

研究简报

聚乙烯醇载体的研究

III. 由聚乙烯醇衍生的活性酰胺和活性酯
及其作为亲合色谱载体的应用*

李福绵 王 林 冯新德

(北京大学化学系)

亲合色谱法在现代生物学和医学上作为新的得力分离分析手段而方兴未艾^[1]。亲合色谱法是将相互在生物学上具有特异亲合力的某一化合物作为固定相接在水不溶性载体上,利用对此固定相的亲合力的差异以分离提纯另一化合物为目的的方法。常用的水不溶性载体如天然纤维素,葡聚糖凝胶,琼脂糖凝胶等或因成型不易,或因对酸,霉菌等的不稳定,或因装柱后流通性不好等原因而不甚理想。特别是它们的非特异性吸附方面更不令人满意,而且这些天然载体的价格昂贵。近来,载体的研究甚被瞩目。合成高分子载体可以根据分子设计,通过对主链结构的选择和活化反应,就有可能克服这些天然物载体天生存在的弱点。我们曾报道了大孔水不溶性球状聚乙烯醇载体的一步法制备,其活化反应及与蛋白质的偶联^{[2][3]}。在此基础上,本文通过缩醛化反应将亲水性的乙醛酸,憎水性的对-醛基苯甲酸引至聚乙烯醇载体上,制成它们的苯并三氮唑活性酰胺和N-羟基丁二酰亚胺活性酯,并进行了它们与含胺基,含羟基化合物的交换反应。还与蛋白质如鸡卵类粘蛋白(Ovomucoid)偶联,以比较不同结构的“臂”对活性的影响。

球状水不溶性聚乙烯醇(MR-PVA)的制备,比表面,孔径,孔容,测定如前文所述^{[4][5]}。本文所用MR-PVA的堆积密度为0.40—0.50克/毫升。

MR-PVA与对醛基苯甲酸(FBA),乙醛酸(GA)的反应:将 1.5×10^{-2} 摩尔的醛基酸溶于40毫升二甲基甲酰胺(DMF)中,加入10毫升的MR-PVA,2毫升浓硫酸及4克硫酸钠,在65—70℃下反应4小时,过滤,用蒸馏水洗聚合物至滤液呈中性,抽干待用。

活性酰胺或活性酯的制备:取含2.7毫克当量羧基的MR-PVA,和1.4毫克当量的苯并三氮唑(BT)于反应瓶中,加入30毫升DMF,在冰浴冷却下分批加入1.4毫克当量的二环己基碳二亚胺(DCCI),约需1小时。然后再在室温下反应2小时。过滤,再用甲醇和四氢呋喃充分洗涤,以除去所生成的二环己基脒。抽干,置于无水二氧六环中保存(略记为MR-PVA-FBA-BT,或MR-PVA-GA-BT)。

N-羟基丁二酰亚胺(NHS)活性酯的制备基本同上(略记为MR-PVA-FBA-NHS,MR-PVA-GA-NHS)。

* 1984年7月24日收到。

PVA-活性酰胺、活性酯与胺、醇的反应^{[4][5]}: 取 0.5 克的 PVA-FBA-BT 溶于 20 毫升 DMF 中, 加入 2 毫升正丁胺, 或 2 毫升丙烯醇与 1 毫升三乙胺, 在室温下反应 20 小时后, 倾入大量水中沉出产物, 洗涤, 剪碎烘干。

MR-PVA-FBA-NHS, MR-PVA-GA-NHS 与蛋白质的偶联: 取 10 毫升的活性酯, 0.25 克鸡卵类粘蛋白 (CHOM), 于 30 毫升 pH 为 7.6 的硼酸缓冲液中, 在室温下反应 24 小时。过滤, 用 0.2 N 甲酸洗一次, 再用蒸馏水洗四次。所制得亲合吸附剂上的偶联蛋白量可用紫外分析法测定。

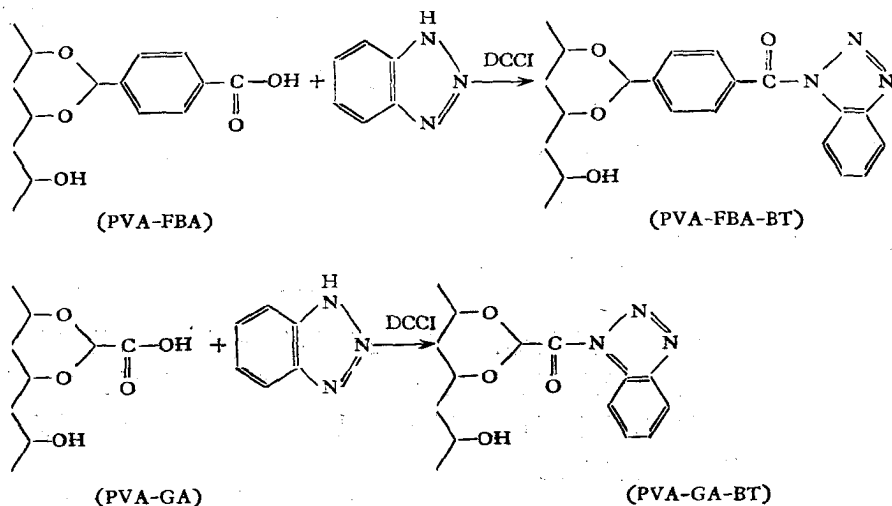
亲合层析^[6]: 将上面所制得的亲合层析剂装入 $\phi 10 \times 70$ 毫米柱中。用 pH 7.5 的 Tris 缓冲溶液平衡后, 流通新激活的牛胰蛋白酶吸附之。用上述缓冲溶液洗至洗涤液中不含蛋白酶之后, 改用 pH 2.5 的甲酸钾 (0.1M)-氯化钾 (0.5M) 溶液洗脱。用紫外分析测定蛋白质在 280nm 处的吸收强度。

以乙二醇同系物做致孔剂, 以对苯二甲醛做交联剂所得的球状聚乙烯醇载体具有一定的机械强度和良好的流体通过性。致孔剂对载体的孔径, 孔容及表面积等的影响示于表 1。

表 1. 致孔剂对 MR-PVA 载体比表面, 孔容, 孔径的影响

致孔剂	比表面 Δ^s (米 ² /克)	孔容 V_p (厘米 ³ /克)	孔径 $\bar{R}$ (Å)
一缩乙二醇	8.0	0.76	2400
三缩乙二醇	7.3	1.16	4000

作为亲和色谱载体, 要求配基与载体骨架之间要有一定的“臂长”。“臂”的亲水、疏水性, 臂的刚性等皆对配基的偶联量, 亲合基团的保留活性等有影响。配基的活性亦甚重要。我们合成了如下结构的活络配基。



它们在较温和的条件下, 可以和含胺基的化合物如正丁胺发生交换反应。而与含羟基的化合物则需在稍高温或催化剂下发生交换反应。

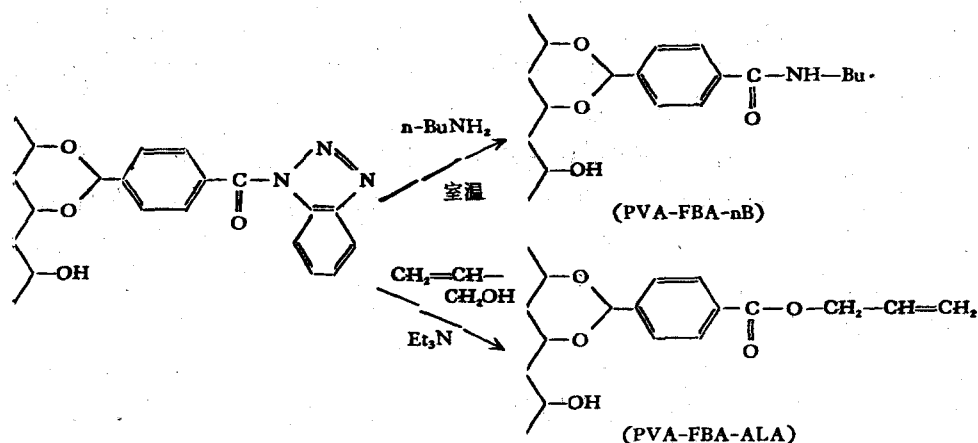
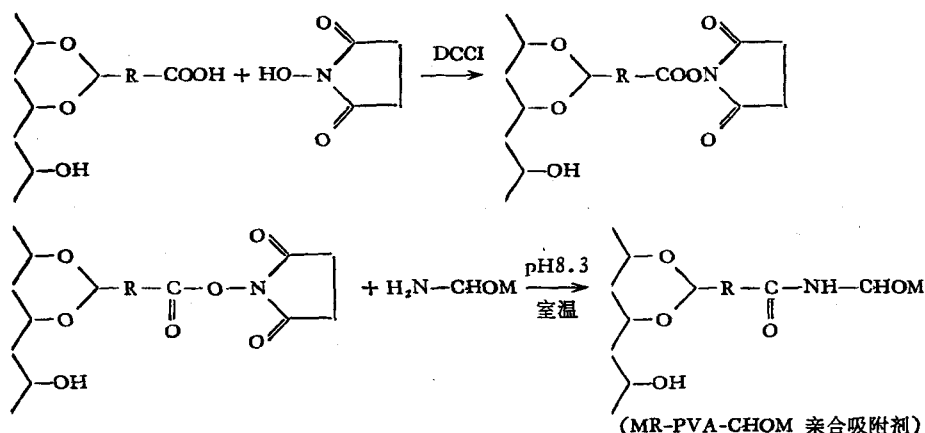


图 1 是各反应产物的红外光谱。在 PVA-FBA 上出现了 1680 cm^{-1} 的羧基 $\nu_{\text{C=O}}$ 特征吸收, 在 750 cm^{-1} 处出现苯环的 $\nu_{\text{C-H}}$ 特征吸收; PVA-FBA 和 BT 反应后, 1680 cm^{-1} 处的 $\nu_{\text{C=O}}$ 吸收减弱, 代之而在 1650 cm^{-1} 出现亚酰胺 $\nu_{\text{C=O}}$ 吸收, 在 $1300\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ 出现 $\nu_{\text{C-N}}$ 的吸收; PVA-FBA-BT 与丙烯醇 (ALA) 交换后, 在 1620 cm^{-1} 出现双键 $\nu_{\text{C=C}}$ 的吸收; 与正丁胺交换后, 在 $1650\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ 处出现酰胺 I 谱带, 在 1300 cm^{-1} 处出现 $\nu_{\text{C-N}}$ 酰胺 III 谱带。

臂的长短, 及刚性对生物活性物质的偶联量和保留活性影响很大。我们将含羧基的 MR-PVA 用 NHS 活化后, 进行了胰蛋白酶的天然抑制剂鸡卵类粘蛋白 (CHOM) 的偶联, 测定了它们的抑制活性。如表 2 所示。

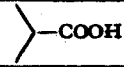
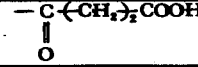


可以看到, 以配基苯甲酸为“臂”时, 尽管苯环具有刚性, 但是, 由于苯环的疏水性和空间阻碍, 使得蛋白偶联量和保留活性都很低, 这一点是和一些报道不同的^[7]。以乙醛酸做配基时, 由于亲水性好, 尽管离骨架很近, 但蛋白质的偶联量及活性都较高。更长的脂肪链臂, 具有令人满意的偶联能力和活性。

将所制成 PVA-CHOM 亲合吸附剂装柱, 进行对胰蛋白酶的亲合层析, 再用 $\text{pH } 2.5$ 的甲酸钾-氯化钾溶液洗脱, 其淋洗曲线示于图 2。级分 25 前面级分为杂蛋白, 后面级分为胰蛋白酶。表明以全合成的 MR-PVA 制得的亲合吸附剂对于胰蛋白酶的分离精制有

很好的效果。

表 2 不同臂对载体偶联 CHOM 量及保留活性的影响

臂			
载体羧基含量 (毫克当量/10 毫升载体)	4.05	0.65	0.12
结合蛋白量 (毫克/毫克当量羧基)	8	104	268
比活力 (BAEE 单位/毫克)	2000	4000	4000

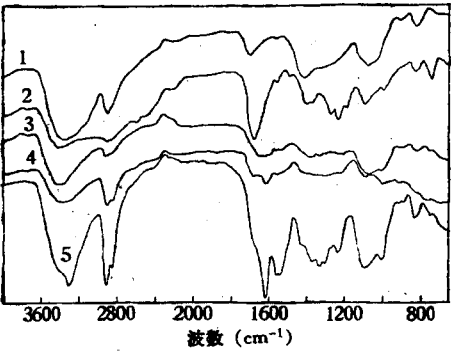


图 1 聚乙烯醇及其衍生物的红外光谱
1. PVA 2. PVA-FBA 3. PVA-FBA-BT
4. PVA-FBA-ALA 5. PVA-FBA-nBu

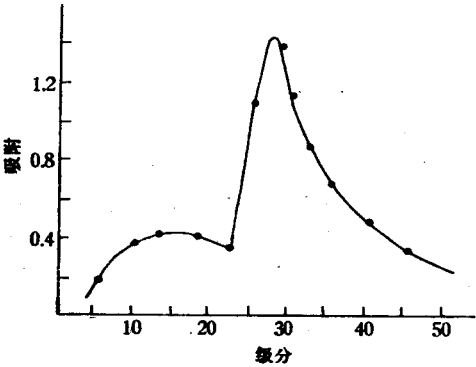


图 2 胰蛋白酶在 PVA-CHOM 柱上的亲和层析
条件:柱体积 10×70 毫米,洗脱液 甲酸-氯化钾
pH = 2.5 洗脱速度 1.5 毫升/分,室温

致谢 北京大学生物系郭虹同志协助测定蛋白质,谨致谢意。

参 考 文 献

[1] Lowe, C. R., Dean, P. D. G., "Affinity Chromatography", John Wiley and Sons Ltd., 1974.
[2] 李福绵,赵萍,冯新德,李德昌,李丽娟,科学通报,1980, 25(15), 695; Kexue Tongbao, 1980, 25(1), 916.
[3] 李福绵,邓卓,高可重,杜兴文,冯新德,高分子通讯,1981, (5), 362.
[4] Ferruti, P., Fere, A., Cottica, G., J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed., 1974, 12(3), 553.
[5] Ferruti, P., Vuscaroti, F., Tanzi, M. C., J. Polym. Sci., 1978, 16(6), 1435.
[6] 张龙翔,张庭芳,李令媛,生化实验方法和技术,人民教育出版社,1981
[7] 陆承勋,李德昌,高分子通讯,1982, (2),121.

STUDIES ON POLYVINYL ALCOHOL CARRIERS

III. Active Amides and Active Esters Derived from Poly-Vinyl Alcohol and Their Uses as the Carriers for Affinity Chromatography

LI Fumian, WANG Lin and FENG Xinde

(Department of Chemistry, Peking University, Beijing)

ABSTRACT

Polyvinyl alcohol carriers having active amide and active ester ligand were prepared by acetalization of granular macro-reticular water-insoluble PVA with glyoxylic acid or p-form ylbenzoic acid, and then reaction with benzotriazole or N-hydroxysuccinimide by using DCCI as condensation agent. The active amides or active esters obtained are easy to react with amines such as n-butylamine or proteines under mild condition.

Ovomucoid, an inhibitor of trypsin was immobilized on the above obtained reactive PVA carrier to give an effective affinity-adsorbent for separation of trypsin.