

固定化金属螯合亲和膜色谱柱制备及 纯化铜锌超氧化物歧化酶的研究

魏 琪¹, 姚汝华¹, 鲍时翔²

(1. 华南理工大学生物工程系, 广东 广州 510641; 2. 中国热带农科院生物技术国家重点实验室, 海南 海口 571101)

摘要:以大孔纤维素滤纸为基质,通过碱处理、环氧活化、偶联亚氨基二乙酸二钠、固定化 Cu^{2+} ,装柱后制得固定化金属螯合亲和膜色谱柱。对 Cu/Zn -SOD 粗品进行了纯化研究,将其比活从 645 U/mL 提高到 6 882 U/mL,纯化倍数为 10.7,蛋白回收率为 92.3%,活性回收率达 985%。设计了一种解决金属离子泄露问题的方案,将 Cu^{2+} 泄露量降至 86 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

关键词:亲和色谱,亲和膜,固定化金属螯合亲和色谱,超氧化物歧化酶

中图分类号:O657.7 Q55 文献标识码:A 文章编号:1000-871X(2000)04-0361-03

1 前言

固定化金属螯合亲和色谱是一种有效的蛋白质分离纯化方法,其原理是通过 Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} 等过渡金属离子与蛋白质表面的组氨酸、色氨酸或半胱氨酸配位结合,利用蛋白质表面这些氨基酸的种类、数量、位置和空间构象的不同所导致的与金属螯合物的亲和力大小的不同,选择性地对蛋白质加以分离纯化^[1,2]。固定化金属螯合亲和色谱常以凝胶为载体,由于凝胶颗粒极易压缩,蛋白质在凝胶颗粒内扩散传质慢,所以分离操作只能在低流速下进行^[3]。近年来,人们结合亲和色谱特异性高和膜分离速度快、处理量大的优点,提出以膜作为亲和配基载体制备亲和膜用于蛋白质分离纯化^[4]。Krause 等人^[5]对染料亲和膜分离苹果酸脱氢酶进行了研究,鲍时翔等人^[6]采用 Protein A 中空纤维膜成功地从人血清中分离出 γ -免疫球蛋白。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)广泛存在于生物界,是生物体防御氧化损伤的一种十分重要的酶,其中 Cu/Zn -SOD 已广泛应用于医药、食品和化妆品等领域^[7,8]。国内外已有采用固定化金属螯合亲和色谱柱纯化 SOD 的报道^[9]。本文以纤维素滤纸为材料,对固定化金属螯合亲和膜的制备及在 Cu/Zn -SOD 分离纯化上的应用进行了研究。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

BioCAD 色谱工作站购自美国 PE 公司,膜色谱

柱由中科院大连化物所惠赠,纤维素分析滤纸购自杭州新华造纸厂,超氧化物歧化酶购自鞍山康美生物制品厂,其它试剂均为国产分析纯化学试剂。

2.2 实验方法

2.2.1 亲和膜色谱柱的制备 固定化金属螯合亲和膜的制备方法参见文献^[10]。将 30 张纤维素分析滤纸放入 5 mol/L 氢氧化钠溶液中,经碱处理 30 min 后,再加入 90 mL 5 mol/L 氢氧化钠-二甲亚砜-环氧氯丙烷的混合液(体积比为 2:4:5),于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下活化 4 h,放入 100 mL 1.5 mol/L 碳酸钠和 1 g 亚氨基二乙酸二钠,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下偶联反应 12 h,然后浸入 50 mmol/L 硫酸铜溶液 1 h,即制得固定化金属螯合亲和膜,所得亲和膜厚 0.3 mm。将其剪成直径为 47 mm 的圆片并装入相同内径的柱管即制得膜色谱柱。膜柱结构参看文献^[11,12]。环氧基密度测定用硫代硫酸钠法,配基密度测定用凯氏定氮法, Cu^{2+} -EDTA 浓度测定用可见光吸收法(检测波长为 800 nm),蛋白质浓度测定用紫外光吸收法(检测波长为 280 nm)。

2.2.2 SOD 纯化 分别将 1 张,5 张,30 张亲和膜装柱,连入 BioCAD 色谱工作站。先用 pH 7.7 的 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液洗柱,再用 pH 4.0 的 0.20 mol/L 柠檬酸盐缓冲液-1 mol/L 氯化钠彻底洗去未结合的 Cu^{2+} ,最后用 pH 7.7 的 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液平衡膜柱。亲和膜纯化 SOD 的操作过程按平衡、上样、淋洗、洗脱和再生 5 个步骤进行。上样溶液采用 pH 7.7 的 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液配制。平衡、淋洗、再生液为 pH 7.7 的 0.025

收稿日期:1999-07-21,修回日期:1999-11-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(29606004)

作者简介:魏 琪(1973-)男,硕士,电话:(020)87113842,E-mail:huangbao@public.hk.hi.cn。

mol/L 磷酸盐缓冲液;洗脱液为 pH 5.0 的 0.20 mol/L 柠檬酸盐缓冲液-1 mol/L 氯化钠。实验均在室温下进行,流速为 1 mL/min。

3 结果与讨论

3.1 亲和膜色谱柱的制备

碱处理可除去滤纸中的杂质,释放并激活纤维素中的羟基,环氧氯丙烷活化纤维素物质,引入三碳链间隔臂及活性环氧基,同时在糖链间产生化学交联,大大强化了其松散的网状结构。按上述方法制备的亲膜表面环氧基密度可达 $8.33 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ 。

3.2 SOD 纯化

分别用 1 张、5 张、30 张的亲膜柱纯化 Cu/Zn-SOD,对应上样量分别为 1 mL、5 mL 和 30 mL。上样溶液中 SOD 质量浓度为 10 g/L,比活为 645 U/mL。实验结果见图 1。纯化后 SOD 的总蛋白、比活等见表 1。

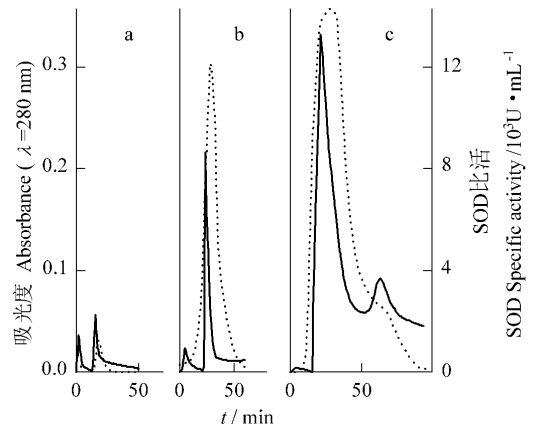


图 1 金属螯合亲和膜色谱柱纯化 Cu/Zn-SOD

Fig.1 Purification of Cu/Zn-SOD with immobilized metal-chelated affinity membranes

—: A_{280} ; ...: SOD 活性(SOD activity)

a.1 张膜(one sheet of membrane); b.5 张膜(five sheets of membrane); c.30 张膜(thirty sheets of membrane)

表 1 固定化金属螯合亲和膜色谱柱纯化铜锌 SOD

Table 1 Purification of Cu/Zn-SOD with immobilized metal-chelated affinity membranes

膜数 Membrane number 张(sheet)	总蛋白 Total protein (mg)	总活性 Total activity (U)	比活 Specific activity ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	纯化倍数 Enrichment fold	蛋白回收率 Protein recovery (%)	活性回收率 Activity recovery (%)
1	6.85	37 565	5 484	8.50	68.5	582
5	43.3	265 775	6 138	9.52	86.6	824
30	277	1 906 314	6 882	10.67	92.3	985

由表 1 可见,经金属螯合亲和膜色谱柱一步纯化 Cu/Zn-SOD 后,SOD 比活有很大提高,SOD 蛋白回收率可达 92.3%,且随着膜数的增加,SOD 蛋白回收率、活性回收率等指标均有较大幅度的提高。这是因为对亲和膜而言,膜基质厚度较小,吸附高浓度样品时,膜的吸附量尚未饱和时就有部分产物未被吸附而透过。膜越薄,轴向扩散的影响越显著(峰宽较大,峰高较低),所以一张膜的纯化效果较差,膜柱的死体积也相对较大;采用多张亲和膜,可降低轴向扩散及死体积的影响,有利于提高流速,增加样品负荷容量。实验结果表明,应用制备的固定化金属螯合亲和膜可有效纯化 Cu/Zn-SOD。

SOD 活性回收率大于 100%,可能是在纯化过程中 SOD 活性有所恢复。SOD 的活性中心是一个椭圆形的“口袋”, Cu^{2+} 与 4 个组氨酸残基咪唑环上的氮原子构成配位结构, Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 之间共同连接组氨酸 His61,形成“咪唑桥”结构。金属辅酶

Cu^{2+} 对 Cu/Zn-SOD 的催化活性影响很大,没有一种金属离子能取代 Cu^{2+} 而起恢复酶活性的作用^[7]。在生产、储藏或运输过程中,氧化剂、变性剂、极端温度或 pH 等都可能使酶蛋白分子结构和金属辅酶及其配位结构受到破坏,从而导致酶可逆或非可逆失活。SOD 经过 Cu^{2+} 螯合亲和膜色谱柱时,柱上的 Cu^{2+} 可能与其活性中心发生了作用,导致酶活性中心构象发生变化,从而使酶活性得到恢复。

3.3 金属离子泄露问题

用固定化金属螯合亲和膜分离纯化 SOD 时,洗脱过程中少量 Cu^{2+} 会随 SOD 一起被洗脱下来,造成目标产物的污染。为此,实验前需先用平衡缓冲液及 pH 4.0 的 0.20 mol/L 柠檬酸盐缓冲液-1 mol/L 氯化钠彻底洗去亲和膜上未结合的 Cu^{2+} 。另外,在膜柱底部放入一张未固定化 Cu^{2+} 的膜以接收可能被洗脱下来的 Cu^{2+} ,可将 Cu^{2+} 的泄露量从 32 mg/L 降至 86 $\mu\text{g}/\text{L}$;同样条件下用购自瑞典

Pharmacia 公司的固定化金属螯合亲和色谱介质(琼脂糖凝胶)洗脱时, Cu^{2+} 泄露量为 0.6 mg/L。

4 结语

以大孔纤维素滤纸为基质, 通过碱处理、环氧活化、偶联亚氨基二乙酸二钠、固定化 Cu^{2+} 后, 可制得性能优良的固定化金属螯合亲和膜, 并可用于 Cu/Zn-SOD 的分离纯化。

参 考 文 献

- 1 Poroth J, Carlsson I, Belfrage G. *Nature*, 1975, 258 (5536) 598-599
- 2 Yip T T, Hutchens T W. *Molecular Biotechnology*, 1994, 1:151-164
- 3 Arnold F H. *Bio/Technology*, 1991, 9:151-158
- 4 SHANG Zhen-hua, ZHOU Liang-mo(商振华, 周良模). *Progress in Chemistry(化学进展)*, 1995, 7(1):47-59
- 5 Krause S, Kroner K H, Decker W D. *Biotechnology Techniques*, 1991, 5(3):199-203

- 6 BAO Shi-xiang, SHI Guo-jun, JIANG Wei, et al(鲍时翔, 石国君, 姜 炜, 等). *Journal of Chemical Industry and Engineering(China)(化工学报)*, 1995, 46(1):15-21
- 7 Mccord J, Fridovich I. *J Biol Chem*, 1969, 244:6 049-6 057
- 8 ZHOU Chao, LÜ xing, CHEN Ji-zhong, et al(周 潮, 吕 星, 陈吉中, 等). *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics(中国生化药物杂志)*, 1993, 64(2):29-33
- 9 LÜ xing, CHEN Ji-zhong, LI Pei-feng, et al(吕 星, 陈吉中, 李培峰, 等). *Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展)*, 1994, 21(3):259-262
- 10 Naoji K, Yasuhiro N, Yukari E. *J Applied Polymer Science*, 1996, 62:1153-1160
- 11 GUO Wei, SHANG Zhen-hua, YU Yi-nian, et al(郭 为, 商振华, 于亿年, 等). *Chinese Journal of Chromatography(色谱)*, 1996, 14(3):168-171
- 12 JIA Ling-yun, YANG Li, ZOU Han-fa(贾凌云, 杨 利, 邹汉法). *Chinese Journal of Chromatography(色谱)*, 1998, 16(6):477-479

Preparation of Immobilized Metal-Chelated Affinity Membrane and Its Application to Purification of Cu/Zn-Superoxide Dismutase

WEI Qi¹, YAO Ru-hua¹, BAO Shi-xiang²

(1. Department of Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China;
2. Biotechnology National Key Laboratory, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Immobilized metal-chelated affinity membranes were prepared using macropore cellulose filter paper as matrix. The matrix was treated with alkaline, activated with epichlorohydrin and coupled with iminodiacetate sodium, and then Cu^{2+} was immobilized. Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) was purified with prepared affinity membranes. The special activity of the purified Cu/Zn-SOD was increased 10.7 times from 645 U/mL to 6 882 U/mL. The protein recovery and the activity recovery were 92.3% and 985%, respectively. A new method to prevent the leaking of metal ion was developed and Cu^{2+} concentration in the effluent was lowered to 86 $\mu\text{g/L}$.

Key words: affinity chromatography; affinity membrane; immobilized metal-chelated affinity chromatography; superoxide dismutase