

• 研究论文 •

固定化乙酰胆碱酯酶的制备及其特性研究

陈军辉^{*,a} 史倩^a 陈晨^{a,c} 李鑫^a
曹为^a 郑立^a 王小如^{a,b}^(a) 国家海洋局第一海洋研究所 海洋生态研究中心 青岛 266061^(b) 厦门大学化学化工学院 厦门 361005^(c) 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306

摘要 本研究以期研制出能重复使用的固定化乙酰胆碱酯酶(AChE), 为天然产物复杂体系中 AchE 抑制剂筛选新方法的发展奠定基础. 以氨基化硅胶(APS-Si)微球为载体, 戊二醛为交联剂对乙酰胆碱酯酶进行交联固定化, 并研究了酶的最佳固定化条件和固定化酶的性质. 结果表明, 0.05 g 氨基化硅胶微球载体, 用戊二醛溶液活化 6 h 后, 在给酶量 5 U, 28 °C 固定 16 h 条件下, 得到固定化酶的活性最大. 固定化酶在常温(20~40 °C), 以及较宽 pH 范围内(pH 6~10)均具有较高的活性, 并且具有良好的保存稳定性和可重复利用率, 为基于固定化靶酶亲和-色谱质谱联用分析快速筛选乙酰胆碱酯酶抑制剂新方法的发展奠定了基础.

关键词 乙酰胆碱酯酶; 固定化酶; 亲和分离材料; 氨基化硅胶

Preparation and Characteristic Research of
Immobilized AcetylcholinesteraseChen, Junhui^{*,a} Shi, Qian^a Chen, Chen^{a,c} Li, Xin^a
Cao, Wei^a Zheng, Li^a Wang, Xiaoru^{a,b}^(a) Research Center for Marine Ecology, The First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061^(b) College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005^(c) College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306

Abstract A new method for preparation of a reusable immobilized acetylcholinesterase (AChE) was developed in order to lay a foundation for screening AchE inhibitors from natural products. AchE was immobilized on aminated silica gel microspheres with glutaraldehyde as cross-linking reagent. The optimum conditions and properties of immobilized enzyme were investigated. The optimal immobilization process was as follows: 0.05 g of aminated silica gel microspheres was activated by glutaraldehyde solution for 6 h, and mixed with AChE solution with the activity of 5 U. Then, the mixture was shook for 16 h at 28 °C. The immobilized enzyme produced by this method had the highest enzyme activity, and it could remain better activity with a wide range of pH (pH 6~10) at room temperature (20~40 °C). The immobilized AChE showed higher storage stability and could be used repeatedly.

Keywords acetylcholinesterase; immobilized enzyme; affinity separation material; aminated silica gel

* E-mail: jhchen@fio.org.cn

Received July 23, 2011; revised November 22, 2011; accepted December 9, 2011.

Project supported by the National Natural Scientific Foundation of China (No. 20905017), the Science Foundation for Youth Scholars of State Oceanic Administration (No. 2010140) and the Primary Scientific Foundation of the First Institute of Oceanography (No. 2010G25).

国家自然科学基金(No. 20905017)、国家海洋局青年基金(No. 2010140)和海洋一所基本科研业务专项(No. 2010G25)资助项目。

天然产物在新药研究中发挥着重要作用,但是,目前流行的基于活性追踪的天然药物化学研究模式耗时长、费用高、效率低,是制约天然药物发展的瓶颈。近年来基于药物靶标生物分子为固定相的亲色谱成为天然药物活性成分快速筛选的有效方法,在国际上得到了广泛的关注^[1-3],也已经成为我国中药、天然产物活性成分快速筛选研究的热点^[4-7]。用做生物亲和色谱固定相配位体的生物大分子主要包括:蛋白质、酶、抗体、受体、膜、细胞、DNA等,近年来的研究成果表明,在基于生物分子亲和-色谱质谱联用分析快速筛选天然药物活性成分的各种方法之中,基于靶标酶抑制剂筛选的模式应用最为广泛,例如,乙酰胆碱酯酶、血管紧张素转化酶、葡萄糖苷酶等酶的抑制剂筛选方法等^[8-11]。由于基于固定化靶标酶的筛选方法,固定化靶酶可以重复使用、靶酶用量小、成本低、易于推广等优点,在复杂体系活性成分快速筛选研究领域具有广阔的发展前景。

乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AchE)在人体中主要存在于神经肌肉组织的突触后膜上,已知其主要功能是催化乙酰胆碱的分解,在胆碱能神经纤维的信号传导中扮演重要角色。AchE与人类阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)的发生密切相关,现今对AD的治疗主要是采用乙酰胆碱酯酶抑制剂(如他克林、加兰他敏、石杉碱甲等),通过提高患者体内的乙酰胆碱水平,延缓乙酰胆碱的水解速度,从而发挥其对AD的治疗作用^[9,12]。目前,国内外很多科研工作者致力于从天然产物中筛选AchE抑制剂,然而筛选AchE抑制剂需要大量AchE溶液,价格昂贵,因此,研制能重复使用的固定化AchE,结合色谱质谱分析技术用于天然产物复杂体系中AchE抑制剂的筛选具有重要意义。

近年来,关于固定化乙酰胆碱酯酶的研究报道较多,但是主要是将乙酰胆碱酯酶固定化,进行生物传感器的研制^[13,14],而研制固定化乙酰胆碱酯酶用于天然产物中乙酰胆碱酯酶抑制剂的筛选研究还未见报道。本研究拟以氨基化硅胶微球为载体,以电鳗AchE为配基,研制可重复使用的固定化乙酰胆碱酯酶。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);全温震荡培养箱 HZP-150 型(上海精宏实验设备有限公司);电子天平(塞多利斯科学仪器(北京)有限公司);调温电热套(北京永光明医疗仪器厂);实验用水为自制 Milli-Q 超纯水(Millipore 公司)。

硅胶(Davisil, grade 643, 200~425 mesh, 150 Å,

99%)购自 Sigma 公司;电鳗乙酰胆碱酯酶(AChE)、碘化硫代乙酰胆碱(ATChI)和 5,5-二硫二硝基苯甲酸(DTNB)均购自 Sigma 公司; γ -氨基丙基三甲氧基硅烷(APS)购自 Alfa Aesar 公司;盐酸为优级纯;其它试剂均为分析纯。

1.2 氨基化硅胶微球载体的制备

将 2.0 g 硅胶微球用 5% HCl 煮沸 45 min,然后用超纯水清洗干净,于 80 °C 条件下烘干 24 h。将 0.50 g 活化后的硅胶微球载体置于 20 mL 含 0.5% γ -氨基丙基三甲氧基硅烷(APS)的甲苯溶液中,90 °C 回流 24 h。将键合了 APS 的硅胶(APS-Si)用丙酮洗涤数次,于室温下干燥后,置于烘箱中 110 °C 干燥 6 h,储存备用。

1.3 AchE 固定化方法

精密称取 0.050 g APS-Si 置于 5.0 mL 离心管中,在 2.0 mL 0.1 mol/L 的磷酸缓冲溶液(pH=7.4)中浸渍一段时间,然后加入 1.0 μ L 浓度为 50%的戊二醛溶液,28 °C 条件下恒温震荡 6 h,之后用超纯水洗涤,直至清洗液中无戊二醛为止,抽滤至干。在交联后的硅胶载体中加入 1 mL 0.1 mol/L 的磷酸缓冲溶液(pH=7.4)和 5 U AchE 液(122 μ L),于 28 °C 震荡固定 16 h,反应完成后依次用 3.5% NaCl 溶液、超纯水洗涤数次,直至洗净未固定化的 AchE,加入 3.0 mL 含有 0.02% NaN₃ 的磷酸盐缓冲液,保存备用。

1.4 AchE 活性检测方法

参照 Ellman^[15]的方法稍作改进,取 250 μ L 上述固定化酶,加入 40 μ L 浓度为 0.5 mmol/L 5,5-二硫二硝基苯甲酸(DTNB),于 37 °C 预热 10 min,再加入 40 μ L 碘化硫代乙酰胆碱,温育 10 min,离心后取上清液 200 μ L 置于 96 孔板中,用酶标仪于 405 nm 测其吸光度,以不加底物的反应体系吸光度值作为初始值。固定化酶的活力(U/g)是指每克载体固定酶以后所具有的活力,相对活力值是指,以最佳条件下的固定化酶活力为 100%,其余条件下同样蛋白量的酶固定在载体上之后与最佳条件下所显示的酶活力之比。

2 结果与讨论

2.1 固定化酶亲和分离介质制备方法的优化

本研究以氨基化硅胶微球为载体,以戊二醛为交联剂对固定化乙酰胆碱酯酶亲和分离介质进行了制备。固定化酶亲和分离介质制备成功与否,取决于载体与酶的良好结合以及酶的活性保持。本研究以固定化酶的相对活力值为指标,对酶固定化的各种影响条件进行了系统优化,包括:戊二醛的用量、固定时的 pH、反应时间、反应温度、载体与酶的比例等,具体结果如下所示。

2.1.1 戊二醛用量的选择

戊二醛是具有两个功能基团的试剂, 可使酶蛋白中赖氨酸的 ϵ -氨基、N 端的 α -氨基、酪氨酸的酚基或半胱氨酸的-SH 基与氨基化硅胶微球上的氨基发生 Schiff 反应, 相互交联成固定化酶. 按 1.3 节步骤, 分别将 0.50, 1.0, 2.0, 5.0, 10 和 20 μL 50%戊二醛加入 APS-Si 载体中处理(图 1), 然后进行 AchE 固定, 考察戊二醛用量对固

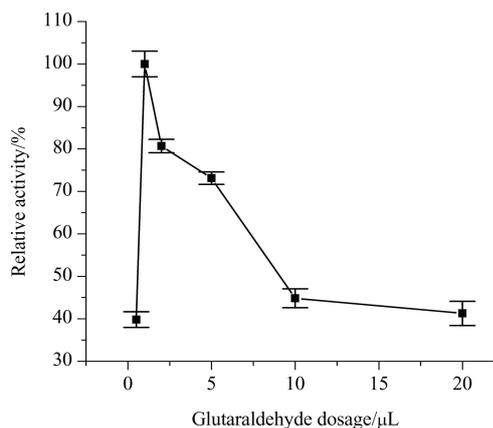
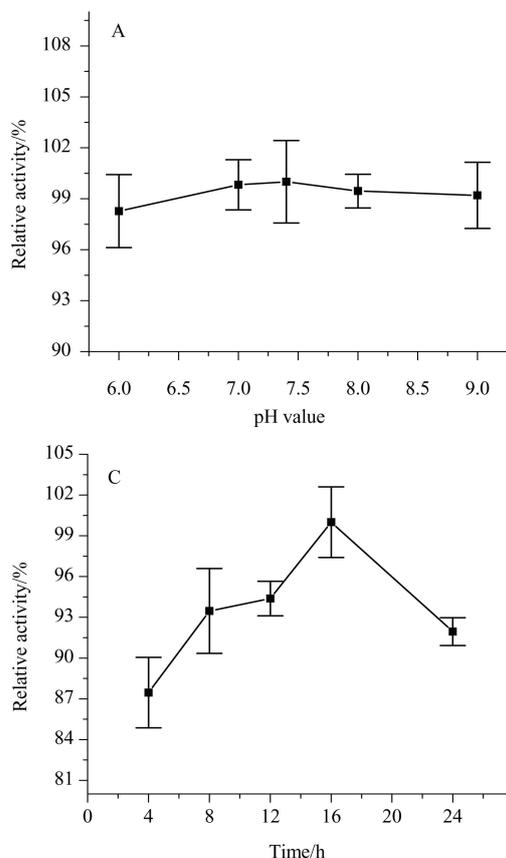


图 1 戊二醛用量对固定化酶活力的影响

Figure 1 Effect of glutaraldehyde dosage on specific activities of the immobilized AchE



定化酶活力的影响. 图 1 实验结果表明, 以 1.0 μL 50%戊二醛作为交联剂, 制备得到的固定化乙酰胆碱酯酶活力值最高. 由于本研究中戊二醛并未与酶液一起加入, 在充分洗涤的情况下, 不会对酶活产生影响, 但过多或过少的戊二醛均会使固定化酶的活力降低. 其原因是当戊二醛的用量过大时, 氨基化硅胶微球结合了过多的活性醛基, 使得活性醛基结合的酶量也相应增加, 这就增加了酶的空间位阻, 使固定化酶的表现活力反而下降; 同时, 过量的戊二醛也使载体间的氨基相互交联, 减少了可供酶蛋白结合的位点.

2.1.2 最佳固定化 pH 值、固定化温度、固定化时间、酶用量的选择

本研究对反应体系不同固定化 pH、固定化温度、固定化时间进行了比较, 结果见图 2. 由图 2(A)可以看出, 在设定的 pH 范围内, 反应体系的 pH 值对固定化酶的活力影响不大, 但是反应体系在 pH 7.0~7.4 条件下固定化酶的活力最高, 与文献^[16]报道结果一致. 由图 2(B)可以看出, 在 4, 20, 28 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 固定化酶的活力变化明显, 而在 28 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 时的活力差别不大, 并且活力达到最高值, 因此选择 28 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳的固定化温

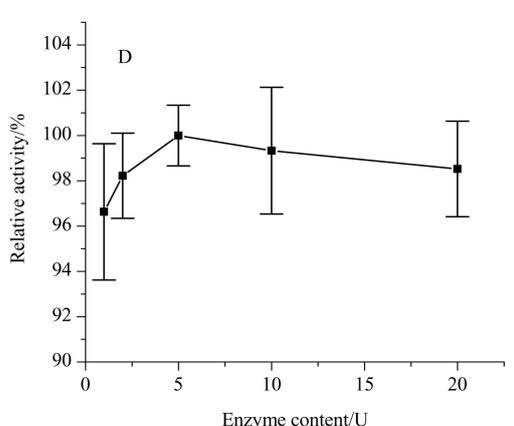
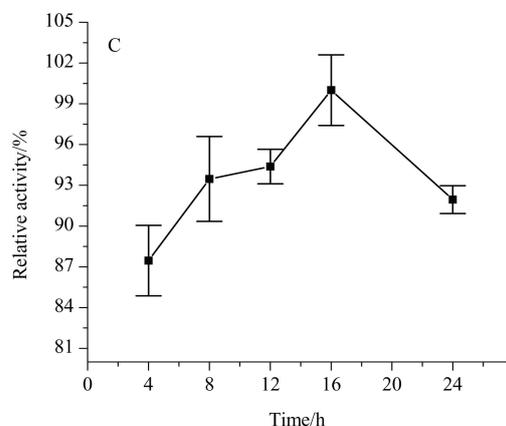
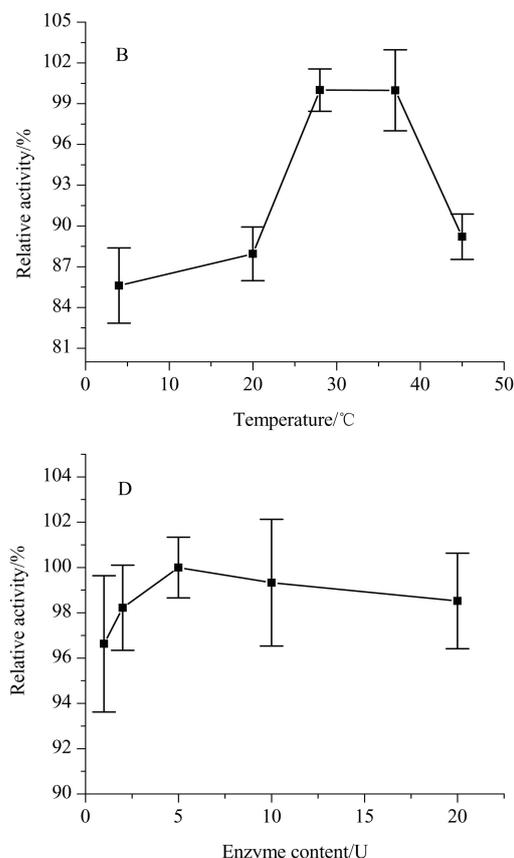


图 2 固定化条件对固定化酶活力的影响. (A)pH; (B)固定温度; (C)固定时间; (D)酶用量

Figure 2 Effect of immobilization conditions on specific activities of the immobilized AchE. (A) pH value, (B) temperature, (C) time, (D) enzyme content given

度. 从图 2(C)可以看出, 在考察的固定化时间范围内(4, 8, 12, 16 和 24 h), 在 16 h 之前随着固定化时间的延长, 固定化酶的活力增强, 在 16 h 达到峰值, 随后随着时间的延长固定化酶的活力反而下降, 因此, 选择 16 h 为最佳固定化时间. 取交联后的载体分别加入 1.0, 2.0, 5.0, 10 和 20 U 酶液于 28 °C 下固定 16 h, 比较不同酶用量对固定化酶活力的影响, 图 2(D)结果显示, 载体固定 5.0 U 酶液时得到的活性最大, 说明与酶结合的官能团在此条件下能够最大化地与酶的活性位点相结合.

2.2 固定化酶的反应特性

2.2.1 pH 对固定化酶活力的影响

按 1.3 节方法制备得到的固定化酶, 离心去掉上清液后, 分别加入 pH 为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.4, 8.0, 9.0 和 10.0 的磷酸缓冲液, 再按 1.4 节的方法测定其活力, 比较其反应体系不同 pH 条件下的活力. 结果显示(图 3), 随着 pH 的升高, 固定化酶的酶活呈持续增大状态, 相对活性均在 85%以上, 说明该固定化酶在较宽的 pH 范围内都保持比较高的催化活性.

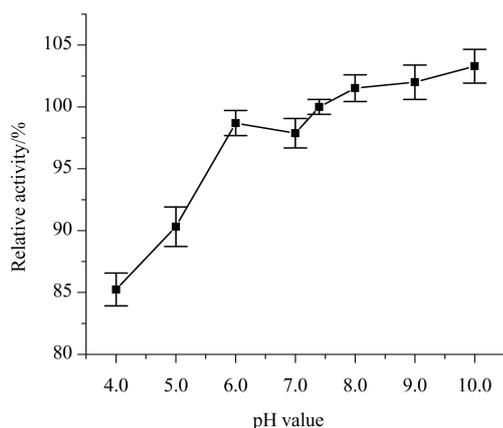


图 3 pH 对固定化酶活力的影响

Figure 3 Effect of pH on specific activities of the immobilized AChE

2.2.2 温度对固定化酶活力的影响

按 1.3 节方法制备得到的固定化 AChE, 将其加热温度分别设为 10, 20, 30, 37, 40, 50, 60 和 70 °C, 并测定其活力, 考察不同温度条件下固定化酶的活力. 从图 4 可以看出, 固定化酶在较低温度条件下活力较高, 且随温度的升高呈逐渐上升的趋势. 当反应温度超过 40 °C 时, 固定化酶活力就开始下降, 到 70 °C 时只保留 60% 的活力. 这可能是由于高温使固定化酶产生结构变化, 抑制了固定化酶的活性, 说明该固定化酶在常温条件下活性较好.

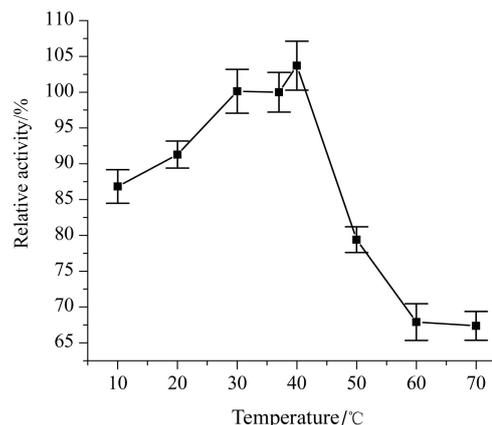


图 4 温度对固定化酶活力的影响

Figure 4 Effect of temperature on specific activities of the immobilized AChE

2.3 固定化酶重复使用次数和保存稳定性

考察了固定化酶的重复利用率和储藏稳定性, 将制备得到的固定化 AChE 按照 1.4 节方法测定其活性, 之后将固定化酶和反应液分离, 对固定化酶进行清洗, 然后再按照 1.4 节方法重复测定固定化酶的酶活性, 结果显示固定化酶连续重复使用 9 次, 仍然保持 99% 的活性. 将固定化酶置于 4 °C 冰箱中湿态保存, 每隔一段时间测定其活力, 图 5 结果显示, 40 d 内固定化酶的酶活变化不大, 保持在初始活力的 90% 以上, 其稳定性好于或与国内外相关的研究报道相当^[17,18]. 由以上结果可知, 本研究制备得到的固定化乙酰胆碱酯酶, 重复使用率较高、易于保存, 为今后研制固定化乙酰胆碱酯酶亲和分离色谱柱奠定了基础.

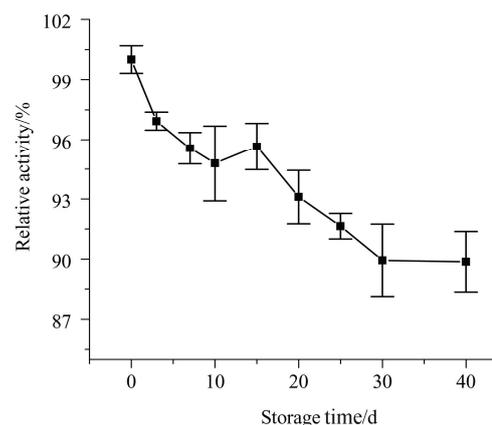


图 5 固定化酶活力与保存时间的相关性

Figure 5 Relation between storage time and specific activity of immobilized AChE

3 结论

本研究以氨基化硅胶微球为载体, 戊二醛为交联剂, 研制了固定化乙酰胆碱酯酶; 为了保证固定化乙酰胆碱酯酶的活性, 对固定化过程中的戊二醛用量、反应体系 pH 值、固定化温度、固定化时间、酶用量等进行了系统优化, 确定了最佳固定化条件. 在最佳条件下制备得到的固定化乙酰胆碱酯酶, 在常温条件下(20~40 °C)活性较好, pH 适用范围较宽, 并且具有较好的重复利用率、易于贮存. 为下一步研制固定化乙酰胆碱酯酶亲和分离色谱柱, 用于天然产物复杂体系中乙酰胆碱酯酶抑制剂的筛选奠定了基础.

References

- 1 Slon-Usakiewicz, J. J.; Ng, W.; Dai, J. R.; Pasternak, A.; Redden, P. R. *Drug Discovery Today* **2005**, *10*(6), 409.
- 2 Espada, A.; Molina-Martin, M.; Dage, J.; Kuo, M. S. *Drug Discovery Today* **2008**, *13*(9~10), 417.
- 3 Slon-Usakiewicz, J. J.; Dai, J. R.; Ng, W.; Foster, J. E.; Deretey, E.; Toledo-Sherman, L.; Redden, P. R.; Pasternak, A.; Reid, N. *Anal. Chem.* **2005**, *77*(5), 1268.
- 4 Jin, N.-Z.; Lu, X.-H. *Chin. J. Biochem. Pharm.* **2003**, *24*(5), 1 (in Chinese).
(金念祖, 陆晓和, 中国生化药物杂志, **2003**, *24*(5), 1.)
- 5 Huang, X. D.; Kong, L.; Li, X.; Chen, X. G.; Guo, M.; Zou, H. F. *J. Chromatogr. B* **2004**, *812*, 71.
- 6 Wang, S.; Sun, M.; Zhang, Y. M.; Du, H.; He, L. C. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*(32), 5246.
- 7 Xin, G. Z.; Zhou, J. L.; Qi, L. W.; Li, P. *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2011**, *14*(2), 93.
- 8 Huang, Y.; Tian, Q.-Q.; Li, T.-Y.; Chen, B.; Yao, S. Z. *Sci. China, Ser. B: Chem.* **2009**, *39*(8), 760 (in Chinese).
(黄燕, 田清清, 李谭瑶, 陈波, 姚守拙, 中国科学 B 辑: 化学, **2009**, *39*(8), 760.)
- 9 Tang, Z. M.; Wang, Z. Y.; Kang, J. W. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 360.
- 10 Hu, F. L.; Zhang, H. Y.; Lin, H. Q.; Deng, C. H.; Zhang, X. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 865.
- 11 Hu, F. L.; Deng, C. H.; Zhang, X. M. *J. Chromatogr. B* **2008**, *871*, 67.
- 12 Rhee, I. K.; van de Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. *J. Chromatogr. A* **2001**, *915*(1~2), 217.
- 13 Zhang, X.-A.; Jia, H.-H.; Wang, X.-F.; Zhang, H.-L.; Yin, H.-W.; Chang, S.-L.; Wang, J.-F.; Wu, W.-J. *Chin. Sci. Bull.* **2009**, *54*(12), 1701 (in Chinese).
(张学骛, 贾红辉, 王晓峰, 张海良, 尹红伟, 常胜利, 王建方, 吴文健, 科学通报, **2009**, *54*(12), 1701.)
- 14 Marinov, I.; Gabrovska, K.; Velichkova, J.; Godjevargova, T. *Int. J. Biol. Macromol.* **2009**, *44*(4), 338.
- 15 Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. Jr.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.
- 16 Zhang, A.-J.; Meng, F.-P. *Polym. Mater. Sci. Eng.* **2011**, *27*(4), 124 (in Chinese).
(张爱静, 孟范平, 高分子材料科学与工程, **2011**, *27*(4), 124.)
- 17 Tumturk, H.; Sahin, F.; Demirel, G. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2007**, *30*, 141.
- 18 Li, Y. R.; Gan, Z. Y.; Li, Y. F.; Liu, Q.; Bao, J. C.; Dai, Z. H.; Han, M. *Sci. China Chem.* **2010**, *53*(4), 820.

(A1107232 Cheng, F.)