

用壳聚糖亲和磁性微球纯化血浆凝血酶的研究

李梅基^{1, 2)} 李昭华²⁾ 胡建成¹⁾ 董先智^{2)*}

(¹⁾ 兰州大学生命科学学院, 兰州 730000; ²⁾ 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 通过化学共沉淀法合成纳米粒子 Fe_3O_4 磁核, 以壳聚糖为包裹材料包被自制的磁核, 采用乳化交联法制备了具有核-壳结构的磁性高分子微球-壳聚糖磁性微球, 并偶联肝素配基得到了一种新型亲和磁性微球, 应用 SEM、FT-IR、XRD 等对微球的粒径、形貌、结构和磁响应性进行了表征。考察了该亲和磁性微球对凝血酶的分离纯化性能, 并与传统的 DEAE 离子交换色谱法进行了比较。结果表明, 所得亲和磁性微球具有较窄的粒径分布、形状规整, 粒径在 50 nm 左右。对凝血酶一步吸附纯化获得了比活为 1879.71 U/mg 的酶, 得率 85%, 纯化倍数 11.057, 而传统柱层析法得率为 72%, 纯化倍数仅为 5.33。制备了壳聚糖亲和磁性微球, 并将磁分离技术应用于凝血酶的分离纯化, 得到了较好的效果, 这将对凝血酶的纯化及生产具有一定参考价值。

关键词 亲和磁性微球, 壳聚糖, 凝血酶, 磁分离, 纯化
学科分类号 Q658

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00587

凝血酶(EC3.4.21.5)是一种专一性很强的丝氨酸蛋白水解酶, 在调节血小板凝集和血液凝固的止血剂中发挥多功能作用^[1-2]。它能水解血纤维蛋白原的 4 个 Arg-Gly 肽键, 产生不溶性的血纤维蛋白, 使血液变成凝胶而发生凝固。专一的酶切位点使得凝血酶在基因工程中也得到了广泛应用, 将凝血酶酶切识别序列作为融合蛋白接合位点^[3-4]进行基因工程蛋白质产品后续加工处理。在临床上, 凝血酶广泛适用于局部止血^[5], 可用于手术中不易结扎的小血管止血、消化道出血以及外伤出血等。目前, 医用和试剂用凝血酶的生产主要依靠从天然产物如动物血浆中分离纯化。从血浆中分离纯化凝血酶主要包括凝血酶原的提取、凝血酶原的激活和凝血酶纯化几个步骤。国内外凝血酶纯化的方法有很多种, 传统的物理化学方法即丙酮沉淀法和硫酸铵分级盐析法, 这两种方法操作简便、成本低, 但得到的凝血酶制品纯度不高、回收率低, 应用上受到一定限制。与传统的物理化学方法相比, 采用层析法分离血浆蛋白具有分辨率高、选择性好等优点, 能够用于血浆中一些微量蛋白的分离, 同时还可以获得较高纯度的血浆蛋白制品。目前纯化凝血酶

的层析法主要有离子交换层析、凝胶过滤层析、疏水层析和亲和层析三种方法。在上述方法中, 获得产品纯度最好的方法是亲和层析法, 在层析柱中使用亲和性填料如肝素化的葡聚糖等, 利用亲和和吸附分离制备凝血酶。然而亲和层析法的一个局限是对上样液体的质量要求较高, 前期粗分离得到的样品液中常常含有悬浮微粒和各类杂质, 如不予以预纯化, 会出现淤堵、层析效率低下等问题并影响产品的质量。此外, 采用亲和层析法分离凝血酶比较耗时, 还会产出大体积的蛋白质稀溶液, 对生产制备都有较大影响。目前, 国内外还尚未见到运用亲和磁分离技术快速纯化凝血酶的报道。

磁性高分子微球是将磁性粒子分散、包裹于高分子材料中或者包覆在高分子材料表面形成的具有特殊功能团的微球^[6], 是近些年发展起来的一种新型功能高分子材料。它除具有高分子微粒的特性, 如可通过共聚、表面改性等化学反应在微球表面引入多种反应性功能基(如—OH、—COOH、—CHO、—NH₂等), 也可通过共价键来结合酶、细胞、抗

* 通讯联系人。

Tel: 010-64839157, E-mail: xzdong@ibp.ac.cn

收稿日期: 2009-10-11, 接受日期: 2009-11-25

体等生物活性物质, 还因具有磁性, 可在外加磁场的作用下方便地分离. 磁性高分子微球广泛应用于生物技术和生物医学的不同领域, 包括酶的固定化^[7]、靶向药物^[8]、蛋白质纯化^[9]、DNA^[10]和细胞分离^[11]. 近些年来化学合成的高聚物如聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇、硝化纤维素、聚乙烯醇缩丁醛和天然高聚物藻酸钙、壳聚糖作为高分子载体用于制备磁性微球^[12]. 化学高聚物存在化学毒性和生物不安全性, 所制备的磁性微球通常用于化学化工和环境保护(如废水中重金属粒子的吸附处理), 并且化学合成比较昂贵. 壳聚糖为甲壳素的 N-乙酰类聚物, 是自然界存在的天然阳离子生物聚合物, 无毒, 具有良好的亲水性、生物相容性、生物可降解性、抗菌性, 并与许多生物大分子具有高亲和性, 其分子链上丰富的羟基和氨基使其易于进行化学修饰而被赋予多种功能, 壳聚糖已经广泛应用于生物技术、生物医学、食品、化工、环境等领域^[13-18]. Chang 等^[19]制备了用于除去 Cu^{2+} 的壳聚糖结合 Fe_3O_4 磁性纳米微粒, Safarikova 和 Safarik^[20]通过磁性壳聚糖粒子一步操作部分纯化了马铃薯块茎中的凝集素.

以磁性高分子微球为固相介质对蛋白质纯化是一项新兴的蛋白质分离技术. 它是通过对磁性微球表面改性, 共价结合能被目标蛋白识别和可逆结合的配基, 然后对目标蛋白进行分离. 生物科学和生物技术领域蛋白质的分离和纯化一般是通过改变 pH 值、温度、粒子强度、介电常数等因素, 采用各种各样的色谱、电泳、超滤、沉淀等来达到分离的目的, 分离过程繁杂, 而且目标蛋白的损失大. 与传统分离方法相比, 蛋白质的磁分离技术具有快速、高纯度、高收率等优点, 并且降低了固定资产投入和操作成本^[21].

我们以自制的 Fe_3O_4 纳米粒子为磁核, 天然多聚物壳聚糖作为高分子包裹材料, 肝素为偶联配基, 成功地制备了用于提纯凝血酶的新型亲和纳米磁珠, 首次将磁分离技术应用于凝血酶的分离纯化, 并对亲和纳米磁珠的配基偶联量、最大凝血酶吸附量、重复使用等性能进行了初步研究. 相比于传统的柱层析法, 亲和纳米磁珠对凝血酶吸附分离得到了很好的纯化效果, 且大大缩短纯化时间和减少洗脱液的用量. 使用天然廉价的壳聚糖作为填料, 降低了操作成本, 这对于凝血酶的生产等研究有一定参考价值.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器和器材. D/Max-2400 粉末 X 射线衍射仪(日本理学公司 Rigaku), 透射电子显微镜(JEM-1400), 傅里叶红外光谱 FTS 3000(美国 DIGILAB 公司), UV-1700 型岛津紫外可见分光光度计, ED-1-50 真空冷冻干燥机, KQ-100DE 数控超声波清洗器, HZB-D 水循环真空泵, 78-1 磁加热搅拌器, DYCZ-24DN 型双垂直蛋白电泳仪(北京六一仪器厂), HD-5 电脑紫外监测仪(上海沪西分析仪器厂), 磁铁.

1.1.2 主要试剂. 壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90\%$, Sigma 公司), 凝血酶标准品(580IU)、纤维蛋白原标准品由中国药品生物制品检定所提供, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、PEG4000、液体石蜡、Span-80、Tween-60、正丁醇、戊二醛(25%水溶液)、环氧氯丙烷、EDC(1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺)、二甲基亚砷均为分析纯, 肝素(160U/mg 上海), DEAE-Sepharose Fast Flow (R10-Flammable, SE-75184Uppsala Swidens).

1.2 方法

1.2.1 壳聚糖亲和磁性微球的制备. 量取 0.5 mol/L 的 FeCl_2 和 FeCl_3 溶液, 通过化学共沉淀法制备了 Fe_3O_4 纳米磁核. 准确称取壳聚糖粉末配制成浓度为 5% 的壳聚糖乙酸溶液, 加入 Fe_3O_4 纳米磁粉超声分散 10 min, 在缓慢搅拌下逐滴滴入到由液体石蜡、Span-80、Tween-60、正丁醇组成的油相混合液中, 以戊二醛作为交联剂, 采用乳化交联法制备壳聚糖磁性微球. 称取一定量制备的壳聚糖磁性微球, 用适量无离子水充分溶胀, 加入 1 mol/L NaOH、DMSO 和环氧氯丙烷后, 悬浮液在 40℃ 振荡保温 2 h. 用水充分洗涤活化后的微球, 磁铁分离. 加入肝素(150 g/L), 用 0.1 mol/L HCl 调节 pH 至 4.75^[24], 缓慢加入 3% EDC, 4℃ 放置过夜, 磁铁分离, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液和去离子水交替充分洗涤, 得到壳聚糖亲和磁性微球^[22-23].

1.2.2 肝素含量的测定——天青 A 比色法. 含碱基的碱性染料天青 A 有一定波长的最大吸收, 在 pH 8.6 的巴比妥缓冲液中结合了肝素后最大吸收向短波移动, 产物在 505 nm 处有最大吸收值, 且与肝素浓度成正比, 测定该波长下的吸收值可以根据标准曲线计算出肝素的含量^[25-26].

1.2.3 凝血酶粗品的制备. -20°C 冷藏柠檬酸钠抗凝的新鲜猪血浆, 4°C 恒温溶解, $4\,000\text{ r/min}$ 低温离心收集上清. 缓慢搅拌下滴加 1 mol/L BaCl_2 , 搅拌 20 min , 4°C 冰箱静置 30 min 后 $4\,000\text{ r/min}$ 低温离心收集沉淀. 沉淀经 $\text{pH } 7.5$, 含 0.15 mol/L NaCl 和 0.2 mol/L BaCl_2 的溶液洗涤后, 用 $\text{pH } 7.5$ 浓度为 1 mol/L 的 EDTA 溶液充分溶解. 在 $\text{pH } 7.5$ 、 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液中充分透析至无 Ba^{2+} , 加入 CaCl_2 于 25°C 激活 3 h , 离心除去沉淀得凝血酶粗酶液.

1.2.4 壳聚糖亲和磁性微球分离纯化凝血酶. 壳聚糖亲和磁性微球加入适量蒸馏水充分溶胀, 用 0.05 mol/L , $\text{pH } 7.5$ 的 Tris-HCl 缓冲液充分平衡洗涤后, 加入凝血酶粗酶液, 室温缓慢搅拌吸附 30 min , 磁铁分离吸附液. 用含 0.1 mol/L NaCl 的上述缓冲液洗涤微球, 洗去杂蛋白, 然后用含 1 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液作为洗脱液洗涤微球, 磁分离收集洗脱液, 经透析脱盐, 浓缩后, 真空冷冻干燥得凝血酶精品.

1.2.5 凝血酶活性的测定. 根据纤维蛋白原标准品的可凝固物含量, 准确称取后以 0.9% NaCl 溶液配制成含有 0.1% 可凝物的纤维蛋白原溶液备用. 凝血酶标准品用 0.9% NaCl 配制成每 ml 含 5.0 、 6.4 、 8.0 、 10.0 单位的标准品溶液. 取内径 1 cm 、长 10 cm 的试管 4 支, 各精密加入配制好的纤维蛋白原溶液 0.9 ml , 置于 37°C 水浴中保温 5 min , 再精密量取凝血酶标准品溶液各 0.1 ml , 分别迅速加入上述各试管中, 摇匀, 以精密度为 0.1 s 的秒表立即计时, 在 37°C 水浴中, 测定并记录纤维蛋白原的初凝时间, 每种浓度各测 5 次, 求平均值. 标准品溶液的浓度测定为控制凝结时间在 $14\sim 60\text{ s}$, 以每管中标准品实际单位数为横坐标, 凝结时间为纵坐标, 绘标准曲线, 求得回归方程. 精密吸取待测样品 0.1 ml , 按标准曲线的制作方法平行测定 5 次, 按回归方程计算凝血酶活力单位.

2 结果和讨论

2.1 XRD 分析

用 D/Max-2400 粉末 X 射线衍射仪对所制备的 Fe_3O_4 纳米磁核和亲和磁性微球进行分析, 采用 Cu ($K\alpha$, $\lambda=0.15406\text{ nm}$) 靶, 石墨单色器, 工作电压 40 kV , 工作电流 60 mA , 扫描速度 $80/\text{min}$.

由图 1 可见, 制备的 Fe_3O_4 纳米粒子(图 1b)和亲和磁性微球(图 1a)的 XRD 衍射峰均出现了 6 个

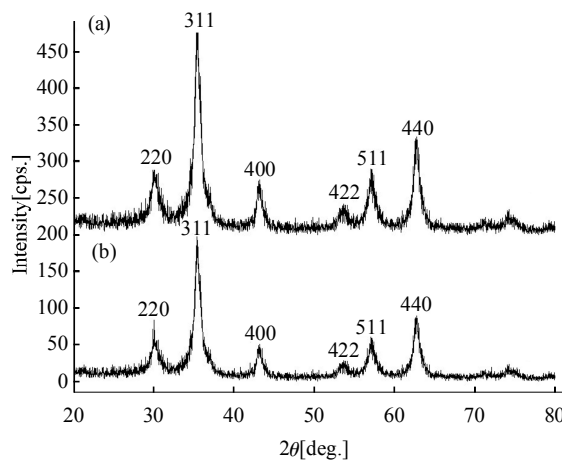


Fig. 1 XRD patterns of Fe_3O_4 nanoparticles (a) and affinity magnetic microspheres (b)

特征峰, 在 $2\theta=30.06$ 、 35.44 、 43.10 、 53.74 、 57.10 、 62.74 处, 分别对应 Fe_3O_4 的(220)、(311)、(400)、(422)、(511)和(440)晶面, 这与 Fe_3O_4 的标准卡片对照(JCPDS card no.79-0418)相一致, 表明合成的产物为立方尖晶石结构的 Fe_3O_4 晶体, 制得的样品物相较纯, 为单相 Fe_3O_4 纳米晶体, 而尖锐的衍射峰说明 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的结晶状态很好. Fe_3O_4 纳米粒子的晶体结构在包埋前后没有发生改变, 说明微球的制备是成功的. 根据 Scherrer 公式 $d=K\lambda/\beta\cos\theta$ 可求得所制备 Fe_3O_4 磁核的平均粒径为 13.41 nm .

2.2 电镜观察大小形貌

将制备好的 Fe_3O_4 纳米磁核和亲和磁性微球分别用无水乙醇溶解成悬浮液, 超声分散 10 min , 然后滴于覆有碳膜的铜网上, 待挥发至干后在透射电子显微镜 JEM-1400 下观察粒子的大小及形貌(图 2).

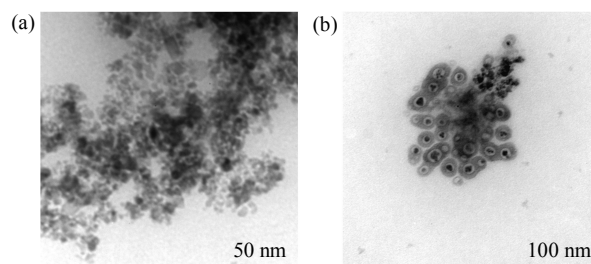


Fig. 2 The transmission electron microscope photographs of Fe_3O_4 nanoparticles(a) and affinity magnetic microspheres(b)

The scaleplate of Fe_3O_4 nanoparticles (a) is 50.0 nm and affinity magnetic microspheres (b) is 100.0 nm .

由图 2 可以看出, Fe_3O_4 磁核(图 2a)的粒径大小在 10 nm 左右, 这与我们经 XRD 分析计算得到的平均粒径 13 nm 相一致, 形状规则, 具较好的分散性. 壳聚糖亲和磁性微球(图 2b)的粒径大小平均为 50 nm 左右, 呈规则的球形, 单分散性较好, 可以看到明显的核壳结构. 在制备磁核过程中 PEG 4000 的加入可以起到分散剂和稳定剂的作用, 它能包裹在磁核的表面, 使之形成胶体粒子.

2.3 红外光谱分析

将真空冷冻干燥过的 Fe_3O_4 纳米磁核及壳聚糖空白微球、壳聚糖磁性微球、壳聚糖亲和磁性微球与 KBr 混匀后压片, 用傅里叶红外变换光谱仪测定其官能团结构, 吸收扫描波数范围为 400~4 000 cm^{-1} .

用红外光谱仪分别测定制备样品的官能团并进行分析比较, 结果如图 3 所示. 谱线 a 中 575.45 cm^{-1} 处为磁性 Fe_3O_4 的特征峰, 对应的是 Fe-O 弯曲振动^[6], 而谱线 d 和 b 在 574.61 cm^{-1} 和 576.59 cm^{-1} 也出现了该特征峰图, 说明壳聚糖对磁核的包覆是成功的. 谱线 d、b、c 共同出现了壳聚糖主要特征峰: 谱线 b 的 3 444.97 cm^{-1} 、谱线 d 的 3 425.02 cm^{-1} 和谱线 c 的 3 441.41 cm^{-1} 是壳聚糖中 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{OH}$ 的伸缩振动峰, 其中也包含壳聚糖的结晶水, 谱线 d、b、c 中 2 929 cm^{-1} 、2 881 cm^{-1} 和 2 926.98 cm^{-1} 的特征吸收峰分别是糖残基上的甲基和次甲基的 C—H 伸缩振动吸收峰. 谱线 b 的 1 401.03 cm^{-1} 、谱线 c 的 1 404.48 cm^{-1} 和谱线 d 的 1 418.07 cm^{-1} 是糖中 CH_3 的 C—H 变形振动吸收. 谱线 b

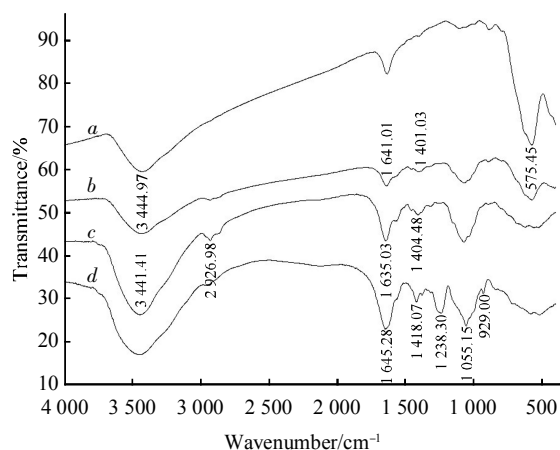


Fig. 3 The FTIR spectrum of Fe_3O_4 magnetic core (a), magnetic chitosan microspheres (b) and chitosan black microspheres(c), chitosan affinity magnetic microspheres(d)

的 1 641.01 cm^{-1} 、谱线 c 的 1 635.63 cm^{-1} 以及谱线 d 的 1 645.28 cm^{-1} 则是 C=N 的特征吸收峰, 说明交联剂的醛基和壳聚糖的氨基之间发生了交联反应. 894 cm^{-1} 左右出现的吸收峰, 是多糖的 β 构型糖苷键的特征峰. 谱线 d 在 1 238.30 cm^{-1} 出现磺酸基吸收峰, 并在 1 055.15 cm^{-1} 、929.00 cm^{-1} 处出现肝素特征吸收峰, 可以说明肝素的偶联即壳聚糖亲和磁性微球的制备是成功的.

2.4 亲和磁性微球的磁响应性测定

分光光度法测定亲和磁性高分子微球的磁沉降曲线. 用蒸馏水稀释磁性微球悬浮液, 分成 2 份, 其中一份用强磁铁放在烧杯的底部, 隔一定时间取悬浮液的上清液分别测量其透光率(480 nm 处测量). 另外的一份微球悬浮液静置, 自然沉降, 隔一定的时间取上层清液在相应的波长测量其透光率.

如图 4a 所示, 壳聚糖亲和磁性微球在磁场中 4 min 时透光率就达到了 87.6, 经过 10 min 透光率从 45 上升到 96.5, 达到比较稳定的值. 而在自然状态下重力场中(图 4b), 40 min 内其透光率仅从 32.8 上升到 55.6, 从而说明, 微球在外加磁场下具

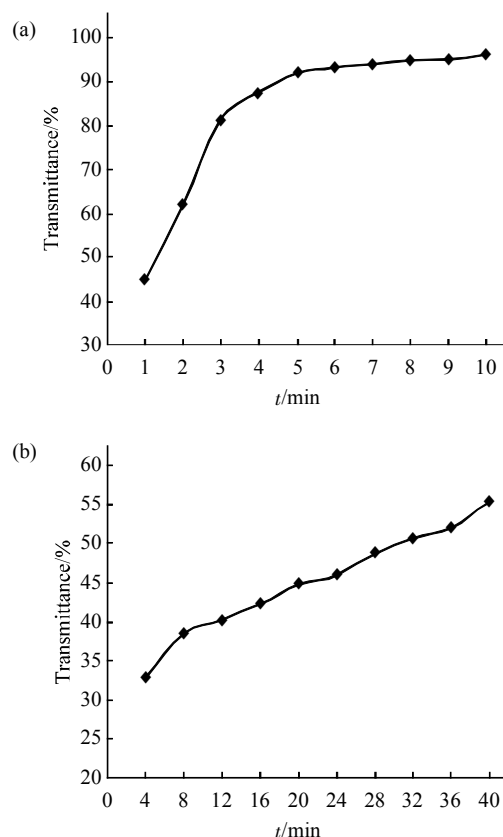


Fig. 4 The sedimentation curve of chitosan affinity magnetic microspheres under the magnetic field(a) and natural state(b)

有较强的磁响应性, 在自然状态下具有较好的悬浮稳定性.

2.5 配基偶联量的测定

称取一定量的壳聚糖磁性微球分成不同等分, 加入肝素量分别为 1、2、3、4、5、6、7、8 ml (肝素浓度为 150 g/L), 经 505 nm 比色后, 根据标准曲线得剩余肝素的浓度, 以总反应肝素量减去剩余肝素量得偶联肝素量^[25-26]. 由图 5 可知壳聚糖磁性微球对肝素的偶联量为 0.57 g/g.

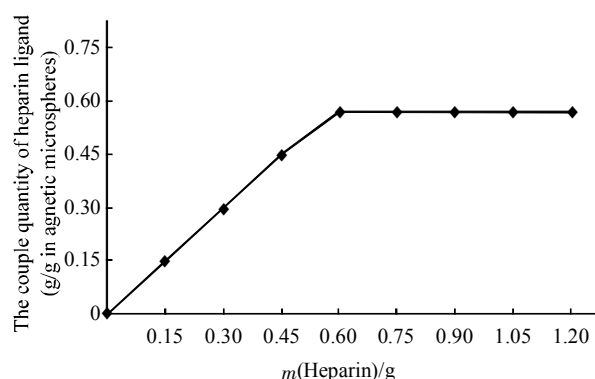


Fig. 5 The couple quantity of heparin ligand

2.6 亲和磁性微球对凝血酶的吸附容量测定

称取 7 等份亲和磁性微球溶于适量 0.05 mol/L, pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液中, 分别加入已知酶活 (310 U/ml) 的凝血酶粗酶液 2、4、6、8、10、11、12 ml, 用相同缓冲液补充至相同体积, 室温搅拌吸附 30 min, 磁分离收集测定上清液中酶活力, 总活力减去上清液中酶活即为亲和吸附磁球对凝血酶的吸附量. 由图 6 可知亲和磁性微球对凝血酶的最大吸附量为 6 200 U/g 磁性微球.

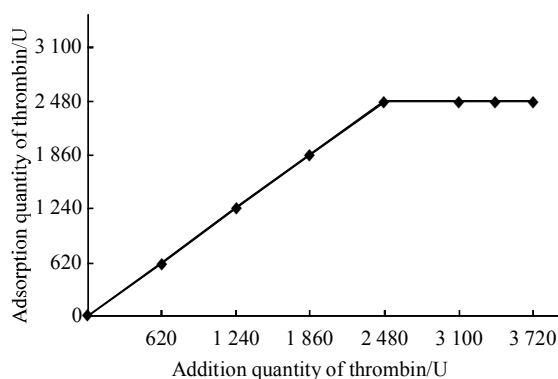


Fig. 6 The adsorption quantity of chitosan affinity magnetic microspheres for thrombin

2.7 壳聚糖磁性微球对凝血酶的非特异性吸附作用

称取一定量的未偶联肝素配基的壳聚糖磁性微球, 溶于适量 0.05 mol/L, pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液中, 加入凝血酶粗酶液, 室温搅拌吸附 30 min, 磁分离测定上清液中酶活力. 重复实验操作, 计算标准偏差 Std=0.4472, 结果如图 7 所示, 表明壳聚糖磁性微球对凝血酶无非特异性吸附作用.

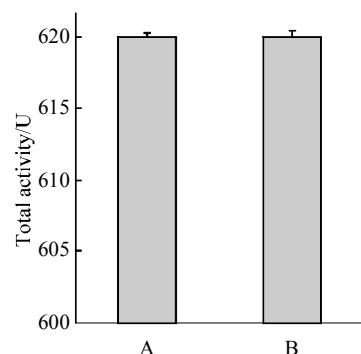


Fig. 7 Nonspecific adsorption of chitosan magnetic microspheres for thrombin
(a) Before adsorption. (b) After adsorption.

2.8 SDS-PAGE 检测亲和磁性微球纯化凝血酶结果

从 SDS-PAGE 图谱(图 8)可以看出, 条带 1 中相对分子质量为 36 ku 的凝血酶在加入 CaCl_2 激活后才出现, 通过亲和磁性微球的纯化, 达到了相对高的纯度. 从图 8 中条带 3、4 和条带 5 比较可以看出, 亲和磁性微球纯化的凝血酶较 DEAE 柱层析纯化的酶有较好的纯度.

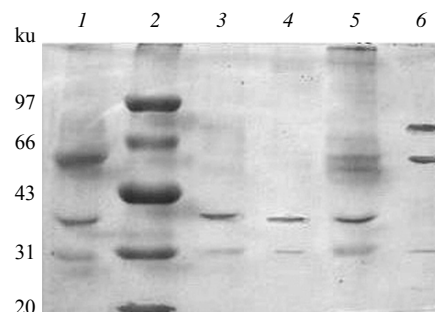


Fig. 8 Analysis of chitosan affinity magnetic microspheres purification results of thrombin by SDS-PAGE

1: Activated prothrombin fractions; 2: Marker; 3~4: Purification of thrombin from chitosan affinity magnetic microspheres; 5: Purification of thrombin from DEAE-Sepharose Fast Flow column; 6: Prothrombin rich fraction.

Table 1 Purification of thrombin by chitosan affinity magnetic microspheres

Steps	Total protein/mg	Total activity/U	Specific activity/(U/mg)	Recovery/%	Purification fold	Purification time/h
Crude sample	7.26	1 238	170	100	1	
DEAE	0.98	892	910	72	5.33	3
Affinity magnetic microspheres	0.56	1 053	1 879	85	11.057	0.75

* $P < 0.05$.

从表 1 可知, 制备的亲磁性微球纯化凝血酶得到了较高的比活, 达到 1 879 U/mg, 回收率可达 85%, 纯化倍数 11.057. 而传统的柱层析法——DEAE 离子交换只得到 910 U/mg 比活, 回收率只有 72%, 纯化倍数仅 5.33. 从纯化时间我们可以看到, 粗酶经 DEAE 层析法纯化需 3 h 左右, 而用亲和磁性微球纯化凝血酶只需 0.75 h, 两相比较, 磁分离纯化凝血酶大大缩短了操作时间.

2.9 壳聚糖亲和磁性微球的重复使用性能

将吸附过了凝血酶的亲磁性微球收集, 用 1.0 mol/L NaCl 为洗脱剂洗到上清检测不到蛋白质为止, 再经 0.1 mol/L NaOH 再生后, 用 0.05 mol/L, pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液充分平衡, 然后重复进行凝血酶吸附纯化实验操作, 考察壳聚糖亲和磁性微球的重复使用性能. 实验表明如表 2 所示, 亲和磁性微球对凝血酶的吸附量几乎可以完全恢复, 说明此亲和磁性微球的重复使用性能是良好的.

Table 2 The repeat functional performance of chitosan affinity magnetic microspheres

Repeat number	1	2	3	4	5	6
Addition quantity of thrombin/(U·g ⁻¹)	6 196	6 200	6 197	6 200	6 198	6 198

Std=1.462.

3 展 望

近年来, 结合功能性磁性吸附粒子的磁分离技术的应用得到广泛关注, 该吸附粒子的磁响应性使得它们具有操作和分离选择性. 磁分离快速、温和、规模化、易自动化, 能够得到通过其他技术方法不可能或不实用得到的析物, 并且在许多学科领域证实其可靠性, 如在废水处理、分子生物学、细胞分选和临床诊断学方面^[27]. 壳聚糖是天然的氨基多糖, 来源丰富, 具网状结构, 机械性能好, 化学性能稳定, 易生物降解、无毒、廉价易得, 在生物医学和其他工业领域得到广泛应用^[28-30].

凝血酶是局部止血的首选药物, 常以干粉或生理盐水溶解后局部涂于伤处及手术处, 在外伤和手术中能迅速达到止血目的. 由于凝血因子异常所导致的牙龈、鼻腔出血等, 在其他药物达不到止血效果时可改用凝血酶直接作用于出血处. 目前研究还表明, 凝血酶不仅在脑出血、脑缺血中有毒性作用, 在中枢神经系统正常发育和损伤保护中也有重要作用. 由于凝血酶所具有的止血快、无副作用的优点, 其临床使用日渐广泛, 将使目前十分紧俏的

凝血酶更趋紧缺, 生产前景看好.

我们采用廉价稳定的壳聚糖作为高分子载体, 制备了新型亲和磁性微球, 并对凝血酶进行吸附纯化研究. 将磁分离技术应用于血浆中凝血酶的纯化, 在这一过程中免去了大量离心操作以及过层析柱等过程, 节省了操作时间和实验消耗(如洗脱液用量等), 并且可以得到具很高酶活的凝血酶精品, 操作过程简单, 步骤少, 收率高, 为工业化生产凝血酶提供了很好的参考.

参 考 文 献

- [1] Jackson C M, Johnson T F, Hanahan D J. Studies on bovine factor X.I. Large-scale purification of the bovine plasma protein possessing factor X activity. *Biochemistry*, 1968, **7**(12): 4492-4505
- [2] Bajaj S P, Mann K G. Simultaneous purification of bovine prothrombin and factor X. *J Biol Chem*, 1973, **248**(22): 7729-7741
- [3] Marston Fiona A O. The Purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1986, **240**(1): 1-12
- [4] Smith D B, Johnson K S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione-transferase. *Gene*, 1988, **67**(1): 31-40
- [5] 庄秀华. 局部止血药——凝血酶简介. *海峡药学*, 2002, **14**(5): 93-94

- Zhuang X H. Channel Pharmacy, 2002, **14**(5): 93–94
- [6] Cornell R M, Schwartzman U. The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses. New York: Cambridge Press, 1996: 127–135
- [7] Dekker R F H. Immobilization of a lactase onto a magnetic support by covalent attachment to polyethylene mine-glutaraldehyde-activated magnetite. Appl Biochem Biotechnology, 1989, **22** (3): 289–310
- [8] Kondo A, Fukuda H. Preparation of thermo-sensitive magnetic hydro gel microspheres and application to enzyme immobilization. J Ferment Bioeng, 1997, **84**(4): 337–341
- [9] Ding Y, Sun Y. Small-sized dense magnetic pellicular support for magnetically stabilized fluidized bed adsorption of protein. Chem Eng Sci, 2005, **60**(4): 917–924
- [10] K'ir'lov'a J, Spanov'a A, Rittich B, *et al.* Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation. J Chromatogr A, 2005, **1064**(2): 247–253
- [11] Partington K M, Jenkinson E J, Anderson G. A novel method of cell separation based on dual parameter immunomagnetic cell selection. J Immunology Meth, 1999, **223**(2): 195–205
- [12] Tartaj P, Morales M P, Gonzalez-Garreno T, *et al.* Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. J Magne Magne Mater, 2005, **290–291**(1): 28–34
- [13] Bozkir A, Saka O M. Chitosan nanoparticles for plasmid DNA delivery: Effect of chitosan molecular structure on formulation and release characteristics. Drug Delivery, 2004, **11**(2): 107–112
- [14] Singla A K, Chawla M, Chitosan J. Some pharmaceutical and biological aspects-an update. Pharm Pharmacology, 2001, **53** (8): 1047–1067
- [15] Chew J L, Wolfowicz C B, Mao H Q, *et al.* Chitosan nanoparticles containing plasmid DNA encoding house dust mite allergen. Der p 1 for oral vaccination in mice. Vaccine, 2003, **21**(22): 2720–2729
- [16] Chen X G, Lee C M, Park H J, *et al.* O/W emulsification for the self-aggregation and nanoparticle formation of linoleic acid-modified chitosan in the aqueous system. J Agric Food Chem, 2003, **51**(10): 3135–3139
- [17] Kabbaj M, Phillips N C. Anticancer activity of mycobacterial DNA: effect of formulation as chitosan nanoparticles. J Drug Targeting, 2001, **9**(5): 317–328
- [18] Mitra S, Gaur U, Ghosh P C, *et al.* Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. J Controlled Release, 2001, **74**(1–3): 317–323
- [19] Chang Y C, Chen D H. Preparation and adsorption properties of monodisperse chitosan-bound Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for removal of Cu (II) ions. J Coll Inter Sci, 2005, **283**(2): 446–451
- [20] Safarikova M, Safarik I. One-step partial purification of solanum tuberosum tuber lectin using magnetic chitosan particles. Biotech Letters, 2000, **22**(11): 941–945
- [21] Pieter B R, Bardeletti G. Enzyme immobilization on a low-cost magnetic support: Kinetic studies on immobilized and coimmobilized glucose oxidase and glucoamylase. Enzyme Micro Tech, 1992, **14**(5): 361–370
- [22] Baki E, Kilicay E, Birlikseven C, *et al.* Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization. Reactive Functional Polymers, 2002, **50**(3): 225–232
- [23] Kavaz D, Cirak T, Ozturk E, *et al.* Preparation of magnetic chitosan nanoparticles for diverse biomedical applications. Springer Netherlands, 2008, **2**: 313–320
- [24] Matsumoto I, Mizuno Y, Seno N. Activation of sepharose with epichlorohydrin and subsequent immobilization of ligand for affinity adsorbent. J Biochem, 1979, **85**(4): 1091–1098
- [25] 张天民. 肝素的性质和检验. 生化药物杂志, 1985, **2**: 1–5
Zhang T M. Journal of Biochemical Drug, 1985, **2**: 1–5
- [26] 袁玉菽, 朱婉华, 陈钧会. 生物化学试验(第二版). 北京: 高等教育出版社, 1995
Yuan Y S, Zhu W H, Chen J H. Experiment of Biochemistry (deuto-edition). Beijing: Publishing Company of High Education, 1995
- [27] Franzreb M, Siemann-Herzberg M, Timothy J, *et al.* Thomas protein purification using magnetic adsorbent particles. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, **70**(5): 505–516
- [28] Paul W, Sharma C P. Chitosan, a drug carrier for the 21st century: a review. STP Pharma Sci, 2000, **10**(1): 5–22
- [29] Muzzarelli R A A, Muzzarelli C. Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences. Adv Polym Sci, 2005, **186**(10): 151–209
- [30] Pillai C K S, Paul W, Chandra P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. Prog Poly Sci, 2009, **34**(7): 641–678

The Study of Purifying Plasma Thrombin Using Chitosan Affinity Magnetic Microspheres

LI Mei-Ji^{1,2)}, LI Zhao-Hua²⁾, HU Jian-Cheng¹⁾, DONG Xian-Zhi^{2)*}

¹⁾ College of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

²⁾ Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Nanometer Fe_3O_4 particle was synthesized by coprecipitation, magnetic polymeric microspheres-magnetic chitosan microspheres, containing a magnetic core and a polymer shell, were prepared by the suspension cross-linking technique. Novel affinity magnetic microspheres were obtained after immobilizing heparin onto the nanoparticles. The size, morphology, structure and magnetic response properties were studied by means of SEM, FT-IR and XRD and so on. The novel affinity magnetic microspheres' properties for thrombin were examined by its adsorption and purification, and compared with the traditional means of column chromatography—DEAE-Sepharose Fast Flow. The results showed the affinity magnetic microspheres had a spherical appearance, narrow distribution of diameter, the particle diameter is about 50 nm, and one-step purification of thrombin using it the specific activity was 1 879.7 U/mg, recovery rate was 85% and purification fold was 11.057. Whereas, purification of thrombin by column chromatography, the product exhibits an activity of 909.84 U/mg, recovery rate of 72% and purification fold of 5.33. In conclusion, chitosan nanometer affinity magnetic microspheres was prepared and magnetic separation techniques was applied for purification of thrombin, the results is better than that from traditional methods and these results have some references values in the production and subsequent study on the research and development.

Key words affinity magnetic microspheres, chitosan, thrombin, magnetic separation, purification

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00587

*Corresponding author.

Tel: 86-10-64839157, E-mail: xzdong@ibp.ac.cn

Received: October 11, 2009 Accepted: November 25, 2009