

共价法固定化胰蛋白酶的研究

徐俊 祁俊 袁中一

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200231)

本文以Sephacryl-4B及其衍生物作为载体,用重氮、三聚氯氰、戊二醛、异硫氰酸酯、水溶性碳二亚胺、环氧等方法研究了胰蛋白酶的共价固定化,测定了这些方法的固定化酶蛋白回收、固定化酶活力回收和固定化酶的相对比活力。实验结果表明前三种方法效果较好,蛋白回收分别为59%、93%和28%;活力回收为53%、38%和20%,考察了这三种固定化胰蛋白酶的最适温度、最适pH、表观米氏常数和在工作稳定性。此外,本文对上述三种不同的固定化方法引起酶对大分子底物(偶氮酪蛋白)和小分子底物(BAPNA)的活力的影响也作了初步的探讨。

关键词 共价法; 琼脂糖凝胶; 固定化胰蛋白酶

胰蛋白酶是专一作用于碱性氨基酸连接键的蛋白水解酶,它在蛋白质的序列分析、多肽的酶促合成以及亲和吸附分离方面已有了较广泛的应用^[1,2]。本文以Sephacryl-4B及其衍生物作为载体,采用7种共价方法制备固定化胰蛋白酶,对其固定化蛋白回收、活力回收以及相对活力等方面进行了分析比较,对其中3种效果较好的固定化酶进行了酶学性质的研究。

材料和方法

(一) 材料

牛胰蛋白酶、苯甲酰-L-精氨酸-对硝基苯胺盐酸盐(BAPNA)、偶氮酪蛋白是上海东风生化试剂厂产品; Sephacryl、Sephacryl-CL4B购自 Pharmacia Fine Chemicals; 三聚氯氰、对-β-硫酸酯乙砜基苯胺(SESAs)系上海染化八厂产品; 25%戊二醛、N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)购自E. Merck Co.。752紫外光栅分光光度计由上海第

三分析仪器厂生产。

(二) 方法

1. 固定化酶制备方法

(1) 环氧法: 称取10g(指用砂芯漏斗抽干,以下均同)Sephacryl-4B,加入10ml 1 mol/L NaOH,1 ml环氧氯丙烷,搅拌下逐渐升温至60℃,保温反应2h,用大量水洗,得到联有环氧活性基团的活性载体。2g此载体加入4ml 0.5mg/ml胰蛋白酶溶液(pH8.0巴比妥缓冲液,含CaCl₂ 1mg/ml), 6℃下搅动过夜。用0.5mol/L NaCl洗涤数次,得到固定化酶,贮存在4℃的0.05mol/L, pH8.0的Tris缓冲液(含CaCl₂ 1mg/ml)。

(2) 戊二醛法: 5g含环氧基活化载体(来自方法1),加5ml水,0.5ml氨水,搅拌下升温至60℃,保温反应2h,用大量水洗,得到连有氨基的Sephacryl载体。将2g NH₂-Sephacryl加入预先混匀的1ml 25%戊二醛和3ml 0.2mol/L磷酸缓冲液pH7.5,搅拌4h。用大量水洗,加入4ml酶液,6℃下搅拌过夜。以下洗涤

本文于1991年5月28日收到。

贮存等步骤同 1。

(3) 氯三嗪法^[3]: 2g Sepharose-4B, 在 0°C 下加入 2ml 0.1mol/L NaOH, 搅拌 15min, 加入 1g 三聚氯氰(溶于 20ml 丙酮中), 不断滴加 10% Na₂CO₃ 维持 pH 7—8, 反应 1h。用丙酮、水洗, 加入 4ml 酶液, 6°C 下搅动过夜。其他步骤同 1。

(4) 重氮法: 按我们以前报道的方法^[4]制备的 2g 对氨基苯砒乙基(ABSE)-Sepharose-CL4B(ABSE-Sepharose), 0°C 下加入 5ml 水, 1mol/L HCl 1ml, 滴加入 1ml 5% NaNO₂, 搅拌反应 15min, 用冰水洗, 加入 4ml 酶液, 6°C 下搅拌过夜。其他步骤同 1。

(5) 水溶性碳二亚胺 /COOH-Sepharose: 10g 环氧活的 Sepharose(由(1)得), 加 50ml 水和 2g 甘氨酸, 用 1mol/L NaOH 调节 pH 至 12, 60°C 搅拌反应 2h。水洗, 得带有 COOH 基的 Sepharose。2g COOH-Sepharose 中加入 4ml 0.1mol/L EDC(调节至 pH 4—5), 搅拌反应 4h。用水洗, 加入 4ml 酶液, 6°C 下搅动过夜。其他步骤同 1。

(6) 水溶性碳二亚胺/NH₂-Sepharose: 2g NH₂-Sepharose, 加入 4ml 酶液和 80mg EDC, 调节 pH 至 4, 6°C 下搅动过夜。其他步骤同 1。

(7) 异硫氰酸酯法^[5]: 2g ABSE-Sepharose, 用无水乙醇洗, DMF 洗, 然后悬于 10ml DMF, 加入 0.2g 碳二亚胺(DCC), 2ml CS₂, 搅拌反应 4h。用无水乙醇洗, 水洗, 加 4ml 酶液搅动过夜。其他步骤同 1。

(三) 酶活力测定

1. BAPNA 为底物^[6]: 3ml 0.05 mol/L pH8.0 的 Tris 缓冲液(含 1mg/ml CaCl₂)中, 加入一定量的胰蛋白酶, 37°C 下预热 5min, 加入 10μl BAPNA 的 DMSO

溶液(1ml DMSO 中含 100mg BAPNA), 保温反应 10min。加入 33% 醋酸 0.2ml 终止反应, 测定 405nm 处的光密度值。酶活力定义为: 在上述条件下, 每分钟引起 OD₄₀₅ 变化 0.01 的酶量为一个活力单位。本实验中除特别说明外, 酶活力测定都是按本方法进行的。

2. 偶氮酪蛋白为底物^[7]: 2ml 0.05 mol/L pH8.0 的 Tris 缓冲液(含 1mg/ml CaCl₂)中, 加入一定量的胰蛋白酶, 37°C 下预热 5min, 加入 1ml 1% 偶氮酪蛋白溶液, 37°C 保温反应 10min。加 3ml 10% 三氯醋酸终止反应。高速离心, 取上清液测定 340nm 处的光密度值。

3. 固定化酶的活力测定: 方法基本同游离酶, 只是在酶反应时保持搅拌状态, 使混合均匀。

4. 蛋白测定: 按 Lowry 方法^[8]。固定化酶的蛋白量为固定化时加入的酶蛋白量和固定化后上清液中蛋白量的差值。

结果与讨论

(一) 胰蛋白酶固定化方法的比较

表 1 固定化胰蛋白酶蛋白回收、活力回收及相对活力
Table 1 Immobilization of trypsin and recoveries of protein and activity

Immobilization procedure	Recovery of protein (%)	Recovery of activity (%)	Relative activity (%)
Epoxide	22	2	9
Diazotization	59	53	90
Glutaraldehyde	54	20	37
Chlorotriazine	93	38	41
Isothiocyanate	25	4	16
WSC(NH ₂ -Sepharose)	32	0	0
WSC(COOH-Sepharose)	10	2	2

从表 1 所列的 7 种方法中, 我们可以看出重氮法、氯三嗪法和戊二醛法对于胰蛋白酶的固定化效果较好。特别是重氮法,

固定化酶的相对比活力可高达90%，说明此共价方法对酶活力的影响甚小。一般说来重氮基团主要和组氨酸的咪唑基和酪氨酸的苯酚环偶联，而苯酚环的反应活性比咪唑基的要稍高些^[9]。牛胰蛋白酶含有10个酪氨酸和3个组氨酸，其中46位组氨酸是该酶的活性中心基团之一^[10]。从本实验结果可以推测载体上的重氮基团主要作用于酶的酪氨酸残基的苯酚环上，此一修饰显然对酶活力无大影响。

pH的关系

从图1可以看出胰蛋白酶经各种载体固定化后，活力的最适温度都发生了不同程度的改变。与此相似，固定化酶的pH-活力曲线(见图2)显示出：戊二醛和氯三嗪法制得的固定化酶最适pH从溶液酶的8升至9左右，而重氮法所引起的变化相对较小。这二个实验结果推测可能也是由于不同的共价方法结合酶蛋白上不同的基团所造成的。

(二) 固定化胰蛋白酶活力和温度、

(三) 固定化酶的稳定性

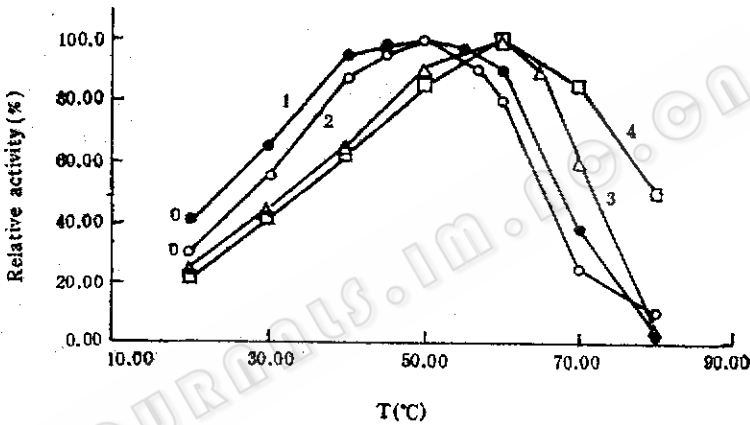


图 1 固定化胰蛋白酶的温度-活力关系

Fig.1 The temperature-activity profiles of immobilized trypsin
 1. IME via diazotization, 2. Native enzyme
 3. IME via glutaraldehyde, 4. IME via chlorotriazine
 IME: Immobilized enzyme

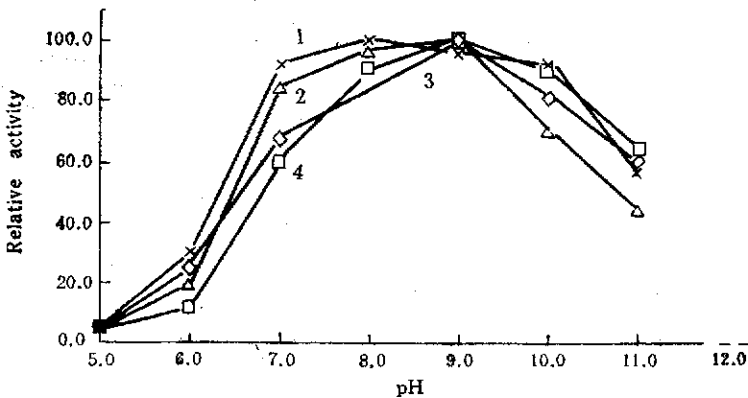


图 2 固定化胰蛋白酶的pH-活力关系

Fig.2 The pH-activity profiles of immobilized trypsin
 Legend is as in Fig.1

表 2 固定化酶的工作稳定性
Table 2 The operation stability of immobilized trypsin

Batches	Remaining activity(%)		
	Glutaraldehyde	Diazotization	Chlorotriazine
1	100	100	100
2	97	89	86
3	100	96	90
4	105	91	85
5	96	91	91
6	106	91	90
7	106	94	87
8	94	96	83
9	99	88	73
10	103	93	77
11	N.D.*	90	75

* no detection

取一定量的固定化酶放入砂芯漏斗中,加入9ml Tris缓冲液(0.05mol/L, pH8.0,含CaCl₂ 1mg/ml),37℃预热,加入30μl BAPNA的DMSO溶液,搅拌反应10min。抽滤,滤液加0.6ml 33%醋酸终止反应,测量OD₄₀₅nm。固定化酶用0.5mol/L NaCl和水洗涤,反复进行上述测定。固定化酶的活力变化情况列于表2。

(四) 固定化酶的表现米氏常数

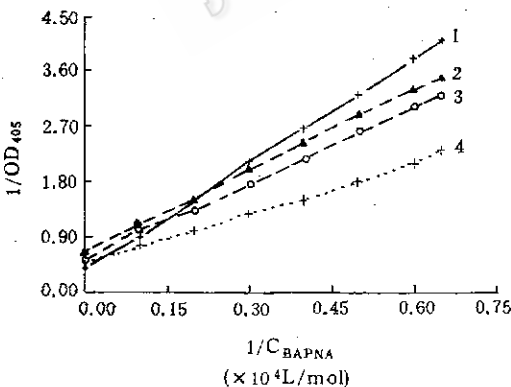


图 3 固定化胰蛋白酶的双倒数法作图
Fig.3 Lineweaver-Burk plots of immobilized and free trypsin

1. Native enzyme
 2. IME via glutaraldehyde
 3. IME via diazotization
 4. IME via chlorotriazine
- IME: Immobilized enzyme

在前述实验条件下用双倒数测得游离胰蛋白酶的 K_m 为 1.7×10^{-3} mol/L,而由戊二醛法、重氮法和氯三嗪法制得的固定化胰蛋白酶的表现米氏常数分别为 6.7×10^{-4} , 7.7×10^{-4} 和 5.4×10^{-4} mol/L,均小于游离酶的 K_m 值。 K_m 值一般反映了底物和酶之间的亲和力,说明这三种固定化酶对底物的亲和力均大于游离酶对底物的亲和力。这可能是因为固定化使酶分子的电荷量和分布发生了变化,有利于酶-底物复合物的形成及进一步的变化,也可能反映了载体对底物 BAPNA 有富集作用,而造成固定化酶邻近区域底物的局部浓缩而使表现米氏常数减小。

(五) 固定化对酶水解大分子底物的影响

由表 3 可知在相同小分子底物活力的情况下,3种固定化酶对大分子偶氮酪蛋白的催化活力分别是游离酶的35%(戊二醛法)、21%(重氮法)和68%(氯三嗪法)。这反映了胰蛋白酶经固定化后对大分子底物的作用能力明显下降,主要反映了载体

表 3 不同固定化胰蛋白酶对 BAPNA 和偶氮酪蛋白的催化活力比较

	Native trypsin	Immobilized trypsin		
		Glutaraldehyde	Diazotization	Chlorotriazine
Activity: BAPNA (OD ₄₀₅)	0.189	0.326	0.287	0.204
Activity: azocasein (OD ₃₄₀)	0.064	0.039	0.02	0.046
(OD ₃₄₀)/(OD ₄₀₅)	0.34	0.12	0.07	0.23
Ratio(%)	100	35	21	68
Relative activity(%) (BAPNA)	100	37	90	41
Relative activity(%) (azocasein)	100	13	19	28

对酶催化所产生的空间障碍。

本实验中还有一点值得重视，不同的底物测定酶活力对评判固定化的效果有较大的差别。对于偶氮酪蛋白作底物，从固定化胰蛋白酶的相对比活力来看，以氯三嗪法的最高；而用BAPNA作底物，则以重氮法的产物最高。也就是说如用偶氮酪

蛋白做底物，则氯三嗪法的固定化效果较好；而以BAPNA做底物，则采用重氮化的方法效果较佳。因此在选择固定化酶的最佳条件时，应该尽量采用与该固定化酶实际应用中所作用的底物相类似的底物测定其固定化效果，这就比较真实、准确。

参 考 文 献

- [1] Kullman, W., *Enzymatic peptide synthesis*, CRC Press, Florida, 1987.
- [2] 曾福跃等, 生物化学与生物物理学报, 21(4):267, 1989.
- [3] Kay, G. and Crook, E. M., *Nature*, 216:514, 1961.
- [4] 袁中一等, 生物化学与生物物理学报, 13(3):291, 1981.
- [5] 徐俊等, 华东化工学院学报, 15(4):438, 1989.
- [6] 谭复隆等, 生物化学与生物物理学报, 13(4):407, 1981.
- [7] 上海生化所固相酶组, 生物化学与生物物理学报, 9(1):63, 1977.
- [8] 张龙翔等主编: 生化实验方法和技术, 高等教育出版社, 北京, p.165, 1981.
- [9] Srere, P. A. and Uyeda, K., *Methods in Enzymology*, Vol. 44(K. Mosbach, Ed.), Academic Press, New York, p.11, 1976.
- [10] Walsh, K. A., *Methods in Enzymology*, Vol. 19(G. E. Perlmann and L. Lorand, Ed.), Academic Press, New York, p.41, 1970.

Immobilization of Trypsin on Sepharose Derivatives Using Various Covalent Bonding Methods

Xu Jun, Qi Jun Yuan Zhongyi

(Shanghai Institute of Biochemistry, Shanghai 200032)

Sepharose and its derivatives containing ABSE-, -NH₂, -COOH, -NCS and oxirane groups were activated via chlorotriazine, diazotization, glutaraldehyde or water-soluble carbodiimide and then used for immobilization of trypsin. The protein recoveries of the immobilized enzyme preparations via diazotization, chlorotriazine and glutaraldehyde were 59%, 93% and 28%, respectively, and the activity recoveries of these methods were 53%, 38% and 20%, respectively, better than those of the other four methods. These immobilized trypsin also showed high stabilities during repeated operations. Besides, the enzymatic properties, such as the optimum pH, temperature, *K_m* and different activities of these immobilized trypsin preparations towards azocasein and BAPNA were studied in comparison to the native trypsin.

Key words Covalent bonding; sepharose; immobilized trypsin