

技术方法

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.09.011

融合标签谷胱甘肽 S-转硫酶高亲和配体的设计与筛选

杨宪峰, 张 灵, 杨晓兰, 龙高波, 张 奕, 廖 飞

(重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘 要】目的:设计与筛选融合标签血吸虫谷胱甘肽 S-转硫酶(Glutathione S-transferase, GST)的高亲和配体。方法:将原核融合表达载体 pGST-MOLUC 转入大肠杆菌, 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷低温诱导 GST 标签表达, 用 Glutathione Sepharose 4B 亲和纯化此标签 GST。初速度法测定 GST 对底物 1-氯-2,4-二硝基苯(1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB)和还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)的 K_m ; 测定 GST 产物 S-(2,4-二硝基苯基)-谷胱甘肽(GS-DNB)、3,5-二甲苯甲酸、对丁基苯甲酸、依他尼酸及三者对应的对称双酰丁二胺对标签 GST 的抑制作用。结果:纯化标签 GST 对 GSH 和 CDNB 顺序结合且 K_m 都高于 0.10 mmol/L; GS-DNB 相对 CDNB 的竞争性抑制常数约 5 μ mol/L, 相对 GSH 的非竞争性抑制常数约 33 μ mol/L。3,5-二甲苯甲酸、对丁基苯甲酸、依他尼酸对此 GST 抑制常数都大于 0.20 mmol/L; N,N'-双依他尼酰-1,4-丁二胺和 N,N'-双对丁基苯甲酰-1,4-丁二胺都为 GST 相对 GSH 的强竞争性抑制, 抑制常数分别为 31 nmol/L 和 (0.61 ± 0.43) μ mol/L ($n=3$)。结论:将标签 GST 低亲和力芳香羧酸用柔性短链连成对称结构, 可获得结合于单个活性中心的高亲和力和标签 GST 抑制剂。

【关键词】谷胱甘肽 S-转硫酶; 亲和力; 抑制剂; 配体

【中国图书分类法分类号】Q555+.8

【文献标识码】A

【收稿日期】2012-01-09

Design and screening of high-affinity ligands for glutathione S-transferase as fusion tag

YANG Xianfeng, ZHANG Ling, YANG Xiaolan, LONG Gaobo, ZHANG Yi, LIAO Fei

(Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To design and screen high-affinity ligands for schistosoma japonicum glutathione S-transferase (GST) as fusion tag. Methods: pGST-MOLUC was induced to express GST in *Escherichia coli* BL21 under low temperature and GST was purified by glutathione Sepharose 4B affinity chromatography. By the initial velocity method, K_m of GST against glutathione (GSH) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) was estimated. S-(2,4-dinitrobenzene)-glutathione (GS-DNB), 3,5-dimethylbenzoic acid, 4-butylbenzoic acid and ethacrynic acid were tested and the inhibition effect of symmetrical biamide of such aromatic carboxylic acid on GST was examined. Results: Homogenous GST was successfully obtained. GSH and CDNB followed sequential bisubstrate kinetic mechanism with both K_m over 0.10 mmol/L. GS-DNB had a competitive K_i of about 5.0 μ mol/L against CDNB but a noncompetitive K_i of about 33 μ mol/L against GSH. 3,5-dimethylbenzoic acid, 4-butylbenzoic acid, and ethacrynic acid showed K_i over 0.20 mmol/L, but N,N'-bis-ethacrynyl-1,4-butyldiamine and N,N'-bis-(4-(n-butyl)-benzoyl)-1,4-butyldiamine displayed strong competitive inhibition on this GST against GSH with K_i of 31 nmol/L and (0.61 ± 0.43) μ mol/L ($n=3$), correspondingly. Conclusion: Symmetrical biamide of low-affinity aromatic carboxylic acid linked via short linear chain has promise to be high-affinity inhibitors to single active site of GST.

【Key words】glutathione S-transferase; affinity; inhibitors; ligand

谷胱甘肽 S-转硫酶 (Glutathione S-transferase, GST) 为同二聚体, 有 2 个轴对称且相距大于 1.6 nm 的活性中心; 每个活性中心有两个分隔位点, 分别结合还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 和疏水底

物^[1]。肿瘤细胞内 GST 同工酶 P1 是肿瘤化疗增敏剂的作用靶点之一^[2-5], 但很难获得满足要求的药用 GST 抑制剂。另外, GST 常用于真核蛋白在原核细胞的可溶性融合表达和亲和纯化^[6]。Smith 等^[6]用日本血吸虫 GST 构建大肠杆菌表达载体, 用于可溶性融合表达活性的真核蛋白并用固定化 GSH 基质进行高效的亲和纯化。针对 GST 融合表达标签的 GST-pulldown 技术是快速发现与融合蛋白发生特异相互作用成分的重要技术^[7]。GST 抑制剂作为 GST 融合

作者介绍: 杨宪峰 (1986-), 女, 硕士,

研究方向: 蛋白质药物与药物筛选生物技术。

通信作者: 廖 飞, 男, 教授, Email: liaofeish@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30472139, 81071427);

重庆市教委科技资助项目 (编号: KJ100313)。

表达标签的亲纯化配基只要求其有高亲和力,且这些抑制剂的结构功能关系能为发现药用 GST 抑制剂提供有价值的信息。所以,设计和筛选针对融合表达标签 GST 的高亲和力配体/抑制剂有重要意义。

最近报道将靶蛋白固定化在磁性微纳米材料表面,通过磁分离和色谱分析快速测定未知含量混合物中候选配体亲和力的组合库筛选新技术;基于此新技术,可高效低成本高通量制备混合物组合库进行快速筛选,寻找靶蛋白的高亲和力配体^[8,9];此新技术需高通量表达和纯化可溶性靶蛋白,并将靶蛋白固定在磁性微纳米材料表面且尽可能保留靶蛋白活性。为保留固定化靶蛋白的活性,针对靶蛋白活性中心以外其它位点进行位点选择性固定化是最理想的方案。借助融合标签既可在原核体系可溶性表达活性真核靶蛋白,还可针对融合标签的活性位点将靶蛋白位点选择性固定化在磁性材料表面。针对蛋白特定位点进行位点选择性固定化需对此活性位点有高亲和力且能共价修饰该结合位点氨基酸残基的配体。所以,针对融合表达标签 GST 的高亲和力配体对应用这种混合物组合库筛选新技术也有重要价值。

增大配体同活性位点的接触面是提高配体亲和力的有效途径。GST 活性中心都可结合大体积疏水配体。将 GST 的低亲和力配体通过近 2.0 nm 柔性臂连接成与两个活性位点同时结合的二价配体,使其亲和力提高 2 个数量级,但其所用连接臂体积很大且合成很难^[10]。本文报道用简单的原料和短链柔性连接臂设计单活性位点结合的 GST 抑制剂,合成筛选后获得针对 GST 融合表达标签亲和力提高可超过 3 个数量级的单活性位点结合的 GST 抑制剂。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Glutathione Sepharose 4B 购自 GE 公司,还原型谷胱甘肽、氨苄青霉素、蛋白分子量参考标准、PEG6000、二巯苏糖醇(DTT)、β-巯基乙醇购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司, BL21(DE3)感受态细胞、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自上海生工,5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸)[5,5'-Dithio bis-(2-nitrobenzoic acid),DTNB]、苯甲基磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride,PMSF)、依他尼酸都购自 sigma。3,5-二甲苯基甲酸、对丁基苯甲酸购自阿达玛斯。1,氯-2,4-二硝基苯(1-chloro-2,4-dinitrobenzene,CDNB)购自 ICN 公司,S-(2-chloro-4-nitrophenyl)-glutathione(GS-DNB)为本实验室合成^[11],pGST-MOLUC 质粒为重庆医科大学周兰教授惠赠^[12],对氨基苯甲脒等其余试剂均为国产分析纯。

1.2 GST 诱导表达

将 pGST-MOLUC 质粒转入 *Escherichia coli* BL 21(DE3)

感受态细胞,挑选阳性克隆菌株在 LB/Amp 培养基中 37 °C 培养至平台期,以 1:1 000 的稀释比例接种于 LB/Amp 培养基在 37 °C 扩大培养至菌液 $A_{600\text{nm}}$ 接近 0.6,加入 IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L,16 °C 低温诱导表达 18 h,4 °C 下 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。菌体用预冷到 4 °C 的 pH 7.3 磷酸盐缓冲液(含 140 mmol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl,10 mmol/L Na_2HPO_4 ,1.8 mmol/L KH_2PO_4)洗涤,每 100 ml 新鲜菌液所得湿菌用 15 ml 细胞裂解液(PBS,1 mmol/L EDTA,1 mmol/L PMSF,1% β-巯基乙醇)重悬,用超声破碎细胞 30 min,4 °C 下 12 000 r/min 离心 20 min 收集裂解上清液。

1.3 GST 亲和纯化

裂解上清液加入已用上述 PBS 平衡的 Glutathione Sepharose 4B 琼脂糖层析柱,控制流速约为 0.5 ml/min,待上清液全部流过柱床后,用相同缓冲液洗去未与琼脂糖介质结合的杂蛋白,直至在 280 nm 吸收的基线平稳后,加入含 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽的 Tris-HCl 缓冲液^[13],pH 为 8.0,将结合在琼脂糖介质上的 GST 洗脱。收集过 Glutathione Sepharose 4B 柱后蛋白含量高的样品用 PEG6000 浓缩至体积为 2 ml 左右,4 °C 用 1 L 透析液(pH 7.0 PBS,30% 甘油,1.0 mmol/L EDTA,1.0 mmol/L PMSF,1% β-巯基乙醇,1.0 mmol/L 对氨基苯甲脒,0.1 mmol/L DTT)透析 18 h,每 6 h 更换 1 次透析液,用 PEG6000 浓缩。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate-PAGE,SDS-PAGE)检测 GST 纯度,并初步估测亚基分子量。

1.4 GST 活性测定

活性测定按照 Habig 法^[9],反应体系为 0.10 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5,含 0.50 mmol/L DETAPA) 1.20 ml,终浓度同为 1.0 mmol/L CDNB 和新鲜配制的 GSH 溶液,加入 5 μl 经恰当稀释的 GST 样品启动反应,延迟 25 s 后每 10 s 间隔记录监测 340 nm 吸收变化,共记录 5 min。

1.5 GST 对 GSH 和 CDNB 的 K_m

初速度法测定 GST 对底物 K_m 及 GS-DNB 对 GST 抑制常数^[14,15]。固定 CDNB 浓度,GSH 浓度为 0.03~0.40 mmol/L;固定 GSH 浓度,CDNB 浓度为 0.25~2.20 mmol/L,双底物模型处理稳态反应动力学数据^[16]。

1.6 候选抑制剂设计、合成和鉴定和抑制常数测定

融合标签 GST 的两个活性中心相距大于 2.0 nm^[1]。故用简单羧酸和丁二胺连接成如下候选抑制剂并合成(图 1)。

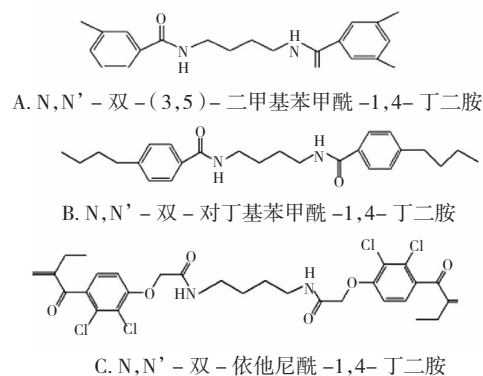


图 1 羧酸与 1,4-丁二胺合成的衍生物

Fig.1 Derivatives of carboxylic acid and 1,4-butyldiamine

以对丁基苯甲酸为例,称取 0.5 g 对丁基苯甲酸置于圆底烧瓶中,室温下缓慢滴加氯化亚砷 10 ml,逐渐升温至回流 5 h,减压蒸除氯化亚砷,向圆底烧瓶中加入 20 ml 四氢呋喃 (Tetrahydrofuran, THF),缓慢滴加已用 THF 稀释的丁二胺 0.3 ml,室温反应完全后旋转蒸除 THF,残留固体用二氯甲烷溶解,依次用 0.5 mol/L 稀盐酸、5%碳酸氢钠溶液和饱和食盐水重复洗涤。无水硫酸钠干燥二氯甲烷层过夜,过滤得白色固体即所需 N,N'-双对丁基苯甲酰-1,4-丁二胺。3,5-二甲苯甲酸、依他尼酸对应的双酰胺产物合成过程类似。

经荧光薄层板展开,换用常见流动相,所得化合物都显示为单一成分;用电喷雾质谱扫描测定 3 种化合物的分子量,发现 3 种化合物都只有唯一主峰,并都出现各自加 H^+ 、 Na^+ 和 K^+ 的分子离子峰信号,及相应的 H 同位素峰信号且相对丰度都符合理论预计(图 2)。

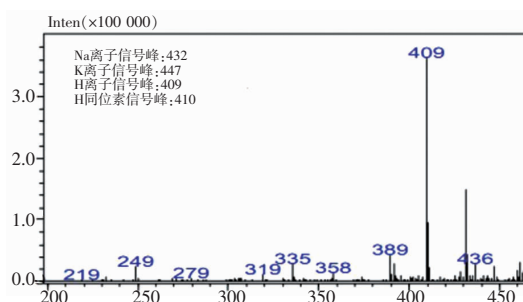


图 2 N,N'-双对丁基苯甲酰-1,4-丁二胺的电喷雾质谱分析

Fig.2 Electro-spray ionization mass spectrometry of N,N'-bis-[4-(n-butyl)-benzoyl]-1,4-butyldiamine

分别配制 GS-DNB、N,N'-双-(3,5)-二甲基苯甲酰-1,4-丁二胺、N,N'-双对丁基苯甲酰-1,4-丁二胺和 N,N'-双-依他尼酰-1,4-丁二胺的四氢呋喃储备液浓度,浓度分别为 12、1.35、1.20、0.76 mmol/L,使用时恰当比例稀释到反应体系四氢呋喃低于 1%。CDNB 固定为 0.3 mmol/L, GSH 变化不同的浓度 (30、44、73、150、400 μ mol/L),最后根据双倒数作图分析抑制类型和 K_i 。

1.7 蛋白含量的测定

用 Bradford 法测定蛋白含量。取 3 ml 考马斯亮蓝 G-250 试剂加入 60 μ l 样品,充分混匀后室温放置 5 min,测 595 nm 吸收,以 3 ml 考马斯亮蓝 G-250 和与样品相同量的缓冲液作为空白对照。

1.8 数据处理和统计分析

用双倒数分析法确定米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_m)且对应回归分析决定系数都大于 0.98;分析表观动力学参数随抑制剂浓度变化确定抑制常数(K_i)时,至少有 4 个表观动力学参数供分析且回归分析的决定系数都大于 0.95。

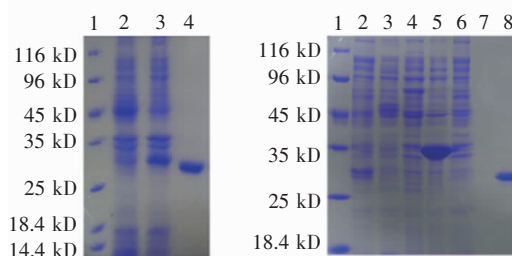
重复测定结果为均数标准差,用 Excel 内嵌函数进行统计分析, t 检验比较差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 GST 的表达和纯化

大肠杆菌 BL21(DE3)用所述带有 GST 融合标签的载体转化并培养后,细胞裂解液中诱导表达后 GST 含量仍然较

低,但亲和层析纯化后 GST 纯度达 90% 以上;每升新鲜菌液可得纯化 GST 接近 45 mg。大肠杆菌 BL21 的内源性 GST 活性低于检测限。用不带 GST 融合标签的原核表达载体转化并诱导表达后,大肠杆菌裂解液中 GST 活性仍然低于检测限,而且用 Glutathione Sepharose 4B 对裂解液亲和纯化,其样品分别进行 SDS-PAGE 检测和 GST 活性检测均低于检测限(图 3B)。因此,从 pGST-MOLUC 转化并诱导的大肠杆菌胞液,亲和纯化所得融合表达标签中应基本无内源性 GST。



A. 融合标签 GST 表达和纯化 B. 大肠杆菌内源性 GST 与 sj26 GST 检测比较

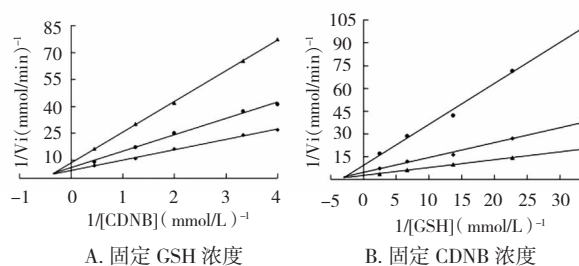
1. 标准蛋白分子量;2. 未诱导全细胞蛋白质;3. IPTG 诱导后全细胞蛋白质;4. 纯化的 GST;1. 标准蛋白分子量;2~5. IPTG 诱导的 pGST-MOLUC 载体、PPAR γ [17]、pMAL-p2x-PDE4B2 [18]、Uricase [19];6. BL21 (DE3) 全细胞;7. Glutathione Sepharose 4B 纯化的 PPAR γ ;8. 纯化的 GST

图 3 SDS-PAGE (12%) 分析融合标签 GST 的表达和纯化

Fig.3 SDS-PAGE (12%) analysis of induced expression and purification of sj26 GST as fusion tag

2.2 GST 与候选配体的亲和力

此标签 GST 对 GSH 的 K_m 为 0.11 mmol/L,对 CDNB 的 K_m 为 0.69 mmol/L,与文献报道结果一致(图 4) [6]。固定 GSH 浓度时 GS-DNB 对 GST 为竞争性抑制常数 K_i 为 $(4.8 \pm 0.4) \mu$ mol/L ($n=2$),固定 CDNB 浓度时 GS-DNB 对 GST 的非竞争性抑制 K_i 为 $(34 \pm 3) \mu$ mol/L ($n=2$)。GS-DNB 对该标签 GST 的抑制效力与其对猪肝碱性和酸性 GST 同工酶都相差很大 ($P < 0.05$,图 5) [11]。另外,GS-DNB 相对 2 个底物的抑制类型不同,1 个为竞争性而另一个为非竞争性,这是酶产物结合在活性中心的特殊现象;可能 GS-DNB 体积较小,不能同时占据 GSH 和疏水底物结合位点,而该 GST 活性位点的容积很大,可设计大体积对称结构的单活性位点结合 GST 抑制剂。



A. 固定 GSH 浓度 B. 固定 CDNB 浓度
A. 固定 GSH 浓度分别为 0.1、0.3、1.5 mmol/L, CDNB 浓度为 250、300、500、800、2200 μ mol/L; B. 固定 CDNB 浓度分别为 0.1、0.3、1.0 mmol/L, GSH 浓度为 30、44、73、150、400 μ mol/L

图 4 固定或 CDNB 浓度测定 GST 对底物的 K_m

Fig.4 Estimation on K_m of GST against substrate by fixing GSH and CDNB concentration

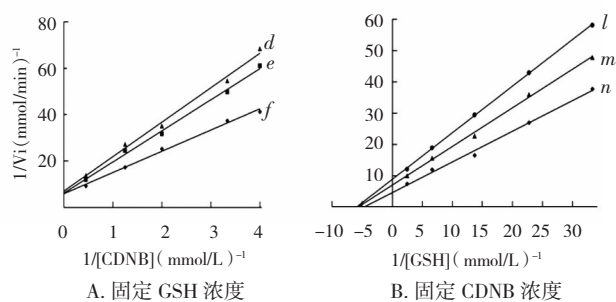


图 5 初速度法测 GS-DNB 对 GST 的 K_i
Fig.5 Estimation on K_i of GS-DNB against GST by initial velocity method

3,5-二甲基苯甲酸、对丁基苯甲酸、依他尼酸对该 GST 抑制常数都高于 0.20 mmol/L (限于溶解度无法准确测定)。依他尼酸对该 GST 抑制效力远低于其对人 GST 同工酶 P1 抑制效力^[10]。初速度法发现这 3 种取代芳香羧酸与 1,4-丁胺的双取代对称酰胺相对于 GSH 和 CNDB 都是竞争性抑制剂,说明此短链连接的对称双酰胺可占据 GST 活性中心的两个底物结合位点。N,N'-双-3,5-二甲基苯甲酰丁二胺的 K_i 约 22 $\mu\text{mol/L}$, N,N'-双-对丁基苯甲酰丁二胺的 K_i 约 $(0.61 \pm 0.43) \mu\text{mol/L}$ ($n=3$), 而 N,N'-双-依他尼酰丁二胺 K_i 约 31 nmol/L (图 6)。可见 N,N'-双-依他尼酰丁二胺对 GST 亲和力比依他尼酸提高接近 3 个数量级,比 GS-DNB 提高接近 2 个数量级。

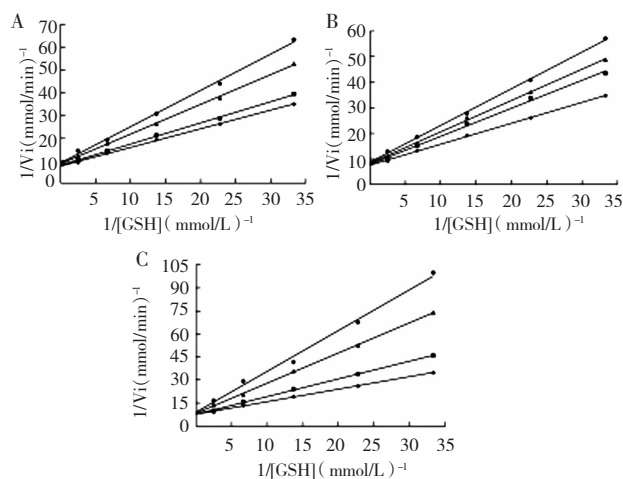


图 6 将 CDNB 浓度固定为 0.3 mmol/L, GSH 浓度 30、44、73、150、400 $\mu\text{mol/L}$, 测定初速度随抑制剂变化
Fig.6 Determination on the variation of initial velocity with the change of inhibitor when CDNB at the concentration of 0.3 mmol/L and GSH at the concentration of 30, 44, 73, 150, 400 $\mu\text{mol/L}$

从分子大小和柔性考虑,每个 GST 活性中心应可结合此类对称 1,4-丁二酰胺;从两个活性中心距离和此类对称 1,4-丁二酰胺长度考虑,这些抑制剂都不能同时结合到两个活性中心而成为二价抑制剂。将 GST 的单价抑制剂恰当连接成为同时结合到两个活性中心的二价抑制剂后,其亲和力还可再提高 2 个数量级^[10]。所以,如有恰当的方法避免位阻而将 N,N'-双-依他尼酰-1,4-丁二胺连接成二价抑制剂,将有望获得对 GST 抑制效力更强的抑制剂,可作为配体用于 GST 融合蛋白亲和纯化,衍生后用于固定化 GST 融合表达靶蛋白,也有望成为新型的肿瘤化疗增敏剂。这些工作正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Kong K H, Nishida M, Inoue H. Tyrosine-7 an essential residue for the catalytic activity of human class PI glutathione S-transferase: chemical modification and site-directed mutagenesis studies[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 182(3): 1122-1129.
- [2] Das G C, Bacsí A, Shrivastav M, et al. Enhanced gamma-glutamyl-cysteine synthetase activity decreases drug-induced oxidative stress levels and cytotoxicity[J]. Mol Carcinog, 2006, 45(9): 635-647.
- [3] Parody J P, de Luján Alvarez M, Quiroga A, et al. Hepatocytes isolated from preneoplastic rat livers are resistant to ethacrynic acid cytotoxicity[J]. Arch Toxicol, 2007, 81(8): 565-573.
- [4] Burg D, Wielinga P, Zelcer N, et al. Inhibition of the multidrug resistance protein 1 (MRP1) by peptidomimetic glutathione-conjugate analogs[J]. Mol Pharmacol, 2002, 62(5): 1160-1166.
- [5] Ruzza P, Rosato A, Rossi C R, et al. Glutathione transferases as targets for cancer therapy[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2009, 9(7): 763-777.
- [6] Smith D B, Rubira M R, Simpson R J. Expression of an enzymatically active parasite molecule in *Escherichia coli*: Schistosoma Japonicum glutathione S-transferase[J]. Mol Biochem Parasitol, 1988, 27(2-3): 249-256.
- [7] Schechtman D, Mochly-Rosen D, Ron D. Glutathione S-transferase pull-down assay[J]. Methods Mol Biol, 2003, 233(3): 345-350.
- [8] Rao S V, Anderson K W, Bachas L G. Oriented immobilization of protein[J]. Microchim Acta, 1998, 128(3): 127-143.
- [9] Pabst M J, Habig W H, Jakoby W B. Glutathione S-transferase, a novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration[J]. J Biol Chem, 1974, 249(22): 7140-7148.
- [10] Maeda D Y, Mahajan S S, Atkins W M, et al. Zebala. Bivalent inhibitors of Glutathione S-transferase: the effect of spacer length on isozyme selectivity[J]. Bioorg Med Chem Letters, 2006, 16(14): 3780-3783.
- [11] 张 灵, 杨晓兰, 白 婧, 等. 测定谷胱甘肽 S-转硫酶动力学参数的变化表征其抑制剂[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(10): 1218-1221.
- [12] Zhang L, Yang X L, Bai J, et al. Characterization of an inhibitor on Glutathione S-transferase by analyzing the changes of kinetic parameters[J]. J Chongqing Med Univ, 2011, 36(10): 1218-1221.
- [12] 游 莉, 徐兰兰, 郭元元, 等. GST-hs100A9 融合蛋白的原核表

技术方法

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.09.012

紫杉醇白蛋白片段纳米粒的制备

高原¹, 于洪儒¹, 王洪新²

(辽宁医学院 1. 生物化学与分子生物学教研室; 2. 药物研究所, 锦州 121001)

【摘要】目的: 利用蛋白酶解和纳米粒技术在白蛋白片段的基础上筛选制备紫杉醇纳米粒的新型载体, 并考察相关理化指标。方法: 利用牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA) 酶解片段作为载体, 分散乳化-旋蒸去溶剂法制备紫杉醇-BSA 酶解片段-纳米粒, 在外观、粒径分布、收率、包封率、载药量及体外释药性方面对样品进行考察。结果: BSA 酶解后经粗分离得到 4 个片段组, 选择第 4 组为候选载体, 得到的纳米粒外观形态圆整、均匀, 初制备纳米粒混悬剂平均粒径为 150.2 nm, 平均收率为 $(45.132 \pm 0.903)\%$, 平均包封率为 $(50.246 \pm 0.712)\%$, 平均载药量为 $(4.804 \pm 0.101)\%$, 48 h 累计释药 82.4%。结论: 利用白蛋白酶解片段制备紫杉醇纳米粒是可行的, 为扩大紫杉醇纳米粒的载体来源、降低制备成本提供了可能。

【关键词】紫杉醇; 纳米粒; 载体; 白蛋白片段

【中国图书分类法分类号】R94

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-01-19

Preparation of Paclitaxel-loaded nanoparticles by albumin fragments

GAO Yuan¹, YU Hongru¹, WANG Hongxin²

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology;

2. Institute of Pharmaceutical Research, Liaoning Medical University)

【Abstract】Objective: To screen and prepare the new carrier for Paclitaxel-loaded nanoparticles from bovine serum albumin by proteolysis and nanoparticle technology and to study the physical and chemical indicators. Methods: Bovine serum albumin (BSA) which was degraded to fragments by pepsin was used as a carrier, the Paclitaxel-BSA fragments-nanoparticles were prepared by homogenized-spin steam. The appearance, size distribution, yield, encapsulation efficiency, drug loading and release in vitro of the sample were assessed. Results: Four clip groups were got through column chromatography after BSA enzymolysis. The fourth group was chosen as the candidate carrier. The nanoparticles got were round and uniform in shape with an average diameter of 150.2 nm. The average yield of nanoparticles was $(45.132 \pm 0.903)\%$, average encapsulation efficiency was $(50.246 \pm 0.712)\%$, average drug-loading rate was $(4.804 \pm 0.101)\%$ and the 48 h accumulative release percentage was 82.4%. Conclusions: The preparation of Paclitaxel-loaded nanoparticles through BSA enzymolysis is feasible. Therefore, there is possibility to increase the sources of carriers for Paclitaxel-loaded nanoparticles and to reduce the cost of preparation.

作者介绍: 高原(1987-), 男, 硕士,

研究方向: 生化药物。

通信作者: 于洪儒, 男, 教授, Email: abugy@126.com。

【Key words】Paclitaxel; nanoparticles; carrier; albumin fragments

达、纯化及鉴定[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(4): 5-8.

You L, Xu L L, Guo Y Y, et al. Prokaryotic expression, purification and identification of GST-human S100A9 fusion protein[J]. Chin J Biochem Pharmaceut, 2011, 32(4): 5-8.

[13] Smith D B, Johnson K S. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione-S-transferase[J]. Gene, 1988, 67(1): 31-40.

[14] Dixon M, Webb E C. Enzymes[M]. London: Longman Group Ltd., 3rd ed., 1979.

[15] Liao F, Li J C, Kang G F, et al. Measurement of mouse liver glutathione S-transferase activity by the integrated method[J]. J Med Coll PLA, 2003, 18(5): 295-300.

[16] King E L, Altman C. A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reaction[J]. J Phys chem, 1956, 60(10): 1375-

1378.

[17] Li W, Yuan Y H, Luo Z W, et al. Bacterial expression, refolding, functional characterization and mass spectrometric identification of full-length human PPAR- γ [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(6): 1173-1180.

[18] Zhu S, Gan Z Y, Li Z R, et al. The measurement of cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 activities via the quantification of inorganic phosphate with malachite green[J]. Anal Chim Acta, 2009, 636(1): 105-110.

[19] Zhang C, Yang X L, Feng J, et al. Effects of modification of amino groups with poly(ethylene glycol) on a recombinant uricase from Bacillus fastidiosus[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(6): 1298-1301.

(责任编辑: 关蕴良)