

文章编号:1673-1689(2009)06-0799-05

国产弱阳离子琼脂糖交换介质的性能及其 用于蛋清溶菌酶的分选纯化

夏海锋, 金雄华, 饶志明, 郝飞, 严伟, 郑志永

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 从理化性能、离子交换容量、静态和动态吸附性能等方面对国产快流速 CM-琼脂糖弱酸性阳离子交换介质进行了综合考察和评价, 并应用该介质进行了鸡蛋清中溶菌酶的分选。结果发现, 国产介质的理化性能符合要求, 离子交换容量达到了 187 mmol/mL, 高于国外商品介质; 对模型蛋白溶菌酶的静态和动态吸附容量分别达到了 107.0 mg/mL 和 90.3 mg/mL(高流速下), 同样略高于国外商品介质, 显示能够满足蛋白质的有效吸附; 离子交换层析分选蛋清溶菌酶较为成功, 纯度在 95% 以上, 产量达到了 4.1 mg/mL 鸡蛋清。

关键词: 国产生化分离介质; 琼脂糖介质; 溶菌酶; 分选纯化

中图分类号: O 647.31

文献标识码: A

Characteristics and Performances of National Agrose Cation Exchanger and Its Application in Lysozyme Purification from Egg White

XIA Hai-feng, JIN Xiong-hua, RAO Zhi-ming, HAO Fei, YAN Wei, ZHENG Zhi-yong
(Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The national cation exchanger (Zhengguang CM-Agrose Fast Flow) was integrated evaluated on its physic properties, functional group density, static and dynamic adsorption properties. Besides, the adsorbents were used to purification of lysozyme from egg white. As a result, it was found that the physic properties of CM-Agrose FF include density, water content and size distribution are up to the requirement. The functional group density reaches 187 mmol/mL, which is higher than CM Sepharose FF. The static and dynamic adsorption of lysozyme reach 107.0 and 90.3 mg/mL (100 cm/h), respectively, which indicated that the adsorbents could fulfil the efficient adsorption of proteins. Lysozyme was successfully purified from egg white using the cation exchanger. The purity of lysozyme was more than 95% and the yield reached 4.1 mg/mL egg white.

Key words: national cation exchanger, agrose, lysozyme, purification

层析方法由于所要求的设备相对简单, 便于自 动化控制, 不会在分离过程中出现发热、相变等效

收稿日期: 2009-06-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(20676053); 国家 863 计划项目(2007AA02Z207)。

作者简介: 夏海锋(1979-), 男, 浙江平湖人, 工学博士, 副教授, 主要从事生物分离技术和工业微生物方面的研究。

* 通讯作者: 饶志明(1975-), 男, 江西临川人, 农学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事工业微生物分子育种和发酵工程方面的研究。Email: raozm@yahoo.com.cn

应等优点^[1],是目前最有效、最普遍采用的生物分离技术之一。其中离子交换层析又是层析技术中应用最广泛的方法^[2],约占公开发表的蛋白质纯化方案的75%^[3]。以琼脂糖为主要代表的多糖类物质是现今层析介质中应用得最为广泛的基质材料。这些基质具有良好的亲水性和生物相容性,常规pH和温度范围内稳定,耐受强酸和强碱的清洗,且再生容易。琼脂糖基质经过环氧氯丙烷^[4]、二溴丙醇^[5]等化学试剂的交联以及功能配基的偶联可制备成为生化分离用层析介质。

长久以来,生化分离介质被国外大公司(如GE Healthcare、Pall、Bio-Rad)所垄断,许多生产标准和实验标准均以Sephacrose为代表的商品介质为基准,大多数研究单位和生产企业采用进口产品。但是国外商品介质价格昂贵,且逐年上涨,因此亟需要国产同等性能的产品来替代。目前,国内已有几家公司和科研单位推出了琼脂糖基的层析介质,具体性能有待于考察和检验。

作者选取了浙江争光实业股份有限公司推出的生化分离介质中具有代表性的快流速CM-琼脂糖弱酸性阳离子交换介质,在理化性能,离子交换容量,静态和动态吸附性能等方面进行了综合考察,并利用该介质对鸡蛋清中的溶菌酶进行了分离。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 国产快流速CM-琼脂糖弱酸性阳离子交换剂(Zhengguang CM-Agrose Fast Flow),浙江争光实业股份有限公司产品;CM Sepharose Fast Flow,美国GE公司产品;溶菌酶标样,美国BBI公司产品;新鲜鸡蛋,农贸市场随机购买,无差异;NaOH、HCl、NaCl、柠檬酸、Na₂HPO₄等均为国药试剂分析纯。

1.1.2 仪器 ÄKTA Basic层析系统,GE Healthcare制造;层析柱(内径1 cm,长15 cm),江阴市新辉层析设备有限公司制造;蛋白质电泳系统,美国Bio-Rad公司制造;Master Size 2000粒径分布仪,英国Malven公司制造;普通光学显微镜,日本Nikon公司制造;真空抽滤仪,天津Autoscience仪器有限公司制造。

1.2 实验方法

1.2.1 理化性能的测定 琼脂糖介质的外形通过Nikon E200显微镜观察,放大倍数为20×10。湿真密度的测定采用水取代法,具体方法为:抽滤10 mL经预处理的介质,称取1 g左右湿态微球于5

mL比重瓶中,注满去离子水并盖上瓶塞,溢出多余水分后擦干瓶身,精确称量。依照相同方法,称量只注满去离子水的比重瓶。湿真密度按照下式计算^[6]:

$$\rho_p = \frac{m_1 \times \rho_w}{m_1 + m_2 - m_3} \quad (1)$$

式中: ρ_p 为微球的湿真密度(g/mL); ρ_w 为水的密度(g/mL); m_1 为湿态微球的质量(g); m_2 为只注满水的比重瓶的质量(g); m_3 为加入微球并注满水的比重瓶的质量(g)。

沉降密度(ρ_s)的确定采用量筒量取和直接称重的方法,具体方法为:取5 mL左右的介质于10 mL量筒中,用水浸没,沉降过夜,然后去掉上层多余的水分并称量。沉降密度按照下式计算:

$$\rho_s = \frac{m_4 - m_5}{V_1} \quad (2)$$

式中: ρ_s 为微球的沉降密度(g/mL); m_4 为加入含水微球的量筒的质量(g); m_5 为空量筒的质量(g); V_1 为量筒量取的介质沉降体积。

介质的含水率(ω)采用减量法测定^[7],具体方法为:抽滤5 g介质于称量瓶中,烘箱内120 °C下放置2 h至恒重,精确称量。失去的水分占总介质质量的百分比即为含水率。

介质的粒径分布采用Master Size 2000粒径分布仪(英国Malven公司)进行测定,重复3次,采用该公司软件处理并得到粒径分布和体积平均粒径。

1.2.2 离子交换容量的测定 采用酸碱滴定法测定微球的离子交换容量^[8]。具体步骤为:将15 mL介质装入层析柱中,用400 mL 1 mol/L HCl溶液缓慢流过层析柱,然后用500 mL蒸馏水以相同的流速流过层析柱;抽滤介质,取2 mL左右置于250 mL具塞三角瓶中,加入100 mL 0.1 mol/L NaOH溶液,室温下反应30 min;从中吸取25 mL溶液,用0.1 mol/L HCl溶液进行滴定,同时进行空白组实验。以单位沉降体积介质中可交换碱性基团的量来表示离子交换容量,可由下式计算:

$$q = \frac{4 \times (V_2 - V_3) \times 100}{V_4} \quad (3)$$

式中: q 为离子交换容量(mmol/mL); V_2 为空白对照消耗的HCl溶液体积(mL); V_3 为样品液消耗的HCl溶液体积(mL); V_4 为样品体积(mL)。

1.2.3 静态吸附曲线的测定 选用溶菌酶作为模型吸附蛋白。首先将介质用设定的缓冲液(pH 6、20 mmol/L柠檬酸-磷酸氢二钠)进行平衡,抽滤后分别称取0.1、0.2、0.4、0.6、1.2 g于25 mL带塞锥形瓶中,加入15 mL含5 mg/mL溶菌酶的缓冲液

(pH 6, 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠);将锥形瓶置于水浴摇床中,25 °C下 180 r/min 振荡 8 h;平衡后取出上清液,280 nm 下测定溶菌酶的吸光值,对照溶菌酶标准曲线得蛋白质质量浓度。

根据物料平衡式计算吸附容量:

$$Q^* = \frac{(C_0 - C^*) \cdot V_5}{V_6} \quad (4)$$

式中: Q^* 为平衡吸附量(mg/mL); C^* 为溶菌酶的平衡浓度(mg/mL); C_0 为溶菌酶的起始质量浓度(mg/mL); V_5 为溶菌酶溶液的体积(mL); V_6 为介质的体积(mL)。

并根据 Langmuir 吸附平衡方程拟合吸附介质对蛋白质的饱和吸附容量和解离常数。

$$Q^* = \frac{Q_m \cdot C^*}{K_d + C^*} \quad (5)$$

1.2.4 动态吸附容量的测定 利用 ÄKTA Basic 层析系统进行溶菌酶穿透曲线的测定。取 4.4 mL 介质于层析柱中(沉降高度约为 5.6 cm),一定流速下通入设定的缓冲液(pH 6, 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠),平衡后通入 2 mg/mL 溶菌酶溶液(缓冲体系同前)。280 nm 紫外检测出口处蛋白质质量浓度随时间的变化,并根据进样量与出口 BSA 浓度绘制穿透曲线。

10% 蛋白质穿透时的动态吸附量按照 Griffith 等^[9]的方法进行计算:

$$Q_{10\%} = \frac{C_0 \times \int_0^{V_{10\%}} (1 - \frac{C}{C_0}) dV}{V} \quad (6)$$

式中: $Q_{10\%}$ 为 10% 穿透时的动态吸附量(mg/mL); C 和 C_0 分别为柱床出口蛋白质质量浓度和初始蛋白质质量浓度(mg/mL); $V_{10\%}$ 为 10% 穿透时蛋白质溶液的体积(mL); V 为柱床中介质的沉降体积(mL)。

1.2.5 蛋清中溶菌酶的分离

1) 样品处理:取新鲜鸡蛋一枚,收集蛋清,按 1:2 的比例加入 pH 4.6, 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液,均匀搅拌,4 °C 冰箱静置过夜。8 000 r/min 离心去沉淀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,最后将溶液用 NaOH 调至上样 pH 值。

2) 层析条件:ÄKTA Basic 层析系统;层析柱和介质量同 1.2.4;上样 pH 值为 6 和 7.5,上样量 0.5 mL,流速 1 mL/min;洗脱条件为 0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱,洗脱液 pH 值与上样缓冲液相同。

3) 蛋白质分析:收集各层析峰,纯度分析采用 SDS-PAGE 电泳法,制板采用 Laemmli 体系,即 12 g/dL 的分离胶和 5 g/dL 的浓缩胶;蛋白质质量浓

度分析采用考马斯亮蓝法。

2 结果与讨论

2.1 理化性能分析

以琼脂糖为基质的层析介质具有含水量高,亲水性好,多孔结构,成球性优良等特点,因此适合于蛋白质层析。作者从显微照片、密度测算、粒径分布等方面对争光弱阳离子琼脂糖介质的理化性能进行考察,主要指标列于表 1。

表 1 争光快速 CM-琼脂糖弱酸性阳离子交换剂的理化性质

$\rho_p /$ (g/mL)	$\rho_s /$ (g/mL)	$\omega / \%$	粒径大小/ μm (d(0.1) ~ d(0.9))	$D_s / \mu\text{m}$
1.08	1.05	91	42.2~156.7	98.2

争光快速 CM-琼脂糖弱酸性阳离子交换剂的基质为 6 g/dL 交联琼脂糖,图 1 为其普通光学显微照片。可以观察到微球的色泽均匀,球形度良好,颗粒大小有一定的分布,但均匀度尚可,可以满足生物大分子层析对介质形态的需要。此外,从使用多次后介质的显微观察来看,能够保持原有的形态。

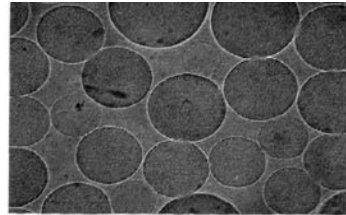


图 1 争光快速 CM-琼脂糖弱酸性阳离子交换剂的显微照片(放大倍数为 200)

Fig. 1 Morphology of Zhengguang CM-Agrose Fast Flow (200×)

微球的湿真密度是指单位体积湿态微球所具有的质量,而降降密度是指沉降状态下单位湿视体积的微球与水的质量。由于微球琼脂糖含量较小,两种密度均接近于水,分别为 1.08 g/mL 和 1.05 g/mL,而含水率则高达 91%。

图 2 为采用粒径分析仪得到的粒径分布形态。可以看到争光介质的粒径呈良好的对数正态分布,分布范围较窄,d(0.1) ~ d(0.9) 在 42.2 ~ 156.7 μm 之间,体积平均粒径(D_s)为 98.2 μm。这一数据与 Sepharose FF 系列介质相近(GE Healthcare 网站,45 ~ 165 μm)。

2.2 离子交换容量

离子交换容量是指单位体积介质中可交换的

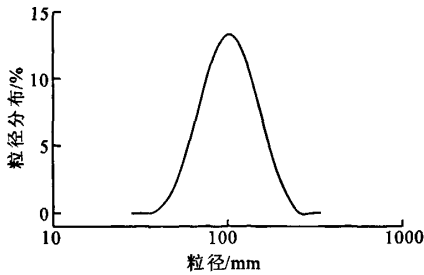


图2 争光快流速CM-琼脂糖弱酸性阳离子交换剂的粒径分布

Fig. 2 Size distribution of Zhengguang CM-Agrose Fast Flow

酸性或碱性基团的含量。采用滴定法测定了3批次争光快流速CM-琼脂糖弱酸性阳离子介质的交换容量,分别为185、197、179 mmol/mL,平均为187 mmol/mL,方差为9.17。同样方法测得CM Sepharose FF的平均交换容量为154 mmol/mL,可见在离子交换容量上国产介质略高。

2.3 静态吸附性能

以碱性蛋白溶菌酶(pI=11.2)为目标蛋白质,考察了争光弱阳离子介质在pH 6时的静态吸附性能,并与商品介质进行了对比。如图3所示,通过Langmuir方程拟合发现国产介质的饱和和吸附容量

(Q_m)达到了107.0 mg/mL,略高于CM Sepharose FF的100.5 mg/mL。争光介质的解离常数(K_d)只有0.177 mg/mL,物理意义为达到吸附容量一半时的蛋白质质量浓度为0.177 mg/mL,尽管高于CM Sepharose FF的0.063 mg/mL,但同样说明争光介质在低质量浓度蛋白质溶液中也能够对蛋白质进行有效吸附,这在实际分离体系的应用中非常重要。两种介质的静态吸附参数列于表2。

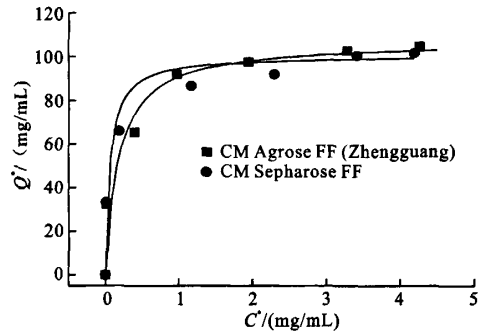


图3 溶菌酶在争光快流速CM-琼脂糖弱酸性阳离子交换剂和商品介质CM Sepharose FF上的吸附等温线(pH 6)

Fig. 3 Isotherm adsorption of lysozyme on CM-Agrose FF and CM Sepharose FF at pH 6

表2 溶菌酶在争光快流速CM-琼脂糖弱酸性阳离子交换剂和商品介质CM Sepharose FF上的静态和动态吸附参数
Table 2 Parameters of static and dynamic adsorption capacities of lysozyme on CM-Agrose FF and CM Sepharose FF

介质	$Q_m /$ (mg/mL)	K_d	$Q_{10\%} /$ (mg/mL)		$Q_{10\%} / Q_m$	
			30 cm/h	100 cm/h	30 cm/h	100 cm/h
CM-Agrose FF	107.0	0.177	93.0	90.3	86.9%	84.4%
CM Sepharose FF	100.5	0.063	—	88.7	—	88.3%

2.4 动态吸附容量

蛋白质在层析柱上的穿透曲线可以反映动态下介质对蛋白质的吸附性能,体现实际应用中的吸附行为。作者考察了两种流速下溶菌酶在争光介质和CM Sepharose FF上的动态吸附,见图4。可以发现,在高(100 cm/h)、低(30 cm/h)两种流速下穿透曲线均比较陡,显示动态下吸附充分。通过10%蛋白质穿透计算,国产争光介质的两种流速的 $Q_{10\%}$ 分别为90.3 mg/mL和93.0 mg/mL,显示高低流速下吸附量相差较小,且相同流速下略高于CM Sepharose FF(100 cm/h, 88.7 mg/mL)。与最大吸附容量(Q_m)比较,百分率分别为84.4%和86.9%,说明争光介质可以满足动态下对蛋白质的有效吸附。两种介质的动态吸附参数见表2。

2.5 蛋清中溶菌酶的分离

溶菌酶是一种糖苷键水解酶,具有一定的溶菌

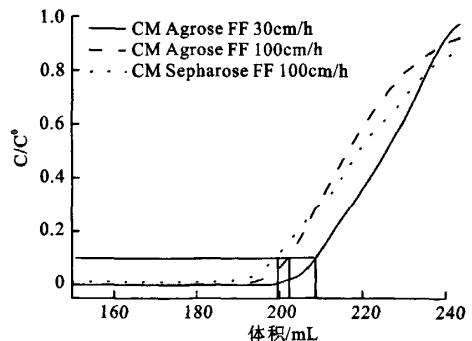


图4 溶菌酶在争光快流速CM-琼脂糖弱酸性阳离子交换剂和商品介质CM Sepharose FF上的穿透曲线

Fig. 4 Breakthrough curves of lysozyme on CM-Agrose FF and CM Sepharose FF at pH 6

作用,可用作食品防腐剂,也是基因工程中必不可少的工具酶。鸡蛋清中溶菌酶的含量约为3.5%,

是商品溶菌酶的重要来源^[10]。通过 pH 4.6 缓冲液的处理,部分卵粘蛋白以等电点的方式除去,减少了离子交换层析的压力。

蛋清溶菌酶的层析分离见图 5。考察了两种 pH 条件,即酸性条件 pH 6 和弱碱性条件 pH 7.5,洗脱梯度相同,各层析峰的电泳条带见图 6。对比层析图可以发现,在 pH 6 时,穿透峰较小,出现了两个洗脱峰;而在 pH 7.5 时穿透峰较大,洗脱峰只有一个。对照电泳条带,洗脱峰 2 (条带 4 和 6) 是溶菌酶,两个 pH 下的纯度均较高,均在 95% 以上,分离较为成功,证明争光弱阳离子交换介质适用于碱性蛋白质的分离;而 pH 6 条件下的洗脱峰 1 主要是部分吸附的卵粘蛋白和血清蛋白。从两个 pH 层析条件来看,pH 6 下收率更高,纯度基本能够满足要求。通过蛋白质质量浓度测算,每毫升蛋清可得到 4.1 mg 溶菌酶。

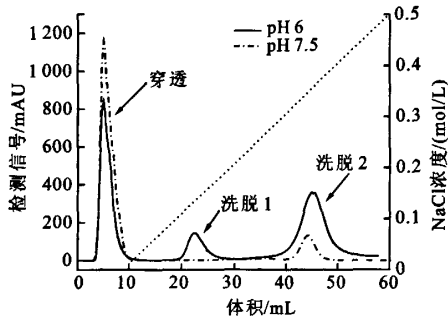


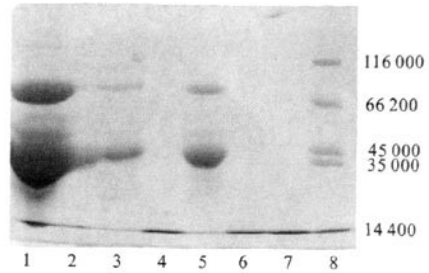
图 5 争光快流速 CM-琼脂糖弱酸性阳离子交换剂分离蛋清溶菌酶的层析过程图

Fig. 5 Chromatography process of lysozyme purification by CM-Agrose FF from egg white

参考文献(References):

- [1] 刘国途. 生物工程下游技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [2] Himmelhoch S R. Chromatography of proteins on ion-exchange adsorbents[J]. *Methods Enzymol*, 1971, 22: 273-286.
- [3] Bonnerjea J, Oh S, Hoare M, et al. Protein purification; the right step at the right time [J]. *Bio/Technology*, 1986, 4: 954-958.
- [4] 张伟, 张教强, 邵伟, 等. 琼脂糖凝胶的制备及化学改性研究[J]. *应用化工*, 2003, 32 (1), 24-27.
ZHANG Wei, ZHANG Jiao-qiang, SHAO Wei, et al. Research on preparation of spherical agarose gel and coupling reaction with diethylaminoethyl [J]. *Applied Chemical Industry*, 2003, 32 (1), 24-27. (in Chinese)
- [5] Pomth J, Janson J C, Lääs T. Agar derivatives for chromatography, electrophoresis and gel-bound enzymes. 1. Desulfated and reduced crosslinked agar and agarose in spherical bead form[J]. *Journal of Chromatography*, 1971, 60: 167-177.
- [6] GB/T 8330-87, 离子交换树脂湿真密度测定方法[S].
- [7] GB/T 5757-86, 离子交换树脂含水量测定方法[S].
- [8] GB/T 8144-87, 阳离子交换树脂交换容量测定方法[S].
- [9] Griffith C M, Morris J, Robichaud M, et al. Fluidization characteristics of and protein adsorption on fluoride-modified porous zirconium oxide particles [J]. *Journal of Chromatography A*, 1997, 776: 179-195.
- [10] Ruckenstein E, Zeng X. Macroporous chitin affinity membranes for lysozyme separation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997, 56: 610-617.

(责任编辑:李春丽)



条带: 1, 样品; 2, 穿透 (pH6); 3, 洗脱 1 (pH6); 4, 洗脱 2 (pH7.5); 5, 穿透 (pH7.5); 6, 洗脱 2 (pH7.5); 7, 溶菌酶; 8, 标准蛋白质

图 6 离子交换层析后各峰的 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the peaks from ion exchange chromatography

3 结 语

作者从理化性能、交换容量、吸附性能和实际应用等方面对国产离子交换介质-争光快流速 CM-琼脂糖弱酸性阳离子交换剂进行了综合评测。结果发现,争光介质的理化性能符合层析介质的要求,离子交换容量和静态吸附容量高于 CM Sepharose FF,且动态吸附效率较高,能够适用于一般操作流速下的离子交换层析。通过蛋清中溶菌酶的分应用实例,发现争光弱阳离子介质能够成功产物,且纯度高于 95%,产量达到了 4.1 mg/mL 鸡蛋清。可以认为,国产争光介质在质量上可靠且高效,完全能够代替进口商品介质用于蛋白质的层析分离。