

- 10 Saxena S K, Ackerman E J. Ribozymes correctly cleave a model substrate and endogenous RNA *in vivo*. *J Biol Chem*, 1990;265:17106
- 11 Sarver N, Cantin E M, Chang P S *et al*. Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science*, 1990; 247:1222
- 12 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning — A Laboratory Manual*. 2nd edition, New York: CSH Laboratory Press, 1989; 1. 25. 1. 38

蔗糖酶在尼龙丝上的固定化及酶管性能研究*

胡伟平 张先恩 李翔 张治平 张晓梅 张兴

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉430071)

提 要

利用盐酸水解法处理尼龙丝表面, 采用戊二醛交联法将蔗糖酶固定在尼龙丝上, 制成酶丝, 进而制成酶管。该酶管可用于蔗糖的测定, 蔗糖通过酶管分解成葡萄糖, 再用葡萄糖氧化酶(GOD)电极测糖。酶管的最适pH为5—6, 最适温度范围: 30—40℃。溶液的流速对酶管的转化效率有显著影响。流速为1.3ml/min时, 蔗糖浓度在0—5mmol/L范围内, 酶管的转化效率基本恒定, 约为28.5%。用同一浓度的蔗糖溶液重复实验, 酶管的重复性很好, $CV < 1\%$ 。酶管活力至少稳定8d(天)以上。

关键词 蔗糖酶, 固定化, 酶丝, 酶管, 蔗糖测定

发酵工业迫切需要快速的蔗糖测定方法。蔗糖属非还原性糖, 主要测定方法为比重法和旋光法。测定精度较差, 且为手工操作, 近些年来, 固定化酶技术已开始用于连续流动分析过程^[1-5]。如果能将样品通过固定化蔗糖酶管, 使蔗糖酶解成葡萄糖, 再经葡萄糖氧化酶(GOD)电极测定葡萄糖含量, 便可反推出蔗糖含量。本研究重点放在酶管的研制并就其应用的可能性进行了讨论。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

蔗糖酶[invertase (INV), EC 3.2.1.26, Sigma, 825 IU/mg]溶于0.04mol/L磷酸缓冲液(pH7.0), 浓度为1—2mg/ml; 戊二醛[上海化学试剂分装厂, 进口分装, 25%(W/V)], 用0.2mol/L硼酸缓冲液(pH8.5)稀释至12.5%; 甲液: 18.6%CaCl₂—18.6%—甲醇—水溶液^[4]; 乙液: 18.6%CaCl₂—18.6%水—甲醇溶液^[1]。

尼龙丝: NF1(1.5号尼龙鱼线, $\phi = 0.205\text{mm}$, 日本进口), NF2(2号尼龙丝, Pal 21, 日本进口), NF3(尼龙丝, $\phi = 0.4\text{mm}$, 加拿大进口)。尼龙-6颗粒: NG(湖南岳阳化工厂, 1×3mm)。

1.2 酶管制作

1.2.1 方法A^[6]

1.2.1.1 将4根1m长的尼龙丝合在一起绕成线圈, 在18.6%CaCl₂—18.6%甲醇—水溶液中50℃水浴处理20min, 水洗后再用3.65mol/L盐酸在45℃水浴处理20min(NF1<2min), 然后用冰水洗去HCl至中性。

1.2.1.2 展开线圈, 塞到 $\phi = 1 \times 2\text{mm}$ 的Teflon管中, 4℃下用12.5%的戊二醛环流45min, 再通入冰水洗去游离戊二醛, 立即进行

* 本文属国家自然科学基金项目(39070017)及国家八五攻关生物技术: 重要传感器的研制专题。

收稿日期: 1992-07-01 修回日期: 1992-09-15

酶联反应。

1.2.1.3 在4℃下将酶液通入管中闭路循环5—12h,再通入蒸馏水充分洗去游离酶,即得到固定化酶尼龙丝——酶丝(管)

1.2.2 方法B^[1]基本与方法A相同,仅在步骤1.2.1.1中用乙液代替甲液处理实验材料。

其它两种较次要的方法将在结果与分析中介绍。

1.3 酶管(丝)活性测定

酶管活性测定装置如图1所示。经三通阀C作用阻断洗脱液,蔗糖溶液进入系统流经酶

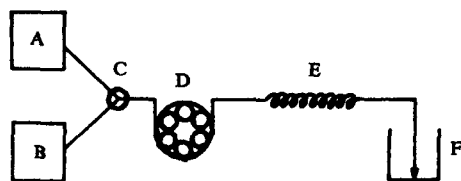


图1 工作系统框图

A. 洗脱液; B. 蔗糖溶液; C. 三通阀;
D. 蠕动泵; E. 酶管; F. 样品收集器

管E,在F处取样,用本实验室自制的 GOD 电极测定样品中葡萄糖含量^[3],得出蔗糖转化率,即酶管的转化效率。计算公式如下:

$$\text{酶管转化效率} = \frac{\text{经反应产生的葡萄糖浓度}}{\text{样品初始蔗糖浓度}}$$

工作条件:室温;流速为1.3ml/min;洗脱液为曝气过的蒸馏水(pH6.0)。在不作特殊说明的情况下都使用此装置来测定酶管活性。

2 结果与分析

2.1 固定化载体的选择

实验选用两种尼龙丝(NF₁和 NF₃)和一种尼龙粒(NG)作为固定化酶载体。酶的固定化采用方法A,戊二醛处理及酶联反应以浸泡的方式进行。检测各种材料的固定化效果时,将其充分洗涤浸泡,以除去游离酶,再把酶丝剪成小段。然后把材料分别浸泡在4ml 0.01mol/L 的葡萄糖溶液(pH6.5磷酸缓冲液配制)中,40℃水浴保温反应,按时取样,用 GOD 电极测定其响应值(对于产生的葡萄糖)。实验结果见表1。

表1 比较几种尼龙材料的固定化酶活性¹⁾

反应时间/min	检测值/mV						
	空白	NF ₁	NF ₁ 对照	NF ₃	NF ₃ 对照	NG	NG 对照
75	0.125	0.375	0.3	0.15	0.15	0.25	0.175
126	0.2	0.675	0.6	0.225	0.225	0.5	0.275
270	0.2	1.05	0.75	0.25	0.25	0.75	0.275
相对活力/% ²⁾	0	100	64.7	5.9	5.9	64.7	8.8

1)反应液:4ml 0.01mol/L 蔗糖溶液,pH6.5, 40℃,

2)相对活力 = $\frac{\text{实验值} - \text{空白值}}{\text{最大实验值} - \text{空白值}} \times 100\%$

表2 蔗糖酶在两种尼龙丝载体上的固定化

载体	产生的葡萄糖/(mmol/L)	转化效率/%
NF1	0.714	7.14
NF2	0.68	6.8

工作条件:样品 10 mmol/L 蔗糖溶液;
流速 1.3 ml/min;室温。

结果表明,NF1固定化效果最佳。在测定之前,材料已经充分洗去游离酶,从 NF1 及其对照组的的结果来看,均有不同程度的酶促活性,可见酶的固定化既有共价交联作用,也有较稳定

的物理吸附作用。但显然,经共价交联后酶活性更高,其中以 NF1效果最好,相对活力最高。然而,实验中发现,该材料太细,在盐酸处理过程中,易变形,于是选择稍粗的尼龙丝 NF2作载体,实验证明,当制成酶管时,NF2与 NF1有相近的固定化酶活性(表2)。

2.2 固定化方法的选择

实验中除使用前述方法A与方法B外,还采用了下述两种方法:

方法 C^[4] 把尼龙材料置于二甲硫醚中沸水浴5min,然后冰浴以中止反应,移入无水甲醇,30—40s 内甲醇变为乳白色,移入新鲜甲醇,停留1min 后转移到0.5mol/L 赖氨酸溶液(pH9.0)反应2h,用0.1mol/L 的 NaCl 充分洗涤,再把材料转移到戊二醛溶液(12.5%在0.1mol/L pH8.5硼酸缓冲液中)45min,用蒸馏水洗涤,再浸入酶液于4℃下过夜.然后把制成的酶丝塞入 $\phi=1\text{mm}$ Teflon 管中形成酶管.

方法 D^[4] 开始的步骤同方法 C,材料经二甲硫醚激活烷基化后不与赖氨酸反应而直接与酶液作用,表3为实验结果.

表3 几种固定化方法的比较

方法	A	B	C	D
转化效率/%	7.14	24.0	2.38	2.38

工作条件:样品 10mmol/L 蔗糖溶液;

流速 1.3 ml/min;室温.

实验中方法 B 使用的材料为 NF2,其它方法使用的材料都是 NF1. 通入酶管的蔗糖浓度为10mmol/L. 显然,在4种方法中,B 的固定化效果最佳,并且远远超过了其它方法,A 的效果次之. 在下述实验中,未作特殊说明的都是采用方法 B 制作酶管.

实验中还发现酶联反应时间长短对酶的固定化效果有着显著的影响. 较长的酶联反应时间对提高固定化效率是有利的. 实验材料为 NF2结果见表4.

表4 酶交联反应时间对酶管活性的影响

交联时间/h	产生的葡萄糖/(mmol/L)	转化效率/%
5	0.661	13.2
12	1.385	27.7

工作条件:样品 5 mmol/L 蔗糖溶液;

流速 1.3 ml/min;室温.

2.3 温度对酶管活性的影响

见图2,在15—40℃的范围内,酶管的转化效率随着温度的升高而增大. 虽然酶管活性在40℃左右还保持着上升趋势,考虑到酶管的使用寿命,在实际应用中,控温在35℃左右为宜. 酶管在不同温度范围内的温度系数,随着温度的上升,其温度系数逐渐下降(表5). 已知游离

酶的温度系数一般为2—4,从实验结果来看,酶经因固定化后其热敏感性明显下降.

表5 酶管的温度系数(Q_{10})¹⁾

温度范围/℃	15—25	20—30	25—35	30—40
Q_{10}	1.347	1.250	1.188	1.116
Q_{10} 平均值	1.225			

1) Q_{10} :温度升高10℃,酶管转化效率的变化倍数; $C(t_0+10)/C_{t_0}$, t_0 为实验的初始温度; (t_0+10) 为实验的终了温度

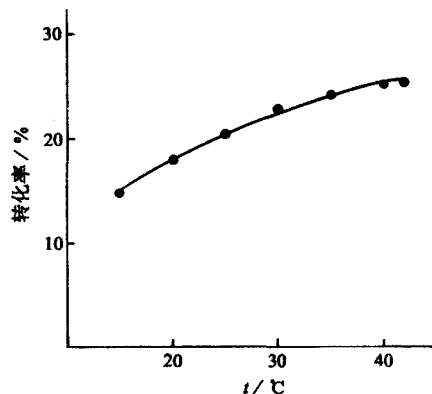


图2 温度对酶管活性的影响

工作条件:样品 1 mmol/L 蔗糖溶液;

流速 1.3 ml/min;水浴保温

2.4 pH 对酶管活性的影响

实验发现在 pH5.5时,酶管的转化效率最高(图3). 游离酶作用的最适 pH 为4.5,酶经固定化后,其最适 pH 发生了变化.

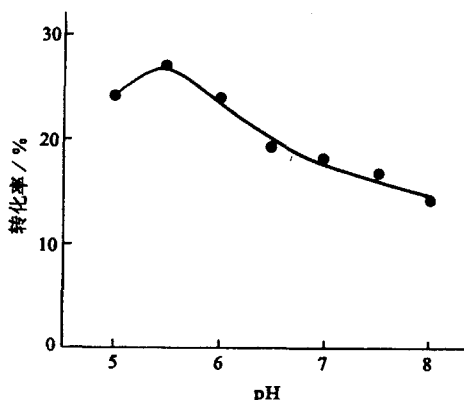


图3 pH 对酶管活性的影响

工作条件:样品为用不同 pH 的磷酸缓冲液配制的

1 mmol/L 蔗糖溶液;室温;流速 1.3 ml/min

2.5 酶管转化效率

流速对酶管转化效率有明显影响,虽流速慢时能获得高的转化效率,但样品停留时间过

长,不利于分析目的,因此本实验不刻意寻求高的转化效率.实验表明,在浓度为0.25—5mmol/L范围内流速为1.3ml/min时,转化效率稳定($28.46 \pm 1.4\%$),能满足测定的需要.

2.6 酶管的稳定性

从两个方面考查酶管的稳定性.对同一样品反应,转化效率的重复性和长期运转以后的酶管失活程度,用5mmol/L蔗糖溶液连续重复实验10次,酶管的转化率平均为20.07%,标准差为0.14%, $CV=0.68\%$.实验的重复性良好.以1mmol/L蔗糖溶液进行实验,检查酶管的隔日稳定性,至第8天,酶管的转化效率仍保持在25%以上,未见失活(表6).

表6 酶管的隔日稳定性

时间/d	1	2	3	8
转化效率/%	26.3	26.4	26.7	27.7

工作条件:样品 1mmol/L蔗糖溶液;

流速 1.3ml/min;室温.

3 讨 论

以尼龙基质为固定化酶的载体已有一些报道^[1,4-6],最常用的尼龙材料为尼龙管,也有人使用过尼龙网,尼龙粉或尼龙膜,本实验利用尼龙丝固定蔗糖酶是一种新的尝试.除了尼龙丝材料易得和价廉以外,当用于酶管制作时,尼龙丝还有两个优点:a.比管材有更大的比表面积,有可能固定较多的酶;b.尼龙粉填充的管或柱往往会产生较大的内压,并易发生堵塞,而酶丝则可避免发生这种情况.

实验中采取方法B进行固定化时,酶管转化效率较高,主要由于18.6%CaCl₂-18.6%水-甲醇溶液能有效溶解低分子量的聚己内酰胺及其非晶态结构部分^[1].尼龙丝经其处理后,其表面由光滑变粗糙,有蚀刻的纹路,可达到增加表面积的目的,进而提高固定化效率.本方法固定的蔗糖酶,其工作寿命达到8d以上,比以前的类似报道(寿命为十几小时)^[5]有了显著提高.但酶丝的转化效率还不太理想(20—30%),拟在本实验的基础上增加两步处理过程^[6],采用羧基转化法及保护戊二醛交联法固定酶,以达到进一步提高固定化效率的目的.

参 考 文 献

- 1 Inman D J, Hornby W E. The immobilization of enzymes on nylon structures and their use in automated analysis. *Biochem J*, 1972; **129**:255
- 2 Satoru M, Shinji I, Makoto M *et al.* On-Line control of glucose concentration using an automatic glucose analyzer. *J Ferment Technol*, 1987; **65**:325
- 3 张先恩,张兴,夏祥明等.酶电极流动注射分析法测定葡萄糖.生物化学杂志,1990;**6**(4):294
- 4 Mascini M, Iannello M, Palleschi G. Enzyme electrodes with improved mechanical and analytical characteristics obtained by binding enzyme to nylon nets. *Anal Chim Acta*, 1983;**146**:135
- 5 Hamid J A, Moody G J, Thomas J D R. Chemically immobilised tri-enzyme electrode for the determination of sucrose using flow injection analysis. *Analyst*, 1988; **113**:81
- 6 孙志敏,朱宏,陈长治等.尼龙管固定化肌酐亚胺水解酶的制备及其性能的研究.生物工程学报,1990;**6**(2):172