

辐射固定化大肠杆菌制备菌体膜研究

曹瑾 陈频 俞晔

(华东化工学院, 上海)

摘要 本文以大肠杆菌作为辐射制备固定化菌体膜的模型, 采用尼龙为骨架, 接枝甲基丙烯酸 β -羟乙酯(HEMA), 使接枝后的尼龙具有亲水性, 而后以低温包埋法固定大肠杆菌成为菌体膜。实验结果表明, 当辐射剂量在10—12 kGy时, 大肠杆菌膜保留活力最高; 用50% HEMA单体浓度包埋时, 其包埋量达2.3 g/ml HEMA; 菌体膜最适温度与最适pH与原始菌体基本相同。

关键词 大肠杆菌, 辐射固定化, 甲基丙烯酸 β -羟乙酯(HEMA), 辐射接枝, 辐射包埋

前言

关于酶、细胞的辐射固定化, 最近几年来陆续发表了许多文章。辐射包埋固定化方法占了相当的篇幅。固定化产物呈块状(或可以切成小块)、粒状或珠状。为了满足缓释药物和生化工程反应等的需要, 对于膜状固定化产物就显得更加迫切。制备固定化膜状产物所采用的方法通常有: (1) 利用人工合成的聚合物膜(聚乙烯、聚丙烯或含氟聚合物膜)先接枝能与酶生成共价键的单体, 而后再与酶发生共价反应, 形成酶膜^[1]; (2) 将酶与聚合物(醋酸纤维素、聚乙烯等溶解在溶剂中, 然后采用流延方法, 挥发去溶剂, 成为固定化酶膜^[2,3]。上述两种制备固定化膜方法均不适用于菌体细胞制备固定化膜。本实验用的菌体细胞是指大肠杆菌经培养后, 产生的一系列产物, 包括菌丝体和培养基等多种成份, 未经分离的混合物。为了解决菌体细胞能制成膜状产物, 作者^[4]曾研究过以尼龙网作为支持骨架, 辐射接枝甲基丙烯酸 β -羟乙酯(HEMA), 使骨架网具有亲水性。经ESR测定, 在接枝后的尼龙网上存在有HEMA自由基。利用辐射包埋方法, 在辐射作用下, 含有菌体细胞的HEMA溶液中, 网上存在的HEMA自由基与HEMA发生聚合反应包埋菌体细胞, 制成固定化菌体膜。

材料与 方法

1. 材料

尼龙6网(Jp-72), 市售, 上海筛网厂产; 甲基丙烯酸 β -羟乙酯(HEMA), 上海珊瑚化工厂产; 3-氨基-6-硝基苯甲酸(NIPAB), 上海东风生化试剂厂产。

2. 方法

尼龙6网辐射接枝HEMA, 采用共辐照方法: 尼龙6网分别用洗涤精、乙醇、蒸馏水清洗干燥后, 放在含有20% HEMA水溶液(加入0.2% CuCl₂)的辐照容器中, 抽空通氮后置于⁶⁰Co γ 辐射场中, 进行辐射接枝反应。反应完成后, 用乙醇、蒸馏水清洗接枝膜, 干燥备用。

取上述已接枝过HEMA的尼龙6网, 平铺于玻璃板上, 以一定量含有大肠杆菌的HEMA溶液均匀分散在该尼龙网上, 在-78℃温度下, 进行辐照包埋。辐照完成后, 自然升温到室温, 从玻璃板上剥离下固定化大肠杆菌膜, 用水、磷酸缓冲液(pH=7.5)清洗。

结果与讨论

1. 自然菌体活力的测定^[5]

自然菌体活力标准曲线测定：用 0.05 mol/L pH 为 7.5 的磷酸缓冲溶液溶解 3-氨基-6-硝基苯甲酸(NIPAB)为试样，以此作标准曲线，求得曲线斜率为 $p = 2.04/\mu\text{mol}$ 。

自然菌体活力测定：将菌体溶解在 pH=7.5 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲溶液中配成 0.1 mg/ml 的溶液。取上述 1 ml 溶液，加入 2 ml NIPAB 溶液 (0.45 g NIPAB 溶解在 500 ml pH=7.5 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲溶液中得 0.9 mg/ml 浓度的 NIPAB)，在 37℃ 恒温水浴中反应 5 min，随即加入 2 ml 5% Na_2CO_3 水溶液，终止反应，取出反应液在 405 nm 处进行比色测定。

$$\text{自然菌体活力} = \frac{\text{O.D.}}{tVp} \quad (\text{单位/ml})$$

式中 O. D. 为菌体消光值；t 为反应时间(min)；V 为样品体积(ml)；p 为标准曲线斜率 $2.04/\mu\text{mol}$ 。

活力单位的定义是在 1 min 内水解产生 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 3-氨基-6-硝基苯甲酸所需要大肠杆菌的量。

2. 固定化菌体膜活力测定

取约 1 cm^2 的固定化菌体膜，加入 1 ml pH=7.5 0.05 mol/L 磷酸缓冲液和 2.0 ml NIPAB 溶液，37℃ 恒温水浴中反应 5 min，然后加入 2.0 ml 5% Na_2CO_3 终止反应，在 405 nm 处测定 O. D. 值。膜取出干燥后，称重 w，则

$$\text{固定化菌体膜活力} = \frac{\text{O.D.}}{wpt} \quad (\text{单位/g})$$

3. 大肠杆菌的辐射损伤

一般而言，电离辐射对菌体细胞均有一定程度的损伤(失活)，剂量越大，损伤越严重，即失活程度越大。但在低温下辐照，可使这种影响减少到相当小的程度。

由图 1 可知，在 -78°C 下辐照，当剂量小于 10 kGy 时，菌体活力几乎没有下降，而在 0°C 辐照，即使剂量很低，菌体也很易受到损伤，因此选择在 -78°C 下固定菌体为宜。

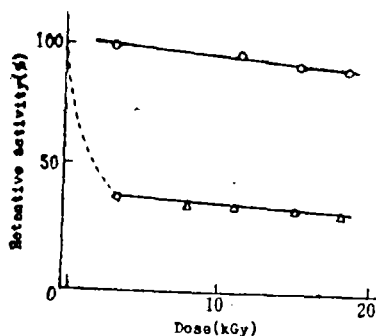


Fig 1. Effect of radiation dose on the activity of E. Coli.

Dose rate: 1.04 Gy/s

Concentration of E. Coli. 1 mg/ml

Radiation temperature: (○) -78°C

(△) 0°C

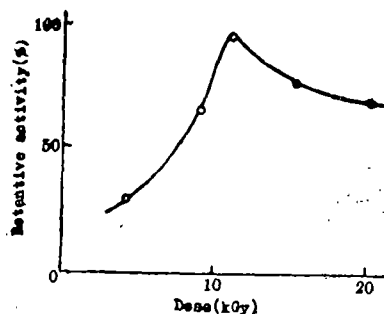


Fig 2. Relation between radiation dose and activity of E. Coli. by immobilized on nylon 6 net

Dose rate: 1.04 Gy/s

Concentration of HEMA: 30%

Entrapment weight: 2.11 g/ml HEMA

Radiation temperature: -78°C

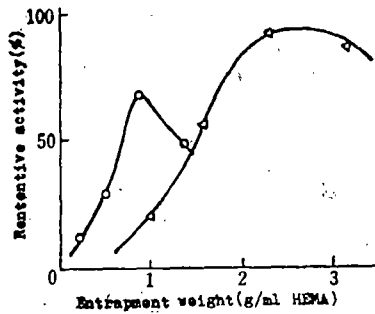


Fig 3. Relation between entrapment weight and activity of *E. Coli.* by immobilized on nylon 6 net
Concentration of HEMA: (○) 30%,
(△) 50%,
Radiation temperature: -78°C

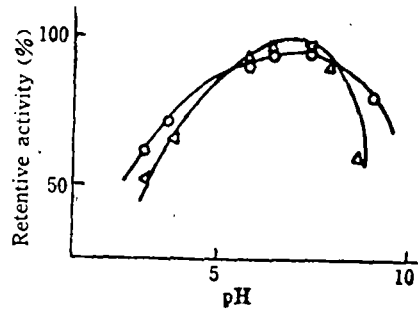


Fig 4. Relation between activity of Original *E. Coli.* and activity of immobilized *E. Coli.* on nylon 6 net at different pH value
(○) Original *E. Coli.*,
(△) Immobilized *E. Coli.*

4. 辐照剂量对固定化菌体膜活力的影响

研究辐照剂量对固定化菌体膜活力的影响的目的,一方面为了保持菌体膜活力,辐照剂量少些为宜,另一方面为了完成包埋过程和增强菌体膜的强度,辐照剂量不宜太少,否则菌体流失过多,包埋太少。实验证明,辐照剂量控制在 10 kGy 左右,可以制得最大保存活性的菌体膜。

5. 包埋量对固定化菌体膜活力的影响

选择 30% 和 50% HEMA 单体浓度,进行研究包埋量对固定化菌体膜活力的影响。由图 3 可知,不同 HEMA 单体浓度都出现了活力最大的包埋量。30% HEMA 单体浓度包埋量为 0.85 g/ml HEMA, 50% HEMA 单体浓度的包埋量为 2.30 g/ml HEMA。包埋量的差别引起活力不同,主要是由于 HEMA 单体聚合之后孔结构大小所引起的。50% HEMA 单体聚合之后的微孔结构较 30% HEMA 的致密。这样一方面包埋菌体量多,表现出菌体膜的活力也高;另一方面,由于致密,内部菌体活力不易表现出来。从图 3 看到,同样 1 g/ml HEMA 包埋量,30% HEMA 浓度所表现的活力较高。

6. 固定化菌体膜和原始菌体性质的比较

(1) 反应最适 pH 值: 实验结果由图 4 所示,固定化菌体膜和原始菌体的最适 pH 值均为 7.5。一般认为,固定化后,最适 pH 值往往会引起偏移,其理由是载体有带电基团,电解质的微环境影响着菌体的活力。然而本实验使用的载体是 HEMA,是电中性的,因此,固定化菌体膜和原始菌体的最适 pH 值都是 7.5。

(2) 菌体膜反应的最适温度: 温度对菌体活力影响具有双重作用。温度升高,可以促进反应的进行,但同时会破坏菌体活力,所以必须选择一个最适温度,使之既能保证酶促反应的进行,又能不破坏菌体的活力。实验结果,最适温度约 40°C 。

(3) 固定化菌体膜的工作稳定性

考察用 30% HEMA 单体浓度,包埋量为 0.85 g/ml HEMA 的固定化菌体膜的工作稳定性,结果如图 6 所示。每次以 NIPAB 法测定菌体膜活力之后,用 $\text{pH}=7.5$ 的磷酸缓冲液洗涤,经 10 次测定后,菌体膜活力达到稳定,保存活力可达 65%。

结 论

利用尼龙 6 网作为骨架,辐射接枝 HEMA,使其具有亲水性,而后采用低温包埋的方法,

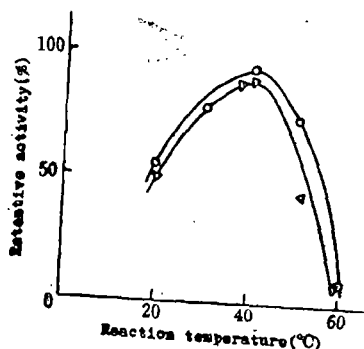


Fig 5. Relation between activity of original E. Coli. and activity of E. Coli. by immobilized on nylon 6 net at different temperature
(○) Original E. Coli,
(△) Immobilized E. Coli.

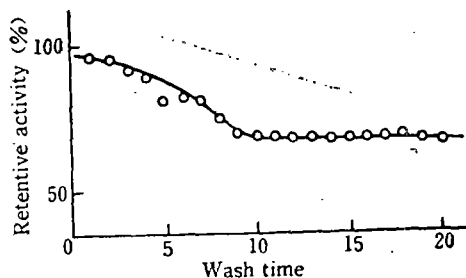


Fig 6. Relation between wash times and activity of E. Coli. by immobilized on nylon 6 net
(○) Entrapment weight: 0.85 g/ml
HEMA

制成固定化菌体膜。从固定化菌体膜的活力测定表明,包埋量对于 30% HEMA 单体浓度显示最大活力为 0.85 g/ml, 50% HEMA 单体浓度的为 2.30 g/ml。固定化菌体膜和原始菌体的反应最适 pH 值均为 7.5。固定化菌体膜反应的最适温度为 40°C。固定化菌体膜经 10 次反应后,保存活力仍可达到 65%。

参 考 文 献

- [1] 曹瑾等, 原子能科学技术, 23 (2), 53 (1989).
- [2] 日本公开特许公报, 81, 39788.
- [3] 日本公开特许公报, 82, 122797.
- [4] Cao Jin et al., RadTech 90-North American, Radiation Curing Conference and Exposition Proceedings, Vol 2, P. 154, March 25-29, 1990, Chicago, USA.
- [5] 上海第三制药厂等, 医药工业, (7), 22 (1978).

(稿件收到日期: 1990 年 8 月 6 日)

THE STUDY OF PREPARATION FOR IMMOBILIZED CELLS MEMBRANES OF E. COLI BY RADIATION TECHNIQUE

Cao Jin, Chen Pin and Yu Yi

(East China University of Chemical Technology, Shanghai)

ABSTRACT The paper described the preparation of immobilized cells membranes with E. Coli by radiation technique. The nylon 6 was grafted with HEMA, which as matrix to prepare immobilized cells membranes with E. Coli. by radiation entrapment at low temperature. The results showed that the retentive activity possessed a maximum value for membranes with E. Coli. when the irradiation dose was at 10—12 kGy, the entrapped cells has 2.3 g/ml at 50% HEMA concentration, the optimum pH and optimum temperature for membranes with E. Coli. are as same the original cells.

KEYWORDS E. Coli., Radiation immobilization, HEMA, Radiation grafting, Radiation entrapment