

# 尼龙管固定化肌酐亚胺水解酶的制备及其性能的研究

孙志敏 朱宏 陈长治 俞耀庭

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

本文研究了用水解法处理尼龙管内壁, 用戊二醛保护法将肌酐亚胺水解酶固定在尼龙-6管壁上的制备方法, 并对酶管反应器的使用性能进行了讨论。

## 材 料 和 方 法

### (一) 材料

1. 尼龙-6管材: 英国进口,  $\phi = 1\text{mm}$
2. 肌酐亚胺水解酶: Sigma公司产品, 酶活力为250units (1unit为在pH7.5, 37℃下每分钟水解1.0 $\mu\text{mol}$ 肌酐的酶量)。
3. 联苯胺: 分析纯, 崇明县裕西试剂厂。
4. 二环己基碳二亚胺: 上海化学试剂商店
5. 乙二醇胺: 分析纯, 北京化工厂。

### (二) 方法

1. 肌酐亚胺水解酶的活性测定: 采用Berthelot法<sup>[1]</sup>。

2. 肌酐亚胺水解酶在尼龙管上的固定化方法

(1) 尼龙管内壁的水解: 将长1m的尼龙管在45℃水浴中用18.6%氯化钙-18.6%甲醇-水溶液以3ml/min流速闭路循环洗涤30min, 再用3.65mol/L盐酸溶液灌注30min后立即将尼龙管浸于冰水浴中, 水洗至流出液呈中性。

(2) 羧基转化: 水解尼龙管依次用丙酮和二氯甲烷洗涤各5min, 在10℃下以1ml/min的流速闭路灌注0.1%联苯二胺-0.1%二环己基碳二亚胺/二氯甲烷溶液, 避光反应4h。

(3) 联戊二醛: 4℃下将克分子比为0.26的戊二醛与乙二醇胺在0.2mol/L, pH8.5的磷酸缓冲液中反应45min后通入尼龙管中闭路循环灌注3.5h, 水洗至中性, 用0.1mol/L HCl洗涤, 脱去乙二醇胺, 再用0.05mol/L, pH7.5的磷酸

缓冲液洗至流出液呈中性, 立即进行联酶反应。

(4) 联酶反应: 以每毫升含1mg酶的酶-磷酸缓冲液(pH7.5)在4℃下以0.25ml/min流速在尼龙管中闭路循环灌注过夜, 再用0.05mol/L的磷酸缓冲液洗涤至流出液中无游离酶蛋白, 即得到固定化酶尼龙管。

3. 酶管反应器活性测定方法: 酶管活性测定装置如图1所示。以含肌酐2-10mg/dl的肌酐-磷酸缓冲液从恒流泵的进样口A输入体系, 经D管预热后进入酶管E进行检测肌酐的酶反应, F处取样测酶活性。

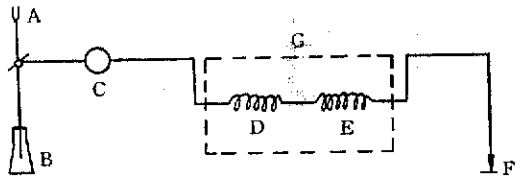


图1 酶管活性测定装置示意图

A. 进样槽 B. 缓冲液贮瓶 C. 恒流泵 D. 预热管 E. 酶管 F. 接收管 G. 恒温水浴

## 结果与讨论

### (一) 固定化方法对酶管活性的影响

尼龙管内壁活化方法的影响: 为增大尼龙管内壁的表面积, 增加其内表面的活性基团数, 参照Laidler<sup>[2]</sup>等人的方法对尼龙管内壁做了两步处理。

1. 尼龙管的水解前处理: 18.6%氯化钙-18.6%甲醇水溶液能溶解低分子量的聚己内酰胺及其非晶态结构部分。在45℃下用上述溶液洗涤尼龙管内壁, 洗涤液中有白色絮状沉淀, 尼龙管内壁表面由光滑变粗糙, 有蚀刻的纹路, 表明此

本文于1988年12月24日收到。

溶液对尼龙-6有一定的溶解能力，可以达到使其表面粗糙度增大，表面积增多的目的。

2. 保护戊二醛交联法固定化酶：因为戊二醛的两个醛基可以同时与尼龙管上的两个氨基作用发生交联反应，导致联酶量降低。本实验用

陈长治等<sup>[3]</sup>提出的保护戊二醛法将肌酐亚胺水解酶固定在经盐酸水解活化的尼龙管内壁上，固定化酶活性可保留67%；与未保护法比较，其固定化酶活性提高了26%（表1）。

(二) 温度对酶管活性的影响

表 1 保护戊二醛法与未保护法固定化酶比较

	固定化脲酶管		固定化肌酐亚胺水解酶管	
	保护法	未保护法	保护法	未保护法
进样底物浓度 (mg/ml)	1.00	1.00	7.68	7.68
消耗掉的底物的浓度 (mg/ml)	0.89	0.79	5.83	3.86

图 2 示出尼龙管固定化肌酐亚胺水解酶催化活性随温度变化关系，表明酶管的使用温度应在 18℃—40℃ 之间，选择应用温度为 37℃。

(三) 体系 pH 值对酶管活性的影响

在不同条件下的固定化肌酐亚胺水解酶与游离酶的活性见图 3，由图 3 看出，酸性条件对该

酶管的活性影响较大，选择 pH7.5—9.0 之间使用为宜。

(四) 尼龙管固定化肌酐亚胺水解酶的使用稳定性

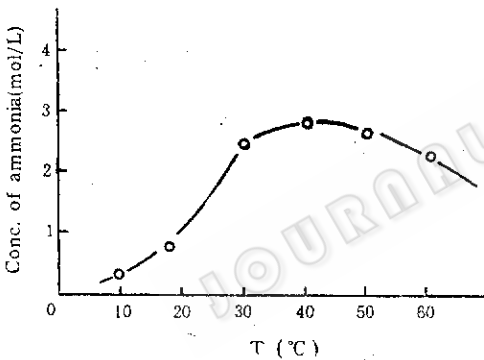


图 2 温度对酶管活性的影响

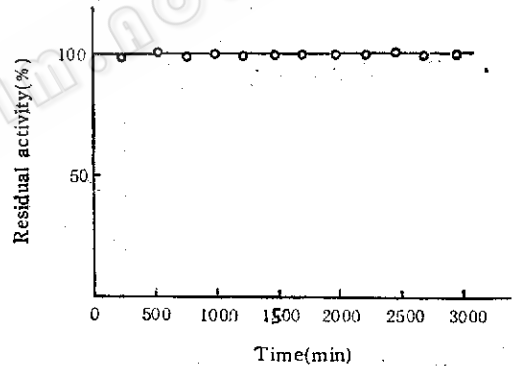


图 4 酶管的使用稳定性

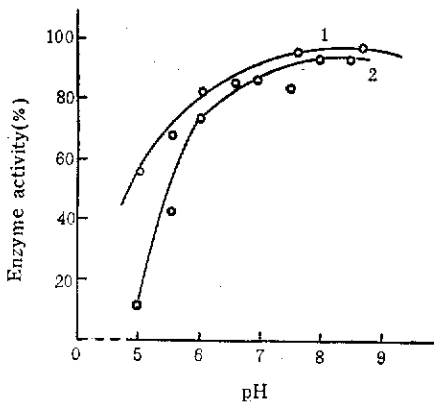


图 3 pH 对酶管活性的影响

1, 自然酶 2, 固定化酶

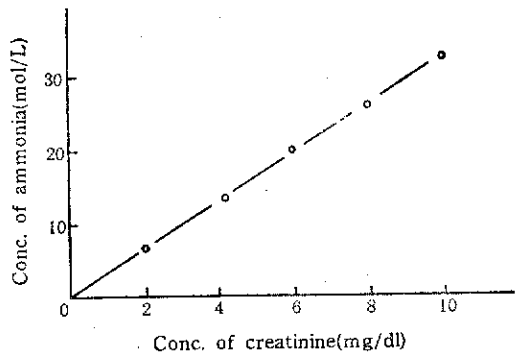


图 5 肌酐含量与酶管反应产氨量的关系

在37℃下将浓度为10mg/dl的肌酐-磷酸缓冲液以3.0ml/min的流速连续通过如图1所示的装置,底物溶液在1m长的酶管中滞留时间为1min,结果表明,以1min测定一次计算,固定化肌酐亚胺水解酶尼龙管可连续测定3000次,酶管活性基本保持不变(图4)。

### (五) 酶管临床检测肌酐的可行性

临床上检测肌酐的浓度范围是2—9mg/dl,用尼龙管固定化肌酐亚胺水解酶检测肌酐,在2—10mg/dl范围内,生成氨量与肌酐浓度呈线性关系(图5)。

## 参 考 文 献

- [1] Kihaka, K. et al., *Anal. Chim. Acta.*, 187: 31, 1986.  
 [2] Sundaram, P.V., *Biochem. J.*, 183: 445, 1979.  
 [3] 陈长治等: 生物工程学报, 2: 46, 1986.

# IMMOBILIZATION OF CREATININE IMINOHYDROLASE ON NYLON TUBE

Sun Zhimin Zhu Hong Chen Changzhi Yu Yaoting  
*(Institute for Molecular Biology, Nankai University)*

In this paper, creatinine Iminohydrolase was covalently attached onto the surface of nylon tube based on an improved glutaraldehyde-crosslinking method. The experiment results show that the immobilized enzyme reactor gives a linear response to the creatinine concentration over the range of 2—10 mg/dl, and its activity remains unchanged after over 3000 tests.

### Key words

Creatinine iminohydrolase, nylon tube, immobilization