

碳酸酐酶在聚甲基戊烯中空纤维膜表面的固定及其性能分析

王琴梅^{1,2}, 张涤华¹, 张静夏³

1 中山大学附属第一医院, 广州 510080

2 中山大学心血管研究所, 广州 510080

3 中山大学药学院, 广州 510080

摘要: 采用两步法将碳酸酐酶共价键合在聚甲基戊烯(Polymethyl-pentene, PMP)膜式氧合器表面以提高其清除血液中CO₂的能力。首先采用等离子体处理法将羟基引入 PMP 表面, 然后用偶联剂溴化氰(CNBr)将碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA)固定在 PMP 膜表面。采用 XPS、表面接触角测定仪对等离子体处理后材料表面的物理化学性质进行了表征。以对硝基苯酚乙酸酯(*p*-nitrophenyl acetate, *p*-NPA)为底物, 采用紫外分光光度计测定了接枝 CA 的活性、浓度、重复利用性、储存稳定性。结果表明, 等离子体处理方法能将羟基成功引入 PMP 表面; CA 能被成功地偶联在无活性官能团聚合物表面, 在保持酶活性的同时获得较高的接枝效率; 共价接枝 CA(Covalently immobilized CA, CA_{CI})的浓度随 CNBr 浓度的增加而增加, 最大可达理论单分子层接枝量的 73%; CA_{CI}比物理吸附的 CA(Physically adsorbed CA, CA_{PA})具更好的重复利用性; 37°C 下, CA_{CI}比 CA 溶液表现出更好的储存稳定性。本方法有望应用在膜式氧合器上以提高其对血液中 CO₂ 的排除效率。

关键词: 聚甲基戊烯, 等离子体处理, 碳酸酐酶, 固定化, 溴化氰

Immobilization and characterization of carbonic anhydrase on the surface of hollow fiber membrane of polymethyl pentene

Qinmei Wang^{1,2}, Dihua Zhang¹, and Jingxia Zhang³

1 First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

2 Institute of Cardiology and Angiology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

3 School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: We immobilized carbonic anhydrase (CA) onto the surface of membrane oxygenator of polymethyl pentene (PMP) to enhance the removal of carbon dioxide in blood by two steps. We first introduced hydroxyl groups onto PMP surface by water plasma treatment, and then coupled CA onto PMP surface by using cyanate bromide (CNBr) as a crosslinker. After plasma treatment, the contact angle with water and chemical composition of PMP surface were characterized by analysis system of surface contact angle and XPS. Using *p*-nitrophenyl acetate (*p*-NPA) as a substrate, the activity, concentration, storage stability and re-usability of immobilized CA on PMP hollow fibers were studied by ultraviolet spectrophotometer. The preliminary data showed that hydroxyl groups could be introduced on the surface of PMP by water plasma treatment, and CA with catalysis activity could be successfully

Received: November 7, 2008; **Accepted:** May 20, 2009

Supported by: Scientific Research Foundation for Returned Scholars, Ministry of Education of China (No. 20071108).

Corresponding author: Qinmei Wang. Tel: +86-20-87755766-8163; E-mail: qinmeiwang@gmail.com

教育部留学回国人员基金(No. 20071108)资助。

introduced onto PMP surface in high immobilization efficiency. The activity of covalently immobilized CA increased with the increase of concentration of CNBr, and the maximum was 73% of the theoretical activity of CA spread on PMP surface in monolayer in studied range. Covalently immobilized CA showed higher reusability compared to physically adsorbed CA, and higher storage stability compared to free CA in solution at 37°C. The method would be used potentially in the membrane oxygenator to improve the capacity of removal of carbon dioxide in blood in the future.

Keywords: polymethyl pentene, plasma treatment, carbonic anhydrase, immobilization, cyanate bromide

氧合器是一种通过氧合血液、同时排除血液中的二氧化碳来补充或替代肺的呼吸功能,治疗呼吸衰竭的装置。目前临床上所用氧合器大多数都是通过中空纤维膜来完成气体交换:血液流经中空纤维膜的外表面,氧气则从中空纤维膜的内腔流过,通过扩散作用,氧气进入血液,血液中的CO₂进入中空纤维膜内腔随氧气一起被带走。

PMP 氧合器是一种具有优异性能的新一代的中空纤维膜式氧合器,它具有低预充容量、低阻力、极好的透气性等优点^[1,2],但它清除血液中CO₂的效率仍然不高。因为血液中的CO₂大部分以HCO₃⁻形式存在,如血浆中为94%,红血球中为82%^[3]。无催化剂时,HCO₃⁻脱水生成CO₂的速率较低(14 S⁻¹),因此血液中CO₂的清除效率将由HCO₃⁻的水解速率决定。

碳酸酐酶(CA)是一种主要存在于红血球中的含一个Zn原子的酶,它可高效催化HCO₃⁻水解,使其脱水速率超过10⁶ S⁻¹^[4-6]。如将外源性的CA直接应用在血液中,虽可能起到一定的作用,但它易水解失活,导致成本提高;此外可能对血液造成污染,给本就衰弱的患者造成新的伤害。固定化酶技术有可能解决这些问题。但氧合器材料表面缺乏可供酶固定的活性位点,因此这方面的研究一直进展较小。Salley等^[7,8]曾进行一些尝试性的工作。他们将CA包埋在硝酸纤维素微粒里,再将微粒粘附在硅橡胶膜(Silicone rubber membrane)氧合器上。结果表明,与自由CA相比,被包埋的CA有更好的热和储存稳定性。体外实验中,固定的CA使CO₂的清除速率提高了约60%。但他们使用的氧合器体积庞大、预充容量大,目前已遭临床淘汰;另外采用物理方法固定CA存在过程可逆、稳定性不足的缺点。

表面处理技术的发展使得可采取一些方法,如等离子体处理技术将活性官能团引入材料表面^[9],用于酶的固定。本研究拟先采用水等离子体处理技术将羟基引入无任何活性官能团的PMP表面,再以溴化氰为偶联剂,将CA共价接枝在PMP表面,希望

得到接枝浓度可控、具有催化活性、较好的重复利用性及储存稳定性的CA,以使其能长期高效催化血液中碳酸氢盐向二氧化碳转化,提高氧合器排除血液中CO₂的能力。

1 材料和方法

1.1 材料

PMP片、PMP中空纤维(Oxyplus®, Capillary membrane, Type PMP 90/200, 外径为380 μm, 内径为200 μm)从Membrana GmbH公司(Wuppertal, Germany)购买。溴化氰(C91492)、对硝基苯酚乙酸酯(N8130)、对硝基苯酚(1048)、牛碳酸酐酶(C-3934)从Sigma-Aldrich公司(St Louis, Mo, USA)购买。其他试剂均为分析纯。水为脱气的蒸馏水。50 mmol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.5)由16.9 mmol KH₂PO₄和33.1 mmol K₂HPO₄溶解在1000 mL蒸馏水中、以NaOH和HCl调节pH配制而成。

紫外分光光度计(GenesysTM5, Thermo Spectronic, USA)测试参数:室温,波长为412 nm。射频辉光放电等离子体产生仪(GCM-250, March Instruments Inc., CA, USA)。X射线光电子能谱仪(MICROLAB MK II, VG Inc., UK)测试参数:Al靶(150 eV, 成分分析; 50 eV, 高分辨率峰位置),真空度<5 × 10⁻⁹ mmHg。接触角测定仪(G1023-MK3, Drop Shape Analysis System, Krüss Inc., Germany),用旋滴法测定,针头直径1.468 mm,溶剂为水,温度为25°C。

1.2 方法

1.2.1 PMP表面的等离子体处理

将长为11 cm的PMP中空纤维两端封口后,置于等离子体产生仪反应仓的隔板上,以水蒸气为工作气体,在100 W、0.2~0.3 mmHg^[10-12]条件下处理3 min,迅速取出,一部分立刻进行下一步反应,另一部分用X射线光电子能谱仪(XPS)分析样品表面化学成分的变化。

同法处理PMP片,采用接触角测定仪分析处理

前后样品对水的表面接触角的变化。

1.2.2 以 CNBr 为偶联剂将 CA 偶联至 PMP 表面

将等离子体新鲜处理的 PMP 中空纤维(30 根)迅速浸于 2 mol/L 的碳酸钠缓冲溶液中, 涡旋搅拌下加入适量 2 g/mL 的 CNBr/乙腈溶液, 室温反应 2 min 后取出, 依次用冰冷的蒸馏水和 0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液(pH 8.0)洗涤以彻底除掉纤维表面粘附的 CNBr, 滤纸吸干纤维表面水分, 再迅速浸泡在 1 mg/mL 的 CA/碳酸氢钠缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 8.0)中, 室温下缓慢摇动 3 h。反应结束后取出纤维束, 用 PBS 充分洗涤至洗出液在 $\lambda = 465 \text{ nm}$ 处无紫外吸收, 滤纸吸干表面水分, 然后以 *p*-NPA 为底物, 按下述方法测定纤维束表面接枝 CA 的活性和浓度, 同时采用 XPS 对样品进行分析。

因 CNBr 极毒, 凡涉及到 CNBr 的操作均应在通风橱中进行。

1.2.3 CA 浓度与活性的测定

1) *p*-NP 标准关系曲线的建立

因不易定量测得碳酸氢盐水解反应中所释放出 CO_2 的量, 且 CA 催化 HCO_3^- 脱水反应(图 1a)的活性位点与催化对硝基苯酚乙酸酯(*p*-nitrophenyl acetate, *p*-NPA)水解反应(图 1b)的活性位点相同^[5,13], 而采用紫外分光光度计可在 412 nm 处定量检测释放出的对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, *p*-NP)^[5,13,14], 本试验以 *p*-NPA 为底物来评价接枝 CA 的活性及浓度。

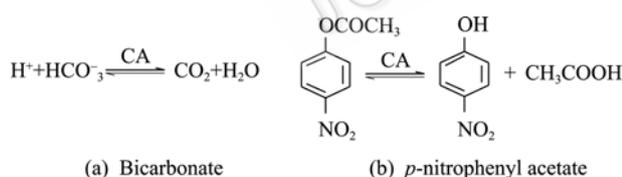


图 1 CA 催化碳酸氢盐和对硝基苯酚乙酸酯的水解反应
Fig. 1 Hydrolysis of bicarbonate and *p*-nitrophenyl acetate catalyzed by CA.

精密称取 *p*-NP 10 mg 置 50 mL 容量瓶中, 加 PBS 使其溶解, 制成 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准贮备液。精密吸取贮备液适量, PBS 稀释, 配制成系列标准溶液, 在 412 nm 处测定吸光度, 以上实验重复 3 次, 数据经计算机回归得 *p*-NP 在 0~84.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 浓度范围内的标准曲线方程为:

$$[p\text{-NP}] = 85.54 A (R^2=1) \dots \text{式 1}$$

其中, $[p\text{-NP}]$ 为 *p*-NP 溶液浓度 $\mu\text{mol}/\text{L}$, A 为吸

光度。

2) CA 活性与浓度标准关系曲线的建立

精密称取 10 mg CA 置 10 mL 容量瓶中, 加 PBS 使其溶解, 制成 1 mg/mL 的标准贮备液。精密吸取贮备液适量, PBS 稀释, 配制成 1000、800、400、200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 系列标准溶液。将 1 mL CA 标准溶液加入具塞比色皿中, 再加 10 μL 40 mmol/L *p*-NPA/乙腈标准贮备液, 开始计时, 同时迅速将溶液混合均匀, 每隔 15 s 测其在 412 nm 处的吸光度, 直至 2 min。因无 CA 时, 2 min 内 *p*-NPA 在水溶液中有少量水解; 纯 CA 溶液也会在 412 nm 处有吸收, 因此所有吸光度值均扣除这 2 个因素的影响。以时间 t 为横坐标, A 为纵坐标作图。当 CA 溶液浓度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 所得曲线为非线性曲线; CA 溶液浓度 $>100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, $A > 1.0$ 。因此, 选择 CA 溶液浓度范围为 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 分别对所得 6 条曲线进行线性回归, 得直线方程($R^2 > 0.99$, $n=3$)。该直线的斜率即为反应速率 V_i , 即吸光度的变化速率(dA/dt)。以 CA 溶液浓度($[CA]$)为横坐标, V_i 为纵坐标作图, 数据经线性回归后得 CA 在 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内的标准曲线方程: $V_i = 0.0036 \times [CA]$ ($R^2 = 0.9974$, V_i 单位为 min^{-1} , $[CA]$ 单位为 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 此直线即为 CA 浓度与活性的关系曲线。

溶液中吸光度的变化是因为 CA 催化 *p*-NPA 产生 *p*-NP 导致的, CA 浓度越高, 单位时间内催化产生的 *p*-NP 越多, 吸光度的变化速率越大。将 CA 的一个活性单位定义为: 在室温, pH 7.5 条件下每分钟催化对硝基苯酚乙酸酯产生 1 μmol 对硝基苯酚所需要的 CA 的量。为了更直观地表达 CA 的浓度与其催化作用的关系, 根据 $[p\text{-NP}] = 85.54 A$, 对 $V_i = dA/dt = 0.0036 \times [CA]$ 进行推导后得到下式:

$$\text{Activity} = d[p\text{-NP}]/dt = 0.3074 \times [CA] \dots \text{式 2}$$

其中 Activity 为 CA 的活性, 单位 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$, $[CA]$ 单位为 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3) 接枝 CA 浓度及活性的测定

将中空纤维(改性或未改性)剪短至 1~2 mm, 转移至 20 mL 的烧杯中, 加入 4 mL PBS, 磁力搅拌器搅拌, 2 min 后, 用 3 mL 的注射器取 1 mL 溶液, 注射器式滤器过滤(PGC scientifics, Maryland, USA)至比色皿中测其吸光度, 然后迅速倒回烧杯中, 搅拌下加入 40 μL 40 mmol/L *p*-NPA/乙腈标准贮备液, 开始计

时。每隔 2 min 从烧杯中取出 1 mL 溶液, 过滤后测其吸光度, 再倒回烧杯, 如此反复, 直至 8 min。以时间为横坐标, 吸光度为纵坐标作图, 所得数据经回归后得一直线, 由直线的斜率即可换算出接枝 CA 的浓度及活性。以未经改性的中空纤维作为空白对照。

1.2.4 接枝 CA 的重复利用性

按上述方法重复 9 次测定同一改性 PMP 上接枝 CA 的活性, 每次测定后用 PBS 溶液洗涤 3 次, 每次洗涤均在磁力搅拌器上搅拌 10 min, 以彻底除掉 *p*-NPA 及 *p*-NP。

以 CA_{PA} 作为对照组, 比较物理吸附、 CA_{Cl} 的重复利用性。 CA_{PA} : 将未经 CNBr 活化的 PMP 中空纤维浸泡在 1 mg/mL 的 CA 碳酸盐缓冲溶液中 (pH 8.0), 缓慢摇动 3 h, 取出纤维束用 PBS 漂洗, 再用滤纸吸干表面水分备用。

1.2.5 接枝 CA 的储存稳定性

改性后的 PMP 中空纤维浸泡于 PBS 中, 置于 37°C 的培养箱中, 定期取出测定接枝 CA 的活性。以 5 μ g/mL CA/PBS 溶液作为对照组, 比较接枝 CA 和自由 CA 的储存稳定性。

2 结果与讨论

2.1 碳酸酐酶在 PMP 表面的固定化

PMP 表面除了 C-C/C-H 外无任何活性官能团 (图 2), 为将 CA 引入 PMP 表面, 本研究先采用等离子体技术将羟基引入 PMP 表面, 然后再利用 CNBr 在碱性条件下与羟基反应生成活性极高的氰酸酯 (Cyanate ester)。氰酸酯再和 CA 上的伯氨反应 (反应 I); 或进一步和表面相邻的羟基反应生成亚氨环碳酸酯 (Cyclic imidocarbonate), 然后和 CA 上的伯氨反应 (反应 II) 从而将 CA 引入 PMP 表面 (图 2)。与氰酸酯相比, 亚氨环碳酸酯的反应活性较低, 本研究采用较高的 CNBr 的浓度, 希望尽可能减少反应 II 的发生, 提高 CA 的接枝量。

2.2 PMP 表面的表面接触角及 XPS 分析

因 CNBr 及氰酸酯的反应活性极高, 本反应成功的关键在于第一步, 即羟基基团的引入。本研究利用等离子体处理前后 PMP 在接触角和表面化学成分的变化来验证羟基基团的引入。表面接触角测定结果表明, 处理前 PMP 表面与水的接触角为 $103.37^\circ \pm 4.22^\circ$, 处理后降为 $50.01^\circ \pm 3.59^\circ$ 。这说明处理后

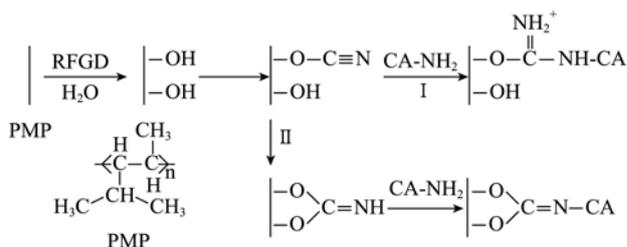


图 2 碳酸酐酶在 PMP 表面的固定化反应示意图

Fig. 2 Mechanism of immobilization of CA on PMP surface.

PMP 表面亲水性极大增加, 证明有大量极性亲水性基团被引入。

表 1 和表 2 为 XPS 分析结果。纯的 PMP 表面无 O 元素 (图 2), 其表面氧含量应为 0, 但 XPS 结果表明其表面含有少量氧 (2.9%), 这可能是因为样品被轻微污染导致的。等离子体处理后, PMP 表面 O 的含量增加了 26.4% (达 29.3%), 而碳的含量则下降了 29.1%, 因纯的 PMP 表面只有 C-C、C-H 键 (图 2), 据此可以认为等离子体处理将大量含氧的基团引入了 PMP 表面。将处理后的 PMP 用 CNBr 活化、再浸泡在 CA 溶液中进行接枝反应后, 其表面 O 含量降低了约 11.8%, 新出现大量 N 原子 (含量高达 8.2%), 并且出现了痕量的 P 和 Na。笔者认为共价接枝样品表面新增的大量 N 原子来源于共价接枝的 CA, 理由如下: 1) PMP 表面及等离子体处理的 PMP 表面无 N 原子; 2) 直接将等离子体处理后的 PMP 浸泡在 CA 溶液中, 所得样品表面的 N 含量仅为 0.6%; 3) XPS 分析仪器和样品之间的掠射角采用 55° , 可检测到的样品深度约为 50Å, CA 的三维尺寸为 $66.7\text{Å} \times 66.7\text{Å} \times 240.0\text{Å}$ [15], 因此可以认为大量氮原子来源于共价接枝的 CA, 而不是物理吸附的 CA。说明 PMP 表面经等离子体处理、再用 CNBr 活化后可将 CA 共价接枝在表面。表 2 可见, 等离子体处理后, PMP 表面超过 40% 的 C-H (284.6 eV) [16-19] 被氧化变成了含氧的极性基团: C-O (286.9 eV, 对应于 -OH 等 [15-18]) 为 31.2%, COO (288.9 eV, 对应于 -COOH 等 [15-18]) 为 10.4%, OCOO (290.4 eV) 为 3.1%。接枝 CA 后, OCOO 基团对应的峰消失, 286.5 eV 处出现了蛋白质/多肽的 C-O/C-N 特征峰, 此结果进一步说明 CA 已被成功固定在 PMP 表面。表 1 和表 2 结果证明, 等离子体处理后, 大量含氧的极性亲水基团 (羟基和羧基等) 被引入 PMP 表面, 这和接触角测定的结果 (接触角降低了 53.36°) 一致。表面接触角和 XPS

表 1 XPS 分析得出的不同 PMP 表面原子百分组成

Table 1 Atomic percentage (composition) on different PMP surfaces determined by XPS

Sample	C (%)	O (%)	N (%)	Si (%)
PMP	97.1	2.9	n/d	n/d
PMP modified with water plasma treatment	68.0	29.3	n/d	2.7
PMP modified with physically adsorbed CA [*]	70.3	27.1	0.6	2.0
PMP modified with covalently immobilized CA	72.8	17.5	8.2	0.9

^{*}: this sample is treated by the same procedure for PMP modified with covalently immobilized CA except CNBr activation. Conditions for XPS: a monochromatized Al K α X-ray, pass energy: 150 eV, take-off angle: $\sim 55^\circ$, Pressure in the analytical chamber: $< 6.7 \times 10^{-7}$ Pa.

表 2 不同 PMP 表面 XPS C1s 谱峰归属及含量

Table 2 C1s peaks and their concentrations of XPS on different PMP surfaces

Sample	C-H		C-O		COO		OCOO	
	%	B.E./eV	%	B.E./eV	%	B.E./eV	%	B.E./eV
PMP	94.0	285.0	6.0	286.5	/	/	/	/
PMP modified with water plasma treatment	55.3	285.0	31.2	286.9	10.4	288.9	3.1	290.4
PMP modified with covalently immobilized CA	71.6	285.0	17.7	286.5 ^b	10.6	288.3	/	/

Conditions for high resolution C1s (HRC) scans was the same as Table 1 except that the pass energy was 50eV. ^a: B.E. means Binding Energy. ^b: The strong peak at ~ 286.5 eV is a mix of C-O/C-N peak, which is typical of peptides/proteins.

分析结果证明图 2 中接枝反应能顺利进行。

2.3 偶联剂的浓度对 PMP 表面有活性 CA 接枝量的影响

本试验以 *p*-NPA 为底物, 检测酶的活性。根据单个牛碳酸酐酶(BCA II)分子的三维尺寸^[15], 可计算出以单分子层平铺于每平方米聚合物表面的 BCA 的最大理论质量为 1.12 mg/m^2 (BCA 的摩尔质量为 $3 \times 10^4 \text{ g/mol}$)。因有催化活性的酶浓度与其活性成正比, 可用酶活性代表 PMP 表面有活性的 CA 接枝量。根据式 2, 可计算出 CA 以单分子层覆盖在每平方米聚合物表面时的最大理论活性为 0.344 U 。

图 3 为当固定等离子体处理的条件、CA 浓度为 1 mg/mL 时, PMP 表面接枝酶的浓度与偶联剂浓度的关系。图中可见, 即使偶联剂浓度低至 0.8 mg/mL , 仍能检测到具活性的共价接枝 CA (0.018 U/m^2), 说明采用本方法确实能高效地将 CA 固定在无活性官能团聚合物表面, 且能保持其活性。随着偶联剂浓度的增加, CA 的接枝量增加, 但增加的趋势逐渐变缓。当 CNBr 的浓度为 200 mg/mL 时, 接枝 CA 浓度达到 0.251 U/m^2 , 为单分子层理论接枝量的 73.0%, 此时聚合物表面 CA 的接枝量已趋饱和。图 2 可见, 在 CA 的接枝反应中, CNBr 几乎起不到任何间隔臂 (Spacer arm) 的作用, CA 只能紧贴 PMP 表面被固定。因此反应存在较大的空间位阻效应, 再加上化学反应可能导致的酶的失活, 聚合物表面 CA 的接枝

量不可能达到理论值, 仅在一定范围内可控。考虑到 CNBr 的毒性, 在重复利用性和储存稳定性实验中, 选择 CNBr 的浓度为 100 mg/mL 。

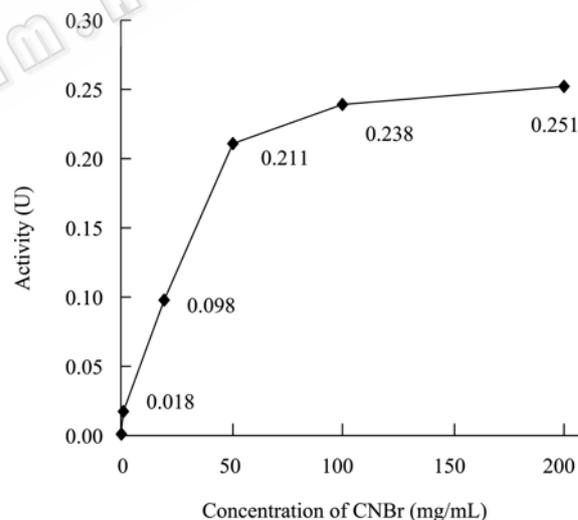
图 3 交联剂浓度对 1 m^2 PMP 表面 CA 接枝量的影响

Fig. 3 Effect of crosslinker concentration on concentration of immobilized CA on 1 m^2 PMP surface.

综上所述, CNBr 活化方法的优点是步骤简单易实施, 反应时间较短, 反应条件温和, 反应活性较高, 重复性好, 不会引入其他无关的可能会破坏酶活性的化学试剂, 可以最大限度减少酶失活的可能性。因此能在保持酶活性的同时, 得到较高的接枝效率。

2.4 接枝 CA 的重复利用性

图 4 为 PMP 表面物理吸附 CA(CA_{PA})、共价接

枝 CA(CA_{Cl})的重复利用性结果。由图可见,机械搅拌下, CA_{Cl} 比 CA_{PA} 更难从PMP表面清除,重复利用性更好。1次洗涤后,PMP表面物理吸附CA活性为0,说明 CA_{PA} 极易从PMP表面清除。PMP表面共价接枝CA的活性随着洗涤次数的增加而逐渐降低,9次洗涤后,仍保留约46%的活性。此结果进一步说明CA能通过共价接枝的方式被固定在PMP表面。因形成了共价键,稳定性增加,与 CA_{PA} 比, CA_{Cl} 重复利用性更好。但CA和CNBr间形成的异脲键不够稳定,随着时间的推移,CA会逐渐从PMP表面解离;此外 CA_{Cl} 仍存在水解失活,但程度比自由CA低;另外机械搅拌可能破坏CA的三维结构而使其失活,因此随着洗涤次数增加,活性逐渐减少。

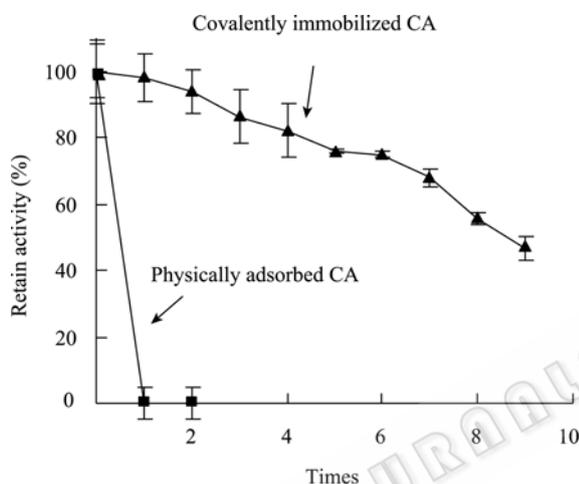


图4 PMP表面物理吸附CA、共价接枝CA的重复利用性
Fig. 4 Reusability of physically adsorbed CA and covalently immobilized CA on PMP surface.

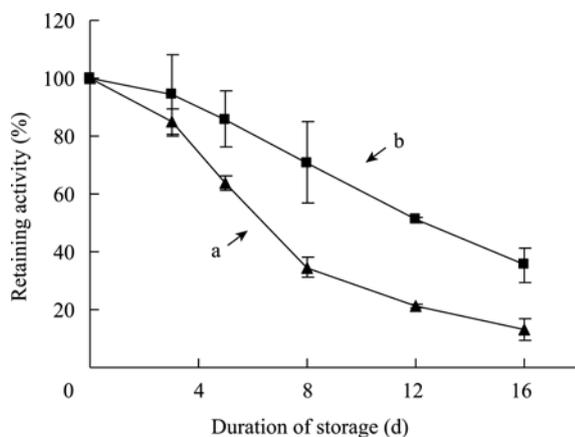


图5 CA的储存稳定性
Fig. 5 Storage stability of CA. a: free CA in solution; b: covalently immobilized CA on PMP surface.

2.5 接枝CA的储存稳定性

图5为CA溶液及PMP表面 CA_{Cl} 的储存稳定性结果。37°C下,随着储存时间的增加,两者的活性均下降,但 CA_{Cl} 比CA溶液表现出更好的储存稳定性:16d内,CA溶液失去约90%的活性,而 CA_{Cl} 失去约64%的活性。37°C溶液中长期存放可能导致CA的降解,因此活性逐渐降低。但接枝后,因空间位阻的存在,使CA降解速度减慢,因此活性降低速度低于CA溶液。

3 结论

表面接触角、XPS、酶活性分析测定、重复利用性及储存稳定性结果表明,采用水等离子体处理技术可将羟基等成功引入聚合物表面,再采用溴化氰作为交联剂,可高效地将CA偶联在无活性官能团的PMP材料表面,且得到的固定化酶能保持其活性,并具有较好的可重复利用性及储存稳定性。此改性方法有望应用在各种膜式氧合器上以提高它们对血液中 CO_2 的清除能力。

REFERENCES

- [1] Peek GJ, Killer HM, Reeves R, *et al.* Early experience with a polymethyl pentene oxygenator for adult extracorporeal life support. *ASAIO J*, 2002, **48**(5): 480–482.
- [2] Leonard RJ. The transition from the bubble oxygenator to the microporous membrane oxygenator. *Perfusion*, 2003, **18**: 179–183.
- [3] Colton CK. In: Zapol WM and Qvist J, Ed. *Artificial Lungs for Acute Respiratory Failure*. Washington DC: Hemisphere Publishing Corporation, 1976: 3–43.
- [4] Smith RG. Inorganic carbon transport biological systems. *Comp Biochem Physiol*, 1988, **90**: 639–654.
- [5] Pocker Y, Sarkanen S. Carbonic anhydrase: Structure, catalytic versatility, and inhibition. *Adv Enzymol*, 1978, **47**: 149–274.
- [6] Khalifah R. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase, stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. *J Biol Chem*, 1971, **246**: 2561–2573.
- [7] Salley SO, Song JY, Whittlesey GC, *et al.* Immobilized carbonic anhydrase in a membrane lung for enhanced CO_2 removal. *ASAIO Transactions*, 1990, **36**: M486–M490.
- [8] Salley SO, Song JY, Whittlesey GC, *et al.* Thermal, operational, and storage stability of immobilized carbonic anhydrase in membrane lungs. *ASAIO J*, 1992, **38**: M684–M687.
- [9] Liu P, Ding JD. Application of plasma surface

- modification in studies of polymeric medical materia. *China Med Device Inf*, 2005, **11**(5): 39-42.
- 刘鹏, 丁健东. 等离子体表面改性技术在医用高分子材料领域的应用. *中国医疗器械信息*, 2005, **11**(5): 39-42.
- [10] Guan J, Sacks MS, Beckman EJ, *et al.* Biodegradable poly(ether ester urethane)urea elastomers based on poly(ether ester) triblock copolymers and putrescine: synthesis, characterization and cytocompatibility. *Biomaterials*, 2004, **25**: 85-96.
- [11] Alves CM, Yang Y, Carnes DL, *et al.* Modulating bone cells response onto starch-based biomaterials by surface plasma treatment and protein adsorption. *Biomaterials*, 2007, **28**: 307-315.
- [12] Chan CM, Ko TM, Hiraoka H. Polymer surface modification by plasmas and photons. *Surface Sci Reports*, 1996, **24**: 1-54.
- [13] Pocker Y, Strom DR. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. IV. Kinetic studies of enzyme-catalyzed hydrolyses of p-nitrophenyl esters. *Biochemistry*, 1968, **7**: 1202-1214.
- [14] Drevon GF, Urbanke C, Russell AJ. Enzyme-containing Michael-adduct-based coatings. *Biomacromolecules*, 2003; **4**(3): 675-682.
- [15] Saito R, Sato T, Ikai A, *et al.* Structure of bovine carbonic anhydrase II at 1.95 Å resolution. *Acta Cryst*, 2004, **D60**: 792-795.
- [16] Steen ML, Butoi CI, Fisher ER. Identification of gas-phase reactive species and chemical mechanisms occurring at plasma-polymer surface interfaces. *Langmuir*, 2001, **17**: 8156-8167.
- [17] Steen ML, Hymas L, Havey ED, *et al.* Low temperature plasma treatment of asymmetric polysulfone membranes for permanent hydrophilic surface modification. *J Mem Sci*, 2001, **188**: 97-106.
- [18] Steen ML, Jordan AC, Fisher ER. Hydrophilic modification of polymeric membranes by low temperature H₂O plasma treatment. *J Mem Sci*, 2002, **204**: 341-357.
- [19] Klomp AJA, Terlingen JGA, Takens GAJ, *et al.* Treatment of PET Nonwoven with a water vapor or carbon dioxide plasma. *J Appl Polym Sci*, 2000, **75**: 480-494.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

核酸等温扩增技术及其应用

彭涛 主编

978-7-03-024693-6 ¥ 38.00 2009年6月 出版

内容简介

近年来核酸等温扩增技术迅猛发展, 显现出广阔的应用前景。本书分为 10 章, 第 1 章介绍核酸等温扩增技术的定义、特点与分类, 并对该技术的发展概况进行了论述。第 2~9 章分别介绍了各种方法的原理、操作要点及应用范围, 帮助读者了解各种方法的特点, 并可进行基本操作。第 10 章概述了相关企业及产品, 分析了产业化发展前景及对策。

本书既有原理又有实验方法, 适合从事分子生物学、临床医学、药学、环境科学等学科的科研工作者学习使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文宇 联系电话: 010-64031535

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目