

乳腺生物反应器表达的重组人乳铁蛋白的分离纯化及生物活性鉴定

白倩^{1,2}, 张焱², 汪音爵², 罗坚², 李岩², 黄永东², 马润宇¹, 苏志国²

1 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

2 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100190

摘要: 以国产高交联度的快流速琼脂糖为基质, 合成了不同配基密度的 SP (Sulfoethyl, 磺酸基) 离子交换介质, 建立了乳腺生物反应器表达重组人乳铁蛋白 (Recombinant Human Lactoferrin, rHLF) 的纯化方法。以溶菌酶为模型蛋白考察了不同配基密度离子交换介质的静态和动态吸附行为, 结果表明介质具有良好的吸附性能。不同配基密度离子交换介质均可纯化得到 rHLF, 其中, 高配基密度 (0.24 mol/L) 的离子交换介质每毫升可以处理 50 mL rHLF 牛乳, rHLF 收率为 86.5%, 纯度为 98.5%。圆二色谱的测定结果表明纯化的 rHLF 二级结构与天然人乳铁蛋白一致。生物学功能实验结果表明, rHLF 的铁结合与释放活性与天然人乳铁蛋白相似, 浓度为 5 g/L 的 rHLF 对大肠杆菌的生长具有明显的抑制作用。

关键词: 离子交换介质, 配基密度, 重组人乳铁蛋白, 纯化, 抑菌活性

Purification and characterization of recombinant human lactoferrin expressed in a cattle mammary bioreactor

Qian Bai^{1,2}, Yan Zhang², Yinjue Wang², Jian Luo², Yan Li², Yongdong Huang², Runyu Ma¹, and Zhiguo Su²

1 College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

2 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: Novel ion exchange adsorbents were synthesized by immobilizing sulfoethyl derivative onto homemade highly cross-linked agarose beads. The effects of different ligand densities (from 0.05 to 0.24 mol/L) on static and dynamic adsorption of the adsorbents were investigated using lysozyme as a model protein. Based on these results, rHLF was purified from the transgenic milk by our SP media. 1 mL high density (0.24 mol/L) adsorbent could handle 50 mL rHLF-containing milk. The mass recovery of rHLF was 86.5% and the purity was 98.5%. CD spectra demonstrated that the native structure of rHLF was not affected in the purification process. The biological functions of the purified rHLF, including iron binding, releasing and antimicrobial activities were then investigated. The results showed that rHLF had comparable iron binding and releasing activity to that of native HLF. 5 g/L concentration of rHLF significantly inhibited the growth of *Escherichia coli*. These studies lay a solid foundation for the wide

Received: February 1, 2010; **Accepted:** April 9, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2007AA100506, 2010AA100501), National Nature Science Foundation of China (No. 20706052).

Corresponding author: Jian Luo. Tel/Fax: +86-10-82627062; E-mail: jluo@home.ipe.ac.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (Nos. 2007AA100506, 2010AA100501), 国家自然科学基金 (No. 20706052) 资助。

application of our self-prepared ion exchange adsorbents in protein purification.

Keywords: ion exchange adsorbents, ligand density, recombinant human lactoferrin, purification, antimicrobial activity

乳铁蛋白 (Lactoferrin, LF) 又名乳转铁蛋白, 是转铁蛋白家族的重要一员。其分子量大约 80 kDa^[1], 等电点为 8.7 左右^[2]。乳铁蛋白分子中结合了两条糖链, 占分子量的 7% 左右。蛋白分子 N 端和 C 端的特征环状结构可以结合三价铁离子。乳铁蛋白具有多种重要的生理功能, 主要包括铁吸收与释放、抗菌活性以及炎症反应中的铁离子代谢等。人乳中乳铁蛋白含量较高, 但因人乳来源有限, 严重限制了其商业化应用。随着转基因技术的突飞猛进, 利用家畜乳腺生物反应器大规模生产人乳铁蛋白已经获得成功^[3], 从重组牛乳中纯化所得的 rHLF 蛋白可以广泛应用于医药及营养等领域。

离子交换层析技术适用范围广, 洗脱条件温和, 已成为蛋白质分离纯化中非常重要的一种手段, rHLF 蛋白也可以通过阳离子交换层析进行有效纯化^[4-5]。但是蛋白质在层析过程中存在的一个主要问题是介质表面可能引起蛋白质结构的变化, 造成蛋白质的失活^[6-7]。其中介质表面的配基类型和密度对蛋白结构影响最大。比如 Karger 小组^[8-9]研究了疏水介质的配基类型对溶菌酶、胃蛋白酶、牛胰蛋白酶抑制剂等蛋白结构的影响, 研究发现介质的疏水性越强, 越易造成蛋白结构的变化。Fernandez 小组^[10]利用 H-D 结合核磁共振发现 α -乳白蛋白 (α -Lactalbumin) 在不同的疏水表面其结构变化的程度不同。Visser^[11]和 Eagle 小组^[12]利用圆二色光谱发现蛋白质在介质表面的吸附状态类似于熔球态, 尽管保留了大部分二级结构, 但是失去了三级结构。黄永东等^[13]在研究离子交换介质的配基密度对重组乙肝病毒表面抗原 (r-HBsAg) 的结构影响时发现介质配基密度越大, 蛋白越容易变性。此外, 目前用于纯化 rHLF 蛋白的商品化离子交换介质 SP Sepharose Fast Flow 为 GE Healthcare 公司产品, 其价格昂贵。而且在实际操作中所处理的物料为牛乳, 其成分复杂, 对离子交换介质的污染比较严重, 所以使用周期有限。因此合成价低质优的离子交换介质用于替代进口介质可以大幅度降低生产成本, 解

决对进口介质的长期依赖问题。

本研究在纯化 rHLF 的过程中, 研制开发了以国产高交联度快流速琼脂糖为基质、不同配基密度的适用于 rHLF 分离纯化的 SP 离子交换介质。该介质吸附性能良好, 合成工艺中配基密度可控, 一方面可以有效地控制层析过程对 rHLF 结构的影响, 从而得到具有正常生物活性的重组蛋白质; 另一方面有效地降低 rHLF 的生产成本, 有望替代目前工业生产广泛使用的进口离子交换介质。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 转基因牛乳冻干粉

由中国农业大学农业生物技术国家重点实验室提供。

1.1.2 阴离子交换介质

高交联度快流速琼脂糖 (QZT, 6% 琼脂糖) 由中国科学院过程工程研究所生化工程技术中心合成; SP Sepharose FF 购自 GE Healthcare 公司 (美国)。

1.1.3 试剂

牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 购自 Roche 公司 (德国); 溶菌酶 (Lysozyme, LYZ) 购自 Merck 公司 (德国); 天然人乳铁蛋白购自 Sigma 公司 (美国); 化学试剂均为国产分析纯试剂; 所用纯水由 Milli Q-plus 超纯水机制备 (Millipore, 美国)。

1.1.4 仪器

常压层析系统: ÄKTA purifier 购自 GE Healthcare 公司 (美国); 质谱仪: LCQ Deca xp^{plus} 购自 Thermo 公司 (美国); 电泳仪: Mini-PROTEAN Tetra System 购自 Bio-Rad 公司 (美国); 高效凝胶过滤色谱仪: Agilent 1100 购自 Agilent 公司 (美国); 圆二色光谱仪: Jasco810 购自 Jasco 公司 (日本); 灭菌锅: 手提式压力蒸汽消毒器购自江阴滨江医疗设备厂; 超净台: YT-CJ-2ND 型生物工作台购自北京半导体设备厂。

1.2 介质合成及层析方法

1.2.1 SP QZT FF 介质的合成

以国产的快流速琼脂糖 (QZT, 6%琼脂糖) 为基质, 经活化, 偶联, 收获 3 个步骤^[14]合成了 SP 琼脂糖凝胶 (SP QZT FF)。通过改变活化剂烯丙基缩水甘油醚 (Allylglycidyl ether, AGE) 的用量, 获得不同配基密度的 SP 琼脂糖凝胶, 配基密度可以控制在 0.05~0.24 mol/L。(配基密度以介质中磺酸基的交换容量来表示)。

1.2.2 SP QZT FF 介质的蛋白吸附性能

具体方法参见文献^[15], 所用缓冲液为 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 实验数据均为 3 次实验的平均值。溶菌酶含量的测定采用紫外吸收法, 溶菌酶消光系数为 2.63 L/(g·cm)^[16]。

1.2.3 层析方法

对于 rHLF 的层析实验, 取转基因牛乳冻干粉, 45℃水溶解后, 4℃、12 000 r/min 离心 30 min 去除脂肪, 即得脱脂乳。以 1 mol/L HCl 调节 pH 至 4.6, 静置 20 min, 4℃、12 000 r/min 离心 30 min, 去除酪蛋白; 再以 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 6.0, 4℃、12 000 r/min 离心 10 min, 上清即为牛乳乳清。合成的介质充分清洗后装柱 (25 cm×10 mm I.D., CV=5 mL), 用 0.5 mol/L NaOH 清洗 5 个柱床体积后, 连接到常压层析系统。使用 Buffer A (20 mmol/L PB, pH 值随具体实验调整) 平衡后, 乳清进样若干, 进样完毕之后继续使用 Buffer A 淋洗至 UV 基线, 得到穿透峰 p_0 , 使用 Buffer B (20 mmol/L PB, pH 值和 NaCl 浓度随具体实验调整) 进行线性洗脱, 洗脱梯度为 0%~100% Buffer B, 洗脱时间 60 min, 收集洗脱峰分别记为 p_1 、 p_2 、 p_3 等, 流速 1 mL/min, 紫外检测波长 280 nm。

1.3 鉴定检测方法

1.3.1 蛋白质浓度测定

蛋白质浓度参照 Bradford 法测定^[17], 根据标准品 BSA 的标准曲线求得原料及各个洗脱峰中的蛋白质含量。

1.3.2 质谱鉴定

送交中国科学院化学研究所质谱中心鉴定。

1.3.3 高效凝胶过滤分析

凝胶过滤使用 Agilent 1100 层析系统和 SuperdexTM75 (20 cm×10 mm, I.D.) 层析柱, 缓冲液为 Buffer C (20 mmol/L PB+0.1 mol/L Na₂SO₄), 流速 0.5 mL/min, 进样量 100 μ L。

1.3.4 SDS-PAGE 电泳分析

SDS-PAGE 电泳参照文献^[18]。浓缩胶的浓度为 5%, 分离胶的浓度为 12%, 电泳缓冲液采用 Tris-甘氨酸系统。

1.3.5 圆二色光谱 (CD) 分析

圆二色光谱仪为 Jasco810 (Jasco, 日本)。扫描波长为 190~260 nm, 分辨率为 1 nm。用与待测样品中溶液相同的体系作为空白, CD 谱图为 3 次测量结果的平均值。

1.3.6 rHLF 铁离子结合与释放活性

铁离子结合活性: 将冻干的重组乳铁蛋白溶解到 FeNTA 溶液 (10 mmol/L 硝酸铁, 8.5 mmol/L NTA, 用固体 NaHCO₃ 调 pH 至 7.0) 中, 乳铁蛋白与 Fe³⁺ 的摩尔比 1:4, 室温下反应 1 h 后用 0.15 mol/L NaCl 溶液透析。透析所得蛋白溶液使用分光光度计进行全波长扫描, 扫描范围 260~700 nm。

铁离子释放活性: 铁饱和的重组人乳铁蛋白分别在不同 pH 值 (pH 2.0~7.0) 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液中透析平衡, 使用分光光度计测量透析所得蛋白溶液在 280 nm 和 465 nm 处的吸收值。

1.3.7 抗菌活性

用肉汤琼脂培养基培养大肠杆菌, 挑单菌落至 10 mL 液体培养基中, 200 r/min 培养 5 h, 温度 37℃。取 100 μ L 菌液加入到 10 mL 终浓度分别为 0.5、2、5 g/L 的 rHLF 蛋白溶液中继续培养, 分别于 0、4、8、16、24 h 的时候取出部分菌液测定其在 600 nm 处的吸收值, 阴性对照使用无菌水代替 rHLF 蛋白溶液, 实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 自制介质蛋白吸附性能的考察

离子交换层析介质的吸附性能会影响分离纯化的效率^[19]。介质的吸附性能包括两个方面: 静态吸附性能和动态吸附性能。静态吸附平衡可以反映介

质的吸附量, 而介质的动态吸附行为与实际操作更为贴近, 本研究首先采用溶菌酶作为模型蛋白质考察了不同配基密度介质的吸附性能, 并与进口介质进行了比较。

2.1.1 静态吸附平衡

以溶菌酶为模型蛋白质考察了常温 25℃ 下自制介质的静态吸附平衡。按照 Langmuir 吸附等温方程^[20]的形式计算了自制介质吸附性能, 结果见表 1, 随着配基密度的增加, 介质对蛋白的饱和吸附容量 q_m 随之增加, 解离常数 K_d 随之减小, 其中 q_m 相近的自制介质 (配基密度为 0.20 mol/L) 与进口介质相比, 其 K_d 值低于进口介质, 这种现象的优点是使得此自制介质结合蛋白的能力增强, 可以对在某些条件下带电性较弱的蛋白形成有效吸附, 虽然此介质也可能在纯化过程中引起蛋白质结构的变化, 但是可以通过提高缓冲液的电导来避免这种现象的发生。此外, 自制介质的最高配基密度可以达到 0.24 mol/L, 该介质的吸附容量高于进口介质的吸附容量。

表 1 不同配基密度对溶菌酶吸附性能的影响
Table 1 Effect of different ligand densities on the adsorption character of Lysozyme to SP QZT FF (25°C)

Ligand density (mol/L)	q_m (g/L)	K_d (g/L)
0.05	88.5±6.1	0.0419±0.0156
0.10	102±3	0.0383±0.0884
0.15	127±2	0.0105±0.0008
0.20	155±8	0.0060±0.0025
0.24	178±5	0.0034±0.0009
0.20 (SP Sepharose FF)	157±4	0.0066±0.0057

2.1.2 动态吸附平衡

通常选用穿透曲线来评价介质的动态吸附性能, 在没有达到吸附饱和之前, 层析柱流出液的蛋白浓度为零; 当达到吸附饱和临界点时, 层析柱流出液的蛋白浓度突然上升并很快达到进样料液的蛋白浓度, 表现为一条非常陡峭的曲线, 通常把峰高 10% 处称为穿透点。图 1 为流速为 0.2 mL/min 时, 溶菌酶在不同配基密度自制 SP QZT FF 层析柱及进口 SP Sepharose FF 层析柱中的穿透曲线。

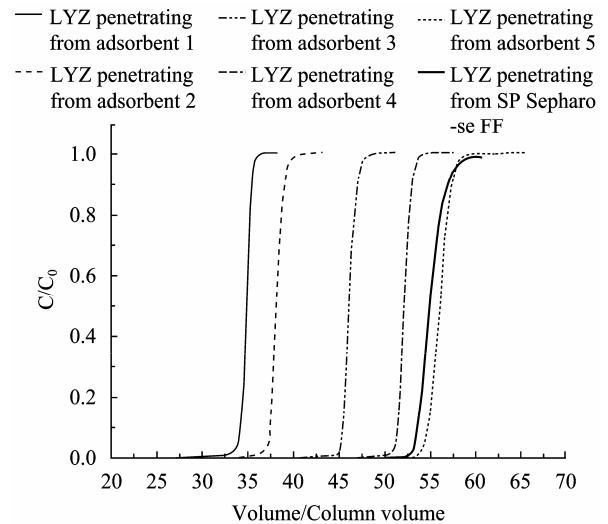


图 1 溶菌酶在不同配基密度自制 SP QZT FF 柱及进口 SP Sepharose FF 柱上的穿透液浓度随层析过程的变化曲线

Fig. 1 Penetration profile of Lysozyme on SP Sepharose FF and self-prepared SP QZT FF with different ligand densities. C/C_0 : ratio of penetrating protein concentration to loading protein concentration; Volume/Column Volume: ratio of loading volume to column volume. The ligand densities of the adsorbents 1 to 5 were 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 and 0.24 mol/L, respectively.

从结果可以看出, 在流速为 0.2 mL/min 的条件下, 随着自制介质配基密度的增加, 溶菌酶的穿透时间越来越晚, 说明其动态载量越来越大。此外, 吸附曲线为窄陡型, 说明自制介质具有很好的动态吸附性能。其中高配基密度 (0.24 mol/L) 的自制介质穿透时间晚于进口介质, 说明自制高配基密度介质的吸附容量高于进口介质, 可以实现蛋白质的高容量分离, 具有良好的应用前景。

2.2 重组人乳铁蛋白的离子交换层析

影响离子交换层析的因素很多, 包括层析介质、流动相、pH 值、盐浓度、蛋白质浓度等, 这些因素之间的作用非常复杂。其中层析介质是纯化过程的核心, 介质的性能对于分离的效果起到决定性的作用。本实验以重组人乳铁蛋白为研究对象, 考察了自制介质对蛋白的纯化效果。通过优化实验选择 Buffer A (20 mmol/L PB, pH 6.0) 和 Buffer B (20 mmol/L PB+1 mol/L NaCl, pH 6.0) 作为流动相。乳清进料 40 mL (蛋白浓度 6.75 g/L) 后用 Buffer A 淋洗至 UV 基线, 再以线性梯度洗脱并分别收集穿透峰和洗

脱峰, 实验考察了不同配基密度介质对 rHLF 分离纯化的层析效果, 图 2 是以高配基密度 (0.24 mol/L) 自制介质纯化 rHLF 的层析谱图, 其他介质对 rHLF 的层析行为均相似。

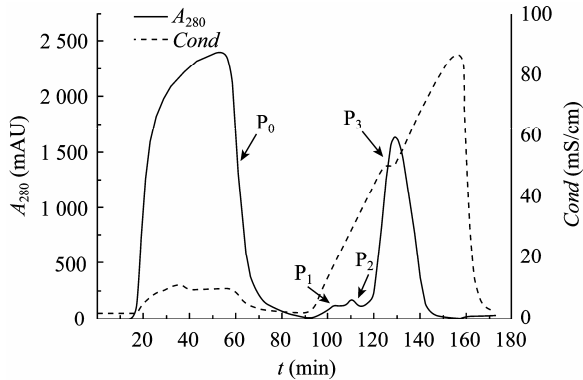


图 2 自制离子交换介质分离 rHLF 层析谱图

Fig. 2 Chromatogram of rHLF purified by self-prepared SP QZT FF. Column size: 25 cm×10 mm I.D., CV=5 mL; Buffer A: 20 mmol/L PB, pH 6.0; Buffer B: 20 mmol/L PB+1 mol/L NaCl, pH 6.0; Loading volume: 40 mL; Flowing rate: 1 mL/min. The ligand density of the adsorbent was 0.24 mol/L.

对图中 p_0 、 p_1+p_2 、 p_3 进行了 SDS-PAGE 分析, 结果见图 3, 自制介质纯化得到的 p_3 峰为高纯度的重组乳铁蛋白, p_1 和 p_2 峰仅含有少量的重组乳铁蛋白, 穿透峰 p_0 里无重组人乳铁蛋白, 分离效果令人满意。本实验又对 p_3 峰进行了高效凝胶过滤分析 (HPSEC, High-Performance Size-Exclusion Chromatography, 图 4), 结果表明自制介质纯化得到的重组人乳铁蛋白的纯度达到 95% 以上, 使用紫外积分计算回收率达到 80% 以上。

此外, 我们考察了不同配基密度介质在分离转基因牛乳过程中的处理量, 并与进口介质进行了比较。在层析进样过程中分段收集流出液, 并使用 HPSEC 分析流出液组分, 出现 rHLF 特征峰时对应的进样体积即为最大处理量, 结果见表 2。随着配基密度的增加, 每毫升介质对转基因牛乳的最大处理量逐渐增加, 其中 1 mL 高配基密度介质 (0.24 mol/L) 可以处理 50 mL 转基因牛乳, 高于进口介质的处理量, 节省了纯化工艺的上样时间, 可以实现 rHLF 高容量分离。

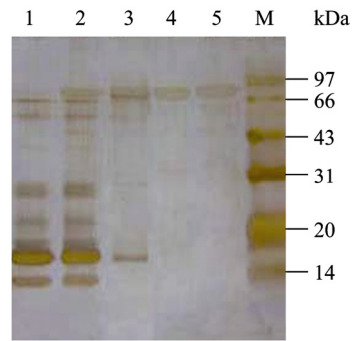


图 3 自制离子交换介质纯化 rHLF 收集组分的 SDS-PAGE 电泳分析图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of fractions collected from self-prepared SP QZT FF. M: molecular weight marker; 1: p_0 flowing through from self-prepared SP QZT FF; 2: whey extract of transgenic milk; 3: p_1+p_2 eluted from self-prepared SP QZT FF; 4: p_3 eluted from self-prepared SP QZT FF; 5: HLF standard. The ligand density of the adsorbent was 0.24 mol/L.

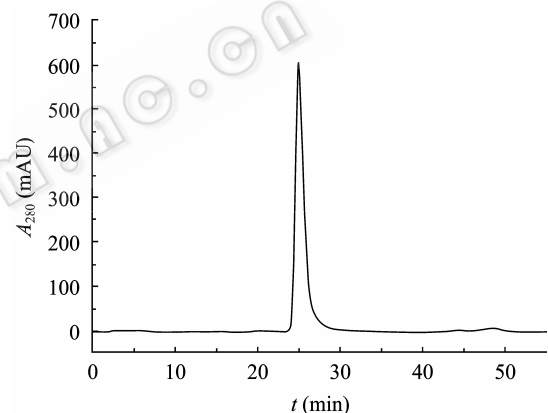


图 4 自制离子交换介质层析洗脱峰 p_3 的高效凝胶过滤图

Fig. 4 HPSEC analysis of elution fraction p_3 from self-prepared SP QZT FF. The ligand density of the adsorbent was 0.24 mol/L.

表 2 每毫升介质对转基因牛乳的最大处理量

Table 2 Maximal transgenic milk treatment volume by 1 mL adsorbent

Ligand density (mol/L)	Treatment volume of the transgenic milk (mL)
0.05	17±4
0.10	25±2
0.15	31±1
0.20	40±2
0.24	50±3
0.20 (SP Sepharose FF)	39±2

Column size: 25 cm×10 mm I.D., CV=1 mL; Buffer A: 20 mmol/L PB, pH 6.0; Buffer B: 20 mmol/L PB+1 mol/L NaCl, pH 6.0; Flowing rate: 0.2 mL/min. Protein concentration of the transgenic milk was 0.16 g/L.

2.3 纯化的重组乳铁蛋白的分子量测定

MALDI-TOF 的结果表明, 我们纯化得到的重组人乳铁蛋白的分子量为 79 481 Da (图 5), 由于人乳铁蛋白单肽的理论分子量为 76 304 Da, 所以重组人乳铁蛋白的糖链分子量应为 3 177 Da。天然人乳铁蛋白的分子量为 82 000 Da 左右, 所以重组人乳铁蛋白与天然人乳铁蛋白的分子量相差 2 000 Da 左右, 分子量的差异可能是牛乳腺表达的重组人乳铁蛋白与天然人乳铁蛋白的糖基化形式的差异造成的^[3]。

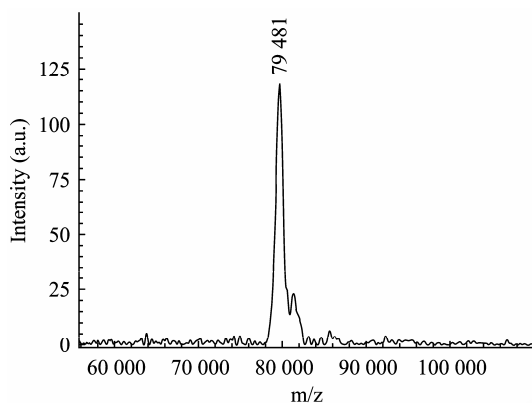


图 5 rHLF 分子量测定

Fig. 5 Determination of molecular weight of rHLF.

2.4 纯化重组乳铁蛋白的圆二色分析

为了评价自制介质对牛乳腺表达的重组人乳铁蛋白结构的影响, 我们使用圆二色谱比较了纯化产品和天然人乳铁蛋白的二级结构, 结果如图 6 所示, 不同配基密度介质洗脱下来的 rHLF 均与天然 HLF 的圆二色谱曲线重合较好, 说明离子交换层析中介质配基密度的高低不会造成 rHLF 二级结构的不可逆变化, 即我们自制介质的纯化不会导致重组蛋白质的变性, 有利于我们得到完整生物活性的重组蛋白。

2.5 纯化重组人乳铁蛋白的生化性质与生理功能的鉴定

重组表达蛋白质的研究往往存在一个问题, 即重组蛋白生物活性丧失, 或活性较低。表达过程中的蛋白一级序列的改变, 或者蛋白折叠的错误, 甚至糖基化、磷酸化的错误修饰都能导致重组蛋白活性的异常。人乳铁蛋白转基因研究的目的是生产大量具有正常生物活性、功能的重组人乳铁蛋白。因

此对重组蛋白的理化性质和生物活性的分析与鉴定就显得尤为重要。本实验考察了重组人乳铁蛋白的活性, 包括铁离子结合能力和抑菌能力, 来评估重组人乳铁蛋白的生化性质与生理功能。

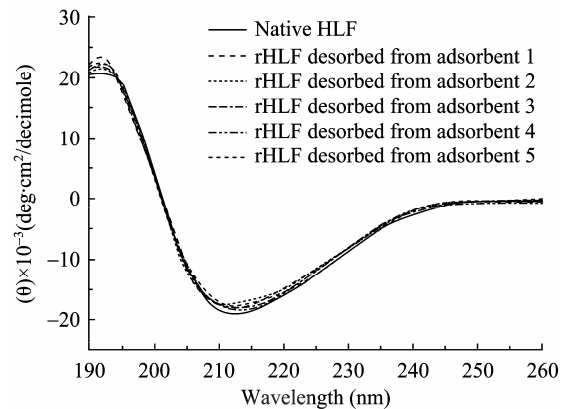


图 6 不同配基密度离子交换介质制备 rHLF 的圆二色谱图

Fig. 6 Circular dichroism spectrum of rHLF desorbed from adsorbents with different ligand densities. The ligand densities of the adsorbents 1 to 5 were 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 and 0.24 mol/L, respectively.

2.5.1 铁结合与释放的结果

人乳铁蛋白结合和释放铁离子的能力具有重要的生理意义。乳铁蛋白在肠道中能够识别并特异结合细胞表面的人乳铁蛋白受体 (LF receptor, LFR), 从而进入细胞内部释放出 Fe^{3+} , 提供给细胞吸收利用。人乳铁蛋白分子结合铁离子之后空间结构会发生变化, 465 nm 处出现特征吸收峰^[21]。实验结果表明, 重组人乳铁蛋白在体外经过铁饱和处理后, 在 465 nm 处也出现了明显特征吸收峰 (图 7), 这说明重组人乳铁蛋白同样具备结合铁离子的能力^[22]。接下来, 我们比较了重组人乳铁蛋白和天然人乳铁蛋白在不同 pH 条件下铁离子的结合能力。实验结果 (图 8) 表明, 重组人乳铁蛋白在不同 pH 条件下与铁离子的结合能力不同, 在中性或偏酸性的条件下, 重组人乳铁蛋白能够有效结合铁离子。当 pH 下降到 4.5 时, 铁离子开始解离; 随着 pH 的进一步降低到 pH 2.5 时, 大部分铁离子均从乳铁蛋白中解离出来, 这与天然人乳铁蛋白的铁结合与释放活性基本一致。

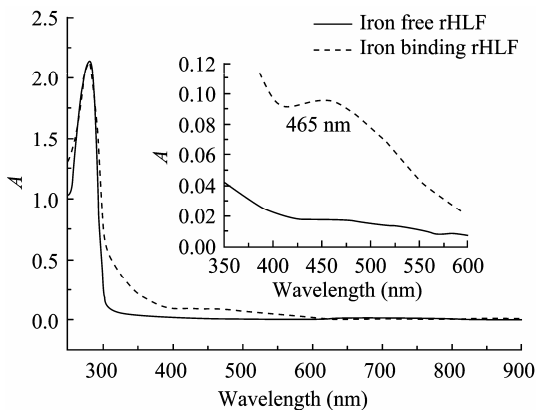


图7 未结合铁与结合铁的 rHLF 的扫描图谱
Fig. 7 Full-wavelength-scan profile of iron free and binding rHLF.

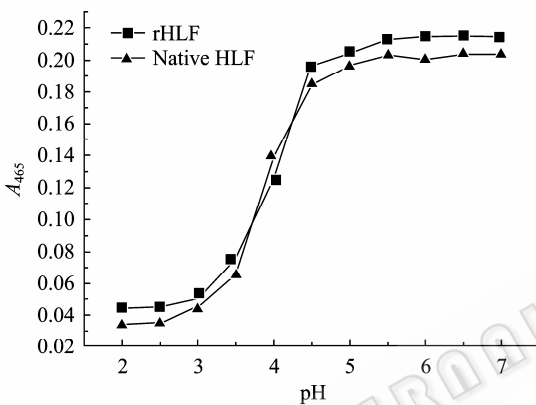


图8 rHLF 在不同 pH 条件下铁结合与释放情况
Fig. 8 Profile of iron binding rHLF in different pH conditions.

2.5.2 重组乳铁蛋白抑菌活性分析

人乳铁蛋白能特异结合细菌生长不可或缺的铁离子^[23]，并抑制细菌的生长。也有报道^[24]认为人乳铁蛋白能够直接结合到细菌细胞壁的脂多糖上，改变细胞壁的渗透压，使细菌的胞质外泻而直接杀灭细菌。我们研究了重组人乳铁蛋白在体外对大肠杆菌生长的抑制作用。结果表明，浓度为 5 g/L 的重组人乳铁蛋白对大肠杆菌的生长具有明显抑制作用(图 9)；当重组人乳铁蛋白的浓度降低到 2 g/L 时，对细菌的生长的抑制作用下降；当重组人乳铁蛋白的浓度进一步降低到 0.5 g/L 时，对细菌基本没有抑制作用。这说明，重组人乳铁蛋白的抑菌作用是剂量依赖的，只有达到一定的剂量，人乳铁蛋白才会表现出明显的抑菌效果。

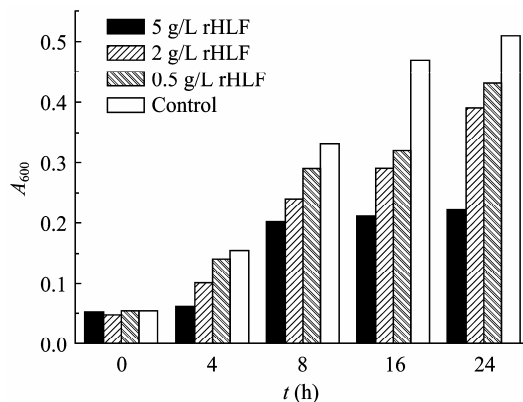


图9 rHLF 对大肠杆菌生长的抑制活性
Fig. 9 Antibacterial effect of rHLF.

3 结论

本研究自主合成了不同配基密度的 SP 离子交换介质，其中最高密度可以达到 0.24 mol/L。以溶菌酶为模型蛋白的吸附实验结果表明，层析介质的吸附容量随配基密度的增加而升高，制备的最高配基密度介质的吸附容量高于进口介质，每毫升此介质可以处理 50 mL 重组人乳铁蛋白牛乳。不同配基密度层析介质均具备良好的 rHLF 分离纯化性能，其中最高配基密度介质纯化 rHLF 收率为 86.5%，纯度为 98.5%。通过层析实验发现，本实验范围内的不同配基密度 SP 离子交换介质不会对 rHLF 的二级结构造成不可逆的改变，纯化所得的 rHLF 具有与天然人乳铁蛋白一致的生物学活性，可以用于 rHLF 纯化的规模化生产。此外，自制介质成本低廉(价格仅约为进口介质的 1/3~1/2)，有效地降低了 rHLF 的生产成本，解决了目前国内蛋白质纯化长期依赖进口介质的问题。

REFERENCES

- [1] Wakabayashi H, Yamauchi K, Takase M. Lactoferrin research, technology and applications. *Int Dairy J*, 2006, **16**(11): 1241-1251.
- [2] Legrand D, Mazurier J, Metz-Boutigue MH. Characterization and localization of an iron-binding 18-kDa glycopeptide isolated from the N-terminal half of human lactotransferrin. *Biochim Biophys Acta*, 1984, **787**(1): 90-96.
- [3] Yang PH, Ni FE, Li N. Study on the production of

- recombinant human lactoferrin in transgenic cattle. *J Anhui Agri Sci*, 2008, **36**(35): 15507–15509.
- 杨鹏华, 倪凤娥, 李宁. 利用转基因牛生产重组人乳铁蛋白研究. *安徽农业科学*, 2008, **36**(35): 15507–15509.
- [4] Recio I, Visser S. Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin: *in situ* enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *J Chromatogr A*, 1999, **831**(2): 191–201.
- [5] Lu RR, Xu SY, Wang Z, *et al.* Isolation of lactoferrin from bovine colostrum by ultrafiltration coupled with strong cation exchange chromatography on a production scale. *J Membr Sci*, 2007, **297**(1/2): 152–161.
- [6] Xiao YZ, Rathore A, Fernandez EJ, *et al.* Generalizing a two-conformation model for describing salt and temperature effects on protein retention and stability in hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr A*, 2007, **1157**(1/2): 197–206.
- [7] Sokol JM, Holmes BW, Fernandez EJ, *et al.* Aprotinin conformational distributions during reversed-phase liquid chromatography. Analysis by hydrogen-exchange mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2003, **1007**: 55–66.
- [8] Oroszlan P, Blanco R, Karger BL, *et al.* Intrinsic fluorescence studies of the kinetic mechanism of unfolding of alpha-lactalbumin on weakly hydrophobic chromatographic surfaces. *J Chromatogr*, 1990, **500**: 481–502.
- [9] Blanco R, Arai A, Karger BL, *et al.* Role of association on protein adsorption isotherms. Beta-lactoglobulin A adsorbed on a weakly hydrophobic surface. *J Chromatogr*, 1989, **482**(1): 1–12.
- [10] Jones TT, Fernandez EJ. α -Lactalbumin tertiary structure changes on hydrophobic interaction chromatography surfaces. *J Colloid Interface Sci*, 2003, **259**: 27–35.
- [11] Engel MFM, Van Mierlo CPM, Visser AJWG. Kinetic and structural characterization of adsorption-induced unfolding of bovine-lactalbumin. *J Biol Chem*, 2002, **277**(13): 10922–10930.
- [12] Maste MCL, Pap EHW, Visser AJWG, *et al.* Spectroscopic investigation of the structure of a protein adsorbed on a hydrophobic latex. *J Colloid Interface Sci*, 1996, **180**(348): 632–633.
- [13] Huang YD, Bi JX, Su ZG, *et al.* Improving recovery of recombinant hepatitis B virus surface antigen by ion-exchange chromatographic supports with low ligand density. *Process Biochem*, 2006, **41**: 2320–2326.
- [14] Johansson BL, Belew M, Eriksson S, *et al.* Preparation and characterization of prototypes for multi-modal separation aimed for capture of positively charged biomolecules at high-salt conditions. *J Chromatogr A*, 2003, **1016**(1): 35–49.
- [15] Weaver LE, Carta G. Protein adsorption on cation exchangers: comparison of macroporous and gel-composite media. *Biotechnol Prog*, 1996, **12**(3): 342–355.
- [16] Reddy KRC, Lilie H, Rudolph R, *et al.* L-arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. *Protein Sci*, 2005, **14**: 929–935.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248–254.
- [18] Yang AS, Gao JY, Li X, *et al.* Study on separation and purification of lactoferrin in bovine milk. *Food Sci Technol*, 2005(3): 17–19.
- 杨安树, 高金燕, 李欣, 等. 牛乳中乳铁蛋白的分离纯化研究. *食品科技*, 2005(3): 17–19.
- [19] Zhang ZQ, Jin YT, Feng XL, *et al.* Purification of recombinant human tumor necrosis factor- α by chromatography in the presence of Polyethylene Glycol (PEG). *J Chem Eng Chin Univ*, 1999, **13**(4): 340–345.
- 张志强, 金业涛, 冯小黎, 等. 聚乙二醇存在下的离子交换层析纯化重组人肿瘤坏死因子. *高校化学工程学报*, 1999, **13**(4): 340–345.
- [20] Chen WD, Sun Y. Effect of adsorption density on pore diffusivity of proteins in ion exchanger. *J Chem Ind Eng*, 2003, **54**(2): 219–224.
- 陈卫东, 孙彦. 吸附密度对蛋白质在离子交换吸附剂中孔扩散系数的影响. *化工学报*, 2003, **54**(2): 219–224.
- [21] Baker EN, Rumball SV, Anderson BF. Transferrins: insights into structure and function from studies on lactoferrin. *Trends Biochem Sci*, 1987, **12**: 350–353.
- [22] Stowell KM, Rado TA, Funk WD, *et al.* Expression of cloned human lactoferrin in baby-hamster kidney cells. *Biochem J*, 1991, **276**(2): 349–355.
- [23] Dionysius DA, Milne JM. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *J Dairy Sci*, 1997, **80**(4): 667–674.
- [24] Schibli DJ, Hwang PM, Vogel HJ. The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles. *FEBS Lett*, 1999, **446**(2/3): 213–217.