

接枝不同金属配基的 pH 敏感型聚合物的制备 及对木瓜蛋白酶的纯化

许英豪¹, 袁德保², 张海德¹, 李芬芳², 李奕星², 王朝政², 陈娇², 彭建¹, 董安华¹

(1. 海南大学食品学院, 海南海口 570100)

(2. 中国热带农业科学院海口实验站海南省香蕉遗传改良重点实验室, 海南海口 570102)

摘要: 本文以四种丙烯酸类单体合成了一种 pH 敏感型聚合物 (PMDMN)。该聚合物连接金属螯合剂 (IDA) 后与 Cu^{2+} 或 Fe^{3+} 通过配位键形成聚合物 PMDMN-Cu 或 PMDMN-Fe。首先对聚合物的红外光谱、等电点及回收率进行了测定。其次, 探讨了 PMDMN-Cu、PMDMN-Fe 对木瓜蛋白酶粗酶的吸附条件, 包括 pH、时间及 NaCl 浓度。通过对洗脱液的酶活回收率的测定, 考察了咪唑、盐酸胍、EDTA 及其浓度配比的洗脱效果。最后通过 SDS-GAGE 对最优洗脱条件的酶液纯度进行了验证。结果显示: 接枝金属配基前后的等电点分别为 5.15 或 5.08, 回收率皆大于 95% (5 个吸附-洗脱循环后); PMDMN-Cu、PMDMN-Fe 最适吸附 pH 值均为 7.0, 并于 120 min 和 210 min 达到吸附平衡, 最大吸附量分别为 5.09 mg、4.58 mg, NaCl 浓度的增加能一定程度增加木瓜蛋白酶的吸附量。在洗脱方案中, 0.5 mol/L 咪唑+1.0 mol/L 盐酸胍具有最好的洗脱效果, 洗脱率皆接近 95%, 同时不会造成金属配基的泄露。SDS-PAGE 显示 PMDMN-Cu 和 PMDMN-Fe 都能大幅度提高木瓜蛋白酶的纯度, 纯化倍数分别为 4.29 和 4.48。

关键词: pH 敏感型聚合物; 木瓜蛋白酶; 纯化

文章篇号: 1673-9078(2016)2-158-163

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.024

Preparation of A pH-sensitive Polymer Grafted with Different Metal Ligands and the Purification of Papain

XU Ying-hao¹, YUAN De-bao², ZHANG Hai-de¹, LI Fen-fang¹, LI Yi-xing², WANG Chao-zheng², CHEN Jiao²,
PENG Jian¹, DONG An-hua¹

(1.Hainan University, College of Food, Haikou 570100, China) (2.Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou
Experimental Station, Hainan Key Laboratory of Banana Genetic Improvement, Haikou 570102, China)

Abstract: A pH-sensitive polymer (P_{MMDMN}) was synthesized from four types of acrylic monomers. Polymer $P_{\text{MMDMN-Cu}}$ or $P_{\text{MMDMN-Fe}}$ was obtained after P_{MMDMN} was attached to a metal chelating agent, and then chelated with Cu^{2+} or Fe^{3+} via a coordination bond. First, the infrared spectra, isoelectric point, and recovery rate of the polymer were determined. Second, the adsorption conditions of $P_{\text{MMDMN-Cu}}$ and $P_{\text{MMDMN-Fe}}$ on the crude papain, including pH, time, and NaCl concentration, were explored. Based on the measurement of enzyme activity recovery rate, the elution efficacies of imidazole, guanidine hydrochloride, and ethylenediaminetetraacetic acid and their combinations were evaluated. Finally, enzyme purity under optimal elution conditions was verified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The results showed that the isoelectric points before and after grafting of the metal ligand were 5.15 and 5.08, respectively; the recovery rate was higher than 95% after five adsorption-elution cycles. The optimum pH value for adsorption by $P_{\text{MMDMN-Cu}}$ or $P_{\text{MMDMN-Fe}}$ was 7.0, and $P_{\text{MMDMN-Cu}}$ and $P_{\text{MMDMN-Fe}}$ reached adsorption equilibrium at 120 and 210 min, respectively, with maximum adsorption capacities of 5.09 and 4.58 mg/g, respectively. The amount of adsorbed papain increased with increasing NaCl concentration to some extent. In all elution methods, the combination of 0.5 M imidazole with 1.0 M guanidine hydrochloride showed the best elution effect, with an elution rate close to 95% and without metal ligand leakage. The electrophoresis results revealed that both $P_{\text{MMDMN-Cu}}$ and $P_{\text{MMDMN-Fe}}$ largely improved the purity of papain, with purification folds of 4.29 and 4.48, respectively.

Key words: pH-sensitive polymer; papain; purification

收稿日期: 2015-05-05

基金项目: 国家自然科学基金 (31260401); 海南大学服务地方经济社会发展项目 (HDSF201306)

作者简介: 许英豪(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向为农产品贮藏与加工; 通信作者: 袁德保(1982-), 男, 博士, 助理研究员

科学研究及医药等领域对高纯度木瓜蛋白酶的需求越来越大,而目前尚缺乏大规模且价格低廉的纯化方法。目前对木瓜蛋白酶的纯化主要采取的研究手段包括亲和膜分离^[1]及双水相萃取等^[2]。

亲和沉淀技术指基于聚合物的可逆沉淀特性及亲和配基与目标物的亲和作用而达到纯化目的的一类新技术。依据聚合物响应性的不同,可分为温敏型、光敏型、pH敏感型。其中pH敏感型聚合物的可逆溶解特性与pH紧密相关^[3]。典型的pH响应型溶解可逆聚合物是由丙烯酸类单体通过聚合反应合成,合成后作为载体用于生物大分子的亲和沉淀。根据目标物特性的不同选取合适配基是亲和沉淀技术关键步骤。常见的亲和配基有金属离子、亲和染料等类型。以过渡金属离子(如Cu²⁺等)或硬酸金属离子Fe³⁺作为亲和配基进行亲和纯化都已有一些成功的案例^[4-6]。

目前尚未见采用亲和沉淀技术开展木瓜蛋白酶纯化方面的研究。前期实验中已比较不同金属离子与IDA之间结合的稳定性,发现Cu²⁺和Fe³⁺与IDA结合得最好。因此,本文首先合成pH敏感型的聚合物,考察并比较不同类型金属离子配基(Cu²⁺、Fe³⁺)对木瓜蛋白酶的纯化效果,以期为木瓜蛋白酶的大规模纯化提供技术和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲基丙烯酸(MAA)、甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEMA)、甲基丙烯酸甲酯(MMA)、N-羟甲基丙烯酰胺(N-MAM)、偶氮二异丁腈(AIBN)、硫酸铜、氯化铁,分析纯,阿拉丁试剂有限公司;SDS-PAGE试剂盒,北京康为试剂有限公司;木瓜蛋白酶粗酶,广西南宁东恒华道生物科技有限责任公司;其他主要试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

Alpha-4 冷冻干燥机(德国 Matrin Christ 公司); CR-22G 冷冻高速离心机(日本 Hitachi 公司); UV-1800 紫外分光光度计(日本岛津公司); 恒温摇床(上海智诚分析仪器制造有限公司); PHS-3CpH 计(上海雷磁仪器厂); Nano S90 Zeta 电位仪(Malvern 公司); MagnaIR 550 红外光谱仪(Nicolet 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 聚合物的合成及金属配基的连接

参考前人文献^[7],单体选用MAA、DMAEMA、

MMA、N-MAM。其中甲基丙烯酸(MAA)作为酸性单体、甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEMA)作为碱性单体,甲基丙烯酸甲酯(MMA)用于调节聚合物的亲水疏水平衡,N-羟甲基丙烯酰胺(N-MAM)为聚合物链引入活性羟基,使得聚合物能够被活化并能连接亲和配基^[8-9]。依据前期实验,上述单体选用9:5:5:1的比例。在氮气保护下,溶于无水乙醇中,加入引发剂偶氮二异丁腈(AIBN),65℃下反应12h(恒温摇床中,120 r/min)。聚合物从无水乙醇中析出,用无水乙醇和丙酮对聚合物(抽滤即得)反复洗涤三次,以去除未反应的单体及甲基丙烯酸自聚物,将得到的聚合物(记为P_{MDMN})真空干燥至恒重。将1g P_{MDMN}溶于100 mL蒸馏水中,缓慢加入0.4 mL的环氧氯丙烷,密封,并于40℃反应2h(恒温摇床中,200 r/min)。将1.5 g亚氨基二乙酸(IDA)加入到30 mL浓度为1 mol/L的Na₂CO₃溶液中充分反应。将上述两种溶液混合、密封,60℃下反应24h(恒温摇床中,120 r/min)。调节pH值使沉淀析出,将沉淀复溶于水,加入20 mmol Cu²⁺或Fe³⁺(分别以CuSO₄或FeCl₃溶液形式)溶液,40℃下反应3h(恒温摇床中,120 r/min),再次调节溶液pH值使沉淀析出,将沉淀(分别记为P_{MDMN-Cu}、P_{MDMN-Fe})真空干燥备用。

1.3.2 红外光谱测定

傅立叶变换红外光谱(FT-IR, Nicolet Nexus for Euro)采用传输模式在室温下获得,将样品与光谱纯KCl混合后压片,收集波数400~4000 cm⁻¹谱图。扫描次数为32次。

1.3.3 等电点(pI)及回收率测定

对P_{MDMN}、P_{MDMN-Cu}及P_{MDMN-Fe}的等电点进行测定。将系列聚合物配制成0.1 mg/mL的水溶液,将溶液体系的pH调为9.0。溶液搅拌均匀后,将溶液的pH值由碱性向酸性进行滴定。Zeta 电位为0时对应的pH值即为pI。将200 mg上述聚合物分别加入10 mL水溶液中,完全溶解后调节溶液的pH值至等电点,溶液10000 r/min下离心10 min,将沉淀低温烘干至恒重,称重(计为M),并将上述步骤循环5次。回收率(X)计算公式如下:

$$X = \frac{M}{200} \times 100\%$$

1.3.4 木瓜蛋白酶的吸附及洗脱

将0.1 g P_{MDMN-Cu}或P_{MDMN-Fe}溶于10 mL 2%(m/V)的木瓜蛋白酶粗酶溶液中(pH值为5.5至9.0, NaCl浓度介于0至1.0 mol/L),室温下振摇0到4h,调节pH值至pI,3000 r/min离心10 min并收集沉淀。将吸附有木瓜蛋白酶的聚合物溶于10 mL系列洗脱液

中 (1 mol/L NaCl 或含有 1 mol/L NaSCN 的 0.1 mol/L pH 7.0 Tris-HCl), 30 °C 振荡 6 h (恒温摇床中, 120 r/min)。调节 pH 至 pI, 3000 r/min 离心 10 min, 上清液经超滤除盐后 (通过 3.5 ku 的透析袋) 进行定容, 以备酶活测定。

1.3.5 木瓜蛋白酶的活性测定

以酪蛋白为底物, 测定木瓜蛋白酶的活性。以 0~100 μg/mL 的 L-酪氨酸溶液浓度为横坐标, 对应浓度在 280 nm 下的吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。酶活性单位定义(U): 在测定条件下每分钟水解酪蛋白释放出的三氯乙酸可溶物在 280 nm 处的吸光值相当于浓度为 1 μg/mL 酪氨酸消光时所需的酶量, 为一个酶活性单位。

1.3.6 SDS-PAGE

根据 Laemmli 的方法^[10], 在不连续缓冲系统上进行 SDS-PAGE 电泳分析, 浓缩胶和分离胶的浓度分别为 4.5%(m/V)和 12.5%(m/V), 考马斯亮蓝 R-250 染色。样品缓冲液为非还原样品缓冲液。

1.4 数据分析

每个实验平行 3 次。采用 Origin 8 软件进行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 聚合物的合成及表征

2.1.1 红外光谱

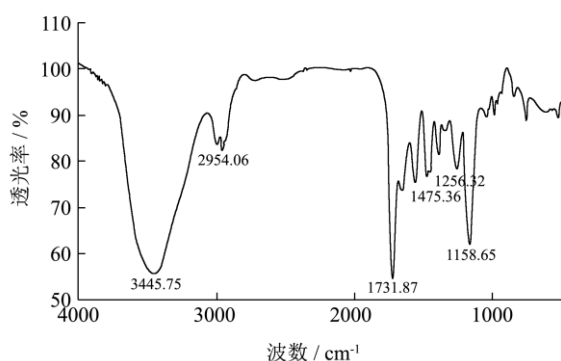


图 1 P_{MDMN} 的红外图谱图

Fig.1 FTIR spectrum of P_{MDMN}

P_{MDMN} 型聚合物红外图谱见图 1。由文献知^[4,9], 3400-3500 cm⁻¹ 处的吸收峰为羟基伸缩振动的吸收峰; 3000~2800 cm⁻¹ 处的吸收峰为酯基上 CH₃ 和 α-CH₃ 的振动吸收峰; 1750~1730 cm⁻¹ 处的吸收峰为羧基的拉伸振动的吸收峰; 1470~1480 cm⁻¹ 处的吸收峰为聚合物长链中 -(CH₂)_n- 中吸收峰; 1300~1200 cm⁻¹ 处的吸收双峰为酯基的 C-O-C 的拉伸振动的吸收峰; 1230~1020

cm⁻¹ 的吸收峰为叔胺基 C-N 键的吸收峰。可见, 3445.75 cm⁻¹ 对应 DMAEMA 或 N-MAM 中的 -OH 伸缩振动吸收峰; 2954.06 cm⁻¹ 为 MMA 酯基上 CH₃ 和 α-CH₃ 的振动吸收峰; 1731.87 cm⁻¹ 对应 MAA 中的羧基的振动吸收峰; 1475.36 cm⁻¹ 为 DMAEMA 中 -(CH₂)₂- 的振动吸收峰; 1256.32 cm⁻¹ 来自 MMA 酯基中的 C-O-C 链的振动吸收峰; 1158.65 cm⁻¹ 来自 N-MAM 中的叔胺基 C-N 键的伸缩振动吸收峰。从上述信息可以看出, 该聚合物含有反应的四种单体。

2.1.2 等电点及回收率

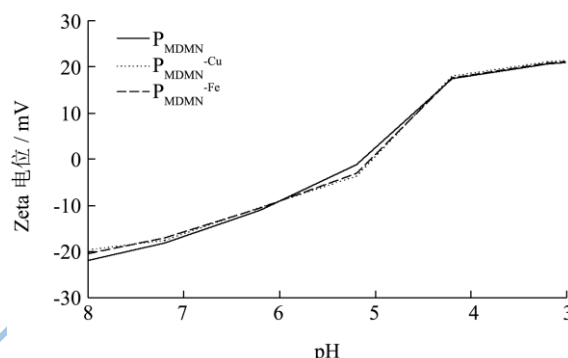


图 2 电位滴定曲线

Fig.2 Zeta potential versus pH

聚合物 P_{MDMN}、P_{MDMN}-Cu 以及 P_{MDMN}-Fe 的电位滴定曲线见图 2。P_{MDMN} 的等电点(pI), 即 zeta 电位为 0 时对应的 pH 为 5.15。P_{MDMN}-Cu 及 P_{MDMN}-Fe 的 pI 均为 5.08。P_{MDMN} 与 P_{MDMN}-Cu 及 P_{MDMN}-Fe 的结构上的区别包括金属离子配基及亚氨基二乙酸 (IDA)。简单来讲, 因 pI = (pk₁ + pK₁) / 2 (pk₁、pK₁ 分别指 -COOH 和 NH₃⁺ 的解离常数), IDA 引入的 -COOH 改变了聚合物本身的电离平衡, 从而使 P_{MDMN}-Cu 及 P_{MDMN}-Fe 的等电点出现了下降。

从表 1 可以看出, 三种聚合物经过 5 个吸附-洗脱循环之后, 其回收率均在 95% 以上。比较三种聚合物, 整体而言, P_{MDMN}-Cu 和 P_{MDMN}-Fe 的回收率要略低于 P_{MDMN}。但总的来讲, 三种聚合物的回收率都在可接受的范围内。

2.2 木瓜蛋白酶的吸附

2.2.1 pH 值对木瓜蛋白酶吸附的影响

溶液体系 pH 值对 P_{MDMN}-Cu 和 P_{MDMN}-Fe 吸附木瓜蛋白酶的影响见图 3。对两种聚合物而言, pH 值对吸附量的影响呈相似趋势。当 pH 低于 5.5 时, 木瓜蛋白酶基本不被吸附。P_{MDMN}-Cu 及 P_{MDMN}-Fe 的 pI 均为 5.08, 因此溶液 pH 值在 pI 左右时, 使得木瓜蛋白酶的吸附量极低。随着 pH 值的增大, 木瓜蛋白酶中的组氨酸残基质子化逐渐减弱, 组氨酸残基与金属配基

间的亲和和吸附逐渐增强,因而被吸附的木瓜蛋白酶大幅增加,而在 pH 7.0 时均达最大值, P_{MDMN}-Cu 和 P_{MDMN}-Fe 能分别吸附的木瓜蛋白酶的量为 4.42 mg 和 4.02 mg。随 pH 值的继续加大,吸附量迅速减小,该结果与前人采用同类型的聚合物吸附内切葡聚糖酶的

结果一致^[1]。pH 值大于 7.0 时, P_{MDMN}-Fe 吸附量下降的程度要显著低于 P_{MDMN}-Cu,说明不同类型金属配基(过渡态金属配基或硬酸金属配基)与木瓜蛋白酶的亲和和吸附作用存在较大的差别。

表 1 聚合物的回收率

Table 1 Polymer recovery

聚合物	循环				
	1	2	3	4	5
P _{MDMN} /%	99.8±0.1	99.5±0.2	99.2±0.1	98.7±0.2	98.3±0.1
P _{MDMN} -Cu/%	97.7±0.1	97.4±0.1	96.9±0.2	96.5±0.1	96.1±0.2
P _{MDMN} -Fe/%	96.8±0.1	96.4±0.0	95.9±0.1	95.6±0.2	95.2±0.1

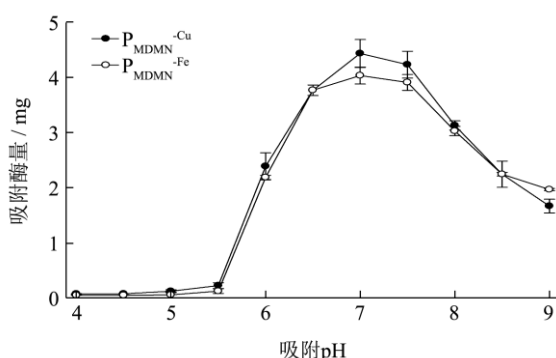


图 3 pH 对木瓜蛋白酶吸附的影响

Fig.3 Effect of pH on papain absorption

Note: Conditions: 20.0 mg Papain, T = 30.0 °C, 2.9 mmol/g affinity ligand density and 0.1 g polymer.

2.2.2 时间对木瓜蛋白酶吸附的影响

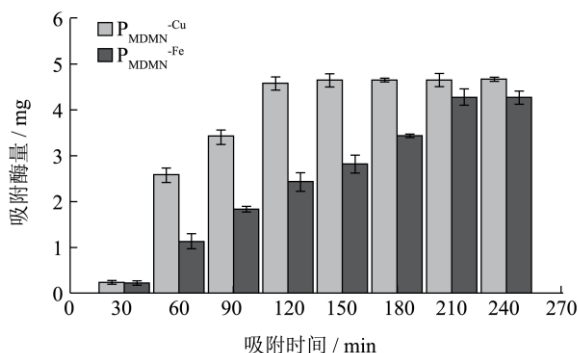


图 4 吸附时间对木瓜蛋白酶吸附的影响

Fig.4 Effect of absorption time on papain absorption

Note: Conditions: 20.0 mg Papain, T = 30.0°C, 2.9 mmol/g affinity ligand density and 0.1 g polymer.

吸附 pH 值为 7.0 时,吸附时间对 P_{MDMN}-Cu、P_{MDMN}-Fe 吸附行为的影响见图 4。P_{MDMN}-Cu 对木瓜蛋白酶的吸附量随着时间的增长迅速升高,120 min 时木瓜蛋白酶的吸附量趋于稳定。而 P_{MDMN}-Fe 在研究范围内,吸附量呈不断增加的趋势,210 min 时,吸附量达最大值。P_{MDMN}-Cu、P_{MDMN}-Fe 对木瓜蛋白酶的最

大吸附量分别为 4.65 mg、4.27 mg。上述现象说明, P_{MDMN}-Cu、P_{MDMN}-Fe 与木瓜蛋白酶间的吸附动力学呈现较大差异,从根本上来讲,两者的深层的吸附机制存在一定的差别,因 Cu²⁺是过渡态金属离子,而 Fe³⁺是硬酸金属离子。

2.2.3 NaCl 浓度对木瓜蛋白酶吸附的影响

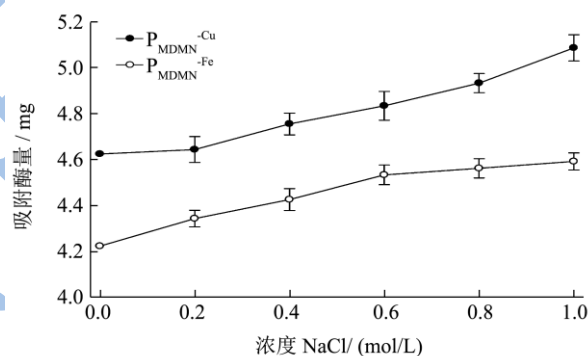


图 5 NaCl 对吸附木瓜蛋白酶的影响

Fig.5 Effect of NaCl concentration on papain absorption

Note: Conditions: 20.0 mg Papain, T = 30.0°C, 2.9 mmol/g affinity ligand density and 0.1 g polymer.

吸附 pH 值为 7.0,吸附时间为 210 min 时,NaCl 浓度对 P_{MDMN}-Cu、P_{MDMN}-Fe 吸附行为的影响见图 5。整体上讲,随 NaCl 浓度的增大,木瓜蛋白酶的吸附量呈一定程度增大。对 P_{MDMN}-Cu、P_{MDMN}-Fe 而言,当 NaCl 浓度从 0 mol/L 增加到 1 mol/L 时,吸附量从 4.62 mg、4.22 mg 分别增加到 5.09 mg 和 4.58 mg,增幅分别为 10.2%和 8.5%。随 NaCl 浓度增大,木瓜蛋白酶表面的电荷逐渐被屏蔽,从而降低了金属离子配基与酶之间的静电排斥力,从而增加了吸附量。

2.3 木瓜蛋白酶的洗脱

2.3.1 蛋白洗脱率及酶活洗脱率

分别考察不同浓度咪唑、咪唑与盐酸胍配合使用及不同浓度 EDTA 洗脱液对 P_{MDMN}-Cu-papain 和

P_{MDMN}-Fe-papain 的洗脱效果, 结果见表 2。随着咪唑浓度的加大, 蛋白洗脱率及酶活洗脱率逐渐增大。采用 0.5 mol/L 咪唑配合不同浓度的盐酸胍 (0.1 mol/L 增加至 1.0 mol/L), 蛋白洗脱率或酶活洗脱率均大幅增加, 均超过 90%。EDTA 浓度从 0.01 mol/L 增加至 0.2 mol/L 时, 蛋白洗脱率或酶活洗脱率由 70% 增加到接近 95%。需指出的是, 当 EDTA 的浓度大于 0.01 mol/L 时, 洗脱出来的酶液呈现较深的颜色, 对

P_{MDMN}-Cu-papain 而言, 呈现绿色, 而对 P_{MDMN}-Fe-papain 而言, 呈现红色, 可见, 稍高浓度的 EDTA 即造成了金属离子配基的泄露。综合比较, 最优的洗脱条件为 0.5 mol/L 咪唑+1.0 mol/L 盐酸胍, P_{MDMN}-Cu-papain 和 P_{MDMN}-Fe-papain 对应的蛋白洗脱率分别为 91.3% 和 94.9%, 对应的酶活洗脱率分别为 94.5% 和 93.6%。

表 2 不同条件下 P_{MDMN}-Cu-papain、P_{MDMN}-Fe-papain 的洗脱率

Table 2 Desorption rate of papain from P_{MDMN}-Cu-papain and P_{MDMN}-Fe-papain under different conditions

洗脱条件	蛋白洗脱率/%		酶活洗脱率/%	
	P _{MDMN} -Cu-papain	P _{MDMN} -Fe-papain	P _{MDMN} -Cu-papain	P _{MDMN} -Fe-papain
0.1 mol/L 咪唑	41.2±0.2	42.2±0.4	45.2±0.3	46.2±0.2
0.2 mol/L 咪唑	50.3±0.3	49.2±0.5	55.3±0.1	54.2±0.3
0.5 mol/L 咪唑	60.1±0.5	58.3±0.6	61.1±0.1	59.3±0.1
0.5 mol/L 咪唑+0.1 mol/L 盐酸胍	68.1±0.5	66.2±0.6	69.2±0.4	67.4±0.2
0.5 mol/L 咪唑+0.5 mol/L 盐酸胍	83.2±0.3	82.5±0.4	86.1±0.3	85.5±0.2
0.5 mol/L 咪唑+1.0 mol/L 盐酸胍	91.3±0.5	94.9±0.7	94.5±0.4	93.6±0.1
0.01 mol/L EDTA	71.3±0.3	71.5±0.5	73.3±0.5	74.3±0.4
0.05 mol/L EDTA	82.4±0.5	81.6±0.3	85.4±0.3	84.6±0.3
0.1 mol/L EDTA	94.4±0.1	93.2±0.3	96.4±0.2	95.2±0.4
0.2 mol/L EDTA	95.3±0.3	95.4±0.4	99.3±0.5	98.4±0.3

2.3.2 SDS-PAGE

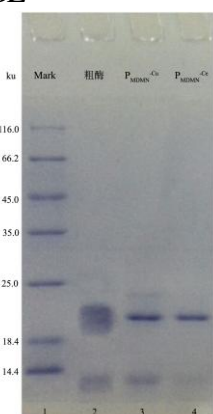


图 6 较优洗脱条件下的 SDS-PAGE 图

Fig.6 SDS-PAGE profile of eluted components under optimized conditions

洗脱条件为 0.5 mol/L 咪唑+1.0 mol/L 盐酸胍时,

表 3 P_{MDMN}-Cu、P_{MDMN}-Fe 纯化木瓜蛋白酶过程中的酶学相关参数

Table 3 Enzymology related parameters during the purification of papain by P_{MDMN}-Cu and P_{MDMN}-Fe

	蛋白含量/(mg/g)	蛋白回收率/%	酶活力/(U/g)	酶活回收率/%	比活力/(U/mg)	纯化倍数
粗酶	478.43±2.14	-	30135.94±98	-	62.98	-
P _{MDMN} -Cu吸附	115.34±13.07	24.11	-	-	-	-
P _{MDMN} -Fe吸附	105.35±7.02	22.02	-	-	-	-
P _{MDMN} -Cu洗脱	105.28±9.02	22.01	28478.46±124	94.49	270.50	4.29
P _{MDMN} -Fe洗脱	100.07±10.09	20.92	28207.93±105	93.60	281.88	4.48

将纯化后的酶液进行 SDS-PAGE 验证, 结果见图 6。

对比前人文献^[12]可知, 22 kD 处为木瓜蛋白酶对应的条带。对比泳道 2~4, 可知, P_{MDMN}-Cu、P_{MDMN}-Fe 使得木瓜蛋白酶粗酶的纯化倍数有了很大提高, 主要表现为: 22 ku 对应的木瓜蛋白酶的条带明显加深, 杂蛋白条带 (如 22 ku 左右及低于 14.4 ku 的条带) 明显变淡。对比泳道 3 和 4, P_{MDMN}-Fe 纯化后的酶纯度要明显高于 P_{MDMN}-Cu。可见, P_{MDMN}-Fe 对木瓜蛋白酶的特异性结合能力要优于 P_{MDMN}-Cu。但相比而言, P_{MDMN}-Cu 在吸附量等方面更具优势。

2.4 P_{MDMN}-Cu 与 P_{MDMN}-Fe 对木瓜蛋白酶纯化效果的比较

$P_{\text{MDMN-Cu}}$ 与 $P_{\text{MDMN-Fe}}$ 纯化过程中的酶学相关参数见表 3。在吸附与洗脱过程中, $P_{\text{MDMN-Cu}}$ 对木瓜蛋白酶的吸附和洗脱能力都强于 $P_{\text{MDMN-Fe}}$ 。至洗脱时, $P_{\text{MDMN-Cu}}$ 与 $P_{\text{MDMN-Fe}}$ 总的蛋白回收率分别为 22.01% 和 20.92%, 纯化后的木瓜蛋白酶的比活力分别为 270.50 U/mg 和 281.88 U/mg, 纯化倍数分别达到 4.29 与 4.48。

3 结论

本文以四种丙烯酸类单体合成了一种 pH 敏感型聚合物 (P_{MDMN})。该聚合物连接金属螯合剂 (IDA) 后与 Cu^{2+} 或 Fe^{3+} 通过配位键形成聚合物 $P_{\text{MDMN-Cu}}$ 或 $P_{\text{MDMN-Fe}}$ 。接枝金属配基前后的等电点分别为 5.15 或 5.08, 回收率皆大于 95% (5 个吸附-洗脱循环后)。 $P_{\text{MDMN-Cu}}$ 、 $P_{\text{MDMN-Fe}}$ 分别于 120 min 和 210 min 达到吸附平衡, 最大吸附量分别为 4.65 mg、4.27 mg。最适吸附 pH 值为 7.0。NaCl 的浓度增加能一定程度增加木瓜蛋白酶的吸附量。0.5 mol/L 咪唑+1.0 mol/L 盐酸胍具有最好的洗脱效果, 使洗脱率皆接近 95%, 同时不会造成金属配基泄露。SDS-PAGE 显示 $P_{\text{MDMN-Cu}}$ 和 $P_{\text{MDMN-Fe}}$ 都能大幅度提高木瓜蛋白酶的纯度, 两者的纯化倍数分别为 4.29 和 4.48。

参考文献

- 何智妍, 聂华丽, 周毓婷, 等. 金属螯合膜的制备及其对木瓜蛋白酶的分离纯化[J]. 膜科学与技术, 2009, 5: 74-78
HE Zhi-yan, NIE Hua-li, ZHOU Yu-ting, et al. The preparation of metal ion chelating membranes and the purification of papain [J]. Membrane Science and Technology, 2009, 5: 74-78
- 董安华, 彭健, 许英豪, 等. PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相平衡数据的关联及木瓜蛋白酶在该体系中分配模型的建立[J]. 现代食品科技, 2014, 10: 194-199
DONG An-hua, PENG Jian, XU Ying-hao, et al. Correlation of PEG/(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase equilibrium data and modeling of partition of papain [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 10: 194-199
- Wahlund P O, Galaev I Y, Kazakov S A, et al. 'Trojan-like' copolymers: effect of polymer architecture on the performance in bioseparation process [J]. Macromolecular Bioscience, 2002, 2(1): 33-42
- Kumar A, Khalil A A M, Galaev I Y, et al. Metal chelate affinity precipitation: purification of (His) 6-tagged lactate dehydrogenase using poly (Vinylimidazole-Co-N-Isopropylacrylamide) copolymers [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33(1): 113-117
- Hana S, Jan K, Ashok M, et al. One-step metal-affinity purification of histidine-tagged proteins by temperature-triggered precipitation [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 82(5): 606-612
- Kumar A, Galaev I Y, Mattiasson B. Isolation and separation of α -amylase inhibitors I-1 and I-2 from seeds of ragi (Indian Finger Millet, Eleusine Coracana) by metal chelate affinity precipitation [J]. Bioseparation, 1998, 7(3): 129-136
- Wang H X, Wan J F, Cao X J. Preparation of a pH-sensitive affinity precipitation polymer and its application in purification of trypsin [J]. Separation and Purification Technology, 2009, 68(2): 172-177
- 丁兆阳. 亲和沉淀技术的机理研究和在蛋白质纯化中的应用[D]. 上海: 华东理工大学, 2013
DING Zhao-yang. Research on affinity precipitation mechanism and applications in protein purification [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2013
- Chern C S, Lee C K, Chen C Y, et al. Characterization of pH-sensitive polymeric supports for selective precipitation of proteins [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1996, 6(1): 37-49
- Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685
- Ding Z Y, Kang L, Cao X J. Application of docking methods for metal chelate affinity precipitation of endo-glucanase using pH-response polymer [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 113: 412-420
- 何智妍, 周毓婷, 张海涛, 等. 金属亲和膜色谱法纯化木瓜蛋白酶条件优化. 化学工程, 2010, 8(1): 67-70
HE Zhi-yan, ZHOU Yu-ting, Zhang Hai-tao et al. Optimized conditions for purification of papain by metal affinity membrane chromatography [J]. Chemical Engineering (China), 2010, 8(1): 67-70