

用于生产胰岛素的 r-胰蛋白酶固定化载体

概要

r-胰蛋白酶固定化载体是将生产胰岛素所使用的重组胰蛋白酶固定化在纤维素粒子上的酶固定化载体。由于胰蛋白酶共价结合纤维素粒子，因此胰蛋白酶的活性相比游离体也极其稳定。根据这个特征，可以期待通过反复使用胰蛋白酶来降低其在生产成本中的比例。

r-胰蛋白酶固定化载体的特征

配体	重组胰蛋白酶（用猪源胰蛋白酶 E. coli 生产）
底物载体	纤维素粒子
粒径	平均 90 μ m
酶活性	> 2,000 BAPNA (Benzyl-DL-arginine-p-nitroanilide) U/ml
保存液	PBS – 50 % 甘油

关于研发品的处置管理方法

r-胰蛋白酶固定化载体是研发中的产品。虽然色谱填料 Cellufine 已经通过 ISO 9001 认证，具有品质保证，但是本产品的质量可能会在研发过程中发生变化。

本产品并非售卖品。作为研发品，我们会提供少量样品。如果是基于生产用途研究本产品的企业（医药品生产、诊断试剂或其他相关产品生产等）或研究人员，我们将在征得您对本意图的同意，并对用途进行斟酌的基础上，提供样品。

关于样品的咨询，请通过以下方式联系我们。

JNC 株式会社

化学品事业部生命化学部

东京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号

TEL : +81-3-3243-6150 Fax : +81-3-3243-6219

e-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp

<http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>

■ 不受 pH 条件影响的优异的酶活性

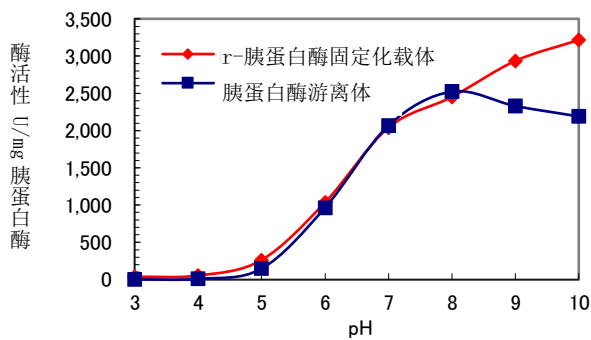
测定条件

反应缓冲液: pH3~10的缓冲液 + 10 mM CaCl₂

测定温度: 25 °C,

酶底物: BAPNA (Benzoyl-DL-arginine-p- nitranilide)

针对不同 pH 条件下的 r-胰蛋白酶固定化载体的酶活性进行了评价。通过将胰蛋白酶固定化在载体上,即使在 pH 10 等的强碱性条件下,也保持了胰蛋白酶的活性。另一方面,胰蛋白酶游离体在 pH8 时表现为最佳活性,而在大于此值的高酸碱度 pH 条件下活性降低。



■ 高温条件下的优异耐久性

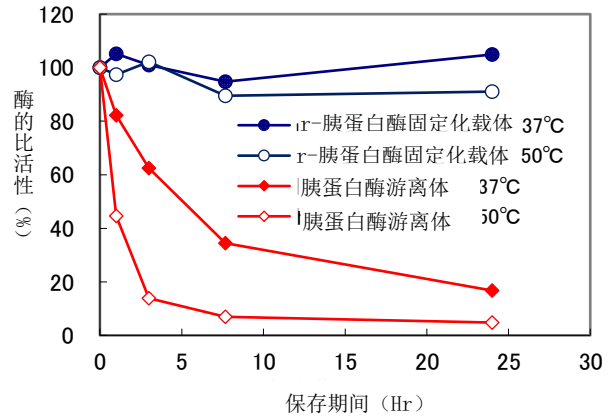
测定条件

反应缓冲液: 50 mM Tris-HCl 10 mM CaCl₂ (pH 8.0)

保存温度: 37°C 或者 50°C

酶底物: BAPNA

与游离体相比,r-胰蛋白酶固定化载体甚至可以在高温条件下使用。即使在 50° C 的高温条件下,它也保持了胰蛋白酶活性。而另一方面,即使只是在 37° C 时,游离体也会随着时间变化失去活性。这是因为胰蛋白酶游离体通过自身消化会渐渐失活。由此可知,通过 r-胰蛋白酶固定化载体将胰蛋白酶固定化在载体上,抑制了自身消化。



■ 优异的长期保存稳定性

保存条件

·保存液 : PBS + 50% 甘油

·保存温度 : 4 °C

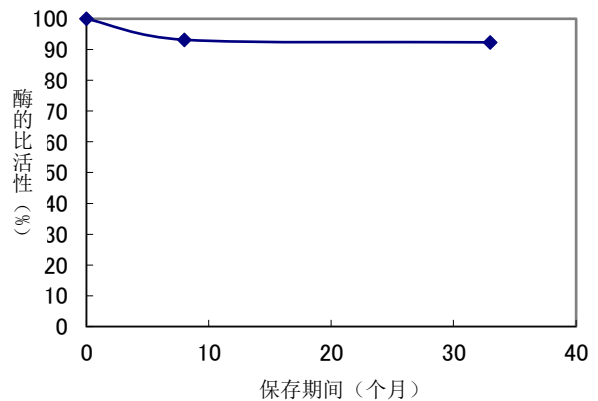
·测定方法:

反应缓冲液 : 50 mM Tris-HCl 10 mM CaCl₂ (pH 8.0)

反应温度 : 25°C

酶底物: BAPNA

r-胰蛋白酶固定化载体显示了优异的保存稳定性。在冷藏保存 (4°C) 的条件下,胰蛋白酶活性保持了 33 个月。



在有机溶剂中的胰蛋白酶活性

测定条件

反应缓冲液: 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH8.0

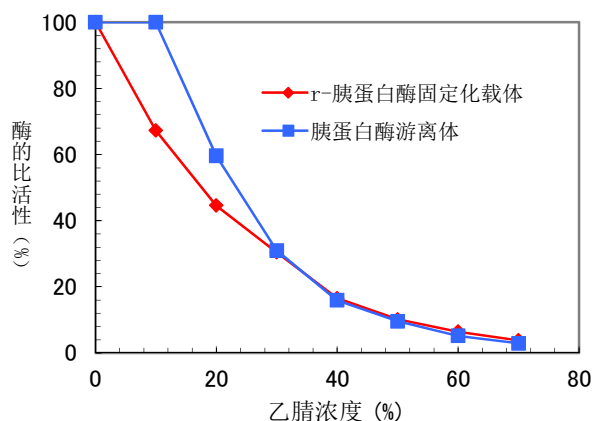
+ 0~90%浓度的有机溶剂

测定温度: 25 °C

酶底物 : BAPNA

用于生产胰岛素的有机溶剂包括二甲基亚砜 (DMSO)、N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) 和乙腈等。即在这些有机溶剂中, 它也会显示出与游离体相同的胰蛋白酶活性。从该结果可知, r-胰蛋白酶固定化载体非常适合用作生产胰岛素用的胰蛋白酶的替代物。

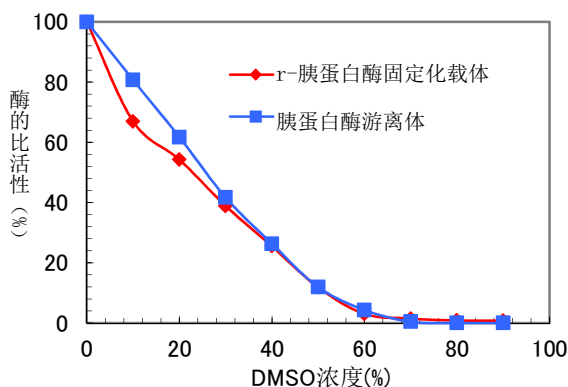
<乙腈>



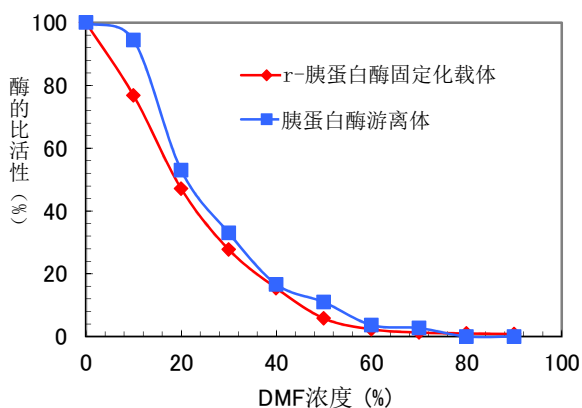
r-胰蛋白酶固定化载体的定置清洗

在层析柱中填充 r-胰蛋白酶固定化载体, 并针对定置清洗的反复试验进行了评价。

<DMSO>



<DMF>



测定条件

层析柱: 0.5 cm I.D. x 5 cm (1 ml)

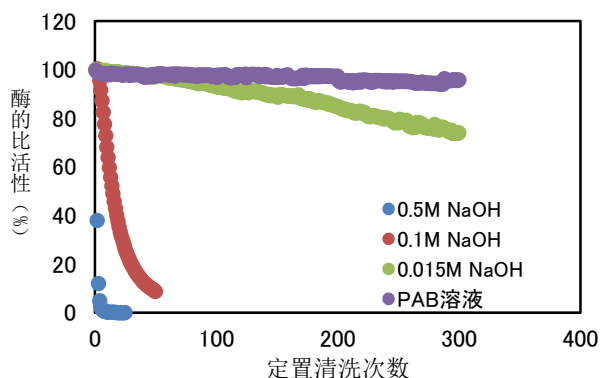
酶底物: BAPNA

测定温度: 25 °C

活性测定: 酶的比活性 = (第 n 个循环的裂解底物峰面积) / (第 1 个循环的裂解底物峰面积) × 100

层析柱方案

平衡化	5 CV	50mM Tris-HCl, 10mM CaCl ₂ , pH8.0
上样量	10 μl	10mM BAPNA in DMSO
溶出	5 CV	平衡缓冲液 检测 PDA 检测器 410 nm
定置清洗	5 CV	NaOH (0.015 M, 0.1 M, 0.5 M) 或者 PAB 溶液 : 132mM 磷酸, 184mM 乙酸, 2.4%(v/v) 苯 甲醇 (pH1.6)
清洗	5 CV	平衡缓冲液



通常情况下，层析柱的定置清洗使用的是氢氧化钠 (NaOH)。r-胰蛋白酶固定化载体具有蛋白质固定化载体所常见的特征，即由于已经将蛋白质的 r-胰蛋白酶固定化，因此其对 NaOH 的耐久性比较低。但是当使用 0.015M NaOH 进行定置清洗时，其在 200 次的反复试验中保持了 85% 的活性。此外，在使用酸性定置清洗液 PAB 溶液的试验中，进行了 300 次的定置清洗循环后，其也仍然保持了活性。

■在赖氨酸缓冲液 (pH12) 中的反复使用性

测定条件

层析柱: 0.5 cm I.D. x 5 cm (1 ml)

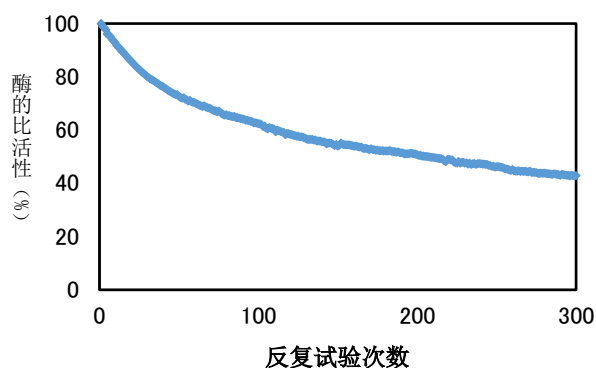
酶底物: BAPNA

测定温度: 25 °C

活性测定: 酶的比活性 = (第 n 个循环的裂解底物峰面积) / (第 1 个循环的裂解底物峰面积) × 100

层析柱方案

平衡化	5 CV	0.1 M 赖氨酸缓冲液 (pH12)
上样量	10 μl	10mM BAPNA in DMSO
溶出	5 CV	平衡缓冲液 检测 PDA 检测器 410 nm
定置清洗	5 CV	PAB 溶液: 132mM 磷酸, 184mM 乙酸, 2.4%(v/v) 苯甲醇 (pH1.6)
清洗	5 CV	平衡缓冲液



pH 12 赖氨酸缓冲液有时会用于胰蛋白酶处理。由于是在强碱性条件下的反应，因此酶活性会降低。在这次检讨试验中，反复使用 30 次后，活性保持了 80%。反复使用 300 次后，活性降至 43%。

■在 50 % DMF 中的反复使用性

测定条件

层析柱: 0.5 cm I.D. x 5 cm (1 ml)

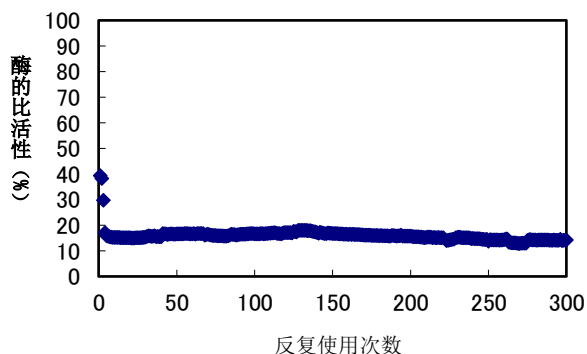
酶底物: BAPNA

测定温度: 25 °C

活性测定: 酶的比活性 = (第 n 个循环的裂解底物峰面积) / (第 1 个循环的裂解底物峰面积) × 100

层析柱方案

平衡化	5 CV	50% DMF in 0.5M Tris-HCl, pH8.7
上样量	10 μl	10mM BAPNA in DMSO
溶出	5 CV	平衡缓冲液 检测 PDA 检测器 410 nm
定置清洗	5 CV	PAB 溶液: 132mM 磷酸, 184mM 乙酸, 2.4%(v/v) 苯甲醇 (pH1.6)
清洗	5 CV	平衡缓冲液



基本上, 在 50%DMF 的存在下, 胰蛋白酶活性仅为 10-20%。在本次层析柱填充后的反复使用试验中活性也表现相同。

经过 300 次反复试验后, 用去除 DMF 的缓冲液 (50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8.0) 对胰蛋白酶的活性进行了评价, 结果酶的比活性恢复到 100%。从这个结果可以看出, 使用 50%DMF, 即使反复使用到 300 次, 胰蛋白酶活性也得到了保持。

■在强碱性条件下的反复使用性

测定条件

层析柱: 0.5 cm I.D. x 5 cm (1 ml)

缓冲液: 0.1 M 赖氨酸缓冲液 (pH 9 或者 pH 12)

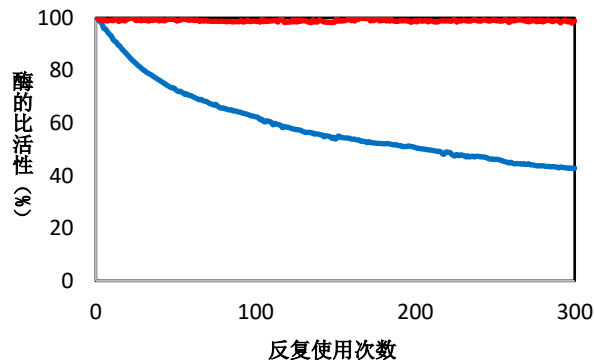
酶底物: BAPNA

测定温度: 25 °C

活性测定: 酶的比活性 = (第 n 个循环的裂解底物峰面积) / (第 1 个循环的裂解底物峰面积) × 100

层析柱方案

平衡化	5 CV	0.1M 赖氨酸缓冲液, pH9 或者 pH10
上样量	10 μl	10mM BAPNA in DMSO
溶出	7.5CV	平衡缓冲液 检测 PDA 检测器 410 nm
定置清洗	5 CV	PAB 溶液: 132mM 磷酸, 184mM 乙酸, 2.4%(v/v) 苯甲醇 (pH1.6)
清洗	5 CV	平衡缓冲液



使用 pH 9 赖氨酸缓冲液, 在反复使用 300 次后, 胰蛋白酶活性依然得以保持。而如果是使用 pH 12 的赖氨酸缓冲液, 则会引起酶活性的不可逆变化, 活性有所降低。

■在乙腈中的反复使用性

I) 50 % 乙腈 / 三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (pH 8)

测定条件

层析柱: 0.5 cm I.D. x 5 cm (1 ml)

缓冲液: 50 %乙腈 / 50 mM Tris 缓冲液, 10 mM CaCl₂ (pH 8) (V/V)

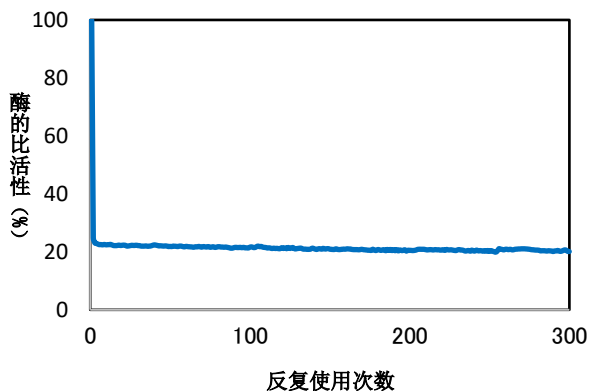
酶底物: BAPNA

测定温度: 25 °C

活性测定: 酶的比活性 = (第 n 个循环的裂解底物峰面积) / (第 1 个循环的裂解底物峰面积) × 100

层析柱方案

平衡化	5 CV	50 % 乙腈 / 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl ₂ (pH 8) (V/V)
上样量	10 μl	10mM BAPNA in DMSO
溶出	7.5CV	平衡缓冲液 检测 PDA 检测器 410 nm
定置清洗	5 CV	PAB 溶液: 132mM 磷酸, 184mM 乙酸, 2.4%(v/v) 苯甲醇 (pH1.6)
清洗	5 CV	平衡缓冲液



在 50% 乙腈的存在下，胰蛋白酶活性仅为 20%。在本次层析柱填充后的反复使用试验中活性也表现相同

经过 300 次反复试验后，用去除乙腈的缓冲液（50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8.0）对酶活性进行了评价，结果酶的比活性恢复到 100%。从这个结果可以看出，使用 50% 乙腈，即使反复使用到 300 次，胰蛋白酶活性也得到了保持。

II) 20 % Acetonitrile / Lysine buffer (pH 10 or 12)

测定条件

层析柱：0.5 cm I.D. x 5 cm (1 ml)

缓冲液：20 % 乙腈 / 50 mM 赖氨酸缓冲液，10 mM CaCl₂ (pH 10 或者 12) (V/V)

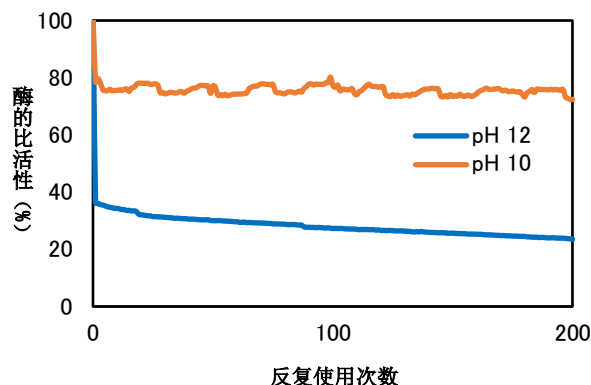
酶底物：BAPNA

测定温度：25 °C

活性测定：酶的比活性 = (第 n 个循环的裂解底物峰面积) / (第 1 个循环的裂解底物峰面积) × 100

层析柱方案

平衡化	5 CV	20 % 乙腈 / 50 mM 赖氨酸缓冲液, 10 mM CaCl ₂ (pH 10 或者 12) (V/V)
上样量	10 μl	10mM BAPNA in DMSO
溶出	7.5CV	平衡缓冲液 检测 PDA 检测器 410 nm
定置清洗	5 CV	PAB 溶液: 132mM 磷酸, 184mM 乙酸, 2.4%(v/v) 苯甲醇 (pH1.6)
清洗	5 CV	平衡缓冲液



在 20% 乙腈 (pH 10) 的条件下，胰蛋白酶活性保持在将近 80% 的状态。经过 200 次反复试验后，用去除乙腈的缓冲液（50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8.0）对酶活性进行了评价，结果酶的比活性恢复到 100%。

另一方面，在使用 20% 乙腈 (pH 12) 溶液的强碱性条件下的反复测试中，胰蛋白酶的活性随着使用次数的增加而降低。经过 200 次反复试验后，用去除乙腈的缓冲液（50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8.0）对胰蛋白酶的活性进行了评价，结果酶的活性没有恢复，而且由于不可逆的变化，导致酶活性丧失。

■ 在有机溶剂中的稳定性

测定条件

保存缓冲液:

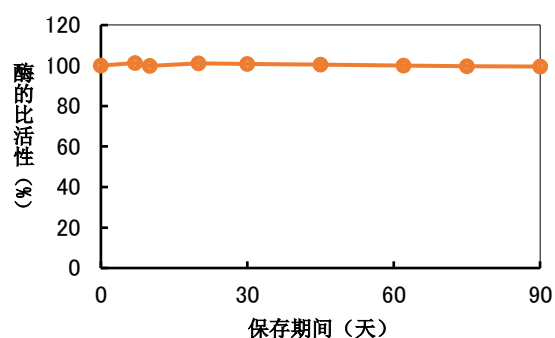
- 50 % DMF / 50 mM Tris-HCl – 10 mM CaCl₂ (pH 8)
- 50 % DMSO / 50 mM Tris-HCl – 10 mM CaCl₂ (pH 8)
- PAB 溶液

保存期间：90 天、25 °C

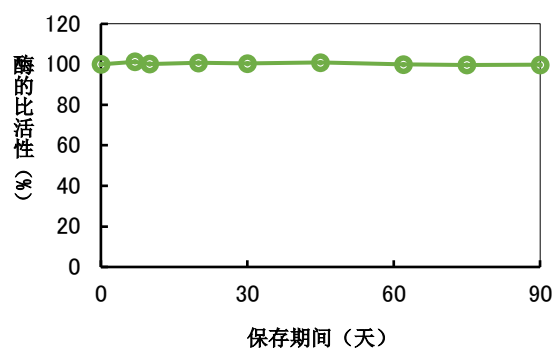
酶活性评价:

填充 1 ml 层析柱。使用 BAPNA 作为底物，在 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ (pH 8) 的条件下进行评价。

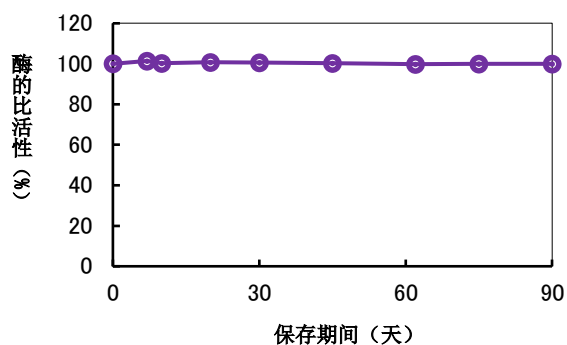
A) 50%DMF



B) 50% DMSO



C) PAB 溶液



将 r-胰蛋白酶固定化载体在每种保存液中保存一定时间后，针对胰蛋白酶的活性进行了评价，结果在每种情况下活性都得以保持。由此可以看出，r-胰蛋白酶固定化载体是对有机溶剂具有高度耐受性的酶固定化载体。

附录

胰蛋白酶活性的测定方法

试剂:

Benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BAPNA)

 反应缓冲液：50 mM Tris-HCl, 10mM CaCl₂ (pH8.0)

以上缓冲液是本资料中所记载内容的基本条件。

BAPNA 溶液：

将 100 mM BAPNA 溶解于二甲基亚砷中。

反应终止：缓冲液 33 % 乙酸 (AcOH)

测定方法:

- 1) 使用过滤器等去除保存液，并准备湿载体。
- 2) 将 0.2 g 湿载体和 980 uL 反应缓冲液添加到 2 mL 微管中，并在 25° C 下轻轻搅拌 3 分钟。
- 3) 向微管中加入 10 μL 的 BAPNA 溶液。
- 4) 在 25° C 下静置 10 分钟。然后添加 200 uL 反应终止缓冲液终止反应。

再生方法：

在过滤器或层析柱中，用 5-10 倍层析柱体积的反应缓冲液进行清洗。

保存方法

使用 PBS (pH 7) -50% 甘油来平衡载体，并在 4° C 条件下进行保存。