

Laboratory Press, 1990: 970~974

- 5 Shweinfst C W, Kelly W H, Gu J R *et al.* Genet Annal Tech Appl, 1990; 7: 64
- 6 冯 骆, 王秀琴, 吴 旻等. 中华医学杂志, 1990; 70 (4): 228
- 7 Steinman R A, Hoffman B, Irol A *et al.* Oncogene, 1994; 9: 3389
- 8 Jiang H P, Lin J, Su Z *et al.* Oncogene, 1994; 9: 3397

**A Strategy for Isolating Differentially Expressed Gene From Human Cells.** Li Baiquan, Wu Min (*National Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China*).

**Abstract** A subtractive hybridization system for isolating differentiation associated gene from human cancer cell line is developed. By using the strategy of differentiation-inducing in combina-

tion with cDNA-cDNA subtractive hybridization, a subtracted cDNA library from human lung adenocarcinoma cell line before and after treatment with all-*trans* retinoic acid (RA) was established. Three cDNAs response to RA treatment were obtained by screening of the subtracted cDNA library. The results of sequencing and function analysis show that three cDNAs are novel cDNAs of differentiation associated genes in human lung adenocarcinoma cell line. This system is also suitable for isolating cDNAs representing deleted or overexpressed gene in human cells.

**Key words** subtractive hybridization, differentiation associated gene, cDNA clone, retinoic acid, lung neoplasm

## 有机溶剂中固定化脂肪酶催化硅醇的酯化反应\*

邱树毅 姚汝华 宗敏华 伍 红<sup>1)</sup>

(华南理工大学生物工程系, 广州 510641)

**摘要** 固定化 *Mucor miehei* 脂肪酶可催化有机硅醇和脂肪酸的酯化反应. 对固定化酶用量、脂肪酸链长、不同有机硅醇底物、有机溶剂极性和水含量等影响因素进行了初步研究.

**关键词** 固定化脂肪酶, 有机溶剂, 硅醇, 酯化反应

有机溶剂中酶的催化反应是酶工程研究的热点之一. 酶在有机溶剂中的催化反应有许多优点<sup>[1,2]</sup>, 已应用于有机合成<sup>[3]</sup>、手性合成或光学拆分<sup>[4]</sup>、油和脂肪的修饰改造<sup>[5]</sup>、多肽合成<sup>[6]</sup>等各方面. 许多酶如脂肪酶、蛋白酶、脱氢酶、氧化酶等均可在有机溶剂中催化反应.

具有 Si—C 结构的有机硅化合物是非天然的人工合成物质. 利用酶对这类非天然物质的生物转化合成, 提供了酶反应和识别非天然物质的有关信息. 同时, 研究发现许多有机硅

化合物具有特殊的生物学活性, 作为药物比相应的碳结构类似物有更佳的药理效果和更低的毒副作用, 因而引起人们的研究兴趣<sup>[7,8]</sup>. 在有机溶剂中利用酶催化有机硅化合物的生物转化已有报道<sup>[9~11]</sup>, 但未见有用来自 *Mucor miehei* 的脂肪酶催化酯化反应的报道. 本文主要介绍利用上述脂肪酶催化有机硅醇与脂肪酸的酯化反应及其影响因素.

\*国家自然科学基金和广东省自然科学基金资助项目.

<sup>1)</sup>华南理工大学造纸国家重点实验室.

收稿日期: 1995-10-19, 修回日期: 1996-02-18

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

固定化脂肪酶, 来源于 *Mucor miehei*, 丹麦 NOVO 公司赠送. ( $\pm$ )1-三甲基硅-1-乙醇, 美国 Aldrich 公司产品. ( $\pm$ )1-三甲基硅-1-丙醇, ( $\pm$ )1-三甲基硅-2-丙醇, 日本田中教授赠送.

### 1.2 仪器

GC-14B 气相色谱仪配 C-R7A 色谱数据处理机, 日本岛津公司.

CPB-20 极性毛细管柱, 相当于 PEG-20M, 最高使用温度 250℃, 柱内径 0.2 mm, 柱长 25 m, 薄膜厚度 0.25~0.5  $\mu\text{m}$ . 日本岛津公司.

深圳产水浴控温振荡器.

### 1.3 方法

**1.3.1 酶的酯化反应:** 在 50 ml 带塞三角瓶中装入 10 ml 有机溶剂, 分别加入 10 mmol/L 有机硅醇底物和 10 mmol/L 脂肪酸底物及 5  $\mu\text{l}$  正十五烷作内标, 加入 200 mg 固定化脂肪酶于 30℃、120 r/min 条件下振荡反应, 一定时间间隔吸取 100  $\mu\text{l}$  反应液, 用气相色谱分析检测底物的减少或产物的生成.

**1.3.2 有机溶剂的水饱和及脱水:** 有机溶剂与水同时置密闭容器中平衡是为有机溶剂的水饱和; 用 0.3 nm 分子筛和无水  $\text{CaCl}_2$  吸附除去有机溶剂中的水分是为有机溶剂脱水.

**1.3.3 固定化酶颗粒除水:** 用真空冷冻干燥机除水.

**1.3.4 测定方法:** 用 GC-14B 气相色谱仪测定, 测定条件: 空气表压 50 kPa, 氢气表压 50 kPa, 氮气表压 300 kPa, 柱前压 100 kPa, 柱温 80℃ 维持 1.5 min, 然后以 30℃/min 程序升温至 180℃, 气化室温度 250℃, 检测器温度 250℃, 进样量为 1  $\mu\text{l}$ , 分流比为 1:100.

## 2 结果及讨论

### 2.1 固定化脂肪酶催化有机硅醇的酯化反应

实验研究了固定化脂肪酶在水饱和的正己

烷溶剂中催化有机硅醇与脂肪酸的酯化反应, 并对固定化脂肪酶用量进行了研究, 所得结果见图 1 及图 2. 可见, 固定化脂肪酶可以催化有机硅醇与脂肪酸在有机溶剂中的酯化反应, 在所用底物及反应条件下, 所用酶量以 200 mg 为宜.

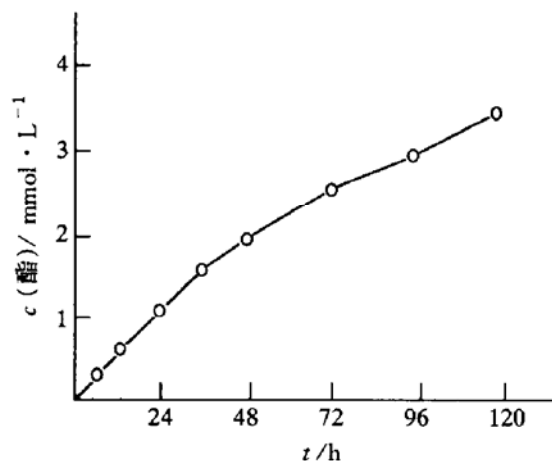


图 1 酶反应过程曲线

反应体系含水饱和正己烷 10 ml, ( $\pm$ )1-三甲基硅-1-乙醇 10 mmol/L, 戊酸 10 mmol/L, 正十五烷作内标, 200 mg 固定化酶, 30℃, 120 r/min 保温振荡反应.

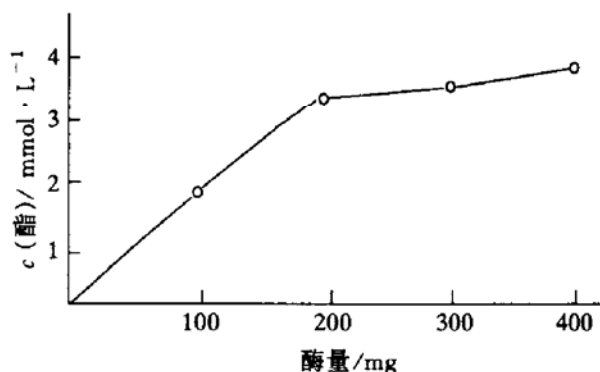


图 2 酶量与酯生成的关系

反应体系同前, 不同固定化酶量. 30℃, 120 r/min 条件下振荡反应 120 h.

### 2.2 不同底物对酶酯化反应的影响

不同来源的脂肪酶, 具有不同的底物特异性<sup>[12]</sup>. 固定化脂肪酶在有机溶剂中催化脂肪酸与醇的酯化反应时, 只对中等长度和长链脂肪酸有作用, 短链脂肪酸则不作用<sup>[13]</sup>. 在该酶催化有机硅醇与脂肪酸作用时, 其底物特异性又如何呢? 我们以丙酸、戊酸和辛酸为底

物, 在固定化脂肪酶催化下与 1-三甲基硅-1-乙醇和 1-三甲基硅-1-丙醇底物进行酯化反应, 所得结果见图 3.

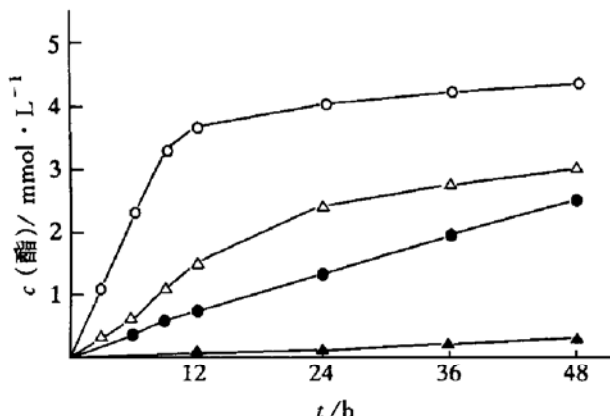


图 3 不同底物对酶酯化反应的影响

反应体系含固定化脂肪酶 200 mg, 不同底物 10 mmol/L, 30℃, 120 r/min 条件下振荡反应。○—○: 1-三甲基硅-1-乙醇 + 辛酸; ●—●: 1-三甲基硅-1-乙醇 + 戊酸; △—△: 1-三甲基硅-1-丙醇 + 辛酸; ▲—▲: 1-三甲基硅-1-丙醇 + 戊酸。

可见, 底物对酶酯化反应有影响, 短链脂肪酸丙酸作底物时, 该酶不能催化其酯化反应, 表明固定化脂肪酶不能作用短链脂肪酸。对醇底物, 两种底物三甲基硅乙醇和三甲基硅丙醇均可在固定化脂肪酶催化下酯化反应, 且三甲基硅乙醇比三甲基硅丙醇的酯化能力高。

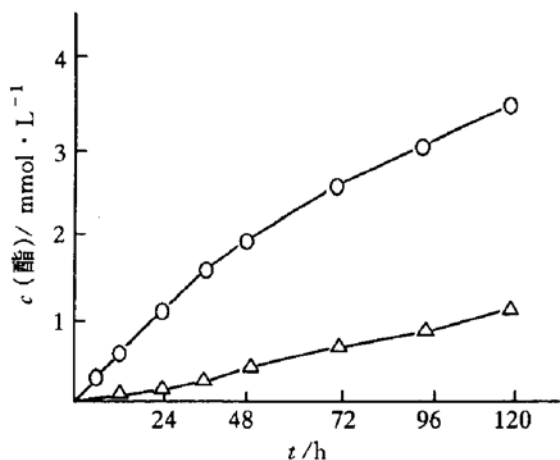


图 4 硅原子对酶催化酯化反应的影响

反应体系同前, 不同醇底物. 30℃, 120 r/min 振荡。○—○: 1-三甲基硅-1-乙醇; △—△: 3,3-二甲基硅-2-丁醇。

这可能是因为三甲基硅乙醇比三甲基硅丙醇有更小的立体障碍。脂肪酶在催化酯化反应时, 首先是形成酰基酶复合物中间体, 再在硅醇的亲核进攻下形成相应的酯<sup>[14]</sup>。当醇的立体障碍较大时, 则不利于其亲核进攻, 故三甲基硅乙醇比三甲基硅丙醇是更好的酰基受体。研究还发现硅醇是比其碳结构类似物更好的酰基受体 (图 4)。这是因为硅原子的电负性小, 这样形成的硅醇更有利于进攻酰基酶复合物中间体而生成相应的酯。采用 *C. Cylindracea* 脂肪酶催化有机溶剂中硅醇与脂肪酸的酯化反应亦有同样结论 (另文发表)。

### 2.3 有机溶剂对酶酯化反应的影响

有机溶剂对酶催化反应有影响<sup>[15]</sup>。在疏水性有机溶剂中, 通常酶具有活性且更加稳定, 而在极性有机溶剂中, 由于酶周围的必需

表 1 有机溶剂极性

有机溶剂	极性 (lgP) <sup>1)</sup>
四氢呋喃	0.49
甲 苯	2.5
环己烷	3.2
正己烷	3.5
庚 烷	4.0
辛 烷	4.5

<sup>1)</sup>P: 溶剂在 1-辛醇/水体系中的分配系数。

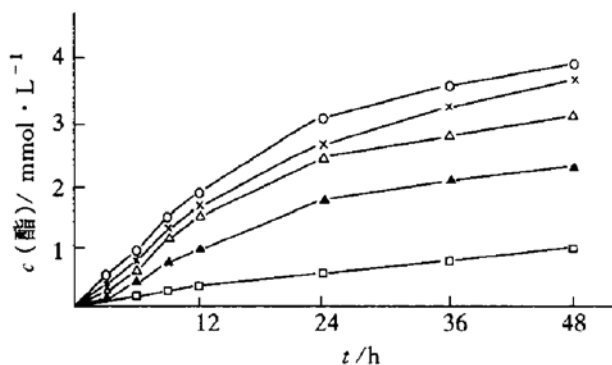


图 5 有机溶剂对酶酯化反应的影响

反应体系含不同有机溶剂 10 ml, 1-三甲基硅-1-乙醇 10 mmol/L, 戊酸 10 mmol/L, 内标正十五烷, 固定化脂肪酶 200 mg, 30℃, 120 r/min 振荡反应。○—○: 辛烷; ×—×: 庚烷; △—△: 己烷; ▲—▲: 环己烷; □—□: 甲苯。

水化层被剥去, 通常使酶失活. 比较了不同有机溶剂 (见表 1) 中固定化脂肪酶催化有机硅醇与脂肪酸的酯化反应, 所得结果见图 5. 四氢呋喃由于其极性很强, 可夺去酶分子周围的必需水化层, 从而使酶失去活性, 而在疏水溶剂中固定化脂肪酶具有催化活性, 随溶剂疏水性增加, 酶活力增加, 在疏水性更强的辛烷中, 酶的活力最大, 这与许多研究结果是一致的<sup>[16,17]</sup>.

#### 2.4 水含量对酶酯化反应的影响

水对有机溶剂中酶催化反应有影响, 水不仅影响酶的催化活性和稳定性, 还影响酶催化反应的速度和产物的生成<sup>[6]</sup>. 在有机相酶催化反应中, 水活度 ( $a_w$ ) 是一较好的指示有机相酶催化反应水影响的参数<sup>[18]</sup>. 实验比较了不同水活度条件下酶的催化反应, 将酶冷冻干燥以除去酶颗粒的水分, 将有机溶剂脱水, 然后再在不同水活度值的盐溶液中平衡, 使固定化脂肪酶和有机溶剂均处于相同的水活度, 再进行酶催化酯化反应, 由图 6 结果可见, 不

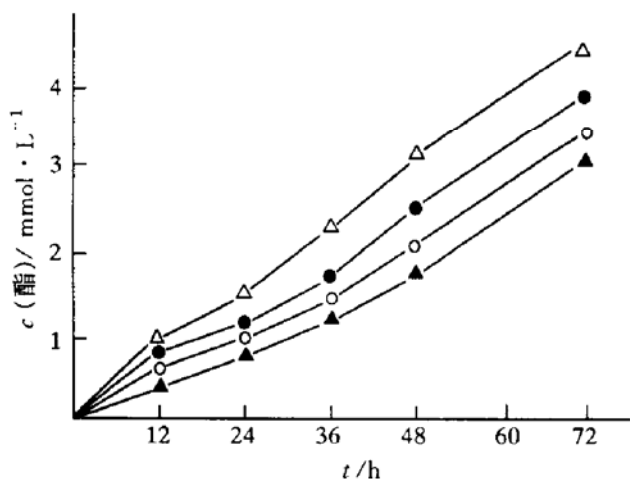


图 6 水活度对酶催化酯化反应的影响

反应体系同前, 不同水活度条件下的己烷溶剂. 30℃, 120 r/min 振荡反应. △—△:  $a_w = 0.43$ ; ▲—▲:  $a_w = 0.84$ ; ○—○:  $a_w = 0.53$ ; ●—●:  $a_w = 0.33$ .

同水活度  $a_w$  值条件下, 酶催化有机硅醇与脂肪酸酯化反应影响不同, 在较低水活度下, 由于酶的最适水含量未达到, 酶分子周围的必需

水少, 故酶反应速度低, 在较高水活度值时, 由于酶分子周围必需水含量过高, 底物和产物的扩散受到影响, 从而亦使酶反应速度低, 在所给条件下固定化脂肪酶催化有机硅醇与脂肪酸酯化反应的最适水活度为  $a_w = 0.43$ .

综上所述, 固定化脂肪酶可以在有机溶剂中催化有机硅醇与脂肪酸的酯化反应. 脂肪酸底物和硅醇底物对酶酯化反应有影响, 有机溶剂和水亦对固定化脂肪酶催化酯化反应有影响. 进一步进行这方面的研究, 如硅醇的光学拆分、反应动力学等均是有趣的研究方向.

#### 参 考 文 献

- 1 Dordick J S. Enzyme Microb Technol, 1989; 11: 194
- 2 Zaks A, Klivanov A M. J Biol Chem, 1988; 263: 3194
- 3 Klivanov A M. Chem Tech, 1986; 16: 354
- 4 Klivanov A M. Acc Chem Res, 1990; 23: 114
- 5 Zaks A, Empie M, Gross A. Trends Biotechnol, 1988; 6: 272
- 6 Gupta M N. Eur J Biochem, 1992; 203: 25
- 7 Tacke R, Zilck H. Endeavour (New Series), 1986; 10: 191
- 8 邱树毅, 姚汝华, 宗敏华. 广州化学, 1995; 2: 44
- 9 Kawamoto T, Fukui T, Tanaka A *et al.* J Biotechnol, 1991; 18: 85
- 10 de Jeso B, Belair N, Deleuze H. *et al.* Tetrahedron Letters, 1990; 131: 653
- 11 Fukui T, Zong M-H, Tanaka A *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1992; 38: 209
- 12 曹淑桂. 生物化学与生物物理进展, 1995; 22: 9
- 13 Miller C, Austin H, Posursk L *et al.* J Am Oil Chem Soc, 1988; 65: 927
- 14 Miller D A, Prausnitz J M, Blanch H W. Enzyme Microb Technol, 1991; 13: 98
- 15 Laane C, Boeren S, Vos K *et al.* Biotechnol Bioeng, 1987; 30: 81
- 16 Yang B, Kuo S-J, Hariyadi P *et al.* Enzyme Microb Technol, 1994; 16: 577
- 17 Valivety R H, Johnston G A, Suckling C J *et al.* Biotechnol Bioeng, 1991; 38: 1137
- 18 Halling P J. Trends Biotechnol, 1989; 7: 50

Immobilized Lipase Catalysed Esterification of Organosilicon Alcohol in Organic Solvent. Qiu

Shuyi, Yao Ruhua, Zong Minhua (*Department of Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China*).

**Abstract** Enzymatic catalysis in organic solvent is one of the most interesting topics. Immobilized lipase from *Mucor miehei* catalysed esterification of organosilicon alcohol in organic solvent

was exposed and the effect of various factors on the reaction was studied. The different organosilicon alcohol substrates and fatty acid substrates, organic solvent polarity and water contents etc. were studied.

**Key words** immobilized lipase, organosilicon alcohol, esterification, organic solvent

## 胚胎骨 I 型胶原的提取与鉴定

李成章 樊明文

(湖北医科大学口腔医学院, 武汉 430070)

**摘要** 应用酸性、中性交互提取法从人胚骨中提取 I 型胶原, 经 SDS-PAGE 电泳, 氨基酸分析和免疫学方法鉴定。结果表明所提胶原电泳区带与 I 型标准品相同, 环状沉淀反应阳性, 氨基酸分析甘氨酸占 1000 个氨基酸总残基的 1/3, 羟脯氨酸与脯氨酸之比为 0.65, 符合 I 型胶原特征, 并显示有较高的纯度, 可用于胶原制品的制作。

**关键词** 胶原, 提取, 人胚骨

胶原 (collagen) 是人体重要的细胞外基质成分。胶原是一个大的蛋白家族, 至少有 15 个型别<sup>[1]</sup>, 各型胶原都具有一定的分子构型和组织分布特点, 其中以 I 型胶原分布最广, 含量最多。胶原不仅作为组织的支持物, 而且对细胞、组织乃至器官行使正常功能及伤口愈合都有重大影响。近 20 年来, 世界各国已将胶原制品广泛应用于临床修复软组织缺损, 覆盖烧伤创面、整形、牙周引导组织再生、口腔种植体、牙槽嵴再建及颌骨空腔修复等领域<sup>[2]</sup>。本研究参照国外文献, 适当加以改进, 拟从人胚骨中提取 I 型胶原, 用于胶原制品的制作。

### 1 材料和方法

#### 1.1 标本前处理

取引产死胎新鲜长管骨, 去骨膜, 冷生理盐水洗净骨髓, 碎成小块, 置于铜制钵中, 加液氮, 捣成 20 目左右的骨粉。用冷生理盐水或 20% NaCl-0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液

(pH 7.5) 洗 3 次 (10 000 × g, 15 min), 将骨粉悬浮于 0.5 mol/L EDTA-0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5), 再装入透析袋中透析脱钙。应用火焰法 (Varian Spectr AA-30 型原子吸收光谱仪) 测定脱钙完全, 用冷蒸馏水洗 3 次, 去除 EDTA, 作为待提标本。

#### 1.2 抽提胶原

将脱钙骨粉浸入 0.5 mol/L HAc 24 ~ 48 h, 取上清缓慢加入研磨精细的 NaCl (终浓度为 4 mol/L), 搅拌过夜。离心 35 000 × g, 20 min (下同), 去上清, 其沉淀物加入 0.5 mol/L HAc 透析溶解, 离心, 取上清依次加入 0.1 mol/L Tris-HCl (终浓度为 0.01 mol/L), 5 mol/L NaOH (调 pH 至 7.4), NaCl (终浓度为 4 mol/L), 搅拌过夜, 离心, 去上清。沉淀以 4 mol/L NaCl-0.05 mol/L Tris-HCl 洗一次, 再加 0.5 mol/L HAc 透析溶解, 离心去沉淀, 上清装入透析袋内, 对 NaCl 溶液透析 (平衡后 NaCl 浓度