

参 考 文 献

- [1] 袁振铎等:《北京医学》,1981年,第3卷,第1期,第6页。
[2] Blank-liss, W. E. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **86**, 67, 1978.
[3] Brack, D. J. H. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **82**,

101 (No 1/2). 1978.

- [4] Hönig, W. and Kula. M. R.: *Anal. Biochem.*, **72**, 502, 1976.
[5] Polson, A. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **82**, 463, 1964.

[本文于1981年10月28日收到]

凝集素的分离纯化方法

孙 册

(中国科学院上海生物化学研究所)

凝集素是一类与糖专一结合的蛋白质或糖蛋白,广泛存在于自然界,最小的生物体,如病毒乃至人体细胞都含有它。可分为水溶性的和膜上的凝集素两类。它们具有许多重要的生物学特性,如血型专一性,促使淋巴细胞有丝分裂、介导细胞与细胞的粘着和细胞识别外界物质等,都是基于凝集素具有糖专一性这一点。凝集素的这一特性成为探查细胞表面含糖高分子结构、组成和功能,以及研究细胞生长和恶变过程中的变化的有用试剂。凝集素在机体内的功能正逐渐被发现。为了深入研究它的性质,须要将它分离纯化。依靠凝集素专一地和可逆地结合糖的性能,再用固定化的糖衍生物作亲和剂可以纯化凝集素。

通常先用生理盐水或缓冲液抽提磨碎的种子粉。含脂质较多的种子如花生、芝麻、大豆等,先用有机溶剂(甲醇或石油醚)预抽提,除去脂质和其它脂溶性杂质。在亲和层析技术建立以前均采用分部分离蛋白质的方法,纯化凝集素,如硫酸铵分级沉淀、离子交换层析、分子筛凝胶过滤、超离心等。现在则多根据凝集素的糖结合专一性采用相应的亲和层析法。其原理与其它具有专一结合位置的生物聚合物如酶等相似。由于凝集素不修饰与它作用的化合物,反应更为简单。凝集素与糖的相互亲和不强(与单糖的结合常数 K_a 通常为 10^2-10^4)^[1,2],因此大多数凝集素在亲和柱上很容易被专一的糖

取代。用单糖和凝集素的粗制品通过血凝作用的半抗原抑制或凝集素与聚糖的双扩散反应,很容易确定凝集素的糖专一性,然后可根据其糖专一性设计合适的纯化方法。纯化凝集素的亲和柱主要有三种:(1)天然的或修饰的聚糖,(2)结合载体的糖蛋白或糖肽,(3)结合载体的单糖或双糖(表1)^[3,4]。第一类中用得最广的是 Sephadex 和 Sepharose。因 Sephadex 是交联葡聚糖,适于纯化对葡萄糖专一的凝集素,如伴刀豆凝集素,扁豆凝集素。Sepharose 可用于半乳糖结合的凝集素,如蓖麻和相思豆凝集素等。但不是所有与半乳糖结合的凝集素都能吸附于 Sepharose,对 α -半乳糖苷专一的,如槐凝集素等就不能吸附于 Sepharose,因为 Sepharose 是 β -糖苷键连接的聚糖。有的凝集素虽无异头专一性,不仅与 α -半乳糖结合,却不吸附于 Sepharose,可能由于这些凝集素不与直链聚半乳糖的链内半乳糖基作用,如果用酸温和地水解聚半乳糖,使链的若干处切开,暴露出半乳糖基,而不使网络完全降解^[5],如大豆、花生凝集素不吸附于 Sepharose,但可与酸化的 Sepharose 作用。通过环氧氯丙烷或丁二烯砜交联天然的含半乳糖的聚糖,如阿拉伯半乳聚糖^[6]、Guaran^[7]、半乳糖甘露聚糖等,可获得对半乳糖专一的凝集素的高容量的亲和剂。Guaran 含 α -半乳糖基,交联的 guaran 可用于纯化对 α -半乳糖专一的凝集素。甲壳素是天然的水溶性的聚

表 1 亲和层析方法纯化凝集素

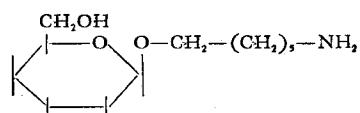
载 体	配 体	凝 集 素 来 源
第 一 类 聚 糖		
Sephadex	—	刀豆,扁豆,豌豆,蚕豆,巢菜,马铃薯
Sepharose	—	相思豆、蓖麻、羊蹄甲、 <i>Modecca digitata</i> 盘状网柄菌、绿脓杆菌
酸处理的 Sepharose	—	菽麻、羊蹄甲、槐、大豆、多花紫藤蛤、槲寄生 I、龙芽花
甲壳素	—	米胚、芝麻、 <i>Bandeiraea simplicifolia</i> II
黑曲菌多糖	—	曼陀罗
固定化的 guaran	—	大豆、蓖麻、 <i>Echinocyttis lobata</i> <i>Bandeiraea simplicifolia</i>
交联的阿拉伯半乳糖	—	蓖麻、大豆、猪屎豆、苦瓜、 <i>Echinocyttis lobata</i>
ECD-Sepharose (环氧活化的 Sepharose)	—	刺桐、电鳗
第二类 与载体结合的糖蛋白和糖肽		
聚亮氨酸	猪血型物质 A + H	双花扁豆、利马豆、槐、番茄、 <i>Evonymus europaeus</i> , 蜗牛 <i>Aaptos papillata</i>
牛血清白蛋白	猪血型物质 A + H	草蓐
Sepharose	猪胃粘蛋白的糖肽	刀豆、大豆、蓖麻、欧洲百脉根、荆豆、大西洋鲑
	人免疫球蛋白	槲寄生 II、III
	人血型物质 A	草蓐
	甲状腺球蛋白	菜豆 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
	卵粘蛋白	米糠、马铃薯
	胎球蛋白	刀豆、豌豆、曼陀罗、大西洋鲑
	牛颌下腺蛋白	大西洋鲑
	人红细胞基质	菜豆 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
	去唾液酸人红细胞糖肽	商陆
	去唾液酸胎球蛋白	鸡胚股肌、牛心、牛肺
	去唾液酸 α -酸性粘蛋白	哺乳动物肝、鸡胚肾
CH-Sepharose	去半乳糖 α -酸性粘蛋白	禽类肝
第三类 与载体结合的单糖和双糖		
Sepharose	N- ϵ -氨基酰- β -L-岩藻糖	欧洲百脉根
	N- ϵ -氨基酰- β -D-半乳糖	大豆
	对-氨基(基)苄基 1-巯基	马铃薯、 <i>Bandeiraea simplicifolia</i>
	N-乙酰葡萄糖胺	
	对-氨基(基)苯基 O-L-岩藻糖	欧洲百脉根
	对-氨基(基)苯基 O-N-乙酰半乳糖胺	大豆、蒙古锦鸡儿
	对-氨基(基)苯基 O-半乳糖	<i>Bandeiraea simplicifolia</i> I
CH-Sepharose	对-氨基(基)苯基巯基半乳糖	哺乳动物肝
	半乳糖胺	大豆
	N- ϵ -氨基酰- β -D-半乳糖胺	长柔毛野豌豆
	3-O-甲基葡萄糖胺	蚕豆
	N-乙酰半乳糖胺	草蓐
	对-氨基(基)苄基 1-硫代-N-乙酰葡萄糖胺	英国栎、白柳、心叶槲、无毛榆
ECD-Sepharose	N-乙酰半乳糖胺	大豆、异型豆
	L-岩藻糖	荆豆、 <i>Sarathamnus Scoparius</i>
二乙烯砒活化的 Sepharose	半乳糖	海红豆
	甘露糖	苦野豌豆
聚丙烯酰胺	烯丙基 2-L-岩藻糖	荆豆 I
	半乳糖	刺芒柄花、木紫芝(木蹄真孔菌)食用小皮伞、 <i>Griffonia Simplicifolia</i> Baill

载 体	配 体	凝 集 素 来 源
氨基基聚丙烯酰胺	葡萄糖	刀豆
	N-乙酰半乳糖胺	草藤、利马豆、大豆、双花扁豆、桑橙。陡头 <i>Sarathamnus scoparius</i>
	乳糖	山羊臭芒柄花、新疆芒柄花
	蜜二糖	<i>Bandeiraea simplicifolia</i> 1
淀粉	乳糖	蓖麻、四稜豆
	麦芽糖	刀豆、扁豆
	L-岩藻糖	电鳗血清
	乳糖	蓖麻
	甘露糖	刀豆
其它	麦芽糖	脂肪细胞膜
甲醛化红细胞	—	刀豆、利马豆、荆豆、刺槐、大西洋鲎 <i>Polysphondylium pallidum</i>
固定化卵巢囊血型物质 A	—	利马豆、金雀花
Ca ⁺⁺ -双(羧甲基氨基琼脂糖 Sepharose)	—	双花扁豆
	伴刀豆凝集素	利马豆、大豆、蜡豆、蒙古锦鸡儿 <i>Bandeiraea simplicifolia</i>

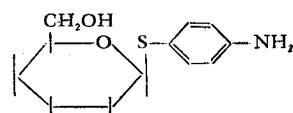
N-乙酰氨基葡萄糖，可纯化对 N-乙酰氨基葡萄糖专一的凝集素，如麦胚凝集素^[8]等。

当没有现成的吸附剂适用于凝集素具有的糖专一性时，可将适当糖基交联到不溶性载体上。交联的糖可以是糖蛋白或糖肽(表 1、第二类)，亦可以是单糖、双糖或合成的糖衍生物(表 1，第三类)。固定化的糖蛋白或糖肽亲和柱不同于交联单糖或双糖的亲和柱，后者只吸附专一识别这种糖的凝集素，前者具有较广的互补糖，因此同一吸附剂可纯化糖专一性不同的凝集素。这类吸附剂被称为“通用亲和吸附剂”，最常用的是胎球蛋白或猪胃血型物质 A + H 或猪胃粘蛋白的糖肽。如胎球蛋白-Sepharose 已用于分离麦胚、刀豆、豌豆、马蹄蟹(即鲎)和其它来源的凝集素^[9]。交联的红细胞^[10,11]和戊二醛处理的红细胞膜^[12]可以看做是固相化的糖蛋白，这类亲和吸附剂可吸附绝大多数凝集素，包括一些用单糖不能抑制其血凝活力的凝集素。后一类情况通常用较低 pH 的溶液洗脱(如 0.1M 乙酸或甘氨酸-HCl 缓冲液，pH2.5)，因此这一系统不适合在此条件变性的凝集素。即使有有效的专一糖抑制剂可用，洗脱亦可能有困难，因为凝集素对红细胞的吸附，除与糖专一结合外，还包含次级的非专一作用(即疏水区

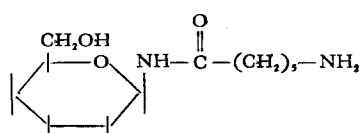
的作用)。



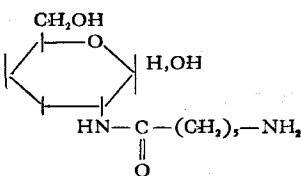
O-糖苷



巯基糖苷



或



N-酰基糖(苷)胺

图 1 用于合成 Sepharose-糖复合物的单糖衍生物

结合载体的单糖或双糖亲和吸附剂中许多是 Sepharose 载体。原则上，通过溴化氰活化的 Sepharose 易与含氨基的糖衍生物交联成 Sepharose-糖复合物，然而自然存在的氨基糖很少，再则单糖或双糖直接偶联到载体的吸附剂，

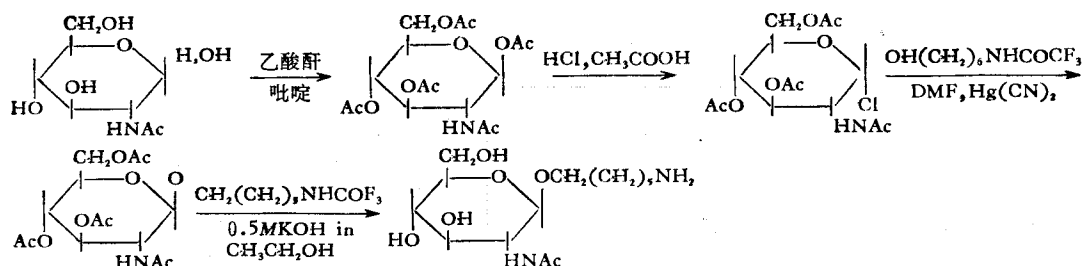


图2 1-(6-氨基己基)-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -葡萄糖吡喃糖的合成

往往使配体不易接近凝集素的结合位置，通常在载体和配体间接一间隔基团，使其隔开，借以减少蛋白质-配体相互作用的位阻。因此制备这类亲和柱的主要问题是合成适合的糖衍生物。为合成这种衍生物和与载体的偶联，已经发展了若干有效的方法。现在常用的衍生物有三类，即 O-糖苷、S-糖苷、N-酰基糖胺(图 1)。它们的制备是比较复杂的，例如用于纯化麦胚凝集素的 1-(6-氨基己基)-2-乙酰胺-2-脱氧- β -

葡萄糖苷的合成过程^[13](图 2)。和用于纯化大豆和花生凝集素的 N-(ϵ -氨基己酰)- β -半乳糖胺的合成过程^[14](图 3)。

以上两例均是配体在固定化于载体以前先与间隔基团偶联。但亦可将间隔基团连结于载体，配体偶联于固定化的间隔物，如含对-氨(基)苄基-1-硫代-N-乙酰葡萄糖胺和对-硝基苯基- β -半乳糖吸附剂的合成。显然，合成这些吸附剂工作量相当大，并且要有一定的有机合成

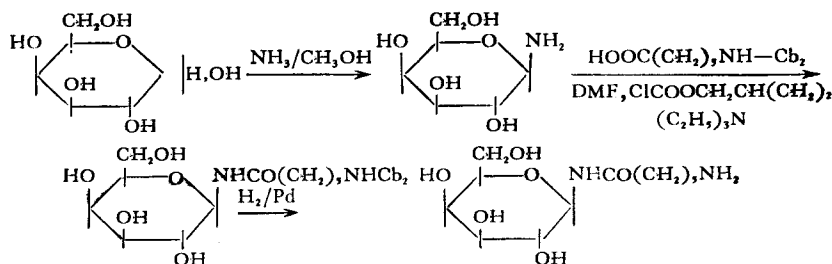


图3 N-(ϵ -氨基己基)- β -半乳糖吡喃糖胺的合成

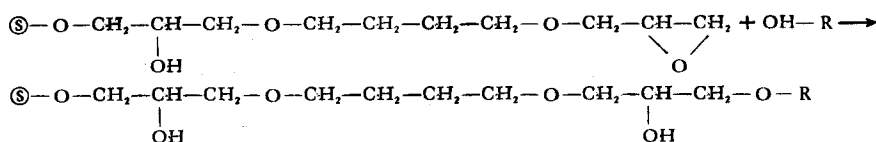


图4 羟基化合物交联于环氧化合物活化的 Sepharose

的经验。自从有了接间隔基团的商品载体后(我国还没有这种商品)，大大地简化了连结糖衍生物的亲和柱的制备。如 CH-Sepharose，是将 6-氨基己酸连接到载体上。用碳化二亚胺交联很容易使氨基接上。含氨基糖的，如氨基半乳糖、氨基葡萄糖和 3-氨基葡萄糖亲和剂，用这种方法制备比较简便。

各种载体各有优缺点。环氧烷活化的 Sepharose 可通过载体与 1,4-双(2,3-环丙氧基)丁烷作用得到，它具有十二个碳原子的间隔基团和一个活化的环氧乙烷基，通过稳定的醚键

与糖的羟基直接交联^[5](图 4)。其缺点是需高 pH(12—13) 和 40℃ 以上才与配体结合，因此限于在碱性条件稳定的糖衍生物。亦可用淀粉为载体，用环氧氯丙烷将单糖或双糖直接交联于载体，如以交联了岩藻糖的淀粉凝胶纯化鳗(eel)血清中对岩藻糖专一的凝集素^[16]，此方法甚为简便，可惜不能用于氨基糖，只适合中性糖。

二乙烯砜交联法中二乙烯砜作为连接于 Sepharose 的间隔基团，也同时是引入的与羟基化合物反应的活性基团^[17](图 5)。

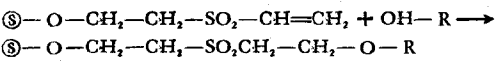


图5 羧基化合物与二乙烯砜活化的 Sepharose 交联

二乙烯基比环氧乙烷活泼，因此二乙烯砜活化的 Sepharose 与配体偶联时的 pH 和温度都比环氧乙烷活化的 Sepharose 低。二乙烯砜交联法是一个非常简便的方法，不幸的是这种偶联在碱性溶液不稳定。

除了经交联基将配体与载体偶联外，亦可用共聚法获得亲和吸附剂，如丙烯酰胺和 N，N-甲叉双丙烯酰胺与链烯 O-糖苷^[18]或 S-糖苷^[19]共聚。选择适当的糖苷和改变共聚成份的量，可引入不同类型、不同长短的间隔基团，并可调节糖的成分和共聚物的孔径，也可以制备具有专一异头构型和环状共聚物。这种吸附剂能抵抗化学的和微生物的降解，其缺点是流速太慢、机械稳定性较低、分子量的外排范围有限、合成烷基糖苷的过程比较复杂。Bio-gel 是一种丙烯酰胺类载体商品，球状，易与乙二胺形成氨基乙基衍生物，通过氨基与糖偶联，不同的糖

偶联速度不同，一般偶联速度很慢，又由于还原糖的环状被破坏，必须用非还原末端为决定性糖的双糖。

理想的载体应是不溶解、适当大小的球颗粒状，耐化学试剂和生化试剂、无吸附性，并容易制备衍生物。偶联方法应该简单、无损伤，能用有效的配体，并与载体形成稳定连接。但事实上没有一个方法能完全满足上述要求。

许多凝集素可用多种不同的方法纯化，如大豆，伴刀豆、花生、麦胚等凝集素。以麦胚凝集素和花生凝集素为例。除甲壳多糖和卵粘蛋白-Sepharose 是纯化麦胚凝集素常用的亲和吸附剂外，还有多种配体(如猪胃粘蛋白的糖肽、葡萄糖胺等)和多种载体(如 CH-Sepharose、Ultrogel A₄ 等)可用(表 2)。花生凝集素除用去唾液酸胎球蛋白-Sepharose、ε-氨基乙酰-β-半乳糖胺-Sepharose 纯化外，亦可用其它吸附剂如交联于乳糖的淀粉凝胶、酸处理的 Sepharose 等纯化(表 3)。

亲和层析纯化膜凝集素依据的原理和采用

表 2 用于纯化麦胚凝集素的亲和层析法

载 体	配 体	交 联 方 法
甲壳素 硅藻土 Sepharose	卵粘蛋白 卵粘蛋白 猪胃粘蛋白的糖肽 6-氨基己基-O-N-乙酰葡 萄糖胺	溴化氰活化 溴化氰活化 溴化氰活化 溴化氰活化
CH-Sepharose ECD-Sepharose	葡萄糖胺 N-乙酰葡萄糖胺 天冬酰-N-乙酰葡萄糖胺	碳化二亚胺交联 在高 pH 直接交联 经琥珀酰碳化二亚胺交联
氨基基聚丙烯酰胺 ultrogel A ₄ 丙烯酰胺与丙烯酸活化酯共聚 甲醛化红细胞	甲壳二糖 对-氨基苄基1-硫代-N-乙酰葡萄糖胺 6-氨基己基-N-乙酰葡萄糖胺	氰基氢化硼还原 经琥珀酰碳化二亚胺交联 共聚

的方法与水溶性凝集素基本相同。某些膜凝集素的蛋白质有一段疏水区镶嵌在膜的双脂层中，必需用去垢剂才能使之溶解。极性去垢剂往往使凝集素变性，失去活力，因此一般采用非极性去垢剂，如 Triton X-100、NP-40、Brij 等等。分离纯化的全过程必须保持溶液中有一定浓度的去垢剂，不然凝集素将聚合沉出，因此亲

和柱要用含相同浓度去垢剂的溶液作预平衡。

哺乳动物肝细胞膜上对半乳糖专一的凝集素的纯化方法^[20,21]：新鲜的或 -20℃ 保存的肝组织，剪碎，冷却，于 -20℃ 制成丙酮粉；丙酮粉先经含 NaCl 的 Tris-HCl 或醋酸钠缓冲液洗涤，然后用含有 1—2% TritonX-100 及 KCl 的 Tris-HCl 缓冲液提取凝集素；提取液吸附于去

