

·成果简介·

# 生物活性分子的相互作用及其在分离分析中的应用

邹汉法\*

(中国科学院大连化学物理研究所, 国家色谱研究分析中心, 大连 116011)

[关键词] 生物活性分子, 相互作用表征, 分子生物色谱, 毛细管电泳

现代生命科学种种发现告诉人们: 生命活动均以分子事件为其结构、能量或信息基础。无论是生物化学的循环级联反应与酶的高选择催化特性, 遗传信息的传递、表达与调控, 还是细胞增殖、分化与衰老, 免疫中的信号、物质传递与调控, 均离不开生物分子间的相互作用。例如, 药物作为一类重要的生物活性物质与血浆蛋白(如白蛋白、 $\alpha_1$ -酸性糖蛋白)存在可逆的结合平衡。血液中只有游离药物可透过血管到达活性位点, 产生药效和引发副作用。因而药物分子在人体血液中与血浆蛋白的相互作用直接影响药物的分布、排泄、代谢、活性和毒副作用。生命过程中的化学反应几乎都是在生物酶的催化下进行的。金属酶是酶中的一大类。金属离子与金属酶结合的性质对金属酶的生物活性和催化作用具有重要的影响。环境毒物与生物大分子(DNA 和蛋白质)的加合物的分析测定方法的研究也越来越受到相关领域的重视。显然, 从分子水平上深入理解这类生物活性分子间的相互作用具有极其重要的实践和理论意义。同时, 有关生物活性分子相互作用的原理已在分离分析中获得广泛的应用。例如, 应用于临床诊断的酶联免疫检测技术(ELISA)、生物传感器、血液免疫吸附疗法、毛细管电泳免疫检测技术和分子生物色谱等都是基于生物活性分子相互作用原理的测试方法和医疗手段。在亲和及免疫亲和色谱中, 通过在固定相载体上共价联接, 能与待分离的生物活性分子产生“亲和及免疫亲和”相互作用的配基, 可以实现复杂样品中待分离物质的高特异性和高选择性的分离和测定。亲和及免疫亲和色谱已成

为生物活性分子分离分析的重要模式之一。

今天, 人们所称的分析化学, 吸取了当代化学、物理、数学、电子学和生物学等学科的新成就, 并不断地诞生新的分析方法、技术和原理。如何充分利用这些新的方法、技术和原理来更有效、更准确地测定和表征生物活性分子的相互作用, 是分析化学研究最重要的方面之一。另一方面, 把生物活性分子相互作用原理引入到新兴的分析技术中, 解决生物分析和其他重要的分析问题, 是分析化学发展的必然趋势。我们在原国家科委和国家自然科学基金委员会的资助下, 在国内系统地开展了生物活性分子的相互作用及其在分离分析中的应用的科研工作, 并取得以下成果。

## 1 采用微渗析-HPLC 联用技术成功测定药物与蛋白质的相互作用

药物分子在人体血液中与蛋白质的结合水平, 直接影响药物的分布、排泄、代谢、活性和副作用。国际上已有的平衡透析、高速离心和超滤等测定药物与蛋白质的相互作用的方法比较费时、费试剂和难于自动化。我们在国际上首次提出采用微渗析(Microdialysis)-高效液相色谱(HPLC)联用技术测定药物与蛋白质相互作用的方法<sup>[1-3]</sup>, 成功地测定了新诺明、卡玛西平、菲诺芬和酮基布洛芬等几种典型药物与人血清白蛋白的相互作用参数, 发现新诺明、卡玛西平与人血清白蛋白的作用较弱且仅有一类结合位点; 而菲诺芬和酮基布洛芬与人血清白蛋白有很高的亲合力且有两类结合位点。微渗析-HPLC 联

\* 1997 年度国家杰出青年科学基金获得者。

原国家科委攻关项目(96-C03-04-03)和国家自然科学基金项目, 批准号 29635010。

本文于 1998 年 5 月 18 日收到。

用技术对于测定药物与蛋白相互作用具有简单、快速、易于自动化的优点。

现在常用的西药绝大部分都为单一化学成分制剂,而中药则是非常复杂的多化学成分制剂。国际上新药研究的重要发展趋势之一是多成分的制剂,因此,建立多种药物与蛋白质相互作用的测定方法成为评价这类多成分药物制剂的重要方面。我们采用微渗析-HPLC 联用技术成功地测定了酮基布洛芬、华法令、布诺芬和人血清白蛋白的竞争作用参数。结果表明:布诺芬与酮基布洛芬的一级结合相同,具有较强的置换效应;而华法令和酮基布洛芬的一级结合不同,彼此没有明显的置换效应<sup>[4]</sup>。我们利用位点结合模型和质量作用定律导出了溶液体系下描述多种药物竞争相互作用的顶替方程式,并采用非甾类抗炎药和人血清蛋白为模型化合物,验证了这一方法的正确性<sup>[5]</sup>。

## 2 毛细管电泳成功表征人生长激素免疫反应活性

对于生物大分子的分析问题,除了测定样品中的含量外,还必须对其结构和活性进行表征。毛细管电泳(CE)已成为生物大分子分辨率最高的分离分析技术。我们成功地发展出毛细管区带电泳测定人生长激素与单克隆抗体的免疫反应活性及其计量数的方法<sup>[6]</sup>,与传统的 ELISA 方法相比,该方法不仅可以测定单克隆抗体或人生长激素的异构体,而且可以同时表征这些异构体的免疫反应活性。

## 3 分子生物色谱技术的应用

分子生物色谱是利用生物活性物质的特异性相互作用进行生物样品的分离分析和生物活性参数测定的新兴技术。我们把牛生长激素释放因子及其抗体固载到灌流色谱填料上,发展出快速测定牛生长激素释放因子及其抗体的免疫亲和色谱方法,该方法还被用于分离纯化牛生长激素抗体与酶的共价聚合物<sup>[7]</sup>。

提高生物大分子色谱分析的检测灵敏度是非常困难的,我们通过对牛生长激素释放因子的抗体进行异硫氰酸盐荧光素(FITC)标记,采用夹心免疫检测原理建立了牛生长激素免疫亲和色谱柱上荧光检测方法,使牛生长激素释放因子的检测下限达到 200 ng/L<sup>[8]</sup>。

传统的生物色谱分析用的固定相都为无机或高分子材料微球,价格十分昂贵;而生物大分子的大规

模制备用的介质则大多为亲水性的高分子聚合物,机械强度较低。我们独立发展出适合于生物大分子分离纯化的膜色谱介质<sup>[9]</sup>,由此介质制备的分析柱,其分离性能与国外最先进的灌流色谱填料相当,制备级的膜色谱柱的分离速度则比传统的凝胶柱快 3—4 倍<sup>[10]</sup>。这些介质已成功的应用于人血清白蛋白、Catalase 酶、人体 IgG 等生物大分子的分离纯化<sup>[11]</sup>。

手性药物的对映体在体内的代谢过程明显不同,在生理活性上也存在一定程度的差别。很显然,这些差别主要基于它们在体内与生物活性分子(如血浆蛋白)相互作用的差别。因此,以生物活性分子为配体的生物色谱可以有效地应用于手性药物的拆分。我们研究了一些非甾类抗炎药在人血清白蛋白柱上的拆分,建立了吸附蛋白质固定相毛细管电泳拆分手性药物的新方法<sup>[12]</sup>。利用微透析和分子生物色谱联用技术测定了药物与人血清白蛋白的立体相互作用<sup>[13]</sup>。

中药是中华民族瑰宝,而中药的物质基础和配伍机理的澄清是中药走向国际市场的前提。传统的中药色谱分析方法是分子作用为基础的。我们提出,将基于生物活性分子间的相互作用的生物色谱技术,应用于中药的成分分析和活性成分筛选,由此不仅可以有效地消除无活性成分对分析结果的干扰,而且还可大大缩小中药活性成分的筛选范围。现有的实验结果表明,多种单味中药在人血清白蛋白(HSA)生物色谱柱上的分离色谱图完全不同,至少可以应用于中药的表征。

免疫亲和反应也已延伸到复杂样品的预处理。把抗体连接到固定相后,就可用于各种与抗体发生特异性反应的生化样品,甚至环境毒物的免疫萃取。免疫亲和反应方法的最大优越性是萃取的高选择性<sup>[14]</sup>。同时,可以利用生物技术对抗体的结构进行修饰,由此实现单成分或多成分的高选择性萃取。通过在毛细管壁或填料上固载配体分子,在毛细管电泳和毛细管电色谱(CEC)中可以实现被分离成分的高选择性萃取,以提高 CE 或 CEC 的检测灵敏度和应用于生物活性化合物相互作用的表征<sup>[15]</sup>。

结合我们已有的工作基础,今后拟开展以下几方面的探索性研究工作:

(1)生物活性分子相互作用的表征方法研究  
探讨微渗析-HPLC 联用技术测定环境毒物与 DNA,中药有效成分与蛋白质和血浆相互作用的可行性。开展微渗析-HPLC 联用技术定量测定金属离子与金

属酶的相互作用,与其他谱学方法相结合,定量研究溶液中氨基酸、核苷、核苷酸和维生素等生物活性低分子量化合物对金属离子与金属酶相互作用和金属酶活性的影响。

(2)分子生物色谱的研究和应用 研究具有分离分析速度快、性能优良的亲和色谱、免疫亲和色谱和手性药物分离分析柱。研究分子生物色谱中,药物和环境毒物分子结构参数与测定的生物参数的定量构效关系。利用生物活性分子相互作用原理开展分子生物色谱测定和表征中药活性成分的研究工作,发展从中药高通量筛选活性成分和药物先导物的生物色谱技术和方法。开展中药药理作用的分析方法研究。

(3)分子生物毛细管电色谱的研究 开展毛细管电色谱测定药物、中药活性成分和手性对映体的研究工作,建立几种常用药物和环境样品的毛细管电色谱测定方法。发展毛细管电色谱测定环境毒物与生物大分子加合物的技术和方法。通过在毛细管电色谱柱中键合具有生物活性的生物大分子配基,开展亲和及免疫亲和电色谱分析方法的研究,同时发展测定药物生化参数的电色谱技术。

(4)生物分子相互作用原理在生物质谱中应用的研究 生物质谱是近年来以基体辅助激光解析时间飞行(MALDI-TOF)质谱等软解离技术为基础而发展起来的研究生物大分子结构的新兴学科。开展生

物大分子相互作用原理与MALDI-TOF质谱相结合的研究工作,主要利用免疫亲和及亲和作用原理作为预处理技术基础,发展亲和及免疫质谱检测抗体和抗原以及生物大分子相互作用活性位点的表征技术和方法。利用后源延迟技术,发展生物大分子的结构和序列的测试方法。

### 参 考 文 献

- [1] Wang H L, Zou H F, Zhang Y K. *Chromatographia*. 1997, **44**:212.
- [2] Wang H L, Zou H F, Zhang Y K. *Anal. Chim. Acta*. 1996, **342**:159.
- [3] Wang H L, Zou H F, Zhang Y K. *Biomed. Chromatogr.* 1998, **12**: 4.
- [4] Wang H L, Zou H F, Zhang Y K. *Sciences in China (Series B)*. 1997, **40**:643.
- [5] Wang H L, Zou H F, Zhang Y K. *Anal. Chem.* 1998, **70**:373.
- [6] Zou H F, Peichang Lu, Krull I S. *Biomed. Chromatogr.* 1996, **10**:78.
- [7] Zou H F, Peichang Lu, Krull I S. *Biomed. Chromatogr.* 1996, **10**: 126.
- [8] Cho B Y, Zou H F, Krull I S. *J. Chromatogr.* 1996, **743**:181.
- [9] Wang H L, Li T, Zou H F. *Biomed. Chromatogr.* 1996, **10**:139.
- [10] Li Y, Jia L Y, Zou H F et al. *Sciences in China (Series B)*. in press.
- [11] Li Y, Jia L Y, Zou H F et al. *Biomed. Chromatogr.* in press.
- [12] Zou H F, Wang H L, Zhang Y K. *J. Liq. Chromatogr.* in press.
- [13] Liu Z, Zou H F, Ni J et al. *Anal. Chim. Acta*. Submitted for publication.
- [14] Ikegawa S, Itoh M, Goto J et al, *Biomed. Chromatogr.* 1996, **10**:73.
- [15] Tomlinson A J, Benson L M, Guzman N A et al. *J. Chromatogr.* 1996, **744**:3.

## SPECIFIC INTERACTION OF BIOMOLECULES AND ITS APPLICATION IN ANALYSIS AND PURIFICATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

Zou Hanfa

(National Chromatographic R&A Center, Dalian Institute of Chemical Physics, CAS, Dalian 116011)

**Key words** biologically active molecule, characteristics of molecular interaction, molecular biochromatography, capillary electrophoresis