

超声对蛋白质盐析作用的研究^{*}

韩萍芳[†] 陈腊梅 姚成 欧阳平凯

(南京工业大学制药与生命科学学院 南京 210009)

摘要 在蛋白质(牛血清白蛋白)-水胶体溶液中加入无机盐,利用蛋白质盐析的原理粗分离蛋白质是常用的生物分离技术。本文试图利用超声强化蛋白质盐析分离过程。讨论了声场参数,即频率、声强、超声辐射时间对该过程的影响。实验表明超声处理牛血清白蛋白时,20kHz超声辐照比无超声处理可缩短了近4.5小时的静置时间,20kHz超声处理可得到约90%的最高蛋白质收率;不同超声频率下有不同的最佳声压值,频率较低时的盐析效果较好;超声辐照并非时间越长越好,超声辐照2min时,牛血清白蛋白的收率最大。由此证明超声技术可加速盐析后的蛋白质沉降速度。

关键词 蛋白质, 盐析, 超声

Effect of ultrasonics on protein salting-out

HAN Ping-Fang CHEN La-Mei YAO Cheng OUYANG Ping-Kai

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009)

Abstract It is an ordinary separation technology using the salting-out method for separating proteins from aqueous solution, such as separating protein from the bovine serum albumin-water sol solution. In this essay, the effect on the separation process by ultrasound is experimentally examined. Parameters such as frequency, intensity and pretreatment time of ultrasound are varied. The results showed that irradiated by 20kHz ultrasound, the standing time of BSA solution could decrease by 4.5h than that without ultrasound, while the highest protein recovery of the solution could reach 90% when so irradiated. Low frequency ultrasound was better to salting-out separation, and the best irradiation time was 2min in some case. All in one, this research shows that the ultrasound irradiation could increase the sedimentation speed of protein in the salting-out process.

Key words Protein, Salting-out, Ultrasonics

2004-10-12 收稿; 2005-08-19 定稿

^{*} 江苏省高校自然科学基金项目 (01KJB530001)

作者简介: 韩萍芳(1954-)女,江苏常州人,副教授,硕士,主要从事生物化工技术开发研究。

陈腊梅(1978-)女,硕士。姚成(1961-)男,教授,博士。欧阳平凯(1945-)男,教授,博士生导师,工程院院士。

[†] 通讯联系人 Email:hpfnj@njut.edu.cn

1 引言

大多数情况下, 工业生产出的粗蛋白是一种蛋白质、细胞壁材料、核酸和杂质的混合物。产品性质的不稳定性及对产品纯度的高要求使蛋白质的分离很复杂, 致使蛋白质下游处理成本占其生产总费用的 50~80%。这样蛋白质的分离与净化是现代生物化工的基本处理过程^[1]。而盐析是一个古老的化工分离方法^[2], Denis (1847 年, 氯化钠法) 和 Hofmeister (1890 年, 硫酸钠法) 首先制备出牛血清白蛋白, 而 1894 年 Harnmarstein 用硫酸铵从牛血清中盐析并结晶出牛血清白蛋白最有影响^[3]。Tsumotomu Arakawa 等讨论了蛋白质盐析机理^[4]。超声在生物技术中的应用, 是一个比较新的热点研究领域。它已在酶工程、发酵工程、细胞工程以及肿瘤的生物治疗方面有所应用并继续研究发展^[5]。而超声波在盐析方面的应用研究, 还未见报道。

牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 是牛肝脏细胞分泌的一种蛋白质。它是牛血清中主要的蛋白质, 其含量约占血清中蛋白质总量的一半左右, 在血液中参与维持渗透压以及物质运输等功能, 是人们最早发现并对其进行研究的蛋白质之一。牛血清白蛋白在血液循环、解毒、脂类代谢等方面执行着重要的生物功能。它在生化、生理、细胞学、免疫学、医学以及生物工程领域都有广泛的应用。该白蛋白的热稳定性很好^[6], 在室温下不会发生变化, 另外牛血清白蛋白易得, 所以本文以牛血清白蛋白为超声分离实验原料, 研究超声对蛋白质的盐析作用。由于实验容器的尺度在量级上接近所用声波波长, 低频超声波在介质中传播衰减较小, 在容器壁上几乎发生全反射, 故可认为本实验在近似混响声场中进行。

2 试验部分

2.1 原材料及仪器

化学试剂: 牛血清白蛋白 (BSA), 氯化钠,

硫酸铵均为分析纯。

试验仪器: 分析天平, 压电陶瓷超声换能器 (不锈钢探头) (20kHz, 电功率 0~1kw; 40kHz, 电功率 0~500w; 500kHz, 电功率 0~140w), 752 型紫外分光光度计, 800 型离心机, C-1 水听器 (灵敏度: 31.6V/Mpa)。

2.2 常规试验与分析

2.2.1 牛血清白蛋白浓度的测定

通过配制不同牛血清白蛋白浓度, 用 752 型紫外分光光度计测得不同的吸光度值, 绘出 BSA 浓度标准曲线, 将实测吸光度值与标准曲线值比较即可得牛血清白蛋白的浓度。

2.2.2 不同硫酸铵溶液饱和度对 BSA 溶液盐析的影响^[7]

称取 15mg 左右 BSA 溶于 45ml 生理盐水中, 缓慢加入 5ml 不同饱和度的硫酸铵溶液 (分别为 10%、30%、50%、70%、90%), 取配好的溶液 5ml 于离心管中, 不同硫酸铵体积饱和度下, 蛋白质浓度均为 0.3mg/ml 左右, 放置 10h, 后离心 1h, 转速 3000r/min。测上清液在 280nm 处的吸光度, 得上清液中 BSA 浓度并由此算得 BSA 收率。实验结果见图 1, 可以看出, 当硫酸铵溶液的体积饱和度增大为 70% 之前, 牛血清白蛋白的收率明显增大, 而当硫酸铵溶液的体积饱和度继续增大, 牛血清白蛋白的收率增加不大。故以下实验均用 70% 时的体积饱和度。

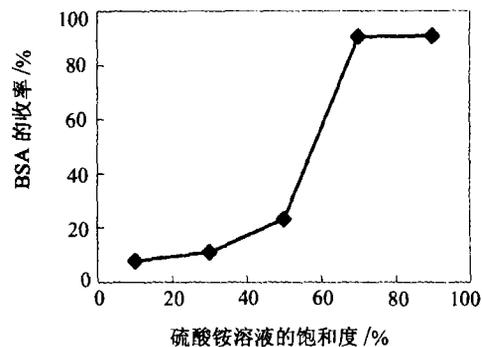


图 1 硫酸铵溶液的饱和度 (%)

2.2.3 不同放置时间对 BSA 盐析的影响

蛋白质浓度均为 0.3mg/ml, 溶液放置不同时间后, 再离心 40min, 离心转速为 3000r/min。从图 2 可以看到静置 5 小时后, 牛血清白蛋白的收率基本不再变化, 因此, 当无超声波作用时, 牛血清白蛋白溶液加入硫酸铵溶液后, 要放置 5 小时才能得到一个好的蛋白质收率。

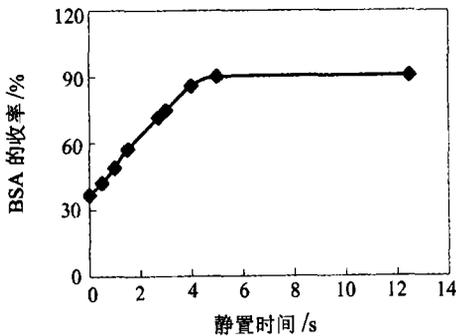


图 2 静置时间 (小时)

2.3 超声处理试验

蛋白质盐析溶液置于 100ml 的烧杯中后, 将超声探头伸入液面下 1 厘米左右, 施加超声后用离心机离心 40min。离心后倾去上清液, 用等量的生理盐水溶解沉淀的白蛋白, 配成牛血清白蛋白的生理盐水溶液, 以待测定并计算收率。

2.3.1 有无超声辐照对比实验及静置时间对 BSA 盐析的影响

本实验作了有无超声的对比实验, 实验条件为: 蛋白质浓度为 0.3mg/ml, 频率为 20kHz, 利用水听器测得超声探头附近声强为 0.64W/cm², 超声辐照时间为 2min。有无超声处理实验后, 均再采用不同的时间 (0~1h) 静置, 实验结果如图 3 所示:

从图 3 可以看到, 有超声辐照后, 在很短的时间内就可得到一个较好的蛋白质收率。超声辐照蛋白质溶液后立即离心分离 (静置时间为 0), 其蛋白质收率已可达到 88.4%; 如果超声辐照后静置 20 分钟再离心, 蛋白质收率即可达

90.5%; 而无超声处理时, 达到 90% 左右的蛋白质收率则需近 5 小时 (见图 2), 这说明了超声辐照缩短了近 4.5 小时的静置时间, 从而提高了蛋白质的生产效率, 有很好的工业应用前景。

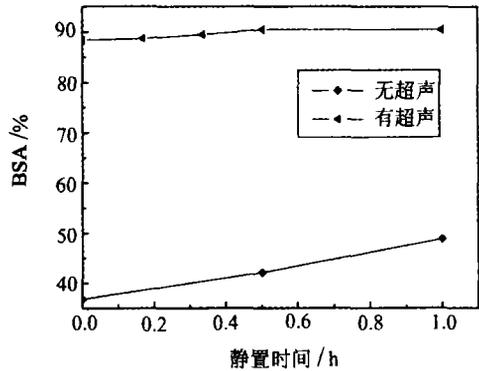


图 3 不同静置时间下 BSA 的收率 (%) (有无超声对照)

2.3.2 超声辐照时间对 BSA 盐析的影响

实验条件: 声强为 0.64W/cm², 频率为 20kHz。蛋白质浓度为 0.3mg/ml。超声处理液不静置, 用紫外分光光度计测待测液在 280nm 处吸光度, 由标准曲线方程计算出牛血清白蛋白的浓度, 从而得出牛血清白蛋白的收率。由图 4 可见, 蛋白质盐析收率随超声辐照时间的增加而增加, 超声辐照 2min 时, 牛血清白蛋

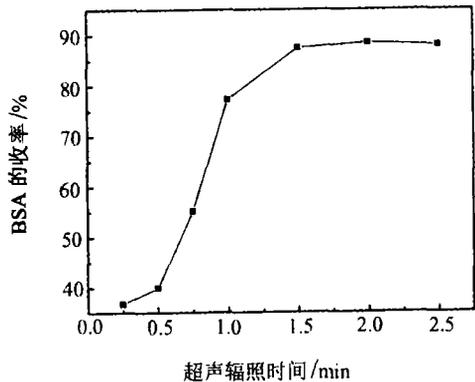


图 4 不同超声辐照时间下牛血清白蛋白的收率

白的收率最大; 但处理 2min 后的蛋白质盐析收率则有所下降, 说明超声辐照并非时间越长越好。

2.3.3 超声声功率对 BSA 盐析的影响

进行超声辐照后, 无静置离心分离的实验。超声波发生器频率分别为 20kHz, 40kHz, 500kHz, 电功率分别为 0~1kw, 0~500w, 0~140w。牛血清白蛋白溶液的浓度 $C = 0.3\text{mg/ml}$, 超声辐照 2min, 离心转速 3000r/min, 离心时间为 40min; 硫酸铵的体积饱和度 70%。离心后弃上清液, 加入等量生理盐水, 使沉淀的 BSA 再溶解, 测此溶液在 280nm 处的吸光度并计算收率。所得结果如图 5 所示:

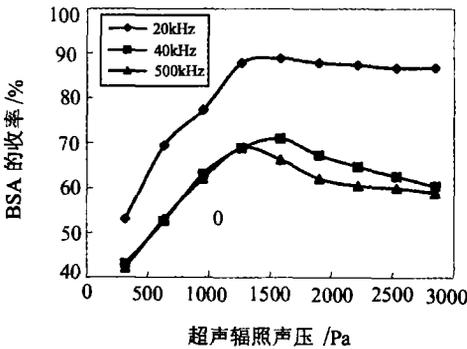


图 5 不同声压对蛋白质收率的影响

从结果可以看出, 20kHz 时, 蛋白质收率有一最高点 88.9%, 利用水听器测得该换能器探头附近对应的最佳声压为 1582.3Pa。40kHz 时, 蛋白质收率也有一最高点 71%, 对应最佳声压也为 1582.3Pa 左右。500kHz 时, 蛋白质收率的最高点为 68.9%, 对应最佳声压为 1265.8Pa 左右。实验表明超声处理牛血清白蛋白时, 不同频率下的最佳声压值有稍许变化; 频率较低时的盐析效果较好。

为考察超声辐照所能节省的时间, 在 100ml 的烧杯内又进行了不同静置时间后再离心分离的实验。

实验条件为: 超声辐照时间均为 2min,

20、40kHz 时, 利用水听器测得探头附近超声辐照声压为 1582.3Pa; 频率 500kHz, 超声辐照声压为 1265.8Pa。实验所得结果见图 6。

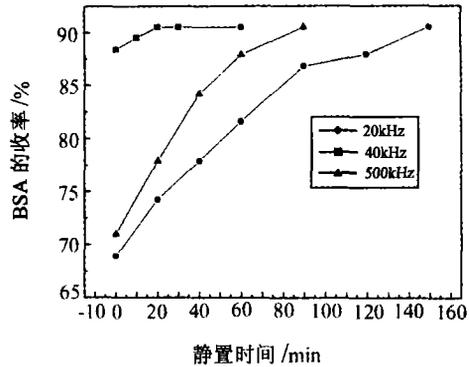


图 6 不同静置时间下 BSA 的收率

由图 6 可见, 频率 20kHz 时, 超声波辐照后并立即离心的蛋白质溶液收率已经达到 88.4%; 如果超声辐照后静置 20 分钟后再离心, 蛋白质的收率即可达到 90.5%; 静置时间超过 20 分钟后, BSA 的收率未见增加; 这说明静置时间为 20 分钟即可达到最大 BSA 收率。

同样, 在频率 40kHz 时, 超声辐照后的静置时间为 1.5h, 牛血清白蛋白的收率已经达到很理想的 90.5%。这样, 与无超声辐照的实验相比较, 节省了大约 3.5 个小时的盐析静置时间。

频率 500kHz 时, 超声辐照后的时间为 2.5h 时, 牛血清白蛋白的收率也可达到很理想的 90.5%。这样, 与无超声辐照的实验相比较, 节省了大约 2.5 个小时的盐析静置时间。

试验表明使用频率 20kHz 超声处理可缩短约 4.5 小时的静置时间, 而频率较高时效果较差, 但仍比无超声处理的效果要好。

3 超声促进蛋白质盐析分离过程的机理分析

盐析分离过程, 一般要经过静置沉淀的过程 [8,9], 这样就使蛋白质盐析时间增长了很

多。本研究利用的是超声波的机械效应。我们认为超声具有凝聚作用,当它作用于溶液体系,可以促进传质过程,加快电解质离子与蛋白质周围的水化层的位置更换,离子很快取代水分子,从而使蛋白质的水化层被电解质离子取代,同时中和了蛋白质表面所带的部分电荷。这样,超声波加速蛋白质分子碰撞,使失去了水化层和电荷的蛋白质大分子,很容易絮凝析出。因此,超声波作用后的盐析体系虽不静置,也可提高蛋白质的盐析分离速度。

4 结论

(1) 超声可加速盐析后的蛋白质沉降速度, 20kHz 超声辐照比无超声处理可缩短了近 4.5 小时的静置时间;

(2) 有超声处理的盐析效果要优于无超声处理的效果;

(3) 频率较低时的盐析效果比较高频率的好;

(4) 不同超声频率下有不同的最佳声压值以得到最高蛋白质收率, 20kHz 超声处理可得到约 90% 的最高蛋白质收率;

(5) 超声辐照并非时间越长越好, 超声辐照 2min 时, 牛血清白蛋白的收率最大。

参 考 文 献

- 1 Saidu M Waziri, Basel F Abu-Sharkh, Sk Asrof Ali. *Biotechnol. Prog.*, 2004, **20**:526~532.
- 2 LU Xiaoping, HAN Pingfang, ZHANG Yaming et al. *Chem. Eng. J.*, 2000, **78**:165~171.
- 3 季钟煜. 生命的化学, 2004, **24**(5):442~444.
- 4 Tsutomu Arakawa, Serge N. Timasheff. *Biochemistry*, 1984, (23):5912~5923.
- 5 时兰春, 王伯初, 杨艳红等. 重庆大学学报, 2002, **22**(10): 139~142.
- 6 潘若文, 范蓓, 马力等. 中国输血杂志, 2001, **14**(5): 281~282.
- 7 高娃. 内蒙古教育学院学报(自然科学版), 2000, **13**(3): 45~46.
- 8 林芃, 刘艳, 杨海波. 大连大学学报, 2002, **23**(4):70~73.
- 9 赵伟良. 精细化工, 1995, **12**(6):55~57.