论著

文章编号:1000-5404(2005)12-1208-03

蛋白质快速定量法及其在rhZP3纯化中的应用

谢琪璇[1],郑育声[2],彭雅林[1],肖銮娟[1],余 巍[1],潘善培[1] ([1]暨南大学生殖免疫研究中心,广州 510632;[2]海南大学生物工程系,海口 570002)

提 要:目的 建立层析过程中洗脱峰蛋白质含量的快速定量法。**方法** 利用蛋白质的紫外吸收原理和层析软件的积分功能,即A_{280}和峰面积计算层析过程中洗脱峰蛋白质含量。**结果** 洗脱峰大小与蛋白质含量呈线性关系,洗脱峰蛋白质含量可用方程X=Y/A进行估算,X为待测蛋白含量(mg),Y为洗脱峰面积(mAU×ml),A为1 g/L待测蛋白在层析系统的紫外吸收值(mAU)。将其应用于重组人卵透明带ZP3蛋白(rhZP3)的纯化,用该方程估算的纯化蛋白含量与用Lowry法测定结果相似。**结论** 该法简便、快速、重复性好,具有一定实用价值。

关键词: 层析;蛋白;定量;重组人卵透明带ZP3蛋白;纯化
中图法分类号: Q503; Q513 **文献标识码:** A

A rapid method for protein quantification and its application in rhZP3 purification

XIE Qi-xuan[1], ZHENG Yu-sheng[2], PENG Ya-lin[1], XIAO Luan-juan[1], YU Wei[1], PAN Shan-pei[1] ([1] Research Center for Reproductive Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632; [2] Department of Biological Engineering, Hainan University, Haikou 570002, China)

Abstract: Objective To find a rapid and simple method for quantifying the amount of eluted proteins in chromatography. **Methods** The method was developed by utilizing the principle of the absorbance of protein at 280 nm and the integral function of the software UNICORN for AKTA FPLC, namely, the protein quantity was evaluated based on its A_{280} and peak area. **Results** The relation between peak area and quantity of the protein was linear correlation. The protein quantity could be expressed as X = Y/A. The Y represented the peak area (mAU × ml) of the interested fraction, and A represented the measurable value (mAU) of 1 g/L interested protein through the FPLC 280 nm cell and X was the quantity of the interested protein (mg). The method was used in the purification of recombinant human zona pellucida-3 protein (rhZP3) and the quantity of the purified rhZP3 evaluated from the formula was confirmed by Lowry method. **Conclusion** The method is easy, rapid, repeatable and practicable to quantify the protein in chromatography.

Key words: chromatography; protein; quantify; rhZP3; purification

层析是蛋白质纯化过程中应用最广,最重要的技术之一。在纯化过程中,常需要对目的蛋白进行定量,以判断纯化效率。传统的做法是汇集该洗脱峰各管,测定蛋白质浓度和体积,进行计算。当样品含量很少时,用紫外吸收法难以检测,而用Lowry法,染料结合法等又会消耗本已不多的样品。随着层析系统的自动化,蛋白含量已反映成峰面积,我们在长期的实践中发现利用层析软件的峰面积(mAU×ml)计算功能推测蛋白质含量,具有快速,简便,不消耗样品,不需汇集各管样品等优点,我们将其作为本实验室层析中蛋白定量的常规方法,并应用于重组人卵透明带ZP3蛋白(recombinant human zona pellucida-3 protein ,rhZP3)的纯化过程。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370541),广东省自然科学基金资助项目(31883),广东省科技计划资助项目(2003830501)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30370541), the Natural Science Foundation of Guangdong Province(31883) and the Program of Science and Technology of Guangdong Province(2003830501)

作者简介: 谢琪璇(1961-),女,广东省汕头市人,副研究员,主要从事基因工程与蛋白纯化方面的研究。电话:(020)85220235, E-mail: txqx@jnu.edu.cn

收稿日期: 2004-06-01; **修回日期:** 2004-12-05

1 材料与方法

1.1 材料

rhZP3为本研究中心利用毕赤酵母表达的重组卵透明带ZP3蛋白[1]。层析系统AKTA FPLC,层析填料,16×20 XK柱均为Amersham Biosciences公司产品。

1.2　方法

1.2.1　峰面积线性梯度回归分析　　用 Sephadex G25 填料装一 1.6 cm × 13 cm 的柱子，将 BSA 配成 1 g/L 溶液，分别采用不同体积的上样环上样 0.1、0.5、1、2 mg，蒸馏水洗脱，峰面积计算采用 AKTA FPLC 的 UNICORN 软件。

1.2.2　不同方法测定结果比较　　分别采用不同体积上样环上样 0.1、0.5、1、2 mg BSA，并分别采用峰面积计算法，Lowry 法和常规紫外分光光度法测定回收率。

1.2.3　重复性检验　　将 1 g/L BSA 用 2 ml 上样环连续上样 10 次，根据峰面积计算方法计算蛋白回收率，并与 Lowry 法和常规紫外分光光度法比较。

1.2.4　不同蛋白峰面积预测及检验　　用注射器分别将 1 g/L 的 BSA、γ 球蛋白、葡萄球菌 A 蛋白推入 FPLC 的紫外测量池测定紫外吸收值，推测理论峰面积，并分别上样 2 mg，测定峰面积，与理论峰面积进行比较。

1.2.5　rhZP3 蛋白含量理论峰面积计算　　利用 DNAstar 软件，预测 rhZP3 的 A_{280}，计算每 mg rhZP3 在层析图中的理论峰面积。

1.2.6　rhZP3 纯化及含量测定　　rhZP3 工程菌培养上清，用 NaOH 调 pH 至 7.4，上镍螯合层析柱，用磷酸缓冲液(0.02 mol/L，含 0.5 mol/L NaCl，10 mmol/L 咪唑，pH 7.4)洗去未结合蛋白，然后用含 100 mmol/L 咪唑的磷酸缓冲液进行洗脱，收集洗脱峰组分，用 Sephadex G25 柱脱盐。收集纯化蛋白峰，通过计算峰面积推测蛋白含量，同时用 Lowry 法测定蛋白含量。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行直线回归及相关分析。

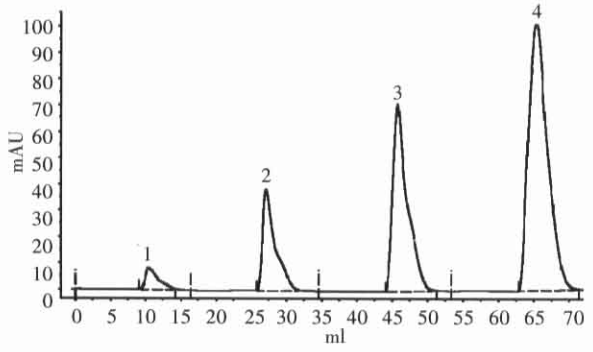
2　结果

2.1　回归方程的计算

不同量 BSA 的洗脱峰图见图 1。将 3 次实验所得峰面积的平均值用 SPSS 10.0 统计软件进行回归分析，得到回归方程：

$$Y = 142.699\,X + 1.929$$

Y 为峰面积(mAU × ml)，X 为蛋白量(mg)，相关系数 r 为 0.999，说明峰面积(mAU × ml)与蛋白量(mg)为正比直线关系。



1:0.1 mg BSA; 2:0.5 mg BSA; 3:1 mg BSA; 4:2 mg BSA

图 1　不同上样量洗脱峰图

Fig 1　Elution curves for different doses of samples

2.2　不同测定方法结果比较

见表 1。

表 1　不同测定方法回收率的比较

Tab 1　Comparison of the recovery rates from different analytical methods

Standard sample quantity (mg)	Measure of peak area (mg)	Measure of Lowry method (mg)	Measure of UV spectrophotometer (mg)
0.1	0.09	0.11	0.15
0.5	0.53	0.56	0.53
1	1.03	1.24	1.14
2	1.95	2.02	1.98
Recovery rate (%, $\bar{x} \pm s$)	99.13 ± 7.03	111.75 ± 9.46	117.25 ± 22.67
CV(%)	7.1	8.5	19.3

2.3　结果的重复性检验

见图 2 和表 2。

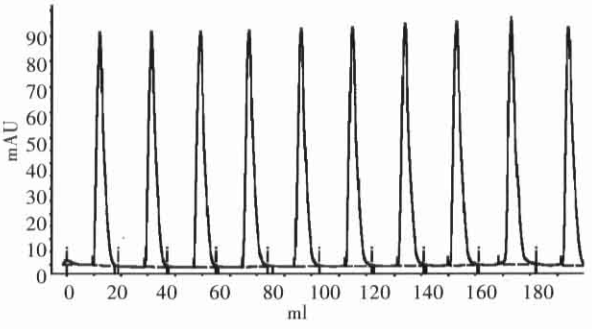


图 2　连续上样洗脱峰图 (2 mg BSA × 10)

Fig 2　Elution curves for consecutive sample of 2 mg BSA (× 10 times)

表 2　不同测定方法结果的重复性比较

Tab 2　Comparison of the accuracy by different analytical methods

Analytical methods	Peak area	Lowry method	UV spectrophotometer
$\bar{x} \pm s$(mg)	2.02 ± 0.06	2.10 ± 0.11	2.10 ± 0.07
CV(%)	2.97	5.24	3.33

2.4　不同蛋白峰面积预测及检验

1 g/L BSAγ 球蛋白、葡萄球菌 A 蛋白利用 FPLC 的紫外测量池测得的紫外吸收值分别为 143、264 mAU 和 60 mAU。对照 BSA 峰面积的回归方程我们可看出，Y≈ AX(可简化为 X = Y/A)，Y：目的蛋白的峰面积(mAU × ml)，A：1 g/L 目的蛋白在测定仪器的光吸收值(mAU)，X：目的蛋白含量(mg)。将 γ 球蛋白、葡萄球菌 A 蛋白的测定值代入该式，2 mg 蛋白理论峰面积分别应为 528 mAU × ml 和 120 mAU × ml。根据层析软件计算结果，其实际洗脱峰面积分别为 520 mAU × ml、120 mAU × ml，回收率分别为 98.48%、100%，结果表明，不同的蛋白，均可采用该方法和方程式进行粗略估测。

2.5　rhZP3 蛋白含量理论峰面积计算结果

根据 DNAstar 软件计算结果，rhZP3 的分子量应为 44 635.59，1A_{280} = 1.06 g/L，即 1 g/L rhZP3 的 A_{280} = 0.943，根据我们对 BSA 等的测定结果可知，1 g/L 蛋白在本层析系统的紫外测量池(5 mm 池)测得的紫外吸收值约为 1 cm 厚度比色杯的 1/5，即 1 g/L rhZP3 在 FPLC 紫外测量池的预期测量值约为 188.6 mAU。根据我们的方程式 Y = AX，1 mg rhZP3 在该 FPLC 蛋白纯

化系统中，峰面积应为 188.6 mAU × ml。

2.6 rhZP3 的纯化结果

50 ml rhZP3 培养上清经亲和层析，脱盐，最后纯化蛋白峰面积为 755 mAU × ml，推测其含量为 4 mg，Lowry 法测定结果为 4.2 mg，两者结果相似。

3 讨论

层析系统中，均采用紫外吸收法监测蛋白峰的位置和浓度，虽显示的是单点的吸收值(mAU)，但可进行峰面积的计算，其结果是 mAU × ml，直接反映了蛋白含量，减少了人为误差。国外已有根据目的峰的大小定量蛋白的探索[2]，国内也有研究者提出利用光纤式检测探头和计算机实时采集数据系统对蛋白质溶液浓度进行快速，灵敏，准确的在线检测[3]。根据反复的实验验证，我们发现利用方程式 X = Y/A 计算洗脱峰目的蛋白含量，其线性化结果、准确度和重复性均高于传统的方法，且瞬时可得结果，不浪费样本，无需额外操作，还能进行回顾性研究，对含量较低的样品测定更为有利。

该法的原理与紫外吸收法相同，因而也具有相同的缺陷：含核酸、色素洗脱峰不能用该法检测；不同蛋白其紫外吸收值会有所不同[4]，造成同等量的蛋白峰面积差异较大，层析系统的流动池体积也会影响蛋白的紫外实测值。因此，需用标准品(≥0.1 mg)测定参考峰面积。也可配成标准溶液，利用所用层析仪器的紫外测定池测定其紫外吸收值，粗略估计每 mg 蛋白的期望峰面积，根据峰面积粗略计算蛋白量。目前，随着蛋白质分析软件的应用，对已知序列的基因工程产物，已可计算其 A_{280} 吸收值，而通过参考蛋白的测定，可测知所用层析系统测量池测定值与 1 cm 测量杯测定值的比值。因此，只要知道目的蛋白的 A_{280} 吸收值，就可推知它在所用层析系统测量池的吸收值，从而通过计算得知每 mg 目的蛋白的理论峰面积，根据实测峰面积对洗脱峰中的目的蛋白进行初步定量。随着层析自动化系统的普及，该法将可作为层析过程中一种简便的常规蛋白定量方法。

参考文献：

[1] 唐 键，谢琪璇，潘善培，等. 重组人卵透明带 ZP3 蛋白在毕赤酵母中的表达[J]. 生物工程学报，2003，19(6)：758－762.

[2] Martins M B，Supico A，Simoes S I，*et al*. An analytical methodology to quantify the incorporation of enzymes in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles based on size exclusion chromatography[J]. J Pharm Biomed Anal，1997，15(6)：811－818.

[3] 高瑞昶，宋宝东，李凭力，等. 光纤技术在蛋白质浓度检测中的应用[J]. 天津大学学报，2000，33(4)：470－473.

[4] 汪家政，范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京：科学出版社，2000. 38－41.

(编辑 薛国文)

(上接 1207 页)

在转染了人 FasL cDNA 的 COS 细胞上清中检测出来，他们还进一步证实活化的人外周血淋巴细胞也可分泌 sFasL；随后发现 sFasL 存在多种肿瘤和自身免疫性疾病中，并有不同的作用机制，有研究者发现人 T 细胞系 Jurkat 细胞活化后，快速释放 sFasL，是诱导细胞凋亡的主要方式[2]。Xiao 等[3]最近研究认为，sFasL 在与靶细胞 Fas 结合时，需对其结合位点进行修饰，而只有在靶细胞膜 Fas 高度表达时，sFasL 才可能修饰；细胞膜表达的 FasL 同时具备结合和信号传导功能，不需修饰，能更有效的诱导细胞凋亡，sFasL 仅作为协同途径存在。

肝癌发生的一个重要方面是由于病毒感染肝细胞凋亡能力下降，使变异肝细胞得以生存和生长，导致肝癌[4,5]。研究表明，肝癌细胞 Fas 表达水平远高于肝炎及肝硬变肝细胞，而对 FasL 介导的凋亡不敏感。我们发现，肝癌患者血清中可溶性 Fas(sFas)明显升高，可溶性 Fas 和肝癌细胞膜 Fas 竞争性与 FasL 结合，从而抑制肝癌细胞凋亡[6]。本实验表明，肝癌患者血清 sFasL 明显低于慢性肝炎及肝炎肝硬变患者，由此推测，肝癌细胞凋亡受抑制还与血清 sFasL 水平下降有关，其机制可能为：①肝癌时活化 T 细胞分泌 sFasL 不足，不能产生足够的 sFasL 与肝癌细胞膜 Fas 结合；②sFasL 与 sFas 结合后消耗。而肝炎及肝硬变时，sFasL 无显著性差异，sFasL 的高表达，有助于诱导病毒感染细胞和变异细胞凋亡。

sFasL 在肝癌、肝炎及肝硬变患者血清中的差异，提示在肝癌的发生中，sFasL 有一定的作用，有进一步研究价值。

关键词：可溶性 Fas 配体；细胞凋亡；肝细胞癌；乙型病毒性肝炎

中图法分类号：R512.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] Tanaka M，Suda T，Takahashi T，*et al*. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes[J]. EMBO J，1995，14(6)：1129－1135.

[2] Suda T，Tanaka M，Miwa K，*et al*. Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand[J]. J Immunol，1996，157(9)：3918－3924.

[3] Xiao S，Jodo S，Sung S S，*et al*. A novel signaling mechanism for soluble CD95 Ligand，synergy with anti-CD95 monoclonal antibodies for apoptosis and NF-kappaB nuclear translocation[J]. J Biol Chem，2002，277(52)：50907－50913.

[4] 罗俊卿，许其稳，王珍亮，等. 氧化砷诱导人肝癌细胞凋亡相关基因的实验研究[J]. 中国现代医学杂志，2003，13(6)：30－31.

[5] 席 睿，阮 翘，韩星敏. 原发性肝癌患者血清铁蛋白、酸性铁蛋白检测[J]. 郑州大学学报(医学版)，2002，37(1)：43－44.

[6] 陈 军，郑宣鹤，唐晓鹏. 慢性乙型肝炎患者与肝癌患者血清可溶性 Fas 水平研究[J]. 湖南医科大学学报，2001，26(2)：173－174.

(编辑 周 芳)