

因子介导的, 其中就包括表皮生长因子. 在肿瘤生长、关节炎等疾病中, 表皮生长因子参与了其中的血管生成作用, 拮抗表皮生长因子介导的血管生成就有可能对与其相关的疾病起到治疗作用, 因此, 表皮生长因子的拮抗剂可能具有重要的临床价值. 拮抗表皮生长因子的作用可以通过许多途径, 其中之一就是找到能与表皮生长因子结合并能干预其与受体结合分子, 因而表皮生长因子可作为药物靶

分子. 从噬菌体文库中筛选药物靶分子的拮抗剂和激动剂已被证明是一种有效的方法. 以表皮生长因子作为药物靶分子, 从多肽噬菌体文库中筛选与表皮生长因子结合的噬菌体多肽, 这些潜在的表皮生长因子拮抗剂先导分子经过优化可能具有重要的临床价值.

关键词 噬菌体展示, 多肽, 表皮生长因子, 药物靶分子
学科分类号 Q75, Q78

高分子络合树脂固定化多酚氧化酶的研究

雷福厚¹⁾ 杨再环 石晓红

(广西民族学院化学系, 南宁 530006)

摘要 为探索新的固定化酶方法, 以漆酚-酪氨酸树脂为固定化酶载体, 与 Cu^{2+} 络合制备成高分子络合剂, 对多酚氧化酶固定化, 实验结果表明, 这种固定化方法是可行的. 固定化多酚氧化酶的适宜 pH 值为 6.64 和 7.17, 在 60 °C 放置 25 min 后活力保留 50.7%, 以邻苯二酚为底物的米氏常数为 1.49×10^{-2} mol/L, 较游离酶略小. 根据实验结果提出了固定化酶模型.

关键词 高分子络合树脂, 多酚氧化酶, 固定化

学科分类号 Q55

我国固定化酶的研究比较活跃, 出现了一些独特的固定化技术^[1], 常用的物理吸附法、包埋法、交联法、共价法现已有许多研究^[2,3], 但也存在一些缺点, 需要探索新的固定化酶方法和开发高效固定化酶载体. 漆酚 (urushiol) 是天然产物生漆的主要成分, 是 3 位有 15 个碳原子的邻苯二酚化合物, 我们曾以漆酚为原料合成了一系列功能基聚合物, 能作为络合树脂络合金属离子和固定化酶的载体^[4,5], 为进一步改进载体的性能, 探索高分子络合剂对酶的固定化方法, 本文将酪氨酸接枝到漆酚树脂上, 制备成漆酚-酪氨酸铜高分子络合剂, 对多酚氧化酶进行固定化, 并探讨这种方法的可行性.

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

漆酚: 将生漆用沸程为 60 °C ~ 90 °C 的石油醚萃取而得, 酪氨酸为生化试剂, 硝化纤维为 5% 乙醇-乙醚溶液, 其余试剂均为分析纯. 721 分光光度计: 上海第三分析仪器厂.

1.2 漆酚-酪氨酸接枝树脂的合成

取适量漆酚 (urushiol) 石油醚溶液, 称取聚合催化剂, 研细后加入反应瓶中, 20 °C 恒温搅拌反

应, 预聚 1 h 后, 加入酪氨酸和硝基苯溶剂, 温度升至 50 °C 继续反应 2 h, 加阻聚剂使催化剂失活, 蒸出溶剂, 用热水反复洗涤, 80 °C 干燥. 将粗产品装柱, 用沸水回流洗涤 2 h, 再用乙醇回流洗涤 1h, 除去聚合物中的小分子物质, 然后干燥, 得到漆酚-酪氨酸功能基树脂 (urushiol tyrosine resin, UTR).

1.3 多酚氧化酶的提取

取市售香蕉果肉约 300 g, 用捣碎机捣碎成糊状, 移入烧杯, 加入缓冲溶液, 充分搅拌, 抽滤, 滤液中加入硫酸铵, 使之浓度为 0.35 g/ml, 抽滤, 滤液中再加硫酸铵至饱和, 沉淀过滤, 为进一步纯化酶, 将沉淀用蒸馏水溶解, 再加丙酮, 沉淀抽滤, 所得凝胶状沉淀即为多酚氧化酶, 低温保存备用^[6].

1.4 活性碳对多酚氧化酶的固定化

称取 1 g 粉末状活性碳和 1 g 多酚氧化酶, 一同装入一小瓶内, 加入约 5 ml 磷酸盐缓冲溶液, 充分振荡 10 h. 过滤, 水洗, 得活性碳固定化多酚氧化酶.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (0771) 3260558

收稿日期: 1999-06-28, 修回日期: 1999-11-11

1.5 硝化纤维对多酚氧化酶的固定化

5% 的硝化纤维乙醇-乙醚溶液与乙酸乙酯按 1:1 混合, 加入多酚氧化酶, 溶剂量为酶的 3~4 倍, 充分搅拌, 然后滴加到蒸馏水中. 制成硝化纤维固定化多酚氧化酶.

1.6 漆酚-酪氨酸络合树脂对多酚氧化酶的固定化

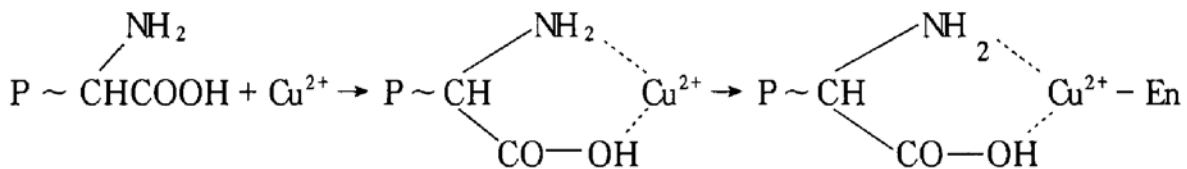
树脂过滤, 多次用蒸馏水洗涤, 再用浓度为 0.1 mol/L 的 10 ml Cu^{2+} 溶液浸泡 12 h. 将浸泡后的树脂过滤, 多次用蒸馏水洗涤. 再将多酚氧化酶和树脂放入烧杯中, 加磷酸盐缓冲溶液, 充分搅拌 12 h, 过滤, 用蒸馏水反复冲洗, 制得漆酚-酪氨酸高分子铜络合物 (UTR-Cu^{2+}) 固定化多酚氧化酶.

1.7 游离酶活性的测试

称取一定质量的多酚氧化酶, 配制成一定浓度的酶溶液, 量取 0.5 ml 酶溶液, 加入到由磷酸盐缓冲溶液、1.5% H_2O_2 和 0.16 mol/L 邻苯二酚乙醇水溶液 (体积比为 1:1) 按体积比 2:1:1 配制的 4 ml 反应液中, 以相同比例的缓冲溶液- H_2O_2 溶液-邻苯二酚溶液为参比液, 在波长 470 nm 处用 721 分光光度计测定吸光度随反应时间的变化, 活性以每秒吸光度变化值 ($\Delta A/s$) 表示^[6,7].

1.8 固定化多酚氧化酶活性的测试

称取一定质量的固定化多酚氧化酶, 置于带过



2.2 固定化酶活性比较

取一定质量活性碳固定化酶、硝化纤维固定化酶、 UTR-Cu^{2+} 固定化酶, 测活性, 结果分别为 0.091/min·g、0.084/min·g 和 0.580/min·g. 而未与铜离子络合的功能基树脂固定化酶的实测值为 0, 说明功能基铜络合树脂固定化酶完全不同于物理吸附, 存在化学键力, 即配位键.

2.3 不同固定化酶的多次重复使用性

分别取一定质量的硝化纤维固定化酶和 UTR-Cu^{2+} 固定化酶, 在相同条件下测定多次使用后的酶活性. 结果列于表 1 中, 实验表明络合树脂固定化酶保留活性高, 而硝化纤维固定化酶保留活性低. 说明高分子络合物与酶的结合力较好.

滤装置的反应器中, 加 12 ml 由磷酸盐缓冲液、1.5% H_2O_2 溶液, 0.160 mol/L 邻苯二酚溶液, 按 2:1:1 配制成反应液恒温反应, 以相同比例缓冲溶液- H_2O_2 溶液-邻苯二酚溶液为参比液, 每隔一定时间取滤液在波长为 470 nm 处测吸光度, 被测定液仍返回到反应器中, 固定化酶活性表示为: 吸光度变化值/时间·质量 ($\Delta A/\text{min}\cdot\text{g}$).

2 结果与讨论

2.1 不同固定化方法固定化多酚氧化酶的保留活力

分别测定活性碳固定化酶、硝化纤维固定化酶和 UTR-Cu^{2+} 固定化酶的活性, 再用蒸馏水洗涤固定化酶, 第二次测定活性. 根据公式:

$$\text{保留活力} = \frac{\text{第二次反应活性}}{\text{第一次反应活性}} \times 100\%$$

进行计算, 其结果分别为 6.94%、11.5% 和 50.80%. 由此可知, 活性碳、硝化纤维固定化酶的保留活力比络合树脂固定化酶要低. 原因是高聚物上的功能基氨基酸与 Cu^{2+} 形成了高分子络合物, 由于高分子链的刚性作用, 此络合物中的 Cu^{2+} 络合未达到饱和, 可以进一步与酶分子中的游离氨基酸配位, 使酶以配位键的形式固定在高聚物上, 其模型表示为:

表 1 固定化酶重复使用时的保留活力比较

使用次数	1	2	3	4
保留活力/%				
硝化纤维固定化酶	100	11.56	4.68	1.71
UTR-Cu^{2+} 固定化酶	100	50.82	25.53	11.86

2.4 UTR-Cu^{2+} 固定化多酚氧化酶的最适宜 pH 值

配制不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液, 分别测定一定质量的固定化多酚氧化酶和游离酶的活性, 结果列于表 2 中, 结果表明固定化多酚氧化酶和游离酶都有两个最适宜 pH 值, 游离酶的最适宜 pH 值为 6.24 和 6.64, 与文献 [5] 报道近似, 而固定化酶的最适宜 pH 值为 6.64 和 7.17. 与游离酶比较向碱性方向偏移约 0.5 个 pH 单位.

表 2 溶液 pH 值对酶活性的影响

pH	5.29	5.59	5.91	6.24	6.49	6.64	6.98	7.17	7.38
酶活性									
游离酶活性	0.0086	0.007	0.016	0.017	0.013	0.032	0.016	0.016	0.001
UTR-Cu ²⁺ 固定化酶	0.297	0.416	0.439	0.515	0.767	0.779	0.503	0.738	0.302

2.5 UTR-Cu²⁺ 固定化多酚氧化酶的热稳定性

测定不同温度下的固定化酶和游离酶的热稳定性, 把只加缓冲溶液的固定化酶和游离酶同时置于水浴恒温槽中, 在温度为 25℃、40℃、50℃、60℃、70℃中恒温 25 min 后, 测其活性, 结果列于表 3 中. 由表 3 可知, 固定化酶的热稳定性比游离酶高得多.

表 3 UTR-Cu²⁺ 固定化多酚氧化酶的热稳定性

t / °C	25	40	50	60	70
固定化酶 活性	0.779	0.617	0.534	0.395	0.097
保留活力 / %	100	79.2	68.5	50.7	12.5
游离酶 活性	0.100	0.027	0.020	0.020	0.0018
保留活力 / %	100	27.0	20.0	20.0	1.80

2.6 UTR-Cu²⁺ 固定化多酚氧化酶的米氏常数

配制不同浓度的邻苯二酚乙醇水溶液, 分别测定一定质量的固定化酶和游离酶的活性, 并以底物的浓度倒数 1/[S] 作横坐标, 以反应速度的倒数 1/V 为纵坐标作图, 结果如图 1 所示, 由图 1 求得固定化酶的米氏常数 $K_m = 1.49 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 游离酶 $K'_m = 1.66 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, UTR-Cu²⁺ 固定

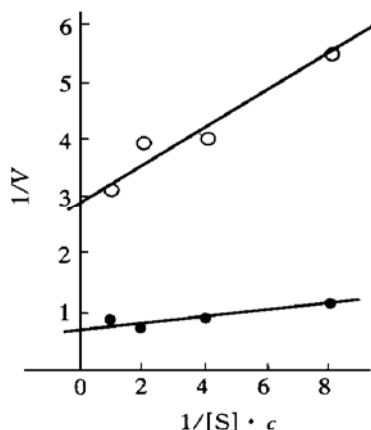


图 1 UTR-Cu²⁺ 固定化多酚氧化酶的米氏常数测定

○—○: 游离酶; ●—●: 固定化酶; c 为 $0.16 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

化多酚氧化酶的米氏常数有所减小, 说明固定化酶与底物亲和力增强, 其原因可能是固定化酶的高分子载体与反应底物邻苯二酚的亲和力较强, 增加了酶与底物的亲和力^[8].

参 考 文 献

- 1 邱广亮, 德力格尔, 栗淑媛, 等. 磁性聚乙二醇载体固定化葡萄糖淀粉酶的研究. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26 (1): 56~ 58
Qiu G L, Deligeer, Li S Y, et al. Prog Biochem Biophys, 1999, 26 (1): 56~ 58
- 2 朱伯儒, 史作清, 何炳林. 环糊精葡萄糖基转移酶的固定化及其应用. 应用化学, 1996, 13 (6): 28~ 30
Zhu B R, Shi Z Q, He B L. Chin J Appl Chem, 1996, 13 (6): 28~ 30
- 3 王洪祚, 刘世勇. 酶和细胞的固定化. 化学通报, 1997, (2), 22~ 27
Wan H Z, Liu S Y. Chemistry, 1997, (2), 22~ 27
- 4 雷福厚, 史伯安, 黄在银, 等. 漆酶在漆酚树脂上的固定化研究. 林产化学与工业, 1996, 16 (4): 19~ 22
Lei F H, Shi B A, Huang Z Y, et al. Chemistry and Industry of Forest Products, 1996, 16 (4): 19~ 22
- 5 史伯安, 雷福厚, 黄在银, 等. 漆酚-水杨酸接枝树脂的合成及对金属离子的吸附. 林产化学与工业, 1998, 18 (3): 35~ 38
Shi B A, Lei F H, Huang Z Y, et al. Chemistry and Industry of Forest Products, 1998, 18 (3): 35~ 38
- 6 杨 萌, Rovel B, Metche M. 高灌蓝越橘多酚氧化酶的提取和纯化. 无锡轻工大学学报, 1998, 17 (3): 54~ 57
Yang M, Rovel B, Metche M. Journal of Wuxi University of Light Industry, 1998, 17 (3): 54~ 57
- 7 塔卡基, 杨方琪, 高福成. 广东芝麻香蕉加工中的酶褐变研究 (I). 无锡轻工学院学报, 1994, 13 (1): 10~ 20
Alex Koku M, Yang F Q, Gao F C. Journal of The Wuxi Institute of Light Industry, 1994, 13 (1): 10~ 20
- 8 曲红波, 丛 威, 韦新桂, 等. 多孔醋酸纤维素球形载体固定化糖化酶的研究. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25 (2): 155~ 158
Qu H B, Cong W, Wei X G, et al. Prog Biochem Biophys, 1998, 25 (2): 155~ 158

Study on Immobilizing Polyphenol Oxidases onto Coordination Polymer. LEI Fu-Hou, YANG Zai-Huan, SHI Xiao-Hong (Department of Chemistry, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China).

Abstract The polymer of the urushiol tyrosine resin coordinating Cu²⁺ (UTR-Cu²⁺) was synthesized to

immobilize polyphenol oxidases. The results of experiment showed that the method was practicle. Optimum pH of the immobilization polyphenol oxidases was 6.64 and 7.17. The effect of the temperature on UTR-Cu²⁺-enzyme was discussed. Michaelis constant was determined and compared

with the free enzyme. It was suggested that the polyphenol oxidases was immobilized by coordination bond, and the model of immobilization enzyme with UTR-Cu²⁺ was proposed.

Key words coordination polymer, polyphenol oxidases, immobilization

经验介绍

DNA 银染的清除与重染

陈涛 刘欣 曹海燕 解用虹

(天津医科大学生物化学教研室, 天津 300070)

聚丙烯酰胺凝胶电泳因其操作简便, 分辨率高, 重复性好等优点在生物大分子的分离, 提取和鉴定等方面得到广泛的应用, 它已经成为开展分子生物学研究必不可少的技术方法. 显示聚丙烯酰胺凝胶电泳中核酸的方法主要有溴化乙锭 (EB) 染色和硝酸银染色. 硝酸银染色因其灵敏度高, 无致癌毒性, 同时也消除了观测时紫外线对眼睛的伤害, 因此而被更多的研究人员所采用.

许多因素可以影响染色显像的成败与优劣, 如胶的厚度, 试剂的浓度, 冲洗次数和反应温度, 特别是终止时间的掌握等. 染色背景过深和显像不理想是几乎所有研究人员都曾有的经历, 这种情况对初学者就更为常见.

不理想或失败的银染有无挽救的可能呢? 这一问题的答案决定于两个方面, 一是不理想的显像能否有效清除; 二是清洗过的凝胶中的 DNA 是否丢失. 如未丢失, 能否重新染色并获得满意的效果.

我们采用了若干方法来解决第一个问题, 较为理想的方法是将银染不满意或失败的凝胶置于

10%~15% 的硝酸溶液中并轻微振摇, 褪色时间随胶的厚度和原染色的深浅程度而有所不同, 振摇和换液有助于加快褪色, 一般 0.5~2 h 均能达到完全清除的目的. 解决第二个问题的途径是用原方法重新染色, 但应分析先前染色失败的原因并做必要的改进, 如果背景过深可适当降低反应温度, 延长漂洗时间及适当提前终止时间等等, 一般均能获得较好的染色效果. 如果仍不理想, 还可重复上述清除与重染的过程. 我们曾有意识地将染色满意和不理想的凝胶分别用硝酸褪色, 然后对其进行重新染色, 最终均能获得满意的结果. 这种清除与重染的过程曾重复高达三次, 所得的染色图谱与原较理想的染色结果相比, 均未发现有任何差别.

这些结果说明凝胶中的 DNA 与 Ag⁺ 的结合是可逆的, 其染色可被硝酸溶液完全清除, 而且用硝酸脱色凝胶中的 DNA 并未造成其明显丢失, 脱银的 DNA 仍可与银染试剂重新反应并有可能获得满意的结果.