

3种固定化尖吻蝾蛇毒金属蛋白酶的比较^{*}

聂学奎, 和七一, 黄达春, 陈峻波, 余晓东

(重庆师范大学 生命科学院 教育部活性物质生物技术工程研究中心 重庆市生物活性物质工程研究中心, 重庆 401331)

摘要:【目的】筛选出一种最优的固定化尖吻蝾(*Deinagkistrodon acutus*)蛇毒金属蛋白酶(Snake venom metalloproteinase, SVMP)的方法。【方法】采用D380大孔树脂、海藻酸钠-壳聚糖、溶胶-凝胶等3种载体固定化SVMP,用分光光度法检测固定化金属蛋白酶和游离金属蛋白酶的酶活性,计算它们的酶搭载率、酶活回收率,并检验它们的温度耐受性、pH耐受性和重复使用性,并由此筛选出最优固定化方法。【结果】溶胶-凝胶固定化酶、海藻酸钠-壳聚糖固定化酶和D380大孔树脂固定化酶的酶搭载率分别为91.47%,78.14%和49.44%;D380大孔树脂固定化酶、海藻酸钠-壳聚糖固定化酶和溶胶-凝胶固定化酶的酶活回收率分别为39.00%,39.53%和41.17%;重复使用4次后,溶胶-凝胶固定化酶的酶活回收率最高;溶胶-凝胶固定化酶pH耐受性最优,对温度的耐受性也最高。【结论】溶胶-凝胶固载体固定尖吻蝾蛇SVMP的效果最优。

关键词:固定化酶;D380大孔树脂载体;海藻酸钠-壳聚糖载体;溶胶-凝胶载体;蛇毒金属蛋白酶(SVMP);尖吻蝾

中图分类号:O221.6

文献标志码:B

文章编号:1672-6693(2021)03-0107-07

蛇毒金属蛋白酶(Snake venom metalloproteinase,SVMP)具有水解纤维蛋白(原)、活化凝血因子X、诱导细胞凋亡、抑制血小板聚集、促炎、抑制血液丝氨酸蛋白酶活性等功能^[1]。大多数蛙蛇蛇毒中的金属蛋白酶含量占毒液蛋白总量的30%以上^[2],表明金属蛋白酶在蛙蛇蛇伤相偶联的病理反应中扮演着重要角色。尖吻蝾(*Deinagkistrodon acutus*)属于蛇亚目(Serpentes)蝰蛇科(Viperidae)蝮亚科(Crotalinae),它的蛇毒的主要成分是SVMP。SVMP根据相对分子质量大小可分为3类^[3]。绝大部分SVMP为出血毒素,少量为非出血毒素,非出血SVMP可以直接降解纤维蛋白和纤维蛋白原^[4]。到目前为止,治疗蛇伤最有效的药物仍是抗蛇毒血清。蛇毒作为抗原免疫马(*Equus caballus*)、兔(*Oryctolagus curiculus*)等动物,得到特异性免疫血清即可用于治疗蛇伤。但是,这一制备过程中会产生大量的异源蛋白质,因此易引发过敏反应和过敏性休克,导致血清病的发生^[5]。事实上,抗蛇毒血清很难完全阻止由SVMP引发的局部损伤。另外,抗蛇毒血清制备过程复杂、价格昂贵,这导致它的应用受到了限制^[6-10]。因此,寻找新的治疗蛇伤的药物来治愈或减轻患者的局部损伤,显得尤为重要。

不少植物中含有丰富的天然抑制剂和药理学成分,在医疗中作为药物有广泛的应用^[11-13]。近些年来,科研工作者就中草药抗蛇毒的功效进行了大量研究,并从中得到了多个SVMP抑制剂,动物实验已经证实了它们在治疗局部损伤和系统性毒性中的效果^[14-15]。SVMP抑制剂的筛选方法包括分光光度法和平板法,这些方法的优点是操作简便且无需复杂设备,但是植物提取物本身的颜色干扰严重,导致筛选困难。因此,建立高效、准确的SVMP天然植物抑制剂筛选模型十分必要。固定化酶技术是一种将酶固定在固体载体上的技术,酶、蛋白质、抗体、细胞等均可作为配体^[16]。目前,基于固定化模型从天然产物中筛选抑制剂多有报道,例如有关葡萄糖苷酶^[17]、胰蛋白酶^[18]、凝血酶^[19]、乙酰胆碱脂酶^[20]等酶的抑制剂筛选。相对于游离酶而言,固定化酶在筛选天然活性成分过程中可明显提高分离纯化效率,简化纯化过程。同时,固定化酶还可以实现酶的重复利用,降低实验成本。

^{*} 收稿日期:2020-09-14 修回日期:2020-10-22 网络出版时间:2021-05-20 09:09

资助项目:国家自然科学基金(No. 31470570);重庆自然科学基金(No. cstc2017chmsxdny0246);重庆师范大学基金项目(No. 17XLB01311; No. 19XLB006);中央林业改革发展资金科技推广项目(渝林科推 2019-2)

第一作者简介:聂学奎,男,研究方向为生物毒素与药物研发,E-mail: nxkpersonal@163.com;通信作者:余晓东,男,教授,博士,E-mail: yxd@cqnu.edu.cn

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20210519.1724.028.html>

此外,固定化酶在使用过程中更易控制^[21],而且固定化酶热稳定性较强^[22-23],更耐酸碱^[24]。

基于上述背景,本研究分别采用 D380 大孔树脂、海藻酸钠-壳聚糖以及溶胶-凝胶为载体,对尖吻蝾 SVMP 进行固定化处理,计算了酶活回收率和酶搭载率,并检验了上述方法的重复使用性,进而选出最优的 SVMP 固定化载体,以便为后期从天然药用植物中筛选 SVMP 抑制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

研究所用的尖吻蝾 SVMP 在笔者所在实验室进行制备,−20 ℃ 储藏。壳聚糖(脱乙酰度达 90.0 %,高粘度,生物试剂级别)由上海瑞永生物科技有限公司提供;大孔弱碱性阴离子交换树脂 D380(分析纯)由郑州和成新材料科技有限公司提供;戊二醛溶液(质量浓度为 25%)由成都市科隆化学品有限公司提供;四甲氧基硅烷(纯度为 98%)由上海阿拉丁生化技术有限公司提供;偶氮酪蛋白由西格玛奥德里奇公司提供;其他实验有关试剂均为分析纯或生化试剂级别。

研究所用仪器有:FD-1A-50 型冷冻干燥机(北京博医康仪器有限公司)、GZX-9146MBE 型电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、TU-10 型恒温金属浴(上海一恒科技有限公司)、TGL-20 型台式低温冷冻离心机(四川蜀科仪器有限公司)、TY-80AIS 型脱色摇床(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)、HH·S21-BS 型数显式电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械有限公司)、BT25S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)、SP-Max 2300A2 型光吸收型全波长酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司)、IKA® Vortex Genius 3 型涡旋振荡器(德国艾卡公司)、RCT basic 型恒温磁力搅拌器(德国艾卡公司)。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质含量的测定 根据文献[25],将 100 mg 考马斯亮蓝 G250 溶于 50 mL 体积分数为 95% 的乙醇溶液中,然后与 100 mL 质量分数为 85% 磷酸溶液混合,用蒸馏水稀释定容至 1 L。牛血清白蛋白(BSA)标准液质量浓度分别为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mg · mL^{−1}。取 160 μL 配置好的考马斯亮蓝 G250 溶液与 40 μL 的标准蛋白溶液充分混匀,5 min 后在波长为 595 nm 下测定混合溶液的吸光度。根据测得数值绘制标准曲线。以固定化过程中剩下的反应液和固定化酶洗涤液作为样品,代替标准蛋白,重复以上步骤。实验重复进行 3 次。

1.2.2 D380 大孔树脂载体制备固定化酶 参照文献[26],称取未活化弱碱性苯乙烯阴离子交换大孔树脂 5 g,根据使用说明书活化大孔树脂。活化处理过的树脂载体用无水乙醇浸泡 24 h 后,50 ℃ 条件下烘干。取 1 g 烘干后的树脂加到质量分数为 10% 的戊二醛溶液中,室温下振荡 24 h。然后用滤纸滤出树脂,用蒸馏水洗净,放入烘箱,在 50 ℃ 下干燥 24 h。将 20 mg 金属蛋白酶溶于 0.2 mol · L^{−1}, pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液中,与结合了戊二醛的树脂混合,冰水浴条件下温和振荡 2 h,再用 0.2 mol · L^{−1}, pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液清洗树脂,直至上清液中检测不到蛋白质,保留洗液。得到的固定化酶保存在 0.2 mol · L^{−1}, pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液中,保存温度为 4 ℃。以等量的缓冲液和 BSA 作为对照,重复上述步骤。实验重复进行 3 次。

1.2.3 海藻酸钠-壳聚糖制备固定化酶 按照文献[27],配制 0.5 mL 质量浓度为 40 mg · mL^{−1}的金属蛋白酶溶液与 5 mL 质量分数为 3% 的海藻酸钠溶液(40 ℃ 水浴溶解),玻璃棒搅拌混匀。取 0.1 g 壳聚糖溶于 5 mL 质量分数为 5% 的乙酸溶液(40 ℃ 水浴溶解),然后加 0.3 mol · L^{−1} 的 CaCl₂ 溶液 1 mL。磁力搅拌器温度恒定为 40 ℃,转速调节为 180 r · min^{−1},将金属蛋白酶和海藻酸钠的混合液滴入壳聚糖溶液中,滴完酶液后,相同条件下继续反应 30 min。然后,将从过滤反应体系得到的圆球状固定化酶颗粒转移到质量分数为 0.3% 的戊二醛溶液中,在 4 ℃ 下交联 4 h。依次用浓度均为 0.1 mol · L^{−1} 的碳酸氢钠(pH 为 8.0)、氯化钠、乙酸钠和 Tris-HCl(pH 为 8.0)共 4 种溶液洗涤固定化酶颗粒。在清洗过程中将固定化酶置于摇床上轻轻震荡,清洗溶液用量为固定化酶体积的 3~5 倍;在换另一种清洗液前,用蒸馏水清洗 2 次。最后真空冷冻干燥固定化酶。以等量的缓冲液和 BSA 作为对照,重复上述步骤。实验重复进行 3 次。

1.2.4 溶胶-凝胶载体制备固定化酶 根据文献[28-29],配制两种混合液。混合液 A 的配制方法为:在烧杯中加入 1.7 mL 四甲氧基硅烷、100 μL 甲醇、300 μL 体积分数为 50% 的甘油溶液、250 μL 超纯水和 100 μL 浓度为 0.04 mol · L^{−1} 的盐酸溶液,混合后在涡旋振荡仪上震荡 20 min,并不时置于冰水浴中。混合液 B 的配置方法

为:把 500 μL 浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液(pH 为 7.5)与 500 μL 质量浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的金属蛋白酶溶液混匀。将混合液 A 和混合液 B 一次性快速混合均匀,凝胶快速形成,称重后静置于 4°C 冰箱中,凝胶为原来质量的 55%~60%时,即可磨成粉末储存在 4°C 环境下备用。空载制备过程和 BSA 固定化过程与酶固定化相同,分别将酶换成缓冲液和同质量浓度的 BSA 溶液。以等量的缓冲液和 BSA 作为对照,重复上述步骤。实验重复进行 3 次。

1.2.5 金属蛋白酶活性检测方法 参照文献[30]的方法,并稍作改进。将偶氮酪蛋白溶于质量分数为 1%的 NaHCO_3 溶液中,质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将 0.06 mL 的偶氮酪蛋白溶液与 7.5 mg 的冻干固定化酶(加入 400 μL pH 为 7.5 的 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl,浸泡至固定化酶体积不再增长,完全吸出缓冲液),并在 37°C 下孵育 60 min。加入与底物等体积的 $1.16 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高氯酸停止反应,离心去除沉淀,取上清 150 μL ,在波长为 440 nm 处测定吸光度。对照分别为空载的海藻酸钠-壳聚糖固定化酶和 BSA 搭载的海藻酸钠-壳聚糖固定化酶。

1.2.6 温度对固定化酶活性的影响 分别取 3 种一定量的固定化金属蛋白酶和游离金属蛋白酶,根据上述酶活检测方法,分别在 35,40,45,50,55 $^\circ\text{C}$ 等不同的温度下测定固定化酶酶活力,其他条件保持不变。以最大吸光度为 100%酶活力,并计算各酶的相对酶活力。

1.2.7 pH 对固定化酶活性的影响 取一定量的 3 种固定化金属蛋白酶和游离金属蛋白酶,在 pH 分别为 7.0,7.5,8.0,8.5 和 9.0 的条件下测定固定化酶和游离酶的活力,其他条件相同。以最大吸光度为 100%酶活力,并计算各酶的相对酶活力。

1.2.8 固定化酶的重复使用性 固定化酶能从反应体系中分离,实现重复使用的可能性。在海藻酸钠-壳聚糖固定化酶中加入 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 为 7.5 的 Tris-HCl,在溶胶-凝胶固定化酶和 D380 大孔树脂固定化酶加入 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 为 7.5 的磷酸盐缓冲液,并加入底物反应 60 min,然后分离液体和固体,洗涤,重复测定固定化酶的酶活性,考察固定化酶重复使用的稳定性。

1.2.9 固定化酶酶活回收率和酶搭载率 利用酶活力测定方法,分别计算 3 种固定化酶酶活回收率,即:

$$\text{固定化酶酶活性回收率} = \frac{\text{固定化酶相对酶活力}}{\text{游离酶相对酶活力}} \times 100\%。$$

采用蛋白质含量测定方法,分别计算 3 种固定化酶酶搭载率,即:

$$\text{固定化酶酶搭载率} = \frac{\text{洗涤液蛋白质含量} - \text{剩余固定化反应液的蛋白质含量}}{\text{游离酶蛋白质含量}} \times 100\%。$$

2 结果

2.1 温度对固定化酶活性的影响

在不同的温度条件下,测定 3 种不同固定化酶和游离酶的相对酶活力变化。由图 1 可知,游离酶、溶胶-凝胶固定化酶、D380 大孔树脂固定化酶和海藻酸钠-壳聚糖固定化酶相对酶活力最高时的温度分别为 45,50,45 和 45°C 。

2.2 pH 对固定化酶活性的影响

由图 2 可知,3 种固定化酶的最适 pH 均为 8.0,此时它们的相对酶活力均达到最高值。同时,随着 pH 数值的上升,游离酶的活性下降速率明显快于固定化酶。

2.3 固定化酶的酶活回收率和酶搭载率

酶固定化过程中受构象效应、位阻效应、微扰效应、分配效应、扩散效应等效应的影响^[31],故有一定比例的酶是无效装载。研究结果显示:D380 大孔树脂固定化酶的酶搭载率、酶活回收率分别是 49.44%,41.17%;溶胶-凝胶固定化酶的酶搭载率、酶活回收率分别为 91.47%和 39.00%;海藻酸钠-壳聚糖固定化酶的酶搭载率、酶活回收率分别为 78.14%和 39.53%。

2.4 固定化酶的重复使用性

如图 3 所示,经多次使用后,相比于 D380 大孔树脂固定化酶,溶胶-凝胶固定化酶和海藻酸钠-壳聚糖固定化酶的相对酶活力更高,稳定性更强。

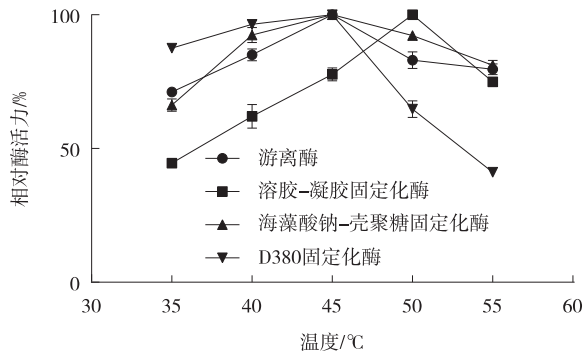


图 1 温度对游离酶和固定化酶的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the activity of immobilized metalloproteinase and free enzyme

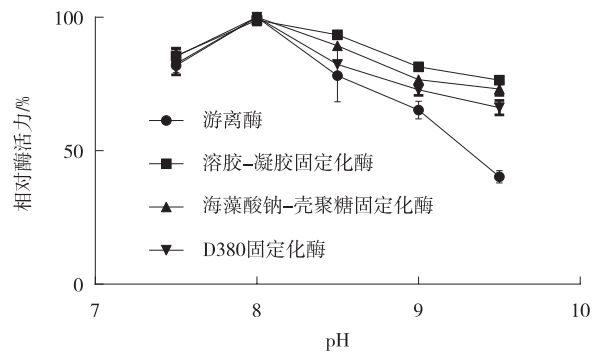


图 2 pH 对游离酶和固定化酶酶活力的影响

Fig. 2 Effects of different pH on the relative enzyme activity of immobilized metalloproteinase and free enzyme

3 讨论

固定化酶的自由度低于游离酶,温度升高可以提高底物和产物的扩散,从而加快反应速度。在本研究中,溶胶-凝胶固定化酶在 55 °C 条件下仍有活性。随着温度不断升高,固定化酶和游离酶的活性都逐渐降低;海藻酸钠-壳聚糖固定化酶与其他两种固定化酶相比,相对酶活力降低更慢。溶胶-凝胶固定化酶最适温度高于游离酶最适温度,说明溶胶-凝胶固定化酶耐热性有所提高。在研究过程中发现,磷酸盐缓冲液易破坏海藻酸钠-壳聚糖固定化酶。在 40 °C 条件下,海藻酸钠-壳聚糖载体可发生自溶,球体结构被破坏,变成粘稠液体。造成自溶原因可

能是钠离子扩大了载体孔径^[32]或者磷酸根离子与海藻酸钙凝胶竞争钙离子。D380 大孔树脂固定化酶与游离酶相比耐热性没有明显增强。但也有固定化酶最适温度低于游离酶的例子^[33]。在不断升温的过程中,溶胶-凝胶固定化酶在 50 °C 时酶活回收率达到最高,且温度越高反应速度越快,这提高了实验效率。

固定化载体的包裹作用具有维持酶结构稳定的作用^[34]。在相同的 pH 范围内,D380 大孔树脂固定化漆酶的酶活力稳定性高于漆酶游离酶^[26]。在本研究中,酶固定化后在 pH 逐渐增大时酶活性下降速率比游离酶更低;并且在相对极端的 pH 条件下,溶胶-凝胶固定化酶的稳定性更好,这延长了它的使用寿命。

本研究中使用的 3 种固定化方法得到的固定化酶的酶活性都低于游离酶活性,但也有报导共价结合的固定化 β -糖苷酶^[35]和纤维素酶^[36]的 K_m 值比它们的游离酶更低。溶胶-凝胶载体和海藻酸钠-壳聚糖载体分别以凝胶包埋法、微囊化法固定化酶,酶搭载率分别为 91.47% 和 78.14%,而 D380 大孔树脂固定化酶的酶搭载率仅为 49.44%。由于包埋法和微囊化法位阻效应尤其明显,导致溶胶-凝胶和海藻酸钠-壳聚糖固定化酶酶活回收率与共价结合的 D380 大孔树脂固定化酶没有明显差异,同时也表明微囊化法的位阻效应低于凝胶法。海藻酸钠-壳聚糖固定化酶的形成依赖于钙离子。较低的钙离子浓度导致包埋不完全,内酶泄漏;钙离子浓度过高,多余钙离子吸附在凝胶表面,与酶分子发生作用,抑制酶活性;同理,交联时间也不能过长^[33]。戊二醛既是反应的交联剂,也是酶的变性剂。制备 D380 大孔树脂固定化酶的反应过程当中戊二醛用量过高或过低、反应时间太长都不利于固定化反应,其中戊二醛用量过高会破坏游离酶的结构,而戊二醛用量过低则固定效果差。并且,用于搭载蛋白质的功能基团有限,如果酶量超过 D380 大孔树脂的搭载阈值,将导致酶搭载率降低,提高了实验成本。包埋法产生的固定化酶的酶搭载率明显高于共价结合产生的固定化酶,这除了跟戊二醛的两次反应过程有关,还与载体上结合戊二醛的活性基团数量以及戊二醛对酶的过多修饰密切相关^[22]。

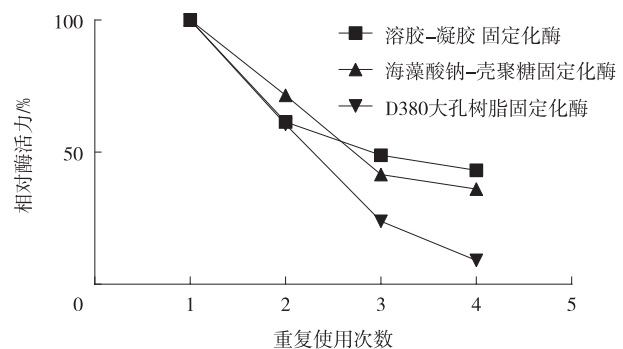


图 3 固定化酶的重复使用性

Fig. 3 Reusability of immobilized enzymes

总之,本研究中采用3种方法固定金属蛋白酶,酶在固定化后的部分性质得到改善:溶胶-凝胶固定化酶最适温度提高达50℃,比游离酶的最适温度高5℃;溶胶-凝胶固定化酶的酶活回收率和酶搭载率最高,节约了实验成本,且制备过程最简单,重复4次实验后的酶活回收率依然最高。因此,溶胶-凝胶载体固定尖吻蝮蛇SVMP的效果最优。

参考文献:

- [1] MARKLAND Jr. F S, SWENSON S. Snake venom metalloproteinases[J]. *Toxicon*, 2013; 62: 3-18.
- [2] FOX J W, SERRANO S M T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity[J]. *FEBS Journal*, 2008, 275(12): 3016-3030.
- [3] FOX J W, SERRANO S M T. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research[J]. *Journal of Proteomics*, 2009, 72(2): 200-209.
- [4] 范春阳, 钱友存, 杨胜利, 等. 五步蛇蛇毒金属蛋白酶 cDNA 的克隆和序列分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(5): 687-691.
FAN C Y, QIAN Y C, YANG S L, et al. Cloning and sequencing of metalloproteinase cDNA from snake venom of *Agkistrodon acutus*[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 15(5): 687-691.
- [5] SCHAEFFER T H, KHATRI V, REIFLER L M, et al. Incidence of immediate hypersensitivity reaction and serum sickness following administration of *Crotalidae polyvalent* immune Fab antivenom: a meta-analysis[J]. *Academic Emergency Medicine*, 2012, 19(2): 121-131.
- [6] KINI R M, SIDHU S S, LAUSTSEN A H. Biosynthetic oligoclonal antivenom (BOA) for snakebite and next-generation treatments for snakebite victims[J]. *Toxins (Basel)*, 2018, 10(12): 534.
- [7] LAUSTSEN A H, GUTIÉRREZ J M, KNUDSEN C, et al. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development[J]. *Toxicon*, 2018, 146: 151-175.
- [8] JENKINS T P, FRYER T, DEHLI R I, et al. Toxin neutralization using alternative binding proteins[J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(1): 53.
- [9] LAUSTSEN A H, KARATT-VELLATT A, MASTERS E W, et al. *In vivo* neutralization of dendrotoxin-mediated neurotoxicity of black mamba venom by oligoclonal human IgG antibodies[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3928.
- [10] YING H E, GAO J, LIN L, et al. Age-related variation in snake venom: evidence from two snakes (*Naja atra* and *Deinagkistrodon acutus*) in southeastern China[J]. *Asian Herpetological Research*, 2014, 5(2): 119-127.
- [11] HARVEY A L, EDRADE-EBEL R, QUINN R J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, 14(2): 111-129.
- [12] THOMFORD N E, SENTHEBANE D A, ROWE A, et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(6): 1578.
- [13] RODRIGUES T, REKER D, SCHNEIDER P, et al. Counting on natural products for drug design[J]. *Nature Chemistry*, 2016, 8(6): 531-541.
- [14] CHINNASAMY S, CHINNASAMY S, NAGAMANI S, et al. Identification of potent inhibitors against snake venom metalloproteinase (SVMP) using molecular docking and molecular dynamics studies[J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2015, 33(7): 1516-1527.
- [15] CHOUDHURY M, SENTHILVADIVEL V, VELMURUGAN D. Inhibitory effects of ascorbic acid toward snake venom metalloproteinase (SVMP) from Indian *Echis carinatus* venom: Insights from molecular modeling and binding studies[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2018, 32(12): e22224.
- [16] 陈军辉, 史倩, 陈晨, 等. 固定化乙酰胆碱酯酶的制备及其特性研究[J]. *化学学报*, 2012, 70(5): 624-628.
CHEN J H, SHI Q, CHEN C, et al. Preparation and characterization of immobilized acetylcholinesterase[J]. *Journal of chemistry*, 2012, 70(5): 624-628.
- [17] ZHU W J, SUN S, YANG F, et al. UHPLC/MS Identifying potent β -glucosidase inhibitors of grape pomace via enzyme immobilized method[J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(4): 1131-1139.
- [18] CHENG M, CHEN Z L. Trypsin inhibitor screening in traditional Chinese medicine by using an immobilized enzyme

- microreactor in capillary and molecular docking study[J]. Journal of Separation Science, 2017, 40(15): 3168-3174.
- [19] LI Q Q, YANG F Q, WANG Y Z, et al. Evaluation of thrombin inhibitory activity of catechins by online capillary electrophoresis-based immobilized enzyme microreactor and molecular docking[J]. Talanta, 2018, 185: 16-22.
- [20] WANG L, ZHAO Y M, ZHANG Y Y, et al. Online screening of acetylcholinesterase inhibitors in natural products using monolith-based immobilized capillary enzyme reactors combined with liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2018, 1563: 135-143.
- [21] 尹志娜. 固定化酶及其在食品和生物领域的研究进展[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(10): 11-15.
YIN Z N. Immobilized enzyme and its research progress in food and biology[J]. Journal of Life Science Instrument, 2009, 7(10): 11-15.
- [22] 高尚欣, 周冰如, 周锦丝, 等. 海藻酸钠-壳聚糖共固定化菠萝茎蛋白酶的研究[J]. 食品工业科技, 2011(5): 209-211.
GAO S X, ZHOU B R, ZHOU J S, et al. Study on the co-immobilization of bromelain with sodium alginate chitosan[J]. Journal of Food Industry Technology, 2011(5): 209-211.
- [23] WANG W, XU Y, QIN X, et al. Immobilization of lipase SMG1 and its application in synthesis of partial glycerides[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2014, 116(8): 1063-1069.
- [24] 艾志录. 橄榄绿链霉菌 E-86 木聚糖酶的固定化及低聚木糖制备研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
AI Z L. Immobilization of xylanase from *Streptomyces olivaceus* E-86 and preparation of xylooligosaccharide[D]. Beijing: China Agricultural University, 2004.
- [25] 王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J]. 天津化工, 2009, 23(3): 40-42.
WANG X P, XING S L. Determination of protein content by Coomassie brilliant blue method[J]. Journal of Tianjin chemical industry, 2009, 23(3): 40-42.
- [26] ZHANG J, YU Y, REN J, et al. Laccase immobilization on D380 macroporous exchange resin by cross-linking with glutaraldehyde[J]. Advanced Materials Research, 2010, 113/114/115/116: 2115-2118.
- [27] 李晓静, 侯俊财, 江连洲, 等. 海藻酸钠-壳聚糖固定化胃蛋白酶的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(1): 168-173.
LI X J, HOU J C, JIANG L Z, et al. Study on the immobilization of pepsin by sodium alginate chitosan[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(1): 168-173.
- [28] 李枬. 基于固定化乙酰胆碱酯酶亲和色谱技术的天然活性成分筛选研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
LI Z. Screening of natural active components based on immobilized ache affinity chromatography [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014.
- [29] ARIGA O, SUZUKI T, SANO Y, et al. Immobilization of a thermostable enzyme using a sol-gel preparation method[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996, 82(4): 341-345.
- [30] FÉLIX-SILVA J, SOUZA T, MENEZES Y A S, et al. Aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) inhibits enzymatic and biological actions of *Bothrops jararaca* snake venom[J]. PLoS ONE, 2014, 9(8): e104952.
- [31] 王伟宸. 超大孔微球固定化酶体系的构建和应用[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2016.
WANG W C. Construction and application of enzyme immobilization system with macroporous microspheres [D]. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2016.
- [32] 张佳宁, 宋云花, 王玥, 等. 海藻酸钠-壳聚糖固定化磷脂酶 A2 的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(21): 201-205.
ZHANG J N, SONG Y H, WANG Y, et al. Study on the immobilization of phospholipase A2 by sodium alginate chitosan[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(21): 201-205.
- [33] 牛海滨, 蔡苏兰, 阎浩林, 等. 大孔树脂 D380 固定化硫酸软骨素裂解酶[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(2): 203-206.
NIU H B, CAI S L, YAN H L, et al. Immobilization of chondroitin sulfate lyase with macroporous resin D380[J]. Chinese Journal of biological products, 2010, 23(2): 203-206.
- [34] 张智, 王瑾, 王腾宇, 等. 磷脂酶固定化方法的研究[J]. 中国油脂, 2009, 34(9): 35-38.
ZHANG Z, WANG J, WANG T Y, et al. Study on the way of immobilization of phospholipase[J]. China Oils and Fats, 2009, 34(9): 35-38.
- [35] PETZELBAUER I, KUHN B, SPLECHTNA B, et al. Development of an ultrahigh-temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose. IV. immobilization of two thermostable beta-glycosidases and optimization of a packed-bed reactor for lactose conversion[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2010, 77(6): 619-631.

- [36] YUAN X Y, SHEN N X, SHENG J, et al. Immobilization of cellulase using acrylamide grafted acrylonitrile copolymer membranes[J]. Journal of Membrane Science, 1999, 155(1): 101-106.

Preparation and Characterization of Three Immobilized Metalloproteinase from the Venom of *Deinagkistrodon acutus*

NIE Xuekui, HE Qiyi, HUANG Dachun, CHEN Junbo, YU Xiaodong

(Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance, Ministry of Education Engineering

Research Center of Active Substance and Biotechnology, College of Life Science,

Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To screen an optimal method for immobilization of snake venom metalloproteinase (SVMP) from *Deinagkistrodon acutus*. [Methods] The immobilization of SVMP was carried out by using three carriers, including D380 macroporous resin, sodium alginate-chitosan and sol-gel. The enzymatic activities of immobilized and free metalloproteinases were measured spectrophotometrically, their enzyme loading rates and enzyme activity recoveries were calculated, and their temperature tolerance, pH tolerance and reusability were examined, and the optimal immobilization method was screened. [Findings] The enzyme loading rates of sol-gel immobilized enzyme, sodium alginate-chitosan immobilized enzyme and D380 macroporous resin immobilized enzyme were 91.47%, 78.14% and 49.44%, respectively; the enzyme activity recovery rates of D380 macroporous resin immobilized enzyme, sodium alginate-chitosan immobilized enzyme and sol-gel immobilized enzyme were 39.00%, 39.53% and the enzyme activity recovery of lyso-gel immobilized enzyme was the highest after four times of repeated use; the pH tolerance of lyso-gel immobilized enzyme was the best and the temperature tolerance was also the highest. [Conclusions] The sol-gel immobilized enzyme had the best effect on the immobilization of SVMP from the sharp-nosed pit viper.

Keywords: immobilized enzyme; D380 macroporous resin carrier; sodium alginate-chitosan carrier; sol-gel carrier; snake venom metalloproteinase (SVMP); *Deinagkistrodon acutus*

(责任编辑 方 兴)