



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20140143

谷胱甘肽亲和层析介质的制备条件及其层析特性研究

易秋分^{1,2}, 张翠英¹, 蒋永吉^{1,2}, 唐昭娜^{1,2}, 陈文成^{1,2},
朱显明^{1,2}, 刘俊伟², 董辉²

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 天津国际生物医药联合研究院, 天津 300457)

摘要: 以琼脂糖凝胶 4FF (Sephacrose 4 Fast Flow) 为基质, 1,4-丁二醇二缩水甘油醚 (BDGE) 为活化剂, 通过活化、偶联谷胱甘肽 (GSH), 得到 GSH 亲和层析介质. 实验结果表明: 活化及偶联的优化条件为 10 mL 基质加入 0.42 g NaOH、15 mL 二甲基亚砷 (DMSO)、15 mL BDGE, 反应温度为 40 °C, 反应时间为 6 h; 偶联溶液 pH 6.5, 反应温度为 37 °C, 反应时间为 24 h. 在此条件下, 环氧基修饰密度可达 60 ~ 65 μmol/mL; 所制备的介质载量为 (14.19 ± 0.98) mg/mL. 以此介质对谷胱甘肽 S-转移酶 (GST)、融合蛋白 GST-Bcl-2、GST-Ald、GST-PTPN12 进行纯化, 结果表明, 该介质纯化效果较好、载量高、稳定性能较好, 可重复使用.

关键词: 谷胱甘肽亲和层析; 活化; 环氧基修饰密度; 载量

中图分类号: Q81 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2015)05-0007-08

The Preparation of GSH Affinity Chromatographic Adsorbent and the Research of its Chromatographic Characteristics

YI Qiufen^{1,2}, ZHANG Cuiying¹, JIANG Yongji^{1,2}, TANG Zhaona^{1,2}, CHEN Wencheng^{1,2},
ZHU Xianming^{1,2}, LIU Junwei², DONG Hui²

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. Tianjin International Joint Academy of Biomedicine, Tianjin 300457, China)

Abstract: The glutathione (GSH) affinity adsorbent was prepared with Sepharose 4 Fast Flow and 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDGE), and then coupled with GSH based on the activated agarose particles. The results showed that the activation and coupling optimization conditions were adding into 10 mL of Sepharose 4 Fast Flow 0.42 g of NaOH, 15 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) and 15 mL of BDGE. The incubation was at 40 °C for 6 h. The activated agarose particles were coupled with GSH at 37 °C for 24 h. The pH of the coupling reaction solution was 6.5. Under these conditions, the density of the epoxy group of the agarose particles was 60-65 μmol/mL and the loading capacity was optimized to be (14.19 ± 0.98) mg/mL. The adsorbents were used to purify the glutathione S transferase (GST), the recombinant GST-Bcl-2, GST-Ald and GST-PTPN12 proteins. The result shows that the GSH affinity adsorbent has good purification effect and a high loading capacity, and its good stability in performance can make the adsorbent be used repeatedly.

Key words: GSH affinity chromatography; activation; density of epoxy group; loading capacity

在外源基因的表达中, 为了更好地获得人们所需要的重组蛋白产物, 需要通过分离纯化获得高纯度、高活性的产物. 为了简化分离纯化手续和降低成本, 专家学者已作了大量研究, 其中融合表达载体的使用使上述问题得到一定程度的改善, 标签技术的应

用, 为提供高纯度、高活性的基因工程产品创造了更有利的条件^[1]. 亲和层析技术具有分离效率高、特异性强、活性损失率低和操作简便等优点, 在分离纯化蛋白质药物、抗体等生物活性大分子中的应用十分广泛^[2]. 谷胱甘肽-S-转移酶融合表达系统是通过大肠

收稿日期: 2014-11-04; 修回日期: 2015-02-03

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (31300601)

作者简介: 易秋分 (1989—), 女, 湖北荆州人, 硕士研究生; 通信作者: 董辉, 副研究员, donghui@irm-cams.ac.cn.

杆菌进行蛋白表达、纯化和检测的重要系统。通过这一系统表达的蛋白一般在 N 末端融合上可溶性谷胱甘肽-S-转移酶作为标签。由于谷胱甘肽-S-转移酶与谷胱甘肽(GSH)能够特异性的结合,因此可以通过固定化谷胱甘肽层析介质对谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白进行分离、富集和纯化^[3]。

GSH 琼脂糖凝胶 4FF (Sephacrose 4 Fast Flow) 亲和层析填料是一种常用的固定化谷胱甘肽层析介质,主要由基质、连接臂和配基组成。目前,GSH 亲和层析介质的生产主要依赖进口(如 GE Healthcare 的 Glutathione Sepharose 系列,以下简称 GE 介质),该填料在国内处于垄断地位,价格较为昂贵,这样不利于实验室大规模使用,因此开发一种适用的国产替代产品将非常有意义^[4]。

亲和层析介质的制备过程涉及到空白介质的活化、配基的偶联、封闭介质上未偶联配基的环氧基团、清洗保存等步骤。其中介质活化及配基偶联过程是影响介质载量的关键因素,终止偶联反应、封闭未发生偶联反应的环氧基团能避免在亲和层析中引入非特性吸附。介质的中间活化可使用环氧氯丙烷(ECH)、1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDGE)、N-羧基丁二酰亚胺、溴化氰、戊二醛、烯丙基溴等活化试剂,不同的活化方法引入不同长度和类型的连接臂,连接臂长度过短可加大空间位阻的影响,而过长则不利于 GSH 偶联以及配基和配体的亲和。陈成等^[5]完成了 BDGE 活化、偶联 GSH、乙醇胺溶液终止偶联反应的介质制备过程。研究发现环氧氯丙烷的低水溶性和活化过程中环氧基水解制约了活化效率,史清洪等^[6]引入亲水试剂二甲基亚砜(DMSO)可消除琼脂糖凝胶与环氧氯丙烷之间的相界面,促进活化试剂的溶解,提高了琼脂糖色谱介质中环氧基的修饰密度,并通过 ECH 浓度、NaOH 浓度及反应时间的优化,得出最大环氧基修饰密度下的最佳活化反应条件。金华雄等^[7]通过使用 ECH 和 BDGE 两种不同长度的连接臂,然后偶联还原型谷胱甘肽,得到两种谷胱甘肽亲和层析介质,认为两种自制介质都能达到纯化要求,但是由于 BDGE 活化引入的连接臂较长,空间位阻较小,有利于蛋白吸附,回收率是 ECH 活化的 2 倍,且纯化效果更佳。冯静等^[8]系统考察了活化时间、偶联时间和偶联溶液 pH 对琼脂糖介质表面上配基偶联位点的影响。蛋白在偶联过程中受环氧基密度影响较大,密度越高,偶联位点多;偶联 12 h 以后偶联蛋白量不再增加。偶联溶液 pH 影响偶联蛋白二

级结构,一定范围内随着 pH 增加,偶联蛋白量增多。

为寻求一种经济、简便、高效、稳定的 GSH 层析介质的制备方法,本文以琼脂糖凝胶 4FF 为基质,BDGE 为连接臂,引入 DMSO 亲水性试剂,制备 GSH 亲和层析介质,重点对凝胶颗粒的活化条件、GSH 偶联溶液的 pH 进行了优化,对 GST 标签蛋白,融合蛋白 GST-Bcl-2、GST-Ald、GST-PTPN12 进行纯化。

1 材料与方法

1.1 菌株、试剂与仪器

分别含表达质粒 pGEX-6P-1、pGEX-Bcl-2、pGEX-Ald、pGEX-PTPN12 的宿主菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3), GST 蛋白及 GST 融合蛋白片段相对分子质量分别为 2.6×10^4 、 6.0×10^4 、 6.5×10^4 、 6.8×10^4 ,均由本实验室保存。

琼脂糖凝胶 4FF、Precision Protease, GE Healthcare 公司; 1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDGE), 玛雅试剂; 二甲基亚砜(DMSO)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、还原型谷胱甘肽、十二水合磷酸钠、碳酸氢钠、碳酸钠、酚酞、硫代硫酸钠、无水氢氧化钠、氯化钠、无水合硫代硫酸钠、磷酸二氢钾,上海生工生物工程有限公司; 95%乙醇,天津市盛迪达贸易有限公司; 浓磷酸、浓盐酸,西陇化工股份有限公司。

Elix 3 & Milli-Q 型纯水仪, Millipore 公司; PB-10 型 pH 计, Sartorius 公司; V410 型无油真空泵,德国 Chemvak 公司; SIIZ-III 型循环水式多用真空泵,上海知信实验仪器技术有限公司; JA5003 型精密电子天平,天津天马衡基仪器有限公司; ZHWY-211C 型恒温培养振荡器,上海智诚分析仪器制造有限公司; ÄKTA explorer 10 S、ÄKTA HPLC 蛋白纯化系统, GE Healthcare 公司; 蛋白质电泳系统,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 琼脂糖凝胶 4FF 颗粒的活化

取 10 mL 凝胶颗粒混合液,在砂芯漏斗中用双蒸水抽滤清洗、抽干。然后,将洗净抽干的凝胶颗粒加入 250 mL 锥形瓶中,依次加 15 mL DMSO、15 mL BDGE、0.42 g NaOH,用石蜡封口膜封口。再将上述悬浮液置于 40 °C 恒温振荡器中,200 r/min 反应 6 h; 反应完毕,将反应物倒于砂芯漏斗中,用体积分数为 20% 乙醇抽滤洗涤未反应完全的残留试剂,再用双蒸水抽滤清洗至无环氧基检出,得到经活化的琼脂糖凝

胶 4FF 颗粒.

1.2.2 活化的琼脂糖凝胶 4FF 颗粒与 GSH 的偶联

将洗净抽干活化后的琼脂糖凝胶 4FF 颗粒置于硅化过的 250 mL 锥形瓶中,加入 30 mL 混合液 (0.1 mol/L GSH, 0.1 mol/L Na_3PO_4 , 1 mmol/L EDTA, pH 6.5), 用石蜡封口膜封口,置于 37 °C 恒温振荡器, 180 r/min 反应 24 h 后,将反应物用双蒸水抽滤洗涤,用真空泵抽干得到凝胶颗粒.

1.2.3 终止偶联反应

向洗净抽干的凝胶颗粒中加入 30 mL 反应终止液 (0.2 mol/L NaHCO_3 , 0.5 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 2 mol/L 乙醇胺, pH 10.0), 然后置于 25 °C 恒温振荡器中, 180 r/min 反应 24 h, 以终止未反应的基团; 反应结束后, 将反应物用双蒸水抽滤洗涤, 用真空泵抽干后得 GSH 层析介质. 最后将该层析介质于室温下浸泡在体积分数为 20% 乙醇溶液中保存备用.

1.2.4 环氧基修饰密度的定量分析

琼脂糖凝胶的环氧基修饰密度的测定采用硫代硫酸钠滴定法^[9]. 准确称取 0.5 g 抽干活化后的凝胶颗粒置于 50 mL 锥形瓶中, 并加入 3 mL 1.3 mol/L 硫代硫酸钠和 2 滴酚酞指示剂; 锥形瓶用石蜡封口膜封口后于 37 °C、180 r/min 反应 30 min; 反应后的溶液用 0.01 mol/L 盐酸标准溶液滴定, 直至溶液由红色变为无色, 0.5 min 内保持不变为止. 记录初始和滴定终止时 0.01 mol/L 盐酸溶液体积 V_0 和 V_1 . 按照式 (1) 计算琼脂糖凝胶的环氧基修饰密度.

$$S = \frac{c_{\text{HCl}}(V_0 - V_1)}{m/\rho} \quad (1)$$

式中: S 为环氧基修饰密度, mol/L; c_{HCl} 为盐酸标准溶液的浓度, mol/L; V_0 为盐酸的初始体积, mL; V_1 为滴定后盐酸的剩余体积, mL; m 为活化介质的质量, g; ρ 为介质密度, 取 1.02 g/mL.

1.2.5 GST 蛋白、GST 融合蛋白菌液的制备

具有 GST 标签的质粒 pGEX-6P-1 的宿主菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3), 经 LB 培养基 37 °C 培养、IPTG 诱导等过程, 获得表达有 GST 蛋白的工程菌. 经高压破菌、高速离心后得到含 GST 蛋白的上清液, 一部分上清液经 0.45 μm 微孔滤膜抽滤, 4 °C 保存备用; 另一部分上清液经 GE 介质纯化, 得到 GST 标签蛋白, -80 °C 冻存备用. GST-Bcl-2、GST-Ald、GST-PTPN12 菌液的获得采用上述同一方法, 并标记为样 1、样 2、样 3.

1.2.6 谷胱甘肽亲和层析介质的层析性能评价

(1) 稳定性层析实验方法^[10]: 稳定性分析样品使

用 0.45 μm 微孔滤膜抽滤过的含 GST 蛋白上清菌液. 结合缓冲液为 PBS, 洗杂缓冲液为高盐 PBS (900 mL PBS, 100 mL 5 mol/L NaCl, 加双蒸水定容至 1 000 mL, pH 8.0), 洗脱缓冲液为 1 \times GSH. 第 1 次为空白循环, 以结合缓冲液替代测试样品上样. 第 2 ~ 7 次操作为平衡层析柱、上样、结合缓冲液冲洗、洗杂缓冲液冲洗、洗脱缓冲液洗脱、洗杂缓冲液冲洗、双蒸水冲洗. 重复 6 次, 上样与洗脱的流量均为 1 mL/min.

取 2 mL 自制层析介质和 GE 层析介质, 分别置于两支 12 mL 亲和层析柱空柱中, 分别取 10 mL 6 mol/L 盐酸胍溶液置于量层析柱中, 室温放置 1 h, 最后用双蒸水、结合缓冲液充分清洗.

(2) 动态载量 (mg/mL) 的测定方法^[11]: 动态载量分析样品 0.45 μm 微孔滤膜抽滤过的含 GST 蛋白上清菌液, 1 mL 自制 GSH Sepharose 4 Fast Flow. 结合缓冲液为 PBS 溶液, 洗脱缓冲液为 1 \times GSH (2.6 mmol/L GSH, 3.13 mmol/L Tris, pH 8.0) 溶液.

层析过程: 采用 ÄKTA HPLC 蛋白纯化系统, 通道 1 条件下, 以 0.5 mL/min 连续上样, 并使用收集器收集穿透液, 待 280 nm 下吸光度 (A_{280}) 升高并稳定, 此时目标蛋白充满全部管路, UV 检测值稳定, 程序由通道 1 改为通道 2, 自制 GSH 亲和层析介质接入管路, 以 0.5 mL/min 继续上样. 随着上样体积的增加, 逐渐达到柱子的载量, 可以在穿透液中检测到 GST 蛋白 UV 值, 至穿透曲线中目标样品活性达到 10% ρ_0 时上样完毕, 以 1 mL/min 流量用 1 \times GSH 洗脱层析介质上结合的 GST 目标蛋白. 计算 $Q_{10\%B}$, 即得到在一定流量、一定缓冲液条件下的动态载量, 按式 (2) 计算.

$$Q_{10\%B} = \frac{V_A \rho_0}{V_C} \quad (2)$$

式中: $Q_{10\%B}$ 为目标样品活性达到 10% ρ_0 的动态载量, mg/mL; ρ_0 为样品中目标蛋白的质量浓度, mg/mL; V_A 为通道 2 条件下穿透曲线中目标样品活性达到 10% ρ_0 时上样的总体积, mL; V_C 为总的柱床体积, mL.

(3) 静态最大载量 (有效载量 mg/mL) 的测定方法: 取 GSH 介质 0.1 mL 置于 1.5 mL EP 管中, 用 1 mL PBS (140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.8 mmol/L KH_2PO_4 , pH 8.0) 溶液润洗 5 ~ 10 次, 充分平衡, 离心去除缓冲液; 依次加入 500 μL PBS 溶液、500 μL GST 蛋白 (用前测定

其准确浓度, 3次取均值 ρ_0), 加入的溶液总体积 (V) 为 1 mL, 37 °C 结合 30 min. 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 12 000 r/min 离心 5 min, 测上清液质量浓度 (mg/mL) 为 ρ_1 (3次取平均值). 按式(3)计算 GST 载量.

$$\text{GST 载量} = \frac{(\rho_0/2 - \rho_1)V}{0.1} \quad (3)$$

(4) GST 蛋白及融合蛋白纯化方法: 取 2 mL 自制层析介质和 GE 层析介质, 分别置于两支 12 mL 亲和层析柱空柱中, 依次用双蒸水、结合缓冲液清洗, 将等体积的样品 1 溶液分别流经两支亲和层析柱, 然后用洗杂缓冲液润洗层析柱, 流出的液滴经考马斯亮蓝 G-250 检测不变蓝时停止润洗, 取介质, 制样. 样品 2、3 制样方法同上; 样品 3 流经层析柱, 洗杂缓冲液冲洗制样后, 加入适量的 Precision Protease, 过夜酶切, 洗脱目的蛋白, 取样, 制样.

(5) 蛋白质分析方法: SDS-PAGE 电泳法, 制板采用 Laemmli 体系, 即 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶; 蛋白质浓度分析采用考马斯亮蓝法.

2 结果与讨论

2.1 琼脂糖凝胶活化条件的优化

关于 GSH 层析介质的制备条件已多见报道, 本文结合金华雄等^[7]方法进行优化探索, $V_{\text{基质}} : V_{\text{DMSO}} : V_{\text{BDGE}} : V_{\text{NaOH}} = 1 : 1.5 : 1.5 : 1.5$, NaOH 溶液浓度为 0.6 mol/L, 30 °C 活化 8 h.

2.1.1 无水反应体系对琼脂糖凝胶 4FF 活化的影响

在通常的水相体系中, 反应体系存在明显的相界面, 制约了活化反应的速率. 将反应液中的 0.6 mol/L NaOH 水溶液换成等量 NaOH 固体, 使琼脂糖凝胶的活化反应环境处于无水环境中, 无水体系消除了反应液的相界面, 有效地提高了活化反应的速率, 环氧基修饰密度比加入相同浓度 NaOH 水溶液提高约 2 倍, 结果如图 1 所示. 由图 1 可以看出: 在 2~8 h 内, 随着反应时间的延长, 琼脂糖凝胶颗粒的环氧基修饰密度不断升高; 其中反应相同时间后, 对 NaOH 固体的无水活化体系和 NaOH 水溶液的含水反应体系分别测定琼脂糖凝胶的环氧基修饰密度, 发现每个时间点的环氧基修饰密度, 无水反应体系约为含水反应体系的 2 倍, 由此确定等量的 NaOH 固体的加入有利于琼脂糖凝胶的活化, 为后续优化活化反应奠定了基础.

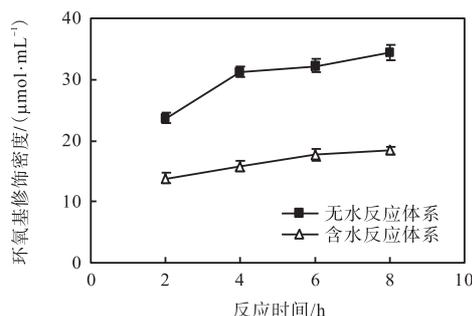


图 1 不同反应体系对环氧基修饰密度的影响

Fig. 1 Effect of different reaction systems on the density of epoxy

2.1.2 温度对琼脂糖凝胶 4FF 活化的影响

BDGE 活化温度条件比较温和, 在一定范围内温度升高, 能够促进活化, 但温度超过一定值后, 活化受到制约, 环氧基修饰密度很难进一步提升. 10 mL 基质中加入 15 mL BDGE、15 mL DMSO、0.36 g NaOH 后, 在不同温度下活化 8 h, 结果如图 2 所示. 由图 2 可以看出: 活化温度低于 40 °C 的情况下, 随着温度的升高环氧基修饰密度提高; 但温度超过 40 °C 后, 反应液变黏稠, 颜色变深, 且环氧基修饰密度降低. 由此可得最适反应温度为 40 °C.

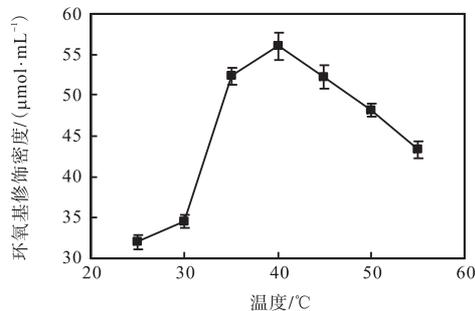


图 2 活化温度对环氧基修饰密度的影响

Fig. 2 Effect of activation temperature on epoxy density

2.1.3 NaOH 浓度对琼脂糖凝胶 4FF 活化的影响

琼脂糖介质可在 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液中稳定存在 2 h 以上^[11]. 因此, 活化反应的 NaOH 浓度不会对介质结构产生不利的影响. 在活化过程中, NaOH 浓度的增加有利于提高琼脂糖凝胶上环氧基的修饰密度, 但是随着 NaOH 浓度增加, 环氧基团会通过加剧水解作用而降低. 10 mL 基质中加入 15 mL BDGE、15 mL DMSO, 活化温度 40 °C, 在不同 NaOH 浓度下反应 8 h, 结果如图 3 所示. 由图 3 可知: 随着加入 NaOH 量增加, 环氧基修饰密度逐渐变大, 当加入 NaOH 量超过 0.42 g 时, 环氧基团水解作用加剧, 环氧基修饰密度开始降低. 最终确定 NaOH

加入量为 0.42 g.

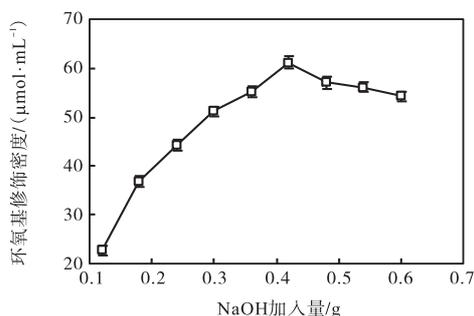


图3 NaOH浓度对环氧基修饰密度的影响

Fig. 3 Effect of NaOH concentration on epoxy density

2.1.4 时间对琼脂糖凝胶 4FF 活化的影响

琼脂糖介质的环氧基修饰密度随着反应时间的延长而增加,但时间也要严格控制. 10 mL 基质中加入 15 mL BDGE、15 mL DMSO、0.42 g NaOH, 反应温度为 40 °C, 活化不同的时间, 结果如图 4 所示. 由图 4 可以看出: 随着时间的推移, 环氧基修饰密度逐渐升高, 反应 6 h 时环氧基修饰密度达到最大; 超过 6 h 后, 琼脂糖基质上已经活化好的环氧根逐步水解, 反应液中环氧基的修饰密度开始降低. 为保证环氧基修饰密度达到最大值, 确定活化反应时间为 6 h.

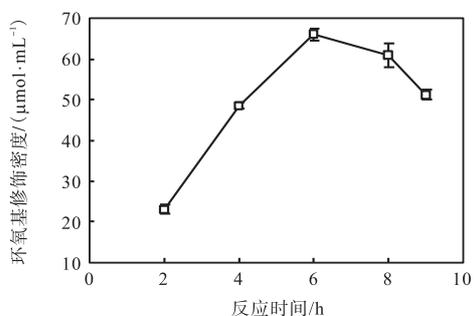


图4 反应时间对环氧基修饰密度的影响

Fig. 4 Effect of activation time on epoxy density

总之, 较高的介质活化程度对于 GSH 亲和载量的提高尤为关键. 为此, 确定活化最佳条件: $V_{\text{基质}} : V_{\text{BDGE}} : V_{\text{DMSO}} = 1 : 1.5 : 1.5$, 即 10 mL 基质加入 0.42 g NaOH、15 mL DMSO、15 mL BDGE; 反应温度为 40 °C; 反应时间为 6 h. 在此条件下, 环氧基修饰密度为 60 ~ 65 $\mu\text{mol}/\text{mL}$, 远高于文献[7]报道的 15 ~ 18 $\mu\text{mol}/\text{mL}$.

2.2 GSH 偶联的优化

GSH 配基的偶联对层析介质的载量影响较大, GSH 上的巯基很活泼, 偶联反应能在温和的条件下

(37 °C) 进行, GSH 的添加量只要比体系中环氧基总物质的量超过 1 倍即可[7]. 彭方等[12]报道活化后的偶联 GSH 反应液比例为 $V_{\text{活化后的基质}} : V_{\text{偶联液}} = 1 : 3$. 结合实验室已有的偶联条件 (0.1 mol/L GSH, 0.1 mol/L Na_3PO_4 , 1 mmol/L EDTA, 37 °C 反应 24 h), 对偶联溶液 pH 进行单因素实验, 并对不同 pH 下制得的介质的载量进行测定, 结果如图 5 所示. 由图 5 可知: 同一批次活化的基质, 随着偶联溶液 pH 变化, 载量受到一定程度的影响. pH 6.5 时, 载量最大, pH 高于 6.5 后, 载量逐渐降低, 说明不同 pH 条件可能影响配基的偶联, 进而影响载量的大小. 所以, 最优的偶联溶液 pH 为 6.5.

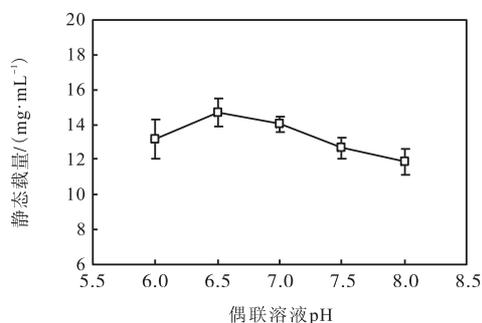


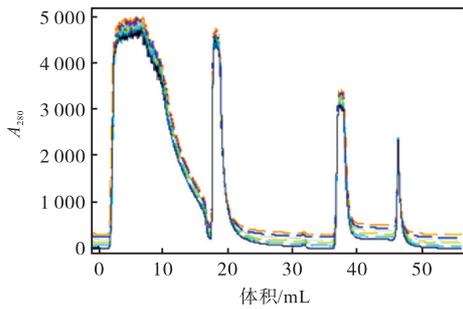
图5 偶联溶液的 pH 对 GSH 亲和层析介质载量的影响

Fig. 5 Effect of the pH of the coupling solution on the loading capacity of GSH affinity chromatographic adsorbent

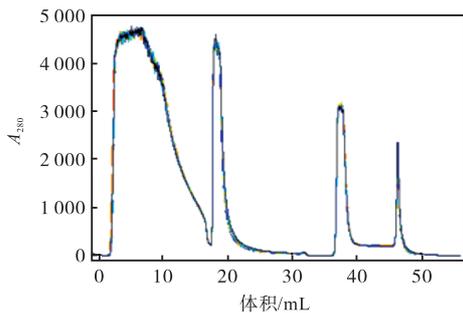
2.3 GSH 层析介质性能

2.3.1 稳定性测试

为了测试层析介质重复使用后的稳定性, 通过 ÄKTA explorer 10 S 蛋白纯化系统进行稳定性的测试, 1 次空白对照加 6 次重复实验, 结果如图 6 所示. 由图 6(a) 错叠和图 6(b) 重叠的峰型图比较可以看出, 在峰型图上保持了一致. 这一结果表明层析介质有较好的稳定性, 可以重复使用. 为证实自制层析介质与 GE 介质的稳定性差异, 参考 GE 公司 Glutathione Sepharose 4 Fast Flow 的填料特性[13], GE 产品能在 1 mol/L 醋酸盐或 6 mol/L 的盐酸胍水溶液中室温放置 1 h. 将等量的自制 GSH 层析介质和 GE 产品置于 6 mol/L 盐酸胍溶液中室温放置 1 h 后, 纯化相同的蛋白, 结果如图 7 所示. 由图 7 可以看出: 等体积的 GST 菌液分别经 2 mL 的自制层析介质纯化, 得到 SDS-PAGE, 处理过后的自制 GST 亲和层析介质与 GE 介质仍能纯化蛋白. 由此可以表明自制层析介质具有较好的稳定性.



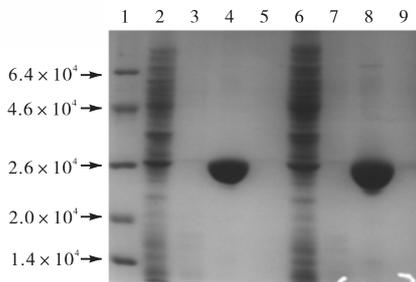
(a) 自制介质层析峰叠图



(b) 自制介质层析重叠图

图 6 GSH亲和层析介质层析峰形图

Fig. 6 Peak shape of GSH affinity chromatographic adsorbent



1. Marker; 2. GST 蛋白上清液过 GE 介质流穿样; 3. GST 蛋白上清液过 GE 介质冲洗样; 4. GST 蛋白上清液过 GE 介质洗脱样; 5. 处理后的 GE 介质样; 6. GST 蛋白上清液过自制介质流穿样; 7. GST 蛋白上清液过自制介质冲洗样; 8. GST 蛋白上清液过自制介质洗脱样; 9. 处理后的自制介质样

图 7 两种 GSH 亲和层析介质经 6 mol/L 盐酸胍水溶液室温处理 1 h 层析稳定性比较

Fig. 7 Comparison of chromatographic stability of two kinds of GSH affinity chromatographic adsorbents in 6 mol/L guanidine-hydrochloride solution for 1 h at room temperature

2.3.2 载量测试

(1) 动态载量: 为了测定已制备层析介质的动态载量与商业 GE 介质的动态载量, 本实验使用 ÄKTA HPLC 蛋白纯化系统对动态载量进行了测定, 见图 8. 在一定流量、一定缓冲液条件下的动态载量, 根据峰形图, 通道 1 时上样体积 5 mL 时管路中充满蛋白

液, 通道 1 改为通道 2 层析柱接入管路, 穿透液达到目标蛋白含量 10% 时, 记录上样体积 V_A , 以及此时穿透液的蛋白质量浓度. 如图 8, 通道 2 条件下, 自制 1 mL 层析介质穿透液达到目标蛋白含量 10% 时, 总上样体积 V_A 为 10 mL, ρ_0 为 1.25 mg/mL. 计算 $Q_{10\%B}$ 为 12.5 mg/mL. 根据 GSH 系列产品说明书, 1 mL GSTrap FF column 在 0.5 mL/min 上样速率、1 mL/min 流量下, 洗脱 13.9 mg/mL 的目的蛋白, 即动态载量为 13.9 mg/mL^[14]. 排除自制 1 mL GSH 层析柱装柱过程中的不可控因素, 所以自制层析介质的动态载量接近于 GE 介质.

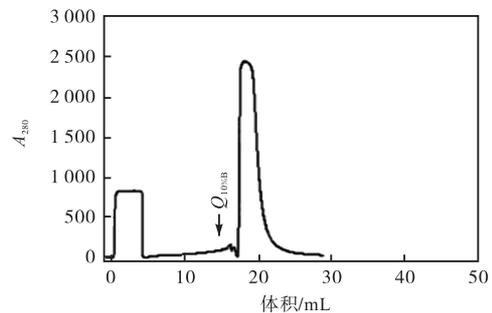


图 8 自制 1 mL GSH 介质层析流动载量峰形图

Fig. 8 The dynamic combination of the load of 1 mL GSH affinity chromatography

(2) 静态载量: 将 1 mL 自制和 GE 层析介质, 用 GST 标签蛋白在室温下进行静态载量的测试, 结果见表 1. 自制介质的载量测定值 (14.19 ± 0.98) mg/mL 略高于 GE 介质的载量测定值 (13.59 ± 0.80) mg/mL. 参照 GE 公司的 GSH 系列产品说明书中 Glutathione Sephrose 4 Fast Flow 填料在小于 3 mL/min 流量下, 与 GST 蛋白结合载量约等于或大于 10 mg/mL, 排除实验中不可控因素, 自制 GSH 层析介质载量等同于或略高于 GE 介质.

(3) SDS-PAGE 结果(图 9)更好地证实了自制介质与 GE 介质载量差异. 相同体积的 GST 融合蛋白上清样 1(GST-Bcl-2)、上清样 2(GST-Ald)、上清样 3(GST-PTPN12) 分别流经等体积的自制和 GE 层析介质, 分别取等体积的介质样, SDS-PAGE 显示, 自制介质结合的融合蛋白量略高于 GE 介质, 证明其载量略高于 GE 介质.

2.3.3 与 GE 介质层析效果对比

如图 10 所示, 相同体积 GST-Bcl-2 融合蛋白菌液分别流经 GE 和自制 GSH 亲和层析柱, 经菌液挂柱、杂蛋白洗脱、融合蛋白过夜酶切、目的蛋白洗脱等纯化步骤以及纯化结束后层析介质的处理, SDS-

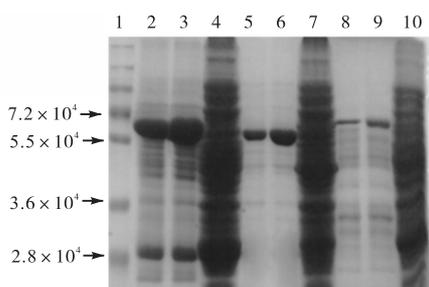
PAGE 显示自制介质纯化效果较优于 GE 介质,处理后的介质上无蛋白残留,无非特异性吸附,已制备的

表 1 比较两种 GSH 层析介质载量

Tab. 1 Comparison of the loading capacity of two kinds of GSH affinity chromatographic adsoebents

序号	自制介质			GE 介质		
	$\rho_0/(mg \cdot mL^{-1})$	$\rho_1/(mg \cdot mL^{-1})$	载量/(mg·mL ⁻¹)	$\rho_0/(mg \cdot mL^{-1})$	$\rho_1/(mg \cdot mL^{-1})$	载量/(mg·mL ⁻¹)
1	5.23	1.25	13.65	5.23	1.31	13.05
2	4.62	0.97	13.40	4.62	1.03	12.80
3	3.91	0.69	12.65	3.91	0.71	12.45
4	4.28	0.67	14.70	4.28	0.72	14.20
5	4.49	0.74	15.05	4.49	0.78	14.65
6	4.07	0.54	14.95	4.07	0.67	13.65
7	5.68	1.39	14.50	5.68	1.43	14.10
8	5.32	1.40	12.60	5.32	1.41	12.50
9	4.51	0.71	15.45	4.51	0.79	14.65
10	4.21	0.61	14.95	4.21	0.72	13.85

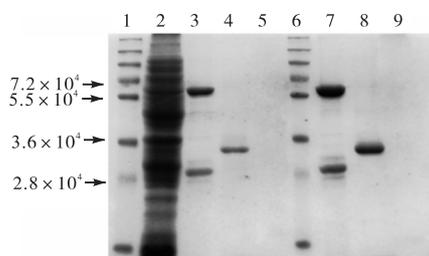
注:自制介质载量为(14.19 ± 0.98) mg/mL; GE 介质载量为(13.59 ± 0.80) mg/mL.



1. Marker; 2. 样 1 过 GE 介质; 3. 样 1 过自制介质; 4. 样 1 上清液; 5. 样 2 过 GE 介质; 6. 样 2 过自制介质; 7. 样 2 上清液; 8. 样 3 过 GE 介质; 9. 样 3 过自制介质; 10. 样 3 上清液

图 9 两种亲和层析介质载量的 SDS-PAGE

Fig. 9 SDS-PAGE detection of the loading capacity of two kinds of GSH affinity chromatographic adsoebents



1. Marker; 2. 样 1 上清液; 3. 样 1 上清液过 GE 介质; 4. 样 1 洗脱液; 5. 处理后的 GE 介质; 6. Marker; 7. 样 1 上清液过自制介质; 8. 样 1 洗脱液; 9. 处理后的自制介质

图 10 两种亲和层析介质纯化效果的 SDS-PAGE

Fig. 10 SDS-PAGE detection of the purification effect of two kinds of GSH affinity chromatographic adsoebents

3 结 语

本文在琼脂糖的活化过程中以 BDGE 为连接臂,活化过程中加入 NaOH 固体从而使反应体系为无水环境,结果显示琼脂糖凝胶介质上环氧基的修饰密度显著提高;同时在水反应体系的基础上,对活化过程中的温度、时间、NaOH 浓度以及偶联 GSH 反应溶液的 pH 等进行了单因子条件摸索,最终得到了较优的活化条件,使得环氧基密度达到 60 ~ 65 $\mu\text{mol}/\text{mL}$;根据制备的层析介质最高载量下对应的偶联反应液条件,得出偶联溶液的最佳 pH. 最终探索得到 GSH 亲和层析介质制备的方法. 利用 GST 标签蛋白进行稳定性及载量的测试,在相同的实验条件下对商业 GE 介质的参数进行对比,根据实验数据证实该 GSH 亲和层析介质稳定性能好,动静态载量方面等同于或略优于 GE 介质. 对 GST-Bcl-2 融合蛋白的纯化过程证实自制 GSH 亲和层析介质纯化效果等同于或优于 GE 介质.

参考文献:

- [1] 丁鸣,余建法,丁仁瑞. 融合表达载体的研究进展[J]. 生物技术,1988,8(4):5-8.
- [2] Van Sommeren A P G, Machielsen P A G M, Gribnau T C J. Comparison of three activated agaroses for use in affinity chromatography: Effects on coupling performance and ligand leakage[J]. Journal of Chromatography A, 1993,

- 639(1):23-31.
- [3] Smith D B, Johnson K S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione *S*-transferase[J]. *Gene*, 1988, 67(1): 31-40.
- [4] 赵彦鼎, 杨博, 张鹏宇, 等. 化学改性琼脂糖凝胶的物化性能及其对重组人血白蛋白的纯化应用研究[J]. *离子交换与吸附*, 2009, 25(3): 218-224.
- [5] 陈成, 庄红芹, 郑伟娟, 等. 谷胱甘肽亲和和色谱介质的制备及对谷胱甘肽硫转移酶蛋白的纯化[J]. *色谱*, 2004, 22(4): 456-457.
- [6] 史清洪, 彭冠英, 孙舒, 等. 环氧氯丙烷活化琼脂糖凝胶过程强化及性能评价[J]. *过程工程学报*, 2007, 7(4): 743-746.
- [7] 金华雄, 夏海锋, 郑兵兵, 等. 两种谷胱甘肽亲和层析介质的制备及其对谷胱甘肽转移酶融合蛋白的纯化[J]. *离子交换与吸附*, 2011, 27(4): 325-333.
- [8] 冯静, 黄孟军, 张贵峰, 等. 亲和层析介质上蛋白质偶联位点的控制方法[J]. *过程工程学报*, 2012, 12(2): 277-282.
- [9] Scoble J A, Scopes R K. Assay for determining the number of reactive groups on gels used in affinity chromatography and its application to the optimization of the epichlorohydrin and divinylsulfone activation reactions [J]. *Journal of Chromatography A*, 1996, 752(1/2): 67-76.
- [10] Dian C, Eshaghi S, Urbig T, et al. Strategies for the purification and on-column cleavage of glutathione-*S*-transferase fusion target proteins[J]. *Journal of Chromatography B*, 2002, 769(1): 133-144.
- [11] Griffith C M, Morris J, Robichaud M, et al. Fluidization characteristics of and protein adsorption on fluoride-modified porous zirconium oxide particles[J]. *Journal of Chromatography A*, 1997, 776(2): 179-195.
- [12] 彭方, 杨锐, 李文鑫. 一种制备 GST 融合蛋白亲和层析胶方法[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(3): 362-363.
- [13] GE Healthcare. Technical Information/Sepharose CL-6B [EB/OL]. [2005-02-01]. <http://www6.amershambiosciences.com/ptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&parentid=17016001&moduleid=166180>.
- [14] GE Healthcare. Protocol/Glutathione Sepharose 4 Fast Flow [EB/OL]. [2003-08-13]. https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc71501697AH_20110830182604.pdf.

责任编辑: 郎婧

《天津科技大学学报》首次入编《中文核心期刊要目总览》

日前,从《中文核心期刊要目总览》2014年版编委会传来喜讯,《天津科技大学学报》(以下简称《学报》)入编《中文核心期刊要目总览》2014年版(即第七版)之综合性科学技术类核心期刊,这是《学报》自1986年创刊以来首次入编《中文核心期刊要目总览》。

学报编辑部负责人陈丽丽表示,经过近30年的努力《学报》首次入选中文核心期刊,得益于学校科研实力的不断提高,得益于广大读者、作者的密切关注与大力支持。此次入编,对《学报》工作是莫大的鼓励和鞭策,中文核心期刊现在每三年进行一次遴选,这就要求我们不懈地追求卓越,更加严谨认真、孜孜不倦、脚踏实地做好组稿、审稿、编校等一系列出版工作,确保《学报》的学术质量和编校质量,同时继续做好为读者和作者的服务工作。她表示,希望大家继续关注和支持《学报》的发展,把天津科技大学日益提升的科研水平通过《学报》这个平台更好地展示出来。

本刊编辑部
2015-09-01