

# 染料配基层析在分离提纯生物活性物质中的应用

卞祖宁 周金耀 金文文 熊振平

(上海医药工业研究院, 上海)

应用各种不同的染料配基层析介质, 分离提纯了D-氨基酸氧化酶、碱性磷酸单酯酶、己糖激酶及γ-球蛋白。从D-氨基酸氧化酶中除去了几乎全部的酯酶, 收率可达80%; 碱性磷酸单酯酶的纯度增加了10倍; 己糖激酶的纯度增加了4倍, 收率可达70%; 由γ-球蛋白中分离除去全部的蛋白水解酶。

**关键词** 染料配基层析介质; D-氨基酸氧化酶; 碱性磷酸单酯酶; 己糖激酶, γ-球蛋白

70年代初生物化学家们相继发现单氯: 二氯三嗪类活性染料如 Cibacron Blue F3G-A (图1) 等可和一系列的生物活性物质起作用, 这些染料与生物活性物质间并不存在任何的生物学关系, 故称它们为假配基 (Pseudo-ligands) 或染料配基 (Dye-ligands), 由此发展起来的分离提纯技术称为假亲和层析或染料配基层析。

水性的极性区域所包围的非极性区域内, 并与其结合。各种蛋白质分子的非极性区域的分布、大小及可接近的程度是不同的, 故与染料配基作用的强弱亦各不相同; 2. 三嗪类染料配基结构中的 I 部分被认为是类似于大多数需要NAD<sup>+</sup>或NADP<sup>+</sup>的脱氢酶类, 及与 ATP 有关的激酶类的结构中相应的核苷酸部分的竞争性抑制剂。

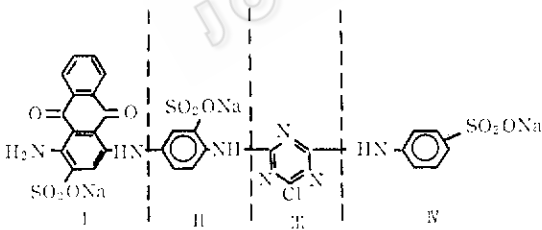


图1 Cibacron Blue F3G-A的化学结构  
Fig.1 Chemical structure of Cibacron Blue F3G-A

染料配基层析分离技术的应用仅只有十余年的历史, 但由于其选择性及分离效果好、介质制备方法简易、价格适宜, 因此发展甚为迅速, 有关它们应用与机理方面的研究报道已近250篇<sup>[1-4]</sup>。应用此种层析技术可分离提纯一系列的脱氢酶、激酶、水解酶、乙酰基转移酶、氨基转移酶 RNA及DNA 核酸酶和聚合酶等。本文报道应用染料配基层析技术分离提纯 D-氨基酸氧化酶、碱性磷酸单酯酶、己糖激酶及γ-球蛋白的研究结果。

人们曾经对染料配基与生物活性物质间作用的机理进行了许多的研究, 但迄今为止除可肯定染料配基结构中 I 部分是与蛋白质分子作用的功能基团外, 其他均在探讨与争论中。目前一般是基于以下两种推测: 1. 染料配基结构中的 I 部分的芳香族大环可伸入蛋白质分子表面的一些被亲

本文于1986年6月3日收到。

我们试制了多种以国产原料为基础的染料配基层析介质, 并用它们先后成功地分离提纯了甘油激酶、α-甘油磷酸脱氢酶及葡萄糖氧化酶等, 愿免费提供此类介质供感兴趣的同志们试用。

## 材 料 和 方 法

### (一) 材 料

1. D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase): 三角酵母菌 (*Trigonopsis variabilis*) 发酵后的菌体用Dyno-mill破碎后所得的含酶粗提液, 经硫酸铵分级沉淀、DEAE-纤维素离子交换层析得到比活为1.02u/mg蛋白的部分提纯品。

2. 碱性磷酸单酯酶(Alkaline phosphatase): 小牛肠粘膜经正丁醇抽提、酸沉淀、硫酸铵分级沉淀、DEAE-纤维素离子交换层析及蓝色Sephadex柱层析, 制得比活为122u/mg蛋白的部分提纯品。

3. 己糖激酶(Hexokinase): 面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌体用Dyno-mill破壁后所得的含酶粗提液, 经酸沉淀、硫酸铵分级沉淀及DEAE-纤维素柱层析, 制得比活为21u/mg蛋白的部分提纯品。

4. 兔抗鼠抗血清: 以鼠IgG免疫家兔, 取抗血清效价为1:32(以琼脂扩散法测试之)的抗血清。

5. 所用的各种支撑介质如Sephadex G-100、Sephadex 4B、DEAE-sepharose CL-6B等均为Pharmacia产品; 活性染料Cibacron Blue F3G-A系Amicon产品; Red(其结构类似于Procion Red HE-3B)为上海染化八厂产品; Matrex gel Blue A系Amicon产品。其他各种化学试剂均为国产化学纯产品。

### (二) 方 法

1. D-氨基酸氧化酶活力测定: 2ml 100mM pH8.1 焦磷酸钠缓冲液, 0.5ml 0.02% 邻苯二胺, 0.01ml (25u/ml) 过氧化物酶, 0.3ml 40mM 头孢菌素C与0.1ml D-氨基酸氧化酶混合均匀, 在37℃

420nm测定每分钟消光值的变化, 以每分钟水解1微克分子的头孢菌素C定为1个活力单位。

2. 酯酶活力测定: 0.5ml (1mg/6ml) 对-硝基苯乙酸盐水解液, 2.0ml 50mM pH7.3 Tris缓冲液与10 $\mu$ l 酯酶液混匀, 在25℃ 405nm 测定每分钟消光值变化, 以每分钟水解1微克分子对-硝基苯乙酸盐定为1个酶活力单位。

3. 碱性磷酸单酯酶活力测定: 按Hausamen方法<sup>[5]</sup>。

4. 己糖激酶活力测定: 采用Darrow等人方法<sup>[6]</sup>。

5. 蛋白质测定: 按Lowry等人方法<sup>[7]</sup>。

6. 染料配基层析介质的制备方法:  
(1) Sephadex-染料介质的制备<sup>[8]</sup>: 20g 干Sephadex加水溶胀后, 加入8g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>并缓慢加入含有16.5g染料的水溶液, 于45℃搅拌反应48h, 反应中止后用蒸馏水充分洗涤所制备的染料介质直至洗涤液呈无色止。加入0.02 NaNO<sub>3</sub>于4℃贮存备用。应用此法我们制得Cibacron Blue F3G-A Sephadex G100。(2) Sepharose-染料介质的制备<sup>[9]</sup>: 4g染料于15min内缓缓加至含有150g湿重的Sepharose悬浮液中, 继续加入12g NaCl, 搅拌反应30min后加入4g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 于45℃搅拌反应48h, 反应中止后同上述方法处理。应用此法我们制得Red-sepharose 4B及Cibacron Blue F3G-A、DEAE-sepharose CL-6B。

## 结 果

### (一) D-氨基酸氧化酶的纯化

D-氨基酸氧化酶可水解头孢菌素C的C<sub>7</sub>位侧链而获得7-氨基头孢烷酸(7-ACA)的前体GL-7ACA, 由于三角酵母

菌在产生 D-氨基酸氧化酶的同时尚产生酯酶, 虽经硫酸铵分级沉淀、DEAE-纤维素离子交换层析, Sephacryl-200或-400凝胶过滤或 Phenyl-sepharose CL-4B 疏水层析均未能将酯酶除去, 但在使用 Amicon 生产的染料配基层析介质 Matrex gel Blue A 分离提纯后, 与 D-氨基酸氧化酶混存的酯酶基本除去。表 1 表明经 Matrex

gel Blue A 染料配基层析后单位体积的酶溶液中 D-氨基酸氧化酶与酯酶活力比由原来的 1:0.86 降至 1:0.008, 即酯酶的含量降低 107.5 倍, D-氨基酸氧化酶的纯度提高 2.2 倍, 收率达 80.5%。

## (二) 碱性磷酸单酯酶的纯化

通常应用常规的纯化技术难以获得高比活力碱性磷酸单酯酶<sup>[10]</sup>, 但我们应用

表 1 用 Matrex gel Blue A 染料配基层析分离 D-氨基酸氧化酶与酯酶

Table 1 Separate esterase from D-amino acid oxidase by using Matrex gel Blue A dye-ligand chromatography

样 品 Sample	体 积 Volume (ml)	D-氨基酸氧化酶 (D-AAO)				酯酶 Esterase			D-氨基 酸氧化酶 活力:酯 酶活力 D-AAO :Esterase
		活性 Activity (u/ml)	总活性 Total ac- tivity(u)	比 活 Specific ac- tivity(u/mg protein)	收率 Yield (%)	活性 Activity (u/ml)	总活性 Total activity (u)	收率 Yield (%)	
染料配基层析前 Before dye-ligand chromatography	13	17	221	1.03	100	14.62	190	100	1:0.86
染料配基层 析后 After dye-li- gand chro- matography	洗涤 Wash	26	0	0		6.80	176.7	93	
	洗脱 Elute	32	5.55	177.9	2.28	80.5	0.042	1.34	0.07

自制的 Red-Sepharose 4B 染料配基层析介质分离纯化它, 获得了满意的结果。层析后该酶的纯度提高 10 倍以上, 比活为 1300 u/mg 蛋白质, 用 SDS-聚丙烯酰胺时呈单一带的纯酶制品 (图 2)。该制品可用于 DNA-或 RNA-5' 磷酸末端的水解, 可作

为 DNA 序列测定和探针标记, 以及酶联免疫测定中。另外, 碱性磷酸单酯酶在层析后的回收率高达 92%, 故具有工业化生产应用价值。有关层析的结果如表 2 所示。

表 2 应用 Red-sepharose 4B 染料配基层析提纯碱性磷酸单酯酶

Table 2 Purification of alkaline phosphatase by Red-sepharose 4B dye ligand chromatography

样 品 Sample	体 积 Volume (ml)	活 性 Activity (u/ml)	总活性 Total ac- tivity(u)	蛋白量 Protein (mg/ml)	比 活 Specific activity (u/mg protein)	收率 Yield (%)
层析前 Before dye-ligand chromatography	32	406	13000	3.32	122	100
层析后 After dye-ligand chromatography	100	120	12000	0.092	1300	92.3

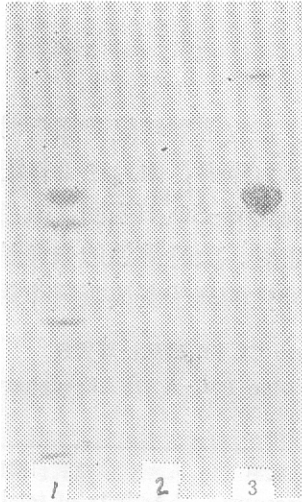


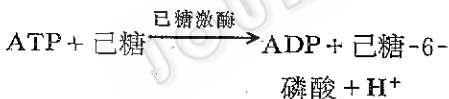
图 2 碱性磷酸单酯酶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶平板电泳图

Fig.2 SDS polyacrylamide gel slab electrophoresis of alkaline phosphatase

1. 层析前 Before dye-ligand chromatography
2. 层析后 After dye-ligand chromatography
3. Sigma 生产的碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase produced by Sigma

### (三) 己糖激酶的纯化

己糖激酶可催化下述反应:



一般常将己糖激酶与6-磷酸葡萄糖脱氢酶偶联,测定葡萄糖或其它有关物质。我们曾参考 Barnard方法<sup>[11]</sup>由新鲜面包

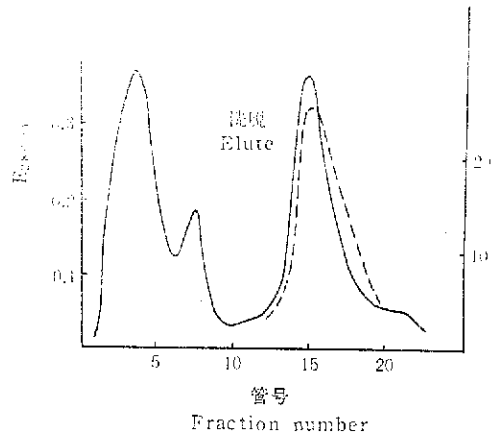


图 3 用Cibacron Blue F3G-A sephadex G-100 纯化己糖激酶

Fig.3 Purification of hexokinase with Cibacron Blue F3G-A sephadex G-100 dye-ligand chromatography

Chromatography conditions:4ml colome, buffer solution:20mM pH5.8 butane diacid containing 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4mM EDTA and 0.005% mercaptoethanol, eluent:above buffer solution containing 0.5M NaCl

—蛋白质浓度 Protein concentration  
...己糖激酶活性 Hexokinase activity

酵母中提取与纯化己糖激酶,但其纯度与进口同类产品相比有差距。现试用自制的 Cibacron Blue F3G-A sephadex G-100染料配基层析介质对己糖激酶的初步提纯品作进一步的纯化,结果如表3及图3所示,纯度提高4倍,比活为85u/mg蛋白,酶活的回收率为70%。

表 3 用 Cibacron Blue F3G-A sephadex G-100 染料配基层析纯化己糖激酶  
Table 3 Purification of hexokinase with Cibacron Blue F3G-A sephadex G-100 dye-ligand chromatography

样品 Sample	体积 Volume (ml)	活性 Activity (u/ml)	总活性 Total activity(u)	比活 Specific activity (u/mg protein)	收率 Yield (%)
染料层析前 Before dye-ligand chromatography	5	68	340	21	100
染料层析后 After dye-ligand chromatography	11.8	20	236	85	69.4

#### (四) $\gamma$ -球蛋白的纯化

通常用硫酸铵分级沉淀、离子交换层析法分离提纯 $\gamma$ -球蛋白,此法不仅耗时、费力而且难以除去与其混存的蛋白水解酶。我们用自制的Cibacron Blue F3G-A DEAE-sepharose CL 6B染料配基层析介质直接由兔抗鼠抗血清中分离纯化 $\gamma$ -球蛋白,表4的结果表明,层析后的 $\gamma$ -球蛋白的纯度大大提高,基本不含有蛋白水解

酶。

## 讨 论

1. 在应用染料配基层析时,系统中的pH最为重要,因为在染料配基的化学结构中尚含有 $-SO_3H$ 基团,故当它们与蛋白质作用时,除特异性的亲和结合外,尚有非特异性的离子交换吸附作用。一般在

表 4 用Cibacron Blue F3G-A DEAE-sepharose CL 6B 提纯 $\gamma$ -球蛋白  
Table 4 Purification of  $\gamma$ -globulin with Cibacron Blue F3G-A DEAE-sepharose CL 6B dye-ligand chromatography

样 品 Sample	总 蛋 白 Total protein (mg)	免 疫 回 收 率 Immunity recovery (%)	总 蛋 白 酶 活 力 Activity of total proteinase (u)
染料层析前 Before dye-ligand chromatography	74	100	0.03
染料层析后 After dye-ligand chromatography	13	78	0.002

pH 低于大多数蛋白质等电点时,非特异性的吸附作用增加,反之则降低。在用Matrex gel Blue A 染料配基层析介质分离提纯D-氨基酸氧化酶时发现如 $pH > 6.0$ 时,酯酶与D-氨基酸氧化酶均不能被吸附上柱,而在pH为6.0时,酯酶仍然不被吸附,但D-氨基酸氧化酶可被吸附,前者在滞留体积中被排除出柱,后者则在洗脱后方能下柱,从而达到了两种酶的分离目的。

2. 作为配基的染料化学结构不同,其应用范围及纯化效果亦不相同。在国际上常用的染料有Blue A、Blue B、RedA、Orange A、Green A等,在提纯D-氨基酸氧化酶时,曾选用了以上几种不同的染料形成的不同染料配基层析介质,结果以Blue A 效果最佳。现在我室也试制了多

种染料配基层析介质供选择使用。

3. 二价阳离子,尤其是镁离子的存在与否(一般其浓度在10mM左右),可影响染料配基与相应的生物活性物质的结合能力,从而改变染料配基层析的选择性。在纯化己糖激酶时,缓冲液中加入5mM  $MgCl_2$ 可使70%的己糖激酶被洗脱下柱,而杂蛋白却大部分留在柱上,故使酶的纯度获得提高。反之,如不含 $MgCl_2$ ,则在其他条件均相同的情况下,己糖激酶难以被洗脱下柱。

4. 染料配基层析属亲和层析范畴,但由于染料配基与生物活性物质间实际上并不存在任何的生物学的关系,即染料配基与生物活性物质间的作用具有一定的特异性,但此种特异性与真正的生物学亲和配基相比是逊色的。

## 参 考 文 献

- [1] Kroner, K.H. et al.: *Affinity Chromatography & Related Techniques*, edited by T.C.J. Gribnau et al., published by Elsevier Scientific publishing company, p.491, 1982.
- [2] Pharmacia Biotechnology Products Catalogue, 1985.
- [3] *Dye Ligand Chromatography*, Amicon Boo-let, 1983.
- [4] Kopperschlager, G. et al.: *Adv. Biochem. Enginee.*, edited by A. Fiechter, published by Berlin, Springer, Vol. 25 p.101, 1983.
- [5] Hausamen, T.U. et al.: *Clin. Chim. Acta.*, 15:241, 1976.
- [6] Darrow, R. A. & Colowick, S.P.: *Methods in Enzymology*, edited by P. C. Sidney & O.K. Nathas, N.Y. Academic Press, Vol.5 p.266, 1962.
- [7] Lowry, O.H. et al.: *J.B.C.*, 193:265, 1952.
- [8] Bohme, H.J. et al.: *J. Chromatography*, 69:209, 1972.
- [9] Deam, P.D.C.: *J. Chromatography*, 165:301, 1979.
- [10] 蒋益众等：脏器生化制药，(1) :50, 1983.
- [11] Barnard, E. A.: *Methods in Enzymology*, Vol.42, p.6, 1976.

## THE APPLICATION OF DYE-LIGAND CHROMATOGRAPHY FOR SEPARATION AND PURIFICATION OF CERTAIN BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES

Bian Zuning Zhou Jinyao Jin Wenwen Xiong Zhenping  
(Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, shanghai)

We have used different dye-ligand chromatographic media to purify D-amino acid oxidase, alkaline phosphatase, hexokinase and  $\gamma$ -globulin. All results are very satisfactory:

1. Elimination of esterase from D-amino acid oxidase with 80% yield.
2. The purity of alkaline phosphatase was increased by ten folds.
3. The purity of hexokinase was increased by four folds and got 70% yield.
4. Separation of all proteolytic enzymes from  $\gamma$ -globulin.

## Key words

Dye-ligand chromatography; D-amino acid oxidase; alkaline phosphatase; hexokinase;  $\gamma$ -globulin.