

交联脲酶聚集体的制备和初步应用

董晓毅* 夏仕文

(第三军医大学医学检验系生物转化实验室,重庆 400038)

摘 要 为提高游离脲酶的稳定性,将游离脲酶用硫酸铵沉淀下来后,以戊二醛作为交联剂对其进行化学交联,制备新型的固定化脲酶-交联脲酶聚集体,并对其酶学性质进行研究。交联脲酶聚集体的最适 pH、最适温度和 K_m 值分别为 pH 8.0、70°C 和 0.021 mol/L。在对交联脲酶聚集体的热稳定性、储存稳定性 和对抗蛋白水解酶的能力的研究中,交联脲酶聚集体均显示了比游离脲酶更高的稳定性。为考察其使用效果和稳定性,将其与包醛氧淀粉联合,用于慢性肾衰动物模型的口服治疗。以腺嘌呤灌胃法(每天 300mg/kg,共 30d)制备慢性肾衰动物模型,将 23 只大鼠随机分为模型对照组(每天以 10mL/kg 蒸馏水灌胃)、单纯包醛氧淀粉组(给予含包醛氧淀粉饲料,10mL/kg 蒸馏水灌胃)和包醛氧淀粉+交联脲酶聚集体组(给予含包醛氧淀粉饲料,交联脲酶聚集体悬浮液 10mL/kg 灌胃),经 2 周治疗后,模型对照组、治疗对照组和治疗组实验前后的肌酐含量均有小幅下降,但差异不显著(P 值分别为 0.922、0.972 和 0.225 > 0.05)。模型对照组的尿素氮含量变化不明显($P = 0.211 > 0.05$)。治疗对照组和治疗组实验前后的尿素氮含量均明显下降(P 值分别为 0.004 和小于 0.001,均小于 0.01)。治疗对照组和治疗组实验前后的尿素氮含量下降量比较,有显著性差异($P = 0.016 < 0.05$)。治疗组尿素氮含量下降更明显。说明交联脲酶聚集体和包醛氧淀粉联合使用时,对尿素的清除效率比单纯使用包醛氧淀粉更高。

关键词 脲酶,固定化,交联脲酶聚集体

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)03-0332-05

脲酶(EC 3.5.1.5)是一种含镍金属酶,特异地催化尿素分解为氨和二氧化碳。长期以来广泛应用于农业、环境保护、食品工业和生物医学等领域。游离脲酶稳定性差,使用前一般要对其进行固定化。

酶的固定化方法通常是借助物理方法或化学方法将酶固定在载体上。载体的存在会降低酶的结合容量和反应能力,有时甚至会影响酶反应的关键步骤。因此,无载体的酶固定化显得很有吸引力。无载体的酶固定化主要是交联法,可分直接交联法和间接交联法两种。直接交联法直接通过酶分子之间和分子内的交联反应形成固定化酶,酶颗粒小,活性损失大,机械性能差,现已极少采用^[1]。现在的研究主要是间接交联法,即先制备酶聚合物,再交联,形成固定化酶。Altus 公司的 Navia 等人先制备酶晶体,再用戊二醛交联,获得了活性和稳定性都很高的交联酶晶体(Cross-linked enzyme crystals, CLECs)^[2-4]。由于制备中需要获得酶的晶体,而酶的结晶需要的条件较高,迄今为止已获得结晶的酶

也不是很多,限制了这种方法的应用范围。

荷兰 Delft 大学 Sheldon 小组提出用盐、有机溶剂或非离子型聚合物沉淀酶蛋白,得到酶聚集体,再用戊二醛交联,制备交联酶聚集体(Cross-linked enzyme aggregates, CLEAs)。目前已成功制备出青霉素酰化酶^[5,6]和 7 种不同微生物来源的脂肪酶的交联酶聚集体^[7,8],分别用于氨苄青霉素的合成和高纯度化学药品工业。与已有的酶固定化方法相比,这种方法操作简便,反应条件易于最佳化,成本低,应用范围广,理论上能被沉淀下来的酶或蛋白都可用这种方法制成交联酶(或蛋白)聚集体,获得的固定化酶稳定性好,活性高,与游离酶相比,某些脂肪酶的交联酶聚集体的活性甚至可提高 10 倍以上^[8],是一种很有前途的酶固定化方法。

为探讨交联酶聚集体技术在医学领域的应用,本文采用硫酸铵使脲酶沉淀以获得脲酶聚集体,再用戊二醛交联,获得了一种新型的固定化脲酶——交联脲酶聚集体(Cross-linked urease aggregates),对其

酶学性质进行了分析,为考察其使用效果和稳定性,将其与包醛氧淀粉联合,用于慢性肾衰动物模型的口服治疗。

1 材料和方法

1.1 材料及仪器

1.1.1 试剂:脲酶(47.0u/mg(DW),Worthlington 生物化学公司);硫酸铵(分析纯,重庆北碚化学试剂厂);戊二醛(25%水溶液,中国医药上海化学试剂公司进口分装);胰蛋白酶(Trypsin,上海生工进口分装);腺嘌呤(华美公司);包醛氧淀粉(Coated aldehyde oxystarch,CAO,天津天大领先制药有限公司);其余试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器:TU-1800PC 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),BX60 型光学显微镜(Olympus),LX20 全自动生化分析仪(贝克曼库尔特公司),大鼠灌胃器(上海茂生生物科技公司)。

1.1.3 动物模型:Wistar 大鼠 50 只,体重 80~120g,雌雄各半,以腺嘌呤灌胃法(每天 300mg/kg,共 30d)制备慢性肾衰动物模型,成活 23 只,经血液生化检验和病理切片诊断确诊为慢性肾衰^[9]。

1.2 实验方法

1.2.1 脲酶聚集体的制备:将脲酶冻干粉 50mg 溶于 10mL 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液(0.1mol/L, pH 7.0)中,取样测定蛋白含量后,置于冰水浴中,缓慢滴加 50% 的硫酸铵溶液,每 30min 取样离心(16 000r/min)后,测定上清液的蛋白含量,约 95% 脲酶被沉淀下来后,所需硫酸铵溶液约 25mL。溶液滴加过程中持续缓慢搅拌以保证脲酶聚集体颗粒均匀。

1.2.2 脲酶聚集体的交联:在冰水浴中缓慢滴加 0.35mL 25% 的戊二醛于脲酶聚集体悬浮液(35mL)中,持续缓慢搅拌,交联 2h 后,取出溶液,10 000r/min 离心弃上清,用磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)洗涤 2 次,每次使用磷酸盐缓冲液 4mL,收集沉淀后用 2mL 磷酸盐缓冲液悬浮,然后将悬浮液置透析袋(分子量 8000~10000)中,用 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液透析 48h(每 12h 换液 1 次,每次使用缓冲液 500mL)以去除多余的戊二醛和影响酶活测定的铵离子。所得交联脲酶聚集体悬浮液置 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 脲酶和交联脲酶聚集体的活性测定方法:采用 Berthelot 法^[10]。

1.2.4 蛋白含量测定:采用 Bradford 法^[11]。

1.2.5 动物模型分组和施加因素:以随机数表法将 23 只大鼠分为模型对照组(8 只,给予自由饮食,

10mL/kg 蒸馏水灌胃)、治疗对照组(8 只,给予含包醛氧淀粉饲料,10mL/kg 蒸馏水灌胃)和治疗组(7 只,给予含包醛氧淀粉饲料,交联脲酶聚集体悬浮液 10mL/kg 灌胃)。分别编号。其中包醛氧淀粉由于颗粒较大,不溶于水,无法灌服,故将包醛氧淀粉与混合饲料按 1:1 混匀后,按 20g/kg 喂食,每日待动物吃完后再给予普通饲料。观察疗程 2 周。

1.2.6 观察指标:治疗前后剪尾取血,约 0.5 mL,以 LX20 全自动生化分析仪测定血清肌酐(Scr)和尿素氮(BUN)含量。

1.2.7 统计分析:资料用 *t* 检验,显著性检验用双侧界值点,表中数值用算术均数 ± 标准差。分析软件使用 SPSS11.0。

2 结果与讨论

2.1 脲酶聚集体交联前后的形态学变化

光学显微镜下观察到,用硫酸铵沉淀下来的脲酶聚集体是脲酶单体的多聚形式,形状不规则,结构松散,颗粒较小(图 1)。戊二醛交联后,颗粒变大,结构紧密(图 2)。其原理是在戊二醛的醛基和脲酶分子的氨基间形成希弗碱(Shiff base),反应可发生在酶分子间和分子内,也可发生在酶聚合物间和聚合物内,最终获得有一定机械强度的交联脲酶聚集体。当然,仅用希弗碱的形成来解释交联反应是不完全的,反应还包括将酶的氨基共轭添加到常用商品戊二醛溶液中存在的 α β 不饱和寡聚体的乙烯双链上等。

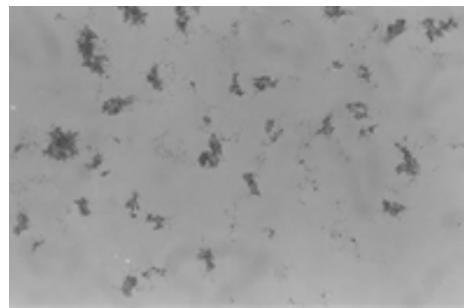


图 1 脲酶聚集体($\times 100$)

Fig. 1 Urease aggregates($\times 100$)

2.2 交联脲酶聚集体的最适温度

在不同的温度下分别测定游离脲酶和交联脲酶聚集体的活性,结果见图 3。游离脲酶和交联脲酶聚集体最适温度分别为 60℃ 和 70℃。

2.3 交联脲酶聚集体的最适 pH 值

分别测定游离脲酶和交联脲酶聚集体在不同 pH 下的活性,结果见图 4。游离脲酶和交联脲酶聚集体的最适 pH 值均为 8.0。

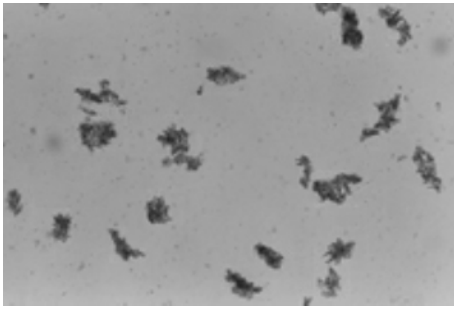
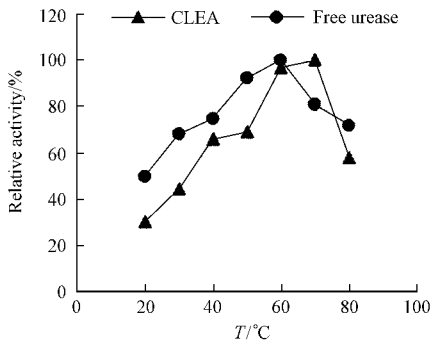
图2 交联脲酶聚集体($\times 100$)Fig.2 Cross-linked urease aggregates($\times 100$)

图3 游离脲酶和交联脲酶聚集体的最适温度

Fig.3 The optimum temperature of free urease and cross-linked urease aggregates

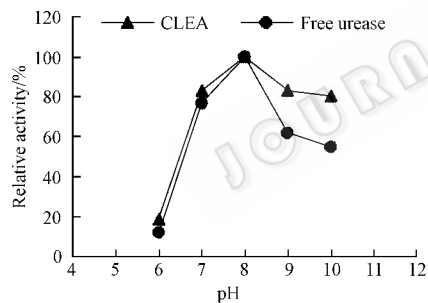


图4 游离脲酶和交联脲酶聚集体的最适 pH 值

Fig.4 The optimum pH of free urease and cross-linked urease aggregates

2.4 交联脲酶聚集体的米氏常数 (K_m)

游离脲酶和交联脲酶聚集体的米氏常数测定结果见图 5、图 6。在本文的实验条件下,游离脲酶和交联脲酶聚集体的 K_m 值分别为 0.014 mol/L 和 0.021 mol/L。说明交联脲酶聚集体对尿素的亲和力小于游离脲酶。

2.5 交联脲酶聚集体的储存稳定性

将游离脲酶和交联脲酶聚集体各取出两份,分别置于 4℃ 和室温下,定期测定酶的剩余活性,结果表明,在 4℃ 下,交联脲酶聚集体在 100d 后仍有 80% 的活性,游离脲酶在 100d 后剩余活性为 70%。

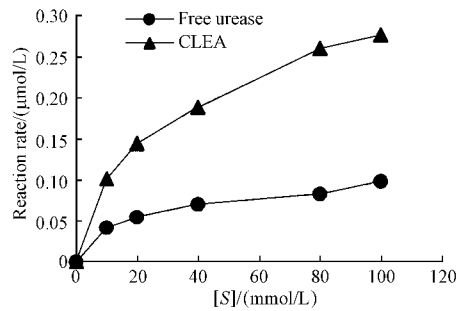
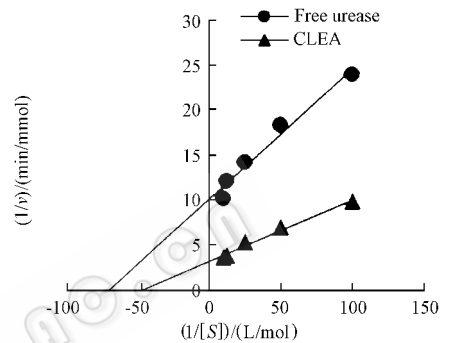


图5 尿素浓度对游离脲酶和交联脲酶聚集体活性的影响

Fig.5 The effect of urea concentration on the activity of free urease and cross-linked urease aggregates

图6 游离脲酶和交联脲酶聚集体的 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图Fig.6 Plots of $1/v$ against $1/[S]$ for free urease and cross-linked urease aggregates

室温下交联脲酶聚集体的半衰期为 20d,游离脲酶为 13d。证明交联脲酶聚集体的储存稳定性比游离脲酶高。

2.6 交联脲酶聚集体的热稳定性

将游离脲酶溶液和交联脲酶聚集体悬浮液置于 65℃ 水浴中,每隔一定时间取样测定脲酶的剩余活性。结果见图 7。交联脲酶聚集体的酶活性下降较慢,游离脲酶的失活半衰期为 20min,交联脲酶聚集体则为 40min,说明交联脲酶聚集体的热稳定性高于游离脲酶。

2.7 交联脲酶聚集体对抗胰蛋白酶水解能力

取游离脲酶溶液和交联脲酶聚集体悬浮液各 3mL,测初始酶活性,分别加入 0.2mL 胰蛋白酶溶液 (5 g/L),37℃ 保温,定时取样测定酶活性。结果见图 8。交联脲酶聚集体经 12h 的保温处理后,活性仅下降 20%,而游离脲酶处理 4h 后的活性残留仅有 50%,说明与游离脲酶相比,交联脲酶聚集体抵抗胰蛋白酶水解的能力更强。

2.8 用于慢性肾衰动物模型的肠道清除治疗

慢性肾衰发展到终末期尿毒症后,肠道内代谢废物积聚,尤以尿素居多。使用口服脲酶制剂分解

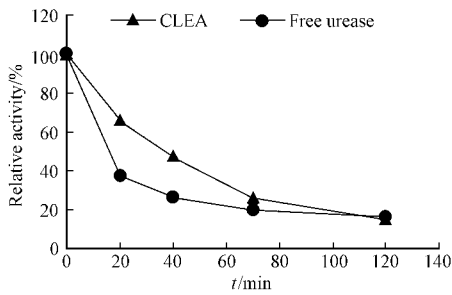


图7 65℃下游离脲酶和交联脲酶聚集体的热稳定性

Fig. 7 Thermal stability of free urease and cross-linked urease aggregates at 65°C

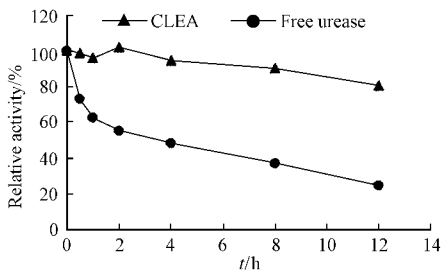


图8 游离脲酶和交联脲酶聚集体对胰蛋白酶的耐受性

Fig. 8 Resistance of free urease and cross-linked urease aggregates to trypsin

肠道尿素,可以达到缓解慢性肾衰症状和快速治疗的目的。这要求脲酶必须能够通过胃酸屏障并耐受胃肠道内胃蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶的降解,到达肠道后,仍能保持相当的活性以发挥药效。我们制备的交联脲酶聚集体对极端 pH 和蛋白酶的抵抗能力明显提高,可与包醛氧淀粉联合用于慢性肾衰的肠道清除治疗。包醛氧淀粉是非特异吸附剂,可以吸附尿素分解后产生的有毒副作用的氨气或铵离子,对肠道内其它代谢废物也有吸附作用。为排除包醛氧淀粉吸附尿素带来的影响,实验中安排了单纯包醛氧淀粉组,我们的实验结果见表 1。

模型对照组、治疗对照组和治疗组实验前后的肌酐含量均有小幅下降,但差异不显著(P 值分别为 0.922、0.972 和 0.225)。模型对照组的尿素氮含量变化不明显($P = 0.211 > 0.05$)。治疗对照组和治疗组实验前后的尿素氮含量均明显下降(P 值分别为 0.004 和小于 0.001,均小于 0.01)。治疗对照组和治疗组实验前后的尿素氮含量下降量比较,有显著性差异($P = 0.016 < 0.05$)。治疗组尿素氮含量下降更明显。说明交联脲酶聚集体和包醛氧淀粉联合使用时,对尿素的清除效率比单纯使用包醛氧淀粉更高。间接说明交联脲酶聚集体在肠道的复杂条件下仍能发挥催化作用,效果明显,稳定性高。

表 1 交联脲酶聚集体和包醛氧淀粉对腺嘌呤致动物慢性肾衰模型的血液生化指标的影响

Table 1 Influence of cross-linked urease aggregates and CAO on blood biochemical indexes of rats with chronic renal failure by adenine

Index	Time	Control	CAO	CAO + CLEAs
BUN(mmol/L)	a	27.87 ± 4.75	26.68 ± 5.31	27.75 ± 3.81
	b	27.05 ± 4.55	20.46 ± 4.52*	15.69 ± 3.74*
Changes of BUN			5.60 ± 3.88	12.07 ± 4.00#
Scr(μmol/L)	a	95.13 ± 20.59	100.25 ± 19.06	104.57 ± 8.17
	b	95.63 ± 17.38	100.13 ± 18.23	100.4 ± 7.32

* $P < 0.01$, compared with 2 weeks ago. # $P < 0.05$, compared with

CAO group. a. Before the 1st dose; b. 2 weeks after withdraw

3 结论

沉淀法是蛋白提纯的常用方法,技术成熟,将它引入酶的固定化中,与交联法相结合,产生了一种简单有效的酶无载体固定化方法-交联脲酶聚集体的制备,这种方法反应条件简单,沉淀和交联发生在一个反应体系中,产生不溶于水的固定化酶。通过优化反应条件来调节,可获得活性和稳定性都不错的交联脲酶聚集体。

交联脲酶聚集体的稳定性是酶聚集体的物理属性和酶分子共价交联的结果。交联脲酶聚集体内有一定的空隙,允许小分子的底物和产物通过,从而保证了交联脲酶聚集体活性的发挥。当酶分子从溶液中转移到酶聚集体中时,静电力和酶分子间的疏水作用增大,阻止了酶蛋白的伸展、聚集和分解,因而提高了酶对热和极端 pH 的稳定性。交联脲酶聚集体具有相对有序的三维结构,大分子的蛋白水解酶则被排斥在外,又提高了对蛋白水解酶的抵抗能力^[5-8]。本文对交联脲酶聚集体的性质评价结果完全支持了上述结论。

慢性肾衰尤其是尿毒症是严重威胁人类健康的疾病。目前尿毒症的治疗广泛采用血液透析和肾移植两种方式。血液透析作为一种支持疗法费用相当昂贵。肾移植尽管非常有效,但肾源有限,异体排斥反应的问题较难解决。将固定化脲酶可制成口服制剂,利用其稳定性高的特点,通过胃酸屏障,到达肠道清除肠道尿素并抵抗消化酶的降解,可达到缓解尿毒症症状,延长病人血液透析周期,减轻病人的经济负担的目的。

我们将交联脲酶聚集体与包醛氧淀粉联合用于慢性肾衰动物模型的肠道清除治疗实验中,交联脲酶聚集体在肠道的复杂条件下仍能发挥有效的催化作用,显著降低了血清尿素氮水平,为进一步开发出高效的肠道清除口服制剂奠定了基础。交联脲酶聚集

体还可望用于医学领域中的以下两个方面:脲酶是临床常用的诊断用酶,存在稳定性差,储存和使用寿命短的缺点。利用交联脲酶聚集体的高稳定性,可制作出稳定的可重复使用的尿素传感器用于临床诊断。另外,以交联脲酶聚集体为基础,制造小型的反应性透析装置,可用于血液透析和血液灌流。

如何利用交联酶聚集体技术为人类服务是我们今后的研究方向,我们的实验为交联酶聚集体技术的进一步应用开辟了道路。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Tyagi B, Batra R, Gupta M N. Amorphous enzyme aggregates; Stability toward heat and aqueous-organic cosolvent mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, **24**: 348 - 354
- [2] Navia M A, Lexington M A, Clair N L *et al.* Cross-linked protein crystals. United States Patent NO. 5849296, 1998
- [3] Navia M A, Lexington M A, Clair N L *et al.* Methods of enzyme therapy by orally administering cross-linked enzyme crystals. United States Patent NO. 5976529, 1999
- [4] Navia M A, Lexington M A, Clair N L *et al.* Method of protein therapy by orally administering cross-linked protein crystals. United States Patent NO. 6011001, 2000
- [5] Cao L, Rantwijk F V, Sheldon R A *et al.* Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Organic Letters*, 2000, **2**(10): 1361 - 1364
- [6] Cao L, Langen L M, Rantwijk F V *et al.* Cross-linked enzyme aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, **11**: 665 - 670
- [7] López-Serrano P, Cao L, Rantwijk F V *et al.* Cross-linked enzyme aggregates of lipases with enhanced activity. *Biotrans* 2001, **18**: 119
- [8] López-Serrano P, Cao L, Rantwijk F V *et al.* Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnology Letters*, 2002, **24**: 1379 - 1383
- [9] Yokozawa T, Zheng P D, Oura H *et al.* Animal Model of Adenine-Induced Chronic Renal Failure in Rats. *Nephron*, 1986, **44**, 230 - 234
- [10] Weatherburn M W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analysis Chemistry*, 1967, **39**: 971 - 974
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 - 254

The Preparation and Application of Cross-linked Urease Aggregates

DONG Xiao-Yi* XIA Shi-Wen

(Laboratory of Biotransformation, Faculty of Medical Laboratory Science, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Urease was immobilized in a simple and effective way by physical aggregation using a precipitant-ammonium sulfate, followed by chemical cross-linking using a bifunctional reagent-glutaraldehyde to form insoluble Cross-linked urease aggregates (CLUAs). The optimum pH, optimum temperature and K_m of CLUAs were 8.0, 70°C and 0.021 mol/L respectively. Compared with that of free urease, the thermal stability, storage stability and resistance of cross-linked urease aggregates to the exogenous proteolysis were enhanced. The efficacy of CLUAs for the treatment of rats with chronic renal failure was also studied. The rats with chronic renal failure caused by adenine were divided into 3 groups randomly: the control group (fed with 10mL water/kg per day), Coated Aldehyde Oxystarch (CAO) group (fed with 20g CAO/kg and 10mL water/kg per day) and CLUAs + CAO group (fed with 20g CAO/kg and 10mL CLUAs/kg per day) in which CAO was used to absorb the ammonia produced from urea. The contents of BUN and Scr in serum before and after 2 weeks treatment were determined. In three groups, the level of Scr decreased slightly ($P = 0.922, 0.972$ and $0.225 > 0.05$ respectively) after treatment. The level of BUN was not changed ($P = 0.211 > 0.05$) in the control group, but decreased greatly BUN in both CAO group and CLUAs + CAO group ($P = 0.004 < 0.05$ and $P < 0.001$ respectively). Furthermore, the decrease of the BUN level after treatment in the CLUAs + CAO group was more remarkable than that in the CAO group ($P = 0.016 < 0.05$), which showed that the CLUAs + CAD system was more efficient than the CAO system for the removal of urea in serum.

Key words urease, immobilization, cross-linked urease aggregates, chronic renal failure