

# 三种亲和层析体系纯化大豆凝集素的比较研究

王利民,秦贵信,刘林娜,张亮亮,张玲玲

(吉林农业大学动物科技学院, 长春 130118)

**摘要** 用N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-Sepharose 6B、半乳糖胺-CH-Sepharose 4B和瓜尔胶三种亲和层析体系对大豆中的凝集素进行分离提纯,并进行了多方面的比较。结果显示:三种亲和层析体系纯化大豆凝集素的产率存在显著差异,依次分别为 $147\pm 15$ 、 $110\pm 12$ 和 $128\pm 16$ mg/100g生大豆;三种亲和胶的亲饱和度差异显著,分别为 $12.2\pm 1.4$ 、 $7.5\pm 1.3$ 和 $2.1\pm 1.6$ mg/mL凝胶。这一结果表明大豆凝集素最理想的纯化方法是N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-sepharose 6B亲和层析体系。

**关键词** 亲和层析;纯化;大豆凝集素

中图分类号 S 565.101 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2007)01-0051-04

## COMPARISON STUDY OF THREE AFFINITY CHROMATOGRAPHY SYSTEMS ON SOYBEAN AGGLUTININ PURIFICATION

WANG Li-min, QIN Gui-xin, LIU Lin-na, ZHANG Liang-liang, ZHANG Ling-ling

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118)

**Abstract** Purification of soybean agglutinin with three affinity chromatography systems, GalNac-epoxy-Sepharose 6B, Gal-CH-Sepharose 4B and guar were compared. The results showed the differences of the production rate and absorbing capacities among the three systems were significant,  $147\pm 15$ ,  $110\pm 12$ ,  $128\pm 16$ mg/100g raw soybean and  $12.2\pm 1.4$ ,  $7.5\pm 1.3$ ,  $2.1\pm 1.6$  mg/mL gel separately. This result indicated that the best way to purify soybean agglutinin was Gal-Nac-epoxy-Sepharose 6B.

**Key words** Affinity chromatography; Purification; Soybean agglutinin

大豆凝集素(Soybean Agglutinin, SBA)是指大豆中能与N-乙酰基-D-半乳糖胺/半乳糖胺/半乳糖特异性结合的糖蛋白,分子量约120kDa,由四个略有不同的亚基构成四聚体,每个亚基分子量约30kDa,在超速离心中随7S蛋白一起沉降<sup>[1]</sup>。自上世纪中叶SBA被首次发现并命名以来,由于其具有特殊的生物学功能(与游离的N-乙酰基-D-半

乳糖胺/半乳糖或细胞膜糖蛋白上的N-乙酰基-D-半乳糖胺/半乳糖结合),如今在抗营养作用、选择性分离骨髓干细胞、分离糖蛋白、靶向给药、植物分类学及人类血型鉴定等方面的研究越来越多。

获得高纯度的SBA是进行上述研究的前提。提取和纯化SBA的方法较多,最初采用盐析、移动界面电泳结合超速离心沉淀技术,但只能得到少量

收稿日期:2006-07-07

基金项目:国家自然科学基金(C020302)资助项目

作者简介:王利民(1966-),男,在读博士,副教授,研究方向为动物营养。Tel:13944188861

通讯作者:秦贵信教授,博士生导师。

的 SBA<sup>[2]</sup>,后来又发展了离子交换和磷酸钙层析法<sup>[3,4]</sup>,而应用上述 SBA 的特殊生物学功能进行亲和层析是近年来普遍采用的方法。其中最常用的亲和层析体系是 N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-Sepharose 6B<sup>[5,6]</sup>、半乳糖胺-CH-Sepharose 4B<sup>[6,7]</sup>和瓜尔胶<sup>[8]</sup>,但这三种方法没有系统的研究,本实验旨在比较三种亲和层析体系的差异,并确定其中的最佳方法,以大量提取 SBA,进而用于抗营养研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验样品 三种亲和层析凝胶(N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-Sepharose 6B、半乳糖胺-CH-Sepharose 4B 和瓜尔胶)均购自 Sigma 公司;大豆(丰交 7607)购于吉林省春雨种子有限公司。

1.1.2 主要试剂 SBA 标准品购自 Sigma 公司;硫酸铵、半乳糖等均为国产分析纯。

1.2.3 主要仪器 低温高速离心机(Sigma 公司)、85-2 磁力搅拌机(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂)、UV-2102PCS 紫外可见分光光度计(龙尼柯仪器有限公司)、恒温水浴(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)、BS-160 型自动收集器(上海沪西分析仪器厂)、PHS-3C 型酸度计(上海伟业仪器厂)等。

### 1.2 方法

1.2.1 SBA 粗提液的制备 称取生大豆 100g,粉碎过 40 目标准筛,置于 500mL 低沸石油醚(馏程 30℃~60℃)内搅拌提取 4h 脱脂,晾干。用磷酸缓冲液(PBS, 0.01mol/L, pH7.6)4℃下浸提过夜。10000r/m 离心 20min,弃沉淀。上清液中加入固体硫酸铵至 85%饱和度,4℃下搅拌 2h,10000r/m 离心 20min,弃上清。沉淀溶于 PBS,并用 PBS 透析过夜,离心除去少量杂质,上清即为 SBA 粗提液。

1.2.2 SBA 的纯化 N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-Sepharose 6B、半乳糖胺-CH-Sepharose 4B 和瓜尔胶均 PBS 平衡处理后,前两种凝胶分别装入 1.5×15cm 的层析柱中,后者装入 3×40cm 的层析柱中。将 SBA 粗提液分批加入各柱,用 PBS 洗去杂蛋白,反复几次,直至使凝胶的亲和能力达到饱和(洗脱液中测不出 SBA)。至流洗液

OD<sub>280 nm</sub><0.01 后,换用含 0.1mol/LD-半乳糖(半乳糖胺-CH-Sepharose 4B 和瓜尔胶)或 0.15mol/LD-半乳糖(N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-Sepharose 6B)的 PBS 洗脱,流速为 0.5 mL/min(半乳糖胺-CH-Sepharose 4B 和瓜尔胶)或 0.8 mL/min(N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-Sepharose 6B),分管收集并合并 OD<sub>280 nm</sub>>0.1 的洗脱峰各管,即为纯化的 SBA。

1.2.3 SBA 的含量测定 以紫外吸收法测定 SBA 的含量。

1.2.4 SBA 的活性检测 以免红细胞凝集试验检测 SBA 的活性。按红细胞的凝集强度,以+++++(强凝集)、++++、++、+和-(不凝集)表示,以出现++的 SBA 最高稀释倍数为凝集效价。

1.2.5 SBA 的纯度鉴定 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对所提取的 SBA 进行纯度分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 洗脱峰

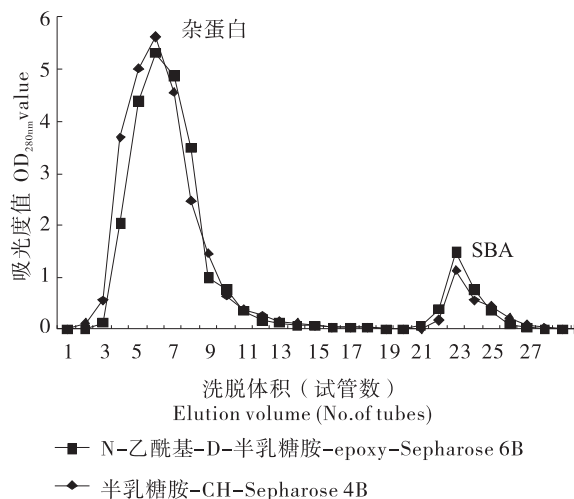


图1 N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-Sepharose 6B 和半乳糖胺-CH-Sepharose 4B 体系纯化大豆凝集素曲线

Fig. 1 Elution curve of SBA purification with GalNAc-epoxy-Sepharose 6B and GalNH<sub>2</sub>-CH-Sepharose 4B system

由图1可见,半乳糖胺-CH-Sepharose 4B 的杂蛋白洗脱峰较 N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-Sepharose 6B 略早,而且峰值高。这是由于 N-乙酰基-D-半乳糖胺对 SBA 的亲合力远大于半乳糖

胺对 SBA 的亲和力。瓜尔胶层析柱的体积大,与 SBA 的亲和力小,故两个峰收集的管数都较多,杂蛋白洗脱峰值高,而 SBA 洗脱峰值低(图 2、图 3)。

2.2 SBA 产率及亲和饱和度

根据纯化后 SBA 的终浓度和收集的总体积,计算出其产率,即每 100g 生大豆经三种亲和层析柱纯化后所得的 SBA。亲和饱和度即每次上样后当层

析柱对 SBA 的结合达到最大时,每毫升凝胶所能结合的 SBA 量。由表 1 可见,三种亲和体系中,N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-Sepharose 6B 的产率最高,其次是瓜尔胶和半乳糖胺-CH-Sepharose 4B,后二者差异不显著。三者的亲和饱和度差异均较显著。

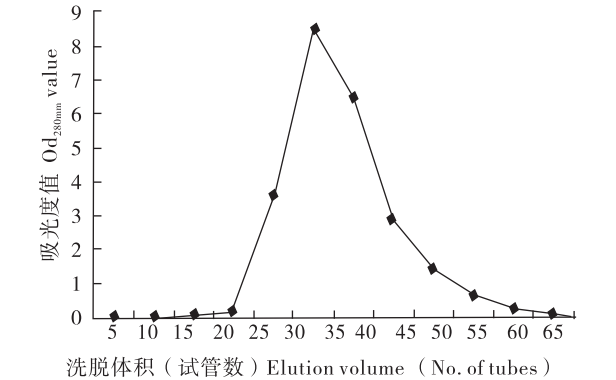


图2 瓜尔胶体系纯化大豆凝集素杂蛋白洗脱曲线  
Fig. 2 Non-aimed protein elution curve of SBA purification with Guar system

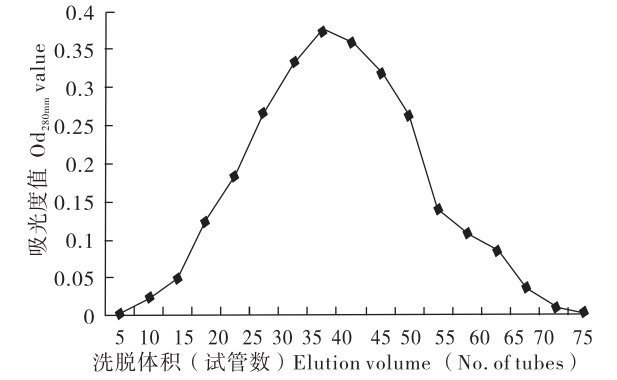


图3 瓜尔胶体系纯化大豆凝集素目的蛋白洗脱曲线  
Fig. 3 Aimed protein elution curve of SBA purification with Guar system

表 1 三种亲和层析体系的大豆凝集素产率和亲和饱和度比较  
Table 1 Comparison of production rate and absorbing capacity of SBA among the three affinity systems

项目 Item	大豆凝集素 SBA	
	产率(mg/100g 生大豆)	亲和饱和度(mg/mL 凝胶)
	Production rate	Absorbing capacity
N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-Sepharose 6B	147.0±15	12.2±1.4
GalNAc-epoxy-Sepharose 6B		
半乳糖胺-CH-Sepharose 4B	110.0±12	7.5±1.3
GalNH <sub>2</sub> -CH-Sepharose 4B		
瓜尔胶 Guar	128.0±16	2.1±1.6

表 2 三种亲和层析体系纯化的大豆凝集素血凝效价比较  
Table 2 Comparison of agglutinating red blood cell effect of SBA among the three affinity systems

样品		SBA 稀释倍数					Dilution times of SBA					
Sample		1 *	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
SBA 标准品	Standard sample	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
纯化样品 <sup>1</sup>	Purified sample <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
纯化样品 <sup>2</sup>	Purified sample <sup>2</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
纯化样品 <sup>3</sup>	Purified sample <sup>3</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

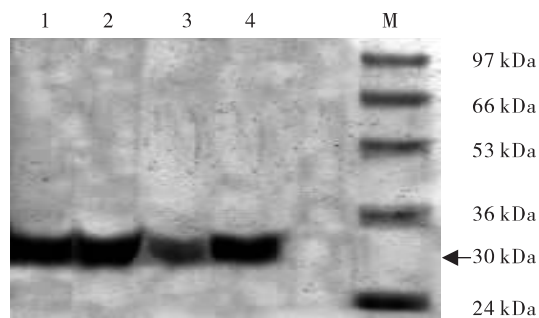
注:1、2、3 分别代表 N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-Sepharose 6B、半乳糖胺-CH-Sepharose 4B 和瓜尔多糖凝胶纯化的 SBA。  
\* 为 SBA 的起始浓度(1mg /mL)。  
Note:1,2,3means SBA made by GalNAc-epoxy-Sepharose 6B, GalNH<sub>2</sub>-CH-Sepharose 4B and Guar gel.  
\* Indicates the initial concentration of SBA(1mg /mL).

2.3 SBA 的纯度

由图 4 可见,三种亲和层析体系纯化的 SBA 与标准 SBA 的电泳结果一致,分子量约为 30KDa,而且没有任何杂蛋白带,表明所纯化的 SBA 纯度较高。此结果与 Lotan<sup>[9]</sup>的报道一致。

2.4 SBA 的生物活性

由表 2 可见,本试验中 SBA 的凝集效价均为 256。三种亲和层析体系纯化的 SBA 的效价与购买的 SBA 标准样品没有显著差异。



1. GalNAc-epoxy-Sepharose 6B 纯化的 SBA;  
2. GalNH<sub>2</sub>-CH-Sepharose 4B 纯化的 SBA;  
3. Guar 纯化的 SBA; 4. SBA 标准品; M. Marker

1. SBA purified by GalNAc-epoxy-Sepharose 6B;  
2. SBA purified by GalNH<sub>2</sub>-CH-Sepharose 4B;  
3. SBA purified by Guar;  
4. Standard SBA sample;  
M. Marker

图 4 纯化的 SBA 电泳结果

Fig. 4 SDS-PAGE of purified SBA

### 3 讨论

虽然三种纯化体系都是亲和层析,但固相载体上所连的配基不同,因而对 SBA 的特异性亲和力也不同。N-乙酰基-D-半乳糖胺和半乳糖胺两种配基分别以化学方法共价结合于作为固相“支架”epoxy-Sepharose 6B(环氧活化的琼脂糖凝胶 6B)和 CH-Sepharose 4B(羧基琼脂糖凝胶 4B)上,且 CH-Sepharose 4B 的结构较 epoxy-Sepharose 6B 疏松<sup>[10]</sup>,因而等量的体凝胶积,epoxy-Sepharose 6B 结合 N-乙酰基-D-半乳糖胺的位点多于 CH-Sepharose 4B 结合半乳糖胺的位点。而且 N-乙酰基-D-半乳糖胺对 SBA 的亲和力又是半乳糖胺对 SBA 的亲和力的 30 倍<sup>[11]</sup>,因此该体系的 SBA 洗脱峰、产率和亲和饱和度都高于半乳糖胺-CH-Sepharose 4B 体系。由于两种配基对 SBA 的特异性亲和力不同,所以这两种体系所用半乳糖洗脱液的浓度和流速也不同。

瓜尔胶是主要(约 80%)由半乳糖和甘露糖聚合而成的天然半乳多缩甘露糖,由原产于非洲的一种豆科草本植物瓜尔豆种子的胚乳加工精制而成的天然植物胶,为大分子天然亲水胶体。本试验显

示,天然瓜尔胶对 SBA 的特异性亲和能力只有 N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-Sepharose 6B 的约 1/6,半乳糖胺-CH-Sepharose 4B 的约 1/3,说明 SBA 对半乳糖的亲和力远不如半乳糖胺和 N-乙酰基-D-半乳糖胺。

综上所述,用亲和层析法纯化大豆凝集素的最理想方法是 N-乙酰基-D-半乳糖胺-epoxy-Sepharose 6B 体系,但价格较贵。瓜尔胶成本较低,但产率也低。

### 参 考 文 献

- [1] Lotan R., H. W. Siegelman, H. Lis. Subunit structure of soybean agglutinin[J]. *Biology Chemistry*, 1974, 249: 1219-1224.
- [2] Liener I. E., M. J. Pallansch. Purification of a toxic substance from the defatted soybean flour[J]. *Biology Chemistry*, 1952, 197: 29-36.
- [3] Wada S, M J Pallansch, I E Liener. Chemical composition and end groups of the soybean hemagglutinin[J]. *Biology Chemistry*, 1958, 233: 395-400.
- [4] 祝芹萌. 大豆凝集素、胰酶和胰蛋白酶抑制剂的分离纯化[A]. 中国农业科技文献, 1991: 38-40.
- [5] Vreblad P. Purification of lectins by biospecific affinity chromatography [J]. *Biochemistry Biophysics Acta*, 1976, 434: 169-176.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化技术研究[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994: 488-489.
- [7] Allen A K, A Neuberger. A simple method for the preparation of an affinity absorbent for soybean agglutinin using galactosamine and CH-Sepharose[J]. *FEBS Lett.* 1975, 50: 362-364.
- [8] 荆剑. 大豆凝集素的纯化及其凝集不同肿瘤细胞的探讨[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, 19: 401-405.
- [9] Lotan R., H. W. Siegelman, H. Lis, et al. Subunit structure of soybean agglutinin[J]. *Biology Chemistry*, 1974, 249: 1219-1224.
- [10] 何昭阳. 动物免疫学试验技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2002.
- [11] DeBoedck H, H Lis, H. Van Tilbeurgh, et al. Binding of simple carbohydrate and some chromophoric derivatives to soybean agglutinin as followed by titrimetric procedures and stopped-flow kinetics[J]. *Biology Chemistry*, 1984, 259: 7067-7074.