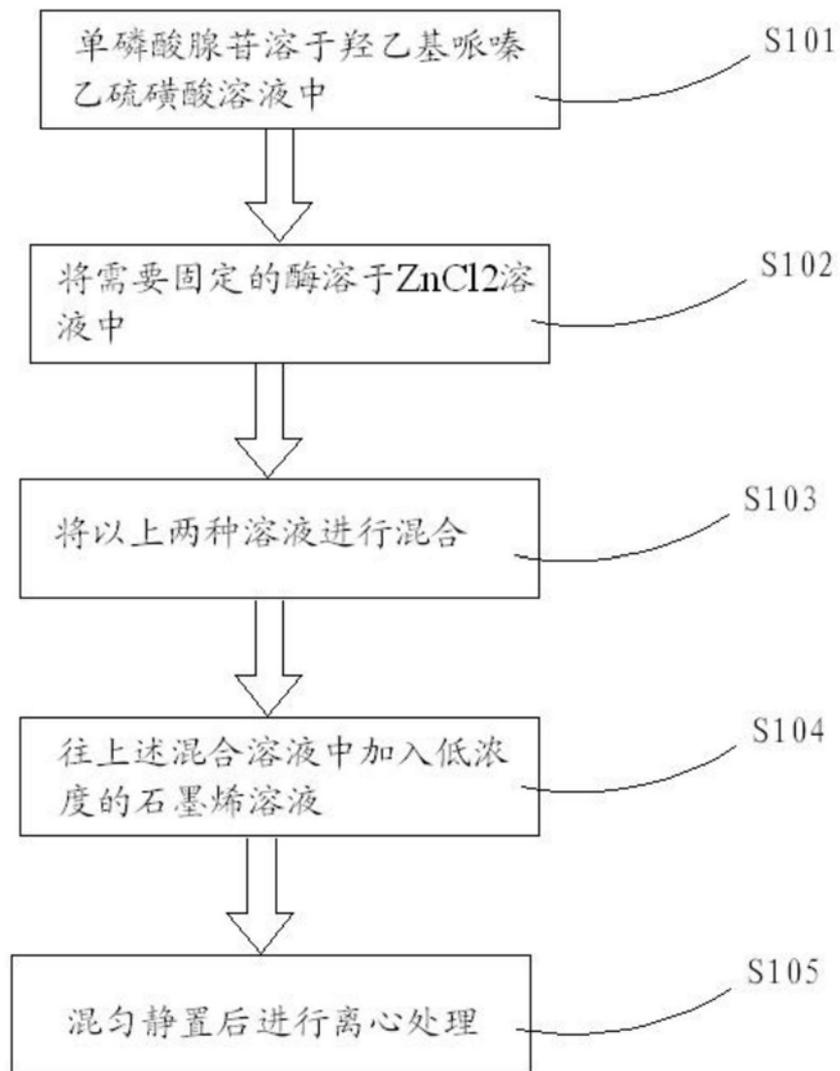


图1

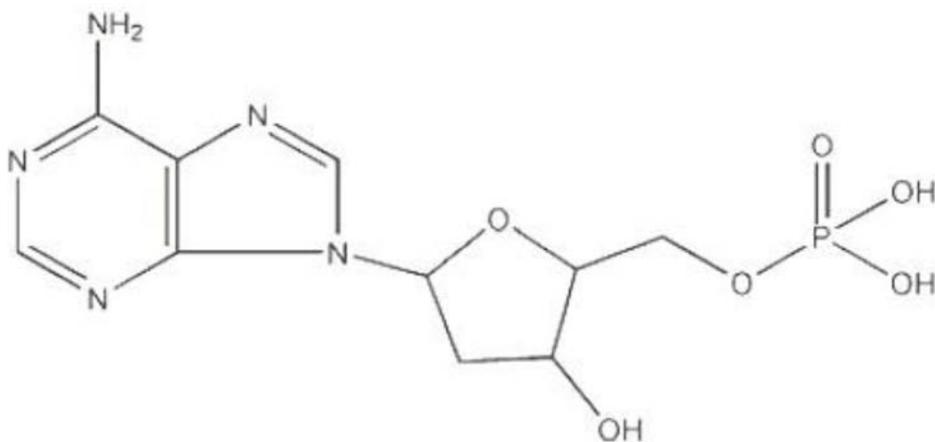


图2

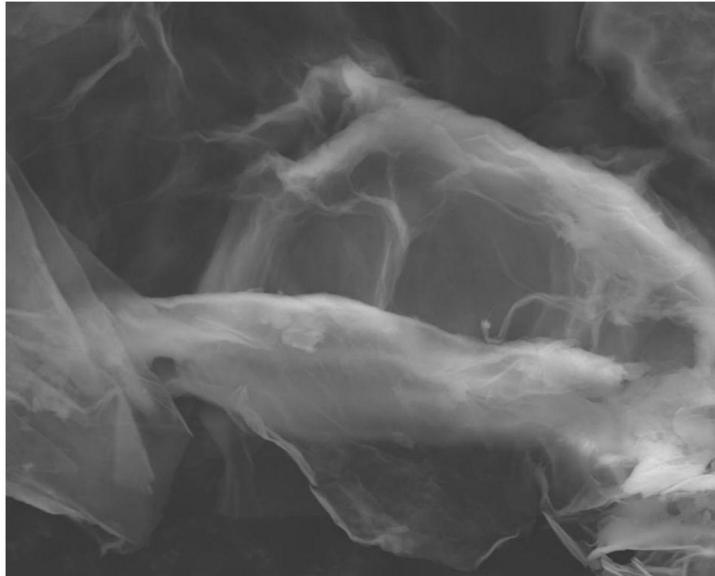


图3