

以伴刀豆球蛋白为介质定向固定化脲酶的研究

周建芹, 陈韶华, 王剑文

苏州大学药学院, 苏州 215123

摘要: 将戊二醛将伴刀豆球蛋白(ConA)和壳聚糖载体交联, 然后利用 ConA 与脲酶糖链的特异性结合作用, 实现脲酶的定向固定化。定向固定化的最适条件为戊二醛浓度 3.5%、ConA 浓度 1 mg/mL、ConA 溶液 pH 值 7.0、脲酶浓度 0.4 mg/mL。定向固定化脲酶的最适 pH 5.0~6.0、最适温度 77°C、米氏常数 K_m 11.76 mmol/L, 与游离酶及非定向固定化脲酶比较, 定向固定化脲酶的最适 pH 向酸性范围发生了偏移并有更宽的 pH 适用范围, 最适温度提高, 与底物的亲和力较大, 且有较好的操作稳定性。

关键词: 脲酶, 伴刀豆球蛋白, 定向固定化

Research on the Orientedly Immobilized Urease via Concanavalin A

Jianqin Zhou, Shaohua Chen, and Jianwen Wang

School of Pharmacy, Soochow University, Suzhou, 215123, China

Abstract: Concanavalin A (ConA) is immobilized on a pre-activated chitosan microspheres, and then oriented immobilization of urease is carried out based on the strong interaction between ConA and glycoprotein. The optimum immobilization conditions are as follows: glutaraldehyde concentration is 3.5%, ConA concentration 1mg/mL, ConA pH 7.0 and urease concentration 0.4 mg/mL. For orientedly immobilized urease, the highest activity was allowed at pH 5.0~6.0 and temperature 77°C, and the Michaelis constant (K_m) was disclosed to be 11.76 mmol/L by Lineweaver-Burk plot. Compared with the free urease and the randomly immobilized urease, the optimum pH of the orientedly immobilized urease becomes smaller and the pH domain wider. Orientedly immobilized urease presents higher temperature resistance, higher affinity to the substrate, and higher stability of operation.

Keywords: urease, concanavalin A, oriented immobilization

定向固定化是通过一定的方法, 使酶的特定位点与载体连接, 酶在载体表面按一定的方向排列, 使底物容易进入到酶的活性位点里去, 改善酶学性质。定向固定化方法主要有下面几种^[1-7]: 利用酶和它的相应抗体之间的亲和力; 利用生物素-亲和素之间的特异亲和力; 通过酶分子上的糖基部分固定化;

酶分子上的特定氨基酸残基和金属离子形成复合物; 用基因工程手段改造酶分子使酶定向固定化。

通过酶分子上的糖基部分固定化方法可以确保酶的空间取向一致, 无必需氨基酸残基参与共价结合, 无化学损伤。伴刀豆球蛋白(ConA)作为一种凝集素, 对含有甘露糖或葡萄糖的糖蛋白有特异的亲

Received: July 30, 2007; Accepted: September 29, 2007

Supported by: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2007051).

Corresponding author: Jianqin Zhou. Tel: +86-512-65880032; E-mail: zkzhu@ustc.edu

江苏省自然科学基金项目(No. BK2007051) 资助。

和力,因此常作为配体分离多糖、各种糖蛋白、免疫球蛋白、血清蛋白甚至完整的细胞。在中性 pH 条件下 ConA 以四聚体的形式存在,每一个亚单位含有一个糖残基的结合位点,四聚体结构为糖蛋白的结合提供了 4 个结合位点^[8]。脲酶(E.C.3.5.1.5)是一种糖蛋白,含有葡萄糖构成的糖链,因此它的糖基部分可以和伴刀豆球蛋白(ConA)特异性结合在一起。

本研究利用戊二醛将 ConA 和壳聚糖载体交联在一起,然后脲酶的糖基部分和 ConA 连接起来,实现了脲酶的定向固定化。首先优化了固定化条件,并以游离酶及非定向固定化脲酶作对照,对定向固定化脲酶的酶学参数进行了深入研究,为定向固定化技术的研究提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 材料

脲酶(Worthington), 伴刀豆球蛋白 ConA (Medicago AB), 壳聚糖、戊二醛、脲、三氯乙酸等试剂为市售生物纯或分析纯。

分光光度计(Shimadzu UV-2401PC), JA5003N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司), 85-2A 型恒温磁力搅拌器(金坛市富华仪器有限公司)。

1.2 载体的制备与脲酶的定向固定化

1.2.1 载体的制备

取适量壳聚糖溶于 1%醋酸溶液中,配成 2.5% 壳聚糖溶液,用 5 号注射器注入磁力搅拌中的凝结液(20%NaOH, 30%CH₃OH 水溶液)中,得粒度均匀的壳聚糖微球,水洗至中性,放入 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 脲酶的定向固定化

伴刀豆球蛋白的活化:将伴刀豆球蛋白 ConA 溶于含 0.1 mol/L KCl, 0.1 mmol/L CaCl₂, 0.1 mmol/L MnCl₂ 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中,配成一定浓度的蛋白溶液,并于 4℃ 冰箱中活化 6 h。

脲酶定向固定化:取 0.5 g 壳聚糖微球与一定浓度的戊二醛溶液交联 2.5 h,用大量的去离子水洗涤壳聚糖微球直到洗液中无戊二醛残留为止(280 nm 处光吸收小于 0.01)。然后,取一定体积活化的 ConA 溶液浸泡壳聚糖微球 17.5 h,再用大量的去离子水洗涤至洗液中无游离蛋白为止(280 nm 处光吸收小于 0.01)。最后用一定浓度的酶液浸泡这些壳聚糖微球 3 h,再用去离子水洗涤至洗液中无酶蛋白为止,

即得定向固定化脲酶。

1.2.3 脲酶的非定向固定化

取 0.5 g 壳聚糖微球与 3.5%的戊二醛溶液交联 2.5 h,用大量的去离子水洗涤壳聚糖微球直到洗液中无戊二醛残留为止。然后将这些壳聚糖微球用酶液浸泡 17.5 h,再用去离子水洗涤至洗液中无酶蛋白为止,即得非固定化脲酶。

1.3 蛋白质含量的测定

采用 Bradford 法,以牛血清白蛋白为标准蛋白绘制标准曲线,进行测定。

ConA 结合率 = (总蛋白量 - 洗液中残留蛋白量) / 总蛋白量

1.4 酶活力的测定

采用奈氏试剂显色法测定酶活力。每分钟催化产生 1 μmol NH₃ 的酶量为 1 个酶活力单位。

游离酶活力的测定:取 0.05 mL 的游离酶(1 mg/mL)加入 0.35 mL 0.2 mol/L 脲中,再加入 0.6 mL pH 7 的磷酸缓冲液,37℃ 中反应 10 min 后,加入 0.5 mL 10% 的硫酸锌,终止反应,再加入 0.5 mL 0.5 mol/L 的 NaOH、蒸馏水 3 mL,过滤。取 1 mL 的滤液,加入 4.5 mL 的去离子水、0.5 mL 10% 的酒石酸钾钠、0.5 mL 0.5 mol/L 的 NaOH、1.0 mL 的奈氏试剂,混合后于室温下放置 10 min,在 460 nm 处以空白管为对照测定吸光度,由铵离子浓度标准曲线查出产生 NH₃ 的量,计算酶活力。

固定化酶活力的测定:取固定化酶颗粒 0.25 g 加入到 3 mL 的 0.2 mol/L 脲中,37℃ 水浴中反应 10 min 后,过滤。取 1 mL 滤液按上述方法,测定 460 nm 处吸光度,计算酶活力。

为便于考察变量(戊二醛浓度、ConA 浓度、ConA 溶液 pH 值、脲酶浓度等)对固定化酶活的影响,以同组实验中酶活最高值为 100%,进行数据处理。

2 结果与讨论

2.1 固定化酶的制备

2.1.1 戊二醛浓度对固定化酶活力的影响

在 2%~5% 范围内取不同浓度的戊二醛溶液与壳聚糖微球交联,然后将微球浸于 pH 7、1 mg/mL ConA 溶液中 17.5 h,再用 0.4 mg/mL pH 5 的酶溶液浸泡 3 h,制备固定化酶,测定 ConA 结合率及固定化酶活力,结果见图 1。

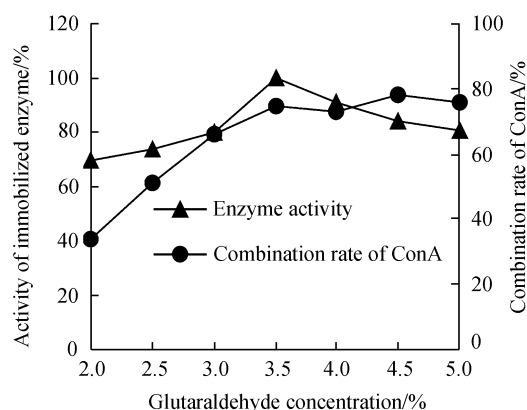


图1 戊二醛浓度对固定化酶活力的影响

Fig. 1 Effect of glutaraldehyde concentration on activity of immobilized enzyme

从图1可见,随着戊二醛浓度的增加,ConA结合率逐渐增加,当戊二醛浓度大于3.5%时,ConA结合率稳定在75%左右;固定化酶的活力先升高后降低,当戊二醛浓度达到3.5%时,固定化酶活力最大。这是因为随着戊二醛浓度的增加,壳聚糖分子被活化的氨基数量增多,相应的ConA结合率也增加,固定脲酶的位点增多,载酶量增加而引起酶活上升。但当戊二醛浓度过大时,壳聚糖微球上过多的活性醛基导致ConA与载体之间形成多点结合,这样会产生空间位阻,导致载酶量反而降低,引起酶活下降。只有用适当浓度的戊二醛作为交联剂,才能获得较高活力的固定化酶,故本试验选择3.5%浓度的戊二醛为交联剂。

2.1.2 伴刀豆球蛋白浓度对固定化酶活力的影响

用3.5%的戊二醛交联后的壳聚糖微球与0.2~1.2 mg/mL范围内不同浓度的pH7的ConA交联17.5 h,然后将微球浸于pH5、0.4 mg/mL的酶溶液3 h,制备固定化酶,测定ConA结合率及固定化酶活力,结果见图2。

从图2可以看出,随着ConA浓度的增加,ConA结合率也逐渐增加,在蛋白浓度为0.6~1.2 mg/mL浓度区间内,ConA结合率基本稳定;固定化酶活力随ConA浓度的增加而升高,当ConA浓度达到1 mg/mL时,酶的活力最高,之后ConA浓度升高,酶的活力反而下降。这是因为脲酶的固定化是依靠ConA识别并结合脲酶糖链中的葡萄糖实现的,ConA浓度越高,结合的酶量就越多,活力呈上升趋势。但是ConA结合率增加到一定程度,固定化脲酶

分子密度太大,彼此之间存在空间位阻,表现出来的活力下降。所以本试验选择1 mg/mL的蛋白溶液。

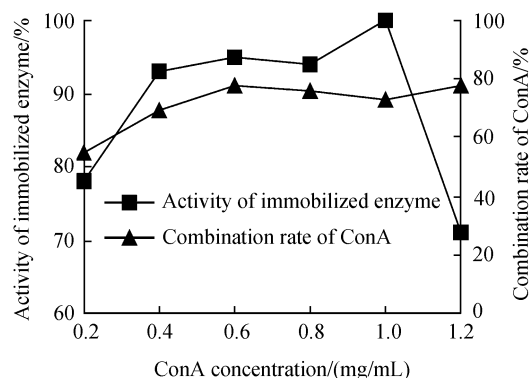


图2 ConA浓度对固定化酶活力的影响

Fig. 2 Effect of ConA concentration on activity of immobilized enzyme

2.1.3 伴刀豆球蛋白溶液的pH值对固定化酶活力的影响

用3.5%的戊二醛交联后的壳聚糖微球与1 mg/mL不同pH值(4.0~9.0)活化的蛋白交联17.5 h,然后将微球浸于pH5、0.4 mg/mL的酶溶液3 h,制备固定化酶,测定ConA结合率及固定化酶活力,结果如图3所示。

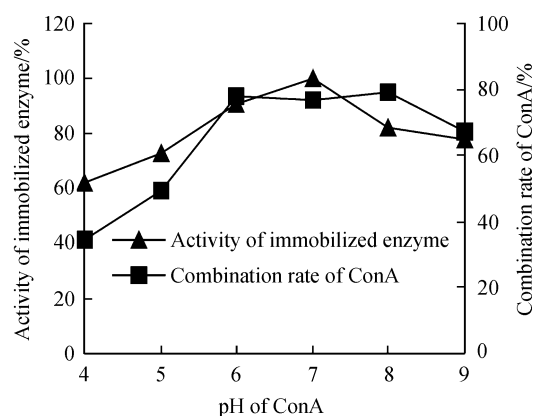


图3 ConA溶液pH值对固定化酶活力的影响

Fig. 3 Effect of pH of ConA on activity of immobilized enzyme

从图3中可见,伴刀豆球蛋白溶液pH值为6~8时,蛋白结合率较高,当伴刀豆球蛋白溶液的pH值小于7时,随着pH的增大,固定化酶活力呈增大趋势,当伴刀豆球蛋白溶液pH值大于7时,固定化酶活力随着pH值的增大而减小。因此ConA活化的最适pH值条件选择7。

2.1.4 脲酶浓度对固定化酶活力的影响

用 3.5% 的戊二醛交联后的壳聚糖微球与 1 mg/mL pH 7 的 ConA 交联 17.5 h, 然后将微球浸入 0.1~0.6 mg/mL 范围内不同浓度的酶溶液(pH 5)中 3 h, 制备固定化酶。测定固定化酶活力, 结果见图 4。

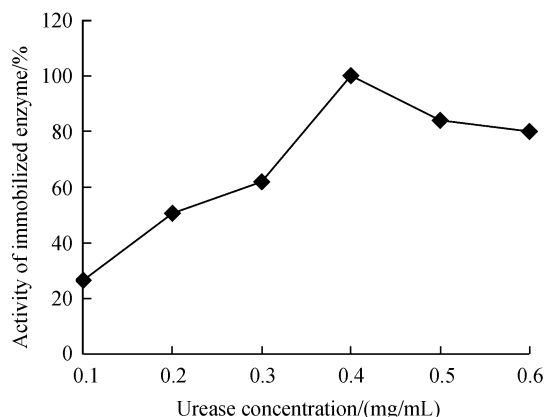


图 4 脲酶浓度对固定化酶活力的影响

Fig. 4 Effect of urease concentration on activity of immobilized enzyme

从图 4 中可见, 随着酶液的浓度的增加, 固定化酶的活力在不断地增加。当酶浓度达到 0.4 mg/mL 时, 酶的活力最高, 当酶浓度继续增加时, 酶的活力反而下降。这可能是酶浓度较少时, 固定在微球上的酶量也较少, 固定化酶的活力较低; 但酶量过大时, 使酶分子相互之间空间重叠, 造成酶活性中心空间结构发生变化, 从而使酶的表现活力下降。为了使制备的固定化酶的活力较大, 采用 0.4 mg/mL 比较合适。

2.2 固定化酶的性质

2.2.1 酶的最适温度

温度对酶的活力的影响较大。从图 5 中可见, 游离酶最适温度为 57°C, 超过或低于 57°C, 游离酶的活力都下降; 脲酶固定化后, 最适温度均升高, 非定向固定化脲酶的最适温度是 67°C, 定向固定化脲酶的最适温度是 77°C。非定向固定化脲酶的最适温度比游离酶提高了 10°C, 而定向固定化脲酶的最适温度又比非定向固定化脲酶提高了 10°C。

2.2.2 酶的最适 pH

从图 6 中可见, 游离脲酶的最适 pH 值为 6, 定向固定化脲酶和非定向固定化脲酶的最适 pH 是 5~6, 向酸性范围发生了偏移。另外, 游离酶的最适 pH 范围很窄, 大于或小于最适 pH 时活力下降非常

大, 而定向固定化脲酶和非定向的最适 pH 范围比较宽, 大于或小于最适 pH 时活力改变不是很大。

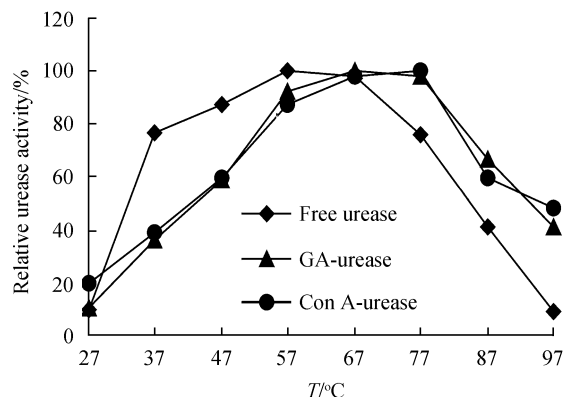


图 5 温度对酶活力的影响

Fig. 5 Effect of temperature on relative activity of soluble and immobilized enzyme

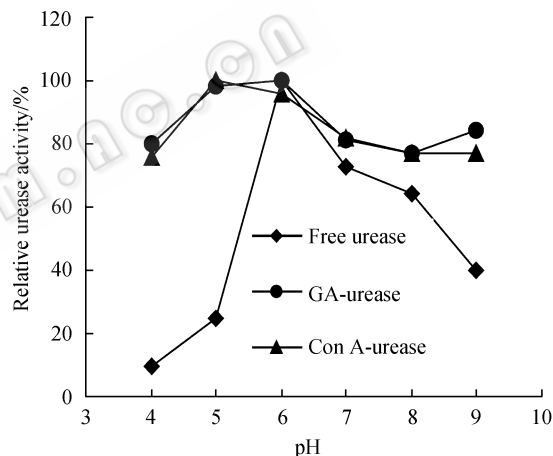


图 6 pH 值对酶活力的影响

Fig. 6 Effect of pH on relative activity of soluble and immobilized enzyme

2.2.3 酶的米氏常数

取 50 μ L 游离酶、0.15 g 非定向固定化脲酶和 0.15 g 定向固定化脲酶, 选用不同的底物浓度, 37°C 测量相应酶促反应的初速度, 用双倒数作图法, 分别求其米氏常数, 结果如图 7 所示。

游离酶的线性方程为 $y=77.018x+2.2495$, 相关系数为: $R^2=0.992$, 可以求出其米氏常数 $K_m=34.238$ mmol/L; 非定向固定化脲酶的线性方程为 $y=101.76x+6.7052$, 相关系数为: $R^2=0.9932$, 可求出其米氏常数为 $K_m=15.18$ mmol/L; 定向固定化脲酶的线性方程为 $y=84.152x+7.1574$, 相关系数为: $R^2=0.9792$, 可求出其米氏常数为 $K_m=11.76$ mmol/L。游离酶的米氏常数最大, 定向固定化脲酶的米氏常

数最小, 其与底物的亲和力最大。脲酶通过远离活性中心的糖链与载体上的 ConA 连接, 实现定向固定化, 有利于底物进入酶的活性中心, 所以与底物的亲和力大。

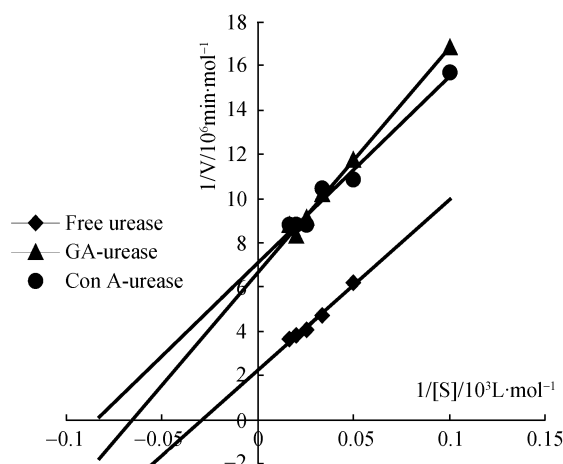


图 7 游离酶和固定化酶的 Lineweaver-Burk 曲线
Fig. 7 Lineweaver-Burk plot of soluble and immobilized enzyme

2.2.4 酶操作稳定性的测定

取 0.15 g 定向固定化脲酶和非定向固定化脲酶, 加入底物溶液, 37°C 反应 15 min, 测定酶活力。然后分离固定化酶, 用去离子水洗涤。重复反应, 并以第一次的酶活力为标准计算酶的相对活力。

从图 8 中可见, 定向固定化脲酶在连续使用 5 次后, 仍然可以保持原活力的 85% 以上, 非定向固定化酶在操作使用 5 次后活力降为原来的 50%, 说明通过 ConA 连接的定向固定化脲酶的操作稳定性较好。

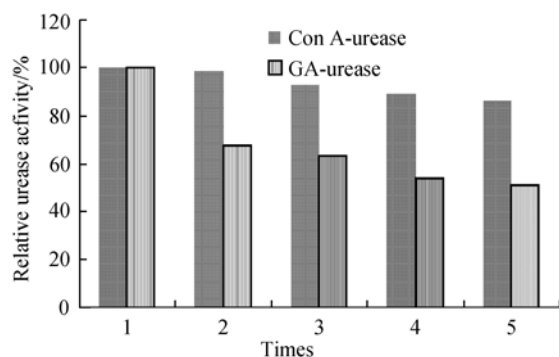


图 8 固定化酶的操作稳定性
Fig. 8 Operation stability of immobilized enzyme

3 结论

利用戊二醛将 ConA 和壳聚糖微球交联在一起,

然后通过脲酶的糖基部分和 ConA 连接起来, 实现了脲酶的定向固定化。酶的定向固定化相对于非定向固定化具有明显的优点, 交联剂不直接与酶分子接触, 避免了交联剂对酶分子造成的化学损伤, 无需氨基酸残基参与共价结合, 确保酶分子的空间取向一致, 热稳定性提高, 与底物的亲和力较大, 有较好的操作稳定性。

通过酶分子上的糖基部分对酶进行固定化操作简单, 容易实现, 适合固定化的对象比较多, 所有含有糖残基的生物活性分子都可以采用相应的凝集素进行定向固定化, 甚至不含有糖残基的蛋白质也可以通过化学修饰的方法得到糖残基, 因此这种方法在医药、生物传感器等领域将有良好的应用前景。

REFERENCES

- [1] Vishwanath S, Bhattacharyya D, Huang W, Bachas LG. Site-directed and random enzyme immobilization on functionalized membranes: kinetic studies and models. *Journal of Membrane Science*, 1995, **108**: 1-13.
 - [2] Girish Aa, Sun HY, Yeo DY, *et al.* Site-specific immobilization of proteins in a microarray using intein-mediated protein splicing. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, **15**: 2447-2451.
 - [3] Carlsson J, Mosbach K, Bulow L. Affinity recipitation and site-specific immobilization of proteins carrying polyhistidine tails. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, **51**: 221-228.
 - [4] Bilkova Z, Slovackova M, Lycka A, *et al.* Oriented immobilization of galactose oxidase to bead and magnetic bead cellulose and poly (HEMA-co-EDMA) and magnetic poly (HEMA-co-EDMA) microspheres. *Journal of Chromatography B*, 2002, **770**: 25-34.
 - [5] Viswanath S, Wang J, Bachas LG, *et al.* Site-directed and random immobilization of subtilisin on functionalized membranes: Activity determination in aqueous and organic media. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, **60**(5): 608-616.
 - [6] Shekhar K, Vishwanath, Watson CR, Huang W. Kinetic studies of site-specifically and randomly immobilized alkaline phosphatase on functionalized membranes. *J Chem Tech Biotechnol*, 1997, **68**: 294-302.
 - [7] Bilkova Z, Mazurova J, Churacek J, *et al.* Oriented immobilization of chymotrypsin by use of suitable antibodies coupled to a nonporous solid support. *Journal of Chromatography A*, 1999, **852**: 141-149.
 - [8] Shi LX, Lu YX, Zhang J, *et al.* Multilayer assembly based on concanavalin-glycoprotein specific interaction and its application to the preparation of glucose biosensors. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2004, **25**(3): 575-579.
- 史立新, 卢迎习, 张晶, 等. 伴刀豆球蛋白-糖蛋白特异性识别作用构筑的多层膜及其在生物传感器制备中的应用. *高等学校化学学报*, 2004, **25**(3): 575-579.