亲和-超滤载体对 His 标记重组 AxCeSD 吸附特性的研究

刘光毅，刘光，陈萍，李琳，胡松青

（华南理工大学轻工与食品学院，华南理工大学淀粉与植物蛋白深加工教育部工程研究中心，广东省天然产物绿色加工与产品安全重点实验室，广东广州 510640）

摘要：采用金属螯合亲和层析技术纯化了 N-末端组氨酸(His)标记的重组蛋白 AxCeSD。以 2000 ku 的水溶性葡聚糖 DextranT2000 为基质，亚氨基二乙酸(IDA)作为螯合剂，Cu^{2+}做亲和配基制备了能特异性吸附重组蛋白 His 标记的水溶性葡聚糖亲和-超滤载体，并探讨了 pH、离子浓度、吸附时间以及温度等因素对水溶性葡聚糖亲和-超滤载体吸附重组蛋白 AxCeSD 的影响。结果表明，在一定范围内，随着 pH 和温度的升高亲和-超滤载体对 AxCeSD 吸附量增加，而随着离子浓度的增加其对 AxCeSD 吸附量减少；亲和-超滤载体对 AxCeSD 的吸附在 30 min 内能够达到平衡。应用 Langmuir 方程拟合了等温条件下亲和-超滤载体对 AxCeSD 的吸附曲线，得到最大理论吸附量为 125.15 mg/g，解离常数为 3.259×10^{-6} mol/L，说明亲和-超滤载体对 His 标记的重组 AxCeSD 的吸附为以螯合作用为主的特异性吸附。

关键词：亲和-超滤载体；葡聚糖；重组蛋白 AxCeSD

文章篇号：1673-9078(2015)5-65-70 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.011

Adsorption Characteristics of Affinity-ultrafiltration Escort to His-tagged Recombinant AxCeSD

LIU Guang-yi, LIU Guang, CHEN Ping, LI Lin, HU Song-qing

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology; Starch And Vegetable Protein Processing Engineering Research Center of The Ministry of Education of South China University of Technology, Guangdong Key Laboratories on Green Natural Products Processing and Product Safety, Guangzhou 510640, China)

Abstract: N-terminal histidine $(His)_6$-tagged recombinant protein AxCeSD was purified by affinity chromatography. The affinity-ultrafiltration escort, Cu^{2+}-IDA-Dextran T2000 specifically able to adsorb the His-tag of recombinant protein, was synthesized using water-soluble Dextran T2000 as the matrix (molecular weight 2000 ku), iminodiacetic acid as the chelating agent, and Cu^{2+} as the affinity ligand. The effects of pH, ionic strength, adsorption time, and reaction temperature on the adsorption characteristics of the escort with N-terminal His-tagged recombinant AxCeSD were investigated. The results showed that the adsorption capacity of the affinity-ultrafiltration escort for AxCeSD increased with the increases in pH and temperature within a certain range, but decreased as the ionic strength increased. Moreover, the adsorption equilibrium could be achieved within 30 min. The isotherm adsorption curve was fitted to the Langmuir model. The maximum adsorption yield was 125.15 mg/g and the dissociation constant was 3.259×10^{-6} mol/L, indicating that the specific adsorption of the affinity-ultrafiltration escort to recombinant AxCeSD was mainly from chelation.

Key words: affinity-ultrafiltration escort; dextran; recombinant protein AxCeSD

亲和-膜过滤技术是亲和载体与目标蛋白的特异性可逆结合形成复合物，然后通过膜过滤使目标蛋白质与其他杂质分离的方法，它是亲和分离和膜分离技术相互结合的新型分离技术，具有如纯化倍数高、分离特异性高、处理量大、易于放大等优点[1~2]。目前，固定金属离子亲和层析技术作为亲和分离的一种方式已经成功地用于小型分离纯化实验[3~4]，然而亲和层析具有一些不足的地方，如处理量小、柱压大等，因此限制了它的的扩大化和工业化，不能满足实践生产的

收稿日期：2014-07-24

基金项目：高等学校博士学科点专项科研基金资助课题（博导类）（20130172110018）

作者简介：刘光毅（1989-），男，硕士，研究方向为蛋白质的原核表达、分离纯化与结构研究

通讯作者：胡松青（1972-），男，教授，博导，研究方向为蛋白质的分离纯化、结构功能与应用

需要。将过渡金属离子亲和配基引入水溶性亲和载体，开发出可以实现对一类蛋白质进行亲和分离的亲和-膜分离载体对重组蛋白质的分离领域和生物医药工程下游技术的发展具有重要的意义。本实验中以 2000 ku 的水溶性葡聚糖 DextranT2000 为基质，亚氨基二乙酸(IDA)作为螯合剂，Cu^{2+}做亲和配基制备了水溶性葡聚糖亲和-超滤载体[5]。该载体中的 Cu^{2+}可以与组氨酸(His)标记的重组蛋白中的 His 标签以配位键可逆结合（螯合作用），为特异性分离该类带 His 标记的重组蛋白提供了强有力的作用力。此外，蛋白质之间静电作用和疏水作用也是不容忽视的，但这种作用远不如配位作用那么牢固，其受溶液环境影响较大，也是影响分离纯化率不可忽视的重要因素[6]。

在醋酸杆菌 *Acetobacterxylinum* 中，由 4 个不同亚基组装而成的跨膜末端蛋白聚集体具有合成、组装和排出纤维素的功能，AxCeSD 是其中一个亚基，在醋酸杆菌中承担纤维素葡聚糖链的排出和结晶[7]。AxCeSD 由 156 个氨基酸残基组成，分子量为 17.3 ku。本文应用水溶性葡聚糖亲和-超滤载体分离含有 N-末端 His-标记的重组 AxCeSD，并研究不同条件下亲和-超滤载体对重组蛋白 AxCeSD 吸附量的变化，了解不同实验因素对亲和-超滤载体吸附 His-标记蛋白分离特性的影响，为实现亲和-超滤载体分离基因重组蛋白提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

重组 AxCeSD 的大肠杆菌 *E.coli* B384，即自行构建的重组 AxCeSD（带有 N-末端 His 标记）质粒在宿主细菌 *E.coli*B384 中表达，AxCeSD 的表达基因片段来源于木醋杆菌 *Acetobacterxylinum*；葡聚糖，Dextran T2000，相对分子量 200 ku，美国 Sigma 公司，分析纯；亚氨基二乙酸(IDA)，上海楷洋生物技术有限公司，分析纯；其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

TF2A5L 型全自动发酵罐，韩国 Biotron 公司；VCX 500 型超声破碎仪，美国 Sonics 公司；AKTA Purifier 型蛋白质快速层析分离系统，美国 GE 公司；超速冷冻离心机，美国 Sigma；Waters2695 型凝胶色谱仪，美国 Waters 公司；Zeta weight Nano ZS 型 Zeta 电位分析仪，英国 Malven 公司；30 ku 超滤离心膜，美国 millipore。

1.3 试验方法

1.3.1 水溶性葡聚糖亲和-超滤载体的制备

以分子量 200 ku 的水溶性葡聚糖 DextranT2000 为基质，亚氨基二乙酸(IDA)作为螯合剂，Cu^{2+}做亲和配基制备出大分子水溶性葡聚糖亲和-超滤载体，具体制备方法参见文献[5]。

1.3.2 水溶性葡聚糖亲和-超滤载体分子量分布的测定

大分子亲和-膜过滤载体分离蛋白质是基于将分子量相对较大的亲和-膜过滤载体与目标蛋白质分子依靠特异性吸附形成分子量远大于其它杂质分子的结合体，再应用超滤膜的筛分作用将结合体与其它杂质分子分离。因此，亲和-膜过滤载体的分子量分布是表征其性能的指标之一。利用凝胶渗透色谱(GPC)分析水溶性葡聚糖亲和-超滤载体分子量分布，所用色谱柱为 TSK-GELPWxl 3000 和 PWxl 5000，流动相为 0.02 mol/L KH_2PO_4，流速为 0.6 mL/min，采用 Waters2714 示差检测器，柱温及检测温度均为 35 ℃，首先取已知不同分子量的葡聚糖标准品绘制标准曲线，然后取适量制备好的水溶性葡聚糖亲和-超滤载体，将其稀释为 4 mg/mL 用于 GPC 测定。

1.3.3 重组蛋白表达和纯化

采用 LB 液态培养基培养重组 AxCeSD 的大肠杆菌 *E.coli* B384，在菌液的 OD_{600} 值达到 0.6~0.8 时，添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达 18 h[8]。高速离心后获得的菌体经超声破碎后，离心取上清液进行固定化金属亲和层析(IMAC)。将分离纯化得到的纯 AxCeSD 溶液采用 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)，0.2 M NaCl 缓冲液在 4 ℃下透析 48 h，透析袋的截留分子量为 5000 Da。透析完成后，将蛋白质溶液置于-80 ℃冰箱中冷冻，再经真空冷冻干燥制成粉末备用。

1.3.4 重组蛋白 AxCeSD 的浓度测定

采用 280 nm 紫外吸收法测定重组蛋白 AxCeSD 的浓度[9]。

1.3.5 重组蛋白的等电点测定

本文采用 Zeta 电位仪测定等电点，其原理是根据激光多普勒法测定体系的电泳淌度，然后将其转换为 Zeta 电位值，将测定的 Zeta 电位值对 pH 值自动作图，Zeta 电位为零时所对应的 pH 值即为所测蛋白质溶液的等电点[10]。

1.3.6 不同条件对水溶性葡聚糖亲和-超滤载体吸附 AxCeSD 特性的影响

取 5 mL 浓度为 4 mg/mL 的水溶性葡聚糖亲和-

超滤载体溶液和浓度为 0.4858 mg/mL AxCeSD 溶液 5 mL，在水浴中恒温至 25 ℃后混合，加入 1.5 mol/L NaCl 溶液使反应体系的离子浓度为 0.9 mol/L，用 0.1 mol/L NaOH 调节反应液 pH 至 8.0，在 25 ℃搅拌反应 1 h。在进行 pH、离子强度和吸附反应时间等操作条件对重组 AxCeSD 吸附量的影响实验时，保持其它条件不变。反应完成后，用截留分子量为 100 ku 的超滤膜，以 4 ℃、2739×g 离心力的条件离心超滤 3 次，每次 15 min。收集滤出液，测量滤出液中重组 AxCeSD 的含量，根据测量结果作出水溶性葡聚糖亲和-超滤载体对 AxCeSD 吸附量随 pH 值、离子浓度、吸附时间以及温度变化的曲线。

1.3.7 水溶性葡聚糖亲和-超滤载体对重组 AxCeSD 的等温吸附曲线

配制浓度为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mg/mL 的重组 AxCeSD 溶液。取 5 mL 亲和-超滤载体溶液，分别加入 5 mL 不同浓度重组 AxCeSD 溶液，加入 2.7 mol/L 的 NaCl 溶液使反应体系的 NaCl 浓度为 0.9 mol/L，调节 pH 值为 8，恒温水浴 30 ℃搅拌反应 30 min。反应完成后，用截留分子量为 100 ku 的超滤膜，以 4 ℃、2739×g 离心力的条件离心超滤至滤出液中不再含有重组 AxCeSD，收集滤出液，测量滤出液中重组 AxCeSD 的含量。根据测量结果得到平衡吸附时，亲和-超滤载体对 AxCeSD 的平衡吸附量，采用 Langmuir 等温吸附方程拟合实验数据，得到亲和-超滤载体对重组 AxCeSD 的最大理论吸附量和解离常数。

1.3.8 数据分析

采用 Origin 8.5，Excel 2010 对试验数据进行分析、处理。

2 结果与讨论

2.1 载体的分子量分布

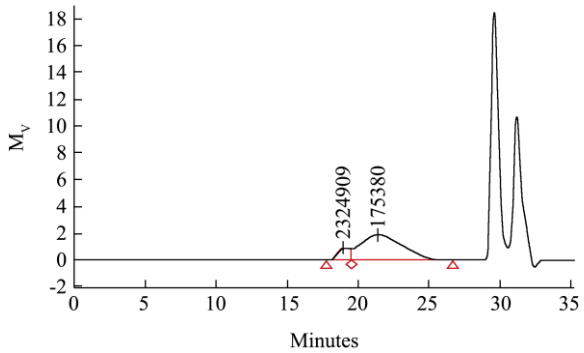


图 1 水溶性亲和-超滤载体的 GPC 图谱

Fig.1 GPC spectrum of water-soluble affinity-ultrafiltration escort

利用 GPC 测得载体分子量分布见图 1。从图中可以看出，水溶性葡聚糖亲和-超滤载体呈现出分子量较大的 1 号峰和分子量较小的 2 号峰，由 GPC 软件处理分别得到 1 号峰和 2 号峰所的重均分子量(Mw)、数均分子量(Mn)、峰位分子量(Mp)及分子量的分布宽度(Mw/Mn)(见表 1)。由表 1 中的数据可以看出所制备的亲和-膜过滤载体的分子量分布范围为 236.47~2380.53 ku，能够满足以截留分子量为 100 ku 的超滤膜分离蛋白质的需要。

表 1 水溶性亲和-超滤载体的相对分子量分布

Table 1 Molecular weight distribution of water-soluble affinity-ultrafiltration escort

	Mn	Mw	Mp	Mw/Mn
1 号峰	2070822±154	2380533±245	2324909±108	1.15
2 号峰	73331±12	236467±62	175380±57	3.22

2.2 重组蛋白 AxCeSD 的分离纯化

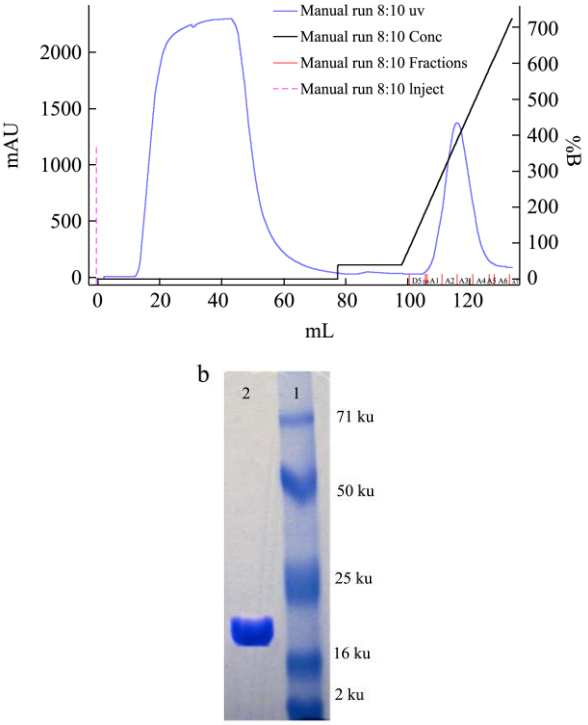


图 2 (a) AxCeSD 的金属螯合层析图谱；(b) AxCeSD 纯化收集蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 (a) Metal chelating chromatography of AxCeSD and (b) SDS-PAGE of proteins collected during affinity purification of AxCeSD

注：1：标准分子量蛋白；2：咪唑洗脱收集蛋白。

图 2a 是以洗脱缓冲液体积为横坐标、280 nm 处吸光度为纵坐标的亲和层析分离图谱。前后出现的两个峰分别为穿透峰和洗脱峰，在含咪唑浓度为 0.1 mol/L~0.25 mol/L 的洗脱缓冲液中获得了与 Ni^{2+}离子

特异性结合的带 His 标记的 AxCeSD 目的蛋白，SDS-PAGE 的结果如图 2b 所示，目的蛋白与其它杂蛋白得到很好的分离，在分子量为 16 kD~25 kD 的蛋白条带之间得到了一个单一条带，这与 AxCeSD 的分子量为 17.3 kD 基本相符。

2.3 重组蛋白 AxCeSD 的等电点测定

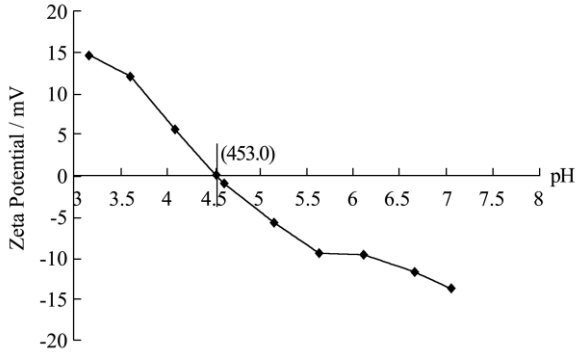


图 3 重组 AxCeSD 的 Zeta 电位曲线

Fig.3 Zeta potential curves of recombinant AxCeSD

重组 AxCeSD 的 Zeta 电位随溶液 pH 变化的曲线如图 3 所示，发现在 pH 为 4.53 时重组 AxCeSD 的 Zeta 电位为 0，因此，重组 AxCesD 的等电点为 4.53，即重组 AxCeSD 为酸性蛋白。当环境 pH 小于 4.53 时，重组 AxCeSD 呈现出阳离子性质，而当环境 pH 大于 4.53 时，重组 AxCesD 呈现出阴离子性质。

2.4 pH 对水溶性葡聚糖亲和-超滤载体吸附 AxCeSD 的影响

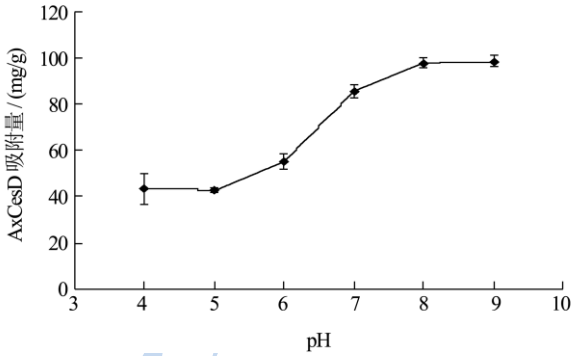


图 4 pH 对载体吸附重组 AxCeSD 的影响

Fig.4 Effect of pH on the adsorption characteristics of the escort with AxCeSD

图 4 探讨了 pH 在 4~9 范围内，亲和-超滤载体对 AxCeSD 吸附量的影响。从图 4 可以得出随着 pH 的上升，载体对 AxCeSD 吸附量在不断增加，究其原因是当 pH 大于其等电点 4.53 后，重组蛋白 AxCeSD 自身所带的正电荷减少，负电荷增加，与载体中带正电荷金属配基的静电排斥作用减弱，促进了吸附的进行。此外，重组蛋白 AxCeSD 上一些基团（如组氨酸上的咪唑基，pKa 为 5.71）在 pH 的变化中逐渐带负电荷，增强了与载体之间的静电引力，导致重组蛋白 AxCeSD 的吸附量上升。

2.5 离子浓度对水溶性葡聚糖亲和-超滤载体吸附 AxCeSD 的影响

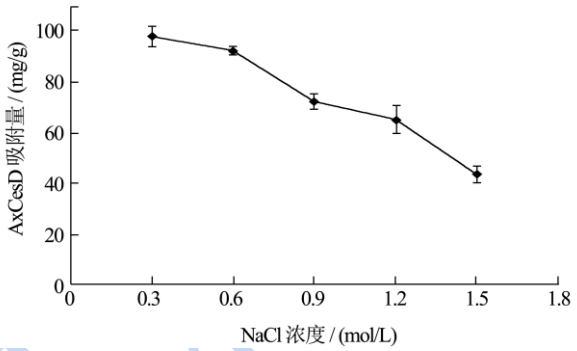


图 5 离子强度对载体吸附 AxCeSD 的影响

Fig.5 Effect of ionic strength on the adsorption characteristics of the escort with AxCeSD

研究了吸附反应体系中的 NaCl 浓度分别为 0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 mol/L 时，水溶性葡聚糖亲和-超滤载体吸附重组 AxCeSD 的变化趋势。结果如图 5 所示，水溶性葡聚糖亲和-超滤载体对重组 AxCeSD 的吸附量随着离子强度的增加持续减少。因此，反应体系中的离子强度是影响水溶性葡聚糖亲和-超滤载体对重组 AxCeSD 吸附的重要因素之一。由于重组 AxCeSD 表面存在有水化层，随着离子强度的上升，离子对极性水分子的吸附，导致水化层减薄，表面疏水性“补丁”外露，蛋白质疏水性增强，与亲水性的水溶性葡聚糖亲和-超滤载体载相互作用减弱；此外，离子强度的增加，减少了水溶性葡聚糖亲和-超滤载体与蛋白质之间的离子键作用，因此水溶性葡聚糖亲和-超滤载体对重组 AxCeSD 的吸附量随着离子强度的增加而减少。

2.6 吸附时间对水溶性葡聚糖亲和-超滤载体吸附 AxCeSD 的影响

载体与 AxCeSD 的吸附是个动态过程，吸附的同时也会发生解吸附，当吸附速度大于解吸附速度时，随着时间的增长，吸附量会不断增加。而当两者速度相等时，吸附量不再增加，此时有最大吸附量，具体影响见图 6。从图中可以得出 10 min 后，亲和超滤载

体对 AxCeSD 的吸附量接近最大吸附量的 90%，说明载体与 AxCeSD 的吸附速度远远大于解吸附速度。当时间从 10 min 到 30 min 时，载体对 AxCeSD 吸附量缓慢增加，30 min 时有最大吸附量，此时吸附与解吸附动态平衡。当时间延长到 60 min，吸附量基本不变略微有下降的趋势，这可能是因为随着时间的延长，物理作用导致亲和载体与 AxCeSD 结合键的力度减弱，使得重组蛋白被解吸出来。

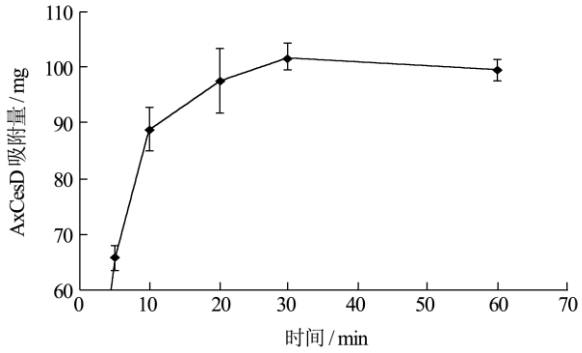


图 6 吸附时间对载体吸附 AxCeSD 的影响

Fig.6 Effect of reaction time on the adsorption characteristics of the escort with AxCeSD

2.7 温度对水溶性葡聚糖亲和-超滤载体吸附 AxCeSD 的影响

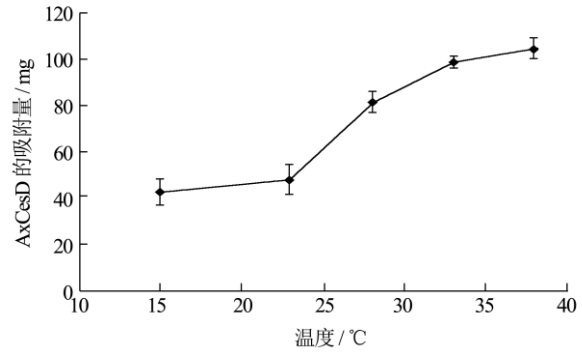


图 7 温度对载体吸附 AxCeSD 的影响

Fig.7 Effect of temperature on the adsorption characteristics of the escort with AxCeSD

研究了反应温度为 15、23、28、33、38 ℃时，水溶性葡聚糖亲和-超滤载体对重组 AxCeSD 的吸附量的变化规律，结果见图 7。从图中可以看出，随着温度的升高，水溶性葡聚糖亲和-超滤载体对 AxCeSD 的吸附量不断增大。实验结果表明，水溶性葡聚糖亲和-超滤载体与重组 AxCeSD 的吸附反应应该是一个吸热过程，温度的升高对水溶性葡聚糖亲和-超滤载体与重组 AxCeSD 形成结合体有利。而且，根据化学动力学，温度的升高往往有利于提高反应速率。但是，对于蛋白质，温度的增加会降低蛋白质的稳定性，使其空间结构发生改变。考虑到 30 ℃左右一般不会引起多数蛋白质变性，因此，在实际操作中可在不影响 AxCeSD 结构和性质下尽可能选择较高的吸附温度，如 30 ℃。

2.8 水溶性葡聚糖亲和-超滤载体对 AxCeSD 的等温吸附曲线

Langmuir 吸附常被用于描述吸附平衡，当吸附剂表面被目标分子“占满”后达到吸附的最大量。亲和一超滤载体与目标分子的结合是特异性吸附，在亲和一超滤载体上每一个可以亲和吸附目标蛋白质的位点只能特异性地与目标蛋白中一个分子结合，而且，在超滤过程中经过了大量的缓冲液清洗杂蛋白的过程，因此，亲和一超滤载体与目标分子的结合应建立在单层吸附的理论上。因此，亲和一超滤载体与蛋白质的特异性吸附可以采用 Langmuir 等温曲线方程进行描述:

$$Q=\frac{Q_{\max}\times k\times C}{1+k\times C}$$

注: Q-蛋白质的平衡吸附量(mg/g); Q_{max}-蛋白质在载体上的饱和吸附量(mg/g); k-Langmuir 解离常数(mg/mL); C-蛋白质浓度(mg/mL)。

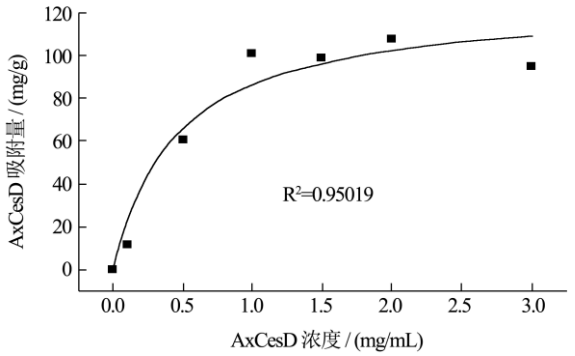


图 8 重组蛋白 AxCeSD 吸附等温线

Fig.8 Isotherm adsorption curve of recombinant AxCeSD

实验中，研究了 30 ℃下，亲和一超滤载体与 AxCeSD 的等温吸附特性。如图 8 所示，采用 Oringin8.5 软件进行 Langmuir 等温吸附线模拟，所得拟合方程相关系数的平方 R^2=0.9502，说明 Langmuir 等温吸附方程能较好地拟合，亲和-超滤载体对 AxCeSD 的吸附同样符合单分子层吸附。从等温吸附方程式可以得出，水溶性葡聚糖亲和-超滤载体对 AxCeSD 的最大理论吸附量为 125.15 mg/g，解离常数为 0.4563 mg/mL。该载体吸附溶菌酶的最大理论吸附量为 13.65 mg/g，解离常数为 3.019 mg/mL[11]。由此可见，其对重组

AxCeSD 的最大理论吸附量是对溶菌酶的最大理论吸附量的 10 倍左右。而且，重组 AxCeSD 在溶液中往往以八聚体（约 140 ku）的形式存在，其解离常数约合 3.259×10^{-6} mol/L。特异性吸附的解离常数一般在 10^{-6}~10^{-8} mol/L 之间，水溶性葡聚糖亲和-超滤载体对 AxCeSD 的解离常数的数量级为 10^{-6}，表明特异性的螯合作用在水溶性葡聚糖亲和-超滤载体对重组 AxCeSD 的吸附中起主要作用。

3 结论

亲和-超滤载体的分子量分布在 17.538~232.49 ku，可选择截留分子量为 100 ku 的超滤膜进行亲和-超滤分离操作；重组蛋白 AxCeSD 的等电点为 4.53；一定范围内 pH 或温度的增加有利于亲和-超滤载体对 AxCeSD 的吸附；离子浓度的增加则不利于亲和-超滤载体与 AxCeSD 的吸附，具有较大的抑制作用；亲和-超滤载体对 AxCeSD 的吸附在短时间内能够达到平衡，应用 Langmuir 方程拟合了等温条件下亲和-超滤载体对 AxCeSD 的吸附曲线，得到最大理论吸附量为 125.15 mg/g，解离常数为 3.259×10^{-6} mol/L，说明特异性的螯合作用在亲和-超滤载体吸附重组 AxCeSD 过程发挥主要作用。

参考文献

[1] Mattiasson B, Ramstorp M. Ultrafiltration affinity purification: isolation of concanavalin a fromseeds of canavalia ensiformis [J]. Journal of Chromatography A, 1984, 283: 323-330

[2] 罗宁,杨慧林,沈徐凯,等.转谷氨酰胺酶酶原在枯草芽孢杆菌WB800中的表达[J].现代食品科技,2011,7:734-737
LUO Ning, YANG Hui-lin, SHEN Xu-kai, et al. Expression of pro-transglutaminase in Bacillus subtilis WB800 [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 7: 734-737

[3] Elmer J, Harris D, Palmer A F. Purification of hemoglobin from red blood cells using tangential flow filtration and immobilized metal ionaffinity chromatography [J]. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical and Life Sciences, 2011, 879(2): 131-138

[4] Chatterjee S, Schoepe J, Lohmer S, et al. High level expression and single-step purification of hexahistidine-tagged l-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase making use of a versatile expression vector set [J]. Protein Expression and Purification, 2005, 39(2): 137-143

[5] 赵玮.基因重组蛋白水溶性亲和-超滤载体的制备与初步应用[D].广州:华南理工大学,2010
ZHAO Wei. Preparation and application of water-soluble affinity-ultrafiltration vector of recombinant protein [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010

[6] 李蓉,邸泽梅,陈国亮.金属螯合亲和色谱中固定金属与蛋白质的作用[J].分析化学,2002,30(5):552-555
LI Rong, DI Ze-mei, CHEN Guo-liang. The reaction between Fixed metal and protein in Metal chelating chromatography [J]. Chinese Journal of Analytieal Chemistry, 2002, 30(5): 552-555

[7] Hu S Q, Gao Y G, Tajima K, et al. Structure of bacterial cellulose synthase subunit D octamer with four inner passageways [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010, 107(42): 17957-17961

[8] 胡松青,沈兴,陈萍等.N-和C-末端组氨酸标记基因重组AxCeSD的柱层析分离特性[J].化工学报,2010,1:99-103
HU Song-qing, SHEN Xing, CHEN Ping, et al. Column chromatographic separation characteristics of gene recombinant protein AxCeSD with N- and C-terminal histidine-tags [J]. CIESC Journal, 2010, 1: 99-103

[9] Watson L, Veeraragavan K. Dilution-free protein concentration measurement by absorbance at 280 nm for high protein concentration samples [J]. Biopharm International, 2014, 27(2): 26-37

[10] Rezwan K, Meier L P, Gauckler L J. A prediction method for the isoelectric point of binary protein mixtures of bovine serum albumin and lysozyme adsorbed on colloidal titania and alumina particles [J]. Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids, 2005, 21(8): 3493-3497

[11] 陈萍,赵玮,李琳,等.水溶性葡聚糖亲和-超滤载体对溶菌酶吸附分离特性的研究[J].食品工业科技,2011,8:84-86
CHEN Ping, ZHAO Wei, LI Lin, et al. Adsorption characteristic of dextran affinity-ulttafittration escort to lysozyme [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 8: 84-86