

木瓜凝乳蛋白酶的自水解作用及其 对分离纯化的影响

舒 薇^{1,2} 郭 勇¹

(1 华南理工大学 食品与生物工程学院, 广东 广州 510640; 2 华南农业大学 测试中心, 广东 广州 510642)

摘要: 对木瓜凝乳蛋白酶的自水解作用及其对分离纯化的影响作了探讨. 结果表明: 激活的和未激活的木瓜凝乳蛋白酶液均能发生自水解作用, 而激活剂的使用可加速酶的自水解过程, 在分离纯化过程中易造成分离纯化产物不均一、酶活力回收率和蛋白回收率下降等; 与之相比, 未激活的木瓜凝乳蛋白酶的应用可抑制或延缓分离过程中酶的水解, 纯化产物蛋白回收率达 64.08%, 比前者提高了 10% 以上; 酶活力回收率达 68.9%, 比前者提高了 15%.

关键词: 木瓜凝乳蛋白酶; 分离纯化; 自水解作用

中图分类号: Q556; Q814.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)01-0080-04

The autolysis of chymopapain and the effect on its purification

SHU Wei^{1,2}, GUO Yong¹

(1 College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

2 Testing Center, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The effect of chymopapain autolysis on its purification was studied. It was found that: activated and inactivated chymopapain solution could undergo autolysis. The use of activator accelerated the autolytic process, resulting in heterogeneity of the purified products, and decline in the recovery of enzyme activity and protein. By contrast, using inactivated chymopapain inhibited or delayed the autolysis, the recovery of protein was 64.08%, showing an increase of more than 10%, and recovery of activity was 68.9%, a gain of over 15%.

Key words: chymopapain; purification; autolysis

木瓜凝乳蛋白酶(Chymopapain, EC 3.4.22.6, 简称 Cp)是木瓜乳汁中含量最丰富、水解和凝乳活性最强的一种巯基蛋白酶^[1]. 目前, 该酶除了在食品、工业生产等领域有重要而广泛的用途外, 在医药(疗)领域也显现出越来越重要的药用价值, 如治疗腰椎间盘突出症^[2~5]、肿瘤的辅助治疗^[6]、分离细胞^[7,8]、Rh 血型鉴定及交叉配血、消炎和助消化等. 然而, 因木瓜乳汁中 4 种巯基蛋白酶的结构、性质极为相似, 所以获得高活力、高纯度的 Cp 非常困难.

近年来, 我国的一些科研人员和实验室相继开展了该酶的分离纯化、抗体制备等相关的研究^[9,10], 在分离纯化过程中大多采用先将酶液用半胱氨酸、EDTA 或巯基乙醇激活半小时, 再进行分离纯化的方法. 本研究通过对自水解过程的分析和对分离纯化结果比较得出: 激活的木瓜凝乳蛋白酶由于具有很强的自水解作用, 常造成分离产物不均一、酶活力回收率及蛋白回收率偏低等结果, 这远不能满足临床医药和科研方面的要求. 本试验鉴于上述结果, 在分离纯化过程

中采用未激活木瓜蛋白酶复合酶为上样酶液, 在离子强度和 pH 线性双梯度洗脱下, 获得比活力为 3 389.1 U/mg、蛋白回收率提高 10% 以上、比活力提高 1.05 倍的纯酶, 这为今后制备高活力、高纯度的木瓜凝乳蛋白酶和开展相关的应用研究提供了重要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与主要试剂 木瓜蛋白酶(粗粉), 广州酶制剂厂提供, ps1 级别, 活力为 130 万酪氨酸单位/g; 羧甲基纤维素(CMC)、截留相对分子质量5 000的超滤浓缩管(型号 Amicon Ultra-4), Millipore 公司产品; 酪蛋白(casein)进口分装; 木瓜凝乳蛋白酶标准品, Sigma 公司产品; 其余试剂为电泳纯或分析纯试剂。

1.1.2 仪器设备 ECONO 中低压层析仪, Bio-rad 公司产品; 截留相对分子质量为30 000的再生纤维超滤包及超滤装置, 型号 Pellicon XL 30, Millipore 公司产品; 小型双垂直电泳槽, 大连捷迈科贸有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Cp 水解活力测定 参照徐凤彩^[11]酶活力测定方法并有所改进。酶活力单位定义为在测定条件下[pH7.0, (37±0.2) °C], 每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。按下式计算酶活力:

$$\text{酶活力 (U/mL)} = \frac{D - D_0}{D_s} \times M_{\text{标}} \times \frac{V}{t} \times \text{样品稀释总倍数,}$$

式中: (D-D₀) 为 275 nm 波长下待测酶液与对照的光密度差值; D_s 指以水为对照, 275 nm 波长下 50 μg/mL 标准酪氨酸光密度值; M_标 为标准酪氨酸溶液浓度; V 为反应体系总体积 (mL); t 为反应时间, 10 min。

1.2.2 Cp 凝乳活力的测定 参照 Arima^[12] 方法。把 40 min 内凝固 1 mL 质量浓度为 0.1 g/mL 脱脂乳(含 0.01 mol/L CaCl₂) 的酶量定义为 1 个酶活力单位, 即 1 个索氏单位(Soxhlet Unit), 以相对活力(RU)表示各因素的影响效果。

1.2.3 蛋白质含量的测定 按 Bradford 方法^[13], 并以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.2.4 SDS-PAGE 电泳比较 取 2 组酶液, 第 1 组将 Cp 溶于 0.05 mol/L pH 7.0 含 20 mmol/L Cys、1 mmol/L EDTA 的磷酸缓冲液中(蛋白质质量浓度 30

mg/mL), 室温放置并分别于激活 3、6、24 和 36 h 后提取酶液进行 SDS-PAGE 电泳分析。第 2 组将 Cp 溶于 0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液中(蛋白质质量浓度 30 mg/mL), 室温放置并分别于第 3、6、24 和 36 h 提取酶液作 SDS-PAGE 电泳分析。电泳参照张龙翔^[14] 方法。用 w=5% 浓缩胶、w=12.5% 分离胶, 每孔点样 10 μL, 稳流 10 mA。剥胶后以考马斯亮兰 R-250 染色 1~2 h, 脱色液脱色至条带清晰, 用凝胶成像系统拍照。

1.2.5 Cp 的分离纯化结果比较 分 2 组。第 1 组将 0.6 g 木瓜蛋白酶粗粉溶于 20 mL 0.05 mol/L pH 7.0 含 20 mmol/L Cys、1 mmol/L EDTA 的磷酸缓冲液中(蛋白质质量浓度 30 mg/mL), 研磨 15 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 上清液上 CMC 层析柱, 用 0.05 mol/L pH 5.8~0.4 mol/L pH 8.0 的磷酸缓冲液进行线性梯度洗脱, 在 280 nm 波长检测下, 收集第 2 活性峰, 经超滤及冰冻干燥成酶粉; 第 2 组将 0.45 g 木瓜蛋白酶粗粉溶于 15 mL 0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液中(蛋白质质量浓度 30 mg/mL), 研磨 15 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 上清液转入 5 000 超滤离心管, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液上 CMC 层析柱, 用 0.05 mol/L pH 5.8~0.5 mol/L pH 8.0 的磷酸缓冲液进行 pH、离子强度线性梯度洗脱, 在 280 nm 波长检测下, 收集第 2 活性峰, 经超滤及冰冻干燥成酶粉。在 CMC 层析过程中, 层析柱大小为 2.6 cm×22.5 cm, 流速均控制在 0.55 mL/min, 5 mL/管。

1.2.6 Cp 的分离纯化及纯度鉴定 Cp 的分离纯化按 1.2.5 中第 2 组未激活酶液的方法进行, 其纯化产物用 SDS-PAGE 电泳进行分析, 电泳方法同 1.2.4。

2 结果与分析

2.1 水解活性随时间变化的趋势

从图 1、2 可见, 激活和未激活酶液(蛋白质质量浓度 0.9 mg/mL) 的水解酶活力和凝乳酶活力均随时间的变化呈下降趋势, 其中以激活态酶活力下降明显, 而未激活酶液的酶活力下降相对缓和。可能的原因是: 木瓜凝乳蛋白酶的独特结构^[15, 16], 使它具有高反应活性的潜能, 在溶液状态下, 活性-SH 一旦被激活就表现出极强的活性, 并以自身为底物, 分子之间相互切割, 发生自水解作用, 导致酶活力下降。而此过程中也出现活性反弹波动, 说明酶的水解

作用使它的一级结构和空间结构不断发生变化,有时结构的变化使其活性中心更有利于与底物结合,也验证了酶的天然结构并不一定是酶的最佳活性结构.

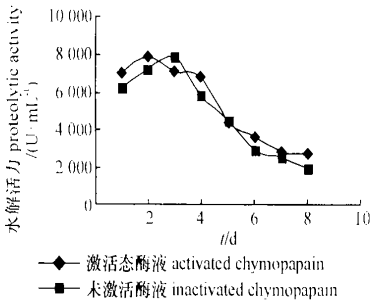


图 1 木瓜凝乳蛋白酶水解活力随时间变化曲线
Fig. 1 Curve of proteolytic activity of chymopapain against time

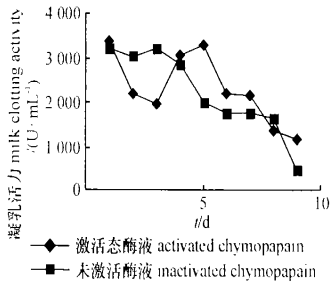


图 2 木瓜凝乳蛋白酶凝乳活力随时间变化曲线
Fig. 2 Curve of milk clotting activity of chymopapain against time

2.2 蛋白质浓度随时间的变化

从图 3 可见,随着时间的变化,2 种 Cp 酶液(蛋白质质量浓度约 0.9 mg/mL)的 $D_{595\text{nm}}$ 值在不断下降. 其中未激活酶液的下降程度较激活的平缓,这与上述结果一致.

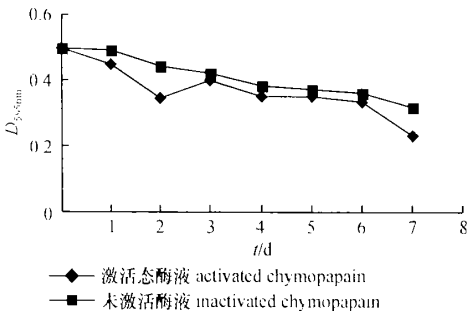


图 3 蛋白质浓度随时间变化曲线
Fig. 3 Curve of chymopapain concentration against time

2.3 SDS-PAGE 电泳比较结果

通过对 SDS-PAGE 电泳图(图 4)比较发现,第 1 组激活的 Cp 于激活 3 h 内已出现明显的降解带,于

第 6、24 和 36 h 在纯酶的对应位置电泳带逐渐变浅或消失,而下方的降解带却较为明显(图 4-a),而第 2 组未激活 Cp 的降解带较第 1 组明显少,降解速度相对较慢(图 4-b),进一步说明了木瓜凝乳蛋白酶的激活加速了其自身降解,最终导致水解片段产生、酶活力下降及产物的不均一性.

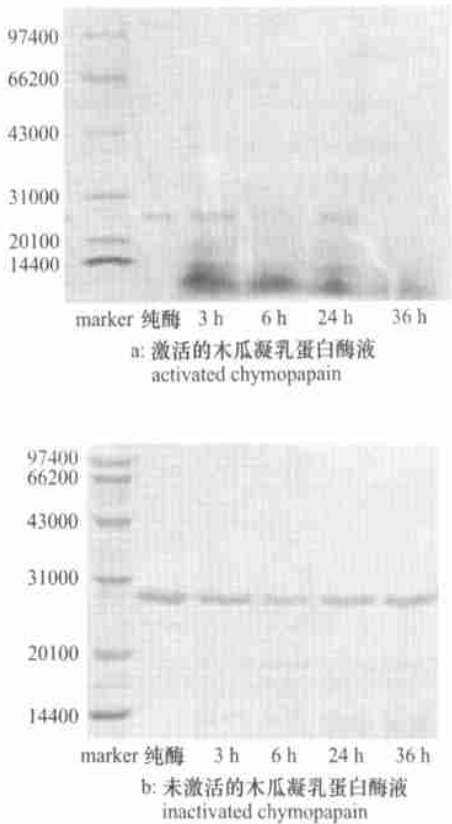


图 4 激活和未激活木瓜凝乳蛋白酶液不同时间的 SDS-PAGE 电泳比较
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of activated and inactivated chymopapain at different times

2.4 Cp 分离纯化结果的比较

从表 1 纯化结果比较来看,未激活酶经多步纯化后酶比活力为 3 389.1 U/mL,是激活酶的 1.05 倍;酶活力回收率为 68.9%,比激活酶的 53.87%提高 15% 以上;蛋白回收率为 64.1%,比激活酶的 53.0%提高了 11%.

2.5 Cp 分离纯化及纯度鉴定

通过以上对比研究表明,激活态酶液活性高,在分离纯化过程中易导致自身降解而造成酶蛋白含量下降及产物的不均一性,因此试验选择以未激活的木瓜蛋白复合酶为上样酶液,经 CMC 离子交换柱层析分离(图 5)、超滤、冻干等步骤纯化,获得 Cp 纯品,经 SDS-PAGE 电泳分析呈现单一条带,达电泳纯(图 6).

表 1 木瓜凝乳蛋白酶的分离纯化结果
Tab. 1 Result of chymopapain purification

木瓜凝乳蛋白酶 chymopapain	步骤 step	<i>V</i> /mL	<i>m</i> (总蛋白 total protein)/mg	比活力 specific activity /(U·mg ⁻¹)	纯化倍数 folds of purification	活力回收率 recovery of activity/%	蛋白回收率 recovery of protein/%
激活态 activated chymopapain	原液 crude proteinase	18.0	49.514	3 166.553	1.00	100.00	100.0
	CMC 收集液 chymopapain after CMC	57.0	31.851	8 233.769	2.60	64.26	64.3
	超滤浓缩液 chymopapain after ultrafiltration	10.0	26.248	3 217.997	1.02	53.87	53.0
未激活态 inactivated chymopapain	原液 crude proteinase	14.0	40.023	3 151.993	1.00	100.00	100.0
	5 000 超滤管收集液 chymopapain after 5 000 ultrafiltration	13.0	36.540	3 302.966	1.05	95.67	91.3
	CMC 收集液 chymopapain after CMC	52.4	28.128	8 195.19	2.60	81.65	70.3
	超滤浓缩液 chymopapain after ultrafiltration	10.0	25.648	3 389.095	1.08	68.90	64.1

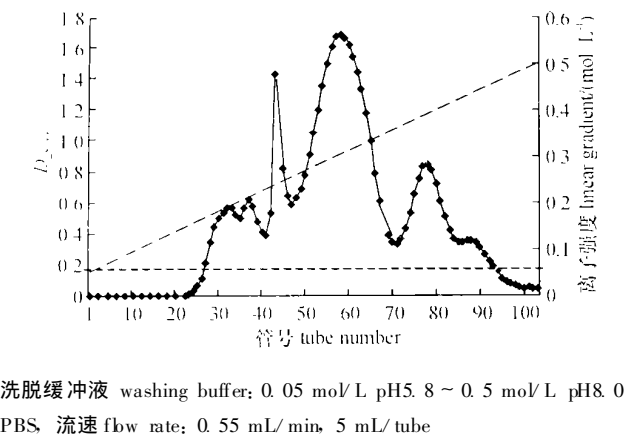


图 5 未激活木瓜凝乳蛋白酶 CMC 柱层析洗脱曲线
Fig. 5 The chromatography of inactivated chymopapain on CMC

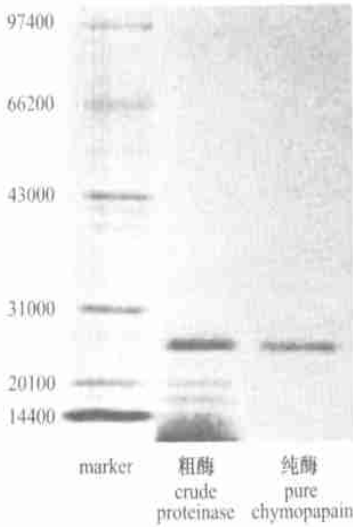


图 6 木瓜蛋白酶粗酶和木瓜凝乳蛋白酶冻干品的 SDS-PAGE
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of crude proteinase and lyophilized chymopapain

3 结论

木瓜凝乳蛋白酶有很强的水解蛋白质、小(多)肽的能力, 它的切割位点很多, 但最优先分解精氨酸-苯丙氨酸的肽键, 此外也具有水解酰胺键和酯键的特点以及具有凝乳活性. 由于它的高水解活性、纯天然性和木瓜资源极其丰富, 目前 Cp 已成为一种非常重要的药用酶. 本试验的结果表明: 在分离纯化过程中, 采用未激活的 Cp 酶液将大大提高产物酶活力回收率、蛋白回收率, 提高产物品质. 这一结果将为该酶的实际生产和开展应用研究提供一定的理论依据和参考.

参考文献:

[1] JANSSEN E F, BALLS A K. Chymopapain: a new crystalline proteinase from papaya latex[J] . J Biol Chem, 1941, 137: 459—460.
[2] 金 今, 邱贵兴, 王以朋, 等. 经皮穿刺木瓜凝乳蛋白酶化学溶核术治疗腰椎间盘突出症[J] . 中国脊髓脊柱杂志, 1998, 8(4): 216—218.
[3] 栾 波, 陈艺新, 金 今, 等. 木瓜凝乳蛋白酶注射治疗腰椎间盘突出症疗效观察[J] . 实用骨科杂志, 2000, 6(3): 177—178.
[4] WITTENBERG R H, OPPEL S. Five-year results from chemonucleolysis with chymopapain or collagenase-A prospective randomized study[J] . Spine, 2001, 26(17): 1 835—1 841.
[5] KAPSALIS A A, STERN I J, BORNSTEIN I. Correlation between hypersensitivity to parenteral chymopapain and the presence of IgE anti-chymopapain antibody[J] . Clin Exp Immunol, 1978, 33(1): 150—158.

(下转第 88 页)

3 Conclusion

Various genotypes of soybean show different responses in somatic embryogenesis in terms of both quantitative and qualitative responses at different auxin levels. Some varieties poorly respond whereas some others highly respond at the same auxin level. All the local varieties used in this study responded well in the lowest concentration of auxin used. However, their responses could be improved by using additives such as copper sulfate and silver nitrate. According to our study, silver nitrate could be used with copper sulfate to obtain their synergistic effects on somatic embryogenesis. The present results have high application value for improvement of soybean when bio-technical means are to be used.

References

- [1] CHRISTIANSON M L, WARNICK D A, CARLSON P S. A morphogenetically competent soybean suspension culture[J]. *Science*, 1983, 222: 632—634.
- [2] WALKER D R, PARROTT W A. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2001, 64: 55—62.
- [3] BONACIN G A, MAURO A O D, OLIVEIRA R C D, et al. Induction of somatic embryogenesis in soybean; physicochemical factors influencing the development of somatic embryos[J]. *Genetics and Molecular Biol*, 2000, 23 (4): 865—868.
- [4] SAMOYLOV V M, TUCKER D M, PARROTT W A. Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic cultures: The role of sucrose and total nitrogen content on proliferation[J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 1998, 34: 8—13.
- [5] TOMLIN E S, BRANCH S R, CHAMBERLAIN D, et al. Screening of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill, lines for somatic embryo induction and maturation capacity from immature cotyledons[J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2002, 38: 543—548.
- [6] HAZEL C B, KLEIN T M, ANIS M, et al. Growth characteristics and transformability of soybean embryogenic cultures[J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 17: 765—772.
- [7] LAZZERI P A, HILDEBRAND D F, COLLINS G B. Soybean somatic embryogenesis: Effects of hormones and culture manipulations[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1987, 10: 197—208.
- [8] KOMASUDA T, OHYAMA K. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*[J]. *Theor Appl Genet*, 1988, 75: 695—700.
- [9] MEURER C A, DINKINS R D, REDMOND C T, et al. Embryogenic response of multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars across three locations[J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2001, 37: 62—67.
- [10] YANG Y S, JIAN Y Y, ZHENG Y D. Copper enhances plant regeneration in callus culture of rice[J]. *Chinese J Rice Sci*, 1999, 13 (2): 95—98.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第83页)

- [6] WALD M, ZAVADOVA E, POUCKOVA P. Polyzyme preparation WOB-EMUGOS inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice[J]. *Life Sciences*, 1998, 62(3): 43—48.
- [7] MAROLLEAU J P, CORTIVO D, MILLS B, et al. Enrichment of peripheral blood CD34⁺ cells for transplantation using a fully automated immunomagnetic cell selection system and a novel octapeptide releasing agent[J]. *Bone Marrow Transplantation*, 1999, 23(8): 819—828.
- [8] SUN R X, LU Z Y, WIJENES J. Large scale and clinical grade purification of syndecan-1⁺ malignant plasma cells[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1997, 205(1): 73—79.
- [9] 郭燕华. 木瓜凝乳蛋白酶的分离纯化和稳定性初步研究[D]. 广州: 华南理工大学食品与生物工程学院, 2002.
- [10] 王素芳. 木瓜凝乳蛋白酶抗体制备研究[D]. 广州: 华南理工大学食品与生物工程学院, 2003.
- [11] 徐凤彩, 项金荣, 汪 炬, 等. 番麻蛋白酶活性中心基团的初步研究[J]. *华南农业大学学报*, 1992, 13 (2): 61—65.
- [12] ARIMA K, SHINJIRO I, GAKUZO T. Milk clotting enzyme from microorganism, part 1, screening test and identification of potent fungus[J]. *Agric Biol Chem*, 1967, 31(5): 540—545.
- [13] 厉朝龙, 陈枢青, 刘子怡, 等. 生物化学与分子生物学实验技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2000. 48: 16—22.
- [14] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1997. 100—106.
- [15] MAES D, BOUCKAERT J, POORTMANS F, et al. Structure of chymopapain at 1.7Å resolution[J]. *Bioche*, 1996, 35: 16 292—16 298.
- [16] MOHAMED A, DOMINIQUE M, JULIE B, et al. Thiol pegylation facilitates purification of chymopapain leading to diffraction studies at 1.4Å resolution[J]. *J Chromatogr A*, 1996, 749: 69—72.

【责任编辑 李晓卉】