

常温预辐射聚合法物理包埋辣根 过氧化物酶的研究

哈鸿飞 高金辉 吴季兰

(北京大学技术物理系, 北京)

摘要 本文发展了一种新型的, 常温下预辐射聚合法物理包埋酶的方法。此法避免了酶直接受到辐照而引起的失活, 且简单易行、包埋效率高, 固相酶的使用性能亦很好。实验表明, 常温预辐射固定化技术对辐射敏感的生物活性分子的固定化将是一种很有希望的新型物理包埋法。

关键词 辣根过氧化物酶, 丙烯酰胺, 生物活性分子, 预辐射聚合, 固定化酶

引 言

生物活性分子(酶、抗体、细胞、抗生素、避孕及抗癌药物等)可用凝胶包埋、微胶囊化、物理或化学吸附以及共价结合等方式进行固定化, 以提高使用价值。利用辐射技术进行固定化是一种较新的、别具特色的方法, 其中用有机单体辐射聚合进行酶及药物的物理包埋法最为简便和实用^[1,2]。

多数酶在室温下接受辐射能后易于失活, 低温(-78°C)辐照对酶的失活有不同程度的保护作用。嘉悦勋等人发展了一种低温辐射包埋技术^[3,4]。为避免酶辐射失活及低温技术的麻烦和限制, 本文采用了有机单体预辐射聚合法物理包埋法。有机单体预辐射聚合早有报道^[5], 刘钰铭等应用此法在研制软接触镜方面取得了很好的结果^[6]。本文将这一技术应用于酶的固定化。分两步进行, 先使丙烯酰胺单体在通氧下室温辐照; 然后在辐射场外与适量酶混合, 通氮使其聚合以达到包埋酶的效果。实验结果表明, 应用此法, 固相辣根过氧化物酶活力恢复可达60%。本文还讨论了提高固相酶活力恢复和保持固相酶活力的技术条件。

实 验 部 分

1. 试剂

(1) 丙烯酰胺(Arc.), 化学纯。中国医药公司提供, 用丙酮重结晶纯化。(2) 辣根过氧化物酶(HRP), $RZ = 2.2$, 蛋白质含量30.1%, 北京永定化工厂产品。(3) 底物溶液: A液: 10.0 mg 邻苯二胺(分析纯, 北京化工厂)溶于25.0 ml 蒸馏水中 B液: 0.15 ml 30% H_2O_2 (分析纯, 北京化工厂), 用蒸馏水冲稀至10.0 ml。在一棕色瓶内取5.0 ml A液, 0.5 ml B液, 用 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液($\text{pH} = 5$)冲至100.0 ml。(4) 酶促反应终止液为2 mol/L H_2SO_4 。

以上试剂及交联剂 NN'-甲叉双丙烯酰胺(Bis)均未经纯化处理。

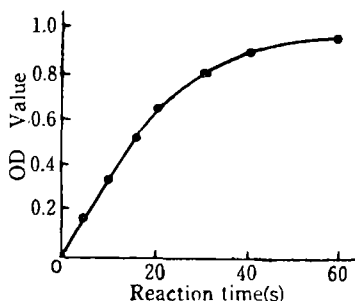


Fig 1. Enzyme reaction kinetic curve, OD value of oxidized product as a function of reaction time.

Determination temperature: 35°C; Enzyme content: 0.67 r/ml

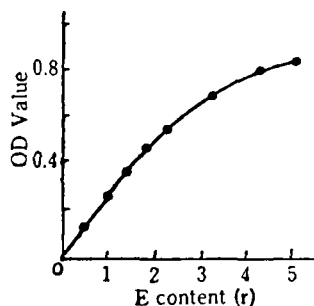


Fig 2. Enzyme reaction kinetic curve, OD value of oxidized product as a function of enzyme content.

Determination temperature: 35°C; Reaction time: 20 s.

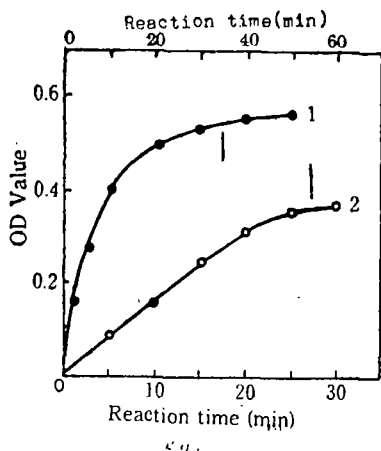


Fig 3. Kinetic curve of immobilized enzyme by using different treatment method.

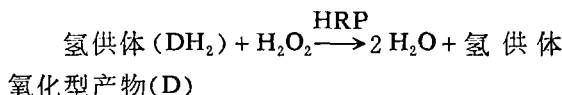
1. Electromagnetic stirring, 2. No stirring
Total dose 3.3 kGy, [Arc] = 20%, Bis/Arc = 5%

固相酶活力的测定方法与自由酶相同,但情况更复杂。对于固相酶,被包埋在聚合物网络之

2. 酶活力测定法

本文用动力学法测定 HRP 活力、酶促反应动力学曲线(见图 1、2)。

HRP 可催化以下反应



本文选邻苯二胺(OPD)为氢供体,形成的氧化型产物在 493 nm 处有特征吸收峰(用国产 751 型分光光度计测定)。用酶促反应动力学曲线中(图 1)OPD 氧化产物的 OD 值随酶促反应时间增长的直线部分计算单位时间内 OPD 氧化型产物 OD 值表示酶活力的相对大小(活力 $\mu = \text{OD 值}/\text{min}$)。本实验取自由酶促反应时间为 20 s。

自由酶浓度对酶促反应亦有影响(见图 2),本实验中体系自由酶浓度控制在 1.5 r/ml 左右。

3. 酶的固定化方法及固相酶活力测定

(1) 预辐射聚合物理包埋法 在 10 ml 吸收管中放入 5.0 ml 载液,置于钴源装置中,不断鼓气泡下,室温照射一定时间。取出吸收管,在辐射场外加入适量酶液后通入高纯氮。15 min 后停止通氮,维持氮气氛下一定时间内单体聚合,得到含酶凝胶。取出凝胶,用刀片切成 $\sim 2\text{ mm}$ 见方小块,用蒸馏水充分洗涤后,滤纸压干,备用。

为减少聚合热对酶活力的破坏,另一种方法是将通氮后发粘的含酶载液转移至一内径为 $\sim 4\text{ mm}$,长 30 cm 的玻璃管中(称细管固化法),氮气氛下放置较长时间缓慢聚合,最后将含酶凝胶推出细管,切成 $\sim 2\text{ mm}$ 厚园片,然后用同上方法处理。

(2) 固相酶活力恢复的测定 固相酶活力恢复用下式表示:

$$\text{活力恢复}(\%) = \frac{\text{固相酶活力}}{\text{加入载液的自由酶活力}} \times 100\%$$

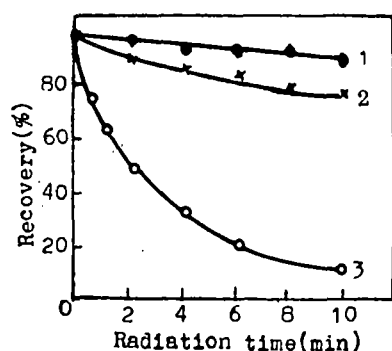


Fig 4. Radiation deactivation of HRP at different temperature.

Dose rate: 0.11 kGy/min

1. -78°C ; 2. -5°C ; 3. 25°C

The determinations of sample's activity were performed exactly at the time of 20 mins after the samples were taken out off the radiation field.

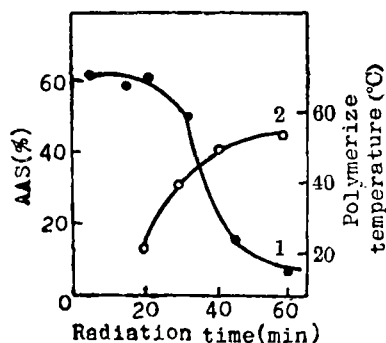


Fig 5. Entrapping efficiency and polymerization temperature as a function of dose. Room temperature, Dose rate: 0.11 kGy/min.

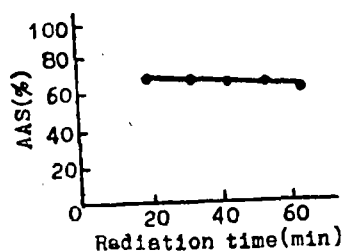


Fig 6. Entrapping efficiency as a function of dose in thin tube entrapping method. Room temperature, dose rate: 0.11 kGy/min

为减少聚合热影响,改用细管法,令其缓慢聚合。结果得到改善(见图6),表观活力恢复随剂量增长而稍有下降。

中的酶与底物反应是受扩散控制的反应,与网络疏密、颗粒(比表面)大小,反应温度以及搅拌方式皆有很大关系。用电磁搅拌与静置法(取试样前用搅棒轻轻搅均)测定结果(见图3)。本实验采用电磁搅拌法,凝胶颗粒 $\sim 2\text{ mm}$ 见方,反应时间为60 s。即使如此,其他条件发生变化(如辐照温度、剂量、Arc浓度、Bis与Arc比例等)也会影响测定结果。因此,我们将一定条件下测定的固相酶活力恢复定义为表观活力恢复或表观包埋率。

结果与讨论

1. 辣根过氧化物酶的辐射稳定性

不同酶对 γ 射线敏感程度差异很大,不同辐射温度下,剂量与酶失活的关系(见图4)。从图4可以看出,在室温下,HRP对 γ 射线比较敏感。当吸收剂量超过1 kGy后HRP几乎全部失活。低温辐照时,HRP的活性得到有效的保护。因此,采用低温技术或预辐射聚合物埋法将会有效地保存酶的活力。

2. 辣根过氧化物酶的预辐射聚合固定化

(1) 剂量对包埋率的影响 以Arc浓度为20%, Bis/Arc比为5%,预辐照后加入自由酶进行了吸收剂量对固相酶表观活力的测定(见图5中曲线1)。

实验结果表明,在接近4 kGy前固相酶表观活力恢复可达60%左右,剂量增大,则迅速下降。这主要是由于预辐照载液在吸收管中通氮后,停放一段时间突然聚合,聚合热难以散发,使体系温度骤然升高。HRP对热亦很敏感,接近 60°C 时很快失活。测定体系聚合瞬间温度的结果表明,随吸收剂量增加体系聚合温度亦很快增加(见图5中曲线2)。在接近4 kGy剂量处聚合热可使体系温度升至 $\sim 50^{\circ}\text{C}$ 。由于是用普通温度计测量,温度传导较慢。因此,聚合时体系实际温度可能比测定值还要高一些。

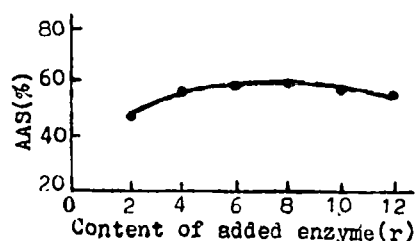


Fig 7. Effect of added enzyme content on AAS(%).
Total dose 3.3 kGy.

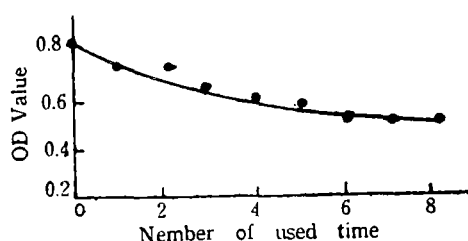


Fig 8. Leakage curve of immobilized HRP.
Total dose: 3.3 kGy

(2) 加入自由酶量对固相酶表现活力恢复的影响 为使单位重量凝胶有更高的酶活力,曾增加每克丙烯酰胺固化前加入的酶量。结果表明,酶量的增加对包埋率的影响是有限的(见图7)。这个结果与苏宗贤等人包埋酵母的实验结果相近^[7]。主要原因估计不是由于载液浓度相对降低,而是由于处在凝胶网络中的酶分子向凝胶外扩散速度与包埋的酶量无正比关系;酶量的增加也增大了酶的泄漏速度,使固相酶表现活力恢复受到限制。在本实验中加入 HRP 量一般控制在每克凝胶 3~8 r 为好。

(3) 固化 HRP 活力的稳定性 取适量上述方法制得的固定化酶凝胶,测定反应次数对固相酶活力的影响(见图8)。结果表明,将近 10 次反应后,固相酶表现活力仍能存活约 60%。可见此法制得的固相酶在室温下有较好的稳定性。

有趣的是用过几次的固相酶,在冰箱中存放过夜后,其活力能得到一定程度的恢复。

总之,预辐射聚合常温包埋法可能成为一种有前途的新型的酶固定化技术。

参 考 文 献

- [1] 哈鸿飞,杨福良,大学化学,2(4),3(1987)。
- [2] Ha Hongfei, Wu Jilan et al., Radiat. Phys. Chem., 31 (4—6), 761(1988)。
- [3] I. Kaetsu, M. Kobayashi IAEA-CN-40/109(Technical Report of Radioisotopes and Radiation Technology P. 353 (1982)。
- [4] I. Kaetsu, M. Kumakura et al., Radiat. Phys. Chem., 27, 245(1986)。
- [5] С. Р. Рафцков, Т. Л. Жлагыщев. Високомолекул. соединения, 3, 1034(1961)。
- [6] 刘钰铭,杨月琪,化学学报,42,785(1984)。
- [7] 苏宗贤,曹瑾等,辐射研究与辐射工艺学报,4(2),49(1986)。

(稿件收到日期:1988年10月3日)

STUDY ON A NEW IMMOBILIZATION METHOD OF HRP VIS PRE-IRRADIATION POLYMERIZATION AT ROOM TEMPERATURE

Ha Hongfei, Gao Jinhui and Wu Jilan

(Department of Technical Physics, Beijing University, Beijing)

ABSTRACT It was found that the deactivation of Horse Radish Peroxidase (HRP) by gamma-ray was very severe at room temperature, but at low temperature (-78°C) it's deactivation could be controlled effectively.

Radiation entrapping immobilization of HRP at low temperature was performed, but the leakage of immobilized HRP from gel made this method undesired.

In this work, a new immobilization method of HRP vis pre-irradiation polymerization of acrylamide was developed. In this method, sample solution of acrylamide and proper ratio of crosslinking agent were being irradiated with bubbling oxygen continuously and then, take the sample out of radiation field, put some unirradiated HRP into the sample which was still not polymerized bubbling high pure nitrogen for about 15 minutes. Finally the sample was polymerized and at the same time the HRP would be entrapped in it.

Some entrapping conditions were investigated. About 60% of HRP can be entrapped and the leakage of HRP gel was somewhat improved.

KEY WORDS Horse Radish Peroxidase (HRP), Acrylamide, Bioactive molecules, Pre-irradiation polymerization, Immobilization