

磁性交联核酸酶 P1 聚集体的制备及性质研究

邵卫祥, 莫晓燕, 李黎

(西安交通大学生命科学与技术学院, 710049, 西安)

摘要: 采用磁性纳米颗粒与酶蛋白共沉淀后经戊二醛交联的方法, 制备了磁性交联核酸酶 P1 聚集体, 并且对比分析了游离酶和固定化酶的部分酶学性质. 优化的最佳制备条件为: 硫酸铵质量浓度为 0.8 g/mL, 沉淀时间为 0.5 h, 戊二醛体积分数为 0.6%, 交联时间为 2 h, 所制得的固定化酶活性回收率为 32.4%. 酶学性质研究表明, 固定化酶的 K_m 值 (30.7 mmol/L) 明显高于游离酶的 (7.27 mmol/L), 二者最适反应温度分别为 90 °C 和 75 °C, 最适 pH 值均为 5.2, 固定化核酸酶 P1 对热和酸碱的耐受性明显增强, 连续反应 6 次后酶活力仍保留 70%, 良好的操作稳定性和磁响应性有利于核酸酶 P1 的工业化应用.

关键词: 核酸酶 P1; 交联酶聚集体; 磁性纳米颗粒; 酶学性质

中图分类号: Q814.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2008)08-1035-05

Preparation and Property of Magnetic Cross-Linked Nuclease P1 Aggregations

SHAO Weixiang, MO Xiaoyan, LI Li

(School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: The magnetic cross-linked enzyme aggregations (CLEAs) were prepared by depositing of nuclease P1 with magnetic nanoparticles and cross-linked with glutaraldehyde, and some enzymatic properties were compared between nuclease P1 and CLEAs. The optimal conditions of preparing magnetic CLEAs are sought out: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80% saturation, depositing time 0.5 h, glutaraldehyde 0.6%, and cross-linking time 2 h. The activity recovery reaches to 32.4% under the above conditions. Investigation of enzymatic properties suggests that K_m of magnetic CLEAs (30.7 mmol/L) gets higher than soluble enzyme (7.27 mmol/L), and the optional reacting temperature of immobilized nuclease P1 is appropriate at 90 °C, while optional reacting pH approaches to 5.2. Once immobilized, the resistance to heat, acid and alkali of nuclease P1 is remarkably improved, and the magnetic CLEAs maintained 70% activity after six consecutive reactions. Good operational stability and magnetic response are beneficial for industrial utilization of nuclease P1.

Keywords: nuclease P1; cross-linked enzyme aggregation; magnetic nanoparticle; enzymatic property

交联酶聚集体(CLEAs)是近年来发展起来的一种新型无载体固定化方法^[1], 而磁性载体因其良好的磁响应性也越来越受到重视^[2]. 核酸酶 P1 是具有广阔应用前景的工业用酶, 其水解产物 5'-核

昔酸广泛用于食品、医药行业以及基因工程研究领域. 但是, 目前核酸酶 P1 的生产菌产酶量不高, 酶活力和纯度较低^[3], 而磁性 CLEAs 的制备方法尚未见报道. 本文结合交联酶聚集体和磁性固定化酶

的优点开展工作,可为核酸酶 P1 固定化研究开拓新的途径,对于核苷酸工业中提高核酸酶 P1 的利用效率具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

核酸酶 P1(由桔青霉(AS3.2788)经摇瓶发酵自制),酵母核糖核酸(生化试剂,中国医药集团上海化学试剂公司),戊二醛(质量分数为 50%的水溶液,天津市博迪化工有限公司),其余试剂均为分析纯。

使用的仪器有 DW 1.0-60E 型台式冻干机(丹麦 HETO 公司),DU-640 紫外分光光度计(美国 BECKMAN 公司),78HW-1 型恒温磁力搅拌器(杭州仪表电机厂),5810R 型高速冷冻台式离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 磁性交联核酸酶 P1 聚集体的制备 磁性纳米颗粒采用水-醇共热法制备并活化^[4]。在冰浴条件下,10 mL 酶液中加入 0.01 g 磁性纳米颗粒,搅拌均匀,加入硫酸铵固体,静置数小时,边搅拌边加入戊二醛溶液,交联数小时后,经 4℃、10 000 r/min 离心 10 min,沉淀透析 48 h,每 12 h 换水一次,再次离心,沉淀冷冻干燥 12 h,得到磁性交联核酸酶 P1 聚集体粉末,称量备用。

1.2.2 固定化酶活力测定及酶活回收率的计算 以酵母 RNA 为底物,采用紫外分光光度法测定酶活力^[5]

$$\text{酶活回收率} = (A_i/A_s) \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_i 、 A_s 分别为固定化酶和游离酶的总活力。

1.2.3 磁性 CLEAs 制备条件的优化 本研究分别考察了硫酸铵浓度、沉淀时间、交联剂浓度和交联时间对磁性 CLEAs 的酶活回收率的影响。

(1)硫酸铵浓度的影响. 戊二醛质量分数取 0.4%,交联时间取 2 h,沉淀时间取 0.5 h,硫酸铵质量浓度分别取 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 g/mL。

(2)沉淀时间的影响. 硫酸铵质量浓度取 0.8 g/mL,戊二醛质量分数取 0.4%,交联时间取 2 h,沉淀时间分别取 0.5、1、1.5、2 h。

(3)戊二醛浓度的影响. 硫酸铵质量浓度取 0.8 g/mL,沉淀时间取 0.5 h,交联时间取 2 h,戊二醛质量分数分别取 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%。

(4)交联时间的影响. 硫酸铵质量浓度为 0.8 g/mL,沉淀时间取 0.5 h,戊二醛质量分数取 0.4%,

交联时间分别取 1、2、3、4 h。

1.2.4 磁性 CLEAs 的部分酶学性质研究 以酵母核糖核酸为底物,考察了磁性 CLEAs 和游离酶的 K_m 值、热稳定性、最适反应温度、pH 稳定性和最适反应 pH,以及磁性 CLEAs 的操作稳定性和磁响应性。

(1)米氏常数的测定. 测定磁性 CLEAs 和游离酶在底物质量浓度分别为 1、2、3、4、5 g/L 时的反应速率,用双倒数作图法求出游离酶和固定化酶的 K_m 值。

(2)温度对酶促反应的影响. 游离酶与磁性 CLEAs 分别在 40、50、60、70、80、90、100℃处理 1 h 后测定残留酶活力,测定反应温度分别为 60、65、70、75、80、85、90、95℃时游离酶与磁性 CLEAs 的酶活力。

(3)pH 值对酶促反应的影响. 游离酶与磁性 CLEAs 分别在 pH 为 1、3、5、7、9、11、13 条件下处理 1 h 后测定残留酶活力,测定反应 pH 分别为 4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6 时游离酶与磁性 CLEAs 的酶活力。

(4)磁性 CLEAs 操作稳定性的测定. 磁性 CLEAs 连续反应 6 次,测定每次反应的酶活力,以第 1 次反应酶活力为 100%,分别计算相对酶活力。

(5)磁响应性实验. 分别将等量的两份磁性 CLEAs 悬浮液置于磁铁上方和远离磁场处,每隔 1 min 取 0.5 mL 上清液测酶活力。

2 结果与讨论

2.1 磁性 CLEAs 制备条件的优化

2.1.1 硫酸铵浓度对酶活回收率的影响 从图 1 中可以看出,硫酸铵质量浓度为 0.8 g/mL 时,制得的 CLEAs 酶活力最高(31.3%)。在一定浓度范围内,硫酸铵浓度的增加使得沉淀的酶蛋白增多,表现为 CLEAs 的活力升高。另一方面,随着硫酸铵浓度增加,沉淀的颗粒直径增大,不利于酶与底物的接触,增加了扩散阻力,酶活力降低。

2.1.2 沉淀时间对酶活回收率的影响 如图 2 所示,在实验范围内酶活回收率基本保持在 30.8%~31.5%。理论上沉淀的酶蛋白量随沉淀时间增加而增大,但单位时间内沉淀的酶蛋白量越来越少。实验表明,核酸酶 P1 在 0.8 g/mL 硫酸铵饱和度下 0.5 h 即可充分沉淀,延长沉淀时间对沉淀效果影响不大。

2.1.3 戊二醛浓度对酶活回收率的影响 如图 3

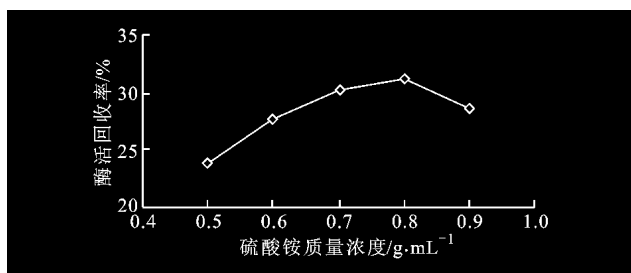


图1 沉淀剂浓度对酶活回收率的影响

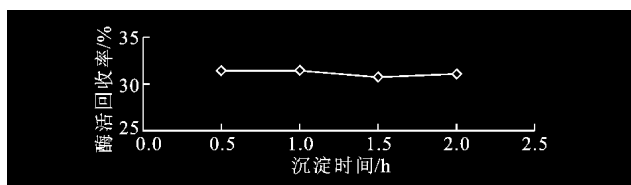


图2 沉淀时间对酶活回收率的影响

所示,随着戊二醛浓度的增高,CLEAs 的酶活回收率逐渐上升,戊二醛质量分数为 0.6% 时达到最高值 31.8%,继续增加戊二醛的浓度活性反而下降。分析原因可能与低浓度戊二醛交联形成的 CLEAs 结构松散,酶容易泄漏,而高浓度戊二醛反应比较剧烈,对酶蛋白伤害较大,从而降低酶活力有关。

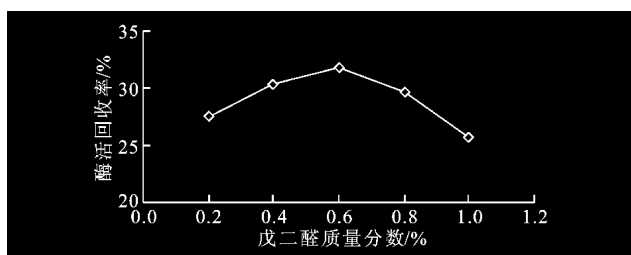


图3 交联剂浓度对酶活回收率的影响

2.1.4 交联时间对酶活回收率的影响 如图 4 所示,随着交联时间的延长,CLEAs 的活性逐渐增加,交联时间为 2 h 时,酶活回收率达到最大值 (31.8%),继续延长交联时间酶活力下降。当戊二醛浓度一定时,交联是否充分与交联时间相关。交联时间短,交联不充分,酶容易泄漏,交联时间长,酶蛋白受戊二醛破坏大,活力也不高。戊二醛质量分数为 0.40% 时交联时间取 2 h 为宜。

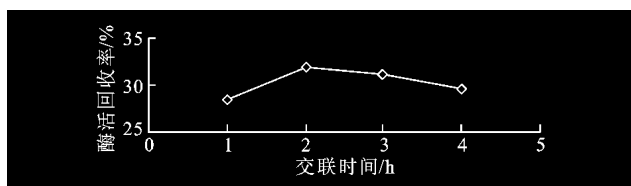


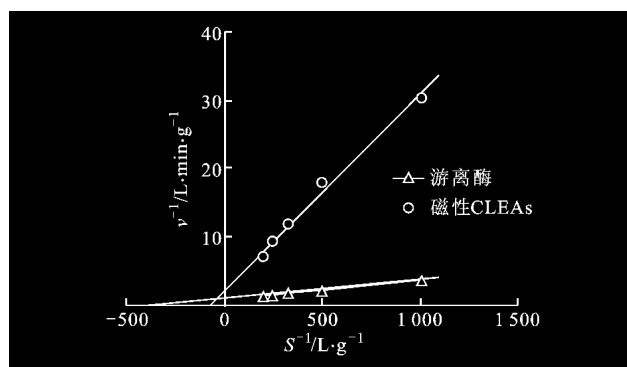
图4 交联时间对酶活回收率的影响

在上述优化条件(硫酸铵质量浓度为

0.8 g/mL,沉淀时间为 0.5 h,戊二醛质量分数为 0.6%,交联时间为 2 h)下制备磁性 CLEAs,得到固定化酶的酶活回收率为 32.4%。

2.2 磁性 CLEAs 的酶学性质

2.2.1 游离酶与固定化酶 K_m 的测定 如图 5 所示,游离酶和固定化酶的 K_m 值分别为 7.27 mmol/L 和 30.7 mmol/L, v 为反应速度。结果表明核酸酶 P1 在固定化后表观 K_m 变大,对底物的亲和力降低。与游离酶相比,磁性 CLEAs 的大部分酶蛋白在颗粒内部,底物的扩散阻力大,内部底物浓度低于主体溶液浓度,从而使表观 K_m 明显增大。

图5 游离酶和固定化酶的 K_m 值

2.2.2 游离酶与固定化酶的热稳定性 相对酶活力如图 6 所示,从图中可看出核酸酶 P1 经固定化后热稳定性增强,在 80 °C 保温 1 h 后游离酶已基本丧失活性,而磁性 CLEAs 在 100 °C 处理 1 h 后仍有 50% 活性,有报道称 CLEAs 在十二烷基磺酸钠溶液中煮沸后几乎无蛋白亚基释放^[6],说明 CLEAs 结构紧密,相当稳定。

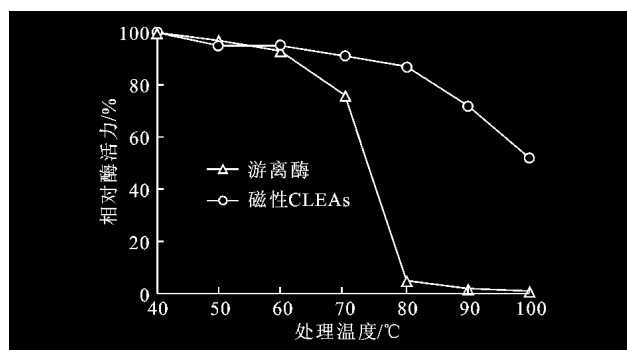


图6 游离酶与固定化酶的热稳定性

2.2.3 游离酶与固定化酶的最适反应温度 从图 7 可看出,游离酶的最适反应温度在 75 °C 附近,磁性 CLEAs 最适反应温度为 90 °C。温度对酶活性的影响分两方面,一方面随着温度升高反应速度加快,

另一方面高温对酶的稳定性不利,从图6可知,磁性CLEAs具有很好的热稳定性,因此其最适反应温度明显高于游离酶。

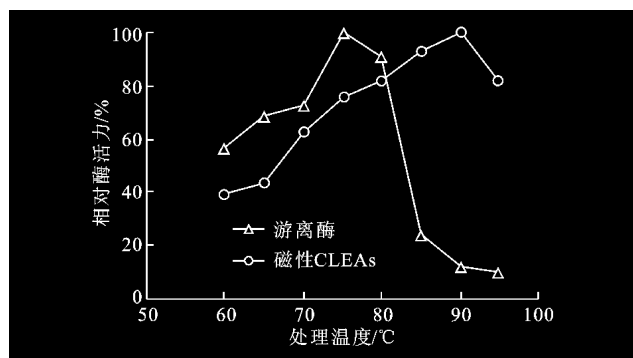


图7 游离酶与固定化酶的温度-酶活曲线

2.2.4 游离酶与固定化酶的酸碱稳定性 如图8所示,磁性CLEAs对酸碱的耐受性明显增强,在pH值为3~9条件下处理1 h仍有80%以上的酶活力,说明固定化对酶蛋白的构象有稳定作用。

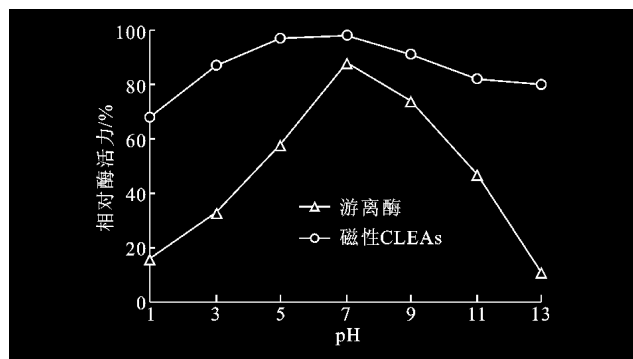


图8 游离酶与固定化酶的酸碱稳定性

2.2.5 游离酶与固定化酶的最适反应 pH 值 图9表明游离酶和磁性CLEAS的最适 pH 值均在5.2左右。

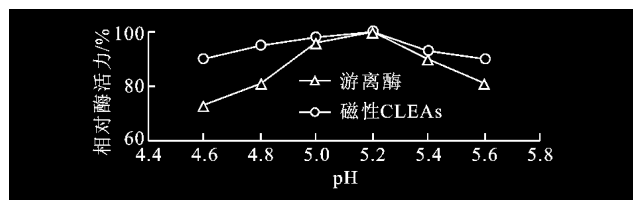


图9 游离酶与固定化酶的 pH 值与酶活曲线

2.2.6 固定化酶的操作稳定性 如图10所示,磁性CLEAs操作稳定性较好,反应6次后相对酶活力仍在70%左右,可以用于连续反应。

2.2.7 磁性CLEAs的磁响应性 如图11所示,在磁场作用下,磁性CLEAs的沉降速率明显增大,

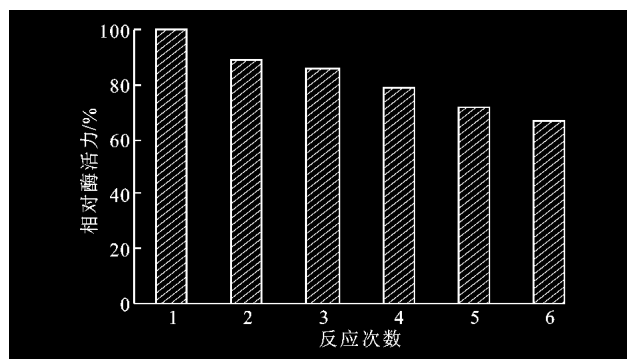


图10 磁性CLEAs的操作稳定性

证明所制备的磁性CLEAs具有很好的磁响应性。

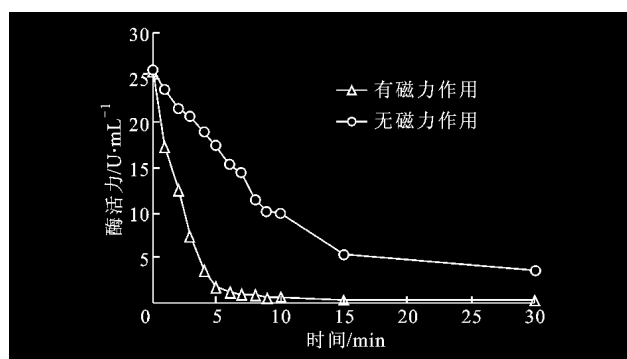


图11 磁性CLEAs的磁响应性

3 小 结

本文结合磁性纳米颗粒和交联酶聚集体两种方法固定核酸酶 P1,实现了这两种新方法的集成,并优化了磁性交联核酸酶 P1 聚集体的制备条件.在优化的制备条件(硫酸铵质量浓度为 0.8 g/mL,沉淀时间为 0.5 h,戊二醛质量分数为 0.6%,交联时间为 2 h)下获得最高酶活回收率 32.4%,同时考察了固定化酶和游离酶的部分酶学性质.结果表明,游离酶和磁性CLEAs的 K_m 值分别为 7.27 mmol/L 和 30.7 mmol/L,最适反应温度分别为 75 °C 和 90 °C,最适 pH 值均为 5.2.核酸酶 P1 在固定化后对底物的亲和力降低,对热和酸碱的耐受性明显增强,并且具有较好的操作稳定性和磁响应性,有利于工业上的连续生产。

参考文献:

- [1] 武仙山,何立千,叶磊. 交联酶聚集体:一种无载体酶固定化方法[J]. 生物技术,2005, 15(2):90-92.
WU Xianshan HE Liqian YE Lei. Cross-linked enzyme aggregations: an immobilizing method without carrier [J]. Biotechnology, 2005, 15(2):90-92.

- [2] 任广智,李振华,何炳林. 磁性高分子微球用于固定化酶的研究进展[J]. 离子交换与吸附, 2000, 16(1): 83-87.
REN Guangzhi, LI Zhenhua, HE Binglin. Advances in enzyme immobilization using magnetic polymermicrospheres[J]. Ion Exchange and Adsorption, 2000, 16(1): 83-87.
- [3] 廖红东,莫晓燕. 核酸酶 P1 研究进展[J]. 药物生物技术, 2004, 11(3): 190-193.
LIAO Hongdong, MO Xiaoyan. Research progress on nuclease P1[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2004, 11(3): 190-193.
- [4] 任欢鱼,刘蕾,刘勇健. 磁流体的制备与性质研究[J]. 中国粉体技术, 2003, 9(1): 21-23.
REN Huanyu, LIU Lei, LIU Yongjian. Preparation and properties of magnetic fluid[J]. China Powder Science and Technology, 2003, 9(1): 21-23.
- [5] 莫晓燕,宋威,张芹,等. 桔青霉生产核酸酶 P1 发酵条件优化研究[J]. 西安交通大学学报, 2003, 37(10): 1083-1086.
MO Xiaoyan, SONG Wei, ZHANG Qin. Study on the optimization of fermentation conditions for penicillium citrinum producing nuclease P1[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University, 2003, 37(10): 1083-1086.
- [6] LORENA W, LORENA B, GLORIA F, et al. Cross-linked aggregates of multimeric enzymes: a simple and efficient methodology to stabilize their quaternary structure[J]. Biomacromolecules, 2004 (5): 814-817.

(编辑 杜秀杰)