

鞘胺醇杆菌肝素酶的产生

高宁国 程秀兰* 杨敬 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 鞘胺醇杆菌 肝素酶 产生条件

中图分类号 Q591 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2003)06-0813-04

肝素类分子是一类结构异常复杂的高度硫酸化的糖胺聚糖,是临床上的一种主要的抗凝剂。除了抗凝血及其相关的抗栓活性以外,肝素还具有多种其他生物学功能,如抗平滑肌细胞及肾小球系膜细胞的增殖^[1]、抗炎症^[2]和阻止肿瘤生长及转移的作用^[3]等。因而肝素可用于防治球囊扩充血管成型术后的血管再狭窄、肾小球系膜细胞增生性肾炎、病理性炎症及肿瘤。但由于完整肝素的抗凝血活性,会引起出血及血小板减少综合症等负作用,限制了肝素在这些方面的临床应用。研究表明,肝素的抗凝血活性依赖于一种独特的肝素五糖序列,约占完整肝素链的 1/3,除了五糖序列以外,还需要附近的至少 13 糖残基,因而不含五糖序列或含五糖序列小于 18 糖的肝素其抗凝活性大大降低^[4]。而六糖以上的肝素片段就具有抗平滑肌细胞增生、抗炎症及抗肿瘤的活性,并且这些活性与抗凝活性无关。因此,可利用特异性的肝素酶降解肝素长链,产生一系列不同结构及大小的肝素片段,并从中筛选出具有不同生物活性的片段。

肝素酶是一类能降解肝素类物质的裂合酶。主要来源于肝素黄杆菌(*Flavobacterium heparinum*)。目前已经从肝素黄杆菌中分离纯化出 3 种肝素酶:肝素酶 I(E.C.4.2.2.7)、II(无 E.C. 号码)和 III(E.C. 4.2.2.8)^[5]。它们能特异性地切开肝素链上具有特定修饰的不同序列,从而产生不同的寡糖片段,分析研究这些寡糖片段将有助于了解肝素精确结构及其结构与功能之间相互关系的信息。现在,肝素酶已被用于体外循环中肝素的消除^[6]、肝素精确结构的确定^[7]、肝素抗凝机理的研究^[8]、制备低分子量肝素^[9,10]及抗肿瘤药物^[11]。另外,肝素酶本身可抑制新血管生成^[12]和血管平滑肌细胞增生^[13],因而可能成为抗肿瘤和抗血管再狭窄的潜在药物。目前商品化的肝素酶均由肝素黄杆菌生产,价格非常昂贵。我们在继从土壤中筛选得到新的肝素酶产生菌种棒杆菌(*Corynebacterium* sp.)^[14]以后,又从土壤中筛选到一株国内外均未报道的活力更高的肝素酶产生菌鞘胺醇杆菌(*Sphingobacterium* sp.),并研究了酶的产生条件和纯化及酶的性质。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

从土壤中筛选得到一株菌,经本所鉴定为鞘胺醇杆菌(*Sphingobacterium* sp.)。基础培养基:每升含 NaCl 1g、K₂HPO₄ 2.5g、MgSO₄ 0.5g、肝素 2g pH 至 6.5。

1.2 仪器和试剂

Beckman J2-21 高速冷冻离心机, Sorval 3B-plus 大容量冷冻离心机, B. Braun-Sonic 2000 型超声破碎

基金项目 国家“九五”攻关项目(96-C020308)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62550365; E-mail: qiansj@sun.im.ac.cn

作者简介 高宁国(1971-)男,安徽省安庆人,中国科学院微生物研究所 96 级博士生,现在美国。

收稿日期 2003-01-17, 修回日期: 2003-08-25

仪。天青 A ,Sigma 产品 粗品肝素为南京生化制药厂产品 精品肝素为烟台生化制药厂产品。

1.3 培养方法和肝素酶活力测定

1.3.1 培养方法 将菌种从牛肉汁斜面上接入基础培养基(50mL 培养基/500mL 三角瓶) ,30℃ 200r/min 摇床上培养 16h ,然后按 4% 的接种量接入装有 50mL 发酵培养基的 500mL 的三角瓶中 ,相同条件下培养 30h。

1.3.2 无细胞粗酶液的提取 细菌培养液 10000g 离心 10min ,用 0.02mol/L 磷酸缓冲液(pH6.8)洗涤菌体 2 次 ,按 0.2g 湿菌体/mL 缓冲液的比例加入 0.02mol/L 的磷酸缓冲液(pH6.8) ,在冰浴内以脉冲方式超声破碎细胞 10min。20000g 离心 40min ,上清液即为无细胞粗提液。

1.3.3 酶活力测定 :取 100 μ L 用 0.05mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)配制的 2% 肝素溶液 ,在 36℃ 预热 1~3min 加入 100 μ L 适当稀释的酶液 ,准确反应 1h ,加 4mL 0.05mol/L HCl 终止反应。然后 ,采用天青 A 法^[15]测定 OD₅₀₅ ,通过标准曲线计算出被降解的肝素量。以在上述条件下 ,每小时降解 1mg 肝素所需要的酶量为一个酶活力单位。

1.3.4 菌体生物量的测定

取 0.1mL 发酵液 ,加入 3.9mL 水 ,测 OD₆₀₀。

2 结果

2.1 肝素酶的最佳产生条件

2.1.1 氮源对菌体生长及产酶的影响 在基础培养基中分别加入 1% 的不同种类的氮源 ,培养 30h 后收集菌体 ,分别测菌体生物量及酶活。结果表明 ,大豆蛋白胨的效果最好(表 1)。

2.1.2 碳源对菌体生长及产酶的影响 在基础培养基中加入 1% 的大豆蛋白胨及 1% 不同种类的碳源 ,培养 30h 后收集菌体 ,测菌体生物量及酶活 ,结果表明 ,蔗糖的产酶效果最好(表 2)。

表 1 氮源对菌体生长及产酶的影响

| Nitrogen source | Biomass/ OD ₆₀₀ | Enzyme activity(U/L) |
|--------------------|----------------------------|------------------------|
| Soytone | 0.230 | 1128 |
| Casein hydrolysate | 0.181 | 870 |
| Tryptone | 0.137 | 852 |
| Casein | 0.138 | 812 |
| Beef extract | 0.113 | 788 |
| Corn steep liquor | 0.102 | 456 |
| Ammonium sulfate | 0.082 | 550 |
| Sodium nitrate | 0.025 | 432 |

表 2 碳源对菌体生长及产酶的影响

| Carbon sources | Biomass/ OD ₆₀₀ | Enzyme activity(U/L) |
|----------------|----------------------------|------------------------|
| No sugar | 0.095 | 1619 |
| Sucrose | 0.180 | 2990 |
| Xylose | 0.162 | 2669 |
| Maltose | 0.210 | 2620 |
| Lactose | 0.093 | 2579 |
| Glucose | 0.183 | 2500 |
| Galactose | 0.176 | 1876 |
| Dextran | 0.102 | 1720 |
| Citric acid | 0 | 0 |

2.1.3 氮源、碳源浓度及氮源碳源比例对产酶及菌体生长的影响 :在基础培养基中加入不同浓度的大豆蛋白胨及不同浓度的蔗糖 ,相互交叉 ,共设制 16 组 ,培养 30h 后收集菌体 ,测菌体生物量及酶活 ,结果表明 ,以大豆蛋白胨的浓度为 2% ,蔗糖浓度为 1.5% 时效果最好。

2.1.4 培养基初始 pH 对菌体生长及产酶的影响 :分别以硫酸或氢氧化钠调培养基的起始 pH ,培养 30h 后收集菌体 ,测菌体生物量及酶活 ,结果表明 ,起始 pH 为 7.5 时效果最好。

2.1.5 最适培养温度的确定 :通过温度梯度摇床试验 ,生长及产酶的最适温度是 32℃(图 1)。

2.1.6 通气量对菌体生长及产酶的影响 :在 500mL 三角瓶中分别装入不同量的培养基 ,接种后培养 30h

收集菌体 结果表明 装 50mL 培养基的效果最好。

2.1.7 种龄及接种量对产酶及菌体生长的影响 按不同接种量将不同种龄的液体种子接入发酵培养基中 培养 30h 测定结果表明 ,14 ~ 16h 的种子产酶较高 ,而接种量影响不大 2% ~ 6% 均可采用。

2.1.8 培养时间对菌体生长及产酶的影响 在最适培养基条件及 30℃ 发酵培养菌体 ,不同时间取样测定。结果表明(图 2),菌体生长及酶活在 36h 达最高。

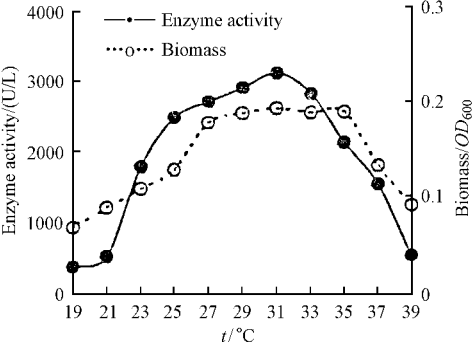


图 1 温度对菌体生长及产酶的影响

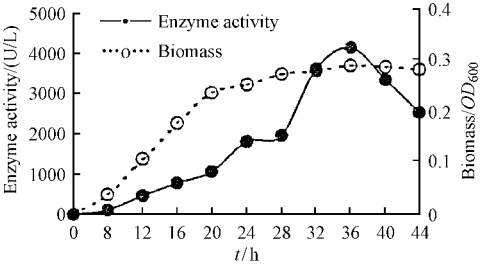


图 2 菌体生长及产酶曲线

3 讨论

筛选得到的肝素酶产生菌鞘胺醇杆菌(*Sphingobacterium* sp.) 是国内外尚未报道的新的肝素酶产生菌种 ,也是微生物分类学上未曾报道的鞘胺醇杆菌属的一个新种 ,其产酶条件与肝素黄杆菌(*Flavobacterium heparinum*)及棒杆菌(*Corynebacterium* sp.)均不同。粗酶液很不稳定 ,在 4℃ 时半衰期仅 48h ,而经 DEAE-Cellulose 和羟基磷灰石吸附及 Sephacryl S 200 柱层析部分纯化后 ,酶稳定性大大提高 ,在 4℃ 放置 3 个月酶活无明显的降低。

参 考 文 献

[1] Karnovsky J , Edelman E R. Heparin/heparan sulfate regulation of vascular smooth muscle cell behavior. *Airways and Vascular Remodelling* , 1994 , **1** :145 ~ 152.

[2] Lane D A , Lindahl U. Anti-inflammatory effects of heparin and its derivatives inhibition of complement and lymphocyte migration. In : Lane D A , *et al.* ed. *Heparin and Related Polysaccharides*. New York : Plenum Press , 1992. 329 ~ 340.

[3] Lappierre F , Holme K , Lam L , *et al.* Chemical modifications of heparin that diminish its anticoagulant but preserve its heparinase-inhibitory , angiostatic , anti-tumor and anti-metastatic properties. *Glycobiology* , 1996 , **6** (3) :355 ~ 366.

[4] Dasai U R , Petitou M , Bjork I , *et al.* Mechanism of heparin activation of antithrombin. *J Biol Chem* , 1998 , **273** (13) : 7478 ~ 7487.

[5] Lohse D L , Linhardt R J. Purification and characterization of heparin lyases from *Flavobacterium heparinum*. *J Biol Chem* , 1992 , **267** (4) :24347 ~ 24355.

[6] Langer R , Linhardt R J , Hoffberg S , *et al.* Enzymatic system for removing heparin in extracorporeal therapy. *Science* , 1982 , **217** :261 ~ 263.

[7] Ernst S , Venkataraman G , Winklar S , *et al.* Expression in *Escherichia coli* , purification and characterization of heparinase I from *Flavobacterium heparinum*. *Biochem J* , 1996 , **315** :589 ~ 597.

[8] Lindahl U. Structure of the antithrombin-binding site in heparin. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1979 , **76** :3198 ~ 3202.

[9] Barrowcliffe T W. Low molecular weight heparin :relationship between antithrombotic and anticoagulant effects. *Adv Exp Med Biol* , 1992 , **313** :205 ~ 220.

[10] Linhardt R J , Grant A , Cooney C L , *et al.* Differential anticoagulant activity of heparin fragments prepared using microbial

heparinase. *J Biol Chem*, 1982, **257**: 7310 ~ 7313.

- [11] Ototani N, Yosizawa Z. Purification of chondroitinase B and Chondroitinase C using glycosaminoglycan-bound AH-Sepharose 4B. *Carbohydr Res*, 1979, **70**: 295 ~ 306.
- [12] Sasisekharan R, Moses M A, Nugent M A, *et al.* Heparinase inhibits neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 1524 ~ 1528.
- [13] Silver P J, Moreau J P, Denholm E, *et al.* Heparinase III limits rat arterial smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol*, 1998, **351**: 79 ~ 83.
- [14] 高宁国 程秀兰 杨 敬,等. 肝素酶产生菌的筛选及发酵条件. 微生物学报, 1999, **39**(1): 64 ~ 67.
- [15] Galliher P M, Cooney C L, Langer R, *et al.* Heparinase production by *Flavobacterium heparinum*. *Appl Environ Micro*, 1981, **41**: 360 ~ 365.

Production of a Novel Heparinase From *Sphingobacterium* sp.

Gao Ningguo Cheng Xiulan* Yang Jing Zhang Shuzheng

(*Institute of Microbiology, Chinese academy of Sciences, Beijing 100080, China*)

Abstract : The novel heparinase-producing bacterial strain *Sphingobacterium* sp. was isolated and screened from soil. The optimum medium composition is (g/L) : Soytone 20, NaCl 1, K₂HPO₄ 2.5, MgSO₄ 0.5, Heparin 2, Sucrose 15, pH 7.5. The optimum temperature for growth and enzyme production was 32°C. When cultured at a rotating shaker at 30°C for 36 hours, 200r/min, 50mL medium in 500mL flask, the production of heparinase reached 4000U/L.

Key words : Heparinase, *Sphingobacterium*, Production conditions

Foundation item : The 9th Five Years Programs for Science and Technology Development of China (96-C020308)

* Corresponding author. Tel : 86-10-62550365 ; E-mail : qiansj@sun. im. ac. cn

Received date : 01-17-2003

欢迎订购《中国病毒学》

《中国病毒学》是由中国科学院武汉病毒研究所和中国微生物学会共同主办、科学出版社出版,国内外公开发行的学报级刊物。为我国生物学和医学核心期刊,被 Chemical Abstract、Biological Abstract、BIO-SIS、Life Sciences Collection、TOXLINE 和《中国生物学文摘》、《中国医学文摘》、《中国农业文摘》、《中国学术期刊光盘版》、万方数据库、中国科技引文索引(CSCI)、《中国科技论文与引文数据库》(CSTPCD)、《中文科技期刊数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库》(CMCC)等国内外数十种重要检索刊物和数据库摘引和收录。它定期反映我国病毒学的最新理论研究动态及各分支学科——人体病毒、动物病毒、昆虫病毒、植物病毒、噬菌体及亚病毒等在工、农、医、林、牧、渔诸方面的应用研究的最新成果。欢迎读者订阅。

本刊为双月刊,大 16 开 96 页,全年 6 期,双月末出版。每期定价 10 元,全年 60 元。邮发代号 38-351。请及时到当地邮局订阅。漏订读者请直接汇款至本刊编辑部,免收邮寄费。地址:湖北省武汉市武昌小洪山 中国科学院武汉病毒研究所内《中国病毒学》编辑部,邮编 430071,联系人:张静林。电话和传真 027-87199157。电子信箱 jbjb@pentium.whiov.ac.cn。