

聚乙二醇衍生物修饰胰蛋白酶的研究

董伟 吴进 刘红 杨生涛 王伟伟

(南京理工大学化工学院 , 江苏 南京 210094)

[摘要] 采用各种类型的聚乙二醇衍生物修饰胰蛋白酶 , 对所修饰酶的酶学性质进行了评价并与原酶比较 . 结果表明 : 修饰酶的残存活力受修饰剂的结构、分子量和修饰化度的影响较大 , 其中分子量为 5 000 或 6 000 的 2 种聚乙二醇衍生物所修饰的酶活力升高 . 所有修饰酶的热稳定性显著改善 , 其最适 pH 值没有发生变化 , 修饰酶的 K_m 值有所增加 . 实验表明采用合适的修饰剂对胰蛋白酶进行适度地修饰不会降低酶的活性和改变酶性能 .

[关键词] 聚乙二醇衍生物 胰蛋白酶 化学修饰

[中图分类号] Q814 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2006)03-0053-05

Studies on the Modification of Trypsin with Polyethylene Glycol Derivatives

Dong Wei , Wu Jin , Liu Hong , Yang Shengtao , Wang Weiwei

(School of Chemical Engineering , Nanjing University of Science and Technology , Nanjing 210094 , China)

Abstract : Trypsin was modified by a series of PEG derivatives , then the properties of modified enzymes were evaluated and were compared with native enzyme . The results show that the activity of modified enzymes depended on the structure , molecular weight of PEG derivatives and the degree of modification , and the activity of enzyme modified by PEG derivatives ($M = 5\,000$ or $6\,000$) was enhanced . The thermal stability of all modified enzymes was improved significantly . The modification does not change the optimum pH value of trypsin . The K_m values of the conjugates are slightly higher than the native enzyme . The temperate modification did not reduce enzyme 's activity .

Key words PEG derivatives , trypsin , chemical modification

化学修饰作为提高多肽、核酸和多糖等生物分子的临床和生物学性能的重要手段得到日益广泛的研究和应用 . 化学修饰的效果好坏很大程度上取决于化学修饰剂的性能优劣 . 在众多的化学修饰剂中 , 聚乙二醇 (Polyethylene glycol , PEG) 及其衍生物由于具有线性、无毒、无免疫原性以及良好的生物相容性等优良性能而在化学修饰中应用最广泛^[1] . 聚乙二醇对蛋白质的化学修饰已被证明具有颇多优点 . 通过对蛋白质实施 PEG 化 , 降低了其免疫原性和体内清除的速率 , 延长了其在体内的半衰期 , 增加了蛋白质的溶解性和热力学稳定性以及抗蛋白酶降解的能力^[2] .

胰蛋白酶 (Trypsin) 以蛋白酶原的形式存在于动物胰脏中 , 一般从牛、羊和猪胰脏中提取 , 它能够催化水解碱性氨基酸的羧基所形成的肽键、酰胺键和酯键 . 国外的科研工作者关于胰蛋白酶的化学修饰已经做了不少研究 . Elsner 等人^[3]用小分子物质修饰胰蛋白酶 , 实现胰蛋白酶的胍基化和琥珀酰化 , 考察化学修饰对酶催化行为和稳定性的影响 ; Gaertner 等人^[4]使用氰尿酸氯活化的单甲氧基聚乙二醇 (mPEG , $\text{CH}_3\text{O} - \text{PEG} - \text{OH}$) 和对硝基苯酚氯甲酸酯活化的 mPEG (mPEG - NPC) 作为修饰剂 , 并对修饰酶进行了表征 ; Zalipsky 等人^[5]使用 PEG - SS (聚乙二醇琥珀酰亚胺琥珀酸酯) 和 PEG - CS (羧甲基化聚乙二醇琥珀酰亚胺酯) 修饰胰蛋白酶 , 比较了两种修饰剂的优劣 . 本研究工作是采用分子量为 2 000 - 10 000 的 4 种不同类型的 PEG 修饰剂来修饰胰蛋白酶 , 详细探讨各种修饰剂对胰蛋白酶的酶学性能的影响 , 并测定修饰酶的

收稿日期 : 2006-04-17 .

基金项目 : 江苏省高校高新技术发展资助项目 (JHB04 - 037) .

作者简介 : 董伟 , 1964— , 副教授 , 主要从事蛋白质化学修饰和阳离子聚合物基因传递系统的教学与研究 .

E-mail : dwmailcn@ yahoo. com. cn

修饰化度、酶活、热稳定性、pH 稳定性和 K_m (米氏常数)值,研究胰蛋白酶的酶学性能变化,进而评价所合成的各种修饰剂。

1 材料和方法

1.1 材料

单甲氧基聚乙二醇(mPEG)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、L-赖氨酸、2,4,6-三硝基苯磺酸钠(TNBS)、N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(BAEE)均购于美国 Sigma 公司;PEG4000、PEG6000(化学纯)购于广州化学试剂经营批发部(进口分装);N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)购于东京化成工业株式会社;胰蛋白酶购于美国 Invitrogen 公司;考马斯亮蓝 G250 购于 Fluka 公司;牛血清白蛋白(BSA)购于上海化学试剂公司;其它试剂均为国产市售分析纯试剂。

1.2 聚乙二醇衍生物的合成

按文献方法分别合成了 PEG-SA, mPEG-SA^[6], mPEG-CA^[7]和 BmPEG^[8]4 种类型的聚乙二醇衍生物,各种类型衍生物结构式如图 1。

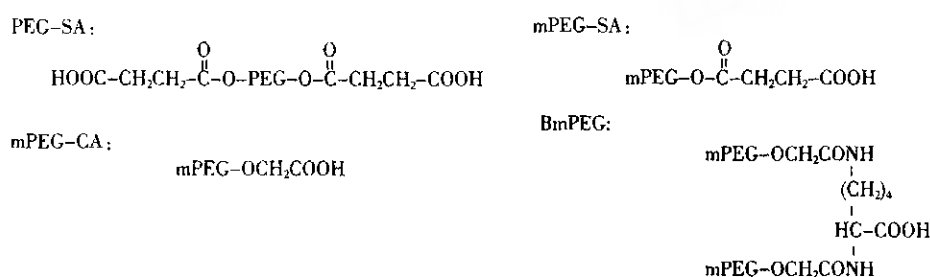
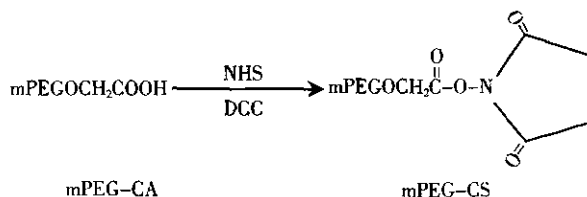


图 1 各种类型 PEG 衍生物结构式

为了使所合成的 PEG 衍生物能够在较温和的条件下直接修饰蛋白质或酶,避免修饰过程中蛋白质的高级结构的破坏和活性丧失,需进行活化,使其与 NHS 和 DCC 反应,形成琥珀酰亚胺活性酯。这样上述 PEG-SA, mPEG-SA, mPEG-CA 和 BmPEG 就转变成相应类型的蛋白质修饰剂 PEG-SS, mPEG-SS, mPEG-CS 和 BmPEG-Lys-NHS。以 mPEG-CA 转变为 mPEG-CS 为例来说明末端羧基活化的过程如下:



1.3 胰蛋白酶的化学修饰

称取一定量的胰蛋白酶(5 mg)溶于 5 mL pH 9.3 硼砂-氢氧化钠缓冲溶液中,配制酶浓度为 1 mg/mL,加入一定量活化聚乙二醇修饰剂,在常温下(20-25 °C)磁力搅拌反应 4 h。所加入的修饰剂量与胰蛋白酶分子中可被修饰的氨基量成一定的摩尔比。为了使修饰反应能够充分进行,反应中 PEG 修饰剂用量充分过量,PEG 修饰剂: $\text{NH}_2 = 5:1$ (摩尔比),胰蛋白酶中可被修饰的氨基为 15 个,即 PEG 修饰剂: Trypsin = 75:1。

1.4 修饰酶的纯化

采用透析法进行蛋白质纯化,透析液为 pH = 8.2 Tris-HCl 缓冲液,透析在 4 °C 下进行。透析袋规格为 D36 mm、截留分子量 8 000-14 000。

1.5 修饰酶的蛋白质浓度的测定

采用 Bradford 检测法^[9]测定蛋白质浓度。

1.6 胰蛋白酶修饰化度测定

采用三硝基苯磺酸钠(TNBS)法来测定胰蛋白酶修饰化度^[10]。取 1.0 mL 0.01%(W/V)TNBS 水溶液至 1.5 mL Tris-HCl(pH 8.2)缓冲溶液中,混合均匀后作为参比;另取两只试管分别加入 1.0 mL TNBS 水溶液,随后依次加入 1.5 mL 胰蛋白酶和修饰酶(蛋白浓度均为 0.25 mg/mL),混合均匀后,室温下静置 30

min 后,在 420 nm 处测定吸光度值.

1.7 胰蛋白酶酶活性测定^[11]

为简单起见,本文只测定其相对酶活的变化,即比活力的变化.测定胰蛋白酶酶活时采用的底物为 N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(BAEE);用 0.10 mol/L pH=8.0 Tris-HCl 缓冲液(内含 10 mmol/L Ca^{2+})配制 0.5 mmol/L BAEE 底物溶液.

1.8 胰蛋白酶及修饰酶的热稳定性的测定

选择了两个温度(37℃,60℃)来衡量酶修饰前后热稳定性的变化,具体操作方法如下:确定原酶与修饰酶的浓度均为 0.5 mg/mL,将其放入相应温度的恒温箱中,每隔一定时间取出酶液,室温下测定其酶活力,最后将测得的各个时段的酶活与各自修饰酶恒温前的初始酶活相比较,计算出经过不同时间后的酶活力残存百分比,从而可以比较热稳定性的变化.

1.9 pH 值对胰蛋白酶及修饰酶活性的影响

选取不同 pH 值(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、9.5 和 10)的底物溶液,并配制 1 mg/mL 的酶溶液,测出在上述不同 pH 值条件下的酶活力,以最适 pH 值条件下的酶活力为 100%,计算出该酶在其余 pH 值下活性残留百分比,观察酶活性随 pH 值的变化趋势,并比较原酶与修饰酶的最适 pH 值变化情况.

1.10 胰蛋白酶及修饰酶 K_m 值的测定

米氏常数 K_m 值的测定采用双倒数作图法(Lineweaver-Burk 法)^[12].

2 结果与讨论

2.1 酶的活性残存与修饰化度关系

在相同摩尔比的反应条件下,不同类型修饰剂修饰胰蛋白酶所得到的修饰化度是不同的,酶的残存活力也不相同.修饰酶的活力和修饰化度的关系如图 2 所示.值得强调的是,当亲电的 PEG 修饰剂和亲核的氨基发生取代反应时,胰蛋白酶分子中游离的氨基都有可能被修饰,此过程属于随机修饰,测得的修饰化度为平均修饰化度.从图 2 中可以看出,胰蛋白酶被同一种类型的修饰剂修饰后,其修饰化度随着修饰剂分子量的增加而降低,例如:PEG4000-SS-Trypsin 修饰化度为 51.0%,而 PEG6000-SS-Trypsin 修饰化度则为 24.4%.修饰化度对修饰酶活力影响较大.选择合适的修饰剂、进行适度的修饰,可以使胰蛋白酶的活力升高,过度修饰,会降低酶的活性.图中结果显示 PEG6000-SS-Trypsin 和 mPEG5000-SS-Trypsin 的酶活力比原酶的活力高,而其它修饰酶的酶活力比原酶低.分析原因,适度的修饰不但不会影响底物与酶活性中心的结合,反而因其对酶构象的稳定,并使酶对外部环境的适应性增强,使酶的活性有所提高,但也有可能是因为修饰使其具有更活泼更易催化的构型.修饰化度愈大,修饰剂在胰蛋白酶分子表面形成的屏障愈突出,对底物与活性位点结合的阻碍作用愈大,使得酶的活性有所降低.

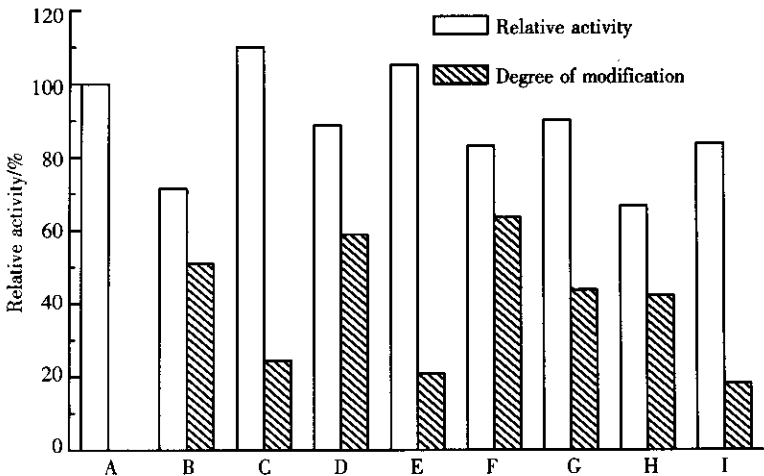


图 2 胰蛋白酶及其修饰酶的活力、修饰化度关系

A. Native Trypsin B. PEG4000-SS-Trypsin C. PEG6000-SS-Trypsin D. mPEG2000-SS-Trypsin E. mPEG5000-SS-Trypsin
F. mPEG2000-CS-Trypsin G. mPEG5000-CS-Trypsin H. 2mPEG2000-Lys-Trypsin I. 2mPEG5000-Lys-Trypsin

2.2 胰蛋白酶热稳定性变化

考察了原酶与 8 种修饰酶的热稳定性变化趋势. 从实验数据看, 经过化学修饰以后, 胰蛋白酶的热稳定性有了显著提高. 但不同类型的修饰剂对胰蛋白酶热稳定性的改善程度是不一样的; 而同一类型不同分子量的 PEG 所修饰的胰蛋白酶的热稳定性没有太大的差别. 为清晰可见, 每种类型修饰剂选择 1 个, 将其在 37 ℃ 热稳定性变化趋势绘于图 3 中. 从图中可以看出, 热稳定性的顺序如下:

BmPEG > mPEG - CS > mPEG - SS > PEG - SS > 原酶

胰蛋白酶及其修饰酶在 60℃ 下的热稳定性变化规律也是一致的. 放置 0.5 h 后, 活力残留数据见表 1. 胰蛋白酶偶联 PEG 链后, 维持了蛋白质的天然构象, 增强了蛋白质的刚性, 从而改善了胰蛋白酶的热稳定性.

2.3 pH 值对酶活性的影响

具体的各酶在不同 pH 值下活力变化情况见图 4. 从图中可以看出胰蛋白酶经过聚乙二醇衍生物修饰后, 其酶的最适 pH 值并没有发生变化, 其最适 pH 值保持在 pH = 8.0, 在这一 pH 值下不管是原酶还是修饰酶都具有最好的催化活性. 在 pH 值小于 8.0 的溶液中, 原酶与修饰酶的活力变化趋势几乎一样, 修饰酶并没有表现出比原酶更好的耐酸性; 但是, 在 pH 值大于 8.0 时, 修饰酶活力下降趋势比原酶要慢, 体现出较好的耐碱性.

2.4 胰蛋白酶修饰前后 K_m 值的变化

依照双倒数作图法求出胰蛋白酶及其修饰酶的 K_m 值, 其数值见表 2.

表 2 胰蛋白酶及修饰酶的 K_m 值	
Enzyme	K_m /(mmol/L)
Trypsin	0. 023
PEG4000 - SS - Trypsin	0. 032
PEG6000 - SS - Trypsin	0. 044
mPEG2000 - SS - Trypsin	0. 037
mPEG5000 - SS - Trypsin	0. 039
mPEG2000 - CS - Trypsin	0. 028
mPEG5000 - CS - Trypsin	0. 034
2mPEG2000 - Lys - Trypsin	0. 032
2mPEG5000 - Lys - Trypsin	0. 063

从表 2 中可以看出, 胰蛋白酶经各种修饰剂修饰以后其米氏常数 K_m 值均有不同程度的增加, 这可近似表明修饰酶对底物的亲和力较原酶小. 由于聚乙二醇与蛋白质相偶联, 在蛋白质分子的表面形成一个柔性的屏障, 在一定程度上阻碍了底物与活性中心的结合, 即酶对底物的亲和力降低; 但是在蛋白质分子表面偶联上 PEG 分子, 又增加了蛋白质表面的亲水性, 从而酶与底物的亲和力会略微提高. 因此可以发现与原酶的 K_m 值相比, 虽然修饰酶的 K_m 值增加, 但幅度并不是很大, 并不会影响修饰酶的应用. 在修饰酶中, 2mPEG5000 - Lys - Trypsin 的 K_m 值最大, 这可能与它的结构和分子量有关. 这种酶是分枝型的聚乙二醇所修饰的, 它比线性修饰剂所形成的屏障更大; 并且其分子量也最大, 所具有的链更长, 因此对底物与活性位点结合的阻碍更大.

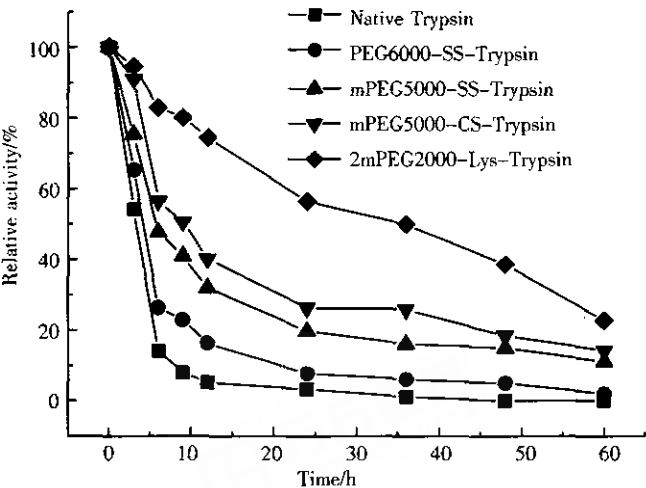


图 3 37 ℃ 下胰蛋白酶及其修饰酶的热稳定性
表 1 60 ℃ 下原酶与修饰酶热稳定性数据

Enzyme	Relative activity/% after 30 min at 60 ℃
Native Trypsin	2. 8
PEG4000 - SS - Trypsin	4. 6
PEG6000 - SS - Trypsin	7. 5
mPEG2000 - SS - Trypsin	12. 3
mPEG5000 - SS - Trypsin	11. 7
mPEG2000 - CS - Trypsin	14. 5
mPEG5000 - CS - Trypsin	18. 5
2mPEG2000 - Lys - Trypsin	37. 9
2mPEG5000 - Lys - Trypsin	19. 7

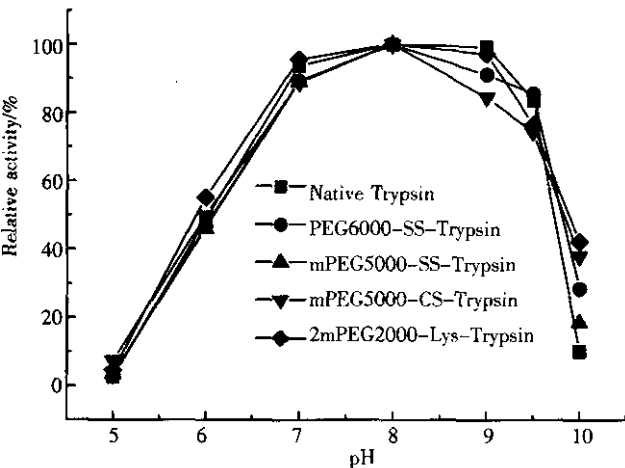


图 4 不同 pH 值条件下胰蛋白酶及修饰酶活力残存百分数

3 结论

采用各种类型的聚乙二醇衍生物修饰胰蛋白酶.从修饰的结果可以看出,修饰酶的残存活力受多种因素影响,其中修饰剂的结构、分子量及酶的修饰化度对修饰酶的残存活力影响显著,但各种修饰酶的热稳定性显著改善,这主要取决于修饰剂的结构,与其分子量的大小关系不大;其最适 pH 值并没有发生变化;由于偶联 PEG,修饰酶的 K_m 值有所增加.通过对修饰酶的酶学性质的表征,比较得出分枝型修饰剂 2mPEG 和 mPEG-CS 修饰蛋白质性能优于可降解的 PEG-SS 和 mPEG-SS.

[参考文献]

- [1] Koumenis I L, Shahrokh Z. Modulating pharmacokinetics of an anti-interleukin 8 by amine-specific PEGylation with preserved bioactivity[J]. Int J Pharm, 2000, 198(1): 83-95.
- [2] Yohkoder, Ayako Matsushima, Misao Hiroto, et al. Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications[J]. Prog Polym Sci, 1998, 23(7): 1233-1271.
- [3] Elsner C, Grahn S, Jakubke H D. Effects of chemical modification of lysine residues in trypsin[J]. J Mol Catal B-Enzym, 2000, 8(4): 193-200.
- [4] Gaertner H F, Puigserver A J. Increased activity and stability of polyethylene glycol-modified trypsin[J]. Enzyme Microb Tech, 1992, 14(2): 150-155.
- [5] Zalipsky S, Edison N J. Active carbonates of polyalkylene oxides for modification of polypeptides: US, 5122614[P]. 1992-06-16.
- [6] Caliceti P, Veronese F M. Immunogenic and tolerogenic properties of monomethoxy poly(ethylene glycol) conjugated proteins[J]. Farmaco, 1999, 54(7): 430-437.
- [7] Garfield P, Royer G M. Anantharmaiah peptide synthesis in water and use of immobilized carboxypeptidase Y for deprotection[J]. J Am Chem Soc, 1979, 101(12): 3394-3396.
- [8] 何明磊, 苏志国. 合成分枝型聚乙二醇的简便新方法[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(8): 1495-1498.
- [9] Zor T, Selinger Z. Linearization of the bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies[J]. Anal Biochem, 1996, 236(2): 302-308.
- [10] Snyder S L. An improved 2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid method for the determination of amines[J]. Anal Biochem, 1975, 64: 284-287.
- [11] 蒋传葵, 金承德, 吴仁龙, 等. 工具酶的活力测定[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982.
- [12] 袁勤生. 现代酶学[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2001.

[责任编辑: 丁蓉]