

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 27/327 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410016047.3

[45] 授权公告日 2006 年 1 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1236305C

[22] 申请日 2004.2.3

[21] 申请号 200410016047.3

[71] 专利权人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

[72] 发明人 孔继烈 陆一东 刘宝红 张松

徐静静

审查员 孙春梅

[74] 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

代理人 姚静芳 王福新

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

生物光敏蛋白—纳米半导体复合光电极的制
备方法

[57] 摘要

本发明提供了一种构建高性能生物光电极的有效途径。通过将提取的紫细菌光合反应中心蛋白(RC)的各类变异体修饰于特定的纳米半导体基底上，可以得到在非常宽的波长范围内，特别是在近红外区有着高效光电转换功能的复合光电极。一方面，这些人工改性的 RC 在该体系中具有比天然 RC 更高效的光电转换性能；另一方面，采用纳米半导体材料，特别是介孔半导体材料可以实现在 RC 高效固定的前提下对蛋白光电转换的积极促进。改性并优化后的 RC 对纳米半导体的敏化作用大大提高了整个复合光电极对太阳能的吸收和利用，为开发高效的太阳能电池提供了借鉴。

1、一种生物光敏蛋白与纳米半导体复合光电极的制备方法，其特征是：

(1)将紫细菌光合反应中心蛋白 RC 溶液与植物脱镁叶绿素或卟啉类色素的丙酮溶液搅拌混合，在 40°C ~45°C 温度下共保温 0.5~2 小时，然后在层析柱上洗去游离的叶绿素，再将 RC 洗脱下来后离心纯化，用缓冲溶液稀释至浓度为 0.5~2 mM 的色素替换 RC 溶液待用；上述混合时丙酮溶液与 RC 溶液的体积比是 5-20%，植物脱镁叶绿素或卟啉类色素与 RC 的摩尔比大于 20-30%；

(2)将两种制备介孔体半导体基体的无机前驱体 WCl_6 和 Ti(OBu)_4 混合后溶于表面活性剂溶液，常温下搅拌 1~4 h 得到母液，母液蒸发后旋涂或蘸涂于掺铟氧化锡玻璃上，干燥，恒温，得到介孔半导体薄膜电极；

(3)将上述介孔半导体薄膜电极置于浓度为 0.5~2 mM 的色素替换 RC 缓冲溶液 4°C 下吸附 1~5 天即可。

2、根据权利要求 1 所述的生物光敏蛋白与纳米半导体复合光电极的制备方法，其特征是制备介孔半导体薄膜电极时表面活性剂用量是无机前驱体的 5-35%。

3、根据权利要求 1 所述的生物光敏蛋白与纳米半导体复合光电极的制备方法，其特征是制备介孔半导体薄膜电极时，母液在温度 20-40°C，湿度 20-30% 条件下蒸发 0.5-2 小时。

4、根据权利要求 1 的方法制得的生物光敏蛋白与纳米半导体复合光电极在太阳能的吸收方面的运用。

生物光敏蛋白——纳米半导体复合光电极的制备方法

技术领域

本发明涉及了生物技术和纳米技术领域中制备改性和优化的生物光敏蛋白——纳米半导体复合光电极的制备方法。

背景技术

对太阳光能的有效开发和高效利用，一直以来作为关系到人类生存与发展的重大课题而引起了各国科研工作者的关注。近年来，有关纳米结构和染料敏化的半导体光电极或光电池（M. Gratzel, Nature 2001, 414, 343.,）以及人工合成或组装的包括捕光系统、给体、桥、受体结构的分子内仿生光合反应中心体系（D. Gust, T. A. Moore, A. L. Moore, Acc. Chem. Res, 2001, 34, 40.,）被大量报道，成为光电转换研究的一大热点。另一方面，设计和制作包含紫细菌光合反应中心蛋白（RC）的各类生物光电极或光电转换器件提供了利用光敏蛋白天然高效的光电转换功能的有效途径。光合反应中心蛋白极高的光致电荷分离的量子产率，特别是对于近红外长波长光的高效吸收是其作为光电转换材料具有的巨大优势。

在先前的工作中曾报道了采用电沉积 TiO_2 固定修饰上 RC，制作生物光电极的方法（03141612.8）。该复合光电极有效拓宽了半导体光电材料对太阳光的吸收，光电转换效率得到了大幅提高。然而，RC 被激发后自发的电子传递过程及随时可能发生的反向电荷复合而回到基态的竞争反应，极大地削弱了光激发后 RC 对溶液中介体的氧化，进而影响到整个光电极的光电转换效率。虽然采用能极匹配性良好的纳米材料可以促进光激发后 RC 电子——空穴对的有效分离，在一定程度上降低 RC 受激后电荷的重组对蛋白光电流产生的负面影响，但是该方法并不能从根本上解决 RC 受激后发生竞争反应对整个光电极光电转换的干扰。

发明内容

本发明的目的是获得光电转换效率高的系列人工改性和优化的生物光敏蛋白——纳米半导体复合光电极。

本发明制备了系列的 RC 变异体，即通过控制替换色素与天然 RC 的摩尔比、反应温度及反应时间等条件，利用植物脱镁叶绿素（Phe）及其它相似的人工色素如卟啉类色素替代 RC 内的细胞脱镁叶绿素（BPh），从而减缓或部分地阻断 RC 受激后自发的电子传递过程，推动光激发后 RC 电子——空穴对的有效分离，延长电荷分离态的寿命。将上述

替代即变异后的 RC 修饰固定于特定的介孔半导体氧化物基体电极上可以得到性能优良的复合生物光电极。

本发明提出的人工改性并优化的生物光敏蛋白——纳米半导体复合光电极的制备包括以下几个步骤：

第一步：色素替换的 RC 变异体的获得。取一定体积的 RC 溶液，加入一定量含植物脱镁叶绿素或其它卟啉类色素的丙酮溶液。加入的丙酮溶液与 RC 溶液的体积比在 5%~20% 间；混合溶液中，植物脱镁叶绿素或其它卟啉类色素与 RC 的摩尔比大于 20-30%。上述溶液在搅拌后置于 40°C~45°C 下共保温 0.5~2 小时，随后在 DEAE-纤维素层析柱（DE-52）上用 NaCl 的 TL 缓冲稀溶液洗去游离的叶绿素。选用浓度稍大的 NaCl 的 TL 缓冲溶液将修饰的 RC 洗脱下来，再将待纯化的 RC 溶液铺在 10%~40% 的蔗糖梯度上，4°C 条件下离心 14~16 h，从上至下取第二层淡黄色上清液，即得到纯化后的色素替换 RC。采用 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液稀释上述色素替换的 RC，得到浓度为 0.5~2 mM 的变异 RC 的稀溶液，置于 4°C 冰箱内保存待用。

第二步：介孔半导体基体的合成。介孔半导体氧化物（如 TiO₂, WO₃ 等）是根据“酸碱对”概念制备的。取一定量的表面活性剂（如 P123）溶于乙醇中（质量比 0.05~0.2），将两种介孔半导体基体的无机前驱体 WCl₆ 和 Ti(OBu)₄ 混合后加入溶液中，并在常温下搅拌 1~4 h。得到的母液在 20°C~40°C，湿度 20%~30% 的条件下充分蒸发 0.5~2 小时。将该母液旋涂或蘸涂于表面经过清洁处理的 ITO（掺铟的氧化锡）玻璃上，在 40°C~60°C 条件下放置一天后，得到的半导体膜置于 350°C 马福炉内恒温数小时，最终得到表面均匀的介孔结构半导体薄膜电极。

第三步：RC（色素替换）——介孔半导体复合光电极的制备。将上述新制备的介孔半导体薄膜电极置于浓度为 0.5~2 mM 的变异 RC 的 pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液中，在 4°C 冰箱内吸附 1~5 天，最终得到人工改性并优化的生物光敏蛋白——纳米半导体复合膜电极。该复合膜电极可以在干态或同种蛋白的稀溶液中于 4°C 冰箱内保存。

上述第二步中表面活性剂的用量是无机前驱体的 5-35%。

制备电极时，母液在 20-40°C、湿度 20-30% 条件下蒸发 0.5-2 小时为好。

本发明电极适用于对太阳能的吸收利用，效果显著。

本发明制备的人工改性和优化的生物光敏蛋白——纳米半导体复合光电极表现出极佳的光电转换性能。一方面，电荷分离态寿命的延长使得经过色素替换后的 RC 在该复合光电极中的光电转换效率要远好于相同条件下天然 RC 的转换效率；另一方面，利用特定的介孔半导体材料可以实现 RC 高效固定的前提下对光激发后 RC 电荷分离的有效促进。

改性并优化后的 RC 对纳米半导体的敏化作用大大提高了整个复合光电极对太阳能的吸收和利用。本发明制备方法不复杂，操作步骤为该领域技术人员现有技术，具有很好推广应用前景。

具体实施方式

实施例一：以菠菜作为原料，获得植物叶绿素粗提液，在 4°C 条件下，进行 DEAE-Sephaerose CL-6B 柱层析。先用约 100 ml 石油醚清洗，然后用含 0.5% 正丙醇的石油醚将植物色素依次洗脱下来，弃去先洗脱的类胡萝卜素，收集接着洗脱下来的叶绿素 a，在 N₂ 中干燥后，溶于 1 g/L 的吡啶溶液中于 4°C 下暗态保存。取 10 ml 稀释的植物叶绿素吡啶溶液 (0.1 mmol/L)，于 N₂ 中干燥，加 0.5 ml 冰醋酸。得到的植物脱镁叶绿素在 N₂ 中干燥后，溶于 10 ml 丙酮，4°C 下暗态保存。取一定体积的 RC 溶液，加入 10% 体积上述植物脱镁叶绿素的丙酮溶液，使植物脱镁叶绿素与 RC 的摩尔比大于 20%。搅拌后，在 43.5±0.5°C 条件下共保温一段时间，随后在 DEAE-纤维素层析柱 (DE-52) 上用 0.09 mol/L NaCl 的 TL 缓冲稀溶液约 600 ml 洗去游离的叶绿素，用 0.15 mol/L 的 NaCl 的 TL 缓冲溶液将修饰的 RC 洗脱下来，再将待纯化的 RC 溶液铺在 10%~40% 的蔗糖梯度上，4°C 条件下离心 16 h，从上至下取第二层淡黄色上清液，即得到纯化后的色素替换 RC。采用 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液稀释上述色素替换的 RC，得到浓度为 2 mM 的变异 RC 的稀溶液，置于 4°C 冰箱内保存。取 1 g P123 溶于 10 g 乙醇中。然后将 0.8 g WCl₆ 和 2.4 g Ti(OBu)₄ 混合后加入上述溶液中，并在常温下搅拌 2 h。得到的母液在 30°C，湿度 20%-30% 的条件下充分蒸发。将该 WO₃-TiO₂ 母液旋涂于表面经过清洁处理的 ITO (掺铟的氧化锡) 玻璃上，在 45°C 的条件下放置一天后，将该 WO₃-TiO₂/ITO 膜置于 350°C 马福炉内恒温 2 h，最终得到孔径分布均一的虫洞结构介孔 WO₃-TiO₂ 薄膜电极。将新制备的介孔 WO₃-TiO₂ 薄膜电极置于上述浓度为 2 mM 的变异 RC 的 pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液中，在 4°C 冰箱内吸附 3 天，得到的人工改性的生物光敏蛋白——纳米半导体复合膜电极置于干态或同种蛋白的稀溶液中于 4°C 冰箱内保存。该复合膜光电极表现出优良的光电转化性能。在 8 mM 的连二亚硫酸钠的 Tris-HCl 溶液中以 60 W 的白炽灯为光源，测得的色素替换 RC——介孔 WO₃-TiO₂ 复合光电极的短路光电流约为 3.2 微安，是相同条件下制备和测试的不含 RC 的介孔 WO₃-TiO₂ 电极短路光电流 (0.7 微安) 的 4.6 倍。上述制备的复合膜电极具有很好的重现性。该复合膜电极置于 4°C 冰箱内保存，在一定时间内表现出良好的稳定性与重复性。

实施例二：采用卟啉正丙醚醇作为替换色素，在一定体积的 RC 溶液中加入 10% 体积替换色素的丙酮溶液，使卟啉正丙醚醇与 RC 的摩尔比大于 25%。搅拌后，在 43.5±0.2°C 条件下共保温一段时间，随后在 DEAE-纤维素层析柱 (DE-52) 上用 0.09 mol/L NaCl 的

TL 缓冲稀溶液约 600 ml 洗去游离的叶绿素, 用 0.15 mol/L 的 NaCl 的 TL 缓冲溶液将修饰的 RC 洗脱下来, 再将待纯化的 RC 溶液铺在 10%~40% 的蔗糖梯度上, 4°C 条件下离心 16 h, 从上至下取第二层淡黄色上清液, 即得到纯化后的色素替换 RC。采用 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液稀释上述色素替换的 RC, 得到浓度为 2 mM 的变异 RC 的稀溶液, 置于 4°C 冰箱内保存。介孔 WO₃-TiO₂ 薄膜电极的制备同实施例一。将新制备的介孔 WO₃-TiO₂ 薄膜电极置于上述浓度为 2 mM 的变异 RC 的 pH8.0 Tris-HCl 缓冲液中, 在 4°C 冰箱内吸附 4 天, 得到的人工改性的生物光敏蛋白——纳米半导体复合膜电极置于干态或同种蛋白的稀溶液中于 4°C 冰箱内保存。在 8 mM 的连二亚硫酸钠的 Tris-HCl 溶液中以 60 W 的白炽灯为光源, 测得的色素替换 RC——介孔 WO₃-TiO₂ 复合光电极的短路光电流约为 2.6 微安, 是相同条件下制备和测试的不含 RC 的介孔 WO₃-TiO₂ 电极短路光电流 (0.7 微安) 的 3.7 倍。上述制备的复合膜电极具有很好的重现性。该复合膜电极置于 4°C 冰箱内保存, 在一定时间内表现出良好的稳定性与重复性。

实施例三: 采用卟啉双甲醚双醇作为替换色素。卟啉双甲醚双醇替换 RC 的 Tris-HCl 缓冲溶液的制备同实施例二。介孔 WO₃-TiO₂ 薄膜电极的制备同实施例一。色素替换 RC——介孔 WO₃-TiO₂ 复合光电极的制备及光电性能的测定过程同实施例二。该色素替换 RC——介孔 WO₃-TiO₂ 复合光电极在上述条件下的短路光电流约为 2.6 微安, 是相同条件下制备和测试的不含 RC 的介孔 WO₃-TiO₂ 电极短路光电流 (0.7 微安) 的 3.7 倍。上述制备的复合膜电极具有很好的重现性。该复合膜电极置于 4°C 冰箱内保存, 在一定时间内表现出良好的稳定性与重复性。

实施例四: 采用次卟啉二甲酯作为替换色素。其它实验条件同实施例三。该色素替换 RC——介孔 WO₃-TiO₂ 复合光电极在上述条件下的短路光电流约为 2.2 微安, 是相同条件下制备和测试的不含 RC 的介孔 WO₃-TiO₂ 电极短路光电流 (0.7 微安) 的 3.1 倍。上述制备的复合膜电极具有很好的重现性。该复合膜电极置于 4°C 冰箱内保存, 在一定时间内表现出良好的稳定性与重复性。