

# 重组人胰蛋白酶的稳定性研究

## 1. 重组人胰蛋白酶反复冻融的稳定性

取重组人胰蛋白酶酶液，置于-20℃下反复冻融。按常规方法测定每次冻融后的酶活，以未冻融酶液的活力为 100%，计算酶活残余率。

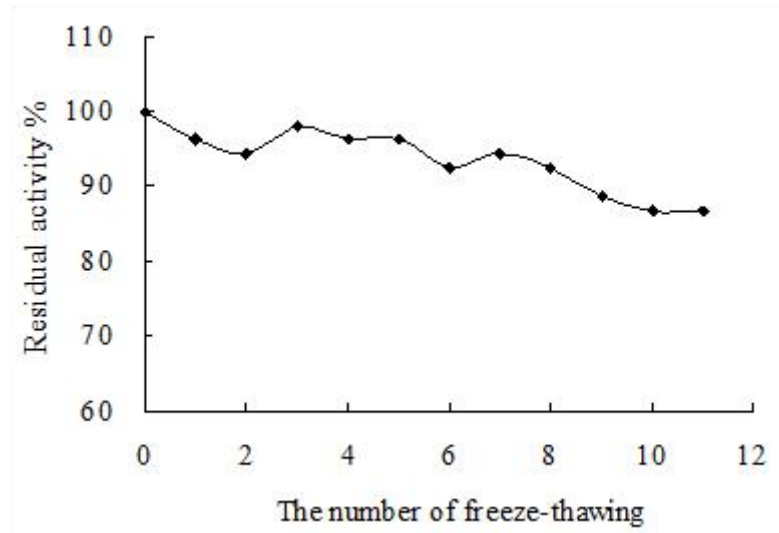


图 1. 重组人胰蛋白酶反复冻融的稳定性

## 2. 重组人胰蛋白酶酶液的稳定性

蛋白浓度为 10mg/ml 的重组人胰蛋白酶酶液，配制 pH 3 HCl 溶液，50mM NaAc-HAc pH 3.0, pH 5.0 缓冲液，50mM Tris-HCl pH 7.6 缓冲液，一组不添加 CaCl<sub>2</sub>，另一组添加 10mM CaCl<sub>2</sub>。每周测定各管酶活，以酶液的初始活力为 100%，计算酶活残余率。

保存条件		酶活残余率%	时间/days	酶活残余率%			
				7	14	28	35
-20℃	1mM HCl	无 Ca <sup>2+</sup>	84.7±3.9	43.8±1.0	34.0±1.0	34.6±0.2	
		10mM Ca <sup>2+</sup>	11.1±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	
-20℃	pH 3 NaAc-HAc	无 Ca <sup>2+</sup>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	
		10mM Ca <sup>2+</sup>	14.6±1.0	2.3±0.1	2.7±0.0	1.8±0.1	
-20℃	pH 5 NaAc-HAc	无 Ca <sup>2+</sup>	116.7±0.0	113.2±2.9	103.5±1.0	111.0±2.0	
		10mM Ca <sup>2+</sup>	118.1±2.9	118.8±2.9	130.6±2.0	133.3±0.0	
-20℃	pH 7.6 Tris-HCl	无 Ca <sup>2+</sup>	92.4±2.9	75.0±2.0	68.8±1.0	64.6±1.0	
		10mM Ca <sup>2+</sup>	116.7±0.0	113.2±1.0	127.1±1.0	113.9±2.0	

4°C	1mM HCl	无 Ca <sup>2+</sup>	50.7±1.0	43.1±2.0	35.0±3.9	35.7±1.4
		10mM Ca <sup>2+</sup>	91.0±1.0	94.4±0.0	81.3±1.0	67.4±1.0
4°C	pH 3 NaAc-HAc	无 Ca <sup>2+</sup>	96.5±1.0	96.5±2.9	92.4±1.0	93.8±1.0
		10mM Ca <sup>2+</sup>	98.6±0.0	97.2±2.0	90.3±0.0	94.4±2.0
4°C	pH 5 NaAc-HAc	无 Ca <sup>2+</sup>	61.1±2.0	60.4±1.0	39.6±1.0	39.4±0.8
		10mM Ca <sup>2+</sup>	93.8±1.0	92.4±1.0	65.3±0.0	59.0±1.0
4°C	pH 7.6 Tris-HCl	无 Ca <sup>2+</sup>	10.6±0.1	5.6±0.0	2.7±0.1	2.3±0.1
		10mM Ca <sup>2+</sup>	90.1±0.2	83.3±2.0	63.2±1.0	54.9±1.0

图 2.重组人胰蛋白酶酶液的稳定性

在-20°C条件下,比较稳定的是添加了 10mM Ca<sup>2+</sup>的 pH 5 NaAc-HAc 缓冲液和 pH 7.6 Tris-HCl 缓冲液,酶活不仅没有损失,反而有所提高。

在 4°C条件下,比较稳定的是 pH 3 NaAc-HAc 缓冲液,并且有无 Ca<sup>2+</sup>存在影响不大,重组人胰蛋白酶在 pH 5.0 的缓冲液中比 pH 7.6 的缓冲液中要略为稳定些,并且同一 pH 条件下添加 10mM CaCl<sub>2</sub> 比不添加 CaCl<sub>2</sub> 稳定性要好。

### 3.重组人胰蛋白酶冻干保护剂的筛选

在蛋白浓度为 6.5mg/ml (80KU/ml) 的重组人胰蛋白酶酶液中,分别添加不同浓度不同种类的保护剂(包括甘露醇,山梨醇,海藻糖,蔗糖,乳糖,牛血清白蛋白,NaCl 等)进行冷冻真空干燥,测定各冻干品酶活,计算酶活残余率。

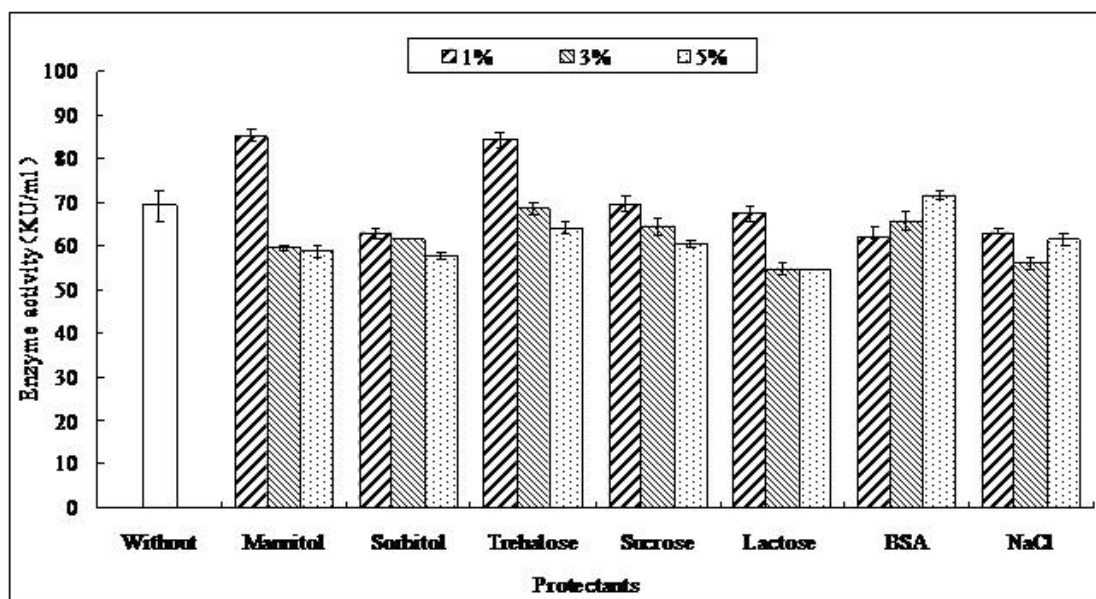


图 3.加入不同冻干保护剂对重组人胰蛋白酶的影响

当酶液中添加 1%甘露醇或 1%海藻糖后，不仅能够使重组 hT2 有良好的赋形性和溶解性，而且酶活完全没有损失，说明 1%甘露醇或 1%海藻糖能够有效提高重组 hT2 冻干过程的稳定性，可以作为重组 hT2 优良的冻干保护剂。

#### 4.重组人胰蛋白酶冻干品的稳定性

将重组人胰蛋白酶冻干品分别置于-20℃，4℃，25℃下，每隔一周取出一管，各加入 0.5ml 纯水溶解后测定酶的活力，以冻干前的初始酶活为 100%，计算相对酶活。

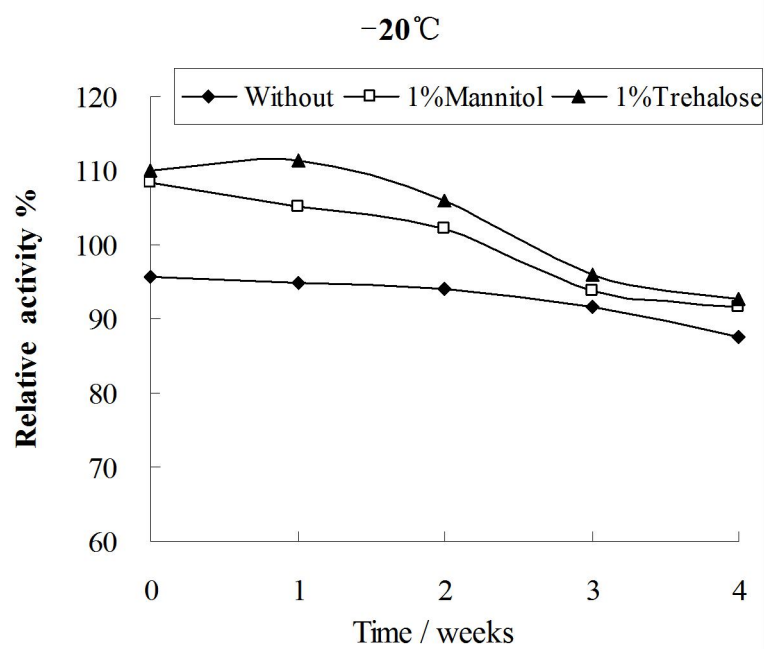


图 4.重组人胰蛋白酶在-20℃下的稳定性

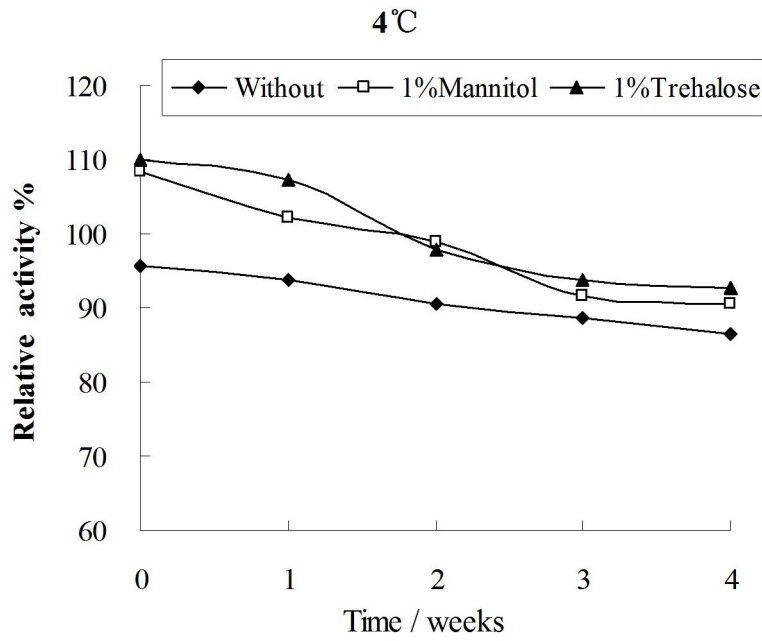


图 5.重组人胰蛋白酶在 4°C 下的稳定性

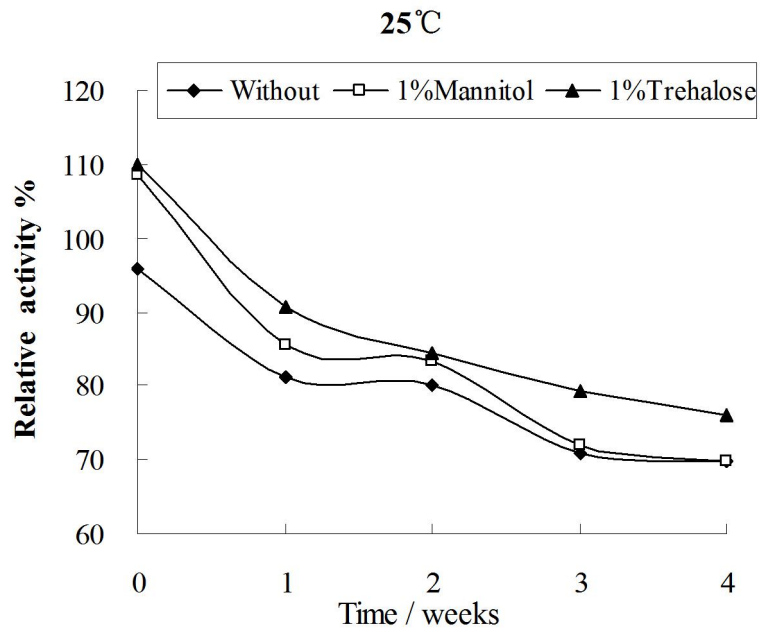


图 6.重组人胰蛋白酶 25°C 下的稳定性

在同一温度下，添加 1%海藻糖的重组 hT2 冻干品比添加 1%甘露醇和不添加任何保护剂的酶活都要略高，而添加同一保护剂的冻干粉在-20°C 下的酶活又高于 4°C 及其它温度。综合以上各温度下不同保护剂的稳定性曲线来看，还是以 1%海藻糖在-20°C 下密封储存最佳。