

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 9/68

C07K 1/14 C07K 1/22



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02116271.9

[43] 公开日 2003 年 10 月 15 日

[11] 公开号 CN 1448508A

[22] 申请日 2002.3.28 [21] 申请号 02116271.9

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

[72] 发明人 李 莉 赫荣乔

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司
代理人 高存秀

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称 间氨基苯硼酸亲和层析法纯化的糖基化蚓激酶及纯化方法

[57] 摘要

本方法采用琼脂糖凝胶-间氨基苯硼酸亲和层析法从蚯蚓的匀浆液中分离纯化出单一的具有纤溶酶活力的糖基化组分。亲和层析过程中采用琼脂糖凝胶作为填料，间氨基苯硼酸作为配基，顺式单糖作为特异性洗脱液，并通过透析或分子筛等方法脱盐，得到糖基化组分；干燥储存。该组分经过 SDS-PAGE 检测为单一成分，N-末端序列为 N-Ala-Glu-Val-Cys-Cys-Pro-Asp-Ile-，是一种新的蛋白质。生色底物测活实验表明它具有较高的纤溶蛋白酶活性。此方法简洁方便，成本低，适用于规模化生产。

1. 一种间氨基苯硼酸亲和层析法纯化的糖基化蚓激酶，其特征是：所述的糖基化蚓激酶具有 N-末端序列为 N-Ala-Glu-Val-Cys-Cys-Pro-Asp-Ile-的蛋白质。

2. 一种间氨基苯硼酸亲和层析法纯化糖基化蚓激酶的方法，其特征是：包括以下步骤：

1) 选取琼脂糖做填料；

2) 采用间氨基苯硼酸作为亲和层析树脂的配基：将间氨基苯硼酸溶解在 0.2 M NaHCO₃ 缓冲液或 pH=8.5, 0.15M NaCl 中，浓度为 10~100g/L，然后与活化后的琼脂糖填料按照 1: 5 ~ 5: 1 的比例混合，搅拌 0.5-2 小时，在温度为 4°C-40°C 下，使配基连接到琼脂糖填料上；

3) 装柱，用终浓度分别为 0.01-0.05M 的天门冬酰氨，0.01-0.05M 氯化镁及 0.01-0.05%的叠氮化钠的混合液平衡，平衡液的 pH 范围是 6.0 ~ 14；

4) 上样：样品是经过通常自溶、匀浆、盐析等方法得到的蚯蚓粗提物，上样时样品浓度为 0.5~5mg/mL，体积为柱体积的 1/10~1/3；上样缓冲液是 Tris-HCl 缓冲液, pH 5.0~14，浓度为 5~50mM；

5) 非特异性洗脱采用终浓度分别为 0.001-0.01M 的 Tris-HCl，0.001-0.005M 的天门冬酰氨，0.05-0.5M 氯化镁及 0.01-0.05%的叠氮化钠四者混合液作洗脱液，非特异性洗脱液 pH 范围 6~12；特异性洗脱液采用终浓度分别是 0.05-0.5M 的 Tris-HCl，0.001-0.01M 的天门冬酰氨，0.1-1.0M 顺式糖及 0.01-0.05%叠氮化钠的混合液，特异性洗脱液 pH 范围 5.0~10，收集特异性洗脱下来的糖化蛋白。

3. 按权利要求 1 所述的间氨基苯硼酸亲和层析法纯化糖基化蚓激酶的方法，其特征在于：还包括首先对琼脂糖填料进行常规活化。

4. 按权利要求 1 所述的间氨基苯硼酸亲和层析法纯化糖基化蚓激酶的方法，其特征在于：还包括在步骤 2 的缓冲液中加入 pH=8.5, 0.15M NaCl，其浓度为 10~100g/L，

5. 按权利要求 1 所述的间氨基苯硼酸亲和层析法纯化糖基化蚓激酶的方法，其特征在于：还包括在步骤 5 完成后，再进行以下步骤：

1) 采用通常的透析和分子筛法除盐；

2) 采用通常的工艺浓缩：超滤，冻干，可得到分离纯化的具有很高的纤溶蛋白酶(蚓激酶)活性，单一稳定的糖基化蛋白组分。

6. 按权利要求 1 所述的间氨基苯硼酸亲和层析法纯化糖基化蚓激酶

的方法，其特征在于所述的琼脂糖填料，包括：Sephacrose-6B，Sephacrose-CL-6B, Sephacrose-4B, 以及 Sephacrose-CL-4B.

7. 按权利要求 1 所述的间氨基苯硼酸亲和层析法纯化糖基化蚓激酶的方法，其特征是：特异性洗脱液为顺式糖溶液，包括 D-果糖、D-葡萄糖、和 D-山梨醇。

8. 按权利要求 1 所述的间氨基苯硼酸亲和层析法纯化糖基化蚓激酶的方法，其特征在于：所述的蚯蚓的纤溶蛋白酶：双胸蚓、赤子爱胜蚓、粉正蚓或锯齿蚓。

间氨基苯硼酸亲和层析法纯化的糖基化蚓激酶及纯化方法

技术领域

本发明涉及一种分离纯化蚯蚓纤溶蛋白酶(蚓激酶)的方法，特别是涉及一种用琼脂糖凝胶-间氨基苯硼酸亲和层析法从蚯蚓中分离纯化出单一的稳定的糖基化蛋白组分，且具有较高的纤溶蛋白酶活性的方法。

背景技术

近年来人们采用盐析、超滤、分子筛、离子交换、高压液相色谱等分离方法，从蚯蚓中分离出一系列蛋白酶。体外平板法说明这些蛋白酶既可以激活纤溶酶原又能够直接降解纤维蛋白，因此被命名为蚓激酶(蚯蚓纤溶酶)。临床实验表明口服蚓激酶对心脑血管栓塞的防治效果明显。但是目前普遍采用的口服蚓激酶制剂是各个组分的混合物，吸收效率低，存在一定的毒副作用，并且对急救栓塞无能为力，针剂的研究势在必行，因此我们必须进一步纯化蚓激酶。目前国外有文章如：Nakajima, N., Mihara, H. and Sumi, N. (1993) Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1726-1730; 一直认为蚓激酶是一组非糖基化的同源蛋白酶，他们已经进行过系统研究的纯化的蚓激酶片段都是非糖基化的。这些蚓激酶保存过程中有一定程度的自降解，另外作为针剂毒性都很大，又如文献 2: (Nakajima, N., Sugimoto, M., and Ishihara, K. (2000) Stable earthworm serine proteases: Application of the protease function and usefulness of the earthworm autolysate. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **90**, 174-197 所介绍的。国内有人利用制备型电泳法分离出了糖基化的蚓激酶组分又如文献 3: “蚯蚓纤溶酶组分的分离纯化和分析”，[生物化学与生物物理进展]，2001，28 (2) 赵晓瑜，静天玉；他们将样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳后染色，切出所需条带，置电泳洗脱槽进行电泳洗脱，根据紫外光吸收回收样品。这种方法虽然得到了糖基化的蚓激酶组分，但仅仅适合于实验室内的样品微量制备，同时，其操作复杂，成本高，回收率低，很难直接用于中试或大规模生产。

发明内容

本发明的目的在于：克服已有蚓激酶分离技术中存在的方法复杂，成

本高，收率低等缺陷；为了提高蚓激酶的药效，进一步开发针剂创造条件；本发明通过配基上的硼-羟基与糖基化蚓激酶糖链上的羰基结合，而得到比非糖基化组分稳定性更强，体内半衰期更长，且毒性更低的糖基化单一组分的目的；为了达到快速有效的大批量分离糖基化蚓激酶组分，实现产业化生产；从而提供一种以简单的操作，低成本的对氨基苯硼酸亲和层析法纯化蚯蚓蛋白酶的方法；也在其他糖蛋白的分离纯化方面做出有益探索。

本发明的目的是这样实现的：

本发明提供的一种对氨基苯硼酸亲和层析法纯化糖基化蚓激酶，其特征是：所述的蚯蚓蛋白酶具有 N-末端序列为 N-Ala-Glu-Val-Cys-Cys-Pro-Asp-Ile-的蛋白质。该糖基化蚓激酶纯度的聚丙烯酰胺电泳检测图如图 1 所示；本发明得到的糖基化蚓激酶组分采用生色底物法进行的活力测定图如图 2 所示。

本发明提供的采用对氨基苯硼酸亲和层析法纯化糖基化蚓激酶的方法，包括以下步骤：

- 1) 选取琼脂糖做填料；所选取的琼脂糖可采用通常的条件进行琼脂糖填料的活化，也可以不进行琼脂糖填料的活化；
- 2) 采用对氨基苯硼酸作为亲和层析树脂的配基：将对氨基苯硼酸溶解在 0.2 M NaHCO₃ 缓冲液中，或为了使配基更好地溶解缓冲液中，还包括加入 pH=8.5, 0.15M NaCl, 浓度为 10~100g/L, 然后与活化后的琼脂糖填料按 1: 5 ~ 5: 1 (V/V) 混合，搅拌 0.5-2 小时，在温度为 4°C-40°C 下，使配基连接到琼脂糖填料上；
- 3) 装柱，用终浓度分别为 0.01-0.05M 的天门冬酰氨，0.01-0.05M 氯化镁及 0.01-0.05% 的叠氮化钠的混合液平衡，平衡液的 pH 范围是 6.0 ~ 14；
- 4) 上样：样品是经过通常的自溶、匀浆、盐析等方法得到的蚯蚓粗提物，上样时样品浓度为 0.5~5mg/mL, 体积为柱体积的 1/10~1/3；上样缓冲液是 Tris-HCl 缓冲液, pH 5.0~14, 浓度为 5~50mM；
- 5) 非特异性洗脱采用终浓度分别为 0.001-0.01M 的 Tris-HCl, 0.001-0.005 M 的天门冬酰氨，0.05-0.5M 氯化镁及 0.01-0.05% 的叠氮化钠的混合液作洗脱液，非特异洗脱液的 pH 范围是 6~12；特异性洗脱以终浓度分别为 0.05-0.5 M 的 Tris-HCl, 0.001-0.01M 天门冬酰氨，0.1-1.0 M 顺式糖及 0.01-0.05% 叠氮化钠的混合液作为洗脱液，特异性洗脱液的 pH 范围是 pH5.0~10；收集特异性洗脱下来的糖基化蚓激酶。

为了进一步纯化分离蚯蚓蛋白酶，还包括：

- 6) 采用通常的透析和分子筛法除盐；
- 7) 采用通常的工艺浓缩：超滤，冻干，即可得到单一稳定的糖基化蛋

白组分，且具有很高的纤溶蛋白酶(蚓激酶)活性。

所述的琼脂糖填料，包括：Sephacrose-6B, Sephacrose-CL-6B, Sephacrose-4B, 以及 Sephacrose-CL-4B.

本发明还包括将得到的产物进行检测：用电泳仪进行 SDS-PAGE 电泳，分离胶浓度为 8-15%。并根据周靓的生色底物法测活(Zhou, J., Fan, R., Wu C. and He R.Q. (1997) Assay of lumbrokinase with a chromophoric substrate. *Protein and Peptide letters* 4, 409-414)。

本发明的优点：间氨基苯硼酸作为亲和层析树脂的配基，能特异性结合 N-末端氨基及赖氨酸侧链氨基糖化的蛋白质，分辨能力强。电泳结果表明由本发明分离得到的糖基化蚓激酶组分是单一条带（如图 1 所示）。N-末端序列为 N-Ala-Glu-Val-Cys-Cys-Pro-Asp-Ile-是一种新的蛋白质。利用生色底物进行测活，结果表明该组分具有很强的纤溶活性（如图 2 所示），因此可以制成针剂或疗效更强的口服液。通常糖链对蛋白质有保护作用，不仅可以延长蚓激酶在体外的保存时间，也能提高它在体内的半衰期，同时降低免疫毒性。因此本方法得到的这一崭新的蚓激酶组分具有很强的应用潜力。更重要的是此方法工艺简洁，设备简单，成本低，原料来源丰富，适用于规模化生产。

附图说明

图 1 是本发明得到的糖基化蚓激酶纯度的聚丙烯酰胺电泳检测图

图 2 是采用生色底物法对本发明得到的糖基化蚓激酶组分进行的活力测定图

具体实施方式

下面结合实施例和附图对本方法进行详细说明

实施例 1:

用羰基二咪唑活化琼脂糖填料 Sephacrose-CL-6B, 采用间氨基苯硼酸作为亲和层析树脂的配基：将间氨基苯硼酸溶解在 0.2 M NaHCO₃ 缓冲液 (pH=8.5, 0.15M NaCl)中，浓度为 10g/L，然后与活化后的琼脂糖填料按 5: 1 (V/V)混合，搅拌 2 小时(4°C)，使配基连接到琼脂糖填料上，装柱。用 pH=6.0 的终浓度分别为 0.01 M 天门冬酰氨，0.01M 氯化镁及 0.01%叠氮化钠的混合液平衡。

称取赤子爱胜蚓粗提物的冻干粉，溶于 pH=5.0 的 Tris-HCl 缓冲液中，终浓度为 0.5mg/mL。上样量为柱体积的 1/3。用 pH=6.0, 0.001M 的 Tris-HCl, 0.001M 的天门冬酰氨，0.05M 氯化镁及 0.01%的叠氮化钠作洗脱液，除去非特异性结合的杂蛋白。然后用 pH=5.0, 0.05M 的 Tris-HCl, 0.001M

的天门冬酰氨, 0.1MD-山梨醇及 0.01%的叠氮化钠进行特异性洗脱。收集糖基化蚓激酶。

透析除盐后, 超滤浓缩。浓缩液冻干后称重为 0.1mg。

配制 SDS-PAGE 电泳凝胶, 分离胶浓度为 15%, 100V 电泳。得到的结果如图 1 所示。采用 Chromozym-TH 作为生色底物, 以 pH=8.3 的 Tris-HCl 作为反应缓冲液, 测定 OD_{385} 的变化, 结果表明所得的糖基化蚓激酶组分纤溶活性很高, 相当于 $35\Delta A \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$, 如图 2 所示。

实施例 2:

用溴化氰活化 Sepharose-CL-4B, 采用间氨基苯硼酸作为亲和层析树脂的配基: 将间氨基苯硼酸溶解在 0.2 M $NaHCO_3$ 缓冲液(pH=8.5, 0.15M NaCl) 中, 浓度为 100g/L, 然后与活化后的琼脂糖填料按 1: 5 (V/V) 混合, 搅拌 0.5 小时(40°C), 使配基连接到琼脂糖填料上, 装柱。用 pH10.2, 终浓度分别为 0.02M 天门冬酰氨, 0.02M 氯化镁及 0.02%叠氮化钠三者混合液平衡。

称取粉正蚓粗提物的冻干粉, 溶于 pH14 的 Tris-HCl 缓冲液中, 终浓度为 5mg/mL。上样量为柱体积的 1/10。用 pH 12, 终浓度分别为 0.01M 的 Tris-HCl, 0.005M 的天门冬酰氨, 0.5M 氯化镁及 0.05%的叠氮化钠四者混合液作洗脱液, 除去非特异性结合的杂蛋白。然后用 pH10, 终浓度分别为 0.5M 的 Tris-HCl, 0.01M 的天门冬酰氨, 1.0MD-果糖及 0.05%的叠氮化钠四者混合液进行特异性洗脱。收集糖蛋白。

透析除盐后, 超滤浓缩。浓缩液冻干后称重为 0.14mg。

配制 SDS-PAGE 电泳凝胶, 分离胶浓度为 8%, 100V 电泳。结果表明得到的蛋白是单一组分。采用 Chromozym-TH 作为生色底物, 以 pH=8.3 的 Tris-HCl 作为缓冲液测定 OD_{385} 的变化, 结果表明所得的糖基化蚓激酶组分纤溶活性很高, 相当于 $27\Delta A \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ 。

实施例 3:

用羰基二咪唑活化 Sepharose-6B, 采用间氨基苯硼酸作为亲和层析树脂的配基: 将间氨基苯硼酸溶解在 0.2 M $NaHCO_3$ 缓冲液(pH=8.5, 0.15M NaCl) 中, 浓度为 10~100g/L, 然后与活化后的琼脂糖填料按 1: 1 (V/V) 混合, 搅拌 1 小时(室温), 使配基连接到琼脂糖填料上, 装柱。用 pH8.75, 终浓度分别为 0.02M 的天门冬酰氨, 0.02M 氯化镁及 0.02%的叠氮化钠三者混合液平衡。

称取锯齿远蚓粗提物的喷雾干粉, 溶于 pH9.0 的 Tris-HCl 缓冲液中, 终浓度为 1mg/mL。上样量为柱体积的 1/5。用 pH 11.0, 终浓度分别为 0.001M

的 Tris-HCl, 0.002M 的天门冬酰氨, 0.1M 氯化镁及 0.02% 的叠氮化钠四者混合液作洗脱液, 除去非特异性结合的杂蛋白。然后用 pH9.2, 终浓度分别为 0.1M 的 Tris-HCl, 0.005M 的天门冬酰氨, 0.2MD-葡萄糖及 0.02% 的叠氮化钠四者混合液进行特异性洗脱。收集糖蛋白。

透析除盐后, 超滤浓缩。浓缩液冻干后称重为 0.2mg。

配制 SDS-PAGE 电泳凝胶, 分离胶浓度为 15%, 100V 电泳。结果表明得到的蛋白是单一组分。采用 Chromozym-TH 作为生色底物, 以 pH=8.3 的 Tris-HCl 作为缓冲液测定 OD_{385} 的变化, 结果表明所得的糖基化蚓激酶组分纤溶活性很高, 相当于 $25\Delta A \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ 。

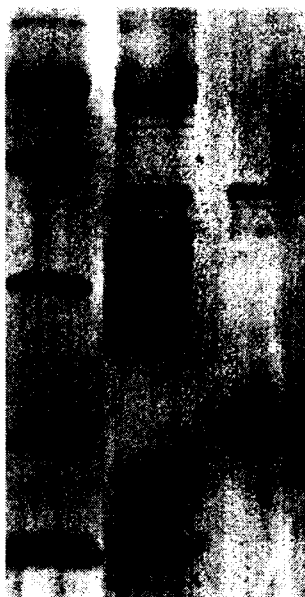


图 1

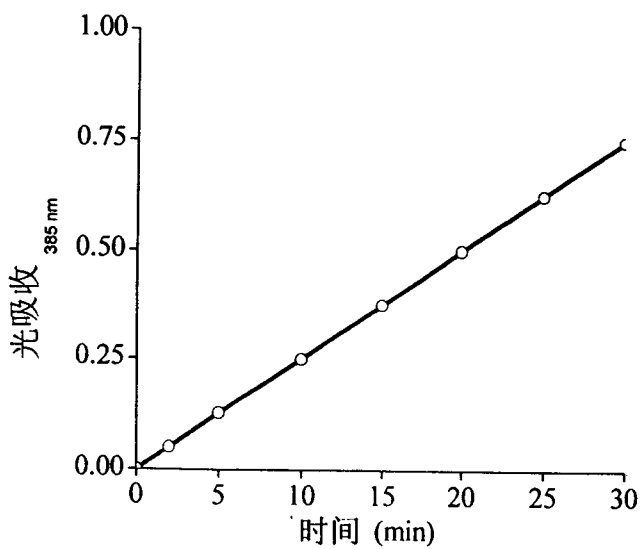


图 2