

研究报告

亲和色谱用无色合成配基对胰蛋白酶纯化功能的研究

杨 利 高昆玉* 程侣柏* 邹汉法 张玉奎

(中科院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心 大连 116011) * (大连理工大学 大连 116012)

提要 考察了一种新型的阳离子无色三嗪化合物、几种阴离子无色三嗪化合物和三嗪染料作为亲和色谱配基对胰蛋白酶的吸附性能。猪胰蛋白酶经阳离子型配基一步纯化,比活达到116U/mg,纯化21.6倍,回收率88%。

关键词 亲和色谱, 无色三嗪配基, 胰蛋白酶

1 前言

在整个生物技术的研究和开发中,下游产品的分离与纯化占有十分重要的地位。亲和色谱是分离纯化生物大分子的重要手段,由于其配基对生物大分子可逆的特异性结合,纯化效果远优于其它方法,但所用配基大都是从特定组织中提取出来的价格昂贵的生物小分子,如辅酶、抑制剂、抗体或抗原等。染料配基亲和色谱是以活性染料为配基的纯化生物大分子的分离技术,它比传统的生物配基亲和色谱具有取材广泛、价格低廉、结合容量大、稳定性好、易与载体偶联、适用范围广、通用性好等优点^[1]。因此,染料配基已成为亲和色谱纯化生物大分子的重要组成部分。通过研究系列葱醌染料与蛋白质相互作用的机制发现,染料分子中的葱醌环并非必要的功能基团,而与三嗪环连接的尾基结构(氨基苯磺酸异构体等)和桥基结构(苯二氨类异构体)对蛋白的吸附容量及选择性有显著影响^[2]。为此,我们设计并合成了六个不带葱醌环的均三嗪无色配基,实验结果表明,它们对小牛肠碱性磷酸单酯酶的分离纯化效果比Cibacron Blue F3GA还好^[3,4]。本文在此基础上将合成的带有阴、阳离子基团的无色三嗪化合物及染料作为亲和色谱配基,研究了对胰蛋白酶的纯化。

2 材料和方法

2.1 材料

牛胰蛋白酶、Sephacrose CL-4B和考马斯亮蓝G-250分别购自Sigma公司、Pharmacia公司、Fluka公司;猪胰蛋白酶粗品由大连理工大学生化工程实验室提供,作为参照的染料配基是本实验室合成的;其它试剂均为国产分析纯试剂。

2.2 实验方法

2.2.1 配基的合成及固定化 参考文献[4~6]。

2.2.2 酶和蛋白的检测 胰蛋白酶和糜蛋白酶活性的检测参考文献[7],蛋白质含量检测用考马斯亮蓝法^[8],以牛血清白蛋白为标准。

2.2.3 粗酶液的制备 将猪胰蛋白酶粗品500mg(干粉)加入到平衡缓冲液中,于4℃下振荡3h,离心(4000r/min)10min。上清液在4℃下对平衡缓冲液透析过夜。透析过的酶溶液使用前需离心5min(由于材料的限制,考察配基吸附影响因素和柱色谱分离时分别采用了牛胰蛋白酶和猪胰蛋白酶)。

2.2.4 染料及无色配基对胰蛋白酶的初分离 染料或无色配基吸附介质(0.5g湿凝胶)悬浮于装有2mL 0.1mol/L醋酸盐缓冲溶液[含46U胰蛋白酶,0.02mol/L CaCl₂和0.05mol/L NaCl, pH 4.0(阴离子配基)或pH 5.5(阳离子配基)]的试管中,室温下,试管在振荡器中缓慢振荡30min,凝胶自然沉降后,检测上清液中的酶活性及蛋白含量。用平衡缓冲液洗掉未吸附的酶,然后用1mol/L KCl解吸结合酶,再测上清液中的酶活性及蛋白含量。

2.2.5 染料及无色配基对猪胰蛋白酶的柱色谱分离过程 将经透析的胰蛋白酶粗酶萃取液(5mL,含114U胰蛋白酶、312U糜蛋白酶,胰蛋白酶比活为5.3U/mg)加到用0.1mol/L醋酸盐缓冲液(对于阴离子配基, pH 4.0;对于阳离子配基, pH 5.5)预平衡的色谱柱(1.1cm i.d. × 8cm, 5.5g湿凝胶)上,用55mL平衡缓冲液洗脱未吸附的杂蛋白,然后对于阳离子配基凝胶柱用含1mol/L KCl的上述平衡缓冲液再淋洗。阴离子配基吸附的胰蛋白酶用0~1mol/L KCl(pH 4.0)线性梯度洗脱,阳离子配基吸

附的胰蛋白酶用 50 mmol/L (55 mL) 甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH 2.1) 洗脱。分别检测收集液 (5.5 mL/管, 流速 24 mL/h) 的酶活性及蛋白含量。

3 结果和讨论

迄今为止, 已有许多商品染料和设计合成的染

料用于亲和色谱分离纯化蛋白质和酶^[9], 这些化合物都是有颜色的, 而且大多数都带有多个磺酸基或其它阴离子基团。然而本文报道的 4 个完全对称的含有两个一氯均三嗪环的生物模拟物是无色的。图 1 给出了 4 个无色配基 (1 种阳离子和 3 种阴离子) 和作为参照的 3 个染料配基的化学结构式。

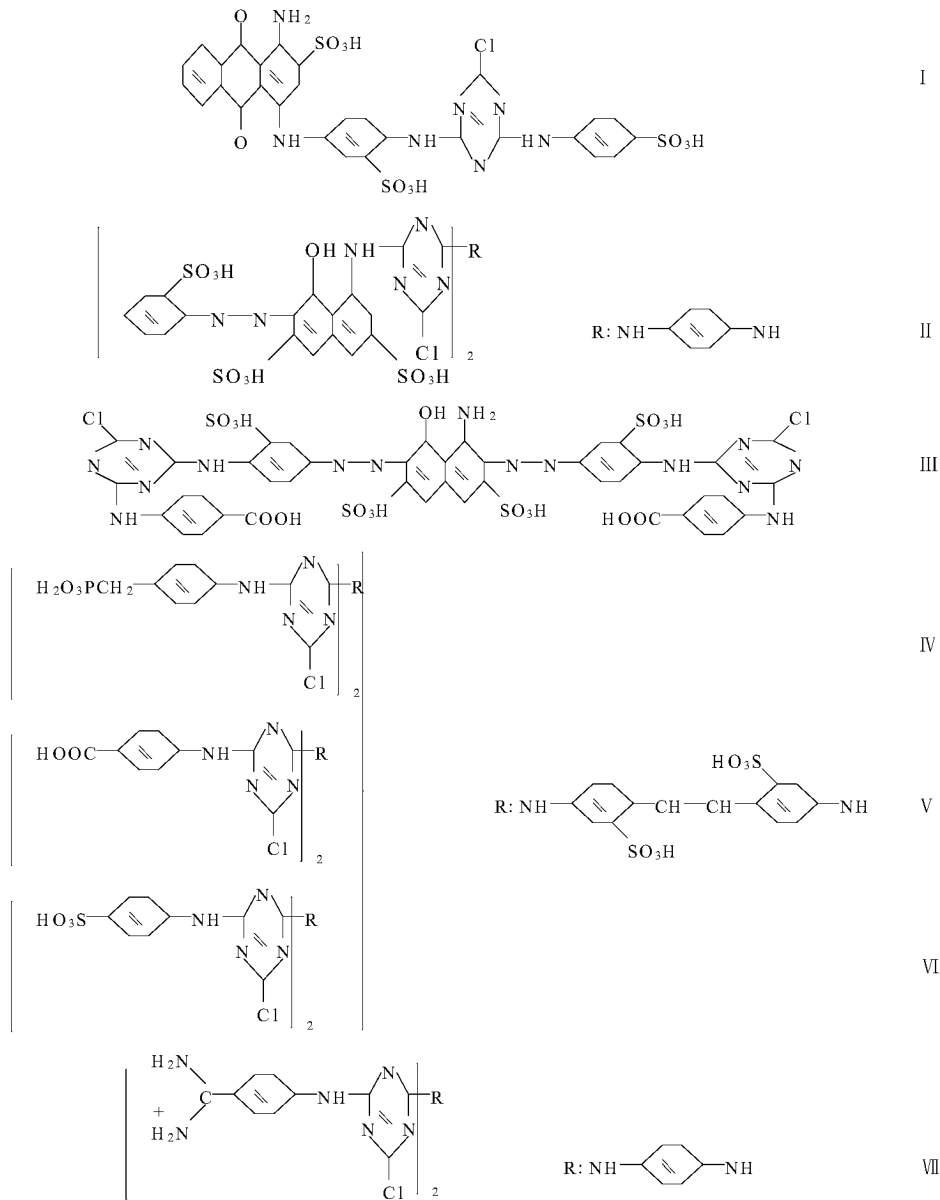


图 1 染料及无色三嗪配基的结构

Fig. 1 The structures of dyes and colourless triazine compounds

I . 蓝色葱醌活性染料, II . 红色偶氮活性染料, III . 新的蓝色偶氮活性染料, IV ~ VI . 无色阴离子配基, VII . 无色阳离子配基。

I . Cibacron Blue F3GA, II . Procion Red HE-3B, III . new azo reactive blue dye, IV ~ VI . anionic colourless ligands, VII . cationic colourless ligand.

所有的无色配基都很容易通过一氯均三嗪活性基与交联琼脂糖 CL-4B 偶联, 为了比较各种配基的纯化功能, 将浓度都控制在每克湿凝胶含 2.5~3.5 μmol 配基的范围。

胰蛋白酶具有抗肿消炎、化痰去瘀及与抗癌药物、抗菌素合用可增强药效等医疗作用。由于它与糜蛋白酶具有相似的一级结构和几何空间构型, 用一般的方法很难将二者彻底分离, 因此, 研究胰蛋白酶与糜蛋白酶的分离提纯方法具有现实意义。

3.1 影响色谱介质吸附效果的物化因素

酶液的初始浓度、缓冲液的 pH 值、离子强度和温度是影响介质对酶吸附的重要因素。本文在保持一定离子强度和室温(20~ 22℃)的条件下主要考察了酶液初始浓度、pH 值对色谱介质吸附牛胰蛋白酶的影响。

3.1.1 胰蛋白酶初始浓度的影响 从图 2 中可以看出, 随着胰蛋白酶初始浓度的增加, 色谱介质对酶的吸附量增大。这是因为酶 E 和配基 L 在吸附过程中存在着一种动态平衡: $E + L \rightleftharpoons EL$, 根据动态平衡移动的原理, 酶浓度 [E] 增加时, 平衡向酶与配基生成的复合物 EL 方向移动, 从而增大了配基对酶的吸附量。

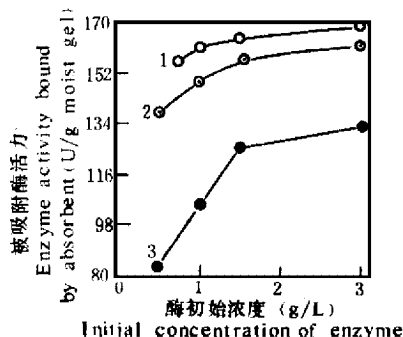


图 2 酶初始浓度对结合胰蛋白酶的影响

Fig 2 Effect of the initial enzyme concentration on binding trypsin

1. 蓝色葱醌活性染料, 2. 红色偶氮活性染料, 3. 无色阴离子配基(图 1 中的 V); pH 4.0.

1. Cibacron Blue F3GA, 2. Procion Red HE-3B, 3. anionic colourless ligands (structure V in Fig. 1); pH 4.0.

3.1.2 pH 值的影响 本文选用两种阴离子(图 1 中的 III 和 V)和一种阳离子(图 1 中的 VII)配基考察 pH 值对配基与胰蛋白酶和糜蛋白酶吸附效果的影响。由于胰蛋白酶和糜蛋白酶在酸性条件下较稳定, 因此将 pH 值考察范围确定在 4.0~ 7.0, 结果见表 1。

表 1 pH 值对酶结合的影响

Table 1 Effect of pH value on the binding of enzyme

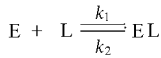
配基编号 No.	配基浓度 Conc. of ligand (mmol/L)	pH	加样酶活性 Enzyme activity applied (U)		平衡洗脱酶活性 Enzyme activity washed off (U)		结合率 Binding rate(%)	
			胰蛋白酶 trypsin	糜蛋白酶 chymotrypsin	胰蛋白酶 trypsin	糜蛋白酶 chymotrypsin	胰蛋白酶 trypsin	糜蛋白酶 chymotrypsin
			III	3.3	4.0	25.25	62.67	6.56
		5.0	25.25	62.67	8.00	11.27	68.32	82.02
		6.0	25.25	62.67	19.78	21.66	21.66	68.96
		7.0	25.25	62.67	15.88	27.10	37.11	56.76
V	3.5	4.0	21.92	60.06	2.34	0.04	89.42	99.93
		5.0	21.92	60.06	1.63	0.50	92.56	99.17
		6.0	21.92	60.06	1.92	3.02	91.24	94.97
		7.0	21.92	60.06	2.63	2.91	88.00	95.15
VII	2.5	4.0	25.25	62.67	3.43	55.47	86.41	11.51
		5.5	25.25	62.67	1.11	49.65	95.60	20.76
		6.5	25.25	62.67	0.97	45.47	96.16	27.44
		7.0	25.25	62.67	0.94	40.36	96.28	35.60

从表 1 中可看出, 3 种配基在不同的 pH 值条件下对酶的吸附量有较大的区别。对于配基 III, 随着 pH 值的升高, 配基对胰蛋白酶和糜蛋白酶的吸附率都有降低趋势, 在 pH 4.0 时, 更有利于酶在配基 III 上的吸附及分离提纯; 对配基 V 而言, 在 pH 4.0~7.0 范围内对胰蛋白酶和糜蛋白酶的吸附率都较

高, pH 值的改变对吸附率的影响较小; 而阳离子配基 VII 对胰蛋白酶的吸附率在 pH 5.5~7.0 之间变化较小, 对糜蛋白酶的吸附率则随着 pH 值的增加而增加。显然, 静电吸引在其中起着相当大的作用, 但后面的实验表明, 阳离子配基 VII 对胰蛋白酶和糜蛋白酶的吸附与其它阴离子配基具有显著不同的特点。

3.2 解离常数(K_d)和最大吸附量(q_m)的测定

解离常数 K_d 是表征配基与生物大分子亲和力的重要参数。最大吸附量 q_m 是表征配基对酶吸附容量的参数。据文献 [10] 报道, 在亲和色谱过程中, 配基与被吸附的生物大分子之间存在着如下关系:



当系统达到平衡时:

$$1/q^* = 1/q_m + (K_d/q_m) \cdot 1/C^*$$

式中 $K_d = k_2/k_1$ 表示解离常数; q^* 表示平衡时单位体积介质结合的酶量; q_m 表示介质对酶的最大吸附量; C^* 表示平衡时溶液中酶的浓度。

测定一系列酶浓度下的平衡吸附量 q^* 和平衡时酶浓度 C^* , 并以 $1/q^*$ 对 $1/C^*$ 作图得一直线, 截距为 $1/q_m$, 斜率为 K_d/q_m 。用上述方法测定并计算了色谱介质对牛胰蛋白酶的解离常数 K_d 和最大吸附量 q_m , 见表 2。

通常, 亲和色谱中介质对酶的解离常数 K_d 在 $10^{-4} \sim 10^{-6} \text{ mol/L}$ 之间, $K_d > 10^{-4} \text{ mol/L}$ 表示亲和力较弱, $K_d < 10^{-6} \text{ mol/L}$ 则表示亲和力较强。由表 2 可知, 阳离子配基 VII 对牛胰蛋白酶的亲和力最强, 配基 II, I, IV 居中, 配基 VI, V 最弱; 最大吸附量的大小顺序为 IV > VI > II > I > V > VII。

表 3 染料及无色配基对胰蛋白酶的初分离

Table 3 Preliminary screening for trypsin binding to immobilized dyes and colourless ligands

配基编号 No.	配基浓度 Immobilized ligand conc. ($\mu\text{mol/g moist gel}$)	结合容量 Binding capacity of eluted enzyme (U/ $\mu\text{mol ligand}$)	比活性 Specific activity (U/mg protein)	酶活性回收率 Activity recovered (%)
I	2.7	13.7	24.7	84
II	3.0	18.3	22.8	89
III	3.5	9.5	12.2	46
IV	3.0	20.6	30.2	86
V	3.3	17.9	22.8	82
VI	2.7	10.3	19.2	38
VII	2.5	12.5	盐洗脱无效 salt ineffective	0

为了考察这些染料及无色配基对胰蛋白酶的纯化性能, 用亲和色谱法作了进一步研究, 结果见表 4 和图 3。表 4 中的数据表明, 阴离子配基 (I, II, IV 和 V) 对猪胰蛋白酶和糜蛋白酶都有吸附作用, 用盐梯度洗脱可将二者先后洗脱下来。不同的是, 在盐 (KCl) 浓度为 0.4 mol/L 时就可将吸附在配基 I, IV 和 V 上的两种酶洗脱下来, 而吸附在配基 II 上的这两种酶在 KCl 浓度为 0.7 mol/L 时才洗脱下来。这似乎说明配基 II 对这两种酶的吸附比配基 I, IV 和 V 更紧密, 但是所有的阴离子配基对这两种酶的分离均不彻底, 从谱图 (图 3a) 中可看出, 粗酶经阴离

表 2 亲和介质对牛胰蛋白酶的解离常数和最大吸附量

Table 2 K_d and q_m values for affinity media to bovine trypsin*

配基	Ligand	K_d (mol/L)	q_m (g/L gel)
I		2.6×10^{-6}	11.4
II		1.4×10^{-6}	17.5
VI		3.9×10^{-5}	20.4
V		1.7×10^{-5}	8.8
IV		4.6×10^{-6}	23.8
VII		5.3×10^{-7}	8.01

* 缓冲液: 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠, 含 0.5 mol/L 氯化钠, pH 4.0 (阴离子配基) 或 pH 5.5 (阳离子配基); 操作温度: 20°C 。

* Buffer: 0.1 mol/L HAc-NaAc, containing 0.5 mol/L NaCl, pH 4.0 for anionic ligands, pH 5.5 for cationic ligand; performed at 20°C 。

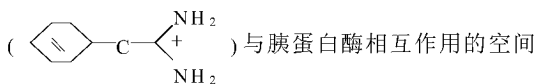
3.3 色谱介质对粗猪胰蛋白酶的试分

首先初步考察了这些染料和无色配基对猪胰蛋白酶的吸附性能 (见表 3)。表 3 表明, 7 种配基都能有效地结合猪胰蛋白酶, 结合容量大小依次为 IV > II > V > I > VII > VI > III。值得注意的是带有正电荷的无色配基 VII 与其它带负电荷的配基对胰蛋白酶的吸附作用有显著不同: 含高浓度盐的洗脱液不能将配基 VII 吸附的胰蛋白酶洗脱下来, 由此可推断阳离子无色配基 VII 与猪胰蛋白酶可能发生了特异性结合。

子配基 VI 柱色谱分析后, 胰蛋白酶峰与糜蛋白酶活性峰有较大重叠。然而阳离子配基 VII 与其它阴离子配基对胰蛋白酶的吸附行为有显著不同 (图 3b), 阴离子配基对胰蛋白酶有很强的吸附作用而大部分糜蛋白酶没有被吸附。用 1 mol/L KCl 可将所吸附的糜蛋白酶洗脱掉却不能将吸附的胰蛋白酶洗脱掉。改变洗脱液 pH 值, 用 pH 2.1 的 50 mmol/L 甘氨酸-盐酸洗脱可得到一个很尖的胰蛋白酶洗脱峰, 胰蛋白酶回收率为 88%, 比活为 116 U/mg , 纯化倍数为 21.6。

3.4 分离机制的探讨

猪胰蛋白酶和糜蛋白酶的等电点分别为 10.8 和 8.6, 它们都是碱性蛋白酶。而本研究中, 吸附实验分别是在 pH 4.0(对阴离子配基)或 pH 5.5(对阳离子配基)条件下进行的, 在此条件下, 这两种酶均带正电荷, 因此可推断, 带有几个负电荷的阴离子配基与这两种酶发生了非专一性的静电吸附作用, 使得这种结构相似的酶没有得到有效的分离; 而带有两个苯胍基团的阳离子配基在 pH 5.5 的实验条件下带有两个正电荷, 它与这两种碱性蛋白酶不会发生非专一性的静电结合作用。有人曾研究了苯胍



结构^[11,12], 发现苯胍结合在胰蛋白酶的特异性口袋中, 并对胰蛋白酶有很强的抑制作用。结晶衍射研究

表明苯胍分子上的两个氨基氮原子分别与胰蛋白酶分子上的 Asp180, Gly219, Ser190 上的羟基氧原子及一个分子内水分子发生了氢键结合^[11]。本文所述合成的阳离子配基 VII 分子中带有两个苯胍基团, 因此, 我们推测阳离子配基 VII 很可能通过两个苯胍基团与胰蛋白酶的特异性口袋发生了类似上述的特异性结合。这种牢固的结合不能被高离子强度的洗脱液解吸。当用 pH 2.1 的甘氨酸-盐酸缓冲液洗脱时, 破坏了苯胍基团与胰蛋白酶肽链形成的氢键而使胰蛋白酶得以解吸, 从而得到了非常好的分离效果。

文献也曾报道用其它的蛋白酶抑制剂作配基来纯化胰蛋白酶, 但是这些配基大都比较昂贵、难于制备、容易降解且使用寿命短。本文报道的阳离子无色亲和和吸附介质具有原料价廉易得、容易制备、耐化学及酶降解等特点, 适于大规模分离生产。

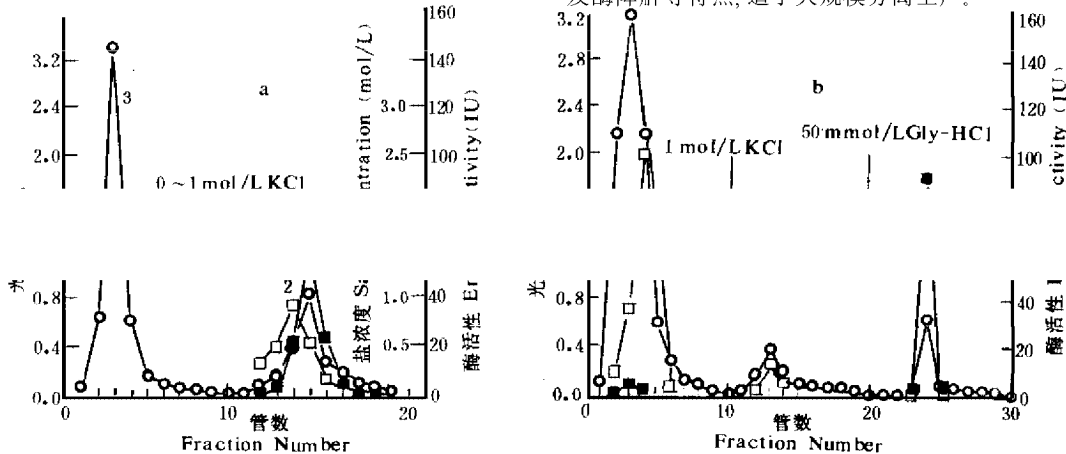


图 3 阴离子配基 IV (a) 和阳离子配基 VII (b) 对猪胰蛋白酶粗品的分离谱图

Fig 3 Chromatography of a crude porcine pancreatic trypsin extract on Agarose CL-4B immobilized anionic IV (a) and cationic compound VII (b)

1. 胰蛋白酶, 2. 糜蛋白酶, 3. 蛋白(280nm)。色谱操作温度 20~ 22℃。

1. trypsin, 2. chymotrypsin, 3. protein(280nm). chromatography was performed at 20~ 22℃.

表 4 猪胰蛋白酶的纯化

Table 4 Purification of porcine pancreatic trypsin

配基 Ligand	平衡洗脱 Elution by equilibration buffer (%)		0~ 1mol/L KCl洗脱 Elution by 0-1mol/L KCl (%)		50mmol/L 甘氨酸-盐酸洗脱 Elution by 50mmol/L Gly-HCl pH 2.1 (%)		纯化倍数 Purification achieved in fold
	C*	T*	C*	T*	C*	T*	
I	31	10.6	65(0.3)	88(0.4)	-	0	4.6
II	21	5.3	74(0.6)	92.6(0.7)	-	-	4.3
IV	34	5.4	62(0.3)	91.4(0.4)	0	0	5.7
V	45	3.0	50(0.3)	95(0.4)	-	-	4.3
VII	80	2.0	7.5	0	0	88.1	21.6

* C. 糜蛋白酶, T. 胰蛋白酶。括号内为酶被洗脱所需的 KCl 浓度。

* C. chymotrypsin, T. trypsin. Concentration of KCl required for elution is indicated in parentheses.

参 考 文 献

- 1 杨 利, 高昆玉. 染料工业, 1989; 5: 1
- 2 高昆玉, 马星华. 大连理工大学学报, 1988; 29: 527
- 3 Gao Kunyu, Yang Li, Cheng Lübai. Biotechnology Techniques. 1991; 5(4): 259
- 4 高昆玉, 杨 利, 富 洵. 大连理工大学学报, 1991; 31(4): 399
- 5 高昆玉, 杨 利, 富 洵. 染料工业, 1993; 3: 12
- 6 杨 利. 新型亲和活性配基的合成及其对酶催化功能的研究(硕士学位论文), 大连理工大学, 1990: 23
- 7 Bergemeyer H U. Method of enzymatic analysis. Verlag chemie and academic press, Berlin, New York and London: 1963: 803, 815
- 8 Bradford M M. Anal Biochem, 1976; 72: 248
- 9 Clonis Y D, Atkinson T, Bruton C *et al.* Reactive dyes in protein and enzyme technology. New York: Macmillan, 1987: 33
- 10 Chase H A. J Chrom atogr, 1984; 297: 179
- 11 Bode W, Schwanger P. J Mol Biol, 1975; 98: 693
- 12 Krieger M, Kay L M, Stroud R M. J Mol Biol, 1974; 83: 209

Colourless Synthetic Triazine Ligands for Purification of Trypsin in Affinity Chromatography

Yang Li, Gao Kunyu*, Cheng Lübai*, Zou Hanfa and Zhang Yukui

(National Chromatographic R. & A. Center,

Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian, 116011)

* (Dalian University of Technology, Dalian, 116012)

Abstract A new immobilized synthetic cationic triazine compound and several anionic colourless compounds coupled with dyes were examined as affinity ligands to isolate and purify trypsin from porcine pancreas. The effects of the initial enzyme concentration and the buffer pH value on the binding capacity of ligands for trypsin were investigated. The dissociation constant (K_d) and the maximum binding capacity (q_m) for trypsin were gained by experiment and calculation. All the anionic dye and colourless ligands bind effectively trypsin and chymotrypsin, but they can't separate the two enzymes completely at the condition of this study. The cationic colourless ligands with two benzamide as functional groups, however, display a noticeable different behavior to all the anionic ligands in binding trypsin and chymotrypsin. A small part of chymotrypsin in the crude extract was bound and would be eluted with salt elution (1 mol/L KCl), while the trypsin bound would not be affected by salt elution. A sharp peak containing 88% of the applied trypsin activity with a specific activity of 116U/mg protein (21.6-fold purification) has been resulted from a crude porcine pancreatic extract in a single step from the immobilized cationic colourless ligand with a specific eluent of 50 mmol/L glycine-HCl, pH 2.1. The binding mechanisms of anionic and cationic ligands to trypsin were discussed separately. It is proposed that nonspecific electrostatic interactions would likely be involved in the binding of the two enzymes mentioned above to the anionic dye and colourless ligands by several net charges. And this would result in an ineffective isolation between trypsin and chymotrypsin. The cationic colourless ligand is probably bound in the specific pocket of the trypsin via the two benzamide groups in the ligand molecule, and therefore, resulted in an effective purification of trypsin from porcine pancreatic extract.

Key words affinity chromatography, triazine colourless ligand, trypsin