

多壁碳纳米管固相萃取-在线提取 蛋清中的溶菌酶

杜卓, 张娜, 王建华

(东北大学分析科学研究中心, 沈阳 110004)

摘要 建立了以羧基功能化的多壁碳纳米管作为吸附剂在线提取蛋清中溶菌酶的新方法. 将多壁碳纳米管经氧化和提纯后装入固相萃取柱, 在顺序注射系统中实现对蛋清中溶菌酶的在线选择性萃取, 以碳酸盐缓冲溶液定量洗脱, 进样量为 2 mL 时, 富集倍率为 12, 吸附率和洗脱率均为 100%, 采样速率为 10 h⁻¹, 精密度为 3.0%. 实验结果表明, 该方法所用试剂量少, 提取速度快, 每 100 mL 蛋清可提取溶菌酶 0.4 g, 且溶菌酶纯度较高.

关键词 碳纳米管; 固相萃取; 溶菌酶; 蛋清

中图分类号 O657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)05-0902-04

溶菌酶是一种无毒、无副作用的蛋白质, 广泛存在于蛋清、泪液、鱼血清及昆虫唾液中, 其中蛋清中的含量最为丰富^[1]. 在蛋清中, 蛋白质的含量为 11% ~ 13%, 主要包括卵白蛋白(Ovalbumin)、伴白蛋白(Conalbumin)、卵粘蛋白(Ovomucin)和溶菌酶(Lysozyme), 其中溶菌酶占蛋清中蛋白质总量的 3.5% ~ 4.0%^[2]. 目前, 用于溶菌酶分离纯化的方法主要有结晶法^[3]、沉淀法^[4]、色谱法^[5]、电泳法^[6]和固相萃取法^[7]. 结晶法和沉淀法操作简单, 主要应用于卵清溶菌酶的工业生产, 虽成本较低, 但生产周期较长, 产品纯度低, 且蛋白质易变性. 液相色谱法和电泳法精密度高且分离度好, 但耗时且需要大量有机溶剂. 固相萃取的回收率高, 有机溶剂消耗少, 富集倍率高, 操作简单且易于自动化, 是最常用的蛋白质分离和预浓集方法. 由于蛋清中溶菌酶含量较低, 固相萃取法的高富集效率用于提取蛋清溶菌酶具有较大优越性. 在固相萃取中, 填料对提高萃取效率具有重要作用, 因此, 吸附剂的选择是萃取目标物质的关键^[8]. 碳纳米管是近年来颇受关注的一种新兴功能材料. 纳米级的尺寸使其具有很大的比表面积, 从而表现出较强的吸附能力和较大的吸附容量^[9,10]. 目前, 以碳纳米管为吸附剂进行固相萃取分离富集主要集中在有机化合物^[11]和金属离子^[12]的研究上. 最近利用碳纳米管吸附生物大分子的研究也取得了一定的进展^[13], 我们前期的研究结果^[14]表明, 羧基化的碳纳米管可用于分离碱性蛋白质, 从而有可能将这种新型、高效的吸附剂应用于提取生物样品中的生物大分子. 另外, 碳纳米管还具有良好的生物相容性^[15], 具有保留被吸附的生物大分子活性的能力, 因此以其作为固相萃取生物大分子的吸附剂有着广泛的应用前景. 本文系统地研究了羧基功能化的多壁碳纳米管萃取溶菌酶的条件, 其中包括 pH 值、离子强度、洗脱液及流速等对吸附性能的影响. 在此基础上, 探讨了碳纳米管对溶菌酶的吸附机理, 并对从蛋清中提取出来的溶菌酶的纯度进行了电泳检验.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

多壁碳纳米管(直径 40 ~ 60 nm, 深圳纳米技术进出口有限公司); 溶菌酶(优级纯, Solarbio 公司); 碳酸钠及碳酸氢钠(分析纯, 上海虹光化工厂); 磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、氯化钠、乙醇、丙酮酰胺、考马斯亮蓝、三羟甲基氨基甲烷(Tris)及甘氨酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 硝酸

收稿日期: 2007-10-30.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20635010, 20725517)资助.

联系人简介: 王建华, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事流动分析及样品预处理研究. E-mail: jianhua@mail.neu.edu.cn

(优级纯, 沈阳经济技术开发区试剂厂); 盐酸(分析纯, 沈阳新化试剂厂); 琼脂糖(Solarbio 公司); 十二烷基磺酸钠(SDS)及过硫酸铵(天津博迪化工有限公司); 甲醇(分析纯, 天津博迪化工有限公司); 蛋白质分子量标准(Marker, 宝生物工程大连有限公司)等. 实验用水均为电阻率 18 M Ω /cm 的二次去离子水.

T6 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); FIAlab-3000 顺序注射系统(美国 FIAlab 公司); 868 型 pH 计(美国热电奥立龙公司); 垂直板电泳槽(DYC^Z-28A, 北京市六一仪器厂); 稳流稳压电泳仪(DYY-III2); 固相萃取柱(自制, 长 10 mm, 内径 2 mm).

1.2 实验过程

将 0.5 g 碳纳米管浸泡在 10 mL 乙醇中, 封闭容器口并在超声波清洗器中超声 15 min, 以润湿碳纳米管并使其均匀分散. 用耐酸过滤漏斗收集碳纳米管并用去离子水冲洗, 然后在浓硝酸中浸泡 6 h, 氧化碳纳米管中的石墨纳米颗粒和无定形碳, 同时形成开口的、链端带羧基的碳纳米管. 过滤并用大量去离子水冲洗至中性, 使碳纳米管端的羧基和羟基充分电离, 得到表面带负电荷的碳纳米管. 然后用质量分数为 1% 的盐酸洗去粘附在碳纳米管表面的金属催化剂, 再用去离子水洗至中性. 最后浸泡在磷酸盐缓冲溶液(pH = 6.0, 0.1 mol/L)中平衡.

用注射器将上述碳纳米管注入一端用玻璃棉堵住的填充柱内, 用玻璃棉堵住另一端, 然后联入流路中. 在进行固相萃取前, 将碳纳米管微柱用足量的去离子水充分冲洗.

顺序注射固相萃取的实验流路(图 1)由 2.5 mL 注射泵、六位阀、固相萃取柱和三通阀组成, 用紫外-可见分光光度计在 280 nm 处在线检测溶菌酶的浓度. 整个实验操作过程分 3 个步骤. (1) 富集: 从 2 号阀位吸入 2 mL 样品溶液, 流经 5 号阀位的碳纳米管进行微柱富集; (2) 预清洗: 从 3 号阀位吸入 2 mL 去离子水清洗黏附在碳纳米管表面的杂质; (3) 洗脱: 从 1 号阀位吸入 200 μ L 洗脱液, 洗脱吸附在碳纳米管上的溶菌酶(去离子水作载流).

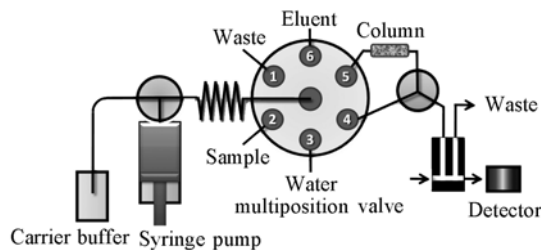


Fig. 1 Flow manifold of the sequential injection system incorporating a micro-column packed with multi-walled carbon nanotubes for solid phase extraction of lysozyme

2 结果与讨论

2.1 萃取条件的选择

蛋清的主要成分是白蛋白和溶菌酶, 为了考察碳纳米管对溶菌酶的吸附选择性, 本实验分别研究了酸性模型蛋白牛血清白蛋白(BSA)和溶菌酶在碳纳米管微柱上的吸附情况.

2.1.1 洗脱液及其 pH 值的选择 分别用氯化钠、磷酸盐缓冲溶液及碳酸盐缓冲溶液洗脱吸附在碳纳米管上的溶菌酶, 结果表明, 由于 NaHCO₃-Na₂CO₃ 缓冲液使碳纳米管表面负电荷密度增加, 洗脱效果较好, 且得到很规则的峰形. 由图 2 可见, 洗脱率随着溶液 pH 值的增加而提高, 说明溶菌酶表面的正电荷减少, 二者之间的引力逐渐减弱, 故有利于提高洗脱率; 当洗脱液 pH 值大于溶菌酶的等电点时, 溶菌酶表面带负电荷, 与碳纳米管表面间的静电斥力增加, 导致洗脱率迅速升高, 当 pH 为 11.0 时能够实现完全洗脱.

2.1.2 富集及洗脱流速的选择 富集流速和洗脱流速不仅影响固相萃取的吸附和洗脱效率, 而且决定整个分析过程所需要的时间. 由于填充柱中碳纳米管的颗粒非常小, 容易产生流动阻力. 本文选择

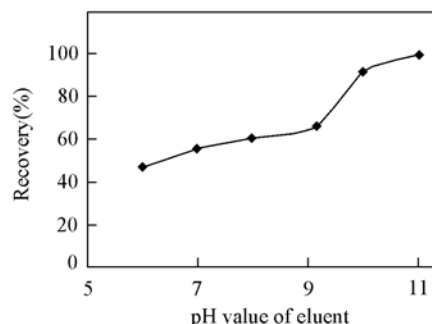


Fig. 2 Effect of pH on the elution efficiency of lysozyme Sampling volume: 2 mL; 200 μ L eluent (0.1 mol/L NaHCO₃-Na₂CO₃ buffer); 5 g/mL lysozyme in the original solution.

的填充长度为 5 mm, 当进样流速超过 30 $\mu\text{L}/\text{s}$ 时, 可观察到流动阻力, 使碳纳米管颗粒紧密堆积, 从而降低对溶菌酶的吸附能力. 在 5 ~ 30 $\mu\text{L}/\text{s}$ 流速范围内, 流速对富集效率没有影响, 说明溶菌酶吸附到碳纳米管上是一个快速的动力学过程, 在 30 $\mu\text{L}/\text{s}$ 的流速下仍能完全富集. 在相同的流速范围内发现, 洗脱流速对洗脱率基本没有影响. 综合考虑填充柱流动阻力和分析时间, 选择富集和洗脱流速均为 20 $\mu\text{L}/\text{s}$.

2.1.3 洗脱液体积的选择 将 2 mL 溶菌酶 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 过柱富集后, 分别用 50, 100, 200 及 400 μL 的碳酸盐缓冲液 ($\text{pH} = 11$) 洗脱, 结果见图 3 所示. 开始时随洗脱液体积增加, 洗脱率提高, 用 200 μL 洗脱液可实现完全洗脱, 继续增大洗脱液体积导致富集倍率减小. 综合考虑, 选择洗脱液体积为 200 μL .

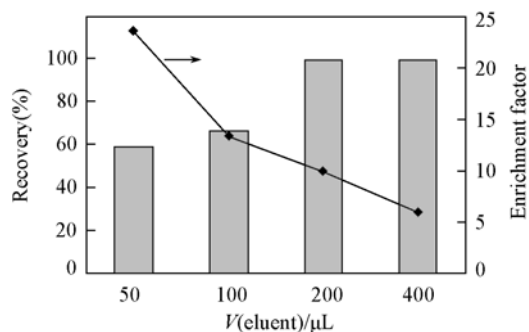


Fig. 3 Effect of eluent volume on the recovery rate and enrichment factor

Sampling volume: 2 mL (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lysozyme in the original solution); eluent: NaHCO_3 - Na_2CO_3 buffer ($\text{pH} = 11$).

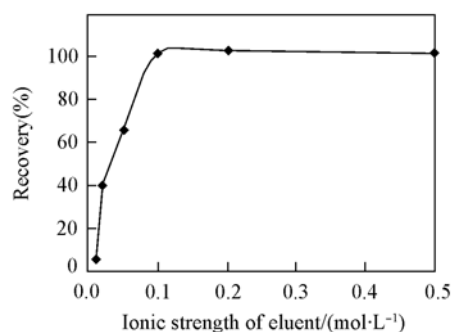


Fig. 4 Effect of ionic strength on the elution efficiency of lysozyme

Sampling volume: 2 mL; 200 μL eluent (NaHCO_3 - Na_2CO_3 buffer, $\text{pH} = 11$); 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lysozyme in the original solution.

2.1.4 洗脱液离子强度的选择 在前述实验条件下, 分别用 0.01 ~ 0.5 mol/L 碳酸盐缓冲液洗脱, 洗脱率随离子强度的变化如图 4 所示. 随着盐浓度的增加, 盐溶液对溶菌酶表面电荷的屏蔽作用增强, 使其与碳纳米管之间的静电引力减弱, 故洗脱效率增加. 本实验基于在流动体系中在线检测溶菌酶浓度, 当盐浓度大于 0.1 mol/L 时, 洗脱液和载流 (水) 的折射指数差异导致洗脱峰形不规则. 另一方面, 蛋白质保存在低盐溶液中会减少其对后续研究的影响, 所以选择缓冲溶液的浓度为 0.1 mol/L.

2.2 萃取机理

蛋白质吸附到固体表面的驱动力可能包括疏水作用力、静电作用力和氢键作用力, 通常疏水作用力和静电作用力起主要作用. 上述实验结果表明, 碳纳米管微填充柱对牛血清白蛋白几乎不吸附, 而对溶菌酶可以完全吸附, 这是由于碳纳米管的等电点为 3.0, 在水溶液中带负电荷, 牛血清白蛋白 (等电点为 4.7) 在水溶液中也带负电荷, 与碳纳米管之间产生静电斥力; 而溶菌酶的等电点是 10.7, 在水溶液中带正电荷, 与碳纳米管之间产生静电引力, 从而实现了碳纳米管对溶菌酶的选择性吸附. 若吸附过程由疏水作用支配, 则溶菌酶必须在高离子强度或 pH 接近其 pI 值的溶液条件下发生吸附, 这与实验结果不符. 而且, 对多壁碳纳米管的氧化预处理在其表面引入了大量羧基和羟基等亲水基团, 使其呈现亲水性, 因此, 多壁碳纳米管吸附蛋白质是基于静电相互作用.

2.3 分析性能

将 2 mL 溶菌酶 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 溶液过柱富集后, 用 200 μL NaHCO_3 - Na_2CO_3 缓冲液 (0.1 mol/L, $\text{pH} = 11$) 洗脱, 在 280 nm 处检测. 实验结果表明, 本方法的保留和洗脱率均为 100%, 富集倍率为 12, 线性范围为 1.5 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 检出限为 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, RSD (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $n = 11$) 为 3.0%, LOD (3σ) 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 采样速率为 10 h^{-1} . 当流速为 14 $\mu\text{L}/\text{s}$ 时, 用 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶菌酶测得由 10 mg 碳纳米管填充的微柱穿透容量为 12.6 mg/g , 最大吸附量为 25 mg/g .

2.4 从蛋清中提取溶菌酶

将蛋清用两层纱布滤除脐带等不溶物, 为了得到均匀、低粘度的蛋清溶液, 加入 6 倍蛋清体积的磷酸盐缓冲溶液 (0.1 mol/L, $\text{pH} = 7.2$), 搅拌均匀 (转速以不产生泡沫为宜). 然后用 $\text{pH} = 2.0$ 的醋酸调至 $\text{pH} = 4.7$, 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 2 min. 冷却后, 以 10000 r/min 的速度离心 5 min, 使白蛋白沉淀.

取出上清液, 用 NaOH(0.2 mol/L) 调至 pH 5.8, 得到蛋清粗提液. 将粗提液用二次去离子水稀释 250 倍, 在最佳条件下提取, 100 mL 蛋清可提取 0.40 g 溶菌酶. 蛋清中所含蛋白质按 13% 计算, 该方法所提取的溶菌酶占蛋清中蛋白总量的 3.6%, 与理论值相符. 在稀释 250 倍的蛋清粗提液中加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶菌酶, 测得其回收率为 96.4%, 表明此方法准确可靠. 用 SDS-PAGE 凝胶电泳对所提取的样品纯度进行检测, 积层胶和分离胶的质量分数分别为 5% 和 15%, 电泳后的凝胶经考马斯亮蓝染色、脱色后的凝胶照片如图 5 所示. 可见标准溶菌酶和样品溶菌酶与蛋清中溶菌酶的出峰位置一致(14.3 kDa), 样品溶菌酶电泳分析图谱中无杂条带, 说明用此方法提取的溶菌酶的纯度与标准溶菌酶相当.

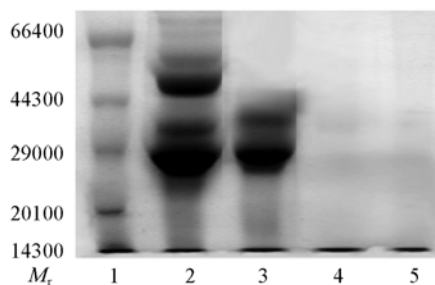


Fig. 5 SDS-PAGE of proteins from egg-white

Lane 1: molecular weight standards; lane 2: 2-fold diluted egg-white solution; lane 3: 7-fold diluted crude extractant from 2-fold diluted egg-white solution; lane 4: isolation of lysozyme from 350-fold diluted crude extractant; lane 5: pure lysozyme.

参 考 文 献

- [1] Lee Y. C., Yang D.. Anal. Biochem. [J], 2002, **310**: 223—224
- [2] Mine Y.. Trends Food Sci. Technol. [J], 1995, **6**: 225—232
- [3] Dobrev D., Baur D., Neumann R.. Appl. Phys. A [J], 2005, **80**: 451—456
- [4] Zhang C. M., Lillie R., Cotter J., *et al.*. J. Chromatogr. A [J], 2005, **1069**: 107—112
- [5] Ruckenstein E., Zeng X. F.. Biotechnol. Bioeng. [J], 1997, **56**(6): 610—617
- [6] Kvasnicka F.. Electrophoresis [J], 2003, **24**: 860—864
- [7] Rojas E. E. G., Coimbra J. S. D., Minim L. A., *et al.*. J. Chromatogr. B [J], 2006, **840**: 85—93
- [8] Zhou Q. X., Ding Y. J., Xiao J. P.. Anal. Bioanal. Chem. [J], 2006, **385**: 1520—1525
- [9] Peigney A., Laurent C., Flahaut E., *et al.*. Carbon [J], 2001, **39**: 507—514
- [10] Li Q. L., Yuan D. X., Lin Q. M.. J. Chromatogr. A [J], 2004, **1026**: 283—288
- [11] MENG Jie(孟洁), SONG Li(宋礼), MENG Jie(孟洁), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2007, **28**(3): 476—480
- [12] Li Y. H., Ding J., Luan Z. K., *et al.*. Carbon [J], 2003, **41**: 2787—2792
- [13] Li X., Xu S. Y., Pan C. S.. J. Sep. Sci. [J], 2007, **30**: 930—943
- [14] Du Z., Yu Y. L., Chen X. W., *et al.*. Chem. Eur. J. [J], 2007, **13**: 9679—9685
- [15] Mordkovich V. Z., Baxendale M., Chang R. P. H., *et al.*. Synth. Met. [J], 1997, **86**: 2049—2050

On-line Isolation of Lysozyme from Egg-white Using Multi-walled Carbon Nanotubes

DU Zhuo, ZHANG Na, WANG Jian-Hua*

(Research Center for Analytical Sciences, Northeastern University, Shenyang 110004, China)

Abstract A novel procedure for the extraction of lysozyme from egg-white using carbon nanotubes as a sorbent was developed. Carbon nanotubes after oxidation and purification were used to pack a micro-column which was incorporated into a sequential injection system for facilitating online selective sorption of lysozyme from egg-white. The retained protein was afterwards quantitatively eluted by a carbonate buffer. With a sample loading volume of 2.0 mL, an enrichment factor of 12 was obtained, along with a retention efficiency of 100% and a recovery rate of 100%. A sampling frequency of 10 h⁻¹ was achieved along with a precision of 3.0% RSD. Lysozyme of 0.4 g could be extracted from 100 mL egg-white. SDS-PAGE demonstrated that the purity of the obtained lysozyme was as high as that of pure reagent.

Keywords Carbon nanotube; Solid phase extraction; Lysozyme; Egg-white

(Ed.: A, G)