

CNBr-Papain-Sepharose 4B 亲和填料的制备及其性质研究

刘明宇, 李树红*, 杨娟, 林昊, 杨珂, 谭小千

(四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625000)

摘要: 为探求从鱼类废弃组织及漂洗水中回收 Cystatin 的高效方法, 首先自制了溴化氢-木瓜蛋白酶-琼脂糖凝胶 (CNBr-Papain-Sepharose 4B) 亲和填料, 确定了适宜的配基 Papain 偶联密度, 之后测定了该亲和填料的热稳定性、酸碱稳定性、贮藏性能及使用的重复性, 最后以该制备的填料对鱼糜漂洗水中的 CPIs 活性进行了初步回收。以对重组鲢鱼 Cystatin 吸附率为评价指标, 确定适宜 Papain 偶联密度, 即 CNBr-Sepharose 4B 和 Papain 溶液最佳料液比为 1:7 (g:mL)。CNBr-Papain-Sepharose 4B 的适宜使用温度为 4~40 °C, 且在 pH 3.0~12.0 之间稳定。CNBr-Papain-Sepharose 4B 在 4 °C 下, 6 个月的贮藏期内, 表现较好的稳定性。将填料装柱后进行验证实验, 证明该填料的使用重复性能稳定, 且最终成功高效地回收了鲢鱼鱼糜漂洗水中的 CPIs。

关键词: CNBr-Papain-Sepharose 4B 制备; Cystatin 吸附率; Papain 偶联密度; 填料性能; CPIs 活性回收

中图分类号: TS 254.9 文章编号: 1673-1689(2021)02-0094-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.02.013

Preparation and Properties of CNBr-Papain-Sepharose 4B Affinity Media

LIU Mingyu, LI Shuhong*, YANG Juan, LIN Hao, YANG Ke, TAN Xiaoqian

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625000, China)

Abstract: To explore an efficient method of recycling Cystatin from fish waste tissue and rinsing water, the self-made affinity media CNBr-Papain-Sepharose 4B was firstly prepared. The optimal coupling density of Papain was further determined. Then the thermal stability, acid-base stability, storage performance and repeatability were respectively detected. At last, the active CPIs in silver carp surimi rinse water was preliminary recycled by the self-made affinity media. The optimal coupling density of Papain was evaluated by the adsorption rate of recombinant carp cystatin. The best liquid-solid ratio of CNBr-Sepharose 4B to Papain was indicated as 1:7 (g:mL). The optimal temperature of CNBr-Papain-Sepharose 4B was 4~40 °C during usage, and it was stable between pH 3.0~12.0. The storage detection suggested that CNBr-Papain-Sepharose 4B was stable at 4 °C within 6 months. The affinity media's repeatability was verified to be stable. Finally, CNBr-Papain-Sepharose 4B affinity media successfully recycled CPIs from silver carp surimi rinse water with high efficiency.

收稿日期: 2020-04-16

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2014NZ0003); 四川省教育厅自然科学重点项目(10ZA052)。

* 通信作者: 李树红(1975—), 女, 博士后, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事水产品加工理论与技术方面的研究。E-mail: lish@sicau.edu.cn

Keyword: preparation of CNBr-papain-sepharose 4B, cystatins adsorption rate, papain coupling density, media performance, active CPIs recovery

木瓜蛋白酶 Papain 是一类半胱氨酸蛋白酶,由 212 个氨基酸残基组成,并含有 3 对二硫键。构成其三维结构的两个结构域之间形成一个缝隙,缝隙内含有酶的活性位点^[2],而半胱氨酸蛋白酶抑制剂(Cysteine proteinase inhibitors,CPIs)是一类蛋白质水解酶抑制因子,其分子活性中心含有半胱氨酸残基(Cys-His)活性基团。它的 3 个疏水结构域构成了一个可外露的楔形结构边缘,与 Papain 在结构上高度互补,进而专一地抑制 Papain 的活性^[3]。因此,可在分离半胱氨酸蛋白酶抑制剂时,将 Papain 作为配基,偶联在活化的载体上,如曾仲奎^[4]等曾以 Papain 为配基纯化百合巯基蛋白酶抑制剂。

Cystatins 广泛存在于动物体内,属于 CPIs 的一个类群,目前对鱼类 Cystatins 的性质及应用研究尚有不足。对鱼源 Cystatins 的精准分离纯化是研究其酶学特性的前提;另一方面,本团队前期研究表明,鱼卵、皮、肝胰等加工废弃组织及鱼糜加工的废弃漂洗水^[5-8]中存在大量 Cystatins 活性。有报道显示,鱼源 Cystatin 在抑制鱼糜凝胶软化^[9]、鱼片抑菌^[10]和保鲜^[11]等食品领域具有潜在的应用前景,但目前尚缺少对从鱼类废弃组织及漂洗水中回收 Cystatin 的高效方法。

基于团队前期实验制备的重组鱼类 Cystatins 能专一高效地与 Papain 结合^[11],作者所在实验室自制了亲和填料(CNBr-Papain-Sepharose 4B)并以木瓜蛋白酶 Papain 为配基,以对鲢鱼重组 Cystatins 的吸附性能为评价指标,测定了该填料配基偶联密度、稳定性、贮藏性能及重复性。以鱼糜漂洗水为例,对该填料的 CPIs 回收情况进行了验证。该研究为今后探索精准分离、高效回收鱼源 Cystatins 的方法奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料与试剂 CNBr:购自美国 Adamas 公司,纯度 $\geq 97\%$;KBr: 购自西亚试剂公司,纯度 $\geq 99.5\%$;Papain:购自美国 Sigma 公司,使用前配制成

5 mg/mL 的溶液;Sepharose 4B: 购自美国 Sigma 公司;重组鲢鱼 Cystatin:参考陈海等^[11]的方法,由作者所在实验室制备,纯度 $\geq 90\%$,使用前配制成 5 mg/mL。

1.1.2 主要仪器设备 全波长酶标仪: 型号 Varioskan flash, 购自美国 Thermo electron 公司;傅立叶变换红外光谱仪:型号 FTIR-650,购自天津港东科技发展有限公司;高效液相色谱仪: 型号 LC-2010ChT,购自日本岛津公司;全自动低中高压层析系统:型号 Duo/Flow,购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 CNBr-Papain-Sepharose 4B 亲和填料的制备

1)Sepharose 4B 的活化 以 Axéan 等^[12-13]的方法为基础,略作改动,对介质 Sepharose 4B 进行活化,即取 6 g 捣碎后的 CNBr,溶于 50 mL 蒸馏水,分批小心倒入 50 mL 预处理后的 Sepharose 4B(pH 10.0)中。该操作在 40 ℃水浴锅中进行,并用 5 mol/L K_3PO_4 - K_2HPO_4 缓冲液(pH 9.3)调节 pH,使 pH 值恒定在 11.0。用 0.1 mol/L Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 缓冲液(pH 9.5)对已活化的 Sepharose 4B 进行快速抽洗,抽干后,即可得活化的 Sepharose 4B,即 CNBr-Sepharose 4B。

2)CNBr-Papain-Sepharose 4B 的偶联 取 3 g CNBr-Sepharose 4B,用 0.6 mol/L HCl 溶液进行多次冲洗,后分别与一定体积的 5 mg/mL Papain 溶液于 4 ℃混合过夜进行偶联。后加入 40 mL 的 0.2 mol/L 甘氨酸溶液(pH 8.0)封闭,4 ℃搅拌过夜。而后用含 0.5 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L CH_3COOH 溶液和 0.1 mol/L Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 缓冲液重复冲洗 3 次,即得已偶联 Papain 的亲和层析填料 CNBr-Papain-Sepharose 4B,将其置于体积分数 30%乙醇中于 4 ℃下保存,备用。

1.2.2 CNBr-Papain-Sepharose 4B 亲和填料的性能分析

1)紫外光谱分析 参考 Amostová 等^[14]的方法,分别将 Sepharose 4B、CNBr-Sepharose 4B 及 CNBr-Papain-Sepharose 4B 的甘油混匀样于 220~400 nm 波长下进行扫描。

2) 红外光谱分析 参考陈嫚等^[15]的方法, 分别制备 Sepharose 4B、CNBr-Sepharose 4B 及 CNBr-Papain-Sepharose 4B 与 KBr 的干燥压片样品。以 KBr 为背景, 于红外光谱仪上分别测定各样品红外光谱, 波数范围为 0~4 000 cm^{-1} 。

3) 微球性状描述 参照孙永亮^[16]等方法, 各取少量 Sepharose 4B、CNBr-Sepharose 4B 和 CNBr-Papain-Sepharose 4B 分别混合于蒸馏水中并均匀的涂于载玻片, 置于光学显微镜($\times 100$)下观察并拍照。

4) 蛋白质浓度的测定 以史新昌等^[17]的方法为基础, 略作改动。用超纯水测定 C18 RP-HPLC 色谱柱的峰面积 S_0 , 后分别将 0、1、2、3、4、5 mg/mL 的 Papain 及重组 Cystatin 在相同条件下 (上样量均为 100 μL) 进行 C18 RP-HPLC 分析, 求得样品的峰面积 S 作为标品。以 S/S_0 的比值为纵坐标, 以 Papain 及重组 Cystatin 的质量浓度为横坐标, 绘制 C18 RP-HPLC 的标准曲线。测样品 S/S_0 , 根据标准曲线计算蛋白质质量浓度及质量。

5) 配基 Papain 的有效偶联密度测定 参照张琦等^[18]方法, 即首先按照 1.2.1 的方法进行 5 组偶联反应, 各组取 3 g 抽干的 CNBr-Sepharose 4B 活化, 加入不同体积 (12、15、18、21、24 mL) 的 Papain (5 mg/mL), 同时以未活化的 Sepharose 4B 做 5 组空白。此时实验组及各空白组 Papain 的加量即偶联前蛋白质质量, 各组 3 次重复。反应后过滤填料, 收集各组滤液, 冻干。冻干粉溶于 1 mL 超纯水, 微滤后取 100 μL 按 1.2.2 中 (4) 的方法检测并计算各组偶联反应后 Papain 的蛋白质质量浓度及质量, 即未偶联蛋白质量, 得出偶联量和相对偶联率。

CNBr-Sepharose 4B 对 Papain 的偶联性能计算公式为:

$$\text{偶联量 (mg/g)} = \frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{M} \quad (1)$$

式中: m_1 为实验组偶联前蛋白质质量, mg; m_2 为实验组未吸附蛋白质质量, mg; m_3 为空白组偶联前蛋白质质量, mg; m_4 为空白组未吸附蛋白质质量, mg; M 为偶联前填料质量, g。

$$\text{相对偶联率 (\%)} = \frac{\text{各组偶联量 (mg/g)}}{\text{最高组的偶联量 (mg/g)}} \times 100\% \quad (2)$$

6) 对重组 Cystatin 有效吸附性能的测定 参考代军等^[19]方法, 略作改动, 向 1.2.2 (5) 中各组偶联

Papain 后的亲和层析填料中添加重组 Cystatin (5 mg/mL), 添加比例仍以抽干的活化 CNBr-Sepharose 4B 为基准, 即按 CNBr-Sepharose 4B:Cystatin 为 1:5 (g:mL) 将二者混匀后, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡吸附 2 h; 同时以 (5) 中的各空白组填料 (即以未活化的 Sepharose 4B 偶联 papain 的处理) 与重组 Cystatin 混合作为 Cystatin 有效吸附性能测试的各空白组, 各组重复 3 次。反应后抽滤, 收集滤液, 冻干后溶于 1 mL 超纯水, 微滤后取 100 μL , 按 (4) 的方法检测吸附后滤液中的 Cystatin 蛋白质质量浓度及质量, 即未吸附 Cystatin 蛋白质质量, 计算得出吸附量和相对吸附率。

CNBr-Papain-Sepharose 4B 对 Cystatin 的吸附性能计算公式为:

$$\text{吸附量 (mg/g)} = \frac{m_1 - m_2}{M} \quad (3)$$

式中: m_1 为空白组未吸附 Cystatin 量, mg; m_2 为实验组未吸附 Cystatin 量, mg; M 为加入的亲和填料总量, g。

$$\text{相对吸附量 (\%)} = \frac{\text{各组吸附量 (mg/g)}}{\text{最高组的吸附量 (mg/g)}} \times 100\% \quad (4)$$

7) 热稳定性测定 对 CNBr-Papain-Sepharose 4B 进行热处理 (4 $^{\circ}\text{C}$ 、10~70 $^{\circ}\text{C}$, 12 h), 而后过滤洗涤, 收集滤液冻干。冻干粉溶于 1 mL 超纯水, 微滤后取 100 μL 按 (4) 的方法检测各组洗涤液中 Papain 的蛋白质质量浓度和质量, 以计算配体 Papain 的残留结合量与结合率。后按 (6) 检测各处理下填料对 Cystatin 的有效吸附性能, 所有实验 3 次重复。以 Papain 的结合率和 Cystatin 的吸附率为纵坐标, 以温度为横坐标作图, 从而确定热稳定性。

Papain 的残留结合量和残留结合率计算公式为:

$$\text{Papain 的残留结合量 (mg/g)} = \frac{m_1 - m_2}{M} \quad (5)$$

式中: m_1 为 Papain 总偶联量, mg; m_2 为反应组 Papain 总脱落量, mg; M 为填料质量, g。

$$\text{Papain 的残留结合率 (\%)} = \frac{\text{Papain 残留结合量}}{\text{Papain 总偶联量}} \times 100\% \quad (6)$$

8) 酸碱稳定性测定 取 CNBr-Papain-Sepharose 4B 与各缓冲液 (pH 2.0~13.0) 按 1:20 (g:mL) 混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h, 后过滤并洗涤, 滤液与洗涤液合并收集。各处理组的 Papain 残留结合量与结

合率及 Cystatin 的吸附性能,测试计算方法同(7)。以 Papain 的结合率和 Cystatin 的吸附率为纵坐标,以 pH 值为横坐标作图,从而确定其酸碱稳定性。

9) 贮藏稳定性 各组 CNBr-Papain-Sepharose 4B 与超纯水均按 1:20(g:mL)混合,4 ℃下贮存 6 个月,每月取样,以超纯水充分过滤洗涤,收集洗涤液,测各取样点填料的 Papain 残留结合量与结合率及 Cystatin 的吸附性能,测试计算方法同 1.2.2 中(7)。以 Papain 的结合率和 Cystatin 的吸附率为纵坐标,以时间为横坐标作图,从而确定其贮藏稳定性。

10) 填料重复性测定 取 5 g 按最佳料液比制备的 CNBr-Papain-Sepharose 4B 亲和填料,装柱,后用 Buffer A (含 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA 及 1 mmol/L β -巯基乙醇的 25 mmol/L 乙酸钠, pH 6.0) 压实、平衡,之后按照 1.2.2 (6) 中所确定的 Cystatin 最大吸附量进行加样 (即 5 g 填料上样 106.3 mg), 收集流出液,冻干。后用 Buffer B (含 1 mol/L NaCl 的 Buffer A, pH 6.0) 洗去非特异性结合的蛋白质,以 Buffer A 除盐后,用洗脱液 Buffer C (含 50 mmol/L NaCl 及 1 mmol/L EDTA 的 0.25 mol/L 磷酸-氢氧化钠缓冲液, pH 11.0) 进行梯度洗脱,流量 0.3 mL/min, 收集流出液并冻干,再用 Buffer A 进行平衡,重复以上操作 3 次,以上操作均于 4 ℃进行。

将 3 次收集的流出液冻干粉分别溶于 1 mL 超纯水,微滤后按 1.2.2 中(4)的方法检测 3 次流出液中的未吸附 Cystatin 蛋白质质量浓度及质量,并计算吸附率。

Cystatin 的吸附率计算公式为:

$$\text{吸附率}(\%) = \frac{M-m}{M} \times 100\% \quad (7)$$

式中: M 为加入 Cystatin 的总质量; m 为未吸附 Cystatin 的质量。

1.2.3 鲑鱼鱼糜漂洗水中 CPIs 的 CNBr-Papain-Sepharose 4B 层析回收 参考李树红^[20]方法,取鱼糜漂洗水进行酸处理(pH 4.0, 37 ℃, 30 min)及硫酸铵分级沉淀处理,后用少量 Buffer A 溶解沉淀,充分透析后浓缩至适当体积,得到浓缩 CPIs 粗提液。

将 CNBr-Papain-Sepharose 4B 亲和填料装柱后,用 Buffer A 压实、平衡,将浓缩粗提液微滤后上样。以 Buffer A 洗去不吸附的蛋白质,以 Buffer B 洗去非特异性结合的蛋白质,经 Buffer A 除盐后,用

Buffer C 进行梯度洗脱,流速 0.3 mL/min, 收集洗脱液。根据 Anastasi 等^[21]的方法测定亲和层析后各收集管样品对 Papain 水解荧光合成肽底物 Z-Phe-Arg-MCA 的抑制活性,以确定目的蛋白质的洗脱峰。

2 结果与分析

2.1 CNBr-Papain-Sepharose 4B 的紫外光谱分析

紫外扫描结果见图 1。CNBr-Sepharose 4B 和 CNBr-Papain-Sepharose 4B 均在紫外波长约 220 nm 处呈现强吸收峰,该峰为溴化氰中双键在紫外光照射下能级跃迁产生的典型吸收峰,说明在 Sepharose 4B 载体上成功引入了溴化氰。CNBr-Papain-Sepharose 4B 在 280 nm 处的吸收峰,表明 Papain 已成功偶联到载体上。

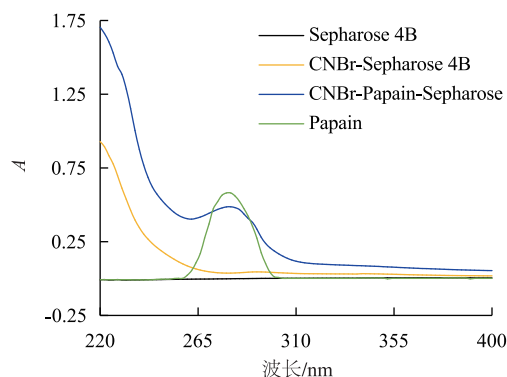


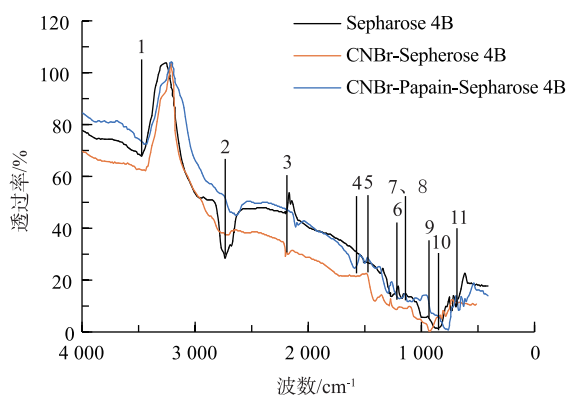
图 1 紫外光谱分析

Fig. 1 Assay of ultraviolet spectroscopy

2.2 CNBr-Papain-Sepharose 4B 的红外光谱分析

红外光谱的结果见图 2。未活化的 Sepharose 4B 在 3 446 cm^{-1} 处的吸收峰(1)是由缔合羟基(ν_{OH})伸缩引起的,2 844 cm^{-1} 处(2)出现的是 ν_{CH} 吸收峰,1 381 cm^{-1} 处(6)出现的峰是 O-H 面内弯曲振动($\delta_{\text{O-H}}$)的吸收峰,1 275 cm^{-1} (7)出现的是 O-H 面内弯曲振动($\delta_{\text{O-H}}$)的吸收峰,1 188 cm^{-1} (9)为糖苷键 $\nu_{\text{C-O-C}}$ 伸缩振动吸收峰,852 cm^{-1} (10)是糖环的 $\sigma_{\text{C-H}}$ 伸缩振动引起的吸收峰,751 cm^{-1} 处(11)出现糖环扩张运动引起的吸收峰。CNBr 活化的 Sepharose 4B 除具有上述光谱特征外,还在 2 210 cm^{-1} (3)出现了氰伸缩振动($\sigma_{\text{C}\equiv\text{N}}$)的特征吸收峰。在此基础上,偶联 Papain 后的填料,还分别在 1 672 cm^{-1} 处(4)、1 547 cm^{-1} 处(5)出现典型的酰胺 I 峰($\sigma_{\text{C=O}}$)、酰胺 II 峰($\sigma_{\text{N-H}} + \nu_{\text{C-N}}$),而在 1 249 cm^{-1} 处(8)出现的较弱的酰胺 III 峰,可能是被 Sepharose 4B 的 $\delta_{\text{O-H}}$ 吸收峰(7)

掩盖。



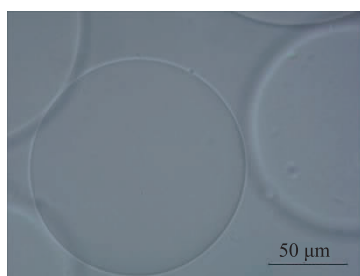
峰 1: 3 446 cm^{-1} ; 峰 2: 2 844 cm^{-1} ; 峰 3: 2 210 cm^{-1} ; 峰 4: 1 672 cm^{-1} ; 峰 5: 1 547 cm^{-1} ; 峰 6: 1 381 cm^{-1} ; 峰 7: 1 275 cm^{-1} ; 峰 8: 1 249 cm^{-1} ; 峰 9: 1 188 cm^{-1} ; 峰 10: 852 cm^{-1} ; 峰 11: 751 cm^{-1} 。

图 2 红外光谱分析

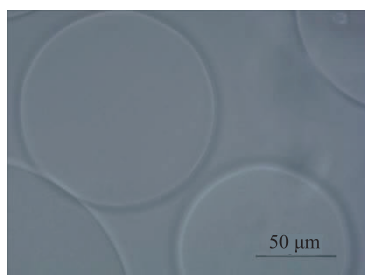
Fig. 2 Assay of infrared spectroscopy

2.3 CNBr-Papain-Sephadex 4B 的微球性状描述

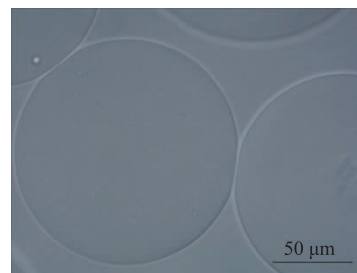
CNBr 活化和配基 Papain 偶联前后琼脂糖凝胶介质 (Sephadex 4B、CNBr-Sephadex 4B 和 CNBr-Papain-Sephadex 4B) 的微粒性状照片见图 3。Sephadex 4B 的粒径在实验过程中始终介于 100~200 μm 之间, 无明显变化, 且表面光滑, 说明活化和偶联的整个过程对凝胶介质的性能没有明显影响, 这对于提高选择性分离具有积极意义^[22]。因此, 推测本实验所制备的亲合层析填料符合实际应用的要求。



(a)Sephadex 4B



(b)CNBr-Sephadex 4B



(c)CNBr-Papain-Sephadex 4B

图 3 Sephadex 4B、CNBr-Sephadex 4B 和 CNBr-Papain-Sephadex 4B 在显微镜下的形态

Fig. 3 Microscopic graphs of Sephadex 4B, CNBr-Sephadex 4B and CNBr-Papain-Sephadex 4B

2.4 Papain 偶联密度及 Cystatin 吸附性能测定

2.4.1 C18 RP-HPLC 测 Papain 及重组 Cystatin 质量浓度绘制标准曲线 不同质量浓度的 Papain 及重组 Cystatin 进行 C18 RP-HPLC 色谱柱绘制标准曲线见图 4-5。Papain 蛋白质标准曲线的线性方程为 $y=2.0528x+1.2525$ ($R^2=0.9902$), 重组 Cystatin 蛋白质标准曲线的线性方程为: $y=2.0854x+1.1397$ ($R^2=0.9912$)

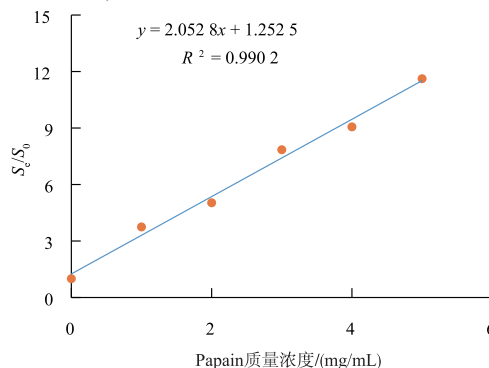


图 4 C18 RP-HPLC 的 Papain 标准曲线

Fig. 4 Standard curve of Papain of C18 RP-HPLC

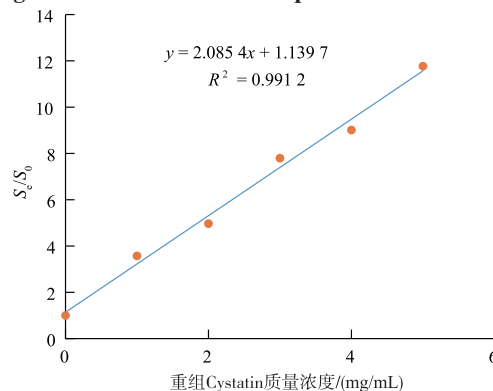


图 5 C18 RP-HPLC 的重组 Cystatin 标准曲线

Fig. 5 Standard curve of recombinant Cystatin of C18 RP-HPLC

2.4.2 Papain 偶联密度及 Cystatin 吸附性能测定

各 Papain 添加量组、Papain 偶联量及相对偶联率值

以及相应组别的亲和填料对 Cystatin 的吸附量和相对吸附率见表 1。

表 1 Papain 偶联密度及 Cystatin 吸附性能测定

Table 1 Determination of coupling density of Papain and adsorption performance of Cystatin

测试项	组别				
	1	2	3	4	5
Papain 添加量/(mL/g)	4	5	6	7	8
Papain 偶联量/(mg/g)	20.00±0.01	25.00±0.01	28.13±0.01	32.17±0.01	35.31±0.06
Papain 相对偶联率/%	56.64±0.02	70.77±0.02	79.65±0.04	91.10±0.01	100.0±0.18
Cystatin 添加量/(mL/g)	5	5	5	5	5
Cystatin 吸附量/(mg/g)	17.45±0.13	18.59±0.04	19.76±0.06	21.26±0.04	20.75±0.02
Cystatin 相对吸附率/%	82.05±0.11	89.60±0.21	92.94±0.17	100.0±0.02	93.53±0.23

随着 Papain 的添加量的增加, 每克 CNBr-Sepharose 4B 对 Papain 的偶联量随之增加。在各组吸附性能测定中, 前三组亲和填料对 Cystatin 的吸附量与 Papain 的偶联量成正相关, 第四组亲和填料对 Cystatin 的吸附量为 21.26 mg/g, 为最大吸附量, 同时达到了最大相对吸附率 (100%)。此后随着 Papain 偶联量增大, 亲和填料对 Cystatin 的吸附量反而下降。因此, 每克 CNBr-Sepharose 4B 加入 7 mL Papain (5 mg/mL), 即配体与配基的料液比为 1:7 (g:mL) 时, 偶联制备的亲和填料 CNBr-Papain-Sepharose 4B 对 Cystatin 的相对吸附率最佳, 即每克活化的 CNBr-Sepharose 4B 对 Papain 的偶联量为 32.17 mg, 此时的填料对 Cystatin 表现为最大吸附量 21.26 mg。

2.5 CNBr-Papain-Sepharose 4B 的热稳定性

CNBr-Papain-Sepharose 4B 的热稳定性测定结果见图 6。在 4~40 °C 的温度范围内, 填料的 Papain 残留结合率及对重组 Cystatin 的吸附率均为 100%, 说明此时制备的亲和填料稳定性高。50 °C 时, 两指标均开始出现下降趋势, 并且此后随着温度的升高而迅速降低, 证明已偶联上的 Papain 会随着温度的升高而脱落, 进而 Cystatin 的吸附性能也会因其受到影响。因此, 本实验所制备的亲和填料最理想的操作温度为 4~40 °C。

配基 Papain 作为一种蛋白质, 其在 50 °C 以下时稳定性较好, 更高的温度会导致其活性下降^[23], 这也可能是该亲和填料在 50 °C 时, Papain 结合率下降的原因之一。同时, 以蛋白质为配基的亲和填料, 其可操作温度通常处于 4~40 °C 之间, 本实验制备的

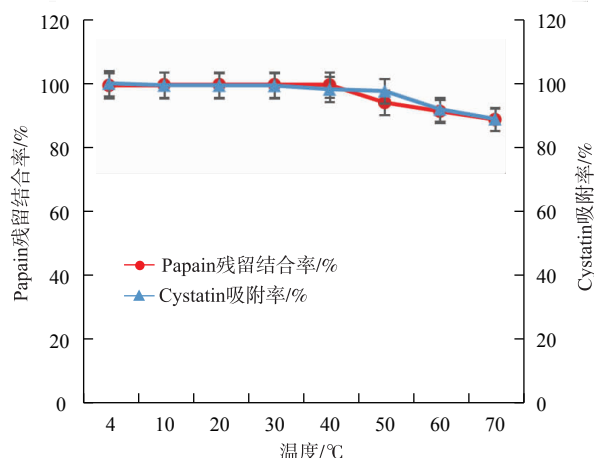


图 6 CNBr-Papain-Sepharose 4B 的热稳定性

Fig. 6 Thermal stability of CNBr-Papain-Sepharose 4B

CNBr-Papain-Sepharose 4B 亲和层析填料的热稳定性结果说明其在实际应用中可行。此外, 拟用该亲和层析填料纯化的鱼源 Cystatin 是具有半胱氨酸蛋白酶抑制作用的活性蛋白, 其纯化的过程需要保持 4 °C 低温条件^[24], 而本实验中制备的亲和填料在 4 °C 下性能非常稳定, 恰好符合该类蛋白质层析操作的温度要求。

2.6 CNBr-Papain-Sepharose 4B 的酸碱稳定性

CNBr-Papain-Sepharose 4B 的酸碱稳定性测定结果见图 7。在 pH 3.0~12.0 之间, Papain 的残留结合率很高, 均在 95.7% 以上, 且对 Cystatin 的吸附率在 85.0% 以上, 说明在此 pH 范围内制备的亲和填料比较稳定; 而在 pH 2.0 极酸和 pH 13.0 极碱的条件下, 亲和填料的配基 Papain 不稳定, 易脱落, 对

Cystatin 的吸附率极显著降低; 另一方面, 在 pH 6.0~8.0 之间, 亲和填料 Papain 的残留结合率和对 Cystatin 的吸附率均最高, 接近 100%。因此, 本研究制备的亲和填料在 pH 3.0~12.0 之间稳定, 最理想的保存及使用 pH 为 6.0~8.0。

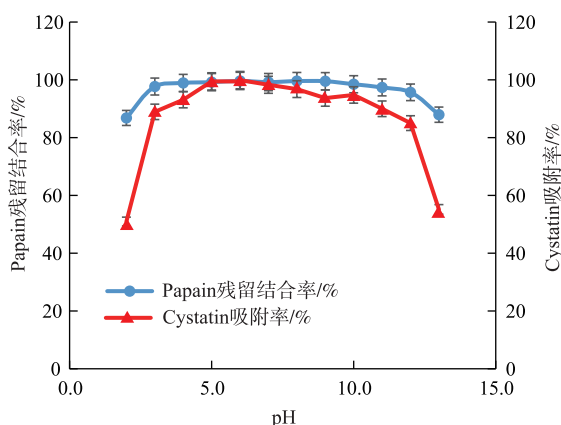


图 7 CNBr-Papain-Sepharose 4B 的 pH 稳定性

Fig. 7 pH stability of CNBr-Papain-Sepharose 4B

对于大部分蛋白质而言, pH 6.0~8.0 是较为温和和适宜的 pH 环境, 此外, 在层析纯化过程中, 洗脱缓冲液的 pH 值偏离目的蛋白质等电点 pI 0.5 单位时, 会更好维持目的蛋白质的稳定性。大部分 Cystatin 的等电点也在 pH 6.0~8.0 附近, 如鲢鱼 Cystatin 的等电点 pI 为 6.5^[25], 三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) PtCystatin 的等电点 pI 为 5.24^[26]。因此进行鱼源 Cystatin 纯化时, 所用适宜的 pH 值条件都基本处于 pH 6.0~8.0 之间, 而此时制备的亲和填料最稳定, 对 Cystatin 的有效吸附性能最高, 意味着在实际应用过程中, 该填料会更有利于目的 Cystatin 类蛋白的纯化, 分离效果更高效。

而鱼源 Cystatin 种类较多, 来源广泛, 个别鱼源 Cystatin 是酸性蛋白或碱性蛋白, 如斑狼鲷 (spotted wolffish) Cystatin 的等电点 pI 为 3.6^[27]; 从中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 中提取得到的 Cystatin C 的等电点 pI 为 9.3^[28-29]。因此在层析纯化过程中, 洗脱缓冲液的 pH 值变化可能较大。该自制亲和填料在 pH 3~12 范围内具有稳定性, 证明其对于鱼源 Cystatin 有较好的适用性。此外, 以 Sepharose 做为介质的层析填料在再生或者在位清洗时常会用到较为激烈的碱性环境, 如使用 0.1 mol/L NaOH (pH 12.0 左右) 作为清洗溶液, 而该填料具有较好的酸碱稳定性, 证明其可以进行短时间的在位清洗和再

生, 具有现实可操作性。

2.7 CNBr-Papain-Sepharose 4B 的贮藏稳定性

不同贮藏时间内制备的亲和填料 CNBr-Papain-Sepharose 4B 的稳定性测定结果见图 8。由图可知, CNBr-Papain-Sepharose 4B 在 4 °C 初始贮藏点时, 其 Papain 的残余结合率及其对 Cystatin 的吸附率均为 100%, 但随着贮藏时间的延长, 两指标呈现降低趋势; 2 个月内非常稳定, 4 个月时, 其 Papain 的残余结合率仍在 92% 以上; 贮藏 6 个月之后, 其 Papain 的残余结合率有所降低, 仍保持在 80% 以上, 但此时对 Cystatin 的吸附率明显降低为 64.95%。

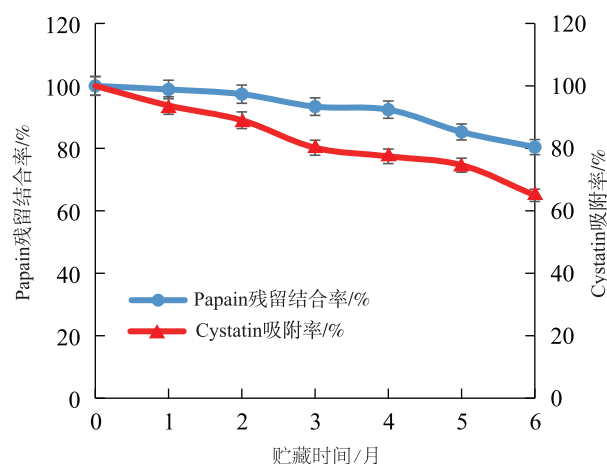


图 8 CNBr-Papain-Sepharose 4B 的贮藏稳定性

Fig. 8 Storage stability of CNBr-Papain-Sepharose 4B

实验制备的 CNBr-Papain-Sepharose 4B 亲和填料在 6 个月的贮藏期内, 保持了大部分的稳定性。其在 6 个月时对 Cystatin 吸附率降低的主要原因应该是与本实验中采用的贮藏溶液有关。通常商业化产品的保存液为适宜 pH 条件下的含有体积分数 20% 或 30% 乙醇的缓冲溶液, 而本实验所用的贮藏溶液为超纯水, 并不有利于维持配基蛋白 Papain 的稳定性。由此可以推测, 改进贮藏溶液的成分将会进一步提高该亲和填料的贮藏稳定性。本团队将在后期实验中进一步、更全面地优化填料的贮藏条件, 提高贮藏性能。

2.8 CNBr-Papain-Sepharose 4B 的使用重复性

CNBr-Papain-Sepharose 4B 的使用重复性见表 2。从表 2 可以看出, 填料对 Cystatin 的吸附率很稳定, 在连续 3 次使用时均维持在 95% 以上, 证明填料的重复性能较好。使用重复性测定时, 填料对

Cystatin 的吸附量均低于 2.4.2 中所测得的 Cystatin 最大吸附量, 主要是因为 2.4.2 在测定吸附性能时采用了静态吸附载量法, 而 1.2.2 中 (10) 采用动态吸附载量法, 更接近实际的层析操作过程。然而由于存在动态的吸附、解吸平衡及一定的样品漏出率 (通常允许在 5% 以内), 所以实验测得的动态吸附载量和吸附率均比静态吸附时要低些, 是正常的。尽管本实验制备的填料使用重复性比较稳定, 但是任何填料的有效重复使用次数都受多种因素的影响, 例如柱的种类、样品性质、填料保存和再生方法、层析操作细节习惯以及纯化的要求, 因此不可能永久再生。本实验制备的填料也是具有一定的使用寿命, 探究该填料的各项性能, 对合理使用填料、延长使用寿命都有指导意义。

表 2 CNBr-Papain-Sepharose 4B 的重复使用性

Table 2 Reusability of CNBr-Papain-Sepharose 4B

使用次数	未吸附 Cystatin 质量浓度/(mg/mL)	未吸附 Cystatin 质量/mg	吸附率/%
1	4.63	4.63	95.64
2	4.81	4.81	95.47
3	5.05	5.05	95.25

2.9 鲢鱼鱼糜漂洗水中 CPIs 的 CNBr-Papain-Sepharose 4B 亲和层析

鲢鱼鱼糜漂洗水中 CPIs 的 CNBr-Papain-Sepharose 4B 亲和层析图见图 9。可以看出, CPIs 浓缩粗提液经 CNBr-Papain-Sepharose 4B 亲和层析后, 于吸光度 A_{280} 处监测到 3 个明显的独立蛋白质峰 (峰 I, 峰 II 和峰 III)。其中经 Buffer A 洗脱下大量杂蛋白质, 即峰 I, 伴随有少量的活性损失; 经 Buffer B 洗脱下的非特异性结合蛋白质峰 II 没有呈现出 Papain 抑制活性; 而经 Buffer C 洗脱液梯度洗脱后, 主要在洗脱液比例升至 58% 时得到峰 III, 该峰 A_{280} 蛋白质峰值最低, 而 Papain 抑制活性最高, 说明其具有明显的 Papain 抑制活性, 证明 CNBr-Papain-Sepharose 4B 填料成功地实现了鲢鱼鱼糜漂洗水 CPIs 的高效回收纯化。

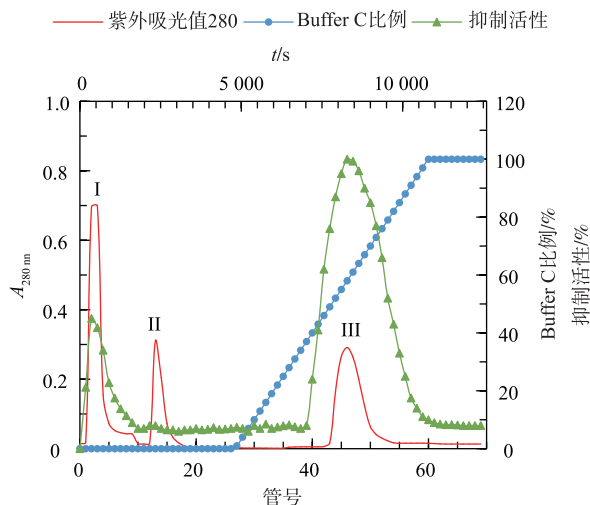


图 9 鲢鱼鱼糜漂洗水中 CPIs 的 CNBr-Papain-Sepharose 4B 亲和层析图

Fig. 9 CNBr-Papain-Sepharose 4B affinity chromatography of CPIs from silver carp surimi rinse water

3 结语

利用溴化氢活化法对 sepharose 4B 进行活化并将其与 Papain 偶联制得亲和填料 CNBr-Papain-Sepharose 4B。通过结构表征, 综合 220 nm 及 280 nm 紫外吸收峰、氰伸缩振动 ($\sigma_{C\equiv N}$) 的特征吸收峰 (210 cm^{-1}) 以及典型的酰胺峰 (1672 、 1547 、 1249 cm^{-1}), 可靠地证实了 Sepharose 4B 被 CNBr 活化, 且 Papain 偶联成功。

利用重组鲢鱼 Cystatin 的吸附率为指标来筛选活化的琼脂糖介质对 Papain 适宜的偶联密度并测定亲和填料的稳定性。结果表明, CNBr-Sepharose 4B 和 Papain 最佳料液比为 $1:7\text{ (g:mL)}$, CNBr-Papain-Sepharose 4B 在 $4\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下热稳定性最高, pH $6.0\sim 8.0$ 之间 CNBr-Papain-Sepharose 4B 最稳定, pH $3.0\sim 12.0$ 之间仍具有较高的可操作性。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以超纯水作为贮藏溶液, 制备的填料在 6 个月内保持 80% 以上的 Papain 残留结合率及 65% 以上的 Cystatin 吸附率。连续重复使用 3 次后, 填料对目的蛋白质的吸附率均保持在 95% 以上, 具有较好的重复性。最后, 制备的 CNBr-Papain-Sepharose 4B 亲和填料成功高效地回收了鲢鱼鱼糜漂洗水中的 CPIs。

参考文献:

- [1] 王桂珍. 亲和层析技术的研究及应用[D]. 广州:暨南大学, 2011.
- [2] 陈天翔. 以木瓜蛋白酶为模型蛋白的亲和色谱新介质的制备及其吸附机理研究[D]. 上海:东华大学, 2012.
- [3] MACHLEIDT W, THIELE U, LABER B, et al. Mechanism of inhibition of Papain by chicken egg white Cystatin; inhibition constants of N-terminally truncated forms and cyanogen bromide fragments of the inhibitor[J]. **FEBS Letters**, 1989, 243(2): 1-238.
- [4] 曾仲奎, 杨育红. 百合巯基蛋白酶抑制剂的纯化及部分性质研究[J]. 生物化学杂志, 1996, 12(2): 182-186.
- [5] 宋川, 李艳芳, 任阳阳, 等. 鲢鱼卵高分子质量 CPI-I 的纯化与鉴定[J]. 食品科学, 2012, 33(13): 100-103.
- [6] 李树红, 陈海, 蒋然然, 等. 鲢鱼和草鱼下脚料中 CPIs 抑制活性比较及其分子量分布的鉴定 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(21): 63-68.
- [7] 蒋然然, 梁宇, 陈治光, 等. 草鱼肝胰中 CPIs 初步分离鉴定及其活性测定[J]. 食品工业科技, 2015, 36(16): 118-123.
- [8] 魏华茂, 张梦芸, 胡小超, 等. 鱼糜漂洗水中蛋白质的回收及其再利用[J]. 核农学报, 2015, 29(11): 2172-2177.
- [9] 刘玲, 蒋然然, 彭海鑫, 等. 鲢鱼卵中低分子 CPIs 的纯化鉴定及改善鱼糜凝胶强度的效果研究[J]. 食品科学, 2014, 35(13): 37-42.
- [10] 钟海霞. 鲢鱼重组 Cystatin 及其酶解物对草鱼 4℃ 冷藏货架期终点优势腐败菌的抑制作用[D]. 雅安:四川农业大学, 2017.
- [11] 陈海, 姜海洋, 吴睿, 等. 鲢鱼重组 Cystatin 的原核表达、鉴定及对铜绿假单胞菌的抑制作用[J]. 食品科学, 2014, 35(21): 133-137.
- [12] BAIN B, BRAZIL M. Adalimumab[J]. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2003, 2(9): 693-694.
- [13] AXEAN R, ERNBACK S. Chemical fixation of enzymes to cyanogenhalide activated polysaccharide carriers [J]. **Febs Journal**, 1971, 18(3): 351-360.
- [14] ARNOSTOVA H, KUCEROVA Z, TISLEROVA I, et al. Affinity chromatography of porcine pepsin on different types of immobilized 3, 5-diiodo-L-tyrosine[J]. **Journal of Chromatography A**, 2001, 911(2): 211-216.
- [15] 陈嫚, 任启生, 宋新荣, 等. 刺桐胰蛋白酶抑制剂亲和层析填料的制备及应用[J]. 北京理工大学学报, 2005, 25(2): 172-175.
- [16] 孙永亮, 李淑娟, 胡道道, 等. 纯化组氨酸标签蛋白金属螯合亲和色谱填料的制备与性能[J]. 陕西师范大学学报:自然科学版, 2007, 35(2): 67-71.
- [17] 史新昌, 韩春梅, 罗立骏, 等. 紫外 - 可见光检测器的高效液相色谱无标准品直接测量蛋白含量的可能性[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1684-1688.
- [18] 张琦, 张子剑, 谭琰, 等. 基于亲和层析方法研究栀子苷的药物靶标[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(15): 2811-2815.
- [19] 代军, 陈长治, 俞耀庭, 等. 类风湿因子(RF)免疫吸附剂的制备及性能研究[J]. 离子交换与吸附, 2001, 17(5): 352-356.
- [20] 李树红. 鲢鱼背肌组织蛋白酶 B、L 的纯化鉴定及水解肌球蛋白的研究[D]. 北京:中国农业大学, 2004.
- [21] ANASTASI A, BROWN M, KEMBHAVI A, et al. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum[J]. **Biochemical Journal**, 1983, 211(1): 129-138.
- [22] CHOUDHUTY D, BISWS S, Roy S, et al. Improving thermostability of Papain through structure-based protein engineering[J]. **Protein Engineering Design & Selection**, 2010, 23(6): 457.
- [23] 李树红, 蒋然然, 杨娟, 等. 鲢鱼卵中两种高分子半胱氨酸蛋白酶抑制因子的纯化与鉴定[J]. 食品科学, 2015, 36(23): 28-33.
- [24] 杨娟, 钟海霞, 李树红, 等. 鲢鱼重组 Cystatin 及其酶解产物对草鱼冷藏肉片优势腐败菌的抑制作用[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(4): 58-64.
- [25] 王京波, 孙敬敬, 廖智, 等. 三疣梭子蟹免疫相关基因 Cystatin 的鉴定与表达分析[J]. 浙江农业学报, 2014, 26(6): 1469.
- [26] 任阳阳, 李艳芳, 刘玲, 等. 鱼类 Cystatins 及其在水产食品中的应用前景[J]. 食品工业科技, 2013, 34(14): 385-389.
- [27] 马冬梅. 中华鲟半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 基因的原核表达[J]. 水产学报, 2003, 27(3): 239-244.
- [28] 李海霞, 徐国宾, 朱立华. 血清胰蛋白酶抑制剂 C 测定的方法学研究进展及临床意义[J]. 临床检验杂志, 2002, 20(5): 314-316.