维普资讯 http://www.cqvip.com

154-155,241

16

文章编号：0253-3626(2000)02-0154-03

Q556.903

以复合硅胶为载体的胰蛋白酶的固定化

陈　辉[1]，杨继虞[2]

（1. 重庆医科大学临床学院检验科 400016；2. 华西医科大学药学生化教研室 610044）

摘　要　**目的**：制备固定化胰蛋白酶，用于转肽反应。**方法**：以涂敷了壳聚糖的硅胶为复合载体，以系统全面反馈优化技术进行优化制备固定化胰蛋白酶。**结果**：所制备的固定化胰蛋白酶平均酶活性为2282U/g，酶活性回收在9%以上。**结论**：制备的固定化酶的单位酶活性高，带入转肽反应体系的水分少，能有效地应用于转肽反应之中。

关键词　硅胶；壳聚糖；固定化胰蛋白酶；优化技术

中国图书分类法分类号：Q503　　**文献标识码**：A　　**收稿日期**：1999-05-18

复合

Immobilized trypsin with compound silica

CHEN Hui, et al

Department of Clinical Laboratory, College of Clinical Medicine

Abstract　**Objective**: An immobilized trypsin (ITP) is prepared for transpeptidation. **Methods**: The silica coated chitosan is used as compound carrier, and the process is optimized by a systemic and all-around feedback optimization technique. **Results**: The average activity of ITP is as high as 2282U/g, and the recovery rate of activity is 9%. **Conclusion**: The activity per gramme ITP is very high , and it carries a little water to system of transpeptidation , so it was used for transpeptidation successfully.

Key Words　Silica; Chitosan; Immobilized trypsin; Optimization technique

随着生物技术应用领域的不断扩大，作为生物催化剂的酶在工业生产中的应用也越来越广泛，但是由于液相酶存在诸多缺点而急需改进,因此固相酶的研究便成为一大热点，因为固相酶有许多优点[1]：(a)酶固定化后，抑制了酶的自溶现象，减少了副反应；(b)在酶反应完成以后，通过离心、过滤等简单的方法即可将酶与产物分离，为分离纯化提供了方便。(c)固相酶在生物反应体系中（特别是以有机溶剂为反应体系时）的稳定性好，变性和失活少；(d)固定化酶易于回收和重复利用，降低了生产成本。现在人们对固定化酶的研究已经不仅仅停留在理论阶段，而更注重于它的实用性。本文以涂敷了壳聚糖的硅胶为复合载体，制备固定化胰蛋白酶用于转肽反应之中。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

结晶猪胰蛋白酶和脱乙酰壳聚糖均为Sigma公司产品，粗孔硅胶(柱层析用)购自青岛海洋化工厂分厂、戊二醛（进口分装）购自成都华西生化制品厂。

1.2　方法

1.2.1　固定化胰蛋白酶的制备方法

参照文献[2]，自行设计如下：

取0.2g壳聚糖，加10 ml H_2O，7.5 ml冰醋酸，在40℃水浴中搅拌1h，过滤，滤液中加硅胶3.0g，室温振荡过夜，抽滤水洗三次，于60℃孵箱中干燥1h，即得涂敷了壳聚糖的硅胶；称此硅胶1.0g，加4.2%的戊二醛水溶液20ml，室温振荡3h，抽滤水洗三次，60℃孵箱中干燥1h，得淡黄色的活化后的硅胶；取此硅胶1.0g，加入含2.5 mg/ml的胰蛋白酶溶液8 ml，调pH值7.0，置4℃冰箱过夜，抽滤，PBS充分洗涤，得固定化胰蛋白酶（Immobilized Trypsin，ITP），置4℃冰箱中保存备用。

1.2.2　筛选胰蛋白酶固定化的最佳条件

本文采用系统全面反馈优化技术，对影响固定化的十四个关键因素进行优化，这十四个因素依次为：醋酸浓度、壳聚糖的量、溶解时间、涂敷时间、涂敷温度、戊二醛浓度、戊二醛体积、活化温度、活化时间、酶浓度、酶体积、固定化温度、固定化时间、固定化pH值，分别用X_1——>X_{14}表示，设计出五组系统诊断实验（见表1）。

以每克ITP的活力单位(Y_1)和胰蛋白酶的活性回收(Y_2)为目标量来考察优化方案的优劣。

经数据处理，优化出固定化条件后，根据其优化条件，分别进行三次重复实验和放大实验。

作者介绍：陈　辉（1970-03出生），男，主管技师，硕士

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 固定化胰蛋白酶系统诊断实验设计方案

	1组	2组	3组	4组	5组
X_1	30	35	40	45	50
X_2	0.30	0.10	0.15	0.20	0.25
X_3	0.8	1.0	1.2	1.4	0.6
X_4	8	11	14	17	5
X_5	26	32	14	18	22
X_6	1	2	3	4	5
X_7	17	9	11	13	15
X_8	26	32	14	18	22
X_9	1	2	2.5	3	0.5
X_{10}	1	2	3	4	5
X_{11}	1	2	4	6	8
X_{12}	16	20	4	8	12
X_{13}	10	12	14	16	18
X_{14}	7	8	9	5	6

目标量：Y1（U/g ITP）

Y2（活性回收）

1.2.3 ITP的单位活力和活力回收的测定

ITP的单位活力的高低直接关系着其在生产应用中的可行性，而活力回收是衡量固定化效果的重要参数。

A：ITP单位活力的测定

参照文献[3]，自行设计ITP测定方法如下：

取ITP 0.3 g，加含$CaCl_2$的BBS 18ml，40℃保温10 min，加入已预热的1.5%酪蛋白30 ml，40℃水浴中搅拌反应15 min，加入5%的TCA 30 ml终止反应，过滤，取续滤液1.0 ml加福林-酚试剂，于650 nm处测光密度值，从酪氨酸含量的标准曲线的回归方程上计算出对应的酪氨酸含量，得出ITP的活性。

参照文献[3]，将ITP的单位活力定义为：在上述条件下，每分钟水解酪蛋白生成的产物（包括短肽与含酚基的氨基酸）与福林一酚试剂反应生成蓝色，在650nm处与1μg酪氨酸相当的酶量。

B：活力回收的测定

活力回收是指所得固定化酶的总活力占所投入的液相酶的总活力的百分比。

2 结 果

2.1 固定化胰蛋白酶的制备结果

2.1.1 系统诊断实验 结果见表2

2.1.2 优化实验

经数据处理，得出固定化酶的优化条件依次如下（$X_1 \rightarrow X_{14}$）：

表2 系统诊断实验结果

	ITP单位活性（U/g）	活力回收（%）
1组	373	3.83
2组	597	4.39
3组	965	4.40
4组	1107	3.36
5组	2245	4.50

表3 优化条件的重复实验结果

批次	ITP单位活性（U/g）	活力回收（%）
1	2304	9.07
2	2195	8.94
3	2347	9.18

42 0.15 0.85 10 22 3 17 22 1.5 3.5 5 12 10 7.5

根据上述优化条件，重复三次实验，结果见表3。根据优化条件，将壳聚糖投量放大至1.0g进行三次放大实验，结果为：ITP单位活力平均为2282 U/g ITP，活力回收平均为在9.15%以上。

2.2 酶活力测定中的标准曲线

经直线拟和，标准曲线的回归方程为：

$y=123.31 \times x - 0.892$ $r=0.9999$

3 讨 论

3.1 固定化载体的选择

用于ITP的载体很多，琼脂糖[4]、羧甲基纤维素[5]、壳聚糖等均可运用。本室以前曾将胰蛋白酶直接固定于单纯的壳聚糖上用于催化酶促半合成人胰岛素的转肽反应，发现其存在明显的不足：这种ITP带入反应体系的水分过多，不易控制（投壳聚糖1.0g，往往可收到10g以上的ITP），而以转肽反应为代表的许多酶促反映都需严格控制水的含量：在反应过程中ITP往往浮于液面，不能与底物充分接触，这些对反应极为不利。作者充分利用硅胶吸水少，能均匀地分布于反应体系的优点，以涂敷了壳聚糖的硅胶做胰蛋白酶的载体，严格地控制了酶在固定化过程中带入的水分；在转肽反应过程只需轻微的振荡，即可使固化酶和反应体系充分接触，达到理想的催化效果，因而成功地应用于转肽反应之中。

（下转第211页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 T_C、T_G、HDL-C、LDL-C测定结果($\bar{x}\pm s$)

年龄(岁)	例数	Tc(mmol/L)	T_G(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)
20～40	男 61	4.59±0.79	1.53±0.80	1.27±0.29	2.7±0.8
	女 151	4.34±0.72	1.13±0.48	1.43±0.33	2.7±0.8
41～60	男 295	4.84±0.88	1.61±0.79	1.26±0.29	2.9±0.8
	女 455	5.03±0.95	1.60±0.80	1.42±0.35	2.9±0.8
61～80	男 168	5.04±1.03	1.60±0.80	1.26±0.34	2.9±0.8
	女 192	5.36±0.88	1.78±0.79	1.43±0.45	3.1±0.8

表2 ApoA、ApoB、Lp(a)测定结果($\bar{x}\pm s$)

年龄(岁)	例数	AopA(mg/L)	ApoB(mg/L)	Lp(a)(mg/L)
20～40	男 40	1461±146.4	840±179.8	120±63
	女 35	1511±153.4	720±134.7	119±33
41～60	男 136	1477±140	883±163	184±113
	女 100	1580±144.9	882±184	146±57
61～80	男 29	1479±192.6	922±185.2	153±62
	女 7	1580±112.3	934±129.2	173±68

的饮食习惯有关。HDL-C、LDL-C、ApoA、ApoB、Lp(a)平均水平接近国内的平均水平，是否可以认为除T_G之外的各项受饮食习惯的影响不大。

总而言之，不同地区人群血脂水平可能有一定的差异，随时监测人群的血脂水平变化，对预防心血管性疾病的发生有十分重要的意义。

参 考 文 献

[1] 何进才，莫其农，刘心亮. 健康成人血清载脂蛋白AI和B参考值[J]. 陕西医学检验，1998;13(1):56

[2] 叶应妩，王毓三. 临床检验操作规程[M]. 中华人民共和国卫生部医政司：东南大学出版社，1997

[3] 血脂异常防治对策专题组. 血脂异常防治建议[J]. 中华心血管杂志，1997;25(3):169~172

[4] 方 圻，王钟林，宁田海，等. 新疆阜康地区哈汉两民族血脂含量及有关影响因素的研究[J]. 中华心血管杂志，1997;25(3):189

(上接第155页)

3.2 固定化方法的选择

在用交联法固定化酶的过程中,绝大多数的文献都是将双功能试剂(以戊二醛为代表)、载体、酶三者混合,这在将酶与载体交联的同时势必会造成大量的交联剂损伤酶的活性中心，从而影响酶的活性。本方法在用戊二醛的醛基活化硅胶表面的脱已酰壳聚糖中的氨基以后，立即用水洗抽滤的方法除去过量的戊二醛，使酶的损失减少到最低，制得的ITP比本室以前制得的ITP的平均单位活性提高了30%。

3.3 优化技术

作者在实验中采用了系统全面反馈优化技术。该优化技术能在较短的时间里对众多的因素进行筛选，其优化效果好，收敛速度快，具有实用性和先进性。较之传统的正交设计和均匀设计更节约人力，物力和时间，是值得推广的新型优化技术。

参 考 文 献

[1] P. S. Sears, D. S. Clark. Comparison of Soluble and Immobilized Trypsin Kinetics: Immplications for Peptide Synthesis[J]. Biotechnol. & Bioeng. 1993;42(1):118~123

[2] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京 中国环境科学出版社，1995;355~356

[3] 中华人民共和国药典（二部）[S]. 1995版. 北京：人民卫生出版社，1995;758~760

[4] R. Keith, D.P. Helen, E. Robin, et al. Rapid Preparation of Human Insulin and Insulin Analogues in High Yield by Enzyme-assisted Semi-synthesis[J]. Biochemical Journal . 1983;211:671~675

[5] H.D. Jakubke. Enzyme-catalyzed Semisynthesis with Porcine Insulin[J]. Methods in Enzymology. 1987;136:178~180