

改性与修饰壳聚糖固定化酶纯化抑肽酶研究*

宋扬 侯司 赵辉 王荣海 吴中华

(安徽省生物研究所, 合肥 230031)

摘要 采用化学改性与修饰微珠壳聚糖为载体, 共价法偶联牛胰蛋白酶, 制成抑肽酶亲和吸附剂, 单位活力 5 190 KIU/g (湿), 蛋白质偶联率 60.5%, 酶活性回收率 55%; 将其直接亲和层析牛肺提取液, 分离纯化高比活抑肽酶. 方法过程简单, 样品比活力 5 700 KIU/mg, 质量稳定, 成本较低; 该吸附剂机械强度高, 抗污染能力较强, 非特异性吸附较小, 可以反复使用, 价格低廉, 适合工业化生产.

关键词 固定化酶, 亲和层析, 抑肽酶, 壳聚糖

学科分类号 Q814

抑肽酶 (aprotinin) 是从牛肺中分离出来的一种多肽类、非特异性、多功能蛋白酶抑制剂, 对人的多种蛋白酶具有很强的广谱抑制作用, 如抑制胰蛋白酶、糜蛋白酶、血纤维蛋白溶酶原、激肽释放酶和弹性蛋白酶等^[1], 为中国药典收载治疗急性慢性胰腺炎, 以及肺气肿、喘息性支气管哮喘的首选药物; 还用于心、脑外科手术, 以防止过度纤溶性出血、渗血及因溶栓治疗引起的并发症, 并可用于肿瘤的辅助治疗^[2].

壳聚糖 (chitosan) 是 N-脱乙酰基氨基葡萄糖的聚合物, 被广泛用于酶和细胞的固定化^[3~5]. 但是, 作为亲和吸附剂的载体研究报道不多, 类似于本文制备化学改性与修饰微珠壳聚糖亲和吸附剂载体, 目前未见报道.

以壳聚糖微珠为载体, 经 CuSO₄ 络合、甲醛改性、3-氯-1, 2-环氧丙烷 (表氯醇) 和氨水修饰, 戊二醛活化, 偶联牛胰蛋白酶配基, 制成抑肽酶亲和吸附剂——化学改性与修饰微珠壳聚糖固定化胰蛋白酶; 将其直接亲和层析分离纯化牛肺提取液, 制取了高比活抑肽酶; 技术指标超过和达到中国药典标准^[6]; 其经济指标优于现行生产工艺.

1 材料与方 法

1.1 材料

黄牛肺: 阜阳牛羊肉制品厂; 结晶牛胰蛋白酶: 上海生物化学研究所东风试剂厂; CNBr-Sepharose 4B: Pharmacia 产品.

1.2 化学改性与修饰微珠壳聚糖活性载体制备

按文献 [7] 方法, 将精制壳聚糖溶于 1% 醋酸, 过滤液喷入凝固液, 丙酮脱水, 真空干燥, 得

微珠壳聚糖. 取微珠壳聚糖^[8], 加入 10% 硫酸铜溶液, 滤出络合物, 再加入 36% 甲醛 (调至中性), 搅拌 2 h, 滤出; 加 6% 盐酸去络合, 得化学改性微珠壳聚糖. 按文献 [8] 方法, 在微珠壳聚糖中加氢氧化钠溶液和表氯醇及硼氢化钠, 水洗, 滤出; 再加氢氧化钠溶液, 滴加表氯醇, 水洗, 滤出; 加稀氨水, 去离子水洗, 滤出, 得化学改性与修饰微珠壳聚糖载体. 用文献 [8] 方法, 将上述制备的壳聚糖载体加入戊二醛-硼砂缓冲液 (0.025 mol/L, pH 7.8) 的混合溶液中, 反应 4 h; 去离子水洗涤; 得化学改性与修饰微珠壳聚糖活性载体.

1.3 活性载体与配基牛胰蛋白酶的偶联

根据文献 [9] 方法, 将上述制备的活性载体加入到牛胰蛋白酶-硼砂缓冲液 (0.025 mol/L, pH 7.8) 中, 2~8℃ 搅拌 24 h; 过滤, 分别用上述缓冲液、0.5 mol/L (pH 1.5) 氯化钠-盐酸溶液洗涤, 滤出物即为抑肽酶亲和吸附剂 (化学改性与修饰微珠壳聚糖固定化胰蛋白酶).

1.4 酶活力测定方法

按 280 nm 和 260 nm 的吸收差测定计算其蛋白质浓度^[10]; 胰蛋白酶活力测定和抑肽酶活力测定均按中国药典^[6]方法测定.

1.5 牛肺抑肽酶的分离纯化

以壳聚糖固定化酶直接亲和层析牛肺提取液纯化抑肽酶 (即“一步”法); 将新鲜或冷冻黄牛肺剔除脂肪、气管等杂物, 切块绞碎, 加两倍量水,

* 安徽省“九五”科技攻关计划项目 (9613014).

Tel: (0551) 5145887-3269.

收稿日期: 1998-11-30, 修回日期: 1999-04-16

用稀 H_2SO_4 调 pH 2.0, 室温搅拌 8 h, 过滤; 滤液加三氯乙酸溶液至 2.5%, 过滤; 滤液调 pH 8.0, $0^\circ C$ 以下静置 8 h 以上; 除去液面固形物, 离心分离, 得上清液即为牛肺提取液. 将含有抑肽酶的牛肺提取液用上述合成的亲和层析介质进行进一步纯化. 装有 200 ml 亲和吸附剂的层析柱 (3.5 cm \times 23 cm), 用硼砂缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.8) 平衡. 抑肽酶提取液以 2 ml/min 流速上样; 接着用相同缓冲液及 0.25 mol/L 醋酸铵-醋酸缓冲液 (pH 4.0), 流速 4 ~ 6 ml/min 洗涤; 再用 0.5 mol/L 醋酸钠-盐酸溶液 (pH 1.5) 以同样流速洗脱, 分部收集, 合并活性组分. 将抑肽酶有效接

收液用 3 ku 中空纤维超滤膜超滤, 补加去离子水, 当流出液硝酸银检测 Cl^- 合格后^[6], 继续超滤至一定体积, 得抑肽酶浓缩液. 浓缩液再经 25 ku 中空纤维超滤膜超滤, 冻干, 得高比活抑肽酶.

按文献 [2], 将上述牛肺提取液硫酸铵盐析, 再以 Seperose-4B 固定化酶 (按 Pharmacia 所述方法偶联胰蛋白酶) 层析盐析物纯化抑肽酶 (即“二步”法).

2 结果与讨论

2.1 制备亲和吸附剂和抑肽酶实验结果与技术参数

见表 1 和表 2.

表 1 亲和吸附剂制备实验结果与技术参数

偶联液及洗涤液		配基		亲和吸附剂 (湿)		蛋白质偶联		酶活性	操作压/	平均
总体积/ L	ρ (蛋白质) / $g \cdot L^{-1}$	单位活力/ $10^4 \text{ KIU} \cdot g^{-1}$	m (蛋白质) / g	单位活力/ $\text{KIU} \cdot g^{-1}$	m (湿重) / g	偶联量/ $mg \cdot g^{-1}$	偶联率/ %	回收率/ %	mm 水柱	使用 批次
3.114	0.38	90	3	5190	286	63.5	60.5	55.0	6 000	72

注: 蛋白质偶联量 ($mg \cdot g^{-1}$) = $\frac{\text{加入蛋白质质量} \times \text{蛋白质偶联率}}{\text{载体量 (干)}}$; 蛋白质偶联率 (%) = $\frac{\text{加入蛋白质质量} - \text{损失蛋白质质量}}{\text{加入蛋白质质量}}$; 酶活性回收率 (%) = $\frac{\text{亲和吸附剂单位活力} \times \text{亲和吸附剂量}}{\text{加入酶总活力}}$. KIU 是中国药典^[6]上规定的抑肽酶活性单位.

表 2 抑肽酶技术指标

比活力/ $\text{KIU} \cdot mg^{-1}$	收率/ $10^4 \text{ KIU} \cdot kg^{-1}$ (牛肺)	卫生学检测
5700	22	符合中国药典标准 ^[6]

2.2 亲和吸附剂纯化抑肽酶效果

由图 1 可见, 亲和层析柱较均匀、致密, 在较快及大量上样、洗涤、洗脱下 (平均速度 10 ml/min), 无明显压床现象, 洗脱峰相对比较集中、对称, 拖尾现象较轻. 表 3 所示亲和层析有效接收液比活 4 459 KIU/mg, 纯化倍数 400 倍, 收率 80.26%.

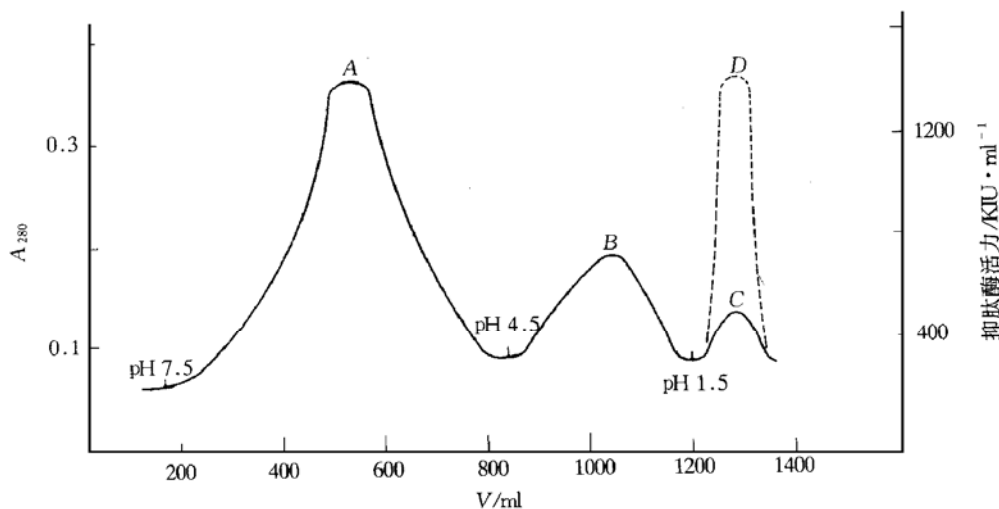


图 1 化学改性与修饰微珠壳聚糖固定化牛胰蛋白酶亲和吸附剂纯化抑肽酶的洗脱曲线

A: 洗涤流出杂蛋白峰 (0.1 mol/L 硼砂缓冲液, pH 7.8); B: 二次洗涤流出杂蛋白峰 (0.25 mol/L 醋酸铵-醋酸缓冲液, pH 4.0); C: 洗脱蛋白峰 (0.5 mol/L 醋酸钠-盐酸溶液, pH 1.5); D: 抑肽酶活性峰.

—: 蛋白质浓度; - - -: 活性.

表 3 化学改性与修饰微珠壳聚糖固定化牛胰蛋白酶亲和层析纯化抑肽酶效果

批次	提取液			洗脱液				
	ρ (蛋白质) / $g \cdot L^{-1}$	比活力 / $KIU \cdot mg^{-1}$	总活力 / $10^4 KIU$	ρ (蛋白质) / $g \cdot L^{-1}$	比活力 / $KIU \cdot mg^{-1}$	总活力 / $10^4 KIU$	活性回收率 / %	纯化倍数
9811	13.24	11.1	30	0.136	4 397	24.04	80.13	396
9812	13.12	11.1	32	0.135	4 459	24.08	75.25	401
9813	13.24	11.1	30	0.134	4537	24.20	86.42	387

2.3 壳聚糖载体化学改性与修饰效果探讨

由于壳聚糖载体分子上存在大量游离氨基，化学性质极其活泼，虽经戊二醛活化偶联胰蛋白酶，但是，仍然存在游离氨基，因此，在亲和层析中，表现有缓冲作用和非特异性吸附现象，限制了壳聚糖作为亲和和吸附剂载体的应用。为解决上述问题，按照文献 [8] 的方法略加改进，先将壳聚糖分子上的氨基络合保护，后在弱碱性条件下与中性甲醛

反应，使未络合的游离氨基及乙酰氨基，转变成化学性质不活泼的一羟或者二羟甲基氨基；因此，减小非特异性吸附。例如配制一定浓度的蛋白质溶液，分别上未改性修饰与改性修饰壳聚糖载体层析柱，用 0.025 mol/L 硼酸-硼砂缓冲液 (pH 8.0) 洗涤，0.5 mol/L 氯化钠-盐酸溶液 (pH 1.5) 洗脱，结果见图 2 和图 3。

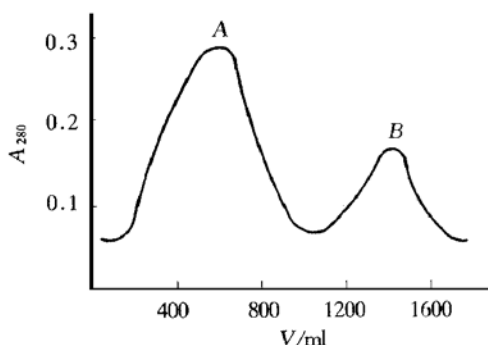


图 2 壳聚糖未改性修饰的载体吸附现象

A: 洗涤液流出蛋白峰 (0.025 mol/L 硼砂缓冲液, pH 7.8); B: 洗脱液洗脱蛋白峰 (0.5 mol/L NaCl-HCl, pH 1.5 洗脱液).

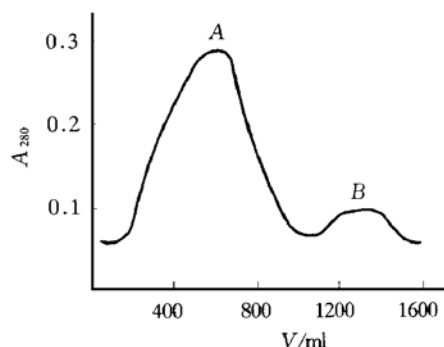


图 3 壳聚糖改性修饰的载体吸附现象

A: 洗涤液流出蛋白峰 (0.025 mol/L 硼砂缓冲液, pH 7.8); B: 洗脱液洗脱蛋白峰 (0.5 mol/L NaCl-HCl, pH 1.5 洗脱液).

由图 2 和图 3 比较可见，改性与修饰壳聚糖载体，非特异性吸附现象较小。另外，载体经化学修饰，增加反应基团数，从而提高配基偶联量，即提高亲和吸附剂单位活力及吸附容量。从表 1 可见，每克载体偶联酶蛋白 63.5 mg，比文献 [11] 每克壳聚糖偶联 20 mg 高 3.5 倍，与文献 [8] 壳聚糖经改性修饰后，增加化学反应基团数的比例较吻

合。因此，化学改性与修饰壳聚糖，是一种较为优良的亲和层析介质载体。

2.4 两种亲和吸附剂纯化效果及性能的比较

分别以化学改性与修饰微珠壳聚糖、Sephacrose 4B 为载体，所制备的两种固定化胰蛋白酶性能及纯化抑肽酶的效果，见表 4、表 5 和图 4、图 5。

表 4 “一步”法与“二步”法纯化抑肽酶效果比较

样品处理 方法	提取液 单位活力/ $KIU \cdot ml^{-1}$	提取液 总活力 ¹⁾ / $10^4 KIU$	硫酸铵盐析 物总活力/ $10^4 KIU$	亲和层析洗脱液			
				比活力/ $KIU \cdot mg^{-1}$	总活力/ $10^4 KIU$	活性收率/ %	纯化倍数
“一步”法	21	30	—	4 459	24.08	80.26	401.7
“二步”法	21	30	21.1	5 128	16.59	56.50	461.9

¹⁾指从 1 kg 牛肺获得的提取液总活力。

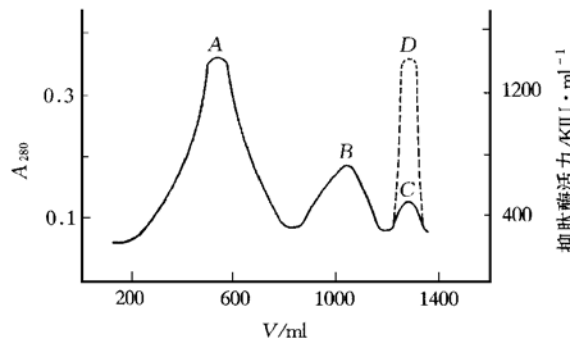


图4 化学改性与修饰微珠壳聚糖固定化牛胰蛋白酶纯化抑肽酶洗脱图谱

—: 蛋白质浓度; - - -: 抑肽酶活性. A: 洗涤杂蛋白质峰 (0.1 mol/L 硼砂缓冲液, pH 7.8); B: 洗涤杂蛋白质峰 (0.25 mol/L 醋酸铵-醋酸缓冲液, pH 4.0); C: 洗脱蛋白质峰 (0.5 mol/L 醋酸钠-盐酸溶液, pH 1.5); D: 抑肽酶活性峰.

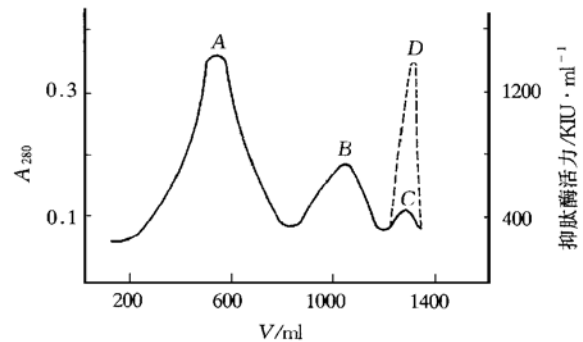


图5 Sepharose 4B 固定化牛胰蛋白酶纯化抑肽酶洗脱图谱

—: 蛋白质浓度; - - -: 抑肽酶活性. A: 洗涤杂蛋白质峰 (0.1 mol/L 硼砂缓冲液, pH 7.8); B: 洗涤杂蛋白质峰 (0.25 mol/L 醋酸铵-醋酸缓冲液, pH 4.0); C: 洗脱蛋白质峰 (0.5 mol/L 醋酸钠-盐酸溶液, pH 1.5); D: 抑肽酶活性峰.

表5 两种亲和吸附剂性能比较

类型	洗降速度	压床现象	机械强度	适应 pH 范围	活化	抗污染能力	价格	应用方法
壳聚糖固定化酶	快	无	高	宽	简单	有	低	“一步”法
Sepharose 4B 固定化酶	慢	有	低	较窄	繁琐	无	高	“二步”法

由图4和图5可见,在分离纯化抑肽酶洗脱图谱上,都有两个杂蛋白质洗涤峰,和一个含抑肽酶的蛋白质洗脱峰,峰形对称,拖尾现象较轻.表4、表5所示,由化学改性与修饰微珠壳聚糖固定化胰蛋白酶的性能,与一步分离纯化抑肽酶的效果,明显优于 Sepharose 4B 固定化胰蛋白酶的性能与分离纯化效果.虽然纯化倍数和样品比活后者略高,但是,前者性能较好、样品收率较高,无需制备粗品,费用较小.

采用化学改性与修饰微珠壳聚糖,共价法偶联牛胰蛋白酶,制备固定化酶,将其对牛肺提取液,直接进行亲和层析,一步制取高比活抑肽酶.研究了壳聚糖固定化酶和抑肽酶的技术指标及工艺参数,结果表明,本法制备抑肽酶具有收率较高,成本较低,工艺过程简单,样品质量稳定等特点,适合工业化生产.

致谢 本研究承蒙安徽安科生物高技术有限公司总裁宋礼华研究员热心指导和支持.

参 考 文 献

- 张天民,王友同,吴梧桐,等.动物生化制药学.北京:人民卫生出版社(Zhang T M, Wang Y T, Wu W T, et al. Animal Biochemical Pharmaceutics. Beijing People's Health Press), 1981. 149~ 152
- 徐浩大,姚仁杰,叶学海,等.交联琼脂糖珠固定化蛋白酶在纯化牛肺 Kunits 制剂应用.生物化学杂志(Xu H D, Yao R J, Ye X H, et al. Chin Biochem J), 1992, 8 (4): 418~ 421
- Shinsaku H, Perfecto F. An introduction to affinity chromatography. Agric Biol Chem, 1982: 46 (6): 1639~ 1643
- 千烟一郎,胡宝华等译.固定化酶.石家庄:河北人民出版社(Qiuyine Laen, Hu B H, et al. Immobilized Enzyme. Shijiazhuang: Hebei People Press), 1981. 6~ 9
- 姜涌明,陈天,史永旭,等.壳聚糖固定化木瓜蛋白酶的研究.生物化学杂志(Jiang Y M, Chen T, Shi Y X, et al. Chin Biochem J), 1993, 7 (4): 47~ 49
- 中华人民共和国药典委员会.中国药典(二部).北京:化学工业出版社(Pharmacopeia Committee of People's Republic of China, China Pharmacopeia (2nd). Beijing: Chemistry Industry Press), 1995. 274~ 275, 256~ 257
- 张所俊,王为国,江龙德,等.球形交联壳聚糖的制备及其在固定化 α -淀粉酶方面的应用.现代化工(Zhang S J, Wang W G, Jiang L D, et al. Modern Chemistry Industry), 1997, (4): 29~ 30
- 宋扬,侯司,汪姗姗,等.化学改性与修饰的壳多糖类活性载体.中国专利.(Song Y, Hou S, Wang S L, et al. A being chemical modified granulechitosan carrier) CN1155581A, 1997. 37~ 38
- 宋扬,赵辉,侯司,等.直接从黄牛肺中制取高纯度抑肽酶的方法.中国发明专利公报.(Song Y, Zhao H, Hou S, et al. A method of preparation of high-purity aprotinin directly extracting from cattle lungs) CN1160720A, 1997. 81~ 82
- 蔡武城,袁后积.生物物质常用化学分析法.北京:科学出版社(Cai W C, Yuan H J. General chemical analysis methods for biomolecule. Beijing: Science Press), 1982: 98~ 100
- 复旦大学生化教研室.溶菌酶的精制.复旦大学学报(自然版)(Department of Biochemistry, FuDan University. Journal of FuDan University, Natural Science), 1978, (1): 55~ 65

A New Method of Preparation of High purity Aprotinin by Chemical Modified Trypsin of Chitosan. SONG Yang, HOU Si, ZHAO Hui, WANG Rong-Hai, WU Zhong-Hua (*Biology Institute of Anhui Province, Hefei 230031, China*).

Abstract The trypsin was covalently linked with chemical modified granulechitosan and was used to isolate and purify aprotinin from the extract of cattle lungs by affinity chromatography. Then high-purity aprotinin was prepared after ultrafiltrating and freeze drying. The result showed: the specific

activity of immobilized trypsin on chitosan was 25 950 kU/g, 60.5% protein was coupled, and the activity recovery of trypsin was 55%. The purity of aprotinin was high, and the activity recovery of trypsin on immobilized trypsin had low non specific adsorption and ideal anti-contamination, and it could be used more than 72 times. It was accepted as a simple and stable method and suitable for purifying aprotinin with high activity in industrial manufacturing.

Key words immobilized trypsin, affinity chromatography, aprotinin, chitosan

用 cDNA 表达阵谱分析小鼠鼻咽部相对特异表达基因*

张玲 凌建华 何志巍 姚开泰¹⁾

(湖南医科大学肿瘤研究所, 卫生部癌变重点实验室, 长沙 410078)

摘要 利用 Mouse AtlasTM cDNA expression array 检测鼻咽、气管、食管、膀胱四种组织中 588 个已知基因的表达谱, 得到 11 个在鼻咽上皮中表达相对较高的基因, 作为鼻咽部组织相对特异基因的候选者, 并用 RT-PCR 进一步验证。

关键词 基因表达谱, 鼻咽, 相对组织特异性基因

学科分类号 Q756

构建鼻咽癌转基因小鼠模型是从整体上研究这一疾病发病分子机理的理想方法, 但成功的关键在于获得鼻咽部特异表达基因的调控区, 使导入的致癌相关基因能在鼻咽部特异性表达。目前工作重点仍在寻找鼻咽部特异表达的基因及其调控区。我室用 cDNA-RDA 方法得到数个在鼻咽部特异表达的片段, 多为未知序列, 有待克隆 cDNA 全长, 特别是基因的启动区^[1]。Clontech 公司最近推出 AtlasTM cDNA expression arrays, 在 80 mm × 120 mm 大小的膜上点有 588 个已知基因的特异代表性片段, 并将基因按功能分类排列在六个区域: a. 瘤基因、抑瘤基因、细胞周期调节因子; b. 应激反应相关基因、信号传导通路调节因子及效应因子; c. DNA 合成、修复、重组基因及凋亡相关基因; d. 转录因子; e. 受体及细胞表面抗原、细胞粘附因子; f. 细胞间信息传递因子 (生长因子、趋化因子、

干扰素等)。可同时检测组织中 588 个基因的表达情况^[2], 或比较组织、细胞在不同发育阶段 588 个基因的表达差异^[3]。我们利用 Mouse AtlasTM cDNA Expression Arrays 检测了鼻咽、气管、食管和膀胱四种上皮组织中 588 个基因的表达情况, 获得其基因表达谱, 通过分析比较基因表达差异, 筛选出在鼻咽部相对表达较高的基因, 作为其相对特异基因的候选者, 用 RT-PCR 进一步验证基因表达差异。

1 材料和方法

1.1 标本来源

五周龄昆明小白鼠 20 只, 颈椎脱臼法处死后,

* 国家自然科学基金重点项目 (39730200) 和美国中华医学会基金 (96-655) 资助项目。

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (0731) 4360094; E-mail: klcrcmh@public.cs.hn.cn

收稿日期: 1998-12-21, 修回日期: 1999-04-26