

磁性亲和分离法纯化胰蛋白酶

安小宁, 高巍

(华南理工大学化学科学学院, 广东 广州 510640)

摘要: 采用壳聚糖包埋纳米钡铁氧体, 经环氧氯丙烷交联制得磁性亲和载体, 应用激光粒度分析仪和振动样品磁性测定仪对磁性亲和载体进行表征, 动态激光散射分析结果表明, 磁性粒子的平均直径为401纳米。磁性测量表明, 超细磁粉具有较高的磁性。然后利用碳二酰亚胺活化法, 将抑肽酶与此微粒共价结合得到磁性亲和吸附剂, 应用于胰蛋白酶的亲和纯化。论文详细讨论胰蛋白酶亲和纯化条件, 将磁性亲和分离法成功地应用于亲和纯化胰蛋白酶。

关键词: 高磁性壳聚糖微粒; 固定化抑肽酶; 亲和吸附剂; 胰蛋白酶纯化; 酶产品

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)11-0037-04

Magnetic Affinity Support for Trypsin Separation and Purification

AN Xiao-ning, GAO Wei

(School of Chemistry, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Ultrafine high magnetic affinity support was prepared by coating nanometer barium ferrite with chitosan, cross-linking with epichlorohydrin, and then activating with carbodiimide. The analysis result of the dynamic laser scatters indicated that the average diameter of the magnetic particles was 401 nm. The magnetic measurement showed that the ultrafine magnetic particles were high magnetic. At first the aprotinin was considered to be affinity ligand and covalently bound onto the magnetic particles via carbodiimide activation, and then these particles were used for the affinity purification of trypsin. The proposed method was successfully applied to the affinity purification of trypsin with the purified conditions of trypsin affinity under discussing.

Key words: magnetic support; immobilization of aprotinin; affinity Purification; Trypsin purification; enzyme production

胰蛋白酶 (Trypsin, EC 3.421.4) 是一种蛋白水解酶 (Protease), 具有蛋白水解酶的通性。胰蛋白酶的专一性很高, 只水解羧基端组成的 L-精氨酸和 L-赖氨酸的肽键。

胰蛋白酶在医药、食品、工业和有机合成中具有广泛应用。临床上可用于抗炎症和消化药物的复配, 食品加工中用于酒类和饮料的澄清、畜蛋白原的水解、胰蛋白酶的制备和除去乳品在贮藏时氧化产生的味道。工业上用于皮革加工和生丝处理^[1]。因此胰蛋白酶的纯化研究具有重要的经济和技术意义。

胰蛋白酶的纯化方法有离子交换法和亲和色谱法, 亲和层析和经典柱层析相比, 亲和层析具有吸附洗脱速率快、色谱柱压较低、生产规模容易按比例放大等多项优点。但亲和吸附剂载体的选择是一个难以解决的问题。

近年来, 一种新型功能高分子材料——磁性高分子微粒作为生物分子的亲和纯化载体, 由于在其表面

能共价键结合亲和配基, 还因具有磁性, 在外加磁场的作用下, 进行快速运动或分离, 因而引起众多研究人员的广泛关注^[2-4]。

本文采用简单、易行的方法, 制备出具活性基团的高磁性壳聚糖微粒、共价偶联抑肽酶, 应用于胰蛋白酶的亲和纯化, 纯化倍数为1.72, 活性回收率为41.2%, 实验结果表明, 高磁性壳聚糖微粒可用作亲和吸附剂。

1 实验部分

1.1 试剂与原料

壳聚糖 (成都智能达化工厂); 纳米钡铁氧磁粉 (兰州大学教育部应用磁学重点实验室); 戊二醛 (北京东环联合化工厂); 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二酰亚胺盐酸盐 (EDC, 美国Sigma-Aldrich公司) 环氧氯丙烷 (上海化学试剂厂); 硼砂 (天津化学试剂厂); 胰蛋白酶和抑肽酶 (上海生化研究所); 苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐 (上海生化研究所)。

1.2 仪器

振动样品磁性测定仪 (VSM, LS7307-9309);

收稿日期: 2007-10-20

基金项目: 广州市科技计划项目 (No: 2005Z3-D2111); 广东省科技计划项目 (No: 2007B030702009)

动态激光散射粒径分析 (HORIBA LA-920); 分光光度计 (HitachiU-1100)。

1.3 高磁性壳聚糖微粒的制备

在带有搅拌的三口瓶中, 加入氢氧化钠溶液和磁粉, 搅拌分散, 加入壳聚糖溶液, 包埋磁粉, 用稀盐酸调节溶液pH=9~10, 加入环氧氯丙烷, 加热至50 °C反应10 h, 过滤, 沉淀用水洗至pH≈7, 在50 °C下干燥。

1.4 抑肽酶的固定方法

40~300 mg磁性壳聚糖微粒加入到2 mL缓冲溶液 (0.003 mol/L磷酸盐缓冲, pH 6), 悬浊液超声分散10 min后, 加入0.5 mL的EDC溶液 (0.025 g/mL的缓冲液) 和25 mL的抑肽酶溶液 (1 mg/mL缓冲液), 悬浊液超声分散30 min。采用离心法分离固定化抑肽酶, 上清液用于蛋白质分析。制得的亲和吸附剂用磷酸缓冲溶液洗涤3次后, 置于磷酸缓冲溶液中, 在4 °C下保存、待用。

1.5 胰蛋白酶的亲和纯化方法

0.5 g亲和吸附剂加入到50 mL胰蛋白酶溶液 (1 mg/mL) 中, 亲和吸附胰蛋白酶10 min, 在磁场中固液分离, 测定溶液中蛋白质的活性和浓度。微粒置于硼砂缓冲溶液中, 振荡洗涤5 min, 重复洗涤4次, 在磁场中固液分离, 测定溶液中蛋白质浓度。加入20 mL、0.5 mol/L氯化钾溶液 (含0.01 mol/L乙酸) 洗脱胰蛋白酶, 在磁场中固液分离, 得到高活性的胰蛋白酶溶液, 测定溶液中胰蛋白酶的活性和浓度。

1.6 测定方法

蛋白质浓度的测定: 测定蛋白质在280 nm和260 nm的吸光值, 计算蛋白质浓度^[5]。

胰蛋白酶活性的测定: 参照文献^[6]中胰蛋白酶活性测定方法。

2 结果与讨论

2.1 高磁性壳聚糖微粒的制备及表征

制备亲和纯化磁性载体的研究应关注两个方面: 第一, 磁性载体表面具有适当密度的官能团, 可高效率的耦合亲和和配体。第二, 磁性载体具有较高的磁学性质, 使磁性粒子从反应相中容易分离^[2-4]。

磁性载体是指用天然或合成有机高聚物包埋磁性材料制成核—壳式磁性微粒, 磁材料一般是用四氧化三铁^[7], 磁流体^[8]或磁铁矿^[9]等, 常用的聚合物有聚乙烯醇^[7]、聚苯胺^[10]、玻璃^[11]和聚苯乙烯^[12]等, 但这些材料并没有提供较高的磁性能或较丰富的官能团。

为了克服上述不足之处, 我们采用壳聚糖包埋纳米铁氧体的办法, 制备出表面具有丰富氨基官能团的

高磁性壳聚糖微粒。磁性壳聚糖微粒的磁性和粒径测定结果见表1。表1结果表明磁性壳聚糖粒子具有较高的磁性和超细粒径。

表1 磁性壳聚糖微粒的磁性和粒径测定结果

测试性能	Hc(Oe)	δs (emu/g)	δr (emu/g)	平均粒径
分析结果	2000	34.7	26.1	401nm

2.2 抑肽酶的固定化

在抑肽酶固定化反应结束后, 测定上清液中蛋白质的含量, 抑肽酶的固定化百分率随着磁性壳聚糖粒子加入量的增加逐步增加, 磁性壳聚糖粒子加入量为205 mg时, 抑肽酶的固定化率达到100%, 结果图1所示。在以下实验中, 采用磁性载体固定化抑肽酶的量20 mg/g。

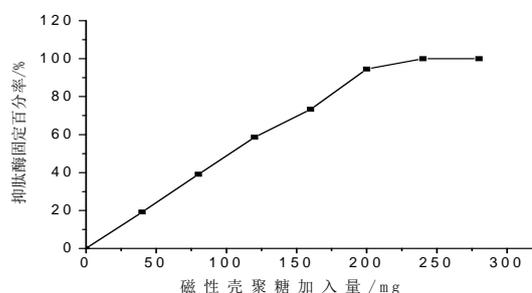


图1 磁性壳聚糖微粒加入量和抑肽酶固定化百分率的关系

Fig.1 Effect of the amount of magnetic chitosan particles added on the amount of aprotinin bound.

因此, 可以认为, 磁性壳聚糖微粒经EDC活化, 在其表面的氨基和抑肽酶的羧基反应形成共价键^[13]。

2.3 胰蛋白酶的纯化

pH值、离子强度、温度和洗涤次数是亲和纯化的重要条件, 磁性亲和分离也不例外。据文献^[14]报道, 抑肽酶与胰蛋白酶之间的亲和性在pH=8.0处是稳定的, 胰蛋白酶的活性在4 °C时比较稳定。本试验中, 强磁性亲和吸附剂亲和吸附胰蛋白酶的温度与pH值采用文献^[14]报道的条件值。

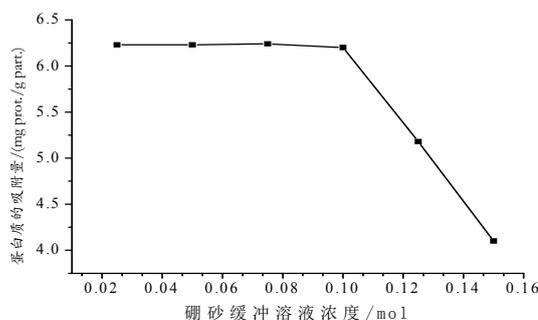


图2 胰蛋白酶的亲和吸附量与缓冲溶液浓度的关系

Fig.2 The effect of borax buffer concentration on the amount of

adsorption protein

胰蛋白酶的亲和吸附量与缓冲溶液浓度的关系如图 2 所示。由图 2 可知，缓冲溶液离子浓度较高不利于胰蛋白酶的亲和吸附。

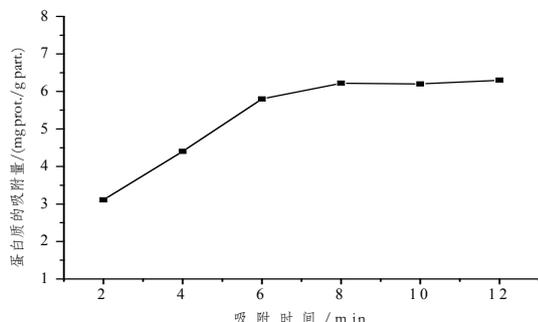


图 3 胰蛋白酶的亲和吸附量与亲和时间的关系

Fig.3 The effect of adsorption time on the amount of adsorption protein.

胰蛋白酶的亲和吸附量与亲和时间的关系如图 3 所示。由图 3 可知，吸附时间超过 8 min 以后，胰蛋白酶的吸附量已经达到了饱和。

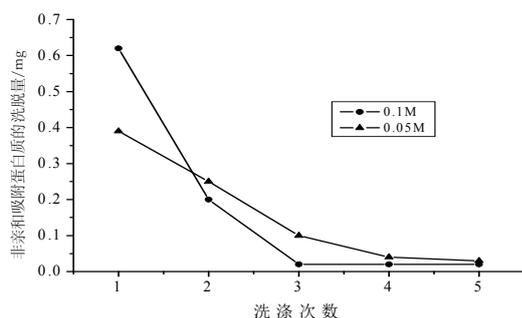


图 4 非亲和吸附的蛋白质的洗脱量与洗脱缓冲液浓度和洗涤次数的关系

Fig.4 The effect of borax buffer concentration and wash times on desorbed amount of nonaffinity adsorption protein.

非亲和吸附的蛋白质的洗脱量与洗脱缓冲液浓度和洗涤次数的关系如图 4 所示，图 4 结果表明，较高洗脱液浓度洗脱非亲和吸附的蛋白质效果更佳，此外，图 4 还显示，0.1 M 硼酸缓冲液洗脱非亲和吸附的蛋白质，需要进行两次。

由于胰蛋白酶的活性在溶液 pH 小于 2.5 时，其活性降低较多，为保持胰蛋白酶在纯化后有较高活性，所以在胰蛋白酶洗脱试验中，选用 pH=3.0 氯化钾溶液，在 4 °C 等条件下，洗脱胰蛋白酶。

胰蛋白酶的洗脱量与洗脱液浓度和洗涤次数的关系如图 5 所示，图 5 结果表明，使用 20 ml、0.5 M 氯化钾洗脱液（含 0.01 M 乙酸）洗脱一次，即可使胰

蛋白酶的收率达到 75%。

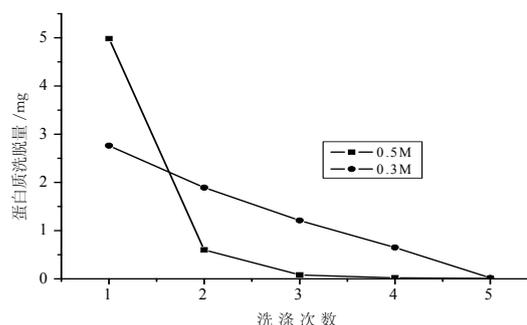


图 5 胰蛋白酶的洗脱量与洗脱液浓度和洗涤次数的关系

Fig.5 The effect of potassium chloride solution concentration and wash times on desorbed amount of trypsin.

综上所述，胰蛋白酶纯化的最佳条件是：亲和吸附介质为 pH 8、0.1 mol/L 硼酸缓冲液，吸附时间为 10 min，采用 pH 8、0.1 mol/L 硼酸缓冲液为洗脱非亲和吸附蛋白质的洗脱液，洗涤两次洗脱非亲和吸附蛋白质，使 20 ml、0.5 mol/L 氯化钾溶液（含 0.01 mol/L 乙酸）洗脱胰蛋白酶。

3 应用

强磁性壳聚糖微粒共价偶联抑肽酶应用于含胰蛋白酶的试样（1500 U/mg），胰蛋白酶纯化后活力单位为 2580 U/mg，纯化活力回收率为 40.97%，纯化后胰蛋白酶的活性提高了 0.72 倍。达到中国药典^[15]中胰蛋白酶的活性指标要求。

4 结论

强磁性壳聚糖微粒共价偶联抑肽酶，制备成胰蛋白酶的亲和纯化的载体，成功应用于胰蛋白酶的亲和纯化。实验结果表明，该种纯化方法简单、高效，可行。该方法与采用离子交换纯化胰蛋白酶的方法相比较，具有胰蛋白酶活力回收率高、制样简单、纯化周期短和试剂用量少等优点；而与采用亲和色谱纯化胰蛋白酶的方法相比较，具有制样简单、纯化周期短和试剂用量少等优点。

参考文献

[1] 沈同,王镜岩,赵邦悌,生物化学[M],北京:高等教育出版社,1996
 [2] Uhlen M, Magnetic separation of DNA[J]. Nature,1989,340: 733-734
 [3] Danilo AT, Manju S, Michael L and Francis SC, Magnetic bead capture of expressed sequences encoded within large

- genomic segments[J]. Nature,1993,361:751-753
- [4] Daniel RD, A new non-isotopic detection system for immunoassays[J].Nature,1995,377:758-760
- [5] Pharmacopoeia Committee of People's Republic of China, China Pharmacopoeia[M], Chemistry Industry Press, Beijing, 1995
- [6] Cao WC and Yuan HJ, General Chemical Analysis Methods for biomolecules[M], Science Press: Beijing,1982
- [7] Mullerschulte D and Brunner H, Novel magnetic microspheres on the basis of poly(vinylalcohol) as affinity medium for quantitative detection of glycosylated hemoglobin[J]. J Chromatogr A,1995,711:53-66
- [8] Hwee PK, David K, Steohen D, Nigel AT and Evgeny NY, The synthesis of submicron magnetic particles and their use for preparative purification of proteins[J]. Biotechnol Bioeng, 1998,60:419-424
- [9] Tanyolac D and Ozdural AR, Preparation of low-cast magnetic nitrocellulose microbeads[J]. Reactive & Functional Polymers, 2000,45:235-242
- [10] Wan MX and Fan JH, Synthesis and ferromagnetic properties of composites of a water-soluble polyaniline copolymer containing iron oxide[J]. J Polymer Science Part A: Polymer Chemistry,1998,36:2749-2755
- [11] Bartl K,Wenzig P and Kleiber J, Simple and broadly applicable sample preparation by use of magnetic glass particles[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 1998,36:557-559
- [12] Bartl K,Wenzig P and Kleiber J, Simple and broadly applicable sample preparation by use of magnetic glass particles[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 1998,36:557-559
- [13] Mehta, R. V.; Upadhyay, R. V.; Charles, S. W..et al. Techniques,1997, 11, 493
- [14] Wan ZQ, Li YL, Li DC. et al. High Biochemical Experiment Tutorial[M], Peking University Press, Beijing,1994
- [15] Pharmacopoeia Committee of Peoples Republic of China. China Pharmacopoeia[S]. Beijing:Chemistry Industry Press, 1995

(上接第 36 页)

4 结论

4.1 甲酸-盐酸混合液水解提取的条件为:用10%盐酸的饱和甲酸溶液在液固比为24:1、水解温度为65℃的条件下水解0.5 h,水解得率为23.62%,工艺具有一定的可行性。

4.2 正交实验结果表明,D311阴离子交换树脂对甲酸具有良好的交换性能,能有效脱除糖溶液中的残余甲酸。同时D311树脂具有一定的脱色效果,可脱色29.79%。

4.3 经脱酸、脱色后的木糖的得率为15.87%(与干燥麦草质量百分比)。这低于未处理时的23.62%,如何

才能减少木糖的损失值得我们进一步研究。

参考文献

- [1] 常雅宁,颜淑玮,俞建璞,等.竹屑制备木糖的工艺研究[J].林产化学与工业,2006,25(2):52-54
- [2] 沈戮,张韶英,赵和妹,等.甘蔗渣生产木糖的工艺探讨[J].广东化工,1999(6):35-36
- [3] 刘仁成,黄广民,姚伯元,等.椰壳常压酸水解制备木糖[J].食品科学,2006,27(12):263-167
- [4] 孙勇,林鹿,庞春生,等.竹浆纤维溶解过程中的均相水解研究[J].生物质化学工程,2007,41(2):5-10

发酵风味剂悄然流行

近期,名为“发酵风味剂”的新型食品配料逐渐在乳品、果汁、果/奶酒行业流行开来。在处处注重天然,提倡健康饮品的时代,“发酵风味剂”以其天然提取风味液的健康形象理念,给传统依靠香精来提升风味的饮料配料市场带来了不小的冲击。

“发酵风味剂”是以奶酪、乳清或果汁等天然物质为原料,经特殊菌种长时间发酵,经生物酶解技术提取其发酵风味物质,再经浓缩、调配而成的天然风味液。据悉,此技术源于日本,在我国由杭州汇捷食品化工有限公司引进技术并生产销售。

“发酵风味剂”包括酸奶风味以及果汁、果酒风味系列产品。应用于乳品中可提供自然、强烈的发酵风味和发酵口感,而省去发酵步骤,运用于果汁中可制成低果汁含量而高倍果汁饱满口感的产品,降低卡路里,节约成本。

(信息来源:中国产业经济信息网)