

氨基末端磁性载体固定化中性蛋白酶的研究

丁丽俐* 翁屹 张阳荣 倪大为

(中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027)

摘要 以氨基末端磁微粒为载体, 用戊二醛作交联剂, 通过共价交联结合法固定化 AS1.398 中性蛋白酶. 可以制备出活力达 45 000 U/g 磁性固定化酶. 探讨了该载体对中性蛋白酶的最适固定化条件, 并对磁性固定化酶的热稳定性, 储存稳定性、操作稳定性等进行了研究, 确定了此载体对酶的固载能力大于 200 mg/g (载体), 及固定化磁性酶最适 pH 为 7.5, 最适温度为 60 °C 等催化特性.

关键词 氨基末端磁微粒, 中性蛋白酶, 戊二醛, 固定化磁性酶

学科分类号 Q55

从 60 年代起, 固定化酶的研究迅速发展, 综述和专著大量涌现. 人们不断地探索新的固定化材料和方法^[1-3]. 氨基末端磁微粒是良好的蛋白质载体之一. 它是由磁性氧化铁微粒外包被氨基基团组成, 并通过共价键将酶与载体结合起来. 它除了具备固定化酶稳定性好, 可以多次使用等优点外, 还具备酶与载体结合牢固, 不会因底物浓度高或因有盐离子存在而轻易脱落. 载体对蛋白质的固载量很大 (> 200 mg/g)、磁响应性强, 在外磁场存在下极易将酶从反应体系中分离出来. 与其他方法相比, 共价结合法固载酶往往会引起酶蛋白高级结构变化, 破坏部分活性中心, 而不能得到活力高的磁性固定化酶 (magnetic immobilized enzyme MIE). 但就本文实验结果: 在磁性固定化酶活力和活力稳定性等方面都优于国内用其他方法固载中性蛋白酶的报道数据^[4,5].

1 材料与方法

1.1 材料

氨基末端磁微粒; 氨基末端磁微粒悬浮液: 称取一定量的氨基末端磁微粒, 悬浮于 1 mmol/L EDTA, pH 7.0 中 (浓度为 50 g/L); AS1.398 中性蛋白酶 (100 000 U/g); 戊二醛 (25%), 天津市医药公司出品; 吡啶, 甘氨酸等其他试剂均为分析纯.

1.2 中性蛋白酶的固定化

取一定量的磁微粒悬浮液, 用 0.01 mol/L 的吡啶缓冲液清洗三遍, 磁分离去上清, 在磁微粒中加入 5% 的戊二醛, 室温下搅拌 3 h, 磁分离去上

清. 再用吡啶缓冲液清洗三遍, 除去残余戊二醛, 将活化后的磁微粒载体中加入一定体积的中性蛋白酶液 (2.5 g/L), 4 °C 冰箱内搅拌 16 h, 磁分离去上清, 加入一定量甘氨酸淬灭剂, 室温下搅拌 30 min, 以封闭磁微粒上多余活性位点. 磁分离弃上清, 用磷酸缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.0) 洗涤三次, 即得到磁性固定化酶.

1.3 酶活测定

可溶性中性蛋白酶和固定化中性蛋白酶活力测定均参考文献 [6] Folin-酚试剂法, 底物为 2% 酪蛋白, 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.0), 40 °C 恒温 10 min, 721 型分光光度计在 680 nm 测定光密度值. 可溶性蛋白酶和固定化中性蛋白酶每分钟水解酪蛋白产生的酪氨酸的微克数, 用于表示自由酶和磁性酶的活性, 单位是 $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$, 即 U.

分别测定固定化过程中加入的自由酶的总活力以及固定化磁性酶的总活力, 按下列公式计算固定化率以及酶活回收率.

固定化率 = (加入酶的总活力 - 上清酶的总活力) / 加入酶的总活力

酶活回收率 = 磁性酶的总活力 / 加入酶的总活力

2 结果与讨论

2.1 中性蛋白酶的固定化条件选择

2.1.1 酶与载体的比例对制备 MIE 的影响:

取 2 ml 酶液 (2.5 g/L), 改变活化后的氨基

* 通讯联系人.

Tel: 0551-3601439, E-mail: llding@ustc.edu.cn

收稿日期: 2000-08-21, 接受日期: 2000-11-03

末端磁微粒用量 (25~ 6.25 mg), 制备 MIE. 分别测定在酶与磁微粒不同比例情况下, 酶的固定化率及 MIE 活性 (图 1).

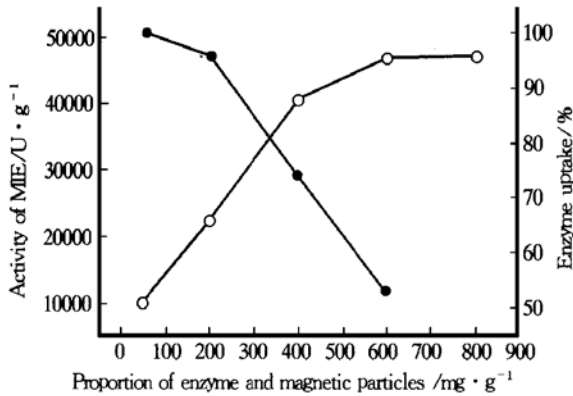


Fig. 1 Effect of different concentration of proteinase on immobilization

●—●: enzyme uptake; ○—○: activity of MIE.

从图 1 可见当酶/载体 > 200 mg/g 时, 载体磁微粒上的活性位点逐渐被饱和, 所以固定化率随之减小, 而固定化酶活性仍逐渐增加, 最终达到饱和, 渐趋不变. 同时从图 1 中还可可见每克磁微粒能固载几百毫克蛋白质. 而通常有机吸附剂单位质量对蛋白质的吸附量只有数十毫克, 无机吸附剂的吸附量则更低, 单位质量吸附蛋白质的量常常小于 1 mg^[7]. 制备的固定化酶活性可高达 45 000 U · g⁻¹.

2.1.2 温度对制备 MIE 的影响:

选定酶与载体的比例为 200 mg · g⁻¹, 分别在不同温度的恒温水浴中制备固定化酶, 戊二醛活化时间缩短为 1 h, 酶交联时间缩短至 2 h, 每隔 5 min 振荡一次, 其余固定化条件不变.

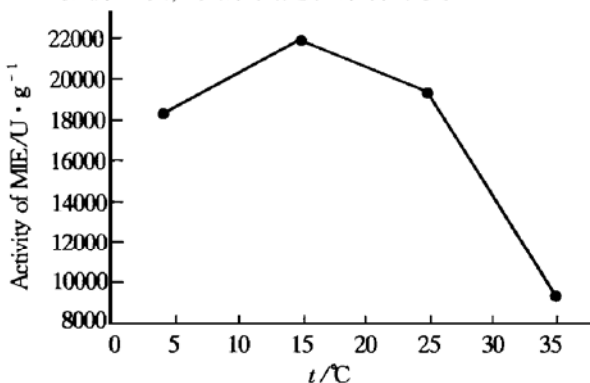


Fig. 2 Influence of different temperature on activity of MIE

由图 2 可知: 在 10 °C ~ 20 °C 内制备的磁性固定化酶活较高, 最佳固定化温度为 15 °C. 推测这可能是由于在较高温度下醛基和氨基间的加成反应

速度有所增加, 但戊二醛对酶的变性作用在加剧, 且在较高温度下酶活保存率也在降低.

2.1.3 pH 值对制备 MIE 的影响:

选定酶与载体比例为 200 mg · g⁻¹, 改变固定化过程中交联缓冲液的 pH 值 (图 3), 分别用不同 pH 值的磷酸缓冲液制备磁性固定化酶, 加入 2 ml 相应 pH 值的 2.5 g/L 的酶液, 其余固定化条件不变.

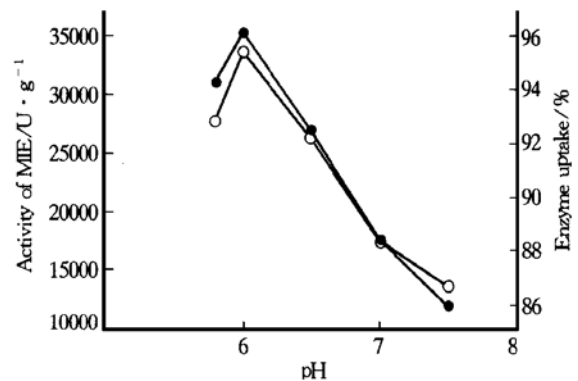


Fig. 3 Influence of different pH on immobilization

●—●: enzyme uptake; ○—○: activity of enzyme.

结果表明在 pH 6 时制备的 MIE 活力最高. 这可能是因为氨基与戊二醛进行加成反应需在酸性环境中进行, 但若酸性太强, 亲核的氨基将变成不活泼的铵离子, 也不利于加成反应的进行. 使得酶固定化率下降.

2.2 固定化中性蛋白酶的催化特性

2.2.1 MIE 的最适作用温度: 取自由酶和 MIE 各 0.1 ml, 每管各加入 1 ml 磷酸缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.0) 稀释, 在 30 °C ~ 70 °C 范围内 (温度间隔为 10 °C) 恒温振荡 10 min, 分别测定 MIE 和自由酶的活性, 图 4 表明, MIE 的最适作用温度为 60 °C, 自由酶的最适温度为 50 °C.

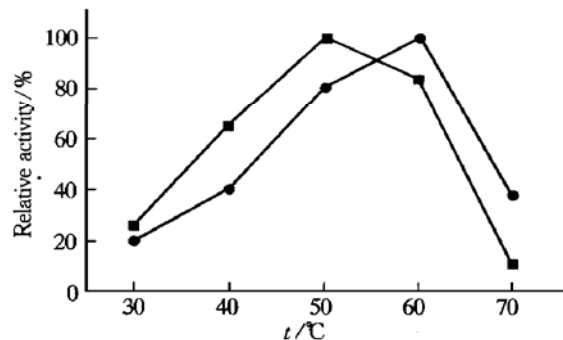


Fig. 4 Optimum temperature of free and immobilized enzyme

■—■: MIE; ●—●: free enzyme.

这可能是由于戊二醛的交联作用稳定了酶分子的构象, 因而使得固定化酶的临界变性温度升高.

2.2.2 固定化酶的最适作用 pH: 取自由酶和 MIE 各 0.1 ml, 分别用不同 pH 值的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液洗涤数次, 再分别加入 1 ml 相应 pH 的磷酸缓冲液. 用蒸馏水配制的 2% 酪蛋白作为底物, 测定酶活力.

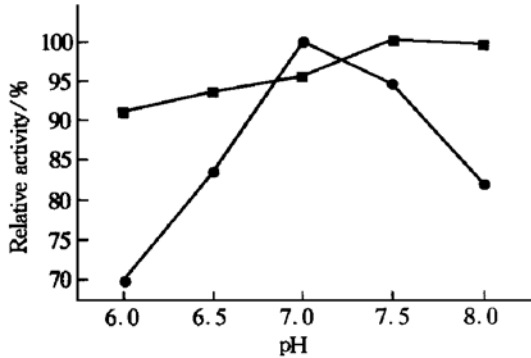


Fig. 5 Optimum pH values of free and immobilized enzyme
 ■—■: MIE; ●—●: free enzyme.

从图 5 可见, MIE 最适 pH 为 7.5, 较自由酶高出 0.5 个单位. 且 MIE 的相对活力-pH 曲线较自由酶平缓很多, 可见 MIE 有更好的酸碱耐受性. 造成这种现象的原因可能是酶固定化后, 酶分子的构象及其活性部位的微环境发生某些改变, 导致 MIE 作用的 pH 范围变宽.

2.2.3 MIE 的热稳定性: 取自由酶和 MIE 各 0.1 ml, 各加入 1 ml 磷酸缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.0) 稀释, 于不同温度的恒温水浴中保温 30 min. 测酶活, 如图 6 所示: MIE 的热稳定性较自由酶强.

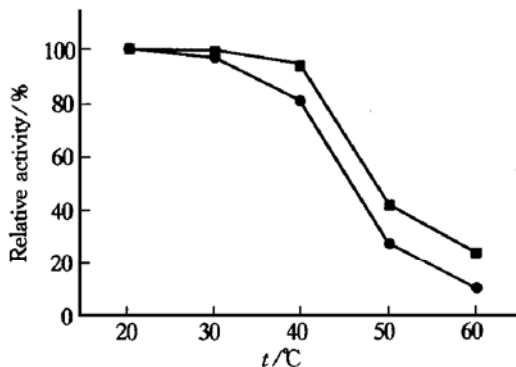


Fig. 6 MIE stabilities to heat

■—■: MIE; ●—●: free enzyme.

2.2.4 MIE 的储存稳定性: 取自由酶和 MIE 各 0.1 ml, 各加入 1 ml 磷酸缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.0) 稀释, 冰箱储存, 分别在储存后的当天、

15 天、30 天, 测酶活, 见图 7.

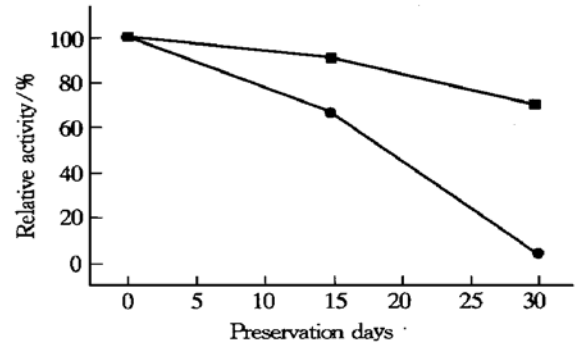


Fig. 7 MIE stabilities to preservation

■—■: MIE; ●—●: free enzyme.

MIE 15 天时酶活保存率 > 80%, 30 天时酶活保存率 > 70%, 半衰期为 59 d. 而自由酶活力 30 天时几乎为 0.

2.2.5 MIE 的操作稳定性:

取适量 MIE, 反复测定其酶活力, 在每一次测活后, 用磷酸缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.0) 洗涤三遍, 从表 1 中可见, MIE 反复使用九次后酶活保存率仍为 75%. 酶活保存率为 50% 时, MIE 可使用 40 次左右.

Table 1 Operational stability of MIE

| Times | A_{680} | Activity of MIE /U·g ⁻¹ | Remaining activity /% |
|-------|-----------|---------------------------------------|--------------------------|
| 0 | 0.226 | 9460 | 100 |
| 1 | 0.214 | 8959 | 94.7 |
| 2 | 0.201 | 8410 | 88.9 |
| 3 | 0.196 | 8202 | 86.7 |
| 4 | 0.194 | 8117 | 85.5 |
| 5 | 0.189 | 7909 | 83.6 |
| 6 | 0.187 | 7823 | 82.7 |
| 7 | 0.184 | 7700 | 81.4 |
| 8 | 0.177 | 7407 | 78.3 |
| 9 | 0.170 | 7114 | 75.2 |

图 6、图 7 及表 1 表明 MIE 较自由酶在热稳定性、储存稳定性和操作稳定性上都有很大提高. 其原因可能是: a. 固定化增加了酶构型的牢固程度; b. 阻挡了不利因素对酶的侵袭; c. 限制了酶分子间的相互作用.

参 考 文 献

- 1 Stanley W L, Watters G G, Chan B J, *et al.* Lactase and other enzymes bound to chitin with glutaraldehyde. *Biotechnology and Bioengineering*, 1975, **17**: 315~ 325
- 2 邱广亮, 栗淑媛, 郝翠秀, 等. 磁性聚乙二醇载体固定化 α 淀

- 粉酶的研究. 生物化学杂志, 1997, **13** (2): 240~ 242
Qiu G L, Li S Y, Hao C X, *et al.* Chin Biochem J, 1997, **13** (2): 240~ 242
- 3 邱广亮, 德力格尔, 栗淑媛, 等. 磁性聚乙二醇载体固定化葡萄糖淀粉酶的研究. 生物化学与生物物理进展, 1999, **26** (1): 56~ 58
Qiu G L, Deliger, Li S Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 1999, **26** (1): 56~ 58
- 4 邱广明, 孙宗华. 用吸附-交联法在磁性胶体粒子上固载中性蛋白酶. 生物化学与生物物理进展, 1993, **20** (4): 311~ 314
Qiu G M, Sun Z H. Prog Biochem Biophys, 1993, **20** (4): 311~ 314
- 5 隋德新, 姜涌明, 赵国骏, 等. AS1.398 中性蛋白酶的固定化研究. 生物化学与生物物理进展. 1990, **17** (4): 311~ 313
Shui D X, Jiang Y M, Zhao G J, *et al.* Prog Biochem Biophys, 1990, **17** (4): 311~ 313
- 6 朱俭, 曹凯鸣, 周润琦, 等. 生物化学实验. 上海: 上海科学技术出版社, 1995. 229~ 236
Zhu J, Cao K M, Zhou R Q, *et al.* Biochemistry Experiment. Shanghai: Science and Technogy of Shanghai Publishing, 1995. 229~ 236
- 7 袁勤生, 赵健, 王维育主编. 应用酶学. 上海: 华东理工大学出版社, 1994. 233~ 259
Yuan Q S, Zhao J, Wang W Y. Applieel Zymology. Shanghai: Huadong University of Technogy, 1994. 233~ 259

Immobilization of Neutral Proteinase onto Amine-terminaled Magnetic Particles

DING Li-Li*, WENG Yi, ZHANG Yang-Rong, NI Da-Wei

(School of Life Science, USTC, Hefei 230027, China)

Abstract Neutral proteinase was covalently attached to amine-terminaled magnetic particles and cross-linking it with glutaraldehyde. Activity of MIE arrive 45 000 U/g (magnetic particles). Optimum conditions of immobilization were studied. Stabilities to heat and preservation, operational stability of free enzyme and MIE also were compared. Some properties of MIE, such as optimum pH is 7.5, optimum temperature is 60 °C were confirmed.

Key words amine-terminaled magnetic particle, neutral proteinase, glutaraldehyde, magnetic immobilized enzyme

* Corresponding author. Tel: 86-551-3601439, E-mail: llding@ustc.edu.cn

Received: August 21, 2000 Accepted: November 3, 2000