

用快速琼脂糖层析纯化磷酸甘油酸激酶 及磷酸甘油醛脱氢酶

谭天伟 沈忠耀

(北京清华大学化学工程系 北京 100084)

摘要 研究了用快速琼脂糖离子交换层析 (DEAE-Fast Flow Sepharose) 结合 PEG 4000/Reppal PES 双水相体系从黄豆中分离纯化磷酸甘油酸激酶 (PGK) 及磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH)。控制床层高度 (10~20cm), 径向放大具有压降低的优点, 设计多点进料取代传统的中心管进料, 解决了径向流场不均匀的问题。GAPDH 的总收率及纯化倍数分别为 58% 和 144, PGK 的总收率及纯化倍数分别为 41% 和 44。工艺成本为 2.92 美元/ku GPADH, 具有一定的实用价值。

关键词 离子交换层析, 磷酸甘油酸激酶, 磷酸甘油醛脱氢酶

双水相萃取技术主要用于蛋白质的初级分离和纯化, 一般纯化倍数为 3~5 倍^[1]。蛋白质产品纯度要求比较高, 仅靠双水相萃取很难达到目的。如何将蛋白质从双水相体系中上相或下相中分离出来, 进一步纯化, 也是双水相萃取应用的一个重要问题。离子交换层析是蛋白质纯化中最为有效的方法之一。但对于 PEG/盐体系, 离子交换层析不能用于后续纯化, 因为盐浓度太高^[2]。与此相比, 高聚物/高聚物双水相体系没有这个问题。谭天伟等人系统地研究了高聚物/高聚物体系^[3], 结果表明, PEG/Reppal PES 体系成本低, 成相性能好。

双水相萃取应用于大规模蛋白质分离纯化时, 成组组分的回收是一个必需考虑的问题, 由于原料成本占工艺总成本的 90% 以上^[4]。对于高聚物/高聚物体系, 这个问题尤为突出。Folke 成功地应用 PEG/水解淀粉 PPT 体系纯化了乳酸脱氢酶, 但由于 PPT 没有回收, 原料成本占 70%^[5]。本文研究了一种高聚物/高聚物双水相体系结合离子交换层析的新工艺, 在纯化酶的同时, 回收了高聚物, 从而大大地降低了双水相萃取的成本。

1 材料和方法

1.1 材料

PEG4000 为德国 Serva 公司产品, Reppal PES 为瑞典 Reppe Glykos AB 公司生产, DEAE-Sepharose Fast Flow 从瑞典 Pharmacia 公司购买, 其他盐类为化学纯。

1.2 分析方法

1.2.1 PEG4000 和 Reppal PES 含量分析: PEG4000 含量采用比色法分析^[6]。Reppal PES 的测定为旋光法, 旋光波长 589nm (钠灯), 旋光光度计为 Perkin-Elmer (德国)。

1.2.2 酶活性分析: PGK 和 GAPDH 活性分析采用 Bergmeyer 法^[7]

1.2.3 蛋白含量测定：蛋白含量分析为 Bradford 法^[8]，以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.3 实验过程

在黄豆匀浆液中加入 9% 的 PEG4000 (50% 溶液)，用 2mol/L HCl 调节到 pH6.1，搅拌 2~5min，5000r/min 下离心 10min 除去絮凝的细胞碎片。在上清液中加入 12% PEG4000，4% 的 Reppal PES，用 1mol/L NaOH 调节 pH 到 7.0，搅拌 5min，用 Separator 离心萃取器分离得到 PEG 相和 Reppal PES 相，并分别通过两个 DEAE-Sephrose Fast Flow 层析柱（预先分别用 20mmol/L 磷酸缓冲液 (pH6.0) 和 20mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0 平衡)，再用平衡缓冲液洗至没有蛋白流出时，进行离子强度梯度洗脱。GAPDH 的洗脱梯度：0~0.1mol/L NaCl 磷酸缓冲液 (pH6.0)。PGK 的洗脱梯度：0~0.04mol/L NaCl 磷酸缓冲液 (pH7.0)。

2 结果与讨论

2.1 离子交换树脂及洗脱条件的选择

阴离子交换树脂 DEAE-Sephrose 和 DEAE-Cellulose 对 PGK 和 GAPDH 都有吸附作用。但 DEAE-Cellulose 流量小，尤其在放大时，床层吸附容易压缩，导致流场分布不均匀，动态吸附容量下降。因而选用 DEAE-Sephrose Fast Flow。这种树脂由交联度很高的琼脂糖构成，网孔结构比较稳定，不易压缩。

pH 对 GAPDH 吸附及解吸的影响如表 1。最佳 pH 应是 GAPDH 恰好能吸附的最低 pH，由表可知，pH 可选为 6.0。

表 1 pH 对 GAPDH 吸附及解吸的影响
Table 1 Effect of pH on absorption of GAPDH

pH		5.5	6.1	6.5	7.0
Absorption 10mmol/L buffer	Absorbed GAPDH/%	96	98	99	99.4
	Absorbed proteins/%	86	90	93	92
Wash 10mmol/L buffer	Washed GAPDH/%	4	0.8	0.5	0.5
	Washed protein/%	8.4	6.5	5.3	5.6
Elution 0.1mol/L NaCl	Eluted GPADH/%	53	55	49	49
	Eluted protein/%	24	24	22	22

平衡缓冲液的离子强度选择如表 2 所示。最佳缓冲液离子强度应是 GAPDH 恰好能吸附的最高离子强度，即 20mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH6.0)。

表 2 离子强度对 GAPDH 吸附的影响
Table 2 Effect of ion strength on absorption of GAPDH

Ion strength /mmol · L ⁻¹		10	15	20
Absorption pH6.0	Absorbed GAPDH/%	99.5	99	98.3
	Absorbed proteins/%	91	87	85
Wash pH6.0	Washed GAPDH/%	0.3	0.9	2
	Absorbed proteins/%	7	9	11
Elution 0.1mol/L NaCl	Eluted GPADH/%	58	60	64
	Eluted protein/%	21	16	10

PGK 平衡缓冲液选择与 GAPDH 类似，最后确定的条件：20mmol/L 磷酸钾 (pH7.0)。

GAPDH 的离子强度梯度洗脱曲线如图 1 所示。当离子强度梯度为 0~0.1mol/L NaCl 时，GAPDH 和杂蛋白的分离效果效果较好。

PGK 的选脱条件和 GAPDH 洗脱相类似，离子强度梯度为 0~0.04mol/L NaCl (pH7.0)

2.2 层析柱的放大

层析柱放大时，主要问题有两个：压降大及传质不均匀。床层压降大具体表现在若按三维方向比例放大时，柱子越大，柱高越长，压降也越大，从而导致流量下降，甚至会出现沟流和短流。解决压降过大，采用控制床层高度为 10~20cm 之间，径向放大，但在径向放大时，遇到径向流场分布不均匀。为此采用多点进料即 4 根进料管均匀分布。流场接近平推流形式。

流体力学参数放大采用线性流速相等原则。线性流速 (cm/min) = 流量 (cm³/min) / 床层面积 (cm²)。两根柱子直径分别为 3.2cm 和 25cm，树脂体积分别为 50ml 和 10L，床层高度都在 12cm 到 17cm 之间，流量分别为 10ml/min 和 600ml/min。放大结果如表 3。

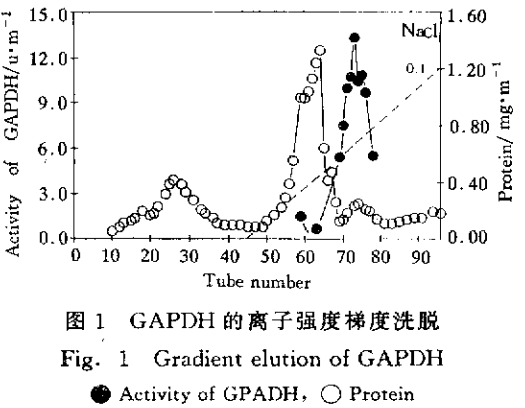
表 3 从黄豆匀浆液中分离 PGK 和 GAPDH 的放大结果
Table 3 Scale up of purification of PGK and GAPDH

Homogenate weight	Step	PGK activity /ku	PGK specific activity /u · mg ⁻¹	PGK recovery /%	PGK purification factor	GAPDH activity /ku	GAPDH specific activity /u · mg ⁻¹	GAPDH recovery /%	GAPDH purification factor
0.2kg	Homogenate	1.62	0.48	100	1	1.58	0.46	100	1
	Flocculation	1.22	2.38	75	5	1.16	2.28	74	5
	Extraction	1.14	3.76	70.4	7.8	0.99	4.0	63	8.7
	Chromatography	1.01	28.0	62	58	0.78	48	49	104
40kg	Homogenate	380	0.41	100	1	334	0.36	100	1
	Flocculation	298	3.0	75	7.3	270	2.74	81	7.6
	Extraction	240	3.0	63	7.3	219	4.5	66	12.5
	Chromatography	155	18	41	44	193	52	58	144

由表可知，GAPDH 的纯化没有明显的放大效应，经过纯化后酶比活已达 52u/mg。与 Serva 公司从兔子肌肉中提取的 GAPDH 标准酶 (60u/mg) 相差不大。PGK 纯化相对差一些，由于洗脱时拖尾较严重。

经过离子交换柱后，PEG4000 和 Reppal PES 由于没有电荷，可以直接通过层析柱得到回收。经过分析，PEG4000 和 Reppal PES 的回收率分别为 90%和 78%。

2.3 纯化工艺的经济评价



整个工艺过程成本由下式计算^[9]: $T = 1.3(M + E) + 2.6L + I$

式中: T 为工艺成本, M 为原料消耗成本, E 为能耗成本, L 为劳动力成本, I 为设备投资。

根据表 3 的情况: 可进行成本计算。由于本工作是在德国完成的, 能源和原料均按德国 1992 年价格计算。电能: 0.12 美元 (\$) /kW. h; 黄豆: 1 \$ /kg; PEG4000: 1.6 \$ /kg; Reppal PES200: 12.8 \$ /kg; 盐: 0.6 \$ /kg; 劳动力: 13 \$ /h。计算结果如表 5 所示。

表 4 工艺过程成本计算
Table 4 Cost of the process

	Items	Cost/\$. h ⁻¹
Materials cost	Soy bean	1.33
	PEG4000	0.32
	Reppal PES	1.02
	Salt	0.55
	Total materials cost M	3.18
Labour cost	Labour cost L	13
Instrument cost	Decanter, depreciation rate 13%, 250 working days per year	10.3
	Separator, depreciation rate 13%, 250 working days per year	9.2
	Column, 250 working days per year	6.2
	Total instrument cost I	25.9
Energy cost	Electricity, 0.12 \$ /kW. h E	2.8
Total cost	Total cost T	67.3
GAPDH cost/\$. ku ⁻¹		2.09

在以往的高聚物/高聚物双水相萃取中, 由于原料没有回收, 因而整个工艺成本很高。但在本工艺中, 层析一步不但纯化了酶, 还回收了高聚物, 使得原料消耗成本只占总成本的 1/20, 因此一般认为双水相萃取原料成本高, 在此已不再是一个主要问题。整个工艺成本 2.09 \$ /Ku GAPDH 比 Serva 公司从兔子肌肉中提取 GAPDH 的价格 (5.2 \$ /Ku GAPDH) 低得多, 而且本工艺还得到另一种产品 PKG, 可使成本进一步降低。

致谢 本文工作主要是在德国生物技术研究所 (GBF) 及瑞典伦德大学完成。在此期间, 得到 Hustedt H. 博士和 Johansson G. 博士的热情帮助, 作者在此深表谢意。

参 考 文 献

- [1] Kula M R, Krone K H, Hustedt H. In: Fiechter A, Advances in Biochemical Engineering, Berlin Hiedeberg New York, Springer Verlag, 1982, 24: 73~118.
- [2] Krone K H, Cordes A, Schelpper A *et al.* In: Cribnau T C T, Affining Chromatography and Related Techniques,

New York, Elsevier Applied Science, 1982, pp. 1491~501.

- [3] Tan T W, Shen Z Y. International Symposium on Thermodynamics in Chemical Engineering and Industry, Beijing, Chemical Industry Press, 1994, pp. 171~175.
- [4] Krone K H, Hustedt H, Kula M R. Process Biochemistry, 1984, 19: 170~176.
- [5] Tjerneld F, Johansson G, Joelsson M. Biotechnol Bioeng., 1987, 30: 809~816.
- [6] Hasko F, Vazleva R, Halaze L. Biotechnol Bioeng., 1987, 24: 1931~1939.
- [7] Bergmeyer H U. Methoden der Enzymatischen Analyse, Weiheim Bergtrasse, Verlag Chemie, 1970, 1: 425.
- [8] Bredford M M. Anal Biochemistry, 1976, 72: 248~255.
- [9] Jung B. Chemie Technik, 1983, 12: 39.

Purification of Phosphoglycerate Kinase and Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase by DEAE-sepharose Fast Flow Chromatography

Tan Tianwei Shen Zhongyao

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract The purification of phosphoglycerate kinase (PGK) and glyceraldehyd phosphate dehydrogenase (GAPDH) from soy bean was studied by a DEAE-Sepharose Fast Flow chromatography. When scaling up, the diameters of columns increase but the heights of columns were maintained in the range of 10 to 20cm to avoid the problem of high pressure drop. The recovery of GAPDH and PGK was 57% and 41%, respectively. The purification factor of GPADH and PGK was 144 and 44, respectively. The economical evaluation indicated that the cost of the process was 2.09 \$ /ku GAPDH, which had some commercial values.

Key words Ion exchange chromatography, phosphoglycerate kinase, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase