

反相色谱分离蚯蚓纤溶酶的初步研究

刘芳 刘紫鹃* 沈忠耀

(清华大学化工系 北京 100084)

蚯蚓纤溶酶是由日本宫崎医科大学的 Mihara^[1]于1982年从蚯蚓的肠和体液中发现的。由于蚯蚓纤溶酶有良好的溶解血栓的作用,可以治疗一系列与血栓形成有关的疾病,因而在临床上有很大的应用价值^[2],有可能成为一种新型的溶栓药物,继尿激酶、链激酶等之后应用于临床^[4]。

关于蚯蚓纤溶酶的分离纯化,大多采用盐析、凝胶层析及离子交换层析等方法^[2-6],也有人采用亲和层析的方法^[7]。本文以赤子爱胜蚓纤溶酶粗品为对象,对用反相色谱技术分离蚯蚓纤溶酶进行了初步尝试,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 蚯蚓纤溶酶

赤子爱胜蚓的分级超滤粗提物,由本校生物科学与技术系提供。

1.2 色谱仪器及条件

高效液相色谱系统由 Waters-600E 主机、481 紫外检测器和 745 色谱记录仪组成,色谱柱是 μ -Bondapak C₁₈, 3.9mm × 300mm, 125 埃分析柱,均为 Waters 公司产品。在无特殊说明下,色谱条件为室温,检测波长 280nm,流动相甲醇:水 = 1:1,流量 1.0ml/min,等度洗脱,记录仪走纸速度 0.5cm/min,纤溶酶样品浓度 0.2mg/ml,进样量 10 μ l。

1.3 分析方法

纤溶酶活力的测定:纤维蛋白平板法^[2];纤溶酶分子量的测定:SDS-PAGE 法^[8];纤溶酶等电点的测定:等电聚焦电泳法^[8]。

2 结果与讨论

2.1 纤溶酶分子量的测定

为了解纤溶酶粗品的大致组成及纯度,用 SDS-PAGE 法测定了它的分子量,样品浓度 3mg/ml,加样量 60 μ l,结果见表 1。从表 1 可知,纤溶酶粗品是由 16 个分子量不等的组分组成的混合物,分子量分布在 15000~64000 之间。

2.2 纤溶酶等电点的测定

对大多数蛋白质而言,使用低 pH2.5~3.5 的流动相可以得到最好的分离^[9]。我们在样品浓度 4mg/ml,加样量 100 μ l 下用等电聚焦电泳法测定得纤溶酶粗品的等电点为 2.8~3.0。可见,对纤溶酶粗品的反相色谱分离,其流动相不能采取过低 pH 值,必须适当地提高 pH,使其偏离纤溶酶的等电点。

甲醇-水体系的 pH 值检测结果表明,当甲醇含量在 0~100% 间变化时,其 pH 值基本不变,约为 6.0,因此,选择甲醇水溶液作流动相时,不致使纤溶酶沉淀。

2.3 流动相中甲醇浓度对纤溶酶活性的影响

一般地,反相色谱分离蛋白质要在高有机溶剂浓度下进行,但高浓度的有机溶剂与蛋白质接触又往

现在山东大学微生物学系。

本文于 1995 年 1 月 23 日收到。

表1 纤溶酶粗品的分子量分布范围

区带号	相对迁移率	分子量	区带号	相对迁移率	分子量
1	0.17	63811	9	0.39	39591
2	0.18	62430	10	0.41	37907
3	0.23	56014	11	0.42	37093
4	0.29	49181	12	0.44	35522
5	0.31	47086	13	0.58	26218
6	0.34	44126	14	0.62	24038
7	0.37	41342	15	0.66	22039
8	0.38	40457	16	0.84	14914

往会使蛋白因变性而失活^[10]。为此,在30mg/ml纤溶酶溶液中加入甲醇,24h后取样检测了甲醇浓度对纤溶酶活性的影响,试验结果见表2。

表2 甲醇浓度对纤溶酶活性的影响

甲醇浓度/%	80	65	60	50	40
现象	沉淀	部分沉淀	无沉淀	无沉淀	无沉淀
测活	完全失活	活性损失约50%	活性部分损失	活性无损失	活性无损失

从表2看出,流动相中甲醇浓度应控制在60%以下,才能保证纤溶酶基本不失活,因此我们选择甲醇浓度上限为50%。

2.4 纤溶酶在水和甲醇水溶液中的稳定性

分别测定了纤溶酶在水和50%甲醇水溶液中4℃下保存不同时间的色谱图(图略),结果表明,纤溶酶在两种情况下的色谱图类似,当存放时间小于2d时,均为4个峰,当存放时间大于2d时,第二个峰都分解为2个峰,可见,纤溶酶在4℃情况下不够稳定,只能短期保存,因此,酶液最好是现配现用。

2.5 反相色谱分离纤溶酶粗品的初步研究

2.5.1 流动相流速对分离的影响:流速的变化通常会引起柱效的改变,图1给出了在水中4℃存放2d的纤溶酶样品在不同的流速下色谱图。

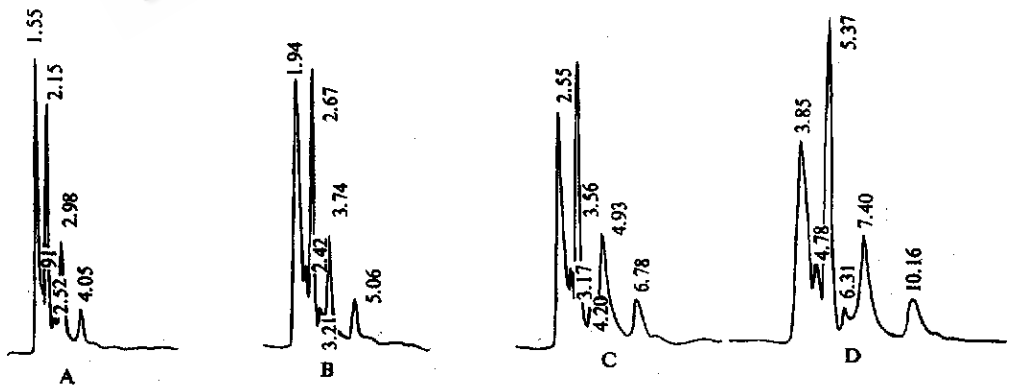


图1 纤溶酶在不同流速下的色谱图

流速/ $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$: A.1.0; B.0.8; C.0.6; D.0.4.

从图1的A~D可见,各个峰的保留时间与流速成反比,但随着流速的降低,保留时间增加的幅度是不同的,以4个主要的峰为例,增加幅度大小顺序是峰1<峰2<峰3<峰4,可见,越是晚流出的峰,流速的变化对其保留时间的影响也越大,所以可以通过控制流速使晚流出的过度分离的峰前移,以利于

缩短分离时间。当流速为 0.6 和 0.4ml/min 时,各峰间虽然间距较大,但拖尾现象也较严重,峰形也不及流速为 1.0 和 0.8ml/min 时尖锐,因此,流动相流速应选择为 0.8~1.0ml/min。

2.5.2 流动相组成对分离的影响:在不同甲醇浓度下等度洗脱的实验结果如图 2 所示。随着甲醇浓度的降低,流动相极性增大,亲水性增强,出峰个数增加,特别当甲醇浓度由 30% 降为 20% 时,色谱图发生急剧变化,出峰数目明显增加,根据以上结果,梯度洗脱时甲醇浓度应选择为 10%~50% 之间。

以上初步实验表明,用反相色谱来分离纯化蚯蚓纤溶酶是可能的,和人们以往常用的方法相比,可以简化分离过程,缩短操作时间。进一步的研究应在反相色谱的制备柱上进行,并对所得的制备量样品进行必要的生化测试和分析。

参 考 文 献

- [1] 新华通讯社编印,参考消息,1982,12月31日,第三版。
- [2] 李长公,曾耀辉. 清华大学学报(自然科学版),1993,33(3):100~106.
- [3] 路英华,金汝成,吴应文等. 生物化学杂志,1988,4(2):166~172.
- [4] 周元聪,朱洪,陈远聪等. 生物化学与生物物理学报,1988,20(1):35~41.
- [5] 程牛亮,牛勃,张祖琦等. 生物化学杂志,1990,6(2):186~190.
- [6] 牛勃,程牛亮,单鸿仁等. CN1037345A,1989.
- [7] 徐健民,张国祯,陈松鹤等. 上海医科大学学报,1991,18(4):252~256.
- [8] 清华大学生物科学与技术系生物化学教研室. 生物化学实验技术,1991,40~49.
- [9] 华家桢. 色谱,1991,9(1):34~38.
- [10] 姚志建. 色谱,1988,6(2):110~112.

Study on Separation of Fibrenolytic Enzyme from the Earthworm by Reversed-phase HPLC

Liu Fang Liu Zijuan Shen Zhongyao

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract Molecular weight and isoelectronic point of fibrenolytic enzyme from *Eisenia foelide* were determined, its stability in aqueous solution and methanol-water was investigated. The effects of composition and flow rate of mobile phase on separation were tested. It was showed that the suitable range of flow rate was 0.8~1.0ml/min and the maximum of methanol concentration was 50%.

Key words Earthworm, fibrenolytic enzyme, RP-HPLC

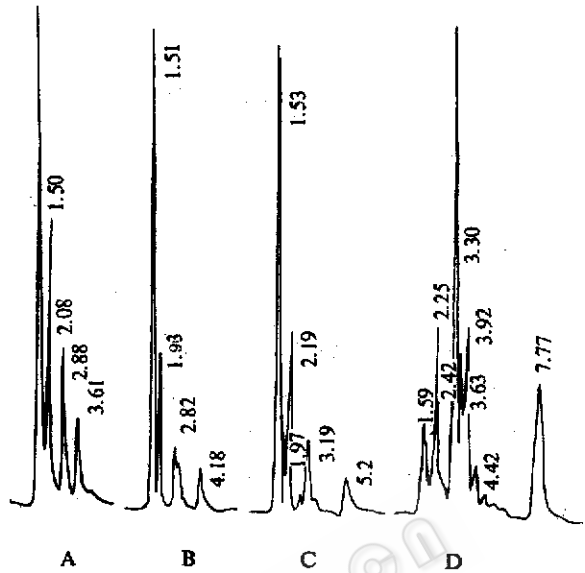


图2 纤溶酶在不同等度洗脱下的色谱图
甲醇浓度/%:A. 50;B.40; C.30; D. 20.