

白质变性,以便在洗柱过程中去除蛋白质,抑制各种核酸酶对 DNA 的降解.我们曾用 Pharmacia 公司的疏水介质 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 进行类似的处理,发现这种介质也能起到纯化 DNA 的作用,但其缺陷是抽滤液体流速太慢,这进一步支持了我们关于树脂类型的推测.

通过对试剂盒组分的研究,我们打破了厂家对同种类不同试剂盒应用范围的限制,在 Wizard Minipreps DNA 纯化系统的说明书中,厂家明确指出该试剂盒不能用于纯化琼脂糖凝胶中的 DNA,但我们通过试验发现原装试剂盒与再生试剂盒都能用于从琼脂糖凝胶中回收 DNA,进行 PCR 产物的纯化,核酸的 clean up,甚至 λ 噬菌体和腺病毒 DNA 的纯化,只是在各种用途中条件略有改变,在 PCR 纯化、从胶中回收 DNA、clean up 时洗柱液用 80% 异丙醇,在纯化病毒 DNA 时,最后洗脱时要 75 °C 的热水或 TE,在高温水浴中孵育,洗脱效果更好,上述所有操作所获得的 DNA 均可直接进行下一步分子操作.

这种简单的树脂再生方法使试剂盒的成本降低 7 倍,从而使该试剂盒能被更广泛地接受.

参 考 文 献

- 1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989. 1.25~ 1.28
- 2 赵永芳等编. 生物化学技术原理及其应用. 湖北: 武汉大学出版社, 1987. 41~ 42

The Recycle of Magic/ Wizard DNA Purification Kit. YUAN Yong, SONG Quan-sheng, LIU Hong-tao, DI Chur-hui, WANG Yurgang (*Department of Immunology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract DNA purification is commonly used in molecular biology procedures. Promega's Magic/ Wizard DNA purification systems make this laborious and time-consuming work easy, but most laboratories in developing countries can not afford the price of this disposable kit. A simple method to recycle the kit was successfully developed. The performance of recycled kit shows no significant difference compared with the original one. The method makes this powerful tools acceptable to most laboratories.

Key words DNA purification, kit, recycle

固定化尿酸酶丝素膜的性质及其尿酸传感器*

张雨青 顾仁敖¹⁾ 朱江²⁾ 曹佩根¹⁾

(苏州大学蚕桑学院, 苏州 215151)

摘要 应用电化学分析法对固定化酶丝素膜的性质进行了分析,结果表明这种酶经丝素膜固定后,活性得率高、性能稳定、能长期存放.用这种酶膜和氧电极等组成的流动注射分析式尿酸传感器对生物样品进行的百次重复分析结果表明,这种传感器的重现性良好,每小时能分析 60 个人血清样品.

关键词 固定化尿酸酶丝素膜,尿酸传感器,氧电极,流动注射分析

学科分类号 O629.8

* 江苏省教委自然科学基金资助课题 (970054). ¹⁾ 苏州大学化学化工学院, 苏州 215151.

²⁾ 苏州大学水产学院, 苏州 215151. 收稿日期: 1997-05-13, 修回日期: 1997-09-22

近年来, 我们应用溴化锂或氯化钙溶解家蚕丝素后分别研制出二种固定化过氧化物酶和葡萄糖氧化酶丝素膜. 对这些酶膜的性能与结构作了研究, 结果表明这些酶膜的活性得率高, 性能稳定, 能长期存放. 丝素膜是一种良好的固定化酶的生物材料^[1-3]. 用固定化葡萄糖氧化酶丝素膜和氧电极等, 我们研制了一种流动注射分析式葡萄糖传感器^[3]. 在这种传感器上, 一片直径不到 1 cm 的酶膜能反复使用一千多次, 能连续分析测定 2 至 4 个月. 因此, 这种酶膜有可能在临床诊断和发酵工业快速检测中得到的应用. 本文简要报道固定化尿酸酶丝素膜的性质及其在尿酸传感器中的应用.

1 材料与方法

1.1 试剂

分析纯尿酸 (进口分装) 溶于 10% 的三乙醇胺溶液配制成尿酸标准溶液. 尿酸氧化酶 (EC 1.7.3.3, Type 1, 2 U/ml) 为 Sigma 产品, 溴化锂等其余试剂为分析纯.

1.2 酶膜的制备

水溶性丝素的制备和固定化尿酸酶丝素膜的制备按作者以前报道的方法进行^[1,2]. 本实验所用的酶膜是 1995 年 8 月 9 日制备的, 保存至 1996 年 10 月初在本实验中进行试验使用.

1.3 固定化酶的活性测定

酶膜的活性测定按以前报道的方法进行电化学测定^[4]. 在每次测定时, 先在反应槽内加入 2 ml 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 8.50), 然后, 加入二片直径为 7 mm 的酶膜或一定量尿酸酶液, 磁力搅拌, 恒温于 (37 ± 0.1) °C, 待记录仪的基线平稳后加入一定量 100 mmol/L 尿酸标准溶液于反应液内. 由于酶反应消耗氧, 使溶液中的溶解氧浓度逐步下降, 在积分仪上记录氧消耗速率的初始斜率 (μV/min). 以游离尿酸酶活性为 100%, 计算固定化尿酸酶的相对活性.

1.4 尿酸传感器的构造与工作原理

尿酸传感器采用流动注射分析系统, 由样品混合器, 恒流泵, 覆盖酶膜的氧电极、流动

池、热交换器、循环恒温水浴锅、溶氧控制器和积分仪组成. 当一定量的试液注入样品混合器后, 与流速为 1.5 ml/min 的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.50) 混合, 一起经热交换器恒温 (32 ± 0.1) °C, 再进入反应室在固定化酶催化下进行氧化反应, 使反应液中溶解氧浓度下降, 这样, 氧电极就产生差异电流响应峰, 由积分仪记录下来, 当溶液中的尿酸经载流液洗脱离开酶反应室后, 电极很快回到起始状态, 信号随即回到基线, 就可以进行第二次注射分析.

2 结果与讨论

2.1 酶膜的性能

酶与丝素水溶液一起干燥成膜后, 还是一种水溶性酶膜, 酶还没有被固定. 所以, 按以前报道的方法用甲醇溶剂浸渍 1 min 后, 酶能牢牢地被固定, 同时就成为不溶于水的酶膜^[3]. 经电化学方法分析测定表明这种固定化尿酸酶的活性回收率象我们以前报道的固定化过氧化物酶和葡萄糖氧化酶一样, 高达 90%.

温度对丝素膜中固定化酶活性的影响只在 20~ 37 °C 的范围内进行调查. 从这个区域来看, 固定化酶的活性与游离酶一样, 随反应温度的升高而升高, 几乎呈线性, 只是线性斜率稍有差异.

游离尿酸酶的最适范围偏于碱性, 在 pH 7.50~ 9.50 之间, 而固定化酶的最适范围向酸性方向加宽, 在 pH 6.50~ 9.50 的范围内 (图 1). 所以, 这种酶膜很适合于测定 pH 值波动较大的样品.

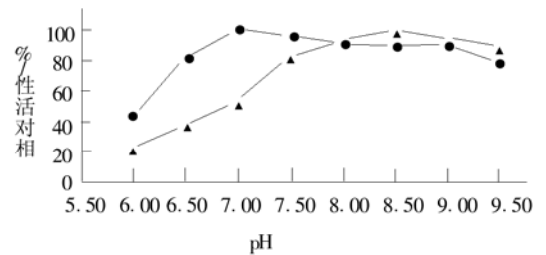


图 1 pH 对丝素膜中固定化尿酸酶活性的影响
▲ — ▲: 游离酶; ● — ●: 固定化酶.

游离酶和固定化酶在指定温度的缓冲液中分别保温 15 min 后, 取出酶膜用缓冲液冲洗数次后, 立即进行分析, 结果由图 2 所示. 在 40℃ 以上保温后, 游离酶活性比固定化酶活性下降幅度要大得多. 象其他酶一样^[1~3], 尿酸酶经丝素膜固定后对热的稳定性也有较大提高.

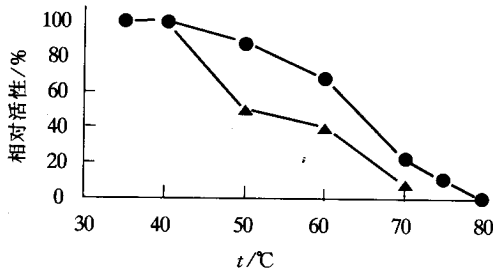


图 2 丝素膜中固定化尿酸酶的热稳定性

▲—▲: 游离酶; ●—●: 固定化酶.

本实验所用的酶膜已保存达一年以上, 其酶活性没发生任何变化. 在前面的酶膜性能分析试验中, 都是使用同样的酶膜. 而且, 这种酶膜能随取随用, 用后能继续保存待以后使用. 这些性能非常有利于丝素膜的商用开发.

2.2 在尿酸生物传感器中的应用

以固定化尿酸酶丝素膜和氧电极为基础, 我们研制了一种流动注射分析式尿酸传感器. 当一系列不同浓度的尿酸标准液分别注入传感器后, 典型的尿酸差异电流响应峰的校正曲线由图 3 所示. 在此传感器上, 尿酸浓度在 0.25~10.0 mmol/L 的范围内, 线性方程为

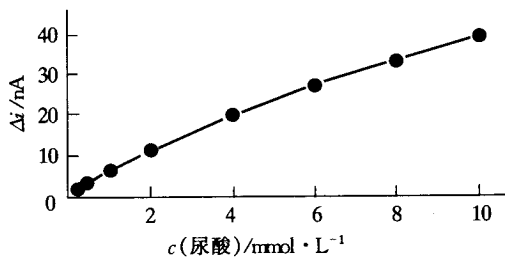


图 3 尿酸在生物传感器上的典型校正曲线

实验条件: 0.640 V 极化电压, 50 μl 样品量, 图中数值为重复测定三次的平均值.

$y = 0.6874 + 5.2268x$, $r = 0.9954$, 线性较差. 当在 0.25~2.0 mmol/L 的较窄范围内, 则线性相关性有所提高 ($r = 0.9981$). 应用这种传感器对尿酸标样、人血清和尿液分别作了 100 次重现性分析, 经统计分析, 它们的相对标准差分别为 2.37%, 3.72% 和 2.95%. 图 4 是人血清样品在尿酸传感器上百次分析的部分原始记录图. 当注射 50 μl 血清时, 其在传感器上的响应时间不足 60 s. 因此, 它每小时能分析 60 个血清样品以上. 另外, 一片酶膜在这种传感器上能反复测定一二千次. 从这些结果来看, 这种酶膜有希望在尿酸传感器上得到应用. 目前, 我们正在对这种尿酸传感器的性能作进一步的研究, 以及与目前医院中常用的酶法作相关性分析和实用性研究.

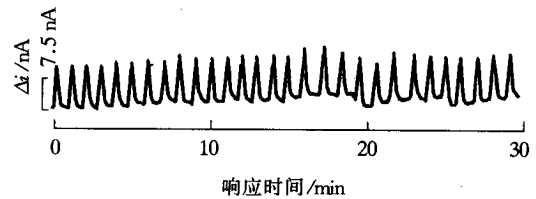


图 4 人血清样品百次重复测定的部分原始记录图

参 考 文 献

- 1 张雨青, 周玉珍. 固定化酶丝素膜的制备及其性质. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22 (2): 162~165
- 2 张雨青, 周玉珍. 过氧化物酶在丝素膜中的固定化及其活性研究. 苏州丝绸工学院学报, 1995, 15 (2): 99~103
- 3 Zhang Y-Q, Zhu J, Shen W-D *et al.* Immobilization of glucose oxidase in silk fibroin membranes, their characteristics and application to biosensor. J Suzhou Univ, 1997, 13 (2): 118~125
- 4 Demura M, Asakura T. Immobilization of glucose oxidase with Bombyx mori silk fibroin by only stretching treatment and its application to glucose sensor. Biotechnol Bioeng, 1989, 33: 598~603

The Characterization of Uricase-Immobilized Silk Fibroin Membrane and Its Application to Biosensor for Uric Acid. ZHANG Yu-qing, GU Ren-ao, ZHU Jiang, CAO Pei-gen (School of Sericulture, Suzhou University, Suzhou 215151, China).

Abstract Uricase-immobilized silk fibroin membrane was characterized by means of electrochemistry method. When uricase was immobilized in silk fibroin membrane, the immobilized uricase was improved largely at its stability to heat and pH, and it can be stored for long time. Based on this uricase membrane and oxygen electrode, an amperometric sensor has been devel-

oped for measurement of uric acid in flow injection analysis. The biosensor has a good reproducibility for repeatedly monitoring biosamples for 100 times respectively and is capable of detecting over 60 serum samples per hour.

Key words uricase-immobilized fibroin membrane, urate sensor, oxygen electrode, flow injection analysis

中国科技期刊排行表* (按被引频次和影响因子排序)

生物学类:

名次	期刊名称	被引频次	名次	期刊名称	影响因子
1	植物学报	943	1	植物生态学报	0.4556
2	植物生理学通讯	553	2	植物学报	0.4286
3	植物生理学报	489	3	遗传学报	0.3926
4	遗传学报	419	4	植物生理学报	0.3860
5	生物化学与生物物理进展	383	5	古脊椎动物学报	0.3265
6	植物分类学报	366	6	细胞生物学杂志	0.2857
7	生物化学与生物物理学报	323	7	微生物学报	0.2549
8	云南植物研究	308	8	植物分类学报	0.2500
9	古生物学报	266	9	人类学学报	0.2444
10	动物学报	264	10	实验生物学报	0.2397

说明:

1. 中国科学引文数据库在连续两年公布《被引频次最高的中国科技期刊 100 名排行表》的基础上, 为使统计数据的排列从多种角度反映科技期刊状况, 特从 1996 年开始按学科编制《中国科技期刊排行表(按被引频次和影响因子排序)》。

2. 被引频次是在对被中国科学引文数据库 1996 年 582 种来源期刊所引用的数千种中国出版的中英文期刊进行频次统计后编制而成。

3. 影响因子的计算方法如下:

$$1996 \text{ 年某刊的影响因子} = \frac{1996 \text{ 年引用 } 1994 \text{ 年和 } 1995 \text{ 年该刊刊载论文的总次数}}{1994 \text{ 年和 } 1995 \text{ 年该刊刊载论文的总次数}}$$

本表中 1996 年的影响因子是在对中国科学引文数据库 1994~1995 年的来源期刊作了统计后编制而成。由于计算影响因子受到期刊发量数据的限制, 因此, 本表中只对能在中国科学引文数据库获得发量数据的 315 种期刊作了统计。1996 年新增加的 267 种来源期刊因无发量数据而未作统计。

4. 本着尊重原始数据的原则, 本表对变名期刊未作任何合并处理。

* 数据来源: 中国科学院文献情报中心中国科学引文数据库 1996 年数据。本表由中国科学引文数据库统计编制。