

## 用高碘酸盐活化葡聚糖凝胶制备亲和吸附剂的研究

刘建华 徐章雄

(贵州省生物技术研究开发基地, 贵阳)

用高碘酸盐活化的Sephadex与鸡卵类粘蛋白偶合制备分离纯化胰蛋白酶的亲和吸附剂。该方法比CNBr活化Sephadex 4B制备亲和吸附剂的方法具有操作安全, 价格低廉等优点。活化载体在4℃保存较长时间不失去键合能力<sup>[1]</sup>。该亲和吸附剂可制备得比活力为11228.8 u/mgBAEE单位电泳单带纯胰蛋白酶, 并能反复使用十余次, 仍具有较强亲和吸附能力。酶活力回收率达67.2%, 与Sephadex 4B制备的亲和吸附剂效果相似<sup>[2]</sup>。

### 材料与 方法

#### 一、材料

Sephadex G-75 (Pharmacia 进口分装), NaIO<sub>4</sub> (A. R.), KBH<sub>4</sub> (C. P.), BANA (Benzoyl-DL-Arginine-β-Naphthylamide), BAEE (Benzoyl-L-Arginine Ethyle Ester HCl), (上海生物化学研究所产品), 鸡卵类粘蛋白 II 和粗胰蛋白酶 (自制)。

#### 二、方法

载体活化: 取2.5g干重 SephadexG-75 溶胀洗涤数次, 缓慢搅拌加入0.05mol/L NaIO<sub>4</sub>溶液50mL反应30分钟, 去离子水洗涤数次备用。

配基引入: 用纯化的鸡卵类粘蛋白 II 87.5mg (抑制胰蛋白酶活力为60125u/mg BAEE单位), 溶于35mL水, 加入活化的Sephadex G-75中, 用5%K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调pH7.5—9.0, 缓慢搅拌反应3小时, 反应中随时加入5% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>以保持pH的相对稳定。

偶合物还原: 取0.27g KBH<sub>4</sub>溶于20mL水, 缓慢搅拌加入上述体系中, 反应5小时, pH 6.5—7.5, 反应中应注意避免大量气泡生成。

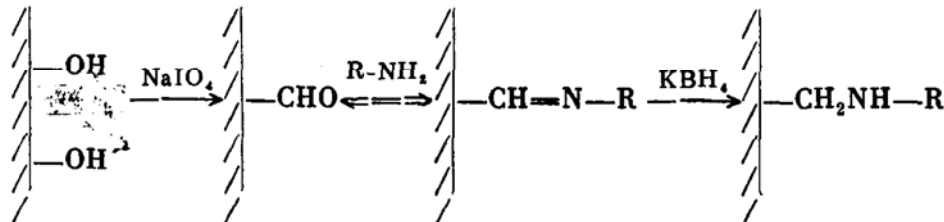


Fig. 1 Scheme of three chemical reactions

亲和吸附与洗脱: 制备的亲和吸附剂装入16×300mm层析柱中, 用pH7.5, 0.1mol/L

Tris-HCl—0.1mol/L KCl—0.05mol/L CaCl<sub>2</sub>: 缓冲液平衡,将溶于相同缓冲液的粗胰蛋白酶 8mL上柱,用平衡液洗脱至未吸附蛋白质 O.D<sub>280nm</sub><0.02时,改用 pH3.0, 0.1mol/L 草酸钾—氯化钾溶液洗脱, 3.5mL/管/15分钟,以BANA为底物监测<sup>[3]</sup>收集活性段洗脱液。

## 结果与讨论

### 一、洗脱与活性测定

收集活性段胰蛋白酶溶液,经透析除盐后冻干,用于重法测定蛋白质含量,以BAEE为

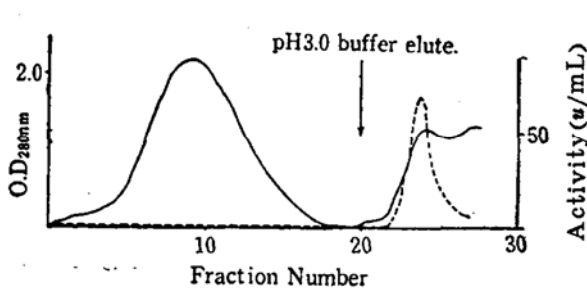
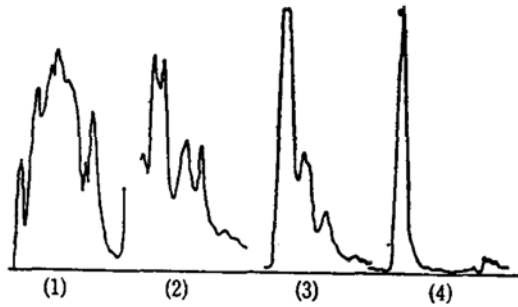


Fig. 2 Affinity chromatography of crude trypsin. (Left, Elute with balance solution. Right, Elute with potassium oxalate and potassium chloride.)  
— O. D.280 nm assay. ----- O. D.580 nm trypsin activity assay



(1) (2) (3) (4)  
Fig. 3 Electrophorogram of different trypsin product. (1), Crude trypsin product. (2), Xinjiang Yili product. (3), Difco product. (4), Affinity purification product.

底物测定酶比活力,并与CNBr活化Sephacrose 4B制备的亲吸附剂纯化胰蛋白酶效果进行比较。结果见Table 1。

Table 1 Efficiency of purification of different affinity adsorbents

Method	Support	Ligand	Activity (u/mg)		Times
			Crude	Pure	
CNBr <sup>[4]</sup>	Sephacrose 4B	Ovomucoid	8000	10000	1.25
NaIO <sub>4</sub>	Sephadex G-75	Ovomucoid I	1000—2200	11228.8	5—11

### 二、电泳检测

用自制粗胰蛋白酶、新疆伊犁产胰蛋白酶、Difco产品与我们亲和制备的胰蛋白酶进行圆盘电泳,染色后在600nm扫描,亲和纯化的胰蛋白酶已达电泳单带纯,结果见Fig. 3。

通过控制适宜的pH,以保持Sephadex的适当孔径和颗粒形状,使色谱材料在柱内具有较好的机械强度和一定的流速。通过以上工作我们认为,交联度较高的Sephadex只要掌握好一定技术条件,仍是较好的亲和色谱载体材料。同时较纯的卵粘蛋白能使亲和色谱柱分离纯化效果明显提高。我们在Kassell方法<sup>[5]</sup>的基础上经过纯化得到电泳纯卵粘蛋白II,用于偶联并获得较为满意的结果。

Table 2 Efficiency of purification of different ovomucoid ligand

Ovomucoido	Ligand weight (g)	Activity of trypsin (u/mg)*			
		First	Second	Third	elute
DEAE-52 purified product	0.3000	27.0	25.0	31.3	
Sephadex purified product I	0.0875	68.0	61.0	60.2	

\* BANA unit.

致谢: 本研究得到单友谅教授的帮助、指导, 徐康东、周萍同志参加了部分工作, 谨致谢意。

### 参 考 文 献

- [1] C R洛著, 刘毓秀译. 亲和色谱导论, 北京: 北京科学出版社, 1983: 74.
- [2] 叶林发等. 医药工业, 1985; 17 (3): 1, 97.
- [3] 张天民等. 动物生化制药学, 北京人民卫生出版社, 1981: 138.
- [4] 张龙翔等. 生化实验方法和技术, 高等教育出版社. 北京, 1981: 208.
- [5] Kassell B, Perlmann G E, Lorand L. *Academic Press*, New York. 1970; Vol XIX 890.

## Study on Preparation of Affinity Adsorbent by the Periodate Oxidation Method

Liu, Jian-hua      Xu, Zhang-xong

(*Biotechnology Research and Development Station in GuiZhou, Guiyang*)