

# 弹性蛋白酶化学修饰的研究

王树岐 程玉华\*

(吉林大学酶工程实验室, 长春)

**提要** 本文用溴化氰活化的右旋糖酐对弹性蛋白酶进行共价修饰, 以改变其若干性质, 使之更有利于应用。结果表明, 修饰酶不仅完全保留了天然酶的活性, 而且在耐热性、耐酸性、抗蛋白酶水解能力上, 都明显地优于天然酶。修饰酶较天然酶稳定, 有较高的应用价值。

**关键词** 弹性蛋白酶; 右旋糖酐; 化学修饰; 稳定性

弹性蛋白酶(elastase, EC 3, 4, 4, 7)是一种肽链内切酶, 水解弹性蛋白、胶原蛋白和糖蛋白<sup>(1)</sup>, 有降血脂、防治动脉粥样硬化等作用, 广泛应用于临床<sup>(2,3)</sup>。弹性蛋白酶与其它蛋白类药物一样, 易变性失活, 对温度敏感, 口服易被胃酸及蛋白酶破坏, 在临床应用上受到限制。生物分子工程学为解决这一问题带来希望。我们曾用右旋糖酐及其磷酸酯等水溶性大分子共价修饰了尿激酶, 得到了比天然酶在若干性质上优越的修饰酶<sup>(4)</sup>。本文用溴化氰活化的右旋糖酐对弹性蛋白酶进行共价修饰, 并对比研究了修饰酶和天然酶的某些性质。

## 材料与 方法

**弹性蛋白酶** 常州生物化学制药厂生产的药用酶, 经 Sephadex G-100 精制备用; 刚果红-弹性蛋白 常州生物化学制药厂; 右旋糖酐  $\bar{M}_w = 35000$ , 延边制药厂; 胰蛋白酶 1比250, 新疆伊犁地区生物化学制药厂; 胃蛋白酶 1比27000, 上海市食品公司制药厂; 溴化氰 Merck-Schuchardt 公司; 其它试剂均为分析纯。

**弹性蛋白酶活力测定** 以刚果红-弹性蛋白为底物, 按文献<sup>(5)</sup>的方法进行测定。规定在 37°C, pH 8.8, 硼酸盐缓冲液(0.02 mol/L)中, 20 min 水解 1 mg 底物的酶量, 为一个弹性蛋白酶活力单位。

**弹性蛋白酶的化学修饰** 按 Axen 法<sup>(6)</sup>用溴化氰活化右旋糖酐, 经 Sephadex G-25 除去残余溴化氰, 制得活化的右旋糖酐。按修饰剂与酶蛋白重量比为 2:1, 混合活化的右旋糖酐和弹性蛋白酶, 在硼酸钠缓冲液(0.02 mol/L, pH 9)中, 4°C 反应过夜, 用 Sephadex G-100 凝胶过滤除去未修饰的弹性蛋白酶和未反应的修饰剂, 得到修饰的弹性蛋白酶。

## 结 果

### 一. 弹性蛋白酶的化学修饰及分离提纯

修饰反应液经 Sephadex G-100 凝胶层析进行分离提纯, 以紫外吸收分析仪于 280 nm 跟踪洗脱, 出现两个洗脱峰, 均有弹性蛋白酶活性(图 1)。以弹性蛋白酶与未活化的右旋糖酐混合液在相同条件下层析, 作为对照实验, 仅在峰 2 处出现一个有弹性蛋白酶活力的洗脱峰。说明, 峰 1 是修饰弹性蛋白酶, 峰 2 是未修饰的弹性蛋白酶。

实验测得修饰酶产率为 60.8%, 残存酶活力为天然酶的 94.6%。

本文于 1985 年 7 月 17 日收到。

\* 吉林大学生物化学专业毕业生施维、李晓娟、程宇、苏欣、关雪妮参加了部分工作。

## 二. 弹性蛋白酶修饰前后的光谱分析

对修饰弹性蛋白酶、天然酶及修饰剂进行了荧光光谱的对比分析。两种酶具有相同的蛋白质浓度，修饰剂浓度与修饰酶所含的右旋糖酐量相同，其它条件如缓冲液、离子强度、溶液的 pH 值、温度、测定条件等都相同。结果如图 2 所示。

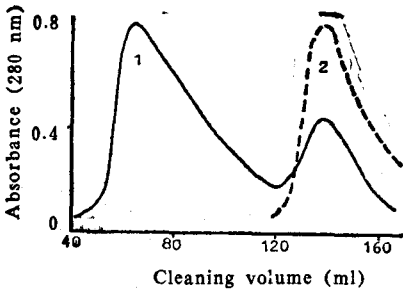


Fig 1. Cleaning curve of modified elastase on Sephadex G-100. column:  $1 \times 96\text{cm}$ ; eluent: sodium borate (0.02 mol/L) pH 8.8; flow rate: 1 ml/cm $\cdot$ h. 1. Modified elastase; 2. Elastase + dextran

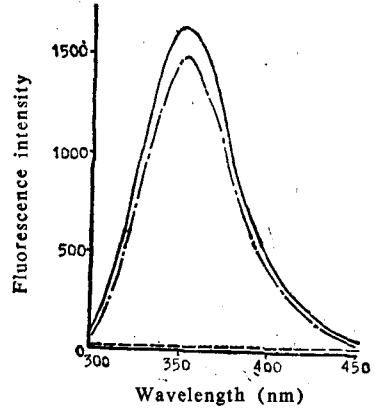


Fig 2. Fluorescence spectrum of modified elastase, elastase and dextran.  $\lambda_{\text{ex}}$ : 288 nm. — elastase; - - - modified elastase; ···· activated dextran

从荧光光谱可以看出，右旋糖酐无荧光，修饰酶与天然酶相比，最大发射波长基本相同(分别为 248.5 nm 与 249.0 nm)，荧光强度较天然酶稍弱(分别为 1478.5 与 1638.3)。

修饰酶相对于天然酶加活化右旋糖酐的紫外差示光谱，其中修饰酶与天然酶的蛋白质浓度相同，活化右旋糖酐的浓度与修饰酶中所含有的右旋糖酐量相同，在其差示光谱中，于 237 nm 处有一个吸收峰，280 nm 处有一个肩吸收。

## 三. 修饰弹性蛋白酶的耐热性

将修饰弹性蛋白酶与天然酶分别溶于 pH 8.8 的硼酸盐缓冲液(0.02 mol/L)中，在 50°C 水浴中温育，定时取样，测定酶的残存活力。结果如图 3 所示。于 50°C 温育 30 min 后，修饰酶与天然酶残存活力分别为 88.2 和 21.0%；90 min 后，它们的残存活力分别为 50 和 8.3%。修饰酶较天然酶有较高的耐热性。

## 四. 修饰弹性蛋白酶的耐酸性

将修饰弹性蛋白酶或天然酶溶于指定 pH 的缓冲液中，37°C 温育，定时取样，测定酶的相对残存活性。结果列入表 1 中。可以看出，修饰酶对 pH 8.8, 7.0, 4.0 与 3.0, 均较天然酶有较强的耐受性。当于 pH 3.0, 37°C 温育 80 min 后，修饰酶活性损失很小(6.3%)，而天然酶活性丧失 32.9%；温育 120 min 后，修饰酶活性仍保留 72.8%，而天然酶活性丧失一半以上。但当 pH 在 2 或 1 时，修饰酶与天然酶均很快完全丧失活性。

## 五. 修饰弹性蛋白酶的抗蛋白酶降解能力

两种弹性蛋白酶分别与胰蛋白酶按蛋白质重量比 1:10 混合，或分别与胃蛋白酶按蛋白质重量比 1:30 混合，溶于相应的缓冲液中。胰蛋白酶组用 pH 8.8 硼酸盐缓冲液(0.02 mol/L)，胃蛋白酶组用 pH 4.0 醋酸盐缓冲液(0.02 mol/L)。在 37°C 水浴中温育，定时取样测定弹性蛋白酶残存活性。为了扣除温度、pH 对酶活性的影响，以无胰蛋白酶或无胃蛋白酶，与样品组相同条件温育，同一温育时间的弹性蛋白酶活力为 100%，计算被蛋白酶降解的天

然酶、修饰酶的相对残存活性(图4)。结果表明修饰酶与天然酶一样,对胰蛋白酶的降解作用有很强的抗性。与胰蛋白酶温育2h后,修饰酶与天然酶的相对残存活性分别为99.1和97.8%,二者无明显差别。从图4可以看出,经胃蛋白酶于pH 4.0, 37°C作用90 min后,修饰酶的残存活力为85.2%,而天然酶的活性仅剩10.0%,两者差别显著。

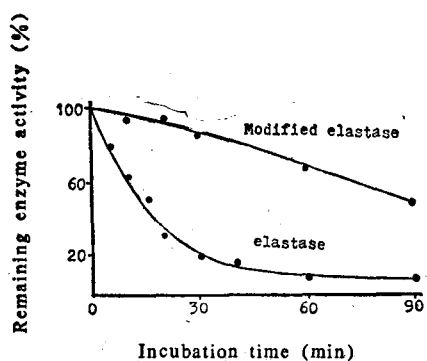


Fig 3. Stability of modified elastase to heat 1 mg/ml elastase or modified elastase sodium borate(0.02 mol/L, pH 8.8) was incubated at 50°C

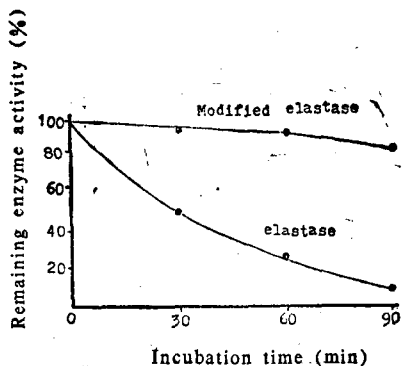


Fig 4. Ability of modified elastase to resist the hydrolysis of trypsin 0.1 mg/ml elastase modified elastase which trypsin in sodium borate (0.02 mol/L) pH 8.8 was incubated at 37°C

Tab 1. Stability of modified elastase to pH

Incubation pH	Sample	Incubation time (min)						
		0	30	40	60	80	90	120
8.8	Natural elastase	100	93.6	—	93.6	—	89.4	80.9
	Modified elastase	100	100	—	100	—	98.8	97.6
7.0	Natural elastase	100	—	88.3	—	80.2	—	73.3
	Modified elastase	100	—	98.8	—	96.9	—	85.3
4.0	Natural elastase	100	92.0	—	82.0	—	69.0	43.0
	Modified elastase	100	98.9	—	97.9	—	97.9	94.7
3.0	Natural elastase	100	—	71.3	—	67.1	—	44.9
	Modified elastase	100	—	98.4	—	93.7	—	72.8

Elastase or modified elastase 1 mg/ml in appointed pH buffer was incubated at 37°C. Buffer: Sodium borate(0.05 mol/L)pH 8.8; sodium phosphate(0.05 mol/L)pH 7.0; sodium acetate (0.05 mol/L)pH 4.0; Sodium citrate (0.05 mol/L)pH 3.0

## 讨 论

修饰弹性蛋白酶的分子量比天然酶明显增大,使其凝胶色谱峰前移(图1);由于修饰剂复盖在酶分子外围,对荧光发射基有屏蔽作用,致使其荧光变弱(图2),这些都证明弹性蛋白酶被右旋糖酐共价修饰。实验证明修饰酶较好地保留了原酶活性(原酶活性的94.6%)。修饰酶由于酶分子上缠绕着亲水性很强的多糖链,因而在溶液中的修饰酶有一个溶剂化层,使稳定酶分子构象的次级键得到保护,因此修饰酶对环境变化(温度、pH)比天然酶有更强的抗性(图3、表1)。大分子修饰剂的存在,使蛋白酶不易与修饰酶的酶分子接触,因此修饰酶对蛋白酶降解有较强的抗性,不易自溶(图3),也不易被胰蛋白酶、胃蛋白酶降解(图4)。修饰酶这些性质变化,有利于工艺和临床应用。更令人兴奋的是,修饰酶较天然酶表现出较

强的抗消化道破坏的能力,使修饰酶更有利于口服给药方式。

### 参 考 文 献

1. Shotton DM. Elastase. In: Perlmann GE, ed *Methods in Enzymology*. Vol XIX. New York: Academic Press, 1970:113~140.
2. 李明云. 弹性酶. 医药工业 1975; (5):41.
3. 王跃芳, 等. 弹性蛋白酶的药理研究. 江苏医药 1980; (5):23.
4. 程玉华, 等. 水溶性大分子修饰<sup>125</sup>I-胰凝乳蛋白酶在小鼠体内的分布与代谢. 吉林大学自然科学学报 1983; (1):91.
5. 吴梧桐, 等. 用亲和层析法纯化胰弹性蛋白酶. 南京药学院学报 1981; (16):17.
6. Axen R, et al. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halide. *Nature* 1967; 214:1302.

## STUDY ON CONJUGATE MODIFICATION OF ELASTASE

WANG Shu-Qi and CHENG Yu-Hua

(Enzyme Engineering Laboratory, Jilin University, Changchun)

**ABSTRACT** Some properties of the dextran activated with bromine cyanide modified elastase were studied and compared with those of natural elastase. Results showed that the enzymatic activity of elastase retained 94.6% of its original enzymatic activity after covalent modification with activated dextran. Modified elastase exhibited the same ability to resist hydrolysis by trypsin as the natural elastase. But its ability to resist hydrolysis by pepsin and denaturation by heat and acid was found to be higher than that of the natural elastase. These results suggest that the modified elastase may have greater merit in clinical applications than natural elastase.

**Key words** Elastase; Dextran; Modification; Stability