

子量的方法,其特点是快速,微量。一次测定的时间仅需半小时左右,柱效可达到每米近 5,000 块理论板;当配有合适的检测器时,其检测灵敏度高于普通的电泳显色,可测出约 10^{-11} 克分子浓度的蛋白。作为一种色谱方法,其分离和测定是同时进行的,因此就可以对一混合样品中的数种成份同时进行测定,从而得到各种成份相对含量。必要时,还可对各个成分分别加以收集,进行小量制备,供进一步的研究。

Imamura 等曾报告在变性剂 (SDS) 存在下用高效凝胶柱测定蛋白质分子量的方法^[7], Takagi^[8] 将这种方法与 SDS 电泳法进行了比较。我们采用的色谱条件是希望保持蛋白质的自然状态,因为目前对自然状态下的蛋白质分子量尚缺乏简便易行的测定方法,而蛋白质的自然状态经常是表现其生物活性的必要条件。

球形蛋白质分子,进入一定孔隙填料的程度取决于这些分子的水化半径。如果是不对称的蛋白分子,则应考虑由于所谓“末端插入”效应 (“end-on insertion”) 而使测出的分子量数值偏低^[9]。另外,由于目前填料发展水平所限,虽然

采用了有一定离子强度的移动相,但对某些蛋白样品来说,仍可能存在着填料对样品的排斥或吸附。例如图 2 中乳酸脱氢酶就与其它蛋白样品的色谱行为有较大的差别,从而造成一定的误差。

总之,这种方法不仅具有微量,快速,能对混合物进行分析、简便易行等优点,又能在各种蛋白质分离提取过程中,作为可对大量的产品和中间产物进行分子量估测的方法,以及直接作为小量制备的手段。

参 考 文 献

- [1] Porath, J. et al.: *Nature*, **183**, 1657, 1959.
- [2] Whitaker, J. R.: *Anal. Chem.*, **35**, 1950, 1963.
- [3] 姚志建:《生物化学与生物物理进展》, 4, 54, 1983.
- [4] Hearn, T. W. et al.: *Amer. Lab.*, **14** (10), 18, 1982.
- [5] Kato, Y. et al.: *J. Chromatogr.*, **190**, 297, 1980.
- [6] 李晋萍:《硕士学位论文》, 1983.
- [7] Imamura, T. et al.: *J. Liquid Chromatogr.*, **4**, 613, 1981.
- [8] Takagi, T.: *J. Chromatogr.*, **219**, 123, 1981.
- [9] Meredith, S. C. et al.: *Anal. Biochem.*, **121**, 234, 1982.

[本文于 1983 年 6 月 24 日收到]

Con. A-Sepharose 亲和吸附剂的制备 及其纯化某些蛋白质的性能

赵永芳 祝兵*

(武汉大学生物系)

伴刀豆球蛋白 A (Con. A) 与溴化氰活化的琼脂糖 (Sepharose) 偶联制成的 Con. A-Sepharose 亲和吸附剂具有纯化某些糖蛋白一类物质的性能。因此,人血清中的胰蛋白酶抑制剂,碱性磷酸酯酶,小牛脾磷酸二酯酶,不同变种的甲胎球蛋白和某些激素如绒毛膜促性腺激素 (HCG), 促黄体激素 (LH) 等物质都可用它纯化^[1-2]。此法操作简单、样品回收率较高,故它已成为纯化上述一类物质的有效工具。

我们参考 Steven^[3] 的方法,用自己制备的

Con. A^[8] 与溴化氰活化的 Sepharose 偶联制成的 Con. A-Sepharose 亲和吸附剂性能较好,经过十三次重复使用,活力未见明显下降。将其置冰箱存放七月余仍有相当活力。用它纯化小牛脾磷酸二酯酶粗提取液,纯化倍数达 55,回收率达 50%,用它分离人血清中的糖蛋白效果良好。本文就这方面的研究进行概述。

* 本校 78 届学生。

材 料 和 方 法

材料

Sephrose 4B, α -甲基吡喃甘露糖苷和溴化氰由国外进口, 人血清丙种球蛋白由武汉生物制品所生产, Con. A 自制。

方法

1. Con. A-Sephrose 亲和吸附剂的制备

Con. A 溶液配制: 1 M NaCl 溶液 30 毫升, 内含 308 毫克 Con. A (按 $E_{280}^{1\%} = 12.0 A$ 计算)。在偶联之前加入 220 毫克 NaHCO_3 粉末。

活化 Sepharose: 取 44 毫升 Sepharose 4B 悬浮液, 用 200 毫升蒸馏水洗涤后, 在布氏漏斗中抽干得沉淀胶。接着取其 20 克倾入盛 20 毫升蒸馏水烧杯中, 放在通风橱的磁力搅拌器上, 在搅拌中加入 2 M Na_2CO_3 溶液 20 毫升。一分钟后, 立即加入溴化氰晶体 0.94 克 (用 1.5 毫升二甲基甲酰胺溶解)。pH 要始终维持在 11 左右, 25°C 反应 7 分钟后放入冰浴中。随后迅速将活化的 Sepharose 倒入布氏漏斗上抽滤, 并用 300 毫升冷蒸馏水和 300 毫升冷的 0.07 M NaHCO_3 (pH 7.5) 溶液分别洗涤。

偶联: 把已活化的 Sepharose 4B 沉积胶加入 30 毫升 Con. A 溶液 (pH 7.5) 中, 置冰箱中用磁力搅拌器间歇搅拌 20 小时后, 加入已调至 pH 9 的乙醇胺溶液 1.0 毫升, 反应 15 分钟, 偶联结束。生成的 Con. A-Sephrose 亲和吸附剂先后用 200 毫升 0.07 M NaHCO_3 -0.5 M NaCl 溶液, 200 毫升 0.1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -0.5 M NaCl 溶液 (pH 8.5) 和 200 毫升 0.5 M NaCl 溶液进行洗涤抽滤。最后将其放入含 0.02% 叠氮化钠的 40 毫升 0.5 M NaCl 溶液中或中性缓冲液中, 保存在冰箱中备用。

2. 脾磷酸二酯酶粗抽提液的制备 取新鲜牛脾脏, 先按 Hilmae^[6] 的方法制备脾磷酸二酯酶丙酮粉。尔后取存放于冰箱的丙酮粉 10 克倾入 50 毫升匀浆器中用 140 毫升 0.2 M 醋酸缓冲液 (pH 6.0) 充分抽提。接着将抽提液置入冰浴中的烧杯内, 用磁力搅拌器搅拌 10 分钟,

加入 1% 吐温 80 1.5 毫升, 离心 (9000 rpm) 15 分钟 (0°C), 上清液放入冰盒内备用。磷酸二酯酶的活力测定是参照原北京大学制药厂编^[7] 方法进行。

3. 糖的定性测定是用 α -萘酚法进行。

4. 蛋白质的测定: Con. A 含量按 Miller 的方法在 280 nm 用 $E_{280}^{1\%} = 12.0 A$ 计算, 酶蛋白含量是用分光光度法, 在 280 nm 测消光读数, 以牛血清白蛋白为标准。

结 果

一、偶联于 Sepharose 4B 中 Con. A 量的测定

(1) 计算法: 根据 Con. A 加入活化的 Sepharose 中的量和偶联后剩余的量之差, 可得知每克湿 Sepharose 能偶联 Con. A 9 毫克。即偶联于每克 Sepharose 的 Con. A

$$\begin{aligned}\text{Con. A 量一偶联后上清液及洗出} \\ \text{量(毫克)} &= \frac{\text{液中蛋白质量}}{\text{湿胶量(克)}} \\ &= \frac{308 - 128}{20} = 9(\text{毫克})\end{aligned}$$

(2) 测定法: 在层析柱 (9×200 mm) 中装入 Con. A-Sephrose 10.2 克 (湿重), 经 0.05 M Tris-HCl-0.2 M NaCl-1 mM MgCl_2 、1 mM CaCl_2 、1 mM MnCl_2 溶液 (pH 7.5) 平衡后, 加入丙种球蛋白 5 毫升 (4 mg/ml W/V 用上述溶液配制), 流速 15 毫升/小时, 待样品全部加完后, 静止反应 1—3 小时, 随之用平衡液洗涤至流出液 $A_{280} < 0.05$ 时, 改用含有 0.1 M α -甲基吡喃甘露糖苷的平衡液洗脱, 每管收集 3 毫升。以 280 nm 消光读数为纵坐标, 以分级的管数为横坐标, 绘制洗脱曲线如图 1 虚线所示。其洗脱峰值为 0.152。以同样方法将不同量 (10、20、40 和 60 毫升) 的丙种球蛋白溶液分别加入经过再生平衡的柱上, 重复上述操作, 可得到图 1 实线所示洗脱曲线。

以上样量为横坐标, 以相应峰值为纵坐标绘制出图 2 曲线。从图看出, 在一定范围内峰值的增加是随着上样量的增加而增加, 二者呈

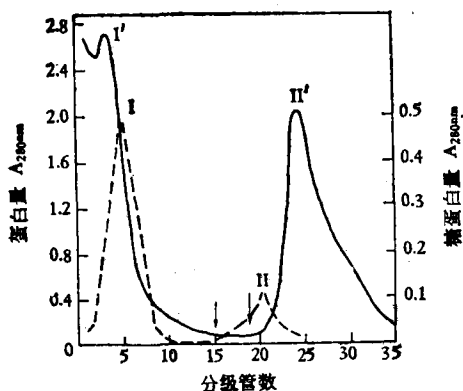


图1 两种球蛋白在 Con. A-Sepharose 层析柱中的分离图谱

柱体积: 0.9×14 cm; -----: 上样量为 5 毫升;
——: 上样量为 20 毫升; 峰 I、I': 蛋白量; 峰 II、II': 糖蛋白量; ↓: 糖苷洗脱开始

线性关系。但是当上样量增加到 240 毫克时, 峰值与上样量之间就不呈线性关系。这表明 Con. A-Sepharose 柱的 Con. A 与两种球蛋白的结合基本饱和。把此峰面积中的全部溶液合并, 测得两种球蛋白量为 29.7 毫克。根据 Con. A 与糖蛋白是以等分子形式结合的原理, 按下式即可计算每克湿胶中的 Con. A 量。

偶联 Con. A 毫克量/克湿胶

$$= \frac{\text{从湿胶中洗出的两种球蛋白量}}{\text{两种球蛋白的分子量} \times \text{湿胶量}} \times \text{Con. A 分子量}^{1)}$$

$$= \frac{29.7 \times 110000}{155000 \times 10.2} = 2.07$$

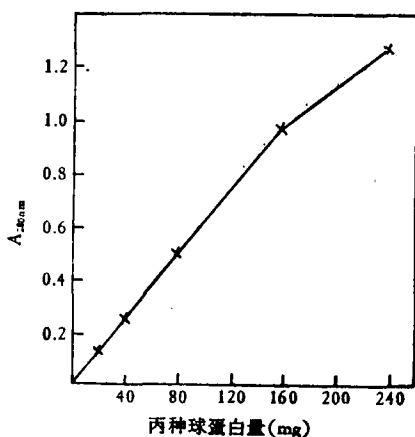


图2 两种球蛋白上样量与峰值 (A_{280}) 的关系

二、Con. A-Sepharose 层析柱的再生:

使用过的层析柱先用 2 M NaCl 溶液 40—60 毫升洗涤至流出液用 α -萘酚法检不出红色环为止, 再用蒸馏水 10—20 毫升洗涤, 最后用平衡液 40 毫升平衡, 即可重复使用。

三、Con. A-Sepharose 层析柱的稳定性

此层析柱在 10°C 以下, 连续使用十三次 (约 26 天), 活力未见下降。将该吸附剂洗涤再生后贮存在冰箱 220 天, 活力下降不明显, 详情见表 1。

表1 Con. A-Sepharose 吸附剂的稳定性

连续使用次数*	累计天数	峰值 (A_{280})	上样量 (4mg 丙种球蛋白/ml)
1	1	0.231	5 ml
2	3	0.238	5 ml
3	5	0.25	5 ml
6	9	0.358	10 ml
7	11	0.621	20 ml
8	12	1.13	40 ml
9	15	1.305	60 ml
10	20	0.43	10 ml
12	24	0.385	10 ml
13	26	0.395	10 ml
14**	220	0.248	6 ml

* 其中第 4、5 和 11 次用于分离糖和脾磷酸二酯酶试验, 故未列入

** 第 14 次系水箱贮藏后的应用情况

四、用 Con. A-Sepharose 层析柱分离脾磷酸二酯酶

用 0.2M 醋酸缓冲液 (内含 1M NaCl、1mM MnCl_2 、1mM MgCl_2 、1mM CaCl_2 和 0.01% 吐温₈₀, pH 6.0), 平衡的 Con. A-Sepharose 柱上加入 50 毫升脾磷酸二酯酶粗抽提液, 分五次加完 (每两次的间隔时间 1 小时)。加样后柱子先用 35 毫升上述平衡液洗涤, 尔后用含 0—0.4 M α -甲基吡喃甘露糖苷的上述平衡液进行梯度洗脱, 洗脱曲线如图 3, 总回收率达 50%。合并较高活力的各管收集液, 计算纯化倍数为 55。

五、用 Con. A-Sepharose 层析柱分离人血清中的糖蛋白

取 3 毫升正常人血清, 先对生理盐水透析

1) 根据文献 [8] 和 [10] 报道的分子量。

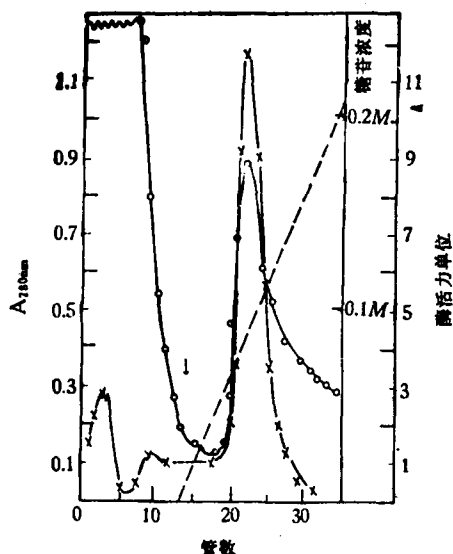


图3 Con. A-Sepharose 层析柱分离脾磷酸二酯酶图谱

柱体积: 0.9×14 cm 流速: 15 ml/小时. 3 ml/管
○—○: 蛋白; ×—×: 酶活力; ↓: 梯度洗脱开始

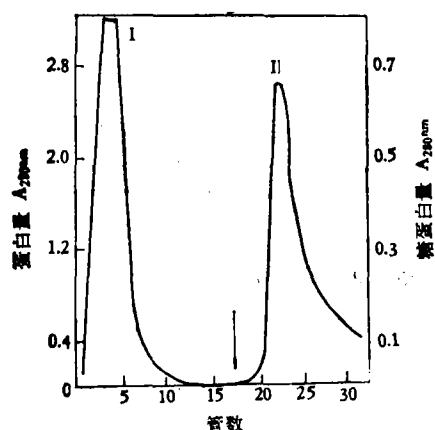


图4 Con. A-Sepharose 层析柱分离人血清图谱

层析条件同图1, 峰I为蛋白量, 峰II为糖蛋白量,
↓表示加入 α -甲基吡喃甘露糖苷洗脱

三次, 再对平衡液透析一次, 尔后离心 (3000 rpm) 10 分钟。将血清上清液加在平衡好的 Con. A-Sepharose 柱上, 用前面叙述的洗涤、洗脱液处理后, 其中的糖蛋白能被较好地分离出来 (图4)。

讨 论

一、从 Con. A-Sepharose 柱的使用结果看, 这种亲和吸附剂的稳定性较好。但是欲达此目的, 在制备过程中应注意以下几点:

(1) 用溴化氰活化 Sepharose 4B 时, pH 应始终稳定在 11 左右。当溴化氰活化 Sepharose 时会不断地释放出 H^+ , 致使 pH 下降, 从而影响了 Sepharose 的活化度。为此 Lloyd^[4] 是用 NaOH 溶液调节 pH, 但因手工操作难以控制 pH, 所以降低了配体偶联数量。本文采用 Steven 的方法, pH 能稳定在 11 左右。

(2) 掌握好活化时间。活化后的 Sepharose 半衰期只有十几分钟, 故活化时间一般宜控制在 8—10 分钟。活化后立即转入冰浴中, 并以适当的体积迅速洗涤, 防止活化度降低。

(3) 加溴化氰量要适中, 溴化氰的量对 Sepharose 的活化度有直接的影响。在一定范围内, 活化度是随着溴化氰量的增加而增加的。但是活化度太高, 反而会降低配体的偶联量。

二、用上述方法, 不但制成的 Con. A-Sepharose 亲和吸附剂能满意地把与 Con. A 亲和力不同的两种球蛋白, 血清中的糖蛋白以及脾脏中的脾磷酸二酯酶得以分离, 而且制成的 γ -球蛋白-Sepharose 亲和吸附剂也能满意地分离病人唾液特有的一种蛋白。后一亲和吸附剂重复使用 6 次, 仍保持一定的活力*。这表示本文叙述的方法, 对于抗原或抗体与 Sepharose 偶联也是适用的。

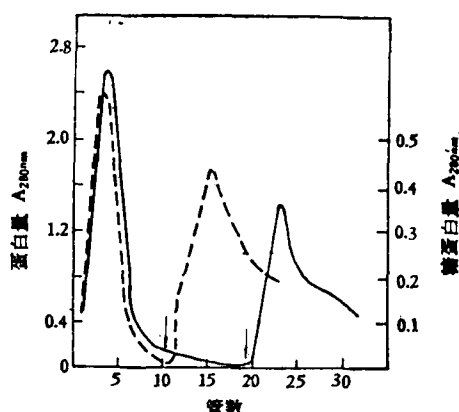


图5 相同量的两种球蛋白在 Con. A-Sepharose 层析柱中静止时间不同的分离曲线比较图

层析条件同图1, 上样量 10 毫升 -----: 反应 1 小时, —: 反应 3 小时

* 此数据由武汉市第一医院皮肤科研究室 胡长发同志提供。

为了提高吸附剂对欲分离物的吸附量,一般采用上样时流速慢或通过一定体积(约柱体积的1/3—2/3)样品液后静止一段时间,使吸附剂和欲分离物进行充分的反应,再行洗脱。

三、Con. A-Sepharose 亲和吸附剂上配体量的测定方法不少,本文采用计算法和测量法^[3],其结果有一定差异,这可能是由以下原因造成的:①测定时丙种球蛋白还未完全饱和(见图2)。丙种球蛋白溶解度低,当上样量相同(浓度一定)时,随着体积加大反应时间的延长,使亲和吸附剂在充分吸附丙种球蛋白的同时,增加了对非特异蛋白的吸附,从而使洗脱时间拖长,特异吸附物的洗脱量降低(见图5)因此,用测定法求出配体量低于计算法。③配体 Con. A 来源和位阻效应的影响,Con. A 的活力与刀豆

的品种及新鲜程度有密切关系(见图6)。

四、虽然 Con. A 与某些含有甘露糖、葡萄糖或果糖的糖蛋白能特异地结合,但是,由于糖蛋白中单糖的组份、含量和位置的差异,致使 Con. A 与其结合的亲和力也产生差异(见图1)

此外层析柱的再生方法,直接影响吸附剂的稳定性。有人^[4]用1M NaCl 进行再生,结果活性丧失1/3;有人^[5]用逐渐降低盐和糖苷的浓度进行再生,结果操作麻烦,成本昂贵。本文叙述的再生方法,不但稳定性和重复性都好,而且简便、廉价、活性几乎不受影响。

参 考 文 献

- [1] Banard, B. et al.: *Biochem. J.*, **183**, 213, 1979.
- [2] Latner, A. L. et al.: *Anal. Biochem.*, **101**, 483, 1980.
- [3] Steven, C. M.: *Anal. Biochem.*, **60**, 149, 1974.
- [4] Lloyd, E. O.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **137**, 460, 1970.
- [5] Surolia, et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **404**, 83, 1975.
- [6] Hilmae, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 2117, 1960.
- [7] 北京大学制药厂编:《微生物学和酶学基本知识》p 213, 1971.
- [8] 赵永芳等:《生物学简讯》武汉大学生物系编, **2**, 15, 1982.
- [9] Klene, R. et al.: *Mol. Immunol*, **16**, 421, 1979.
- [10] Klene, R. et al.: *Amino-acids peptides and proteins*, **8**, 167, 1976.

[本文于1983年3月29日收到]

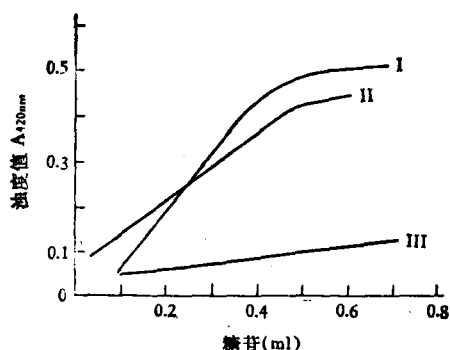


图6 不同类型刀豆的 Con. A 活力比较曲线
I、新鲜白刀豆 II、新鲜红刀豆 III、陈旧的红刀豆

一种简化的人血浆徐缓激肽放射免疫测定法

彭启明 李家芬 刘素媛

(中国医科大学, 沈阳)

徐缓激肽 (Bradykinin, 简称 BK) 是一种具有很强生物活性的九肽, 它是由血浆激肽释放酶作用于激肽元(属于 α_2 -球蛋白)使之水解而释放的。实验证明, BK 参与许多重要的生理及病理过程。它可使回肠、子宫及支气管平滑肌收缩, 使十二指肠舒张; 具有很强的扩血管作用, 与血管紧张素共同调节微循环。它还与

凝血因子有关, 特别值得提出的是它作为炎症的介质参与许多病理过程。研究 BK 的这些作用, 对于深入了解中毒性休克、冠心病、高血压以及肺、肾等器官病变, 将有重要意义。通常血中有两种很强的酶(生成 BK 和破坏 BK 的酶), 所以 BK 的代谢极快, 半衰期仅为 16 秒, 因而使血中 BK 的测定十分困难, 国外曾采用多种