

## 重组羧肽酶 B 的稳定性研究

王亚辉, 辛爱洁, 李素霞

(华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

**摘要:**目的 筛选重组羧肽酶 B(rCPB)酶液的保存方法以及 rCPB 的冻干保护剂。方法 将添加和不添加甘油的两组 rCPB 酶液置于不同温度下保存,定期测定活力;在 rCPB 酶液中加入不同浓度的不同保护剂,比较冷冻干燥后的活性保留率,并从赋型性和溶解性方面评价冻干保护剂的作用。结果 4℃下,含 25%甘油的 rCPB 酶液在 6 个月内活力保持不变;添加 3%甘露醇和 5%海藻糖的 rCPB 冻干品的酶活保留率分别为 102%和 100%。结论 甘油能显著提高 rCPB 酶液的稳定性;从冻干保护效果和冻干品外观来评价,3%甘露醇可作为 rCPB 冻干过程中的最佳保护剂。

**关键词:**重组羧肽酶 B; 稳定性; 冷冻干燥; 保护剂

中图分类号:Q556.3; R927.11 文献标识码:A 文章编号:1005-1678(2010)04-0241-03

### Study on stability of recombinant carboxypeptidase B

WANG Ya-hui, XIN Ai-jie, LI Su-xia

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** **Purpose** To investigate the storage condition for recombinant carboxypeptidase B solution and to screen the reagents to protect rCPB in the process of lyophilization. **Methods** RCPB solution containing 25% glycerol or without glycerol were stored at -20℃, 4℃ or room temperature, respectively, to be investigated for the activity at different durations. Trehalose, mannitol and sorbitol were selected to protect the activity of rCPB from losing during lyophilization, at the concentration of 1%, 3% and 5%, respectively. **Results** The activity of rCPB with addition of 25% glycerol kept unchanged at 4℃ within six months. No activity of rCPB was lost when 3% mannitol or 5% trehalose was used as additives for rCPB lyophilization. **Conclusion** Glycerol was helpful for the storage of rCPB solution and no activity was lost within 6 months when kept at 4℃. 3% mannitol was selected as the best protector for the lyophilization of rCPB and there was no activity losing in the process of lyophilization and a good appearance was got.

**Key words:** recombinant carboxypeptidase B; stability; lyophilization; protector

羧肽酶 B (Carboxypeptidase B, CPB) (EC3.4.17.2) 是一种含锌的胰外肽酶。CPB 可特异性水解肽链 C-端的碱性氨基酸:精氨酸、赖氨酸或鸟氨酸。CPB 在科研中的应用主要基于其切割特性,用于蛋白质和多肽的测序;在医学上用于诊断胰腺炎。另外,在重组胰岛素的生产中,胰岛素原活化为胰岛素

的过程中,CPB 为不可缺少的双酶之一,其比活的高低及稳定性是影响胰岛素原活化收率的重要参数。

我们已成功在大肠杆菌中克隆表达了鼠羧肽酶原 B<sup>[1-2]</sup>,获得了高效表达菌株,对重组羧肽酶原 B 包涵体进行了复性。复性后的重组羧肽酶原 B 经胰蛋白酶酶解后成为具有催化活性的重组羧肽酶 B (recombinant carboxypeptidase B, rCPB)。以往的对 CPB 稳定性的考察主要针对的是从动物胰脏中提取的 CPB<sup>[3-4]</sup>。本研究考察了保存温度以及甘油的添加对 rCPB 酶液稳定性的影响,并筛选了 rCPB 酶液冻干过程中的保护剂。

#### 1 材料

收稿日期:2009-10-12

基金项目:生物反应器工程国家重点实验室专项(No. 2060204)

资助

作者简介:王亚辉,男,安徽人,在读硕士研究生, E-mail: wangyahui8@sina.com; 李素霞,通信作者, Tel: 021-64252255, E-mail: liuxia@ecust.edu.cn。

马尿酸-L-精氨酸, Sigma; 山梨醇(生物级)、甘露醇(美国药典级)、海藻糖(试剂级), Bio Basic Inc.; 丙三醇(分析纯), 上海凌峰化学试剂有限公司)。

T6 紫外分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; FD-1 冷冻干燥机, 上海田枫实业有限公司; 低温离心机, Beckman。

## 2 方法

### 2.1 rCPB 的制备

按照文献[1,5]方法制备 rCPB, 纯化后的酶液经 0.2  $\mu\text{m}$  滤膜除菌过滤后备用。

### 2.2 rCPB 活力测定

参照 Wolff<sup>[6]</sup>的方法, 含有 0.1 mmol/L 马尿酸-L-精氨酸底物的 0.1 mol/L NaCl 溶液新鲜配制。总测定体系 3 mL, 测定波长 254 nm。加入酶溶液 5~20  $\mu\text{L}$ , 立即摇匀校正零点, 然后间隔适当时间记录 A 值。完全水解的 A 值为 0.36。调酶浓度到 10 min 内水解反应不超过 30%。在测定范围内, 数据显示底物的水解速率与酶浓度呈明显的正相关关系。1 个酶活性单位定义为每 1 min 水解 1  $\mu\text{mol}$  底物所需要的酶量。

### 2.3 rCPB 酶液的稳定性

将添加甘油、未添加甘油的 2 组 rCPB 酶液分别置于 4, 25 和 -20  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 每隔一段时间测定其酶活力。以纯化后的 rCPB 酶液的酶活力作为 100%, 计算酶活力保留率(%)。

### 2.4 保护剂的添加对 rCPB 酶液冻干过程中酶活稳定性的影响

首先将 rCPB 酶液超滤浓缩至蛋白浓度为 19 mg/mL, 而后将不同类型保护剂分别按照一定含量百分比加入到 rCPB 酶液中, 溶解混匀, 冷冻干燥。用水溶解冷冻干燥的粉末至冷冻干燥前体积, 然后分别取样测定其酶活力。以冷冻干燥前 rCPB 酶液的酶活力为 100%, 计算酶活力保留率(%)。

### 2.5 保护剂对冻干品的性状及其溶解性的影响

观察加入不同保护剂的冻干品的溶解性和赋型性, 以及放置一段时间后的冻干品的形态。将此作为筛选冻干保护剂的参考因素。

## 3 结果

### 3.1 rCPB 酶液的稳定性

对置于不同温度下的 2 组 rCPB 酶液测定活力 ( $n=3$ ), 计算酶活保留率, 得到 rCPB 在 6 个月内的稳定性(见图 1)。

由图 1 可见, rCPB 酶液常温保存时, 其酶活丧

失最快, 3 个月后就剩不到 10%, 6 个月后活性几乎完全丧失; 在 4 和 -20  $^{\circ}\text{C}$  条件下保存时, -20  $^{\circ}\text{C}$  下的酶活丧失略小于 4  $^{\circ}\text{C}$ , 且两者酶活丧失都要远小于常温保存的, 6 个月后两者的酶活保留率都在 50% 以上。由此可以看出, 低温保存有利于 rCPB 酶液的稳定。

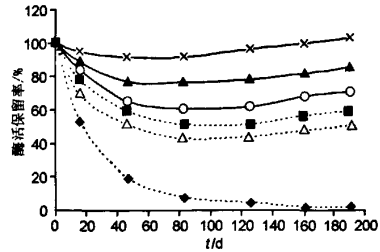


Fig. 1 Stability of rCPB solution  
 - x - .4  $^{\circ}\text{C}$ , 25% 甘油; -  $\Delta$  - . -20  $^{\circ}\text{C}$ , 25% 甘油; -  $\circ$  - .25  $^{\circ}\text{C}$ , 25% 甘油; -  $\square$  - . -20  $^{\circ}\text{C}$ ; -  $\Delta$  - .4  $^{\circ}\text{C}$ ; -  $\diamond$  - .25  $^{\circ}\text{C}$   
 - x - .4  $^{\circ}\text{C}$ , 25% glycerol; -  $\Delta$  - . -20  $^{\circ}\text{C}$ , 25% glycerol; -  $\circ$  - .25  $^{\circ}\text{C}$ , 25% glycerol; -  $\square$  - . -20  $^{\circ}\text{C}$ ; -  $\Delta$  - .4  $^{\circ}\text{C}$ ; -  $\diamond$  - .25  $^{\circ}\text{C}$

图 1 rCPB 酶液的稳定性

Fig. 1 Stability of rCPB solution

另外, 从图 1 还可以看出, 25% 甘油的加入能明显提高 rCPB 酶液的稳定性, 加入甘油的酶液在 3 个温度下的同期酶活保留率都显著高于不加甘油的。即使在常温下, 加入 25% 甘油的 rCPB 酶液的酶活保留率在 6 个月后就达到 70%; 4  $^{\circ}\text{C}$  下含 25% 甘油的 rCPB 酶液最为稳定, 其酶活保留率在 1 年后没有任何损失(数据未列出)。

### 3.2 保护剂添加对冻干过程中的 rCPB 活力稳定性的影响

将可能具有保护作用的几种冻干保护剂添加到 rCPB 酶液中, 然后进行冷冻干燥, 比较其对酶液冷冻干燥过程中 rCPB 稳定性的影响。结果见表 1。

由表 1 可见, 在 rCPB 冻干过程中, 加入 3% 的甘露醇对其保护效果最好, 酶活保留率超过了 100%。这与胰脏提取 CPB 酶液的最适冻干保护剂相符。李显林等<sup>[7]</sup>在其专利中指出 3%~5% 甘露醇为胰脏提取 CPB 的最适冻干保护剂。5% 海藻糖作为冻干保护剂, rCPB 酶活保留率也达到了 100%。1% 和 3% 的海藻糖和甘露醇条件下的酶活保留率虽然都在 100% 以下, 但都高于对照组(未加保护剂)的 83.8%。这说明海藻糖、甘露醇对 rCPB 都有不同程度的保护作用。保护能力最差的是山梨醇, 添加低浓度山梨醇的 rCPB 冻干品, 其酶活保留率低于对照组, 浓度达到 5% 后酶活保留率才提高到 94.6%。

从表 1 还可看出, 海藻糖、山梨醇对 rCPB 冻干

过程的保护作用具有浓度依赖性,随着浓度的升高,酶活保留率也在上升;而甘露醇浓度达到 5% 后,酶活保留率反而下降,因此其最适浓度为 3%。

表 1 不同保护剂对重组羧肽酶 B 冻干过程的影响

Tab. 1 The effect of different additives on lyophilization of rCPB

保护剂	浓度 /%	酶活保留率 /%	赋型性	溶解性
海藻糖	1	94.6	好,蓬松	易溶
	3	94.6	好,蓬松	易溶
	5	100	好,蓬松	易溶
山梨醇	1	67.6	一般,紧实	易溶
	3	75.7	一般,紧实	易溶
	5	94.6	一般,紧实	易溶
甘露醇	1	91.4	好,蓬松	极易溶
	3	102.7	好,蓬松	极易溶
	5	89.2	好,蓬松	极易溶
未加保护剂	-	83.8	一般,紧实	不易溶

### 3.3 保护剂对冻干品的性状及其溶解性的影响

不加入任何保护剂的冻干品,呈白色粉末状,色泽比较均一,但溶解性差,甚至不能完全溶解,可能是因为冷干燥过程中产生的一些应力使得 rCPB 蛋白变性,破坏了蛋白的稳定性。甘露醇是目前最常用的生物蛋白冻干制剂的保护剂,不仅在冻干过程中起到赋型剂的作用,同时也是蛋白的保护剂。加入甘露醇的 rCPB 冻干品外观细腻,色泽洁白溶解度和澄清度均很好。放置一段时间后,其外观、色泽、溶解度和澄清度都依然很好,没有什么改变。加入海藻糖的 rCPB 冻干品,在冻干刚结束时,其外观、色泽、溶解度和澄清度都很好,但海藻糖很容易吸潮,放置一段时间后,出现萎缩,色泽稍变黄,溶解度和澄清度也变差。而加入山梨醇的 rCPB 冻干品,外观上出现崩塌,结构比较紧密。因此,总的来看,3% 甘露醇作为 rCPB 的冻干保护剂,无论从活性的保持以及所得冻干品的外观和溶解性来看,都是最合适的。

## 4 讨论

保护剂对液体蛋白质的保护机理,目前被广为接受的是优先作用假说<sup>[8]</sup>,在有起稳定作用的保护剂存在的条件下,蛋白质优先与水作用(优先水合),而保护剂优先被排斥在蛋白质区域外(优先排斥)。在这种情况下,蛋白质表面就比其外部溶液含有较多的水分子和较少的保护剂分子,从而起到稳定蛋白质的水化膜,发挥对蛋白质的保护作用。这可解释本实验中甘油对 rCPB 酶液的保护作用。

冷冻干燥过程中,由于脱水过程本身会使蛋白质损伤,使得复水后的蛋白质很容易失去活性。因此,必须加入保护剂以减少酶活力的损失。目前,对于保护剂稳定生物分子的机理主要有两种假说<sup>[8]</sup>:一种是“水替代”假说,认为蛋白质在冷冻干燥过程中失去水分后,保护剂的羟基能替代蛋白质表面的水的羟基,使蛋白质表面形成一层假定的水化膜,从而保护氢键的联结位置不直接暴露在周围环境中,稳定蛋白质的高级结构。另一种称为“玻璃态”假说,认为在含保护剂溶液的干燥过程中,当浓度足够大且保护剂的结晶不会发生时,保护剂-水混合物就会玻璃化。在玻璃态下,具有黏性的保护剂包围在蛋白质分子的周围,形成一种玻璃体,阻止蛋白质的伸展和沉淀,维持蛋白质分子三维结构的稳定,从而起到保护作用。有研究报道保持玻璃态的甘露醇在药品冷冻干燥过程中能够保护蛋白质的活性,而结晶的甘露醇则对蛋白质不能起保护作用<sup>[9]</sup>。

本实验中 3% 甘露醇对冻干过程中的 rCPB 保护效果最好。甘露醇作为保护剂所得的 rCPB 冻干品具有成型性好,放置过程中稳定性好,不易吸潮,极易溶解等特点,而且甘露醇对溶解后的 rCPB 同样具有活性保护作用。因此,甘露醇是 rCPB 的一种理想的冻干保护剂。

### 参考文献:

- [1] Li S X, Zhang Y J, Tian L P, et al. Cloning, expression of a new procarboxypeptidase B gene in *Escherichia coli* and purification of recombinant carboxypeptidase B [J]. *Protein Pept Lett*, 2003, 10 (6): 1-10.
- [2] 张映新, 李素霞, 杨祥, 等. 重组羧肽酶原 B 在大肠杆菌中的可溶性表达及活性羧肽酶 B 的纯化 [J]. *药物生物技术*, 2006, 13 (2): 83-86.
- [3] 周颖, 杨桦, 肖尚志, 等. 羧肽酶 B 的稳定性考察 [J]. *中国生化药物杂志*, 2002, 23 (4): 185-186.
- [4] 王伟刚, 吴以芳, 姚松. 羧肽酶 B 保存方法及其稳定性比较 [J]. *武汉工业学院学报*, 2006, 25 (2): 10-11.
- [5] 李素霞, 田丽萍, 张晓彦, 等. 重组羧肽酶 B 在胰岛素原 C 肽制备工艺中的应用 [J]. *华东理工大学学报: 自然科学版*, 2004, 30 (4): 387-391.
- [6] Folk J E, Piez K A, Carroll W R, et al. Carboxypeptidase B: IV. purification and characterization of the porcine enzyme [J]. *J Biol Chem*, 1960, 235: 2272-2277.
- [7] 李显林, 杨炜, 王伟刚. 一种羧肽酶 B 的制备方法及其组合物: 中国, CN1948471 [P]. 2007-04-18.
- [8] 张玉华, 凌沛学, 籍保民, 等. 糖类在生物活性物质冷冻干燥中的保护作用及其作用机制 [J]. *中国生化药物杂志*, 2006, 27 (4): 247-249.
- [9] 刘占杰, 华泽钊. 蛋白质药品冷冻干燥过程中变性机理的研究进展 [J]. *中国生化药物杂志*, 2000, 21 (5): 263-265.

# 重组羧肽酶B的稳定性研究

作者: [王亚辉](#), [辛爱洁](#), [李素霞](#), [WANG Ya-hui](#), [XIN Ai-jie](#), [LI Su-xia](#)  
作者单位: [华东理工大学, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海, 200237](#)  
刊名: [中国生化药物杂志](#)   
英文刊名: [CHINESE JOURNAL OF BIOCHEMICAL PHARMACEUTICS](#)  
年, 卷(期): 2010, 31 (4)

## 参考文献(9条)

1. 周颖;杨桦;肖尚志 [羧肽酶B的稳定性考察](#)[期刊论文]-[中国生化药物杂志](#) 2002(04)
2. 刘占杰;华泽钊 [蛋白质药品冷冻干燥过程中变性机理的研究进展](#)[期刊论文]-[中国生化药物杂志](#) 2000(05)
3. 张玉华;凌沛学;籍保民 [糖类在生物活性物质冷冻干燥中的保护作用及其作用机制](#)[期刊论文]-[中国生化药物杂志](#) 2006(04)
4. 李显林;杨炜;王伟刚 [一种羧肽酶B的制备方法及其组合物](#) 2007
5. Folk J E;Piez K A;Carroll W R [Carboxypeptidase B:IV.purification and characterization of the porcine enzyme](#) 1960
6. 李素霞;田丽萍;张晓彦 [重组羧肽酶B在胰岛素原C肽制备工艺中的应用](#)[期刊论文]-[华东理工大学学报\(自然科学版\)](#) 2004(04)
7. 王伟刚;吴以芳;姚松 [羧肽酶B保存方法及其稳定性比较](#)[期刊论文]-[武汉工业学院学报](#) 2006(02)
8. 张映新;李素霞;杨梓 [重组羧肽酶原B在大肠杆菌中的可溶性表达及活性羧肽酶B的纯化](#)[期刊论文]-[药物生物技术](#) 2006(02)
9. Li S X;Zhang Y J;Tian L P [Cloning, expression of a new procarboxypeptidase B gene in Escherichia coli and purification of recombination carboxypeptidase B](#) 2003(06)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zgshywzz201004008.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgshywzz201004008.aspx)