

经验交流

胰蛋白酶的高压灭菌

何元政 刘定干¹⁾

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 胰蛋白酶在酸性条件下经过高压灭菌, 仍有活力. 在细胞培养中, 以这种方法对胰蛋白酶消毒比常规的过滤除菌更加简便, 经济, 安全可靠.

关键词 胰蛋白酶, 高压灭菌, 细胞培养

学科分类号 Q55, Q28

胰蛋白酶是实验室常用的蛋白水解酶, 特别是在细胞培养中, 常与 EDTA 结合使用, 用于贴壁培养细胞的消化. 目前胰蛋白酶的灭菌通常采用过滤法. 胰蛋白酶具有较好的热稳定性^[1,2], 特别是在酸性条件下, 曾有人报道过胰蛋白酶被加热到沸点, 活力下降很少^[3]. 基于以上的原因, 我们采用常规高压灭菌法 (100 kPa, 120 °C) 消毒胰蛋白酶, 发现其仍有活力, 并能很好地运用于细胞培养实验中.

1 材料与方法

1.1 试剂

粗制 (1:250) 胰蛋白酶 (EC 3.4.21.4) 购自 Difco. N-苯甲酰-L-精氨酸乙酸乙酯 (BAEE) 购自上海东风生物技术公司. 2×D-Hanks 平衡盐溶液 (16.0 g/L NaCl, 0.8 g/L KCl, 0.12 g/L Na₂HPO₄·H₂O, 0.12 g/L KH₂PO₄, 0.7 g/L NaHCO₃, 0.04 g/L 酚红, 另加 EDTA 到 10 mmol/L, 葡萄糖 2.0 g/L).

1.2 高压灭菌处理

胰蛋白酶溶液 (溶于 1 mmol/L HCl, pH 3.0, 浓度 0.1%~0.5%, 视需要) 于 100 kPa, 120 °C 条件下灭菌 20 min, 冷却至室温后与同时灭菌并冷却至室温的 2×D-Hanks 液等量混匀, 如有沉淀, 静置后吸除, 再用 10 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0 (根据酚红的颜色), 4 °C 贮存备用. 如此得到的胰蛋白酶终浓度为 0.05%~0.25% (计算值), 并含有 5 mmol/L EDTA.

1.3 活性测定

底物 BAEE 溶于含 5 mmol/L Tris/HCl (pH 8.0) 和 20 mmol/L CaCl₂ 的缓冲液中, 并使其最终浓度为 1 mmol/L, 于 25 °C 下测定胰蛋白酶的酯酶活性. 70 μl 的胰蛋白酶样品加于 930 μl 的底物溶液, 混匀, 并立即记时. 产物浓度通过检查 A₂₅₃ 而算出, 每 30 秒测定一次, 持续 5~6 min. 酶活力计算按 Rich 的方法^[1].

2 结果与讨论

在本文所述的浓度和 pH 条件下, 高压灭菌 20 min 后的胰蛋白酶溶液很少出现沉淀, 且胰蛋白酶越稀沉淀越少, 0.1% 胰蛋白酶溶液几乎完全无沉淀产生. 活力测定表明, 经过一次高压灭菌后 (20 min), 胰蛋白酶仍含有全部酶活力的至少 20%~30%. 用灭菌后的胰蛋白酶常规消化贴壁细胞, 一个 25cm² 培养瓶的汇合的各种细胞, 用 0.2 ml 0.1%~0.25% 的胰蛋白酶, 10~15 min 后完全脱壁; 150cm² 大瓶的汇合细胞, 用 0.5 ml 上述胰酶, 10~15 min 后均可完全脱壁. 消化后的细胞存活良好, 传代时活细胞达 95%~100%. 使用效果良好.

与常规的过滤除菌法相比, 高压灭菌法简便易行、安全可靠, 也更加经济. 这种方法已在本实验室作为常规的胰蛋白酶灭菌方法. 必须指出, 胰蛋

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-06-01, 修回日期: 1998-09-28

白酶的高温灭菌必须在酸性条件下进行, 因为胰蛋白酶在碱性和中性条件下, 不具有这种热稳定性^[2, 3].

参 考 文 献

- 1 Rick W. Trypsin. In: Bergmeyer H U eds. Methods of Enzyme Analysis. New York: Academic Press, 1963. 807~ 818
- 2 Northrop J H, Kunitz M, Herriott R M. Crystalline Enzymes. New York: Columbia University Press, 1948. 125~ 167
- 3 Moskvichyov B V, Komarov E V, Ivannova G P. Study of trypsin thermodenaturation process. Enzyme Microb Technol, 1986, 8

(8): 498~ 502

Sterilization of Trypsin by Autoclaving. HE Yuarr Zheng, LIU Ding-Gan (*Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract Trypsin remains active after autoclaving at 120 °C in acidic solution. This method of sterilization has been used routinely in cell culture work and found more simple, reliable and economical.

Key words trypsin, autoclave, cell culture

会 讯

1999 神经信息加工和生物医学工程学术研讨会会议纪要 由中国生物物理学会生物控制论与生物信息论专业委员会, 生物数学专业委员会和中国自动化学会生物控制论与医学工程专业委员会联合举办的“1999 神经信息加工和生物医学工程学术研讨会”于 1999 年 5 月 10 日至 15 日在湖南省张家界市举行。本次会议为主办专业委员会委员及邀请的有关专家、教授参加的学术研讨会, 目的是对本领域“神经系统信息加工的实验、模型与模拟”, “生物系统中的非线性问题”, “生物医学信号和图象处理”, “生物系统的调节与控制”等专题的最新研究进展进行交流。与会代表共作了 20 个专题报告, 内容涉及神经编码, 视觉、听觉、嗅觉信息加工, 心血管系统的神经调控, 凝血动力学和医学图象处理等多个方面和睡眠、注意、思维等不同的脑功能状态下的模型和仿真问题以及动物行为等高层次问题, 还讨论了关于意识等脑的高级功能的研究现状。报告的内容在神经信息加工和生物医学工程这一科学领域覆盖的面还是相当广的, 其中部分研究工作达到了相当先进的水平, 已在国际上有影响的刊物和重要的国际学术会议上发表了论文。会上对当前这一领域中最重要三个前沿科学的热点问题, 即意识问题, 模型化方法和神经编码还专门组织了讨论。本次会议的报告坚持了理论与实验, 模型与模拟的紧密结合, 模型工作都有扎实的生理学背景。会议坚持了充分发扬学术民主和畅所欲言的优良传统。

学术会议通知 据 1999 年 5 月中国生物物理学会自由基生物学和医学专业委员会 (在京委员) 会议发出消息, 第五届全国自由基生物学和医学学术会议定于 2000 年 10 月在湖南长沙举行, 会议的主题是: 面向 21 世纪自由基生物学和医学。此次会议将邀请著名专家围绕当前自由基生物学和医学的前沿课题作大会综述报告, 经组委会审稿接收的部分论文, 也将安排在会上报告。报告内容围绕以下几方面: 1. 自由基与生物学; 2. 自由基与医学; 3. 自由基与抗氧化剂; 4. 自由基与农业; 5. 自由基测试技术。

目前会议筹备组即将发通知, 征集会议论文。会员可来函索要会议通知单。(联系人地址: 100101, 北京市朝阳区大屯路 15 号, 中国科学院生物物理研究所 赵保路 李即)

中国生物物理学会