

木瓜凝乳蛋白酶的单链单甲氧基聚乙二醇 修饰产物的检测与分析

舒薇^{1,2}, 郭勇¹, 贺丽苹², 温宏睿²

(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:在底物保护下, 采用三聚氰氯活化的单链单甲氧基聚乙二醇(mPEG₁)对木瓜凝乳蛋白酶(Cp)进行了共价修饰. 反应混合物经毛细管电泳(CE)分析及 Sephadex G-75 分离纯化获得修饰度为平均每分子 Cp 偶联 3~4 个 mPEG₁ 长链的修饰纯酶(mPEG₁-Cp). 以三硝基苯磺酸(TNBS)法与 CE 法作对比测定了该修饰酶的平均氨基修饰度; 以 ELISA 法检测 mPEG₁-Cp 的抗原性; 用紫外吸收光谱和荧光发射光谱对 mPEG₁-Cp 进行了结构的测定分析. 结果表明: Cp 的 mPEG₁ 修饰产物经毛细管电泳检测为多组分体系, 最大产物峰为平均每分子 Cp 偶联 3~4 个 mPEG₁ 的低修饰度修饰酶, 其相对分子质量为 40 712~46 044; 该修饰酶抗原抗体结合能力完全消失, 体内活性半衰期是原酶的 1.6 倍. 同时酶活力保持在 36.5%; 紫外吸收光谱和荧光发射光谱分析表明: mPEG₁-Cp 结构有轻度的改变.

关键词:木瓜凝乳蛋白酶; 单链单甲氧基聚乙二醇(mPEG₁); 化学修饰; 修饰产物; 检测分析

中图分类号: Q-331; TQ460.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)03-0064-05

The determination and analysis of 2-(O-methoxypolyethyleneglycol)-4, 6-dichloro-S-triazine-modified chymopapain

SHU Wei^{1,2}, GUO Yong¹, HE Li-ping², WEN Hong-rui²

(1 College of Food and Bioengineering, South China Univ. of Tech., Guangzhou 510640, China;

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

Abstract: Under the protection of the substrate, chymopapain (Cp) was modified with cyanuric chloride(cc)-activated 2-(O-methoxypolyethyleneglycol)-4, 6-dichloro-S-triazine (mPEG₁). Pure mPEG₁-Cp (3-4 mPEG₁ chains per molecule Cp) was obtained by capillary electrophoresis (CE) and by Sephadex G-75 gel filtration. Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) was used to determine the average modification degree of the mPEG₁-Cp, and ELISA to assess its antigenicity. UV-absorption and fluorescence spectra were applied for analyzing the structure of mPEG₁-Cp. The CE results showed that the modified product was a heterogeneous mixture, and the poorly modified Cp (3-4 mPEG₁ chains per molecule Cp) was the most plentiful product peak, its relative molecular mass being 40 712~46 044; The antigenicity of the mPEG₁-Cp was completely removed, the half life *in vivo* became 1.6 times of that of natural enzyme, while enzyme activity of mPEG₁-Cp still retained the 36.5% level. The UV-absorption and the fluorescence spectra showed that the structure of the mPEG₁-Cp was slightly changed.

Key words: chymopapain; 2-(O-methoxypolyethyleneglycol)-4, 6-dichloro-S-triazine (mPEG₁); chemical modification; modified product; determination and analysis

木瓜凝乳蛋白酶(chymopapain, EC3.4.22.6, Cp) 因具有纯天然、资源丰富、酶活性高等特点已成为一种重要的医药用酶^[1~3], 其中以注射治疗椎间盘突

出症的非手术疗法最为确切、显著和成功^[3,4,6]. 但由于该酶体内半衰期短且多次注射易引发免疫过敏反应^[6,7] 所以降低了该酶的临床应用效果, 而目前从

根本上解决上述问题的最有效方法,即对木瓜凝乳蛋白酶进行化学修饰的研究及应用鲜见报道。为了降低或消除 Cp 的免疫原性、延长其体内半衰期、增强其稳定性,作者开展了在小分子底物 N-乙酰-L-酪氨酸乙酯(N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester, ATEE)保护下,以无免疫原性的单甲氧基聚乙二醇(monomethoxypolyethylene glycol, mPEG, $M_r=5\ 000$)为修饰剂对 Cp 进行共价修饰的研究(另文发表)。本文在此基础上进一步对修饰产物进行初步的检测和分析研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与主要试剂 木瓜凝乳蛋白酶纯品,自制,达电泳纯;mPEG($M_r=5\ 000$),2,4,6-三硝基苯磺酸(trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS),均为 Sigma 公司产品;三聚氰氯(cyanuric chloride, cc),购于瑞士 Fluka 公司;ATEE,进口试剂,购于广州威佳生物技术公司;木瓜凝乳蛋白酶抗体,自制,抗血清效价经酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测为 10^6 ;辣根过氧化物酶标记的 Cp 抗体,由北京鼎国生物技术发展有限公司纯化标记;Sephadex G-75,Pharmacia 产品;十二烷基磺酸钠(SDS),上海生化试剂三厂;其余试剂为生化或分析纯试剂。

1.1.2 仪器设备 Wellscan MK3 型酶标分析仪,Wellwash 4MK2 型洗板机,均为芬兰雷勃集团产品;96 孔酶标板,购于宝泰克生物科技有限公司;凝胶成像系统,珠海黑马医学仪器有限公司;4 000 UV/Visible 紫外-可见吸收光谱仪,瑞典 Pharmacia Biotech 产品;F4500 荧光分光光谱仪,日本日立公司产品;P/ACE™ MDQ 毛细管电泳系统,美国 Beckman Coulter 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 活化修饰剂 mPEG₁ 的制备 参照 Abuchows-ki^[8] 方法稍加改进。三聚氰氯用前经无水苯(4A 分子筛除水)重结晶 2 次。

1.2.2 底物保护下 mPEG₁ 对 Cp 的化学修饰及分离纯化 Cp 溶于 0.1 mol/L pH9.0 硼酸缓冲液中,按 $n(\text{底物}):n(\text{酶})=100:1$ 的比例加入底物 ATEE,4 °C 放置 30 min,加入一定量活化的 mPEG₁,4 °C 反应 1 h,对 0.05 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液(含 $w=0.85\%$ 的 NaCl)透析过夜(透析袋截留相对分子质量为 8 000~10 000),冰冻干燥后用于毛细管电泳检测与分析。另将透析后的修饰反应物经 PEG-6000 浓缩后上 Sephadex G-75 层析柱,以 0.05 mol/L pH7.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗脱,收集各峰产物,冻干备用。

1.2.3 修饰产物的毛细管电泳检测与分析 采用全套 eCAP SDS 14-200 Kit 毛细管电泳体系:聚丙烯酰胺涂层的中性毛细管电泳柱,总长为 40 cm,有效长度 34 cm,内径 100 μm;样品缓冲液(0.12 mol/L Tris-HCl, $w=1\%$ 的 SDS, pH6.6);Orange G 参比标准;蛋白质检测混合物($M_r=14\ 200\sim 205\ 000$)以及 SDS 14-200 凝胶缓冲液。将上述修饰产物按该电泳体系操作说明书上的样品处理步骤进行处理后进样,在 UV 检测器波长 214 nm、运行电压 -15 kV 及 (25 ± 0.1) °C 柱温等运行模式下进行电泳。

1.2.4 酶水解活力测定 参照文献[9]方法测定酶活力。

1.2.5 平均氨基修饰度测定 采用 TNBS 法^[10]对修饰酶进行氨基修饰度测定。

1.2.6 抗原抗体结合力测定 采用 ELISA 法^[11]检测修饰酶的抗原抗体结合力。以待测样品的平均 $D_{490\text{nm}}$ 值为 P ,阴性血清的平均 $D_{490\text{nm}}$ 为 N ,计算 $P-N$ 值,并以原酶的 $P-N$ 值为 100%,计算 mPEG₁-Cp 与抗体的相对结合力(%)。

1.2.7 药代动力学参数测定(体内活力半衰期的测定) 分别将 Cp 和 mPEG₁-Cp 按 1 mg/kg 注射量一次性由耳缘静脉注入新西兰大耳兔体内,给药后隔时隔时采血 1 mL/只,低温离心(4 °C, 5 000 r/min, 5 min)分离血清,测定酶活力。用 MCPKP 药代动力学程序计算药代动力学各参数。

1.2.8 mPEG₁-Cp 的紫外光谱扫描分析 Cp (0.2 mg/mL)和 mPEG₁-Cp (6 mg/mL)分别在 200~400 nm 波长处进行紫外光谱扫描,测定紫外吸光光谱作比较分析。

1.2.9 mPEG₁-Cp 荧光发射光谱分析 以 0.05 mol/L pH7.0 磷酸缓冲液扫描基线后,分别测定 Cp (0.2 mg/mL)和 mPEG₁-Cp (6 mg/mL)在 230 nm 激发波长下的荧光发射光谱。

2 结果与分析

2.1 毛细管电泳(CE)对修饰产物组分及相对分子质量的测定与分析

由于常规的 SDS-PAGE 电泳不适于对 mPEG 修饰酶作进一步的分析^[8,12,13],因此本试验采用分辨率高的毛细管电泳体系对 mPEG₁ 修饰产物进行分析。依标准蛋白毛细管电泳图谱(图 1)绘制及求出标准蛋白相对分子质量的对数与相对迁移时间的倒数($1/t_{RM}$)的标准曲线及方程(图 2),并依待测修饰产物毛细管电泳图谱(图 3)中各峰迁移时间、积分面积得到 SDS-CE 分析结果(表 1)。

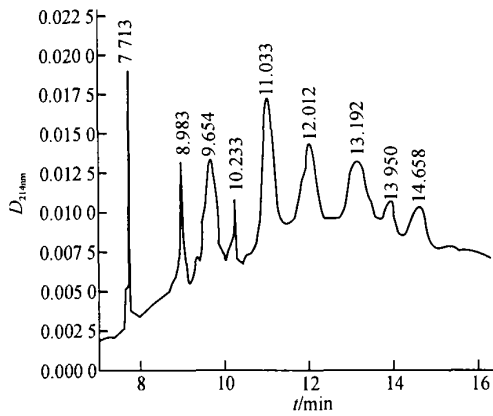
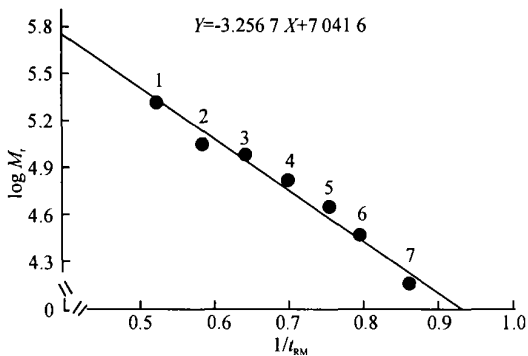


图1 标准蛋白毛细管电泳图谱

Fig. 1 Capillary electrophoretogram of test mixture using eCAP SDS 14-200 kit



- 1: 肌(浆)球蛋白 myosin ($M_r = 205\ 000$);
- 2: β -半乳糖苷酶 β -galactosidase ($M_r = 116\ 000$);
- 3: 磷酸化酶 b phosphorylase b ($M_r = 97\ 400$);
- 4: 牛血清蛋白 bovine serum albumin ($M_r = 66\ 000$);
- 5: 卵清蛋白 ovalbumin ($M_r = 45\ 000$);
- 6: 碳酸酐酶 carbonic anhydrase ($M_r = 29\ 000$);
- 7: α -乳清蛋白 α -lactalbumin ($M_r = 14\ 200$)

图2 标准蛋白质的相对分子质量对数与相对迁移时间的倒数的标准曲线

Fig. 2 Standard curve by plotting the log of the M_r vs $1/t_{RM}$ for each standard protein in the test mixture

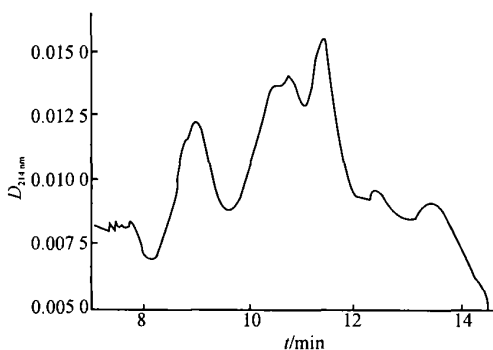


图3 修饰产物毛细管电泳图谱

Fig. 3 Capillary electrophoretogram of mPEG₁-modified chymopapain using eCAP SDS 14-200 kit

表1 毛细管电泳测定与分析结果

Tab. 1 The results by capillary electrophoresis

峰	迁移时间	每分子C _p 偶联的mPEG ₁ 数 ¹⁾	各峰积分面积比例 ²⁾
peak	migration time/min	mPEG ₁ numbers per molecule C _p	area percent/%
1	9.000	0	26.7
2	10.546	2.88	26.9
3	10.783	3.95	18.3
4	11.387	7.05	28.1

1) 本列各数据均以各 $1/t_{RM}$ 值代入标准方程 $Y = -3.2567X + 7.0416$ 求得各修饰产物相对分子质量, 并以 C_p 在 SDS 毛细管电泳中实测平均相对分子质量 ($M_r = 26\ 311$) 为计算基数, 求出平均每分子 C_p 偶联的 mPEG₁ 数目; 2) 峰 2、峰 3 积分面积比例合计 45.2%

从图3和表1可见: mPEG₁ 修饰产物经 CE 共得到4个峰: 峰1为未被 mPEG₁ 偶联的组分; 峰2为平均每分子 C_p 偶联3个 mPEG₁ 的低修饰度产物峰, 峰3为平均每分子 C_p 偶联4个 mPEG₁ 的低修饰度产物峰, 峰2、峰3因2组分相对分子质量较接近, 所以在图谱中较为靠近而被视为1个低修饰度产物峰, 其积分面积比例总计为45.2%; 峰4为平均每分子 C_p 偶联7个 mPEG₁ 的高修饰度产物峰, 其积分面积比例为28.1%, 低修饰度产物是高修饰度产物的1.6倍。由此可见, 在 mPEG₁ 修饰产物中以每分子 C_p 偶联3~4个 mPEG₁ 的修饰产物占较大比率, 因此低修饰度产物峰为主产物峰。经 Sephadex G-75 柱层析收集此低修饰度修饰酶, 进一步进行检测与分析。

2.2 mPEG₁-C_p 各指标的测定

修饰产物的平均修饰度、酶活力、免疫原性及体内活力半衰期的检测结果见表2。C_p 有多个亚型, 各亚型间氨基酸的组成数目也不尽相同(218、226或227个)^[14-15], 本试验按每分子 C_p 由218个氨基酸组成来统计, 至少有22个可修饰氨基(21个赖氨酸侧链的 ϵ -NH₂ 和1个N末端的 α -NH₂), 依 TNBS 法测得的平均氨基修饰率为37.7% 计算出平均每分子 C_p 偶联上8.3个 mPEG₁。TNBS 法测定结果与 SDS CE 测定结果相比稍高, 这一差异可能是由于 TNBS 法的副反应干扰^[10-13] 或 mPEG 活化衍生物本身的亲核性所致^[19]。

木瓜凝乳蛋白酶溶核术治疗椎间盘突出症的机理是将 C_p 注入椎间盘后作用于髓核中的大分子糖蛋白, 为能准确、真实地反映 mPEG₁-C_p 进入体内后作用于大分子蛋白质的作用特点, 本试验采用以大分子酪蛋白为作用底物的酶活性测定方法。从表2中可以看出, 在此修饰度下的 mPEG₁-C_p 免疫原性已经完全消失, 而残留酶活力为36.5%。

C_p 体内半衰期为220.6 min, mPEG₁-C_p 体内半衰期为360.4 min, 修饰酶体内半衰期是原酶的1.63倍。mPEG₁-C_p 在体循环中消除速率变慢, 这将有效

表 2 木瓜凝乳蛋白酶(Cp)与 mPEG₁-Cp 各指标测定结果

Tab. 2 Analysis results of chymopapain (Cp) and mPEG₁-Cp

酶 enzyme	平均氨基修饰率 ¹⁾ average ratio of modified-NH ₂ /%	每分子 Cp 偶联的 mPEG ₁ 数 mPEG ₁ numbers per molecule Cp	相对酶活力 relative activity/ %	免疫原性 antigenicity/ %	体内活力半衰期 ²⁾ half-life <i>in vivo</i> /min
Cp	0	0	100	100	220.6
mPEG ₁ -Cp	37.7	8.3 ³⁾	36.5	0	360.4

1) TNBS 法测定, 氨基修饰率=1-氨基残留率; 2) 此列仅列出体内活力消除半衰期, 其余各药代动力学参数略; 3) 按每分子 Cp 中含有 22 个可修饰氨基计算而得

提高药用酶在体内的作用时间, 持续地对靶目标发挥药效. 半衰期延长的可能机理为: 1) mPEG₁-Cp 由于解除了免疫原性, 因而注入体内后不会通过免疫反应而被清除; 2) 偶联的大分子长链在蛋白分子表面产生空间位阻效应, 减弱了各种水解酶对其的降解及自水解, 从而有效地延长了在体内循环系统中的保留时间; 3) 修饰后的 mPEG₁-Cp 增加了相对分子质量及分子体积, 降低了肾小球的排除速率.

2.3 紫外吸收光谱分析

Cp 和 mPEG₁-Cp 的紫外吸收光谱见图 4、5.

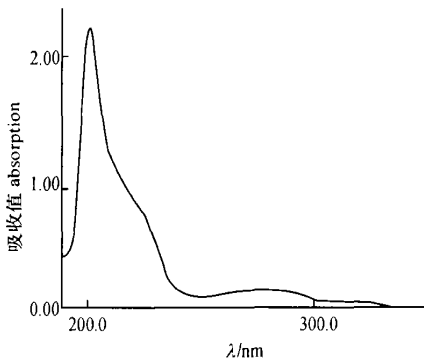


图 4 木瓜凝乳蛋白酶(Cp 0.2 mg/mL)的紫外吸收光谱

Fig. 4 UV absorption spectrum of chymopapain

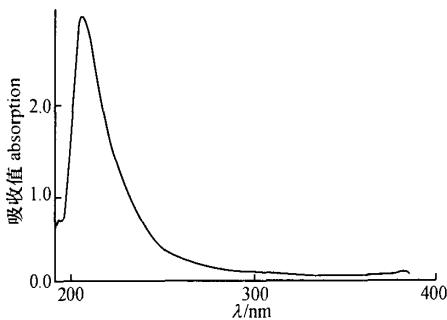


图 5 mPEG₁-木瓜凝乳蛋白酶(6 mg/mL)的紫外吸收光谱

Fig. 5 UV absorption spectrum of mPEG₁-chymopapain

从图 4、5 可见, mPEG₁-Cp 较 Cp 在第 1 吸收峰处发生微弱改变, 由 202.8 nm 增加到 205.9 nm, 有轻微红移现象(3.1 nm), 说明修饰酶的个别共价键较原酶发生改变, 这种变化进一步提示 mPEG₁ 与 Cp 的共价结构形成; Cp 修饰后, 在原酶 279.2 nm 处的第 2 吸收峰消失, 也说明覆盖于 Cp 表面的 mPEG₁ 的存

在. 由于 mPEG₁ 部分屏蔽了 Cp 表面, 尤其是屏蔽了在 250~280 nm 附近有紫外吸收的 Tyr、Trp 和 Phe 而导致修饰后第 2 吸收峰的消失. 另外, 由于屏蔽作用, mPEG₁-Cp 峰吸收值也明显下降.

2.4 荧光发射光谱分析

将酶溶解液 PBS 扫基线, 发现 PBS 也有轻微荧光发射特征(图略), 其发射峰在 470~500 nm 附近. 扣除 PBS 的荧光发射峰, Cp 和 mPEG₁-Cp 的荧光发射图谱及峰值见图 6、7.

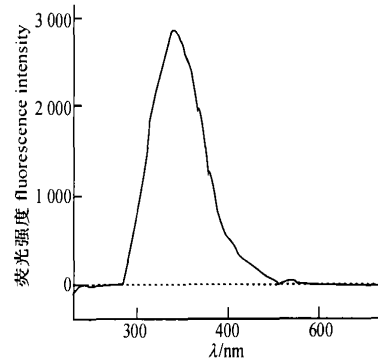


图 6 木瓜凝乳蛋白酶(Cp 0.2 mg/mL)的荧光发射光谱

Fig. 6 Fluorescence spectrum of chymopapain

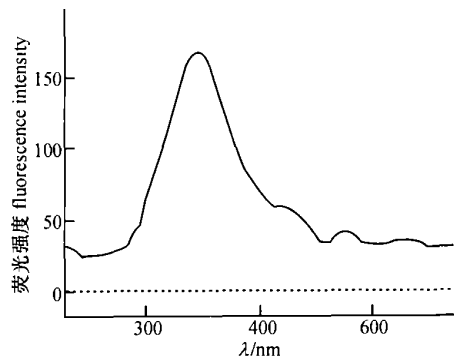


图 7 mPEG₁-木瓜凝乳蛋白酶(6 mg/mL)的荧光发射光谱

Fig. 7 Fluorescence spectrum of mPEG₁-chymopapain

从图 6、7 可见, 在激发波长 $\lambda = 230$ nm 下, mPEG₁-Cp 与 Cp 的光谱峰形相似, 但 mPEG₁-Cp 发射波长轻度红移, 即由 339.4 nm 增加到 345.4 nm, 且荧光强度明显减弱. 这正是由于 Cp 分子表面的 mPEG₁ 层对 Cp 分子中荧光发射基团的屏蔽作用所致.

3 讨论

目前,药用酶蛋白 PEG 化学修饰已成为改善和提高天然酶酶学和药理学性质的重要手段之一。然而 mPEG 对酶的修饰是随机修饰,在修饰酶分子上的抗原决定簇的同时,也可能修饰了酶活性部位的氨基或用以维持酶活性中心天然构象的有关氨基而导致酶活力损失。因此,本试验采用底物 ATEE 保护下 cc-mPEG₁ 对药用木瓜凝乳蛋白酶进行共价修饰,对修饰酶的分析结果表明:mPEG₁-Cp 抗原抗体结合能力完全消失,体内半衰期提高 1.6 倍,同时酶活力保持在 36.5%,可见 mPEG₁-Cp 较 Cp 具有更优的临床应用价值。mPEG₁ 修饰后酶活力下降的原因可能为:1)Cp 分子表面偶联的 PEG 层造成了空间位阻效应,使作用底物不易与酶活性位点接近和相互作用而造成 mPEG₁-Cp 对底物的催化活性明显下降;2)mPEG₁ 对 Cp 的修饰是随机修饰,虽在底物保护下活性中心不被破坏,但随机 PEG 化极有可能因被修饰的 Lys 靠近酶活性中心,或本身是用于维持酶活天然构象的有关氨基,致使酶天然结构发生了一定程度的改变,而导致酶活力下降。

研究中还发现:不同的 PEG 活化衍生物对修饰产物的性能(反应活性、毒性、产物活性及稳定性等)有不同的影响^[17]。本试验采用的 cc 法活化 mPEG 虽然是较为经典和常用的 PEG 活化方法之一,但与其他 PEG 的活化衍生物如 ss-PEG、sc-PEG 相比,其在反应选择性、修饰产物生物活性等方面存在一定的不足。因此开展不同 PEG 活化衍生物对 Cp 进行化学修饰的比较研究,并最终获得性质更优的 mPEG₁-Cp 产物具有重要意义,这一研究工作有待今后进一步深入进行。

对修饰产物的分析和结构测定已成为 PEG 修饰蛋白研究的重点和难点之一。由于修饰过程的随机性和修饰产物的多态性,给检测和分析工作带来较大难度^[12,18],目前尚无统一的分析方法和程序。对修饰产物的均一性及相对分子质量的检测,常规 SDS-PAGE 电泳存在一定的不足,而本试验采用分辨率高的 eCAP SDS 14-200 Kit 毛细管电泳体系,对 mPEG₁-Cp 修饰产物进行了定性定量的分析,取得了较好效果。

参考文献:

[1] JANSEN E F, BALLS A K. Chymopapain: a new crystalline proteinase from papaya latex[J]. J Biol Chem, 1941, 137: 459-460.
[2] ZUCKER S, BUTTLE D J. The proteolytic activities of chymopapain, papain, papaya proteinase III[J]. Biochimica et

Biophysica Acta 1985, 828(2): 196-204.

- [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): 1835-1841.
[5] SUN R X, LU Z Y, WIJENES J, et al. Large scale and clinical grade purification of syndecan-1⁺ malignant plasma cells[J]. Journal of Immunological Methods, 1997, 205(1): 73-79.
[6] 吴显荣,张耕耘.木瓜凝乳蛋白酶[J].热带作物科技,1992,4:5-7.
[7] 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.
[8] ABUCHOWSKI A, VAN E T, PALCZUK N C, et al. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol[J]. J Biol Chem, 1977, 252(11): 3578-3581.
[9] 舒薇,郭勇.木瓜凝乳蛋白酶的自水解作用及其对分离纯化的影响[J].华南农业大学学报,2005,26(1): 78-82.
[10] HABEED A F S A. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid[J]. Analytical Biochemistry, 1966, 14: 328-336.
[11] 余冰宾.生物化学实验指导[M].北京:清华大学出版社,2004.222-225.
[12] 李伟军,林炳承,苏志国.聚乙二醇共价修饰药用蛋白质的分析方法[J].分析化学,2001,29(2): 228-231.
[13] 李伟军,张颖,王云山,等.聚乙二醇修饰牛胰核糖核酸酶[J].药物生物技术,2001,8(3): 147-151.
[14] KUNIMITSU D K, YASUNOBA K T. Chymopapain IV—The chromatographic fractionation of partially purified chymopapain and the characterization of crystalline chymopapain B[J]. Biochem Biophys Acta, 1967, 139(2): 413-417.
[15] 蔡小玲.木瓜凝乳蛋白酶的分离纯化及活性研究[D].广州:华南理工大学生物科学与工程学院,2004.
[16] BULLOCK J, CHOWDHURY S, SEVERDIA A, et al. Comparison of results of various methods used to determine the extent of modification of methoxypolyethylene glycol 5000-modified bovine cupric-zinc superoxide dismutase[J]. Anal Biochem, 1997, 254: 254-262.
[17] 姜忠义,许松伟,高蓉.生物分子化学修饰用聚乙二醇衍生物的合成及应用[J].高分子通报,2002,1: 34-40.
[18] 姜忠义,高蓉,许松伟,等.蛋白质和多肽类药物分子化学修饰的研究进展[J].中国生化药物杂志,2002,23(2): 102-104.

【责任编辑 李晓卉】