DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.03.016

用2-亚胺生物素-AH-琼脂糖凝胶4B亲和层析纯化抗生物素蛋白

刘奉亭 陈鸿书（生化教研室）

根据抗生物素蛋白和生物素之间的高度的亲和力发展起来的ABC（Avidin-Biotin-Enzyme Complex）技术已在免疫检测及核酸杂交方面得到了广泛的应用[1][2]，建立一种快速提取高纯度抗生物素蛋白的方法，是促进该项技术发展的重要环节。

抗生物素蛋白的纯化通常采用羧甲基纤维素离子交换层析[3]或固定化生物素亲和层析[4]的方法。前法不仅产率低，纯度也很难保证；后法虽可制得较纯的抗生物素蛋白，但由于Avidin-Biotin的高度亲和力，需要极端的条件（6mol/L盐酸胍，pH1.5）才能将其洗脱下来，不仅成本高，而且还需要进行蛋白复性等工作，操作较为复杂。

本文利用生物素的衍生物2-亚胺生物素，在不导致蛋白变性的条件下，亲和层析提取抗生素蛋白，与上述两法相比，操作更简单，产品纯度更高。

材料和方法

一、2-亚胺生物素-AH-琼脂糖凝胶4B柱的制备

1，6-已二胺-琼脂糖凝胶4B的制备参照Cuatrecasas[5]的方法。

取1，6-已二胺-琼脂糖凝胶4B浆14ml（干重约2g），加入32mg 2-亚胺生物素（自制），用1%HBr调pH4.8，搅拌使2-亚胺生物素溶解，然后边搅拌边缓缓加入0.34g 1-环己基-3-(2-吗啉代乙基）碳二亚胺对甲苯磺酸盐（Fluka），反应14小时以上，反应过程中不断加入1%HBr维持pH4.8，最后在2号多孔玻璃漏斗上依次用1mol/L NaCl和重蒸水洗涤并装柱。

二、抗生物素蛋白的分离提纯

1. 硫酸铵分步沉淀法粗提：把白壳鸡蛋清按2:1（蛋清：水，v/v）稀释，加入硫酸铵使达到70%饱和度，搅拌两小时后，于4℃，8000×g离心20分。弃去沉淀，上清液加入硫酸铵至100%饱和度，搅拌过夜，9000×g离心30分钟（4℃），将沉淀溶于适量的重蒸水，于4℃对重蒸水透析，然后用1mol/L NaOH调pH11，加入NaCl至浓度为1mol/L，滤去不溶组分，4℃保存。

2. 2-亚胺生物素-AH-琼脂糖凝胶4B柱亲和层析纯化：将抗生物素蛋白粗提液加到预先用50mmol/L Na_2CO_3（pH11，含1mol/L NaCl）平衡的2-亚胺生物素-AH-琼脂糖凝胶4B柱上，用平衡缓冲液洗脱（10毫升/时）至282nm的光吸收回到基线。然后用50mmol/L乙酸铵缓冲液（pH4.0，含0.5mol/L NaCl）洗脱，收集洗脱峰组分，4℃对水透析。

洗脱峰的蛋白质含量用紫外吸收法测定。

三、抗生物素蛋白活性的测定[6]

将抗生物素蛋白溶液适当稀释后，以重蒸水为空白，于分光光度计上用已知浓度的生物素溶液滴定，直到232nm的光吸收不再增加为止，根据用去生物素的量计算抗生物素蛋白的活性。

四、抗生物素蛋白的生物素-辣根过氧化物酶显色

将硝酸纤维素滤膜置于PBS溶液（phosphate buffered saline，pH7.4）中浸泡30分钟，取出后用滤纸吸干，点样，65℃烘烤5分，用PBST溶液（含0.02%NaN_3、0.3%Tween20的PBS溶液）洗涤15分，置生物素-辣根过氧化物酶溶液（15μg/ml，pH7.5，本室自制）中25℃浸泡15分，于37℃用PBS溶液洗涤一次，PBS-T溶液洗涤二次，置显色液（含3,3-联苯胺0.6mg/ml，过氧化氢0.45μg/ml，pH7.4）中于20℃显色20分，重蒸水洗涤，

五、聚丙烯酰胺凝胶电泳分析抗生物素蛋白的纯度

采用垂直平板型不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳，凝胶溶液的配制见表1，凝胶板尺寸为7.8×10×0.2cm，样品中含10%的甘油，电极缓冲液为β-丙

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

氨酸-乙酸缓冲液（pH4.5），电流：20mA，电泳时间：4小时，0.2%考马氏亮蓝R-250染色，乙酸-乙醇-水溶液（8:25:67，v/v）脱色。

表1 凝胶溶液的制备

分离胶（10%）		浓缩胶（3%）	
30%(W/V)丙烯酰胺 0.8%(W/V) N,N'-甲双丙烯酰胺	5 ml	30%（W/V）丙烯酰胺 0.8%(W/V) N,N'-甲双丙烯酰胺	0.5ml
3M 乙酸甲（pH4.3）	1.87ml	0.5M 乙酸钾（pH6.8）	0.625ml
N,N,N',N'-四甲基乙二胺	20μl	N,N,N',N'-四甲基乙二胺	5μl
10% 过硫酸铵	300μl	10% 过硫酸铵	100μl
水	8 ml	水	3.8ml

结　果

一、亲和层析结果和柱性能测定

用2-亚胺生物素-AH-琼脂糖凝胶4B柱分离抗生物素蛋白的图谱见图1，用50mmol/L Na_2CO_3（pH11，含1mol/L NaCl）溶液洗脱时，无论洗脱多长时间都不会洗下抗生物素蛋白峰，更换50 mmol/L乙酸铵溶液(pH4.0，含0.5mol/L NaCl)后，抗生物素蛋白峰很快就被洗脱下来。

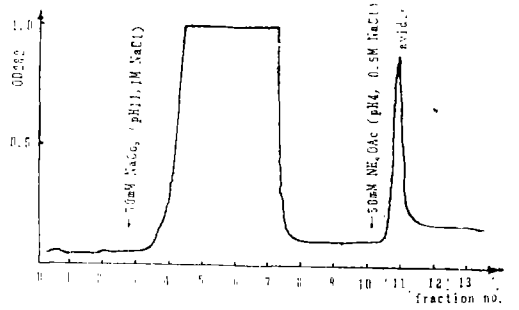


图1　用2-亚胺生物素-AH-琼脂糖凝胶4B柱亲和纯化抗生物素蛋白。柱尺寸：1×8cm，流速：10ml/h

通过紫外吸收法测得2-亚胺生物素-AH-琼脂糖凝胶4B柱对抗生物素蛋白的结合能力为0.7mg/ml凝胶，抗生物素蛋白洗脱液中的蛋白浓度为0.53 mg/ml，产率为25mg/L蛋清。与羧甲基纤维素离子交换层析方法[3]（浓度0.078mg/ml，产率7mg/L蛋清）相比，洗脱液中抗生物素蛋白浓度提高6倍以上，产率提高约3.5倍。

二、抗生物素蛋白峰的分析鉴定

1．活性测定：根据结合生物素后232nm光密度的增加测得抗生物素蛋白的活性为14units/mg，与文献报道值[7]接近。将纯化的抗生物素蛋白溶液按1/5逐级稀释点到硝酸纤维素滤膜上，用生素物标记的辣根过氧化物酶显色，可见很高的灵敏度（图2）。

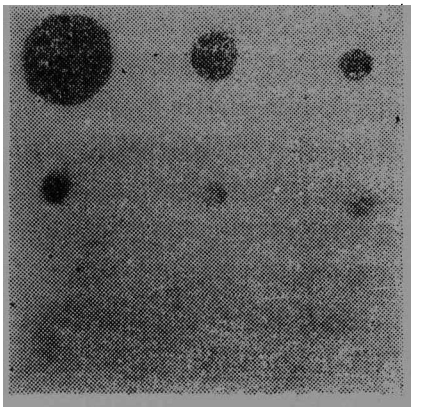


图2　在硝酸纤维素滤膜上用生物素-辣根过氧化物酶显色抗生物素蛋白。点样量：10μg到0.0256ng（1/5逐级稀释）

2．纯度鉴定：按上法制备的及商品的抗生物素蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图3所示，按上法纯化的抗生物素蛋白只呈现一条带，而国内外品至少有两条带，表明本产品的纯度高于国内外同产类产品。

讨　论

Green[8]的研究表明，非质子化的2-亚胺生物素与生物素具有相似的功能，能与抗生物素蛋白牢固结合，随着pH的降低，2-亚胺生物素对抗生物素蛋白的胺亲和力迅速降低。利用这一性质，使用不同pH的洗脱液，就可对抗生物素蛋白进行亲和层析分离

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

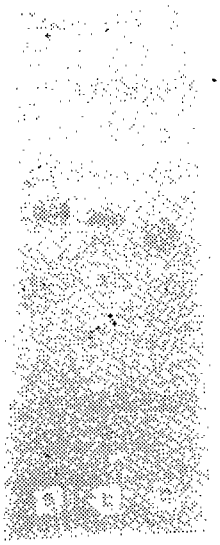


图3　不同来源抗生物素蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳。a、用2-亚胺生物素-AH-琼脂糖凝胶4B柱纯化的抗生物素蛋白；b、海军医学研究所的产品；c、西德Boehring Mannhein的产品

提纯。由于抗生物素蛋白在很宽的pH范围内是稳定的[9]，所以用此法提纯抗生物素蛋白时，不会引起该蛋白变性失活。

用固定化生物素柱虽然也能较好地分离提纯抗生物素蛋白，但由于Avidin-Biotin的高度亲和力，只有使用6mol/L盐酸胍（pH 1.5）才能把抗生物素蛋白洗脱下来，洗脱后还要立即加入10倍的缓冲液或透析使抗生物素蛋白复性[4]，不仅操作麻烦，而且大量消耗盐酸胍，成本较高。

使用2-亚胺生物素制作的亲和层析柱，则可克服上述缺点，只需使用不同pH的洗脱液，就可在蛋白不变性的前提下亲和纯化抗生物素蛋白，不仅成本低，操作简单，而且纯度高于国内外同类产品（图3）。与羧甲基纤维素离子交换层析[3]相比，2-亚胺生物素亲和层析方法的产率提高3.5倍，洗脱液中抗生物素蛋白的浓度提高6倍多，减少了进一步浓缩干燥的工作量。

另外，在使用生物素-抗生物素蛋白系统进行研究工作的时候，有时要使用抗生物素蛋白的复合物，如铁蛋白轭合的抗生物素蛋白等[1]。若使使用固定化的生物素柱来纯化这些轭合物，极端的洗脱条件（6mol/L盐酸胍，pH1.5）很有可能使之受到破坏，而使用2-亚胺生物素-AH-琼脂糖凝胶4B柱，则有可能把它们以活性的形式分离出来。

参考文献

1. Bayer EA and Wilchek M. in Meth. Biochem Anal (Glick D,ed.) 1980; 26:1～45
2. 郑志明、向近敏。国外医学分子生物学分册1984；6(2):79～82
3. 施秉钧，等。中华微生物学和免疫学杂志1985；5(3):161
4. Cuatrecasas P and Wilchek M. Biochem Biophys Res Commun 1968; 33:235
5. Cuatrecasas P. J Biol Chem 1970; 245:3059
6. Green NM. Biochem J 1963; 89:599
7. Melamed MD and Green NM. Biochem J 1963; 89:591
8. Green NM. Biochem J 1966; 101:774
9. Green NM. Biochem J 1963; 89:602

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net