

固定化内切型肝素酶的研究

钞亚鹏 徐冠珠 程秀兰 钱世钧*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 将提纯的一种内切型肝素酶固定于聚酯载体上,固定化效率达 78.8%。酶活力在 pH 为 7.5 左右时表现最高,并且在此条件下固定化酶的稳定性最好。最适反应温度为 40℃。热稳定性试验表明,固定化酶的稳定性较差。固定化酶的使用半衰期比游离酶延长 4.4 倍。固定化酶催化肝素底物反应的 K_m 值约为 95.4 μ mol/L 而游离酶的 K_m 值约为 71.2 μ mol/L。固定化酶可以同时作用于肝素和硫酸乙酰肝素,而对硫酸软骨素没有催化能力。肝素经降解后,产生一定量的非硫酸化或低硫酸化的二糖和不同聚合度的寡糖混合物。

关键词 肝素酶,固定化肝素酶,制备,性质

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)05-0689-03

肝素酶是能够裂解肝素和硫酸乙酰肝素的一类酶,在临床和医药行业中有重要的应用。它已经被用来清除血液中的肝素,还具有抑制新生血管的生成,促进伤口愈合等多种生物学活性,而用肝素酶降解肝素产生的低分子量肝素作为药物在保持肝素的生物活性的同时,能减少肝素使用中产生的副作用,因而具有明显的优势^[1-3]。肝素酶还是用于肝素和硫酸乙酰肝素精细结构分析的重要工具^[4]。

自然界中肝素酶来源比较稀少,主要存在于肝素黄杆菌、枯草芽孢杆菌、拟杆菌、鞘氨醇杆菌等少数种属的细菌中,其中以肝素黄杆菌肝素酶研究较为广泛和深入^[5]。人们已经将肝素黄杆菌的 3 个肝素酶组分肝素酶 I、II 和 III 进行了纯化和性质研究、酶基因的克隆和表达,以及酶蛋白的改造等,对肝素酶的作用机制和生物学活性都有了一定的认识^[6-8]。但是,肝素酶依然非常珍贵,市场价格昂贵,使得对肝素酶的基础和应用研究受到了很大限制。

国外曾报道用溴化氰活化琼脂糖作为载体进行肝素酶的固定化研究,并且探讨了临床上去除血液中肝素的应用^[9,10]。国内由于对肝素酶的相关研究起步较晚,处于初级阶段^[11-13],尚未见到有关固定化的报道。本实验室筛选到一株产肝素酶的菌株,对其发酵条件、纯化及性质、底物专一性、降解肝素产生低分子量肝素的生物学活性等进行了研究,发现它有不同于已经报道的肝素酶的特性^[5]。在此基础上,本文尝试进行酶的固定化研究,取得了一些结果,这对该肝素酶的临床应用、生产低分子量肝素和降低应用成本有重要意义。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

肝素酶为本实验室自行制备,制备方法见参考文献[5],固定化载体系聚苯甲酸酯。肝素(猪肠黏膜)购自烟台生化

试剂有限公司,硫酸乙酰肝素,肝素二糖对照和硫酸软骨素系 Sigma 产品,其余试剂为国产分析纯。756MC-紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂),高效液相色谱仪 Waters 600E(Waters 公司),分析型和半制备型阴离子高效液相色谱柱(大连伊利特公司)。

1.2 肝素酶活力测定

参照文献[5]进行。将 0.1mL 适当浓度酶液的 20mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.4)和 0.1mL 2%的肝素底物混合,在 36℃ 反应一定时间后,用 1.8mL 50mmol/L 的盐酸终止反应,测定 A_{232} ,对照在保温前加入盐酸。此条件下的摩尔消光系数为 5100 cm^{-1} ^[13]。固定化酶的测定为将固定化酶悬浮于 0.1mL 20mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.4),其余步骤同上。

1.3 固定化肝素酶的制备

将经氯化活化的载体 50mg 浸没于含有 0.5IU 的肝素酶缓冲液(20mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH7.4) 4℃ 反应 18h。取出载体,用滤纸压干后,小心用上述缓冲液洗涤 3 次,用滤纸压干,待用。同时测定反应残留液中肝素酶活力进行比较固定化效果。

1.4 高效液相条件

流动相分为 A 液和 B 液。A 液为 pH3.5 的纯水;B 液为 pH3.5 的 NaCl 溶液,浓度为 2mol/L,流速为 3mL/min。梯度洗脱程序为 0~2min, A 液;2~50min, 为 A→B 0%~100% 的连续线性梯度。

1.5 固定化酶的分析

1.5.1 固定化酶的最适作用 pH 和 pH 稳定性 pH5 和 6 缓冲系统选用 NaOH-柠檬酸缓冲液, pH7.0、7.5 和 8.0 选用磷酸盐缓冲液, pH9 和 10.5 选用 NaOH-Gly 缓冲液,浓度皆为 20mmol/L。pH 稳定性试验为将一定量的固定化酶在不同 pH 条件下放置 30min,然后在 pH7.5 条件下测定酶活力。

1.5.2 固定化酶的适宜反应温度和温度稳定性 适宜反应

基金项目:国家自然科学基金(30270330);中国科学院创新工程方向项目(KSCX2-3-02-03)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-62651598; E-mail: qiansj@sun.im.ac.cn

作者简介:钞亚鹏(1974-)男,山西临县人,在职博士研究生,从事酶学和糖生物学基础和应用方面的研究。E-mail: zhaoyap@vip.sina.com

收稿日期:2004-02-17,修回日期:2004-04-27

温度的测定是在 20~60℃ 范围内,每隔 10℃ 测定固定化酶的活力,在稳定性试验中,分别将一定量的固定化酶在不同温度下放置 30min,然后在 36℃ 下测定残留酶活力。

1.5.3 固定化酶反应动力学试验 称取一定量的固定化酶,与不同浓度的肝素底物混合,于 36℃ 的水浴中保温。用 1.8mL 50 mmol/L 的稀盐酸终止反应,测定 A_{232} 值,根据底物浓度和反应速度的双倒数作图,求得酶催化的动力学常数。

1.5.4 固定化酶降解肝素产物的高效液相分析 将一定量的固定化酶置于 2mL 2% 的肝素缓冲液中,于 36℃ 的水浴中保温 24h。取反应 0h 和 24h 的反应液进行液相色谱分析。

2 结果

2.1 肝素酶的固定化

肝素酶和载体在 4℃ 作用 18h 后,酶蛋白基本都固定到载体上,固定化效率约为 78.8%,残液中剩余活力为总活力的 4% 左右。继续延长作用时间到 24h 以上,残液中的酶活力再没有明显的变化。

2.2 固定化酶的最适作用 pH 和 pH 稳定性

配制不同 pH 值的缓冲液,测定固定化肝素酶在相应酸碱度下的活力(图 1)。酶活力在 pH 7.5 左右时表现最高,6.0~9.0 的 pH 内都能保持较好的活力。将固定化酶在不同 pH 值的缓冲液中浸泡相同的时间后,适宜条件下测定酶活力(图 2)。结果表明,固定化酶在 pH 7.5 条件下稳定性最好,当 pH 低于 6.0 或高于 8.0 时,酶活力明显受到影响。

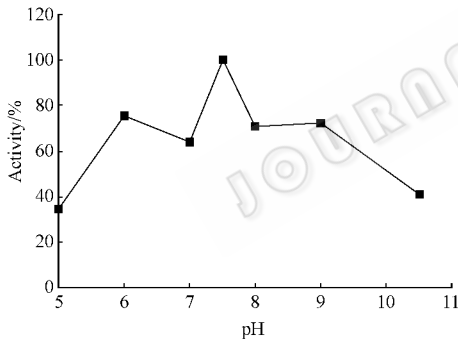


图 1 固定化肝素酶的最适作用 pH

Fig.1 Optimal pH for the immobilized heparinase

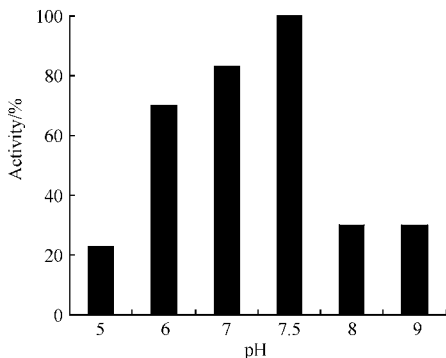


图 2 固定化酶的 pH 稳定性

Fig.2 pH stability of the immobilized enzyme

2.3 固定化酶的适宜温度和温度稳定性

分别测定不同温度下的固定化酶活力,结果表明最适反

应温度为 40℃,在 20℃ 下也能保持 60% 的活力(图 3)。热稳定性试验表明,固定化酶的稳定性较差,在 50℃ 条件下放置 30min,活力几乎完全丧失,而低于 40℃ 时酶的稳定性较好。因此,在降解肝素时,可适当降低反应温度来控制反应速度,以获得所希望的低分子量肝素产品。在 30℃ 下降解肝素的反应半衰期从游离酶的 10h 提高到 44h,延长了 4.4 倍。

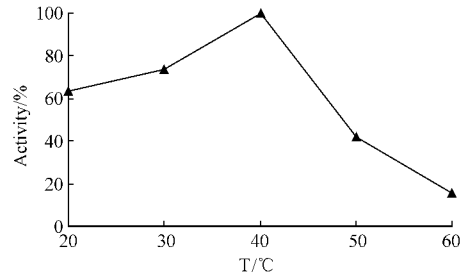


图 3 固定化肝素酶的适宜反应温度

Fig.3 Optimal temperature for the immobilized enzyme activity

2.4 固定化酶的反应动力学常数

根据试验所得反应速度,运用双倒数作图法作图(图 4)。求得固定化酶催化肝素反应的 K_m 值约为 95.4 $\mu\text{mol/L}$,而游离酶的 K_m 值约为 71.2 $\mu\text{mol/L}$ 。

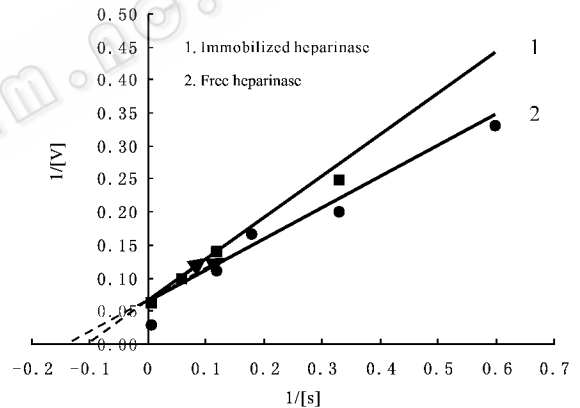


图 4 固定化酶的反应动力学常数

Fig.4 Reaction kinetic constant of immobilized heparinase

2.5 固定化肝素酶催化不同底物的特性

分别以肝素、硫酸乙酰肝素和硫酸软骨素为底物,测定固定化肝素酶的活力。结果表明,固定化酶可以同时作用于肝素和硫酸乙酰肝素,而对硫酸软骨素没有催化能力。说明肝素酶固定化后底物专一性未发生变化,有利于替代游离肝素酶进行低分子量肝素生产。

2.6 固定化酶降解肝素产物的高效液相分析

固定化酶催化肝素产生分子量不等的肝素寡糖的混合物。本实验将肝素底物与固定化酶保温一段时间后,用液相色谱分析降解产生的肝素寡糖的特点。比较标准二糖和肝素降解前后的液相图谱发现,肝素经降解后,产生一定量的二糖,但多为非硫酸化或低硫酸化的二糖,并没有大量出现肝素结构中占较大比例的三硫酸化二糖。同时,大峰的整体峰型前移,说明大多数肝素分子得到了不同程度的降解。并且,在游离酶催化的二糖降解产物中也没有大量出现三硫酸

化二糖,证明二者的催化特性是一致的。

3 讨论

固定化肝素酶不仅在临床上可以用于清除血液中的肝素,而且在医药行业中用于制备低分子量肝素,这对降低其成本有重要意义。本文用聚酯载体固定了内切型肝素酶,并对相关性质作了探讨。研究结果表明,固定化肝素酶基本上保持了游离肝素酶的理化性质和催化特性,因此有望替代游离肝素酶用于低分子量肝素的开发,有利于促进肝素酶的工业化应用。

用聚酯载体固定肝素酶的缺点是固定化酶的稳定性较差,可能由两方面的因素决定:其一是载体与酶通过离子键结合,不如共价键牢固;其二是在反复使用过程中,载体碎屑脱落较多,也影响了固定化酶的稳定性。我们曾尝试用戊二醛交联分别活化聚酯载体和三醋酸纤维载体,用来固定化肝素酶,结果表明固定化后载体上几乎没有酶活力,残液中的酶活力也大大降低,说明肝素酶对醛基敏感,不适合用戊二醛作为肝素酶固定化的交联剂。进一步试验拟尝试用环氧桥载体进行偶联试验,或者用包埋法进行固定化。

参 考 文 献

- [1] Pu L L, Holme K R, Symes J F. Heparinase enhances collateral vessel development ischemic limb. *Int Surg*, 2002, **87**(4): 260 - 268.
- [2] Reid H, Tareck O N, Allaan M L. Heparinase III exerts endothelial and cardioprotective effects in feline myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1997, **283**(3): 1032 - 1038.

- [3] Zacharski L R, Ornstein D L. Heparin and cancer. *Thromb Haemost*, 1998, **80**: 10 - 23.
- [4] Ganesh V, Zachary S, Rahul R, et al. Sequencing complex polysaccharides. *Science*, 2003, **286**(5439): 537 - 551.
- [5] Chao Y, Gao N, Cheng X, et al. Rapid purification, characterization and substrate specificity of the heparinase from a novel species of *Sphingobacterium*. *J Biochemistry (Tokyo)*, 2003, **134**: 365 - 371.
- [6] Lohse D L, Linhardt R J. Purification and characterization of heparin lyases from *Flavobacterium heparinum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, **267**(34): 24347 - 24355.
- [7] Watanabe M, Tsuda H, Yamada S, et al. Characterization of heparinase from an oral bacterium *Prevotella heparinolytica*. *J Biochem*, 1998, **123**: 283 - 288.
- [8] Kim B T, Kim W S, Kim Y S, et al. Purification and characterization of a novel heparinase from *Bacteroides stercoris* HJ-15. *J Biochem*, 2000, **128**: 323 - 328.
- [9] Bernstein H, Victor C Y, Langer R. An investigation of heparinase immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1987, **16**: 129 - 143.
- [10] Bernstein H, Victor C Y, Langer R. Distribution of heparinase covalently immobilized to agrose: Experimental and theoretical studies. *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, **30**(2): 196 - 206.
- [11] 高宁国,程秀兰,杨敬,等.肝素酶产生菌的筛选及发酵.微生物学报,1999, **39**(1): 64 - 67.
- [12] 高宁国,程秀兰,杨敬,等.鞘氨醇杆菌肝素酶的产生.微生物学报,2003, **43**(6): 813 - 816.
- [13] 罗璠,王忠彦,胡承,等.肝素酶产生菌的筛选及其粗酶性质的研究.四川大学学报(自然科学版),2002, **39**(4): 777 - 779.

Preparation and Characteristics of The Immobilized Endolytic Heparinase

CHAO Ya-Peng XU Guan-Zhu CHENG Xiu-Lan QIAN Shi-Jun*

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: A purified heparinase from the species of *Sphingobacterium* was immobilized on the polyether carrier with the recovery of 78.8%. The immobilized enzyme showed highest activity under pH 7.5, more stability around pH7.0. Its optimal temperature was 40°C, but thermostability was poor. Half life of the immobilized heparinase prolonged by 4.4 times than free heparinase. The Michaelis constant of the immobilized heparinase for heparin was 95.4 μmol/L, and that of free heparinase was 71.2 μmol/L. Heparin and heparan sulfate were both suit substrates of the enzyme. The mixture of heparin oligosaccharides degraded by immobilized heparinase contained both low sulfated disaccharides and more other oligosaccharides with different polymerization.

Key words: Heparinase, Immobilized heparinase, Preparation, Characteristics

Foundation item: Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (KSCX2-3-02-03); National Natural Science Foundation of China (30270330)

Corresponding author. Tel/Fax 86-10-62651598; E-mail: qiansj@sun.im.ac.cn

Received date: 02-17-2004