

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 9/68

C07K 1/16



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02116747.8

[43] 公开日 2003 年 11 月 12 日

[11] 公开号 CN 1454994A

[22] 申请日 2002.4.30 [21] 申请号 02116747.8

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100080 北京市朝阳区大屯路 15 号

[72] 发明人 赵 静 赫荣乔

[74] 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司

代理人 王凤华

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 4 页

[54] 发明名称 分离纯化单组分蚯蚓纤溶酶的亲和层析法

[57] 摘要

本方法采用琼脂糖凝胶偶联 p-氨基苯甲脒配基制备亲和层析柱，从蚯蚓的匀浆液中分离纯化出具有较强纤溶活力的单组分蛋白酶。通过该亲和层析柱，用含有脲基及胍基的化合物制备洗脱液进行梯度洗脱，经透析或分子筛等方法脱盐，得到其中的 EFE-III 纤溶蛋白酶，它具有很强的纤维蛋白溶解活力。用该方法纯化来源于各种蚯蚓的纤溶蛋白酶具有简洁方便，成本低等特点，适用于实验室和规模化生产。

1. 一种分离纯化单组分蚯蚓纤溶酶的亲和层析法，其特征在于以 p-氨基苯甲脒为配基，包括以下步骤：
 - 1) 用羰基二咪唑或溴化氰活化琼脂糖填料：
 - a. 用羰基二咪唑活化琼脂糖填料：在沙芯漏斗中充分清洗琼脂糖，以除去有机相；用浓度递增的二氧六环逐渐转入有机相；将羰基二咪唑溶于二氧六环中，同琼脂糖混合搅拌；再用浓度递减的二氧六环洗涤，最后置换到水相中；
 - b. 用常规的溴化氰方法活化琼脂糖填料；
 - 2) 采用 p-氨基苯甲脒作为亲和层析树脂的配基：将 p-氨基苯甲脒和缩合剂 1-乙基-3-碳二亚胺盐酸盐溶解在 NaHCO_3 溶液中，然后与活化后的琼脂糖填料按体积比 1: 10~1: 5 混合，于室温下振荡偶联，使配基连接到琼脂糖填料上，反应结束后，将填料抽干，充分洗涤，再用 Tris-HCl 缓冲液和乙酸盐缓冲液交替洗涤 2 次以上，抽干，待用；
 - 3) 用平衡缓冲液装柱，充分平衡；
 - 4) 蚯蚓粗提物上样；
 - 5) 非特异性洗脱采用平衡缓冲液，洗脱至基线；特异性洗脱是用包括 0.01~3.0M 的含有脲基或胍基化合物的平衡液作为特异性洗脱液，来进行特异性梯度洗脱；收集特异性梯度洗脱下来的单组分蚯蚓纤溶酶；
 - 6) 除去洗脱下来的蛋白酶溶液中的盐；
 - 7) 采用通常的工艺浓缩得到蚯蚓纤溶酶中的 EFE-III 组分。
2. 按权利要求 1 所述的 p-氨基苯甲脒亲和层析法纯化蚯蚓蛋白酶的方法，其特征在于所述填料琼脂糖树脂，包括琼脂糖 6B，琼脂糖 CL-6B，琼脂糖 4B 或琼脂糖 CL-4B。
 3. 按权利要求 1 所述的分离纯化单组分蚯蚓纤溶酶的亲和层析法，其特征在于步骤 1) 中用于转入有机相和洗涤的二氧六环，其浓度是 20~100%。
 4. 按权利要求 1 所述的分离纯化单组分蚯蚓纤溶酶的亲和层析法，其特征在于步骤 2) 中所用的 NaHCO_3 溶液，浓度为 0.5~1.5M。
 5. 按权利要求 1 所述的分离纯化单组分蚯蚓纤溶酶的亲和层析法，其特征在于步骤 2) 中偶联时维持 pH4~5。
 6. 按权利要求 1 所述的分离纯化单组分蚯蚓纤溶酶的亲和层析法，其特征在于步骤 5) 中，非特异性洗脱采用终浓度分别为 0.01~0.1M 的 Tris-HCl, 0.1~10mM NaCl 及 0.01~0.05% 的叠氮化钠的混合液作洗脱液。

7. 按权利要求 1 所述的分离纯化单组分蚯蚓纤溶酶的亲和层析法，其特征在于步骤 5) 中，所述的含有脲基或胍基化合物的特异性洗脱液，包括尿素、盐酸胍和精氨酸。

8. 按权利要求 1 所述的分离纯化单组分蚯蚓纤溶酶的亲和层析法，其特征在于本方法适用于纯化双胸蚓、异唇蚓、爱胜蚓、正蚓以及锯齿蚓的纤溶蛋白酶。

分离纯化单组分蚯蚓纤溶酶的亲和层析法

技术领域

本发明涉及一种分离纯化单组分蚯蚓纤溶蛋白酶（蚓激酶）的方法，特别是涉及一种采用羧基二咪唑或溴化氰活化琼脂糖树脂，偶联 p-氨基苯甲脒的亲和层析柱，从中分离纯化出纤溶酶中有较高纤溶活性的 EFE-III 组分的技术与方法。

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（目前国外有文章如文献 1：Nakajima, N., Mihara, H. and Sumi, N. (1993) Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1726-1730. 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。），从蚯蚓中分离出六种蛋白同功酶（EFE-I-0, -I-1, -I-2, -II, -III-1 和 -III-2），其中 EFE-III 二种同功酶具有最高的纤溶酶活力。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，因此被命名为蚯蚓纤溶酶（蚓激酶）。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，新的剂型（针剂等）的研究势在必行。因此，进一步纯化有高纤溶活力的蚓激酶，使其成为单组分，可能是制备蚓激酶新的剂型的可行技术路线。

在分离蚓激酶的方法上，又如国内有人利用亲和层析法分离出了糖基化的蚓激酶组分（如文献 3：赵晓瑜，静天玉（2001）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*, 28 (2): 218-220 所介绍的）。他们将样品经大豆胰蛋白酶抑制剂为配基的层析柱后，得到一组非均一的蛋白酶；还要再经过二次离子交换柱后采取梯度洗脱分离出单一蛋白组分。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单一的蚓激酶组分，但成本高，回收率低，仅仅适合于实验室的微量样品制备。国内还有采用亲和层析分离单一组分蚓激酶的工艺（如文献 4：孙启良（2000）蚓激酶分离工艺，发明专利公开号：CN1293245A），但是，该专利没有设计出制备亲和层析柱的方法，也未能发明出蛋白组分的洗脱工艺流程和实验的结果证据，很

难应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，进一步开发新的剂型（针剂等）创造条件；通过将丝氨酸类蛋白酶的可逆性竞争抑制剂 p-氨基苯甲脒以共价结合到羰基二咪唑或溴化氰活化的琼脂糖（Sephrose）上作为配基，用含有脲基或胍基化合物的溶液进行特异性梯度洗脱，得到具有高纤溶活性的单组分蚓激酶。该方法操作简单，成本低，适用于实验室和规模化生产。

本发明提供一种分离纯化单组分蚯蚓纤溶酶的亲和层析法，包括以下步骤：其特征在于以 p-氨基苯甲脒为配基，包括以下步骤：

1. 羰基二咪唑或溴化氰活化琼脂糖填料：

1) 用羰基二咪唑活化琼脂糖填料：在沙芯漏斗中充分清洗琼脂糖，以除去有机相；用浓度递增的二氧六环逐渐转入有机相；将羰基二咪唑溶于二氧六环中，同琼脂糖混合搅拌；再用浓度递减的二氧六环洗涤，最后置换到水相中；

2) 用常规的溴化氰方法活化琼脂糖填料；

2. 采用 p-氨基苯甲脒作为亲和层析树脂的配基：将 p-氨基苯甲脒和缩合剂 1-乙基-3-碳二亚胺盐酸盐溶解在 NaHCO₃ 溶液中，然后与活化后的琼脂糖填料按体积比 1: 10~1: 5 混合，于室温下振荡偶联，使配基连接到琼脂糖填料上，反应结束后，将填料抽干，充分洗涤，再用 Tris-HCl 缓冲液和乙酸盐缓冲液交替洗涤 2 次以上，抽干，待用。

2. 用平衡缓冲液装柱，充分平衡。

3. 蚯蚓粗提物上样。

4. 非特异性洗脱采用平衡缓冲液，洗脱至基线；特异性洗脱是用包括 0.01~3.0M 的含有脲基或胍基化合物的平衡混合液作为特异性洗脱液，来进行特异性梯度洗脱；收集特异性梯度洗脱下来的单组分蚯蚓纤溶酶。

5. 除去洗脱下来的蛋白酶溶液中的盐。

6. 采用通常的工艺浓缩得到蚯蚓纤溶酶的单组分。

在上述方法中，亲和层析柱所用的填料包括琼脂糖 6B，琼脂糖 CL-6B，琼脂糖 4B 以及琼脂糖 CL-4B；步骤 1) 中用于转入有机相和洗涤用的二氧六环，其浓度是 20~100%；步骤 2) 中所用的 NaHCO₃ 溶液，浓度为 0.5~1.5M；步骤 2) 中偶联时维持 pH4~5；步骤 5) 中，非特异性洗脱采用终浓度分别为 0.01~0.1M 的 Tris-HCl，0.1~10mM NaCl 及 0.01~0.05% 的叠氮化钠的混合液作洗脱液；步骤 5)

中，含有脲基或胍基化合物的特异性洗脱液，包括尿素、盐酸胍和精氨酸；本方法适用于纯化来源于双胸蚓、异唇蚓、爱胜蚓、正蚓以及锯齿蚓的纤溶蛋白酶。

本发明的优点是：亲和层析树脂的配基 p-氨基苯甲脒是胰蛋白酶的可逆竞争性抑制剂，胰蛋白酶或胰蛋白酶样的蛋白酶可以结合在填料上，用来纯化蚓激酶，具有很强的分辨能力。将采用本发明分离纯化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%。SDS-PAGE 电泳图及 Western Blotting 结果表明由本发明分离得到的蚓激酶组分是单一条带（如图 1，2 所示），电泳显示分子量为 35,000 Da。氨基酸序列测定仪（Applied Biosystems Procise-PROCISE）的实验结果显示，N-末端氨基酸序列为：N-Ile-Val-Gly-Gly-Ile-Glu-Ala-Arg（图 3），表明此蛋白确为 EFE-III，即命名为 EFE-III-a。利用生色底物法进行测活（如文献 5：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），结果表明该组分具有很强的纤溶活性（如图 4 所示），因此可以制成新的剂型——针剂或疗效更强的口服液。

此方法工艺简单，不需要大型复杂的设备，原料来源丰富，因此成本低，特别适合于规模化工业生产。

附图说明

- 图 1 本发明得到的单一蛋白组分纯度的 SDS-聚丙烯酰胺电泳检测图
- 图 2 Western Blotting 检测所得到蛋白组分的抗原性
- 图 3-1~10 所得蛋白组分的 N 末端测序结果
- 图 4 采用生色底物法对本发明得到的蛋白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

以下实施例中所用的羰基二咪唑（CDI）、p-氨基苯甲脒（PAB）、1-乙基-3-（3-二甲基氨基丙基）-碳二亚胺盐酸盐（EDAC）、盐酸胍、溴化氰、Tris 购自 Sigma 公司（美国）；Chromozym-TH 购自 Roche 公司（瑞士）；琼脂糖填料（Sepharose）购自 Pharmacia 公司（美国）；其他试剂为分析纯或电泳纯。

实施例 1：

1) 用羰基二咪唑活化琼脂糖填料 Sepharose CL-6B：取 10mL Sepharose CL-6B，在沙芯漏斗中水洗 2~3 次，再用 0.001M HCl 洗一次，双蒸水洗多次；分

别用 30%、70%和 100%的二氧六环转入有机相；将羰基二咪唑（CDI）溶于二氧六环中，同 Sepharose 混合搅拌 15~30 分钟；再分别用 100%、70%和 30%的二氧六环各洗一次，最后用双蒸水充分洗涤，待用。

2) 步骤 5) 中，含有脲基或胍基化合物的特异性洗脱液，包括尿素、盐酸胍和精氨酸。采用 p-氨基苯甲脒作为亲和层析树脂的配基：将 p-氨基苯甲脒和缩合剂 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐（EDAC）溶解在少量 1.0M NaHCO₃ 中，然后与活化后的琼脂糖填料按 1: 5 (V/V) 混合，于室温下振荡偶联 24 小时（维持 pH=4.0），使配基连接到琼脂糖填料上。反应结束后，将填料抽干，用双蒸水充分洗涤，再用 0.1M, pH=8.0 Tris-HCl 缓冲液（含 1.0M NaCl）和 0.1M, pH=4.0 乙酸盐缓冲液（含 1.0M NaCl）交替洗涤数次。

3) 装柱，用终浓度为 pH=6.0, 0.02M Tris-HCl 的混合缓冲液平衡。

4) 上样：称取赤子爱胜蚓（*Eisenia fetida*）粗提物的冻干粉，溶于 pH=6.0 的 0.02M Tris-HCl, 0.2mM NaCl 缓冲液中，终浓度为 0.5mg/mL。上样量为柱体积的 1/3。

5) 洗脱：0.02M 的 Tris-HCl, 0.2mM NaCl 及 0.02%的叠氮化钠的混合液作洗脱液，除去非特异性结合的杂蛋白；然后用 pH=6.0, 0.1M 的 Tris-HCl 及 0.02% 叠氮化钠的混合液，用浓度范围 0.01~2.0M 盐酸胍进行特异性线性洗脱。收集洗脱下来的胰蛋白酶类似物组分。

6) 透析除盐后，超滤浓缩。浓缩液冷冻干燥后称重为 0.1mg。

配制 SDS-PAGE 电泳凝胶，分离胶浓度为 15%，100V 电泳，得到的结果是分子量为 35,000 Da 的单一蛋白带（如图 1 所示）。Western Blotting 结果表明由本发明分离得到的蚓激酶组分是单一条带（如图 2 所示）。氨基酸序列测定仪的实验结果显示，N-末端氨基酸序列为：N-Ile-Val-Gly-Gly-Ile-Glu-Ala-Arg（如图 3 所示），表明此蛋白确为 EFE-III。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 OD₃₈₅ 的变化，结果表明所得的蚓激酶组分纤溶活性很高，相当于 35ΔA·g⁻¹·min⁻¹（如图 4 所示）。

实施例 2:

1) 溴化氰活化 Sepharose CL-4B: 取 15ml Sepharose CL-4B 在沙芯漏斗中用双蒸水充分清洗，抽干，将其悬浮在 2.0M 碳酸钠溶液中；称 1.5g 溴化氰溶于 1.5ml 乙腈中，分次加入 Sepharose CL-4B 悬浮液中，并滴加 2.0M 氢氧化钠溶液，维持 PH 值不变。反应一段时间后，立即抽干，再用 0.1M 四硼酸钠溶液洗涤已活化的琼脂糖填料。

2) 采用 p-氨基苯甲脒作为亲和层析树脂的配基：将 p-氨基苯甲脒和缩合剂

1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDAC)溶解在少量 1.0M NaHCO₃ 中, 然后与活化后的琼脂糖填料按 1: 8 (V/V) 混合, 于室温下振荡偶联 30 小时 (维持 pH=5.5), 使配基连接到琼脂糖填料上。反应结束后, 将填料抽干, 用双蒸水充分洗涤, 再用 0.1M, pH=8.0 Tris-HCl 缓冲液 (含 1.0M NaCl) 和 0.1M, pH=4.0 乙酸盐缓冲液 (含 1.0M NaCl) 交替洗涤数次。

3) 装柱, 用终浓度为 pH=10.0, 0.04M Tris-HCl 的混合缓冲液平衡。

4) 上样: 称取粉正蚓 (*Lumbricus rubellus*) 粗提物的冻干粉, 溶于 pH=12 的 0.05M 甘氨酸-氢氧化钠, 0.5mM NaCl 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 0.05M 的甘氨酸-氢氧化钠。

5) 洗脱: 0.5mM NaCl 及 0.05%的叠氮化钠的混合液作平衡液, 除去非特异性结合的杂蛋白。然后用 pH=10.0, 0.2M 的甘氨酸-氢氧化钠及 0.05%叠氮化钠的混合液, 用浓度范围是 0.02~1.5M 精氨酸进行特异性线性洗脱。收集洗脱下来的胰蛋白酶类似物组分。

6) 透析除盐后, 超滤浓缩。浓缩液冷冻干燥后称重为 0.12mg。

配制 SDS-PAGE 电泳凝胶, 分离胶浓度为 10%, 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 OD₃₈₅ 的变化, 结果表明所得的蚓激酶组分纤溶活性很高, 相当于 27ΔA·g⁻¹·min⁻¹。

实施例 3:

1) 用羰基二咪唑活化 Sepharose 6B: 取 8mL Sepharose 6B, 在沙芯漏斗中水洗 2~3 次, 再用 0.1M HCl 洗一次, 双蒸水洗多次; 分别用 20%、50%、80%和 100%的二氧六环转入有机相; 将羰基二咪唑 (CDI) 溶于二氧六环中, 同 Sepharose 混合搅拌 15~30 分钟; 再分别用 100%、80%、50%和 20%的二氧六环各洗一次, 最后用双蒸水充分洗涤, 待用。

2) 采用 p-氨基苯甲脒作为亲和层析树脂的配基: 将 p-氨基苯甲脒和缩合剂 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDAC)溶解在少量 1.0M NaHCO₃ 中, 然后与活化后的琼脂糖填料按 1: 8 (V/V) 混合, 于室温下振荡偶联 20 小时 (维持 pH=5.5), 使配基连接到琼脂糖填料上。反应结束后, 将填料抽干, 用双蒸水充分洗涤, 再用 0.1M, pH=8.0 Tris-HCl 缓冲液 (含 1.0M NaCl) 和 0.1M, pH=4.0 乙酸盐缓冲液 (含 1.0M NaCl) 交替洗涤数次, 装柱, 用终浓度为 pH=10.0, 0.04M Tris-HCl 的混合缓冲液平衡。

3) 装柱: 用 pH=7.0 的 0.1M 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠, 0.6mM NaCl 缓冲液平衡。

4) 上样: 称取红色爱胜蚓 (*Eisenia rosea*) 粗提物的喷雾干粉, 溶于 pH=7.0 的 0.1M 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠, 0.6mM NaCl 缓冲液中, 终浓度为 3.0mg/mL, 上样量为柱体积的 1/5。

5) 洗脱: 用 pH=10, 终浓度分别为 0.1M 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠, 0.6mM NaCl 及 0.03% 的叠氮化钠的混合液作洗脱液, 除去非特异性结合的杂蛋白。然后用 pH=9.0, 0.2M 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠及 0.03% 叠氮化钠的混合液, 用浓度范围是 0.1~1.5M 尿素进行特异性线性洗脱。收集洗脱下来的胰蛋白酶类似物组分。

6) 透析除盐后, 超滤浓缩。浓缩液冷冻干燥后称重为 0.15mg。

配制 SDS-PAGE 电泳凝胶, 分离胶浓度为 8%, 120V 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, 结果表明所得的蚓激酶组分纤溶活性很高, 相当于 $31\Delta A \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ 。

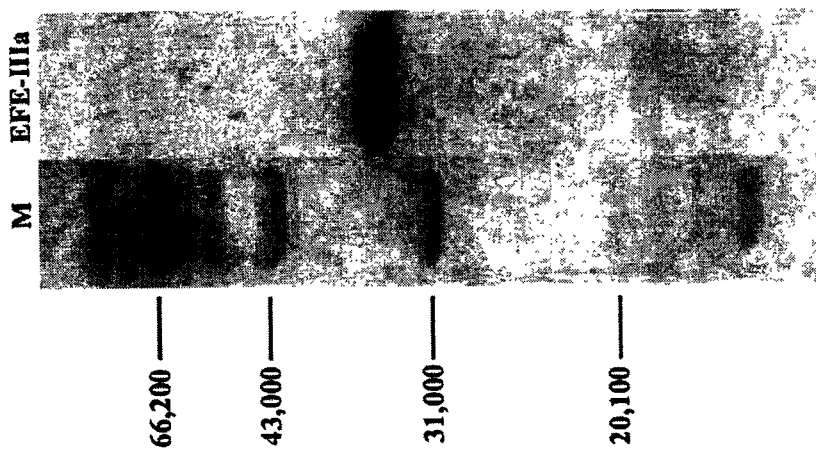


图 2

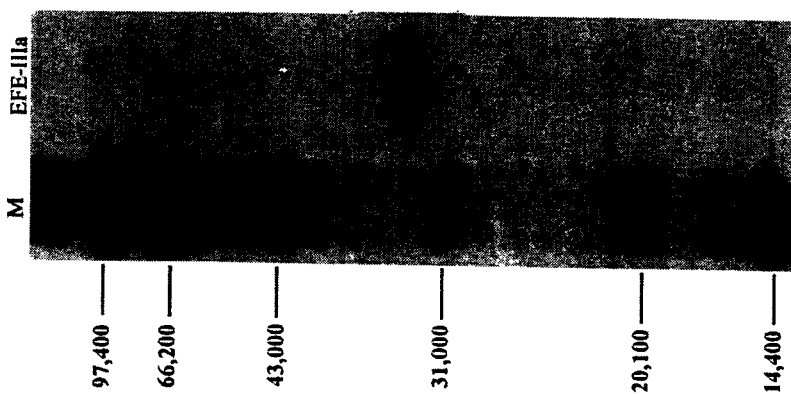
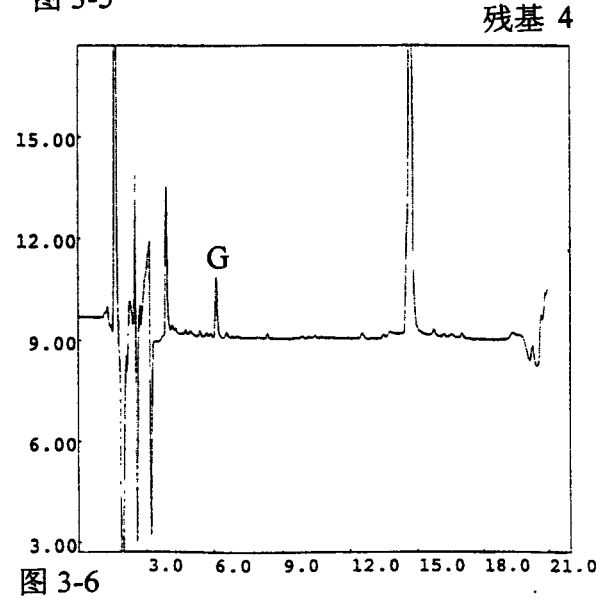
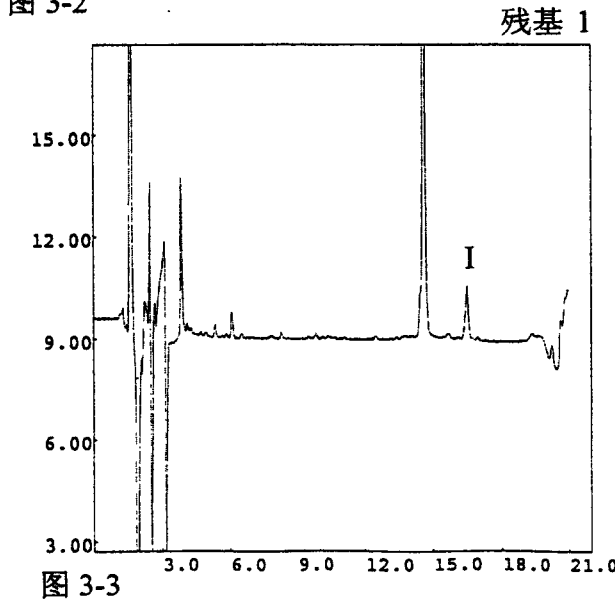
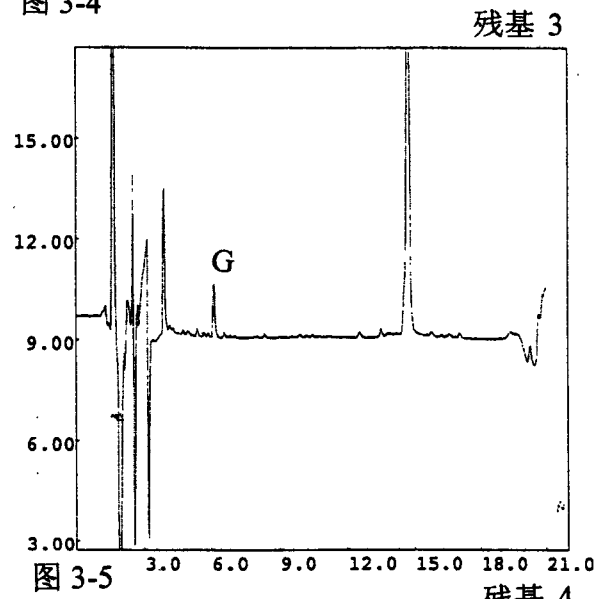
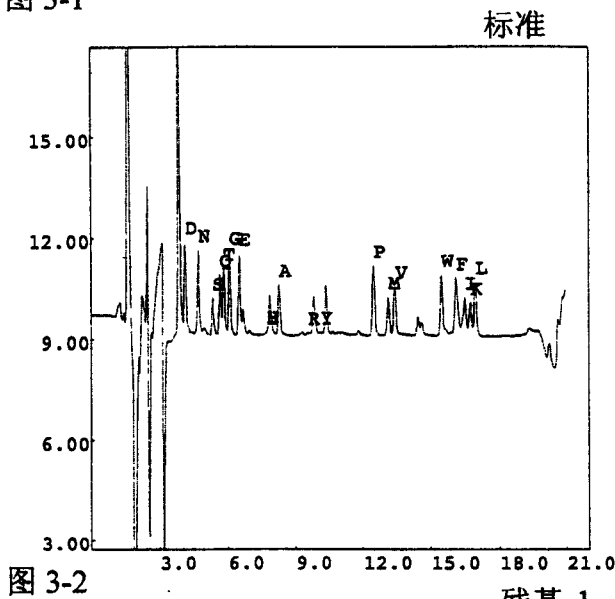
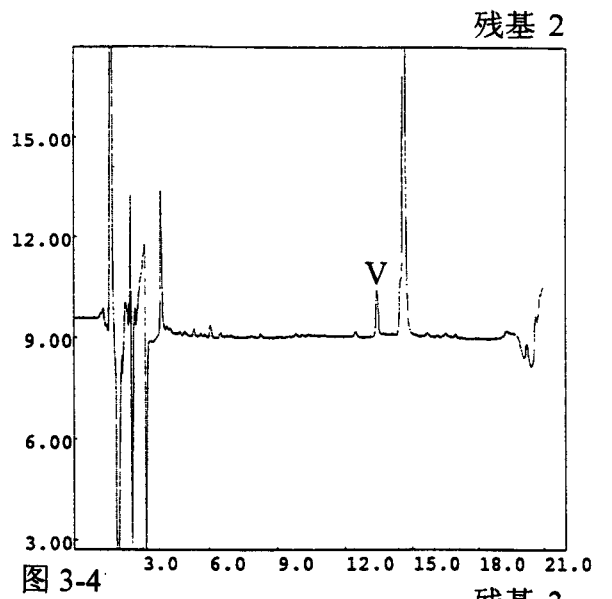
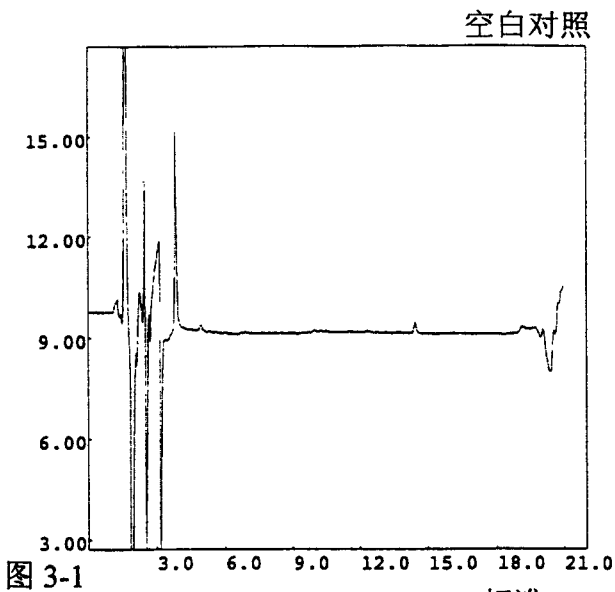


图 1



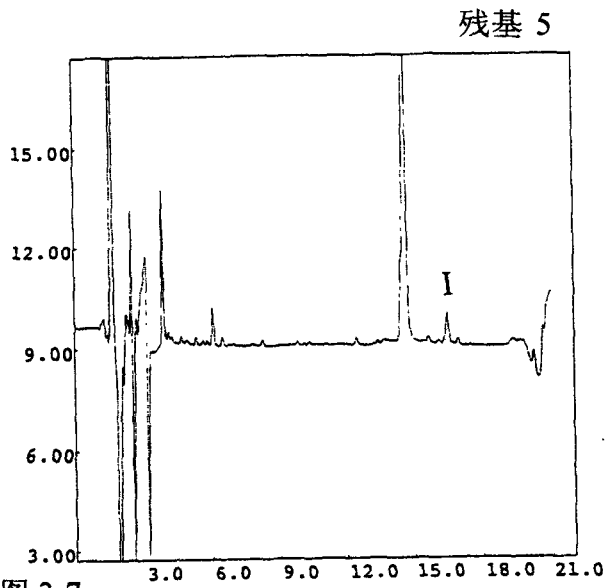


图 3-7

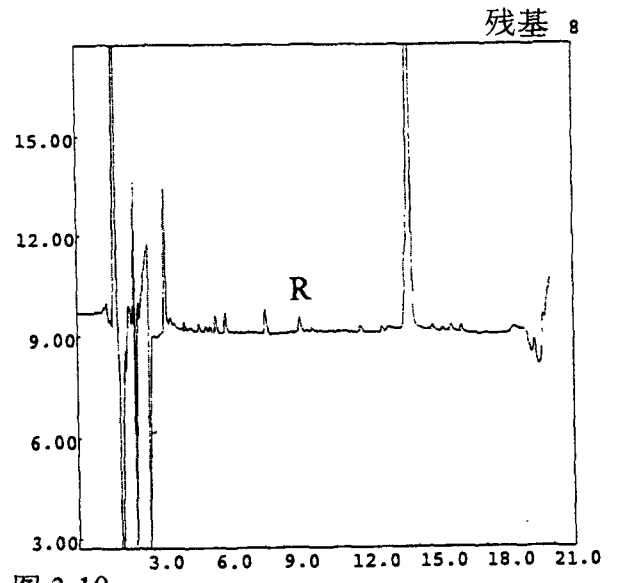


图 3-10

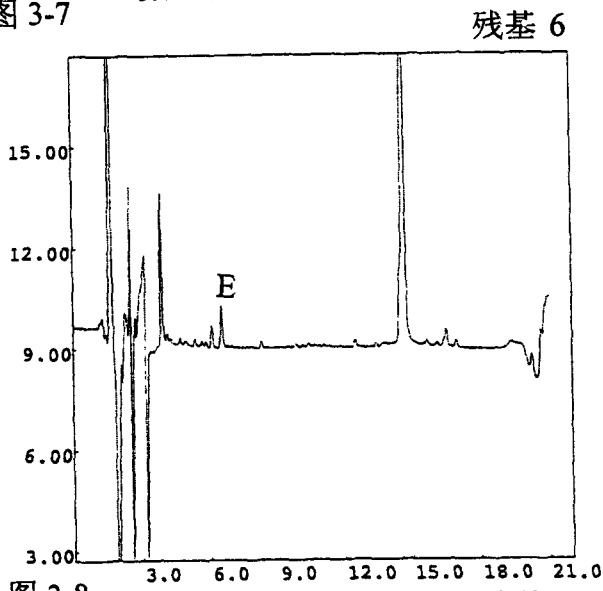


图 3-8

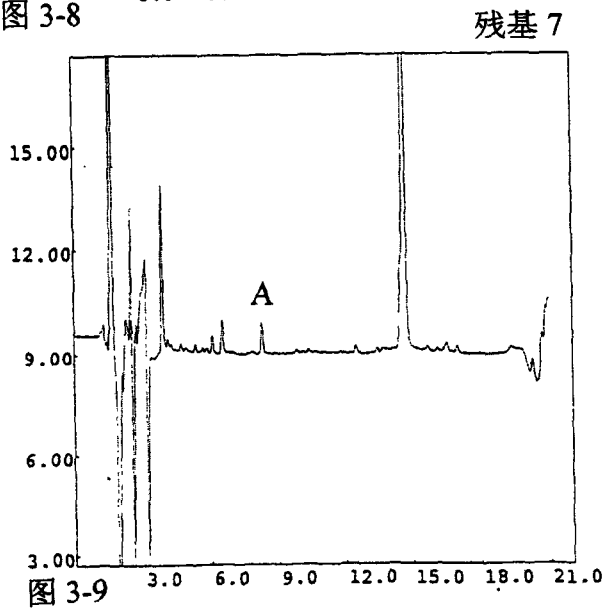


图 3-9

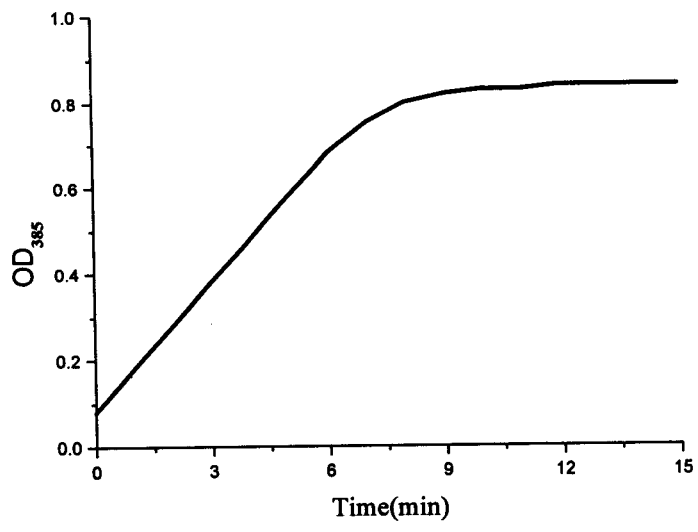


图 4