

pH 值敏感相分离特性的蛋白质酶解试剂研究

吴蓓蓓 商云岭 邬建敏*

(浙江大学化学系微分析系统研究所, 杭州 310058)

摘 要 通过 DEC/NHS 偶联反应将胰蛋白酶(Trypsin) 连接到具有 pH 值敏感性的壳聚糖(CS) 链上。Trypsin-CS 偶联物保留了 CS 的 pH 值敏感相分离特性及 Trypsin 的酶催化活性。浊度滴定实验表明, 此偶联物的临界相分离 pH 值(CPSP) 仍保持在偏中性范围内, 并且随 CS 的分子量降低而略有上升。这种偏中性的 CPSP 值有利于相分离循环过程中保持酶的催化活性。分子量为 8×10^4 的 CS 与 Trypsin 的偶联物在存放 30 d 后可保留 69% 的初始酶活性。偶联物经过 6 次循环使用后的残余活性为初始活性的 79%。Trypsin-CS 偶联物可在低于 CPSP 值的条件下对蛋白质进行均相酶解, 并在高于 CPSP 值时从催化体系中分离出来。HPLC 肽谱分析表明, Trypsin-CS 偶联物中 Trypsin 的自降解被显著抑制, 因而有效消除了 Trypsin 自降解肽段对肽谱分析的干扰。

关键词 pH 值敏感高分子; 胰蛋白酶; 偶联; 酶活性; 肽谱分析

1 引 言

pH 值敏感高分子材料或凝胶是一种能随 pH 值的变化而产生体积或形态改变的材料。这种变化是基于分子水平及大分子水平的刺激响应性, 因而具有可重现特性。通常, 具有 pH 值响应性的高分子材料中含有弱酸性或弱碱性基团。随着介质 pH 值的改变, 这些基团发生可逆的电离及去电离过程, 导致大分子链段间各种作用力的平衡状态发生变化, 引起溶胀体积变化或溶解度的改变。对于溶解-沉淀可逆的高分子而言, 通过调节环境 pH 值, 可实现溶解与沉淀状态的相互转化。利用此特性, 线型 pH 值敏感高分子可用于生物大分子的分离、酶的固定化和免疫分析的研究^[1~4]。

pH 值敏感高分子材料具有临界相分离 pH 值(Critical phase separation pH point, CPSP)。在此 pH 值附近, 高分子材料发生溶解及沉淀的两相转化。在生物分离与分析应用领域, 接近于中性的 CPSP 值是该类高分子材料的理想特性。因为大多数生物分子在偏中性条件下能保持最大的活性。壳聚糖(CS) 分子中氨基的 pK_a 值在 6.3 ~ 6.5 之间^[5], 因此, CS 是具有偏中性 CPSP 值的天然高分子材料。此外, 其丰富的氨基使生物功能分子极易被偶联到 CS 分子链上, 并使复合物同时具备 pH 值敏感的相分离特性及生物活性。利用复合物的溶解-沉淀可逆特性, 可实现均相生物催化反应、选择性识别与结合, 及异相分离^[6]。然而胰蛋白酶(Trypsin) 的最佳活性 pH 值在 7.0 ~ 8.0 之间, 天然 CS 的 CPSP 值仍无法满足要求。本研究通过 CS 的分子量控制制备 CPSP 值更接近于中性的 Trypsin-CS 偶联物, 在低于 CPSP 值下进行高效的均相酶解反应, 在高于 CPSP 值下将 Trypsin-CS 进行沉淀分离及重复使用, 消除了 Trypsin 均相催化时自身酶解产生的肽段对目标蛋白肽谱分析的干扰。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

751-GW 分光光度计(上海分析仪器厂); Agilent 1100 高效液相色谱(美国 Agilent 公司); HY-2 调速振荡器(江南仪器厂); 移液器(芬兰雷勃公司); DKS-A 型恒温水浴锅(杭州蓝天化验仪器厂)。

壳聚糖(CS, M_w 8.0×10^5 , 脱乙酰度 96%, 浙江海洋生物化学有限公司); 经 TPCK 处理的胰蛋白酶(Trypsin-TPCK, Worthington 公司); 牛血清白蛋白(BSA, 上海生物工程有限公司); 二硫苏糖醇

2010-04-11 收稿; 2010-06-27 接受

本文系国家转基因重大专项(No. 2009ZX08011-014B) 资助

* E-mail: wjm-stl@zju.edu.cn

(DTT, 上海生物工程有限公司); *m*-苯甲酰-*D*, *L*-精氨酸对硝基苯胺盐酸盐(BAPNA, Sigma-Aldrich 公司); 三羟甲基甲胺(Tris); 2-(*N*-吗啉)乙磺酸(MES); 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC); *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)为生化试剂。三氟乙酸(TFA, 化学纯); 乙腈(CAN, 色谱纯); 实验用水为去离子水。

2.2 实验方法

2.2.1 不同分子量 CS 的制备方法^[7] 将 5 g CS 溶解在 150 mL 3% 醋酸溶液中, 逐滴加入 50 mL 6% H_2O_2 溶液, 在 40 °C 水浴降解。每隔数小时, 取适量溶液, 用 10 mol/L NaOH 沉淀, 以水洗至中性后, 用乙醇冲洗, 真空干燥备用。不同降解时间的 CS 在 0.1 mol/L 乙酸和 0.2 mol/L NaCl 溶液中于 25 °C 下测定特性粘度数(η), 按下式计算 CS 的粘均分子量(M_η):

$$\eta = 0.00181 M_\eta^{0.93}$$

2.2.2 Trypsin-CS 偶联物的制备方法 将 10 mg CS 溶解于 5 mL 0.1 mol/L MES 缓冲液(pH = 5.50)中, 加入 1 mL 5 g/L EDC, 1 mL 10 g/L NHS 及 3 mL 2 g/L Trypsin (比活力为 2500 U/mg) -MES 溶液, 在 5 ~ 15 °C 条件下反应 2 h。将溶液调至碱性, 离心沉淀物, 用 PBS 洗涤, 除去未偶联的 Trypsin。将得到的固体分散在 0.01 mol/L Tris(含 150 mmol/L NaCl, 0.1% NaN_3 , 0.2% BSA, pH 8.2) 室温反应 2 h, 封闭剩余的活性位点。反应完毕后, 用 PBS 充分洗涤, 除去多余的 BSA 后, 得到 Trypsin-CS 偶联物。

2.2.3 CPSP 值的测定 采用紫外分光光度计测定 CS 及 Trypsin-CS 体系在不同 pH 值下的浊度变化, 将 10 mg CS 或 Trypsin-CS 溶解于 5 mL 0.1 mol/L HAc 溶液中, 调至 pH 4.0, 逐滴加入 0.1 mol/L NaOH, 在 pH 4.0 ~ 10.0 之间, 每隔 0.5 个 pH 单位取样, 在 543.5 nm 下测定不同 pH 值下的浊度变化, 以浊度对 pH 值作图, 浊度突变的 pH 值即 CPSP 值。滴加 3% 醋酸至沉淀中, 将溶液缓慢调至酸性, 按上述方法重复测定 3 次。

2.2.4 Trypsin-CS 偶联物对 BAPNA 底物的催化活性测定 依据文献[8]测定 Trypsin 的活性, 在 25 °C 下, 以 BAPNA 为底物进行测定。用 1 mL DMSO 溶解 33 mg BAPNA, 即得 BAPNA 底物溶液。在 410 nm 下, 每分钟 0.001 个单位吸光度的增加值即定义为一个活性单位(IU)。将适量 Trypsin 或 Trypsin-CS 溶于 50 mmol/L MES 缓冲液(pH 6.2, 含 10 mmol/L $CaCl_2$) 使其终体积为 3.0 mL, 加入 15 μ L 底物溶液, 充分混匀, 在 410 nm 下, 用紫外分光光度计测定吸光度随时间的变化值。

2.2.5 Trypsin-CS 的稳定性实验 将 10 mg Trypsin-CS 溶于 5 mL MES 缓冲液(pH = 6.2)中, 在室温下放置, 记录 30 d 后酶活性的变化。以自由态 Trypsin 作对照, 观察 Trypsin-CS 偶联物中酶的稳定性。

2.2.6 Trypsin-CS 在两相循环过程中的稳定性变化 在测定 Trypsin-CS 对 BAPNA 的催化活性后, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液调至 pH 8.0, 此时 Trypsin-CS 沉淀, 5000 r/min 离心, 洗涤, 再用 MES 缓冲液(pH 6.2)溶解, 重复测定酶活性。按上述方法循环数次, 分别记录每个循环的酶活性。

2.2.7 Trypsin-CS 对 BSA 的酶解及产物的 HPLC 分析^[9] 将 10 mg Trypsin-CS 溶于 5 mL MES 缓冲液(pH 6.2)中, 取样 500 μ L 置于聚乙烯离心管中, 加入 170 μ L 0.1 mol/L NH_4HCO_3 , 10 μ L DTT 和 20 μ L 100 g/L BSA 溶液, 混匀后置于 37 °C 下进行酶解反应。一定时间后加入 0.1 mol/L NaOH 终止消解反应, 并将 Trypsin-CS 沉淀。过滤后, 用 HPLC 检测酶解产物。以乙腈和 0.1% 三氟乙酸为流动相, Hypersil C_8 蛋白质分析柱(20 cm $\times$ 4.6 cm, 5 μ m) 为固定相, 分离水解所得的肽段溶液。流速为 1.0 mL/min, 乙腈在 0 ~ 30 min 变化为 5% ~ 70%, 对肽段进行梯度洗脱, 检测波长为 210 nm。

2.2.8 Trypsin 自消解产物的 HPLC 分析 分别将 5 mg Trypsin 及 10 mg Trypsin-CS 溶于 5 mL MES 缓冲液(pH 6.2)中, 取样 500 μ L 置于聚乙烯离心管中, 加入 170 μ L 0.1 mol/L NH_4HCO_3 和 10 μ L DTT。混匀后置于 37 °C 下进行酶的自消解反应。按上述同样的 HPLC 分析条件测定自消解产生的肽段。

3 结果与讨论

3.1 Trypsin-CS 偶联物的制备

EDC/NHS 体系常采用蛋白质偶联, EDC 可活化 Trypsin 分子中的 $-COOH$, 与 NHS 生成较稳定的中间产物, 此中间产物可与 CS 中的氨基反应, 生成 Trypsin-CS 偶联物。此偶联反应过程如图解 1 所示。

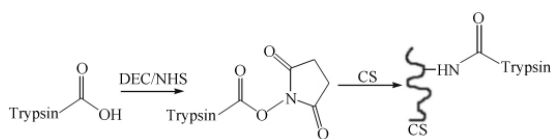
当固定 EDC/NHS 的用量及活化时间后,可以通过反应体系中的 CS 与 Trypsin 的比例控制 CS 链中的氨基与 Trypsin 的偶联率。实验表明,随着 Trypsin 在反应体系中的比例增加,单位质量的偶联物酶活性增大,CS 中有更多的氨基糖单元与 Trypsin 偶联。酶活性测定结果表明,在上述实验条件下,获得的 Trypsin-CS 偶联物中 Trypsin 的总活力为 8500 U。反应体系中共投加 15000 U Trypsin,因此约有 56.7% Trypsin 与 CS 偶联。将 Trypsin-CS 沉淀后,测定上清液的酶活力发现,占初始总活力 25% 的酶残存于溶液中。两者总活力之和小于初始总活力,说明在 EDC/NHS 偶联反应过程中部分酶失活,也可能是由于 Trypsin 与 CS 偶联后,活性位点受到空间位阻,而导致酶活性的降低。偶联物中酶活力的存在,直接证明了 Trypsin 与 CS 发生偶联。

3.2 CS 分子量对偶联物 CPSP 值的影响

pH 值敏感高分子在处于 CPSP 值时发生溶解与沉淀的两种状态的转化。对于 CS 及其衍生物而言,当 $\text{pH} < \text{CPSP}$ 时,CS 链中的氨基质子化产生静电排斥作用,而使 CS 或其偶联物溶解;当 $\text{pH} > \text{CPSP}$ 时,静电排斥作用消失,糖链之间的氢键及骨架间的疏水作用使高分子链团聚而发生沉淀,当 CS 偶联生物分子后,pH 值敏感的相分离特性仍然能保留。用于生物催化和生物分离的高分子材料,其 CPSP 越接近中性越好。如果 CPSP 远离中性值,在相分离过程中有可能导致生物分子失活。实验发现,CS 的分子量对偶联物的 CPSP 值有一定的影响。图 1 表明,随 CS 的分子量的增加,CPSP 值趋向酸性;而 CS 分子量降低时,CPSP 值向中性接近。由此可见,采用较低分子量的 CS 较为有利。但分子量过低时,CS 不再具有相分离特性,既在所有 pH 值下均呈溶解状态。本研究选用分子量为 8×10^4 的 CS,其 CPSP 值为 6.36。在 $\text{pH} < 6.36$ 时,CS 为溶解状态; $\text{pH} > 6.36$ 时,则为聚沉状态。实验表明,当 CS 与 Trypsin 偶联后,偶联物的 CPSP 值未发生明显变化。

3.3 Trypsin-CS 偶联物在多次相分离过程中的活性回收率

由于 Trypsin 与分子量为 8×10^4 的 CS 的偶联物仍具备 pH 值敏感特性,因此可通过调节溶液体系的 pH 值实现均相酶催化,并通过相分离将 Trypsin-CS 偶联物回收重复使用。在循环使用过程中,酶活性的变化程度是评价该类偶联物性能的重要指标。实验中,将初始酶活性设定为 100%,经过各次相分离循环后,将所测得的偶联物的酶活性与初始活性比较,既可得到各次循环的酶活性回收率,结果如图 2 所示。在 6 次循环过程中,酶的活性回收率总体呈降低趋势,但降低幅度不大。经过第 6 次相分离循环后,残余酶活性仍达 79%,说明相分离循环过程中的环境改变对酶的活性变化影响较小。这可能是由于所制备的 Trypsin-CS 偶联物的 CPSP 在接近于中性条件(在 $\text{pH} 6.0 \sim 7.0$ 之间循环变化)下,实现偶联物的相分离循环过程,在此 pH 范围内,不至于引起 Trypsin 的构象发生较大变化,有利于酶活性的保留。文献[10]报道,漆酶(Laccase)与 CS 偶联物在经过多次相分离循环后也能保持较高的活性回收率。



图解 1 Trypsin 与 CS 偶联反应示意图

Scheme 1 Diagram of conjugate reaction between trypsin and chitosan (CS)

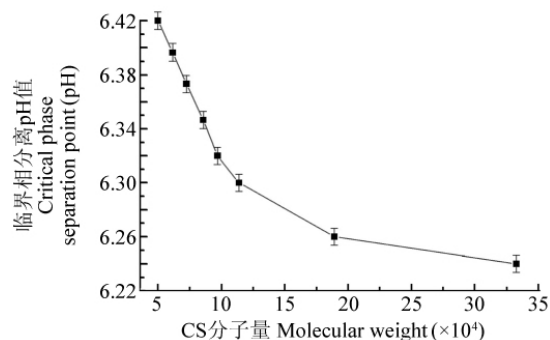


图 1 CS 分子量对 Trypsin-CS 偶联物 CPSP 值的影响

Fig. 1 Effect of chitosan molecular weight on the critical phase transitional pH (CPSP)

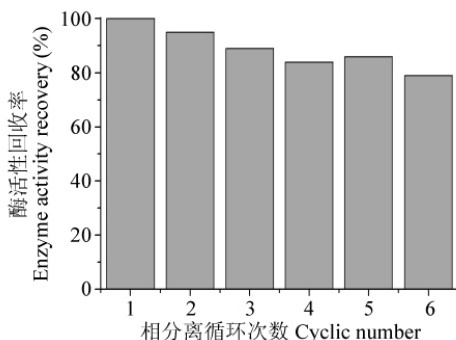


图 2 多次相分离循环过程中的酶活性回收率变化

Fig. 2 Recovery of residual enzyme activity during phase transitional cycles

少量活性的损失可能是由于偶联物相分离过程中质量回收率也有一定程度的降低。此外,游离态 Trypsin 通常在 pH 7.0~8.0 的范围内保持最佳催化活性。本研究发现, Trypsin-CS 偶联物在 pH 6.2 条件下也能保持较高的催化活性。随 pH 值的降低,此偶联物的生物催化活性有所降低,但其活性对 pH 值敏感性明显低于游离态 Trypsin。这可能是由于偶联物中的 Trypsin 被高分子链缠绕,增加了其构象的稳定性。

3.4 Trypsin-CS 偶联物的活性稳定性

研究表明, Trypsin 溶液在保存过程中酶活性降低程度较大,在室温存放 30 d 后,残余酶活性仅约为初始活性的 5%^[7]。Trypsin 的自降解是引起存放过程中活性损失的主要原因,这是因为自由态的酶分子之间极易相互碰撞而产生催化降解作用。实验表明, Trypsin-CS 偶联物在经过 30 d 存放后仍能保存 69% 的初始酶活性,与固定化 Trypsin 的活性稳定性相似^[7]。尽管 Trypsin-CS 在保存时仍以溶液状态存在,但偶联于 CS 链上的 Trypsin 分子自由度较小,相互之间进行催化降解的能力显著降低。

3.5 Trypsin-CS 偶联物与自由态 Trypsin 对 BSA 的酶解及自身酶解程度比较

Trypsin 是蛋白质肽谱分析中的常用酶解试剂。采用自由态 Trypsin 对蛋白质进行酶解时, Trypsin 本身的自降解产生的肽段极有可能对肽指纹图谱(Peptide fingerprint mapping) 的分析产生干扰。采用固定化酶对蛋白质进行降解可有效避免此问题。但在试样量较小的情况下,固定化酶的固相基质对微量蛋白的吸附会大大降低肽谱分析的灵敏度。采用 Trypsin-CS 偶联物在均相条件下对目标蛋白进行降解,既可提高酶解效率,又可显著降低 Trypsin 的自降解程度。文献[11]的研究表明,CS 对蛋白质的非特异性吸附较小,因而相分离后的偶联物对降解产物的吸附应低于常用的固定化酶基质。图 3a 为自由态 Trypsin 与 BSA 在 37℃ 下恒温 2 h 后降解产物的 HPLC 图。由于试样中除了 BSA 降解的肽段外,还存在 Trypsin 及其自降解产物,这些物质的存在对 BSA 肽段的 HPLC 分离产生了干扰。图 3a 的插图为 Trypsin 自降解 24 h 后的 HPLC 图,进一步证明了自降解肽段的存在。图 3b 表明,以 Trypsin-CS 偶联物作为酶解试剂时,BSA 降解产物的 HPLC 色谱峰之间有更好的分辨率,这是由于 HPLC 试样中 Trypsin-CS 已经被相分离而去除,而且自降解几乎被抑制(图 3b 插图)。由此可见,具有 pH 值敏感相分离特性的 Trypsin-CS 偶联物可有效避免 Trypsin 及其自身降解产物对蛋白质肽谱分析的干扰。

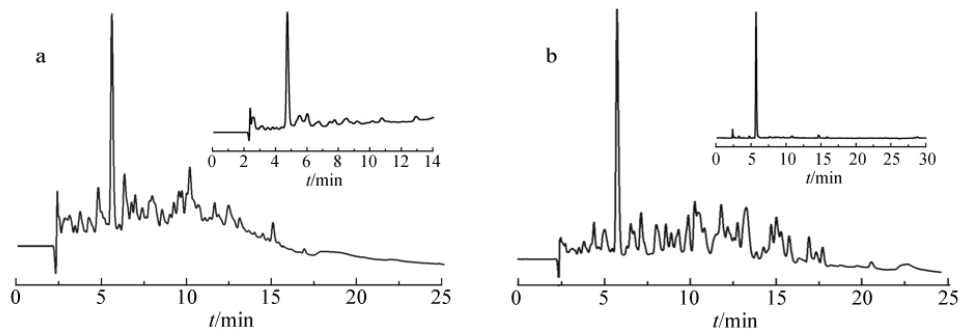


图3 BSA 经 Trypsin(a) 及 Trypsin-CS(b) 酶解后的 HPLC 肽谱以及 Trypsin 自降解肽段的液相色谱图

Fig.3 HPLC peptide map of bovine serum albumin(BSA) digested by trypsin(a) and Trypsin-CS(b) Conjugant, the inset is the self-digestive peptide fragment of trypsin

a. BSA 被 Trypsin 水解 2 h 的肽谱,插图为自降解产物肽谱(Peptide map of BSA digested by free trypsin for 2 h, peptide map of self-digestive product is shown on the inset); b. BSA 被 Trypsin-CS 水解 2 h 的肽谱,插图为自降解产物肽谱(Peptide map of BSA digested by trypsin-CS for 2 h)。

4 结 论

Trypsin-CS 偶联物同时具备了酶催化活性和 pH 值敏感的相分离特性,使之兼具均相酶催化的高效特性及固定化酶的高稳定性及重复使用性。作为蛋白质降解试剂可有效避免酶自身降解产物对蛋白质肽谱分析的干扰。此高分子酶解试剂有望用于微通道内壁的蛋白酶修饰,制备高效酶解微反应器。

References

- 1 Chen J , Hoffman A. *Biomaterials* , **1990** , 11(9) : 631 ~ 634
- 2 Sharma S , Kaur , P , Jain , A , Rajeswari M , Gupta M. *Biomacromolecules* , **2003** , 4(2) : 330 ~ 336
- 3 Monji N , Hoffman A , Priest J , Houghton R. *US Patent* , US 4 , 780 , 409
- 4 Alarcon C , Pennadam S , Alexander C. *Chem. Soc. Rev.* , **2005** , 34(3) : 276 ~ 285
- 5 Shahidi F , Arachchi K , Jeon Y. *Trends in Food Sci. Tech.* , **1999** , 10(2) : 37 ~ 40
- 6 Hoffman A , Stayton P. *Prog. Polym. Sci.* , **2007** , 32(8-9) : 922 ~ 932
- 7 ZHAO Jia-Yin , WU Jian-Min(赵佳胤 , 邬建敏) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2006** , 34(11) : 1555 ~ 1559
- 8 Xi F , Wu J , Jia Z , Lin X. *Process Biochemistry* , **2005** , 40(8) : 2833 ~ 2840
- 9 LUAN Ming-Ming , WU Jian-Min(栾明明 , 邬建敏) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2006** , 34(12) : 1707 ~ 1710
- 10 Rafael V , Raunel T , Paul D , Timmie L , Payne G. *Bioconjugate Chem.* , 2001 , 12(2) : 301 ~ 306
- 11 Xi F , Wu J. *J. Chromatogr. A* , **2004** , 1057(1-2) : 41 ~ 47

pH Sensitive Phase Transition and Enzyme Activity of Trypsin-Chitosan Conjugant

WU Bei-Bei , SHANG Yun-Ling , WU Jian-Min*

(*Institute of Microanalytical System , Department of Chemistry , Zhejiang University , Hangzhou 310027*)

Abstract Trypsin-chitosan conjugant was prepared by coupling trypsin with chitosan (CS) through the method of 1-(3-dimethylaminopropyl) -3-ethylcarbodiimide/*N*-hydroxysuccinamide (EDC/NHS) coupling reactions. The resulting conjugant had borne both characteristics of pH-sensitive phase transitional behavior and enzyme catalytic activity. The critical phase transitional pH point (CPSP) of the conjugant was determined by turbid titration method. The results show that CPSP value increase with the decrease of chitosan molecular weight. The CPSP value of CS and its trypsin conjugant could reach 6.36 when the chitosan with molecular weight of 8×10^4 was used. The near neutral CPSP is in favor of stabilizing the enzyme activity during the cyclic procedure of phase transition. Trypsin-CS conjugant could preserve 69% of initial enzyme activity after 30 days storage , and 79% of enzyme activity was observed after 6 cyclic phase transitional procedure. Trypsin-CS conjugant could catalyze the degradation of BSA in homogeneous phase when the pH of solution is slightly less than CPSP value. The conjugant could be recovered by precipitating it from solution when the pH is higher than CPSP value. HPLC results demonstrated that the self degradation of trypsin was significantly inhibited and the interference from the self-degraded peptide could be eliminated in the peptide fragment mapping.

Keywords pH sensitive polymers; Trypsin; Conjugation; Enzyme activity; peptide fragment mapping

(Received 11 April 2010; accepted 27 June 2010)