

· 论 著 ·

重组人II型胰蛋白酶的性质及初步应用研究

纪德凯, 吴倩, 李素霞*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 目的 研究重组人II型胰蛋白酶的性质及初步应用。方法 用米氏方程和双倒数作图法确定米氏常数 K_m , V_{max} 值, BAEE法测定胰蛋白酶活性, 将胰蛋白酶用于激活羧肽酶原B及细胞消化。结果 重组人II型胰蛋白酶最适反应温度30℃, 最适pH 7.6, 以BAEE为底物, K_m 和 V_{max} 分别为12.7 $\mu\text{mol/L}$ 和212.76 $\mu\text{mol/min}$ 。EDTA与PMSF抑制酶活性, 高于50℃条件下易失活。与牛胰蛋白酶相比, 重组人胰蛋白酶对羧肽酶原B有更高的激活效率, 细胞消化方面二者效果基本相同。结论 温度及pH是影响酶稳定性的较大因素, 重组人胰蛋白酶可替代牛胰蛋白酶用于激活羧肽酶原B和细胞消化。

关键词: 重组人II型胰蛋白酶; 牛胰蛋白酶; 性质; 应用

中图分类号: Q556⁺.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-979X(2010)11-0384-05

Research on Characteristic and Preliminary Application of Recombinant Human Trypsin II

Ji De-kai, Wu Qian, Li Su-xia

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

收稿日期: 2010-05-25

作者简介: 纪德凯(1984-), 男, 辽宁人, 硕士研究生, 研究方向为重组蛋白克隆与表达

E-mail: jidekai888@163.com

*通讯作者: 李素霞, 女, 副教授 E-mail: lisuxia@ecust.edu.cn Tel: 021-64252255

途、生产用原料的来源和质量、生产规模等灵活掌握。例如, 原料中如含较大胶原蛋白, 是去除还是回收联产, 则方法不同。

2.5 超滤过程的运用, 宜根据上述不同情况, 严格设计和实施才能成功。国外生物制药工业生产规模的各个过程, 均有严格设计, 包括超滤在内^[13]。无论是酶水解, 还是离子交换分离及超滤等过程, 要有所创新, 取得技术突破才能有良好的经济效益。

参考文献

- [1] Wang P, Tang J. Solvent-free mechanochemical extraction of chondroitin sulfate from shark cartilage[J]. *Chem Eng Process*, 2009, 48: 1187-1191.
- [2] 张天民, 凌沛学. 硫酸软骨素的过去、现在和将来[J]. *食品与药品*, 2010, 12(1): 1-3.
- [3] Tadashi E. Sodium chondroitin sulfate, chondroitin sulfate containing material and processes for producing the same: EP 1557472 A1[P]. 2005.
- [4] Schiraldi C, Cimini D, De Rosa M. Production of chondroitin sulfate and chondroitin[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87: 1209-1220.
- [5] Im A R, Park Y, Kim Y S. Isolation and characterization of chondroitin sulfate from sturgeon(*Acipenser sinensis*) and their effects on growth of fibroblasts[J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(8): 1268-1273.
- [6] 凌沛学. 透明质酸[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 30-40.
- [7] Lignot B, Lahogue V, Bourseau P. Enzymatic extraction of chondroitin sulfate from skate cartilage and concentration-desalting by ultrafiltration[J]. *J Biotechnol*, 2003, 103: 281-284.
- [8] Murado M A, Fragues J, Montemayor M I, et al. Preparation of highly purified chondroitin sulphate from skate (*Rafa clavata*) cartilage by-productis. Process optimization including a new procedure of alkaline hydroalcoholic hydrolysis[J]. *Biochem Eng J*, 2010, 49: 126-132.
- [9] Silva L C F. Isolation and purification of chondroitin sulfate[J]. *Adv Pharmacol*, 2006, 53: 21-31.
- [10] Nakano T, Betti M, Pietrasik Z. Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate glycosaminoglycans[J]. *Recent Patents Food Nutr Agric*, 2010, 2: 61-74.
- [11] 张天民, 吴梧桐, 王友同, 等. 动物生化制药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1981: 214-215.
- [12] 马淑涛, 张天民. 各类硫酸软骨素制备方法概述[J]. *中国医药工业杂志*, 1992, 23(12): 557-560.
- [13] Lutz H, Raghunath B. Ultrafiltration process design and implementation[C]//Shukla A A, Etzel M R, Gadam S. Process scale bioseparations for the biopharmaceutical industry. Boca Raton: Taylor & Francis, 2007: 297-332.

Abstract: Objective To study the characteristic and preliminary application of recombinant human trypsin II (rh-TII).

Methods The K_m and V_{max} values were calculated using Michaelis equation and double-reciprocal plot method. The activity of trypsin was determined using BAEE as the substrate. The trypsin was used to activate procarboxypeptidase B and digest cells. **Results** The optimum reaction temperature and pH of rh-TII were 30 °C and 7.6, respectively. With BAEE as the substrate, the K_m and V_{max} values were 12.7 $\mu\text{mol/L}$ and 212.76 $\mu\text{mol/min}$, respectively. The activity of rh-TII was inhibited by EDTA and PMSF. Rh-TII was easily inactivated up 50 °C. Compared with bovine trypsin, rh-TII activated procarboxypeptidase B more efficiently, but had almost equal effect on cell digestion. **Conclusion** Both pH and temperature play more important roles in the stability of rh-TII. Rh-TII can be instead of bovine trypsin in procarboxypeptidase B activation and cell digestion.

Key Words: recombinant human trypsin II; bovine trypsin; characteristic; application

盐胰蛋白酶原为胰蛋白酶的前体,在胰脏合成。在 Ca^{2+} 存在条件下,胰蛋白酶原可通过肠激酶或胰蛋白酶的自身激活,断开肽链N端6位赖氨酸和7位异亮氨酸残基之间的肽键,失去一段6肽,分子构象变为有活性的胰蛋白酶^[1, 2]。胰蛋白酶可激活酶原,成为有活性的酶^[3]。商品化胰蛋白酶主要来源于猪或牛的胰腺。

人胰蛋白酶有I型和II型2种类型,根据等电点不同,又分为阳离子型和阴离子型。我们用基因工程方法得到了重组人阴离子型胰蛋白酶原(II型胰蛋白酶),激活后得到高活性的人源胰蛋白酶。由于胰蛋白酶在溶液中稳定性较差,容易发生自降解,使酶活性下降^[4]。本实验研究了重组人II型胰蛋白酶的稳定性及部分性质,并初步研究了酶解激活羧肽酶B酶原及在细胞消化中的应用。

1 材料

1.1 试剂

牛胰蛋白酶(Sigma);重组人II型胰蛋白酶(本实验室制备);苯甲酸-L-精氨酸乙酯(BAEE, Sigma);其余试剂为进口或国产分析纯。

1.2 仪器

T6紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司);FE20型pH计(梅特勒-托利多仪器公司);EV265双向电泳仪(PS265-230V, Hoefer)

2 方法

2.1 K_m 值的测定

以BAEE为底物,测定重组人II型胰蛋白酶和牛胰蛋白酶的米氏常数 K_m 。底物BAEE的浓度范围为0.005~0.25 mmol/L,用双倒数作图法,以底物浓度的倒数值为横坐标,反应速率即活性的倒数值为纵坐标做图,与X轴交点的负倒数即为 K_m 。

2.2 重组人II型胰蛋白酶的最适温度及最适pH

取3 mL底物分别置于4, 15, 20, 25, 30, 40, 55, 65, 75 °C保温1 h,加入等量的重组人II型胰蛋白酶,测定酶活性。底物用不同pH的20 mmol/L乙酸钠-乙酸, Tris-HCl及Gly-NaOH缓冲液配制。测定重组人II型胰蛋白酶活性,确定最适pH。

2.3 重组人II型胰蛋白酶与牛胰蛋白酶热稳定性和pH稳定性

将重组人II型胰蛋白酶与牛胰蛋白酶分别配制成0.5 mg/mL溶液,分别于-20, 4, 15, 37, 50 °C保温,测定不同保温时间的活性,计算失活百分比。

将重组人II型胰蛋白酶1 mL分别加入不同pH的缓冲液中,配成200 U/mL(0.3 mg/mL)溶液。缓冲液分别用50 mmol/L乙酸钠-乙酸, Tris-HCl和Gly-NaOH, pH<3直接用盐酸溶液。4 °C放置24 h,测定活性。另取牛胰蛋白酶粉末用不同pH的缓冲液溶解后,按上述方法配置。

2.4 金属离子及化学试剂对重组人II型胰蛋白酶与牛胰蛋白酶活性的影响

向重组人II型胰蛋白酶液(活性860 U/mL)分别加入不同金属离子(Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+}) 1 mmol/L, 4 °C保温1 h后测活性。重组人II型胰蛋白酶液(活性750 U/mL)分别按1%的量加入EDTA(乙二胺四乙酸), PMSF(苯甲基磺酰氟), DTT(二巯基苏糖醇), SDS(十二烷基硫酸钠), Triton X-100, 4 °C保温1 h后测活性。另取牛胰蛋白酶粉末按上述方法配成相同活性溶液。

取重组人II型胰蛋白酶分别加入不同浓度(0.5, 1 mol/L)氯化钠溶液及尿素(1, 2 mol/L)溶液配制成活性为1 200 U/mL溶液。4 °C放置24 h后测活性。另取牛胰蛋白酶粉末配成相同活性溶液,同法操作。

2.5 重组人II型胰蛋白酶酶解羧肽酶B动力学研究

取牛胰蛋白酶和实验室制取的重组人II型胰蛋白酶,按蛋白浓度比1:50将等量的2种酶加入羧肽酶B复性液(0.5 mg/mL)中。间隔一定时间测羧肽酶B活性,并留取样品检测SDS-PAGE。

2.6 重组人II型胰蛋白酶消化细胞的初步研究

细胞消化液组成:胰酶0.5 mg/mL, EDTA 0.04 g/mL溶于PBS液中,并用盐酸调为pH 7.4。所用溶液均经高温灭菌,或者经0.22 μm滤膜过滤。

A组为牛胰蛋白酶组, A1: 800 U/mL牛胰蛋白酶酶液200 μL, EDTA 0.04 g/mL; A2: 800 U/mL牛胰蛋白酶酶液100 μL, EDTA 0.04 g/mL。

B组为重组人胰蛋白酶组, B1: 800 U/mL重组人II型胰蛋白酶酶液200 μL, EDTA 0.04 g/mL; B2: 800 U/mL重组人II型胰蛋白酶酶液100 μL, EDTA 0.04 g/mL; B3: 400 U/mL重组人II型胰蛋白酶酶液200 μL, EDTA 0.04 g/mL。

C组为专用细胞消化液200 μL, 活性800 U/mL, EDTA 0.04 g/mL。

将传代的鼠T3细胞传代于6孔板,加入细胞培养液培养。待细胞贴壁生长后,向6孔板分别加入上述6种试液。显微镜下观察细胞形态变化,待细胞完全脱离培养瓶时拍照并记录时间。比较细胞形态变化和完全消化所需时间。

3 结果

3.1 重组人II型胰蛋白酶和牛胰蛋白酶 K_m 值的测定

结果见图1。由图1 A计算可知,重组人II型胰蛋白酶的 K_m 值为12.7 μmol/L, V_{max} 为212.76 μmol/min。由图1 B计算可知,牛胰蛋白酶 K_m 值为40 μmol/L, V_{max} 为588.23 μmol/min。表现出重组人胰蛋白酶对BAEE有更高的亲和力。

3.2 最适温度及最适pH的确定

不同的测定温度测得的吸光度在5 min内的变化见图2。测活温度低于30 °C,吸光度变化均匀。高于30 °C,5 min内的吸收度随时间呈下降趋势,即酶在高于30 °C条件下易失活。所以,30 °C为测定重组人II型胰蛋白酶活性的最适温度。通常情况下,我们仍选择25 °C的标准条件为测活温度。

pH对测定活性有很大的影响,pH 7.6时酶活性最高,所以pH 7.6为胰酶测活的最适pH。见图3。

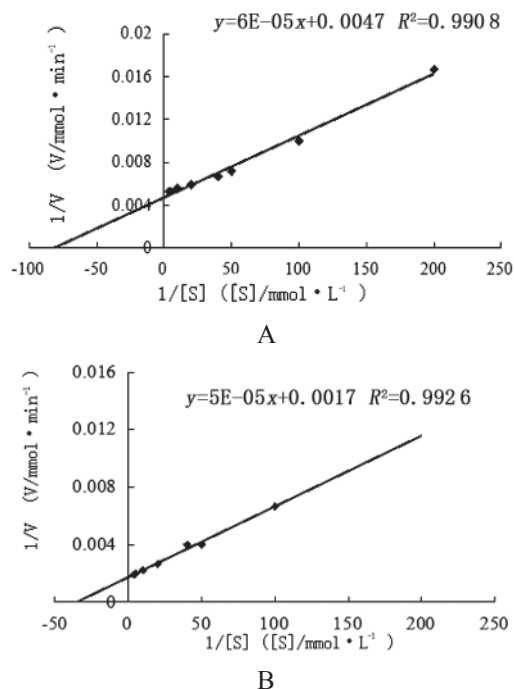


图1 重组人II型胰蛋白酶和牛胰蛋白酶 K_m 值确定

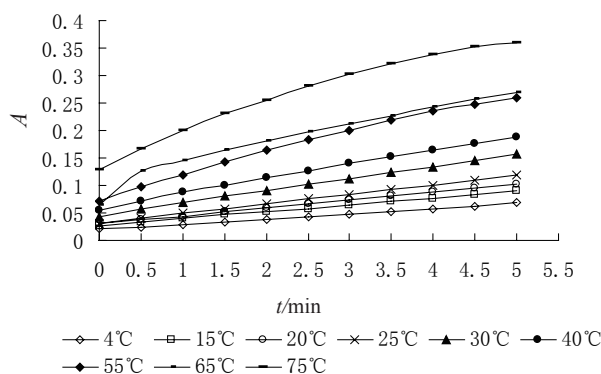


图2 不同测活温度下胰酶催化反应动力学曲线

3.3 重组人II型胰蛋白酶与牛胰蛋白酶的热稳定性及pH稳定性

重组人II型胰蛋白酶酶液置于不同温度下,活性随着时间的变化见图4A。由图4A可见,温度越

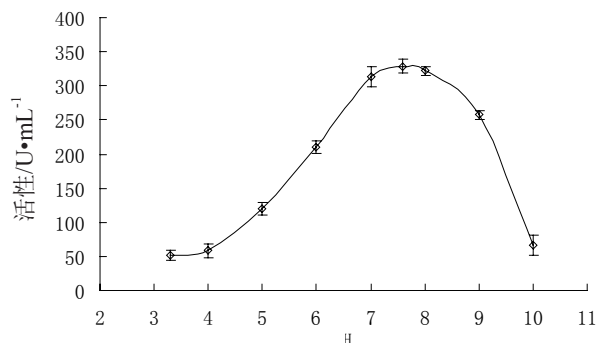


图3 重组人II型胰蛋白酶的最适pH测定曲线

低, 酶活性损失越小, 温度高于50 °C, 酶活性很快丧失。但是, 酶置于-20 °C的条件下, 活性丧失相当快。这可能是冻融过程中蛋白构象发生变化所致。所以重组人II型胰蛋白酶的最适保存温度为4 °C。牛胰蛋白酶液置于不同温度下, 活性随着时间的变化见图4B。牛胰蛋白酶随着温度升高活性丧失很快, -20 °C条件下酶液最稳定。相同时间内, 牛胰蛋白酶活性丧失的速度比重组人II型胰蛋白酶快。

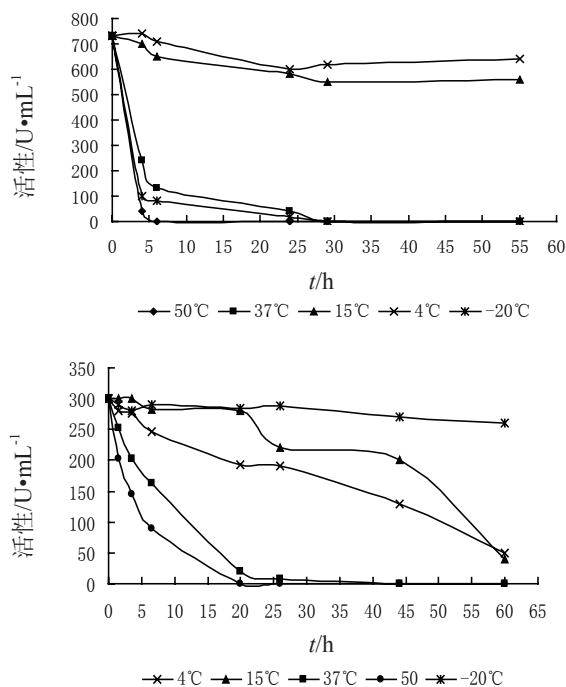


图4 重组人胰蛋白酶及牛胰蛋白酶温度稳定性

重组人II型胰蛋白酶及牛胰蛋白酶在不同pH条件下活性变化见图5。由图5可见, 2种酶的变化趋势基本相同。pH过低或过高都使2种酶活性降低, 重组人II型胰蛋白酶pH 8~9时活性最稳定。牛胰蛋白酶对pH的耐受性要强, pH 7~10时牛胰蛋白酶活性只有较小的损失。

3.4 金属离子及试剂对胰蛋白酶活性的影响

各种试剂对酶活性的影响见表1。牛胰蛋白酶活性随着EDTA浓度上升丧失增多, 1 mmol/L EDTA就能使重组人II型胰蛋白酶活性丧失80%。EDTA使酶活性丧失是因酶液中钙离子被EDTA整合, 表明重组人II型胰蛋白酶活性中心的钙离子对酶活性的发挥有至关重要的作用。二者不同可能与牛胰蛋白酶含Ca²⁺有关。PMSF对酶活性有抑制作用, 因为PMSF是丝氨酸蛋白酶抑制剂, 这也表明胰蛋白酶是丝氨酸蛋白

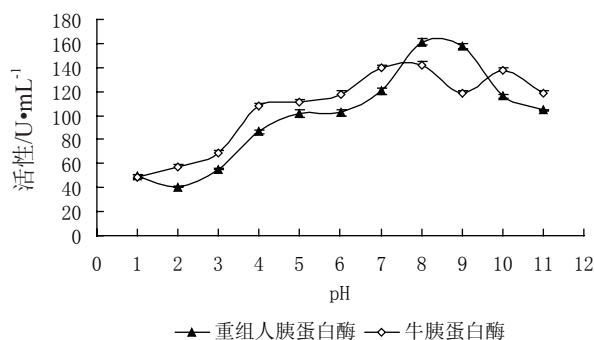


图5 重组人胰蛋白酶及牛胰蛋白酶pH稳定性

酶, 活性被抑制。DTT对2种酶的活性也有很大的影响, 尤其是对重组人II型胰蛋白酶。1% SDS和0.1% Triton-X100能使酶活性彻底丧失, 使蛋白质发生变性。高浓度的NaCl (如0.5 mol/L和1 mol/L) 和低浓度的Urea (如1 mol/L和2 mol/L) 对重组人II型胰蛋白酶活性没有影响。

表1 不同试剂对牛胰蛋白酶及重组人胰蛋白酶活性的影响

试剂	牛胰蛋白酶		重组人胰蛋白酶	
	浓度/ mmol·L ⁻¹	活性/%	浓度/ mmol·L ⁻¹	活性/%
阳性对照		100		100
EDTA	10	46.6	1	20
EDTA	50	40	10	0
PMSF	1%	26.6	1%	0
DTT	1	40	1	0
DTT	5	26.6	5	0
SDS	1%	0	1%	0
Triton-X100	0.1%	0	0.1%	0
NaCl	500	100	500	100
NaCl	1 000	100	1 000	100
Urea	1 000	70	1 000	95.2
Urea	2 000	65.8	2 000	80.9

3.5 重组人II型胰蛋白酶及牛胰蛋白酶用于羧肽酶原B的酶解激活

用重组人II型胰蛋白酶酶解的羧肽酶B的最终比活性是用牛胰蛋白酶酶解样品的1.5倍。由图6可见, 重组人离子型胰蛋白酶酶解羧肽酶原B在速率上优于牛胰蛋白酶。由图7可见, 羧肽酶原B在加入胰蛋白酶后, 逐步酶解为羧肽酶B。所以, 我们通过基因工程方法制备的重组人胰蛋白酶在某些方面已经达到甚

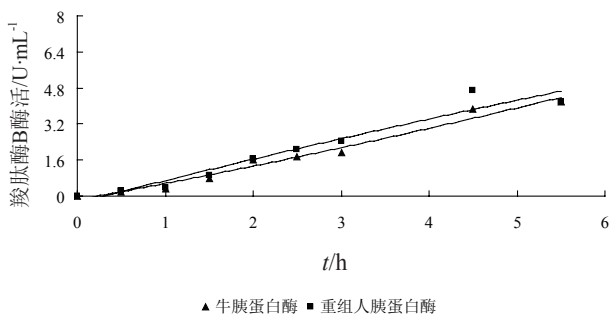


图6 重组人II型胰蛋白酶及牛胰蛋白酶酶解激活羧肽酶原B的速率比较

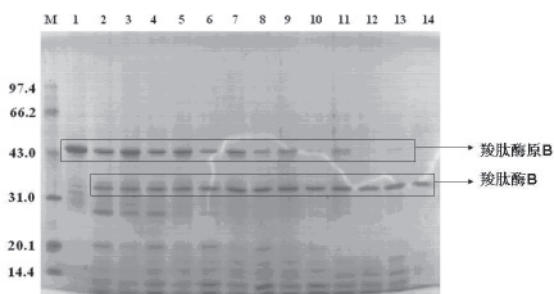


图7 羧肽酶原B酶解电泳图
2, 4, 6, 10, 12为牛胰蛋白酶酶解羧肽酶B酶原样品1, 2, 3, 4, 5 h; 3, 5, 7, 9, 11, 13为重组人胰蛋白酶酶解羧肽酶B酶原样品1, 2, 3, 4, 5 h

图7 羧肽酶原B酶解电泳图

至超过了市场同类产品。

3.6 重组人II型胰蛋白酶消化细胞初步研究结果

各组样品完全消化细胞所用时间见表2。由表2可见,在活性相同时,重组人II型胰蛋白酶完全消化细胞所用的时间较短,几乎与市场上消化细胞专用消化液所用时间相同。

表2 不同胰酶样品完全消化细胞所用的时间

组别	完全消化所需时间/min
牛胰蛋白酶	A1 13
	A2 19
	B1 3
重组人II型胰蛋白酶	B2 4.3
	B3 6
细胞消化液	C 2.5

细胞消化效果见图8。经过胰蛋白酶消化作用后,原来贴壁生长的T3细胞从培养瓶壁上脱离,细胞形态从扁平状变成球状,T3细胞之间出现空隙。细胞生长状态良好。

4 讨论

胰蛋白酶原具有自身活化和自身降解的特性,在

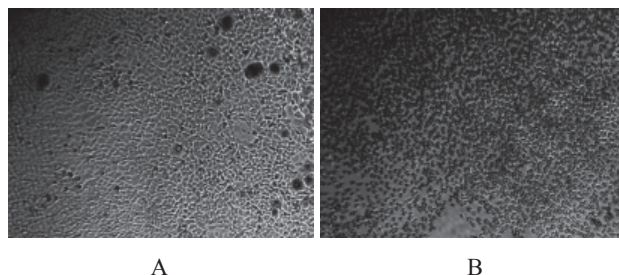


图8 T3细胞消化前(A)与细胞消化后(B)形态比较(10×光学显微镜)

真核系统中表达,很难得到完整的胰蛋白酶原,并且其活化为有活性的胰蛋白酶会对宿主细胞造成一定的毒性^[5]。因此,在毕赤氏酵母中天然牛胰蛋白酶没有成功表达^[6]。

我们在大肠杆菌中成功的表达出人胰蛋白酶原。人胰蛋白酶原以无活性的包涵体形式表达,避免了活性胰蛋白酶对宿主细胞的毒性作用。此后通过激活作用获得活性的人源胰蛋白酶。

但是我们研究发现,重组胰蛋白酶在常温下容易失活。研究证明,阴离子型胰蛋白酶的稳定性较阳离子型胰蛋白酶稍差。我们试图通过对其自降解位点进行突变以提高其稳定性,此项研究正在进行。初步研究结果说明,我们制备的重组人II型胰蛋白酶酶解羧肽酶B的效率及效果都优于牛胰蛋白酶;消化细胞的速率也快于牛胰蛋白酶,效果与牛胰蛋白酶相当。

参考文献

- [1] Wöldike H F, Kjeldsen T B. A process for producing trypsin (trypsinogen): Int Patent WO 97/00316[P]. 1997.
- [2] Walsh K A. Trypsinogens and trypsins of various species[J]. *Methods Enzymol*, 1970, 19: 41-63.
- [3] 涂艳, 欧西军. 重组人胰蛋白酶原2表达载体的构建、表达及其单克隆抗体的制备和应用: 中国: CN200410099275.1 [P]. 2004-12-29.
- [4] Key J, Kassell B. The autoactivation of trypsinogen[J]. *Biol Chem*, 1971, 246: 6661-6665.
- [5] Jungbauer A, Kaar W, Schlegl R, et al. Folding and refolding of proteins in chromatographic beds[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, 15(5): 487-494.
- [6] Szilagyi L, Kenesi E, Katona G, et al. Comparative in vitro studies on native and recombinant human cationic trypsins[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 24574-24580.