

# 凝胶过滤与镍柱亲和纯化金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素重组蛋白的生物学特性比较

张海燕<sup>1,2</sup>, 杨宏军<sup>1</sup>, 王长法<sup>1</sup>, 何洪彬<sup>1</sup>, 马卫明<sup>2</sup>, 杨少华<sup>1</sup>

1 山东省农业科学院 奶牛研究中心, 济南 250100

2 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018

**摘要:** 以在宿主菌株 BL21(DE3)中成功表达的重组金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素蛋白为研究对象, 分析比较通过凝胶过滤层析(Gel filtration chromatography)和镍柱亲和层析纯化试剂盒(Ni-NTA spin columns)纯化所得到的重组蛋白的蛋白含量和生物特性方面的差异。SDS-PAGE 分析检测纯化产物, Bradford 法测定蛋白含量, 兔红细胞测定半数溶血效价, 结果显示这 2 种方法得到的纯化产物在 53 kD 处均呈现单一清晰带, 达电泳级纯度。与此同时, 凝胶过滤对目的蛋白的纯化率为 14.04%, 蛋白含量为 0.337 mg/mL, 溶血活性为 1519 HU/mg; 镍柱亲和层析的纯化率为 17.5%, 蛋白含量为 0.35 mg/mL, 溶血活性为 1463 HU/mg。由此可见, 凝胶过滤得到的纯化产物在蛋白含量和蛋白活性方面丝毫不亚于镍柱亲和层析纯化试剂盒。

**关键词:**  $\alpha$ -溶血素, 凝胶过滤层析, 镍柱亲和层析

## Activity and quality comparison of the engineered protein *Staphylococcus aureus* $\alpha$ -hemolysin purified with gel filtration chromatography and Ni-NTA

Haiyan Zhang<sup>1,2</sup>, Hongjun Yang<sup>1</sup>, Changfa Wang<sup>1</sup>, Hongbin He<sup>1</sup>, Weiming Ma<sup>2</sup>, and Shaohua Yang<sup>1</sup>

1 Cow Research Center, Agricultural Science Academy of Shandong Province, Jinan 250100, China

2 College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

**Abstract:** The  $\alpha$ -hemolysin protein of *Staphylococcus aureus*, which was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) with recombinant pET32a<sup>+</sup>- $\alpha$ -HL plasmid, was purified with gel filtration chromatography (GFC) and Ni-NTA spin columns. The quality and biological characteristic were compared. First, the purified products were analyzed with SDS-PAGE, and the expected protein band was with a molecular mass of 53 kD. Second, protein concentration was determined by the method of Bradford, and the median hemolytic dose potency (HD50) was finally analyzed with rabbit erythrocyte. The protein purified with GFC was 0.337 mg/mL, its hemolysis activity was 1519 HU/mg, and hemolysin yield was 14.04%. Meanwhile, the protein purified with the Ni-NTA Spin Columns was 0.35 mg/mL, its hemolysis activity was 1463 HU/mg, and hemolysin yield was 17.5%, respectively. The results

**Received:** September 10, 2008; **Accepted:** November 13, 2008

**Supported by:** the High-tech Independence and Innovation Foundation of Shandong Province (Nos. 2006YCX027, 2007YCX017-03).

**Corresponding author:** Hongjun Yang. E-mail: longfei1997@sina.com

Changfa Wang. E-mail: wcf1967@yahoo.com.cn

山东省农科院高技术自主创新基金(Nos. 2006YCX027, 2007YCX017-03)资助。

showed that there is no significant difference in the quality, hemolysis activity and yield of the recombinant proteins purified with Ni-NTA spin columns and GFC.

**Keywords:**  $\alpha$ -Hemolysin, gel filtration chromatography, Ni-NTA spin columns

Ni-NTA 纯化试剂盒是非常高效的蛋白纯化系统,但其只适应于实验室规模的小量样品制备,应用于大规模生产基因工程重组蛋白则有一定的局限性。一方面,用Ni-NTA 纯化试剂盒纯化的蛋白量非常少,根据试剂盒附赠的Ni-NTA Spin Handbook,每个Column在操作无误的情况下仅可以得到几百微升蛋白;另一方面,Ni-NTA 纯化试剂盒价格昂贵,国际市场售价约为13.53 美元/Column。如此高的成本对于大规模的分离纯化工作是难以接受的。应用于奶牛乳腺炎的基因工程亚单位疫苗需要大量的从表达宿主菌株中分离纯化出目的蛋白,因此寻找一种高效简捷的方式取代Ni-NTA 纯化系统已成为必然。蛋白纯化方法日新月异,综合考虑本实验室现状以及课题需要,决定首先采用凝胶过滤层析<sup>[2,3]</sup>来纯化目的蛋白。

本研究以含重组质粒 pET32a(+)- $\alpha$ -HL 的大肠杆菌 BL21(DE3)为宿主菌株,以克隆表达的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素为目的蛋白,对凝胶过滤层析和Ni-NTA 亲和层析纯化目的蛋白的各种基本参数进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌种和质粒

含 pET32a(+)- $\alpha$ -HL 重组质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)由本实验室构建并保存<sup>[4]</sup>。

#### 1.1.2 试剂

蛋白胨(Tryptone)和酵母粉(Yeast extract)购自英国 OXOID 公司; Ampicillin 购自朋远生物; IPTG 购自 Promega 公司; 丙烯酰胺(Acr)及甲叉双丙烯酰胺(Bis)购自 Fluka 公司; 四甲基乙二胺(TEMED)购自 Bio-Rad 公司; SephadexG-100(Pharmacia 进口分装)购自上海化学试剂厂; 考马斯亮蓝 G-250 购自 Sigma 公司; Ni-NTA 纯化试剂盒购自 Qiagen; 凝胶过滤层析柱(14 mm $\times$ 900 mm)购自上海锦华层析设备厂; 其余试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.3 主要仪器

超净工作台: MSC-12 型 购自 Jouan; 冷冻离心

机: 3K15 型 购自 Sigma; 紫外分光光度计: UV-2000 型 购自 Tanon; 电泳仪: DYY-8C 型 购自北京六一仪器厂。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 试剂的配制

IPTG(24 mg/mL), Ampicillin(100 mg/mL), LB/Amp 等试剂的配制和保存方法均参照 TaKaRa 宝生物工程(大连)实验室常规试剂的配制方法。

#### 1.2.2 菌体生长及目的蛋白的诱导表达

菌体培养密度以  $OD_{600}$  值表示<sup>[8]</sup>,  $OD_{600}$  值在 0.4~0.6 时加入 IPTG, 使 IPTG 在培养液中的终浓度为 1 mmol/L。

增菌培养: 将重组菌 BL21[pET32a(+)- $\alpha$ -HL]接种于 500 mL LB/Amp 培养基中, 恒温摇床 37 $^{\circ}$ C 孵育 8 h, 紫外分光光度计测  $OD_{600}$  值, 加入 500  $\mu$ L IPTG, 继续恒温摇床 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 室温, 14 000 r/min 离心 30 s, 弃上清, 收集细菌沉淀留样 SDS-PAGE<sup>[11]</sup> 检测。

#### 1.2.3 目的蛋白的收集

取诱导的菌液于离心管中 5000 r/m 离心 5 min, 弃上清, 重悬于 Buffer B 中, 室温下微量振荡器上作用 1 h, 以 14 000 r/min 室温离心 25 min。将一部分取上清于 PB(pH 9.0)缓冲液中透析过夜, 用于凝胶过滤层析; 另一部分取上清进行 Ni-NTA 亲和层析。

#### 1.2.4 凝胶过滤层析

准确称取 SephadexG-100 凝胶 10 g, 去离子水浸泡溶胀 24 h, 倾去上清, 灌注层析柱, 用 PB 缓冲液(pH 9.0)进行洗脱平衡, 直到流出液的 pH 值与 PB 缓冲液的 pH 值相近时为止。将样品缓缓注入凝胶柱中, 控制流速 1 mL/min, 使样品与凝胶之间发生充分的作用。当样品充分浸入凝胶中时, 缓缓注入 PB 缓冲液进行洗脱, 流速不变, 3 mL/管。收集 20 管, 聚乙二醇透析浓缩至原体积的 20%, 即 0.6 mL/管, SDS-PAGE 检测。

#### 1.2.5 Ni-NTA 亲和层析

取 1.2.3 中得到的上清 600  $\mu$ L 加入 Buffer B 预先平衡的 Ni-NTA 层析柱中, 2000 r/min 离心 2 min,

弃流出液。600  $\mu\text{L}$  Buffer C 洗涤 Ni-NTA 层析柱, 2000 r/min 离心 2 min, 弃流出液。200  $\mu\text{L}$  Buffer E 洗脱 Ni-NTA 层析柱 2 次, 2000 r/min 离心 2 min, 收集流出液共 400  $\mu\text{L}$ , 即为目的蛋白。Buffer B、Buffer C、Buffer E 配方详见 Ni-NTA Spin Handbook。

### 1.2.6 蛋白含量测定

目的蛋白含量的测定参照 Bradford 法<sup>[6]</sup>, BSA 为标准蛋白。

取不同含量的标准蛋白溶液与考马斯亮蓝 G-250 试剂混匀, 室温放置 2 min, 紫外分光光度计 595 nm 下比色。根据比色结果制作蛋白标准曲线。

### 1.2.7 溶血活性检测

溶血素的检测方法很多, 由于兔红细胞对溶血素的溶细胞作用最为敏感<sup>[1]</sup>, 因此常用兔红细胞的溶血试验作为检测溶血素活性的指标之一。以 1% 兔红细胞进行半数红细胞溶血效价<sup>[7]</sup>的测定。首先将兔红细胞用磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 0.015 mol/L NaCl, pH 7.0, PBS)洗涤 3 次, 以 2000 r/min 离心 10 min, 再以同样缓冲液配成所需浓度(1%, V/V)红细胞悬液备用。然后将凝胶过滤层析和亲和层析分别得到的纯化产物倍比稀释<sup>[5]</sup>, 紫外分光光度计 414 nm 下比色。

溶血素比活<sup>[9]</sup>=溶血效价/蛋白浓度, 单位 HU/mg。

## 2 结果

### 2.1 $\alpha$ -溶血素蛋白的表达及纯化

SDS-PAGE 检测诱导及纯化结果如图 1 和图 2 所示, 与未诱导株相比, IPTG 诱导株在 53 kD 处均有明显蛋白条带, 确认为 $\alpha$ -溶血素蛋白<sup>[4]</sup>。而且图 1 和图 2 所示的凝胶过滤层析和镍柱亲和层析试剂盒纯化得到的产物在 SDS-PAGE 中 53 kD 处均呈现单一条带, 达电泳级纯度。

### 2.2 蛋白含量的测定

由表 1 数据得到图 3 蛋白含量标准曲线, 测得 1.2.3 上清、凝胶过滤层析得到的纯化产物和亲和层析所得的纯化产物在 595 nm 下比色结果分别是 0.263、0.395 和 0.410, 根据图 3 方程可以得到其蛋白含量分别是 0.200 mg/mL、0.337 mg/mL 和 0.350 mg/mL。

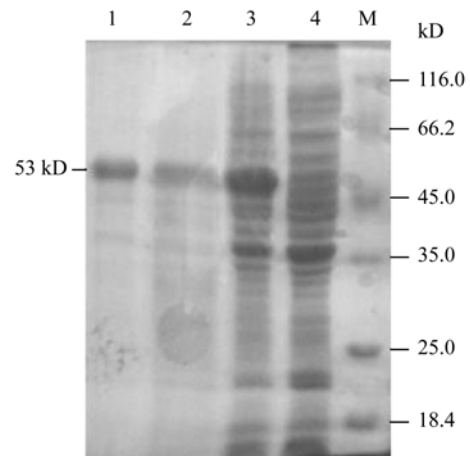


图 1 凝胶过滤层析得到的 $\alpha$ -HL 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of  $\alpha$ -HL obtained from GFC. M: protein marker; 1, 2: purified  $\alpha$ -HL with GFC; 3: *E. coli* BL21 [pET32a(+)- $\alpha$ -HL] induced for 4 h; 4: *E. coli* BL21 [pET32a(+)- $\alpha$ -HL] before induction.

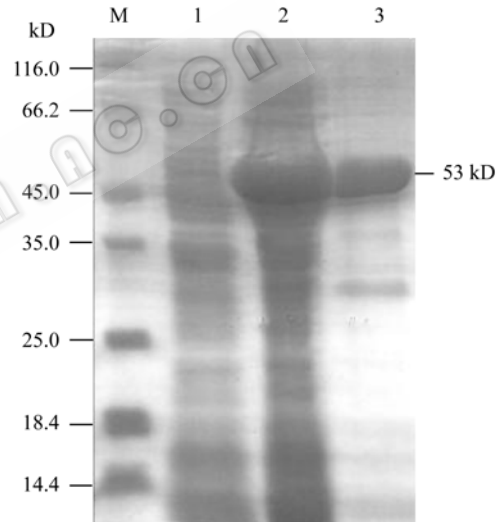


图 2 Ni-NTA 亲和层析得到的 $\alpha$ -HL 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of  $\alpha$ -HL obtained from Ni-NTA spin columns. M: protein marker; 1: *E. coli* BL21 [pET32a(+)- $\alpha$ -HL] before induction; 2: *E. coli* BL21 [pET32a(+)- $\alpha$ -HL] induced for 4 h; 3: purified  $\alpha$ -HL with Ni-NTA spin columns.

### 2.3 溶血活性测定

紫外分光光度计检测 414 nm 下的  $OD$  值, 完全溶血对照组(蒸馏水+兔红细胞) $OD_{414}=0.957$ , 不溶血对照组(PBS+兔红细胞) $OD_{414}=0.032$ , 2 种方法纯化得到的 $\alpha$ -HL 以及 1.2.3 上清同时做倍比稀释, 比色结果如表 2 所示, 1.2.3 上清的蛋白溶血活性最大稀释度<sup>[10]</sup>为 2<sup>7</sup>, 凝胶过滤得到的蛋白溶血活性最大稀释度为 2<sup>9</sup>,

镍柱亲和层析试剂盒纯化得到的蛋白溶血活性最大稀释度为  $2^9$ , 由此推算出 1.2.3 上清的溶血比活为 640 HU/mg, 凝胶过滤产物溶血比活为 1519 HU/mg, 亲和层析产物溶血比活为 1463 HU/mg。

表 1 BSA 标准溶液紫外分光光度计 595 nm 下比色结果  
Table 1 Outcomes of BSA standard solution shade selection at UV spectrophotometer 595 nm

BSA contents in 0.1 mL standard solution ( $\mu$ g)	$OD_{595}$
10	0.132
20	0.255
40	0.561
60	0.598
80	0.818
100	1.054

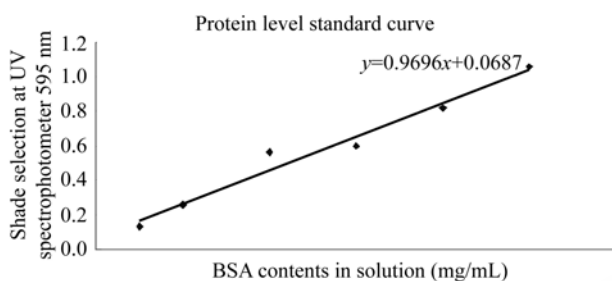


图 3 蛋白含量标准曲线

Fig. 3 Protein level standard curve.

表 3  $\alpha$ -HL 提纯各步骤含量测定  
Table 3 Purification of  $\alpha$ -HL

Purification step	Sample volume (mL)	Concentration of protein (mg/mL)	Total protein (mg)	Hemolytic titer (HU)	Total hemolytic titer (HU)	Specific activity (HU/mg)	Hemolysis yield (%)
Supernatant	36.0	0.200	7.200	128	4608.0	640	30.60
Purified by GFC	3.0	0.337	1.011	512	1536.0	1519	14.04
Purified by Ni-NTA	3.6	0.350	1.260	512	1843.2	1463	17.50

### 3 讨论

$\alpha$ -溶血素亦称 $\alpha$ -毒素, 是金黄色葡萄球菌的重要致病因子之一<sup>[1]</sup>, 具有良好的抗原性, 经甲醛处理可制成类毒素。Herbelin 等<sup>[2]</sup>研究表明其类毒素对金黄色葡萄球菌所致的乳腺炎有部分保护作用。近年来国内外研究表明基因工程亚单位疫苗由于具有大剂量高度纯化的抗原、无遗传物质及宿主和培养基的成分等优点, 在动物传染病的免疫预防中应用较为广泛。由此本实验可以将成功表达的 $\alpha$ -溶血素蛋白从基因工程菌中分离纯化出来, 制成基因工程亚单位

表 2 倍比稀释的 $\alpha$ -HL 在 414 nm 下比色值

Table 2 Multiproportion and shade selection at 414 nm of diluted  $\alpha$ -HL

Multiproportion of $\alpha$ -HL( $2^n$ )	$OD_{414}$		
	Supernatant	GFC	Ni-NTA
1	0.501	0.678	0.885
2	0.377	0.605	0.708
3	0.265	0.556	0.563
4	0.199	0.520	0.491
5	0.109	0.476	0.435
6	0.089	0.385	0.382
7	0.032	0.290	0.302
8	0.030	0.198	0.205
9	0.027	0.078	0.068
10	0.028	0.069	0.040
11	0.034	0.040	0.038
12	0.028	0.042	0.027
13	0.031	0.034	0.027
14	0.030	0.036	0.028
15	0.035	0.030	0.028
Complete hemolysis control		0.957	
Inhemolysis control		0.032	

### 2.4 溶血素得率

将 $\alpha$ -HL 纯化过程中的各步得到的参数进行了综合比较, 得到表 3。由此计算出通过凝胶过滤和镍柱亲和层析得到的溶血素蛋白的纯化效率分别为 14.04% 和 17.5%。

疫苗以应用于金黄色葡萄球菌引起的奶牛乳腺炎的预防。在此,  $\alpha$ -溶血素基因重组蛋白从表达宿主菌株中的分离纯化成为重中之重。

基因工程蛋白的纯化, 国内外报道较少。镍柱组氨酸标签亲和层析纯化试剂盒是非常高效的蛋白纯化系统, 但如前所述, 它并不适合于大规模蛋白的纯化, 其本身的费用已经超过目的蛋白的价值。为了寻找一种高效简捷优质的方法, 根据蛋白纯化所遵循的原则<sup>[2]</sup>, 本实验首先采用了凝胶过滤层析来对目的蛋白进行纯化。Jobos 等<sup>[12]</sup>和 Gottschalk 等<sup>[13]</sup>曾采用超滤、亲和层析、离子交换层析和凝胶过滤

层析法对猪链球菌 2 型溶血素进行纯化, 与之相比, 本实验采用的凝胶过滤层析法也可以获得较高的蛋白含量、比活力及纯化率。电泳结果还表明, 只采取凝胶过滤层析法纯化得到的蛋白不经其他纯化方法也显示单条带型, 纯化产物已经达到理想纯度。与镍柱亲和层析试剂盒相比, 除了在纯化效率上略低以外, 其他各参数均不相上下。然而, 凝胶过滤纯化效率虽不及镍柱亲和层析, 但凝胶介质 SephadexG 系列具有价格低廉, 可重复利用, 易保存等优点, 这使其在蛋白纯化的大规模应用中仍具有优于镍柱亲和层析试剂盒的潜在价值和优势。

本研究探讨了应用凝胶过滤层析纯化目的蛋白, 对所得蛋白的含量和性质方面的影响, 优化了纯化条件, 纯化产物蛋白含量相当可观。初步推算, 凝胶过滤的绝对纯化效果虽然不如镍柱亲和层析试剂盒, 但若以这样的纯化条件, 纯化相同量的目的蛋白, 凝胶过滤纯化的成本仅为镍柱亲和层析纯化试剂盒的 3%。本实验结果表明, 凝胶过滤层析纯化得到的蛋白与镍柱亲和层析相比, 在蛋白活性方面显示了很好的溶血活性, 这为在动物机体上的毒性试验提供了参照。目前, 小白鼠毒性试验和免疫效力试验正在进行中。这些试验结果可为应用凝胶过滤作为纯化方式最终应用于重组基因工程疫苗的工业化生产提供参考。

## REFERENCES

- [1] Martin MD, Paul MO, Patrick MS. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, 2000, **13**: 16-34.
- [2] Zhang YL, Zhang H. *Vaccinology*. 1st Ed. Beijing: Science Press, 2004.  
张延龄, 张晖. 疫苗学. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 2004.
- [3] Zhu LP, Chen XQ. *Normal Experimental Method on Immunology*. Beijing: People's Military Medicine Press, 2000.  
朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 2000.
- [4] Zhang SR, Zhao HK, Yang HJ, *et al*. Prokaryotic expression and bioactivity of the *Staphylococcal*  $\alpha$ -Hemolysin. *J Agr Biotechnol*, 2007, **15**(4): 727-728.  
张善瑞, 赵宏坤, 杨宏军, 等. 金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素的原核表达及其生物活性分析. 农业生物技术学报, 2007, **15**(4): 727-728.
- [5] Surujballi OP, Fackrell HB. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -Toxin. *J Clin Microbiol*, 1984, **19**(3): 394-398.
- [6] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248-254.
- [7] Geoffroy C, Gaillard JL, Alouf JE, *et al*. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, 1987, **55**(7): 1641-1646.
- [8] Wu YF, Zhang SQ, GaoXY, *et al*. Expression of B lymphocyte stimulator(BlyS) from pET plasmid using lactose as inducer. *J Nanjing Normal Univ (Nat Sci)*, 2002, **25**(1): 89-93.  
吴一凡, 张双全, 高秀玉, 等. 乳糖诱导 pET 载体表达重组蛋白的研究. 南京师大学报(自然科学版), 2002, **25**(1): 89-93.
- [9] Fang QZ, Lu CP. Purification of haemolysin of *Streptococcus suis* type 2 strain HA9801 isolated in Jiangsu province. *Chin J Prev Vet Med*, 2003, **25**(5): 363-365.  
方绍庆, 陆承平. 猪链球菌 2 型江苏分离株溶血素的纯化. 中国预防兽医学报, 2003, **25**(5): 363-365.
- [10] Chen GQ, Lu CP, Yao HC. Purification and biological characteristic of a hemolytic toxin of *Streptococcus suis* type 2 of Jiangsu strain. *Chin J Zoonoses*, 2001, **17**(5): 75-77.  
陈国强, 陆承平, 姚火春. 猪链球菌 2 型溶血素的提纯及其生物学特性. 中国人兽共患病杂志, 2001, **17**(5): 75-77.
- [11] Wang JZ, Fan M. *Protein Technical Manuals*. 1st Ed. Beijing: Science Press, 2000.  
汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 2000.
- [12] Jacos AAC. Identification, purification, and characterization of a third-activated haemolysin (Suilyaion) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun*, 1995, **62**: 1742-1748.
- [13] Marcelo G Gottschalk. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 hamelysin. *Microbiology*, 1995, **141**: 189-195.