

分离尿激酶的胍基型亲和色谱填料研究*

常建华 高俊萍** 梁峰 冯越 董聿生

(西北大学化学系, 西安, 710069)

苏天升

(中国科学院北京化学研究所, 北京, 100080)

郭立安

(第四军医大学中心实验室, 西安, 710032)

摘要 本文合成了 5 种新的分离尿激酶的胍基型亲和色谱填料, 研究了它们的分离特性与基质和配基的关系, 发现胍基是一种很好的分离尿激酶配基, 聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球是优良的基质。用精氨酸作配基、聚甲基丙烯酸环氧丙酯作基质合成的填料与目前常用的商品化填料 Benzamidine-Sepharose 6B 比较, 前者具有更高的活性回收率、更大的比活提高倍数、更好的机械性能和更长的使用寿命。

关键词 填料, 亲和色谱, 分离, 尿激酶

分类号 0621.29

尿激酶的精制一般要使用亲和色谱^[1,2,3]。目前实际使用和文献报道最多的填料是在 Sepharose 上键合对氨基苯脒(简称 p-ABZ)制得^[1]。这种填料分离效果较好, 但是机械强度不高, 只能用于常压色谱, 而且寿命较短。前文我们报道了用 Sepharose 和聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球为基质, p-ABZ 为配基分离尿激酶的亲和色谱填料的对照研究^[2]。

本文报道含胍基的有机小分子为配基, Sepharose、一般聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球和亲水性改性的聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球为基质的分离尿激酶的新型色谱填料的合成和性能试验。发现胍基己酸和精氨酸为配基的亲和色谱填料对尿激酶有分离纯化作用。以精氨酸为配基、聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球为基质的亲和色谱填料是一种性能优良的亲和色谱填料。本文还探讨了基质及配基对填料性能的影响。

1. 实验部分

1.1 仪器和试剂

WZ-90-1 型紫外检测仪(上塘教学仪器厂), BT01-100 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)。

Sepharose-4B(Pharmacia 公司), 聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球及亲水性聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球、~7 μm(中国科学院化学研究所提供)。氨基己酸(上海试剂三厂, 生化试剂), L-精氨酸(简写 L-Arg, 第二军医大学政翔化学试剂研究室), 对氨基苯脒盐酸盐(简写 p-ABZ 盐酸盐, 进口分装), 环氧氯丙烷(西安化学试剂厂, 化学纯), 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(简写 EDC·HCl, 中国科学院上海生物化学研究所东风生化技术公司), 二环己基碳二亚胺(简写 DCC)。Benzamidine-Sepharose 6B(Pharmacia 公司, 简称 Sepharose-p-ABZ)。

1.2 活性回收率的测定

用平板法测定尿激酶的活性, 方法见文献^[4]。将未上柱的样品, 按柱后收集液的体积扩大的倍数稀释相同倍数, 用注射器各吸 20 μl, 点在同一块平板上, 室温放置二天后, 分别量出溶圈斑点的两个垂直直径, 两个直径的乘积即为活性大小的量度。用未上柱的尿激酶溶液的活性作为标准(100%), 求得过柱回收液的活性回收率。

1.3 比活提高倍数的测定

蛋白质浓度使用 Lowry 法测定^[4]。用平板法测溶液中尿激酶的活性。活性与蛋白质质量的比值即为比活, 分别以 P_p 、 P_r 表示未上柱的尿激酶溶液和过柱回收液的比活。柱后收集液比活 P_r 除以未上柱样品的比活 P_p 得比活提高的倍数。比活提高倍数 = P_r / P_p 。

联系人及第一作者: 常建华, 男, 55 岁, 教授, E-mail: changjh@163.net

*陕西省教委重点科研项目资助(96JZK15)

**现在中国科学院上海有机化学研究所工作

B. 含环氧基的琼脂糖基质与硝基被保护的精氨酸甲酯的反应:

反应条件参见 1.4.1.C。

C. 三氯化钛还原硝基的反应:

见 1.4.1 中步骤 D, 得填料 III。

1.4.4 填料 IV 的合成

聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球与自制的硝基被保护的胍基己酸反应, 产物经还原得到填料 IV。

A. 胍基己酸 (GCA) 的制备^[9, 10]: 按文献 9.10 制备。

B. 胍基被硝基保护的胍基己酸 [GCA(NO₂)] 的制备:

参照 1.4.1A 的方法合成, 产品 m. p. 144-148°C。

对 GCA(NO₂)、GCA、Arg(NO₂)、Arg 作紫外光谱分析。四图对比, 可看到胍基被硝基保护后, 形成一个 -C=N-NO₂ 共轭体系, 在 268-269nm 处有一强的吸收峰, 而胍基被硝基保护前无此吸收。

C. 环氧基在碱催化下与羧基的反应^[11]:

2 克 GCA(NO₂) 倒入三颈瓶中, 加入 30ml 二氧六环, 在水浴中搅拌至 GCA(NO₂) 溶解。再加入 3g 聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球, 继续搅拌加热 48 小时。抽滤, 烘干, 得产品。

D. 三氯化钛还原硝基的反应:

见 1.4.1 中步骤 D, 得填料 IV。

1.4.5 填料 V 的合成

合成填料 V 时使用亲水性的聚甲基丙烯酸环氧丙酯作基质, 其合成路线及合成步骤与合成填料 IV 的相同。

1.5 填料应用实验

1.5.1 色谱条件:

平衡液: 0.1mol/L NaCl+0.02mol/L NaH₂PO₄, pH=7.2; 洗脱液: 0.1mol/L NH₄AC+0.4mol/L NaCl, pH=4.0。紫外检测波长: 280nm。柱子: 10mm(ID)×70mm。

1.5.2 样品: 尿激酶粗品或尿激酶针剂用平衡液溶解, 离心后取上清液。

2. 结果与讨论

2.1 胍基类有机小分子是分离尿激酶的亲和色谱填料的有效配基

目前文献报道最多并已商品化的分离尿激酶的亲和色谱填料的配基是对氨基苯甲脒 (p-ABZ)。本文的实验结果表明, 胍基也是分离尿激酶的亲和色谱填料的有效配基。Arg 和 GCA 都是端基为胍基的有机小分子, 以 Arg 和 GCA 为配体的亲和色谱填料对尿激酶具有特异性亲和作用, 见表 1。

Table 1 The characteristic of packings of affinity chromatography with guanido

Packings	Matrix	Ligand	Bioactivity recovery%	Purification fold
I	Polyepoxypropyl methacrylate	Arg	88	49
II	Hydrophilic polyepoxypropyl methacrylate	Arg	66	57
III	Sepharose-4B	Arg	53	30
IV	Polyepoxypropyl methacrylate	GCA	39	6.6
V	Hydrophilic polyepoxypropyl methacrylate	GCA	80	2.4

*样品为尿激酶粗品

2.2 精氨酸是优良的分离尿激酶的亲和配基

比较本文的 Arg 和 GCA 和前文的 p-ABZ^[2] 三种配基, 发现以精氨酸为配基, 比活提高倍数高, 活性回收率一般也很高, 是一种分离尿激酶的优良配基。

用市售尿激酶针剂为样品, 对照了自制填料 I、II 和 Pharmacia 公司的 Sepharose-p-ABZ 填料。自制的填料 I 和 II 性能优于 Sepharose-p-ABZ, 见表 2。

Table 2 The comparison of packings I and II with Sepharose-p-ABZ

Packings	Matrix	Ligand	Bioactivity recovery%	Purification fold
I	Polyepoxypropyl methacrylate	Arg	64	23
II	Hydrophilic polyepoxypropyl methacrylate	Arg	44	31

在实验中还发现, Sepharose-p-ABZ 填料分离性能下降很快, 使用 3 次就发现分离性能明显下降; 而自制的以聚甲基丙稀酸环氧丙酯类微球为基质精氨酸为配体的填料分离性能下降很慢, 使用 8 次仍无明显变化, 后者柱寿命远大于前者。

2.3 聚甲基丙稀酸环氧丙酯微球是一种亲和色谱填料的优良基质

比较本文的和前文中各种相同配基不同的基质的填料, 从比活提高倍数看不同基质是: 聚甲基丙稀酸环氧丙酯>亲水聚甲基丙稀酸环氧丙酯> Sepharose; 从活性回收率看有高有低, 但聚甲基丙稀酸环氧丙酯类不比 Sepharose 差。而 Sepharose 强度差, 只能用于常压色谱; 聚甲基丙稀酸环氧丙酯类微球可耐压 15MPa/cm², 且价格也较低。总的看来, 聚甲基丙稀酸环氧丙酯类微球是一类亲和色谱填料的优良基质。

2.4 用聚甲基丙稀酸环氧丙酯类微球作基质时合成方法比用 Sepharose 简便且廉价

用 Sepharose 作基球, 合成中要用 DCC 等价格较贵的试剂。而且 Sepharose 不耐热, 温度高了会溶解于水, 机械强度又差, 使制备填料时有不少困难。聚甲基丙稀酸环氧丙酯类微球无论耐热性、机械强度都远强于 Sepharose, 试剂便宜, 合成填料较方便。

3. 结论

- 3.1 脒基和胍基对尿激酶都有亲和作用, 都可用于分离尿激酶时作配基。
- 3.2 精氨酸是比一般常用的对氨基苯脒更好的分离尿激酶的配体。
- 3.3 聚甲基丙稀酸环氧丙酯类微球可代替 Sepharose 作基质, 并且具有耐压好、合成简便、产品分离性能好等优点。
- 3.4 聚甲基丙稀酸环氧丙酯微球作基质、精氨酸作配体的填料分离性能、使用寿命、机械性能都优于目前普遍使用的 Benzamidine-Sepharose 6B 填料。

参考文献

- 1 Richard F. T., Ingrid G. M.; J. Chromatogr., 1984, **317**:193
- 2 GAO Jun-Ping(高俊萍), LIANG Feng(梁峰), CHANG Jian-Hua(常建华) et al.; Chinese J. Chromatogr. (色谱), 定稿待发
- 3 Holmberg L., Bladh B., Astedt B.; Biochem. Biophys. Acta, 1976, **445**, 215
- 4 Vesterber O., Eriksson R.; Biochem. Biophys. Acta, 1972, **285**, 393
- 5 HUANG Wei-De(黄惟德), CHEN Chang-Qing(陈常庆); the polypeptide synthesis(多肽合成), Beijing(北京), science press(科学出版社), 1985, 61-64
- 6 Hofmann K, Pekhan W. D, Rheeiner A., J. Am. Chem. soc., 1956, **78**, 238
- 7 Freidinger R. M., Hildchmann R., Veber D. F., J. Org. Chem., 1978, **43**, 4802
- 8 Turkova J., Blaha k., Horacek k., et al., J. Chromatogr., 1981, **215**, 165-179
- 9 The compile group of the laboratory technique of organic chemistry; The laboratory technique of organic chemistry, Beijing(北京), science press(科学出版社), 1978, 17-18
- 10 Horning E. C., et al., Translated by the organic chemistry teaching and research group of the department of chemistry, Nanjing university(南京大学化学系有机教研室译), the organic synthesis(有机合成), 3rd volume(第3集), Beijing(北京), science press(科学出版社), 1964, 271-272
- 11 Kokiuchi H., Tanaka Y., J. Org. Chem., 1965, **31**, 1559-1564

Studies on the Packings with Guanido of Affinity Chromatography for the Separation of Urokinase

CHANG Jian-Hua, GAO Jun-Ping, LIANG Feng, Feng Yue, Dong Yu-Sheng
(Department of Chemistry, Northwest University, Xi'an, 710069)
Su Tian-Sheng

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

Guo Li-An

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

Abstract Five guanido packings of affinity chromatography for the separation of Urokinase have been synthesised. The separation characteristics and the effect of matrix and ligands on them have been studied. The guanidine derivative is a fine ligand, the packings with ligand of Arginine are much better than that with ligand of p-ABZ. The polyepoxypropyl methacrylate microsphere is a good matrix. The comprehensive function of packings with ligand of Arginine and matrix of polyepoxypropyl methacrylate microsphere is more excellent than Sepharose-p-ABZ.

Keywords Packings, Affinity chromatography, Separation, Urokinase.

摘要 本文合成了 5 种分离尿激酶的胍基亲和色谱填料, 研究了分离特性和基质及配基对分离特性的影响。发现胍基衍生物是一种很好的配基, 用精氨酸作配基的填料比以 p-ABZ 作配基的填料的性能好得多。聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球是一种很好的基质。用精氨酸作配基聚甲基丙烯酸环氧丙酯作基质的填料的综合性能比 Sepharose-p-ABZ 更优良。