

· 研究简报 ·

常温预辐射聚合法物理包埋葡萄糖 氧化酶的研究*

刘鹏飞 哈鸿飞

(北京大学技术物理系, 北京, 邮政编码: 100871)

关键词 葡萄糖氧化酶、丙烯酰胺、辐射聚合、固定化酶

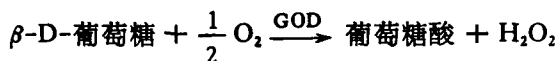
多数生物活性分子, 如酶, 抗体及药物在室温下接受辐射能后其生物活性和药力会受到不同程度的损伤。低温(-78℃)辐射对酶的辐射失活有不同程度的保护作用。为此, 嘉悦烈等人曾发展了一种低温辐射包埋技术^[1]。另外, 有一些酶(如过氧化氢酶、辣根过氧化物酶等)还具有辐射后失活效应, 即受辐照酶样品取出辐射场后其活性仍随存放时间而不断下降。低温可以减缓后失活速率但难以完全排除。为避免低温操作的麻烦和辐射失活与后失活的损失, 作者曾使用一种室温预辐射包埋技术^[2]。这一技术是将包埋过程分为两步: 先使单体溶液在不断通氧下室温预辐照, 然后在辐射场外与适当酶混合, 通氮使其聚合, 达到物理包埋的效果。

本文发展了这一技术, 将它应用在葡萄糖氧化酶 GOD 上, 测定了剂量、酶初始浓度、交联剂 N', N'-次甲基双丙烯酰胺 Bis 等条件对包埋效果的影响。

实验

1. GOD 活力的测定

GOD 可催化如下反应



本工作采用测定 $\beta\text{-D-葡萄糖}$ 分解量来测定 GOD 活力。采用 3,5-二硝基水杨酸比色法^[3]测定 $\beta\text{-D-葡萄糖}$ 分解量。

2. 固相包埋酶活力的测定

测定方法与自由酶相同。本实验中聚合水凝胶直径 4mm, 厚 2mm, 电磁搅拌下反应 60s, 所测出的活性称表观活性。

3. 物理包埋方法

在包式吸收管内加入 4ml 一定浓度丙烯酰胺 (AAM) 溶液, 不断通氧下辐照, 剂量率 56.0Gy/min, 经一定时间辐照后取出, 立即通高纯氮 10min。待溶液开始发粘, 加入需包埋的酶, 继续通氮 5min, 然后在氮气保护下将其导入细玻璃管中(内径 4mm), 并将玻璃管两端连乳胶管并用螺旋夹封住。水平放置过夜, 管内单体聚合成透明水凝胶。将固定了的酶分子的水凝胶推出玻璃管, 切成 2mm 园盘。

* 1991年10月11日收到

4. 样品辐照

待照样品置于包式吸收管中,在⁶⁰钴 r 源装置内,不断通氧下,室温辐照一定时间。未注明的剂量率皆为 56.0Gy/min.

结果

1. 水溶液中 GOD 的辐射稳定性

GOD 水溶液 (1mg/ml), 通氧,室温下辐照不同时间观察酶的活力的变化,结果见图 1。从图 1 可以看出, GOD 在常温下辐射失活很严重, 5kGy 就有近 80% 的 GOD 失活.水溶液中 GOD 初始浓度越高,失活速率越快。

2. 聚合水凝胶形态与聚合条件的关系

辐照后的单体溶液在辐照场外的聚合速度及形成水凝胶外观与通高纯氮的流速与通气时间关系甚大。高纯氮流速越快、通气时间越长,聚合反应时间短,反应激烈。所得聚合物外观为乳白色不透明状;高纯氮流速过小,水凝胶难以形成。适宜的高纯氮流速为 0.8L/min, 通气时间为 10—15min。停气后缓慢聚合,聚合水凝胶外观透明,硬度也较适中。

3. 剂量对固相酶表观活力保存的关系

当其它实验条件固定时,吸收剂量与固相酶表观活力保存的关系见图 2。图 2 结果表明吸收剂量越大所得固相酶表观活力保存越低。

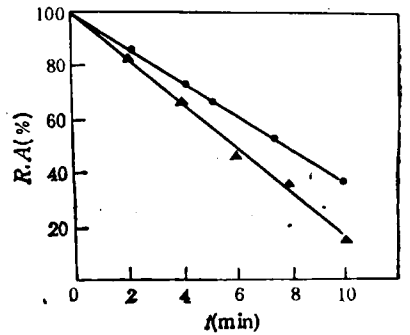


图 1 GOD 辐照失活曲线

-●-GOD 浓度为 0.5mg/ml; -▲-GOD 浓度为 1.0mg/ml

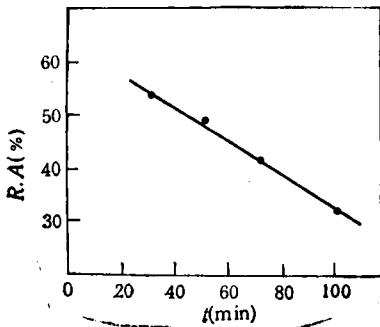


图 2 吸收剂量与固相酶表观活力保存的关系
AAM: 20%; Bis/AAM: 5%. 加入 GOD 量 4.0mg; AAM 总重 4.27g

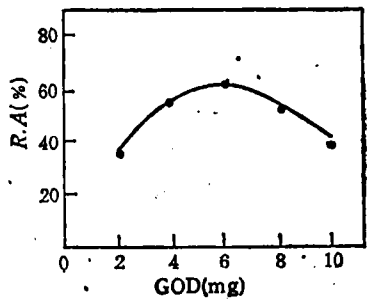


图 3 酶量对固相酶表观活力保存的影响
AAM: 20%; Bis/AAM: 5%;
剂量: 1.68kGy

这里,活力保存含活性酶包埋率概念,即在固相所测得酶的表现活力占初始加入自由酶活力的百分数。

第一步,由于不断吹氧,单体在γ射线作用下并不聚合,而是把辐射能转化为单体的过氧化物或过氧化氢。第二步在辐射场外,通氮除氧,上述过氧化物又转化为自由基,由后者来引发单体聚合^[4]。显然,剂量越大,第一步积累的过氧化物就越多,第二步给出的

自由基就越多,聚合速度就越快,这时聚合热可使局部地区瞬间温度很高,会诱发酶的热失活。另一方面,剂量增加,使形成的水凝胶交联密度增大,网络空间变小,溶胀度降低,酶和底物分子的扩散速度变小,60s 内测定的表观活力就下降了。为了得到较好的包埋率,剂量最好控制在 3kGy 左右,这时包埋率可接近 50%。

4. 酶加入量对固相酶表观活力保存的影响

为了增加单位重量凝胶的酶活力,在同样重量单体的体系中加入不同量的自由酶,包埋结果表明自由酶量的增加只是一定限度对增加固相酶表观活力保存有利,超过这个限度酶量的增加反而降低了固相酶表观活力保存(见图 3)。这个结果是由于酶量的增加同时也增加了酶从固相凝胶中泄漏的速度。在本实验中,每克凝胶包埋 1.5mg 左右的葡萄糖氧化酶效果最好。对不同酶,由于分子大小不同,加入酶量的最佳值也会有变化,改变其它实验条件,如剂量、单体和交联剂浓度等也会影响这一数值。

5. 单体和交联剂浓度对固相酶表观活力保存的影响

固相酶的酶促反应是扩散控制过程,因此形成凝胶的紧密程度、网格和比表面大小对固相酶表观活力影响很大。当剂量一定,体系中单体和交联剂浓度就是两个重要因素(见图 4)。

实验结果表明,在一定剂量下 (1.68kGy), 单体浓度为 20%, 交联剂浓度为 5% (指交联剂与单体重量比的百分数),包埋效果最理想,这时凝胶机械强度也最好,不过软,也不易碎,无色透明,强度适中。

6. 固定化分子表观活力的稳定性

物理包埋法实现生物分子固定化包含两层意思,一是把自由酶物理地“固定”于某一空间,使它失去原有的“自由”;另一层是它应以一定速度向外扩散,或称泄漏。全然不泄漏的物理包埋难以实现,也无实际意义,过快泄漏也会失去包埋的初衷,因此控制泄漏速度,维持多次使用是考验包埋方法的一个重要方面。

本实验中对 GOD 的包埋是成功的,不仅有较高的包埋率,固相酶多次使用的效果也很好,连续使用十数次表观活力保存依然可达 40% 左右(见图 5)。

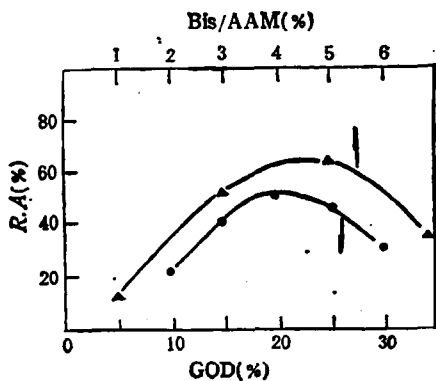


图 4 固相酶表观活力保存与单体和交联剂浓度的关系
 ●- 单体浓度曲线, Bis/AAM 5%; -▲- 交联剂浓度曲线 AAM 20%; 总剂量 1.68kGy

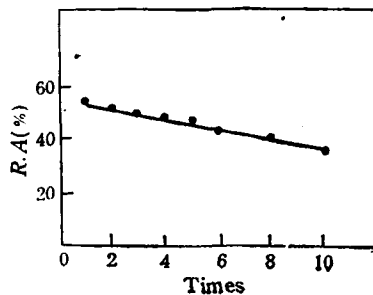


图 5 固相 GOD 泄漏曲线

参 考 文 献

- [1] Kaetsu, I., Kumakura, M., Fujimura, T., Yoshida, M., Asano, M., Kasal, N., Tamada, M., *Radiat. Phys. Chem.*, 1986 27, 245
- [2] 哈鸿飞、高金辉、吴季兰, 辐射研究与辐射工艺学报, 1990, 8(2), 75
- [3] 苏宗贤、曹瑾, 辐射研究与辐射工艺学报, 1986, 4(2), 49
- [4] Chapiro A. "Radiation Chemistry of polymeric systems", Interscience, New York, 1962

STUDY ON THE PHYSICAL ENTRAPPING OF GOD VIA PRE-IRRADIATION POLYMERIZATION AT ROOM TEMPERATURE

LIU Pengfei, HA Hongfei

(Department of Technical Physics, Peking University, Beijing, Post code: 100871)

ABSTRACT

Most of bioactive species such as enzyme and antibody will be damaged and lose part of their bioactivity when they are irradiated by ionizing radiation at room temperature. Low temperature could somewhat control the effect, so kaetsu and his co-workers developed an entrapping technique at low temperature (-78°C). On the other hand, some enzymes such as catalase and house radish peroxidase have so-called radiation-induced post-deactivation effect as well. In order to avoid the trouble in performance and loss of bioactivity, a physical entrapping of bioactive species via preirradiation polymerization at room temperature were developed in the Authors' lab. In this work we developed this technique. The glucose oxidase was entrapped in polyacrylamide hydrogel induced by pre-irradiation. Experiments under several different conditions such as absorbed dose and concentrations of enzymes, monomer and crosslinking agent were carried out. The results showed that this technique can be used extensively in various enzyme.

Key words Glucose oxidase, Acrylamide, Radiation polymerization, Physical entrapping