

分离尿激酶的亲合色谱填料制备*

高俊萍 梁峰 常建华**

(西北大学化学系 西安 710069)

郭立安

(第四军医大学中心实验室 西安 710032)

苏天升

(中国科学院北京化学研究所 北京 100080)

提要 本文合成了以 Sepharose 和聚甲基丙烯酸环氧丙酯为基质, 对氨基苯甲脒为配基的分离尿激酶两种亲合色谱填料, 并应用于尿激酶粗品的直接纯化中, 活性回收率分别为 108.3% 和 43.4%, 比活提高倍数分别为 9.06 倍和 36.9 倍。

关键词 亲合色谱 填料 分离 尿激酶

1 前言

亲合色谱是利用其不溶性载体上的特殊配体对与其具有特异性亲和作用的生物大分子进行分离纯化的色谱方法^[1]。由于这种方法选择性好, 活性回收率高, 已广泛应用于生物大分子的分离制备、生物认知^[2]、药物分析^[3]、食品分析^[4]及生化分析^[5]等各个领域, 在生化制药及生物工程下游得到广泛应用。

尿激酶是一种蛋白水解酶^[6], 存在于哺乳动物的血液中^[7], 能活化血纤维溶酶原成为血纤维溶酶蛋白, 对血栓病有特殊疗效, 具有很高的经济价值。而直接从尿液中提取的尿激酶粗品必须经过进一步分离纯化才能应用于临床制药。

目前分离尿激酶粗品的主要方法有离子交换色谱法^[8]、疏水色谱法^[7]和亲合色谱法。前两者用于初步的纯化, 而使用亲合色谱法作进一步纯化具有明显优势。文献报道, 在 Sepharose 和聚甲基丙烯酸基球上键合对氨基苯甲脒可用来分离尿激酶^[9]。文献上报道的纯化试剂是尿激酶针剂, 为了寻找能用于尿激酶粗品的分离的亲合色谱填料, 研究亲和配体的结构为对尿激酶的作用, 探求一种高效而价廉的合成工艺, 我们对不同基球、不同配体及不同合成工艺的亲合色谱填料进行了研究。

本文采用 Sepharose 和聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球作基质, 对氨基苯甲脒作配体, 采用新的合成方法制成填料, 并应用于尿激酶粗品的分离纯化, 取得了较为满意的效果。

2. 实验部分

2.1 试剂和仪器

Sepharose—4B (pharmacia 公司), 环氧氯丙烷 (西安化学试剂厂, 化学纯), 氨基己酸 (上海试剂三厂, 生化试剂), 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (简写 EDC.HCl, 中科院上海生化所), 对氨基苯甲脒盐酸盐 (简写 p—ABZ 盐酸盐, 进口分装), 聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球 (中科院北京化学所提供), 二环己基碳二亚胺 (简写 DCC), 其他试剂皆为分析纯。

WZ—90—1 型紫外检测仪 (上塘教学仪器厂), BT01—100 型蠕动泵 (保定蓝格公司), TU—1201 紫外分光光度计 (北京通用仪器公司)。

2.2 填料的合成

2.2.1 填料 A 的合成

30ml Sepharose—4B 凝胶用水充分洗涤后, 加入 30 ml 2mol/L NaOH 和 3ml 环氧氯丙烷, 110mg NaBH₄, 室温下搅拌 2h。在此期间缓慢滴加 15ml 2mol/L NaOH 和 9ml 环氧氯丙烷, 放置过夜。产物用水—20%乙醇—水依次洗涤。

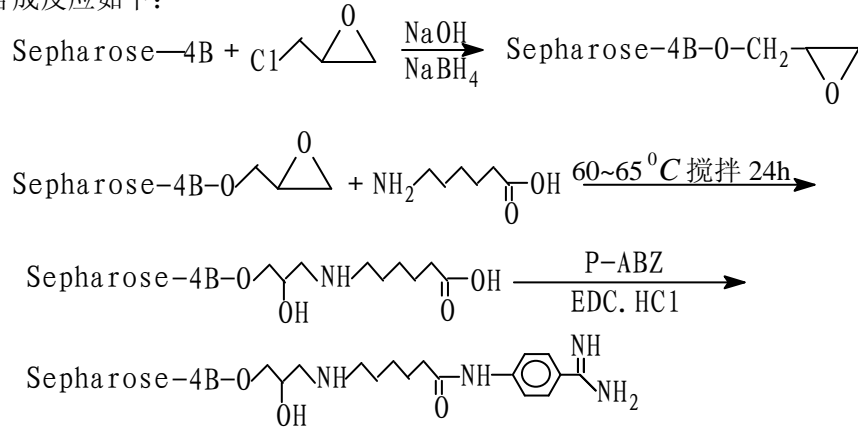
取上述产品 5 ml 加入氨基己酸 5 g, 2 mol/L 的碳酸盐缓冲溶液 (pH=10.5) 30ml, 60—65°C 反应 16h, 放置过夜, 过滤出产品, 依次用水—10%乙醇—水洗。

上述产品加入 45 ml 水, 300mg p—ABZ, 调 pH=4.5, 加入 0.8g 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC.HCl)。室温下搅拌 24 小时, 过滤, 洗涤, 得产品。

*陕西省教委重点科研项目资助, 项目批准号: 96JZK15

**通讯联系人

合成反应如下:



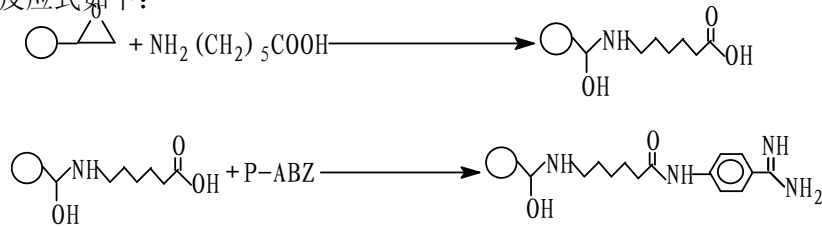
2.2.2 填料 B 的合成

将 2.0g NH₂(CH₂)₅COOH 溶于 20ml 2 mol/L CO₃²⁻/HCO₃⁻ 的缓冲液中, 加入 4g 聚甲基丙烯酸环氧丙酯, 再加入 10ml CO₃²⁻/HCO₃⁻ 缓冲液, 在 60-65°C 的水浴中搅拌 24 小时, 抽滤, 用 10% 的醋酸、CH₃Cl 依次洗涤, 得固体。

将 1.3g p-ABZ 盐酸盐溶于 30ml 氯仿中, 用浓氨水调至 pH=5 后, 将溶液与前面固体混合, 再加入 2.7g DCC, 冰浴搅拌 3 小时, 放置过夜。

抽滤产品, 用无水乙醇—水—稀氨水—水依次洗涤。得填料 B。

反应式如下:



2.3 活性回收率测定:

用平板法测定尿激酶的活性, 方法见文献^[10]。用未上柱的尿激酶溶液的活性作为标准 (100%), 来求得过柱回收液的活性回收率。

2.4 比活提高倍数的测定

用 lowry 法^[11]测定未上柱和上柱回收液的蛋白含量, 分别再测定它的活性, 求出未上柱和上柱回收液的比活, 再求出比活提高的倍数。

3. 结果与讨论

3.1 引入环氧基可避免使用剧毒的 CNBr 活化剂

活化 Sepharose 的羟基经典方法是使用 CNBr, 而本文则采用环氧氯丙烷进行活化, 避免了使用剧毒的 CNBr 及可能放出剧毒气体 HCN 的毒害。

3.2 尿激酶粗品的色谱分离

将填料装柱, 与蠕动泵、紫外检测仪及记录仪组成的一套装置对填料 A、B 分离尿激酶粗品的情况进行实验。色谱图如下:

A :0.1MNH₄Ac+0.4MNaCl PH=4.0

流速:0.6ml/min 柱长:L=7cm

图 1 分离尿激酶的色谱图
A :0.1MNaCl+0.02MPBS PH=7.2

Fig.1 Chromatogram of separation

Urokinase

3.3 两种不同基质填料的对照

我们将收集下来的活性峰样品与未上柱的尿激酶粗品溶液做了活性及比活的对比,其蛋白浓度使用 lowry 法测得。数据见表 1:

表 1 不同基质填料的性能对照

Table 1 The comparison of two kinds of packings

	实验次数 times	平均活性回收率 (%) bioactivity recovery(%)	平均比活提高倍数 purification fold
填料 A (Packing A)	3	108.3	9.06
填料 B (Packing B)	3	43.4	36.9

填料 A 选用 Sepharose 作为基球,其优点是表面为亲水性,不易使酶失活,活性回收率较高。但 Sepharose 作为软基质,一般只适用常压色谱,流动相流速较慢。填料 B 选用高分子球作为基质,耐压 25MPa,可用于高效液相色谱。在同样柱体积时,填料 B 上柱时间少,分离纯化快,比活提高倍数高。两种填料各有优缺点。

4. 结论

本文首次采用国内高分子基球作为载体合成的填料 B,与国外同类填料相比,比活提高倍数较大,且耐压性好,允许较大压力操作,分离纯化时间短,基球作适当改性,增强亲水性,可制备出分离尿激酶的高效填料。

参 考 文 献

- 1 Lowe C R 著,刘毓秀译.亲和色谱导论.北京:科学出版社,1983.11-13
- 2 Liao J L, Wang Y, Hjerten S. *Chromatographia*, 1996, 42(5-6): 259-262
- 3 Bongartz D, Hesse A. *J. Chromatogr. B: Biomed Appl.*, 1995, 673(2): 223-230
- 4 Carson M C, Breslyn W. *J. AOAC Int.*, 1996, 79(1): 29-42
- 5 Brockman A H, Orlando R. *Anal. Chem.*, 1995, 67(24): 4581-4585
- 6 谭佩华,陶宗晋,祁国荣等.现代化学试剂手册 第三分册 生化试剂(一).北京:化学工业出版社,1986.344-345
- 7 Hayashi S, Yamada K. *Ketsueki to Myakkan*, 1983, 14(4): 467-473
- 8 Kenneth C H, Richard Z. *J. Chromatogr.*, 1990, 525: 297-306
- 9 Taylor R F, Marenechic I G. *J. Chromatogr.*, 1984, 317: 193-200
- 10 Burges R A, Brammer K W. *Nature*, 1965, 208(5013): 894
- 11 郭立安.高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术.西安:陕西科技出版社,1993.374-376

Study on the Packings of Affinity Chromatography for the Separation of Urokinase

Gao Junping, Liang Feng, Chang Jianhua*

(Department of Chemistry, Northwest University, Xi'an, 710069)

Guo Li'an

(Central Laboratory, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032)

Su Tiansheng

(Beijing Institute of Chemistry, the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080)

Abstract Two kinds of affinity chromatography packings for the separation of Urokinase were synthesized by coupling of P-amino benzamidine (P-ABZ) to commercially available Sepharose and polyepoxypropyl methacrylate (PEPMA). Then they were applied for separating crude Urokinase. It was found that the average recovery of bioactivity was higher on Sepharose than that on PEPMA, resulting in 108.3% and 43.4%, respectively. The high rigidity of PEPMA permits fast flow of protein solutions and operation by higher-pressure affinity Chromatography. The average fold purification of PEPMA column was 36.9 that increased purification times as much as nine-fold in comparison to Sepharose column. The purification of crude Urokinase described in this paper demonstrates that PEPMA column is effective for purifying biological products in a large scale.

Key words affinity chromatography, packings, separation, Urokinase