

·研究简报·

纤维素固定化血红蛋白研究*

孔德领 俞耀庭 贾永会 彭小文

(南开大学分子生物研究所生物活性材料开放研究实验室 天津 300071)

王子晖

(香港科技大学生物化学系 香港九龙)

关键词 氧化纤维素, 血红蛋白, 固定化, 机理研究

纤维素是一种重要的化工原料, 由于来源广泛、价廉以及良好的再生性、反应性和通用性, 被广泛用做载体材料. 在酶的分离纯化, 蛋白质分离纯化, 亲合色谱固定相, 拆分手性化合物等应用领域, 往往采用球形纤维素或膜状纤维素形式. 而在水吸附剂, 分离回收金属离子, 从海水中提取铀、金等贵金属等方面, 可以直接使用絮状纤维素, 节约加工费用, 则更有应用意义. Hayatsu^[1]用棉花共价键联活性染料, 用于吸附多环化合物, 清除环境污水中的致癌物和诱变剂等, 具有选择性高、吸附量大、容易洗脱等特点, 可广泛用于生活污水处理.

作者以纤维素为载体固定化血红蛋白(Hb), 进行了氧载体的研究. Hb经固定化后仍具有携氧功能, 类似于鱼鳃, 能够从海水中富集氧气, 并在一定条件下释放氧气, 可满足人类在海底作业, 如潜水、潜艇的氧气需要. 美国在这一研究领域已取得一些应用性成果^[2]. 作者在实验中发现, 纤维素经过 NaIO_4 预氧化、碱处理和再氧化, 能够大量固定 Hb, 三步反应缺一不可. 为了进一步了解三步活化反应与 Hb 固定化的关系, 了解其中的反应过程, 为 Hb 的固定化提供理论指导, 本文在前面工作的基础上, 对纤维素的活化和固定化反应机制进行了研究, 并采用 X-衍射和红外光谱对纤维素结构进行了表征, 对反应机制进行了解释.

1 主要试剂和仪器

过期人血: 天津市血液研究所提供; 棉短绒(纤维素): 江苏省滨海县精制棉厂; 高碘酸钠: 分析纯, 天津市化学试剂三厂; 盐酸羟胺: 分析纯, 天津市化学试剂一厂; 百里酚蓝: 指示剂, 北京化工厂.

自动高速冷冻离心机: 日本 Hitachi 20PR-520 型; 原子吸收分光光度计: 日本日立 180-80 型; 红外光谱仪: 日本 Shimadzu-IR-435; 恒温振荡器: THZ-82 型, 上海跃进医疗器械四厂; 旋转阳极 X-衍射仪: 日本理学 DMAXRA 型.

2 血红蛋白的提取

过期人血于 4℃、5000rpm 下离心 10min, 弃去上清液, 以等体积生理盐水洗涤两次.

* 1997-09-19 收稿, 1998-05-01 修稿

得到的红血球加等体积蒸馏水, 4℃ 搅拌下裂解 30~60min, 加入 0.4 倍体积的四氯化碳, 搅拌 15min, 4℃, 7000rpm 下离心 10min, 吸取上层血红蛋白溶液. 在 N₂ 气流下通过压滤器(0.3μm 微孔滤膜)灭菌, 4℃ 保存. 用原子吸收分光光度计测定 Hb 溶液中二价铁离子的浓度, 再计算 Hb 的浓度.

$$[\text{Hb}] = [\text{Fe}] \times \frac{64500}{56 \times 4} = 0.0288[\text{Fe}]$$

单位: [Fe] ppm; [Hb] g/dL

3 纤维素氧化

1.0g 棉短绒, 加 20mL 0.25mol/L NaIO₄ 溶液, 于恒温振荡器中, 30℃ 避光反应一定时间, 水洗除去 NaIO₄. 通过测定氧化纤维素上的醛基含量, 衡量氧化程度.

4 碱处理

由以上所得的氧化纤维素加 50mL 5mol/L NaOH 溶液, 在 70℃ 热水浴上加热 30min, 立即用大量蒸馏水冲稀, 静置, 倾去碱液, 抽滤并水洗至中性. 接着进行再氧化反应, 氧化条件与以上相同.

5 醛基含量测定

参考文献[3], 采用半微量盐酸羟胺法, 以甲醇为溶剂, 百里酚蓝为指示剂.

6 血红蛋白固定化

湿态氧化纤维素, 加一定量 Hb 溶液(10.0g/dL), 置于 4℃ 冰箱中反应过夜. 过滤, 水洗至滤液无色, 收集滤液并定容, 用原子吸收分光光度计测定固定化前后 Hb 溶液浓度, 计算 Hb 固定量.

仪器分析

红外光谱采用 KBr 压片.

8 碱处理对 Hb 固定化的影响

如表 1 所示, 碱处理对 Hb 固定量的影响很明显. 未经碱处理的氧化纤维素, 尽管醛基含量较高, Hb 固定量却很小, 最高为 42.6mg/g. 在对不同醛基含量的氧化纤维素进行环氧氯丙烷活化反应中, 氧化纤维素经过 5.0mol/L NaOH, 70℃, 30min 处理后, 由白色絮状变成无色凝胶状, 对 Hb 的固定量明显提高, 达到 128.4mg/g.

Table 1 Effect of alkaline treatment on hemoglobin (Hb) immobilization

Amount of aldehyde group (mmol/g)		1.85	4.00	5.73	7.11
Bound Hb	A: Without alkaline treatment	11.2	25.3	36.7	42.6
(mg/g)	B: with alkaline treatment	48.0	55.5	105.3	128.4

对碱处理条件进行了进一步研究. 用不同浓度的 NaOH 处理醛基含量为 6.22 mmol/g 的氧化纤维素, 实验结果如表 2 所示. 未经过碱处理的氧化纤维素为白色絮状, 醛基含量 6.22 mmol/g, Hb 固定量为 70.0mg/g; 0.1mol/L NaOH 使氧化纤维素断裂为白色粉末,

Hb 固定量为 80.0mg/g. 用 1.0mol/L NaOH 处理, 氧化纤维素溶解, 收率为零. 而 5.0mol/L NaOH 使氧化纤维素变成凝胶状, Hb 固定量明显提高. 比较反应温度发现, 经 5.0mol/L NaOH, 25℃ 处理后的产物在水中不易沉降, 难于抽滤和洗涤, 收率较低, 而 70℃ 处理则易于抽滤和洗涤, 收率稍高.

氧化纤维素在不同浓度 NaOH 溶液中表现出完全不同的反应情况, 这与氧化纤维素的碱降解有关, 后面将作详细讨论. 碱处理条件选择为 5.0mol/L NaOH, 70℃, 30min.

Table 2 Hb immobilization vs NaOH concentration in alkaline treatment

NaOH conc. (mol/L)	0	0.1	1.0	5.0	5.0
Temperature (℃)	25	25	25	25	70
Yield of product (%)	100	60.0	0	17.9	33.3
Status of oxycellulose	white cotton	white powder	—	gel	gel
Amount of aldehyde group (mmol/g)	6.22	0.17	—	0.07	0.04
Amount of immobilized Hb(mg/g)	70.0	80.0	—	156.4	216.2

9 再氧化对 Hb 固定量的影响

由表 2 可知, 氧化纤维素经 5.0mol/L NaOH 处理后, 变成凝胶, 有利与大分子 Hb 反应, Hb 固定量明显提高. 但是另一方面, 碱处理使得醛基几乎完全消失. 因为 Hb 固定化主要是通过醛基与胺基的反应实现的, 必须进行再氧化, 产生醛基. 纤维素经过 0.25mol/L NaIO₄, 30℃, 6h 预氧化和碱处理, 于 30℃ 再氧化不同时间, 与 Hb 溶液进行固定化反应, 结果如表 3 所示, Hb 固定量大大提高, 达到 1.2g/g, 产物为暗红色的不规则颗粒状, 在水中长期浸泡不泄漏. 再氧化时间越长, Hb 固定量越大.

Table 3 Effect of the second oxidation time on Hb immobilization

Second oxidation time (h)	2	4	6	8
Yield of oxycellulose (%)	36.8	34.2	28.6	28.0
Amount of aldehyde group (mmol/g)	2.09	2.22	4.03	4.03
Amount of immobilized Hb(mg/g)	652.2	853.8	1146.9	1200.0

10 预氧化程度对 Hb 固定量的影响

表 4 结果表明, 不同预氧化程度的纤维素在相同条件下进行碱处理和再氧化, 预氧化程度对 Hb 固定量的影响很大. 如果纤维素不经过预氧化直接进行碱处理和氧化, Hb 固定量最低, 只有 151.5mg/g. 随着预氧化时间的增加, Hb 固定量明显增加, 当预氧化时间为 6h 时, Hb 固定量达到 843.9mg/g.

Meara D O 等^[5~6]详细研究了氧化纤维素的碱降解机制, 发现尽管纤维素具有高度稳定性, 但是氧化纤维素很容易在碱性条件下发生降解, β 位 C—O 键断裂, 反应式如图 1 所示. 同时约有 20% 的相邻醛基发生分子内 Cannizzaro 反应, 生成酸性多糖, 醛基因为碱降解而消耗. 碱降解破坏了纤维素的高级结构, 生成凝胶态. 可见预氧化为碱处理创造了基础条件, 是必不可少的. 碱处理的意义在于发生碱降解, 破坏晶体结构, 增大纤分子

Table 4 Effect of pre-oxidation on Hb immobilization

Pre-oxidation time (h)	0	1	2	3	6
Yield of final product (%)	92.4	54.0	45.4	42.0	34.6
Amount of aldehyde (mmol/g)	4.60	3.81	2.16	2.47	1.66
Amount of immobilized Hb (mg/g)	151.5	455.6	643.2	695.2	843.9

(Second oxidation; 30°C, 4h)

维素的极性,有利于 Hb 固定化.由于碱处理造成醛基损失,只有经过再氧化产生醛基,才能大大提高 Hb 固定量.所以,对于氧化纤维素固定化 Hb,预氧化、碱处理和再氧化是缺一不可的活化条件.

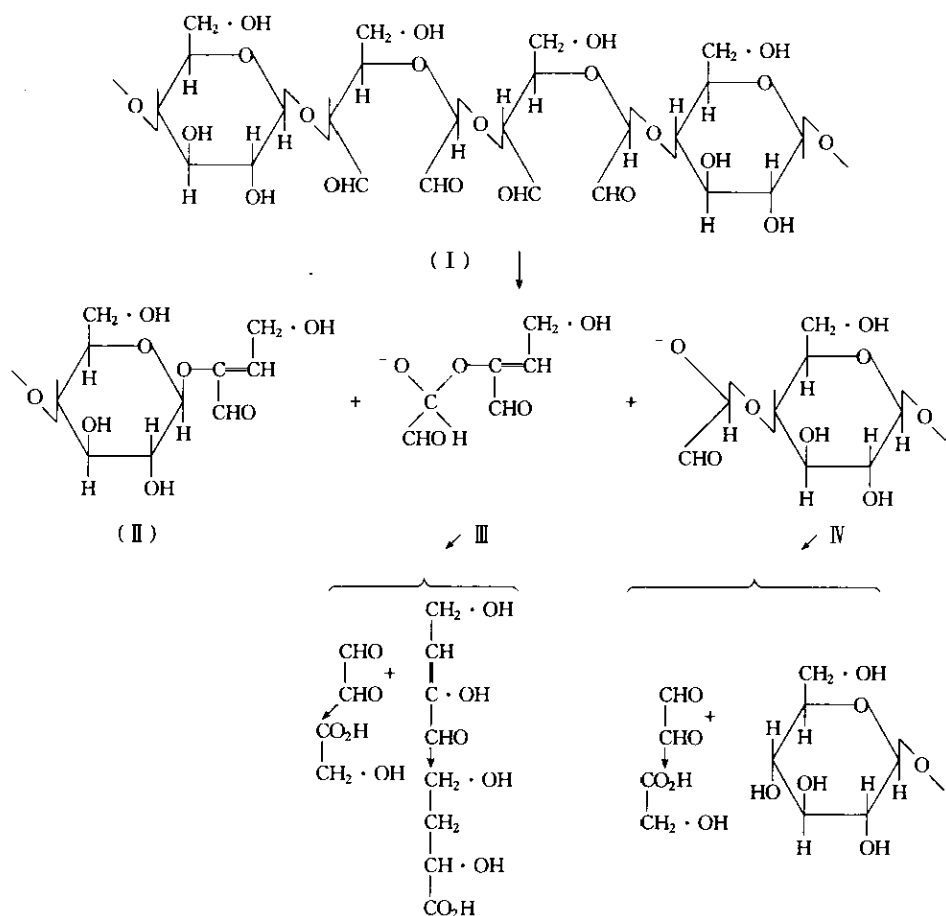


Fig. 1 Sketch of alkaline degradation of periodate oxycellulose

11 结构表征

为了进一步研究纤维素结构与 Hb 固定量的关系,分别测试了样品的 X-衍射图谱和红外吸收光谱.经过一步氧化得到的氧化纤维素,它的 X-衍射图谱(图 2, a)有一个很强的尖锐吸收峰,这表明样品具有微晶体结构,纤维素分子高度有序排列.而经过碱处理和再氧化后,纤维素变成凝胶状,它们的 X-衍射图谱如图 2(b, c).尖锐吸收峰消失,变成较弱

的宽峰,这表明纤维素分子为无序排列. X-衍射从微观上证明了纤维素的高度有序性结构,是影响 Hb 固定化的主要因素. 正是由于碱处理破坏了纤维素分子的有序性,为 Hb 固定化创造了条件.

纤维素、氧化纤维素及氧载体的红外光谱如图 3 所示. 氧化纤维素的图谱中出现的

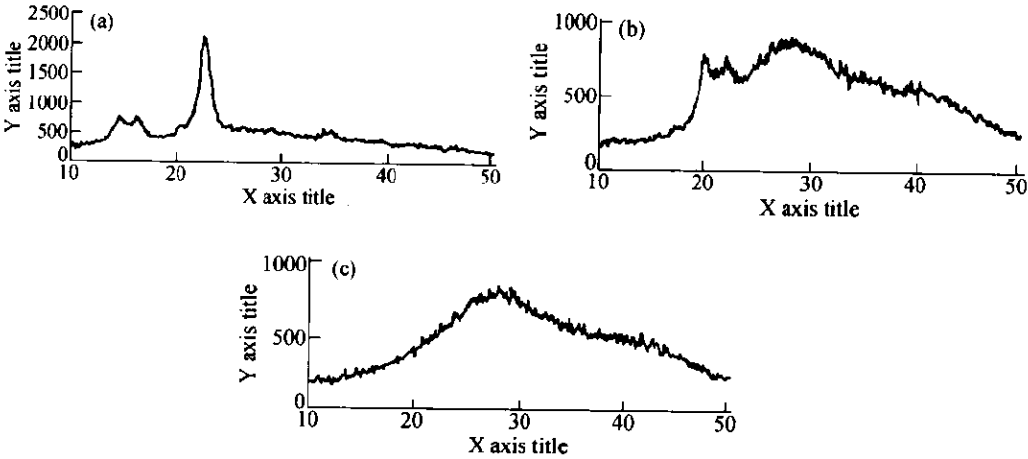


Fig. 2 X-diffraction spectrum of
(a) periodate oxycellulose without alkaline treatment;
(b) alkaline treated periodate oxycellulose;
(c) periodate oxycellulose treated with alkaline and second oxidation

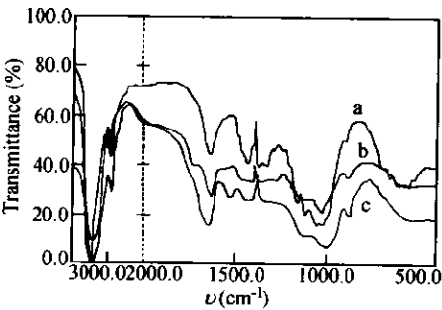


Fig. 3 Infrared spectra of samples
a. cellulose; b. periodate oxycellulose; c. oxygen carrier

1709.2cm^{-1} 为醛基吸收峰,与 Hb 反应后, 1709.2cm^{-1} 吸收峰消失,出现了 1650cm^{-1} 和 1530cm^{-1} 两个亚胺吸收峰,其中 1650cm^{-1} 被水吸收峰 1625cm^{-1} 所掩盖^[7]. 红外光谱表明,醛基与 Hb 上的氨基结合,形成亚胺结构,Hb 不泄漏,氧载体具有很好的稳定性.

REFERENCES

1 Bonaventure J. Appl Biochem Biotechnol, 1984, 9:65~78

- 2 Hayatsu H. J Chromatogr, 1992, 597(1~2): 37~56
- 3 Maute R L, Owens M L. Anal Chem, 1965, 28: 1312~1314
- 4 Richards G N, Sephton H H. J Chem Soc, 1957, 11: 4492~4499
- 5 Meara D O, Richards G N. J Chem Soc, 1958, 11: 4504~4508
- 6 Meara D O, Richards G N. J Chem Soc, 1958, 3: 1204~1211
- 7 Wang Zhengxi(王正熙). Application of Infrared Spectrum in Analysis and Determination of Polymers (聚合物红外光谱分析和鉴定), Chengdu(成都): Sichuan University Press(四川大学出版社), 1989. 225~226

MECHANISM STUDY OF HEMOGLOBIN IMMOBILIZATION ON PERIODATE OXYCELLULOSE

KONG Deling, YU Yaoting, JIA Yonghui, PENG Xiaowen

(Institute of Molecular Biology, Bioactive Materials Research Laboratory of Nankai University, Tianjin 300071)

WONG J Tzeferi

(Department of Biochemistry, University of Science and Technology, Hong Kong)

Abstract Cellulose can be easily oxidized to oxycellulose with periodic acid, which can serve as a carrier for the immobilization of hemoglobin acting like a bionic gill, to extract oxygen from sea water, which may provide a source of oxygen for human life support in an undersca environment. The present paper studied the mechanism of hemoglobin immobilization on periodate oxycellulose. It was found that only by the unique activation procedure, that the cotton was first oxidized with NaIO_4 , then treated with 5.0mol/L NaOH and again oxidized with NaIO_4 , the carrier thus obtained was able to immobilize a very high amount of Hb, i. e. 1.0g Hb/g cellulose. When cellulose was oxidized only once with NaIO_4 , although the aldehyde group content was rather high, the linking amount of Hb was very low. The mechanism was studied by means of X-diffraction, infrared spectrum and determination of functional groups. It was found that Hb was immobilized by the interaction between the aldehyde groups in the oxycellulose and the amino groups on Hb. And the microcrystalline structure in cellulose was the main hindrance in immobilization process. Alkaline degradation of periodate oxycellulose led to destruction of the microcrystalline structure. The alkaline degradation and Cannizzaro reaction also resulted in a complete loss of aldehyde groups. In order to obtain maximum amount of immobilized Hb, a second oxidation with NaIO_4 was necessary to produce aldehyde groups.

Key words Periodate oxycellulose, Hemoglobin, Immobilization, Mechanism study