

# 固定化酶新载体-N'-ε-甲基丙烯酰胺基己酸酯的研究\*

陆承勋

(北京大学化学系)

李德昌

(北京大学生物系)

## 摘 要

合成了一种新的反应性聚合物聚 N-ε-甲基丙烯酰胺基己酰氧-5-降冰片烯-2, 3-双甲酰亚胺 [P(MACONB)], 其相应的新单体 N-ε-甲基丙烯酰胺基己酰氧-5-降冰片烯-2, 3-双甲酰亚胺 (MACONB), 是由 N-ε-甲基丙烯酰胺基己酸 (MACOH) 与 N-羟基-5-降冰片烯-2, 3-双甲酰亚胺 (HONB) 在环己基羰二亚胺存在下经偶联成酯反应而得。反应性聚合物 P(MACONB) 是一个较好的固定化胰蛋白酶的载体, 它极易与胰蛋白酶在温和反应条件下进行胺解反应, 形成一个具有较高酶活力的固定化胰蛋白酶。

在以前的工作中<sup>[1-3]</sup>, 我们系统地研究了生物活性丙烯酸酯及生物活性 N-对甲基丙烯酰胺基苯甲酸酯的合成, 聚合以及聚合物与胰蛋白酶或血清蛋白质的固定化, 本文结果说明反应性聚合物的结构, 如侧基的结构及其能与蛋白质进行胺解反应的活性酯基团的结构均对固定化酶的活力有着显著的影响。例如在合成反应性聚合物的大分子碳碳主链与蛋白质分子之间引进一个疏水性及刚性的苯环骨架作为“手臂” (Spacing arm) 以及又选用对脂肪胺具有专一性胺解反应能力的 (HONB) 的活性酯基团与蛋白质进行偶联时, 则可获得较好活力的固定化酶。

为了深入研究高聚物的“手臂”的结构, 考察柔软的次甲基链, 如—(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>—的手臂对固定化酶活力的影响, 我们合成了具有这种结构的新单体, N-ε-甲基丙烯酰胺基己酰氧-5-降冰片烯-2, 3-双甲酰亚胺 (MACONB, III) 及其聚合物 [P(MACONB), IV], 并研究了此载体与胰蛋白酶的固定化。

## 实 验 部 分

**原料:** (1) N-羟基-5-降冰片烯-2, 3-双甲酰亚胺 (HONB, I); 按 Bauer 及 Mirka 的方法<sup>[4]</sup>合成, 熔点 165—166℃, 与文献值<sup>[4]</sup>相符; N-ε-甲基丙烯酰胺基己酸 (MACOH, II), 按 Shibaev 等的方法<sup>[7]</sup>合成, 熔点 49—50℃, [文献值<sup>[7]</sup>为 53℃]; (2) 胰蛋白酶: 从

\* 1981年3月9日收到。

牛胰脏中提取,一次结晶的牛胰蛋白酶的蛋白质含量为 50%,用 BAPA 法测定比活力为 12.6U/毫克蛋白。(3)单体合成 N-ε-甲基丙烯酸酰胺基己酰氧基-5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚胺 (MACONB, III),在三口瓶中加入 4.5 克(0.025 克分子)的 N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚胺 (HONB),4.9 克(0.025 克分子) N-ε-甲基丙烯酸酰胺基己酸 (MACOH),及 80 毫升的无水四氢呋喃 (THF),搅拌使其成为均相后,用冰盐浴冷却使内温至 0—5℃,再加入 5.1 克(0.025 克分子)的 N,N'-二环己基羰二亚胺 (DCCI),先在 0—5℃ 后在室温各反应 2 小时。反应完毕,吸滤,除去 N,N'-二环己基脲的结晶物,迴旋蒸馏除去 THF 至原混合溶液体积的 1/4 时止,随后将剩余的溶液倒至 400 毫升正庚烷中,析出的无色粉末状物重 6.2 克,熔点 75—79℃。经苯及正己烷的混合溶剂(体积比为 1:1)重结晶,得熔点为 86—87℃ 的无色颗粒状结晶物,重 5.1 克,产率 57%。IR (KBr):1780(内酰亚胺的羰基);3300 (νN-H);1730 厘米<sup>-1</sup>(酯基的羰基),NMR (CDCl<sub>3</sub>):ppm, 2.03(S, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.27—1.83 (m, 8H,  $-\text{CH}_2\text{--}$ ), 及  $-\text{CH}_2\text{--}$ ); 2.53(t, 2H,  $-\text{CH}_2\text{--CO--}$ ); 3.23—3.35 (m, 4H,  $-\text{CH}_2\text{--N}$  及  $-\text{CH--}$ ); 3.41(S, 2H,  $-\text{CH--}$ ); 5.27, 5.53(2S, 2H,  $\text{CH}_2 = \text{C}$ ); 5.93(S, 1H,  $-\text{CONH--}$ ); 6.13 (S, 2H,  $-\text{CH}=\text{CH--}$ )

分析: C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 计算值: C, 63.71%; H, 6.71%; N, 7.77%; 实测值: C, 63.35%; H, 6.60%; N, 7.74%。

**聚合反应:** 聚 N-ε-甲基丙烯酸酰胺基己酰氧基-5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚胺 [P(MACONB), IV] 的制备,是在洗净烘干的,具有进出气两个侧管的磨口聚合管中,加入 2.0024 克的(MACONB)单体,12 毫克偶氮二异丁腈(AIBN)及 20 毫升的无水二甲基甲酰胺 (DMF),通氮气约 20 分钟后,再关闭进出口的测管,将聚合管放入 60℃ 的恒温槽中聚合 24 小时,聚合完毕,将聚合液缓慢地倒至 300 毫升的蒸馏水中,搅拌,则析出絮状物。过滤,经真空加热干燥至恒重,得无色粉末状聚合物,重 1.4848 克,转化率为 74%,特性粘度为 0.11,(溶剂为 DMF,浓度为 0.5g/dl,温度为 30℃),IR(KBr):1780 (内酰亚胺的羰基);1730 厘米<sup>-1</sup>(酚基的羰基),NMR (CDCl<sub>3</sub>):ppm, 6.13 (S, 2H,  $-\text{CH}=\text{CH--}$ )。

分析: (C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>; 计算值: C, 63.31%; H, 6.71%; N, 7.77%; 实测值: c, 62.87%; H, 6.85%; N, 7.60%。

**胰蛋白酶的固定化:** P(MACONB)-胰蛋白酶:称取 P(MACONB)载体 100 毫克和胰蛋白酶 50 毫克(蛋白质含量为 50%),分别放入小烧杯中,胰蛋白酶先用 5 毫升水使之溶解,倒入盛有载体的烧杯中,容器再用 2—3 毫升水洗涤两次,将烧杯放在电磁搅拌器上进行偶联反应,同时用 pH 酸度计观察偶联反应液中 pH 值的变化,随时用 0.1 N NaOH 调 pH 值(7.6—8.0),在室温下反应 2—3 小时即可。反应液在 10,000 rpm 离心分离 15 分钟,倾出上清液,离心管内沉淀物加 3—5 毫升水,用玻棒搅拌后离心,如此重复两次,将离心后上清液合并装入透析袋中,置冰箱中透析 24—48 小时,离心管内的固相载体放真空干燥器中干燥。

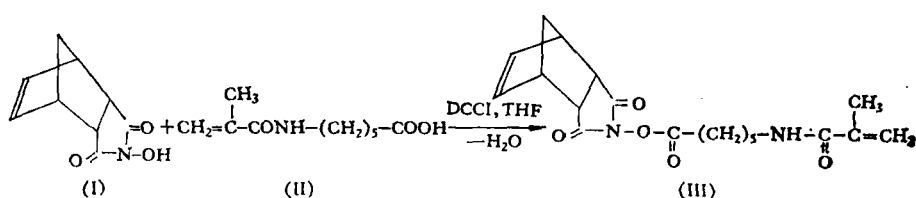
**Folin-酚法测定剩余蛋白含量:** 将经透析的离心上清液分别定容至 25 毫升,吸取 0.5—1.0 毫升溶液放入试管中,先后加入试剂甲、乙,在 30℃ 恒温半小时,用 721 型分光光

度计在 500nm 下测定 OD 值,从标准曲线中查出蛋白含量,再以偶联前含蛋白量相减,测得 P(MACONB) 载体偶联胰蛋白酶量为 96 毫克·克载体<sup>-1</sup>

DL-BAPA 法测定固相载体的相对酶活力: 称固定化胰蛋白酶 10 毫克,加入 5 毫升 DL-BAPA 溶液(N-苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基苯胺),振荡 5 分钟后,在 30℃ 恒温 10 分钟(时间要准确),立刻加入 1 毫升 30% 乙酸,摇匀后过滤,滤液在 410nm 下测 OD 值,根据胰蛋白酶活力标准曲线可换算出固定化前、后酶活力回收的相对百分比, P(MACONB) 胰蛋白酶的活力回收为 24%。

## 结果与讨论

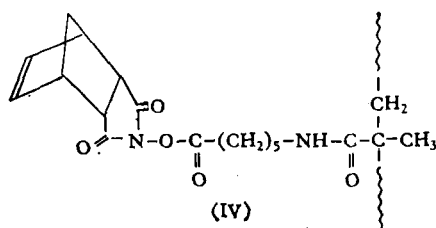
我们最近研究<sup>[5]</sup>中,发现将 HONB 或 HOSu (N-羟基丁二酰亚胺)的活性酯基团对脂肪胺具有专一性胺解反应,作为一个基本反应而用在固定化酶的偶联反应中,则有利于提高固定化酶的活力,为此本文在合成新单体(MACONB)时,先按文献[7]合成了具有柔软侧基的羧酸化合物 N-ε-甲基丙烯酰胺基己酸(MACOH, II),然后用活化羧基反应,使其-COOH 基在羰二亚胺(DCCl)作用下与 HONB 反应,经脱水使分子中具有一 COONB 活性酯基团的单体(III)。



新单体 III 是一个具有固定熔点的无色颗粒状结晶,溶于丙酮、苯、乙醇和二甲基甲酰胺,不溶于正己烷和正庚烷,在湿空气中稳定。

红外吸收光谱及核磁共振谱分析证明,此新单体有一 COONB 活性基团又有碳碳双键结构,如图 1 所示,在 1800 及 1780 厘米<sup>-1</sup>处有内酰亚胺羰基的特征峰,在 930 厘米<sup>-1</sup>处有 CH<sub>2</sub>=C< 基的特征吸收峰;在核磁谱图中,5.27 及 5.53ppm 处有 CH<sub>2</sub>=C< 基的二个氢面积的双单峰,在 6.13ppm 处有降冰片烯基上的一 CH=CH—二个氢面积的单峰。

单体 III 在偶氮二异丁腈(AIBN)引发聚合得可溶性的聚合物 P(MACONB)(IV),IV 能溶于氯仿、丙酮和 DMF 中。经 NMR 分析证实,此单体的聚合反应与文献[1,5]的一样,其结构如下:



均聚物 IV 与 III 比较,在 NMR 谱图上 III 单体中的 CH<sub>2</sub>=C< 基的二个氢所形成的双单峰全部消失,而降冰片烯基中的一 CH=CH—的二个氢的单峰仍保留在 6.13

ppm 处;在 IR 谱图上,酰胺基的羰基的特征峰与  $\text{CH}_2=\text{C}$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$  特征峰重叠,但在  $930\text{ 厘米}^{-1}$  处清楚地观察到 III 单体中的  $\text{CH}_2=\text{C}$  基的 C—H 键的面外振动特征峰,而在其聚合物的谱图中已经消失(见图 1)。

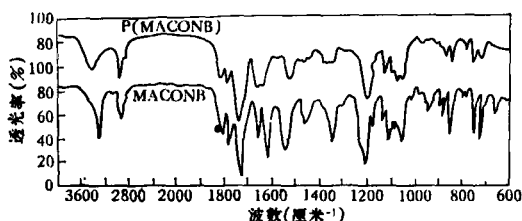
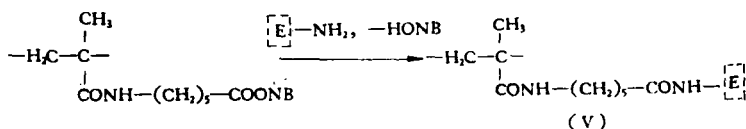


图 1 MACONB (III) 及其相应的 P(MACONB) (IV) 聚合物的红外吸收光谱 (KBr)

均聚物 IV 是一个反应性聚合物,其侧链上有一  $-\text{COONB}$  活性酯基团存在,其能在室温下有选择地与胰蛋白酶分子上的  $\alpha$ -或  $\epsilon$ -胺基进行胺解反应得到固定化酶 P(MACONB)-胰蛋白酶 (V),此固定化酶的偶联量是  $96\text{ 毫克} \cdot \text{克载体}^{-1}$ ,酶活力回收为 24%。



将本文与文献[1,4,5]的实验结果列于表 1 中,从表 1 看出,在相同偶联反应,即均采用  $-\text{COONB}$  活性酯基团的胺解反应并在相同的偶联反应条件下,不同手臂结构的反应性聚合物对其所得的相应固定化酶的性质是有显著影响的。如在偶联胰蛋白酶的能力上,以带有柔软性手臂  $-(\text{CH}_2)_5$  的 P(MACONB) 为最差,  $96\text{ 毫克} \cdot \text{克载体}^{-1}$ ,在固定化胰蛋白酶的酶活力回收百分率上,以带有刚性苯环手臂的 P(MABONB) 为最高,其回收酶活力是无手臂结构的 P(MONB) 的四倍左右。其次是含有柔软性手臂的 P(MACONB),其回收酶活力是无手臂结构的 P(MONB) 的三倍左右。

以上结果说明,聚合物的“手臂”结构对于固定化胰蛋白酶的保留酶活力及偶联酶量存在着下述规律性:如在合成反应性单体及相应的聚合物时,其反应性基团  $-\text{COONB}$  与主链的碳碳大分子链间,可以引入一个疏水性的,刚性的苯环骨架,或是柔软的次甲基链  $-(\text{CH}_2)_5$  骨架的“手臂”式结构,都会对固定化了的酶产生有疏水性的相互作用或减弱聚合物(载体)引起的空间障碍的影响,从而有利于保持较高的酶活力。又如引入苯环骨架的效果要比引入柔软的  $-(\text{CH}_2)_5$  骨架为好,这是由于易弯曲的  $-(\text{CH}_2)_5$  碳链具有又折叠回去的特性,这就有可能将部分的反应性基团如  $-\text{COONB}$  被卷曲在内,从而减少了它与蛋白质发生反应的机率,在另一方面,当蛋白质被偶联至 P(MACONB) 载体上后,其固定化胰蛋白酶的活力可能会受到柔软性  $-(\text{CH}_2)_5$  碳链的影响。与含有刚性苯环载体的固定化酶相比,则 P(MACONB) 载体易引起空间位阻影响,所以其偶联酶量及保留酶活力值上均低于具有一个刚性苯环骨架作为手臂的固定化胰蛋白酶 [P(MABONB)-胰蛋白酶]。再如即使是引入柔软的  $-(\text{CH}_2)_5$  作为骨架,其保留酶活力还是比“无手臂”结构的要高三

倍左右, 即 P(MACONB)-胰蛋白酶 > P(MONB)-胰蛋白酶。这说明合成具有一定长度的, 柔软性的次甲基链作为“手臂”介于蛋白质与载体之间, 也可作为提高固定化酶活力的一种重要手段。

表 1 固定化胰蛋白酶的偶联量及保留回收酶

| 固定化酶                    | P(MABONB)-<br>胰蛋白酶*                                                                                                                                                                                      | P(MACONB)-<br>胰蛋白酶                                                                                                                                                                                                                                                | P(MONB)-<br>胰蛋白酶*                                                                                                         | 备<br>注       |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 结 构 式                   | $  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  -\text{H}_2\text{C}-\text{C}- \\    \\  \text{C}=\text{O} \\    \\  \text{NH} \\    \\  \text{C}_6\text{H}_4 \\    \\  \text{CONH}-[\text{E}]  \end{array}  $ | $  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  -\text{H}_2\text{C}-\text{C}- \\    \\  \text{C}=\text{O} \\    \\  \text{NH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CONH}-[\text{E}]  \end{array}  $ | $  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  -\text{H}_2\text{C}-\text{C}- \\    \\  \text{CONH}-[\text{E}]  \end{array}  $ | 三种载体偶联反应条件相同 |
| 偶联量毫克·克载体 <sup>-1</sup> | 147                                                                                                                                                                                                      | 96                                                                                                                                                                                                                                                                | 122                                                                                                                       |              |
| 保留酶活力 (%)               | 31                                                                                                                                                                                                       | 24                                                                                                                                                                                                                                                                | 8                                                                                                                         |              |

\* 根据文献[1,4,5]的实验结果。

## 参 考 文 献

- [1] Lu Chengxun, Feng Xinde, Wang Chongqing and Dechang, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **18**, 2411(1980).
- [2] 陆承勋, 顾忠伟, 冯新德, 王重庆, 李德昌, 高分子通讯, **1980**(4), 240.
- [3] 陆承勋, 屈立年, 冯新德, 科学通报, **25**, 589(1980).
- [4] 陆承勋, 王东法, 冯新德, 李德昌, 李丽娟, 科学通报, **26**, 214(1981).
- [5] Lu Chengxun, Yang Jijin, Leng Liecheng, Feng Xinde and Li Dechang, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, to be published.
- [6] Bauer, L., and Miarka, S. T., *J. Org. Chem.*, **24**, 1293(1959).
- [7] Shibaev, V. P., Plate, N. A., and Feidzon, Ya, S., *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **17**, 1655(1979).
- [8] Erlanger, B., Kokowsky, N., and Cohen, W., *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 271(1961).

## STUDIES OF A NEW IMMOBILIZED ENZYME CARRIER N-ε-METHACRYLAMID CAPRONIC ESTER

Lu Chengxun

Li Dechang

(Department of Chemistry, Peking University) (Department of Biology, Peking University)

## ABSTRACT

A new poly (N-ε-methacrylamidocaproxyloxy-5-norbornene-2, 3-dicarboximide) was obtained by radical polymerization of corresponding monomer, in turn prepared by coupling of ε-methacrylamidocaproic acid with N-hydroxy-5-norbornene-2, 3-dicarboximide in the presence of dicycl ohexylcarbodiimide. The new polymer proved to be good carrier for the immobilization of trypsin. This immobilized trypsin had rather high enzymatic activity.