

- neurotrophic factor (BDNF) prevents lesion-induced axonal die-back in yong rat optic nerve. *Brain Res*, 1995, **679** (2): 249~ 254
- 6 Yan Q, Elliott J, Sinder W D. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature*, 1992, **360** (6406): 753~ 755
- 7 Kawasaki E S. Amplication of RNA. In: Innis M A Eds., PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. 21~ 27
- 8 李金照, 陈 燕, 夏另朝, 等 (Li J Z, Chen Y, Xia L C, *et al.*). 脑源神经营养因子基因转染神经断端促进切断坐骨神经再生. *生物物理学报 (Acta Biophysica Sinica)*, 1997, **13** (3): 448~ 452

Expression of Human Brain-derived Neurotrophic Factor Gene. CHEN Yan, ZHANG Ying, LI Jir-Zhao, DENG Wei, XIA Ling-Chao, QIU Rong (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract The cDNA of human brain-derived neurotrophic factor (hBDNF) and the fragment encoding mature hBDNF were amplified from human genomic DNA by PCR, and separately ligated into pUC18. Two inserted fragments were analysed by sequencing, which are correct. The expression of the hBDNF was controlled by CMV promotor in NIH/3T3 cells transfected with recombinant plasmid, and analysed by RT-PCR, showing existance of BDNF mRNA in cells. The expression product of the mature hBDNF under the control of T7 promotor was in the inclusion body of *E. coli*, and visualized by SDS-PAGE analysis.

Key words brain-derived neurotrophic factor, PCR, gene expression

有机相酶促酯化反应中水分调控技术的研究*

崔玉敏 魏东芝 俞俊棠

(华东理工大学生物化学研究所, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要 在有机相酶促反应中, 水含量是影响酶活力的关键因素. 对异辛烷/正辛醇体系中柱状假丝酵母脂肪酶催化萘普森酯化反应中的水分调控技术进行了研究. 结果表明: 水合盐对—— $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{SO}_4$ 对系统水分的变化具有有效的缓冲作用; 非极性硅藻土吸附固定酶, 使之对水分的敏感性得到缓解; 另外, 加入分子筛去除副产物——“水”可促进酯化过程的进行.

关键词 有机相酶催化, 酯化反应, 萘普森, 水分调控

学科分类号 Q55

酶在含微量水的有机溶剂中不仅可以保存其活力, 而且可以获得在水溶液中所不具备的新特性^[1]. 常规条件下催化水解反应的酶, 如脂肪酶, 在有机溶剂中催化反应的平衡点发生转移, 可催化酯的合成反应. 其催化酯化反应活力的高低与体系中的水含量 (或水活度) 密切相关. 无水或过少的水不足以使酶分子形成其活性构象, 而过量的水又会使酶发生粘结, 催化效率大大降低, 而且酶长时间暴露于含过量水的有机溶剂中时, 热稳定性下降, 易于失

活^[2]. 所以, 控制适宜的水含量是酶在有机溶剂中有效催化的关键. 特别在有水生成的酯化反应中, 水的调节与控制更加重要. 本文对有机溶剂体系中脂肪酶催化萘普森酯化反应中游离酶发挥活力的最适水含量、水合盐对体系中水的缓冲作用及硅藻土作为固定化载体对水分的调控能力进行了探讨.

* 国家自然科学基金资助项目 (29706003).

收稿日期: 1997-07-28, 修回日期: 1998-01-07

1 材料与方法

1.1 材料

柱状假丝酵母脂肪酶, Type VII, pH 7.2 催化橄榄油水解活力为 1 440 U/mg, Sigma 公司生产; 底物: 2- (6-甲氧基 2-萘基) 丙酸 (萘普森), 中国西南第二制药厂生产; 溶剂: 正辛醇, 异辛烷, 四氯化碳, AR. 上海化学试剂公司购买; 水合盐: $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 将 Na_2SO_4 , AR. 进行重结晶制得; 硅藻土: CP. 上海奉贤奉城试剂厂生产.

1.2 方法

1.2.1 初始水含量的影响: 在经过 0.4 nm 分子筛脱水的正辛醇或异辛烷/正辛醇 (6:4, 体积比) 混合溶剂中, 萘普森浓度为 58.4 mmol/L, 游离酶 10 g/L, 体系中加入一定量的 0.1 mmol/L, pH 7.2 的磷酸缓冲液, 体系密封, 于 50℃ 的水浴摇床中反应, 摇床振荡频率为 150 次/min. 以 HPLC 测定转化率随时间的变化.

1.2.2 水合盐对的缓冲作用: 在相同反应体系中, 不加缓冲液, 以 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{SO}_4$ (1:1, 质量比) 作为水缓冲剂进行反应.

1.2.3 硅藻土吸附固定脂肪酶: 100 mg 脂肪酶中加入 100 μL 上述缓冲液, 完全润湿后加入 600 mg 硅藻土, 搅拌均匀, 代替游离酶催化酯化反应. 体系中不再加入水合盐对或缓冲液.

1.2.4 分子筛脱水对酯化反应的促进作用: 在异辛烷/四氯化碳 (6:4, 体积比) 混合溶剂中, 萘普森浓度为 20 mmol/L, 三甲基硅甲醇 40 mmol/L, 加入相当于游离酶 10 g/L 的硅藻土吸附脂肪酶, 50℃ 水浴摇床中反应.

1.2.5 转化率测定: HPLC, 流动相, 甲醇: 水为 96:4 (体积比), 流速, 0.8 ml/min, 30℃, 270 nm 测定紫外吸收.

2 结果与讨论

2.1 最佳初始水含量的确定

在异辛烷/正辛醇 (6:4, 体积比) 混合溶

剂中, 以游离酶催化萘普森酯化反应. 向反应体系中加入缓冲液, 测定不同含水量时的反应速率, 结果如图 1 所示: 混合溶剂作为反应介质时, 在一个狭窄的初始含水量范围内, 酶有较高的催化酯化活力, 初始含水量为 1.6% 时, 反应速率最高, 此时水与酶的比例为 1.6 μL 水: 1 mg 酶. 当初始加水量较低时, 酶分子由于不能获得形成活力构象所必需的水, 表现出较低的催化反应活力. 当体系中初始水含量高于 1.6% 时, 从物理状态来看, 在反应的初始阶段酶粉即发生粘结, 附着于反应器壁上, 至反应后期, 形成坚硬的球形颗粒, 无法均匀分散, 故反应速率也较低.

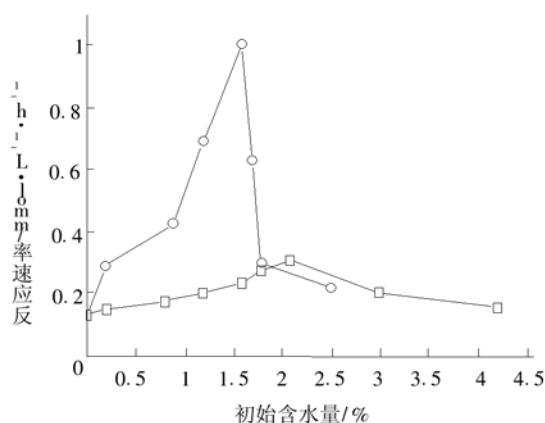


图 1 体系初始含水量对游离脂肪酶催化萘普森酯化反应速率的影响

○—○: 反应介质为异辛烷/正辛醇 (6:4, 体积比),
□—□: 反应介质为正辛醇.

另外, 从实验结果可以看出, 混合溶剂中游离酶催化反应速率对体系中水的含量极为敏感. 酶的最适水含量与有机介质的极性有关: 与混合溶剂相比, 正辛醇作为反应介质时, 酶催化反应速率在含水量为 2.0% 时达到最高. 反应速率随初始含水量的变化较为平缓. 这是由于正辛醇的非极性 ($\lg P = 2.9$) 低于异辛烷 ($\lg P = 4.7$), 更易“容纳”水分, 从而对水含量的变化起到了缓解作用. 在反应之前, 用分子筛不能完全去除正辛醇所吸附的水分 (测定结果表明, 在相同条件下用分子筛脱水过夜

后, 异辛烷中几乎测不出水含量, 而正辛醇中仍有微量的水 (0.013%) 存在。因此, 当体系的加水量为 0 时, 在正辛醇体系中酶仍能获得微量的水, 表现出一定的催化活力; 当向体系中加入过量的水时, 由于正辛醇有一定的吸附水的能力, 从而减轻了过量水对酶的“压力”; 环境中水含量发生较大变化时, 酶微环境中水含量变化较小, 酶活力随体系中水含量的变化呈平缓变化趋势。

在正辛醇作为反应介质的体系中, 酶催化反应速率较低, 是由于高浓度醇对酯化反应的竞争性抑制作用而造成的^[3]。另外, 反应介质粘度较大, 不利于传质过程也是导致反应速率降低的原因。

2.2 水合盐对体系水分的缓冲作用

在异辛烷/正辛醇混合溶剂体系中, 酶有较高的催化活力, 但对水含量的变化极为敏感。因而, 向体系中加入 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{SO}_4$ (1:1, 质量比) 作为水的缓冲剂。与未加盐体系作对照, 转化率随时间的变化如图 2。

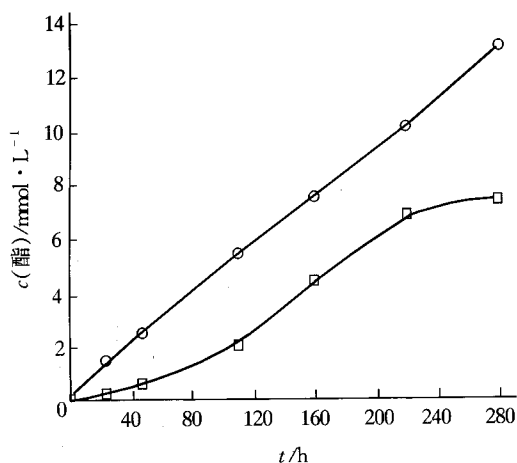


图 2 游离脂肪酶催化己酸的酯化反应历程

○—○: 体系中加入 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{SO}_4$;
□—□: 溶剂经 0.4 nm 分子筛脱水, 不加盐。

体系中不加水合盐和缓冲液时, 反应初速率很低, 随反应的进行, 反应速率逐渐提高。这是由于反应初期酶分子不能获得足够的“必需水”, 无法有效发挥其催化活力。随反应的

缓慢进行, 副产物水积累, 供给酶形成结合水层, 酶的催化活力升高, 反应速率加快。当生成的水分在体系中积累, 超过酶所需要的量, 进而达到较高浓度后, 酯化反应受到抑制, 酯的生成趋于平缓。而体系中加入水合盐对时, 反应初期水合盐 ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 提供一定的水分给酶和整个体系, 使反应得以进行, 盐本身转化为无水形式; 随反应的进行, 生成的水与无水盐 (Na_2SO_4) 结合, 避免了体系中水的积累, 从而有效维持体系恒定的水活度^[4]。酶分子可以获得恒定的结合水, 以较高且恒定的活力催化反应进行, 产物浓度随时间线性增加。

体系中水合盐对的加量对酶活力有一定的影响, 如图 3 所示: 当体系中盐加量很少时, 不能提供足够的初始水, 也无法有效维持体系水活度的恒定。相反, 过多固体盐的存在会包覆酶粉颗粒, 传质阻力增大, 同样不利于反应的进行。适宜的水合盐加量为 60 g/L, 与酶的比例为 6:1 (质量比)。总的来看, 加盐量在一个较宽的范围内部可使酶表现出较高的催化活力。

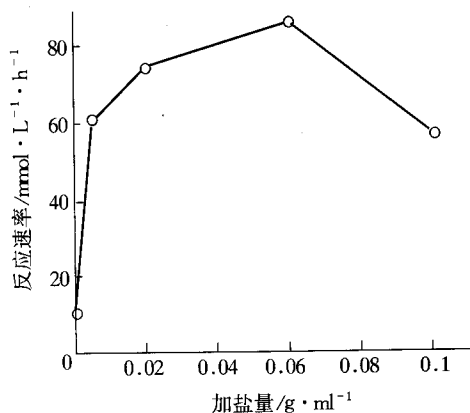


图 3 体系加盐量对游离脂肪酶催化己酸酯化反应速率的影响

2.3 硅藻土对水分的调节作用

水合盐对可以维持体系中恒定的水活度, 而当硅藻土作为固定化载体时, 载体本身也能有效地降低水分对酶活力及其分散状态的影响程度, 固定化酶对水分的承受范围拓宽。图 4 为酶固定化过程中初始加水量对转化率的影响:

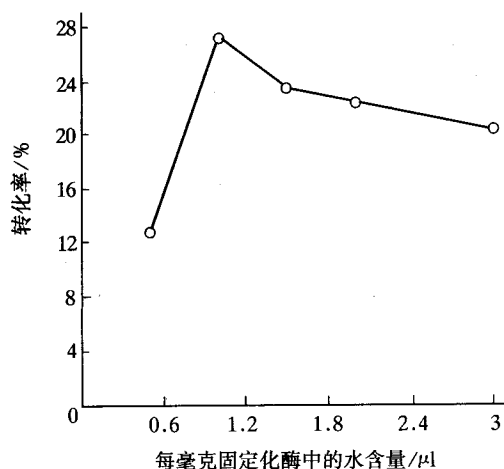


图4 硅藻土吸附脂肪酶催化酯化反应中不同水含量时的转化率
反应 111 h.

当固定化过程中酶:缓冲液:载体的比例为 1:1:6 (质量:体积:质量), 体系中水含量为 1.0% 时转化率最高. 硅藻土是一种可被水润湿的非极性载体, 固定化中加入的过量水, 由于硅藻土的润湿而被吸附, 使酶分子保持一定的结合水. 另外, 硅藻土可在酶分子周围形成非极性微环境, 为酶提供适宜的催化反应条件. 在反应过程中酶粉吸附于不易粘结的硅藻土上, 保持良好的分散状态, 反应速率提高.

2.4 分子筛对产物水的去除

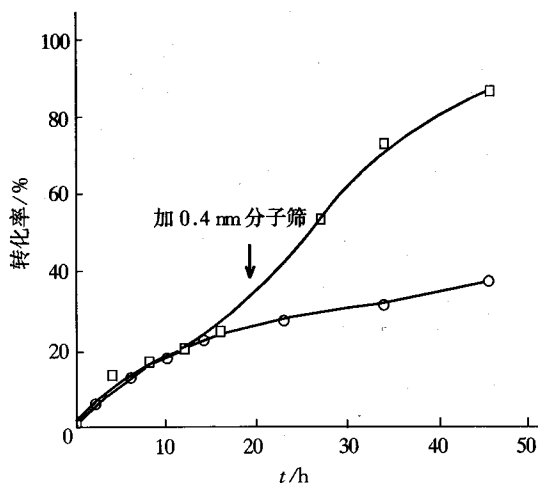


图5 分子筛除水对酯化反应的促进作用

□—□: 反应 20 h 后加入分子筛, ○—○: 不加分子筛.

以硅藻土吸附酶催化萘普森与三甲硅甲醇的酯化反应. 随反应的进行, 副产物水产生, 体系中总水含量升高, 利于水解反应的进行, 酯化过程在一定程度上受到抑制, 转化率的提高趋于平缓. 反应 20 h 后, 向体系中加入 0.4 nm 分子筛除去生成的水, 转化率出现陡升. 如图 5, 不加分子筛的体系, 转化率趋向恒定.

3 结 论

在含微量水的有机溶剂体系中, 酶催化反应活力受其水化程度的影响. 实际上, 水在体系各相之间进行分配, 直至达到平衡, 酶分子结合水量由此平衡来决定. 因此, 酶分子所能获得的结合水与溶剂的极性、“水缓冲剂”的存在以及固定化载体的性质等因素密切相关. 非极性溶剂吸附水的能力弱, 因而作为反应介质时, 体系中水含量的变化直接对游离酶的构象和分散状态产生极大的影响, 表现为酶对水含量变化的极度敏感. 而体系中水合盐对或固定化载体的存在可有效缓冲水含量的变化. 另外, 副产物水的去除, 可以打破酯化与其逆反应之间的平衡, 促进反应向正向进行, 分子筛、乙基纤维素^[5]都是有效的除水剂.

参 考 文 献

- 1 Zaks A, Empic M, Gross A. Potentially commercial enzymatic processes for the fine and specialty chemical industries. *Trends Biotechnol*, 1988, **6** (11): 272~275
- 2 Sylvain L, Marie D L. Working at controlled water activity in a continuous process: the gas/solid system as a solution. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **45** (5): 387~397
- 3 崔玉敏, 魏东芝, 俞俊棠 (Cui Y M, Wei D Z, Yu J T). 有机介质中固定化酶催化萘普森与硅醇的酯化反应. 华东理工大学学报 (*Journal of East China University of Science and Technology*), 1998, **24** (4): 411~415
- 4 Kvittingen L, Sjursnes B, Thorleif A. Use of salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalysed synthesis in organic media: a practical procedure for organic chemists. *Tetrahedron*, 1992, **48** (13): 2793~2802
- 5 Otamiri M, Adlercreutz P, Mattiasson B. Effects on ester synthesis in toluene by immobilized chymotrypsin by addition of polymers to reaction medium. *Biotechnol Appl Biochem*, 1991, **13** (1): 54~64

水平可持续 12 h; 成纤维细胞通过自分泌介质反馈抑制自身生长可能是伤口愈合后期细胞生长抑制的机制之一; Manabu 报道 TGF- β 在体外明显抑制 5d 伤口成纤维细胞的生长^[5], 在 Cromack 的测定中, TGF- β 在伤口渗出液中约伤后 8~9 d 达到峰值, 这些研究提示: 伤口微环境中 TGF- β 量的积累及其他生长刺激因子水平量的下降可能导致伤口愈合过程中修复细胞生长终止的重要机制. 目前, 伤口愈合后期的细胞生长负调控的研究才开始起步, 有关生长抑制因子的作用机理有待深入研究.

参 考 文 献

- 1 朱旭东 (Zhu X D). 伤口修复细胞的简易培养方法. 中国修复重建外科杂志 (Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery), 1994, 8 (3): 157~158
- 2 Ono L. Evaluation of cytokine in donor site wound fluids. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 1994, 28 (4): 369~372
- 3 Grayson L S. Quantitation of cytokine level in skin graft donor site wound fluid. Burns, 1993, 19 (5): 401~405
- 4 Desmouliere A. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. Am J Pathol, 1995, 146 (1): 56~60
- 5 Manabu F. The mitogenic activity of peritoneal tissue repair cell: control by growth factors. J Surg Res, 1989, 47 (1): 45~48

The Effect of Wound Fluid on the Proliferation of Wound Fibroblast. CHEN Rong-De, ZHANG Yan, ZHU Xu-Dong (The Research

Institute of Surgery, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China).

Abstract The change of quality and quantity of wound fluid during different stages could reflect the course of wound healing in a certain degree. The effect of WF taken from different post wounding days on the proliferation of mouse wound fibroblast (mWFB) was studied, and the regulatory role of wound microenvironment on the growth of mWFB was also investigated. It was performed in two kinds of culturing medium: 1640-1% FCS-10% WF. It was found that WF obtained from postwounding days 1, 3 and 7 could effectively stimulate the proliferation of mWFB, while, WF obtained from postwounding days 9, 11 and 15 with 10% FCS presented inhibitory effects on the proliferation of mWFB. However, the same WF with 1% FCS may induce death of mWFB. The results showed that wound microenvironment could stimulate the proliferation of mWFB within the first week after wounding, and that cell growth may be arrested by WF of the wound during the second week. These might be some growth inhibitory factors in the wound microenvironment of later stage during wound healing.

Key words cell proliferation, fibroblast, wound fluid, wound healing

(上接第 542 页, Continued from page 542)

Studies on the Techniques of Water Control in Enzymatic Esterification in Organic Solvent. CUI Yu-Min, WEI Dong-Zhi, YU Jun-Tang (State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Institute of Biochemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China).

Abstract Water content is a crucial factor influencing the enzyme activity in organic solvent. The techniques of water control were investigated in the esterification of Naproxen

catalyzed by lipase from *Candida cylindracea* in isooctane/octanol system. The results demonstrated that the salt hydrate pair — $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O} / \text{Na}_2\text{SO}_4$ had the capability of buffering water. The sensibility of enzyme to water was decreased by adsorbing the lipase on celite — an apolar carrier. In addition, Esterification could be improved effectively by adding molecular sieve to remove the byproduct-water.

Key words enzymatic reaction in organic solvent, esterification, naproxen, water control