



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101716494 A

(43) 申请公布日 2010.06.02

(21) 申请号 200910238077.1

(22) 申请日 2009.11.18

(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 董先智 李梅基 李昭华

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

B01J 20/28 (2006.01)

B01J 20/285 (2006.01)

B01J 20/30 (2006.01)

C12N 9/74 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种纯化凝血酶磁性亲和微球及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供一种纯化凝血酶的磁性亲和微球,及其制备方法和应用,其中所述纯化凝血酶的磁性亲和微球包括磁核、包裹在所述磁核外部的高分子包裹材料和与所述高分子包裹材料偶联的配基,其特征在于所述配基能特异性亲和凝血酶。

1. 一种纯化凝血酶的磁性亲和微球,其包括磁核、包裹在所述磁核外部的高分子包裹材料和与所述高分子包裹材料偶联的配基。
2. 按照权利要求 1 的纯化凝血酶的磁性亲和微球,其特征在于所述配基是凝血酶的亲和配基,如肝素、核酸适体等。
3. 按照权利要求 1 的纯化凝血酶的磁性亲和微球,其特征在于所述磁核是 Fe_3O_4 纳米粒子。
4. 按照权利要求 1 的纯化凝血酶的磁性亲和微球,其特征在于所述高分子包裹材料选自壳聚糖、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇、硝化纤维素、聚乙烯醇缩丁醛或天然高聚物藻酸钙。
5. 一种用于制备按照权利要求 1 的纯化凝血酶的磁性亲和微球的方法,包括:
 - 1) 制备磁核;
 - 2) 用高分子包裹材料包裹所述磁核;和
 - 3) 在所述高分子包裹材料上偶联配基。
6. 按照权利要求 5 的方法,其特征在于在步骤 3) 中使用交联剂,所述交联剂优选是戊二醛。
7. 按照权利要求 5 的方法,其特征在于所述配基是凝血酶的亲和配基,如肝素、核酸适体等。
8. 按照权利要求 5 的方法,其特征在于所述磁核是 Fe_3O_4 纳米粒子。
9. 按照权利要求 5 的方法,其特征在于所述高分子包裹材料选自壳聚糖、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇、硝化纤维素、聚乙烯醇缩丁醛或天然高聚物藻酸钙。
10. 按照权利要求 1-4 中任一项的纯化凝血酶的磁性亲和微球在纯化凝血酶中的应用。

一种纯化凝血酶磁性亲和微球及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白质的纯化,具体地,涉及凝血酶的纯化。

背景技术

[0002] 凝血酶 (EC3. 4. 21. 5) 是一种专一性很强的丝氨酸蛋白水解酶,能水解血纤维蛋白原的四个 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。在临床上,凝血酶是局部止血的首选药物,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。实施时常以干粉或生理盐水溶解后局部涂于伤处及手术处,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、脑缺血中有重要作用,在中枢神经系统正常发育和损伤保护中也有重要作用。由于凝血酶具有止血快、安全性好等优点,其临床使用日渐广泛,市场对纯度高、活性好的凝血酶需求强劲,产品供应日趋紧缺。

[0003] 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采用凝胶过滤层析、离子交换层析和肝素亲和层析三种方法。目前,获得高纯度产品较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、琼脂糖等,利用亲和吸附分离制备凝血酶。然而亲和柱层析法的一个局限是生产成本很高,同时对上样液体的质量要求较高。生化提取时,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。

[0004] 近年来,功能性磁吸附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很难甚至无法得到的析物,并在许多领域中证实了其可靠性,如废水处理、分子生物学、细胞分选和临床诊断等。壳聚糖是天然的氨基多糖,其来源丰富、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,是纳米磁珠的良好包载材料和功能耦联材料。

发明内容

[0005] 1. 一种纯化凝血酶的磁性亲和微球,其包括磁核、包裹在所述磁核外部的高分子

包裹材料和与上述高分子包裹材料偶联的配基。

[0006] 2. 按照以上 1 的纯化凝血酶的磁性亲和微球,其特征就在于所述配基是凝血酶的亲和配基,如肝素、核酸适体等。

[0007] 3. 按照以上 1 或 2 的纯化凝血酶的磁性亲和微球,其特征就在于所述磁核是 Fe_3O_4 纳米粒子。

[0008] 4. 按照以上 1-3 中任一项的纯化凝血酶的磁性亲和微球,其特征就在于所述高分子包裹材料选自壳聚糖、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇、硝化纤维素、聚乙烯醇缩丁醛或天然高聚物藻酸钙。

[0009] 5. 一种用于制备按照以上 1-4 中任一项的纯化凝血酶的磁性亲和微球的方法,包括:

[0010] 1) 制备磁核;

[0011] 2) 用高分子包裹材料包裹所述磁核;和

[0012] 3) 在所述高分子包裹材料上偶联配基。

[0013] 6. 按照以上 5 的方法,其特征就在于在步骤 3) 中使用交联剂,所述交联剂优选是戊二醛。

[0014] 7. 按照以上 5 或 6 的方法,其特征就在于所述配基是凝血酶的亲和配基,如肝素、核酸适体等。

[0015] 8. 按照以上 5-7 中任一项的方法,其特征就在于所述磁核是 Fe_3O_4 纳米粒子。

[0016] 9. 按照以上 5-8 中任一项的方法,其特征就在于所述高分子包裹材料选自壳聚糖、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇、硝化纤维素、聚乙烯醇缩丁醛或天然高聚物藻酸钙。

[0017] 10. 按照以上 1-4 中任一项的纯化凝血酶的磁性亲和微球在纯化凝血酶中的应用。

[0018] 本发明中所使用的 Fe_3O_4 纳米粒子的尺寸可以在 10-200nm 的范围内,肝素和壳聚糖的比例可以在 0.2-2g/g 范围内。

[0019] 本发明中所使用的高分子包裹材料优选是壳聚糖,其脱乙酰度一般在 80% 以上,优选地,脱乙酰度 $\geq 90\%$ 。

[0020] 在制备磁核过程中,为了增加微球分散性,避免团聚造成比表面积减小,可以加入聚乙二醇 (PEG),诸如 PEG4000,PEG 的加入可以起到分散剂和稳定剂的作用,它能包围在磁核的表面,使之形成胶体粒子。这样制备的微球不易团聚,分散性好。

[0021] 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质识别和可逆结合的配基,然后对目标蛋白质进行分离。生物科学和生物技术领域蛋白的分离和纯化一般是通过改变 pH 值、温度、离子强度、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,而且目标蛋白质的损失大。与传统分离方法相比,蛋白质的磁分离技术具有快速、高纯、高收率等优点,并且降低了固定资产投资和操作成本。

[0022] 我们以 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,首次制备了用于提纯凝血酶的亲和磁珠,成功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。这种磁性亲和材料对凝血酶吸附分离效果,相比传统的柱层析法,不仅纯化效果好,而

且大大缩短纯化时间和减少洗脱液的用量。天然廉价的壳聚糖作为柱层析填料有一定的局限性,但是作为磁珠的包被材料则非常适合,因此,该磁性亲和材料与现有的亲和层析材料相比也有很好的优势。实践表明,这种磁性亲和分离材料大大降低了凝血酶的分离成本,对于凝血酶的规模化提纯有重要参考价值。

[0023] 上述技术发明工艺中微球内核为 Fe_3O_4 纳米粒子,高分子包裹材料为天然廉价多糖壳聚糖,亲和配基为肝素等。

[0024] 我们采用廉价稳定的壳聚糖作为高分子载体,制备了对凝血酶有特异性的新型功能磁性微球,并进行了凝血酶的纯化测试。将磁分离技术应用于血浆凝血酶的纯化,可以得到具很高酶活的凝血酶精品,同时省去大量的离心、过层析柱、浓缩等生产过程,节省了时间和成本。功能磁珠法操作过程简单、步骤少、收率高,为工业化生产凝血酶提供了很好的参考。

[0025] 与现有技术相比较,本发明的特点是:

[0026] (1) 无需购买纳米磁珠,采用 10nm 左右 Fe_3O_4 粒子为纳米磁核。

[0027] (2) 不使用琼脂糖等价格昂贵的材料作为载体,而用天然廉价的壳聚糖作为高分子包裹材料。

[0028] (3) 凝血酶纯化过程经过制备的磁性亲和微球吸附,磁分离,操作过程简单,且大大缩短了纯化过程。

[0029] (4) 制备的壳聚糖磁性亲和微球一步纯化凝血酶,所得蛋白液量少,大大减少了洗脱液的用量,避免了后续花费的浓缩过程,从而节省生产投资。

[0030] (5) 采用磁性亲和微球制备的凝血酶产品比活和回收率高且性能稳定,允许大规模生产。

附图说明

[0031] 图 1 是 Fe_3O_4 纳米粒子 (a) 和磁性亲和微球 (b) 的 XRD 模式;

[0032] 图 2 是 Fe_3O_4 纳米粒子 (a) 和磁性亲和微球 (b) 的发射电子显微镜照片;

[0033] 图 3 是 Fe_3O_4 磁核 (a)、壳聚糖磁性亲和微球 (b)、壳聚糖磁性微球 (c) 和壳聚糖空白微球 (d) 的傅立叶红外 (FTIR) 光谱;

[0034] 图 4 是壳聚糖磁性亲和微球在磁场 (a) 和自然状态 (b) 中的沉降曲线;

[0035] 图 5 是壳聚糖磁性亲和微球对凝血酶的吸附量;

[0036] 图 6 是壳聚糖磁性微球对凝血酶的非特异性吸附作用,其中 A:吸附前;B:吸附后;和

[0037] 图 7 是 SDS-PAGE 检测壳聚糖磁性亲和微球纯化凝血酶的结果分析,其中泳道 1:激活后的凝血酶原;泳道 2:标准蛋白 maker (97Kd, 66Kd, 43Kd, 31Kd, 20Kd);泳道 3-4:壳聚糖亲和磁性微球纯化后的凝血酶;泳道 5:DEAE-Sepharose Fast Flow(二乙胺基乙基纤维素-琼脂糖填料)柱层析纯化后的凝血酶;泳道 6:没有激活的凝血酶原。

具体实施方式

[0038] 本发明通过以下实施方案来实现:

[0039] 实施例 1. 制备纯化凝血酶的磁性亲和微球

[0040] 1) Fe_3O_4 纳米磁核的制备: 分别量取 FeCl_2 和 FeCl_3 溶液混合均匀, 再加入 PEG4000 (聚乙二醇 4000, 产品号: Topbio, Merck817006), 充分溶解后在磁力搅拌下快速滴加到 3mol/l 的 NaOH 中, 溶液迅速变为浓稠的亮黑色, 表明水解产生了大量的 Fe_3O_4 , 维持溶液 pH 值为 9 ~ 11, 继续搅拌 30min, 使大颗粒变小, 接着超声 10min, 使小颗粒溶解, 80℃ 水浴熟化 30min 后, 再超声 10min, 此时溶液水解已趋于完全, 变得均匀细腻, 用磁铁吸住底部倾去上清液, 重蒸水冲洗至中性, 抽滤, 真空冷冻干燥后备用。

[0041] 2) 壳聚糖包裹纳米磁核: 准确称取 1.0g, 脱乙酰度 $\geq 90\%$ 的壳聚糖粉末 (Sigma 公司), 溶解在 20ml, 5% 的乙酸溶液中, 直至完全溶解得到浓度为 5% 的壳聚糖乙酸溶液, 再加入 0.5g Fe_3O_4 磁粉超声分散 10min, 在缓慢搅拌下逐滴滴入到由 80mL 液体石蜡、2.5mL Span-80 (司盘-80, 国药集团化学试剂有限公司)、1.5ml Tween-60、2ml 正丁醇组成的混合液中, 超声并电动搅拌 10min, 使之形成微乳体系。停止超声后迅速滴入 5ml, 10% 戊二醛溶液, 在 2000r/min 下继续搅拌 2h。反应结束后用磁铁吸住底部倾去上清液, 再依次用石油醚、丙酮、重蒸水反复洗涤, 洗去表面活性剂和有机溶剂, 抽滤, 真空冷冻干燥后备用。

[0042] 3) 壳聚糖磁性亲和微球的制备: 称取 0.4g 制备的壳聚糖磁性微球, 用适量无离子水充分溶胀, 加入 6ml, 1mol/L NaOH, 0.8ml DMSO (二甲基亚砜, 天津市光复精细化工研究所) 和 0.5ml 环氧氯丙烷后, 悬浮液在 40℃ 振荡保温 2h。用水充分洗涤活化后的微球, 磁铁分离。加入 2ml 肝素 (产品号: Topbio H1045, 150mg/ml), 用 0.1mol/L HCl 调节 pH 至 4.75, 缓慢加入 6ml, 3% EDC (1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺, 国药集团化学试剂有限公司), 保持 pH 4.75, 4℃ 放置过夜, 磁铁分离, 用 0.1mol/L NaOH 溶液和去离子水交替充分洗涤, 得到壳聚糖磁性亲和微球, 真空冷冻干燥后备用。

[0043] 实施例 2. 使用纯化凝血酶磁性亲和微球分离纯化凝血酶

[0044] 1) 壳聚糖磁性亲和微球分离纯化凝血酶: 制备好的壳聚糖磁性亲和微球, 加入适量蒸馏水溶胀后, 用 0.05mol/L, pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液充分平衡洗涤后, 加入凝血酶粗酶液 (新鲜抗凝血浆经柠檬酸钡法初步纯化得到), 室温缓慢搅拌吸附 30min, 磁铁分离吸附液。用含 0.1mol/L NaCl 的上述缓冲液洗涤微球, 洗去杂蛋白, 然后用含 1mol/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, 真空冷冻干燥得终产物。

[0045] 2) 凝血酶检测及效价测定

[0046] ① 配制含有 0.1% 凝固物的纤维蛋白原标准溶液:

[0047] 准确称取纤维蛋白原标准品 (中国药品生物制品检定所, 55% 凝固物含量) 后以 0.9% 氯化钠溶液配制成 0.2% 的标准纤维蛋白原溶液, 用 0.05mol/L 的磷酸氢二钠溶液调节 pH 至 7.0 ~ 7.4, 再以 0.9% 氯化钠溶液稀释到含有 0.1% 可凝物的纤维蛋白原溶液备用。

[0048] ② 凝血酶标准品溶液配制:

[0049] 取凝血酶标准品用 0.9% 氯化钠溶解, 分别配制成每 ml 含 5.0、6.4、8.0、10.0 单位的标准品溶液备用。

[0050] ③ 纤维蛋白原的凝结时间测定:

[0051] 取内径 1cm, 长 10cm 的试管 4 支, 各精密加入配制好的纤维蛋白原溶液 0.9ml, 置于 37℃ 水浴中保温 5 分钟, 再精密量取上述凝血酶溶液各 0.1ml, 分别迅速加入上述各试

管中,摇匀,以精密度为 0.1sec 的秒表立即计时,在 37℃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 ~ 60sec。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 $y = -1.0015x + 2.4747$ ($R^2 = 0.9953$)。

[0052] ④样品凝血酶效价的测定:

[0053] 精密吸取待测样品 0.1ml,按标准曲线的制作方法平行测定 5 次,按回归方程计算活力单位。经测定,磁性亲和微球纯化出的凝血酶活力很高,比活达到 1879U/mg。

[0054] 实施例 3. 检测磁性亲和微球的构建和性能

[0055] 下面结合表征技术方法对本发明作进一步的说明:

[0056] 1、粉末 X 射线衍射 (XRD) 分析

[0057] 用 D/Max-2400 粉末 X 射线衍射仪 (Rigaku, 日本理学公司) 对所制备的 Fe_3O_4 纳米磁核和磁性亲和微球进行分析,采用 Cu (K α , $\lambda = 0.15406nm$) 靶,石墨单色器 (傅里叶红外光谱 FTS 3000 美国 DIGILAB),工作电压 40kv,工作电流 60mA,扫描速度 80/min。

[0058] 由图 1 可知,制备的 Fe_3O_4 纳米粒子 (a) 和磁性亲和微球 (b) 的 XRD 衍射峰均出现了六个特征峰,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,这与四氧化三铁的标准卡片对照 (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。四氧化三铁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 Scherer 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 13.41nm。

[0059] 2、电镜观察大小形貌

[0060] 将制备好的 Fe_3O_4 纳米磁核和磁性亲和微球分别用无水乙醇溶解成悬浮液,超声分散 10 分钟,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。

[0061] 由图 2 可以看出, Fe_3O_4 磁核 (a) 的粒径大小在 10nm 左右,这与我们经 XRD 分析计算得到的平均粒径 13nm 相一致,形状规则,具较好的分散性。磁性亲和微球 (b) 的粒径大小平均为 50nm 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 PEG4000 的加入可以起到分散剂和稳定剂的作用,它能包围在磁核的表面,使之形成胶体粒子。

[0062] 3、红外光谱分析

[0063] 将经真空干燥过的 Fe_3O_4 纳米磁核及壳聚糖空白微球、壳聚糖磁性微球、壳聚糖磁性亲和微球与 KBr 混匀后压片,粉体的质量浓度为 KBr 的 1%,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 $400cm^{-1} \sim 4000cm^{-1}$ 。

[0064] 利用红外光谱仪 (傅里叶红外光谱 FTS 3000, 美国 DIGILAB) 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。其中谱线 a 中 $575.45cm^{-1}$ 处为磁性 Fe_3O_4 的特征峰,对应的是 Fe-O 弯曲振动,而谱线 b 和 c 中在 $574.61cm^{-1}$ 和 $576.59cm^{-1}$ 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 b 和谱线 c、谱线 d 中共同出现了壳聚糖主要特征峰,谱线 c 的 $3444.97cm^{-1}$ 和谱线 b 的 $3425.02cm^{-1}$ 、谱线 d 的 $3441.41cm^{-1}$,是壳聚糖中 $-NH_2$ 和 $-OH$ 的伸缩振动峰,其中也包含壳聚糖的结晶水。谱线 b、c、d 中 $2929cm^{-1}$ 、 $2881cm^{-1}$

和 2926.98cm^{-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 c 中的 1401.03cm^{-1} 、谱线 d 中的 1404.48cm^{-1} 和谱线 b 中的 1418.07 是糖中 CH_3 的 C-H 变形振动吸收,谱线 c 的 1641.01cm^{-1} 、谱线 d 的 1635.63cm^{-1} 以及谱线 b 的 1645.28cm^{-1} 则是 $\text{C}=\text{N}$ 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。 894cm^{-1} 左右出现的吸收峰,是多糖的 β -构型糖苷键的特征峰。在谱线 b 中,在 1238.30cm^{-1} 出现磺酸基吸收峰,以及 1055.15cm^{-1} 、 929.00cm^{-1} 处出现肝素的特征吸收峰,可以说明肝素的偶联即壳聚糖磁性亲和微球的制备是成功的。

[0065] 4、磁性亲和微球的磁响应性测定

[0066] 分光光度法测定磁性亲和微球的磁沉降曲线: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。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。

[0067] 如图 4(a) 所示,磁性亲和微球在磁场中 4min 时透光率就达到了 87.6,经过 10min 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),40min 内其透光率仅从 32.8 上升到 55.6,从而说明,磁性亲和微球在外加磁场下具有较强的磁响应性,在自然状态下具有较好的悬浮稳定性。

[0068] 5、磁性亲和微球对凝血酶的吸附量测定

[0069] 称取 7 等份磁性亲和微球溶于适量 0.05M pH7.5 Tris-HCl 缓冲液中,分别加入已知酶活 ($310\text{U}/\text{ml}$) 的凝血酶粗酶液 2、4、6、8、10、11、12ml,用相同缓冲液补充至相同体积,室温搅拌吸附 30min,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珠对凝血酶的吸附量。由图 5 可知磁性亲和微球对凝血酶的最大吸附量为 $6200\text{U}/\text{g}$ 磁性微球。

[0070] 6、壳聚糖磁性微球对凝血酶的非特异性吸附作用

[0071] 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 0.05M pH7.5 Tris-HCl 缓冲液中,加入凝血酶粗酶液,室温搅拌吸附 30min,磁分离测定上清液中酶活力。重复实验操作,计算标准偏差 $S_d = 0.4472$,结果如图 6 所示,表明壳聚糖磁性微球对凝血酶无非特异性吸附作用。

[0072] 7、SDS-PAGE 检测磁性亲和微球纯化凝血酶结果

[0073] 从 SDS-PAGE 电泳图谱(图 7)可以看出,泳道 1 中相对分子质量为 36Kd (泳道 2 为 marker,如箭头所示)的凝血酶在加入 CaCl_2 激活后才出现,通过磁性亲和微球的纯化,达到了相对高的纯度。从图中泳道 3、4 和泳道 5 的比较可以看出,磁性亲和微球纯化的凝血酶较 DEAE 柱层析纯化的酶有更好的纯度。

[0074] 从表 1 可知,制备的磁性亲和微球纯化凝血酶得到了较高的比活,达到 $1879\text{U}/\text{mg}$,回收率可达 85%,纯化倍数 11. 而传统的柱层析法-DEAE 离子交换层析只得到 $910\text{U}/\text{mg}$ 比活,并且回收率只有 72%,纯化倍数 5.33。从纯化时间我们可以看到,粗酶经 DEAE 层析法纯化需 3 小时左右,而用磁性亲和微球纯化凝血酶只需 0.75 小时,相比较,磁分离纯化凝血酶大大缩短了操作时间。

[0075] 表 1 壳聚糖磁性亲和微球和 DEAE 柱层析纯化凝血酶的比较

	步骤 Steps	总蛋白(mg) Total protein	总活力(U) Total activity	比活(U/mg) Specific activity	回收率(%) Recovery	提纯倍数 Purification fold	纯化时间(h) Purification time
[0076]	粗酶	7.26	1238	170	100	1	
	DEAE	0.98	892	910	72	5.33	3
	磁性亲和微球	0.56	1053	1879	85	11.057	0.75

[0077] 8、壳聚糖磁性亲和微球的重复使用性能

[0078] 将吸附过了凝血酶的磁性亲和微球收集,用 1.0mol/L NaCl 为洗脱剂洗到上清检测不到蛋白质为止,再经 0.1mol/L NaOH 再生后,用 0.05mol/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,考察壳聚糖磁性亲和微球的重复使用性能。实验表明(如表 2 所示),磁性亲和微球对凝血酶的吸附量几乎可以完全恢复,说明此磁性亲和微球的重复使用性能是良好的。

[0079] 表 2 壳聚糖磁性亲和微球的重复使用性能

	重复次数	1	2	3	4	5	6
[0080]	酶吸附量(U/g 磁性亲和微球)	6150	6200	6100	6200	6100	6150

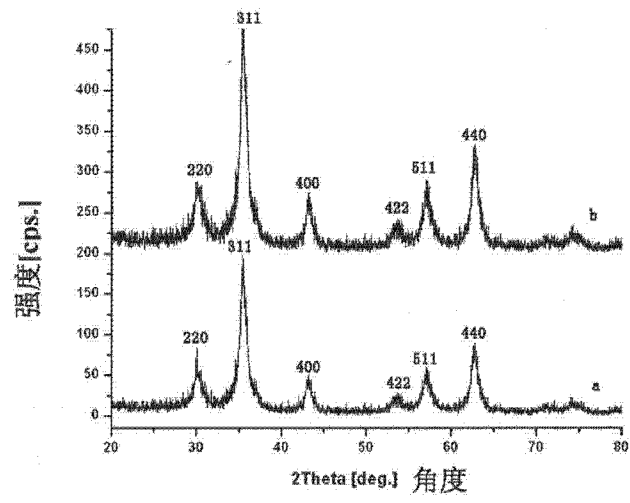


图 1

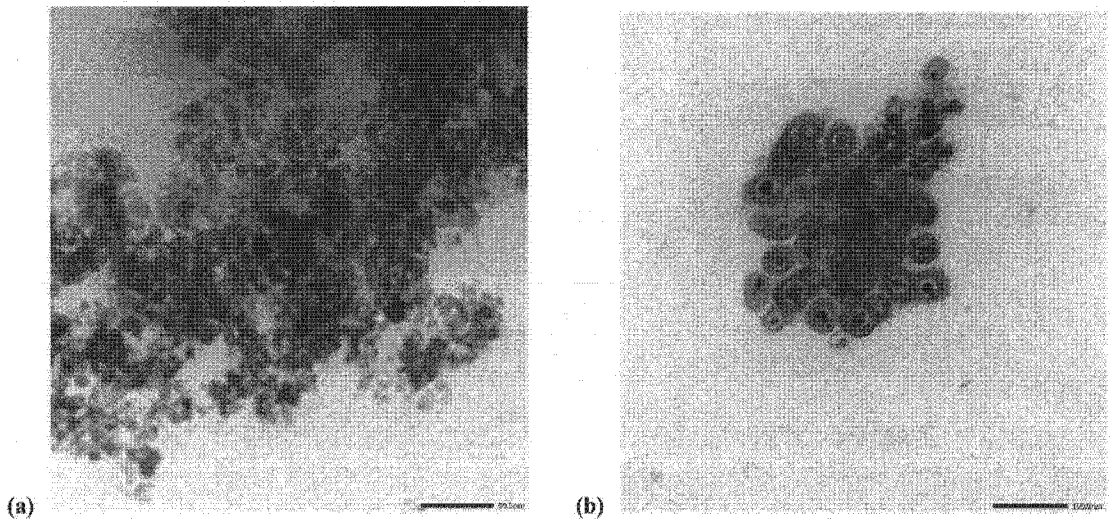


图 2

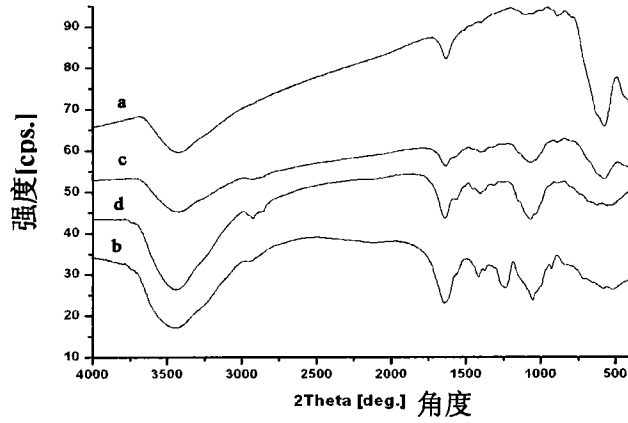


图 3

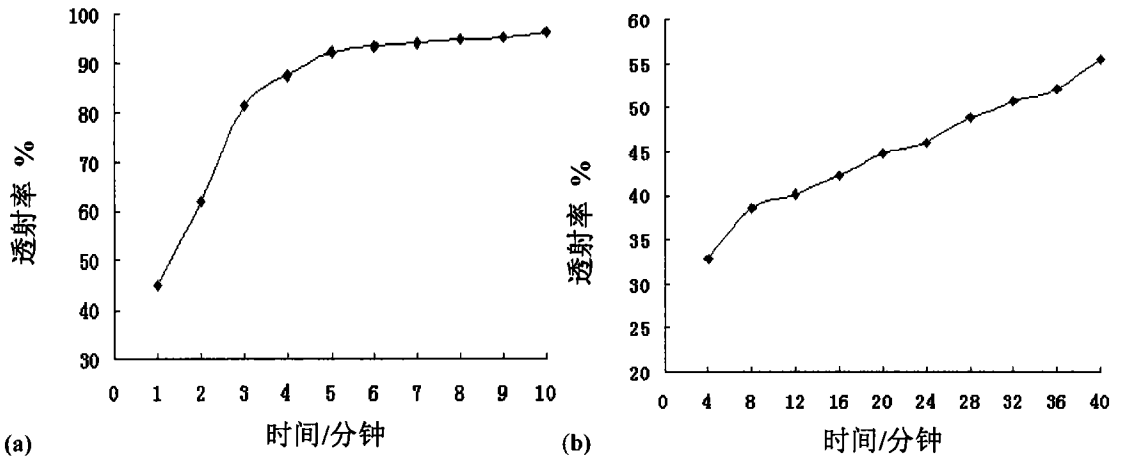


图 4

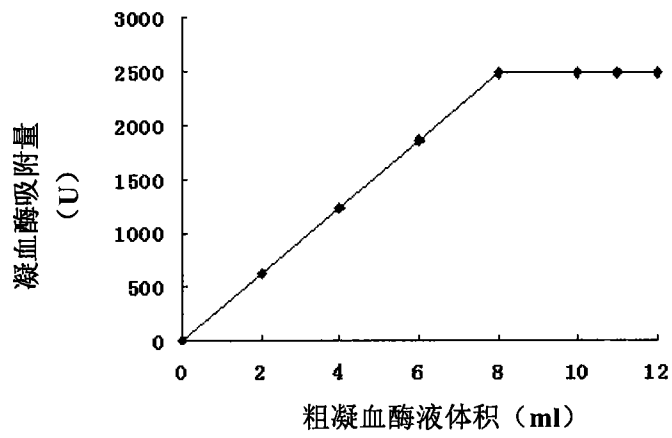


图 5

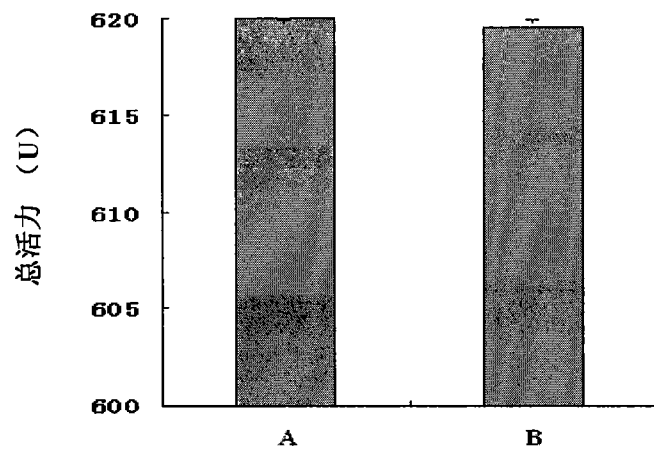


图 6

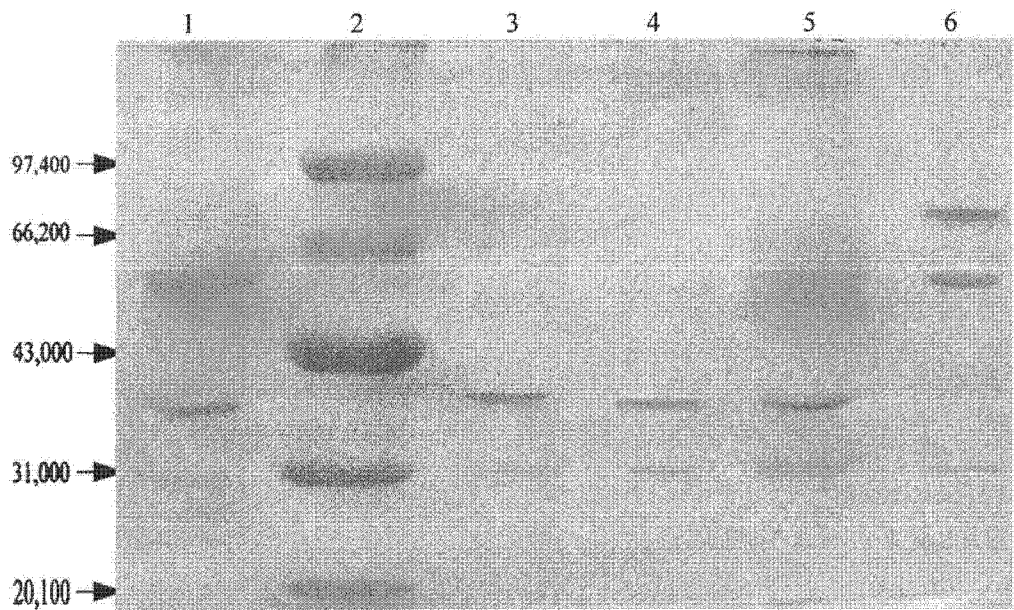


图 7