

研究论文

三种蛋白质生物素化化学方法的比较研究

童宇, 薛才, 王永刚, 马建忠*

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050)

摘要: 本文以N-羟基丁二酰亚胺(N-Hydroxy succinimide, NHS)活化酯偶联法原理为基础, 探究结晶偶联法、反应液直接偶联法及二环己基碳二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide, DCC)偶联法之间的优劣。旨在为实验室安全有效、快捷便利地进行蛋白质生物素化提供更优选择。分别用上述三种方法对牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)进行生物素偶联实验, 用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)以及紫外波谱扫描特征吸收峰鉴定偶联产物, 用凝胶成像系统及Image Lab软件操作系统测定偶联产物相对分子质量, 以此确定偶联比。结合上述定性、定量结果对三种偶联方法进行评价。结果显示, 三种方法均可以将生物素偶联到BSA上。结晶偶联法首先通过化学合成活化酯并结晶, 产率为37.28%, 熔点为214~217, 偶联比为8.9, 单次反应成本128.71元; 直接偶联法偶联比为7.0, 单次反应成本34.01元; DCC偶联法偶联比为2.2, 单次反应成本33.81元。综上所述可知, 反应液直接偶联法相较于结晶法, 其偶联效果与结晶偶联法相差无几; 相较于DCC偶联法, 其偶联反应进行过程中对载体蛋白的变性损失更小。且反应液直接偶联法操作简单, 用时较短, 过程安全, 价格低廉。

关键词: 蛋白质生物素化; 直接偶联法; 结晶偶联法; 二环己基碳二亚胺偶联法; 紫外扫描光谱

Comparison of three chemical methods for protein biotinylation

TONG Yu, XUE Cai, WANG Yonggang, MA Jianzhong*

(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Based on the principle of the N-Hydroxy succinimide (NHS) activated ester coupling method, advantages and disadvantages of the crystallization coupling method, the direct coupling method of reaction solution and the dicyclohexylcarbodiimide (DCC) coupling method were explored. This paper aims to provide a better strategy to perform protein biotinylation safely, effectively, quickly and conveniently. Biotin coupling experiments were carried out on Bovine albumin (BSA) by the above three methods respectively, and the coupling products were analyzed by SDS- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and UV-scanning spectrum. The relative molecular mass of the coupling products was calculated by the Gel Imaging System and the Image Lab (Bio-Rad). Then the coupling ratios were determined. Combined with the above qualitative and quantitative results, the three coupling methods were evaluated. The results showed that all three methods can conjugate biotin to BSA. The crystallization coupling method firstly activates the ester by chemical synthesis and crystallization, the yield rate is 37.28%, the melting point is 214~217 °C, the coupling ratio is 8.9, and the single reaction cost is ¥128.71; the coupling ratio of the direct coupling method is 7.0, and the cost of a single

收稿日期: 2022-04-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860063)

第一作者: E-mail: t1127361658@163.com

*通信作者: E-mail: majz@lut.edu.cn

reaction is ¥34.01; the coupling ratio of the DCC coupling method is 2.2, and the cost of a single reaction is ¥33.81. The direct coupling method has almost the same coupling effect as the crystallization coupling method and lower denaturation loss of the biotinylated protein in the DCC coupling method. Therefore, the direct coupling method is simple in operation, short in time, safe in process and low in price.

Key Words: protein biotinylation; the direct coupling method; the crystallization coupling method; the dicyclohexylcarbodiimide coupling method; UV-scanning spectrum

生物素(Biotin)是由植物或原核生物合成的一种可溶性小分子物质,其分子式为 $C_{10}H_{16}N_2O_3S$,相对分子质量为244.3032,分子结构如图1所示,为有3个手性碳原子的噻吩并咪唑酮环连接戊酸侧链的结构。出于手性碳原子作用,生物素分子有8种立体异构体,但是其中只有D-(+)-生物素才具有生物活性^[1]。生物素又被称为维生素H、辅酶R,也属于维生素B族(被称作维生素B7),是一种水溶性维生素^[2]。

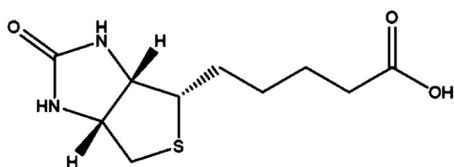


图1 D-(+)-生物素结构式

生物素可与亲和素(avidin)通过非共价键结合。亲和素亦称抗生物素蛋白,是最早从蛋清中提取出的一种碱性糖蛋白^[3]。生物素与亲和素之间的非共价结合的结合力Kd值高达 10^{-15} mol/L^[4],是自然界中发现的与生物素具有最强亲和力的物质^[5],特异结合能力是抗原抗体的100万倍^[6]。

利用生物素与亲和素之间的强效亲和作用,以及它们既可偶联抗体等大分子生物活性物质,又可被酶等多种材料所标记的特性,研制成一种新型生物反应放大系统,即生物素-亲和素系统(biotin-avidin-system, BAS)。并建立了多种高灵敏度、高特异性、高度稳定,方便、经济和快速的生物反应检测和分离纯化手段^[7]。

目前在研究领域中,单纯的生物素被认为是难以进行蛋白质生物素化的,所以要对生物素进行必要的化学修饰。而化学修饰的部位通常选择在其戊酸链上^[8]。目前,比较常见的一种修饰方法是N-羟基丁二酰亚胺(N-Hydroxy succinimide, NHS)活化酯法。即将生物素先与NHS反应,将生

物素末端的羧基转化为含有活泼酯结构的NHS-生物素酯(NHS-biotin, BNHS)^[9],进而使活化酯与蛋白质反应达到生物素偶联蛋白的目的。然而,在文献中有将活化酯结晶提纯后再与蛋白质偶联反应的方式^[10],也有将活化酯反应原液直接用于偶联反应的方法^[11]。

由于活化酯结晶偶联法在操作中涉及复杂的除杂和纯化过程,还需要使用乙醚、异丙醇等易燃易爆且有毒的试剂,带来诸多不便。若非工业生产纯品试剂用于商业,而是在实验室研究中用于中间步骤,则可以采用反应液直接偶联法。该方法可以简化操作步骤、降低成本及实验安全风险。在此,本文从偶联效率、操作流程以及方法成本等方面对NHS活化酯结晶偶联法与两种反应液直接偶联法进行了探究和比较。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

本研究所使用的主要仪器有:分析天平(杭州友恒称重设备有限公司)、电泳系统及蛋白质电泳仪(Bio-Rad公司)、高速离心机(上海安亭科学仪器厂)、转移脱色摇床(Qilinbeier公司)、涡旋震荡器(江苏金坛市医疗仪器厂)、电热恒温水浴锅(江苏金坛市医疗仪器厂)、冷冻高速离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司)、光学显微镜(麦克奥迪有限公司)、截留相对分子质量为8 000~14 000的透析袋(Biotopped产品)、凝胶成像系统及Image Lab软件操作系统(BIO-RAD)、pH计(上海雷磁仪器有限公司)、微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司)、熔点仪(上海易测仪器设备有限公司)。

1.2 试剂与溶液

1.2.1 试剂

NHS、二环己基碳二亚胺(DCC)、D-(+)-生物

素购自生工生物工程(上海)股份有限公司;牛血清白蛋白(BSA)购自赛国生物科技有限责任公司;N,N-二甲基甲酰胺(DMF)购自天津天新精细化工开发中心;乙醚购自白银良友化学试剂有限公司;无水乙醇及异丙醇购自天津富宇精细化工有限公司。其中,NHS和BSA纯度为生物试剂纯度,DCC纯度为优级纯度,D-(+)-生物素纯度为美国药典级纯度,其他溶剂纯度皆为分析纯。

1.2.2 溶液

本研究所用的主要溶液有:5×SDS Loading Buffer、1 g/L考马斯亮蓝G-250染色液、0.1 g/L考马斯亮蓝R-250溶液、考马斯亮蓝染色脱色液、1×PBS缓冲液(pH7.24)、10 mg/mL BSA的PBS溶液。

1.3 BNHS活化酯结晶偶联法

1.3.1 BNHS活化酯制备

参考文献[9]制备BNHS,反应如图2所示。称取0.5 g生物素、0.25 g NHS、0.45 g DCC一起溶于10 mL DMF中。反应体系置于50 °C水浴中24 h,抽滤去除针状白色结晶副产物。滤液加入乙醚后开始产生白色沉淀,直到白色沉淀不再明显增多,冰浴1 h后过滤得沉淀。取白色沉淀加入20 mL热异丙醇溶解,冰浴3 h重结晶。异丙醇重结晶反复2次。最后用无水乙醇适量淋洗晶体,挥干结晶上残留的乙醇。称重,计算产率并低温保存。所得晶体取出适量,在光学显微镜下观察其晶体形态。将产物结晶、NHS、生物素各自称取10 mg溶于0.5 mL DMF后进行紫外扫描(200~350 nm),并用熔点仪对适量晶体进行熔点测定,使用H-NMR

和IR表征其结构。

1.3.2 BNHS活化酯偶联

取1.3.1中制备的活化酯晶体20 mg,加入2 mL DMF,在涡旋振荡仪上震荡使其充分溶解,冰上预冷10 min。取BSA溶液5 mL,冰上预冷10 min。将活化酯溶液缓慢滴入BSA溶液,边加边搅拌。置于4 °C反应过夜,然后8 000 r/min离心15 min,取上清液透析2 d,期间6 h换液一次。偶联产物用微量分光光度计测定蛋白质浓度,置于-20 °C保存。

1.4 NHS活化酯直接偶联法

由于活化酯结晶会带来称取困难、水解失效、提纯复杂等问题。在文献[12]的基础上,采用“一锅法”——活化酯制备反应液直接偶联蛋白质的策略,不经过结晶操作,在活化酯反应完成后,直接用含有活化酯的反应液与蛋白质进行偶联(图3)^[13]。

取生物素20 mg、NHS 15 mg溶于2 mL DMF中,加入17 mg DCC。待充分溶解后置于4 °C反应5 h。8 000 r/min离心15 min,取上清液记为A液。10 mg/mL的BSA溶液记为B液。A、B液均置于冰上预冷10 min,将A液缓慢加入B液,加的过程中不断搅拌。4 °C反应过夜,而后将反应液8 000 r/min离心15 min,取上清液透析2 d,期间6 h换液一次。偶联产物用微量分光光度计测定蛋白质浓度,置于-20 °C保存。

1.5 DCC直接偶联法

作为脱水缩合剂,DCC在活化酯反应法中的作用是让生物素的羧基部分(-COOH)与N-羟基琥珀酰亚胺的羟基部分(-OH)脱水形成酯键。但是文献

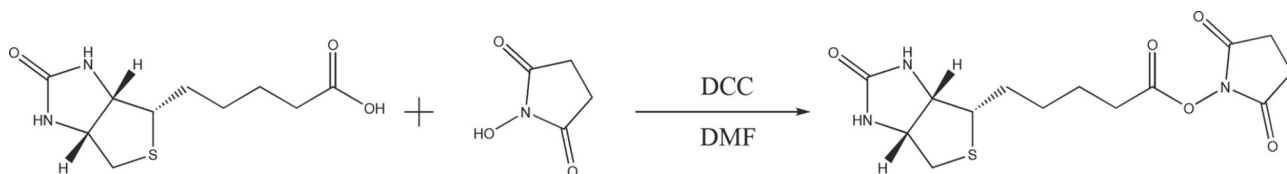


图2 BNHS化学合成路线图

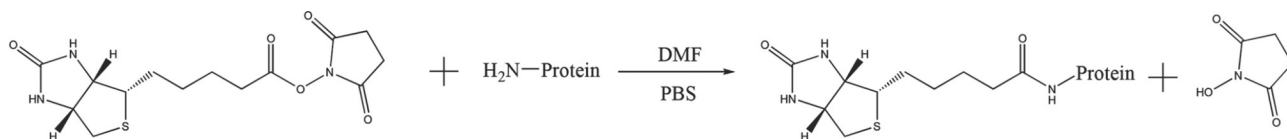


图3 BNHS法偶联蛋白反应流程

报道, DCC也可以直接用于小分子物质与蛋白质的偶联反应中^[14]。蛋白质上的氨基与生物素上的羧基, 可以在DCC的脱水缩合作用下, 形成酰胺键, 从而实现偶联效果。其反应如图4所示。

取DCC 20 mg、生物素25 mg溶于2 mL DMF。室温反应3 h, 记为C液。10 mg/mL的BSA溶液记为D液。C、D液均置于冰上预冷10 min, 将C液缓慢加入D液, 加的过程中不断搅拌。4 °C反应过夜, 而后将反应液8 000 r/min离心15 min, 取上清液透析2 d, 期间6 h换液一次。所得的偶联产物用微量分光光度计测定蛋白质浓度, 置于-20 °C保存。

1.6 偶联产物的鉴定

1.6.1 UV波谱扫描鉴定

按文献分别对上述各方法所得的透析后偶联产物使用微量分光光度计测定蛋白质浓度^[15]。用PBS将各偶联产物稀释到相同浓度, 并配制等浓度的BSA参照溶液。用DMF配制生物素参照溶液。在波长190~350 nm范围内进行紫外扫描。

1.6.2 SDS-PAGE鉴定

样品加入Loading Buffer后煮沸15 min。配制SDS-PAGE凝胶, 选择浓缩胶浓度为5%, 分离胶浓度为10%。浓缩胶电泳电压为60 V, 待样品泳动至同一基线即调整电压为120 V, 进行分离胶电泳。待电泳结束后, 取出胶块, 用考马斯亮蓝-R250染色1~2 h后用脱色液对胶块进行脱色, 期间脱色液颜色变深即换液。

1.6.3 偶联比测定

利用凝胶成像系统对SDS-PAGE后的蛋白质条带进行拍照与分析。通过Image Lab软件配合蛋白质分子量标准品(Marker)对电泳所得条带进行拟合分析^[16]。按下式计算标准品各条带 R_f 值:

$$R_f = L_i / L_0$$

注: L_i 为凝胶顶部到标准品各条带的距离, L_0 为凝胶顶部到电泳染料迁移前沿的距离

对标准品各条带代表的相对分子质量取常用对数值($\lg MW$)为Y, R_f 值为X作线性函数: $Y = aX + b$ 。计算系数a、b以及 R^2 (线性相关系数)^[17]。

通过计算凝胶上载体蛋白(空白对照)和三种偶联法所得到的偶联产物蛋白的 R_f 值, 计算出四条泳道中蛋白质条带相应的 $\lg MW$ 。进而得出各蛋白质条带的相对分子质量, 并按照下列公式计算各种方法下的偶联比^[18]。

$$\text{偶联比} = (M_1 - M_0) / M_B$$

注: M_1 为偶联产物相对分子质量, M_0 为载体蛋白相对分子质量, M_B 为生物素相对分子质量

2 结果

2.1 BNHS活化酯结晶

反应结束后, 产物BNHS活化酯经重结晶后称重, 共收得产物0.2344 g, 产率约为37.28%, 熔点测定熔程为214~217 °C。

结晶产物为白色结晶粉末, 光学显微镜下观察结果如图5。产物主要为片状或短棒状结晶, 总体粒度较为均一, 但也有一些较小的碎片结晶。

将反应产物、生物素以及NHS配成20 mg/mL的DMF溶液。在波长200~350 nm下进行扫描, 对比三种物质的紫外吸收峰, 如图6所示。紫外扫描结果表明, 生物素在波长245 nm时有明显吸收, NHS在波长260 nm时有明显吸收, 反应产物在波长245 nm、260 nm有两处明显吸收, 体现出生物素和NHS的特征吸收, 符合紫外光谱的叠加原理。

图7、图8为反应产物重结晶样品的H-NMR(图7)以及IR(图8)表征图谱。由核磁共振氢谱数据可知: ^1H NMR (DMSO, 400 MHz): $\delta = 6.44$ (s, 1H, -NH-), 6.38 (s, 1H, -NH-), 4.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, -CHCH₂S), 4.15 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, 2.89~2.81 (m, 5H, -CH₂-), 2.67 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, -CHCOO), 2.60 (d, $J = 12.8$ Hz,

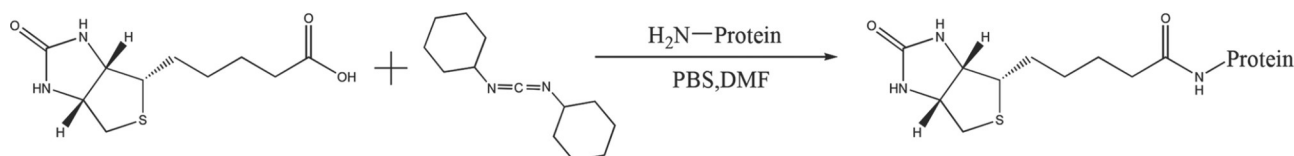


图4 DCC法偶联蛋白反应流程

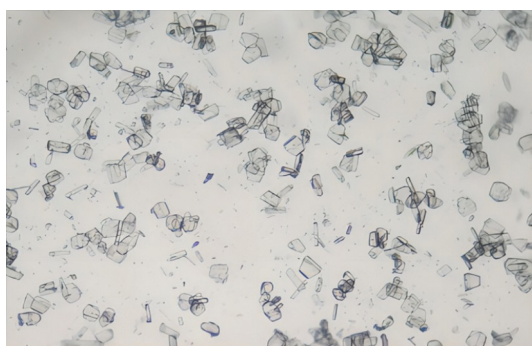


图5 BNHS结晶光镜观察

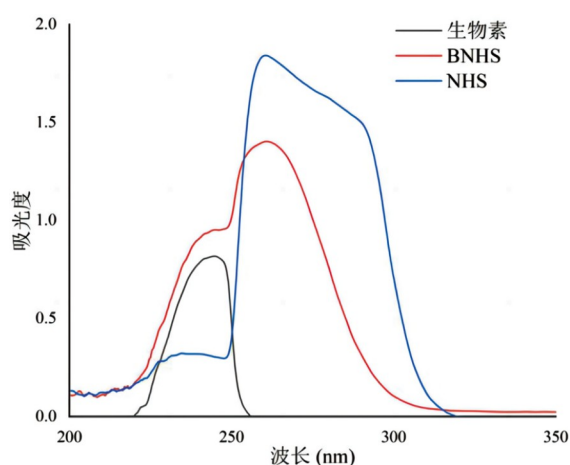


图6 BNHS、生物素、NHS紫外扫描光谱

1H, -CH₂S), 1.68–1.42 (m, 6H, -CH₂-)。

而由红外光谱数据可知：波数3 237 cm⁻¹和3 118 cm⁻¹附近范围内的吸收峰分别为酰胺A谱带

和B谱带中的N-H伸缩振动峰；波数1 827 cm⁻¹附近范围内的吸收峰为生物素上环内酰胺中C=O结构的伸缩振动峰；波数1 787 cm⁻¹和1 704 cm⁻¹附近范围内的吸收峰分别为N-羟基琥珀酰亚胺(环状酰亚胺)上C=O结构的对称偶合振动峰和不对称偶合振动峰；波数1 733 cm⁻¹附近范围内的吸收峰为反应产物中新生成的酯羰基中C=O结构的伸缩振动峰；波数740 cm⁻¹附近范围内的吸收峰为生物素上N-H结构中的面外弯曲伸缩振动峰。

综合熔点测定、紫外扫描光谱、红外光谱和核磁共振氢谱的表征，则可得出反应产物符合目标产物化学特征的判断，即为BNHS。

2.2 偶联产物SDS-PAGE分析

由于SDS对蛋白质分子的解构、包裹，形成了分子形状基本一致的SDS-蛋白质分子复合物。SDS-PAGE时，蛋白质样品的迁移速率主要取决于其相对分子质量的差异。所以，偶联生物素后的BSA由于相对分子质量增加，其迁移速率会下降。

SDS-PAGE可以看出(图9)，三种偶联法得到的电泳条带相较于BSA电泳条带出现明显滞后，可以说明在这三种方式下生物素已经与BSA偶联。且可以看出，结晶偶联法与直接偶联法条带位置接近，说明这两种方法偶联程度接近。而DCC偶联法所表现的条带虽较BSA滞后，但相较于另外两种偶联法则偶联程度更低(迁移率更快，相对分子质量更低)。

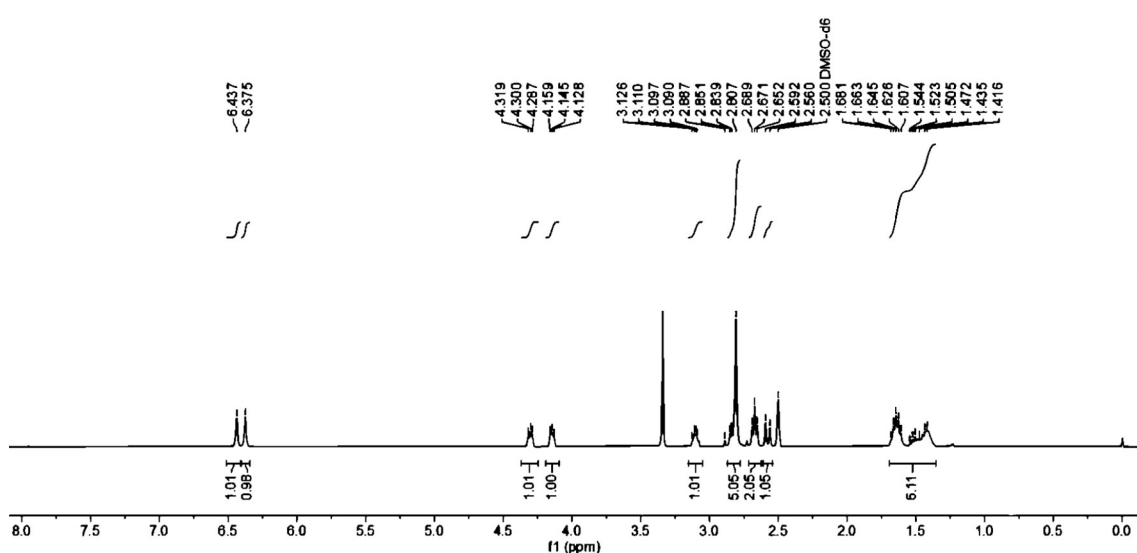


图7 BNHS结晶的¹H-NMR图谱

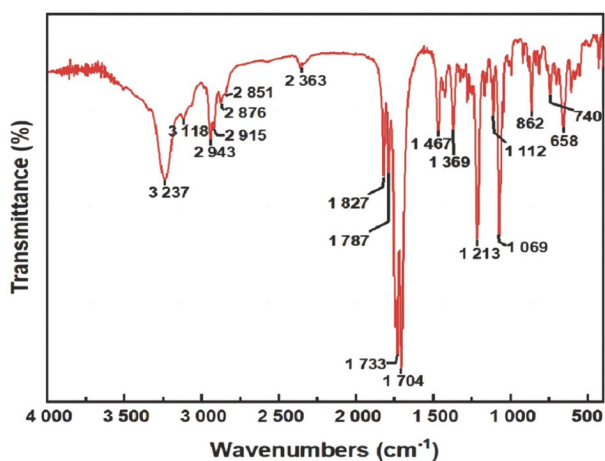
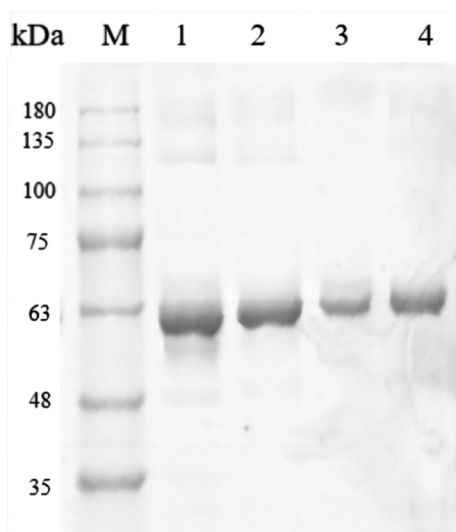


图8 BNSH结晶的IR图谱

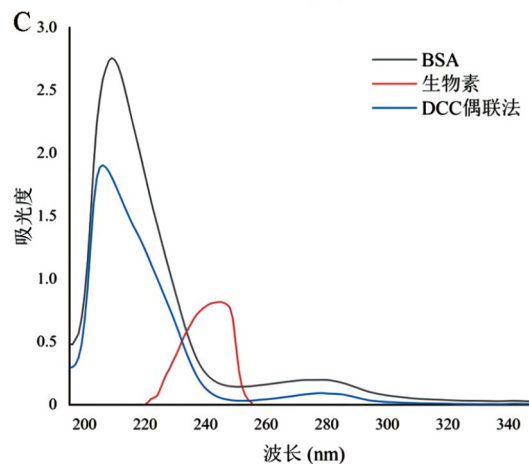
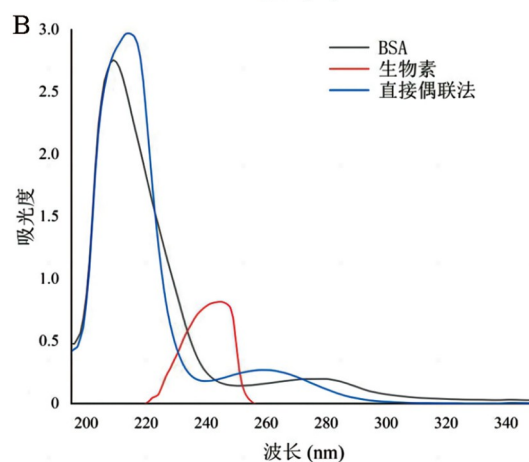
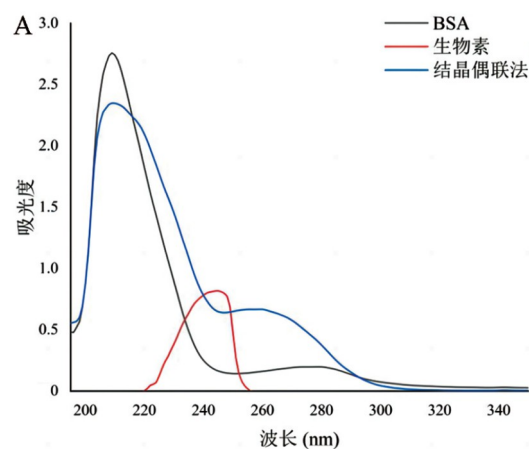


M: 蛋白质分子量标准品; 1: BSA; 2: DCC偶联法; 3: 直接偶联法; 4: 结晶偶联法

图9 偶联产物SDS-PAGE鉴定

2.3 偶联产物紫外扫描鉴定

生物素和蛋白质分子均有特殊的紫外吸收峰。生物素化的蛋白质由于其叠加、位移的紫外特征吸收峰可用于生物素化蛋白质的分析与鉴定。由图10(A、B、C)三个紫外扫描图谱可以看出,生物素在230~250 nm之间有较为明显的吸收峰,BSA在209 nm和280 nm处有明显的吸收峰。在图10A和图10B中,结晶偶联法的偶联产物在260 nm和210 nm处有明显吸收峰,且210 nm附近的吸收峰较BSA的吸收峰出现了红移现象、260 nm的吸收峰出现了蓝移现象;直接偶联法得到的偶联产物在259 nm处有明显吸收峰,且210 nm附近的吸



A: 晶偶联法; B: 接偶联法; C: DCC偶联法

图10 偶联产物、BSA、生物素紫外扫描光谱

收峰红移至214 nm。但是DCC偶联法产物的紫外吸收峰形与前两者有所不同(图10C),偶联产物与BSA在280 nm处的吸收一致,仅在210 nm处的吸收峰较BSA有所变宽,所以DCC偶联法可能并不能有效地将BSA与生物素偶联,需要进行后续的偶联比测定来进一步探究DCC偶联法的效果。

三种偶联法扫描的紫外波谱中, 210 nm左右波长处的吸收情况都有一定程度的红移或峰形改变, 可能是因为偶联反应是通过酰胺键(肽键)完成的, 而酰胺键(肽键)的特征吸收在210 nm附近, 从而导致紫外吸收峰的变化。

偶联产物的吸收峰明显出现了生物素和BSA的特征, 而位移效应使偶联产物的吸收峰相较于生物素和BSA有位移现象。所以三种偶联法的产物都符合特征峰吸收的叠加效应与位移效应, 可以定性为偶联反应已经发生。

2.4 偶联比测定

运用Image Lab软件分析SDS-PAGE中蛋白质分子量标准品的 R_f 值与相对分子质量的对数之间的线性关系(图11), 并做出标准曲线得出线性回归方程(图12): $y = -1.1x + 2.29 (R^2 = 0.9812)$; 由软件计算得出各样品相对分子质量(图13): 空白BSA为66 300, DCC偶联法所得样品为66 800, 接近BSA的相对分子质量, 说明DCC直接偶联法效果不佳; 而直接偶联法所得样品为6 8000, 结晶偶联法所得的样品为68 500, 相较于BSA的相对分子质量有明显增加, 说明此两种方法的偶联效果更加明显。

偶联比等于生物素化BSA的相对分子质量减去对照BSA的相对分子质量, 再除以生物素的相对分子质量($\Delta M_{\text{生物素}}/M_{\text{生物素}}$), 其大小表征了BSA生物素化的程度。

经计算所得各样品偶联比(表1): DCC偶联法为2.2, 直接偶联法为7.0, 结晶偶联法为8.9。

2.5 三种偶联法综合比较

实验方法的安全性、有效性和简单便利是评价实验方法优劣的重要指标。通过对以上方法的成本、耗时、安全性、得率和操作难易五个方面综合比较, 本文认为直接偶联法表现出了较好的优势。

根据每种偶联法的成本投入, 可以计算出三种偶联法的成本如下(反应投料以0.5 g生物素、0.25 g NHS、0.45 g DCC和10 mL DMF计算): 结晶偶联法为128.71元; 直接偶联法为34.01元; DCC偶联法为33.81元。

除成本因素外, 实验耗费的时间、安全系数等问题也需加以考虑。三种偶联法的综合对比如表2所示。

由表2可知, 结晶偶联法成本最高、耗时最长且安全性差, 其高成本、高耗时和高实验风险均来自结晶操作和重结晶操作过程中需要用到的大量乙醚和异丙醇, 且乙醚的用量难以精确掌握。直接偶联法与DCC偶联法无论从成本、耗时、安全性和操作难易相比, 都无明显差异。但DCC偶联法得率过低, 在实验时也伴有大量白色沉淀从蛋白质溶液中析出, 可能是蛋白样品变性导致的较低产率, 其准确原因尚待进一步研究。

3 讨论

3.1 偶联反应效果的判断

鉴定小分子修饰物与载体蛋白偶联常用的方法有UV、IR、SDS-PAGE、核磁共振碳谱(^{13}C -

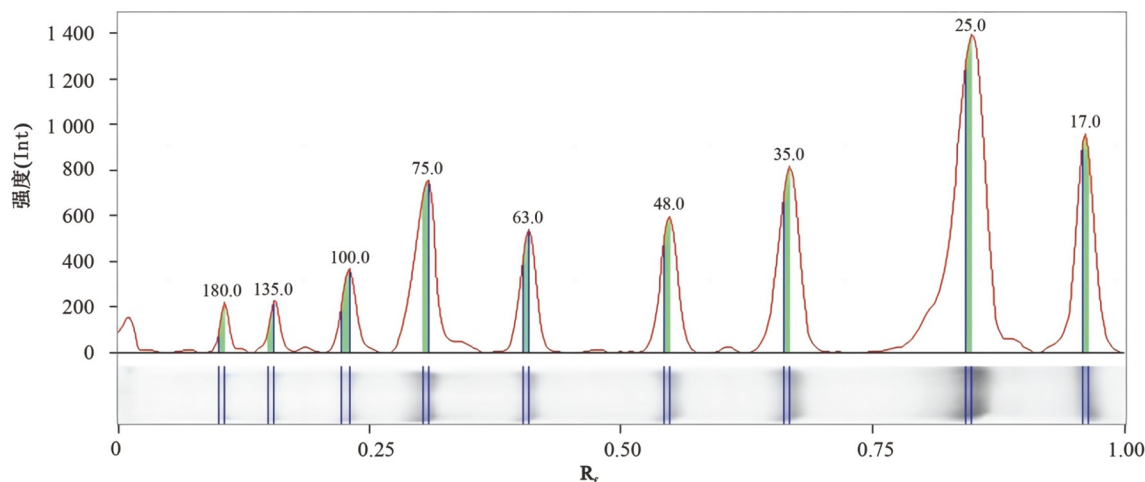


图11 凝胶成像系统扫描蛋白质分子量标准品各条带

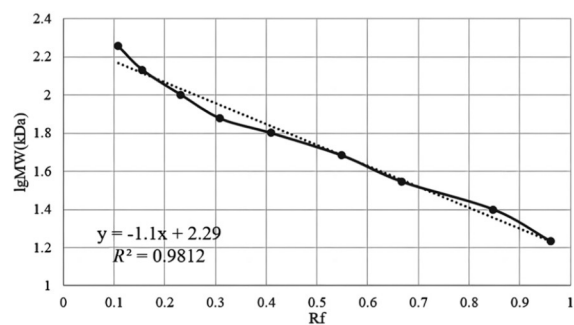
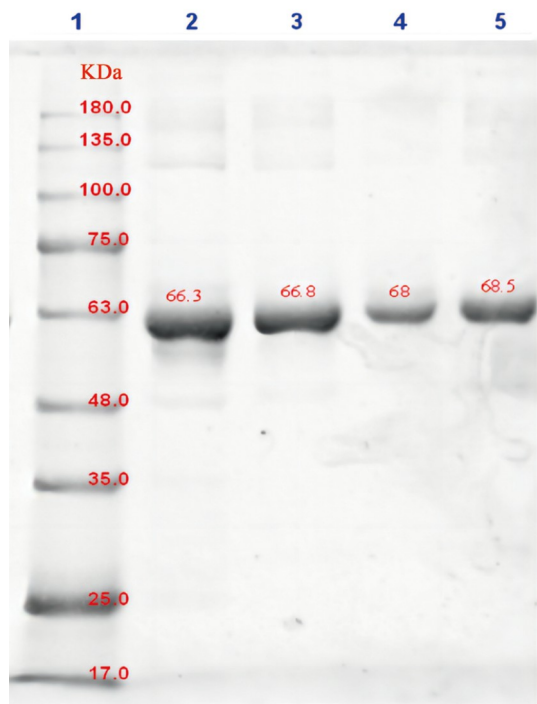


图12 lgMW-Rf标准曲线



1: 蛋白质分子量标准品; 2: BSA; 3: DCC偶联法; 4: 直接偶联法; 5: 结晶偶联法

图13 凝胶成像系统计算的蛋白质相对分子质量

表1 三种偶联方法的相对分子质量、R_f与偶联比

样品	相对分子质量	R _f	偶联比
空白BSA	66300	0.425876	无
DCC偶联法所得样品	66800	0.423181	2.2
直接偶联法所得样品	68000	0.412399	7.0
结晶偶联法所得样品	68500	0.409704	8.9

NMR)、标记抗原示踪法等^[15]。IR和¹³C-NMR虽然可准确测定样品的化学结构，但是生物学者对这两种图谱不太娴熟；标记抗原示踪法则需要对半抗原进行标记，还需要测定结合半抗原的放射强度，有较高风险并且繁琐复杂。此外，将抗

表2 三种偶联法综合比较

种类	成本	耗时	安全性	得率(偶联比)	操作难易
结晶偶联法	128.71元	1.5 d	较危险	8.9	复杂
直接偶联法	34.01元	3 h	安全	7.0	简单
DCC偶联法	33.81元	3 h	安全	2.2	简单

体等活性蛋白质大分子与小分子修饰物进行偶联并非最终目的，其最终目的在于将修饰后的偶联物用于生物反应检测或医药科学创新等领域。所以，研究的重点在于被小分子修饰物偶联后的抗体等活性蛋白质大分子的生物学活性不能在偶联反应中被掩盖或消除。因此，生物学者们鉴定小分子修饰偶联抗体常用的验证策略是使用UV、SDS-PAGE和Western blot结合的方式来验证反应产物的相对分子质量差异和产物分子的特异性结合能力。

从紫外扫描实验结果来看，结晶偶联法与直接偶联法都可以将生物素偶联到蛋白质上。由于反应后的偶联产物均经过足够的透析除杂，所以紫外分析中的光谱数据有足够的可信度^[19]。

但是，如果仅定性判断两者是否产生了有效偶联，在大多数情况下采用紫外扫描分析即可得到较为可信的结论。然而，评判一种偶联方式的可靠性，仅凭紫外扫描分析的定性检测是不够的，还需要结合偶联比来分析偶联效率。虽然紫外扫描也可以用于定量计算偶联比^[20]，但前提是载体蛋白与修饰物之间具有明显的、可区分的不同吸收特征，如相距较远的特征吸收峰等^[21]。所以，由于紫外图谱的叠加效应，得到的偶联比往往是不准确的。本研究中，生物素的特征峰基本位于230~250 nm区域，这与蛋白质的末端吸收区域(200~230 nm)和特征吸收区域(260~290 nm)距离较近甚至有一部分重叠。

所以，本研究可以将紫外扫描分析用于是否偶联的定性判别依据不适于利用紫外法测定偶联比。SDS-PAGE分析时既可以定性分析，也能够利用凝胶成像系统分子量测算法来计算偶联比。

3.2 DCC法偶联

本研究使用DCC偶联法与活化酯偶联法作参照。DCC是有机合成和医药制造工业常用的脱水剂，它可以使两个本来不能反应的分子脱水形成

化学键^[22]。羧酸类物质与DCC在DMF中反应,首先生成活性中间体,中间体的高度活性使其极为容易与胺反应^[23]。DCC是最早用于肽键(酰胺键)合成的碳二亚胺类化合物,现已广泛应用于该领域。首先是因为DCC相对便宜,其次是由于DCC可溶于肽键合成常用的溶剂(如DMF)。在肽键形成期间,DCC转变为二环己基脲(DCU)从反应液中沉淀出来。但是,DCU难以从反应体系中完全去除,为此衍生出了一些改造的缩合剂,如EDC[1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)-碳二亚胺盐酸盐]。这些改造后的碳二亚胺类物质在肽合成中所形成的脲,可以很容易地从反应物混和物中分离出来^[24]。

Kolosova等^[25]用EDC偶联出了氯霉素全抗原;李林峰等^[26]也用此方法偶联出利福平全抗原,说明以EDC为代表的新型碳二亚胺类缩合剂的使用日益普遍。但是,该方法合成并不稳定,常出现未能达到偶联效果的情况。其原因可能与活性中间体的反应机制有关。EDC通过与羧基反应形成氨基反应活性O-酰基脲中间体,如果该中间体未能在较快的时间里与氨基反应,则会很快水解并重新释放出羧基基团,从而导致合成失败^[27]。加入N-NHS或N-羟基琥珀代丁二酰亚胺(Sulfo-NHS)作为稳定剂,可以使反应生成的活性中间体留存时间加长,从而达到稳定的反应效率^[28]。

4 结论

根据偶联比的数据分析,采用结晶偶联法和直接偶联法的标记效率差异并不明显。而结晶偶联法前期准备工作繁杂冗长、操作复杂、涉及危化品且成本高昂,不如直接偶联法快速便捷、安全廉价。而DCC偶联法虽然成本最低,但偶联产物的浓度和偶联比也是最低,可能原因是其高脱水反应活性导致蛋白质变性,从而造成了一定程度上的蛋白质损耗。

综上所述,在生物素偶联蛋白质分子时,采用活化酯法是较为成熟与主流的,而活化酯反应液直接偶联法有耗时短、操作简便、安全低毒等特点。相较于活化酯结晶偶联法操作中重结晶、除杂以及纯化涉及到的繁琐的实验步骤和危险性化学试剂的取用而言,直接偶联法优于结晶偶联

法。值得注意的是,结晶偶联法虽然纯化BNHS比较麻烦,但是后期应用于偶联反应更加方便,纯化步骤快速简便。由于直接偶联法中DCC参与反应时产生的DCU白色沉淀很难完全除去,导致通过透析方法纯化偶联产物的过程困难且费时。但是,对于化合物纯化方法不熟练但对生物操作纯熟的实验室而言,反应液直接偶联法则是更优的选择。

参考文献

- [1] Salaemae W, Booker GW, Polyak SW. The role of biotin in bacterial physiology and virulence: a novel antibiotic target for mycobacterium tuberculosis. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(2): 797-822
- [2] León-Del-Río A. Biotin in metabolism, gene expression, and human disease. *J Inherit Metab Dis*, 2019, 42(4): 647-654
- [3] Kramer KJ, Morgan TD, Throne JE, et al. Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(6): 670-674
- [4] Kay BK, Sang T, Veronica VV. High-throughput biotinylation of proteins. *Methods Mol Biol*, 2009, 498: 185-196
- [5] 刘筏, 杨金刚, 翟晓鑫, 等. 烟台黑猪SLA-I重链基因末端生物素修饰及表达. *生物技术通报*, 2014, 34(1): 191-195
- [6] 秦家林. 基于对蛋白质色氨酸残基荧光猝灭的均相亲和分析方法及其应用[D]. 重庆医科大学, 2014
- [7] 章谷生. 生物素-亲和素系统试剂及其应用的研究. *医学研究通讯*, 1989(6): 31-34
- [8] Monteiro R, Chafsey I, Leroy S, et al. Differential biotin labelling of the cell envelope proteins in lipopolysaccharidic diderm bacteria: exploring the proteosurfaceome of escherichia coli using sulfo-NHS-SS-biotin and sulfo-NHS-PEG4-bismannose-SS-biotin. *J Proteomics*, 2018, 181: 16-23
- [9] 徐常龙, 严平, 王琳, 等. N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯的合成与应用. *化工中间体*, 2007(1): 15-16
- [10] 王硕, 房立, 于姣, 等. 四环素人工抗原的制备与鉴定. *天津科技大学学报*, 2010, 25(3): 1-4
- [11] 张波, 袁媛, 黄璐琦, 等. 大黄酸人工抗原合成及免疫原性鉴定. *中国中药杂志*, 2015, 40(8): 1463-1467
- [12] 聂雯莹, 唐承明, 王建霞, 等. 牛奶中 β -内酰胺类和四环素类药物胶体金快速检测方法的建立. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(12): 70-75
- [13] 蔡陈芳, 周常义, 曾磊, 等. 杀草丹半抗原及其人工抗原的制备与鉴定. *食品工业科技*, 2019, 40(14): 284-291
- [14] 王婷婷, 严睿文, 陈勤. 阿魏酸人工抗原合成与光谱鉴别的研究. *中国药理学杂志*, 2008(8): 629-631

- [15] 张海棠, 李桂平, 季跃光, 等. 氨苄青霉素人工抗原的制备及抗体特性鉴定. *生物技术通报*, 2009(2): 138-141
- [16] Laver WG. Structural studies on the protein subunits from three strains of influenza virus. *J Mol Biol*, 1964, 9(1): 109-124
- [17] Shapiro AL, Viñuela E, V. Maizel Jr. J. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, 1967, 28(5): 815-820
- [18] 隋建新, 林洪, 刘春娥, 等. 恩诺沙星完全抗原的合成及其偶联条件的初步优化. *中国食品学报*, 2006, 6(1): 167-172
- [19] 石德时, 周斌, 覃雅丽, 等. 氯霉素间接竞争ELISA(cIE-LISA)检测方法的建立. *中国预防兽医学报*, 2002, 22(1): 78-80
- [20] Branaa P, Naar J, Chinain M, et al. Preparation and characterization of domoic acidprotein conjugates using small amount of toxin in a reversed micellar medium: application in a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Bioconjug Chem*, 1999, 10(6): 1137-1142
- [21] 赵肃清, 孙远明, 乐学义, 等. 农药人工抗原合成的研究进展. *农药*, 2002, 41(3): 9-11
- [22] 薄采颖, 毕良武, 王玉民, 等. DCC及其在有机合成中的应用. *化工时刊*, 2007, 21(10): 4-6
- [23] Kurzer F, Douraghi-Zadeh K. Advances in the chemistry of carbodiimides. *Chem Rev*, 1967, 67(2): 107-152
- [24] Izdebski J, Kunc D. Evaluation of carbodiimides using a competition method. *J Pept Sci*, 1997, 3(2): 141-144
- [25] Kolosova AY, Samsonova JV, Egorov AM. Competitive ELISA of chloramphenicol: influence of immunoreagent structure and application of the method for the inspection of food of animal origin. *Food Agric Immunol*, 2000, 12(2): 115-125
- [26] 李林峰, 崔秀巧. 琥珀酸酐-碳二亚胺法制备高结合比利福平人工抗原. *北京医科大学学报*, 1994, 26(2): 136-137
- [27] Staros JV, Wright RW, Swingle DM. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal Biochem*, 1986, 156(1): 220-222
- [28] Grabarek Z, Gergely J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal Biochem*, 1990, 185(1): 131-135