

· 论 著 ·

重组猪胰蛋白酶冻干制剂稳定性研究及在细胞培养中的应用

周超, 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 筛选重组猪胰蛋白酶 (rPT) 冻干保护剂和保存方法, 及配制细胞消化液的稳定性及其应用。方法 在rPT酶液中添加不同浓度不同种类的冻干保护剂, 比较冷冻干燥后的活性保留率, 并从赋型性、色泽度、溶解性方面评价冻干保护剂的作用; rPT酶液经过无菌过滤处理, 内毒素含量检测合格后, 冻干。然后配制成细胞消化液, 优化细胞消化液组成, 将细胞消化液应用于细胞培养。结果 添加3%甘露醇和3%海藻糖的rPT冻干品的酶活性保留率分别为101%和86.5%; 用PBS缓冲液配制细胞消化液 (含有0.01% EDTA) 消化贴壁细胞的综合效果最好, 且保存在-20℃时稳定性较好。结论 从冻干后酶活性保留率和冻干品外观评价, 3%甘露醇可作为rPT冻干过程中的最佳保护剂; rPT细胞消化液应用在细胞培养中的成功, 证明rPT可以替代提取的猪/牛胰蛋白酶使用, 消除了动物源性病毒等外源因子的污染。

关键词: 重组猪胰蛋白酶; 稳定性; 保护剂; 细胞消化

中图分类号: TQ925⁺.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-979X (2012) 07-0229-04

Research on Stability and Application of Recombinant Porcine Trypsin in Cell Culture

ZHOU Chao, LI Su-xia*

(State Key Laboratory of bioreactor engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Objective To screen lyophilized protectant of recombinant porcine trypsin (rPT), and to investigate the stability of cell dissociation solution and its application. **Methods** Different concentrations of different types of lyophilized protectants were added to rPT solution. The role of lyophilized protectants was evaluated by comparing the retention rate of the activity of lyophilized powder, physical appearance, solubility and color. The cell dissociation solution was prepared with sterile lyophilized rPT powder. The content of endotoxin in the prepared cell dissociation solution was less than 3 EU per mg rPT. Then the preparation method was optimized. The cell dissociation solution was applied in cell culture. **Results** Owing to adding 3% mannitol and 3% trehalose, the retention rates of the activity of lyophilized product were 101% and 86.5%. The cell dissociation was prepared with PBS buffer (containing 0.01% EDTA), digesting attached cell best and having better stability when stored at -20 °C. **Conclusion** From the evaluation of physical appearance of lyophilized sample and retention rates of the activity, 3% mannitol can be used as the best protectant. The successful application of rPT cell dissociation with PBS buffer in cell culture can prove that rPT can substitute for extracted animal trypsin and avoid extrinsic contamination induced by virus-derived factors.

Key Words: recombinant porcine trypsin; stability; protectant; cell dissociation

胰蛋白酶 (EC 3.4.21.4) 是一种蛋白水解酶, 在胰脏中作为酶的前体胰蛋白酶原被合成, 是肽链内切酶, 可将多肽链中赖氨酸和精氨酸残基中的羧基侧切断。它不仅起消化酶的作用, 而且能限制分解糜蛋白

酶原、羧肽酶原、磷脂酶原等其它酶的前体, 起活化作用。在不同的生物技术研究胰蛋白酶是一种添加剂, 如表面黏附细胞的脱壁^[1], 流感病毒疫苗的生产^[2], 胰岛素的生产, 以及蛋白水解激素的处理和其它

收稿日期: 2011-10-31

作者简介: 周超 (1986-), 男, 河南人, 硕士研究生, 研究方向为重组猪胰蛋白酶克隆表达, 包涵体复性,

E-mail: zczszj66@163.com

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

蛋白质生产^[3]。传统的胰蛋白酶一般来自猪或牛的胰腺。现在大量需求重组替代品,以避免供体生物体所致相关病原体污染的风险。

我们已成功地构建了猪源胰蛋白酶高效表达菌株,以包涵体形式表达,使重组胰蛋白酶包涵体复性。复性的重组胰蛋白酶经过激活成为具有特异性水解能力的胰蛋白酶。先前对提取胰蛋白酶的相关研究较多^[4-5]。本项目研究了rPT冻干过程中使用的冻干保护剂,以及细胞消化液的配制和保存方法;并研究了rPT在细胞消化中的应用。

1 材料与方法

1.1 试剂

N-苯甲酸-L-精氨酸乙酯(BAEE, Sigma-Aldrich); 甘露醇(药典级)、海藻糖(试剂级)(Bio Basic Inc.); 重组猪源胰蛋白酶(Sigma-Aldrich); 其余试剂为分析纯。

1.2 仪器

T6新世纪紫外可见分光光度计(北京普析); FD-1冷冻干燥机(上海田枫); 低温离心机(Beckman)。

1.3 方法

1.3.1 rPT的制备 利用克隆表达、纯化等技术制备rPT,纯化后的酶液经过无菌滤膜过滤后备用。

1.3.2 rPT活性测定 胰蛋白酶专一性水解由碱性氨基酸的羧基形成的酯键和酰胺键,所以可使用含有0.25 mmol/L BAEE底物的25 mmol/L Tris-HCl缓冲液检测胰蛋白酶活性。在波长253 nm时,BAEE的紫外吸收值远小于*N*-苯甲酰-L-精氨酸(benzoyl-L-arginine, BA)。在一定的条件下,随着催化反应的进行,BAEE逐渐减少,产物BA逐渐增多,反应体系的紫外吸收值逐渐增加,最后以 $\Delta A_{253\text{nm}}$ 计算胰蛋白酶活性,每分钟使 $\Delta A_{253\text{nm}}$ 增加0.001酶量为1个BAEE单位(1U)^[6]。

1.3.3 添加保护剂对rPT酶液冻干过程中酶活性稳定性的影响 将rPT酶液的蛋白浓度浓缩至1 mg/mL,然后将不同种类的保护剂分别按照一定含量的百分比加至rPT酶液中,充分溶解混匀,冷冻干燥。待冻干完成后,用水溶解冷冻干燥的粉末至冻干前体积,然后分别取样测定其酶活性。以冷冻干燥前rPT的酶活性为100%,计算样品酶活性保留率(%)。

1.3.4 添加保护剂对rPT冻干品的赋型性、色泽度和溶解性的影响 观察加入不同浓度、不同保护剂冻干品的赋型性、色泽度、溶解性,以及这些冻干品放置一段时间后的状态,以此作为筛选冻干保护剂的重要依据。

1.3.5 rPT细胞消化液的配制和稳定性研究 无菌过滤的rPT酶液,按照《中国药典》附录XII E^[7]检查细菌内毒素。合格后(每毫克蛋白质小于3 EU),rPT细胞消化液。用两种缓冲液稀释rPT酶液:①PBS,②PBS+0.01%EDTA。分别配成1, 2, 5, 10 kU/mL(1 kU=1000 U)4个活性水平的细胞消化液。

将活性为2 kU/mL的两种细胞消化液作为稳定性研究的对照,将配制的细胞消化液分别放置在4, 25, -20 °C条件下,每隔一段时间测定其酶活性变化。以2 kU/mL活性作为100%,计算酶活性保留率(%)。

1.3.6 rPT细胞消化液在细胞培养中的应用 准备6孔细胞培养板2个,HeLa细胞为研究对象。一组用①PBS配制的细胞消化液消化贴壁细胞,另一组用②PBS+0.01%EDTA配制细胞消化液消化贴壁细胞。在消化时间段,拍摄其消化效果照片。转接培养24 h后,再观察细胞生长状态。最终确定哪种条件的细胞消化液消化效果最好。

2. 结果与分析

2.1 添加保护剂对rPT冻干过程中活性的影响

将具有保护作用的几种冻干保护剂添加至rPT液中,然后冷冻干燥,比较保护剂对酶在冻干过程中稳定性的影响。结果见表1。

表1 不同保护剂对rPT冻干品的影响

保护剂	保留活性 / %	浓度 / %	赋型性	溶解性	色泽
空白	77.1	/	+	-	淡黄
甘露醇	81.3	1%	+	- - -	白
	101.0	3%	+++++	- - -	白
	95.2	5%	+++++	- - -	白
海藻糖	82.5	1%	+	- -	白
	86.5	3%	+++	- - -	白
	79.8	5%	+++++	- -	白

注:“+++++”,赋型性较好,冻干品蓬松呈蛋糕状;“+++”,赋型性好,冻干品较为蓬松;“+”,赋型性一般,冻干品紧实;“-”,不易溶;“- -”,易溶;“- - -”,极易溶;

综合上述考察因素,发现rPT在冻干过程中,加入3%甘露醇的保护效果最好,酶活性保留率维持在100%。而不同浓度的海藻糖的保护效果都在90%以下,而且浓度(5%)高时,保护效果反而不好。不添加保护剂的对照组,其酶活性保留率在80%以下。整体看,添加保护剂的rPT实验组酶活性保留率要高于不添加保护剂的对照组。

2.2 添加保护剂对rPT冻干品的赋型性、色泽度和溶解性影响

不加入任何保护剂的rPT冻干后,呈淡黄色粉末状,几乎贴壁,赋型性差,粉末粗糙,不细腻,色泽均一,但溶解性差,不易溶解。这可能是冻干过程中产生的一些应力使得rPT蛋白变性,破坏了结构,使稳定性下降。

甘露醇是目前常用的生物产品冻干保护剂之一,不仅在冻干过程中对蛋白质起到赋型剂作用,使其外表美观,且起保护蛋白质活性的作用。由表1可见,加入甘露醇的rPT冻干品赋型性、色泽和溶解度都较好。放置一段时间后,其各因素指标无变化。加入海藻糖的rPT的冻干品,初各因素指标尚正常,但是放置一段时间后,其赋型性,色泽变差。这可能与海藻糖易受潮有关。总之,3%的甘露醇可作为rPT的冻干保护剂,无论从活性的保留率及冻干品的赋型性、色泽和溶解性来看,都是最合适的。

2.3 rPT细胞消化液的稳定性研究

将配制的细胞消化液分别放置在4, 25, -20℃条件下,每隔一段时间测定其酶活性的变化($n=3$),计算酶活性保留率,表明得到rPT在10 d内稳定。见图1(a), (b), (c)。

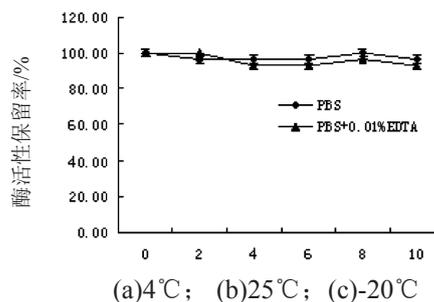
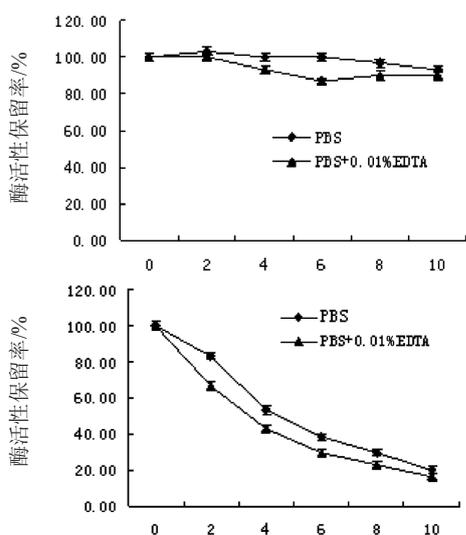


图1 rPT细胞消化液在不同温度下的稳定性

由图1可见,两种rPT细胞消化液在常温保存时,酶活性失去最快,10 d后仅剩16%;在4℃和-20℃条件下保存时,-20℃下的酶活性丧失略小于4℃,且两者酶活性丧失的速度都要远低于常温保存的rPT细胞消化液,10 d内后两者的酶活性保留率都在95%以上。由此可确定,低温保存有利于rPT细胞消化液的稳定。一个月后,测定各温度下的rPT细胞消化液的酶活性,发现常温下活性已完全失去,在4℃条件下的酶活性已失去约85%,而在-20℃条件下酶活性依然维持在95%以上。实验结果表明rPT细胞消化液保存在-20℃时最稳定。

2.4 rPT细胞消化液的选择及在细胞培养中的应用

用不同活性(1, 2, 5和10 kU/mL)的两种细胞消化液消化HeLa贴壁细胞,观察消化效果和记录消化时间及转接培养后的生长状态,见表2。

表2 不同细胞消化液的细胞消化时间及消化后和转接培养后的生长状态

细胞消化液	时间/min	消化完全细胞/%	生长状态
PBS+1 kU	7	86	好
PBS+2 kU	6	80	好
PBS+5 kU	4.5	50	不好
PBS+10 kU	3	42	不好
PBS+0.01% EDTA+1 kU	3	90	好
PBS+0.01% EDTA+2 kU	2	96	好
PBS+0.01% EDTA+5 kU	1.8	35	不好
PBS+0.01% EDTA+10 kU	1.5	20	不好

由表2可见,第一组细胞消化液是单独使用rPT消化贴壁细胞,在“PBS+1 kU”和“PBS+2 kU”组的消化时间很慢(6 min以上),且由于时间过长,致使细胞损害,细胞传代后不能正常生长;随rPT活性增加到5 kU和10 kU,消化时间缩短,但细胞毒性增加,所以rPT不能单独使用。第二种细胞消化液是rPT和EDTA配合使用,消化时间缩短,消化后和转接培养后细胞状态较好。由于EDTA是化学螯合剂,主要

螯合 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ，使细胞分离，细胞毒性小，能帮助rPT消化细胞。根据消化时间、消化后细胞生存能力和转接培养后生长状态，最终确定活性为2 kU/mL的PBS+0.01%EDTA细胞消化液最合适。见图2。

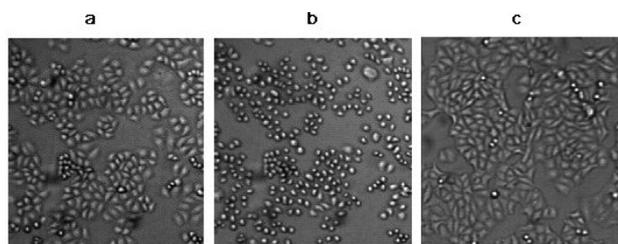


图2 细胞消化前后形态

a: HeLa细胞消化前的形态; b: HeLa细胞消化后的形态正常, 细胞分离完全(消化时间: 2 min); c: 转接培养24 h后的生长状态正常

3 讨论

随着基因工程技术的发展, 现有的基因工程药物, 尤其是具有活性的蛋白质类药物, 为避免变性失活, 便于保存和使用, 许多制成冻干制剂。冻干过程是一个复杂的相变过程, 在预冷、升华、干燥和贮存过程中, 存在许多诱导蛋白质变性和酶失活的因素, 所以冻干过程中通常要使用保护剂以稳定药物中的蛋白质。因此, 为获得稳定的蛋白质药物冻干制品, 选择合适的保护剂至关重要。综合酶活性保留率和各因素指标, 最终确定3%甘露醇是rPT理想的冻干保护剂。

胰蛋白酶是细胞培养中不可或缺的一种消化酶。我们用rPT配制不同的细胞消化液消化贴壁细胞, 最终确定了合适的rPT细胞消化液。由于胰蛋白酶对细

胞的分离效果与细胞的类型、特性和瓶壁表面特性有关, 所以本实验只以HeLa细胞作为研究对象, 其他细胞可能需调整使用量。本实验还研究了rPT细胞消化液的稳定性, 确定了保存温度为 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时保存一周内稳定。

在细胞培养中应用rPT解决了“消化细胞用的胰蛋白酶应证明无外源性或内源性病毒污染”(中国药典三部(2010年版)第XII页)的问题。rPT可以替代提取的动物源性胰蛋白酶, 为利用动物细胞系统进行新药研发提供了安全的保证。

参考文献

- [1] Merten O W. Cell detachment[C]// Spier R E (Ed.). *Encyclopedia of Cell Technology*. New York: Wiley, 2000: 351-365.
- [2] Kaverin N V, Webster R G. Impairment of multicycle influenza virus growth in Vero (WHO) cells by loss of trypsin activity[J]. *J Virol*, 1995, 69: 2700-2703.
- [3] Thim L, Hansen M T, Norris K, et al. Secretion and processing of insulin precursors in yeast[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1986, 83: 6766-6770.
- [4] 耿莉娜, 胡重江, 李英文, 等. 草鱼肝胰脏中两种胰蛋白酶的纯化及部分性质的研究[J]. *重庆师范大学学报*, 2008, 25(1): 14-19.
- [5] 李明生, 李倬, 乔自林, 等. 胰蛋白酶的制备及其在细胞培养中的应用研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2009, 21(6): 1011-1014.
- [6] Albert I, Alfonso G, Salvador G, et al. Toxic effect of melanoidins from glucose-asparagine on trypsin activity[J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47: 2071-2075.
- [7] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 2010年版. 三部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 95-98.

本刊要求文稿具有科学性、创新性和时效性。立论正确, 文字简练, 数据可靠。文稿内容涉及食品与药品的研究、生产和应用, 侧重生物科技方面的研究成果。包括新产品及新生物活性物质的研发, 生产工艺和新技术应用, 分析检验和质量控制, 药理或功能实验, 临床试验及食品卫生等。

论 著 学术水平较高的实验研究、临床研究等, 一般不超过5 000字。

技术交流 实用价值较高的新工艺、新技术、新方法、新剂型研究。一般不超过3 000字。

综 述 对某一领域或专题有前瞻性和独到见解的分析和评价。一般不超过6 000字。