

AS 1.398 中性蛋白酶的固定化研究

隋德新 姜涌明 赵国骏 马玉琰

施伟* 姜嘉娴 严锦文

(江苏农学院生化教研室,扬州)

提 要

本文对枯草杆菌 AS 1.398 中性蛋白酶的固定化进行了研究。考查了温度、pH 值、交联剂用量,以及载体与酶的比例等因素对 AS 1.398 中性蛋白酶固定化的影响;确定了固定化 AS 1.398 中性蛋白酶的一些催化特性:最适温度 60℃,最适 pH 值 8.0,操作半衰期 88 天。固定化 AS 1.398 中性蛋白酶活性回收为 74%。

关键词 固定化, AS 1.398 中性蛋白酶,载体,壳聚糖,半衰期

引 言

1.398 中性蛋白酶是一种来源于枯草杆菌的胞外蛋白水解酶。该酶能使蛋白质迅速水解为胨、肽、肽类和部分游离的氨基酸。广泛地应用于皮革脱毛、皮板软化,畜血清蛋白质的水解,果酒,啤酒和饮料中蛋白质的去除(澄清)以及医药工业等^[1-3]。近年来,为了扩大该酶在果酒、啤酒和饮料的澄清以及畜血清蛋白质的应用,一些研究者致力于探索该酶的固定化研究,以提高该酶的利用效率,降低生产成本^[6,7]。如果能找到一种好的载体和简便的固定化方法,制备成稳定性好、活性回收高,使用周期长,机械性能强的固定化酶,将给该酶在工业上的应用带来广阔的前景。

我们利用自制的壳聚糖为载体,采用壳聚糖吸附和戊二醛交联的方法,对 AS 1.398 中性蛋白酶的固定化条件和固定化酶的特性进行了研究。结果表明:固定化酶活性回收为 74%,最适 pH 值 8.0,最适温度 60℃,操作半衰期 88 天,并且具有机械性能稳定,操作简便等优点。

材 料 和 方 法

1. 材料

(1) AS 1.398 中性蛋白酶 无锡酶制剂厂产品,活性为 50000 U/g。

(2) 壳聚糖 从淡水虾壳自制,含氮量 < 6.20,粘度为 850 厘泊,纯白色。

(3) 戊二醛 E. Merck 公司进口,上海试剂厂分装,浓度为 25%。

(4) 其它试剂均为生化试剂或分析级试剂。

2. 酶活性测定方法

可溶性中性蛋白酶活性测定按文献 [8] 进行,以 1% 酪蛋白为底物,0.1 mol/L, pH 8.0 磷酸盐缓冲液,45℃ 恒温振荡,660 nm 测定光密度。固定化中性蛋白酶活性测定:称取适量固定化酶,采用同可溶性酶相同方法测定。

3. 酶的固定化方法

称取 5g 壳聚糖,加 300 ml 1% 冰醋酸溶解 24h,用 2.0 mol/L 的氢氧化钠调 pH 值为 8.0,过滤,抽干,得白色沉淀物;加入适量的中性蛋白酶溶液(用 0.1 mol/L pH 8.0 磷酸盐缓冲液配制),室温搅拌 30min,抽真空 30min,滴加 25% 戊二醛溶液至一定量的最终浓度,充分振荡均匀,交联 8h。然后过滤,用蒸馏水洗涤,

* 兽医 89 级毕业生

用 0.1 mol/L pH 8.0 磷酸盐缓冲液充分洗涤，压干得固定化酶。

结 果

1. 酶固定化条件的选择

(1) 戊二醛浓度对制备固定化酶的影响

采用戊二醛作交联剂制备固定化酶，戊二醛的正确使用是关键之一，因为戊二醛既是交联剂。也是酶的强烈变性剂，其浓度直接影响酶活性回收。我们采用戊二醛终浓度在 0.1%—1.0% (图 1)，分别制备固定化酶，测定酶活性。结果表明，戊二醛最终浓度为 0.3% 时，固定化酶活性最高，小于或高于此浓度，固定化酶活性回收明显降低。

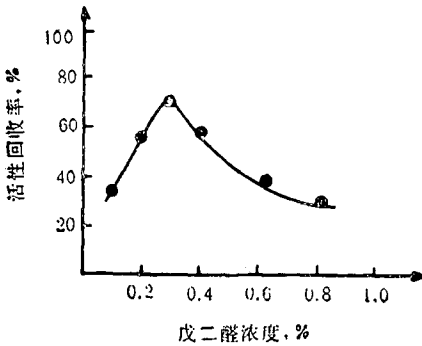


图 1 戊二醛浓度对制备固定化酶的影响

(2) pH 值对制备固定化酶的影响

采用 0.1 mol/L pH 5.0—9.0 范围内的磷酸盐缓冲液，分别制备固定化酶，测定酶活性

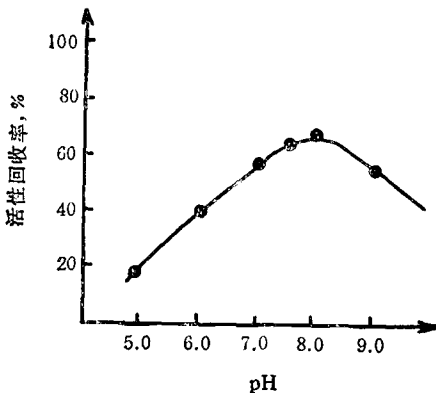


图 2 pH 对制备固定化酶的影响

(图 2)。结果表明，在其它条件恒定的情况下，pH 值的变化对制备固定化酶的影响较大，在 pH 值 7.5—8.0 范围内，固定化酶活性回收最佳。这很可能是体系的 pH 值影响载体和酶的解离状态，降低了酶结合量，造成酶固定化效率的差异。

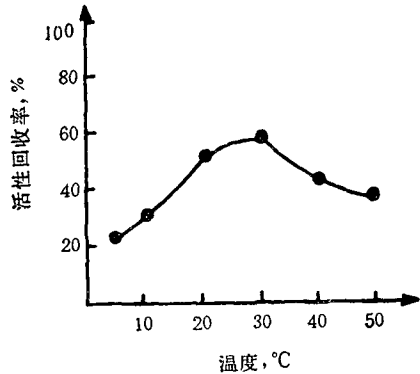


图 3 温度对制备固定化酶的影响

(3) 温度对制备固定化酶的影响

在恒定其它条件的情况下，在 4—50°C 范围内制备固定化酶，测定酶活性，从图 3 的结果可以看出，在 25—30°C 条件下，制备固定化酶活性最高。推测在较低温度下醛基和氨基间的反应性降低，而温度较高时，戊二醛对酶失活作用加强，使固定化酶活性回收下降。

(4) 酶与载体比例对制备固定化酶的影响

恒定其它条件，取相同量的载体各 1.0g，变化酶的用量 (10000—50000 U, 1000 U/ml)，分别制备固定化酶，测定酶活性。图 4 的结果表明，每克干重的壳聚糖最大载酶量为 15000 U，超过此量，固定化酶活性不再升高。

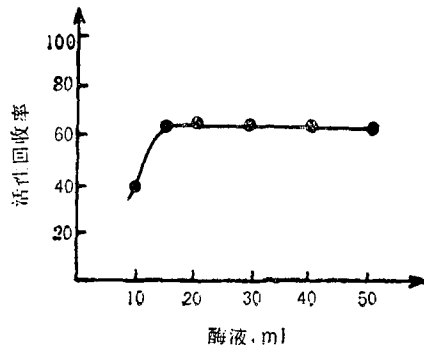


图 4 不同酶量对制备固定化酶的影响

2. 固定化中性蛋白酶的催化特性

(1) 固定化酶的最适作用温度

取一定量的固定化酶,以1%的酪蛋白为底物(pH 8.0),在30—70℃范围内,每隔10℃振荡保温15 min,测定酶活性,并在相同条件下,测定可溶性酶活性。从图5可见,固定化酶最适作用温度为60℃,比可溶性酶最适温度高15℃。很可能是壳聚糖的导热性低所致。在实际应用中,考虑到热变性因素的影响,通常在低于最适温度5—10℃情况下使用,以延长固定化酶的操作半衰期。

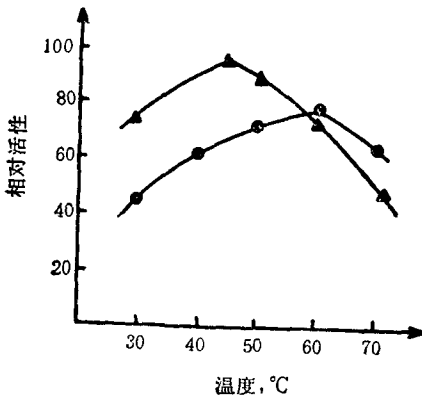


图5 固定化酶最适作用温度曲线

▲—▲: 可溶性酶, ●—●: 固定化酶

(2) 固定化酶的最适作用 pH

取一定量的固定化酶,在0.1 mol/L不同pH值(pH 6.0—9.0)的磷酸盐缓冲液中,用1%的酪蛋白为底物,45℃振荡保温15 min,测定酶活性,可溶性中性蛋白酶在相同条件下

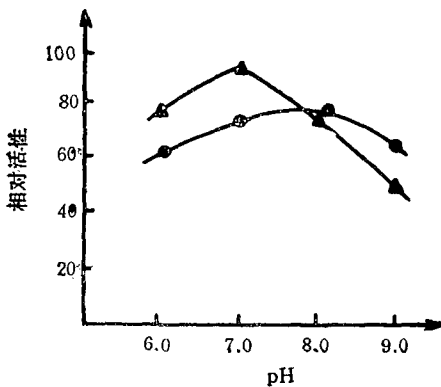


图6 固定化酶最适作用 pH 曲线

▲—▲: 可溶性酶, ●—●: 固定化酶

测定。图6的结果表明,固定化中性蛋白酶的最适作用pH值为8.0,比可溶性酶最适pH高1个单位。有可能是酶经过固定化后,酶分子的构象以及活性部位的微环境发生改变,以致影响活性基团的解离状态,使得固定化酶的最适pH提高。

(3) 固定化酶的操作半衰期

在内径为50mm,长400mm,带有夹套的玻璃层析柱内,填充500g固定化酶(总活性为 7.25×10^6 U),以1%的酪蛋白溶液为底物(pH 8.0),控制流速为10ml/min,循环水浴恒温控制温度55℃,连续运转88天,残余酶活性为54%。表明该固定化酶在上述操作条件下,半衰期至少为88天。

讨 论

以上我们报道了以壳聚糖为载体固定化AS 1.398中性蛋白酶的研究结果。在固定化过程中,固定化酶的活性回收受温度、pH值、交联剂用量和载体与酶的比例等因素的直接影响。此外,壳聚糖的粘度、脱乙酰化程度也直接影响固定化酶的活性回收^[9]。因此,使用我们自制的载体和控制前述固定化条件下,固定化中性蛋白酶活性回收为71%—77%,平均为74%,高于现有文献报道的结果(55—60%)^[10]。

壳聚糖是一种N-脱乙酰基-氨基葡萄糖的聚合物。其生产原料(甲壳类动物外壳)十分丰富,方法简单。以壳聚糖为载体制备的固定化中性蛋白酶不仅活性回收高,操作半衰期长,而且颗粒大(可以控制)、流速快,不易压床等优点。因此,适于啤酒的较大规模的澄清处理,以及畜血清蛋白质的水解(该项研究正在进行),在食品和医药工业上有着广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 1 横山定治. 化学と生物, 1976; 14(2): 2
- 1 布川弥太郎. 日本酿造协会誌, 1976; 71(4): 282
- 3 中村精二. *New Food Industry*, 1969; 8(11):33
- 4 西原富雄. 公开特许公报 1090967, 1967
- 5 西原富雄. 公开特许公报 1119342, 1968
- 6 Finley J W et al. *Process Biochemistry*, 1979; 7
- 7 Stanley W L et al. *Biotechnol Bioeng*, 1975; 17:315

以反意义 RNA 为探针的原位杂交组织化学方法

马维骏 杨胜利 邹冈

(中国科学院上海药物研究所)

提 要

原位杂交组织化学方法是在组织及细胞水平上研究基因表达及调控的重要方法之一。我们利用一个由体外转录产生的与小鼠阿黑促皮原 (POMC) mRNA 顺序互补的反意义 RNA 为探针,直接在大鼠垂体的组织切片上进行杂交反应。结果表明,杂交在反意义 RNA 探针及 POMC mRNA 之间进行,并形成稳定的杂交分子。放射自显影影像显示出垂体中 POMC mRNA 的分布及相对含量。

关键词 原位杂交,反意义 RNA 探针,垂体,阿黑促皮原

基于碱基配对原则的核酸杂交技术已被广泛地用于神经、内分泌、免疫和生殖等系统中特异 mRNA 的分布和含量的研究。虽然 Northern 杂交、打点杂交、液相杂交都不失为研究基因表达的调控机制的有效检测手段,但对于由多种形态和功能各异的细胞组成的组织和器官来说,以上几种方法难于对可能散布于其中的部分甚至单个表达特异基因的细胞进行研究。为克服这一局限,出现了可以直接在组织切片上进行特定种类 mRNA 杂交的所谓“原位杂交”方法^[1]。由于这一方法同时具有组织化学的特色,又称做“原位杂交组织化学”方法。近年来,一些实验室已经成功地用这一方法对组织中特异 mRNA 的定位和调控进行了研究^[2-5]。本实验室建立了这一方法,并运用于 POMC mRNA 在垂体前叶及中叶中的分布及含量的检测。为提高检测灵敏度,使用了反意义 RNA 探针。这种探针用于核酸杂交具有特异性好、比活性高、本底低的优点。探针是用体外转录反应^[6]酶促合成的。所得杂交结果与文

献报道的用互补 DNA 探针或寡聚核苷酸探针得到的结果^[1,7-9]相符。

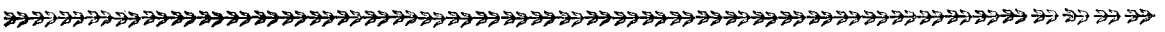
材 料 和 方 法

一、动物及组织制备

雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (250g, 上海实验动物中心),腹腔注射戊巴比妥钠 (150mg/kg) 麻醉,经心脏灌流 0℃ 生理盐水 500ml,然后换用甲醛灌流液 (4% 甲醛, 5% 蔗糖, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.2) 500 ml。取出垂体,置 4% 甲醛溶液中,固定 1h 后,转入 15% 蔗糖溶液 (0.02 mol/L 磷酸缓冲生理盐水配制), 4℃ 放置过夜。组织块用干冰冷冻,在 -20℃ 的冰冻切片中切成 10 μl 厚的片,贴在预先经多聚赖氨酸处理过的载玻片上, -40℃ 低温保存。

二、反意义 RNA 探针的制备

pSP65-P1 质粒 (S. J. Watson 赠送) 的启动子下游 EcoR I 与 Hind III 位点之间含有倒转的小鼠 POMC mRNA 片段。此质粒用限



8 朱俭等. 生物化学实验. 上海: 上海科技出版社, 1981: 186-190

9 VaLentin M *et al.* *Journal of Applied Biochemistry*, 1983; 5:420-428

10 Muzzarelli R A A. *Chitin*, Oxford: Pergamon Press, 1977:105-149

[本文于 1989 年 7 月 14 日收到]