

脱氨再生几丁质凝胶亲和柱层析法 纯化溶菌酶

王炜军 徐凤彩

(华南农业大学生物技术学院, 广州, 510642)

摘要 首次采用脱氨再生几丁质凝胶亲和柱层析法直接从鸡蛋清及菜心的茎叶粗提液中纯化了溶菌酶。纯化倍数分别为 42.4倍和 310.9倍;回收率为 70.2%与 61.0%;每克酶蛋白的活性分别为 99153U和 71100U。每克吸附剂对鸡蛋清溶菌酶的活性吸附量为 312.7U;蛋白吸附量为 161mg。两种纯化的溶菌酶经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳结果均显示单一条蛋白带。

关键词 脱氨再生几丁质凝胶;亲和层析;溶菌酶

中图分类号 Q503

溶菌酶 (Lysozyme, EC3.2.1.17) 具有广泛的用途,如食品的防腐保鲜,微生物发酵与生物工程技术中的菌体裂解及临床药物和诊断上的应用等 (船津等, 1982; 缪辉南, 1985)。采用几丁质衍生物亲和层析法来制备溶菌酶已有不少报道。如: 甲壳质粉 (复旦大学生化教研组, 1978; Chiang et al, 1993)、羧甲基-几丁质 (Imoto et al, 1968)、几丁质包埋纤维素 (CC-纤维素) (Imoto et al, 1973a; 1973b)、脱氨几丁质粉 (张珍田等, 1986; Weaver et al, 1977)、N-酰化壳聚糖 (Hirnao et al, 1991)。其中 CC-纤维素和脱氨几丁质粉使用得较多,但 CC-纤维素颗粒小,沉降慢;脱氨几丁质粉会吸附色素等杂质且颗粒小于 60目时易堵塞层析柱筛板,这些限制了它们在生产上的大规模应用。本文报道了制备一种新型的脱氨再生几丁质凝胶,并首次用来制备鸡蛋清溶菌酶和菜心溶菌酶,效果良好。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡蛋清 (华南农业大学兽医院提供), 菜心 *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* (网室栽培), 壳聚糖 (中国科学院广州化学研究所), 考马斯亮蓝 G-250和 R-250 (Fluka进口分装), 溶壁微球菌 (*M. lysodeikticus*) (Sigma公司), 牛血清白蛋白 (上海生化所), 其余的均为国产分析纯试剂或生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 脱氨再生几丁质凝胶的制备 先用一定量的乙酸酐将壳聚糖醋酸溶液凝胶化,然后在高速组织捣碎机中捣碎至一定大小的颗粒,再经脱氨处理 (张珍田等, 1986),最后在尼龙布上用自来水冲洗并除去一些太细的颗粒,浸泡在内含 3mmol/L NaN₃ 的水溶液中或经冷

冻干燥后保存备用。

1.2.2 鸡蛋清和菜心溶菌酶的亲和层析 鸡蛋清溶菌酶的亲和层析: 将 20mL 新鲜的鸡蛋清用 5mmol/L NaHCO_3 (内含 0.2mol/L NaCl , 溶液 A) 稀释至 200mL, 搅拌均匀, 两层纱布过滤, 滤液中加入适量抽干的凝胶吸附剂 (经溶液 A 平衡), 开放搅拌 100min (室温), 倒在尼龙布上用溶液 A 洗涤, 上柱 (2cm \times 22cm), 用溶液 A 洗涤至 $A_{280} < 0.1$, 改用 0.1mol/L HAc 洗脱 (4.8mL/管、80mL/h), 收集活性部分, 低温浓缩备用。

菜心溶菌酶的亲和柱层析: 300g 菜心茎叶加 250mL 溶液 A 高速捣碎, 尼龙布过滤, 滤液经 6000r/min 离心 10min (室温), 取上清液, 以下过程基本同上, 上柱 (3cm \times 30cm), 洗脱 (6mL/管、90mL/h)。

1.2.3 脱氮再生几 质凝胶对鸡蛋清溶菌酶亲和吸附量的测定 取 2g 冷冻干燥的吸附剂, 在溶液 A 中减压膨润, 抽干, 加到 200mL 的蛋清稀释液 (同上) 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下缓慢搅拌 2h, 抽干, 收集滤液, 用 200mL 预冷的溶液 A 洗涤吸附剂数次, 合并滤液, 测定吸附前后溶液中溶菌酶活性和蛋白含量。

1.2.4 酶活力的测定及蛋白质含量测定 鸡蛋清溶菌酶活力测定按 Weaver 等 (1977), 菜心溶菌酶活力的测定稍有改动, 在 3mL 的悬浮底物中加入 30 μL 的酶液, 测定温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 以每分钟在 450nm 波长下下降 1.0 个光密度值的酶量为一个活性单位 (U)。蛋白质含量测定按 Bradford 法 (1976), 并以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳 按张龙翔等 (1985) 方法, 2.5% 的浓缩胶, 15% 的分离胶, 电流为每管 2mA, 每管上样量: 菜心溶菌酶蛋白含量为 5.1 μg , 鸡蛋清溶菌酶蛋白含量为 4.4 μg 。

2 结果

2.1 酶的亲和柱层析

在两种材料的亲和柱层析中, 蛋白峰与活性峰完全一致, 且分布集中, 结果如图 1 图 2。鸡蛋清溶菌酶和菜心溶菌酶各自被纯化了 42.4 倍和 310.9 倍, 回收率为 70.2% 与 61.0%; 每克酶蛋白的活性分别为 99153U 和 71100U, 见表 1。

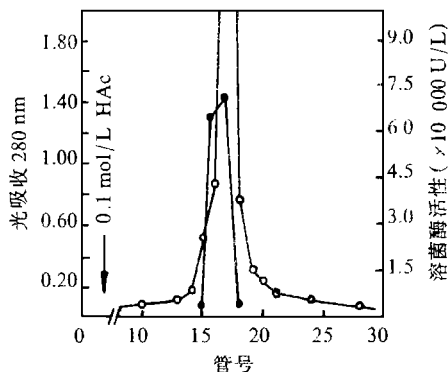


图 1 鸡蛋清溶菌酶亲和柱层析 (2cm \times 22cm)
洗脱液: 0.1mol/L HAc ; 洗脱速度: 80mL/h;
4.8mL/管. O—Q 光吸收; ●—● 酶活性。

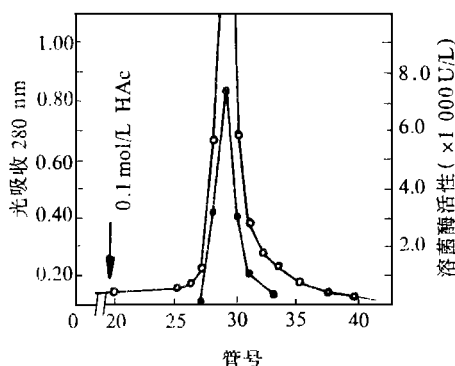


图 2 菜心溶菌酶亲和柱层析 (3cm \times 30cm)
洗脱液: 0.1mol/L HAc ; 洗脱速度: 90mL/h;
6mL/管. O—Q 光吸收; ●—● 酶活性。

表 1 鸡蛋清溶菌酶和菜心溶菌酶的纯化结果

材料	步骤	总体积 /mL	总蛋白 /mg	总活性 /U	比活性 /U·g ⁻¹	纯化倍数	浓缩倍数	回收率 / (%)
鸡蛋清	I ⁽¹⁾	200	342.5	800000	2335.8	1	1	100
	II ⁽²⁾	9.6	5.67	561600	99153	42.4	14.6	70.2
菜心茎、叶	I	470	925.0	211500	228.7	1	1	100
	II	18	1.80	127980	71100	310.9	15.8	61.0

(1) 粗提; (2) 亲和柱层析.

2.2 脱氨再生几丁质凝胶对鸡蛋清溶菌酶的亲和吸附量

每克吸附剂对鸡蛋清溶菌酶的活性吸附量为 312.7U, 蛋白吸附量为 16.1mg, 见表 2

表 2 脱氨再生几丁质凝胶对鸡蛋清溶菌酶的吸附能⁽¹⁾

项 目	总活力 /U	总蛋白 /mg
吸附前的鸡蛋清	834.0	339.4
吸附后的鸡蛋清	208.6	307.3
1g 吸附剂的吸附能力	312.7	16.1

(1) 吸附剂的干重为 2.0g.

2.3 酶的纯度检测

亲和层析法制备所得的二种精酶经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳, 结果均显示单一条带, 见图 3.

3 讨论

本实验使用的脱氨再生几丁质凝胶系壳聚糖经 N-酰化和脱氨二个步骤制成, 简便易行. 和脱氨几丁质粉相比, 它避免了对酚类和色素等杂质的非专一性吸附. 这可能是由于几丁质粉具蜂窝状的多孔结构 (林瑛等, 1993), 经脱氨处理后依然存在, 故对色素等有很强的物理吸附作用, 尤其对于植物性材料的粗提液, 而本实验制备的吸附剂系壳聚糖醋酸溶液经 N-乙酰凝胶化而成, 不具此种结构, 从而克服了这种物理吸附. 其次聚壳糖酰化后尚存在少许未酰化的带电的 NH₂ 基团, 脱氨处理可除去这些基团, 消除非特异性的离子交换吸附. 另外溶液 A 中含有 0.2mol/L NaCl 其目的也是为了进一步克服离子交换吸附, 从而提高吸附剂对溶菌酶的吸附专一性.

本实验制备的吸附剂呈凝胶状, 性状均匀, 表面积大, 因而具较大的吸附容量, 流速好; 从图 1 图 2 中可看出蛋白峰和活性峰的分布集中, 因而有良好的浓缩效果, 从表 1 中

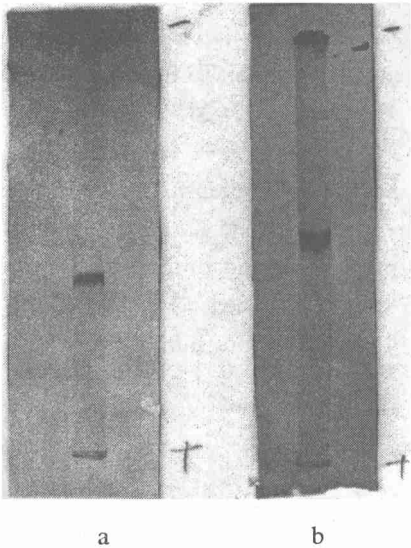


图 3 纯化酶的 SDS 聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳
a 鸡蛋清溶菌酶; b 菜心溶菌酶

可往知鸡蛋清溶菌酶和菜心溶菌酶分别被浓缩了 14.6 倍和 15.8 倍；其次在溶菌酶的制备中往使用磷酸缓冲液，其成本高，而且使得回收的蛋清中含有磷酸盐，限制它的再度利用，本法以 5mmol/L NaHCO_3 (含 0.2mol/L NaCl) 溶液代之，克服了上述缺点。

参 考 文 献

- 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 1985. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 112~ 118
- 张珍田, 任瑞芳, 宋贤一, 等. 1986. 利用亲和层析法纯化鸡蛋蛋白溶菌酶之研究. 中国农业化学会志, 24 (3): 272~ 279
- 林 瑛, 林瑞洵. 1993. 蟹壳中各组分的形态及其存在关系. 化学通报, (6): 37~ 40
- 复旦大学生物化学教研组. 1978. 溶菌酶的精制—甲壳素亲和层析法和二乙氨基乙基—纤维素层析法. 复旦大学学报, (1): 56~ 65
- 船津 胜, 鹤 大典著. 1982. 李兴福等译. 溶菌酶. 济南: 山东科学技术出版社, 256~ 295
- 缪辉南. 1985. 溶菌酶的生化特性、制备及其在医学上的应用. 生化药物杂志, (3): 28~ 41
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, (72): 248~ 254
- Chiang B H, Su C K, Tsai G J, et al. 1993. Egg white lysozyme purification by ultrafiltration and affinity chromatography. J Food Sci, 58 (2): 303~ 306
- Hirao S, Kaneko H, Kitagawa M. 1991. N-lower-fatty-acyl derivatives of chitosan as adsorbents for lysozyme and chitinase. Agr Biol Chem, 55 (6): 1683~ 1684
- Imoto T, Hayashi T, Funatsu M. 1968. Characterization of enzyme-like complex of lysozyme. J Biochem, 64 (3): 387~ 392
- Imoto T, Yagishita K. 1973a. Chitin coated cellulose as an adsorbent of lysozyme-like enzymes. Some applications. Agr Biol Chem, 37 (3): 1191~ 1192
- Imoto T, Yagishita K. 1973b. Chitin coated cellulose as an adsorbent of lysozyme-like enzyme preparation and properties. Agr Biol Chem, 37 (3): 465~ 470
- Weaver G L, Knoger M, Katz F. 1977. Deaminated chitin affinity chromatography—a method for the isolation, purification and concentration of lysozyme. J Food Sci, 42 (4): 1084~ 1087

PURIFICATION OF LYSOZYME BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY UTILIZING DEAMINATED REGENERATED CHITIN

Wang Weijun Xu Fengcai

(College of Biotechnology, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

An efficient and simple chromatographic method was developed for purification of lysozyme, utilizing a novel adsorbent— deaminated regenerated chitin. The lysozymes from fresh egg white and crude extract of *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* stems and leaves were purified 42.4 fold and 310.4 fold, the specific activity reached $99153 \text{ U}^\circ \text{ g}^{-1}$ and $71100 \text{ U}^\circ \text{ g}^{-1}$ and the recovery of total activity were 70.2% and 61.0% respectively, just by one step. The adsorbing capacity of deaminated regenerated chitin for lysozyme from egg white was $312.7 \text{ U}^\circ \text{ g}^{-1}$ and $16.1 \text{ mg}^\circ \text{ g}^{-1}$. Subjected to SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis both purified lysozymes showed a single protein band.

Key words deaminated regenerated chitin; affinity chromatography; lysozyme