



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118086439 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 28

(21) 申请号 202410357238.3

(22) 申请日 2024.03.27

(71) 申请人 华南师范大学

地址 510631 广东省广州市天河区中山大
道西55号

申请人 重庆芳禾生物科技有限公司

(72) 发明人 倪贺 程健 孔丽丽

(74) 专利代理机构 北京振安创业专利代理有限
责任公司 11025

专利代理师 郭宁

(51) Int. Cl.

C12P 21/06 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种获取高纯度去端肽的胶原蛋白的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种获取高纯度去端肽的胶原蛋白的方法,包括以上步骤:将动物皮用脱脂剂进行脱脂,加入磷酸缓冲盐溶液或氯化钠溶液浸泡提取,洗涤、离心,在加入乙酸或盐酸浸泡,加入胃蛋白酶溶解,离心除杂,低温盐析,精制处理沉淀,获得纯度99%以上的去端肽的胶原蛋白。本发明可有效去除胶原蛋白的端肽,同时可保证胶原蛋白三螺旋结构的完整性,并准确检测胶原蛋白端肽去除率达到99%以上,大幅提高胶原蛋白制备的经济效益和社会效益。



1. 一种获取高纯度去端肽的胶原蛋白的方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - a) 获取动物皮,加入脱脂剂进行脱脂处理;
 - b) 将脱脂后的动物皮按固液比1:10-1:25加入中性的磷酸缓冲盐溶液或者氯化钠溶液,搅拌浸泡提取,纯水洗涤,低速离心;
 - c) 除杂后的得物用乙酸或盐酸浸泡4-6小时,并调节溶液pH值在1.9-2.1范围内,再加入活性不低于28000U/mg的胃蛋白酶溶解,搅拌酶解;
 - d) 离心酶解液,得上清,超滤除杂,中性低温沉淀,离心收集沉淀;
 - e) 沉淀进行精制处理,获得纯度99%以上的去端肽的胶原蛋白。
2. 如权利要求1所述的获取高纯度去端肽的胶原蛋白的方法,其特征在于,所述步骤c)包括:加入胃蛋白酶后的溶液在22-28℃下低速离心搅拌。
3. 如权利要求1或2所述的获取高纯度去端肽的胶原蛋白的方法,其特征在于,所述步骤c)中乙酸/盐酸的使用浓度为0.5mol/L,乙酸与动物皮用量比120-160:1(体积/重量),所述胃蛋白酶与动物皮的用量比为1/40-1/25(重量/重量)。
4. 如权利要求3所述的获取高纯度去端肽的胶原蛋白的方法,其特征在于,所述步骤c)中加入活性29000U/mg的胃蛋白酶。
5. 如权利要求4所述的获取高纯度去端肽的胶原蛋白的方法,其特征在于,所述步骤c)中,加入胃蛋白酶后的溶液反应2-5小时,其间以30-90rpm的低速进行搅拌,或多次离心搅拌。
6. 如权利要求5所述的获取高纯度去端肽的胶原蛋白的方法,其特征在于,所述脱脂剂包括:2% Na_2CO_3 、0.1mol/L NaOH或0.6%十二烷基磺酸钠中的一种或两种以上的组合。
7. 如权利要求6所述的获取高纯度去端肽的胶原蛋白的方法,其特征在于,所述步骤b)包括:用榨汁机粉碎脱脂后的动物皮,再加入中性的磷酸缓冲盐溶液或者氯化钠溶液,用搅拌机搅拌。
8. 如权利要求7所述的获取高纯度去端肽的胶原蛋白的方法,其特征在于,所述步骤d)中,利用1.1-1.3 μm 滤芯过滤除杂上清液。
9. 如权利要求8所述的获取高纯度去端肽的胶原蛋白的方法,其特征在于,所述的动物皮包括猪皮、牛皮、马皮或驴皮。
10. 如权利要求9所述的获取高纯度去端肽的胶原蛋白的方法,其特征在于,所述步骤c)中,离心所用的离心机内壁设置有多多个均匀分布的平滑、圆润的凸起。

一种获取高纯度去端肽的胶原蛋白的方法

技术领域

[0001] 本申请涉及生物医用材料制备领域,尤其涉及一种获取高纯度去端肽的胶原蛋白的方法。

背景技术

[0002] 胶原蛋白是哺乳动物细胞外基质中的主要结构蛋白,广泛分布于哺乳动物的骨、皮肤、肌腱等结缔组织中,对组织细胞等起着支撑、修复、保护的作用,在医学与生物领域有着广泛的用途。

[0003] 胶原蛋白的分子结构包括三股螺旋结构和位于三股螺旋结构两端的N末端区域和C末端区域,对胶原免疫反应的主要靶抗原表位的肽区域即为该两端区域,称为端肽,去除胶原蛋白端肽可有效降低胶原蛋白的免疫原性。现有技术中对于胶原蛋白端肽去除的研究多集中于端肽的去除方法方面,但对于胶原蛋白端肽去除并不彻底,还含有相当量的含端肽的胶原蛋白,而含有部分端肽的胶原蛋白在实际应用中会降低应用产品的品质和性能,而端肽去除率是影响去端肽的胶原蛋白纯度的关键因素,因此,提高胶原蛋白端肽去除率是一个亟待解决的问题。

发明内容

[0004] 本发明的发明目的是公开一种获取高纯度(99%以上)去端肽的胶原蛋白的方法。

[0005] 实现本发明的技术解决方案是:包括以下步骤:

[0006] a) 获取动物皮,加入脱脂剂进行脱脂处理;

[0007] b) 将脱脂后的动物皮按固液比1:10-1:25加入中性的磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffer saline,简称PBS)或者NaCl溶液,搅拌浸泡提取,纯水洗涤,低速离心;

[0008] c) 除杂后的得物用乙酸或盐酸浸泡4-6小时,并调节溶液pH值在1.9-2.1范围内,再加入活性不低于28000U/mg的胃蛋白酶溶解,搅拌酶解;

[0009] d) 离心酶解液,得上清,超滤除杂,中性低温沉淀,离心收集沉淀;

[0010] e) 沉淀进行精制处理,获得纯度99%以上的去端肽的胶原蛋白。

[0011] 优选的,所述步骤c)包括:加入胃蛋白酶后的溶液在22-28℃下低速离心搅拌。

[0012] 优选的,所述步骤c)中所述乙酸/盐酸的使用浓度为0.5mol/L,乙酸与动物皮的用量比120-160:1(体积/重量),所述胃蛋白酶与动物皮的用量比为1/40-1/25(重量/重量)。

[0013] 优选的,所述步骤c)中加入活性29000U/mg的胃蛋白酶。

[0014] 优选的,所述步骤c)中,加入胃蛋白酶后的溶液反应2-5小时,其间以30-90rpm的低速进行搅拌,或多次离心搅拌。

[0015] 优选的,所述脱脂剂包括:2% Na_2CO_3 、0.1mol/L NaOH或0.6%十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfate,简称SDS)中的一种或两种以上的组合。

[0016] 优选的,所述步骤b)包括:用榨汁机粉碎脱脂后的动物皮,再加入中性的PBS或者NaCl溶液,用搅拌机搅拌。

[0017] 优选的,所述步骤d)中,利用1.1-1.3 μ m滤芯过滤除杂上清液。

[0018] 优选的,所述的动物皮包括猪皮、牛皮、马皮或驴皮。

[0019] 优选的,所述步骤c)中,离心所用的离心机内壁设置有多均匀分布的平滑、圆润的凸起。

[0020] 本发明的上述技术方案是经过大量的实验、对比和分析而得出的,该技术方案精准控制胶原蛋白的酶解程度,在彻底去除胶原蛋白端肽的同时,有效控制明胶、多肽等杂质的产生,保证胶原蛋白三螺旋结构的完整性,提高胶原蛋白端肽去除率,并准确检测胶原蛋白端肽的去除率达到99%以上,其中,端肽去除率=去端肽胶原蛋白/胶原蛋白全长,这是现有技术无法达到的,且获得的去端肽的胶原蛋白的得率高,产生的杂质少,可大幅提高制备的经济效益。

附图说明

[0021] 图1为利用本申请的从猪皮中获取去端肽胶原蛋白的制备方法制备的去端肽胶原蛋白产品图。

[0022] 图2为图1的去端肽胶原蛋白产品的蛋白质凝胶电泳分析图。

[0023] 图3为图1的去端肽胶原蛋白产品的LC-MS/MS结果分析图。

具体实施方式

[0024] 下面详细给出本发明的具体实施方式,需要说明的是本发明的具体实施方式的描述是为便于对本发明的技术内容的全面理解,而不应视为是对本发明的权利要求保护范围的限定。

[0025] 本发明的具体实施例的技术解决方案是:包括以下步骤:

[0026] a) 获取动物皮,加入脱脂剂进行脱脂处理;

[0027] b) 将脱脂后的动物皮按固液比1:10-1:25加入中性的磷酸缓冲盐溶液(PBS)或者NaCl溶液,搅拌浸泡提取,纯水洗涤,低速离心;

[0028] c) 除杂后的得物用乙酸或盐酸浸泡4-6小时,并调节溶液pH值在1.9-2.1范围内,再加入活性不低于28000U/mg的胃蛋白酶溶解,搅拌酶解;

[0029] d) 离心酶解液,得上清,超滤除杂,中性低温沉淀,离心收集沉淀;

[0030] e) 沉淀进行精制处理,获得纯度99%以上去端肽的胶原蛋白。

[0031] 在上述技术方案中,通过步骤a)去除动物皮毛发和表皮脂肪,将动物皮处理成边长小于1cm的块状,加入脱脂剂使小块的动物皮充分匀质,有效析出动物皮中的油脂,实现有效脱脂;步骤b)中,在脱脂后的动物皮中加入pH=7的磷酸盐缓冲液或NaCl溶液,溶解动物皮中的短肽及其它可溶性蛋白质,再将处理后的动物皮在600-800rpm下离心取得沉淀,特别是采用磷酸盐缓冲液,去除水溶性杂蛋白效果明显,可有效去除水溶性杂蛋白;经过前两步骤的除杂处理,在步骤c)中进行酶解反应,通过在除杂后的动物皮加入乙酸/盐酸,调整溶液pH值至1.9-2.1,再加入活性不低于28000U/mg的胃蛋白酶溶解,在此酸性条件下,胶原蛋白溶解度大且相对稳定,胃蛋白酶活性好,酶位切点为苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和亮氨酸等,有效促进酶解反应的进行,特别的,在pH=2时,胶原蛋白溶解度最大,胃蛋白酶的活性最佳,此时胶原蛋白两端端肽被去除,同时,胶原蛋白的三螺旋结构不被破坏或被破坏的程

度最小,由此产生的明胶和多肽等杂质最少,因此,该步骤不仅达到充分的水解反应,同时又防止水解反应过度进行,从而实现了酶解反应的充分性和适度性;在此步骤中,精准控制胶原蛋白端肽的去除程度,即控制水解程度,防止水解不充分而导致未能彻底去除端肽,同时又防止水解过度而导致胶原蛋白三股螺旋结构被破坏而产生明胶、多肽等杂质,进而影响最终获取去端肽胶原蛋白的纯度和总量;酶解反应后,在步骤d)中离心酶解液去除猪毛等大杂质,再进行超滤除杂,去除胶原聚集体及大分子杂质,用NaOH调节pH至6-8,静置8-10小时,离心收集沉淀;经过步骤e)进行二次除杂,特别是使用磷酸盐缓冲液,可完全去除分子量小、不能形成四级结构的明胶或多肽,最终获得99%以上去端肽的胶原蛋白。

[0032] 所述步骤c)中,加入胃蛋白酶后的溶液在22-28℃下低速离心搅拌;不同于现有静置浸泡或间歇性搅拌,该步骤中,为使水解反应更高效的进行,先用乙酸/盐酸浸泡脱脂后的动物皮4-6小时,使动物皮充分膨胀与酸溶液完全接触,再加入胃蛋白酶,在22-28℃下低速离心搅拌,本技术方案采用离心机进行低速、持续搅拌,使动物皮与溶液充分接触并促进水解反应进行,极大提高了酶解反应的效果,同时节省至少1/2的反应时间,提高了整体生产的效率,特别的,用乙酸浸泡脱脂后的动物皮6小时,在25℃下酶解反应效果最佳,最终可获得99.63%去端肽的胶原蛋白。

[0033] 所述步骤c)中乙酸/盐酸的使用浓度为0.5mol/L,乙酸与动物皮用量比120-160:1(体积/重量),所述胃蛋白酶与动物皮的用量比为1/40-1/25(重量/重量);胃蛋白酶活性、胃蛋白酶用量和酶解时间是影响水解反应的关键因素,其三者的耦合关系直接影响水解程度和效果,本步骤中通过协调控制胃蛋白酶活性、胃蛋白酶用量和酶解时间,使水解反应充分且适度,实现胶原蛋白端肽彻底去除,同时不破坏胶原蛋白三螺旋结构,减少了明胶、多肽等杂质的产生,添加120-160:1(乙酸/动物皮,体积/重量)浓度为0.5mol/L的乙酸或盐酸,加入活性不低于28000U/mg的胃蛋白酶1/40-1/25(酶/动物皮,重量/重量),可获取99%以上的去端肽胶原蛋白;特别的,所述步骤c)中加入活性为29000U/mg的胃蛋白酶,胃蛋白酶添加量为1/25(重量/重量,酶/动物皮),0.5mol/L乙酸添加量为140:1,酶解3小时,酶解程度最佳,端肽去除效果最好,最终可获得99.78%去端肽的胶原蛋白。

[0034] 步骤c)中还包括,加入胃蛋白酶后的溶液反应2-5小时,其间以30-90rpm的低速进行搅拌,或多次离心搅拌;通过采用低速离心搅拌,使胃蛋白酶均匀分布于溶液中并接触动物皮的各个区域,实现动物皮与溶液充分接触,同时采用离心机进行低速离心搅拌,避免使用传统的搅拌叶片与动物皮颗粒和动物皮颗粒之间的高速运动碰撞产生物粒的脱离,不破坏胶原蛋白的三螺旋结构,保证胶原蛋白结构的完整性,特别的,60rpm离心3小时,水解反应最佳,大幅提高获取的去端肽的胶原蛋白的纯度。

[0035] 所述步骤a)中,所述脱脂剂包括:2% Na_2CO_3 、0.1mol/L NaOH或0.6%SDS溶液中的一种或两种以上的组合;特别的,使用2% Na_2CO_3 进行脱脂,脱脂率可达到82%。

[0036] 在所述步骤b)中,用榨汁机粉碎脱脂后的动物皮,加入中性的PBS或者NaCl溶液,用搅拌机搅拌;该步骤采用榨汁机搅碎脱脂后的动物皮,再使用搅拌机在800rpm下搅拌粉碎后的动物皮和中性溶液1-2分钟,达到充分、高效匀质。

[0037] 所述步骤d)中,利用1.1-1.3 μm 滤芯过滤除杂上清液;胶原蛋白水解后形成的明胶和多肽等杂质不能形成三股螺旋结构,分子量小于90kD,与去端肽后的胶原蛋白尺寸(分子量约为270kD)差异较大,利用1.1-1.3 μm 滤芯可有效去除该明胶、多肽等杂质,进一步提高

胶原蛋白的纯度,特别的,1.2 μm 滤芯的去除效果最佳。

[0038] 所述动物皮包括猪皮、牛皮、马皮或驴皮;猪皮、牛皮、马皮或驴皮富含丰富的胶原蛋白,且该四类动物皮获取容易,适于应用在去端肽胶原蛋白的提取中,且可实现大量生产。

[0039] 所述步骤c)中,离心所用的离心机内壁设置有多个均匀分布的平滑、圆润的凸起;在离心机内壁上设置凸起,可使动物皮因离心作用被甩到内壁边缘时,碰撞到内壁上的凸起,由凸起的反作用力将动物皮推回至离心搅拌轨道,往复多次进而加大离心搅拌程度,有效增加动物皮与溶液的充分、均匀接触,促进酶促反应进行,因该凸起表面平滑且圆润,不会对动物皮产生强烈的机械碰撞和破坏,特别的,凸起上下错位多层分布,凸起形状可为表面光滑的半圆形、半椭圆形、不规则的弧形等。



图1

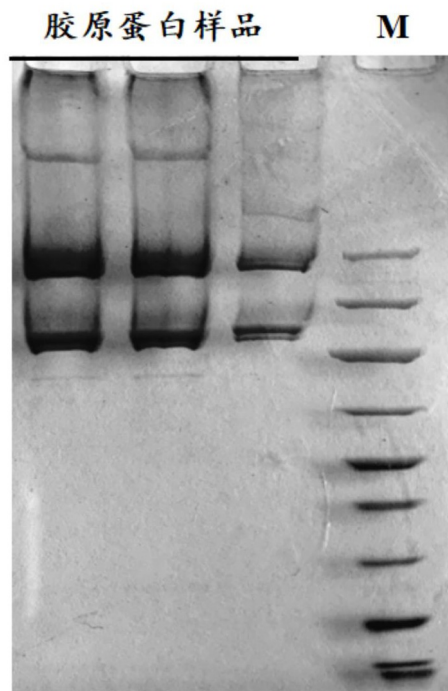


图2

Protein Coverage:

1 MFSFVDLRL LLAAATALLT HGQEEGQEEG QQGQEEEDIPP VTCVQNGRLY HDRDVWKVPV CQICVCDNGN VLCDDVICDE
81 IKNCPSARVP AGECCPVCPE GEVSPTDQET TGVEGPKGDT GPRGPRGPSG PPGRDGIPGQ PGLPGNFAPQ **LSYGYDEKSA**
161 **GISVPGPMGP SGPR**GLPGPP GAFGPQGFGQ PPGEFGEFGA SGPMGPRGPP GPPGKNGDDG EAGKPGRPGE RGPPGPGGAR
241 GLPGTAGLPG MKGHR**GFSGL DGAKGDAFGA GPKGEPGSPG ENGAPQMGP**RGLPGER**GRP GPPGPAGARG NDGATGAAGP**
321 **PGPTGPAGPP GPPGAVGAKG EAGPQGARGS EGPQGVR**GEP GPPGPAGAAG PAGNPGADGQ PGGKANGAP GIAGAPGFPG
401 ARGPSGPQGP SGPPGPKGNS GEPGAPGSKG DTGAK**GEPGP TGVPQPPGFA GEEGKR**GARG EPGPAGLP**GP PGERGPGSR**
481 **GFPAGDGVAG PK**GPAGERGS PGPAGPKGSP GEAGRPEAG LPGAKGLTGS PGSPGPDGKT GPPGPAGQDG RPPPPPPGA
561 **RQAGVMGFP GPK**GAAGEFG KAGER**GVPGP PAVGPAGKD GEAGAQQPPG PAGPAGER**GGE QGPAGSPGFQ GLPGPAGPPG
641 EAGKPGEQGV PGDLGAPGPS GARGERGFPG ER**GVQGPFP AGPRGANGAP GNDGAK**GDAG APGAPGSQGA PGLQGMPPGER
721 GAAGLPGPKG DRGDAGPKGA DGAPGKDGVR **GLTGPIGPPG PAGAPGDKGE TGPSGPAGPT GAR**GAPGDRG EPGPFPAGF
801 AGPPGADGQP GAKGEPGDAG AKGDAGPPGP AGPTGPPGPI GSVGAPGPKG ARGSAAGPPGA TGFP**GAAGR**V GPPGPSNAG
881 PGPFPAGK ESKGPR**GET GPAGR**PGEAG PGPFPAGE **KGSPGADGFA GAPGTFGPQG IAGQRGVVGL PGQR**GER**GFP**
961 **GLPGPSGEPG KQGPSGPSGE RGPPGPMGPP GLAGPPGESG**REGAPGAEGS PGRDGAPGFK **GDRGESGPAG PPGAPGAPGA**
1041 **PGFVGPAGKS GDRGETGPAG PAGFVGPVGA RGPAGPQGP**GDKGETGEQ**Q DRGIKGRGF**SGLQGPFP**GP GSPGEQGPSG**
1121 **ASGPAGPRGP**PGSAGAPKD **GLNLPGPIG PPGPR**GRTGD AGPVGPPGPP GPPGPPGPPS GGDFFSFLPQ PPQEKADGG
1201 RYRADDANV VRDRDLEVDT TLKSLSQIE NIRSPEGRK NPARTCRDLK MCHSDWKSGE YWIDPNQCN LDAIKVFCNM
1281 ETGETCVYPT QPSVPQKNWY ISKNPKDKRH VWYGESMTDG FQFEYGGEGS DPADVAIQLT FLRLMSTEAS QNITYHCKNS
1361 VAYMDQQTGN LKKALLQGS NEIEIRAEGN SRFTYSVIYD GCTSHGTAWG KTVIESLSAS CKLPPQSGS LPPNPIADP
1441 GNKQTPQTET PPKAKKWQTI SHGLWKIFFS FAFISQT

图3