

## 重组胰蛋白酶最适温度和温度稳定性

**样品：**重组胰蛋白酶，比活 4000USP u/mg pro.，上海雅心生物技术有限公司，纯度如图 1 所示。BAEE, Sigma.

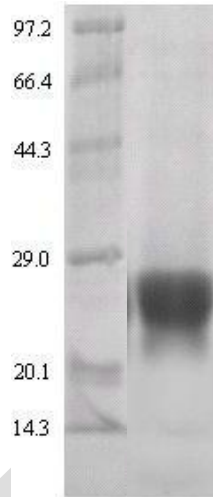


图1. 重组胰蛋白酶的纯度的SDS-PAGE鉴定

### 1.最适温度的研究

将底物 BAEE (0.25mM) 分别置于 4℃、15℃、20℃、25℃、30℃、40℃、50℃、60℃和 70℃水浴中温浴 20min，加入相同体积的 RPT 酶液测定 rPT 的活力，结果表示为测定数值占最高酶活的百分比。

### 2.温度稳定性的研究

取 10mg/ml RPT 纯酶液稀释 10 倍后，分别置于 4℃、15℃、20℃、30℃、40℃、50℃、60℃，70℃水浴中温浴 2h，每隔 20min 取样测定酶活，结果表示为测定数值占最高酶活的百分比。

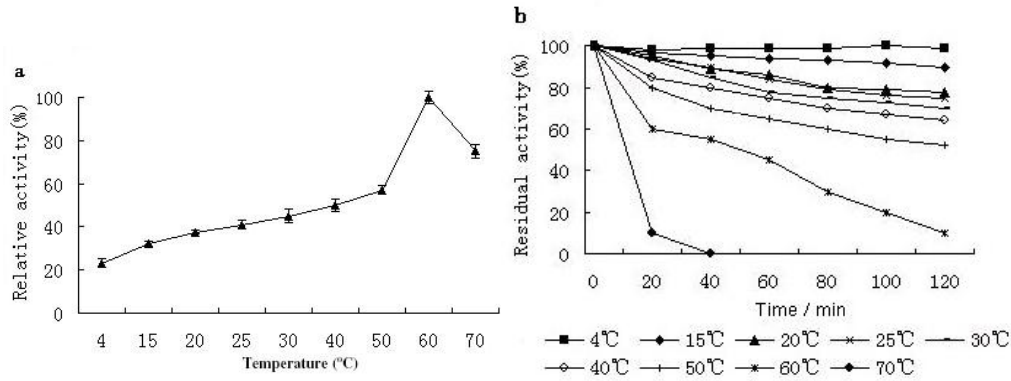


图2. a, RPT最适温度曲线； b, RPT的温度稳定性

把底物分别放置在 4°C、15°C、20°C、25°C、30°C、40°C、50°C、60°C 和 70°C 水浴中，然后加入同体积的纯酶液测活。图 2a 显示，温度越高，测得的酶活也就越高。60°C 酶反应速率很快，酶活最高，然而温度继续升高，胰酶的自水解加剧，酶活性损失加快。

把酶液分别放置在 4°C、15°C、25°C、30°C、40°C、50°C、60°C 和 70°C 水浴中温浴，每隔 20min 检测残余酶活，得到 rPT 的热稳定性曲线，如图 2b 所示。4°C 条件下 rPT 相对最稳定，2 小时内酶活残余率在 97% 以上；随着温度的升高，分子的结构发生了变化，分子间碰撞加剧，导致酶结构遭到破坏，rPT 的降解速率也随之加快。50°C 条件下 2 小时内酶活残余还能达到 60% 左右；60°C 条件下 2 小时内酶活残余还能达到 10% 左右，而 70°C 时 20min 之内胰蛋白酶就会完全失活。

### 3. 重组胰蛋白酶运输条件下的稳定性

试剂：

1、重组胰蛋白酶冻干粉（批号：RPT1305001）

2、测活缓冲液：25mmol 三羟甲基氨基甲烷（Tris-HCl）缓冲液（pH7.6），含 100mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>。

3、0.001M HCl：取稀释至 1M 的 HCl, 稀释 1000 倍即得，pH3-4。

4、底物溶液（2.5mmol/L）：精密称取 N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯（BAEE）（Sigma）42.8 mg，加入相应 50ml 体积的测活缓冲液，使其溶解，即为 2.5mmol/L 的底物母液，现配现用, 使用时，用测活缓冲液 10 倍稀释。

5、供试品：精密称取待测样品适量。平行分装 3 支，置于蓝冰保温运输箱内，室温下放置。

**实验方法：**

1、重组胰蛋白酶运输条件下的稳定性：样品测定活性，作为初始活性。蓝冰于-20℃充分预冷后，取出，与样品同时放入泡沫保温运输箱内，同时放入温度记录仪，2日后，取出，测定活性，取平均值。以初始时酶活定为100%，以残余酶活百分比表示测定结果。

**实验结果：**

运输过程中的温度变化曲线如图3所示。

结论：重组胰蛋白酶在蓝冰保温箱内保持低温的条件下运输稳定。活性无损失，活性保持为100%。

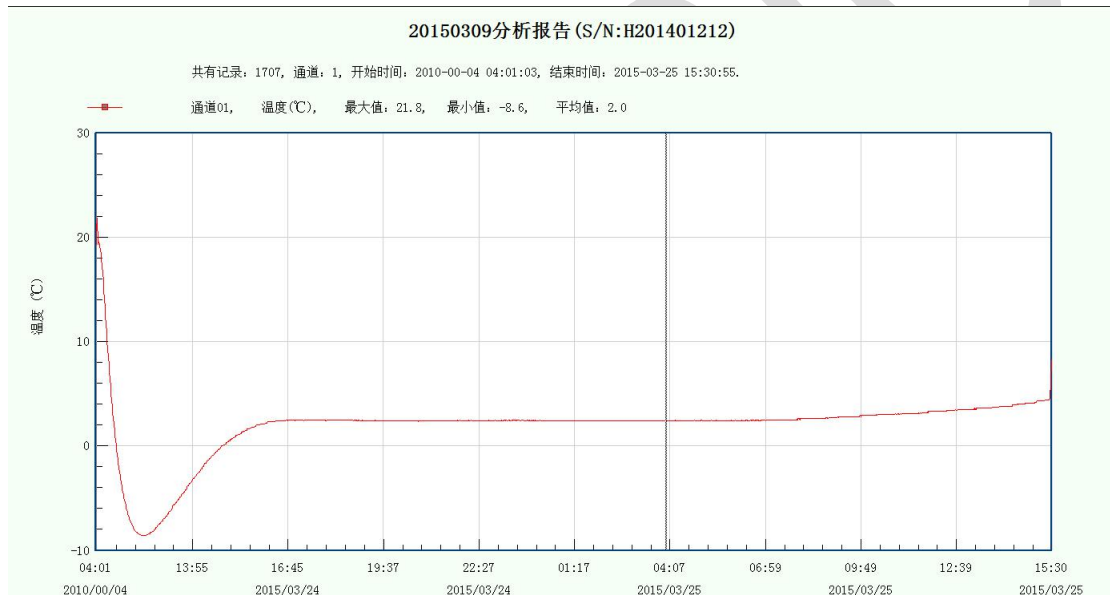


图3.运输过程中的温度变化曲线