

乙酰胆碱酯酶壳聚糖膜的制备研究*

Research on Acetylcholinesterase and Chitosan Membrane

王 晔^{1,2}, 彭 元², 赵肃清³, 徐凤彩^{4**}

WANG Ye^{1,2}, PENG Yuan², ZHAO Su-qing³, XU Feng-cai^{4**}

(1. 百奥泰生物科技(广州)公司, 广东广州 510760; 2. 广西科学院, 广西南宁 530007;
3. 广西植物研究所, 广西桂林 541006; 4. 华南农业大学生命科学学院, 广东广州 510642)

(1. Sinoasis Pharmaceuticals Inc., Guangzhou, Guangdong, 510760, China; 2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 3. Guangxi Institute of Botany, Guilin, Guangxi, 541006, China; 4. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong, 510642, China)

摘要:以新鲜母鸡血为材料, 30%~70%(V/V)乙醇分步沉淀制备粗酶制剂, 再经 DEAE-Cellulose 与 Sephadex G-75 柱层析, 部分纯化鸡红细胞乙酰胆碱酯酶(AChE), 再以壳聚糖制备成膜作为载体, 采用吸附-交联法固定 AChE 制备壳聚糖酶膜, 分别考察制备壳聚糖酶膜的壳聚糖浓度(0、0.05、0.1、0.15、0.2g/ml), 壳聚糖酶膜的吸附时间(2、4、6、8、10、12h)和吸附温度(0、4、25、30、37℃), 以及戊二醛质量浓度(0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%), 戊二醛交联时间(40、80、120、160、1200min), 戊二醛交联温度(0、4、25、37℃)和给酶量(0~2000U/ml)对壳聚糖酶膜固定化效果的影响。结果显示, 鸡红细胞 AChE 粗酶制剂的部分纯化倍数为 12 倍时, 活力回收 34.1%。优化的固定化条件是以 0.1g/ml 壳聚糖溶液制备载体膜, 采用 950 U/ml 的酶液(蛋白质含量为 0.43 mg/ml), 在 4℃下吸附 10 h, 再以质量浓度为 0.6%的戊二醛溶液 4℃下交联 2h。此条件下制备的酶膜活力达 11.5 U/cm², 活力回收达 30%。

关键词:乙酰胆碱酯酶 壳聚糖 固定化酶

中图分类号: Q552.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2007)02-0085-04

Abstract: By 30%~70% ethanol fractional precipitation, DEAE-Cellulose and Sephadex G-75 chromatography, the Acetylcholinesterase is purified from hen erythrocyte, then the Acetylcholinesterase Membrane is immobilized by absorbing and crosslinking with carrier of Chitosan. In order to prepare the best Acetylcholinesterase Membrane, so difference activation mass of Acetylcholinesterase and difference conditions were studied such as the concentration of Chitosan for 0g/ml, 0.05g/ml, 0.1g/ml, 0.15g/ml and 0.2g/ml, time for absorbing 2h, 4h, 6h, 8h, 10h and 12h, temperature for absorbing 0℃, 4℃, 25℃, 30℃ and 37℃, concentration of glutaraldehyde for 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8% and 1.0%, time for crosslinking with glutaraldehyde for 40min, 80min, 120min, 160min and 1200min, temperature for crosslinking with glutaraldehyde for 0℃, 4℃, 25℃ and 37℃. The results show the Acetylcholinesterase purification from hen erythrocyte has reached 12-folds with a yield of 34.1%. By using as a bifunctional crosslinking reagent, the optimum conditions for membrane of immobilization are as follows: the concentration of chitosan is 0.1g/ml; the concentration of the free AChE is 950U/ml; absorbing time and temperature for 10h at 4℃; crosslinking temperature at 4℃ with the concentration of glutaraldehyde is 0.6% for 2h. The activity and recovery of immobilized AChE are 11.5 U/cm² and 30%, respectively.

收稿日期: 2007-03-05

修回日期: 2007-04-25

作者简介: 王 晔(1974-), 男, 工程师, 硕士, 主要从事酶工程研究。

* 广西区科技厅攻关(桂科攻 0537007-07-02)和南宁市科技攻关(200501065B)项目资助。

** 通讯作者。

Key words: Acetylcholinesterase, chitosan, immobilization

有机磷农药的生化机制是抑制乙酰胆碱酯酶

(Acetylcholinesterase, 3. 1. 1. 7, AChE)^[1]。采用固定化 AChE 制备检测卡或酶传感器检测有机磷农药的研究已较多,但是大多采用纯酶或昆虫脑匀浆,制备困难,价格昂贵,且对载体的选择、制备及性质探索较少;对固定方法与固定化酶的酶学性质均缺少系统而深入的研究^[2~4]。本试验以来源广泛的鸡血为材料,以壳聚糖为载体制备 AChE-壳聚糖酶膜,探索其固定化条件,为进一步研究 AChE 酶学性质以及利用酶膜检测有机磷农药提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与主要试剂

新鲜母鸡血;壳聚糖[Chitosan,脱乙酰度 93.28%(m/m),广州凯利生物制剂制品厂生产];戊二醛溶液(Fluka 公司生产);氯化乙酰胆碱(acetylcholine chloride, AChCl, Sigma 公司生产);5,5-二硫-二-[2-硝基苯甲酸](DTNB,Fluka 公司生产);纤维素膜(杭州新华纸业有 限公司生产);考马氏亮蓝 G-250(Fluka 公司生产);其他试剂为市售生化试剂或分析纯试剂。

1.2 方 法

1.2.1 AChE 粗酶制剂的制备

取新鲜母鸡血,加入 1:10(V/V)的草酸钾溶液抗凝。3000r/min,4℃离心 15min,取下层红细胞,加入等体积预冷的生理盐水,悬浮洗涤 3 次。红细胞按 1:3(m/m)加入预冷蒸馏水,冰浴下搅拌 30min 溶血。8000r/min,4℃离心 15min,取上清液,低温下缓慢加入预冷至-20℃的乙醇至 30%(V/V),充分搅拌 30min,4℃下静置 1h。再经离心(8000r/min,4℃,15min),取上清液加入预冷至-20℃的乙醇至 70%(V/V),搅拌 30min,4℃下静置过夜。次日,离心收集沉淀,用-20℃的丙酮洗涤 3 次。沉淀真空干燥,为粗酶制剂。

1.2.2 鸡红细胞 AChE 的部分纯化

将 1g 粗酶制剂充分溶于 pH 值 8.0、0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(PBS),离心,取 5ml 上清过 DEAE-Cellulose 柱层析(1.5cm×50cm),以 20~200mmol/L、pH 值 8.0 的 PBS 离子强度线性梯度洗脱。洗脱液出现 2 个蛋白峰,其中主酶峰位于第 1 峰内,收集此峰共 25.4 ml(蛋白质质量浓度为 5.83mg/ml,酶活性 1950U/ml)。聚乙二醇浓缩,再过 Spandex G-75 柱层析(1.5cm×50 cm),以 20mmol/L、pH 值 8.0 的 PBS 洗脱,收集酶峰。此即部分纯化的 AChE 酶液。

1.2.3 壳聚糖膜的制备及物理性状测定

取 1g 壳聚糖粉末,加入 10ml、1%(m/m)的醋酸水溶液,搅拌 10min 至形成黄色溶胶。室温下 3000r/min 离心 5min 除去不溶颗粒。将纤维素膜(3cm×4cm×0.04cm)置于该溶胶中浸泡 12h,取出晾干后再置于 0.1mol/L、pH 值为 8.0 的 PBS 浸泡 12h,取出,晾干备用。

将干壳聚糖膜 25℃下置于蒸馏水中充分浸泡 3d,测定其厚度变化,并按下式计算膜的溶胀度(SR%),

$$SR\% = \frac{W - W_0}{W_0} \times 100\%,$$

式中 W_0 为干膜质量(g), W 为溶胀后的质量(g)。

1.2.4 壳聚糖酶膜的制备及固定化条件的选择

将壳聚糖膜置于 1ml 酶液中吸附,用戊二醛进行交联,取出膜,用 PBS 将多余的戊二醛洗净,吸干,即制得壳聚糖酶膜。

分别考察制备壳聚糖酶膜的壳聚糖浓度(0、0.05、0.1、0.15、0.2g/ml),壳聚糖酶膜的吸附时间(2、4、6、8、10、12h)和吸附温度(0、4、25、30、37℃),以及戊二醛浓度(0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%)(m/m),戊二醛交联时间(40、80、120、160、1200min),戊二醛交联温度(0、4、25、37℃)和给酶量(0~2000U/ml)对壳聚糖酶膜固定化效果的影响,选取最优固定化条件。

1.2.5 蛋白质含量测定

按 Bradford^[5]方法,以牛血清蛋白为标准蛋白质进行蛋白质含量测定。

1.2.6 AChE 活力测定

按 Ellman 法^[6]并稍加改进,以每 5min 内在测定条件下变化 0.001 吸光度单位的酶量为 1 个活力单位进行 AChE 活力测定。

1.2.7 固定化酶活力测定

按 1.2.6 测定法加以修改:3ml 底物溶液 37℃保温 5min,加入酶膜(3cm×4cm×0.04cm),反应 5min,取出酶膜、测定反应前后 412nm 处的吸光度变化值。

以 5min 内,在测定条件下,单位面积(cm^2)变化 0.001 吸光度的酶量定义为 1 个活力单位(U),以 U/cm^2 载体表示。固定化酶活力回收按下式计算:

$$\text{固定化酶活力回收}(\%) = \frac{\text{固定化酶总活力}}{\text{溶液酶总活力}} \times 100\%.$$

2 结果与分析

2.1 鸡红细胞 AChE 的部分纯化结果

如表 1 所示,粗酶制剂经 DEAE-Cellulose 与 Sephadex G-75 部分纯化,酶被纯化了 12 倍,活力回收 34.1%,比活力为 2401.9 U/mg。

表 1 鸡红细胞 AChE 的部分纯化结果

纯化步骤	体积 (ml)	总活力 (U)	总蛋白含量 (mg)	比活力 ($U \cdot mg^{-1}$)	纯化倍数 (\times)	活力回收 (%)
丙酮粉溶解酶液	5.0	97000	486.9	199.2	1	100
DEAE-Cellulose	25.4	49530	148.2	333.6	1.67	54.3
Sephadex G-75	38.5	33110	13.8	2401.9	12	34.1

图 1 显示,经 Sephadex G-75 层析,出现了 2 个酶峰,前者为 AChE 的 G4 形式的酶,后者为分散的 G 形式的单体^[7]。收集酶峰,即部分纯化酶液。

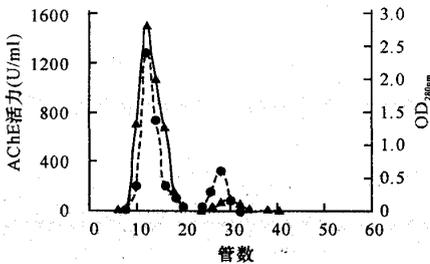


图 1 鸡红细胞 AChE 的 Sephadex G-75 柱层析

●: AChE; AChE 活力; ▲: OD_{280nm}

2.2 壳聚糖膜的物理性状

制得的壳聚糖膜的溶胀度为 189%,壳聚糖层厚 3.6 μm 。说明纤维素膜有效地吸附了解壳聚糖,制得的壳聚糖膜具有良好的溶胀性能。

2.3 固定化条件对固定化效果的影响

2.3.1 降解壳聚糖浓度对固定化效果的影响

随着壳聚糖浓度的升高,制得的壳聚糖膜的吸附能力与游离氨基开始增加,酶膜的活力与活力回收也逐渐升高(图 2)。但当壳聚糖浓度超过 0.1 g/ml 后,酶膜开始变得褶皱易碎。结合固定化酶活力与物理性状两方面因素,采取 0.1 g/ml 的壳聚糖溶液制备酶膜。此时酶膜坚韧平展,活力与活力回收也较高,分别为 8.7 U/cm^2 和 23.5%。

2.3.2 吸附时间对固定化效果的影响

取 6 组 0.1 g/ml 壳聚糖溶胶制备的膜,加入等量酶液,不同吸附时间结果表明,以 10h 的酶膜活力与活力回收最高。壳聚糖为阳离子高聚物,而 AChE 的 pI 为 4.0 左右,在 pH 值 8.0 的 PBS 中带负电

荷,易被壳聚糖吸附。与载体吸附饱和后,随时间延长,酶失活加剧,反而导致两者下降。

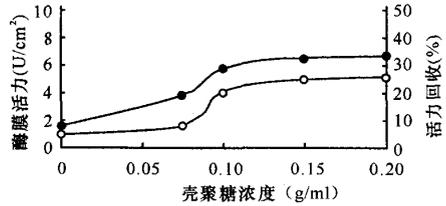


图 2 壳聚糖浓度对固定化效果的影响

●: 酶膜活力; ○: 活力回收

2.3.3 吸附温度对固定化效果的影响

等量壳聚糖膜(同 2.3.2),加入等量酶液,不同吸附温度下分别固定 10h 的结果表明,在 4℃ 下吸附固定的酶膜的活力与活力回收最高,分别为 6.2 U/cm^2 和 23.6%。吸附反应是放热过程,随着温度升高,酶稳定性降低,两者下降。

2.3.4 戊二醛浓度对固定化效果的影响

图 3 显示,当戊二醛浓度为 0.6% (m/m) 时,酶膜的活力与活力回收最高。但随着戊二醛浓度的进一步升高,两者开始减小,这是因为戊二醛浓度过高,会使部分酶分子内交联,从而导致酶变性失活^[8]。

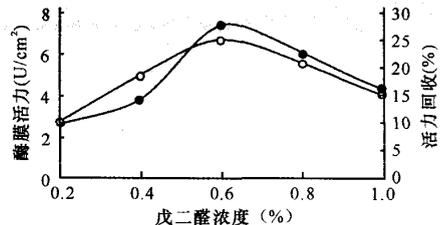


图 3 戊二醛浓度对固定化效果的影响

●: 酶膜活力; ○: 活力回收

2.3.5 戊二醛交联时间对固定化效果的影响

等量壳聚糖膜,加入等量酶液,于 4℃ 下吸附 10h,加入终浓度为 0.6% (m/m) 的戊二醛,不同交联时间结果表明,交联 120min 的活力为 10.4 U/cm^2 ,活力回收为 25.0%,达最高。之后随着时间的延长,戊二醛自身缔合,酶变性加剧,导致两者开始下降。

2.3.6 戊二醛交联温度对固定化效果的影响

按 2.3.5 中条件制备酶膜,不同交联温度下交联 2h 的结果表明,4℃ 下交联酶膜活力与活力回收最高,分别为 12.1 U/cm^2 和 30.5%。当交联温度升高,两者下降,这是由于温度升高,戊二醛自身缔合加快及酶变性加剧所致。

2.3.7 给酶量对固定化效果的影响

随着给酶量的增加,载体结合酶量越多,酶膜活力越高,当给酶量为 950 U/ml 时,由于结合的酶量趋于饱和,所以酶膜的活力达到最高并趋于稳定。此时的酶活力回收为 30% 左右,结果如图 4 显示。

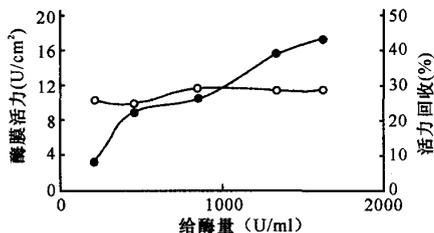


图 4 给酶量对固定化效果的影响

●: 酶膜活力; ○: 活力回收

综上所述,在本试验下,壳聚糖固定 AChE 的最佳条件为:以 0.1g/ml 壳聚糖溶液制备载体膜,用 950U/ml 的酶溶液(蛋白质含量为 0.43 mg/ml),4℃下吸附 10h,再以 0.6%戊二醛溶液 4℃下交联 2h,固定化酶膜活力达 11.5U/cm²,活力回收 30%。

3 结束语

固定化是制备 AChE 酶膜或酶传感器用以检测有机磷污染的基础。影响固定化的因素有酶源、载体、固定化方法和条件等。固定化方法主要有吸附、交联、共价键结合和包埋法等。实际上,单独采用一种固定方法,往往达不到理想的效果,所以要结合载体的性质进行选择^[8]。

降解壳聚糖因含有大量的游离氨基,是天然多糖中唯一的碱性多糖,因而具有许多特殊的理化和生理性质,如优良的吸附性能和交联性能^[9],而 AChE(pI4.0)在 pH 值 8.0 的磷酸缓冲液下,带负电荷,两者的吸附效果好。基于此,我们首先制备了物理性能良好的壳聚糖膜。再部分纯化了鸡红细胞 AChE,采用吸附-交联法制备成壳聚糖酶膜,研究了壳聚糖浓度、戊二醛浓度、交联时间和温度的影

响,结果显示条件优化后得到的酶膜的活力与活力回收均较高。关于固定化酶的酶学性质以及以该酶膜检测有机磷农药的效果,将有待进一步的研究与报道。

参考文献:

- [1] 江藤守絨. 有机磷农药的化学与生物化学[M]. 杨石先,张立言,译. 北京:化学出版社,1974:11.
- [2] MENDOZA C. Enzymatic detection of ten organophosphorous following separation on thin-layer chromatograms [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1968,16(5):808-812.
- [3] BERNABEI M, CREMISINI C, MASCINI M, et al. Determination of organophosphorous and carbamic pesticides with a choline and acetylcholine electrochemical biosensor [J]. Analytical Letters, 1991, 24(8):1317-1331.
- [4] HOBEL W, POLSTER J. Fiber optic biosensor for pesticides based on acetylcholinesterase [J]. Journal of Analytical Chemistry, 1992, 343:101-102.
- [5] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72:248-254.
- [6] ELLMAN G L, COURTNEY K, ANDERS V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochemistry and Pharmacology, 1961, 7(1):88-95.
- [7] 郭胜清,曹树桂,程玉华. 鸭血清胆碱酯酶的纯化及性质研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20(2): 119-124.
- [8] 徐凤彩. 酶工程[M]. 北京:中国农业出版社,2000:69.
- [9] 蒋挺大. 壳聚糖和甲壳素作为酶和细胞的固定化载体的研究进展[J]. 工业微生物, 1998, 8(3):32-37.

(责任编辑:韦廷宗)

深色真菌能吸收辐射并将其转化成养料

切尔诺贝利核反应堆曾在 1986 年的一次事故中受到严重污染,纽约爱因斯坦医学院的研究小组成员 Casadevall 了解到在现已关闭的切尔诺贝利核反应堆内和周围有真菌生长,从而联想到也许这种真菌能够利用黑色素抵御辐射。于是研究人员开始培育真菌——一些有黑色素一些没有黑色素——然后用伽玛射线辐射它们。结果那种深色,富含黑色素的真菌在辐射过程中长势更好。研究表明,深色的真菌能够吸收辐射并可将其转化成养料。研究认为,这种真菌能够在高辐射太空环境下生长,并可用作执行长期太空任务宇航员的食物来源。研究人员将在实验室试验真菌在一系列电磁辐射(从紫外线到可见光)下的表现。他们还将对一些可食用的真菌进行试验,包括蘑菇等。

(据科学网)