

以壳聚糖为亲和层析载体提纯胰蛋白酶

隋德新 陈 天 姜涌明 史永昶

(江苏农学院生化教研室, 扬州 225001)

提 要

以自制的壳聚糖为亲和层析载体, 鸡蛋粘蛋白作配基, 通过戊二醛交联构建成为亲和吸附剂, 对胰蛋白酶的亲和层析提纯进行了研究。结果表明, 胰蛋白酶活性回收率达 70%, 纯度经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为一条带, 实验有操作安全、简单、快速和收率高等优点。

关键词 壳聚糖, 亲和层析, 胰蛋白酶

与其他生化分离方法相比, 亲和层析技术具有高收率, 高纯度, 能保持生物大分子天然状态等优点, 广泛地应用于生物大分子的分离提纯。特别是对含量极少的基因工程产物的一步提纯, 更显示出这一技术的优越性^[1,2]。但是, 亲和层析的缺点是载体(如琼脂糖 Sepharose)价格昂贵, 机械强度低(易压床), 配基的偶联条件激烈, 需要使用剧毒的活化剂(CNBr), 并且耗时、费力, 因而限制了这一技术的大规模应用^[2,3]。如能找到一种容易制备、价格低、效率高的载体, 建立简便、安全的配基偶联方法, 制备成稳定性好, 活性回收高, 使用周期长, 机械性能稳定的亲和吸附剂, 无疑将给该技术的工业应用带来广阔的前景。

壳聚糖是一种 N-脱乙酰基氨基葡萄糖的聚合物, 广泛地应用于酶和细胞的固定化, 构建人工器官等^[4-6]。我们以自制的壳聚糖为载体, 鸡蛋粘蛋白作为配基, 采用戊二醛交联, 硼氢化钠还原的方法, 成功地制备了用于胰蛋白酶提纯的新型亲和吸附剂, 并对胰蛋白酶的纯化进行了研究, 结果表明: 提纯的胰蛋白酶收率达 70%, 纯度好(电泳均一), 没有非特异性吸附作用, 层析过程中流速快, 无压床现象, 特别是配基的偶联过程简单, 以戊二醛替代有毒的溴化

氰提供了安全、快速的配基偶联方法, 此外, 壳聚糖具有亲水、多孔、均匀, 载体上有较多的可供活化的氨基, 是一种较为理想的亲和层析载体。目前, 在国内外杂志上尚未见到以壳聚糖为亲和层析载体的研究报道, 特介绍如下。

材 料 和 方 法

1. 材料

(1) 壳聚糖: 由淡水虾壳自制, 粘度 850 厘泊, 纯白色。(2) 鸡蛋粘蛋白: 按文献[7]方法自制。(3) 粗胰蛋白酶: 按文献[8]方法制备。(4) 戊二醛: E. Merck 公司产品, 浓度 25%。(5) 硼氢化钠: E. Merck 公司产品。(6) 其他试剂为分析纯或生化试剂。

2. 方法

(1) 胰蛋白酶的活性测定按文献[9]进行。
(2) 蛋白质浓度测定按文献[10]进行。
(3) 酶纯度测定按文献[11]方法进行水平式 PAGE 和 IEF-PAGE 鉴定。
(4) 配基偶联效率的测定采用间接法, 即将偶联时所用的蛋白量减去偶联后所残存的未偶联的量(偶联后的母液和洗液中的蛋白总量和)即为被结合的蛋白量。
(5) 鸡蛋粘蛋白抑制作用的测定参照文献

【7】的方法进行。

(6) 亲和吸附剂的制备方法 称取一定量的壳聚糖, 用 1% 的冰醋酸彻底溶解得均一粘稠的壳聚糖溶液, 随后, 加入鸡蛋粘蛋白溶液, 搅拌吸附 30min, 再间歇加入戊二醛稀溶液至终浓度 0.6%, 在快速搅拌下交联 6—8h。然后, 滴入到氢氧化钠稀溶液中, 使亲和吸附剂沉出 (pH 8.0)。经蒸馏水反复洗涤后, 悬浮在 0.05 mol/L pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液中, 加入 1% 的硼氢化钠使游离的醛基充分封闭 (还原)。最后, 用布氏漏斗抽滤, 用蒸馏水充分洗涤, 再经上述缓冲液洗涤, 得颗粒均匀, 粒度约 100 目的纯白色亲和吸附剂。

结果和讨论

1. 配基偶联量的确定

在最适戊二醛用量 (0.6%) 和确定的 pH 条件下, 取不同的配基量 10—100mg, 分别制备亲和吸附剂, 测定配基结合量。结果表明, 每克干重的壳聚糖结合配基的最大量为 50mg。

2. 亲和吸附剂对胰蛋白酶的抑制能力

胰蛋白酶的活力测定是以酪蛋白为底物进行的, 酶活力单位定义为: 每分钟分解出 1 μ g 酪氨酸的酶量为 1 单位。实验结果表明, 提纯的粘蛋白抑制胰蛋白酶的比例为 1:1, 即 1mg 粘蛋白可抑制 0.23U 的胰蛋白酶。而 1mg 固定化的粘蛋白可抑制 0.161U 的胰蛋白酶, 即具有 70% 的抑制能力。推测固定化的粘蛋白对胰蛋白酶抑制能力的下降可能是由于载体的空间位阻和扩散限制所致。此外, 在配基偶联过程中戊二醛使部分粘蛋白变性也是影响因素之一。

3. 亲和吸附剂对胰蛋白酶的提纯能力

按前述的亲和吸附剂制备方法, 取 2.0g 壳聚糖加 100mg 粘蛋白和取 5.0g 壳聚糖加 250mg 粘蛋白制备成亲和吸附剂, 分别装于 (ϕ : h = 2:20cm) 和 (ϕ : h = 3.1:30cm) 的玻璃层析柱内, 用 0.05mol/L pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液平衡后, 将粗胰蛋白酶上柱, 再用相同缓冲液淋洗, 然后, 用 0.1mol/L pH 2.5 甲酸钾 (含

0.5mol/L KCl, 0.05mol/L CaCl₂) 缓冲液洗脱, 用紫外检测仪检测和部分收集器收集。实验结果如图 1 和表 1 所示。

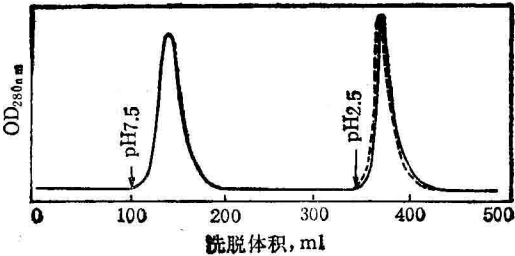


图 1 壳聚糖-粘蛋白亲和吸附剂纯化胰蛋白酶洗脱曲线
活性—— 蛋白浓度——

表 1 壳聚糖-粘蛋白亲和吸附剂纯化胰蛋白酶的能力

说明 批次	总蛋白 (mg)	比活性 (U/ mg)	总活性 (U)	回收率 (%)	提纯 倍数	等电聚 焦电泳 (带)
样品液 ¹⁾	214	0.23	49.22	100	1	4
洗脱液 ¹⁾	88	0.39	34.50	70	1.7	1
样品液 ²⁾	534	0.23	122.82	100	1	4
洗脱液 ²⁾	234	0.39	91.26	74	1.7	1

- 1) 由 2.0g 壳聚糖作载体, 偶联 100mg 粘蛋白构成的亲和吸附剂。
2) 由 5.0g 壳聚糖作载体, 偶联 250mg 粘蛋白构成的亲和吸附剂。



图 2 胰蛋白酶亲和层析前后 IEF-PAGE 图谱
1.亲和层析后; 2.亲和层析前

从图 1 可见,亲和层析柱是均匀、致密的,在比较快的淋洗和洗脱速度(100—120ml/h)下,没有任何压床现象,洗脱峰集中,对称,无拖尾现象。粗的胰蛋白酶经亲和纯化后,收率达 70%,提纯倍数为 1.7;亲和层析前,粗胰蛋白酶经聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳为 4 条区带,经亲和层析后,洗脱液在相同条件下电泳为单一区带,如图 2。

4. 壳聚糖载体的非特异性吸附作用

在没有配基存在,其它条件与试验组相同的情况下,考查了壳聚糖对胰蛋白酶的非特异性吸附作用。实验结果表明,经上述处理的壳聚糖对胰蛋白酶几乎没有非特异性吸附作用,淋洗和洗脱图谱如图 3 所示。

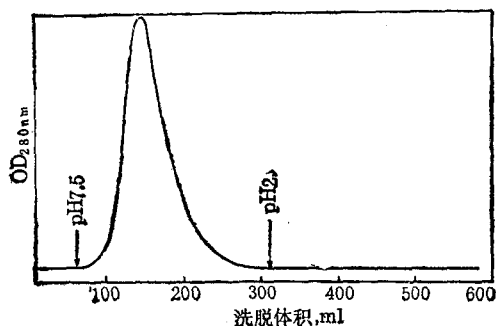


图 3 壳聚糖载体的非特异性吸附作用

5. 亲和吸附剂的重复使用性能

亲和吸附剂的特性之一是可以重复多次使用。为此,我们考查了上述亲和吸附剂提纯胰蛋白酶的重复使用性能。结果表明,上述亲和吸附剂,在相同实验条件下,经 4 次(每隔 7 天使用一次)重复使用,流速、提纯能力,收率等均未下降,符合亲和吸附剂的要求。

综上所述,以壳聚糖作为亲和层析载体具有如下特点:

(1) 壳聚糖是 N-脱乙酰基氨基葡萄糖的聚合物,分子上含有大量的游离氨基,可供与配基偶联。

(2) 利用壳聚糖上的氨基和配基上的氨基,以戊二醛作偶联剂共价连接,可制备成性能稳定的亲和吸附剂。特别是在配基偶联过程中,不使用溴化氰,使亲和吸附剂的制备过程安

全、省时、省力和低成本,便于常规条件的实验室操作和较大规模的放大,为替代价格昂贵的琼脂糖(Sephrose)载体提供了可能。

(3) 壳聚糖的分子量、脱乙酰化程度、粘度、含氮量对配基的偶联都有一定的影响。高分子量、高脱乙酰化(>90%)、高粘度(>850厘泊)和含氮量<6.5的壳聚糖,可制备成配基偶联量较高的亲和吸附剂。

(4) 壳聚糖可以从虾、蚕蛹等甲壳类动物的外壳通过简易方法制备。其原料来源广泛,价格低廉,是一种很有开发价值的天然生物大分子,在医药、化工、食品领域已有应用^[12],用它作为载体制备高活性的固定化酶已有报道^[13,14]。而用它作为载体与配基偶联制备成亲和吸附剂,在国内外刊物上尚未见公开报道。可以预料,用它作载体在生物大分子的分离提纯,特别是基因工程产物的下游工程方面,具有不可低估的潜力。

参 考 文 献

- 1 袁中一等. 固相酶与亲和层析. 北京:科学出版社,1975: 145—211
- 2 Luong J H T et al. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988; 31: 439
- 3 Lowe C R. *An Introduction To Affinity Chromatography*, Elsevier/North—Holland Biomedical Press, 1979: 21—80
- 4 Stanley W L et al. *Biotechnology and Bioengineering*, 1975; 17: 315
- 5 隋德新等. 中国农业生物技术. 北京:农业部科技司, 1989: 99—102
- 6 Champluvier B et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988; 27: 464
- 7 张龙翔等. 生物化学实验方法和技术. 北京:人民教育出版社,1981: 138—142
- 8 何兆雄等. 动物生化制药基础. 北京:中国商业出版社, 1985: 285—287
- 9 朱俭等. 生物化学实验. 上海:上海科学技术出版社, 1981: 186—189
- 10 Cooper T G. *The Tools of Biochemistry*, A Wiley-Interscience Publication, 1977: 51
- 11 华家桢等. 实用蛋白质化学技术. 上海:上海科学技术出版社,1982: 326—338
- 12 陈天等. 生物医学工程学杂志,1989;6: 60
- 13 隋德新等. 生物化学与生物物理进展,1990;17(5): 309
- 14 Finley J W et al. *Process Biochemistry*, 1979; 6: 12

[本文于 1990 年 5 月 23 日收到,9 月 3 日修回]