



(21) 申请号 201210598004. 5

(22) 申请日 2012. 12. 30

(73) 专利权人 青岛九龙生物医药有限公司

地址 266100 山东省青岛市崂山区株洲路
97 号

(72) 发明人 王议锋 刘翠珍 葛翠凤 宋超龙

(51) Int. Cl.

C12N 9/76 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1944641 A, 2007. 04. 11,

CN 1696284 A, 2005. 11. 16,

CN 102174495 A, 2011. 09. 07,

CN 101643723 A, 2010. 02. 10,

CN 1807612 A, 2006. 07. 26,

审查员 王知非

(54) 发明名称

从动物胰脏中提取胰蛋白酶的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种从动物胰脏中提取胰蛋白酶的方法。本发明的技术方案是利用硫酸溶液将胰腺细胞中含有的酶原提取出来,然后根据等电点沉淀的原理,调节 pH,硫酸铵分级盐溶、盐析将胰蛋白酶原等沉淀析出。本法每千克胰脏可得 6 克胰蛋白酶。

1. 一种从动物胰脏中提取胰蛋白酶的方法,其特征在于,该方法包括如下步骤:

1. 提取工序:

1.1 新鲜的胰脏,用镊子和剪刀将脂肪结缔组织除去,置绞碎机中绞碎,称重 15Kg;

1.2 绞碎物置塑料桶中,用 0.125mol / L 硫酸溶液 30L 浸渍 24 小时,在浸渍期中每小时搅拌 1 次;

1.3 将浸渍物置滤袋过滤,滤渣再用 0.125mol / L 硫酸溶液 15L 浸渍 1 小时,滤干后弃去滤渣;

2. 盐溶、盐析工序:

2.1 将两次浸渍液合并,体积为 44.9L,置塑料桶中,每 1000ml 溶液中加入固体硫酸铵 242g,达到 40% 饱和度,共加 10.866Kg 固体硫酸铵,静置 12 小时;

2.2 过滤,留取过滤液,滤液体积为 44L,固体弃去;

2.3 在每 1000ml 清液中加入固体硫酸铵 205g,达到 70% 饱和度,共用硫酸铵 9.020kg,静置 12 小时;

2.4 过滤,留取滤饼,称重 269.2g,弃滤液;

2.5 用 807.6ml 水溶解,再按 2.1、2.2、2.3、2.4 步骤分次加固体硫酸铵近 40% 和 70% 饱和度沉淀;

2.6 70% 饱和度沉淀物,称重 178.5g,用 267.8ml 水溶解,加入 89.3ml 饱和硫酸铵溶液,并用 5mol / L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 5.00;

2.7 将溶液静置 25℃ 恒温箱中 48 小时,有针状的糜蛋白酶粗品结晶析出;

2.8 过滤,母液用 0.25mol / L 硫酸调节 pH 至 3.0,其体积为 328.4ml 加入硫酸铵 100.8g,静置 12 小时;

3. 干燥工序:

取沉淀物,置真空干燥箱内干燥,即得胰蛋白酶粗品,称重 91.8g,即每千克胰脏可得 6.12 克胰蛋白酶。

从动物胰脏中提取胰蛋白酶的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地说涉及从动物胰脏中分离胰蛋白酶的方法。

背景技术

[0002] 胰蛋白酶 Trypsin (Pancrezyme) 为蛋白酶的一种, EC3. 4. 21. 4。在脊椎动物中,作为消化酶而起作用。在胰脏是作为酶的前体胰蛋白酶原而被合成的。作为胰液的成分而分泌,受肠激酶,或胰蛋白酶的限制分解成为活化胰蛋白酶,是肽链内切酶,它能把多肽链中赖氨酸和精氨酸残基中的羧基侧切断。它不仅起消化酶的作用,而且还能限制分解糜蛋白酶原、羧肽酶原、磷脂酶原等其它酶的前体,起活化作用。是特异性最强的蛋白酶,在决定蛋白质的氨基酸排列中,它成为不可缺少的工具。

[0003] 糜胰蛋白酶与弹性蛋白酶在结构和催化机制方面也具有密切关系,但其特异性则完全不同。胰蛋白酶系自牛、羊或猪胰中提取的一种蛋白水解酶。中国药品标准规定按干燥品计算,每 1mg 的效价不得少于 2500 单位。由牛、羊、猪胰脏提取而得的一种肽链内切酶,只断裂赖氨酸或精氨酸的羧基参与形成的肽键。白色或米黄色结晶性粉末。溶于水,不溶于乙醇、甘油、氯仿和乙醚。分子量 24000, pI10. 5,最适 pH 值 7. 8 ~ 8. 5 左右。pH > 9. 0 不可逆失活。Ca²⁺ 对酶活性有稳定作用;重金属离子、有机磷化合物、DFP、天然胰蛋白酶抑制剂对其活性有强烈抑制。临床用于抗炎消肿,工业上用于皮革制造、生丝处理、食品加工等。

[0004] 胰蛋白酶为蛋白质水解酶,能选择地水解蛋白质中由赖氨酸或精氨酸的羧基所构成的肽链,能消化溶解变性蛋白质,对未变性的蛋白质无作用,因此,能使脓、痰液、血凝块等分解、变稀,易于引流排除,加速创面净化,促进肉芽组织新生,此外还有抗炎症作用。临床上用于脓胸、血胸、外科炎症、溃疡、创伤性损伤、瘻管等所产生的局部水肿、血肿及脓肿等。喷雾吸入,用于呼吸道疾病。也可用于治疗毒蛇咬伤。还常用于动物细胞培养前对组织的处理。

[0005] 胰蛋白酶的作用是使细胞间的蛋白质水解从而使细胞离散。不同的组织或者细胞对胰酶的作用反应不一样。胰酶分散细胞的活性还与其浓度、温度和作用时间有关,在 pH 为 8. 0、温度为 37℃ 时,胰酶溶液的作用能力最强。使用胰酶时,应把握好浓度、温度和时间,以免消化过度造成细胞损伤。因 Ca²⁺、Mg²⁺ 和血清、蛋白质可降低胰酶的活性,所以配制胰酶溶液时应选用不含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 BSS,如 :D-Hanks 液。终止消化时,可用含有血清培养液或者胰酶抑制剂终止胰酶对细胞的作用。

[0006] 用现有的方法提取胰蛋白酶是相当困难的。2006 年 7 月上海阿敏制药有限公司公开了一种糜胰蛋白酶的制备方法 (200610023582. 0),其采用低温酸提、梯度盐析、冰水透析、亲和层析、乙醇醇析的产品工艺,得到糜胰蛋白酶。2011 年 1 月马忠仁等申请了一种提取糜胰蛋白酶的方法 (200910170682. X),其采用了 CaCl₂ 激活糜胰蛋白酶原成为糜胰蛋白酶的同时加入饱和度的 (NH₄)₂SO₄,使其生成硫酸钙沉淀吸附糜胰蛋白酶,经过洗脱、盐析、超滤和冻干获得白色的糜胰蛋白酶的冻干粉末。产品均为糜胰蛋白酶的混合物,没有单纯

的提取胰蛋白酶。本发明降低了成本,且能将胰蛋白酶提取出来。

发明内容

[0007] 本发明的目的是从动物的胰脏中提取胰蛋白酶,实现糜胰蛋白酶的分离。

[0008] 本发明的技术方案是:利用硫酸溶液将胰腺细胞中含有的酶原提取出来,然后根据等电点沉淀的原理,调节 pH,硫酸铵分级盐溶、盐析将胰蛋白酶原等沉淀析出,包括如下步骤:

[0009] (1) 提取工序:将新鲜的胰脏绞碎成胰浆,称重。按每千克胰浆加入 2~3L 的 0.1~0.2mol/L 硫酸溶液,浸渍 20~28 小时,将浸渍物置滤袋过滤,滤干后弃去滤渣,留取滤液;

[0010] (2) 盐溶工序:浸渍液中加入硫酸铵,达到 30~50% 饱和度,静置 10~16 小时,过滤,留取滤液;

[0011] (3) 盐析工序:滤液中加入硫酸铵,达到 50~80% 饱和度,静置 10~16 小时,过滤,留取滤饼;

[0012] (4) 每克滤饼加入 2~5ml 的水溶解,重复上述 (2)、(3) 操作;

[0013] (5) 每克滤饼用 1~3ml 的水溶解,然后每克滤饼中加入 0.1~1ml 的饱和硫酸铵溶液,调节 pH 至 4.0~6.0;

[0014] (6) 结晶工序:溶液在 20~30℃ 温度中静置 24~72 小时,有针状糜蛋白酶结晶析出;离心,调节 pH 至 2.0~5.0,每 1000ml 溶液中加入 300~400g 固体硫酸铵,达到 50~80% 饱和度,静置 12~16 小时,抽滤;

[0015] (7) 干燥工序:取沉淀物,干燥,即得胰蛋白酶粗品。

具体实施方式

[0016] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

[0017] 实施例 1

[0018] 所述的利用稀酸溶液将胰腺细胞中含有的酶原提取出来,然后根据等电点沉淀的原理,调节 pH 以沉淀除去大量的酸性杂蛋白以及非蛋白杂质,再以硫酸铵分级盐析将胰蛋白酶原等沉淀析出,包括如下步骤:

[0019] 1. 提取工序:

[0020] 1.1 新鲜的胰脏,用镊子和剪刀将脂肪结缔组织等除去,置绞碎机中绞碎,称重 15Kg;

[0021] 1.2 绞碎物置塑料桶中,用 0.125mol/L 硫酸溶液 30L 浸渍 24 小时,在浸渍期中每小时搅拌 1 次;

[0022] 1.3 将浸渍物置滤袋过滤,滤渣再用 0.125mol/L 硫酸溶液 15L 浸渍 1 小时,滤干后弃去滤渣;

[0023] 2. 盐溶、盐析工序:

[0024] 2.1 将两次浸渍液合并,体积为 44.9L,置塑料桶中,每 1000ml 溶液中加入固体硫酸铵 242g,达到 40% 饱和度,共加 10.866Kg 固体硫酸铵,静置 12 小时;

[0025] 2.2 过滤,留取过滤液,滤液体积为 44L,固体弃去;

[0026] 2.3 在每 1000ml 清液中加入固体硫酸铵 205g, 达到 70% 饱和度, 共用硫酸铵 9.020kg, 静置 12 小时;

[0027] 2.4 过滤, 留取滤饼, 称重 269.2g, 弃滤液;

[0028] 2.5 用 807.6ml 水溶解, 再按 2.1、2.2、2.3、2.4 步骤分次加固体硫酸铵近 40% 和 70% 饱和度沉淀;

[0029] 2.6 70% 饱和度沉淀物, 称重 178.5g, 用 267.8ml 水溶解, 加入 89.3ml 饱和硫酸铵溶液, 并用 5mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 5.00;

[0030] 2.7 将溶液静置 25℃ 恒温箱中 48 小时, 有针状的糜蛋白酶粗品结晶析出;

[0031] 2.8 过滤, 母液用 0.25mol/L 硫酸调节 pH 至 3.0, 其体积为 328.4ml 加入硫酸铵 100.8g, 静置 12 小时;

[0032] 3. 干燥工序:

[0033] 取沉淀物, 置真空干燥箱内干燥, 即得胰蛋白酶粗品, 称重 91.8g, 即每千克胰脏可得 6.12 克胰蛋白酶.

[0034] 实施例 2

[0035] 1. 提取工序:

[0036] 1.1 新鲜的胰脏, 用镊子和剪刀将脂肪结缔组织等除去, 置绞碎机中绞碎, 称重 10Kg;

[0037] 1.2 绞碎物置塑料桶中, 用 0.150mol/L 硫酸溶液 25L 浸渍 24 小时, 在浸渍期中每小时搅拌 1 次;

[0038] 1.3 将浸渍物置滤袋过滤, 滤渣再用 0.150mol/L 硫酸溶液 12.5L 浸渍 1 小时, 滤干后弃去滤渣;

[0039] 2. 盐溶、盐析工序:

[0040] 2.1 将两次浸渍液合并, 体积为 37.4L, 置塑料桶中, 每 1000ml 溶液中加入固体硫酸铵 225g, 达到 35% 饱和度, 共力 8.415Kg 固体硫酸铵, 静置 12 小时;

[0041] 2.2 过滤, 留取过滤液, 滤液体积为 36.8L, 固体弃去;

[0042] 2.3 在每 1000ml 清液中加入固体硫酸铵 186g, 达到 65% 饱和度, 共用硫酸铵 6.845kg, 静置 12 小时;

[0043] 2.4 过滤, 留取滤饼, 称重 180.2g, 弃滤液;

[0044] 2.5 用 720.8ml 水溶解, 再按 2.1、2.2、2.3、2.4 步骤分次加固体硫酸铵近 35% 和 65% 饱和度沉淀;

[0045] 2.6 取 65% 饱和度沉淀物, 称重 90.5g, 用 181ml 水溶解, 加入 54.3ml 饱和硫酸铵溶液, 并用 5mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 5.10;

[0046] 2.7 将溶液静置 25℃ 恒温箱中 48 小时, 有针状的糜蛋白酶粗品结晶析出;

[0047] 2.8 过滤, 母液用 0.25mol/L 硫酸调节 pH 至 2.9, 其体积为 234.7ml 加入硫酸铵 82.1g, 静置 15 小时;

[0048] 3. 干燥工序:

[0049] 取沉淀物, 置真空干燥箱内干燥, 即得胰蛋白酶粗品, 称重 60.9g, 即每千克胰脏可得 6.09 克胰蛋白酶

[0050] 以上所述, 仅是本发明的较佳实施例而已, 并非是对本发明作其它形式的限制, 任

何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例。但是凡是未脱离本发明技术方案内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与改型,仍属于本发明技术方案的保护范围。