

戊二醛交联法制备固定化酶的改进研究

陈长治 宗建超 俞耀庭

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

本文对以交联聚丙烯酰胺为载体的戊二醛交联法制备固定化酶进行了两点改进: (1) 将戊二醛进行醛基保护, 避免发生交联反应; (2) 将载体的酰胺基经酰肼化反应, 使其转化成较活泼的酰肼基。然后将含有活泼酰肼基的载体用保护了醛基的戊二醛进行载体活化反应, 再偶联脲酶、L-门冬酰胺酶, 可缩短反应时间; 提高偶联酶量及酶活性。

关键词 戊二醛; 固定化酶; 交联

戊二醛交联法是制备固定化酶的常用方法之一^[1-7]。从化学反应的角度来看, 该方法尚存在一些缺点。例如, 在载体活化反应中, 用戊二醛直接与载体上的酰胺基反应, 必然会产生交联反应, 降低载体上自由醛基含量, 导致联酶量低。若将载体上的酰胺基直接与醛基反应, 其反应活性不好。为了解决上述问题, 本文对以交联聚丙烯酰胺为载体的戊二醛交联法进行了两点改进: (1) 将戊二醛进行醛基保护, 避免发生交联反应; (2) 将载体的酰胺基经酰肼化反应, 使其转化为较活泼的酰肼基。然后将含有活泼酰肼基的载体用保护了醛基的戊二醛进行载体活化反应, 用改进后的戊二醛交联法对脲酶、L-门冬酰胺酶进行了固定化研究。实验证明改进的戊二醛交联法具有反应时间短, 偶联酶量及酶活性高等优点。

材料与方 法

(一) 材料

丙烯酰胺(分析纯, 天津化学试剂一厂生产) N,N'-亚甲双丙烯酰胺(分析纯, 广州试剂厂生产), 过硫酸铵(分析纯, 天津东方化工厂生产), 四甲基乙二胺

(进口分装), 50%水合肼(进口分装), 乙二醇胺(分析纯, 北京化工厂生产)。

脲酶(为“脲酶活性基”Urease-active, 由西瓜籽中提取。原标活性: 每毫克该品于35℃在30min内分解尿素3mg。该品为英国产品, BDH chemical Ltd, Poole England, 用时过100目筛)。L-天冬酰胺酶(注射用, 每支1000u, 天津生化药厂)。

(二) 方法

1. 交联聚丙烯酰胺的制备: 在带有搅拌的500ml三口瓶中先后加入150ml氯仿和150ml甲苯, 2ml司本-85。慢速搅拌使司本-85分散均匀。

在100ml烧杯中加入3g丙烯酰胺、0.8g N,N'-亚甲双丙烯酰胺、10g葡萄糖和25ml蒸馏水、搅拌使其溶解。滤去不溶物, 用冰盐水浴冷却该溶液至0—2℃, 加入1.2ml 5%的过硫酸铵溶液和1.2ml四甲基乙二胺溶液, 迅速搅拌均匀后慢慢倒入三口瓶中, 于25℃氮气保护下不断搅拌进行交联聚合反应。10min后定型, 60min后反应完成。取下三口瓶, 倾倒滤出球形交联聚丙烯酰胺, 用洗衣粉(十二烷基磺

本文于1985年5月22日收到。

酸纳) 溶液 (1%) 洗涤两次, 转入水中, 可得到40—50ml交联聚丙烯酰胺球状体。

2. 酰肼化反应^[8]: 在装有搅拌的250ml三口瓶中加入60ml 湿态交联聚丙烯酰胺凝胶体*, 加入50%的水合肼60ml, 于50℃下搅拌反应12h。分离出酰肼化小球后, 用0.1M 氯化钠溶液将酰肼化小球反复洗涤, 洗至中性, 待用。

3. 载体活化: 首先将6—8%的戊二醛与二乙醇胺按一定摩尔比混溶, 在三角瓶中搅拌30min, 然后加入酰肼化载体小球, 在25℃进行载体活化反应3—4h。分离出活化载体球, 用0.1M的氯化钠溶液反复洗涤, 洗到中性为止。然后加入0.2N盐酸于室温搅拌30min以脱除醛基保护试剂, 最后用蒸馏水洗至中性, 在0—4℃下保存。

4. 联酶反应: 在装有搅拌的250ml三口瓶中加入100ml pH7.0的0.01M磷酸盐缓冲溶液, 0.6g脲酶, 搅拌20min后加入10ml活化的载体小球, 25℃搅拌下进行联酶反应12h以上。反应完毕后分出固定化酶小球, 用0.1M氯化钠溶液洗涤数次, 于0—4℃下湿态保存, 待测活性。

5. 活性测定: 固定化脲酶^[9]和固定化L-门冬酰胺酶^[10]的活性按文献用721型分光光度计进行比色测定。

结果与讨论

(一) 醛基保护

在醛基保护反应中, 戊二醛与二乙醇胺的摩尔比以及戊二醛浓度对活化载体的醛基含量、固定化酶的活性有较大影响 (图1和图2)。从理论上分析, 戊二醛中一个醛基被保护后对载体活化反应最有利, 但实验表明戊二醛/二乙醇胺的摩尔

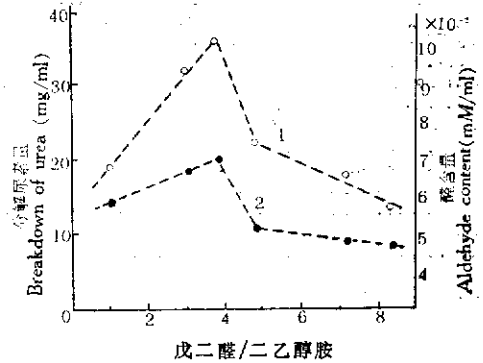


图1 不同摩尔比的戊二醛、二乙醇胺与醛含量、固定化酶活性的关系

Fig. 1 Molar ratio of glutaraldehyde, and diethanol amine versus aldehyde content and the activity of immobilized enzyme

1. 固定化酶活性 (载体活化2h, 联酶7.5h) 2. 载体醛含量

1. Activity of immobilized enzyme (carrier activation 2h, enzyme linking reaction period 7.5h)
2. Content of aldehyde on carrier

分解尿素量指每毫升固定化酶分解尿素的毫克数 (下同) 比为3.8:1时, 活化载体的醛含量最高, 为 $6.9 \times 10^{-2} \text{ mM/ml}$ (活化载体), 在此条件下制备的固定化脲酶活性也最高, 尿素分解量达36mg/ml (固定化脲酶) (图

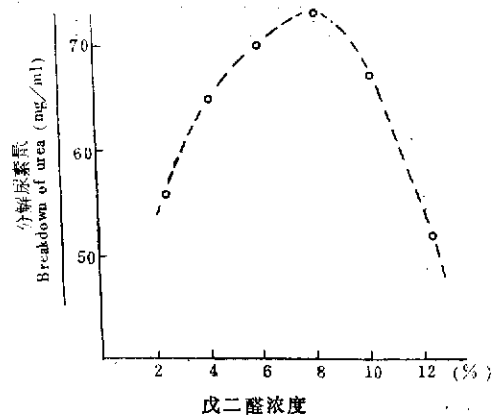


图2 戊二醛浓度与固定化脲酶活性的关系 (载体活化3.5h, 联酶10h)

Fig. 2 Glutaraldehyde concentrations versus the activity of immobilized urease (carrier activation 3.5h, enzyme linking reaction time 10h)

* 本文中凡涉及湿态交联聚丙烯酰胺凝胶球的度量, 均用体积 (ml) 表示, 作者在实验中体会, 对含水量很大的湿态凝胶球用体积度量方便, 实用, 准确。

1)。在醛基保护反应中，戊二醛浓度在6%—8%的条件下制备的固定化脲酶活性最高，尿素分解量达70—73mg/ml(固定化脲酶)(图2)。

(二) 载体活化时间

在载体活化反应中，活化时间是重要的影响因素。开始时，随着载体活化反应时间的延长，固定化脲酶的活性也随之升

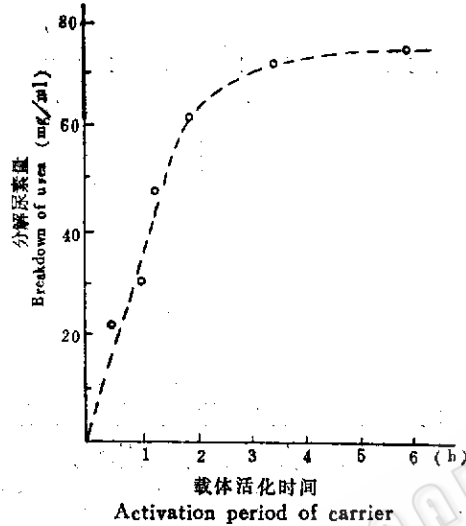


图3 载体活化时间与固定化脲酶活性关系
Fig.3 Carrier reaction period versus the activity of immobilized urease (enzyme linking reaction time 10h)

高，但活化反应3.5h后，再增加反应时间，固定化脲酶的活性升高趋于缓慢(图3)。

(三) 保护基的水解

用盐酸处理活化载体可使保护基水解下来。实验表明活化载体用0.2N盐酸水解30min为宜(图4,5)。

(四) 联酶反应

活化载体联酶量与固定化酶活性(L-门冬酰胺酶)都随着反应时间的增加而升

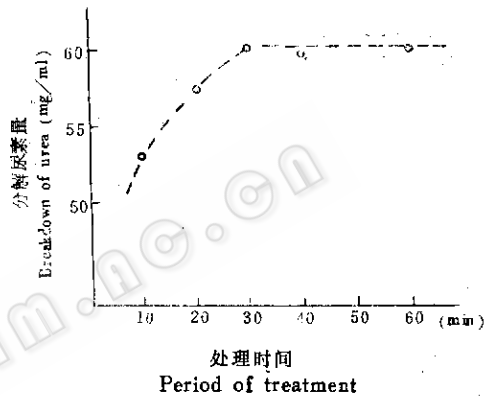


图5 盐酸处理载体时间与固定化酶活性关系(载体活化2h, 联酶10h)

Fig.5 Period treatment of carrier by hydrochloric acid(0.2N) versus the activity of immobilized enzyme(carrier activation 2 h, enzyme linking reaction 10h)

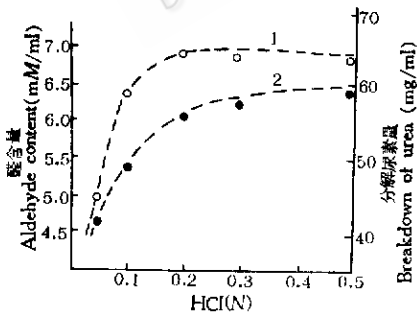


图4 处理载体的盐酸浓度与醛含量、固定化脲酶活性关系(载体活化2h, 联酶反应10h)

Fig.4. Hydrochloric acid concentration used for treatment of carrier versus aldehyde concentration and the activity of immobilized urease (carrier activation period 2h, enzyme linking reaction 10h).

- 1. 固定化脲酶活性 Activity of immobilized urease
- 2. 载体醛含量 Aldehyde concentration on the carrier

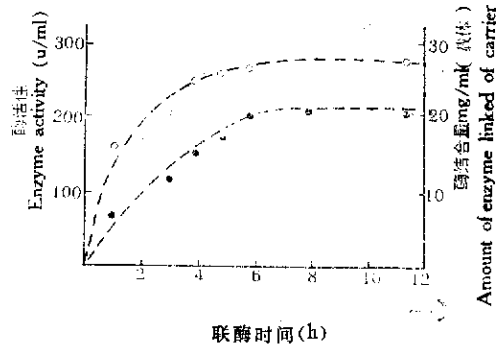


图6 联酶反应时间与酶结合量、固定化酶活性的关系
Fig.6 Enzyme linking period versus amount of enzyme linked and its activity

- 1. 固定化L-门冬酰胺酶活性
- 2. 酶结合量
- 1. Activity of immobilized asparaginase
- 2. Amount of enzyme linked

高, 6 h 达到一个平衡值。联酶量的增加与固定化酶活性的升高是一致的(图 6)。

(五) 联酶反应的最适 pH 值

在不同 pH 值条件下进行了联酶反应, 实验结果表明, pH 值为 7.0 时所得固定化酶活性最高(表 1)。

表 1 联酶反应的最适 pH 值
Table 1 Optimum pH for enzyme linking reaction

pH	6.5	6.9	7.0	7.2	7.5
mg(尿素)/ml(固定化脲酶) mg(urea)/ml (immobilized urease)	21	33	41	27	26

(六) 不同方法活化载体对固定化酶活性的影响

交联聚丙烯酰胺载体经酰肼化反应, 用保护醛基的戊二醛活化, 可以提高载体的醛含量及蛋白质结合量。酶蛋白的结合量提高约 10 倍, 固定化酶的活性提高 5—6 倍(图 7)。

(七) 固定化酶的稳定性

固定化脲酶于 0—4 °C 贮存 62 天活性仍保持 70%; 固定化 L-门冬酰胺酶循环使用 16 次, 活性由 220 单位降至 163 单位(表 2, 表 3)。

表 2 固定化脲酶贮存稳定性
Table 2 Storage stability of immobilized urease

贮存时间(天) Storage time(days)	0	14	45	62
活性 Activity(%)	100	93	89	70

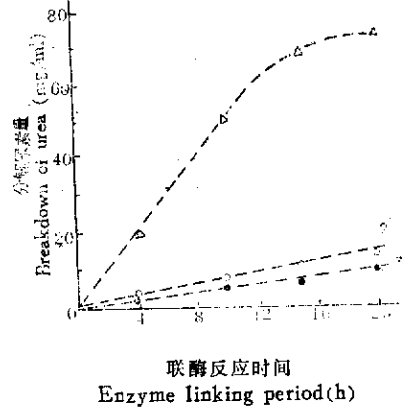


图 7 不同方法活化载体制备固定化脲酶的活性
Fig. 7 Different method for the activation of carrier versus the activity of immobilized urease

1. 酰肼化载体经保护醛基的戊二醛活化
 2. 酰肼化载体用戊二醛活化
 3. 交联聚丙烯酰胺经戊二醛活化
1. Carrier first treated with hydrazine then linked by glutaraldehyde with aldehyde group protected
 2. Carrier first treated with hydrazine then linked by glutaraldehyde with aldehyde group not protected
 3. Crosslinked polyacrylamide treated with glutaraldehyde only

表 3 固定化 L-门冬酰胺酶循环使用稳定性 (37 °C)
Table 3 Recycling stability of immobilized asparaginase

循环次数 Number of recycling	1	2	3	4	5	6	7	8
活性(单位) Activity(u)	220	207	220	240	200	204	213	240
循环次数 Number of recycling	9	10	11	12	13	14	15	16
活性(单位) Activity(u)	225	207	187	170	170	207	187	163

参 考 文 献

- [1] Weston, P.D. and Avrameas, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45:1574, 1971.
 [2] Johansson, A.C. and Mosbach, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 370:339, 1974a.
 [3] Johansson, A.C. and Mosbach, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 370:348, 1974b.
 [4] Baum, G.: *Biotechnol. Bioeng.*, 17:253, 1975.
 [5] Allison, J.P. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47:66, 1972.
 [6] Dixon, J.E. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52:905, 1973.
 [7] Van Leemputten, E. and Horisberger, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, 16:385, 1974b.
 [8] Inman, J.K. and Dintzis, H.M.: *Biochem.*, 8:4074, 1969.
 [9] 山东人民医院检验科编:《临床检验手册》, 山东人民出版社, 1975年, p.397.
 [10] 中山大学生物系生化教研室编:《生物技术导论》, 人民教育出版社, 1979年, p.66.

AN IMPROVEMENT OF GLUTARALDEHYDE CROSSLINKING METHOD IN ENZYME IMMOBILIZATION

Chen Changzhi Zong Jianchao Yu Yaoting
(Institute of Molecular Biology, Nankai University)

Glutaraldehyde crosslinking is one of the most common methods in immobilization of enzymes. Glutaraldehyde reacting with the amide groups of the polyacrylamide carrier can cause crosslinking on the carrier. This reaction prevents the free aldehyde groups on the carrier to react with the amino groups on the enzyme resulting in low immobilization efficacy.

The present paper investigated the improvement of this method:

1. Diethanol amine was used to protect the aldehyde groups from the crosslinking reaction on the carrier.
2. The activity of the amide group was enhanced by the reaction with hydrazine.

The improved method was used in the immobilization of urease and L-asparaginase. Experimental results showed that the amount of enzyme immobilized on the carrier was increased by 10 fold, enzymatic activity raised by 5-6 fold and the immobilization reaction shortened from 12 to 6 h.

Key words

Glutaraldehyde; immobilization of enzymes; crosslinking