

碱性磷酸酶在壳聚糖上的固定化作用

陈 盛 吴海生

(福建师范大学高分子研究所生化研究室,福州 350007)

提 要

本文报道以蟹、虾废壳为原料提取壳聚糖,用戊二醛作交联剂,将碱性磷酸酶固定于壳聚糖上。同时探讨了一定量湿壳聚糖载体与交联剂浓度,给酶量及产率等关系的最适固定化酶条件,并对固定化酶的热稳定性、操作稳定性、米氏常数、最适 pH、最适温度等理化性质进行了探讨。

关键词 壳聚糖,戊二醛,碱性磷酸酶,固定化

引 言

从已有文献报道表明,用于酶及细胞固定化载体不少,但从实用性方面考虑,探索研制高

效、廉价的载体乃是酶工程应用基础研究亟需解决的一个重要课题。近年来,壳聚糖作为固定化酶载体引起了不少学者重视。壳聚糖是从蟹、虾、鲎等甲壳动物废弃的外壳中提取的一种

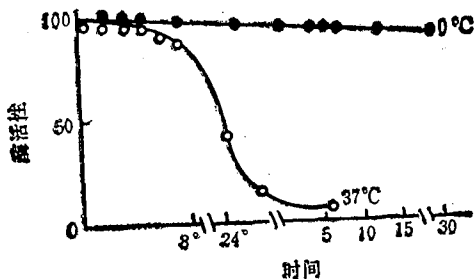


图5 温度对稀酶液的影响

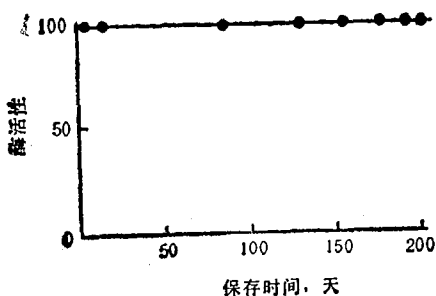


图6 酶的稳定性

表4 不同来源的酶活力比较

酶 源	牌 号	比 活 力 mmol/(min · mg)
微 球 菌	本实验室	26.719
细 菌	B. Merck	1.399
真 菌	B. Merck	2.633
牛 肝	Sigma(C-10)	5.516
牛 肝	Sigma(C-40)	1.399
牛 肝	上海东风厂	0.574

项研究国内未见有人报道。

参 考 文 献

- 1 刘昌玲等.中国药理学报,1985;6: 207
- 2 Munoz M V. *Trabajos del Departamento de Botany y Fisiologia Vegetal*. Facultad de ciencias, Universidad de Madrid, 1970; 2: 29—38
- 3 潘家秀等.蛋白质化学研究技术.北京;科学出版社,1961; 28—31
- 4 Herbert D. *Methods in Enzymology*, New York and London; Academic press, 1955; 2:784—874
- 5 刘昌玲.军事医学科学院院刊,1983;1: 89
- 6 Jacob G S. *Biochemistry*, 1979; 18: 2967

[本文于1989年9月19日收到]

氨基多糖,其学名为: 2-氨基-1,4- β 葡聚糖。我国海岸线较长,壳聚糖的来源十分丰富,对它的开发利用已引起人们的关注^[1-3]。有关文献报道壳聚糖的用途不少于三十种,作为生化载体就是其中之一。国外不少学者已成功地在壳聚糖上固定了胰凝乳蛋白酶、淀粉酶、葡萄糖异构酶、乳糖酶、酸性磷酸酶等^[4-9]。壳聚糖在蟹、虾壳中与蛋白质及无机钙盐交织成网状结构,在去除蛋白质及无机盐后得到甲壳质(chitin),再脱去其分子中的乙酰基即成为壳聚糖(chitosan)。它是一种网状载体,具有机械性能良好,化学性质稳定,耐热性好等优点,特别是其分子中存在的氨基,既易于与酶共价结合,又可络合金属离子,使酶免受金属离子的抑制;它的来源丰富,制备简单,成本低廉,同时又易于通过接枝而改性,是一种亟待开发利用的固定化酶的良好载体。

本文报道将碱性磷酸酶通过戊二醛交联固定于壳聚糖载体上,并对固定化酶的最适条件及稳定性等理化性质进行了探讨。

材料与 方法

一、材料

蟹、虾壳,自己收集。碱性磷酸酶, Sigma 产品;对-硝基酚磷酸盐, E. Merck 产品;戊二醛,上海化学试剂站分装厂出品(按 25% 计);其它试剂均为分析纯。

二、载体壳聚糖的制备

将洗净晒干的蟹、虾壳经稀酸浸泡脱钙和稀碱煮沸脱蛋白反复处理二至三次,得到白片甲壳质。甲壳质再经 50% 浓碱 80℃—100℃ 保温 5—8 小时,即脱去分子中的乙酰基,洗净晒干,得到灰白色片状壳聚糖。将壳聚糖溶于 1% 醋酸,配制成 1% 的壳聚糖醋酸胶液,用 5mol/L NaOH 使壳聚糖絮凝沉降,水洗沉淀至中性,抽滤脱水成湿状壳聚糖载体。

三、碱性磷酸酶的固定化

一定量壳聚糖加入一定浓度的戊二醛,室温下搅拌 1.5 小时,静置 10 小时,离心弃去上清液,水洗三次以除去残余戊二醛,在交联后的

壳聚糖载体中加入碱性磷酸酶液,室温下搅拌 2 小时,再于 4℃ 下反应 10h,离心弃去上清液,水洗三次后得到固定化酶。

四、酶活力测定

游离态碱性磷酸酶的活力测定按文献[10]进行。固定化酶的活力测定:在一定量固定化酶(一般为 1.00g)中加入一定量(1.00—2.00ml) 0.01mol/L 对硝基酚磷酸盐溶液,37℃ 水浴保温 5min 后离心 5min,吸取反应液 1.00ml,加入 5.00ml 0.04mol/L NaOH 溶液,混匀后在 405nm 处测定吸收值。

结果与 讨论

一、戊二醛浓度对固定化酶活力的影响

壳聚糖是一种氨基多糖,但其分子中氨基含量随甲壳质脱乙酰基程度不同而异,因而所需交联剂量也不同。在一定量载体及给酶量条件下,改变交联剂浓度所制备的固定化酶活力不同,见图 1。

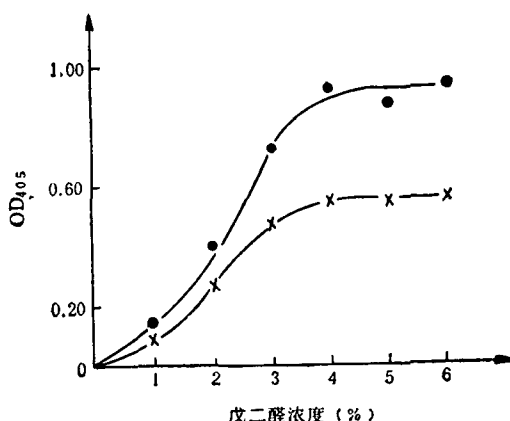


图 1 戊二醛浓度对固定化酶活力的影响

—●—●—给酶量 2.00mg —×—×—给酶量 1.20mg

由图 1 表明,固定化酶活力随戊二醛浓度增大而增加,但戊二醛浓度达 4% 以上时,固定化酶活力则趋于平稳。用不同的给酶量重复以上实验,得到相似的结果。本实验自制的壳聚糖载体,其氨基值经江苏省南通市水产研究所测定为 58%,这说明,4% 戊二醛足以使该壳聚糖分子上的氨基充分发生交联反应,所形成的载体与酶结合量已达最大。

二、给酶量与固定化酶活力及产率关系

一定量交联后的壳聚糖,其活性基团是一定的。因而在结合位点未饱和之前,所制得固定化酶活力随给酶量增加而增大,当结合位点饱和后,增加给酶量却不增加固定化酶活力。同时产率(也即酶的活力回收率)却依给酶量的增大而渐减,因而在确定给酶量的同时,要兼顾固定化酶活力和产率进行选择,见图 2。

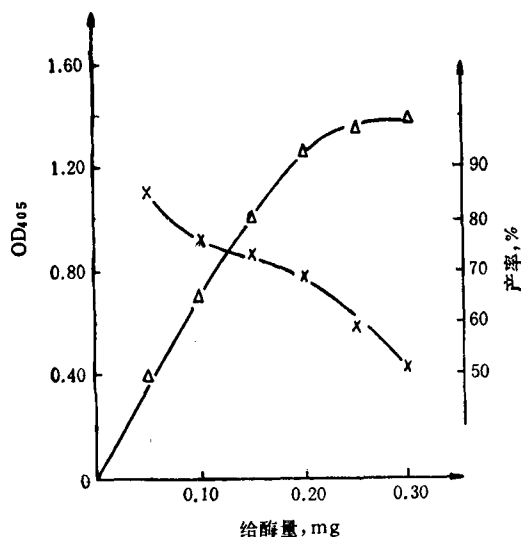


图 2 给酶量与固定化酶活力及产率关系

—△—△—: 固定化酶活力 (OD₄₀₅)
—×—×—: 产率(%)

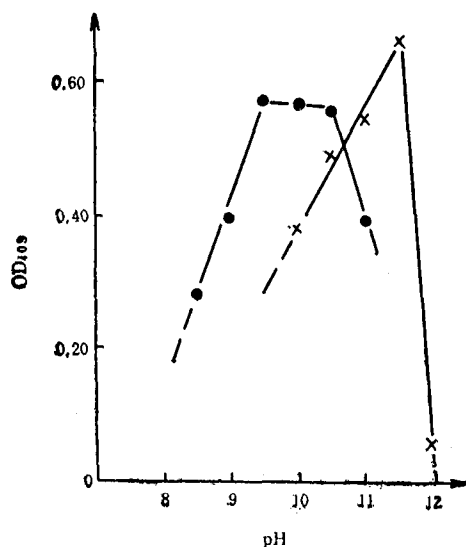


图 3 游离态与固定化碱性磷酸酶最适 pH 曲线

—×—×—: 固定化酶 —·—·—: 游离酶

由图 2 表明,在本实验条件下,1.00g 湿壳聚糖与 4% 戊二醛交联后,固定 0.125mg 碱性磷酸酶效果较好。用此方法,固定碱性磷酸酶蛋白量为 2.00mg/克干载体,产率为 75%。

三、固定化酶最适 pH 及米氏常数

据文献报道,当固定化酶载体带有离子基团时,会使固定化酶的最适 pH 发生移动,且一般固定化酶的 pH 曲线要比游离酶更陡一些^[11-12]。同理,固定化酶的表观米氏常数 K'_m 将低于游离酶的米氏常数。本实验固定化酶的最适 pH(11.5) 较游离酶最适 pH(9.5—10.5) 向碱性方向移动,且最适 pH 范围窄小;米氏常数 $K'_m = 0.482 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 较游离酶 $K_m = 1.92 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 较小,见图 3, 4。

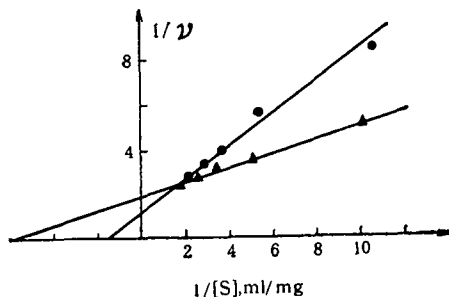


图 4 游离态与固定化碱性磷酸酶 K_m 值

—·—·—: 游离酶 $K_m = 1.92 \times 10^{-3} \text{mol/L}$
—△—△—: 固定化酶 $K'_m = 0.482 \times 10^{-3} \text{mol/L}$

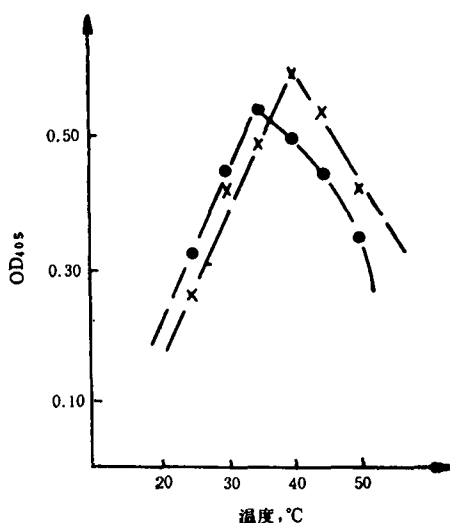


图 5 游离酶与固定化酶最适温度曲线

—·—·—: 游离酶 —×—×—: 固定化酶

四、固定化酶的稳定性

酶在固定化后,稳定性普遍增加。这主要表现在固定化酶的最适温度较游离酶高;对热的稳定性也较游离酶要高得多;同时在连续反复使用及贮存过程中也显示了很高的稳定性,详见图5,6。

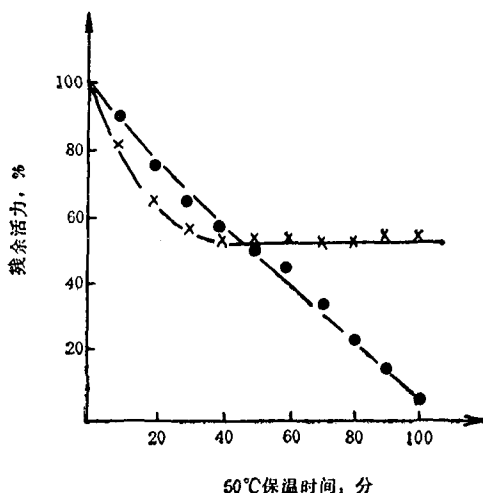


图6 游离酶与固定化酶对热稳定性曲线

—×—×—: 固定化酶 —●—●—: 游离酶

由图5,6可见,固定化酶最适温度为40℃,较游离酶高;固定化酶在50℃保温100min后,残余活力仍有54%,而游离酶在同样条件下,残余活力仅剩6%。另外,固定化酶的贮存稳

定性及重复使用性均较好,我们在固定化酶制备后随即进行了三次活力测定(每日一次),后二次比第一次略有降低(这可能与残余游离酶有关),但与固定化酶在4℃贮存半个月后,再每二日进行的一次活力测定(共测十余次),其结果基本不变。可见壳聚糖固定化的碱性磷酸酶稳定性很好。这种从蟹、虾废弃的外壳中提取的壳聚糖确为一种价廉、性能良好的酶载体。

参 考 文 献

- 1 Muzzarelli R A A. *Chitin*. Oxford Pergamon Press, 1977
- 2 严俊. 化学通报, 1984; (1): 26
- 3 杨世安. 医药工业, 1981; (11): 26
- 4 Shinsaku Hayashida, Perfecto Q Flor. *Agric Biol Chem*, 1982; 46(6): 1639
- 5 Muzzarelli R A A, Barontini G *et al. Biotechnology and Bioengineering*, 1976; 18: 1445
- 6 Flor P Q, Hayashidas. *Biotechnology and Bioengineering*, 1983; 25: 1973
- 7 Nishimura Shin-ichiro, Yoshihiro Ikeuchi *et al. Carbohydrate Research*, 1984; 134: 305
- 8 申炳华, 冯涛, 刘鸿铭. 北京师范大学学报, 1986; (1): 67
- 9 刘亚欣, 高天慧, 刘鸿铭. 第六次全国生化学术会议论文摘要, p252
- 10 蒋传葵, 金承德, 吴仁龙等. 工具酶的活力测定. 上海科学技术出版社, 1982; 60—62
- 11 袁中一, 刘树煌, 袁静明. 固相酶与亲和层析. 北京科学出版社, 1975; 34—37
- 12 查晓, 沈家骥, 周会等. 生物化学杂志, 1988; 4(6): 558

[本文于1989年7月14日收到]

经验交流

用于双向电泳的组合式电泳槽

白书农

(中国科学院植物所, 北京 100044)

王长举

(北京六一仪器厂)

关键词 电泳, 组合式电泳槽

蛋白质分析中常用的双向电泳存在不能同时进行多个样品比较的局限性。1978年Anderson发明的ISO-DALT系统同时可以进行12块板分析, 大大提高了功效, 只是目前进口仪器价格昂贵。为此我们参考国外产品和资料制作了一种简易的组合式电泳槽, 其结构见图1。

这种组合电泳槽具有以下特点:

1. 一次最多可以同时使用12块胶板, 也可以根据需要做2, 4, 6, 8, 10等双数胶板。
 2. 胶板面积比较大, 分离胶可达21×19cm有利于提高分辨率。
 3. 上下槽电极采用分流式安装, 以保证每板承受
- (下转第396页)