

# 木瓜蛋白酶交联琼脂糖N-羟基琥珀酰亚胺酯共价偶联

韩沾元 曹慧敏\*

(中国科学院上海生理研究所, 上海)

马建国

(中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂, 上海)

本文介绍环氧氯丙烷活化琼脂糖, 偶联甘氨酸, 制备其N-羟基琥珀酰亚胺酯; 以及木瓜蛋白酶与此活化酯偶联方法和此固定化酶的某些性质。

## 材料和方法

### (一) 材料

1. 珠状琼脂糖 6%: 60—120目, 中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂出品。
2. 2,2'-联吡啶二硫化物按照Drawings和Gavin方法, 从2-氨基吡啶合成, m.p.56—58℃。
3. 木瓜蛋白酶: 部分参照 Bookleurst 方法<sup>[1]</sup>, 从干木瓜粉制备, 酶活力30u/mg蛋白, 含0.7 $\mu$ mol SH/ $\mu$ mol酶。

### (二) 方法

1. 蛋白质测定: 木瓜蛋白酶按  $\epsilon_{280} = 5.6 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$  <sup>[1]</sup> 测定。
2. 木瓜蛋白酶和固定化木瓜蛋白酶活力测定<sup>[2,3]</sup>: 木瓜蛋白酶活力测定在25℃, pH6.2。固定化木瓜蛋白酶活力测定在30℃, pH8.2。酶反应液中各组分与Axen<sup>[2]</sup>相同。酶活力计算按文献<sup>[4]</sup>。
3. 珠状琼脂糖6%的活化, 交联及其N-羟基琥珀酰亚胺酯的制备: 27g珠状琼脂糖6% (湿重), 加90ml 1.0mol/L NaOH和54mg硼氢化钾, 搅拌滴加27ml 环氧氯丙烷, 于60℃水浴搅拌2—3h, 过滤洗除未反应的环氧氯丙烷, 倾入70ml 0.5mol/L 甘氨酸 (pH13—14), 70℃搅

拌4—5h, 放置过夜, 过滤洗除未偶联的甘氨酸, 依次用甲醇和无水二氧六环洗涤, 加入22.5ml 0.2mol/L N-羟基琥珀酰亚胺和 22.5ml 0.2mol/L 二环己基碳二亚胺 (两者均用无水二氧六环配制), 搅拌2h, 用无水二氧六环洗除二环己胺, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>真空干燥, 约得650mg 交联珠状琼脂糖N-羟基琥珀酰亚胺酯。

4. 木瓜蛋白酶活性中心必需基团——巯基的处理, 和制成固定化酶后, 2-硫代吡啶基的拆除: 50ml木瓜蛋白酶 (4.6mg/ml, 0.7 $\mu$ mol SH/ $\mu$ mol酶), 加入13ml 1.5mmol/L 2,2'-联吡啶二硫化物, 室温放置30min, 于4—6℃对1mmol/L EDTA透析, 至外透液A<sub>343nm</sub> < 0.05, 得62ml 用2-硫代吡啶基封闭酶游离巯基的木瓜蛋白酶抑制剂。

酶与交联珠状琼脂糖N-羟基琥珀酰亚胺酯偶联完毕后, 置于砂芯漏斗中过滤, 并依次用冰冷重蒸水, 0.1mol/L pH6—7 磷酸缓冲液和 1mmol/L EDTA 洗除未偶联蛋白, 将固定化酶悬浮于5—10倍体积30—40mmol/L 巯基乙醇 (或 10mmol/L 二巯基苏糖醇) 中, 4—8℃, 30—40min, 砂芯漏斗过滤, 用上述方法洗除过量的巯基乙醇, 冷冻干燥。

## 结果与讨论

### (一) 酶的固定化条件

1. 酶的固定化及其活性中心必需基团——

本文于1988年10月7日收到。

\* 华东化工学院生化专业1987毕业生。

巯基的影响:将木瓜蛋白酶与交联珠状琼脂糖 N-羟基琥珀酰亚胺酯于 4℃ 搅拌偶联 24—48h,

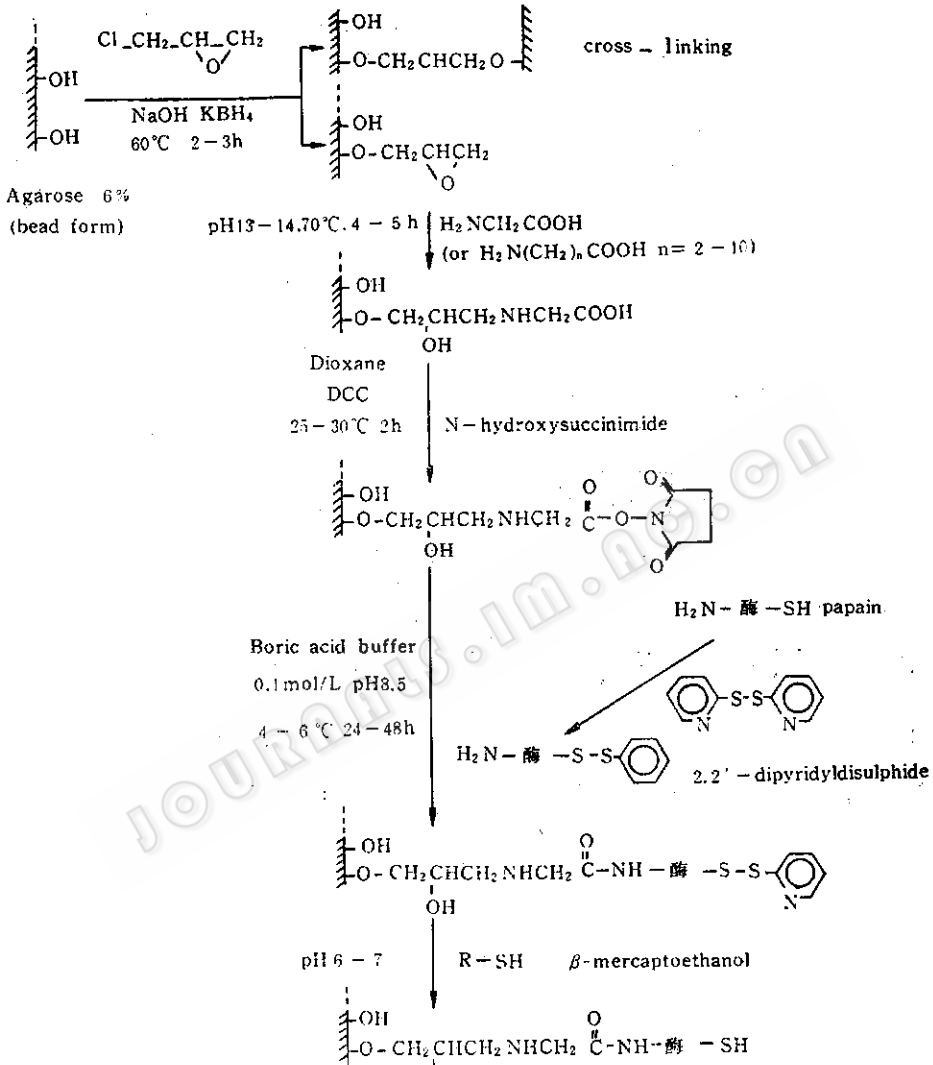


图 1 交联琼脂糖N-羟基琥珀酰亚胺酯制备及其对木瓜蛋白酶共价偶联  
Fig.1 The preparation of N-hydroxysuccinimide ester of crosslinked agarose and its covalent coupling with papain

2. pH的影响:结果见图 2。偶联最适 pH 为 8.5,如在 pH 7—7.5 偶联,固定化酶活力下降 30—40%。

3. 间隔臂长度的影响:结果见表 1。

4. 缩合剂的影响:分别用 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(简称 EDC)和二乙基碳二亚胺(简称 DCC)制备交联琼脂糖

N-羟基琥珀酰亚胺酯,在相同条件下各自分别与木瓜蛋白酶偶联结果如表 2。

### (二) 固定化酶的性质

1. 酶反应最适 pH:见图 3。固定化木瓜蛋白酶作用的最适 pH 为 8.2。

2. 酶反应最适温度:结果如图 4。固定化酶反应最适温度为 60℃,比自然酶高 5℃。

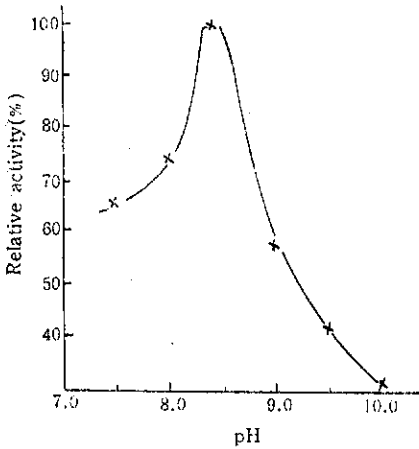


图 2 pH对木瓜蛋白酶固定化的影响

Fig.2 Effect of PH on the immobilization of papain

表 1 间隔臂长度对固定化木瓜蛋白酶活力影响  
Table 1 Effect of the length of spacer arm on the activity of immobilized papain

间隔臂中n的数目 n, number of (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> in spacer-arm	固定化木瓜蛋白酶 Immobilized papain	
	活力 Activity (u/g)	偶联蛋白量 Coupled protein (mg/g)
1	444	14.6
3	310	13.4
5	230	29.4

3. 米氏常数和最大反应速度: 以不同浓度BAEE为底物, 分别测定固定化酶和自然酶反应速度, 按双倒数法作图, 结果如图5。自然酶的K<sub>m</sub>为9.1mmol/L, V<sub>max</sub>为0.248mmol/L/min, 固定化酶分别为7.0mmol/L和0.746mmol/L/min。

表 2 DCC和EDC对木瓜蛋白酶固定化影响  
Table 2 Effect of DCC and EDC on immobilization of papain

缩合剂 Condensing reagent	加入木瓜蛋白酶量 Amount of added papain (u)	固定化木瓜蛋白酶 (冷冻干燥) Immobilized papain (lyophilized)			
		总重 Total weight (mg)	总活力 Total activity (u)	活力 Activity (u/g)	偶联蛋白量 Coupled protein (mg/g)
DCC	94	61	27	437	14.6
EDC	94	60	61	1020	44.6

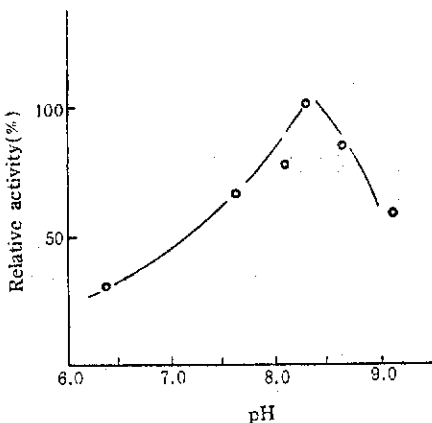


图 3 pH对固定化木瓜蛋白酶活力影响

Fig.3 Effect of pH on the activity of immobilized papain

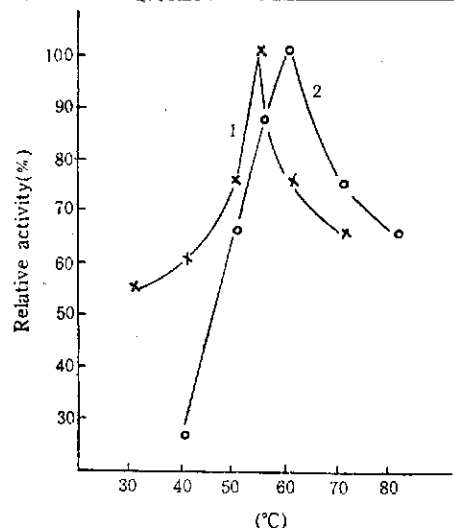


图 4 温度对酶活力影响

Fig. 4 Effect of temperature on enzyme activity

1. 自然酶 Free enzyme
2. 固定化酶 Immobilized enzyme

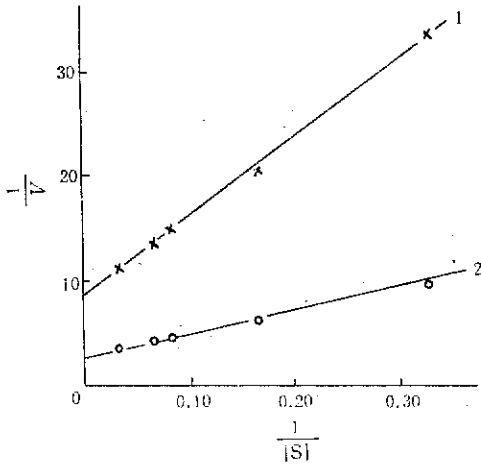


图 5 自然酶和固定化酶的 Lineweaver-Buck 图

Fig.5 Lineweaver-Buck plots of free and immobilized enzyme

- 1. 自然酶 Free enzyme
- 2. 固定化酶 Immobilized enzyme

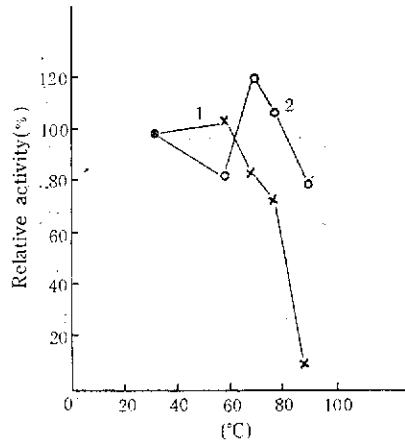


图 6 热稳定性

Fig.6 Thermal stability

- 1. 自然酶 Free enzyme
- 2. 固定化酶 Immobilized enzyme

4. 酶的稳定性：酶的热稳定性结果见图

0.01mol/L 醋酸缓冲液（含0.01%百里酚）中，均置于4—6℃冰箱中保存，稳定性见表3。

6. 固定化酶冷冻干燥，自然酶悬浮于pH5.0、

表 3 固定化木瓜蛋白酶和木瓜蛋白酶贮存稳定性  
Table 3 Storage stability of immobilized papain and papain

贮存期 (月) Storage time (months)	0	1	7	36
固定化木瓜蛋白酶活力 Immobilized papain activity	100	99	78	50
木瓜蛋白酶活力 Papain activity	100	40		

参 考 文 献

[1] Broeklehurst, K. et al.: *Biochem, J.*, 133:573—584, 1973.  
 [2] Axen, R. and Ernback, S.: *Eur. J. Biochem.*, 18:351—360, 1971.  
 [3] 蒋传葵等：工具酶活力测定，上海科学技术出版社，p.112—114, 154, 1984.  
 [4] 张树政等：酶制剂工业（上册），科学出版社，p.288—289, 351—360, 1984.

COVALENT COUPLING OF PAPAIN AND N-HYDROXYSUCCINIMIDE ESTERS OF CROSS-LINKING AGAROSE

Han Zhanyuan Cao Huimin

(Shanghai Institute of Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

Ma Jianguo

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)

This paper presents a method to prepare N-hydroxysuccinimide esters of cross-linking agarose beads by covalent coupling with papain through the stable

O-C, C-C and N-C bonds of spacer-arm and certain properties of the immobilized papain. Coupling was carried out after treatment of papain by 2,2'-dipyridyldisulfide. The activity of immobilized papain was increased about 60%. The optimal pH of coupling is 8.5. The effect of the length of spacer arm and the condensing agents on the activity of the immobilized papain was investigated. The activity of immobilized papain with  $\alpha$ -N-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) as substrate was tested to be 400—1020u/g immobilized enzyme. Recovery of papain activity was 30—65%. The optimal pH and optimal temperature of immobilized papain were 8.2 and 60°C respectively.  $K_m$  is  $7.0 \times 10^{-3}$  mol/L. The activity of immobilized papain was 50% after storage at 4°C for three years.

#### Key words

Immobilized papain; N-hydroxysuccinimide esters of agarose