

PVC 固定化脲酶膜的表观动力学研究

王 厚 行 李 青

(第三军医大学野战外科研究所,重庆)

提 要

本文报道了 PVC 固定化脲酶膜的表观动力学参数: 表观最适 pH7.5, 比天然脲酶下降 0.5; 表观 K_m 为 25mmol/L, 比天然脲酶约大 4 倍; 并对这些参数进行了讨论。

固定化酶是酶工程的重要组成部分, 在临床医学及检验中亦得到广泛的应用。作者选用价廉的 PVC (聚氯乙烯) 作为载体, 建立了固定化酶方法, 首先用于固定化脲酶。为了给广泛的应用奠定基础, 作者研究了 PVC 固定化脲酶膜的表观动力学参数, 现介绍如下。

一、试 剂

1. PVC 固定化脲酶膜 本室制备。脲酶购于四川省校办企业公司生化试剂一厂。本研究使用者为: 3mg 脲酶/11mg 膜重。

2. Berthelot 氏酶法测定尿素的试剂 参照文献 [1] 配制。

3. 1mmol/L 硫酸铵标准液 取已在 110℃ 干燥半小时的 $(NH_4)_2SO_4$ (A. R. 重庆北碚化学试剂厂) 13.214 mg 于 pH 7.5 的 20 mmol/L 磷酸盐-10mmol/L EDTA 缓冲液(以下简称缓冲液), 加至 100ml。用同样缓冲液稀释成 0.1、0.2、0.5、0.8mmol/L。

4. 200mmol/L 尿素标准液 取在干燥器过夜的尿素 (A. R. 重庆化学试剂厂) 1.2012g 于 pH7.5 或 8.0 的缓冲液, 加至 100ml。并用同样缓冲液稀释成 10、20、50、80、100mmol/L。

二、操作与结果

1. 天然脲酶的最适 pH 值测定 在 37℃,

在不同 pH 的缓冲液中, 使脲酶溶液作用于尿素 (50mg 尿素氮/dl), 参照文献 [1] 操作, 测得其最适 pH 值为 8。见图 1。

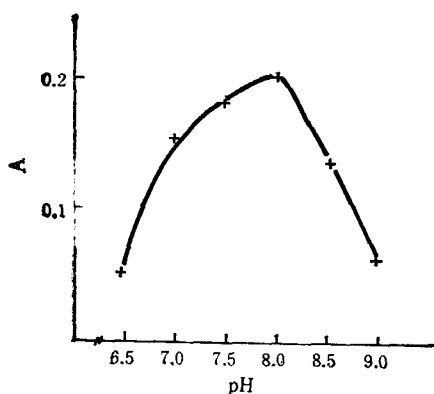


图 1 天然脲酶最适 pH 值

37℃, 20mmol/L 磷酸盐-10mmol/L EDTA, 尿素氮 50mg/dl

2. PVC 固定化脲酶膜的表观最适 pH 值测定 操作同 1, 只是不加天然脲酶溶液而代之以 PVC 固定化酶膜。测得其表观最适 pH 为 7.5。见图 2。

3. 硫酸铵标准曲线 取不同浓度的硫酸铵标准液直接显色测定 (参照文献 [1])。以浓度为横坐标, A 值(吸光度)为纵坐标绘制标准曲线。从图 3 可见, 1mmol/L 以下线性关系良好。直线回归方程 $y = 1.03x$ 。

4. 天然脲酶 k_m 测定 取 pH8.0 缓冲液

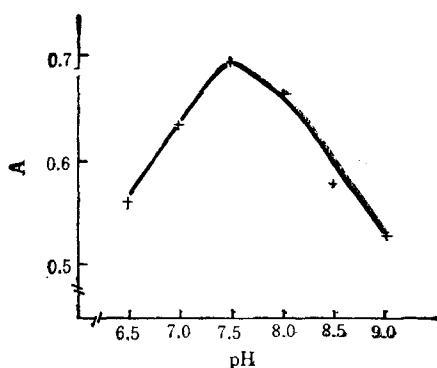


图2 PVC 固定化脲酶膜表现最适 pH 值
37℃, 20mmol/L 磷酸盐-10mmol/L EDTA,
尿素氮 50mg/dl

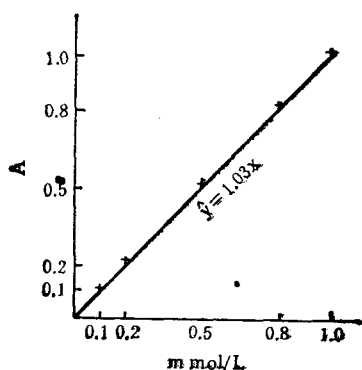


图3 硫酸铵标准曲线

0.8ml, 加尿素标准液 0.1ml, 37℃ 水浴 5 分钟后加入 0.1ml 脲酶溶液 (各种尿素标准液加入后最终尿素浓度为 1、2、5、8 和 10mmol/L), 立即混匀、计算时间, 于 1、2、5、10 和 15 分钟取 0.1ml 反应混合液参照文献 [1] 显色测定。

以时间为横坐标, A 值为纵坐标作图, 由直线斜率求出不同底物浓度的初速度 (A/分),

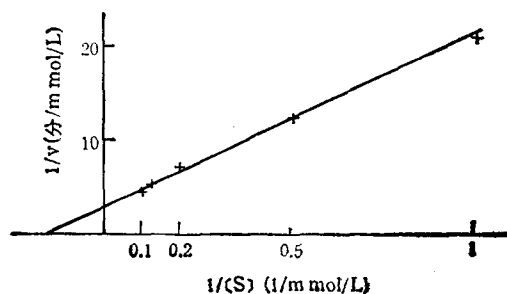


图4 天然脲酶 Km

查硫酸铵标准曲线, 换算成 mmol/L/分。按照 Lineweaver-Burk 作图法 (见图 4) 求得 Km 为 6.6mmol/L。

5. PVC 固定化脲酶膜表现 Km 测定 取 pH7.5 缓冲液 0.9ml, 操作同 4, 只是用 PVC 固定化脲酶膜代替酶溶液。求得其表现 Km 为 25mmol/L。见图 5。

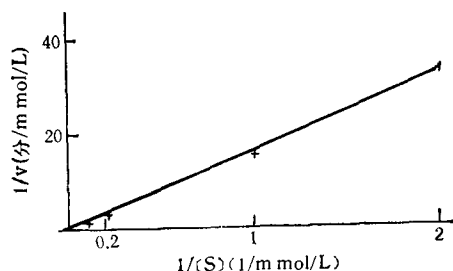
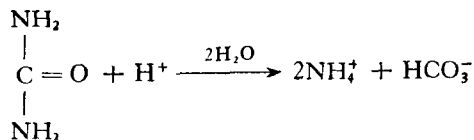


图5 PVC 固定化脲酶膜表现 Km

三、讨 论

根据固定化酶载体、酶载量、形状等, 其表现最适 pH 值与天然酶相比或酸移或碱移或不变。就固定化脲酶膜而言, 因其在 pH9.3 以下的酶促反应



中吸收 H^+ , 使其酶膜的 pH 比外部溶液高, 而使表现最适 pH 低于天然脲酶, 在本研究中其表现最适 pH 酸移 0.5。同样的现象也有其他作者报道 [2-3]。

本研究中硫酸铵标准液用 pH7.5 的缓冲液配制。但亦适用于天然脲酶 (最适 pH 为 8) 测定 Km 值时查对。因为呈色反应的最适 pH 为 11—12, 主要由碱性次氯酸钠溶液决定, 而 0.1ml 反应混合液的 pH 改变 0.5, 对此影响甚微。

用 Berthelot 氏酶法测定尿素 (37℃, pH 8.0, 20mmol/L 磷酸盐-10mmol/L EDTA 缓冲液) 时脲酶的 Km 未见报道。本研究测出为 6.6mmol/L。与 Carr [4] 报道的 4mmol/L (pH 6.7—7.6), 试剂手册 [5] 所载 4mmol/L (pH 8.0,

人恶性疟原虫 DNA 的制备及研究

王昌才 陈仕荣 吴承声 金福军 钟雄林

(第一军医大学, 广州)

提 要

本文报道应用 SDS-酚方法从人工培养的海南人恶性疟原虫中提取 DNA, 用 $1 \times \text{SSC}$ 缓冲系统测得熔点 (T_m) 值为 63°C , 推算出 G + C 含量为 22.2%。用 S1 及绿豆核酸酶处理凝胶电泳分析表示在 DNA 内部存在对 S1 酶敏感的结构。

疟疾流行范围很广, 其病原体为疟原虫。近年来国外都在用基因工程技术研制疟疾疫苗和对原虫进行分子生物学的深入研究, 以便进行有效的防治。本文报道从人工培养的海南人恶性疟原虫中分离纯化出基因组 DNA, 进行凝胶电泳以及 S1 和绿豆核酸酶分析, DNA 熔点 (T_m) 测定推算碱基组成的结果, 并对 DNA 内部结构进行了初步探讨。

材 料 和 方 法

一、海南人恶性疟原虫 为本校疟免室人工培养, 纯化。

二、恶性疟原虫基因组 DNA 的制备

Tris 缓冲液) 相近似。而 PVC 固定化脲酶膜的表观 K_m 亦未见报道, 本研究测得为 25 mmol/L (37°C , $\text{pH} 7.5$, 20 mmol/L 磷酸盐- 10 mmol/L EDTA)。有人^[6-7]认为固定化酶由于基质和产物的扩散限制, 其表观 K_m 大都有增大的趋势。尽管酶膜的扩散限制小, 亦都增大。本研究测得的 PVC 固定化脲酶膜表观 K_m 比天然脲酶的 K_m 约大 4 倍, 与之相符。

参 考 文 献

- [1] Kaplan, A. et al.: *Selected Methods of clinical chemistry* Vol. 9(ed. Faulkner, W. R. et al.), American

取已分离纯化的人工培养疟原虫, 用 TE 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl $\text{pH} 9.0$; 10 mmol/L EDTA) 洗 2 次, 用 3—5 体积 TE 缓冲液匀浆, 加入 SDS 至最终浓度为 1%, 60°C 保温 30 分钟, 加 RNase (用前 100°C 15 分钟处理) 至 $50 \mu\text{g/ml}$, 37°C 保温 1 小时, 加 $50 \mu\text{g/ml}$ 蛋白水解酶 E, 50°C 保温 1 小时, 然后用等体积的酚-氯仿-异戊醇提取 2—3 次, 收集水相 (含 DNA), 加入 2 体积的冷乙醇, 用玻棒将白色纤维状 DNA 挑出, 溶于 TE 缓冲液中备用。

三、琼脂糖凝胶电泳分析 按文献[1]进行。

- Association for clinical chemistry, New York, 1982, 357.
[2] Thomas, D. et al.: *Biochimie*, 1972, 54, 229.
[3] Konecny, J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 403, 573.
[4] Carr, P. W. et al.: *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical chemistry*, John Wiley & sons, New York, 1980. 183.
[5] 上海化学试剂采购供应站: 《试剂手册》, 上海科学技术出版社, 1985, 1274.
[6] Wingard, L. B. et al.: *Immobilized Enzyme Principles*, Academic Press, New York, 1976, 128.
[7] Goldstein, L.: *Methods in Enzymology* (ed. Mosbach, K.), Vol. 44. Academic Press, New York, 1976, 397.

[本文于 1987 年 7 月 21 日收到]