

癌、甲状腺癌及 5 例正常组织不反应。

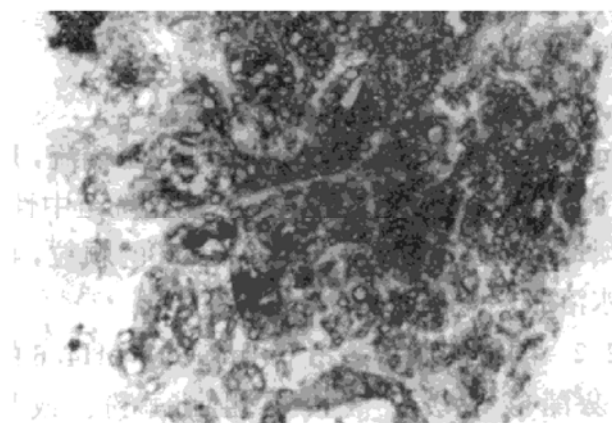


图 3 McAb AF9 对乳腺癌冰冻切片的免疫组化染色

3 讨 论

AF9 是一个以乳腺癌原发灶细胞膜作免疫原制备的抗人乳腺癌单克隆抗体, 属小鼠 IgG₁ 类。免疫组化结果显示 AF9 具有良好的肿瘤特异性, 表明其识别的抗原与细胞恶变相关联, 但为一种分布较为广泛的肿瘤相关抗原, 可在多种肿瘤中检测到。对其特性的进一步研究显示该抗原为糖、脂及蛋白质组成的复合蛋白质, 由分子量为 51000, 56000, 67000, 73000 的 4 条带组成, 该抗原不耐热, 被 AF9 识别的抗原决定簇不存在于铁蛋白及癌胚抗原。AF9 抗原有可能是由这 4 条带组成的大分子化合物, 也可能是相同蛋白质核心上表达不同的侧链。

目前国外的抗乳腺癌单克隆抗体识别的抗

原大多数为高分子量的粘蛋白样糖蛋白, 分子量为 200 000—400 000^[7], AF9 抗原显然不属于这一类。Garcia^[8]等报道了一种分子量为 52 000 的雌激素调节蛋白, 存在于胞浆及胞膜上, 同时能通过外吐进入细胞培养液中, 能在乳腺癌病人渗出液及血清中检测到, 这点与 AF9 抗原不同, 竞争性抑制试验表明 AF9 抗原不存在于乳腺癌病人血清中。Keydar^[9]等报道的单抗 H23 识别一种据认为属于乳腺癌病毒产物的 68 000 糖蛋白, 免疫组化染色结果只与乳腺癌组织反应而不与正常组织及其它肿瘤反应。这两种成分均不与脂类相关联, 故可以认为, AF9 对应抗原可能是新的乳腺肿瘤相关抗原, 对其深入研究将有助于了解乳腺癌的癌变因素, 从而有助于乳腺癌的诊断及治疗。

参 考 文 献

- 1 Stacker S A, Thompson C, Riglar C *et al.* JNCI, 1985; **75**: 801
- 2 Pancino G, Charpin C, Osinaga E *et al.* Cancer Res, 1990; **50**: 7333
- 3 Peterson J A, Zava D T, Duwe A K *et al.* Hybridoma, 1990; **9**: 221
- 4 Canevari S, Fossati G, Balsari A *et al.* Cancer Res, 1983; **43**: 1301
- 5 Laemmli U K. Nature, 1970; **227**: 680
- 6 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Proc Natl Acad Sci USA, 1979; **6**: 4350
- 7 Mandeville R, Damas F, Amarouch A. Hybridoma, 1987; **6**: 441
- 8 Garcia M, Capony F, Derocq D. Cancer Res, 1985; **45**: 709
- 9 Keydar I, Chou C S, Hareuveni M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; **86**: 1362

酶固定化的新型载体——PF 凝胶应用研究*

李源勋 叶庆玲

(河北大学化学系, 保定 071002)

摘要 用对苯二酚和甲醛在酸催化下制得新一类凝胶, 此凝胶价廉, 易于制备, 多孔、无毒、亲水性强; 能选择性吸附多糖, 而用于多糖与低聚糖及单糖的分离; 可作为载体对多种酶及蛋白质给予固定, 与蛋

白质的最大结合量为 558mg/g, 固定糖化酶时的活力回收达 84%; 此固化酶对淀粉的转化率达 93%, 当加入一定量的间苯二酚, 可得改性的 PF 凝胶, 其性能又有提高, 可见 PF 凝胶为新型的酶的固定化优良载体.

关键词 酚醛树脂, 对苯二酚-甲醛树脂, 固定化, 糖化淀粉酶, 牛血清白蛋白

酶的固定化是酶工程的重要部分, 固定化酶的关键技术之一是选择合适的载体, 本文是以苯酚类(如对苯二酚)和甲醛经缩聚而成的新一类凝胶状树脂(phenolic-formaldehyde resins), 取名为 PF 凝胶, 此类凝胶价廉并易于制备, 疏松多孔、无毒、不溶于水, 而且具有极强的亲水性, 不溶于有机溶剂, 有较好的机械强度等特点, 作为载体它能简单、快速、有效地对多种酶和蛋白质加以固定, 对蛋白质有很高的结合量, 更主要的一个特点是 PF 凝胶对底物(如多糖)有很好的吸附作用, 而对产物(如低分子糖)没有亲和性, 本身就可用于多糖与低聚糖及单糖的分离. 这类固定化酶必然具有高的活力回收, 应用于酶解淀粉时, 也必定具有高的转化率和高的稳定性, 测量结果表明上述性质已超过文献值^[1,2], 本文还研究了加入一定量的间苯二酚参加缩聚反应, 得到了改性的 PF 凝胶, 当用作为酶的固定化载体时, 其性能又有所提高, 此类凝胶在国内尚未见报导.

糖化型淀粉酶能使淀粉转化成葡萄糖, 但若用天然酶, 则用酶量大, 并且产物色深、质次, 尚需配备精制设备, 而用 PF 凝胶对酶固定后, 制成连续流动反应器, 能简单、方便直接得到精制产品. 我国盛产玉米, 固定化酶的技术将对玉米淀粉的深加工, 展现广阔的前景.

1 材料与方法

1.1 材料

糖化型淀粉酶(无锡酶制剂厂, 市售粗产品)、可溶性淀粉(天津试剂厂)、牛血清白蛋白(进口分装)、其他试剂均为化学纯或分析纯.

1.2 方法

1.2.1 树脂的制备 在装有搅拌器的三颈瓶中加入对苯二酚 22g 和甲醛水溶液(37%)

50ml 和 15ml 盐酸, 开动搅拌, 加热至沸腾, 反应 1h 后, 将产物倒入去离子水中, 洗至中性, 经研磨, 取直径为 0.076—0.15mm 的颗粒, 再经水溶胀, 即得产品.

1.2.2 酶液的制备 用 0.1mol/L, pH4.6 的醋酸-醋酸钠缓冲液浸提粗制酶粉(或用 0.1mol/L 的氯化钠水溶液), 经过滤得酶液(粗酶液).

1.2.3 糖化酶的固定 称取 0.1g 的凝胶加入上述酶液 2ml 和 0.1mol/L HAc-NaAc 缓冲液 8ml (pH4.6), 置于恒温水浴振荡器中, 在 15℃ 下, 转速为 180r/min, 反应 4h, 过滤, 除去滤液, 再用 0.1mol/L 的 HAc-NaAc 缓冲液 (pH5.0) 充分洗涤, 即可得到固定化酶.

1.2.4 蛋白质含量的测定 凯氏定氮法.

1.2.5 糖化酶的活力测定 用次亚碘酸盐法, 测定酶解淀粉所生成的葡萄糖, 来表示酶的活力, 测定方法按文献 [3].

1.2.6 固定化酶对淀粉转化的测定 以固定糖化酶为催化剂, 用碘量法^[4]测定淀粉经酶解转化生成的葡萄糖.

2 结果与讨论

2.1 PF 凝胶的性质

PF 凝胶为棕褐色、亲水、多孔的固体, 经

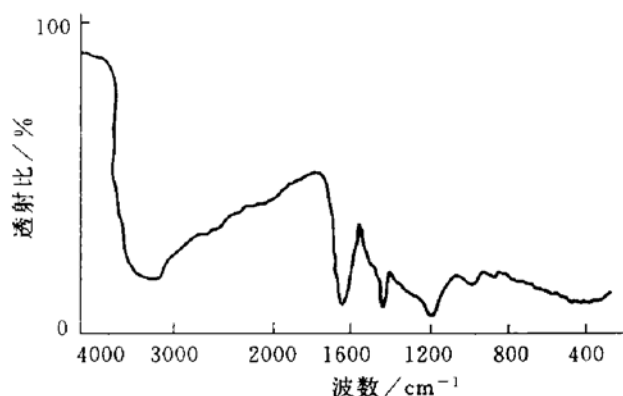
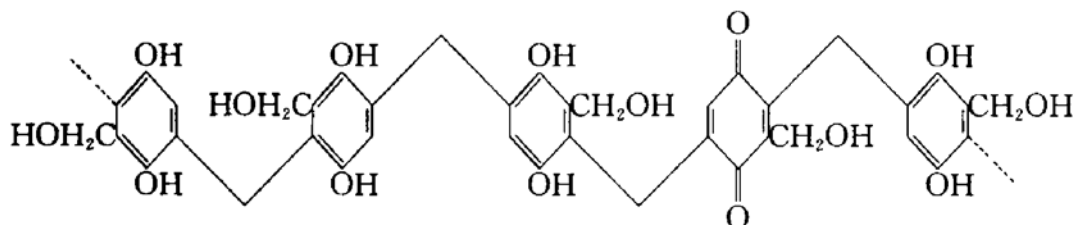


图 1 PF 凝胶的红外吸收光谱图

吸滤泵抽干后, 其持水量仍保持在 85% 左右, 不溶于水、乙醇、丙酮、苯等有机溶剂, 其红外吸收光谱示于图 1.

由图 1 可见 $3200-3400\text{cm}^{-1}$ 为 $\text{O}-\text{H}$ 伸

缩振动, 1640cm^{-1} 为醌结构中 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动, 1430cm^{-1} 为 $\text{C}-\text{H}$ 变角振动, 表明甲基桥的存在, $1180-1200\text{cm}^{-1}$ 为芳核上 $\text{C}-\text{H}$ 面内变角振动, 因此可能结构为:



2.2 PF 凝胶与蛋白质的结合

2.2.1 反应时间的影响 在一定量的凝胶中, 加入过量的以 $\text{pH} 7.0, 0.1\text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液配制的 1% 牛血清白蛋白溶液, 在室温下反应, 以不同时间终止反应, 抽滤, 用缓冲液充分洗涤, 烘干至恒重, 分别测其蛋白质的结合量, 结果示于图 2.

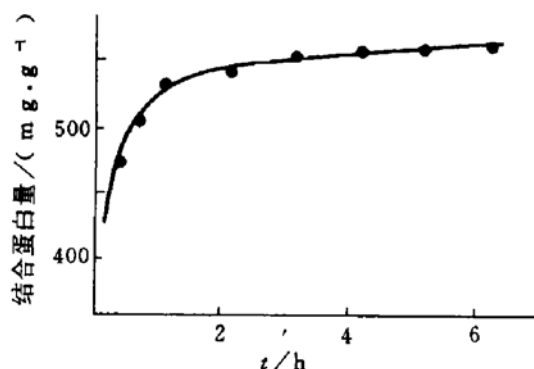


图 2 凝胶与牛血清白蛋白的结合量的时间曲线

由图 2 可见, 反应 3h 后, 凝胶与牛血清白蛋白结合已达最大值.

2.2.2 pH 值的影响 称取一定量凝胶分别加入 $\text{pH} 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 的 0.1mol/L 的缓冲液配制 1% 牛血清白蛋白溶液, 室温下反应 4h 后, 抽滤, 用缓冲液充分洗涤、烘干至恒重, 分别测其蛋白质的结合量, 结果示于图 3, 由图 3 可见当 pH 值为 4 时, 其结合量最大.

2.2.3 凝胶对牛血清白蛋白和糖化酶的最大结合量 精确称取一定量的凝胶, 分别加入过量的 1% $\text{pH} 4.6$ 的牛血清白蛋白的缓冲溶液

和 $\text{pH} 4.6$ 的糖化酶的缓冲溶液, 室温下反应 4h, 抽滤和用缓冲液充分洗涤, 烘干至恒重, 分别测其蛋白质的结合量, 其结果分别为每克干载体能结合牛血清白蛋白 558mg, 糖化酶 330.5mg, 以上的量已超过文献值^[1,2].

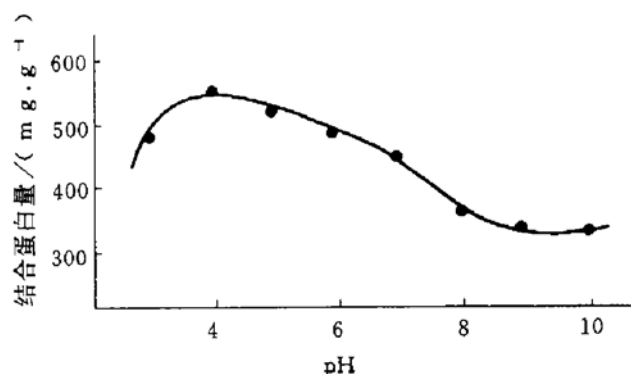


图 3 pH 值对凝胶与牛血清白蛋白结合的影响

2.3 以 PF 凝胶为载体固定糖化酶

2.3.1 温度对固定化反应的影响 当在 $\text{pH} 4.6, 0.1\text{mol/L}$ $\text{HAc}-\text{NaAc}$ 的缓冲液中, 以不同的温度进行固定化反应, 可得不同温度下, 固定化酶的活力回收, 结果示于图 4, 可见其活力回收随温度上升而下降.

2.3.2 pH 值对固定化反应的影响 温度 15°C 时, 在不同 pH 值 ($3.0-8.0$) 的缓冲溶液中, 进行固定化反应, 可得到在不同 pH 值的介质中对固定化反应的影响, 其活力回收示于图 5, 可见当 pH 值为 4.6 时, 其固定化效果最佳.

2.3.3 在不同的 pH 介质中固定糖化酶对淀粉进行酶解反应的影响 在 15°C 下, $\text{pH} 4.6$ 的缓冲溶液中, 用 PF 凝胶以糖化酶进行固定, 用此固定化酶在不同的 pH 值的缓冲液中对淀粉

进行酶解反应,测定其活性的相对关系,结果示于图6,由图6可见,固定糖化酶酶解淀粉不同于天然酶,介质的pH值以5.0为宜.

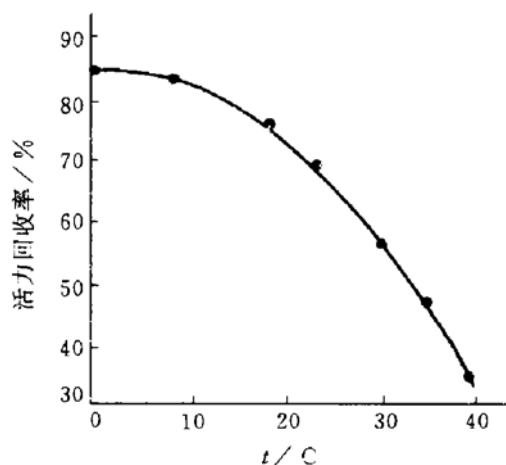


图4 固定糖化酶温度影响曲线

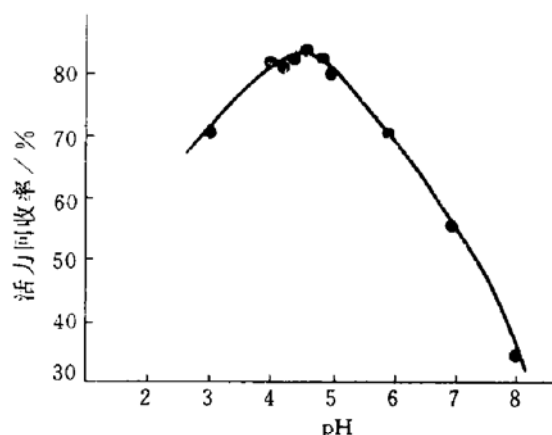


图5 固定糖化酶反应pH值的影响

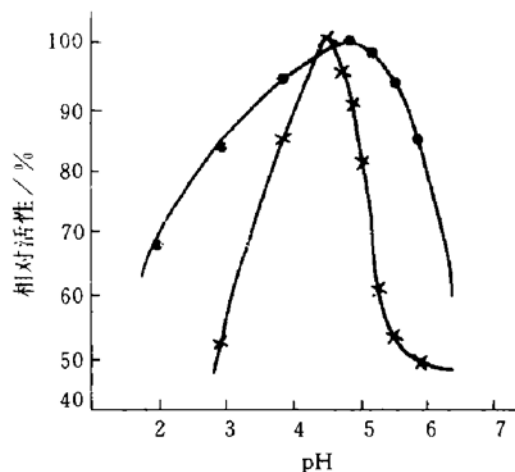


图6 不同介质中酶解淀粉活性相对关系

●—●固定化酶, ×—×天然酶.

2.3.4 固定化酶的贮存稳定性 在上述最佳固定化条件下所得固定化酶,其活力回收为84.34%,在室温下贮存一年后,再测其活力,其活力回收为83.96%,可见,固定糖化酶的稳定性优良.

2.3.5 固定糖化酶对淀粉转化及转化率的测定 称取PF凝胶1.0038g(含水量为89%)加入过量的酶液,在15℃,pH4.6介质中进行固定化反应4h,过滤,用0.1mol/L pH5.0的缓冲液充分洗涤后,加入25ml 2%淀粉溶液和5ml pH5.0, 0.1mol/L HAc-NaAc缓冲液,在40℃下酶解1h,用碘量法^[4]测其转化率,经多次测定平均转化率为92.65%.

2.3.6 以固定化酶装柱成填充床反应器的应用 用固定化的糖化酶装入夹套层析柱中(40mm×15mm),夹套通20℃的水恒温,上面滴加2%淀粉溶液和pH5.0的HAc-NaAc的缓冲液的混合液(体积比5:1)流速为30ml/h,每天酶解若干小时后,然后将淀粉洗净,保存在pH4.6的缓冲液中,周而复始,在反应器中存放31d,其中累积酶解时间为360h,定时取样测其转化率,其累积酶解时间与转化率的关系列于表1.

表1 淀粉转化率随时间变化的关系

累积时间 /h	1	33	73	108	145	170	206
转化率 /%	91.84	90.65	88.81	88.12	86.51	82.90	81.85
累积时间 /h	242	268	290	315	339	350	360
转化率 /%	83.00	82.66	81.06	79.61	75.58	76.96	75.58

由表1可知存放31d其中累积酶解时间达360h,转化率仍维持在75%以上,可见固定化酶的使用性能优良,为工业生产的连续化、自动化提供了依据.

2.4 以改性 PF 凝胶为载体固定糖化酶

在对苯二酚中加入一定量的间苯二酚,与甲醛进行缩聚,得到一类改性的 PF 凝胶,它除具有 PF 凝胶的特点外,其性质及应用等方面又有所提高。

2.4.1 改性 PF 凝胶与蛋白质的结合 以不同比例的间苯二酚加入而形成的改性 PF 凝胶,用其为载体对牛血清白蛋白进行固定其最大结合量列于表 2。

表 2 间苯二酚的含量与蛋白质结合量的关系

凝 胶	PF +6% 间苯 二酚	PF +8% 间苯 二酚	PF +10% 间苯 二酚	PF +12% 间苯 二酚	PF +14% 间苯 二酚
最大结合量 ¹⁾ /mg · g ⁻¹	282.4	374.6	562.7	328.3	291.0

¹⁾毫克每克干载体。

从表 2 可见改性 PF 凝胶与蛋白质的结合量最高可达 562.7mg/g,远远超过文献值^[1],可见此类凝胶对蛋白质结合十分有效。

2.4.2 以改性 PF 凝胶为载体固定糖化酶 以不同比例的间苯二酚所形成的改性 PF 凝胶,在上述最佳条件下对糖化酶进行固定,然后分别测其活力回收,结果列于表 3。

表 3 不同量的间苯二酚所形成载体固定糖化酶的活力回收

凝 胶	PF +6% 间苯 二酚	PF +8% 间苯 二酚	PF +10% 间苯 二酚	PF +12% 间苯 二酚	PF +14% 间苯 二酚
活力回收率 /%	80.84	82.81	84.03	85.07	87.60

从表 3 可见,随着凝胶中,间苯二酚含量的增多,固化酶的活力回收增加,当凝胶中,间苯二酚的量为 14%时,固化酶的活力回收高达 87.60%。

2.4.3 改性 PF 凝胶固定糖化酶对淀粉连续酶解 其转化率与时间的关系 称取 5.000g 改性 PF 凝胶,加入过量的酶液,在温度 15℃下,固定 4h,以此固化的糖化酶装入夹套层析柱中(40mm×15mm),夹套中通以 20℃的水恒温,上面滴加 2%淀粉溶液和 pH5 的缓冲液的混合液(体积比 5:1),流速为 30ml/h,定时取样,以碘量法测其转化率,其结果示于图 7。

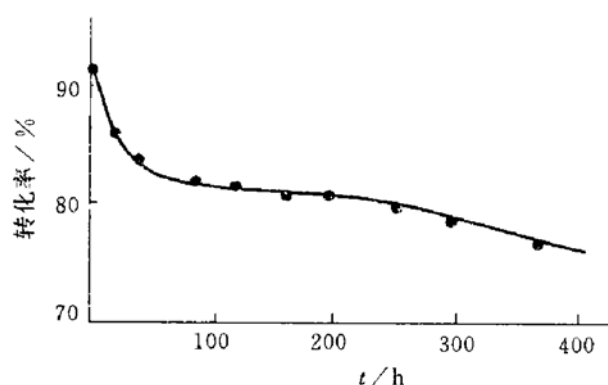


图 7 连续酶解淀粉其转化率与时间的关系

从图 7 可见,累积工作 370h (此时已存放 30d),其转化率仍高于 75%以上,可见以改性 PF 凝胶为载体所形成的固定糖化酶,使用性能优良,已远远超过文献值^[2]。

综上所述,PF 凝胶和改性的 PF 凝胶是一类优良的固定化酶的新型载体。

致谢 崔建霞、刘 卅、顾兴法等参加部分工作,特此感谢。

参 考 文 献

- 1 Jiri Kucera. Biotechnology and Bioengineering, 1986; 28: 110
- 2 Chaplin M F, Kennedy J F. J Chem Soc Perkin 1, 1979; 1 (9): 2144
- 3 中华人民共和国轻工业部部颁标准. 工业用液化型淀粉酶、糖化型淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶测定方法. 北京: 技术标准出版社, 1981: QB 547—80
- 4 吴 平, 唐本珪, 孙荣先等. 食品分析. 北京: 轻工业出版社, 1985: 166

ognized antigen with molecular weights of 51, 56, 67 and 73 kD. Immunohistochemical staining showed that the antigen mainly existed in the cytoplasm and on the membrane of breast cancer cell, and also could be observed in some other tumors, but no staining was detected in normal tissues. The AF9-recognized antigen may be a new tumor-associated antigen.

Key words breast carcinoma, tumor-associated antigen, monoclonal antibody

Application of PF Gel as New Carrier for the Immobilization of Enzyme. Li Yuanxun, Ye Qingling. (*Department of Chemistry, Hebei University, Baoding 071002*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (6): 523—527

PF gel-type resin has been synthesised by polycondensation of hydroquinone with formaldehyde in the presence of acidic solution. The gel-type resin is cheap and easy to produce, non-toxic, porous, hydrophilic, extremely stable. It is a effective carrier for the simple and rapid immobilization of various enzymes and proteins. The amounts of bound protein (BSA) and glycoamylase in one gramme of the dry carrier were 558mg and 330mg respectively, the activity recovery of 84% for immobilized glycoamylase was obtained. The conversion (%) for starch into glycoase, using immobilized glycoamylase is as high as 93%. A new kind of modified PF gel-type resins were synthesised by copolymerization of hydroquinone and some resorcin with formaldehyde. Thus PF and modified PF gel-type resins are superior carriers for immobilization of enzyme.

Key words phenolic-formaldehyde resin, hydroquinone-formaldehyde resin, immobilization, glycoamylase, bovine serum albumin (BSA)

Characterization of Modified Staphylococcal Protein A and Its Artificial Membrane on Substrate Surface. Lu Bin, Yie Ning, Wei Yu. (*Laboratory of Molecular and Biomolecular Electronics, Southeast University, Nanjing 210018*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (6): 528—532

A method is described for incorporation of water-soluble SpA into phospholipid monolayer using covalent SpA-stearate conjugates, and then transferring the monolayer on a pre-treated silica surface to form a SpA containing membrane. Stearic acid containing a reactive N-hydroxysuccinimide ester group is synthesized, and the derivative is reacted with SpA in a deoxycholate buffer. The modified SpA (m-SpA) has the solubility properties very similar to integral membrane proteins. The CD results show that the content of β structure in the m-SpA is increased in lower lipid coupling degree, but in higher modification the random coil content rapidly increased. After SpA is incorporated in the DPPA monolayer, unmodified SpA is readily ejected from the monolayer but m-SpA incorporates into the monolayer stably. The incorporation of the protein is proportional to the lipid coupling degree. The IgG binding ability of m-SpA decreases with the increase of the lipid coupling degree. The ability is further reduced about 20%—30% when m-SpA is incorporated in the membrane, which might be due to the incorporating procedure.

Key words SpA, lipid modification, conformation changes, artificial membrane, IgG binding activity

A Study of Combining Surroundings of Ca^{2+} in Fibrinolytic Principle of the Venoms in *Agkistrodon Acutus* Using Tb^{3+} as a Fluorescent Probe. Xia Wensheng, Lu Jingfen, Liu