

用膨胀床金属亲和层析从淡菜匀浆液中分离纯化纤维素酶

谭天伟 邓 利 许伟坚 张淑荣

(北京化工大学生物化工系 北京 100029)

摘 要 研究了一种新的膨胀床金属亲和层析技术,即将金属亲和层析结合膨胀床层析,直接从淡菜(*Blue mussel*)匀浆液中纯化纤维素酶。研究了金属亲和配基种类、pH、离子强度及流速对酶吸附和解吸的影响,确定了酶洗脱条件和介质再生条件。一步可纯化纤维素酶 19.4 倍,酶收率达 82%。本方法不需要预先去除细胞碎片,而且处理速率比传统层析技术高 3~4 倍。

关键词 金属亲和层析,膨胀床,纤维素酶,淡菜
学科分类号 Q 503

在众多亲和层析中,染料亲和层析^[1]和金属亲和层析(Immobilized metal affinity chromatography, IMAC)是两种价格低廉而且配基稳定的亲和分离技术。金属亲和层析利用金属离子 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} 等和蛋白质表面的组氨酸和丝氨酸之间的亲和性来分离纯化蛋白质^[2]。和传统的亲和层析相比,具有以下优点:(1)配基稳定性高,不易脱落;(2)金属离子配基价格低廉,再生成本低;(3)可在高盐浓度下操作,从而省去了脱盐的预处理步骤,而且可以减少非特异性吸附;(4)蛋白质洗脱比较容易,采用较低 pH 或采用竞争性物质如咪唑或 EDTA 便可将吸附蛋白解吸下来。由于 IMAC 的这些优点,已广泛用于酶和干扰素的分离纯化中,如 Heine 采用 IMAC 从细胞破碎的上清液中分离纯化人干扰素,一步纯化便可达到 $1.7 \times 10^9 \text{u/mg}$,而收率高达 91.4%^[3]。鉴于 IMAC 具有稳定性好和价格低廉等特点,因而有可能用于膨胀床亲和层析,膨胀床层析(Expanded bed chromatography)是 90 年代初出现的一种将固体颗粒去除和目标蛋白纯化合并在一一步的层析技术^[4]。本文研究将金属亲和层析用于膨胀床,直接从高盐浓度淡菜匀浆液中分离纯化纤维素酶。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

淡菜(*Mytilus esulis*)从瑞典市场购买,咪唑(Imidazole)和羧甲基纤维素(CMC)为 SIGMA 产品,金属亲和层析介质 STREAMLINE 是 Pharmacia 专门为膨胀床生产的一种高度交联 Sepharose,其和螯合剂亚氨基二醋酸(IDA)的交联采用文献介绍的方法进行^[5],蛋白分析母液及标准蛋白 IgG 为 Bio-Rad 公司产品。其它化学试剂为化学纯。

1.2 淡菜匀浆液的制备

收稿日期:1997-06-04,修回日期:1998-04-16。

将带壳淡菜与1倍体积(W/V)的自来水混合,用粉碎机粉碎后,用连续倾析机(转速1000r/min)离心除去未粉碎的壳及较大的固体颗粒($>50\mu\text{m}$),得到淡菜匀浆液。

1.3 酶活、蛋白质及固体颗粒含量分析方法

纤维素酶活力分析根据文献[6],以CMC为底物,用二硝基水杨酸显色法测定降解CMC产生的还原糖的量,但由于匀浆液中含有还原糖,对分析产生干扰,用Sephadex G-25柱脱除还原糖后,测定酶活。

蛋白质含量分析采用Bradford法^[7],以IgG为标准蛋白。

匀浆液中固体颗粒含量采用浊度法(600 nm)分析,以无离子水为空白。

1.4 酶和蛋白质吸附容量的测定

为选择金属亲和配基及pH值,操作过程如下:

取0.4g固定 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} 的湿胶,加在15 ml试管中,用8~10 ml 25 mmol/L磷酸钠缓冲液(预先调好pH及NaCl浓度)平衡后,加入10 ml匀浆液的上清液(17 000r/m离心10min)。在摇床上振荡30min,测定上清液中剩余的酶活力及蛋白质含量,根据物料衡算算出酶和蛋白质的吸附容量。固定床中酶和蛋白质动态容量的测定如下:取1.40 g固定有 Zn^{2+} 的STREAMLINE介质,装入 $\phi 1.0\text{cm} \times 2.5\text{cm}$ 的柱子中,在FPLC系统(Pharmacia Biotech)中,用0.6 mol/L NaCl 25 mmol/L磷酸钠缓冲液(pH7.50)平衡后,上样10ml匀浆液上清液,流速0.7~2 ml/min,收集流出液,分析酶活及蛋白质含量,根据物料衡算算出酶和蛋白质的动态吸附容量。膨胀床中酶和蛋白质的动态吸附容量测定如下:取10.0g固定有 Zn^{2+} 的STREAMLINE介质,装入 $\phi 1.2\text{cm} \times 50\text{cm}$ 柱子中,用0.6mol/L NaCl 25mmol/L磷酸钠缓冲液(pH7.50)平衡,流速为1.88~4.2 ml/min,流向自下而上,待床层膨胀稳定后,上样120ml匀浆液收集流出组分,分析酶活及蛋白质含量,根据物料衡算算出酶和蛋白质的动态吸附容量。

1.5 膨胀床亲和层析实验

取50g湿的已固定有 Zn^{2+} 的STREAMLINE装入 $\phi 2.5\text{cm} \times 100\text{cm}$ 层析柱中。用0.5 mol/L NaCl 25 mmol/L磷酸钠缓冲液(pH7.50)在流速18 ml/L(225 cm/h)时,由下至上进行床层膨胀,待床层膨胀稳定后(床层高度约30 cm),上样280 ml,流速225 cm/h。上样结束后,用平衡缓冲液以225 cm/h流速冲洗,当记录到达基线时,停止进料,待床层恢复静止状态(15cm)时,调整流向,用50mmol/L咪唑由上而下洗脱,收集蛋白质峰,并分析酶活。

1.6 层析柱的再生

洗脱完毕后,用25mmol/L EDTA洗下金属离子,用0.5 mol/L NaOH洗脱,待记录走到基线时,用1倍体积0.5 mol/L HCl清洗,用无离子水冲洗,当流出液pH到5.0~6.0时,用2倍床层体积0.2mol/L ZnSO_4 过柱,便可再生STREAMLINE介质。

2 结果与讨论

2.1 金属配基种类,pH及离子强度的选择

金属亲和层析可选择的金属配基有多种如 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} 和 Fe^{2+} 等,但常用的配基是 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} ,这2种金属配基对纤维素酶的吸附容量影响如表1。

由表 1 可知,纤维素酶在 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 二种配基上的吸附容量相差不大,但 Cu^{2+} 吸附的蛋白质较多。pH 为 7.5 时,杂蛋白的吸附较少,从分离纯化上来看,选用 Zn^{2+} , pH 为 7.50。

我们通过在匀浆液中加入 NaCl,配成不同离子强度样品,其吸附结果如表 2。

表 1 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对纤维素酶吸附容量的影响

Table 1 Effect of Cu^{2+} and Zn^{2+} on adsorption of cellulase

Metal ligand	Cu^{2+}				Zn^{2+}				
	pH	6.5	7.0	7.5	8.0	6.5	7.0	7.5	8.0
Cellulase bound/ $\text{u}\cdot\text{g}^{-1}$	10.3	8.3	8.0	7.8	9.5	9.2	8.7	8.0	
Protein bound/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	30.5	24.6	15.6	12.0	29.0	24.9	12.7	10.8	

* NaCl 0.8 mol/L

表 2 盐浓度对纤维素酶和蛋白质吸附容量的影响

Table 2 Effect of ionic strength on adsorption of cellulase and protein

NaCl/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.45	0.6	0.8	1.0
Cellulase bound/ $\text{u}\cdot\text{g}^{-1}$	12.0	8.6	8.0	5.5
Protein bound/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	36.0	18.0	13.2	14.0

* pH7.50

离子强度低时,杂蛋白的吸附量很多(表 2),当离子强度增加时,蛋白吸附量减少,而纤维素酶吸附量也有所降低,离子浓度太高时(1mol/L),蛋白质吸附量没有降低,这可能是盐浓度太高时,疏水作用在蛋白质吸附上起较大作用。综合考虑酶的分选纯化与吸附容量,选用 0.6~0.8 mol/L NaCl。

2.2 膨胀床的膨胀特性

流速太低时(<50 cm/h),床层膨胀小,样品中固体颗粒难于通过介质之间的空隙,从而堵塞柱子^[4]。但太高时,如流速达 300 cm/h 时,膨胀床已开始转向流化床,即轴向混合加大,这对蛋白质的吸附是不利的,膨胀床层析操作应该避免这种现象。这一点许多文献都提到^[4,7]。因而匀浆液的进料流速选择应是保持床层膨胀而液体流动为平推流,同时又可使颗粒易于通过床层不发生堵塞,300ml 的匀浆液通过膨胀床的穿流曲线如图 1。在 225cm/h 下,匀浆液中的固体颗粒很快通过膨胀床,纤维素酶基本被吸附,有少部分约 20%左右通过柱子,杂蛋白质的穿流特性和固体颗粒相似,绝大多数杂蛋白通过柱子流出。

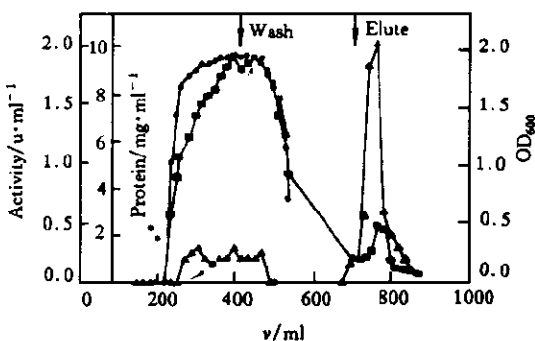


图 1 匀浆液通过膨胀床的穿流曲线

Fig. 1 Through curve in expanded bed

在前面提到的酶吸附容量是在一定的 pH 及离子强度下,用上清液测定的静态最大吸附容量,但实际膨胀床中,酶的动态吸附容量与用上清液测定的静态吸附容量差距较大。流速对酶和蛋白质在膨胀床中的动态吸附容量的影响如表 3。由表 3 可知,当流速达到 100cm/h 时,床层膨胀比可达到 1.5,匀浆液中固体颗粒不会堵塞柱子。而且膨胀床的动态吸附容量与流速变化关系不大,当流速增加 1 倍时,纤维素酶和蛋白质的动态吸附容量并

没有降低太多,这一点与固定床不同(表 4)。

表 3 流速对膨胀床中酶吸附容量的影响

Table 3 Effect of flowrate on cellulase adsorption in expended bed

Flow rate/cm·h ⁻¹	100	160	225
Expended ratio (H/Ho)	1.50	2.29	2.56
Cellulase bound/u·g ⁻¹	5.4	4.9	5.1
Protein bound/mg·g ⁻¹	9.0	7.3	8.0
Removal of debris/%	100	100	100

表 4 流速对固定床中纤维素酶吸附容量的影响

Table 4 Effect of flow rate on cellulase adsorption in fixed bed

Flow rate/cm·h ⁻¹	54	107	153
Cellulase bound/u·g ⁻¹	8.3	6.8	6.1
Protein bound/mg·g ⁻¹	15.6	12.2	11.2

对于固定床吸附,酶与蛋白质的动态吸附容量与流速关系较大,流速过快时,床层有压缩,不利于吸附,因此固定床吸附一般流速在 50 cm/h 以下。

对于膨胀床而言,流速增加,床层高度由于膨胀也增加,如流速由 100cm/h 增加到 225cm/h 时,床层膨胀高度分别为 25.3 cm 和 36 cm,平均停留时间为 15.1 min 和 9.6 min,即停留时间只降低了 56%,而且膨胀床中传质阻力小,因而吸附容量降低不是很多,对于膨胀床,匀浆液进料速度可达 225 cm/h~250 cm/h,即处理速度比固定床大 3~4 倍,可以大大地缩短处理时间,这对工业化应用来说是非常有利的。

膨胀床在相同流速下,动态吸附容量比固定床低(表 3 和表 4)。由于固定床数据是用上清液(17 000r/min,离心 10min)测得的,这说明匀浆液中固体颗粒的存在会阻碍蛋白质和酶的吸附,而且膨胀床本身有一定的轴向返混,使膨胀床动态吸附容量降低。

2.3 洗脱方式和介质再生

在金属亲和层析中,吸附在介质上的蛋白可以通过降低 pH 或采用对金属离子有竞争性的螯合剂如咪唑或 EDTA 等。对于纤维素酶,由于其对 pH 较为敏感,我们采用咪唑和 EDTA 洗脱吸附的酶,EDTA 对金属离子螯合性很强,只需 20 mmol/L EDTA 便

可将所有金属离子及吸附的蛋白全部解吸下来,这样对纤维素酶纯化不利,我们采用对金属离子螯合性较弱的咪唑洗脱蛋白,不同浓度咪唑对纤维素酶解吸的影响如表 5。由表 5 可知,当咪唑浓度增加时,洗脱酶回收率和比活增加,而且洗脱体积也低,这有利于纯化,但咪唑浓度达 65mmol/L 以上时,酶洗脱率反而下降,由此说明咪唑过高对酶有抑制作用。因此在纤维素酶洗脱时,咪唑浓度选为 50mmol/L。整个分离纯化结果如表 6。

表 5 咪唑浓度对纤维素酶洗脱的影响

Table 5 Effect of imidazole concentration on elution of cellulase

Imidazole/mmol·L ⁻¹	25	35	50	65
Elution volume/ml	180	150	135	90
Cellulase eluted/%	55	76	91	87
Specific activity/u·mg ⁻¹	0.65	0.68	0.78	0.80

Sample:280 ml, elution flow rate 22.5 cm/h

表 6 膨胀床分离纯化结果

Table 6 Purification of cellulase in expended bed

Step	Volume/ml	Activity/u	Recovery/%	Specific activity/u·mg ⁻¹	Purification factor
Sample	280	170	100	0.041	1.0
Elution	135	139	82	0.780	19.4

由表 6 可知,采用膨胀床亲和层析,不用离心或过滤除去细胞碎片,一步可将纤维素酶分离纯化 19.4 倍,收率 82%,从而大大地简化了分离纯化过程。

3 结 论

将金属亲和层析和膨胀床层析结合组成的膨胀床金属亲和层析是一种高效的蛋白质纯化方法。和传统的金属亲和层析相比,处理速度可提高 3~4 倍,而且不用预先除去细胞碎片或微生物细胞。膨胀床金属亲和层析比一般的离子交换膨胀床纯化倍数高,金属配基便宜,易于再生。当用于纤维素酶分离纯化时,一步可纯化酶 19.4 倍,收率达 82%。

参 考 文 献

- 1 McCreath G E, Chase H A, Uwen R O. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, **48**:341~354
- 2 Porath J. *Protein Expression and Purification*, 1992, **3**:263~281
- 3 Heine J W, Ley M D, Damme J V *et al.* *Ann N Y Acad Sci*, 1980, **350**:364~373
- 4 Chase H A. *Draeger N M. J Chromatography*, 1992, **597**:129~145
- 5 Wood W A, Kellogg S T. In: Abelson J N, Simon M II Eds. *Methods in Enzyme*, 1974, **160**:pp. 101~102
- 6 Miller G L. *Anal Chem*, 1959, **31**:426~428
- 7 Bradford M. *Anal Biochemistry*, 1997, **72**:248~255

Purification of Cellulase from Blue Mussel Homogenate with Expanded Bed Metal Affinity Chromatography

Tan Tianwei Deng Li Xu Weijian Zhang Shurong

(*Department of Biochemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029*)

Abstract A new integrated bioseparation technique for protein purification, expanded bed metal affinity chromatography, was studied. This method was used to purify cellulase directly from homogenate of blue mussel. The optimal metal ligand, pH and ionic strength were determined. The cellulase was purified 19.4 times with a recovery of 82%. The new technique has high treatment capacity compared with conventional chromatography and especially saves the step for removal of cell debris.

Key words Metal affinity chromatography, expanded bed, cellulase, blue mussel