

大孔树脂纯化豆豉溶栓酶的工艺优选

王鹏娇¹, 孟小夏¹, 张敏¹, 蒋建民², 高秀丽^{1*}

(1. 贵阳医学院, 贵阳 550004; 2. 贵州秀生堂医药生物有限公司, 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 优选豆豉溶栓酶的大孔树脂纯化工艺。方法: 以湿比吸附量为指标筛选大孔树脂型号; 以豆豉溶栓酶比活性为指标, 采用单因素试验考察吸附性能(上样体积、吸附时间)和洗脱性能(洗脱剂种类、洗脱剂 pH、洗脱速度、洗脱剂体积), 利用 SDS-PAGE 电泳对纯化效果进行分析。结果: HPD-400 型大孔树脂对豆豉溶栓酶具有很好的吸附作用, 优选的工艺条件为上样量 2 BV, 吸附时间 2 h, 加水 2 BV 洗去杂质, 加 pH 8.0 的 Tris-HCl-30% 乙醇缓冲液 4 BV 以 2 BV·h⁻¹ 流速洗脱; 豆豉溶栓酶比活性 2 254.29 IU·mg⁻¹, 纯化数 44.17 倍, 发酵液 20 mL 平均可得到蛋白质 2.86 mg, 电泳检测显示豆豉溶栓酶呈现单一条带, 相对分子质量 28 kD。结论: HPD-400 型大孔树脂可用于豆豉溶栓酶的分离纯化, 优选的工艺条件稳定可行。

[关键词] 大孔树脂; 豆豉溶栓酶; 纯化工艺; 湿比吸附量; 比活性

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0030-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110030

Optimization of Purification Technology of Lobster Sauce Streptokinase by Macroporous Resin

WANG Peng-jiao¹, MENG Xiao-xia¹, ZHANG Min¹, JIANG Jian-min², GAO Xiu-li^{1*}

[收稿日期] 20131228(001)

[基金项目] 贵州省科学技术厅项目[黔科合 LG 字(2011)020 号]; 贵阳市科技局计划项目(筑科合同[2013204]4-2 号)

[第一作者] 王鹏娇, 硕士, 讲师, 从事新药研发及体内药物分析研究, Tel: 18985419011, E-mail: 25209728@qq.com

[通讯作者] * 高秀丽, 硕士, 教授, 从事中药药效物质基础及质量研究, Tel: 0851-6908783, E-mail: xiuligao@hotmail.com

芥子碱硫氰酸盐、迷迭香酸提取量作为三子方醇提取物的评价指标, 同时结合豚鼠组胺引喘药效试验, 使优选的提取工艺更为合理。

传统中药的提取常采用水煎煮法以保持复方的组成结构, 发挥多成分的协同作用, 但存在有效成分提取率低、服药量大等缺点; 而盲目使用乙醇等有机溶剂提取则可能破坏中药复方的组成结构^[11]。本文通过豚鼠组胺引喘药效试验初步确定乙醇提取法有利于三子方的药效发挥, 结合药效学指标辅助化学指标优化的提取工艺既可保证有效成分的提取率, 又可保证中药复方的整体药效。

[参考文献]

[1] 潘洪平, 潘毓宁. 三子养亲汤的研究进展[J]. 中成药, 1995, 17(10): 42.
[2] 沈顺琴. 三子养亲汤止咳、祛痰疗效观察[J]. 中药通报, 1986, 11(8): 56.
[3] 何安健. 自拟“二三方”治疗小儿急性支气管炎 88 例[J]. 上海中医药杂志, 1991, 10(1): 22.
[4] 梁文波, 赵红, 孙学梅, 等. 三子养亲汤镇咳、祛痰、平

喘作用的药理研究[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(2): 11.

[5] 郑林, 黄勇, 兰燕宇, 等. 化学指标结合药效学指标优选紫金透骨喷雾剂提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 26.
[6] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理试验方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 165.
[7] 赵红, 张志强, 李洋, 等. 三子养亲汤的化学成分研究[J]. 中医学报, 2003, 31(2): 15.
[8] 王辉, 苑艳霞, 邱琳, 等. 芥子碱平喘作用及其机制[J]. 中草药, 2011, 42(1): 134.
[9] 吴建章, 郁建平, 赵东亮. 迷迭香酸的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(3): 383.
[10] Sanbongi C, Takano H, Osakabe N, et al. Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model[J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34(6): 971.
[11] 贾晓斌, 黄洋, 陈斌, 等. 药效学结合正交试验优选通脉颗粒抗心肌缺血成分的提取工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(2): 154.

[责任编辑 刘德文]

(1. Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China;

2. Guizhou Xiushengtang Medical Biological Co. Ltd, Guiyang 550004, China)

[Abstract] Objective: To optimize purification technology of lobster sauce streptokinase by macroporous resin. **Method:** Type of macroporous resin was screened by taking moisture adsorption as index; With specific activity of lobster sauce streptokinase as index, single factor tests were adopted to optimize purification process parameters, such as adsorption performance (loading quantity of sample, adsorption time) and elution performance (species, pH and volume of eluent, elution rate), purification effect was analyzed by SDS-PAGE electrophoresis. **Result:** HPD-400 macroporous resin had a good adsorbability to lobster sauce streptokinase, optimum purification conditions were as follows: sample volume of 2 BV, adsorption time of 2 h, removed impurities with 2 BV of water, eluted with 4 BV of Tris HCl-30% ethanol buffer (pH 8.0) with adsorption speed of $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$; under these conditions, specific activity of lobster sauce streptokinase was $2\,254.29 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, purification multiple was 44.17 times, we could receive 2.86 mg of protein in 20 mL of fermentation liquor, lobster sauce streptokinase showed a single strip in electrophoretogram whose relative molecular weight was 28 kDa. **Conclusion:** HPD-400 macroporous resin could be adopted to purify lobster sauce streptokinase, this optimized purification technology was stable and feasible.

[Key words] macroporous resin; lobster sauce streptokinase; purification technology; moisture adsorption capacity; specific activity

豆豉溶栓酶是从发酵食品豆豉中分离的一种具有很强溶解血栓活性的蛋白酶,类似于纳豆激酶。该酶属于食源性药物,与临床应用的链激酶、尿激酶、组织型纤溶酶原激活剂等溶栓药物相比,具有血栓溶解力强、安全性好、易吸收、药效持久、造价低廉等优点^[1]。豆豉溶栓酶的纯化常采用沉淀、盐析、离心、过滤、离子交换色谱、凝胶层析等方法^[2],这些方法往往须交叉使用,选择性低、纯化效率不高且步骤繁琐^[3-4]。本实验采用大孔树脂直接从豆豉发酵液中分离纯化豆豉溶栓酶^[5],通过单因素试验优选吸附-洗脱条件,为豆豉溶栓酶的开发应用和工业化生产提供参考。

1 材料

DYY-6C型蛋白质电泳仪(北京六一仪器厂),24D型垂直电泳槽(北京百晶生物技术有限公司),冷冻干燥系统(丹麦Heto-Holten),AB104-N型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。考马斯亮蓝试剂盒(赛兰博生化试剂公司),D101,HPD400,ADS-17,AB-8型大孔树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司),蛋白质相对分子质量对照品(14.4~97.6 kDa,北京法特捷生物技术发展中心),发酵液(自制),水为蒸馏水,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 蛋白质含量测定^[6] 采用考马斯亮蓝染色法。按表1配制检测和标准溶液,混匀后静置

10 min,于595 nm处检测空白管、标准蛋白溶液管、测定管的吸光度(A),用水调零,按 $C_{\text{蛋白质}} = (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) / (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times C_{\text{标准蛋白溶液}}$ 计算蛋白质含量。

表1 蛋白质含量测定的溶液配制 mL

| 溶液 | 水 | 标准液 ($0.563 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) | 样品 | 考马斯亮蓝 显色剂 |
|-----|------|--|------|--------------|
| 空白管 | 0.05 | - | - | 3 |
| 标准管 | - | 0.05 | - | 3 |
| 测定管 | - | - | 0.05 | 3 |

2.2 SDS-PAGE电泳 采用分离胶浓度12%,浓缩胶浓度5%的SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色法显示蓝色蛋白条带,该方法已发表^[7]。

2.3 酶活性测定

2.3.1 溶液配制 用无菌生理盐水配成 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的牛血纤维蛋白原溶液于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存;加无菌生理盐水配成 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的凝血酶溶液于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

2.3.2 对照品溶液的制备 取尿激酶适量,加无菌生理盐水配成 1 000,3 000,5 000,7 000,9 000 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 共 5 个稀释度,备用。

2.3.3 供试品溶液的制备

2.3.3.1 发酵液 取发酵液,于 $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清,即得。

2.3.3.2 酶 称取酶约 4 mg,加水 1 mL,于 12 000

$r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 即得。

2.3.4 样品测定 采用纤维蛋白平板法。取琼脂粉 300 mg, 加入无菌生理盐水 16 mL, 煮沸使之溶胀, 置 55 °C 温箱平衡, 加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 纤维蛋白原 4 mL 和 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 凝血酶 20 μL , 缓慢摇匀避免产生气泡, 倒入预先装好的模具中, 垂直放置使充分凝固, 于 4 °C 放置至少 30 min, 待用。在平板上打直径 2 mm 的小孔, 分别将对照品溶液与供试品溶液分别加入孔内, 于 37 °C 湿盒水平放置 12 h, 用游标卡尺纵向和横向量取溶圈直径 ($n = 2$)。以标准溶液的生物学活性相应溶圈面积的对数进行直线回归, 计算供试品溶液的生物学活性。

比活性 = 酶活/蛋白质量

2.4 大孔树脂型的预处理 在预试验基础上, 取大孔吸附树脂湿法装柱, 加 70% 碱性乙醇溶液 (含 5% 氢氧化钠) 2 BV 浸泡 2 h, 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱, 加乙醇 4 BV 以 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱, 用水洗至中性且无醇味, 备用。

2.5 大孔树脂型号的筛选 称取已处理好的 D101, HPD400, ADS-17, AB-8 型大孔树脂各 10 g, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入发酵液 30 mL, 置于摇床上震荡吸附 2 h, 滤过, 滤液按 2.1 测定蛋白质质量浓度, 计算湿比吸附量, 结果见表 2, 故选择 HPD400 型大孔树脂。

表 2 不同型号大孔树脂对豆豉溶栓酶吸附量的影响

| 型号 | 树脂湿重/g | 吸附量/mg | 湿比吸附量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ |
|--------|--------|--------|--|
| D101 | 10 | 8.91 | 0.791 |
| HPD400 | 10 | 9.09 | 0.909 |
| ADS-17 | 10 | 5.73 | 0.573 |
| AB-8 | 10 | 6.45 | 0.645 |

2.6 大孔树脂吸附性能考察

2.6.1 上样量 称取 HPD400 型大孔树脂 10 g, 共 4 份, 分别取发酵液 10, 20, 30, 40 mL 上样, 加 Tris-HCl-30% 乙醇缓冲液洗脱, 透析除去盐分, 冷冻干燥, 按 2.1 项下方法测定蛋白质含量, 按 2.3 项下方法测定酶活性, 计算豆豉溶栓酶的比活性分别为 1 092, 2 194, 2 183, 1 831 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 故选择发酵液上样量 2 BV。

2.6.2 吸附时间 称取 HPD400 型大孔树脂 10 g, 共 4 份, 各加发酵液 20 mL 上样, 分别吸附 1, 2, 3, 4 h, 加 Tris-HCl-30% 乙醇缓冲液洗脱, 透析除去盐分, 冷冻干燥, 计算豆豉溶栓酶比活性分别为 1 947, 2 283, 2 206, 2 155 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 故选择吸附速率

$1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.7 大孔树脂洗脱性能考察^[9]

2.7.1 洗脱剂 称取 HPD400 型大孔树脂 10 g, 共 2 份, 按 2.6 项下优选的条件吸附, 分别加水、Tris-HCl 缓冲液和 Tris-HCl-30% 乙醇缓冲液进行洗脱, 收集洗脱液, 按 2.2 项下方法检测蛋白组分, 结果发现水仅洗脱了部分杂质蛋白, 并未将目标蛋白洗脱下来, 而 Tris-HCl 的 30% 乙醇缓冲液洗脱效果最好。

2.7.2 加水量 称取 HPD400 型大孔树脂 10 g, 共 3 份, 按优选的吸附条件上样, 分别加 1, 2, 3 BV 水洗除杂, 用 pH 8.0 的 Tris-HCl-30% 乙醇缓冲液洗脱, 收集洗脱液, 按 2.1 项下方法测定蛋白质含量, 按 2.3 项下方法测定酶活性, 计算比活性分别为 2 057, 2 136, 2 101 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 表明加水量对洗脱液中酶比活性影响不大, 故选择加水量 2 BV。

2.7.3 洗脱剂 pH 取 HPD400 型大孔树脂 10 g, 共 6 份, 按优选的吸附条件上样, 加水 2 BV 除杂, 分别用 pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 的 Tris-HCl-30% 乙醇缓冲液洗脱, 按 2.1 项下方法测定蛋白质质量浓度分别为 0.028, 0.050, 0.056, 0.077, 0.048 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 故选择 pH 8.0 的 Tris-HCl-30% 乙醇缓冲液洗脱。

2.7.4 洗脱流速 取发酵液 2 BV, 共 4 份, 按优选的吸附条件上样, 加水 2 BV 除杂, 分别加 pH 8.0 的 Tris-HCl-30% 乙醇缓冲液 4 BV 以 1, 2, 3, 4 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱, 收集洗脱液, 计算比活性分别为 1 815, 2 107, 2 046, 1 927 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 故选择洗脱流速 2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.7.5 洗脱剂体积 取 HPD400 型大孔树脂 10 g, 按优选的吸附条件上样, 加水 2 BV 除杂, 加 pH 8.0 的 Tris-HCl-30% 乙醇缓冲液 8 BV 以 2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱, 收集各流份, 每 1 BV 为 1 份, 结果各流份中蛋白质质量分别为 0.96, 0.81, 0.57, 0.21, 0.09, 0.08, 0.06, 0.04 mg, 表明 pH 8.0 的 Tris-HCl-30% 乙醇缓冲液 4 BV 可将 90% 豆豉溶栓酶洗脱完全。

2.8 验证试验 称取大孔树脂 10 g, 按最佳工艺条件进行 3 次验证试验, 透析除盐, 冷冻干燥, 得豆豉溶栓酶, 测定蛋白含量及酶活性, 计算比活性和纯化倍数, 结果见表 3, 表明优选的工艺稳定可行。

2.9 电泳分析 采用 2.2 项下 SDS-PAGE 电泳检测, 见图 1, 结果显示豆豉溶栓酶呈现单一条带, 相对分子质量 28 kD, 与文献报道^[10] 接近。

3 讨论

大孔吸附树脂具有物理化学稳定性高、比表面积大、洗脱条件温和等优点, 而豆豉溶栓酶在

表3 大孔树脂对豆豉溶栓酶的纯化结果

| 样品 | 上样量 /mL | 蛋白质量 /mg | 酶活性 /U | 比活性 /U·mg ⁻¹ | 纯化倍数 |
|-----|------------|-------------|-----------|----------------------------|-------|
| 发酵液 | 0 | 94.12 | 4 804.07 | 51.04 | 1.00 |
| 1 | 20 | 2.54 | 5 617.21 | 2 211.50 | 43.33 |
| 2 | 20 | 2.97 | 6 958.32 | 2 342.87 | 45.90 |
| 3 | 20 | 3.08 | 6 802.21 | 2 208.51 | 43.27 |



1. 发酵液;2,4. Marker;3. 豆豉溶栓酶

图1 豆豉溶栓酶 SDS-PAGE 电泳

<40 ℃环境中稳定性良好^[11],故在纯化过程中能很好地保持该酶的稳定性。洗脱试验发现 pH 8.0 的 Tris-HCl-30% 乙醇缓冲液 4 BV 可将 90% 豆豉溶栓酶洗脱,8 BV 仅能再洗脱 1.4%,但洗脱体积增大会给后续浓缩工作带来困难。

豆豉溶栓酶的等电点为 pH (8.6 ± 0.2)^[1],在 pH 7.0 ~ 9.0 时稳定性好,最适 pH 8.6,最适温度 35 ℃^[8],本文主要通过改变溶剂的 pH 来进行洗脱,最后发现 pH 8.0 的缓冲液洗脱效率最高。洗脱液选择时发现,采用单纯缓冲液的洗脱效果不是很理想,本文预先测试了豆豉溶栓酶在不同体积分数乙醇中的溶解度,发现乙醇体积分数较高时,溶解度较

小,乙醇体积分数低时洗脱效率差,故最后确定在 Tris-HCl 缓冲液中加入 30% 乙醇进行洗脱。洗脱液冷冻富集后,加入含有小鼠血块的离心管中,发现可明显溶解小鼠血块。

[参考文献]

- [1] 孙月娥,王卫东. 豆豉纤溶酶的功能及应用前景[J]. 中国酿造,2010(9):25.
- [2] Liu J G, Xing J M, Chang T S, et al. Reverse micelles extraction of nattokinase: From model system to real system[J]. Chinese Sci Bull,2006,51(7):796.
- [3] 肖璐,张仁怀,张义正. 豆豉溶栓酶工程菌的发酵条件及重组溶栓酶的分离纯化[J]. 食品与工业发酵,2005,31(1):66.
- [4] 刘柳,郭勇. 层析法分离纳豆激酶的研究[J]. 现代食品科技,2006,23(1):17.
- [5] 朱梦良,招丽君,梁新丽,等. 大孔吸附树脂分离纯化葛根总黄酮和葛根素的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):23.
- [6] 刘小华,张美霞,于春梅,等. 考马斯亮兰法测定壳聚糖中蛋白的含量[J]. 中国交通医学杂志,2006,20(2):159.
- [7] 高秀丽,宋智魁,王清忱,等. 贵州豆豉激酶组分的 Tricine-SDS-PAGE 电泳方法研究[J]. 贵阳医学院学报,2010,35(6):575.
- [8] 宋永生,张炳文. 细菌型豆豉中溶栓活性成分的初步研究[J]. 中国酿造,2005(1):18.
- [9] 柏冬,王瑞海,李景远,等. 大孔树脂纯化大蒜总皂苷的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(12):4.
- [10] 关晨晨,赵敏. 豆豉纤溶酶的分离纯化及部分酶学性质研究[J]. 中国药学杂志,2010,45(16):1218.
- [11] 龚福明,柳陈坚,李海燕. 豆豉纤溶酶研究现状[J]. 生物技术通报,2009(11):34.

[责任编辑 刘德文]

欢迎投稿

欢迎订阅