

Western blot analysis confirmed that positive clones were able to express about 50 ku proteins after induced with IPTG. These data indicate that four positive clones express the human Fab

fragment with antigen specificities.

Key words PCR, phage antibody library, human antibody

壳聚糖固定化纤维素酶的研究

陈 盛 黄智跃 刘艳如

(福建师范大学高分子研究所, 福州 350007)

摘要 以蟹壳为原料提取壳聚糖, 用戊二醛作交联剂, 将纤维素酶固定于壳聚糖上. 同时探讨了一定量壳聚糖载体与交联剂浓度、给酶量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、最适温度、离子强度的影响及使用半衰期等理化性质进行了探讨.

关键词 纤维素酶, 戊二醛, 壳聚糖, 固定化

近年来壳聚糖作为固定化酶载体的研究引起了不少学者重视^[1,2]. 壳聚糖是从蟹、虾等甲壳动物废弃的外壳中提取的一种氨基多糖, 它来源丰富, 制备较简单, 应用广泛. 壳聚糖学名为: 2-氨基-1, 4- β 葡聚糖. 在蟹壳中它与蛋白质及无机盐交织成网状结构, 在去除钙盐和蛋白质之后, 其机械性能大为改善, 而且化学性质稳定, 耐热性好, 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, 同时又易通过接枝而改性. 是一种亟待开发利用的固定化酶的良好载体.

据文献 [3] 报道, 壳聚糖与戊二醛发生 Schiff 反应, 再与酶发生 Schiff 反应制得的固定化酶活力最高. 因此, 本文将通过壳聚糖与戊二醛交联, 再将纤维素酶固定化, 并对固定化酶的最适条件及稳定性、最适 pH 值、最适反应温度, 表观米氏常数、离子强度对酶活力的影响及该固定化酶的使用半衰期等理化性质进行了探讨.

1 材料与方法

1.1 材料

蟹壳, 自己收集. 纤维素酶, Sigma 产品.

底物, 羧甲基纤维素钠盐, 购自上海化学试剂采购供应站. 戊二醛, 生化试剂, 上海化学试剂站分装厂 (按 25% 计). 壳聚糖从蟹壳制备, 40 目, 脱酰度 60% 左右. 3, 5-二硝基水杨酸, 湖州生物化学厂产品. 其他试剂均为分析纯.

仪器: 721 分光光度计, 上海第三分析仪器厂产品; 电热恒温水浴锅, 武汉建新器械厂产品; 800 型离心沉淀器, 上海手术器械厂产品; NDJ-1 型旋转粘度计, 上海天平仪器厂出品.

1.2 方法

1.2.1 壳聚糖载体的制备: 将洗净晒干的蟹壳经稀酸浸泡脱钙和稀碱煮沸脱蛋白质反复处理 2 至 3 次, 得白色几丁质. 几丁质再经 50% 浓碱于 80℃~100℃ 保温 5~6 h, 趁热取出洗涤, 晒干即得白色壳聚糖^[4].

1.2.2 纤维素酶的固定化: 称取一定量 40 目壳聚糖, 加入一定浓度的戊二醛, 室温下搅拌 3.5 h, 静置过夜, 离心弃去上清液, 水洗 3 次以除去残余戊二醛, 抽滤. 往交联后的壳聚糖中加入纤维素酶, 室温下搅拌 2.5 h 后, 转入冰箱中于 4℃ 静置过夜. 离心弃上清, 水洗 3 次, 抽滤即得固定化酶.

1.2.3 酶活力测定：原酶活力测定按文献[5]进行。固定化酶活力测定：在一定量固定化酶中（一般取0.1~0.5 g）加入一定量（一般为3.0 ml）羧甲基纤维素钠盐溶液，40℃水浴保温10 min后离心5 min，吸取反应液2.0 ml，加入0.4 ml 2 mol/L NaOH溶液，加入0.8 ml 3,5-二硝基水杨酸显色剂，定容至6.2 ml，沸水浴中加热5 min后流水冷却，在721分光光度计（490 nm）测定吸光度 A （1 cm 比色皿）。

2 结 果

2.1 戊二醛浓度对固定化酶活力的影响

取6份0.1 g 40目壳聚糖于6个小烧杯中，分别加入不同浓度的戊二醛（1%~6%）溶液5.0 ml，磁力搅拌3.5 h，移至离心管中离心分离，洗涤3次以除去残余的戊二醛，往交联物中分别加入4.0 ml（1 g/L）的纤维素酶溶液，放入4℃冰箱中，每小时搅拌1次，持续24 h，离心弃去上清液，水洗3次，得固定化酶。按上述方法测定固定化酶活力，结果如图1所示。

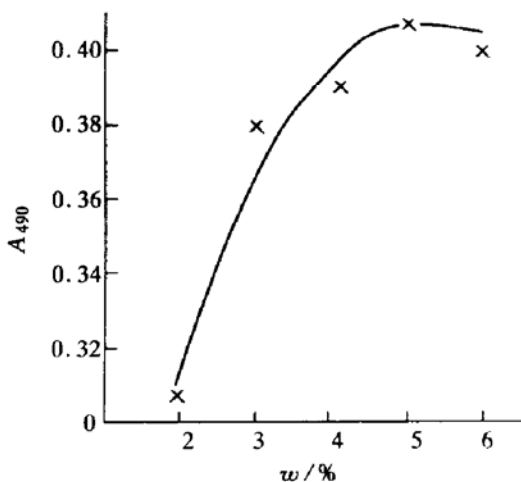


图1 戊二醛浓度对固定化酶活力的影响

图1表明，固定化酶活力随戊二醛浓度增大而增大，但当戊二醛浓度达5%时，固定化酶活力达最大。这说明，5%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可达最大。

2.2 给酶量对固定化酶活力的影响

平行取6份0.1 g壳聚糖与5%戊二醛的交联物，各加入不同量的酶液（1 g/L）使之固定化，按同样方法测定酶活力，结果见图2。

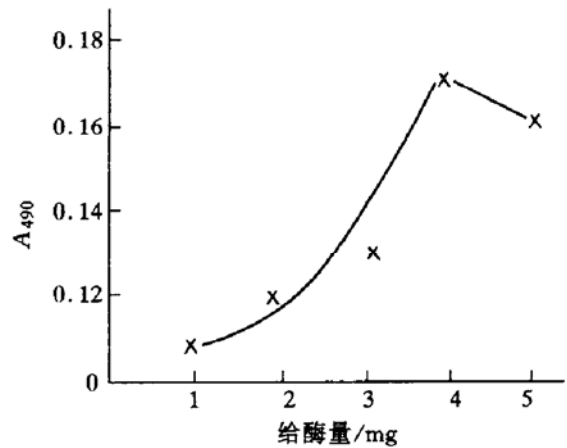


图2 给酶量对固定化酶活力的影响

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，所制得的固定化酶活力随给酶量增加而增大，当结合位点饱和后，增加给酶量却不增大酶活力。图2表明，在本实验条件下，0.1 g干壳聚糖与5%戊二醛交联后，固定4.0 mg纤维素酶效果较好。酶活力回收率为75%。

2.3 pH值对酶活力的影响

平行取固定化酶0.1 g和原酶0.5 ml（1 g/L）各9份，分别在不同pH值条件下测定酶活力，结果见图3。

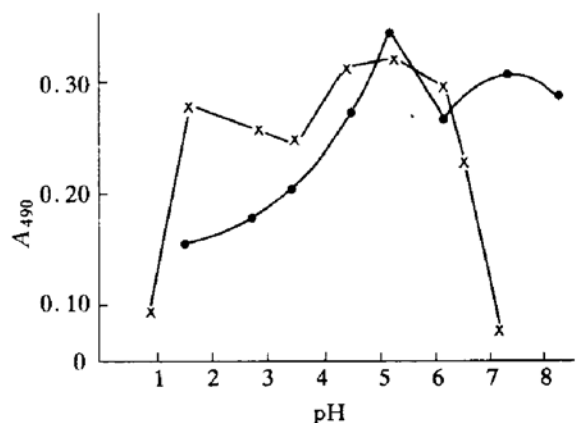


图3 pH值对酶活力的影响

x—x：固定化酶；●—●：原酶。

据文献 [6] 报道, 纤维素酶的最适 pH 大多偏酸性, 但不同来源的纤维素酶的最适 pH 有所不同. 在本实验条件下 (图 3), 纤维素原酶的 pH 值在 5.2 和 7.2 时, 活力较大, 而固定化酶的 pH 在 1.6 和 5.0 时活力较大, 且适宜的 pH 值范围较宽. 由于壳聚糖是阳离子型载体, 因而固定化酶的最适 pH 比原酶要低^[7]. 从图 3 可见, 在本实验条件下, 固定化酶的最适 pH 值较原酶往酸性方向移, 且在弱酸性范围 (pH 1.5~6.5) 内受 pH 的影响较小. 这与文献 [7] 和 [8] 报道结果一致.

2.4 原酶与固定化酶米氏常数的比较

平行取固定化酶 0.1 g 与原酶 0.5 ml (1 g/L) 各 6 份, 分别与一定量 (3.0 ml) 不同浓度 (0.1%~0.6%) 底物于 40℃ 水浴中反应 15 min, 测其吸光值, 用双倒数法作图, 求得米氏常数 (图 4).

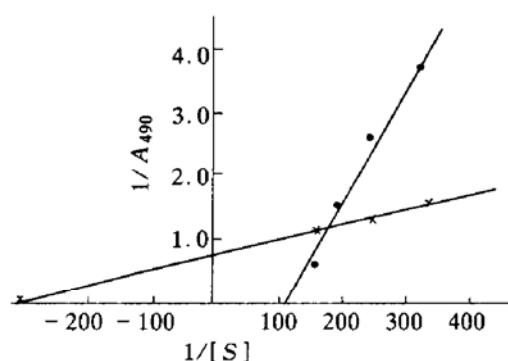


图 4 原酶与固定化酶的 K_m 值

x—x: 固定化酶; ●—●: 原酶.

由图 4 可求得 $K'_m(\text{固}) = 3.7 \times 10^{-3} \text{ g/L}$, $K_m(\text{原}) = 7.7 \times 10^{-3} \text{ g/L}$, 说明该纤维素酶在固定化后, 表观米氏常数减小, 表明该纤维素酶经固定化后, 与底物的亲和力有所增加.

2.5 离子强度对酶活力的影响

平行取固定化酶 0.1 g 和原酶 0.5 ml (1g/L) 各 9 份, 分别在不同离子强度条件下 (0.02~0.20 mol/L NaCl) 测定酶活力, 结果见图 5.

从图 5 可知, 离子强度对原酶具有一定激

活作用, 原酶活力随离子强度的增加而平稳上升; 而离子强度对固定化纤维素酶活力具有一定抑制作用, 固定化酶活力随离子强度的增加而逐渐下降, 二者呈现相反的结果. 这可能是由于酶经固定化后, 高级结构有所变化而影响酶分子中的离子键所致.

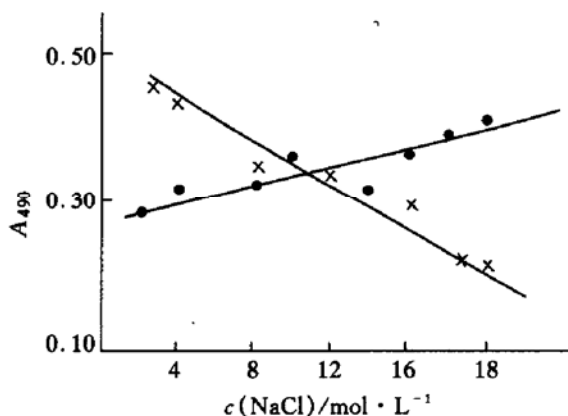


图 5 离子强度对酶活力影响的比较

x—x: 固定化酶; ●—●: 原酶.

2.6 温度对酶活力的影响

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原酶高, 对热的稳定性也较原酶高.

平行取 0.1 g 固定化酶和原酶 0.5 ml (1g/L) 各 6 份, 分别在不同温度 (30~80℃) 条件下, 测定酶活力, 从图 6 可见, 原酶的最适温度为 50℃, 曲线走向较陡峭, 表明受温

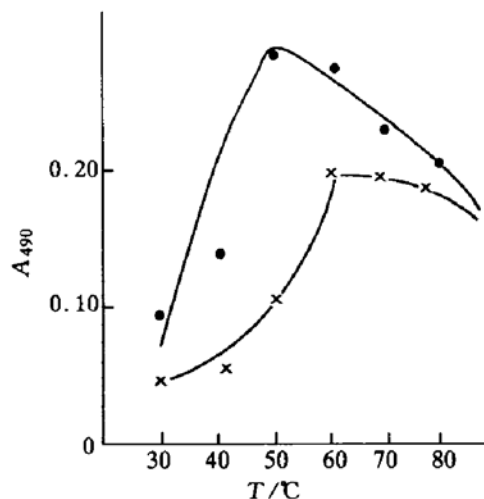


图 6 温度对酶活力的影响

x—x: 固定化酶; ●—●: 原酶.

度影响较敏感, 这与文献 [6] 一致. 而固定化酶在 60~80℃ 范围内活力都较高. 这表明纤维素酶经壳聚糖固定化之后, 对热的稳定性明显提高.

2.7 原酶与固定化酶的热稳定性比较

平行取 0.1 g 固定化酶和原酶 0.5 ml (1g/L) 各 10 份, 把原酶置于 60℃ 水浴中, 固定化酶置于 80℃ 水浴中, 每间隔 10 min 取出一支按上述方法分别测定其活力, 持续 100 min (图 7).

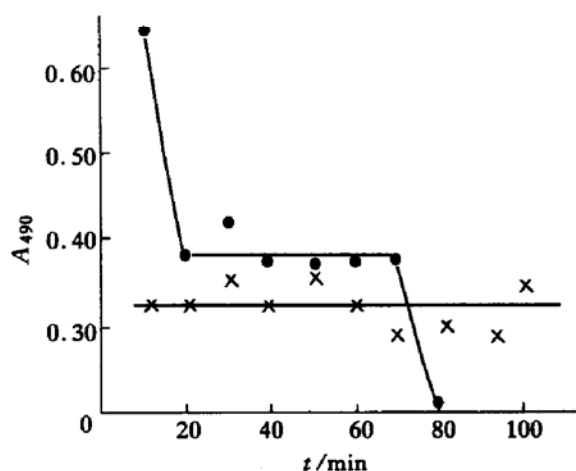


图 7 原酶与固定化酶热稳定性比较

×—×: 固定化酶 (80℃); ●—●: 原酶 (60℃).

结果表明, 原酶在 60℃ 水浴中保持 20 min 后, 酶活力明显下降, 经过 20~70 min 的平稳期后, 酶活力再次下降, 80 min 时已无活力. 而固定化酶在 80℃ 水浴中保持 1.5 h 后酶活力未见不同, 可见固定化酶比原酶具有高得多的热稳定性.

2.8 固定化酶的操作半衰期

该固定化纤维素酶经 60 d, 隔日重复测试, 酶活力未见明显下降, 在第 85 天测定时, 残余酶活力为 53%. 表明该固定化酶在本实验条件下, 半衰期至少为 85 d.

3 讨 论

本文以干壳聚糖直接与戊二醛交联, 并将纤维素酶固定化. 通过实验测定发现, 固定化

酶的活力受到载体性能、交联剂用量、载体与酶的比例, 以及环境的温度、pH 值、离子强度等因素的直接影响. 作为载体的壳聚糖是一种氨基多糖, 属阳离子型载体, 其分子中的氨基含量随几丁质脱乙酰度不同而异, 脱乙酰度高, 其分子中氨基含量大, 所需交联剂浓度就大. 本研究采用自制壳聚糖, 脱乙酰度在 60% 左右. 实验结果表明, 0.1 g 壳聚糖 (干) 与 5% 戊二醛交联, 与 4.0 mg 纤维素酶固定结合, 效果较好, 酶活力回收为 75%.

通过固定化纤维素酶和原酶的一些理化性质比较, 发现固定化酶的最适 pH 向酸性方向移动, 且在弱酸性范围内受 pH 影响较小; 固定化酶与底物亲和力略有增大; 固定化酶在 60~80℃ 范围内, 其活力均较大, 而原酶在高于 60℃ 的条件下其活力急剧下降, 说明该纤维素酶经壳聚糖固定化后, 理化性能得到改善, 特别是热稳定性明显优于原酶. 这种来源广泛, 制备简单, 价格低廉的壳聚糖作为载体, 把纤维素酶固定化后, 酶活力回收率较高, 热稳定性很好, 操作半衰期长, 容易回收并可重复使用, 可望为今后工业化酶法分解纤维素成为葡萄糖的实际应用等提供有价值的参考资料.

参 考 文 献

- 1 千烟一郎, 胡宝华等译. 固定化酶, 第一版. 河北: 河北人民出版社, 1981: 6~9
- 2 Shinsaku H, Perfecto F. Agric Biol Chem, 1982; 46 (6): 1639
- 3 申炳华, 冯 涛, 刘鸿铭等. 北京师范大学学报, 1986; (1): 67
- 4 陈 盛, 吴海生. 生物化学与生物物理进展, 1990; 17 (5): 383
- 5 B. 施特尔马赫. 钱嘉渊译. 酶的测定方法, 第一版. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 102~118
- 6 张树政, 袁中一. 酶制剂工业 (下册), 第一版. 北京: 科学出版社, 1984: 598~599
- 7 张树政, 袁中一. 酶制剂工业 (上册), 第一版. 北京: 科学出版社, 1984: 374~378
- 8 袁中一, 刘树煌, 袁静明. 固相酶与亲和层析, 第一版. 上海: 上海科学技术出版社, 1975: 27~46

Study on Chitosan-immobilized Cellulase. Chen Sheng, Huang Zhiyue, Liu Yanru (*Institute of Polymer Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China*).

Abstract Chitosan was obtained from crab shells by treating with HCl and NaOH. The conditions of cellulase immobilized on chitosan by glutaraldehyde were studied. The results indicated that the immobilized-cellulase prepared by 0.1 g dry chitosan cross-linking with 5%

glutaraldehyde and then combining with 4.0 mg cellulase showed higher cellulase activity and better activity recoveries (75%). And some characters of immobilized and native cellulases, such as optimum temperature Michaelis constant and the effect of ionic strength, stabilities to heat and repeat operation were studied and compared.

Key words chitosan, cellulase, immobilization, glutaraldehyde

肾炎致病原重组受体相关蛋白的表达及纯化^{*}

胡迎青 张卫苏 朱爱平 夏之银

(南通医学院分子生物学研究室, 南通 226001)

摘要 用 pGEX 载体系统体外构建了 Heymann 肾炎致病原受体相关蛋白 (RAP) 重组表达质粒, 经 IPTG 诱导, 该质粒表达的融合蛋白在大肠杆菌中得到了高效表达, 其表达量达 39.4%, 经 GST-Sephrose 4B 亲和层析, 得到了高度纯化, 其诱导产生的抗体经蛋白质印迹法分析证明能识别肾皮质天然抗原 44 ku 受体相关蛋白. RAP 表达及纯化的成功为研究致病原病理表型提供了有利条件.

关键词 受体相关蛋白, 表达, 纯化

大鼠 Heymann 肾炎 (HN) 在免疫组织化学、超微结构和临床症状上和人类膜性肾病酷似. 为探讨其免疫复合物沉积的机理及病理表型, 我们用克隆的受体相关蛋白 (RAP)-cDNA^[1] 构建了重组受体相关蛋白-谷胱甘肽巯基转移酶融合蛋白 (GST-RAP) 表达载体, 在大肠杆菌中得到了高效表达. 其表达蛋白经亲和层析得到了高度纯化. 蛋白质印迹法分析证明, 针对融合蛋白的抗体可以和肾皮质天然抗原 44 ku 受体相关蛋白结合. 我们用 pGEX 载体系统在 DH5 α 菌株中成功地高效表达了 GST-RAP, 并对其方法作了些探索与比较, 寻找出最佳诱导时间. GST-RAP 高效表达成功为进一步研究 HN 致病原的病理表型提供了准备.

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

pGEX 载体购自 Pharmacia 公司, DH5 α 菌株购自 BRL 公司, RAP-cDNA 片段见文献 [1].

1.2 主要试剂

异丙基硫代 β -D-半乳糖苷酶 (IPTG)、内切酶系列、T4 DNA 连接酶、琼脂糖购自 Promega 公司. GST-Sephrose 4B 层析柱购自 Sigma 公司.

1.3 重组融合蛋白 GST-RAP 的构建

提取 RAP5B1 质粒^[1], 用 EcoR I 酶切,

^{*} 国家自然科学基金资助课题.

收稿日期: 1995-08-07, 修回日期: 1995-11-02