

经验交流

一种安全制备活化琼脂糖树脂的方法*

伍学勤¹⁾ 吴 岑²⁾ 凌晓红¹⁾ 陈建文¹⁾ 赫荣乔^{2)**}⁽¹⁾ 中关村医院内分泌科, 北京 100080; ⁽²⁾ 中国科学院生物物理研究所, 中国科学院视觉信息加工重点实验室, 北京 100101)

摘要 溴化氰是常用载体(树脂)活化剂, 但其毒性很强, 具有挥发性, 活化后树脂带较强的电荷而导致非特异性吸附。羰基二咪唑(1, 1'-carboxyl diimidazole, CDI)近年来被用于树脂的活化, 具有毒性低、相对安全、方便、活化效率高、活化后树脂所带电荷相对较少等优点。由于国内同行很少采用 CDI 活化树脂制备亲和层析柱或固定化酶, 在此介绍该方法的一些关键步骤供同行参考。

关键词 亲和层析, 固定化酶, 羰基二咪唑, 溴化氰, 3-磷酸甘油醛脱氢酶, 蚯蚓蛋白酶

学科分类号 Q814

亲和层析和固定化酶方法是分子生物学及生物工程中的常用技术, 载体活化与偶联是其中的关键环节。自 Axen 等(1967 年)^[1] 使用溴化氰作为亲和层析载体活化剂(matrix activated agent)以来, 溴化氰便成为应用最广泛的载体活化剂。溴化氰活化载体与配基(ligand)或酶的氨基结合, 形成稳定的共价偶联^[2]。但是, 溴化氰是剧毒试剂, 并具有挥发性, 在使用时, 需要十分仔细。从试剂的称量到偶联后树脂的洗涤都不能出现差错。另外, 溴化氰活化载体后形成的氰氧基容易水解, 而影响偶联效率; 活化后的树脂带有较强的电荷, 导致非特异性吸附等^[3]。最早使用羰基二咪唑(1, 1'-carboxyl diimidazole, CDI)作为活化剂的是 Mallia 等^[4], 但由于在活化过程中将 CDI 溶于丙酮, 该有机溶剂的挥发性很强, 使其活化效率受到一定程度的影响。目前, CDI 作为一种相对安全的载体活化剂已经被同行认可^[5,6]; 其活化与偶联效率较高、操作简便、偶联反应容易控制。在此, 我们介绍 CDI 活化琼脂糖凝胶(Sephacryl CL 6B)的方法及其影响偶联效率的关键点。

1 材料与方法

1.1 材料

羰基二咪唑、溴化氰、山梨醇、Tris、curcumin、间氨基苯硼酸(APB)以及天门冬酰胺购于 Sigma 公司; Sephacryl CL 6B 购于 Pharmacia 公司; 糖基化亲和层析微柱购于 Seiagaku 公司(Tokyo); 无水二氧六环(一级)购于北京化工

厂; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 溴化氰活化及配基偶联

根据 Axen 等^[1,2]以及 Wilchek 等^[7]建立的方法进行操作。

1.3 羰基二咪唑活化及糖基化蛋白亲和配基的偶联

1.3.1 配制二氧六环梯度(dioxane)溶液: 二氧六环: 水(体积比) = 1: 4 (A), 1: 1 (B) 以及 4: 1 (C)。

1.3.2 活化: 取湿重 5.0 g 的 Sephacryl CL 6B, 用 100 ml 无离子水洗涤。在布氏漏斗中将树脂逐渐由水相通过二氧六环梯度溶液(A、B、C, 各 20 ml)转移到无水二氧六环中(不可在溶液置换时, 将树脂抽干, 否则将影响活化效果)。将树脂悬浮在 8 ml 无水二氧六环中, 加入 0.2 g CDI, 25℃震荡 15 min。

1.3.3 洗涤: 用 10 ml 无水二氧六环反复抽滤洗涤三次, 按活化的相反顺序, 将活化后的树脂分别用 C、B、A 溶液(各 20 ml)置换到 0.2 mol/L NaHCO₃-0.015 mol/L NaCl (pH 10.0) 水相中(如果暂时不偶联, 则可将其抽干, 4℃保存)备用。

1.3.4 配基偶联: 按 100 ml 活化树脂加入 1.0 g 间氨基苯硼酸的比例偶联(4℃, 摇床 30~40 r/min, 12 h; 不用磁力搅拌)。偶联缓冲液为: 0.2 mol/L NaHCO₃-0.015 mol/L NaCl (pH 10)。偶联后按下列

* 北京市海淀区科委基金项目(A06-1999-026)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2001-08-24, 接受日期: 2001-10-18

液体 (各用五倍体积) 顺序通过抽滤进行洗涤: 无离子水、1 mol/L NaCl、无离子水、0.1 mol/L HCl、无离子水、最后再置换到上述缓冲液中 (树脂: 缓冲液= 1: 2, 体积比)。

1.3.5 偶联后处理: 五倍体积无离子水反复洗涤 2~ 4 次, 置于 0.001 mol/L HCl 中 4℃ 保存备用。

1.3.6 偶联效率的测定: 用 0.1% 姜黄试剂测定含硼量, 分析 APB 偶联到树脂上的效率, 具体操作见参考文献 [8]。

1.4 糖基化血红蛋白的亲层析

取 0.1 ml 新鲜静脉血 (EDTA 或 heparin 抗凝), 1% Triton X-100 溶解红细胞, 在 0.25 ml APB-Sepharose CL-6B 亲和层析柱中进行分离分析。糖基化血红蛋白的分离、分析以及溶液配制见参考文献 [9]。

1.5 糖基化 3-磷酸甘油醛脱氢酶的分离

兔肌 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 的分离纯化以及糖基化 GAPDH 的亲层析分离、分析以

及活力测定见参考文献 [9, 10]。

1.6 蚯蚓蛋白水解酶的固定化

根据 Zhou 等^[11]使用的方法分离纯化蚯蚓蛋白水解酶 (EFE-III 1), 固定化酶的操作过程见参考文献 [6]。

2 结果与讨论

CDI 为白色粉末状试剂, 由于直接接触会刺激皮肤, 可将其制备为 0.2 g/ml 储液 (-20℃)。由于树脂的活化, 在无水二氧六环中进行, CDI 被水解破坏较少。由表 1 可见, 用姜黄法^[8]测定间氨基苯硼酸的偶联率, CDI 的活化效率明显相对较高, 仅仅用 0.05 g/ml (树脂) 即可达到 10% 溴化氰活化的效果。对照实验表明, 如果减少溴化氰的量, 将达不到相应的偶联效率。溴化氰活化效率较低的原因, 可能是由于其活化在水溶液中进行, 部分溴化氰被水解所致 (表 1)。

Table 1 Comparison of CDI with CNBr in activation of Sepharose CL 6B

Activated agent	CDI	Cyanate bromoamide ^[1,2]
Using per 100 ml resin ^[8]	5 g	10 g
Toxicity and volatility	Less than CNBr; do not touch and inhale when exposed	Hazard! Never touch and inhale as carefully using in fume hood
Stock solution	20% in dioxane	20% in DMSO
Activating solvent	absolute dioxane	water
Amount of washing water after activated (in the volume of resin)	~ 10	~ 50
Unspecific absorption (%) ¹⁾	4~ 8	12~ 18

¹⁾ Percentage of gHb to total Hb with APB-column.

另外, CDI 活化操作过程相对安全, 可以在实验台上进行 (如果暂时没有通风厨); 而溴化氰的活化则绝对不能在通风厨外的实验台上进行, 而且即便在通风厨内进行, 也要十分小心, 并且需要进行一系列防护措施, 以防意外事件的发生^[12, 13]。

与 Bio-Rad 生产的糖基化血红蛋白离子交换柱的结果相比较, CDI 活化的 Sepharose CL 6B 亲和层析柱的分析 gHb 效果与其基本相同。但是溴化氰活化的亲和层析柱, 分析的数值误差相对偏高。其原因是由于溴化氰的活化将使树脂所带的电荷增加, 导致分析中的非特异性吸附增加 (表 2)。

采用 APB-Sepharose CL-6B, 我们从经硫酸铵

沉淀法纯化的兔肌 GAPDH 中分离出了糖基化 gGAPDH^[11, 14], CDI 与溴化氰活化制备的亲和层析结果表明, 溴化氰活化的亲和层析柱的非特异性吸附较对照高出约 18% 左右。另外, EFE-III 1 的固定化实验表明, 溴化氰活化固定的蛋白酶活力较 CDI 低了 10% 左右。造成这一结果的原因可能是溴化氰活化引入的强离子基团影响了 EFE-III 1 的空间结构所致。以上结果表明, CDI 活化琼脂糖不但具有安全操作简单的优点, 同时活化与偶联效率也较高, 因此, 在制备亲和层析柱或固定化酶时, CDI 应该考虑作为活化树脂的选择试剂。

Table 2 Comparison of CDI with CNBr in activation of Sepharose CL 6B to analysis of glycated hemoglobin and glycated GAPDH

Methods	Control ¹⁾	CDI	CNBr
APB (g) per 100ml resin, for column of gHb*	—	1	3
gHb criteria from 100 normal cases/ %	5.4 ± 0.7	5.3 ± 0.8	5.0 ± 1.8
Rabbit muscle glycated GAPDH/ %	—	8~ 12	12~ 16
Total activity of GAPDH in blood/ (U·ml ⁻¹)	~ 4930	~ 4930	~ 4930
Relative activity of gGAPDH in blood/ %	54 ± 9.2	55 ± 8.4	65 ± 14.5
Activity of native EFE/ U ²⁾	—	45	45
Activity of immobilized EFE/ U	—	29	20

¹⁾ Micro column came from Seigaku Corporation. ²⁾ One unit either EFE- III 1 or GAPDH is defined as the specific activity required to convert 1 μmol substrate per minute with 1 mg enzyme.

尽管 CDI 用于活化琼脂糖凝胶具有一系列的优点, 但是在操作中亦应该注意以下事项以获得活化的高成功率: a. 在称量 CDI 时不要深呼吸, 不要直接接触试剂; b. 在活化时注意二氧六环是否是无水, 如果含有水份, CDI 将被水解, 导致活化效率降低; c. 在洗涤和溶液置换过程中树脂不能被抽干; d. CDI 一定要保存在低温干燥环境中, 防止其水解; e. 树脂活化后, 从无水二氧六环中置换到水溶液中时, 不要过于忙乱, 尽管在置换过程部分活化后的咪唑基团会被水解下来, 但是水解的速度远比游离 CDI 慢; f. 务必将游离的 CDI 洗干净; g. 虽然偶联可以在室温下进行, 但是最好在低温下操作 (可以适当延长时间); h. 偶联后的树脂一定要把残留的配基清洗干净并置于 4℃, 不可将其放在 0℃ 以下保存。

另外, 环氧类试剂 (epoxy-activated agarose, EAA) 也是较为安全的活化剂。但是, 该活化剂同样导致树脂获得较强电荷基团, 非特异性吸附十分明显, 空间位阻也较为明显, 偶联率较低^[4]。同时, 由于环氧剂的氧化性很强, 在固定化酶的制备中, 还原氨基酸的侧链基团将受到破坏, 因此在使用该活化剂时应该考虑这一因素。由于还原性氨基酸被活化剂反应而被破坏, 其应用范围将受到一定的限制。近年来, 某些新的固定化酶技术也开展起来, 如磁性固定化^[15]、膜固定化^[16]等, 但是这些技术有待于进一步完善和发展。

参 考 文 献

- Axen R, Proth J, Ernback S. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*, 1967, **214** (5059): 1302~ 1304
- Proth J, Axen R, Ernback S. Chemical coupling of proteins to agarose. *Nature*, 1967, **215** (5180): 1491~ 1492
- Bethell G S, Ayers J S, Hancock W S, *et al.* Structure heterogeneity of human hemoglobin a due to nonenzymatic glycosylation. *J Biol Chem*, 1979, **254** (10): 3892~ 3898
- Mallia A K, Hernanson G T, Krohn R I, *et al.* Preparation and use of a boronic acid affinity support for separation and quantitation of glycosylated hemoglobins. *Anal Lett*, 1981, **14** (B8): 649~ 661
- Kuhn N. Activation of molecular oxygen by hemin complexes. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 1982, **18** (4): 489~ 98
- Qian F, Wu C, Li L, *et al.* Some features of intestinal absorption of intact fibrinolytic enzyme III 1 from *Lumbricus rubellus*. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1526** (2): 286~ 292
- Wilchek M, Miron T, Kohn J. Affinity chromatography. *Meths Enzym*, 1984, **104** (c): 3~ 55
- Mair J W Jr, Day H G. Curcumin method for spectrophotometric determination of boron extracted from radiofrequency ashed animal tissues using 2-ethyl-1, 3-hexanediol. *Anal Chem*, 1972, **44** (12): 2015~ 2017
- He R Q, Zheng X, Liu W, *et al.* Isolation of glycated and non-glycated D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and detection of glycation. *Acta Biophys Sin*, 1996, **12** (1): 15~ 20
- He R Q, Yang M D, Zheng X, *et al.* Isolation and some properties of glycated D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. *Biochem J*, 1995, **309** (Pt1): 133~ 139
- Zhou J, Wu C, He R Q. Characterization of activity and conformation of earthworm fibrinolytic enzyme III 1. *J Biochem Mol Biol Biophys*, 1998, **2** (5): 195~ 199
- 宋 扬. 改良与修饰壳聚糖固定化抑肽酶研究. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (1): 82~ 85
- Song Y. *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (1): 82~ 85
- 辛嘉英. *Candida rugosa* 脂肪酶同功酶的分离及选择固定化. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (5): 513~ 515
- Xin J Y. *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (5): 513~ 515
- He R Q, Li Y G, Wu X Q, *et al.* Inactivation and conformation changes of the glycated and non-glycated GAPDH during guanidine-HCl denaturation. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1253** (1): 47~ 56
- 丁丽俐. 氨基末端磁性载体固定化中性蛋白酶的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (5): 691~ 694
- Ding L L. *Prog Biochem Biophys*, 2000, **28** (5): 691~ 694
- 郭永胜. 醋酸纤维素固定化酯化酶膜的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (5): 748~ 751
- Guo Y S. *Prog Biochem Biophys*, 2000, **28** (5): 748~ 751

A Safe Method for Activating Resin for Affinity Chromatography*

WU Xue-Qin¹⁾, WU Cen²⁾, LING Xiao-Hong¹⁾, CHEN Jian-Wen¹⁾, HE Rong-Qiao^{2)**}

¹⁾ Department of Endocrine, Zhongguancun Hospital, Beijing 100080, China;

²⁾ Laboratory of Visual Information Processing, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Cyanogen bromide has been widely used as an activator to some resins while preparing affinity chromatography column and immobilized enzymes. Nevertheless, it is a hazard poison with a volatilization feature, which should be carefully used. Here, 1, 1'-carboxyl-diimidazole is used as an activator to Sepharose CL-6B, in order to immobilize earthworm fibrinolytic enzyme III1 (EFE-III1), m-aminophenylboronic acid and to detect glycated D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), with a low poison, a high coupling rate and a convenient process.

Key words affinity chromatography, immobilization, carboxyl-diimidazole, CNBr, D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, earthworm fibrinolytic enzyme

* This work was supported by Haidian Sci-Tech Committee Foundation (A06-1999-026).

** Corresponding author. Tel: 86-10-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

Received: August 24, 2001 Accepted: October 18, 2001

中国科学院生物物理研究所 期刊编辑部招聘启事

招聘岗位:《生物物理学报》编辑

招聘人数: 1 人

应聘条件: 生物物理或相关专业大学本科以上学历, 对生物物理及相关学科领域有较为全面的了解. 有科研工作经验, 中级以上专业技术职称 (高级职称者优先考虑). 有较强的中英文读写能力. 年龄 50 岁以下 (其他条件较好者, 年龄可适当放宽).

待遇: 参照我所同级人员待遇 (年薪 3~ 6 万元).

有意者请与中国科学院生物物理研究所期刊编辑部联系.

电话: 010-64888459; E-mail: prog@sun5.ibp.ac.cn

联系人: 王海群

中国科学院生物物理研究所
期刊编辑部