

蛋白质的染料亲和色谱分离纯化

冯 文 科

(西北大学化学系, 西安 710069)

提 要

介绍了三嗪染料配基亲和色谱(包括高效亲和色谱)分离纯化蛋白质的基本原理和方法,并介绍了染料亲和色谱固定相制备方法及应用的最新发展。

关键词 亲和色谱,三嗪染料,蛋白质

早在 1965 年,人们就用三嗪染料-葡聚糖作为凝胶过滤的死体积测定物质^[1]。当三嗪染料存在于分离体系时,许多蛋白质都表现出不寻常的行为^[2]。后来发现,这是因为三嗪染料的生色团对某些蛋白质起到了一定的亲和作用。因此,以染料作为配基的所谓“基团特异性”或“一般配基”亲和色谱很快被人们所认识并得到了广泛应用^[3],成为蛋白质纯化分离的一种有力工具。近年来,高效液相亲和色谱(high-performance liquid affinity chromatography, HPLAC)的出现使它在生物大分子物质分离纯化中显示出更大的潜力。

三嗪染料是一种反应性染料,它包括三个部分,即活性三嗪环(用于与载体偶联),多芳香环和离子性磺酸基团。就作为亲和色谱配基而言,三嗪染料分为两类,一类是二氯三嗪染料,它的三嗪环上有两个氯,较为活泼,室温下就可与适当载体偶联;另一类是一氯三嗪染料,它是前者的一个氯被一些功能基团取代而得(图 1),一氯染料反应性稍低,在亲和色谱中特别是高效亲和色谱中,一般先要将取代氯转变为

6-氨基己基衍生物然后再与载体连接。

1 染料亲和色谱固定相制备方法

1.1 基质 理想的基质应是刚性多孔,具有化学和生物稳定性,亲水的并能连接较多染料的基质。经典染料色谱基质包括琼脂糖、葡聚糖、聚丙烯酰胺、纤维素和多孔玻璃,文献[4]报道了这些基质之间的差别。从柱容量看,琼脂糖较纤维素和聚丙烯酰胺好,葡聚糖与琼脂糖相当。软基质的缺点是它们不耐压,不允许进行加压高流速操作,分离效率低且生物稳定性稍差。近年来,随着高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)的发展,硬基质硅胶、可控孔径玻璃及高分子聚合物也成为 HPLAC 的基质。Walters^[6] 证明在 HPLAC 硅胶基质选择上,最好用大孔材料,小孔径硅胶会使柱效明显降低。最近 Anspach^[7] 又证明了非孔性硅胶键合三嗪染料也适用于许多酶的分析 and 制备,并且有更高的柱效。

1.2 间隔臂 最初制备三嗪染料亲和材料,是用染料与基质直接偶联而得。后来发现,在三嗪染料与基质之间插入一间隔分子,不但使反应易于进行,更重要的是可以增加分离蛋白质的选择性。软基质常用葡聚糖、己基和聚乙烯撑亚胺基等作为间隔分子。HPLAC^[4] 常用

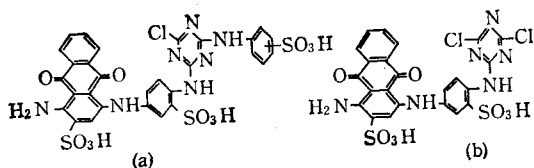


图 1 两种典型的三嗪染料

(a) Cibacron Blue F3GA (b) Procion Blue MX-R

收稿日期: 1991-03-15

修回日期: 1991-05-27

γ -缩甘油氧丙基三甲氧基硅烷^[8,9]、3-氨丙基三乙氧基硅烷^[2]等作为间隔分子。

1.3 配体与基质的连接 三嗪染料与软基质的连接通常有三种方法：一种是通过基质上或间隔臂上的羟基等与染料三嗪环上氯原子反应。第二种方法是三嗪染料蒽醌环上的氨基与溴化氰或 N-羟基琥珀酰亚胺活化的琼脂糖等连接，其缺点是三嗪环没有钝化，可能与蛋白质发生不可逆吸附。第三种方法是采用物理吸附的方法^[11]，不足是结合不牢固。第一种方法更为常用。在 HPLAC 中，亦是通过三嗪环上的氯与已接成间隔臂的硅胶直接反应连接^[10]。

2 染料亲和色谱的操作条件

一次成功的色谱分离受着诸多因素的影响，如柱子形状、流速、进样体积等，在这些方面染料亲和色谱与生物特异性亲和色谱基本相同。

2.1 pH 一般来说，蛋白质在低的 pH 时与三嗪染料结合更为牢固，因此保留时，需选用低的 pH 值，洗脱时则用高的 pH 值。

2.2 配体浓度 仔细调整染料配体的浓度可以改变纯化因子。这种调整可用二个方法进行。一是在合成时引入不同量的配体，这时每一颗粒基质上的染料浓度是相同均一的。二是在一定浓度的染料-基质中加入未键合染料的基质，这时每一颗粒的染料浓度是不均匀的。例如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶在染料柱上明显的不可逆吸附，可用降低配基浓度的方法来解吸。

2.3 洗脱方式 根据研究目的及蛋白与染料的作用大小，可用脉冲、分段、梯度及停流洗脱。

2.4 洗脱剂的选择 磷酸盐、辅酶和核苷酸、底物、多元醇、表面活性剂及 pH 等洗脱剂都适用于染料亲和色谱。Dean^[3]发现，纯化从羊肝等材料中提取的各种脱氢酶时，KCl 或 pH 洗脱比核苷酸特异性洗脱能得到更为尖锐的峰，纯化后比活性更高。

2.5 染料的选择 目前大量使用的 Cibacron Blue F3G-A(CB) 染料可用来纯化 a. 吡

啶核苷酸依赖的脱氢酶，b. 各种激酶，包括水解酶，乙酰基转移酶，磷酸水解转移酶，RNA 和 DNA 核酸酶和限制性核酸内切酶等，c. 肌球蛋白，各种血蛋白及干扰素等。比较 CB 和 Procion Red HE-3B，前者适于纯化 NAD⁺ 依赖的脱氢酶，后者对 NADP⁺ 依赖的脱氢酶则更有亲和性。

关于蛋白质与其他三嗪染料结合的特异性至今没有系统报道。

2.6 温度 温度对蛋白质在染料柱上吸附解吸的影响报道很少。从 CB 和 Procion Red HE-3B 柱上洗脱 6-葡萄糖磷酸脱氢酶时，随着温度的升高，洗脱所需盐的浓度增加。

3 三嗪染料与蛋白质的作用机理

三嗪染料与蛋白质的作用机理是很复杂的。最初 Thompson^[12]提出了 CB 与一定的激酶和脱氢酶的作用基础，他认为蓝色葡聚糖的生色团起着类似于核苷酸和辅酶的作用，模仿了天然核苷酸底物的整个形状、芳香性和电荷分配。后来发现，一些不具有核苷酸折迭结构区域的蛋白质也对 CB 显示出亲和性，所以这种核苷酸特异性作用机理显然不够全面。

因为染料生色团含有氨基和磺酸基，并有一定的芳香性，所以离子交换及疏水作用必然存在。Easterday 证明了众多的蛋白质都与 CB 有非特异性结合作用。当疏水作用起主导作用时，可用降低盐浓度，变化 pH 甚至加有机溶剂使蛋白洗脱，当离子交换起主导作用时，可在低 pH 下使蛋白质吸附，而在高 pH 下使其洗脱。依据这种非特异性作用机理，使洗脱剂无须用核苷酸底物类，而用 pH 变化或离子强度则可达到洗脱的目的。

二价金属离子在染料亲和色谱中起到了良好的作用。Zn²⁺ 与己糖激酶的 ATP 和 D-葡萄糖位置在 CB 上发生竞争吸附，使己糖激酶的吸附减弱；低浓度的 Zn²⁺、Mg²⁺ 能使羧肽酶 G2、碱性磷酸酶、己糖激酶和卵清蛋白在 CB 上结合更为牢固，卵清蛋白在金属离子不存在时几乎不与染料结合。据认为这是因为金属离子

在染料和蛋白质之间作为桥形成三元络合物,也可能是因为金属阳离子中和了染料的负电荷,因而增加了染料与蛋白之间的疏水作用。

4 应用

由于三嗪染料亲和色谱具有纯化效率高,价格便宜而适于大规模纯化等显著优点使它无论在蛋白质的分离或制备中都得到了普遍应用。

4.1 蛋白质的亲和色谱分离纯化

Dean 和 Watson^[3] 列举了众多文献说明使用固定化染料纯化蛋白质到均一化。例如,固定化 Procion Brown MX-5BR 和 Green HE-4BD 分别用于纯化 tryptophanyl-tRNA 137 倍并使它和 methionyl-tRNA 合成酶纯化到均一。干扰素的纯化充分说明了三嗪染料的优点。干扰素显著的抗病毒和免疫活性使它成为一种很有价值的生物制品,用经典凝胶或离子交换色谱或免疫亲和色谱纯化证明都不理想,但是用 CB 染料纯化却得到了满意的结果^[16]。徐伟军^[17]等用艳蓝 K-GRS 和红色活性染料柱,以小牛肠粘膜为原料,纯化了碱性磷酸单酯酶,产率达 23% 以上,纯化系数达 1300。

4.2 蛋白质的制备色谱纯化

由于三嗪染料价格便宜,易于固定化,使它用于大规模亲和色谱很理想^[14,15,19]。Procion 染料色谱已用来大规模纯化 3-羟基丁脂脱氢酶。1000g 去细胞萃取物加到 1.5L Procion Red HE-3B 琼脂糖柱上,用 1mol/L KCl 分段洗脱 3-羟基丁脂脱氢酶,同时,用 2mmol/L NADH 洗脱苹果酸脱氢酶。3-羟基丁脂脱氢酶部分收集后,透析以除去盐,然后加到 1L 琼脂糖-Procion Blue MX-4GD 柱上,用 3mmol/L NADH 洗脱,得到了 300mg 均一酶,产率 80%。苹果酸脱氢酶部分透析后也加到琼脂糖-Procion Blue MX-4GD 柱上,用 0—700mmol/L KCl 洗脱,得到 1g 均一酶,回收率 70%,以上对于 3-羟基丁脂脱氢酶的纯化使原来的九步纯化步骤大为缩短。

Scawen^[19]等从 *B. stearothermophilus* 中,用

染料亲和柱大规模纯化了甘油激酶。从 DEAE-葡聚糖柱上部分纯化的甘油激酶,可用 3.5L 琼脂糖-Procion Blue MX-3G 柱,以 5mmol/L Mg^{2+} , 5mmol/L ATP 洗脱。纯化得到 10g 均一酶,回收率 80%。这些例子都证明了三嗪染料亲和色谱可用于一些重要酶的大规模纯化。

4.3 HPLAC 应用

染料亲和色谱最重要的发展是 HPLAC。80 年代以来,由于 HPLC 技术的逐渐成熟,用三嗪染料作配基的 HPLAC 得到了迅速发展^[5-9]。

Lowe^[9] 将 CB 氨基化,然后与已接上间隔臂的双醇硅胶键合得到 CB-硅胶高效柱,高效分离了牛血清蛋白 (BSA),并分离了 LDH 的两种同工酶 LDM-M4 和 LDH-M4 和 BSA 的混合物。

Small^[8] 用 Procion Blue MX-R-硅胶柱

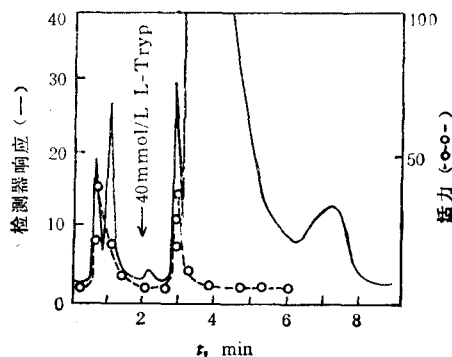


图 2 L-tryptophanyl-tRNA Synthetase 在 CB 染料柱上的高效亲和色谱

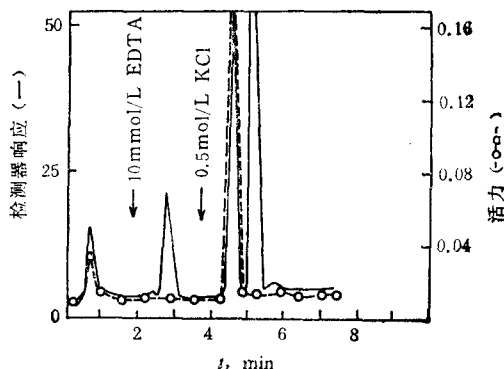


图 3 羧肽酶 G2 在 Procion Red H-8BN 染料柱上的高效亲和色谱

和 Procion Brown MX-5BR-硅胶柱分别分离了 LDH 及 L-tryptophanyl-tRNA 合成酶, 部分纯化的羧肽酶 G2 也在 CB-硅胶柱上得到了很好分离(图 2,3)。

Small^[3] 将 Procion Blue MX-R 键合到制备级硅胶上, 大规模纯化了 LDH。他将粗的兔肌乳酸脱氢酶提取液 1ml 加到了染料高效柱上, 用 2mmol/L NADH 脉冲洗脱, 在 5min 内得到基本纯的酶, 产率达 80% 以上(图 4)。

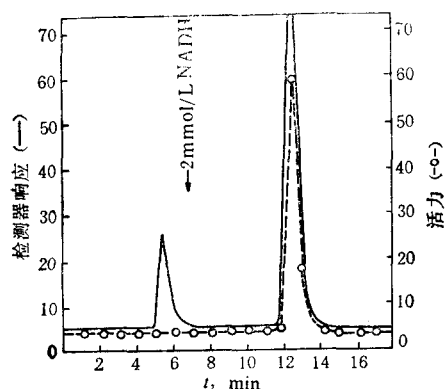


图 4 兔肌乳酸脱氢酶在 Procion Blue MX-R 柱上的高效亲和色谱

我们^[6]将 CB 通过新的方法键合到大孔硅胶上制成高效染料柱, 用于人白细胞干扰素及基因工程 α -干扰素的分离也得到了满意的结

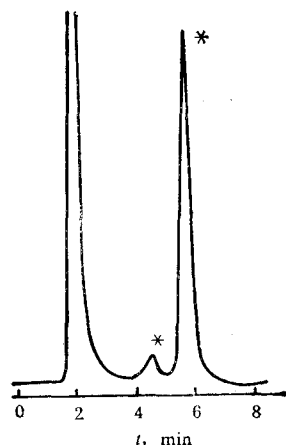


图 5 r-IFN- α_D 在 CB 柱上的高效亲和色谱
* 干扰素峰

果(图 5), 由于 HPLC 技术的高效、高速、全自动化等优点使得染料 HPLAC 技术无论在分析或制备方面都显示出巨大的潜力。

结 语

三嗪染料亲和色谱主要具有以下几方面的特点: a. 纯化效率高, 产率高; b. 作为一种亲和色谱材料, 可有多种用途, 纯化不同的蛋白和酶; c. 染料价格便宜, 适用于大规模制备; d. 采用了高效亲和色谱, 更使它具有高分辨率, 高速等特点。由于以上特点, 三嗪染料亲和色谱特别是高效染料亲和色谱已成为生物大分子物质分离纯化不可缺少的工具。目前的工作主要是 a. 弄清染料与蛋白质的作用机理, 为进一步优化洗脱条件找到依据; b. 合成新的高效的染料色谱固定相, 特别是制备高效色谱固定相, 为天然生物制品及生物工程产品的后处理创造条件。

参 考 文 献

- 1 Andrews P. *Biochem J*, 1965; 96: 595
- 2 Kopperschlager G, Frigyer R, Diezel W et al. *FEBS Lett*, 1968; 1: 137
- 3 Dean P D G, Watson D H. *J Chromatogr*, 1979; 165: 301
- 4 Angal S, Dean P D G. *Biochem J*, 1977; 167: 301
- 5 Lowe C R, Small D A P et al. *J Chromatogr*, 1981; 215: 303
- 6 Walters R R. *J Chromatogr*, 1982; 249: 19
- 7 Anspach B, Unger K K, Davis J et al. *J Chromatogr*, 1988; 457: 195
- 8 Small D A P, Atkinson T. *J Chromatogr*, 1981; 216: 175
- 9 Clonis Y D. *J Chromatogr*, 1987; 407: 179
- 10 李华儒. 生物化学与生物物理进展, 1988; 15: 428
- 11 Baird J. *FEBS Lett*, 1976; 70: 61
- 12 Stellwagen E, Thompson S T. *Nature*, 1975; 257: 716
- 13 Stellwagen E. *J Chromatogr*, 1983; 266: 151
- 14 Hupher P, Lowe C R. *Biochem Biophys Acta*, 1982; 700: 90
- 15 Robinson J B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981; 78: 2287
- 16 冯文科, 耿信笃. 第七次全国色谱学术报告会论文集. 北京: 1989; 389
- 17 徐伟军等. 生物化学与生物物理学报, 1986; 18: 410
- 18 Ledger R. *J Chromatogr*, 1984; 299: 175
- 19 Scawen M D et al. *Anal Biochem*, 1983; 132: 413