

蛋壳残留溶菌酶的磁性亲和分离

王炜军, 方颖, 黄国林

(华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510642)

摘要:采用包埋法制备了具有磁响应性能的几丁质凝胶亲和吸附介质,并对其颗粒表面结构、吸附特性等物化特性进行了分析. 试验表明:介质中的 Fe_3O_4 颗粒对杂蛋白存在非特异性吸附,而含醋酸铵的磷酸盐缓冲液的充分洗涤可有效消除非特异性吸附. 利用此介质所建立的方法对蛋壳清洗液中的溶菌酶进行了分离. 结果表明:通过外加磁场可快速地实现亲和吸附介质与粘稠清洗液及其中蛋壳碎片和泥沙等固形物杂质的分离,大大简化了操作步骤,酶活力回收可达 26%,纯化酶对蛋白的比活性为 50 894 U/mg,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示单一条酶蛋白带.

关键词:溶菌酶;磁性亲和吸附;蛋壳清洗液

中图分类号:Q503

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2005)04-0062-05

Separating lysozyme from eggshell using magnetic affinity adsorption medium

WANG Wei-jun, FANG Ying, HUANG Guo-lin

(College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The chitin gel affinity adsorption medium with the magnetic response was prepared by embedding method, and its apparent structure and adsorption characteristic were determined. The results showed that the powder of Fe_3O_4 in the medium could non-specifically adsorb non-target protein which could be overcome by being washed thoroughly in NH_4Ac containing sodium-phosphate buffer, and lysozyme could be isolated directly from washing solution of eggshell. It suggested that the affinity adsorption medium could be separated quickly in added magnetic field from the solid-particles such as pieces of eggshell and sands, which greatly simplified the procedure of lysozyme purification. The purified lysozyme showed a single protein band in SDS-PAGE, the recovery rate of its total activity was 26%, and the specific activity reached 50894 U/mg.

Key words: lysozyme; magnetic affinity adsorption; washing solution of eggshell

溶菌酶(lysozyme, EC3.2.1.17)在食品、日用化工和医药上具有广泛的用途. 采用几丁质衍生物亲和层析法制备溶菌酶已有不少报道^[1~6],如:几丁质粉、羧甲基几丁质、几丁质包埋纤维素、脱氨几丁质粉、N-酰化壳聚糖、脱氨再生几丁质凝胶. 磁性介质已被广泛用于分离细胞及核酸、蛋白质等生物大分子和激素等小分子生物活性物质. 其优点在于通过外磁场的作用可快速地实现固液及磁性介质与其他

固形物杂质间的分离,尤其是当待分离的液体样品含有固形物或较为粘稠时更显现其优越性. 蛋壳上残留有大量的蛋清,是制备溶菌酶的潜在资源,但蛋壳清洗液中常混有泥沙、蛋壳和蛋壳膜碎片等杂质,且粘度较大,采用一般的亲和层析时易造成层析柱的堵塞. 本研究在原有亲和凝胶介质的基础上进一步制备了具磁性的几丁质凝胶亲和介质,并探讨了此介质用于蛋壳清洗液中残留溶菌酶的分离.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡蛋壳(收集于华南农业大学兽药厂), Fe_3O_4 颗粒(广东台山化工厂), 壳聚糖(中国科学院广州化学研究所), 考马斯亮蓝 G-250(Fluka 公司), 溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus*(Sigma 公司), 低相对分子质量标准蛋白(上海丽珠生化试剂公司), 其余的均为国产分析纯试剂或生化试剂。环型铁氧体磁铁($d_{\text{外}} = 6.0 \text{ cm}$, $d_{\text{内}} = 3.2 \text{ cm}$, $h = 5.0 \text{ cm}$, 深圳圣磁有限公司)最大表场为 0.1067 T , 包被圆型铁氧体磁铁的带环型条纹塑料外套(订制)。

1.2 方法

1.2.1 溶菌酶磁性亲和介质的制备 采用 Fe_3O_4 颗粒包埋法:将 Fe_3O_4 于烘箱干燥研细,过 200 目筛;取 5 g 脱乙酰几丁质,按王伟军等^[7]方法制成其醋酸-甲醇溶液,再加入 10 g 上述 Fe_3O_4 粉末,搅拌 30 min(不可用磁力搅拌)使 Fe_3O_4 粉末分布均匀后,加入 12.5 mL 的乙酸酐,迅速混匀,静置 60 min,待壳聚糖醋酸溶液充分凝胶化后,在高速组织捣碎机中将凝胶捣碎至一定大小的颗粒,然后用环型铁氧体磁铁作为外磁场收集并筛选具良好磁响应的颗粒,再经脱氨等处理即得亲和吸附介质^[4], 4°C 保存备用。

1.2.2 磁性亲和介质颗粒结构的观察 凝胶整体结构采用 Olympus SZH 立体镜观察,凝胶颗粒表面结构的观察使用 Philips XL-30 ESEM 环境扫描显微镜,凝胶颗粒中 Fe_3O_4 包埋状况的观察采用 JEM-100CX 型透射电镜(日本)。

1.2.3 磁性亲和介质层析相关特性的分析 单位干质量介质床体积和介质的吸水值的测定:取适量介质在蒸馏水中自然沉降于量筒中,静置 2 h,记录介质的床体积,然后抽滤除去多余的水分,称量得介质的湿质量,再全部倒入培养皿中, 110°C 烘干至恒质量,称量得介质的干质量,重复测定 3 次取平均值。其中:

单位干质量介质的床体积(mL/g) = 介质的床体积 / 介质干质量;

单位干质量介质的吸水值(g/g) = (介质的湿质量 - 介质干质量) / 介质干质量。

1.2.4 磁性亲和介质对鸡蛋清溶菌酶特异吸附的分析 对溶菌酶特异吸附进程分析:将 20 mL 鸡蛋清用 $10 \text{ mmol/L NaHCO}_3$ (含 0.5 mol/L NaCl) 稀释 20 倍,离心($10\,000 \text{ r/min}$, 8 min , 4°C),收集上清液,加入 50 mL 床体积的已抽干并平衡好的介质,开放搅拌吸附,隔一定时间取上清液测定残留的溶菌酶活力。其中:

相对吸附率 = [(初始酶活性 - 吸附后酶活性) / 初始酶活性] $\times 100\%$ 。

介质吸附容量的分析:取 40 mL 鸡蛋清同上操作,加入 20 mL 床体积的已抽干并平衡好的磁性亲和介质(使待吸附的溶菌酶过量),开放搅拌吸附 60 min,取上清液测定残留的溶菌酶活力。

介质吸附容量(U/mL) = (吸附前酶液总活性 - 吸附后酶液总活性) / 介质的床体积。

1.2.5 蛋壳残留溶菌酶的磁性亲和分离 取 200 g 的鸡蛋壳,加 $10 \text{ mmol/L NaHCO}_3$ 溶液 300 mL,搅拌清洗蛋壳上的残留蛋清,纱布过滤得蛋壳清洗液,加入适量经 $10 \text{ mmol/L NaHCO}_3$ 平衡并抽滤干的磁性亲和吸附剂,室温下开放搅拌吸附 60 min,用带环型条纹塑料外套的圆型铁氧体磁铁作为外磁场收集亲和介质,此时介质被吸附于塑料外套的表面,取出塑料外套中的磁铁,此时被吸附于塑料外套表面的介质将脱落,并将悬浮于内含 0.5 mol/L NaCl 的 $10 \text{ mmol/L NaHCO}_3$ 溶液中(溶液 A),缓慢搅拌,磁性回收,如此洗涤介质 2 次,装柱($2.0 \text{ cm} \times 22.0 \text{ cm}$),再用 pH 7.8、内含 $0.5 \text{ mol/L NH}_4\text{Ac}$ 的 0.1 mol/L 磷酸钠盐缓冲液(溶液 B)洗涤至流出液的 $D_{280 \text{ nm}} < 0.05$,再用少量溶液 A 洗涤,以替换柱子中的溶液 B,最后用 0.15 mol/L HAc 洗脱(4 mL/管 , 60 mL/h),收集活性部分, 4°C 保存备用。

1.2.6 溶菌酶活力的测定 鸡蛋清溶菌酶活力测定参照 Weaver 等^[8]方法。测定温度为 30°C ,在 2.0 mL 的底物悬浮溶液中加入 $50 \mu\text{L}$ 的酶液,迅速混匀启动反应, 450 nm 波长下测定 1 min 内的光密度变化值,以 450 nm 波长下光密度每分钟下降 0.001 单位所需的酶量为一个酶活性单位(U)。

1.2.7 蛋白含量的测定 按 Bradford^[9]法,并以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

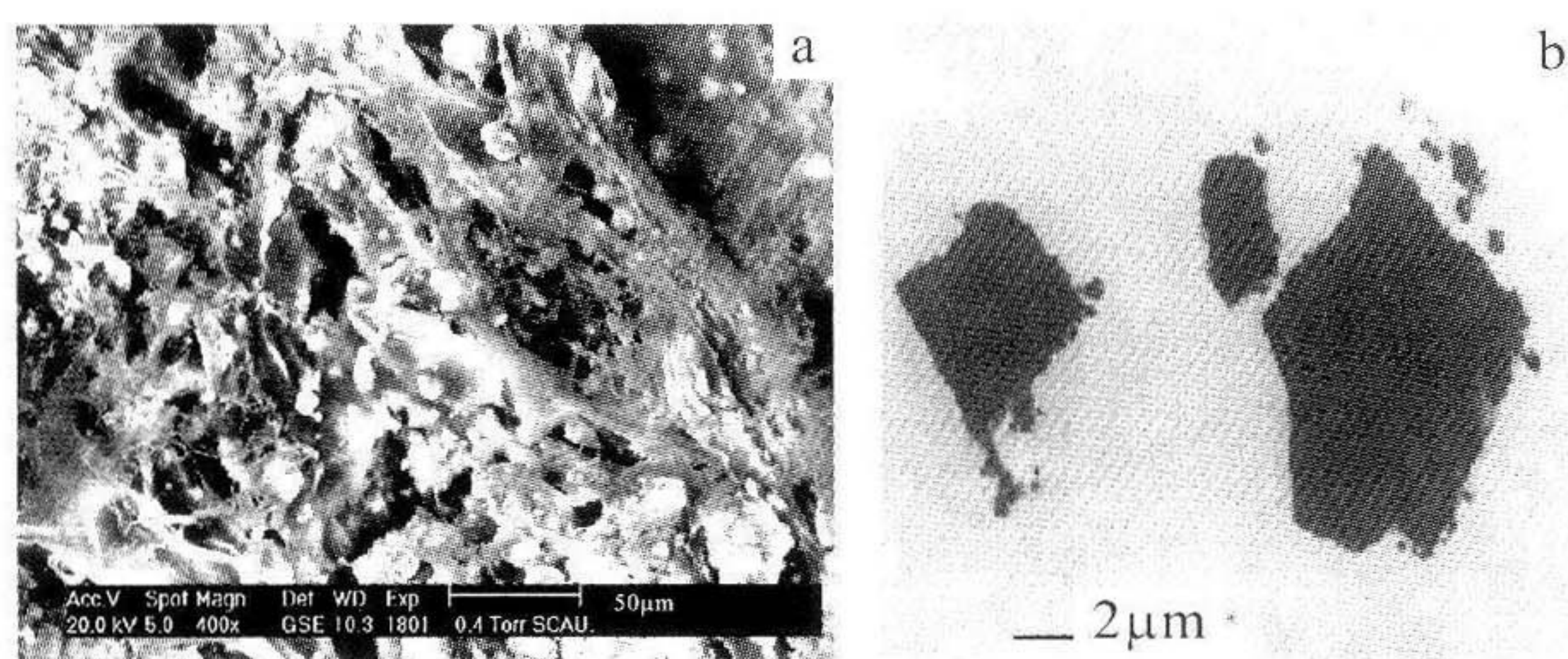
1.2.8 SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳 按张龙翔等^[10]方法,浓缩胶质量浓度为 30 g/L ,分离胶质量浓度为 150 g/L ,上样 $10 \mu\text{L}$ (含蛋白 481 mg/L),电流 10 mA ,电泳 2 h。脱胶后用考马斯 R-250 进行蛋白染色, $\varphi = 20\%$ HAc 溶液脱色。标准蛋白质(相对分子质量)分别为:鸡蛋清溶菌酶(14 400)、胰蛋白酶抑制剂(20 100)、牛碳酸酐酶(31 000)、兔肌动蛋白(43 000)、牛血清白蛋白(66 200)、兔磷酸化酶 B (97 400)。

2 结果与分析

2.1 磁性亲和介质的物理化学特性

2.1.1 磁性亲和介质颗粒的表观结构分析 选用 Fe_3O_4 粉末作为磁响应材料,采用凝胶包埋法制备得具磁响应性的溶菌酶亲和吸附介质,该介质在 Olym-

pus SZH 立体镜下呈现为红褐色的无规则的凝胶颗粒,进一步经环境扫描电镜观察,显示介质颗粒表面具有多孔结构(图1-a),切片后经透射电镜观察,则清楚地显示高电子密度的 Fe_3O_4 颗粒被包埋在凝胶颗粒中(图1-b),这些 Fe_3O_4 颗粒赋予了亲和介质的磁响应能力。



a: 电镜下磁性亲和吸附介质颗粒的表面结构;

b: 电镜下磁性亲和吸附介质颗粒的内部结构

a: The surface structure of magnetic affinity medium under environmental scanning electron microscopy;

b: The interior structure of magnetic affinity medium under transmission electron microscopy

图1 溶菌酶磁性亲和吸附介质颗粒的表观结构观察

Fig.1 Apparent structure of magnetic affinity medium for lysozyme

2.1.2 磁性亲和介质层析相关特性的分析 分析表明:单位干质量介质的床体积为 14.3 mL/g,吸水值约为 12.3 g/g. 非常便于洗涤和洗脱操作. 所得的介质具有良好的磁响应能力(图2),便于利用外加磁场进行固液和与其他固形物的分离,从而达到快速回收的目的。

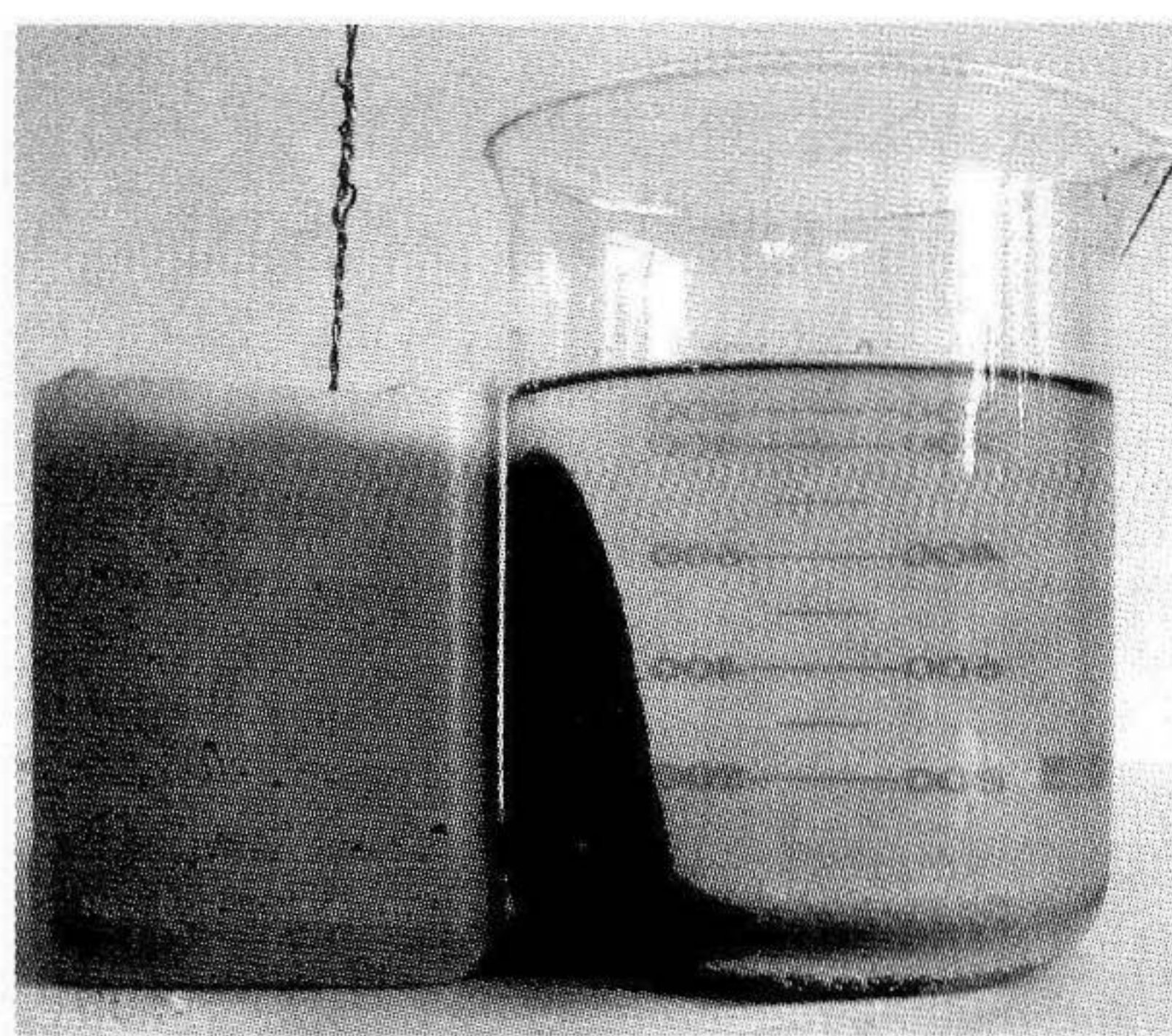


图2 磁性亲和介质的磁响应性

Fig.2 Magnetic response of the magnetic affinity medium for lysozyme

2.2 磁性的吸附特性

2.2.1 磁性亲和介质对溶菌酶的特异吸附作用

磁性亲和介质对溶菌酶的吸附作用是一个较为快速的过程(图3),仅开放吸附 3 min 即可达约 50% 的相对饱和吸附率,40 min 时基本已达到饱和吸附. 故确定亲和开放吸附的时间为 50 min. 同时测得此介质对溶菌酶的吸附容量约为 35 000 U/mL.

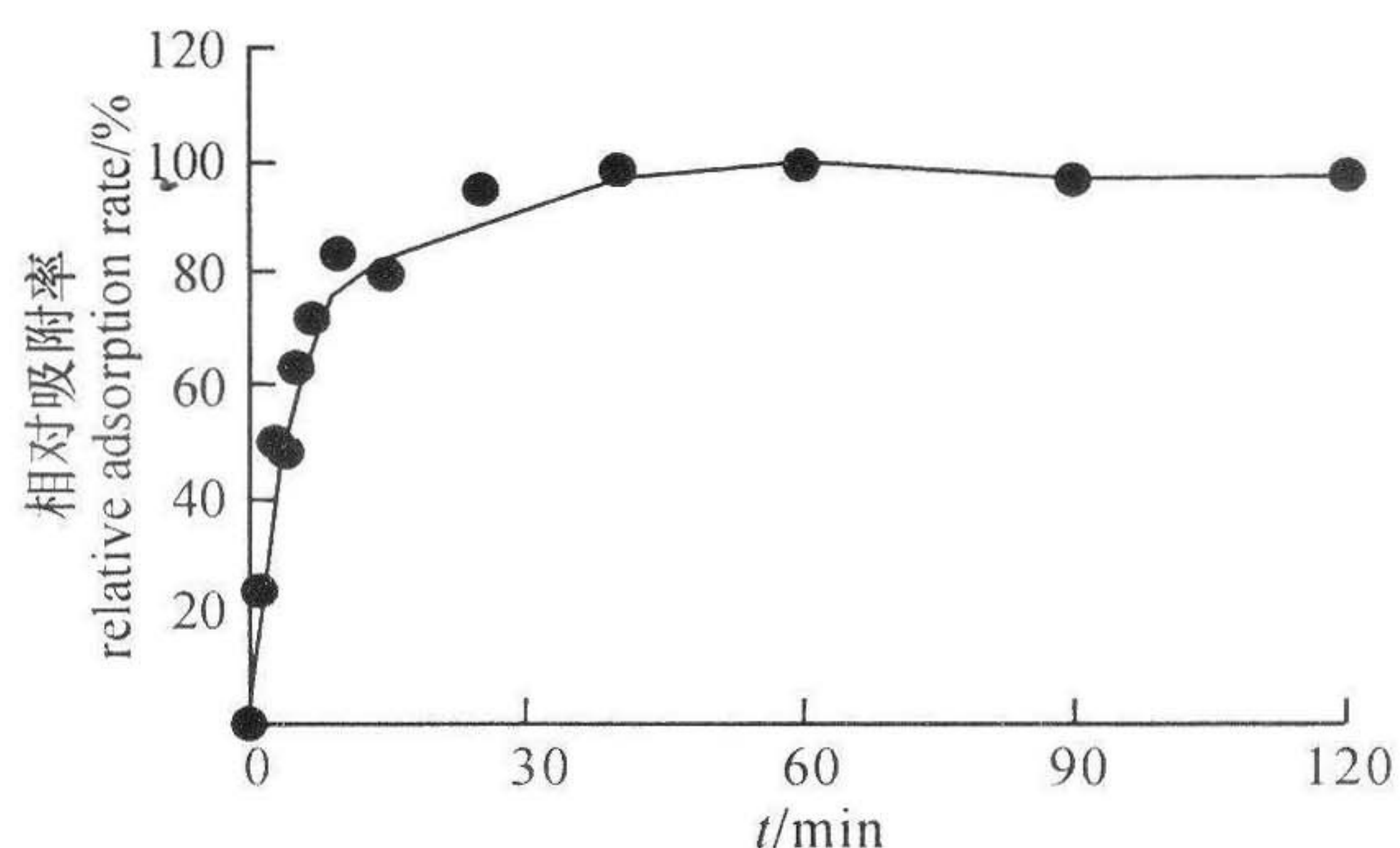
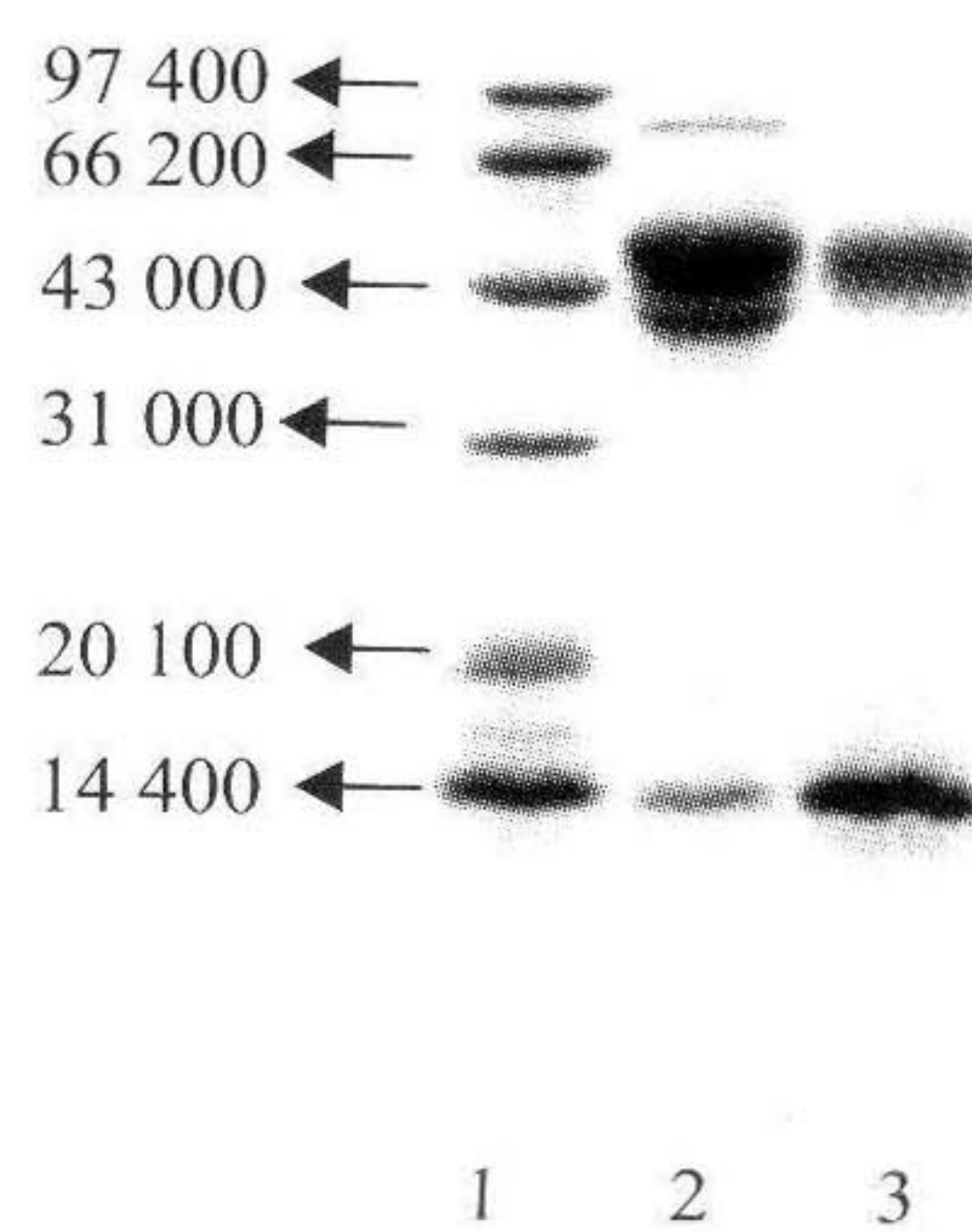


图3 磁性亲和介质对溶菌酶的吸附进程曲线

Fig.3 The absorption procedure of magnetic affinity medium for lysozyme

2.2.2 磁性亲和介质对杂蛋白的非特异性吸附作用

在纯化中,按文献[7]方法,采用内含 0.5 mol/L NaCl 的 10 mmol/L NaHCO_3 溶液充分洗涤后,再用 0.15 mol/L HAc 洗脱,所得的纯化溶菌酶经 SDS-PAGE 蛋白染色后发现,除应有的溶菌酶外,在相对分子质量为 45 000 左右出现一条含量很高的杂蛋白带(图4泳道3),表明此亲和介质存在非特异性吸附. 进一步单独用 Fe_3O_4 颗粒代替亲和吸附介质来作同样的分离操作,结果发现,当 Fe_3O_4 颗粒经内含 0.5 mol/L NaCl 的 10 mmol/L NaHCO_3 溶液充分洗涤后,再用 0.15 mol/L 的 HAc 洗脱时,会出现一个明显的蛋白吸收峰,该蛋白峰的 SDS-PAGE 分析显现了多条蛋白染色带,其中,含量最高的条带与上述相对分子质量为 45 000 的杂蛋白带对应,同时亦有溶菌酶条带,这表明介质的这种非特异吸附是由于 Fe_3O_4 颗粒对杂蛋白的吸附作用所造成的,而含高离子强度的 0.5 mol/L NaCl 溶液的洗涤并不能除去非特异吸附的杂蛋白(图4泳道2)。



1:标准分子量蛋白;2:能被 Fe_3O_4 颗粒所吸附的蛋清蛋白;
3:以内含 0.5 mol/L NaCl 的 10 mmol/L NaHCO_3 溶液作为洗涤液时纯化所得的溶菌酶。

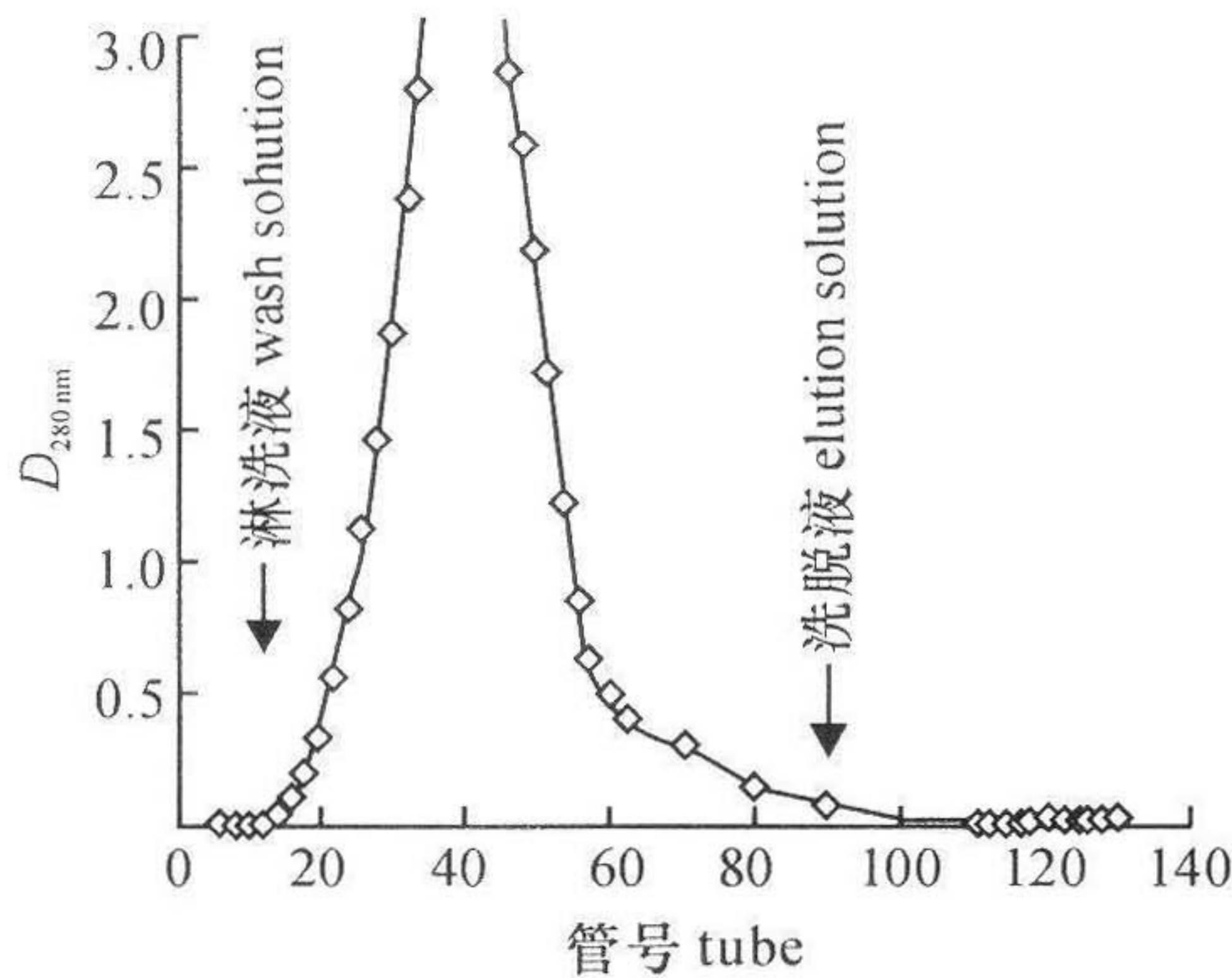
1:protein marker ;2: the proteins adsorbed by Fe_3O_4 powder from egg white;3: the lysozyme purified from egg white by affinity chromatography using 10 mmol/L NaHCO_3 containing 0.5 mol/L NaCl as the wash solution.

图4 Fe_3O_4 颗粒对蛋清蛋白的非特异吸附

Fig.4 The non-specific adsorption of Fe_3O_4 powder for proteins from egg white

2.2.3 磁性亲和介质对杂蛋白非特异性吸附的克服

蛋白质表面的羧基、氨基和羟基严重干扰了亲和介质对溶菌酶的特异吸附,因此尝试改用含 0.5 mol/L NH₄Ac 的磷酸缓冲液来进行洗涤,因为 NH₄Ac 既有氨基又有羧基,应当能交换被 Fe₃O₄ 吸附的杂蛋白而将其洗涤下来,从而消除 Fe₃O₄ 的干扰作用. 当用内含 0.5 mol/L NH₄Ac 的磷酸缓冲液洗涤 Fe₃O₄ 颗粒后,再用 0.15 mol/L HAc 洗脱时,不再出现蛋白吸收峰(图 5),表明上述洗涤液较为彻底地洗涤了颗粒上所吸附的蛋白,而该洗涤液对溶菌酶与介质的吸附却无影响,因此,内含 0.5 mol/L NH₄Ac 的磷酸缓冲液洗涤步骤是十分有效地克服非特异性吸附的方法.



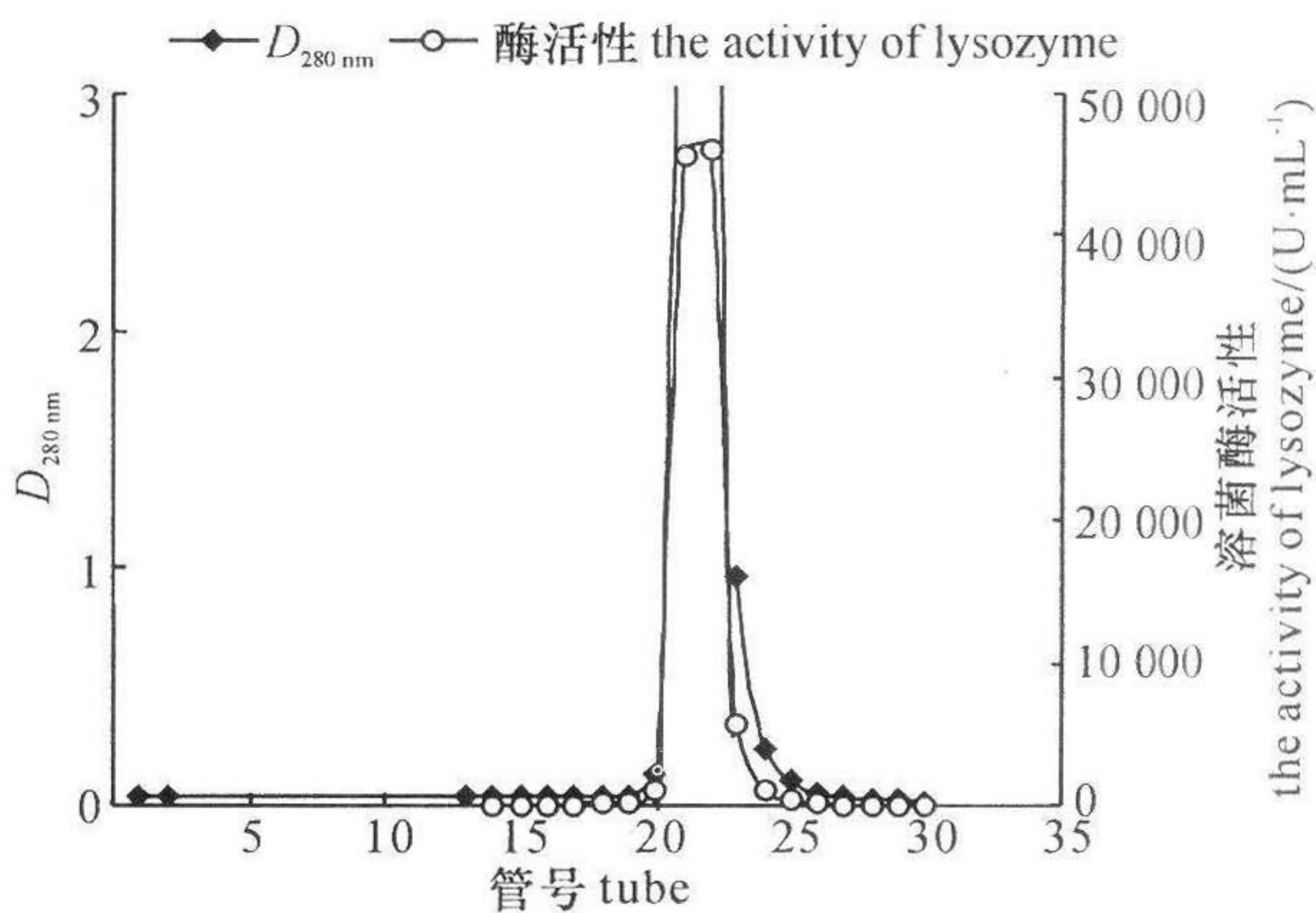
淋洗液:100 mmol/L pH7.8 的磷酸钠缓冲液内含 0.5 mol/L NH₄Ac;洗脱液:0.15 mmol/L HAc. 流速:1 mL/min,4 mL/管
wash solution:100 mmol/L pH7.8 sodium phosphate buffer containing 0.5 mol/L NH₄Ac;elution solution:0.15 mol/L HAc;
flow rate;1 mL/min,4 mL/tube

图5 淋洗缓冲液对 Fe₃O₄ 颗粒非特异性吸附的消除作用
Fig.5 The non-specific adsorption of Fe₃O₄ minimized by changing wash solution.

2.3 蛋壳残留溶菌酶的磁性亲和吸附

根据上述实验结果,确定分离操作磁性亲和吸附、洗涤和洗脱操作的条件为:搅拌开放吸附50 min,

磁性分离介质用内含 0.5 mol/L NH₄Ac 的磷酸缓冲液来进行洗涤,0.15 mol/L 的 HAc 进行洗脱(图 6). 利用此确定的条件对蛋壳残留溶菌酶进行亲和吸附分离,所得的蛋壳清洗液略显粘稠,经纱布初步过滤后尚混有一些泥沙,因为所采用的介质具有磁响应能力,因此可省去离心步骤,经开放吸附后,介质可直接用外加磁场加以回收,解决了传统的柱上洗涤时由于蛋清样品粘稠而堵塞层析柱的问题,洗涤极为方便. 洗脱所得的纯化溶菌酶对蛋白的比活性可达 50 894 U/mg(表 1),所得的纯化酶经 SDS-PAGE 分析显示单一条蛋白染色带(图 7),表明溶菌酶已得到了较好的纯化,酶活力回收约 26%,低于采用非磁性亲和吸附介质时所得的结果,这可能是由于 Fe₃O₄ 颗粒吸附了的部分溶菌酶在洗涤过程中却被丢失了的缘故.



100 mmol/L pH7.8 PBS (含 0.5 mol/L NH₄Ac) 洗涤后,0.15 mol/L HAc 洗脱,流速:4 mL / 管,1 mL / min
Washing with 100 mmol/L pH7.8 PBS (0.5 mol/L NH₄Ac) , then eluting with 0.15 mol/L HAc, the velocity of flow: 4 mL/tube,1 mL / min

图6 鸡蛋清溶菌酶磁性亲和柱层析
Fig.6 The affinity chromatography of magnetic affinity medium for lysozyme from egg white

表1 蛋壳残留溶菌酶的磁性亲和分离
Tab.1 Magnetic affinity separation of lysozyme on eggshell

纯化步骤 purification step	V(总 total) /mL	m(总蛋白 total protein) / mg	总活性 total activity / U	比活性 specific activity /(U · mg ⁻¹)	纯化倍数 purification multiple	回收率 recovery rate /%
蛋壳洗涤液 washing solution of eggshell	545	919.04	1 885 700	2 051.8	1.0	100
磁性亲和吸附 separation with magnetic affinity medium	20	9.63	490 282	50 894.0	24.8	26.0

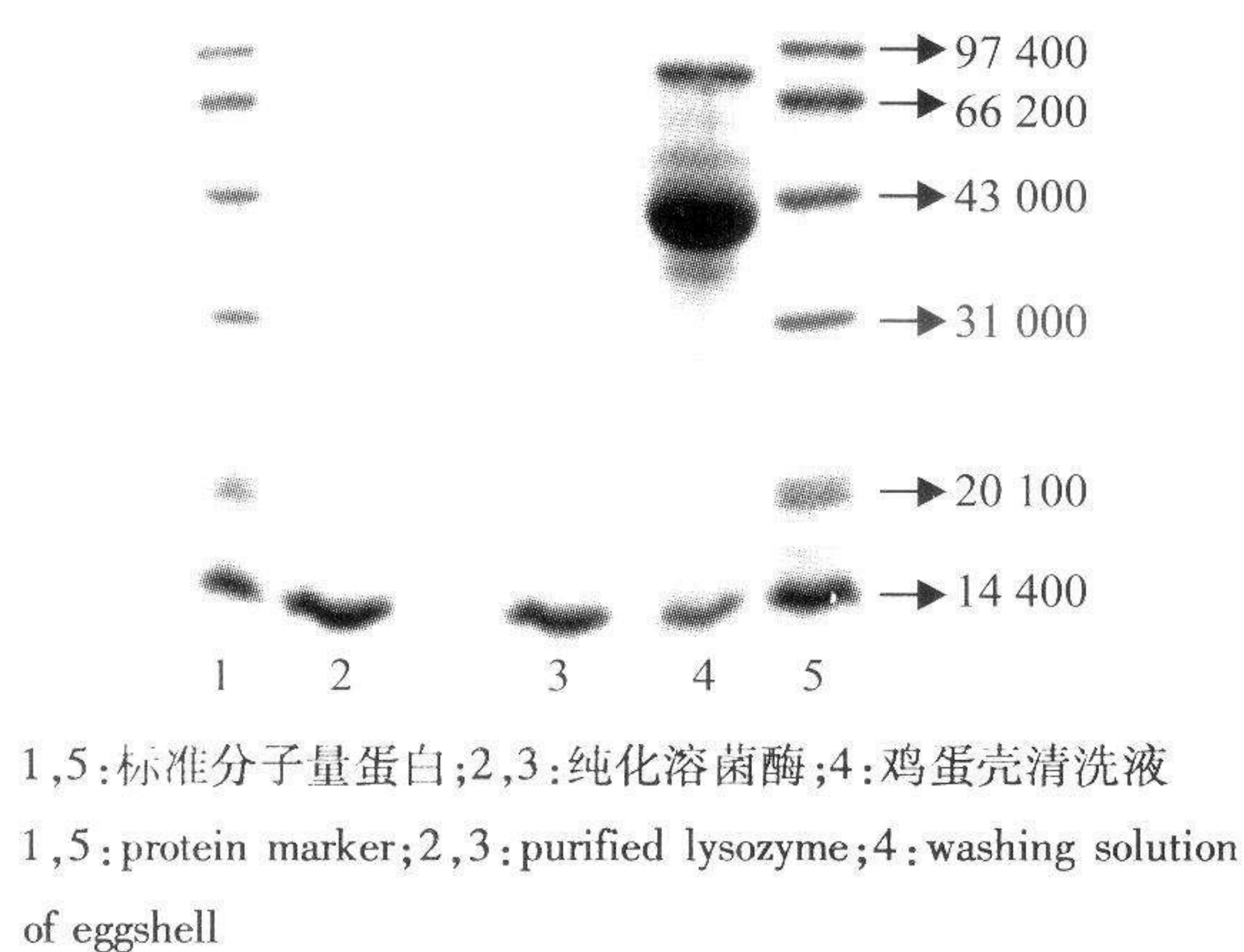


图7 纯化溶菌酶的 SDS-PAGE 分析

Fig.7 SDS-PAGE of purified lysozyme from washing solution of eggshell

3 讨论

磁性亲和介质被广泛用于分离细胞及核酸、蛋白质等生物大分子和激素等小分子生物活性物质,其优点在于通过外磁场的作用可快速地实现固液及磁性介质与其他固形物间的分离,尤其是当待分离的液体样品含有固形物或较为粘稠时,利用亲和层析技术分离溶菌酶国内外已有大量的报道,本文在原有亲和层析介质^[7]的基础上引入具磁响应性的 Fe_3O_4 颗粒,使得介质复合了特异亲和吸附和磁响应性的功能,但随着 Fe_3O_4 颗粒的引入同时又导致了介质对杂蛋白的非特异吸附,为克服这种非特异吸附,采用了内含 $0.5\text{ mol/L NH}_4\text{Ac}$ 的磷酸缓冲液进行充分洗涤,取得了较好的效果,但这种吸附最终也导致了部分活力回收的丧失。磁性分离在生物分离上已得到越来越广泛的应用,所采用的磁性颗粒均为 Fe_3O_4 ,与蛋白质分子表面 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 等基团存在相互作用,造成非特异性吸附,严重干扰试验结果,因此较为理想的方法是将 Fe_3O_4 颗粒的表面涂上一层惰性材料的膜以消除这种非特异吸附,笔者曾

经尝试用疏水的硅烷化试剂,但未取得预期的效果。

参考文献:

- [1] HIRNAO S, KANEKO H, KITAGAWA M. N-lower-fatty-acyl derivatives of chitosan as adsorbents for lysozyme and chitinase [J]. Agr Biol Chem, 1991, 55 (6): 1 683 - 1 684.
- [2] IMOTO T, HAYASHI T, FUNATSU M. Characterization of enzyme-like complex of lysozyme [J]. J Biochem, 1968, 64 (3): 387 - 392.
- [3] IMOTO T, YAGISHITA K. Chitin coated cellulose as an adsorbent of lysozyme-like enzymes: some applications [J]. Agr Biol Chem, 1973, 37 (3): 1 191 - 1 192.
- [4] IMOTO T, YAGISHITA K. Chitin coated cellulose as an adsorbent of lysozyme-like enzymes: preparation and properties [J]. Agr Biol Chem, 1973, 37 (3): 465 - 470.
- [5] YOSHIMOTO T, HAYASHIDA S, TOBIISHI M, et al. Purification of several bacteriolytic enzymes by affinity chromatography on lysozyme-lysate of *Micrococcus lysodeikticus* cell wall coupled with sepharose [J]. J Biochem (Tokyo), 1975, 78 (2): 253 - 259.
- [6] YAMADA H, FUKUMURA T, ITO Y, et al. Chitin-coated celite as an affinity adsorbent for high-performance liquid chromatography of lysozyme [J]. Anal Biochem, 1985, 146 (1): 71 - 74.
- [7] 王炜军,徐凤彩. 脱氨再生几丁质凝胶亲和层析法纯化溶菌酶[J]. 华南农业大学学报, 1996, 17(3): 59 - 63.
- [8] WEAVER G L, KNOGER M, KATZ F. Deaminated chitin affinity chromatography—a method for the isolation, purification and concentration of lysozyme [J]. J Food Sci, 1977, 42 (4): 1 084 - 1 087.
- [9] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72 (1-2): 248 - 254.
- [10] 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 1985. 116 - 129.

【责任编辑 李晓卉】