

链霉亲和素纯化和鉴定方法的研究*

刘福英 宋淑霞 郑 龙 张焕铃 尤红煜 王俊霞**

(河北医科大学实验动物学部 石家庄 050017)

摘要: 对链霉亲和素进行纯化、鉴定, 采用冷钝化的方法去除培养液中大部分杂蛋白, 用亲和层析法从链霉菌 L-183 的培养液中纯化链霉亲和素 (SA), 经试验, SA 回收率为 75% ~ 85%。鉴定表明, 自制 SA 的分子量为 74.5kD, 每分子 SA 可结合 3.2 个生物素分子, 活性为 11.2U/mg, pI 为 7.4。自制 SA 各项生物学性质与文献报道相符。

关键词: 链霉亲和素, 纯化鉴定, 亲和层析

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0112-05

Study on Purification and Identification of Streptavidin*

LIU Fu-Ying SONG Shu-Xia ZHENG Long ZHANG Huan-Ling
YOU Hong-Yu WANG Jun-Xia**

(Department of Laboratory Animal, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

Abstract: The aim of this research is to refine the protocol of purification of SA and identify the character of SA. By utilizing the cold-denaturing method, most of other kinds of protein were screened out and SA was purified from the fermentation broth of L-183 by using the refined affinity chromatography method. The rate of recollection was checked to be 75% ~ 85%. By identification, it is indicated that the molecular weight of self-made SA was 74.5kD, the biotin-combining number 3.2, the activity 11.2u/mg, the pI around 7.4. So, the essential characters of SA are same as described by documents.

Key words: Streptavidin, Purification and identification, Affinity chromatography

链霉亲和素 (Streptavidin, SA) 是阿维丁链霉菌 (*Streptomyces avidinii*) ATCC 27419 在生长过程中分泌的一种蛋白。由于 SA 不含糖基以及与生物素具有高度亲和力, 因此 SA 已广泛应用于酶联免疫吸附实验、免疫组织化学、时间分辨免疫荧光技术、定量 PCR、单链 DNA 制备、生物分子纯化、单克隆抗体制备等生物技术领域。

刘 丽等从石家庄地区土壤中分离出一株 SA 分泌菌, 命名为 L-183^[1]。本文对 SA 的生物学性质鉴定及其分离纯化方法进行研究改良。为生产、鉴定 SA 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种: 链霉菌 L-183 (本室保存), SA (本室自制), 标准链霉亲和素与生物素

* 河北省科技厅专项基金资助项目

** 通讯作者 Tel: 0311-86266147, E-mail: wangjunx62@163.com

投稿日期: 2005-10-28, 修回日期: 2006-01-18

(Promega 公司产品), 2-亚氨基生物素琼脂糖凝胶 4B (Sigma 公司产品), 生物素化辣根过氧化物酶 (北京鼎国生物公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 SA 的分离纯化: 发酵培养: 参照宋淑霞等的方法^[2]。发酵结束后, 将培养液 4℃, 5,000g 离心 15min, 收集上清。

培养液处理: 取 1L 上清, 向其中加入硫酸铵至 80% 饱和度, 4℃ 搅拌 2h 后, 4℃, 10,000g 离心 15min, 弃上清, 收集沉淀。向沉淀中加入 100mL 双蒸水, 充分摇匀, 置 -20℃ 冷钝化。48h 后取出, 室温融化, 4℃, 10,000g 离心 15min, 收集上清, 用 6mol/L 氢氧化钠调至 pH 11。收集沉淀, 重复上述步骤。

亲和层析: 使用 pH 11 的 0.05mol/L 碳酸钠溶液将 2-亚氨基生物素琼脂糖凝胶 4B 亲和层析柱平衡后, 封住出口, 将一定体积处理后上清装柱, 37℃ 静置 5min。打开出口, 先用 0.05mol/L 碳酸钠溶液洗脱杂蛋白, 当洗脱液 OD_{280} 降至 0.05 以下后, 换用 pH 4 的 0.1mol/L 醋酸钠缓冲液解离, 收集洗脱液。

产品浓缩: 将收集的洗脱液装入已经处理的截流范围 6,000~8,000 的透析袋, 在透析袋外加聚乙二醇 6000 浓缩至原体积 1/10, 对双蒸水透析 24h, 中间换水 5~6 次, 即可供检测用^[3]。

1.2.2 SA 的鉴定: 浓度测定: $SAE_{1\text{cm}}^{282\text{nm}} = 3.4\text{L/g}^{[4]}$, 取 20 μL 自制 SA 溶液稀释至 3mL, 用 752 紫外光栅分光光度计于 282nm 测 A 值, 计算 SA 浓度。

纯度鉴定: 根据亲和柱洗脱液吸收曲线和不连续 SDS-聚丙烯酰胺电泳进行判断。

分子量测定: 采用不连续 SDS-聚丙烯酰胺电泳。

酶切产物鉴定: 采用蛋白酶 K^[5,6], 电泳条件同上。

活性测定: 采用 $OD_{233\text{nm}}$ 紫外光谱测定法, 向比色杯中加 1mg/mL 自制 SA 2.5mL, 蒸馏水调零, 测定 233nm 的 A 值。依次加 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 生物素, 复测 A 值, 以 A 值不再增加时的生物素总微克数除以自制 SA 总毫克数, 即为自制 SA 的活性单位^[7]。

pI 测定: 采用醋酸纤维素膜电泳法, 在 8×2cm 膜正中点样, 每次 1 μg , 共 3 次。分别使用 pH 值为 6.0、7.1、7.4、7.8、8.0 的 PBS, 电压 100V, 电流 50mA, 电泳 1h 后, 用 CCB-G250 显色 30min, 洗脱 30min, 中间换洗脱液 1~2 次。

紫外吸收扫描图谱: 向比色杯中加 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 自制 SA 2.5mL, 蒸馏水调零, 测 340~200nm A 值, 加过量生物素后复测 A 值。

2 结果

2.1 浓度测定

A 值为 0.025, 根据公式 $C = A/E$ 计算, 自制 SA 浓度 1.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2.2 纯度鉴定

在自制 SA 的亲和柱洗脱曲线和活性曲线上均显示一个吸收峰, 且两个吸收峰完全一致 (图 1)。图 2 显示, 经过 SDS-PAGE, 自制 SA 仅有一条泳带。因此, 自制 SA 达到亲和层析纯。

2.3 分子量测定

自制 SA 经过变性后, 分子量下降, 仅显示一条泳带, 表明自制 SA 仅由同种亚基构成, 每一亚基分子量为 18.6kD, 所以自制 SA 的分子量为 74.5 kD (图 3)。

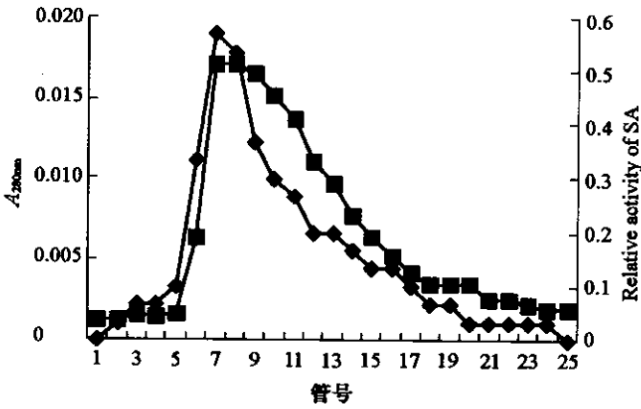


图1 自制SA的亲合柱洗脱曲线和活性曲线

◆ Absorbance at 282nm, ■ Relative activity of SA

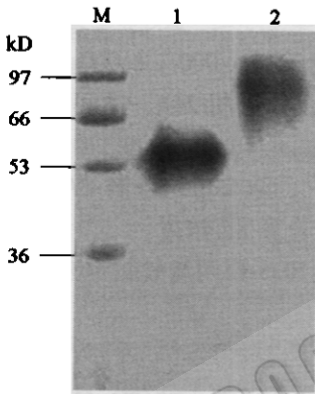


图2 自制SA和Promega core SA的SDS-PAGE图

M 标准蛋白, 1 Promega core SA, 2 SA product

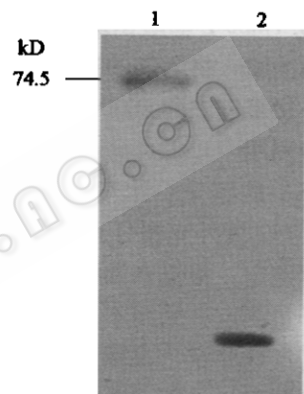


图3 未变性SA和已变性SA的SDS-PAGE图

1 Original SA product, 2 Denatured SA product

2.4 酶切产物鉴定

经过蛋白酶K处理, 除自制SA的泳带外, 出现一条新的泳带, 分子量与Promega的核心SA相同(图4), 表明自制SA降解为核心SA。

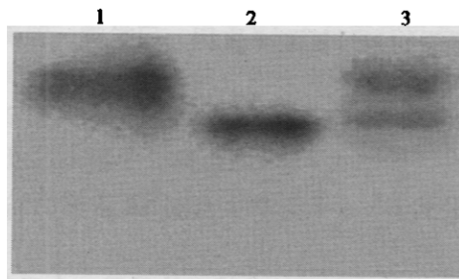


图4 3种SA的SDS-PAGE

1 SA product, 2 Promega core SA, 3 SA product digested by protease K

2.5 活性和每分子结合生物素分子数测定

2.5mg SA中加入1μg/μL生物素28μL达到饱和, 计算自制SA活性=11.2u/mg, 低于文献报道的未被生物素饱和的75kD SA活性14u/mg, 两者活性比为0.8。由于未被生物素饱和的SA分子可结合4个生物素分子, 因此每个自制SA分子可以结合3.2

个生物素分子。结果见表1。

表1 SA生物素结合性

$A_{233\text{nm}}$	Adding volume of biotin solution ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$)									
	0	4	4	4	4	4	4	2	2	2
	0.907	0.914	0.921	0.931	0.937	0.943	0.950	0.955	0.957	0.957

2.6 pI测定

当缓冲液选用pH值为6.0或7.1的PBS时自制SA向正极泳动,当缓冲液为pH值7.8或8.0的PBS时SA向负极泳动,只有在pH7.4 PBS中SA无泳动,因此自制SA的pI值为7.4左右,略低于文献报道的未被生物素饱和75kD SA的pI 7.5,结果见图5。

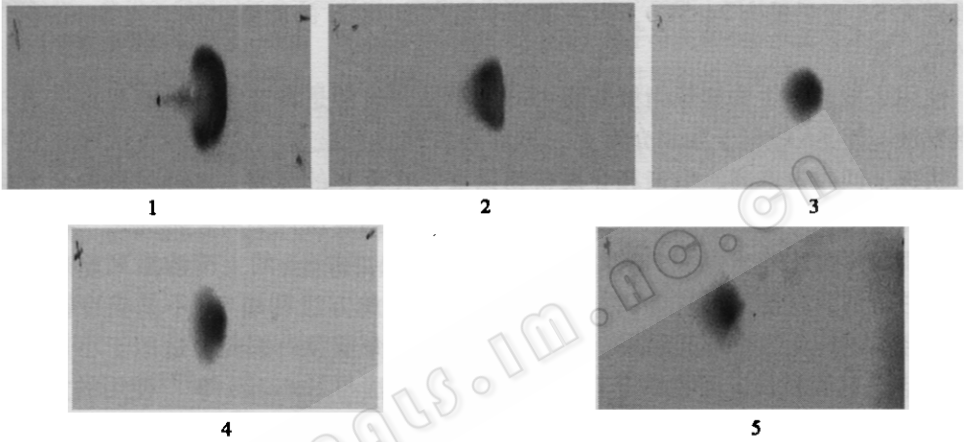


图5 不同pH的SA醋酸纤维素电泳图

1 pH 6.0, 2 pH 7.1, 3 pH 7.4, 4 pH 7.8, 5 pH 8.0

2.7 紫外吸收扫描图谱

340nm~200nm紫外区测A值所得图谱显示,在280nm有一个平缓吸收峰,从250nm A值开始增加,最大吸收在200nm。加过量生物素后,340nm~248nm吸收曲线完全重合,247nm~227nm A值比未加生物素时增加,其中233nm A值增加最大,226nm~206nm A值比未加生物素时下降,206nm~200nm A值又增加,吸收曲线在200nm A值达到最大。结果表明,自制SA结合生物素后 $OD_{233\text{nm}}$ 明显增高,此特性符合已有报道^[8]。结果见图6。

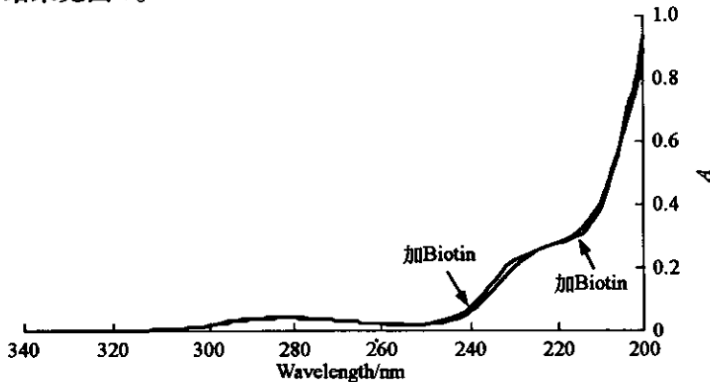


图6 SA的紫外吸收光谱

3 讨论

根据文献报道, SA 的分离纯化有两种方法: 经典方法包括硫酸铵沉淀、离子交换层析、结晶等流程^[9]。由于硫酸铵使培养液中的 SA 和内源性蛋白酶被共同浓缩、沉淀, 因此蛋白酶作用加强, 结果使 SA 分子降解, 最后分离到的 SA 分子量为 60kD 左右, 许多作为商品的核心 SA 就是将其进一步处理后得到。另一种是亲和层析法^[5], 使用 2-亚氨基生物素琼脂糖凝胶 4B 亲和柱, 其与 SA 的亲和力随 pH 的下降而减弱, 在 pH 10~11 范围内, 两者紧密结合, 当 pH 降至 4 时, SA 即被解离下来, 由于在 pH 4~11 范围 SA 活性不受影响, 因此分离纯化 SA 效果良好。使用这一方法可直接从培养液中分离 SA, 因此省略了沉淀、浓缩等步骤, 从而减弱了内源性蛋白酶的作用。本实验得到大 SA 分子量为 74.5kD, 由 4 条分子量约为 18kD 的肽链组成。与 Bayer 等^[6]报道的相一致。

使用 2-亚氨基生物素琼脂糖凝胶 4B 纯化 SA, 通常是将亲和介质直接加入离心后的培养液, 使 SA 吸附于亲和介质上, 然后再装柱进行洗脱^[10]。这种方法操作较为简单, 快速, 回收效率高, 但亲和介质价格昂贵, 在反复的吸附、装柱过程中会发生损耗, 因此适用于有足够亲和介质纯化 SA。此外, 我们也设计了另一种纯化 SA 的方法, 使用盐析、冷钝化等步骤将 90% 以上的杂蛋白除去, 含 SA 的上清浓缩到原来体积的 10% 左右, 然后直接加到柱体内与亲和介质吸附。此方法利用 SA 不易被冷钝化的性质, 将经典的纯化方法与亲和层析结合起来, 亲和介质没有损耗, 适用于小规模制备 SA, 缺点是时间较长, 回收率为 75%~85%。此方法与 Hofmann 等^[11]使用的方法有某些相似之处, 但由于我们使用黄豆饼粉作为氮源, 使培养液中含有大量杂蛋白, 因此添加了冷钝化等步骤。

商品 SA 是分子量为 53kD 的核心 SA, 具体生产过程不明。文献报道的方法通常是将完整的 SA 进行酶切处理或直接构建表达核心 SA 的工程菌进行生产。蛋白酶 K、木瓜蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、弹性蛋白酶均可将 18kD 的肽链降解为 13.2kD 的肽链。其中蛋白酶 K 和枯草杆菌蛋白酶的效果较好^[5]。本研究采用蛋白酶 K 对 SA 初产物进行处理, 但图 3 显示仅有一部分自制 SA 降解为核心 SA, 表明自制 SA 具有极强的抵抗蛋白酶作用的能力。

参 考 文 献

- [1] 刘 丽, 闫振权, 王秀芳, 等. 河北医科大学学报, 2001, 22 (5): 257~260.
- [2] 宋淑霞, 吕占军, 韩丽枝, 等. 河北医科大学学报, 2002, 23 (1): 4~6.
- [3] 贾文祥, 孟文彤, 胡其乐. 华西医学报, 1995, 26 (1): 113~115.
- [4] 贾文祥, 黄 健, 孟文彤. 华西医学报, 1995, 26 (4): 436~438.
- [5] Bayer E A, Ben-Hur H, Wilchek M. *Methods in Enzymology*, 1990, 184: 8~89.
- [6] Bayer E A, Ben-Hur H, Hiller Y, *et al.* *J Biochem*, 1989, 259: 369~376.
- [7] Chaiet L, Wolf F J. *Arch Biochem Biophys*, 1964, 106: 1~5.
- [8] 程振球, 封 岩, 左正斌, 等. 上海免疫学杂志, 1993, 13 (5): 303~306.
- [9] Diamandis E P, Christopoulos T K. *Clin Chem*, 1991, 37: 625~636.
- [10] Bayer E A, Ben-Hur H, Gitlin G, *et al.* *J Biochem Biophys Methods*, 1986, 13: 103~112.
- [11] Hofmann K, Wood S W, Brinton C C, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77 (8): 4666~4668.