



## 酸性蛋白酶的测定方法及 缓冲液和底物的选择

新疆生物土壤研究所微生物研究组

### 酸性蛋白酶的测定方法

福林—酚试剂显色反应法的原理是:福林试剂(磷酸和钼酸的混合物),在碱性条件下极不稳定,可被酚类化合物还原,因而呈蓝色反应(钼蓝和钼蓝的混合物)。由于蛋白质分子中含有带酚基的氨基酸,利用蛋白酶分解蛋白质(底物),生成含酚基的氨基酸,与福林试剂作用,因而也呈蓝色反应。显色程度与底物在酶作用下产生的水解产物数量成正比,因此可推算出酶活力。具体说来就是在一定的 pH 值和温度条件下,酶液与底物作用一定时间后,加入三氯乙酸以终止酶反应,并使残存的蛋白质底物沉淀,与水解产物分开,经过滤后,用碳酸钠碱化滤液,再加入福林试剂使之显色,在一定波长下的分光光度计或光电比色计上测定光密度,计算出酶活力。

在酶—底物—试剂的全部反应过程中,要以适宜的缓冲液保持比较恒定的 pH 值条件。本试验以同一种方法比较了三种缓冲液。蛋白质底物,有的采用酪蛋白,亦有的用血红蛋白。本试验对这两种底物也进行了比较。所测的酸性蛋白酶有上海市工业微生物研究所和上海市酒精厂试制的黑曲霉(*Aspergillus niger*) 3.350 酸性蛋白酶制剂,新疆生物土壤研究所与新疆军区生产建设兵团化工厂试制的白字佐美曲霉(*Aspergillus shiuousamii*) 7401 酸性蛋白酶制剂。

#### (一) 试剂的制备

1. 福林试剂 于 2000 毫升蒸馏瓶内装入钨酸钠 100 克,钼酸钠 25 克,蒸馏水 700 毫升,85% 磷酸 50 毫升,浓盐酸 100 毫升,轻微回流煮沸 10 小时,然后加入硫酸锂 50 克,蒸馏水 50 毫升,溴水数滴,摇匀,拆掉冷凝装置,再煮沸 15 分钟,以除去多余的溴,混合液冷却后若呈绿色,应再加溴水,再煮沸除溴,冷却后加蒸馏水稀释至 1000 毫升,混合均匀,过滤,滤液呈金黄色即合于要求,将它贮于棕色瓶中备用,用时再以蒸馏水稀释至 3 倍。

2. 0.55M 碳酸钠 称取碳酸钠 58.3 克,以少量蒸馏水加热溶解,然后定容至 1000 毫升。

3. 10% 三氯乙酸 称取三氯乙酸 100 克,溶于蒸馏水中,定容至 1000 毫升。

#### (二) 底物的制备

1. 0.5% pH3.0 酪蛋白 称取酪蛋白 0.5 克,加约 50 毫升 0.05M pH3.0 乳酸—乳酸钠缓冲液调溶,然后加热煮沸,至清晰透明状,冷却后再以上述缓冲液定容至 100 毫升,若有泡沫,可加 1—2 滴无水酒精消除。此溶液应随用随配,不宜保持时间过长,若有异味不能用。平常应保存在冰箱中。

2. 0.5% pH3.0 国产血红蛋白 称取国产血红蛋白 0.5 克,用约 50 毫升 0.02N 盐酸溶解后过滤,再以此盐酸经多次洗涤滤渣,滤液定容至 100 毫升。

3. 1.5% pH3.0 进口血红蛋白 称取进口血红蛋白 1.5 克,按上述方法配成 100 毫升溶液。

#### (三) 缓冲液的配制

1. 0.05M 乳酸—乳酸钠 pH3.0 缓冲液配法如下:

甲液: 0.2M 乳酸液。称取乳酸 9 克,加蒸馏水定容至 500 毫升。

乙液: 0.2M 乳酸钠液。称取乳酸钠 11 克,加蒸馏水定容至 500 毫升。

甲液和乙液以 5:1 混合,再加 3 倍于混合液的蒸馏水,即为 0.05M 乳酸—乳酸钠 pH3.0 的缓冲液。

2. 0.2M 磷酸氢二钠—0.1M 柠檬酸 pH3.0 缓冲液配法如下:

甲液: 称取 35.61 克磷酸氢二钠(含 2 个结晶水),用蒸馏水溶解后定容至 1000 毫升。

乙液: 称取 21.01 克柠檬酸(含 1 个结晶水),用蒸馏水溶解后定容至 1000 毫升。

甲液和乙液以 41.1:158.9 混合即可。

3. 0.1M 柠檬酸—柠檬酸钠 pH3.0 缓冲液配法如下:

甲液: 即上面 2 的乙液。

乙液: 称取 29.4 克柠檬酸钠(含 2 个结晶水),用蒸馏水溶解后定容至 1000 毫升。

甲液和乙液以 18.6:1.4 混合即可。

#### (四) 标准曲线制作

为了确定酪氨酸量与光密度(OD)值的对应关系,需要事先以不同浓度的酪氨酸标准溶液与福林试剂反

应显色,测定其光密度(OD)值,绘制标准曲线。可分甲、乙两法。

1.100 微克/毫升酪氨酸溶液配制 称取经 105℃ 烘干至恒重的酪氨酸 100 毫克,逐步加入 0.1N 盐酸

溶解,定容至 100 毫升,即得 1 毫克/毫升的酪氨酸溶液,保存于冰箱中。用时取 10 毫升,再用 0.1N 盐酸定容至 100 毫升,即得 100 微克/毫升酪氨酸溶液。

2.配制不同浓度的标准酪氨酸溶液 取 11 支试

表1 不同浓度的酪氨酸标准溶液

蒸馏水(毫升)	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
100微克/毫升酪氨酸(毫升)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
酪氨酸标准溶液浓度(微克/毫升)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

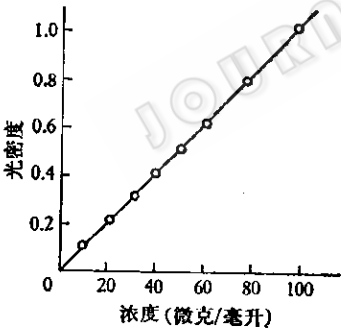
注:此表可供甲、乙两法用。

表2 酪氨酸标准溶液浓度(微克/毫升)与光密度(OD)关系

标准液浓度 光密度	10	20	30	40	50	60	—
OD <sub>1</sub>	0.095	0.205	0.310	0.410	0.530	0.620	—
OD <sub>2</sub>	0.105	0.210	0.315	0.420	0.530	0.630	—
ΔOD	0.100	0.208	0.313	0.415	0.530	0.625	—

管,按下表顺序分别加入蒸馏水和上述酪氨酸溶液。

甲法:取不同浓度的酪氨酸标准溶液 1 毫升于试管中,每种做两个平行管,分别加入 0.55M 碳酸钠 5 毫升和稀释至 3 倍的福林试剂 1 毫升,置于 40℃ 恒温水浴中显色 15 分钟后,以分光光度计在波长 680 毫微米测定光密度(OD),结果如表 2。



以 ΔOD 值为纵座标,酪氨酸标准溶液浓度为横座标,绘制标准曲线如图,要求以 0 为起点,各对应点基本上呈一直线。求出 OD 值为 1 时酪氨酸微克/毫升数为 K 值,即比色常数。

K 值的求得方法:

$$K_{20} = \frac{20}{0.208} \approx 96.1$$

$$K_{30} = \frac{30}{0.313} \approx 95.8$$

$$K_{40} = \frac{40}{0.415} \approx 96.3$$

$$K = \frac{96.1 + 95.8 + 96.3}{3} \approx 96$$

根据图标和计算,确定 K 值为 96。

乙法:取不同浓度的酪氨酸标准溶液 1 毫升于试管中,每种做两个平行管,分别加入 0.5% 酪蛋白 2 毫升,置于 40℃ 水浴中反应 15 分钟,再加 10% 三氯乙酸 3 毫升,沉淀 5 分钟后过滤,分别取滤液 1 毫升加于事先准备好的对应试管中,再加 0.55M 碳酸钠 5 毫升和稀释至 3 倍的福林试剂 1 毫升,置于 40℃ 水浴中显色 15 分钟,用分光光度计在 680 毫微米测其光密度 OD<sub>1</sub>。

另外,对照管与上述操作相同,仅在加酪蛋白前加三氯乙酸,同样反应和显色,测其光密度 OD<sub>2</sub>。

将 ΔOD = (OD<sub>1</sub> - OD<sub>2</sub>) 乘以 6 作纵座标,以酪氨酸浓度为横座标,绘制标准曲线。求出 OD 为 1 时酪氨酸的微克/毫升数即 K 值。

根据实验,甲法和乙法所求得的 K 值基本相同,为简化手续,采用甲法比较方便。

### (五) 酸性蛋白酶活力的测定

1. 酶液的稀释 为了按公式计算准确起见,在测定时必须使酶活力与光密度呈直线关系。因此需将酶液稀释一定倍数,使测定时光密度能在 0.2—0.3 之间的范围内,这个范围相应的酶活力大概在 10—15 单位/毫升。

具体做法:精确称取酶粉 2.00 克,用约 100 毫升 0.05M 乳酸-乳酸钠缓冲液调溶,然后用蒸馏水定容在 200 毫升容量瓶中,振荡使其充分溶解。吸取一定量

表3 加入试剂的量

试 剂 \ 管 号	对 照	1	2	3	备 注
酶液(毫升)	1	1	1	1	
10%三氯乙酸(毫升)	3	0	0	0	加后置 40℃ 水浴中预热片刻
0.5%酪蛋白或血红蛋白(毫升)	2	2	2	2	待试液预热 2 分钟后加,准确反应 15 分钟
10%三氯乙酸(毫升)	0	3	3	3	静置 5 分钟后过滤

的上清液用上述缓冲液定容在一定量的容量瓶中摇匀待用(如果上清液混浊,则需过滤)。若酶粉活力为 20,000 单位/克,为达到上述的要求范围,上清液用缓冲液定容应达到再稀释 20 倍方可。

2. 测定步骤 首先将底物在 40℃ 水浴中预热,取试管 3—4 支编号,并严格按表 3 顺序加入各种溶液。

分别吸取酶滤液 1 毫升于事先编好号的对应试管中,再加入 0.55M 碳酸钠 5 毫升和稀释至 3 倍的福林试剂 1 毫升,摇匀后置 40℃ 水浴中显色 15 分钟,以对照管为空白,用 72 型分光光度计 680 毫微米测定光密度。

3. 计算 根据定义,在 40℃, pH3.0 的条件下,每克酶制剂分解酪蛋白或血红蛋白每分钟产生 1 微克酪氨酸为蛋白酶的一个活力单位,计算公式如下:

$$\text{活力单位(Pu)} = \frac{6}{15} \times K \times OD \times N$$

K——标准曲线中 OD 为一时酪氨酸微克/毫升

N——酶液稀释总倍数

$\frac{6}{15}$ ——全部试剂总体积为 6 毫升,故乘以 6;测定

共反应 15 分钟,故除以 15。

## 不同缓冲液和不同底物的 试验及结果

本试验以三种缓冲液:① 0.05M 乳酸-乳酸钠溶液,② 0.2M 磷酸氢二钠-0.1M 柠檬酸溶液,③ 0.1M 柠檬酸-柠檬酸钠溶液,分别溶解酸性蛋白酶液体深层发酵制剂和固体曲发酵制剂。再分别以两种蛋白质底物:

表4 同一底物三种缓冲液比较

酶 缓冲液 光 密 度	液体发酵酶制剂(1.2万单位/克)			固体曲发酵酶制剂(5.5千单位/克)		
	乳酸乳酸钠	磷酸氢二钠柠檬酸	柠檬酸柠檬酸钠	乳酸乳酸钠	磷酸氢二钠柠檬酸	柠檬酸柠檬酸钠
OD <sub>1</sub>	0.285	0.278	0.295	0.295	0.265	0.306
OD <sub>2</sub>	0.295	0.277	0.300	0.278	0.275	0.304
OD <sub>3</sub>	0.280	0.274	0.310	0.275	0.278	0.297
ΔOD	0.285	0.276	0.302	0.283	0.273	0.302
活力(单位/克)	10982.0	10598.0	11596.0	5433.5	5241.5	5798.0

表5 同一缓冲液不同底物比较

酶 底 物 光 密 度	液体发酵酶制剂(1.2万单位/克)			固体曲发酵酶制剂(5.5千单位/克)		
	0.5%酪蛋白	0.5%国产血红蛋白	1.5%进口血红蛋白	0.5%酪蛋白	0.5%国产血红蛋白	1.5%进口血红蛋白
OD <sub>1</sub>	0.340	0.470	0.560	0.278	0.325	0.356
OD <sub>2</sub>	0.340	0.475	0.540	0.275	0.325	0.350
OD <sub>3</sub>	0.340	—	—	0.278	—	—
ΔOD	0.340	0.472	0.550	0.277	0.325	0.353
活力(单位/克)	13056.0	18124.8	21120.0	5318.5	6240.0	6777.6

①0.5%酪蛋白,②0.5%国产血红蛋白或1.5%进口血红蛋白,进行了酶活力的对比测定,结果于下:

1.在同一底物的条件下,以三种不同的缓冲液溶解酶制剂,所测结果如表4。

由表4看出,在同一底物的条件下,以三种不同的缓冲液分别溶解液体深层发酵和固体曲发酵生产的酸性蛋白酶制剂,所测得的酶活力,对同一种酶制剂而言,基本上是一致的,可见三种不同的缓冲液对缓冲酸性蛋白酶酶促反应pH值条件的效果是大致相同的。

2.在同一缓冲液的条件下,分别以不同底物试验,所测结果如表5。

表5表明,底物不同时测定酶活力的结果也有所不同。一般多采用酪蛋白作底物。酪蛋白和血红蛋白均可作为底物,但由于不同底物下测出的酶活力差异较显,因此在研制和应用中宜选定一个底物,不要随意更改,特别是试验与投产,作为测定酶活力的底物,前后要一致,以免对酶活力控制不当给生产造成损失。