

HPLAC 及其在酶的分离和纯化中的应用

李 华 儒

(西北大学, 西安)

提 要

叙述了高效液相亲和色谱法(HPLAC)在酶的分离和纯化中的应用,以及组成吸附剂常见的基质、间隔臂、配体的性能和分离过程中的洗脱技术。

高效液相亲和色谱法(简称 HPLAC)是七十年代末兴起的一项新分离技术^[1]。这项技术是在传统高效液相色谱和亲和色谱法的基础上发展起来的,因此它兼有二者的优点:具有 HPLC 快速、分辨率高的特点,又有一般亲和色谱法选择性高的长处。由于它有上述优点,因此随着新型吸附剂的不断开发, HPLAC 在分离纯化生物大分子尤其酶方面得到广泛应用,本文拟简单介绍近几年 HPLAC 在酶的分离与纯化中的应用,以及有关基质、间隔臂和配体。

一、基质、间隔臂和配体

1. 基质

HPLAC 中的吸附剂是将具有生物特异性配体通过间隔臂偶合到硬基质上制成。由于 HPLAC 是在高压和较大流速下工作,因此使用的基质应具有较高的机械强度,抗生物和化学腐蚀能力,一般亲和色谱法所用的软基质因受压易变形不宜采用。HPLAC 中常用的基质有硅胶和可控孔径的多孔玻璃。这两种基质性能相似,都具有较大的刚性和化学稳定性。一旦孔径大小确定后,即能得到明确的排阻极限和良好的分辨能力,可以有效地分离分子量 10^5 — 10^9 的生物大分子,甚至病毒和细胞。

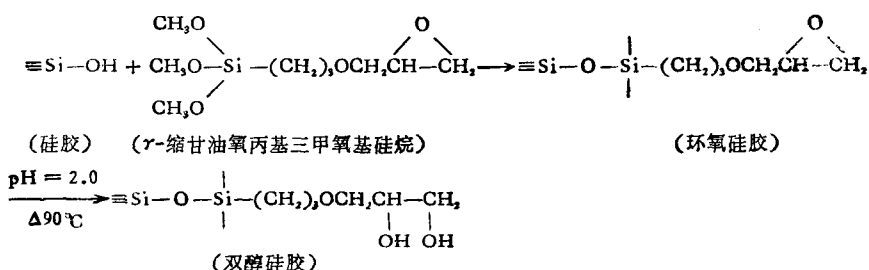
多孔玻璃与硅胶相比较,前者制造麻烦、造价昂贵、不适宜大规模地分离和纯化。选用硅胶作基质,首先必须考虑硅胶孔径和粒度对色

谱柱效和柱容量的影响。为获得较高柱效和柱容量,硅胶的粒度以 $10\mu\text{m}$ 为宜,孔径应在 300 — 500Å ^[2,3]。

2. 间隔臂

未经修饰的硅胶表面具有非特异性吸附能力、排阻效应和空间效应的影响。非特异性吸附能力的发生是由于硅胶表面含有大量硅醇(Si-OH)和硼酸盐。硅醇为弱酸性基团($\text{pK}_a = 10.5$),在溶液中部分离解而使硅胶荷负电,对溶液中带电蛋白质产生非特异性静电作用。硼酸盐是路易士酸性基团,能接受电子与蛋白质分子中亲核基团形成路易士酸-碱络合物,从而加强了硅胶表面的非特异性吸附能力。如果不设法消除,可以破坏蛋白质构象而使酶失活。

排阻效应和空间效应是由于硅胶孔径和空间障碍使配体与互补蛋白质分子间的亲和力受到限制。为了减小非特异性吸附、排阻效应和空间效应的影响,最好的方法是在硅胶和配体间引入一个间隔分子作为间隔臂。为使间隔分子与基质和配体结合牢固,间隔分子一端应含有能与硅胶形成硅醚键的硅氧烷基,另一端是能与配体键合的其它功能团如环氧基,胺基,烷氨基,巯基,乙烯基等。其中使用最多的是 γ -缩甘油氧丙基三甲氧基硅烷,当与硅胶偶合时可制成双醇硅胶,其反应如下^[4]:



除 γ -缩甘油氧丙基三甲氧基硅烷外, 一些常见的硅烷试剂见表 1。

表 1 一些常用的带反应功能团的烷氧基硅烷试剂^[2]

γ -氨丙基三甲氧基硅烷	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
γ -乙二氨丙基三甲氧基硅烷	$(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$
γ -氯丙烷基三甲氧基硅烷	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{Cl}$
γ -氰丙基三甲氧基硅烷	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$
β -(3,4-环氧环己基)-乙基三甲氧基硅烷	$(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}$
γ -缩甘油氧丙基三甲氧基硅烷	$(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}-\text{CH}_2$
γ -巯基丙基三甲氧基硅烷	$(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{HS}$
γ -甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷	$(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$

3. 配体

亲和色谱中所用的配体应对被分离蛋白质具有较高的生物特异作用, 满足上述条件的配体通常是酶的底物和抑制剂。根据配体对蛋白质分子选择性的高低, 常见的配体可分为“特异性”和“通用性”两类。特异性配体仅对指定酶具有亲和力, 而通用性配体可与一类或几类酶同时作用。这两类配体相比各有利弊, 特异性配体选择性高、使用方便, 但为数极少, 其特异性常随分离条件发生改变。因此, 对每个分离对象为获得特异性配体, 常常必须通过大量实验进行筛选。如果使用通用性配体, 可减小繁杂的筛选过程, 由此而失去的特异性, 可通过选择适当的洗脱条件得到补偿。表 2 列举的配体, 除胰蛋白酶抑制剂外, 其余均属通用型。

为提高配体的选择性, 近几年一些生物化学家试图用单克隆抗体 (McAb) 作配体来纯化一些生物大分子, 研究其结构和功能。由于单克隆抗体是针对单一抗原决定簇的, 因此其生

物特异性更高^[6], 有可能从酶的粗提取液中直接分离出所需要的酶。由于该法还处于试验阶段, 尚未扩大到 HPLAC 中。但是可以想象单克隆技术和色谱技术的结合, 将会对酶的分离和纯化带来新的希望。

表 2 HPLAC 中纯化酶用的配体^[2]

No	配体	分离的酶
1	AMP (腺苷-磷酸)	醇脱氢酶, 乳酸脱氢酶
2	ϵ -氨基己酰-L-Phe-OMe	蛋白酶, 胃蛋白酶
3	抗人肌酸激酶抗体	肌酸激酶
4	ConA(伴刀豆球蛋白 A)	葡萄糖氧化酶
5	赖氨酸	过氧化物酶
6	NAD (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)	乳酸脱氢酶
7	大豆胰蛋白酶抑制剂	胰蛋白酶, 胰凝乳蛋白酶
8	金属螯合体	胰蛋白酶, 毒性磷脂酶
9	cibacron 蓝 F3G-A	醇脱氢酶, 乳酸脱氢酶, 己糖激酶, 核糖核酸酶
10	procion 蓝 MX-R	乳酸脱氢酶
	procion 棕 MX-5BR	tRNA 合成酶
	procion 绿 H-4G	己糖激酶
	procion 红 H-8BN	碱性磷酸酶
	procion 黄 H-A	碱性磷酸酶, 羧基酯酶

二、HPLAC 中常用吸附剂的应用

1. 三嗪染料-硅胶

三嗪染料是一种通用配体,它对许多酶如脱氢酶及其同功酶^[7]、碱性磷酸酶^[8]、L-色氨酸-tRNA 合成酶^[9]和牛胰核糖核酸酶^[7]等具有很强亲合力。常见的三嗪染料有两类:三嗪环上含有一个氯的 cibacon 蓝 F3G-A 和 procion 黄 H-A 和含两个氯的 procion 蓝 MX-R 等。这两类染料结构和性能相似,不同的是前者反应活性较低不能直接偶合到硅胶的间隔臂上。由于三嗪染料造价便宜,便于保存,易固定到硅胶上,制备的吸附剂吸附容量较大,因此应用很广^[7-9]。Small^[8]用 procion 蓝 MX-R 硅胶吸附剂从 BSA (牛血清清蛋白)和 LDH (猪心乳酸脱氢酶)的混合物中分离出乳酸脱氢酶。Lowe 等^[7]把 6-氨基己基-cibacon 蓝 F3G-A 硅胶吸附剂用于蛋白质和酶的在线监测系统,快速连续地从简单或复杂提取液中分离和监测了猪心和兔肌乳酸脱氢酶及其同功酶,猪心苹果酸脱氢酶,马肝醇脱氢酶,己糖激酶,3-磷酸甘油酯激酶和牛胰核糖核酸酶 A。由于聚亚甲基疏水作用的影响,上述各种酶的分离必须用特殊洗脱液进行冲洗。脱氢酶及其同功酶用 NAD⁺(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)和 NADH (还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸),激酶用 MgATP (三磷酸腺苷-Mg),而牛胰核糖核酸酶 A 用 2'-CMP (2'-胞苷酸)。整个操作在室温 (20—22℃)下进行。

为了大规模地从粗提取液中纯化兔肌乳酸脱氢酶,Small 等^[9]将制成的 procion 蓝 MX-R 硅胶吸附剂(粒度 40—63 μm,配体浓度 12 微摩/克、干硅胶)填充在 30×2.5cm 的不锈钢柱中,用 pH = 7.0 的 HEPES (N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙基磺酸)缓冲液平衡后,脉冲注入 NADH,从粗提取液中纯化出均匀的兔肌乳酸脱氢酶,产率为 80% 以上,比活性提高了 5.1 倍,从进样到收集不超过 15 分钟。吸附剂容量为 0.33mg 纯酶/每克硅胶。

Small^[8]用 6-氨基己基-procion 绿 H-4G 硅

胶吸附剂纯化酵母己糖激酶时发现, Mg²⁺对酶在吸附剂上的键合有明显促进作用。当注入的缓冲液中无 Mg²⁺时,己糖激酶在柱的空体积流出,当缓冲液中含 6mmol/L 的 Mg²⁺时,酶定量地结合在吸附剂上,并用 10mmol/L ATP-10 mmol/L D-葡萄糖可以有效地洗脱出。图 1 表示 Mg²⁺浓度对酶结合率的影响。从图看出酶的结合率随 Mg²⁺浓度增加,当 Mg²⁺浓度达到一定值后(如≥2.0mmol/L),曲线变化平稳,这就意味染料-Mg²⁺-酶三元络合物的形成。有趣的是 Mg²⁺对酵母己糖激酶在 6-氨基己基-cibacroⁿ 蓝 F3G-A 硅胶和 6-氨基己基-procion 黄 H-A 硅胶吸附剂上的结合影响很小。

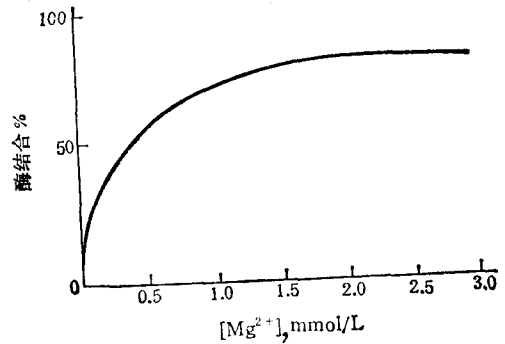


图 1 Mg²⁺对酵母己糖激酶在 procion 绿 H-4G 柱上结合的影响

其它金属也可以促使酶的结合,如 Zn²⁺可促使羧肽酶 G₂在 procion 红 H-8BN 硅胶吸附剂上的结合,牛肠碱性磷酸酶在 procion 黄 H-A 硅胶上的结合,但用 Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺ 等代替 Zn²⁺却不发生影响。上述事实表明,金属对酶在吸附剂上结合的影响是有选择性的,利用这种选择性可以提高配体的特异性。

2. ConA-硅胶

外源凝集素如 ConA 对糖类具有很强亲合能力,因此可用来分离一些糖蛋白如过氧化物酶和葡萄糖氧化酶等。Borchert^[10]用席夫碱法制成 ConA-硅胶吸附剂(100—1000 Å),有效、快速地(5—30 分钟)分析和纯化了过氧化物酶和葡萄糖氧化酶。吸附剂性能十分稳定,室温下连续使用 60 次被分离物的容量比 k' 不

变。

3. 抑制剂-硅胶

蛋白质水解酶与其对应的肽抑制剂具有特异的亲和力,因此可用肽抑制剂作配体纯化许多蛋白酶。常用的肽抑制剂有两类:一类是天然高分子量的蛋白酶抑制剂如卵类粘蛋白和赖氨酸,另一类是人工合成低分子量的抑制剂如 *p*-氨基苯脒和 *N*-苄氧基羰基氨乙酰-D-苯基丙氨酸。

Kasche 等^[11]用天然大豆胰蛋白酶抑制剂(ST1)作配体,制成 ST1-硅胶生物特异吸附剂。用 KH_2PO_4 缓冲液洗脱,成功地分离了 α -和 β -胰蛋白酶, α -胰凝乳蛋白酶和胰凝乳蛋白酶原。并考察了 HPLAC 的柱效,发现 HPLAC 的塔板高度($\approx 1\text{cm}$)较 HPLC($\leq 0.1\text{cm}$)大得多。导致 HPLAC 柱效降低的原因可能由于酶-配体离解速度常数较低和酶到吸附剂表面液相传质速率较小的缘故。

Walters^[12]利用大豆胰蛋白酶抑制剂-硅胶吸附剂,在 $6.35\text{mm} \times 4.1\text{mm}$ 的微型柱上,仅用 18 秒钟从胰蛋白酶的粗制品分离出胰蛋白酶。用微型柱的优点是填充剂用量少,非特异性吸附小,峰形窄,分析速度快、且可以在低压下操作(50—300 p.s.i)是很有前途的一种分离技术。

在人工合成抑制剂方面, Turkova^[13]把 *p*-氨基苯脒和 *N*-苄氧基羰基氨乙酰-D-苯丙氨酸分别固定到 1, 6-己二胺修饰过的甲基丙烯酸羟烷酯聚合物上,纯化了胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶。将羧酸蛋白酶抑制剂 ϵ -氨基己酰-L-Phe-D-Phe-OMe, 固定到环氧氯丙烷修饰过的甲基丙烯酸羟烷酯聚合物上,制成对胃蛋白酶有特异性的吸附剂。

Turkova 实验证明,在类似条件下用合成抑制剂和天然抑制剂分离蛋白质水解酶,效果相同。但由于天然抑制剂不太稳定,放置过程易变性而失活,因此不如人工合成抑制剂应用广泛。

4. AMP-硅胶

AMP 对脱氢酶具有良好的亲和力,可用来

分离脱氢酶及其同功酶。Ohlson^[14]在 N^6 -(6-氨基己基) AMP-硅胶吸附剂上,用生物特异洗脱技术高速度地分离了 LADH (乙醇脱氢酶)和 LDH (乳酸脱氢酶)。LADH 与脉冲加入的 NAD^+ + 吡唑形成三元复合物流出柱外,而 LDH 与 NAD^+ + 丙酮酸酯形成三元复合物。Ohlson 在同一柱上,用 NADH 的磷酸钠缓冲液进行梯度洗脱,从 BSA + LDH (H_1 , 猪心) + LDH (M_1 , 兔肌) 混合液中分离出猪心和兔肌乳酸脱氢酶的同功酶,所有操作室温下进行。

5. 金属螯合配体吸附剂

近几年随着新的耐压金属螯合载体例如 TSK_{gel}G5000PW ($\phi 10\mu\text{m}$) 的出现, Porath^[14]提出的金属螯合亲和色谱法也开始用于 HPL-AC 中。KaTo 等^[15]在 Zn-5PW 柱上,成功地分离和检测了核糖核酸酶 A, 转铁蛋白和碳酸酐酶的混合物,得到分辨率可与离子交换色谱,反相色谱和疏水色谱相比的尖锐峰(图 2)。核糖核酸酶 A 的回收率 93%, 流出时间不到 15

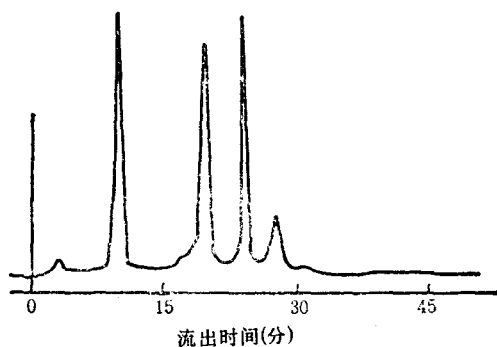


图 2 核糖核酸酶 A(1), 转铁蛋白(2)和碳酸酐酶(3)在 Zn-5PW 柱上谱图

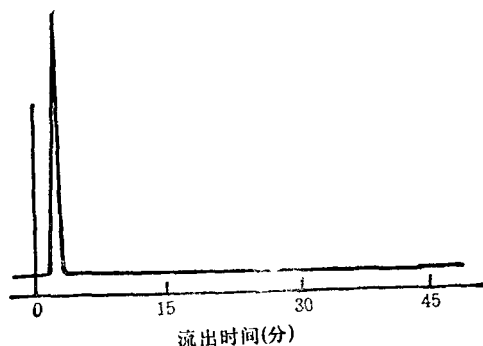


图 3 与图 2 相同混合物在无 Zn^{2+} 柱上得到的谱图

分钟。如果色谱柱无 Zn^{2+} 存在,则所有蛋白质将在柱空体积流出(图 3)。由此可见蛋白质在 Zn-5PW 柱上的保留,是由于蛋白质与载体上亚氨基二乙酸- Zn^{2+} 螯合物作用的结果。

KaTo 等还用 Zn-5PW 柱纯化了脂肪氧化酶粗样,通过活性试验,酶的回收率达 90%,比活性提高 7.5 倍。进一步用不同进样量的脂肪氧化酶粗样研究了 Zn-5PW 吸附剂的柱容量,给出在最大分辨率时,最大负荷约为 2 毫克样品。当用该柱分离商品苹果酸脱氢酶时,酶的回收率为 95%,比活性提高 3.9 倍。

由此可见,利用各种蛋白质对重金属亲和力不同这一性质,可以选择性的分离许多酶。由于 TSK-螯合-5PW 载体有几千 Å 的孔径,因此有可能用来纯化分子量很大的蛋白质。此外,它的化学性质很稳定,25°C 在 0.5mol/L NaOH 或 20% 醋酸中悬浮 10 天,亚氨基二乙酸的含量无明显变化。因此,可望金属螯合亲和色谱法将成为分离蛋白质的一项重要技术。

三、结 束 语

HPLAC 问世至今已有八、九年历史,由于该法具有高效,快速,选择性和分辨率高的特点,引起许多生物化学家和色谱学家的极大兴

(上接第421页)

- [9] Margolis, R. L. et al: *Nature (Lond.)*, 1981, 293, 705.
- [10] Saxton, W. M. et al.: *J. Cell Biol.*, 1984, 99, 2175.
- [11] Hill, T. L. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1983, 80, 7234.
- [12] Salmon, E. D.: *Molecular Biology of the Cytoskeleton*, 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1984,

趣^[16]。可以想象这一新的分离技术,在大规模地分离纯化生物大分子,研究其结构和功能方面将发挥更大的作用。进一步研究配体的亲和理论,开发新的选择性高,柱容量大的吸附剂和洗脱技术,仍是今后研究工作关注的问题。

参 考 文 献

- [1] Ohlson, S. et al.: *FEBS Lett.*, 1978, 93, 5.
- [2] Dean, P. D. C. et al.: *Biochemical Society Transactions*, 1985, 13(6), 1055.
- [3] Larsson, P. O. et al.: *Adv. Chromatog.*, 1982, 21, 41.
- [4] Glad, M. et al.: *J. Chromatog.*, 1980, 200, 254.
- [5] Elving, P. J.: *Affinity Chromatography, Bioselective Adsorption on Inert Matrices*, 1981, 30.
- [6] 李勇等:《生物化学与生物物理进展》,1986,(3),54.
- [7] Lowe, C. R. et al.: *J. Chromatog.*, 1981, 215, 303.
- [8] Small, D. A. P. et al.: *J. Chromatog.*, 1981, 216, 175.
- [9] Small, D. A. P. et al.: *J. Chromatog.*, 1983, 266, 151.
- [10] Borchert, A. et al.: *J. Chromatog.*, 1982, 244, 49.
- [11] Kasche, V. et al.: *J. Chromatog.*, 1981, 216, 169.
- [12] Walters, R. R.: *Anal. Chem.*, 1983, 55, 1395.
- [13] Gribnau, J. C. J. et al. (Editors): *Affinity Chromatography and Related Techniques*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1982, 513—529.
- [14] Porath, J. et al.: *Nature*, 1975, 258, 598.
- [15] Kato, Y. et al.: *J. Chromatog.*, 1986, 354, 511.
- [16] 姚志建,《生物化学与生物物理进展》,1985,(4),60.

【本文于 1987 年 9 月 28 日收到】

- Section 1, 99—109.
- [13] Rothwell, S. W. et al.: *J. Cell Biol.*, 1986, 102, 619.
- [14] Raff, E. C. et al.: *Molecular Biology of the Cytoskeleton*, 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1984, Section 2, 293.

【本文于 1987 年 8 月 20 日收到】