

荧光素酶在PEG/盐系统中分配系数的研究

孙万儒

(中国科学院微生物研究所, 北京)

A. E. G. Cass

(英国帝国理工学院生物技术中心应用酶学实验室, 伦敦)

海洋发光细菌产生的荧光素酶在PEG/盐双水相系统中的分配系数(K)的对数值与PEG分子量成线性关系。低分子量PEG亲水性较强, 有利于酶分配于PEG上相中; 而高分子量PEG疏水性较强, 有利于酶分配在下相盐溶液中, PEG/三价盐与PEG/二价盐系统不同, 前者有一折点。

在使用单一分子量PEG组成的PEG/硫酸铵系统中, K值随系统中使用的硫酸铵浓度增加而增加, 硫酸铵达到一定浓度后, 其浓度继续增加对K值的增加影响减小; 但在两种不同分子量的PEG混合物组成的PEG/硫酸铵系统中, K值随硫酸铵浓度的增加有一最小值, 在此硫酸铵浓度之外, 增加或减小硫酸铵浓度, K值均会增加。在PEG/硫酸铵系统中, 荧光素酶的K值随系统的pH增加略有提高, 但变化不大。而在PEG/磷酸盐系统中, 在pH6.4时, K值最小, pH高或低于此值, K值均增加。系统的温度变化对K值影响很小。

关键词 荧光素酶; PEG/盐双水相系统; 分配系数

双水相系统是近十多年来在国际上迅速发展的一种分离技术, 它适合于多种生物材料的分离, 操作简便、省时, 对生物活性有稳定作用^[1-3]。海洋发光细菌产生的胞内荧光素酶有较广泛的用途^[4-7], 本文以此酶为材料, 研究它在PEG/盐双水相系统中的分配系数与相组成的基本因素之间的关系。

材料和方法

(一) 菌种

海洋发光细菌 *Beneckea harveyi*

(二) 试剂

葵醛、连二亚硫酸钠、FMN 和不同分子量的PEG(聚乙二醇)均为Sigma产品。其它试剂为市售分析纯商品。

(三) 菌体培养和收集

按Hastings, J.W. 等报道的方法进行^[8]。收集的菌体细胞于-30℃下保存。

(四) 酶的释放

称取一定量保存的菌体细胞, 加入少量的3%氯化钠溶液, 10℃下放置解冻, 然后加入10℃的50mmol/L, pH7.0的磷酸缓冲液, 使细胞浓度达到30%, 在冰浴中超声波破碎, 每次20s, 处理3-5次。

(五) 相系统制备

分别配制50%的PEG和硫酸铵浓溶液。按相系统总体积4ml, 以及相系统组成要求将一定量的PEG和硫酸铵浓溶液与一定量的细胞破碎物加入刻度试管中, 混合均匀, 于20℃下放置10h以上, 测定上下相体积, 以及上下相中的荧光素酶的活性。

(六) 荧光素酶活性测定

本文于1991年9月6日收到。

1. 按 15mg/ml 的量称取连二亚硫酸钠, 溶在 50mmol/L, pH7.0 的磷酸缓冲液中, 通氮气 15min, 待用。

2. 将 188 μ l 的葵醛溶在 1.0ml 的乙醇中。取上述溶液 0.1ml 加到 9.9ml 的 50mmol/L, pH7.0 的磷酸缓冲液中, 超声波处理 30s, 制成乳浊液。

3. 称取 8mg 的 FMN, 溶在 1.0ml 的 50mmol/L, pH7.0 的磷酸缓冲液中, 取 10 μ l 加到 990 μ l 的上述缓冲液中, 于 445nm 下测定光密度。若 $A_{445nm} = 1.22$, 即可使用。若低或高于此值, 用浓 FMN 溶液或缓冲液进行调整到上述规定值。

4. 取 470 μ l 50mmol/L, pH7.0 的磷酸缓冲液, 10 μ l 的 FMN 溶液, 10 μ l 连二亚硫酸钠溶液和 10 μ l 酶液加到测定管中, 混合均匀后放入发光测定仪的测定室内, 旋转至测定位, 用注射器快速注入 500 μ l 的葵醛溶液。在发光测定仪上读取最大发光强度。酶活性按每微升酶液催化发光反应时在发光测定仪上读到的毫伏数表示 (mV/ μ l)。

结果与讨论

(一) 盐的种类和 PEG 分子量对 K 值的影响

分别取分子量为 600, 1000, 1500, 2000, 3400, 4000 和 5000 的 PEG 与不同的盐, 按系统中 PEG 18%, 盐 18%, 破碎细胞物 15% 比例混合, 分相, 测定荧光素酶的分配系数 K, 结果如图 1。

在二价盐如硫酸盐, 琥珀酸盐和酒石酸盐与 PEG 形成的双水相系统中, $\log K$ 与 PEG 分子量之间成直线关系; 而在三价盐如磷酸盐和柠檬酸盐与 PEG 组成的相系统中, $\log K$ 与 PEG 分子量之间的线性关系中有一折点。此处使用的三价盐与

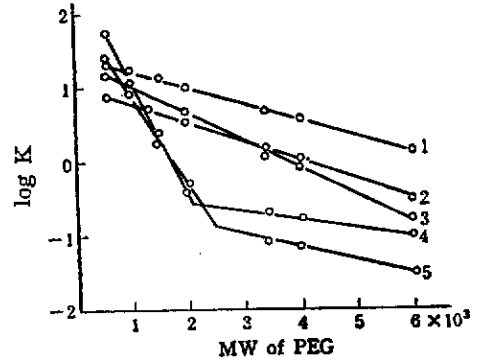


图 1 PEG 分子量和盐种类对 K 值的影响
Fig. 1 Relation between K of luciferase and MW of PEG in differential PEG/salt system

1. PEG/sulfate, 2. PEG/succinate,
3. PEG/tartrate, 4. PEG/phosphate,
5. PEG/citrate.

蛋白质之间的相互作用远强于二价盐, 分子量大于 2000 的 PEG 疏水性明显增加, 对三价盐与酶蛋白之间的相互作用的影响降低, 而使 K 值的变化减小。

(二) 盐的金属离子对 K 值的影响

使用含不同金属离子的硫酸盐与 FE G2000 (18%) 组成相系统, 测定荧光素酶在相关相系统中的 K 值, 结果列于表 1。

表 1 盐的金属离子对 K 值的影响
Table 1 Effect of cation in sulfate on K of luciferase in the PEG/sulfate system

Sulfate Conc. (mol/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄	MgSO ₄
	0.605	0.419	0.087
0.682	0.349	0.012	0.002
0.758	0.280	0.007	0.003

在使用相同浓度的不同硫酸盐时, 对降低 K 值有 $Mg^{2+} > Na^+ > NH_4^+$ 的顺序。说明金属离子对 K 值也有重要影响, 金属离子的价数对界面电位的作用可能不低于其浓度的影响。对降低 K 值更有效。

(三) PEG 分子量和浓度对 K 值的影响

浓度分别为15%和18%的分子量不同的 PEG 与浓度分别为14%和16%的硫酸铵及15%细胞破碎物混合、分相、测定酶的K值，结果示于图2。由图2看出低分

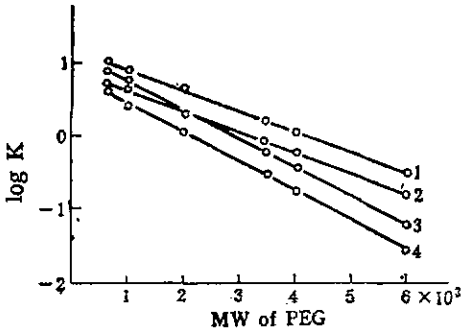


图2 PEG分子量、浓度及硫酸铵浓度与K值的关系
Fig.2 Influence of MW and concentration of PEG and concentration of ammonium sulfate on K of luciferase in the PEG/ammonium sulfate system
Concentration of PEG/(NH₄)₂SO₄(%):
1. 18/16, 2. 15/16, 3. 18/14, 4. 15/14

子量 PEG 具有较高亲水性，有利于酶分配在富含PEG的上相中；随着 PEG 分子量增加，其疏水性增加，有利于酶分配在富含硫酸铵的下相。在 PEG 分子量和浓度相同情况下，随硫酸铵浓度增加，因盐析作用加强而使K值增加。

(四) PEG和硫酸铵浓度对K值的作用

分别按 18%、15%、12%、10% 和 8% 的 PEG1000 和不同浓度的硫酸铵与 15%的细胞破碎物组成相系统，分相后测定荧光素酶的K值，结果如图3。在任何 PEG 浓度下，提高硫酸铵浓度可增加 K 值。但较高浓度时其作用明显降低。使用其它分子量的 PEG 也有相似结果。为提高K值。可采用增加系统中PEG或硫酸铵浓度的方法，但前者不如后者更有效。

(五) 两种不同分子量的 PEG 混合比例对K值的影响

分别将PEG4000 与 PEG1000, PE-

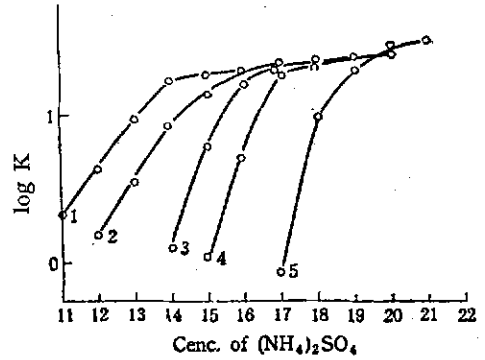


图3 相系统中PEG和硫酸铵浓度对K值的影响
Fig.3 Dependence of K on the concentration of PEG and ammonium sulfate in the PEG/(NH₄)₂SO₄ system
Concentration of PEG in the system:
1. 18%, 2. 15%, 3. 12%, 4. 10%, 5. 8%.

G4000与PEG1500, PEG6000与PEG1000 和PEG6000与PEG1500 按不同比例混合，使相系统中PEG总浓度为 15%，硫酸铵浓度为14%或12%，细胞破碎物浓度为 15%组成相系统，测定K值变化，结果如图4所示。

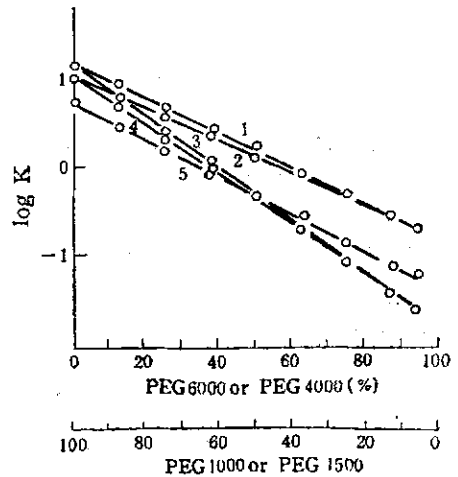


图4 两种不同分子量的PEG混合比例对K值的影响
Fig.4 Dependence of K of luciferase on the ratio of PEG with differential MW in the phase system
15% PEG and 14% or 12% (NH₄)₂SO₄ in the phase system
1. PEG4000 + PEG1000, 2. PEG4000 + PEG1500, 3. PEG6000 + PEG1000, 4. PEG6000 + PEG1500, 5. PEG6000 + PEG1500 (12% (NH₄)₂SO₄)

在相系统中，增加高分子量 PEG 的比例，会使K 值降低，分子量越大对降低K 值越有效。反之，要提高K 值，可使用更小分子量的PEG，或增加其比例。

(六) 在两种不同分子量PEG混合的系统中硫酸铵浓度对K 值的影响

保持相系统中的PEG 总浓度为15%，改变PEG6000和 PEG 1500的比例及硫酸铵浓度，其对K 值的影响如图 5。

在上述情况下，随着系统中硫酸铵浓度增加，K 有一最小值。而增加相系统中的PEG6000比例(减小PEG1500 的比例)，logK-硫酸铵浓度曲线几乎平行地向低 K 值方向移动。

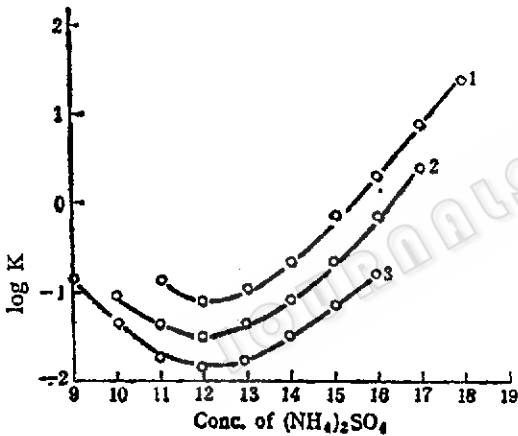


图 5 在PEG1500和PEG6000的不同混合比例的系统中硫酸铵对K值的影响

Fig.5 Effect of concentration of $(NH_4)_2SO_4$ on K of luciferase in the phase system with differential ratio of PEG1500 and PEG6000

- The phase system 1. PEG1500(60%) + PEG6000(40%),
 2. PEG1500(47%) + PEG6000(53%),
 3. PEG1500(33%) + PEG6000(67%).

The total concentration of PEG in the system:16%.

(七) 在两种不同分子量PEG的混合比例恒定时，PEG总浓度和硫酸铵浓度对K值的作用

图 6 为在PEG1000为60%，PEG6000为40%的相系统中 PEG 总浓度和硫酸铵浓度对K值的影响。在每个 PEG 总浓度下，随着硫酸铵浓度增加K有一最小值，随着 PEG 总浓度降低曲线向高硫酸铵浓度方向移动，最低K 值也略有下降。与图 3 结果比较，在单一分子量 PEG 系统中无此现象。这说明PEG分子量的分布是影响K值的重要因素之一。

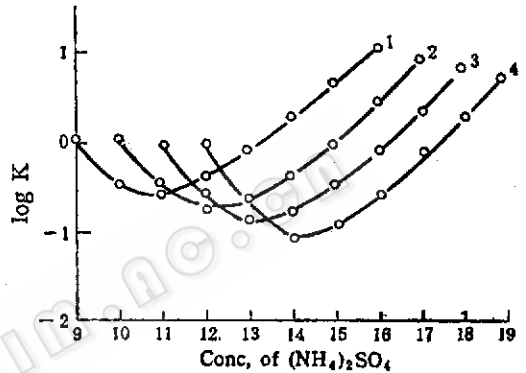


图 6 在PEG1000和PEG6000 比例恒定条件下K值与PEG总浓度及硫酸铵浓度的关系

Fig.6 Dependence of log K on the total concentration of PEG and the concentration of ammonium sulfate in the phase system with constant ratio of PEG1000 and PEG6000

The total concentration of PEG1000 and PEG6000 in the phase system:
 1. 18%, 2. 15%, 3. 12%, 4. 10%.

(八) 相系统中细胞破碎物含量对K 值的影响

保持PEG1000/ $(NH_4)_2SO_4$ 和 PEG1500/ $(NH_4)_2SO_4$ 系统中各组分浓度均为15%，改变系统中细胞破碎物的含量，测定荧光素酶的K值。结果如图 7。

在以上相系统中，细胞破碎物含量为30%时K值最大，在PEG1000系统中最大K值比PEG1500系统约高一倍。

(九) 相系统的pH对K值的影响

按相系统各组分为15%的要求将PEG1000或PEG1500分别与用氨水调到不同

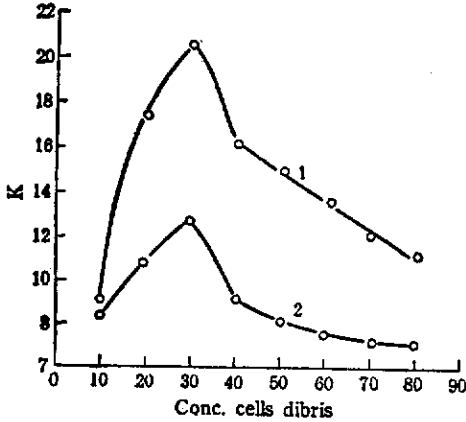


图 7 相系统中细胞破碎物含量对 K 值的影响
Fig.7 Dependence of K on the content of cell debris in the PEG1500 and PEG1000/(NH₄)₂SO₄ system. The phase system: 1. PEG1000; 2. PEG1500.

pH 的硫酸铵溶液或用磷酸盐调配的不同 pH 的磷酸钠溶液，以及细胞破碎物组成相系统，分相后测定 K 值，结果示于图 8。

在 PEG/(NH₄)₂SO₄ 系统中 pH 变化对 K 值影响不大，可认为硫酸铵的解离程度及酶分子电荷变化对 K 值影响较小。硫

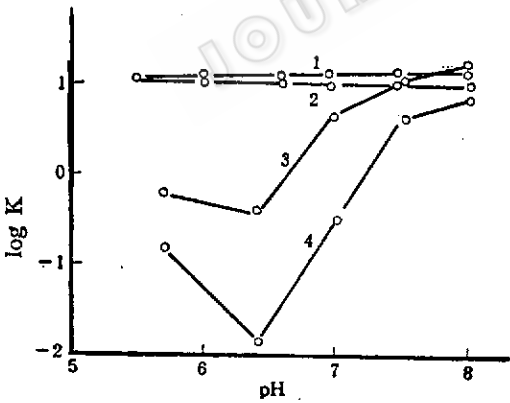


图 8 在 PEG/(NH₄)₂SO₄ 和 PEG/磷酸盐系统中 pH 对 K 值的影响
Fig.8 Influence of pH of the phase system on K of luciferase in the PEG/(NH₄)₂SO₄ and PEG/Na₂HPO₄ system
The phase system:
1. PEG1000/(NH₄)₂SO₄;
2. PEG1500/(NH₄)₂SO₄;
3. PEG1000/Na₂HPO₄;
4. PEG1500/Na₂HPO₄.

酸铵浓度增加，其盐析作用增加，是影响荧光素酶 K 变化的主要因素。而在 PEG/磷酸盐系统中，K 值与系统 pH 密切相关，在 pH 6.4 时 K 值最小。在不同 pH 下，酶所带电荷性质和数量不同，另外磷酸盐的解离方式，及所带电荷数不同，HPO₄²⁻，H₂PO₄⁻ 以及 PO₄³⁻ 在两相中分配系统不同，直接影响两相界面电位及其与 PEG 之间的相互作用，因而引起 K 值的明显变化。

(十) 温度对 K 值的影响

分别用 PEG1000 或 PEG1500 (15%) 与不同浓度的硫酸铵及细胞破碎物 (15%) 组成相系统，在 4° 和 22°C 下放置 10h 以上，分相测定 K 值，结果如图 9。

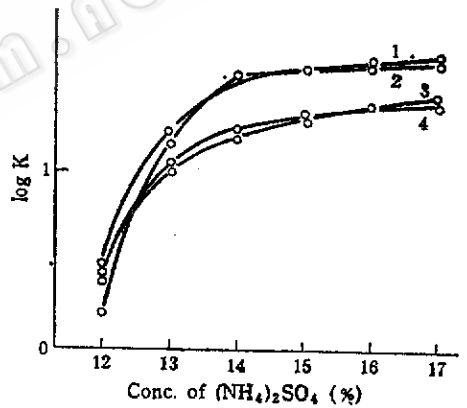


图 9 温度对 K 值的影响
Fig.9 Effect of temperature on K of luciferase in the PEG/(NH₄)₂SO₄ system
1. PEG1500 4°C, 2. PEG1000 22°C,
3. PEG1000 4°C, 4. PEG1500 22°C.

在 4° 和 22°C 下进行相分离，测得的 K 值无明显变化，说明温度对荧光素酶的分配影响很小，也说明 PEG/(NH₄)₂SO₄ 系统对荧光素酶的稳定性有保护作用。

以上结果可看出在 PEG/(NH₄)₂SO₄ 系统影响 K 值的因素较简单。因此这个相系统比较适合于双水相萃取的基础研究。

参 考 文 献

- [1] Kula, M. R., et al.: *Adv. Biochem. Engin.*, Vol 24, Ed. by Fiechter, A., Springer-Verlag, Berlin, pp.74-117, 1982.
- [2] Mattiasson, B. and Torbjorn, G. J. Ling: *Separations for Biotechnology*, Ed. by Verrall, M. S. and Hudson, M. J., Ellis Horwood Limited, London, pp. 270-292, 1987.
- [3] Hustedt, H., et al.: *Process Biochem.*, 23:129-37, 1988.
- [4] Larry, K.J.: *Anal. Biochem.*, 175(1):14-21, 1988.
- [5] Vgarova, N. N., et al.: *Anal. Biochem.*, 173(2):221-227, 1988.
- [6] Hastings, J. W., et al.: *Adv. Microb. Physiol.*, 26:239-291, 1985.
- [7] Kricka, L. J. and Stanley, P. E.: *J. Biolumin. Chemilumin.*, 1(3):189-199, 1987.

The Partition Coefficient of Luciferase from Photobacteria in the PEG/salt Two Aqueous Phase System

Sun Wanru

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

A.E.G. Cass

(*Centre for Biotechnology, Imperial College of Science and Technology, London, SW7 2AZ*)

The relationship between the logarithmic partition coefficient(K) of luciferase of photobacteria and PEG MW in the PEG/salt two aqueous phase system shown a linear function. Hydrophilic PEG with low MW facilitated the partition of luciferase into the top PEG-riching phase and give a higher K value, while the high MW one, due to its hydrophobic characterstic, made the enzyme partition more into the bottom salt-riching phase, and a lower K value. In the PEG/trivalent salt system, such as phosphate and citrate, there is a turn-point on the linear relation between the log K and the PEG MW, but it is never appeared if a divalent salt such as sulfate, succinate or tartrate is used in the system.

If the system was compased of PEG with homogenous MW and ammonium sulfate, the K value would be increased with the increment of the salt concentration, but after the salt concentration had reached at certain level, the K value would not be influenced. If two kind of PEGs with different MW were used in this system a minimal K value would be appeared at a certain ammonium sulfate concentration, and the K value would be raised when the salt concentration was either increased or decreased.

Neither the proportion of the two kind of PEGs nor their total con-

centration used in the system would pose any impact on the above patterns, although the K value would have a corresponding change.

In PEG/ammonium sulfate system, the K value was slightly increased with the increase of the system pH, while in the PEG/phosphate system, a minimal K value appears at pH 6.4 and it would go up when the system pH was either increased or decreased. The effect of system temperature on K value was very slight.

Key words

Luciferase; two aqueous phase system; partition coefficient

JOURNALS.IM.AC.CN