利用 FPLC 技术建立重组碱性蛋白酶的快速纯化方案*

唐雪明　沈　微　邵蔚蓝　王正祥　方惠英　诸葛健

（江南大学教育部工业生物技术重点实验室，无锡，214036）

摘　要　在构建了以地衣芽孢杆菌为宿主的产碱性蛋白酶的工程菌 BA071 以后，为了给探索重组酶的性质及其稳定性奠定基础，利用快速蛋白液相层析（FPLC）技术，建立了快速高效纯化碱性蛋白酶的方案。发酵液通过硫酸氨沉淀、DEAE-A-50 脱色及聚乙二醇浓缩得粗酶，再经过 CM-Sephadex-C-50、Sephadex-G-75 柱层析后较好地得到了单一组份的重组碱性蛋白酶，酶纯度提高了 76.2 倍。SDS-PAGE 显示重组碱性蛋白酶分子质量为 28 ku。

关键词　碱性蛋白酶，基因工程菌，快速蛋白液相层析，分离纯化

蛋白酶是工业生产中应用最广泛的酶种，约占酶总量的 60%，而碱性蛋白酶又占了蛋白酶的市场销售额的 50%以上，它在洗涤剂、食品工业和皮革制造中发挥巨大作用，目前，国内外市场上对碱性蛋白酶的需求量增长很快。自从 Jacobs 通过建立基因文库克隆了第 1 条碱性蛋白酶基因以来[1]，利用基因工程的手段和蛋白质工程技术获得高产碱性蛋白酶的工程菌已经是当前蛋白酶研究中的 1 个热点，这给蛋白酶的进一步应用研究提供了广阔的前景[2]。我们在前期工作中利用 *B. licheniformis* 6816 和 2709 突变株碱性蛋白酶基因序列的高度同源性，以 *B. licheniformis* 为宿主，通过同源基因交换的方法获得 1 株碱性蛋白酶的工程菌 BA071，使其酶产量在基础培养基下提高了 55%[3]。为了给探索重组酶的性质及其稳定性奠定基础，我们利用快速蛋白液相层析，即 FPLC（fast protein liquid chromatography）技术，建立了快速高效纯化碱性蛋白酶的方案，较好地得到了单一组份的重组碱性蛋白酶。

1　材料和方法

1.1　材　料

1.1.1　菌　株

BA071，整合型碱性蛋白酶工程菌，笔者构建。

1.1.2　试　剂

DEAE Sephadex-A-50、CM-Sephadex-C-50、Sephadex-G-75 均为瑞典 Pharmacia 公司产品。聚乙二醇 PEG 8000、十二烷基硫酸钠（SDS）为上海华舜产品，进口分装，电泳纯丙烯酰胺，N，N′-甲叉双丙烯酰胺为 Sigma 公司产品，标准分子量为中科院上海生物化学所东风试剂厂产品。0.02 mol/L PBS 缓冲液，其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3　培养基

LB 液体培养基用于细菌培养，在液体培养基中添加 1.5%的琼脂即为 LB 固体培养基，LB 固体和液体培养基在需要时加入卡那霉素至 30 μg/mL；BY 液态培养基（g/L）：牛肉膏 5，酵母膏 5，蛋白胨 10，NaCl 5，葡萄糖 5，pH7.2～7.4。

1.1.4　仪　器

快速蛋白液相层析系统 FPLC，Pharmacia 公司产品，包括 CM-Sephadex-C-50、Sephadex-G-75 自动监控系统；紫外分光光度计 UV-120-02XIN 型，Shimadzu 产品；电导仪 DDS-11A 型，上海雷磁仪器厂；垂直板状电泳系统，Bio-Rad 公司产品。

第一作者：博士研究生，讲师。

* 教育部高等学校骨干教师资助项目（教技司[200]65）·江南大学太湖学者专项基金资助项目（No.9825751）
收稿时间：2001－10－21

1.2 方 法

1.2.1 蛋白酶活力测定

按原轻工业部颁行业标准 QB/1803—1993[4]进行酶活定义：1 mL 液体酶，在 42℃和 pH 10.5 的条件下，1 min 水解 1 μg 酪素产生 1 μg 酪氨酸为 1 个活力单位，以 u/mL 表示。

1.2.2 硫酸胺梯度盐析、透析和蛋白质浓缩

方法见参考文献[5]。

1.2.3 DEAE Sephadex-A-50 短柱处理及脱色

将原装 DEAE Sephadex-A-50 溶于 10 倍体积的去离子水中静置过夜，使其溶胀，用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液浸泡 1 h 后去离子水反复清洗，过滤，然后用 0.5 mol/L HCl 溶液浸泡 1 h，用去离子水反复清洗，过滤，再用 0.5 mol/L 的 NaOH 反复清洗后，用去离子水充分漂洗至 pH 值不变，除去空气备用。将清洗的离子交换剂溶于 0.02 mol/L pH 6.0 的 PBS 缓冲液中平衡，过滤，将平衡后的离子交换剂小心倾注入柱中，避免产生气泡，再用数倍体积的 0.02 mol/L pH6.0 的 PBS 缓冲液洗柱至 pH 6.0。样品按照常规方法脱色[6]。

1.2.4 CM-Sephadex-C-50 柱层析

将处理好的凝胶装柱后，用 0.02 mol/L pH6.0 的 PBS 缓冲液平衡，上样后用同样的 PBS 缓冲液（流经 A 泵）及含 1 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L pH6.0 的 PBS 缓冲液（液经 B 泵）在 FPLC 系统中自动混匀进行离子梯度洗脱，分步收集器速度为 4mL/min，收集活性峰洗脱液。

1.2.5 Sephadex-G-75 柱层析

原装 Sephadex-G-75 颗粒用水洗，并用沸水浴方法加速溶胀，常规方法装柱。将 CM-Sephadex-C-50 层析所收集活性峰洗脱液 2 mL 上样，用含 0.15 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L pH 6.0 的 PBS 缓冲液在 FPLC 系统控制下洗脱，分步收集器速度为 2 mL/min 收集活性峰，浓缩酶液，于 -4℃保存。

1.2.6 蛋白浓度测定

采用 Bradford 法[7]，以牛血清白蛋白作为标准。

1.2.7 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 方法参照参考文献[8]，采用 12%的分离胶和 4%的浓缩胶进行。

2 结 果

2.1 重组菌的发酵和粗酶的制备

将重组菌接种于 50 mL LB 液体培养基，37℃，220 r/min 摇床培养 16 h，取 1%的发酵液接种 100 mL 液体培养基，发酵液静置 2 h，6 000 r/min 离心 30 min，去上清液，加硫酸铵进行梯度盐析，室温离心收集饱和度为 50% ~ 60%的沉淀部分，溶于 0.02 mol/L pH 6.0 的 PBS 缓冲液中，在 0.02 mol/L pH 6.0 的 PBS 缓冲液中进行透析除盐，用电导仪测透析情况，至透析液导电率基本无变化，离心除去少量不溶物，过 DEAE Sephadex-A-50 短柱脱色素，PEG 8 000 浓缩，用 0.02 mol/L pH6.0 的 PBS 缓冲液溶解，得到淡褐色透明清液。比酶活为 4 551.5 u/mg。

2.2 CM-Sephadex-C-50 柱层析

取 2 mL 脱色浓缩酶液上柱，收集活性峰测酶活。比酶活为 20 097.7 u/mg。结果见图 1。

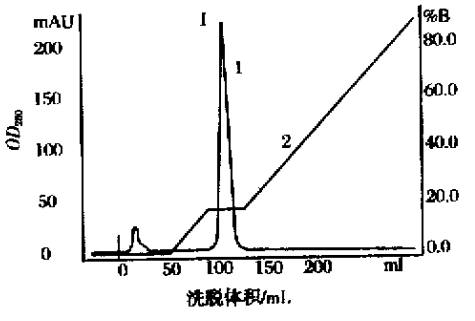

图 1 CM-Sephadex-C-50 柱层析

1－蛋白质（OD_{280}） 2－流经 B 泵的缓冲液在洗脱液中所占的百分比（即形成不同离子梯度的洗脱液）

2.3 Sephadex-G-75 柱层析

将过 CM-Sephadex-C-50 收集的活性峰Ⅰ为样品上柱。比酶活为 34 648.1 u/mg。结果见图 2 所示。

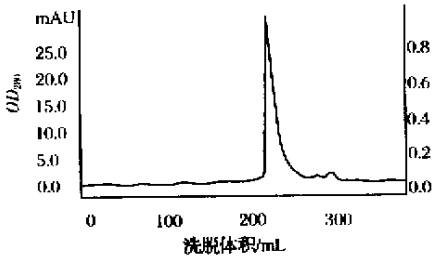

图 2　Sephadex-G-75 柱层析

2.4　SDS-PAGE 分析

收集 Sephadex-G-75 层析所得的活性峰酶液浓缩，取 10 μL 浓缩液上样（如图 3 所示）。结果显示得到单一电泳条带，分子质量为 28 ku。

3　讨　论

来自整合型工程菌 BA071 的重组碱性蛋白酶在重组菌生长对数后期分泌表达，重组酶大量存在于发酵液中，经过梯度盐析、透析、DEAE 纤维素柱脱色，及 CM-Sephadex-C-50 和 Sephadex-G-75 层析后获得电泳纯，纯度提高了 76.2 倍。利用 DEAE 纤维素柱可以除去大量的色素和杂蛋白。由于碱性蛋白酶的 pI 一般在 7.0～8.0 之间，所以我们选用阳离子交换柱 CM-Sephadex-C-50，并选用比碱性蛋白酶 pI 低，不少于 1 个单位的 pH 为 6.0 的 0.02 mol/L PBS 缓冲液进行洗脱。在预备实验中我们发现，在进行 CM-Sephadex-C-50 层析时，当含 1 mol/L NaCl 的 PBS 缓冲液（即 FPLC 系统中流经 B 泵的缓冲液）在洗脱液中占 16.5% 时，活性洗脱峰出现得比较稳定，于是在正式实验中设置参数，使流经 B 泵的缓冲液在洗脱液中占 16.5% 时，保持该状态下连续洗脱 40 mL，即稳定此时洗脱液中的离子浓度，获得较好的效果。

表 1　重　组　酶　的　纯　化

处　理　步　骤	体　积 /mL	总酶活 /U	总蛋白 /mg	比　活 /U·mg^{-1}	酶回收率 %	纯化倍数
离心发酵液	100	491 150	1080	454.7	100	1
硫酸铵沉淀	25	348 716	348.6	1 000.3	71	2.2
DEAE Sephadex-A-50 脱色后浓缩	20	285 751	62.78	4 551.5	58.18	9.79
CM-Sephadex-C-50	10	152 845	7.6	20 097.7	31.12	44.2
Sephadex-G-75	5	100 636	2.9	34 648.1	20.49	76.2

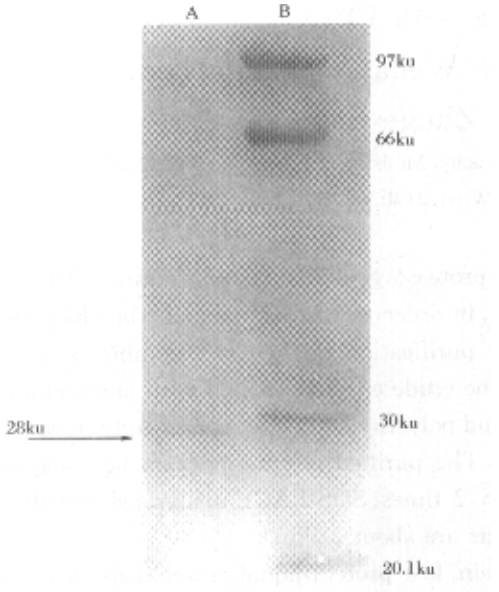

图 3　重组碱性蛋白酶的 SDS-PAGE 电泳
A－FPLC 纯化后的重组酶；B－标准蛋白分子质量

FPLC 系统为全惰性系统，完全保留了样品的生物活性。该系统利用双泵梯度高压动力混合，比 HPLC 单泵静态混合所形成的梯度更准确，并保证了梯度有很好的重复性。由于加压的结果，使分离速度快，效率高，5 h 内可以完成本实验的所有层析工作，全自动监控。系统灵活性很大，可以控制和检测多个参数，可以经过预备实验建立最优化的程序。

在工业微生物的基因工程研究中，利用芽孢杆菌作为表达宿主进行外源蛋白的分泌表达很有意义，目的蛋白质能以活性结构生成而不发生聚集，避免了复性的困难，产物与

大量的细胞蛋白质分离，给下游工程的研究带来了便利。在本实验中，我们利用 FPLC 技术对整合行工程菌分泌至胞外的重组碱性蛋白酶进行纯化，大大提高了的纯化的速度和效率，为下一步的酶学性质鉴定和分析工作打下了良好的基础，也为其他分泌表达的重组工业酶制剂的下游提取研究提供了模型。

参 考 文 献

1 Jacobs M，Eliasson M，Uhlen M. Nucleic Acids Res.，1985，13：8913～8926

2 Von der Laan J，Gerrtse G，Mulleners L et al. Appl. Environ. Microbiol.，1991，57：901～909

3 唐雪明，邵蔚蓝，沈 微等. 生物技术，2001，11(4)：3～6

4 中华人民共和国轻工业部部颁标准. 洗涤剂用碱性蛋白酶制剂标准. QB1806—1993

5 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用(第 2 版). 武汉：武汉大学出版社，1995. 25～35

6 苏拔贤主编. 生物化学制备技术. 北京：科学出版社，1998. 86～87

7 Frederick M Ausubel. 颜子颖，王海林译. 精编分子生物学指南. 北京：科学出版社，1998. 332～333

8 Sambrook J，Fritsch E F，Maniatis T. 金冬雁，黎孟枫译. 分子克隆指南(第 2 版). 北京：科学出版社，1995. 881～887

Construction of Fast Purification Method of Recombinant Alkaline Protease with FPLC

Tang Xueming Shen Wei Shao Weilan Wang Zhengxiang
Fang Huiying Zhuge Jian

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Southern Yangtze University，Wuxi，214036)

ABSTRACT In the preceding stage the alkaline protease gene engineering strain BA071 with *Bacillus licheniformis* as host cell was constructed，in order to further research the characterization of recombinant protease，constructed the fast purification method of recombinant protease with FPLC(fast protein liquid chromatography). The crude enzyme，treated with ammonium sulfate fractionation and decolored with DEAE-A-50 and polyethylene glycol concentration，was purified with CM-Sephadex-C-50 and Sephadex-G-75. The purified enzyme appears homologous on SDS-PAGE. The purity of enzyme was increased 76.2 times. SDS-PAGE analysis shows that the molecular weights of expressed recombinant products are about 28 ku.

Key words alkaline protease，gene engineering strain，fast protein liquid chromatography，purification

欧盟限制使用香兰素剂量

最近，欧盟专家委员会决定在欧盟范围内限制香兰素添加剂的使用剂量，以减少对人体的危害。

据介绍，香兰素存在于许多天然植物中，通常用化学方法由丁香酚、愈创木酚、黄樟素或木质素等不同原料合成，是重要的食用香料之一。这种香料作为添加剂可加入许多甜食制品中，并被广泛用于化妆品生产。欧盟专家委员会称，经多年实验研究发现，大剂量使用香兰素可以导致头痛、恶心、呕吐、呼吸困难，甚至能够损伤肝、肾，对人体有较大危害。因此决定重新制定香兰素使用标准，进一步降低允许剂量。