

蚓激酶提取条件的优化与酶活性测定

陈欲云, 杨跃寰, 刘春丽, 谢万如

(四川理工学院化学与制药工程学院, 四川 自贡 643000)

摘要: 蚓激酶是目前较为理想的溶栓药物之一, 具有广泛的临床应用前景。采用盐析法从蚯蚓中提取蚓激酶, 通过采用考马斯亮蓝 G-250 染色法间接地测定蚓激酶活性, 优化出最佳的提取条件。结果显示, 蚓激酶的提取最佳 PH 为 7.5-8.0, 二次盐析硫酸铵饱和度应在 80% 以上。

关键词: 蚓激酶; 提取条件; 酶活性; 考马斯亮蓝 G-250 染色法

中图分类号: Q814

文献标识码: A

引言

传统中药材地龙(Lumbricus), 习称蚯蚓, 中医除去杂质, 洗净, 切段, 干燥入药; 传统医学认为地龙具有清热定惊, 通络, 平喘, 利尿的功效。日本 Mihara 于 1982 年首次报道了从蚯蚓中提取出一组具有纤溶活性的蚓激酶(Lumbrokinase, LK), 具有强烈的溶解纤维蛋白及血栓的作用^[1-3]。以蚯蚓纤溶酶制成的口服药物服用方便、副作用小、药理作用广泛, 是目前较为理想的溶栓药物之一, 具有广泛的临床应用前景。本研究旨在对蚓激酶的提取条件作初步探讨, 并用考马斯亮蓝 G-250 染色法间接地研究蚓激酶活性, 对蚓激酶提取条件作出评价。目前, 尚未文献报道, 将此法用于蚓激酶活性研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

蚯蚓挖取于自贡本土, 鸡血购于自贡市某农贸市场。

1.2 实验试剂

牛血清白蛋白(上海伯奥生物科技有限公司, 110222), 考马斯亮蓝试剂(成都科龙化工试剂厂, 090601)。

1.3 实验方法

1.3.1 蚓激酶提取工艺

新鲜蚯蚓→清水漂洗数次→称重→加入两倍体积磷酸缓冲液→匀浆→4℃静置 4h→4℃离心→上清液加硫酸铵→离心→上清加硫酸铵→离心→取沉淀缓冲液溶解→透析去盐→蚯蚓粗提液

挖取自贡本土蚯蚓, 用水冲洗数次, 让蚯蚓肚中的泥沙尽量洗净, 用滤纸将蚯蚓的水分吸干, 称重。称取干净蚯蚓 500 g, 加入 2 倍体积的缓冲液, 放入匀浆器中匀浆 10 min, 然后将匀浆液放于 4℃冰箱静置 4 h, 然后于 4℃恒温离心机 5 000 rpm 离心 10 min, 取上清液。加入硫酸铵至饱和, 在 4℃离心机中 4 000 rpm 离心 10 min, 取上清液, 再加入固体硫酸铵调节饱和度, 于 4℃冰箱中静置过夜。4℃离心机中 4 000 rpm 离心 10 min。收集沉淀, 然后用缓冲液溶解此沉淀物, 用透析袋透析去盐后, 即得棕色蚓激酶提取液。

1.3.2 PH 值对盐析时沉淀量的影响

取 7 支 10 mL 的离心管, 每支加入 6 mL 盐析液, 用 1.0 mol/L 的硫酸和氨水调节 pH(2.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0)^[4], 静置后, 在 4℃离心机中 4 000 rpm 离心 10 min, 观察沉淀情况。

1.3.3 第 2 次盐析所加硫酸铵最佳饱和度的测定

将第 1 次离心后的盐析液分成 6 组, 每组各取 30 mL, 用固体硫酸铵调整该盐析液的饱和度(50%、60%、70%、80%、90% 和 95%) 静置, 4℃离心机中 4 000 rpm 离心 10 min, 观察沉淀情况^[5-6]。然后将沉淀

收稿日期: 2011-09-20

作者简介: 陈欲云(1977-), 女, 福建平潭人, 讲师, 硕士, 主要从事天然产物方面的研究 (E-mail) chenyyun@yeah.net

用缓冲液溶解,用透析袋去盐后得蚓激酶粗提液,用蒸馏水定容至100 mL,测酶活备用。

1.3.4 酶活性的测定

1.3.4.1 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量 - 标准曲线制作

参考文献[7],考马斯亮蓝 G-250 100mg 溶于 50ml 95% 乙醇,加入 100ml 85% H_3PO_4 ,用蒸馏水稀释至 1000ml,滤纸过滤。最终试剂中含 0.01% (W/V) 考马斯亮蓝 G-250,4.7% (W/V) 乙醇,8.5% (W/V) H_3PO_4 。

标准蛋白质溶液:

纯的牛血清白蛋白,预先经微量凯氏定氮法测定白氮含量,根据其纯度同 0.14mol/L NaCl 配制成 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白溶液。

标准曲线制作:

蛋白质标准曲线各试剂加入量参照表 1,以 $A_{595\text{nm}}$ 为纵坐标,标准蛋白含量为横坐标(六个点为 0、20 μg 、40 μg 、60 μg 、80 μg 、100 μg) 在坐标轴上绘制标准曲线。得回归方程 $y = 0.0076x + 0.0093$ ($R^2 = 0.9986$)

蛋白质含量的测定:样品即所测蛋白质含量样品(含量应处理在所测范围内),依照以上步骤操作,测出样品的 $A_{595\text{nm}}$,然后利用标准曲线或回归方程求出样品蛋白质含量。一般被测样品的 $A_{595\text{nm}}$ 值在 0.1~0.8 之间,所以上述样品如果 $A_{595\text{nm}}$ 值太大,可以稀释后再测 $A_{595\text{nm}}$ 值,然后再计算。

表 1 绘制 1~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白质标准曲线各试剂加入量及测得吸光度

试管编号	0	1	2	3	4	5	样品
1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准蛋白(ul)	0	20	40	60	80	100	5
0.14mol/L NaCl (ul)	100	80	60	40	20	0	95
考马斯亮蓝试剂(ml)定容	5	5	5	5	5	5	5
$A_{595\text{nm}}$	0	0.168	0.328	0.455	0.630	0.767	

注: $A_{595\text{nm}}$ 测值为摇匀 1h 内以 1 号管为空白对照值。

1.3.4.2 蚓激酶活性的测定

参考文献[3],首先除去鸡血块中可溶蛋白,其工艺流程为:新鲜鸡血块→加水捣碎→离心→沉淀→加水捣碎→离心→沉淀→备用。

蚓激酶活性的测定方法:取备用的鸡血 1g,蚓激酶粗提液 30 mL,酶解 3 h,作为样品 1;取备用的鸡血 1g,加蒸馏水 30 mL,作为样品 2;取蚓激酶粗提液 30 mL,作为样品 3。将 3 份样品离心,得上清液 1 号、2 号、3 号,测定其可溶性蛋白质含量。参考文献[7],样品中可溶性蛋白质含量采用考马斯亮蓝法 G-250 染色法测定。

2 结果与讨论

2.1 PH 值对盐析时沉淀量的影响

由表 2 可见,pH 为 7.8 时,沉淀量最少,当 pH < 7.8 时沉淀量依次增加,当 pH > 7.8 时,沉淀量也依次增加。由于在提取过程中要求所有的蛋白均是溶解状态,离心后沉淀越少,则说明蚓激酶最大量的溶解于上清液中。pH 为 7.5 时为最佳提取条件,提取蚓激酶的量越多,发挥的作用最强。

目前认为,蚓激酶是一组相对分子质量为 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 、PI3~5、具有纤溶酶活性的丝氨酸蛋白酶。它们有许多相似的特性:①热稳定性:对热较稳定。在 55 $^{\circ}\text{C}$ 以下放置 1 h,酶活力基本不变;超过 60 $^{\circ}\text{C}$ 时,酶活力迅速下降;当温度达到 70 $^{\circ}\text{C}$ 时,酶已完全失活。②酸稳定性:其作用的 pH 范围较宽。在 pH 4~11 活力变化很小,pH 8~9 时该酶稳定性最好,活力较高。本研究中蚓激酶的提取最佳 PH 为 7.5~8.0,与文献报道一致^[8]。

表 2 不同 PH 值对二次盐析的影响

PH	沉淀量(g)
2.5	0.075
6.0	0.017
6.5	0.012
7.0	0.0089
7.5	0.0027
8.0	0.0049
9.0	0.021

2.2 第 2 次盐析所加硫酸铵最佳饱和度的测定

由表 3 可见,在第 1 次离心的基础上,随着硫酸铵饱和度的增加,第 2 次离心的沉淀也在增加,当硫酸铵的饱和度为 80% 时,沉淀的量较多,此时硫酸铵也全部溶解,当硫酸铵的饱和度达到 90% 时,此时沉淀有少量的增加,但是在试管的底部有少量的硫酸铵未溶解。从沉淀的量来看,80%、90% 的饱和度都较好,但从经济角度来看,80% 的饱和度更好。

从酶活性测定实验可以看出,当二次盐析硫酸铵的饱和度为 80% 以上时,蚓激酶的活性已趋于稳定,说明 80% 以上的盐饱和度对蚓激酶的收率影响已经不大,所以,二次盐析的硫酸铵饱和度应在 80% 以上。

表 3 不同硫酸饱和度对二次盐析的影响

硫酸铵饱和度	沉淀量(g)	$A_{595\text{nm}}$	可溶性蛋白含量(mg)	未被溶解鸡血块沉淀量(g)
30%	0.081	0.199	5.01	0.994
50%	0.127	0.244	6.18	0.989
70%	0.169	0.169	21.5	0.752
80%	0.208	0.243	30.7	0.527
90%	0.257	0.252	31.9	0.519
95%	0.355	0.249	31.5	0.53

3 结 论

蚓激酶的提取最佳 PH 为 7.5 ~ 8.0 ,二次盐析硫酸铵饱和度应在 80% 以上。本研究酶活性的重复实验证明,考马斯亮蓝 G - 250 染色法操作简单、结果较为准确,适用于含量较低的可溶性蛋白含量的测定。

参 考 文 献:

- [1] Mihara H ,Sumi H ,Akazawa T ,et al. Fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm [J]. *Thromb Haemostas* ,1983 ,50: 258-263.
- [2] 王东鹏,孙贵宝. 高活性蚓激酶提取工艺研究[J]. *宁夏科技* 2001(6) :44-45.
- [3] 马 闯,杨新力,杨丽萍,等. 蚓激酶提取工艺的初步研究[J]. *山东食品发酵* ,2007(1) :3-4.
- [4] 刘美艳,张双全,张 健. 蚯蚓纤溶酶的纯化及 pH 值、温度和胰蛋白酶对其纤溶活性的影响[J]. *中国生化药物杂志* 2003 24(4) :167-170.
- [5] 李兴发,贾飞飞,刘建蓉,等. 蚓激酶研究和应用进展[J]. *中国新药杂志* 2005(8) :964-968.
- [6] 蔡武城. 生物化学实验技术教程[M]. 上海: 复旦大学出版社,1987.
- [7] 赵英永,戴 云,崔秀明,等. 考马斯亮蓝 G-250 染色法测定草乌中可溶性蛋白质含量[J]. *云南民族大学学报: 自然科学版* 2006 ,15(3) :235-237.
- [8] 闫 峻,汤立达. 蚓激酶的研究与临床应用[J]. *中草药* 2006 ,37(2) :296-298.

Optimization of Lumbrokinase Extraction Conditions and Determination of Its Activity

CHEN Yun-yun , YANG Yue-huan , LIU Chun-li , XIE Wan-ru

(School of Chemical and Pharmaceutical Engineering , Sichuan University of Science & Engineering , Zigong 643000 , China)

Abstract: Lumbrokinase is considered one of the preferred thrombolytic drugs and widely used in clinical. Lumbrokinase is extracted from the earthworms by salt fractionation and lumbrokinase activity is indirectly measured by Coomassie Brilliant Blue G-250 staining. The optimal extraction conditions of the lumbrokinase from the earthworms is determined: the best pH value is 7.5 ~ 8.0 and saturation of ammonium sulfate should be above 80% in the second salting-out.

Key words: lumbrokinase; extraction conditions; enzyme activity; Coomassie Brilliant Blue G-250 staining