

通用性配体亲和层析

熊克勇

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

提 要

通用性配体亲和层析采用稳定、价廉的简单配体与固相基质连接形成亲和吸附剂, 这种吸附剂已广泛应用于蛋白和多肽等的分离纯化。本文介绍三种通用性配体亲和层析方法的基本原理和应用, 包括金属螯合物配体亲和层析、染料配体亲和层析和组氨酸配体亲和层析。

关键词 亲和层析, 通用性配体亲和层析, 蛋白质纯化

亲和层析是一种具有高度选择性的生物大分子的纯化方法, 特别适于纯化那些对纯度要求高的产物(如医用蛋白和肽)。由于这种方法具有很好的浓缩效果, 也适于从大体积样品中分离纯化含量很少的物质。近年来, 这种方法在蛋白、肽和多核苷酸的分离纯化中已获广泛应用^[1,2], 适合实验和生产规模使用的亲和吸附剂也不断增加^[3,4]。

(如受体、抗体), 后者的配体为非生物分子(如金属和染料)和简单的生物分子(如氨基酸)。表 1 为这两类亲和层析的常用配体^[5]。

1 两类亲和层析比较

亲和层析利用配体与被分离的生物分子间的吸附作用(如静电吸附、疏水作用吸附和免疫吸附等), 首先选择性地吸附样品中的某些生物分子, 然后在一定条件下分别将吸附物从配体上洗脱, 从而达到纯化的目的。

特异性配体亲和层析所用的配体只与样品中某种生物分子特异作用, 如免疫亲和层析中以单克隆抗体为配体时, 能高度选择性地吸附相应的抗原。但是, 这类层析所用的配体昂贵, 不易连接到基质上, 在使用过程中可能出现配体渗漏, 这些缺点妨碍了它的广泛应用, 特别不利于用在大规模的纯化中。通用性配体亲和层析所用的配体在一定条件下可与一种或几种生物分子作用, 这种配体一般是简单的小分子, 用这种配体纯化具有容量高、花费低等突出优点。另外, 通过改善吸附和脱附条件, 可以补偿通用性配体亲和层析特异性较差的缺点。因此, 这类配体也广泛用于高效液相亲和色谱 (HPLAC)

表 1 根据连接配体将亲和层析分为两类

亲和层析			
特异性配体亲和层析		通用性配体亲和层析	
强特异性配体	弱特异性配体	非生物分子配体	生物分子配体
受体; 激素抑制剂; 激活剂; 抗原; 抗体底物	辅因子及其片段外源凝集素其它如调钙蛋白	金属离子(如 Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} 等)三噻染料疏水性手臂	氨基酸(如组氨酸等)

亲和层析利用连接到固相基质上的配体与生物分子作用, 选择性地分离纯化生物分子。根据连接的配体不同将亲和层析分为两大类, 即特异性配体亲和层析 (Biospecific ligand affinity chromatography) 和通用性配体亲和层析 (Pseudobiospecific ligand affinity chromatography), 前者连接的配体为复杂的生物分子

中^[6]。表 2 比较了这两类亲和层析的主要参数。

2 金属螯合物配体亲和层析

这种亲和层析方法始于 70 年代^[7]，近几年已广泛用于生物分子的分离纯化。Porath 等^[8]详细论述了这种亲和层析配体的作用原理和制备方法，现摘要介绍如下：

2.1 作用机理

过渡金属离子如 Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 等能与电子供体的 N, S 和 O 等原子以配位键连接。用亚氨二乙酸一类螯合试剂与金属离子作用，生成带有多个配位基的金属螯合物（图 1）。这类螯合物在水介质中与水分子高度溶剂化，具有活泼的羟基和由盐产生的活性基因。这些与基质连接的金属螯合物上的配价位点就是生物分子的吸附位点，这些位点在溶液中由溶

表 2 特异性配体亲和层析和通用性配体亲和层析的比较

比较参数	特异性配体亲和层析	通用性配体亲和层析		
		金属螯合物配体亲和层析	染料配体亲和层析	组氨酸配体亲和层析
特异性	高	较高；基团特异性；仔细调整吸附/脱附条件可提高。	中等；有基团特异亲和吸附的可能。	高；与吸附条件有关。
结合强度 (K_i 值)	高(10^{-7} — 10^{-15})	中(10^{-3} — 10^{-6})	中(10^{-4} — 10^{-7})	低(10^{-2} — 10^{-4})
偶联方法	各种方法；通用的是 CNBr 活化	通过环氧基	直接吸附或化学偶联	通过环氧基
脱附的方便程度	中	易	易	易
容量	低(配体利用率 0.1—10%)	高	高	中
重复使用和稳定性	低；配体阻塞，配体变性；不能用浓 NaOH 溶液清洗	高；可以脱掉金属然后重新装载	高	高；可用浓 NaOH 溶液清洗
特定柱基质的挠性	低	高	高	高
费用	高	低	最低	低
配体渗漏和渗漏配体毒性	中到高；有些配体有严重的污染(如单克隆抗体)	正常操作条件下无渗漏；无毒性。	很高；蓝色染料 F3GA 对鼠的 LD_{50} 为 5mg/kg 体重	无渗漏；非毒性配体

剂分子或阴离子所占有。因此，在制备连接基质的螯合物配体时，要综合考虑两个因素，即配价金属的稳定性和金属螯合物的配价位点数。在这类螯合物的制备中，常用羧甲基胺作螯合剂^[9]，图 1 中用亚氨二乙酸 (IDA) 和二乙二胺 (TED) 两种螯合剂，分别产生不同吸附位点的螯合物，它们对吸附蛋白的选择性和容量也不同。

生物分子与金属螯合物之间有三种作用机制(图 2)。第一种为静电吸附(图 2a)，例如，由图 1 产生的 Cu^{2+} -IDA-Sepharose 载体就带有净负电荷，这种载体可用来分离表面氨基酸残

基带正电荷的蛋白，如带精氨酸的蛋白^[10]。第

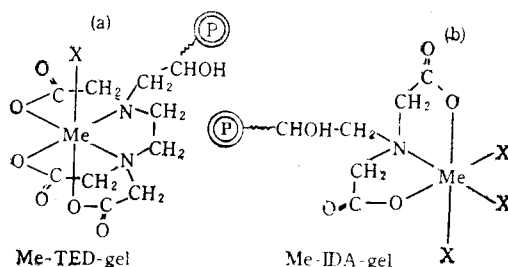


图 1 与基质连接的金螯合物结构^[8]

(a) 螯合剂为 TED; (b) 螯合剂为 IDA。

Me. 配位价为 6 的金属; P. 基质; X. 吸附位点

二种为配价键结合(图 2b), 蛋白表面的组氨酸、半胱氨酸、色氨酸等残基与金属离子(Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 等)就是以这种方式作用的, 这些氨基酸残基上的咪唑等基团上的未共用电子对与金属之间形成配价键。第三种为共价键结合(图 2c), 金属离子与蛋白表面含硫的基团作用形成共价键。了解这三种作用机制有利于正确地选择金属螯合物配体、建立合适的层析条件。

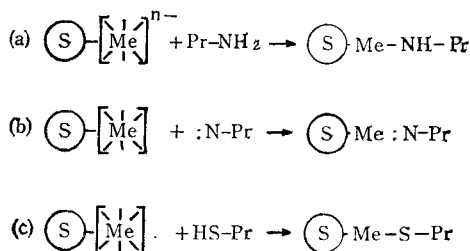


图 2 金属离子与蛋白作用的机理
(a) 静电和电荷诱导作用; (b) 配价键结合; (c) 共价键结合。
S. 载体; Me. 金属; Pr. 蛋白

2.2 应用

Krishnan 等^[11]用金属螯合物配体亲和层析成功地分离了一组丝氨酸羧肽酶的同工酶, 用 Ni^{2+} 、 Fe^{3+} 等金属螯合物配体分离纯化血清蛋白已获得满意的结果^[8], 用 Zn^{2+} 螯合的亲和柱能大规模地纯化重组的血纤维蛋白溶酶原活化剂^[12]。蛋白对 IDA-Me^{2+} 的吸附一般在碱性条件下, 加入盐 (1mol/L NaCl) 既可抑制非特异的离子吸附, 又可增强选择性, 增加金属与蛋白表面氨基酸之间形成络合物的稳定性。

有三种方法将吸附到金属螯合物配体上的蛋白脱附。第一种为络合物排除法, 采用一种螯合剂(如 EDTA) 洗脱层析柱, EDTA 与载体上的金属离子形成一种更稳定的络合物, 有效地排除掉吸附在金属离子上的蛋白。这种方法对蛋白的脱附缺乏选择性(图 3a), 因此其应用局限性很大, 只有被纯化蛋白为吸附的唯一蛋白时才能用这种方法。第二种方法为配体交换法, 用一种与吸附蛋白竞争性结合的溶质洗脱层析柱, 特异性地将吸附的不同蛋白分别洗脱下来(图 3b), 这类竞争性溶质包括含 $-\text{NH}_2$ 、

$-\text{COOH}$ 、 $-\text{SH}$ 等基团的物质和咪唑等取代剂。第三种方法为质子化法, 用较低 pH 的缓冲液洗脱层析柱, 将吸附程度不同的蛋白分别脱附下来(图 3c)。实验表明, 后两种脱附方法具有较好的选择性。图 3 为上述三种脱附方法的示意图。采用后两种方法将丝氨酸羧肽酶的三种同工酶分成三个洗脱峰, 而用络合物排除法只能得到一个洗脱峰。

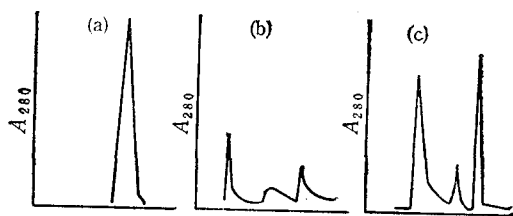


图 3 三种洗脱方法的结果比较
用 IDA-Cu^{2+} 配体吸附三种丝氨酸羧肽酶, 然后用不同方法洗脱
(a) 络合物排除法; (b) 配体交换法; (c) 质子化法(用 HCl 梯度洗脱)

3 染料配体亲和层析

染料配体亲和层析是一种发展很快的蛋白纯化技术, 主要用来纯化以核苷酸和脱氢辅酶为底物的酶^[13]。以染料为配体的吸附剂容易制备, 生化特性稳定, 容量高, 因此, 这种方法特别适用于生物分子的大规模纯化。

3.1 作用机理

染料配体亲和层析采用三嗪(三氮杂苯)染料与固相基质连接, 这类染料是多环芳香族的磺化物, 含有三嗪反应基团, 这种结构加速了染料与基质的连接。图 4 是应用最广的一种三嗪染料的化学结构, 它的很多功能团都能与蛋白作用, 这些作用包括离子作用、疏水作用和电荷转移等。在一定的 pH 和离子强度条件下, 染料与蛋白表面残基上的电荷和疏水性差别等综合因素造成了蛋白对染料的选择性吸附。有关染料配体亲和层析的详细作用机理尚待进一步研究^[14]。

3.2 应用

Angal^[14] 对染料配体吸附剂的制备和应用

已有详细论述。很多商品的三嗪染料都可作亲和吸附剂的配体,根据染料含氯原子的不同将其分为两类,表 3 列出了适合用作配体的各种染料。

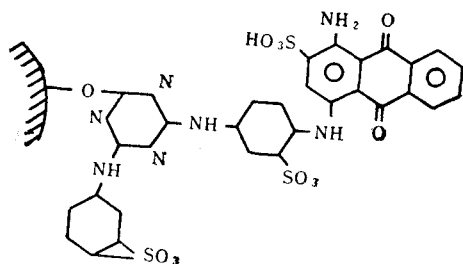


图 4 三嗪染料的化学结构
染料为 Cibacron 蓝色 F3GA

表 3 适合用作亲和层析配体的三嗪染料¹⁾

单氯三嗪染料	二氯三嗪染料
Procion blue H-B	Procion brown MX-5BR
Procion blue HE-RD	Procion blue MX-4GD
Procion red H-8BN	Procion blue MX-R
Procion green H4G	Procion rubine MX-B
Procion green HE-4BD	Procion scarlet MX-G
Procion brown H-2G	Procion orange MX-G
Procion red HE-3B	Procion yellow MX-8G
Procion violet H-3R	
Procion turquoise H-A	
Procion yellow H-A	

1) 接近表上部的染料结合的蛋白比下部染料多

用染料配体亲和层析纯化酶等生物分子已有大量报道。郑榕岚等采用国产红色染料 Procion red HE3B 为配体,从人肝中成功地纯化了 L 型丙酮酸激酶^[15];徐伟军等也用国产染料制成的吸附剂从小牛肠粘膜中成功地纯化了碱性磷酸单酯酶^[16]。他们的实验证实,采用染料配体亲和层析纯化步骤简便,产率高,层析柱可以反复使用,特别适用于大规模纯化。同时,这种层析方法吸附条件宽,在 pH5.9—9.0 范围内,缓冲液浓度高达 100mmol/L 都能成功地分离,含硫的保护基和蛋白酶抑制剂对吸附无明显干扰。在层析柱中加入低浓度的二价金属离子能形成三元复合物,有利于蛋白的吸附。

脱附与染料结合的蛋白有各种方法,如采用高浓度的盐溶液 (NaCl, KCl, Na₂SO₄ 等)或

促溶剂(如尿素、KSCN 或 NaSCN);如果已用金属离子加速吸附,则可用金属螯合剂洗脱。此外,用底物溶液或核苷酸辅酶也可以特异性地洗脱吸附蛋白。Rajgopal 等用金属-EDTA-蔗糖复合物从染料配体上洗脱了核苷酸酶^[17],证实用这种方法洗脱蛋白具有很好的特异性。

4 组氨酸配体亲和层析

上述两种通用性配体亲和层析中,蛋白表面的组氨酸残基都可能与配体产生吸附作用,而组氨酸本身也可以作为一种配体与被纯化的生物分子作用。

4.1 作用机理

在一系列氨基酸中,组氨酸具有很多独特的性质,如它的疏水性很弱,由于咪唑环使其电荷转移的可能性小,其 pK_a 值范围宽,具有不对称的碳原子等。这些性质决定了在一定 pH、温度和离子强度条件下,组氨酸能以多种方式与蛋白作用。而且,当适当的基团与多羟基基质(如 Sepharose 或硅胶)连接时,还会出现与蛋白特异的偶极诱导作用。用组氨酸-Sepharose 层析柱分离藻青蛋白色肽的实验表明,当 pH 接近组氨酸的 pK 值 (pH6.5) 和色肽的 pK 值 (pH5.8) 时,它们之间的主要作用是咪唑环的弱电荷转移和质子交换。该类肽中偶极基团(如丝氨酸和带正电荷的赖氨酸、精氨酸残基)的位置不同时,各种色肽的吸附能力也不相同。从图 5 可以看出,组氨酸的 -COOH 基、-NH₂ 基和咪唑侧链都可能与蛋白作用。很多实验证实,组氨酸配体与蛋白的作用机理主要涉及静电吸附和疏水作用两方面。

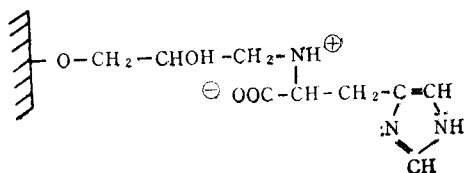


图 5 组氨酸配体的化学结构

4.2 应用

一系列实验表明^[18,19],蛋白分子与组氨酸配体吸附的 pH 在吸附蛋白的等电点及其附

近。表 4 列举了用组氨酸配体亲和层析纯化的几种蛋白和肽。在更高的 NaCl 浓度时, 吸附主要由咪唑与芳香族残基之间的电荷转移作用。因此可以在高盐浓度的条件下从混合物样品中分离蛋白。

实验还表明, 这种亲和层析能在很温和的条件下用 NaCl 梯度洗脱吸附蛋白, 这不但使洗脱条件易于控制, 而且有利于保持纯化物质的生物活性。

表 4 用组氨酸配体亲和层析纯化的蛋白和肽

被纯化物质	等电点	吸附的 pH
凝乳酶	6.0	5.5
酸性蛋白酶 <i>A. niger</i>	3.6	3.0—4.0
酵母羧肽酶	3.6	3.0—4.0
人胎盘 IgG1	6.8—7.2	7.4
Myxaline (细菌的人血抗凝剂)	4.0	5.5
藻青蛋白色肽	5.8	5.0—6.0

5 通用性配体层析方法的选择

上述三种通用性配体亲和层析方法所用的配体虽然不同, 但它们对蛋白作用的很多吸附位点却是相同的。三种配体都能以电子受体作用, 蛋白中的组氨酸、半胱氨酸、色氨酸等侧链上所含的 $-NH$, $-SH$, $-OH$ 基团则作为互补的电子供体。因此, 一种蛋白可以选择一种或几种上述层析方法纯化, 如干扰素就可用金属螯合物配体和染料配体两种亲和层析方法纯化; 人的 IgG 可用上述三种方法纯化; 凝乳酶可用染料配体和组氨酸配体两种层析方法纯化。不同方法纯化的最佳吸附 pH 和离子强度十分接近, 特别是染料配体与组氨酸配体的纯化条件更接近。下面简单介绍选择通用性配体层析方法的几点原则:

a. 富含组氨酸的蛋白可用 IDA- Cu^{2+} , IDA- Zn^{2+} 或 IDA- Ni^{2+} 层析柱, 用非过渡金属 (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}) 螯合物配体亲和层析能特异性地识别天冬氨酰、酪氨酰和含磷的基团;

b. 核苷酸辅因子相关酶容易与染料配体结合;

c. 大多数蛋白在其等电点及其附近能选择性地保留在组氨酸配体柱上。在高盐浓度和低 pH(5.0) 的条件下, 组氨酸配体亲和层析可以分离血清蛋白和肽以及芳香族化合物。

6 应用前景

亲和层析是 70 年代发展起来的一种生物分子分离纯化技术, 至今已有数百种蛋白和一些核苷酸用这种方法分离纯化^[20], 通用性配体亲和层析近年来发展很快。有两个因素将决定亲和层析的应用前景, 一个是这种方法能否用于蛋白的工业规模纯化; 二是能否方便地用于纯化治疗用的医用蛋白和肽^[21]。在这两方面, 通用性配体亲和层析都具有明显优势。从表 2 可见, 它的稳定性、容量和费用都比特异性配体亲和层析方法更易满足第一个条件; 除染料配体以外, 另外两种配体的渗漏及其毒性参数也对满足第二条件有利。随着通用性配体亲和层析所用载体基质的进一步改进, 新的通用配体的不断开发和应用, 以及这种方法与适当的仪器 (如 HPLC) 配套使用, 可以肯定, 通用性配体亲和层析方法在生物分子的分离和纯化中将具有良好的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Narayanan S R, Crane L J. *Trends Biotech*, 1990; **8**: 12
- 2 Clonis Y D. *Biotechnology*, 1987; **5**: 1290
- 3 Sulkowski E. *Protein purification: micro to macro*. New York: Alan R Liss Inc. 1987: 149—162
- 4 Janson J C. *Trends Biotech*, 1984; **2**: 31
- 5 Vijayalakshmi M A. *Trends Biotech*, 1989; **7**: 71
- 6 Ohlson S, Hansson L, Glad M *et al.* *Trends Biotech*, 1989; **7**: 179
- 7 Porath J, Carsson J, Olsson I *et al.* *Nature*, 1975; **158**: 598
- 8 Porath J, Olin B. *Biochemistry*, 1983; **22**: 1621
- 9 Porath J. *Trends Anal Chem*, 1988; **7**: 254
- 10 Vijayalakshmi M A, Krishnan S. *Bioscience*, 1987; **6**: 89
- 11 Krishnan S, Vijayalakshmi M A. *J Chromatogr*, 1986; **370**: 315
- 12 Zimmerman T S, Fulcher S. *US patent* No. 4361509, 1982
- 13 Dean P D G, Watson D H. *J Chromatogr*, 1979; **165**: 301
- 14 Angal S. *Methods in molecular biology*, Vol. 3 *New Protein Techniques*, Clifton: Humana Press, 1988: 111—122

- 15 郑裕岚,陈惠黎,生物化学与生物物理进展,1988; 15:45
- 16 徐伟军,周金耀,吉鑫松等,生物化学与生物物理学报,1986; 18:410
- 17 Rajgopal S, Vijayalakshmi M A. US patent No. 4666604, 1987
- 18 Kanoun S, Amourache L. J Chromatogr, 1986; 376: 259
- 19 Amourache L, Vijayalakshmi M A. J Chromatogr, 1984; 303: 285
- 20 Groman E V, Wilchek M. Trends Biotech, 1987; 5: 220

载脂蛋白 B 的分子生物学基础

许霖水

(第三军医大学生化教研室,重庆 630038)

提 要

载脂蛋白 B(apoB)是富含甘油三酯和胆固醇的脂蛋白(CM、VLDL 和 LDL)特有的蛋白质成分。apoB₁₀₀ 是 LDL 受体的专一性配基,介导血中 LDL-胆固醇(LDL-Ch)被外周组织细胞摄取和清除。载脂蛋白 B 基因遗传变异和 apoB 异常,血中 LDL-Ch 堆积,导致动脉粥样硬化发生是冠心病危险因素。

关键词 载脂蛋白 B, 载脂蛋白 B 基因, 动脉粥样硬化, 基因突变

现代理论认为动脉粥样硬化斑块的形成是血管壁损伤-修复的反复循环结果。大量流行病学和遗传学调查、临床资料和动物模型的病理研究证明^[1,2],血中低密度脂蛋白的胆固醇(LDL-Ch)浓度异常升高是动脉粥样硬化的前提条件,高胆固醇血症和动脉粥样硬化、冠心病的发病率成正比。载脂蛋白 B(apoB₁₀₀)对 VLDL 和 LDL 的生成、运输和从血浆中被清除,调节血中胆固醇浓度起关键性作用。本文就近年来载脂蛋白 B 分子生物学研究进展作一简要叙述。

1 载脂蛋白 B 的结构与功能

apoB 是 8 种主要载脂蛋白中分子量最大,疏水性最强的一种。它是富含甘油三酯(CM、VLDL)和富含胆固醇(LDL)的脂蛋白重要蛋白质成分,尤其是 LDL 受体的专一性配基。介导 LDL-Ch 从血中被清除。现知 apoB 有两种形式:apoB₁₀₀ 和 apoB₄₈。人类 apoB₁₀₀ 由肝细胞合成(大鼠肝脏合成 apoB₁₀₀ 和 apoB₄₈)。它结合和运输内源性甘油三酯和胆固醇。apoB₄₈

由小肠上皮细胞合成,它结合和运输外源(食物)性脂质和脂溶性维生素。

apoB₁₀₀ 是一种分子量为 512kD 的糖蛋白。其全氨基酸顺序 1986 年已阐明,它由 4536 个氨基酸残基组成的单一多肽链。每分子 LDL 颗粒只含一分子 apoB。蛋白质仅能覆盖颗粒表面的 $\frac{1}{3}$ 至 $\frac{1}{2}$ 。apoB₁₀₀ 分子含有 25 个 Cys 残基,其中 11 个 Cys 残基集中分布在前面 500 个氨基酸组成的区域,形成链内二硫键。所以 N-端高度交联呈典型的球状结构^[3]。Cys 残基通过硫酯键与软脂酸、硬脂酸等共价结合使 apoB 牢固地连接脂质成分^[4]。另外 apoB₁₀₀ 还有分子内硫酯键(Cys₅₁-Glu₅₄ 和 Cys₃₇₃₄-Asp₃₇₃₇)以及 Cys 和 Tyr 的磷酸化位点。这对维持 apoB 空间构象,促进 VLDL 生成和分泌有重要意义^[5]。apoB₁₀₀ 还含有 20 个 N-糖苷化位点(Asn-X-Thr/Ser),大部分集中在 3197—3438 残基之间。关于 O-糖苷化位点尚不清楚。