

重组胰蛋白酶最适 PH 和 PH 稳定性

样品：重组胰蛋白酶，比活 4500USP u/mg pro.，上海雅心生物技术有限公司，纯度如图 1 所示。BAEE, Sigma.

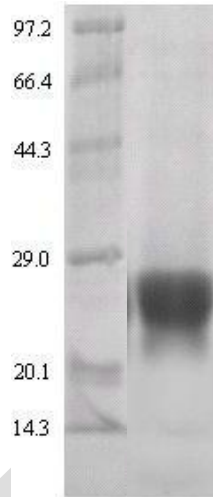


图 1. 重组胰蛋白酶的纯度的 SDS-PAGE 鉴定

1. 最适 pH 的研究

准备 pH 为 3~12 的底物 *BAEE* (0.25mM)，分别测定 rPT 纯酶液的活性，最后结果表示为测定数值占最高酶活的百分比。缓冲液成分依次为 25mM NaAc-HAc (pH 3~6)，25mM Tris-HCl (pH 7~8)，25mM Gly-NaOH (pH 9~12)，所有缓冲液均为 25℃ 下配制。底物在 25℃ 温浴 10 分钟后，开始测活。

2. pH 稳定性的研究

取活性为 10mg/ml 纯酶液，分别在 pH 3~12 缓冲液中稀释 10 倍，在 25℃ 下温浴 2h，取样品测定酶活，以水浴前酶液初始活性作为 100%，计算残余活性。缓冲液依次为 25mM NaAc-HAc (pH 3~6)，25mM Tris-HCl (pH 7~8)，25mM Gly-NaOH (pH 9~12)，所有缓冲液均为 25℃ 下配制。

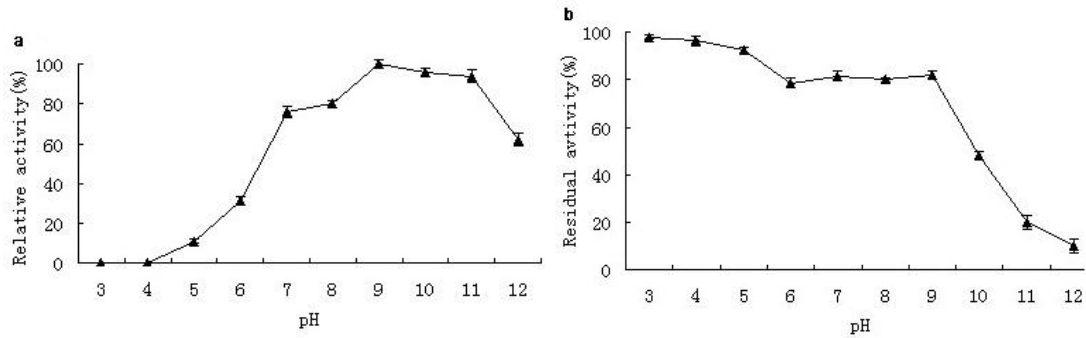


图2. a, RPT最适pH曲线; b, RPT的pH稳定性

分别在pH 3.0~12.0不同的pH条件下,测定rPT活性。结果见上图2a,最适pH范围是7~11,而pH为9.0时测得rPT活性为最大值,这与天然提取的猪胰酶不同(天然胰酶最适pH为7.6-9.0),几乎接近极值,确定该值为测活最适条件,但是底物在碱性条件易降解,所以底物尽量要现用现配。

分析不同pH环境对RPT活性的影响,如图2b所示,rPT在pH 3.0 NaAc-HAc缓冲液里最为稳定。随着pH的升高,RPT酶活的损失程度也随之提高。在测定rPT最适pH值时发现,pH \leq 5底物条件下,RPT蛋白几乎无活性,如图2a所示。而图1b所示,在pH \leq 5的缓冲液中,2小时后依然保持较高的活性。说明在pH \leq 5,RPT稳定,自降解的速率大大降低,酶分子处于相对稳定的状态。此时把酶液转入到pH 7.6的测活体系中,此时酶分子的构象瞬间发生变化,重新暴露出活性位点,于是又恢复了活性。此外,RPT对碱性环境有一定时间的耐受性,在pH $<$ 9环境中,2小时后依然有80%以上的酶活残余,从这一点讲,rPT扩大了胰酶的应用pH范围,有很大的意义。但是pH $>$ 10环境中,活性损失非常快。