

expressed *A. aBPLA₂* is close to those of denatured-refolded native acidic phospholipase *A₂* from *Agkistrodon halys* Pallas, *A. aBPLA₂* has the same hemolytic activity as denatured-refolded basic phospholipase *A₂* from *Agkistrodon halys* Pallas, but its inhibiting effect on platelet aggregation is negligible.

The roles of various amino acid residues in the enzymatic activity and pharmacological activities of phospholipase *A₂* are discussed.

Key words *A. aBPLA₂*, expression, activities assay, structure, function

壳聚糖固定化半纤维素酶的研究*

朱启忠

(菏泽师范专科学校生物系, 菏泽 274015)

摘要 从青霉菌 m8 提取出半纤维素酶, 将其固定在用戊二醛交联的壳聚糖载体上. 0.5 g 壳聚糖与 4% 的戊二醛结合固定 2.5 mg 蛋白质, 酶活回收率为 45.6%. 原酶的最适 pH 为 4.6, 固定化酶为 pH 3.6. 原酶的最适温度为 55 °C, 固定化酶在 60~75 °C 都具有较高活性. 固定化酶的耐热性优于原酶. 以半纤维素为底物, 固定化酶的表现 K_m 值略低于原酶, 前者为 5.0×10^{-2} g/L, 后者为 3.58×10^{-2} g/L.

关键词 壳聚糖, 半纤维素酶, 固定化酶

学科分类号 Q815

壳聚糖 (chitosan), 其学名为 2-氨基-1, 4-β 葡聚糖. 壳聚糖的来源十分丰富, 对它的开发利用已引起人们的普遍关注, 其在食品工业、日化工业和医药工业等方面都具有广泛的用途. 现有不少文献报道壳聚糖的用途, 作为生化载体就是其中之一. 壳聚糖是一种网状载体, 具有机械性能良好, 化学性质稳定, 耐热性好等优点, 特别是其分子中存在的氨基, 既易于与蛋白质和酶共价结合, 又可络合金属离子, 使酶免受金属离子的抑制, 同时它又易于通过接枝而改性. 因此, 它是一种良好的蛋白质和酶的载体, 近年来受到国内外不少学者的重视, 已成功地在壳聚糖上固定了碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、淀粉酶、天门冬氨酸酶及纤维素酶等十几种酶.

半纤维素是一种异质多糖, 约占陆生植物干重的 15%~30%, 微生物产生的半纤维素酶可降解半纤维素生成木糖及其他单糖. 研究半纤维素转化具有重要意义, 如在造纸工业的生物制浆和废水处理、转化半纤维素为单糖等. 在国外已有不少有关真菌和细菌降解半纤维素的研究^[1,2], 国内也已逐步开展, 但有关半纤维素酶的固定化尚未见报道. 本研究通过对产胞外半纤维素酶菌株进行培养, 提取半纤维素酶, 并将其通过戊二醛交联固定于壳聚

糖载体上, 制成固定化酶, 并对固定化酶的最适条件及稳定性等性质进行了探讨.

1 材料和方法

1.1 材料

虾壳, 自己收集. 戊二醛, 上海化学试剂站分装厂出品 (按 25% 计); 3, 5-二硝基水杨酸, 中国亚太医药工业研究所产品; 木聚糖, Sigma 公司产品; 壳聚糖, 自制; 半纤维素酶, 本实验室提取; 其他试剂均为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 菌株培养及酶液制备: 菌种为青霉菌 m8 (*Penicillium* sp. m8), 由本实验室采集、分离并初步命名. 菌株培养及酶液制备按孙迅等^[3]方法.

1.2.2 壳聚糖载体的制备: 参照陈盛等^[4]方法略加改动: 将河虾虾皮洗净, 去掉残余虾肉, 用 2~3 倍量体积的 3% 稀盐酸和 10% NaOH 反复处理 3~4 次, 每次 7~9 h, 用水洗至中性. 所得白色几丁质加入 45% NaOH, 于 80~100 °C 下保温处理 5~6 h 后, 水洗至中性, 晒干粉碎, 过 40 目筛即得产品.

* 山东省科委科研资金资助项目 (971164805).

Tel: (0530) 5525805, E-mail: wyw@public.hzptt.sd.cn

收稿日期: 1999-03-11, 修回日期: 1999-07-16

1.2.3 半纤维素酶的固定化: 取一定量的壳聚糖加入一定浓度的戊二醛, 室温下搅拌 2 h, 4℃过夜; 离心去上清, 水洗 2~3 次以洗去残余的戊二醛; 在交联后的壳聚糖中加入半纤维素酶液, 室温下搅拌 1.5 h, 于 4℃静置过夜; 洗净游离酶, 即得固定化酶。

1.2.4 半纤维素酶活性的测定: 采用 DNS 法^[5], 稍加改动。取 0.5% 半纤维素, 加入适当稀释的酶液 0.5 ml 或一定量的固定化酶, 55℃保温 30 min 后加入 3 ml DNS 试剂, 沸水浴加热 15 min, 用 723 型分光光度计测定光吸收值 (550 nm 处, 1 cm 比色皿)。酶活单位定义为每分钟每毫升酶液水解半纤维素生成 1 μmol 木糖所相当的酶量。

2 结果

2.1 戊二醛浓度对固定化酶活力的影响

平行取 6 份 0.5 g 壳聚糖于 6 个小烧杯中, 分别加入不同浓度的戊二醛 (1% ~ 6%) 溶液 4.0 ml, 按上方法制得固定化酶, 并测定其固定化酶活力, 结果如图 1 所示。

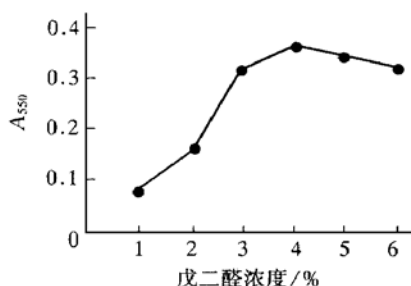


图 1 戊二醛浓度对固定化酶活力的影响

由图 1 可见, 固定化酶活力随戊二醛浓度增加而增大, 但戊二醛浓度达 4% 时, 固定化酶活力则趋于稳定。由于壳聚糖是一种氨基多糖, 其分子中氨基的多少, 是随制备过程中脱乙酰基程度的不同而不同, 因而所需交联剂量也不尽相同。所以此结果说明在本实验条件下, 4% 的戊二醛足以使该壳聚糖分子上的氨基充分发生交联, 所形成的载体与酶结合量已达最大。

2.2 给酶量对固定化酶活力的影响

平行取 6 份 0.5 g 壳聚糖与 4% 戊二醛交联物, 各加入不同量的酶液 (0.5~2.5 ml) 使之固定化, 按同样方法测定酶活力, 结果见图 2。

图 2 表明, 随给酶量的增加, 酶活力随着增

大, 但当给酶量增加到一定程度时, 酶活力不再增大。这可能是由于一定量交联后的载体, 其活性基团是一定的, 在其结合位点未被饱和之前, 固定化酶活力随给酶量增加而增大, 当结合位点被饱和后, 增加给酶量却不增加酶活力。在本实验条件下 0.5 g 固定化载体固定 3 ml 酶液 (相当于 2.5 mg 蛋白质) 效果较好, 酶活回收率为 45.6%。

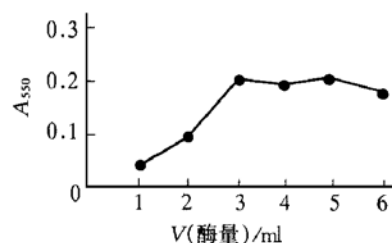


图 2 给酶量对固定化酶活力的影响

2.3 pH 对酶活力的影响

平行取 8 份固定化酶 0.5 g 和适当稀释的原酶液 0.5 ml, 分别在不同 pH 值下 (2.0~8.0) 测定酶活力, 结果见图 3。

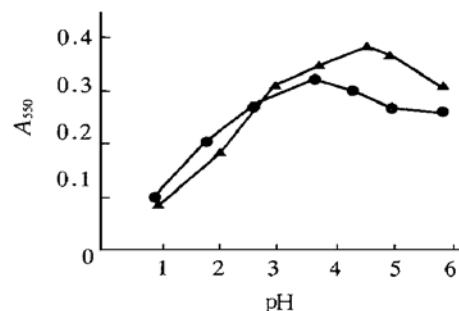


图 3 pH 对酶活力的影响

▲—▲: 原酶; ●—●: 固定化酶。

由图 3 可见, 固定化酶的最适 pH 为 3.6, 原酶的最适 pH 值为 4.6。由于壳聚糖是阳离子型载体, 因而固定化酶的最适 pH 值比原酶要低。从图 3 还可见, 在本实验条件下, 固定化酶的最适 pH 值较原酶往酸性方向移动, 且受 pH 的影响较少。

2.4 温度对酶活力的影响

平行取 6 份固定化酶 0.5 g 和适当稀释的原酶液 0.5 ml, 分别在不同温度 (25~85℃) 下测定其酶活, 发现原酶在 55℃ 时酶活力最高, 固定化酶的最适温度为 65℃, 且固定化酶的热稳定性较原酶高, 在 60~75℃ 酶活力都较高。这表明半纤维素酶经固定化后, 对热的稳定性明显提高 (图 4)。

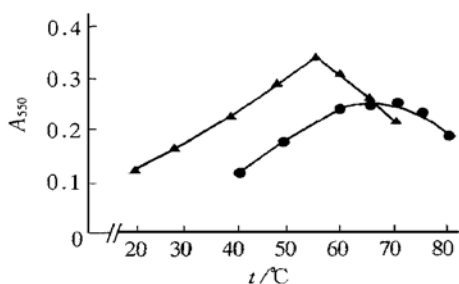


图4 温度对酶活力的影响
▲—▲: 原酶; ●—●: 固定化酶.

2.5 固定化酶与原酶的耐热性试验

10 份固定化酶和原酶液置于 65 °C 水浴中, 每隔 10 min 取出一管, 按上述方法测定其酶活, 持续 100 min (图 5).

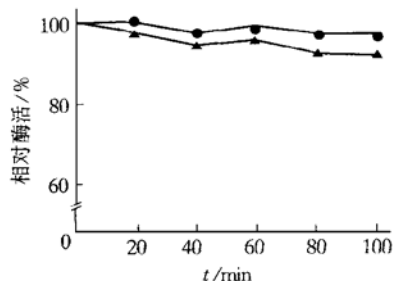


图5 酶的耐热性试验
▲—▲: 原酶; ●—●: 固定化酶.

结果表明, 青霉菌胞外半纤维素酶的耐热性较强, 保温 100 min 后, 酶的相对活力仍达 87.5%, 固定化酶基本保持不变, 可见固定化酶比原酶具有较高的热稳定性. 由此可以看出, 该酶 (特别是固定化酶) 的适应性较强, 可广泛应用于各个方面, 如造纸工业的酶制浆过程和废水处理等.

2.6 固定化酶与原酶米氏常数的比较

取 6 份固定化酶 0.5 g 和适当稀释的原酶液 0.5 ml, 分别与一定量不同底物浓度 (0.05% ~ 0.35%) 的底物于 55 °C 反应 15 min, 测定其吸收值, 用双倒数作图法求得米氏常数 (图 6).

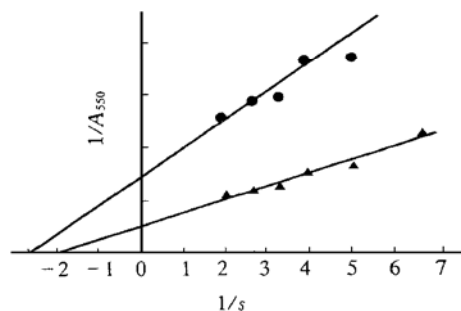


图6 原酶与固定化酶的 K_m 值
▲—▲: 原酶; ●—●: 固定化酶.

由图 6 可求得 K'_m (固) = 3.58×10^{-2} g/L, $K_m = 5.0 \times 10^{-2}$ g/L, 说明该半纤维素酶在固定化后, 表观米氏常数略为减小, 表明酶经固定化后与底物的亲和力有所增加.

2.7 固定化半纤维素酶的半衰期

固定化后的半纤维素酶经 30 d, 每 2 天测定一次酶活, 酶活力未见明显改变, 在 66 d 测定时, 固定化酶的残余活力为 51.7%, 表明该固定化酶在本实验条件下半衰期至少为 66 d.

3 讨 论

用戊二醛交联后的壳聚糖为载体固定半纤维素酶, 实验测定发现固定化半纤维素酶的活力受到载体性能、交联剂用量、载体与酶的比例, 以及环境因子如温度、pH 值等因素的影响. 比较固定化半纤维素酶与原酶的一些理化性质, 可以看出固定化酶的 pH 值向酸性方向移动; 固定化酶与底物的亲和力稍有提高; 最适反应温度升高, 且在 60~75 °C 范围内活力均较高. 说明该半纤维素酶经壳聚糖固定化后, 理化性质得到改善, 特别是热稳定性明显优于原酶. 其次, 用壳聚糖固定的半纤维素酶活力回收也较高, 操作半衰期较长, 且容易回收重复利用, 因此, 壳聚糖可作为固定半纤维素酶的一种良好载体.

有关固定化青霉菌胞外半纤维素酶在造纸原材料预处理过程中的降解能力及其在环保等方面的作用正在研究中.

参 考 文 献

- 1 Bajpai P, Bajpai P K. Application of xylanase in proleaching of bamboo Kraft pulp. Tappi Journal, 1996, 79 (4): 225~ 230
- 2 Haltrich D, Nidetzky B, Kulbe K D, et al. Production of fungal xylanase. Bioresource Technology, 1996, 58 (3): 137~ 161
- 3 孙 迅, 朱 陶, 朱启忠. 产胞外木聚糖酶放线菌的分离与筛选. 微生物学杂志, 1998, 18 (4): 29~ 32
Sun X, Zhu T, Zhu Q Z. J Microbiology, 1998, 18 (4): 29~ 32
- 4 陈 盛, 黄 智, 刘艳如. 壳聚糖固定化纤维素酶的研究. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23 (3): 250~ 253
Chen S, Huang Z, Liu Y R. Prog Biochem Biophys, 1996, 23 (3): 250~ 253
- 5 Laura P, Castro W, Blanca A, et al. Thermostable xylanase produced at 30 °C and 45 °C by a thermotolerant *Aspergillus* strain. FEMS Microbiology Letters, 1997, 146 (2): 97~ 102

Study on Chitosan-immobilized Hemicellulase. ZHU Qi-Zhong (Department of Biology, Heze Teacher's College, Heze 274015, China).

Abstract The extracellular hemicellulase from

Penicillium was immobilized on chitosan by glutaraldehyde. The results indicated that the immobilized hemicellulase prepared by 0.5 g chitosan crosslinking with 4% glutaraldehyde and then combining with 2.5 mg protein showed higher enzyme activity and better activity recoveries (45.6%). The optimum pH of soluble enzyme and immobilized enzyme were pH 4.6 and pH 3.6 respectively. The optimum temperature of soluble

enzyme was 55 °C, whereas immobilized showed high activity in 60~75 °C. Thermal stability of immobilized enzyme was better than soluble enzyme at 65 °C. The apparent K_m' of the immobilized enzyme was 3.58×10^{-2} g/L and the K_m of soluble enzyme was 5.0×10^{-2} g/L with hemicellulose as the substrate.

Key words chitosan, hemicellulase, immobilized enzyme

分子信标探针用于 PCR 检测对虾白斑杆状病毒*

章晓波 徐 洵^{1,2)} 李庆阁³⁾ 徐丽美²⁾

(中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026)

摘要 将对虾白斑杆状病毒的一段特异性 DNA 设计成分子信标探针, 用于该病毒的 PCR 检测. 温度与荧光强度之间的关系表明, 所设计探针的发夹既可以形成也可以打开, 符合 PCR 对分子信标探针的要求. 结果表明, 在 PCR 同时加入分子信标探针不影响 PCR 扩增, 分子信标探针只能与目的 DNA 杂交, 具有较高的特异性. 随着 PCR 循环数的增加以及含目的 DNA 的质粒拷贝数的增加, 荧光强度都随之增强.

关键词 对虾白斑杆状病毒, PCR, 分子信标探针

学科分类号 Q78

对虾白斑杆状病毒 (prawn white spot bicilliform virus, WSBV) 是引起对虾病害的一种主要病原, 在我国和亚洲养殖对虾中高度感染, 引起很大的经济损失, 但是至今为止对于这种没有包涵体的新型杆状病毒不能进行有效治疗. 通过早期诊断、及早预防, 有利于防止此病毒的发生. 对虾白斑杆状病毒的检测方法中, 多聚酶链反应 (PCR) 是一种较为简便快速且有效的方法^[1~3], PCR 扩增产物的检测通常采用琼脂糖凝胶电泳. 依据荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 原理^[4~6], Tyagi 和 Kramer^[7]首次建立一种新的荧光探针即分子信标 (molecular beacon) 探针, 用荧光素和淬灭剂分别在两端同时标记发夹式探针, 这种探针尤其适合于 PCR. 在 PCR 同时加入分子信标探针, 根据扩增产物是否产生荧光, 以确定目的 DNA 的有无, 使得 PCR 扩增和扩增产物的检测在同一封闭的试管中进行, 这样不仅可以避免 PCR 后扩增产物琼脂糖电泳过程中可能造成的污染, 简化检测手段, 更重要的是同时进行引物特异性扩增和探针的特异性

杂交检测而极大地提高了方法的特异性. 分子信标探针在 PCR 检测中的应用研究不多, 国内则未见这方面的报道. 为此, 本研究试图将分子信标探针技术应用于对虾白斑杆状病毒的 PCR 检测, 以提高检测的特异性, 简化检测手段.

1 材料与方法

1.1 PCR 扩增的模板制备

将对虾白斑杆状病毒的一段 DNA 克隆在 pBluescript 中, 通过 Sanger 双脱氧法测序后^[8], 设计特异性较高的 PCR 扩增引物 (已申请专利), 按文献 [8] 介绍的方法少量制备重组质粒, 此重组质粒用作 PCR 扩增的模板. 收集发病的对虾, 按文献上的方法制备含对虾白斑杆状病毒的对虾样

* 国家“863”计划 (819-02-04) 和国家海洋局海洋生物工程重点实验室开放基金资助项目 (Hy9801).

¹⁾ 通讯联系人.

²⁾ 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物工程重点实验室, 厦门 361005.

³⁾ 厦门大学生物系, 厦门 361005.

Tel: (0592) 2085376, E-mail: xxu@public.xm.fj.cn

收稿日期: 1999-03-10, 修回日期: 1999-08-02