

胞内蛋白的选择性提取

周 延 张 鹏 谭天伟*

(北京化工大学生物化工系 北京 100029)

关键词: 胞内蛋白, 选择性提取, 细胞破碎

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)02-0143-03

生物技术如 DNA 重组、细胞融合技术, 已使应用微生物廉价地大规模生产有价值的生物产品如: 胰岛素、葡萄糖苷酶等成为可能。但很多基因重组蛋白是以胞内包涵体形式存在的, 这些胞内蛋白制品在纯化过程中, 由于步骤多、最终收率低, 极大提高了生产成本。据统计, 在蛋白制品生产中, 分离和纯化费用占总生产费用的 80% 以上^[1]。因而开发新型生化分离技术, 生产胞内蛋白质已成为工业生产的核心问题。

减轻蛋白质后处理工艺的负荷最根本的方法是尽量减少目标蛋白提取时非目标杂质的混入。传统胞内产物分离纯化的第一步是细胞破碎, 破碎方法主要有机械破碎法(高压匀浆法、球磨法、超声波法等); 非机械法(化学渗透法、溶菌酶法等)。其中机械破碎法已广泛应用于大规模工业生产。但这些方法有其不足之处: (1) 大量细胞碎片的产生, 使后处理工艺负荷量和难度大大增加。(2) 大量核酸类物质的释放使发酵液粘度显著提高, 处理时必须先降低体系粘度。(3) 在机械法处理时, 剧烈的机械作用引起胞内所有可溶性杂蛋白的释放, 给蛋白质纯化带来很大难度^[2]。从而使蛋白质的后续纯化工艺被复杂化, 收率低而且成本提高。

理想的蛋白质提取应是选择地、高效、高速提取蛋白, 而核酸及其它杂蛋白则保留在细胞里。由于没有细胞碎片, 残留细胞可用过滤或离心方便地除去。这样可以显著减轻后续工艺的负担。现在已知的开发的选择提取法如下: (1) 化学处理提取法; (2) 双水相提取法; (3) 酶提取法; (4) 渗压冲击提取法; (5) 电脉冲提取法; (6) 分步、分级提取法。

1 胞内蛋白质的提取方法

1.1 化学处理提取法 细胞对于化学物质的辨别、响应以及运输很大程度上取决于其胞壁或胞膜表面特

性, 因而可以通过使用较弱的化学试剂如: 螯合剂、向药剂、有机溶剂、表面活性剂等作用于细胞, 改变其表面特性、特别是细胞通透性, 使目标产物得以有效提取。

与机械破碎法相比, 化学处理方法避免了细胞碎片的产生。处理后微生物细胞仍维持其大致形态, 核酸仍留在细胞内。这样不但核酸的去除步骤被减化, 同时也避免了由于核酸的释放带来的体系粘度的增高, 而且溶液易澄清。另一个明显好处是用带搅拌的容器进行简单的批处理即可代替机械破碎装置, 也减少了由于强剪切和热介质作用引起的酶失活和降解。但此法的缺点包括从终产物中去除化学物质、化学品造成的不可逆生产损失和非最大生产量, 而且此法也不适用于形成包涵体的重组产物。

Damid 从暴露于 2mol/L 盐酸胍和 2% Triton X-100 4h 的大肠杆菌细胞电镜照片发现化学试剂处理过程中内膜完全溶解, 外壁发生分子水平的改变, 包括外壁脂层或蛋白的部分溶解, 从而改变了细胞的通透性。在盐酸胍和 Triton X-100 同时作用的情况下出现两个较高的蛋白质提取区, 即高盐酸胍浓度区 (大于 2mol/L) 和盐酸胍浓度为 0.1mol/L Triton X-100 为 0.5%~2% 的区域, 此时总蛋白收率近 50%。特别值得注意的是, 在后一区域内可以明显观察到盐酸胍与 Triton X-100 的协同作用, 蛋白提取率呈波型变化^[2]。

Lam 认为在 L-半胱氨酸-磷酸钾盐体系中 *K. fragilis* 提取 β -D-呋喃果糖苷酶与体系 pH 关系很大,

* 通讯联系人

收稿日期: 1999-01-18, 修回日期: 1999-03-22

pH从5变到8时,酶提取率从7%增加到50%。pH小于7时酶稳定。而半胱氨酸的加入,增加了酶的稳定性,而且提高了提取速度^[4]。此外 Chaib F. 分别用氯仿和盐酸胍处理大肠杆菌细胞提取丝裂霉素,结果用盐酸胍处理,其选择性和经济性均很好,适于工业应用^[5]。Yu Peng 用丝裂霉素作用于 *E. coli* 细胞提取胞浆周围酶。发现丝裂霉素对细胞生长有抑制作用,当丝裂霉素浓度达到 300ng / mL 时,酶总活力下降 50% 以上,而 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 会阻止细胞自溶,提高系统稳定性^[6]。谭天伟等用异丙醇浸泡高产 SOD 酵母使得超氧化物歧化酶比活提高了 25 倍,且设备简单、操作方便^[3]。

1.2 双水相提取法 自 1956 年瑞典伦德大学的 Albertsson 发现双水相体系到 1979 年德国 GBF 的 Kula 将双水相萃取分离技术应用于生物产品分离,双水相体系已被广泛用于蛋白质、核酸和病毒等生物产品的分离、纯化^[7]。

Kuboi 发现每种酶的提取常数与环境、酶位置有关,其提取常数 K_i 与总蛋白提取常数 K 之比反映了酶的胞内位置^[8],他推导了 β -半乳糖苷酶分配系数与 PEG 分子量、浓度、磷酸盐浓度、成相比例的关系。并设计了一个间歇生产过程^[10]。

Ariga 认为 PEG 可能影响膜的连接方式,磷酸盐影响膜中的磷脂,而下相中亲水的甘氨酸会使 β -半乳糖苷酶主要分配在上相。分配系数主要与 PEG 分子量、磷酸盐浓度和甘氨酸量有关^[9]。

双水相法提取和提纯目标蛋白,处理量大、速度快、容易放大且不易变性,这些在工业化方面具有一定优势。

1.3 溶菌酶提取法 Huang R. B. 用溶菌酶处理酵母细胞使细胞壁转化酶提取率比机械法提高近 20 倍^[11]。Kurimura M. 用 3 种溶菌酶联合作用于绿色海藻细胞有效提取虾青素,结果比一般有机溶剂提取收率提高 3 倍^[12]。Ferrer 研究了分布在细胞壁表面和内部的甘露糖蛋白,认为它决定了细胞壁的多孔性和渗透性。确切地说是甘露糖蛋白上的二硫键和甘露聚糖链的数量决定了孔的类型和尺寸。用 β -1,3-甘露糖苷酶可以提取出甘露糖蛋白,从而改变细胞的多孔性和渗透性,达到选择提取胞内蛋白的目的^[13]。

1.4 渗压冲击提取法 渗压冲击提取法是较温和的一种处理方法。将细胞放在高渗介质(一定浓度的甘油

或蔗糖溶液)中,达到平衡后介质被突然稀释或者将细胞转入低渗溶液中,这样一来,由于渗透压的迅速变化,水大量进入细胞内,引起胞壁破损,从而使细胞通透性增大。

E. Braendli 把 1g 悬浮细胞放入 5mL 25% 的高渗蔗糖溶液 (0.2mol / L Tris, pH9.0) 其中含有 0.1mol / L EDTA。在 4℃ 下作用 20min 然后离心,再把细胞转移到 Tris 缓冲溶液 (10mmol / L, pH9.0) 中,试验结果表明,稀释倍数为 5 时效果最好,提取的 Cystatin C 为 1.38mg / g。与超声波法相比 Cystatin C 提取量虽略有减少,但 Cystatin C 占总蛋白提取量的比值却提高近 20 倍。渗压冲击法选择性很高,且提取速度快,工艺简单,易放大,具有很大工业化潜力^[5]。

1.5 电脉冲提取法 电场对细胞作用的研究是细胞生物物理学的传统领域,近年来由于引入了新的技术和方法,使电场在生物与医学的实际应用方面开辟了广阔的途径。

用电脉冲处理微生物细胞会造成细胞壁的电损伤,从而改变细胞的通透性,在适当条件下处理能引起胞内物质的提取^[14]。由电脉冲处理前后紫外吸收情况可知,由于电脉冲处理细胞壁破损,产生小孔。当小孔占总胞壁表面百分率不大时,由于脂分子的扩散和蛋白分子重排小孔被修复,产生可逆的孔。但当孔直径太大或孔百分率过大时,孔就不能被修复。控制场强低于 10kv / cm 时为可逆孔产生范围,可保持细胞活性同时提取目标蛋白——转化酶。

电脉冲处理条件温和、速度快,达到最大提取量仅用数秒即可,即使超声波法和匀浆法也至少要用 1min。而且既对细胞生长没有任何影响,又不添加任何物质使蛋白纯化过程复杂化。

1.6 分步、分级提取法 细胞里有多种有价值的蛋白,已经证实,由于不同蛋白提取特性不同,可以通过特殊操作使得不同蛋白以一定次序先后从细胞中提取出来。这是多种选择提取方法的综合运用。通过对不同体系的实际分析,选择不同方法组合,可以使用于任何体系。

Kuboi R. 先用 Triton X-100 提取大肠杆菌胞浆周围酶,再用溶菌酶提取原生质内酶,并推导了整个过程的动力学模型,进一步建立了最优化条件和分步提取的方法^[10]。Yu Peng 发现大肠杆菌在 Mitomycin C (浓

度低于 200ng / mL) 作用下提取胞浆周围酶。当 Mitomycin C 浓度约为 300ng / mL 时诱导菌株产生大肠杆菌素 (BRP), BRP 能选择提取 α -淀粉酶和 β -乳糖酶, 此法使 α -淀粉酶和 β -乳糖酶提取效率分别提高 7 和 3 倍。由细胞内标记酶可知溶胞作用并未发生。

Huang R. B. 将酵母细胞的整个提取过程分成三步, 第一步用溶菌酶处理细胞, 溶解细胞壁, 形成原生质体, 提取出所有细胞壁上的蛋白质。第二步用温和的化学试剂破碎原生质体, 提取出细胞质中的蛋白质, 而细胞器没有破碎。第三步用强化学渗透剂处理细胞器, 提取出细胞器中的蛋白质。与传统机械法相比, 第一步提取效率提高 20 倍, 第二步提高 3.4 倍, 第三步提高 4.5 倍。此法生成稳定的原生质体至关重要。低 pH 值 (pH4~5), 对原生质体有保护作用。必须使用膜稳定试剂, 经过比较 ZnSO_4 浓度为 10~20mmol / L 稳定效果最好, 可提取胞壁酶最高, 且无胞浆蛋白和延胡索酸酶(细胞器内酶)提取。但介质中的 Mg^{2+} 会减弱 Zn^{2+} 的稳定作用。此法综合了酶法和化学渗透法的优点, 可提取细胞内任何位置的酶和蛋白, 具有更高效果和提取速度^[11]。

2 胞内蛋白的选择性提取方法展望

综上所述, 细胞蛋白产物的选择性提取所具有的优点使其具有重要的应用前景, 如不需要特殊设备, 在提取同时可达到纯化目标蛋白的目的, 简化了分离工艺。但仍有几个待改进的方面: (1) 廉价方法的开发。本文所介绍的几种方法, 大多数使用了价格比较高的化学试剂或酶, 因而, 大规模的生产必须造成成本直线上升。寻找廉价的代用品或降低溶菌酶的生产成本, 是最终选择性提取方法替代传统的机械破壁法的最重要一环。(2) 高处理量的获得。上述方法中双水相法处理量大而快速, 这一特点也是工业化的一大前提。(3) 多种方法的综合集成。比如分级提取的方法, 把两种或两种以上的提取方法结合起来, 从而达到更好的提取效果。这也是一个大的研究方向。(4) 方法的广泛适用性。找到一种具有更广泛适应性的方法, 例如: 不但适用于大肠杆菌而且对酵母菌选择性提取也有有效的方

法, 从而使细胞内产物提取得以规范化和推广。

此外, 细胞内蛋白部分提取的研究虽然已经很长时间, 但各种方法的机理研究还很薄弱。这不但阻碍了方法本身的研究, 也不利于思路的开放和扩展。

总之, 细胞内产物的选择性提取以其对后续工艺的优良影响和具有很大的实际应用价值, 引起了学者们的研究兴趣。我们期待随着对其机理的深入研究, 会有更多的卓越方法面世。

参 考 文 献

- [1] Ronschoff T C Murphy M K. Biopharm., 1990, 3(3): 20~26.
- [2] Damid H, Henry W. Biotechnol. and Bioeng., 1989, 33: 886~895.
- [3] 谭天伟, 沈忠耀. 微生物学通报, 1996, 23(6): 368~370.
- [4] Lam K S, Groot Wassink J W D. Enzyme Microb. Technol., 1985, 7(5): 239~242.
- [5] Chaib F, Bemier A. Biotechnol. Techniq., 1995, 9(3): 179~184.
- [6] Yu Peng, San Ka-Yiu. Biotechnol. Prog., 1992, 8(1): 25~29.
- [7] Tan Tianwei, Yan Yuanzhong. Biotechnol. Techniq., 1994, 77(1): 71~74.
- [8] Kuboi R, Umakoshi H. Advances in Bioseparation Engineering, 1994: 38~43.
- [9] Ariga O, Miyakawa I. J. Fermentation and Bioengineering, 1994, 77(1): 71~74.
- [10] Kuboi R, Umakoshi H. Advances in Bioseparation Engineering, 1993: 44~47.
- [11] Huang R B, Andrews B A. Biotechnol. and Bioeng., 1991, 38: 977~985.
- [12] Kurimura M, Sakamoto Y. Biotechnol. Techniq., 1997, 11(9): 657~660.
- [13] Ferrer P, Diers i. Biotechnol. and Bioeng., 1998, 58: 321~324.
- [14] 马志章, 蒋承浚等. 细胞生物学杂志, 1996, 18(3): 111~114.
- [15] Ohshima T, Sato M. Advances in Bioseparation Engineering, 1994: 27~43.