

固定化镍离子亲和层析胶的制备及其性能鉴定*

刘平 张双全** 闫晓梅 徐进曙

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要 以 Sepharose 6B 为原料, 在强碱性条件下用环氧氯丙烷活化, 再与亚氨基二乙酸 (IDA) 的钠盐溶液反应, 在活化好的胶颗粒表面上接上很多手臂 IDA; 最后与硫酸镍溶液反应, 使手臂 IDA 与 Ni^{2+} 发生螯合反应, 即得到固定化 Ni^{2+} 亲和层析胶 (Ni^{2+} -IDA). 采用原子吸收法及从大肠杆菌表达产物中纯化重组人 B 淋巴细胞刺激因子 (hBLyS) 等方法检测制备胶的理化指标和纯化蛋白质的性能. 结果表明用此法制得的亲和胶与相应商品胶的性能完全一致, 而成本却不到商品胶的十分之一.

关键词 Ni^{2+} -IDA 亲和层析胶, 原子吸收, 活化, 螯合

学科分类号 Q814.9

自 70 年代 Porath 等^[1]提出一种新的蛋白质分离纯化技术——金属螯合亲和层析技术以来, 固定化金属离子亲和层析法在生物大分子的分离纯化尤其在蛋白质的分离纯化中越来越被广泛采用. 目前, 金属离子螯合亲和层析胶的制备技术均已被国外一些生物制品大公司所垄断, 并规模生产且价格昂贵. 国内虽已有相关研究报道^[2], 但他们都是以复合纤维素膜与亚氨基二乙酸 (IDA) 为起始材料; 用这种材料制备出来的亲和胶在分离纯化蛋白质时过程复杂, 操作繁琐. 鉴于此, 本实验室通过悉心研究, 摸索出一套用硬度较大、不易变形的 Sepharose 6B 和 IDA 为起始材料合成固定化镍离子亲和胶的制备方法, 在固定化金属离子亲和层析胶制备技术方面进一步完善了国内的研究.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂: 环氧氯丙烷; 硫酸镍; 硼氢化钠等均为国产分析纯级.

1.1.2 载体: Sepharose6B (Pharmacia 公司).

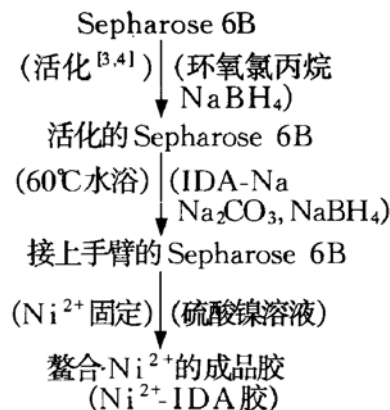
1.1.3 配基: IDA (CP 级, 湖州生物化学厂).

1.1.4 纯化对象: 带有 His-tag 的蛋白质 (重组人 B 淋巴细胞刺激因子, rhBLyS).

1.1.5 设备: 低压层析仪 (Bio-Rad 公司); 原子吸收仪 (澳大利亚 GBC 公司); 调速搅拌器 (上海医械专机厂) 等.

1.2 实验方法

1.2.1 固定化 Ni^{2+} 亲和胶的制备方法及流程:



1.2.2 固定化 Ni^{2+} 亲和层析胶的分析: a. 胶中螯合 Ni^{2+} 的定量分析: 称取 2 g 于 G-3 漏斗上抽干的制备胶, 用 20 ml Stripping 缓冲液 (含 100 mmol/L EDTA, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 浸泡并搅拌, 让结合在载体胶上的 Ni^{2+} 与缓冲液的 EDTA 充分螯合而进入溶液; 然后取缓冲液 (含有 Ni^{2+} 的 EDTA 螯合物) 0.5 ml 稀释至 250 ml, 用原子吸收法定量分析 Ni^{2+} 含量. b. 成品胶用于分离带 His-Tag 蛋白质的性能测试: 本研究中用于分离纯化的靶蛋白是一种新发现的人 B 淋巴细胞刺激因子^[5] (hBLyS, 1999 年发现). 用 PCR 及 Nest-PCR 等方法从人胎盘 cDNA 文库中扩增出 hBLyS 的 cDNA, 并构建成带有 His-Tag 纯化标记的融合表达基因载体 pET-30a (+) / hBLyS,

* 国家自然科学基金资助项目 (39770117).

** 通讯联系人.

Tel: 025-3598216, E-mail: zhangSQ@263.net

收稿日期: 2000-03-28, 接受日期: 2000-04-26

在大肠杆菌 λ DE3 中高效表达后, 经离心、裂解细胞等处理, 将裂解上清液用上述制备的 Ni^{2+} -IDA 亲和层析胶做成的亲和层析柱^[6-8]在低压层析仪上进行靶蛋白的分离纯化; 纯化得到的含融合蛋白(靶蛋白)的洗脱液直接进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 [pET System Manual (Novagen), 7th Edition, 1997].

2 结果与分析

2.1 亲和层析胶中 Ni^{2+} 的定量测定

用原子吸收法定量测定亲和层析胶中 Ni^{2+} 的含量; 同时配制 Ni^{2+} 标准溶液, 绘制标准曲线, 结果如图 1 所示.

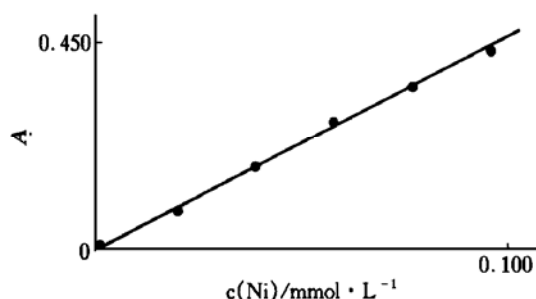


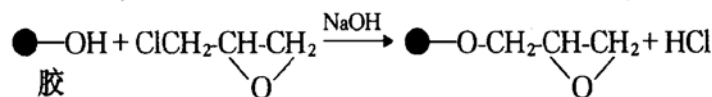
Fig. 1 Standard curve and the values of sample on atomic absorption spectroscopy

R^2 Fit: 0.9976; Max. Error: 0.0021 mmol/L.

由图 1 可知: 取上述实验样品 Striping 缓冲液 0.5 ml 用双蒸水稀释到 250 ml 后, 测得其中 $[\text{Ni}^{2+}] = 0.0168 \text{ mmol/L}$ (图 2).

计算得到: 每克抽干胶中螯合的 Ni^{2+} 为 4.93 mg 或 84 μmol ; 每毫升沉淀胶中螯合的 Ni^{2+} 为 4.11 mg 或 70 μmol .

此结果与有关资料报道的数字 8~12 $\mu\text{mol/ml}$ [The QIAexpressionist (QIAGEN), 2nd, 1992], 35 $\mu\text{g/g}$ ^[4] 及 15.7 $\mu\text{mol/ml}$ ^[9] 相比, 实验测定的结



此反应属于脱卤化氢的反应, 反应条件(尤其碱性条件)要求非常严格; 因此本实验根据这类反应的特性, 摸索到合适的反应条件, 使反应效果达到最佳.

胶颗粒上的手臂与 Ni^{2+} 螯合后的结构如下:

果要高出许多倍. 可见本研究制备 Ni^{2+} -IDA 亲和层析胶的条件是比较合适的.

2.2 成品胶分离 hBLYS 的效果

用制得的 Ni^{2+} -IDA 亲和层析胶纯化靶蛋白 rhBLYS, 洗脱液电泳得到单一条带(图 2); 低压层析仪记录得到的洗脱曲线成单一峰(图 3).

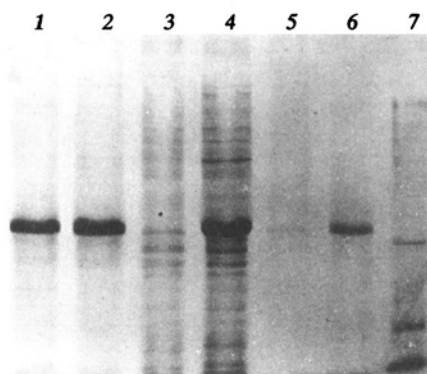


Fig. 2 SDS-PAGE of effluent fraction
1, 2: concentrated fraction; 3: washed fraction; 4: lysate deposit; 5, 6: effluent fraction; 7: Marker.

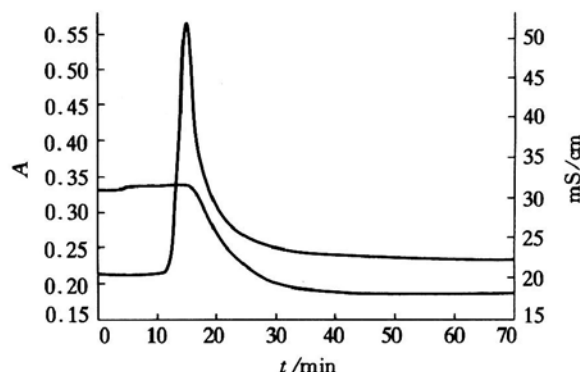
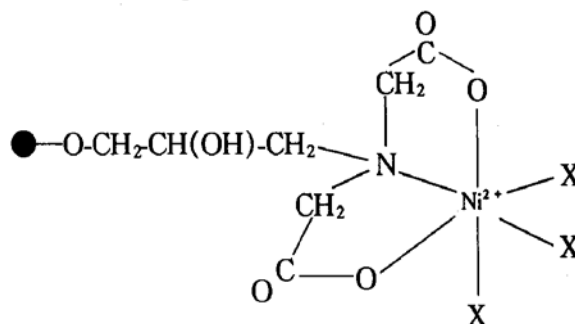


Fig. 3 Elution profile of aim protein

2.3 分析与讨论

在制备过程中, 第一步反应是关键; 手臂接得好坏、接得多少, 在于环氧氯丙烷与 Sepharose 6B 胶连接的反应情况(即胶的活化情况). 反应如下:



结构式中, X 表示 Ni^{2+} 用于螯合蛋白质的配位位置. 可见, 此种亲和层析胶在纯化蛋白质时的吸附量是很大的; 因此, 实验中用少量的胶就能纯化大量的蛋白质.

本实验研究制备的 Ni^{2+} -IDA 亲和层析胶分离带有 His-tag 标记的蛋白质的功能是非常好的, 鉴定结果与相应商品胶的功能结果^[4,9] 完全一致. 但与国外生物公司的成品 Ni-IDA 亲和层析胶相比, 成本却降低了十倍之多. 因此, 此技术在生物基因工程等领域值得推广 (目前本技术已申请国家专利).

参 考 文 献

- 1 Porath J, Carlsson J, Olsson I, *et al.* Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 1975, **258**: 598- 599
- 2 杨 利, 贾凌云, 邹汉法, 等. IDA 型固定化镍离子螯合亲和膜色谱对人血清白蛋白的分离纯化. *生物工程学报*, 2000, **16** (1): 74~ 77
Yang L, Jia L Y, Zou H F, *et al.* *Chinese Journal of*
- 3 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1998. 203~ 208
Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. *Biochemically experimental method and technology*. 2nd. Beijing: Advanced Education Press, 1998. 203~ 208
- 4 Jerker P, Birgit O. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*, 1983, **22** (7): 1621~ 1630
- 5 Paul A M, Ornella B, Li Y L, *et al.* BlyS: Member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*, 1999, **285** (5425): 260~ 263
- 6 Eugene S. Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, 1985, **3** (28): 1~ 7
- 7 Michele C S, Thomas C F, Thomas D I, *et al.* Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography. *J Biol Chem*, 1988, **263** (15): 7211~ 7215
- 8 Suresh V, Venkatesh N, Stuart G, *et al.* Nonlinear multicomponent gradient chromatography in metal affinity systems. *Separation Science and Technology*, 1998, **33** (54): 2465~ 2489
- 9 Michele C S, Thomas C F, Charles P. Immobilized iminodiacetic acid metal peptide complexes. Identification of chelating peptide purification handles for recombinant proteins. *Inorg Chem*, 1987, **26** (12): 1965~ 1969

Study on Preparation and Identification of Immobilized Metal Ion Affinity Adsorption Gel*

LIU Ping, ZHANG Shuang-Quan**, YAN Xiao-Mei, XU Jir-Shu

(Academy of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract Sepharose 6B was activated by epichlorohydrin in the strong base condition, and then reacted with solution of iminodiacetic sodium. The arms of IDA were conjuncted to the activated Sepharose 6B. Then the products were reacted with the solution of NiSO_4 . The arms of IDA were chelated with Ni^{2+} , and the chelating resin⁴/ Ni^{2+} -IDA could be prepared. The physicochemical indexes and performance in purifying protein of the expressing product were assayed with atomic absorption method and purifying aimed protein-human B lymphocyte stimulator (hBlyS) from the expressing products in *E. coli*. The results indicated that the performance of made gel is very good, and its price is less than 1/10 of that of commodity gel.

Key words Ni^{2+} -IDA affinity gel, atomic absorption, activation, chelation

* This work was supported by a grant from National Natural Sciences of Foundation of China (39770117).

** Corresponding author. Tel: 86-25-3598216, E-mail: ZhangSQ@263.net

Received: March 28, 2000 Accepted: April 26, 2000