



浙江工业大学

# 硕士学位论文

论文题目: 酶为标靶的前沿亲和色谱法筛选天然药物的应用

作者姓名 蒋盛蓝

指导教师 钱俊青 教授

学科专业 生药学

所在学院 药学院

提交日期 2012 年 4 月

---

**M. S. Thesis**

**APPLICATION OF FRONTAL AFFINITY  
CHROMATOGRAPHY FOR SCREENING THE  
NATURAL MEDICINES USING ENZYME TARGET**



***Shenglan Jiang***

**College of Pharmaceutical Sciences**

**Zhejiang University of Technology**

Hangzhou, P.R.China

## 浙江工业大学

### 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的研究成果。除文中已经加以标注引用的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得浙江工业大学或其它教育机构的学位证书而使用过的材料。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人承担本声明的法律责任。

作者签名：蒋盛蓝

日期：2012年 5 月 28 日

### 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权浙江工业大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

1、保密□，在\_\_\_\_\_年解密后适用本授权书。

2、不保密□。

(请在以上相应方框内打“√”)

作者签名：蒋盛蓝

日期：2012年 5 月 28 日

导师签名：钱俊青

日期：12 年 5 月 28 日

## 酶为标靶的前沿亲和色谱法筛选天然药物的应用

### 摘 要

目前酶为标靶的分子筛选技术已在国内外广泛应用。酶作为分子标靶开展筛选，现有的方法主要是考察筛选对象对酶活的抑制作用，因此筛选过程往往对酶活要求高。由于价格高，资源少，靶酶的获取目前是这项研究的难题。而资源较多的基因工程克隆酶又存在酶活低的问题，在现有的以酶活性抑制率作为考察指标的方法中，很难应用。如何利用活性低的酶进行筛选，是一个亟待解决的问题。

根据目前的研究现状，本实验室已经建立了可用于筛选天然药效物质的前沿亲和色谱筛选平台。本文在此平台的基础上以筛选对象与酶蛋白的分子结合为考察依据，继续依托前沿亲和色谱技术进行，以一级结构完整、但活力较低的酶作为筛选标靶。通过研究酶活对筛选结果的影响，得到在不同酶活条件下的筛选结果，并且验证了此筛选平台在靶酶酶活低但一级结构完整的条件下，依然可以获得有效检测结果。同时还将该方法应用于糖化酶抑制剂的检测，实验证明此方法比传统的糖化酶抑制剂的筛选方法更精确、灵敏度更高。

本文的主要研究内容如下：

#### 一、 研究方法：

1、为了研究酶活对筛选结果的影响，将胰蛋白酶进行加热，获



得了一级结构不改变而酶活有损失的酶。首先选用酶的特异性底物 N- $\alpha$ -苯甲酰-DL-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐(BAPNA)进行检测。以酶活为 2933.33 U/mL 和 33.33 U/mL 的胰蛋白酶分别作为靶酶,以凝胶-溶胶法制得前沿亲和色谱柱,并且比较检测结果,以获得不同酶活对筛选结果的影响。

2、前沿亲和色谱应用于胰蛋白酶抑制剂苦参碱、苦参素的筛选已获得本实验室的验证。本文在此基础上,同样以加热的方法得到酶活分别为 2933.33 U/mL、2053.33 U/mL、1353.33 U/mL、1030 U/mL、373.33 U/mL、66.67 U/mL、33.33 U/mL、32.33 U/mL 的酶。以不同酶活的酶作为标靶,对苦参碱、苦参素进行检测,得到了酶活对筛选结果的影响。

3、在以上实验建立的分析方法的基础上,以糖化酶作为靶酶,以杨梅黄酮作为检测对象对该前沿亲和色谱筛选方法进行应用。通过改变酶活、酶的纯度、改变制柱条件中 PEG 的用量和浓度,获得适用于以糖化酶为靶酶的色谱柱的应用条件。

## 二、实验结果:

1、BAPNA 与酶活为 2933.33 U/mL 的胰蛋白酶的  $K_d$  (0.525  $\mu$ M) 明显小于其与酶活为 33.33 U/mL 的  $K_d$  (1.977  $\mu$ M)。说明酶活减小,则两者结合度也降低。该结果也从侧面验证酶的特异性底物与酶的结合主要与酶的空间结构有较大的关系。

2、实验得到的结果显示,酶活改变的情况下,小分子化合物苦参碱、苦参素与酶的  $K_d$  有微小变化。但是仍然可以得到苦参碱与胰

蛋白酶的亲和力大于苦参素的结果。这说明酶活对筛选结果无影响，可推测小分子物质与酶的结合很可能是单位点结合，与酶的一级结构相关，受酶的二、三级结构变化影响较小。

3、实验结果显示，酶活力明显减小的情况下，杨梅黄酮与酶结合的  $K_d$  不会发生明显的变化；酶的纯度提高后，酶的比活力提高，杨梅黄酮与酶结合的  $K_d$  明显减小，即两者结合度增加；PEG 分子量在一定范围内(400-1000)时，分子量越小，越能获得较好的流出曲线；相同分子量情况下，PEG 浓度越大，样品流出曲线的突破体积越大，在 150 mg/mL-250 mg/mL 的范围内时，均可以获得有效的检测结果。

**关键词：**酶，标靶，前沿亲和色谱，筛选

# APPLICATION OF FRONTAL AFFINITY CHROMATOGRAPHY FOR SCREENING THE NATURAL MEDICINES USING ENZYME TARGET

## ABSTRACT

The enzyme target molecular screening techniques have been extensively used in China and abroad. Existing enzymes target methods in screening mainly inspect the filter object on enzyme inhibition, therefore requiring high enzyme activity. Patient's diseased tissue was the common way to get the high activity enzymes, and only can be provided in small quantities. Genetic engineering can clone enzymes, but often low activity. It is difficult to be used in the existing drug screening method which depend on the active of inhibition.

According to the current researches, no enzyme activity screening techniques requires to be found. The laboratory has been established a method which can be used for screening of natural active substances on frontal affinity chromatography screening platform. The experiments in the paper are based on the platform, to screen natural medicines which

used enzyme as target. Continue to rely on the frontal affinity chromatography technology, to the level of structural integrity, but low dynamic activity enzyme as a screening target. Through the research on the influence of enzyme activity to screening results, we obtained screening application in different conditions of enzyme activities, and verify the screening platform in the enzyme target level structure under conditions of intact but low activity, which can still achieve effective results. Also the method is applied to the Glucoamylase inhibitor detection, this method is more precise and more sensitive than the traditional Glucoamylase inhibitor screening method.

The main contributions were as follows:

Experiment methods:

1. In order to study if the enzyme activity can influence on screening results. Trypsin is heated, and obtained level structure does not change but different activities of enzymes. The first object is the substrate specificities of trypsin N - A - benzoyl - DL - arginyl - 4 - Nitro aniline hydrochloride (BAPNA). The enzyme activity of 2933.33 U/mL and 33.33 U/mL trypsin were used as target enzymes, gel-sol method column is used. And compared the test results can obtain the effect on the result of enzyme activity.

2. Applied frontal affinity chromatography to trypsin inhibitor screen- ing, Matrine and Oxymatrine has been selected as objects

according to our laboratory's pre-verification. On the basis, similarly, heating to get the enzyme at different activities: 2933.33 U/mL, 2053.33 U/mL, 1353.33 U/mL, 1030 U/mL, 373.33 U/mL, 66.67 U/mL, 33.33 U/mL, 32.33 U/mL enzyme. Made these enzymes which at different activities as target, matrine and oxymatrine as objects, can get results of screening on the effect of enzyme activities.

3. Base on the above experiments, we established frontal affinity chromatographic screening method used Glucoamylase as target enzymes, and myricetin as checking object. The application on Glucoamylase is made under different conditions of enzyme activities, enzyme purity and PEG dosage.

#### Experimental results:

1. The  $K_d$  ( $0.525\mu\text{M}$ ) of BAPNA and trypsin which activity is 2933.33 U/mL was significantly smaller than  $K_d$  ( $1.977\mu\text{M}$ ) when the trypsin activity is 33.33 U/mL. That means when trypsin activity reduced, the combination of BAPNA and trypsin become lower. The results validate enzyme specificity of trypsin and substrate.

2. Experimental results show that, when enzyme activity changes, the  $K_d$  of matrine oxymatrine and enzyme have small but not obvious changes. At the same time combination between small molecular substances and enzymes is likely to be the unit combination, and more correlated to the space structure of enzyme.

3. The results show that, enzyme activity significantly reduced, but  $K_d$  of myricetin and Glucoamylase has no obvious change; when Glucoamylase increase the purity, the  $K_d$  of myricetin and Glucoamylase increased obviously; when the molecular weight of the PEG in a certain range (400-1000), the smaller molecular weight, the better outflow curve; when molecular weight same, the PEG concentration is higher, the sample elution curve breakthrough size is larger. In the range of 150 mg/mL-250 mg/mL, all can obtain effective results.

KEY WORDS: enzyme, target, frontal affinity chromatography, screening



## 目 录

|                                         |     |
|-----------------------------------------|-----|
| 摘 要 .....                               | IV  |
| ABSTRACT.....                           | VII |
| 第一章 文献综述 .....                          | 1   |
| 1.1 研究意义和背景 .....                       | 1   |
| 1.2 以酶为靶筛选药物的研究现状 .....                 | 1   |
| 1.2.1 酶与小分子的结合情况 .....                  | 1   |
| 1.2.2 酶固定化技术的应用 .....                   | 2   |
| 1.2.3 以酶为靶筛选药物技术的应用 .....               | 4   |
| 1.3 利用亲和作用筛选天然药物的研究现状 .....             | 5   |
| 1.3.1 亲和色谱原理 .....                      | 5   |
| 1.3.2 亲和色谱筛选药物的应用 .....                 | 6   |
| 1.4 前沿亲和色谱 .....                        | 8   |
| 1.4.1 前沿亲和色谱的原理 .....                   | 8   |
| 1.4.2 前沿亲和色谱工作模型 .....                  | 9   |
| 1.4.3 前沿亲和色谱的应用 .....                   | 13  |
| 1.5 本课题的研究内容和实验方案设计 .....               | 14  |
| 1.5.1 研究内容 .....                        | 14  |
| 1.5.2 实验方案设计 .....                      | 14  |
| 第二章 酶的活力对前沿亲和色谱筛选结果的影响 .....            | 18  |
| 2.1 引言 .....                            | 18  |
| 2.2 材料与方法 .....                         | 18  |
| 2.2.1 主要试剂及仪器 .....                     | 18  |
| 2.2.2 溶液的配制 .....                       | 19  |
| 2.2.3 制柱前体 glycerated silane 合成方法 ..... | 20  |

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 2.2.4 胰蛋白酶活力测定(BAEE-units/mg)方法 ..... | 22 |
| 2.2.5 SDS-PAGE 法鉴定胰蛋白酶一级结构的变化.....    | 22 |
| 2.2.6 前沿亲和色谱柱的制备 .....                | 23 |
| 2.2.7 前沿亲和色谱检测 .....                  | 24 |
| 2.3 结果与讨论 .....                       | 25 |
| 2.3.1 不同温度加热后酶活测定结果 .....             | 25 |
| 2.3.2 SDS-PAGE 法鉴定胰蛋白酶一级结构.....       | 27 |
| 2.3.3 前沿亲和色谱筛选结果 .....                | 27 |
| 2.4 本章小结 .....                        | 49 |
| 第三章 以糖化酶为标靶的前沿亲和色谱的应用 .....           | 18 |
| 3.1 引言 .....                          | 51 |
| 3.2 材料与方法 .....                       | 51 |
| 3.2.1 主要材料、试剂及仪器 .....                | 51 |
| 3.2.2 溶液的配制 .....                     | 52 |
| 3.2.3 糖化酶酶活测定方法 .....                 | 53 |
| 3.2.4 糖化酶色谱柱的制备 .....                 | 54 |
| 3.2.5 不同 PEG 浓度的糖化酶色谱柱的制备: .....      | 54 |
| 3.2.6 不同 PEG 分子量的糖化酶色谱柱的制备: .....     | 55 |
| 3.2.7 不同纯度糖化酶色谱柱的制备 .....             | 56 |
| 3.2.8 不同酶活糖化酶色谱柱的制备 .....             | 56 |
| 3.2.9 杨梅黄酮在不同酶活色谱柱中的检测 .....          | 57 |
| 3.2.10 杨梅黄酮与游离糖化酶的相互作用情况 .....        | 58 |
| 3.3 结果与讨论 .....                       | 58 |
| 3.3.1 糖化酶酶活测定结果 .....                 | 58 |
| 3.3.2 杨梅黄酮在未失活酶色谱柱中的检测结果 .....        | 59 |
| 3.3.3 不同 PEG 分子量对检测结果的影响.....         | 61 |
| 3.3.4 不同 PEG 浓度对检测结果的影响.....          | 62 |
| 3.3.5 杨梅黄酮在纯化后谱柱中的检测结果 .....          | 63 |
| 3.3.6 杨梅黄酮在不同酶活色谱柱中的检测结果 .....        | 64 |

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 3.3.7 杨梅黄酮与游离糖化酶的相互作用情况 ..... | 66 |
| 3.4 本章小结 .....                | 66 |
| 第四章 结论与展望 .....               | 68 |
| 4.1 结论 .....                  | 68 |
| 4.2 创新点 .....                 | 69 |
| 4.3 展望 .....                  | 70 |
| 参考文献 .....                    | 71 |
| 致 谢 .....                     | 77 |
| 攻读学位期间发表的学术论文 .....           | 78 |

## 第一章 文献综述

### 1.1 研究意义和背景

目前,各学科发展迅速,药学发展也进入了一个崭新的阶段。与以往相比,天然药物目前是新药开发的重要源泉,天然药效物质的筛选更是目前新药研发的核心过程。因此,适当的方法和技术对筛选出天然药效物质具有重大意义。分子生物学、生物化学、遗传学、信息学以及计算机化学等学科的研究成果和理论为药物筛选提供了新的思路。目前药物筛选中比较热门的方向包括酶、特异性受体以及核酸等潜在的药物设计靶点,同时参考其他的类源性配体或天然产物底物的化学结构特征设计出合理的药物分子,可以找出具有选择性作用于某种靶点的新药。

近年来随着分子生物学的发展,特别是基因组学、生物信息学、蛋白质组学、质谱联用技术及生物大分子相互作用分析技术等推动了从天然药物中发现特异性药物作用靶标分子的进程。酶作为临床药物最重要的靶标之一,现已被大量用于从复杂的天然药物中筛选药效化合物。分子间的相互作用是一切生物或化学变化的基础<sup>[1]</sup>,因此在以酶为靶标的药物筛选过程中,色谱技术应用广泛,是天然药物化学研究不可或缺的分析手段。

### 1.2 以酶为靶标筛选药物的研究现状

#### 1.2.1 酶与小分子的结合情况

氢键、范德华力、疏水作用力和静电引力等是生物大分子与药效物质作用力的主要类型。根据药效物质和生物大分子相互作用的有关热力学参数  $\Delta H$ 、 $\Delta S$  可以判断其相互作用力的类型<sup>[2, 3]</sup>。因为分子内部的运动有转动、振动和电子运动,因此分子具有转动能级、震动能级和电子能级。一般来说,处于低能量的基态分子从外界吸收能量后,分子能量会发生跃迁。紫外吸收光谱是由于

分子中价电子跃迁产生的,也可以称为电子光谱。因此用紫外光谱法可以得到芳香族氨基酸残基在蛋白质分子中的位置、环境及数量;在物理和化学因素的影响下,蛋白质二、三级结构的变化<sup>[4]</sup>。

目前大量实验表明,生物大分子的功能不仅与其一级结构有关,而且与其三维空间结构有关。要想了解酶的催化机理以及基因表达调控中的分子相互作用,都需要从生物大分子空间结构去探索。同时,生物碱与酶作用的可能机理是 $\pi$ 键之间的刚性紧密接合,这就从另外一种方面提示我们,小分子生物碱可能并未与酶共价化合<sup>[5,6]</sup>。

张伟<sup>[7]</sup>等通过研究咖啡因与茶碱分别与胰蛋白酶相互作用的光谱性质变化,表明两种生物碱分别对胰蛋白酶有荧光猝灭作用,且荧光猝灭机理均属动态猝灭。根据热力学公式,计算出咖啡因和茶碱与胰蛋白酶之间的作用力均主要是疏水作用力。

何开大<sup>[8]</sup>等通过实验发现一定温度和压力下,小檗碱与胰蛋白酶二者的结合是一个自发的放热过程。根据Ross总结的判断生物大分子和小分子结合力性质的规律<sup>[9]</sup>,表明小檗碱与胰蛋白酶之间的作用力主要为疏水作用力。小檗碱改变了胰蛋白酶的二级结构和Trp、Tyr残基所处的微环境,通过疏水作用力与之形成稳定的复合物,从而抑制了胰蛋白酶的催化活性。

从目前的研究现状来看,生物大分子与小分子物质结合的方式是研究药物筛选中的一个关键点。两者在结合时,往往与生物大分子的空间结构有关,例如酶的抑制剂大部分是通过改变酶的空间结构而与酶结合,进而抑制酶的活力。为了能够研究前沿亲和色谱柱中,酶与样品之间的结合是否与酶的活性有关,本研究中利用了不同酶活的酶作为标靶,观察酶的活力对筛选结果的影响。

### 1.2.2 酶固定化技术的应用

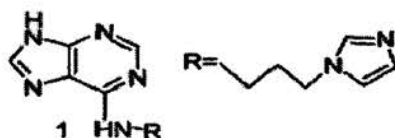
现代分子生物学的发展,逐步阐明了体内神经介质、酶、受体在生命活动中所起的调节作用,酶、受体、DNA、血浆中的运输蛋白和其它具有重要生理功能的生物大分子均可作为分子生物色谱的配基,开展药物活性成分的研究。目前临床上使用的大量药物都存在与这些大分子作用的靶点,因而,各种与疾病相关的靶分子药物筛选技术应运而生<sup>[10]</sup>。靶分子亲和技术是利用药物靶点与配体的亲和作用或靶酶的催化作用将活性成分从复杂体系中抽提出来。靶分子

的固定化是该筛选技术中重要的步骤。

酶的固定化是指,用固体材料将酶束缚或限制于一定区域内,使其仍能进行催化反应,并可回收及重复利用的一类技术<sup>[11, 12]</sup>。固定化方法有吸附法、交联法、共价结合法及包埋法等。被固定住的酶仍然具有其生物活性。固定化靶酶与小分子化合物(抑制剂、激动剂、底物、产物等)比溶液体系中的酶更容易分离,固定化靶蛋白对外界环境的耐受性也比较强,而且可以循环使用<sup>[13, 14]</sup>。卢大胜等<sup>[15]</sup>模拟  $\alpha$ -葡萄糖苷酶在体内小肠壁上的情况,将酶固定化,建立了筛选模型对 2 种天然产物-虎杖水溶性部位和广西血竭甲醇溶液进行筛选。最后得出固定化酶比游离酶的耐受性(酸、碱、有机溶剂、热)更强。以往游离酶的筛选范围通常较窄,要求筛选物质水溶性不能太差,而该实验可以得出筛选天然药物的范围不再局限于此。另外,该固定化酶筛选模型能重复再用,这样使得固定化酶筛选模型用于药物的筛选更加高效、便利和快速。

由于天然药物的成分非常复杂,有呈酸性的,有呈碱性的,有水溶性的,有醇溶性的,在筛选过程中所能使用游离靶酶的选择范围较小。而固定化酶具有较强的耐酸耐碱等能力,这些性质为天然药物的筛选提供了较广的筛选范围。这些优点使得将靶酶进行固定化用于药效物质的筛选的技术得以发展。然而,在酶固定化的过程中,很可能导致酶的结构发生改变,从而导致酶活力的损失。尤其是胞内酶,预分离过程使酶活力损失更大<sup>[16]</sup>。在大多数情况下,酶固定化以后活性部分失去,甚至全部失去。郑成等<sup>[17]</sup>通过分子亲和技术发现,酶经固定化后其结构的变化与配体间的亲和关系不明确。

Toledo-Sherman 等<sup>[18]</sup>以 EphB2 酪氨酸激酶为靶标,采用虚拟耦合的方法,通过前沿亲和色谱筛选抗癌药效化合物。结果显示药效化合物准确定位在 19 $\alpha$  位点上,其在色谱图上具有 36% 的迁移,  $IC_{50}=5.2 \mu M$ ,  $K_d=3.3 \mu M$ , 是 EphB2 的抑制剂,具有潜在的抗癌活性,其结构如下图:



Ng 等<sup>[19]</sup>以 N-乙酰基葡萄糖转移酶为靶标,采用前沿亲和色谱法-液质联用技术对两个三糖化合物库进行了筛选,在含有 81 个化合物的库中确定了 15 个有效的化合物,成功建立了高通量筛选其抑制剂的方法。



目前固定化酶色谱柱的制备的现有技术是以颗粒载体固定酶,装柱而成。可以用于制柱的载体颗粒种类很多,有大孔吸附树脂、离子交换树脂、葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶等等。固定酶的方式也很多,有吸附法、共价交联法等等。目前的色谱柱由于是由颗粒载体固定酶再装柱的方法制备的,所以目前的柱径均比较大,难以制成柱径在1毫米以下的毛细管固定化柱<sup>[20-23]</sup>。现有的固定化酶色谱柱,主要应用于亲和层析分离,分离纯化与柱中固定的酶具有亲和力的成分。

而本文就是基于这个基础,以溶胶-凝胶作为酶固定化的载体类型,制成毛细管色谱柱。便于需要筛选的物质与酶结合。在酶的固定化过程中,控制酶的一级结构不改变,观察酶活对筛选结果的影响。并且目前将靶酶固定化联合亲和技术已成功运用于药物的筛选,这就意味着可以用活性较低的基因工程表达的酶为靶靶进行药物的筛选还有待研究。

### 1.2.3 以酶为靶靶筛选药物技术的应用

目前广泛应用的靶酶亲和技术的基本原理主要有两类:一是将靶酶与待筛化合物一起孵育,通过一定的技术获得靶酶-小分子复合物,通过直接分析复合物或者对复合物解离后的特异小分子进行分析,可以得到小分子的结构及与靶酶的亲和参数等相关信息<sup>[24, 25]</sup>;另一类是在含有靶酶的反应体系中加入底物及待筛选物质,通过酶促反应的产物或底物量的变化来获取小分子的活性信息。因此分子亲和技术特别适合于研究复杂体系中的效应物质。目前在天然药物筛选过程中得到了广泛应用,已逐渐成为一种重要的筛选技术手段。

陈双红等<sup>[26]</sup>用微量稀释法和气相色谱-质谱联用技术分别在细胞水平和离体酶水平研究5个化合物(氟康唑、艾迪康唑、A1、A3、E2、E8)对靶酶不同突变衍生体蛋白的MIC80值和相对抑酶活性,用Roman光谱法研究化合物与酶的结合能力。结果显示Y118、S378残基与化合物特定侧链的化学集团形成配位结合或其它的相互作用,增强酶与化合物的结合能力,提高了化合物的抗真菌活性。Liu D等<sup>[27]</sup>以视黄醇类X受体为靶点,利用液相色谱技术对化合物库进行筛选,得到了可以与受体结合的小分子化合物,为癌症的治疗提供新的起点。

与游离酶相比,固定化酶具有更佳的环境耐受性,这一特性扩大了药物筛选的可行性范围,在药物的筛选过程中,将靶酶进行固定化再结合相应的筛选



技术成为主流。本课题正是以固定化酶为基础，以前沿亲和色谱这一高效、灵敏、精确的方法作为技术手段。主要考察该技术对酶活的要求。

### 1.3 利用亲和作用筛选天然药物的研究现状

#### 1.3.1 亲和色谱原理

本文是基于酶与药效化合物之间的亲和特性，依托前沿色谱，研究前沿亲和色谱的应用的。亲和色谱(affinity chromatography, AC)是利用生物大分子与亲和色谱固定相表面配位体之间，存在的生物学和生物化学过程的特效性亲和吸附作用，来进行选择性分离生物分子的分离方法。简单的说，亲和色谱就是一种以生物大分子为配基，对物质进行分析或分离纯化的特殊色谱方法<sup>[28]</sup>。

亲和色谱也是由生物分子与其配体的亲和能力决定的。这种亲和作用主要有分子间静电作用力、疏水作用力、氢键以及这些作用力的空间排斥作用<sup>[29]</sup>。保留作用的强弱，则与两者间相互作用的强弱有关。

如图 1-1 所示，L 是被固定化的配体，它与物质 A 能特异性作用。当含有 A 和 I 的样品通过含有 L 的基质时，A 与 L 相互作用，较晚被洗脱，而不与 L 相互作用的 I 则先被洗脱。

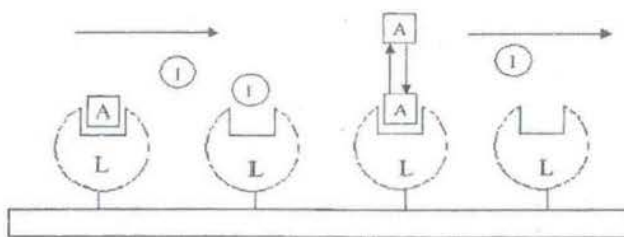


图 1-1 亲和色谱原理示意图

Fig.1-1 The Schematic of Affinity chromatography

利用已知的分子相互作用规律选择配基是目前获取亲和配基最主要的途径。只要两种物质之间有明显的相互作用，就可将其中一个固定在载体上，就可以构建成简单的亲和作用体系，用于分离或分析另一个物质。当然，为了能够是吸附和洗脱两个作用都比较容易达到，两个物质之间的亲和常数一般在  $10^{-4} \sim 10^{-8}$  mol/L 数量级之间，不能过高或过低。基于亲和作用的配基种类很多，性质各不相同，分类方法也很多。一般可将它们分为族亲和配基( group affinity

ligands)和生物专一性亲和配基(bioaffinity ligands)两大类。在亲和色谱中,生物专一性配基可获得最佳的亲和效果。利用抗原-抗体、酶-底物、酶-抑制剂、激素-受体、维生素与结合蛋白等生物体内存在的相互作用体系,将其中一方选为配基,用以识别或分离另一方<sup>[30]</sup>。这一类亲和作用,特别是利用抗体或抗原为配基的亲和色谱在生物医学和生物制药领域均有重要的应用。

### 1.3.2 亲和色谱筛选药物的应用

亲和色谱的可重复利用是基于生物高分子与配基可逆结合的原理。这种可逆的结合作用主要是靠生物高分子对它的配基的空间结构的识别<sup>[31]</sup>。亲和色谱<sup>[32-34]</sup>利用生物分子间亲和吸附和解离进行分离,具有高度的生物作用定向性。被固定的标靶与配体之间持续平衡流动,突破体积呈S型曲线的方法使得药物筛选技术得到更进一步的发展。以生物和非生物来源物质为配基的各种亲和色谱在天然药物活性成分分析中得到了广泛应用,已逐渐成为一种重要的技术手段<sup>[35]</sup>。此外,药效物质产生的生物活性与生物体内与其发生亲和作用的酶、蛋白等密切相关<sup>[36]</sup>。受体蛋白,通常是药效化合物的主要靶标,而酶类则是最重要的受体类型之一<sup>[37]</sup>,与生理平衡以及神经传导等很多生理过程密切相关,这说明将酶、受体等作为靶标应用于药效物质的筛选成为新药研发的重要途径。当然,药物与靶酶之间的结合程度在一定程度上与药物在人体内的作用通路有关。

亲和作用还可以帮助酶在众多的化合物中快速筛选出适合的抑制剂。由于化学方法可以产生大量的新化合物用于药物筛选,传统的逐一筛选法就会使工作量增加很多。因此,有针对性地进行筛选显得非常重要。利用亲和作用筛选药物主要是依靠靶蛋白与化合物之间的亲和活性,无亲和活性的化合物就能与靶标分离,从而快速地从大量混合物中找到目标物质。亲和作用筛选药效物质大体分为两种方式:一种是将靶标固定在载体上,有亲和活力的化合物被保留,无亲和作用的化合物会被洗掉;另一种是在溶液中标靶物质与混合物一起孵育,然后利用受体配体复合物与不结合的化合物性质的差别进行区分。因此亲和选择筛选法也适合于化合物的种类和含量都未知的天然提取物的筛选<sup>[38]</sup>。

以酶为基础根据药物分子与酶的直接结合来研究分子间相互作用进行药物筛选的方法种类有很多。包括电喷雾电离质谱(ESI-MS)、生物膜色谱、金属离

子亲和色谱等。这些方法都有其各自的优缺点<sup>[39]</sup>。

电喷雾电离质谱(ESI-MS)可以直接检测小分子化合物与靶分子的复合物,有复合物分子就说明目标物质和靶物质相结合,该方法筛选通量高。但由于ESI-MS不能使用非挥发性无机盐(非挥发性无机盐对质谱信号有很强的抑制或增强作用),使得非挥发性盐类、表面活性剂、辅因子等均不能使用。使用范围较窄。

贺浪冲等立了一种新的生物亲和色谱方法—细胞膜色谱法多年来对其基础理论、实验方法和应用价值进行了系统、深入地研究,并不断完善和提高。已经成为继经典放射性配体方法之后,又一种新的受体药理学实验研究方法,并成功地用于对中药复杂体系中物质基础的筛选研究。<sup>[40-42]</sup>

金属离子亲和色谱是利用金属离子的络合和螯合能力来吸附蛋白质的一种分离方法。而且标靶稳定性高,不易脱落,可在高盐浓度下操作,无需脱盐的预处理步骤,配体洗脱比较容易等优点,但其筛选通量也不高。

相对于以上这些亲和色谱存在的缺点,前沿亲和色谱操作方便,应用范围广。存在的优点有:(1) 对目标小分子物质有特异性的识别作用,选择性强、分离效率高,能提供化合物与靶标结合的有关数据比如结合常数等,筛选准确性高。避免了传统分离提取的非特异性和低效性;(2) 筛选时省时省力,实验操作简单等;(3) 通用性广,可以选用不同的靶标,通过溶胶—凝胶可以制备小粒径的亲和色谱柱,从而筛选不同的药物。这项技术是国际领先水平的分子水平上筛选药物的方法。可以根据实际需要灵活配置仪器,同时测得相应的解离常数  $K_d$ ,同时还可区分药物靶标分子的结合位点类型,其筛选通量随检测器而变化,不需要标记,但标靶需要进行固定化,用微型柱为佳。

整体柱是通过在柱管内原位聚合或固化的方法制备得到的具有多孔结构的整体棒状固定相,与传统的填充柱相比,具有通透性好、传质速率快、容易制备等优点,因此在分离分析领域特别是生物分离分析中发挥的作用日益增大。整体柱的制备及应用近年来也得到了快速发展,层出不穷的新型整体柱已被广泛用于色谱高效分离分析、固相萃取及酶反应器等方面,大大推动了分离分析科学的发展。<sup>[43]</sup>

鉴于前沿亲和色谱较一般亲和色谱的优点,本文将前沿亲和色谱应用于天

然药效物质的筛选，并重点研究标靶的生物活性对筛选结果的影响。以期建立起无酶活要求的凝胶柱前沿亲和色谱筛选法。

## 1.4 前沿亲和色谱

### 1.4.1 前沿亲和色谱的原理

目前，各种色谱技术作为提取分离手段已广泛应用于药效物质的筛选，但很多色谱分都是基于物质间理化性质的差异，并未包含任何药理功能的信息。在亲和色谱中，将能与潜在药物特异结合的物质固定于载体上制备色谱柱，再将待分离混合物与色谱柱固定后，以洗脱液洗脱，使混合物缓慢并且连续地通过色谱柱，即可实现混合物间的分离。该分离是以亲和性为基础。虽然亲和色谱一般使用生物来源的配基，但随着其应用范围的扩大，一些非生物来源的配基也逐渐被采用<sup>[44]</sup>。前沿亲和色谱是用于定量分析分子间相互作用的方法<sup>[45]</sup>。由 Kasai 于 1975 年首次引入。目前在药物研究中如药物筛选，先导化合物的优化等相关领域已具有重要作用<sup>[46-49]</sup>。

前沿亲和色谱是亲和色谱中的一种，由亲和色谱柱和适宜的检测器组成。其基本原理是采用合适的固定方法将标靶物质固定于载体内。分析前先用结合缓冲液平衡柱子，获得平稳的基线。然后进样器中切换到含有配基的样品缓冲液。待测化合物以一定的流速连续流过色谱柱使其达到饱和平衡状态。在柱中，已与标靶结合的化合物不断地被亲和力更强的物质置换下来，化合物与标靶的亲和力越强保留时间越长。根据亲和力的不同，得到相应的突破体积 ( Breakthrough Volume )，可以得到与之相对应的突破时间。通过测定其配体浓度随时间的变化，得到呈 S 形的亲和色谱图，所有配基由弱到强依次流出，反应两相结合力的  $K_d$  常数也可以通过计算得到。亲和色谱柱中固定的生物大分子量及解离常数  $K_d$  等系列数据的获得及计算<sup>[50-52]</sup>已得到了很好的说明。

$$\text{前沿亲和色谱的基本平衡方程为 } K_d = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{B_t}{V - V_0} - [A]_0 \quad (1) \quad K_d \text{ 是解离}$$

系数；A 是待测化合物；B 是柱子所固定的生物大分子； $[A]_0$  是待测化合物 A 进入亲和柱中的浓度； $B_t$  是亲和色谱柱中固定的总的生物大分子 B 的量；V 是化合物 A 的洗脱体积； $V_0$  是与前沿色谱柱上生物大分子 B 没有亲和力的化合物的洗脱



体积<sup>[53]</sup>。若待测化合物A以不同浓度的 $[A]_0$ 进入色谱柱,则可得到相应的V,以

$1/(V-V_0)$ 为纵坐标,以 $[A]_0$ 为横坐标,可得到一条直线 $y=kx+b$ ,  $y = \frac{1}{V-V_0}$ ,

$x=[A]_0$ , 那么  $k = \frac{1}{Bt}$ ,  $b = \frac{Kd}{Bt}$ , 即  $Bt = \frac{1}{k}$ ,  $Kd = \frac{b}{k}$ 。

该技术应用范围广,高通量,可同时计算出抑制剂相关动力学参数<sup>[54, 55]</sup>,是一种方便高效的筛选方法。在柱中,已与标靶结合的化合物不断地被亲和力更强的化合物置换下来,化合物与标靶物质的亲和力越强则保留时间越长。待测溶液中加入一个指示剂或一个阴性对照物。其中指示剂是保留时间已知的阳性化合物,阴性对照物则是与标靶物质没有亲和作用的化合物,其保留时间作为该柱的死时间。理论上,以指示剂保留时间为参考,被筛混合物体系中化合物保留时间越长活性越强。前沿亲和色谱-质谱联用技术(FAC-MS)一天可筛选上万个化合物,是一种高通量的筛选方法。鉴于该方法的优势,FAC技术已经广泛应用于多种靶蛋白的活性化合物的筛选中,如 $\beta$ -半乳糖苷酶、山梨醇脱氢酶、人雌激素受体等靶蛋白抑制剂的筛选<sup>[56, 57]</sup>。

前沿亲和色谱中对物质的吸附能力是用于具有生物活性系统中特定、可逆的分子间相互作用。前沿亲和色谱以其操作简单,提供的信息多,可求得相应的解析常数,可对各种配体的亲和力大小排序,可区分多个结合位点等优点,在药物研究领域,是一项有效的研究手段。

#### 1.4.2 前沿亲和色谱工作模型

典型的前沿亲和色谱模型是指<sup>[58]</sup>,在前沿亲和色谱中,样品是连续不断通过色谱柱的。短时间内,随着时间的推移,样品与柱子内部的靶标渐渐达到完全吸附。随后,到达突破体积时,随着时间的推移,样品随缓冲液流出的浓度逐渐增加。评价色谱系统的指标包括:柱容量的利用率、洗脱的样品量以及处理时间。(1) 物理模型:很多工业应用前沿亲和色谱系统包括单一成分吸附,由于这个原因,在物理模型研究中,前沿亲和色谱是基于单一成分的等温线吸附。(2) 传输模型。同时前沿亲和色谱还应用于很多简单结合位点的配体的分析<sup>[59]</sup>。

Jun Hirabayashi<sup>[60]</sup>等将前沿亲和色谱应用于凝集素(LEC-6)与壳寡糖的筛选。将壳寡糖用荧光标记后,十二吡啶壳寡糖通过微量(2 mL)进样系统进入色

谱柱，通过荧光检测获得洗脱情况。洗脱体积通过绘制成图，与半抗原乳糖的体积( $V_0$ )进行比较，然后根据公式计算出  $K_d$  值。

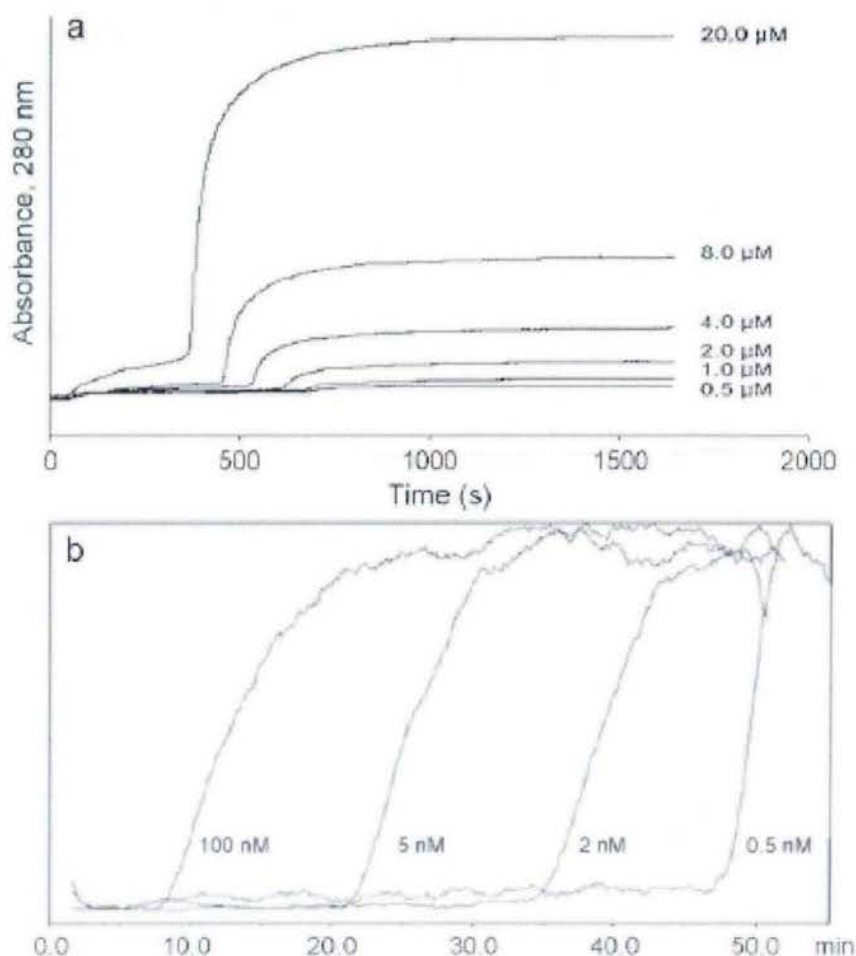


图 1-2 典型的前沿色谱流出曲线

Fig.1-2 The elution curve of front Chromatography

典型的前沿亲和色谱曲线可以得到前沿色谱流出曲线<sup>[59]</sup>。图 1-2 是前沿亲和色谱的整体流程图。整个体系包括(1) 色谱柱的制备。(2) 评估柱内固定的配体的量，即  $B_t$  值，以及固定配体的有效性。(3) 得到不同样品的  $V_f$  和  $V_0$ 。(4) 根据方程计算出不同的配体和受体间的  $K_d$  值。

前沿亲和色谱所用色谱柱属于亲和色谱柱，但前沿亲和色谱的工作原理和应用范围与常规的带状色谱有明显的区别。前沿亲和色谱与带状色谱主要区别在，前沿亲和色谱可以持续注入样品溶液，使色谱柱在饱和状态工作，并达到平衡。而带状色谱需要控制进样量，使其在所用柱容量范围之内。

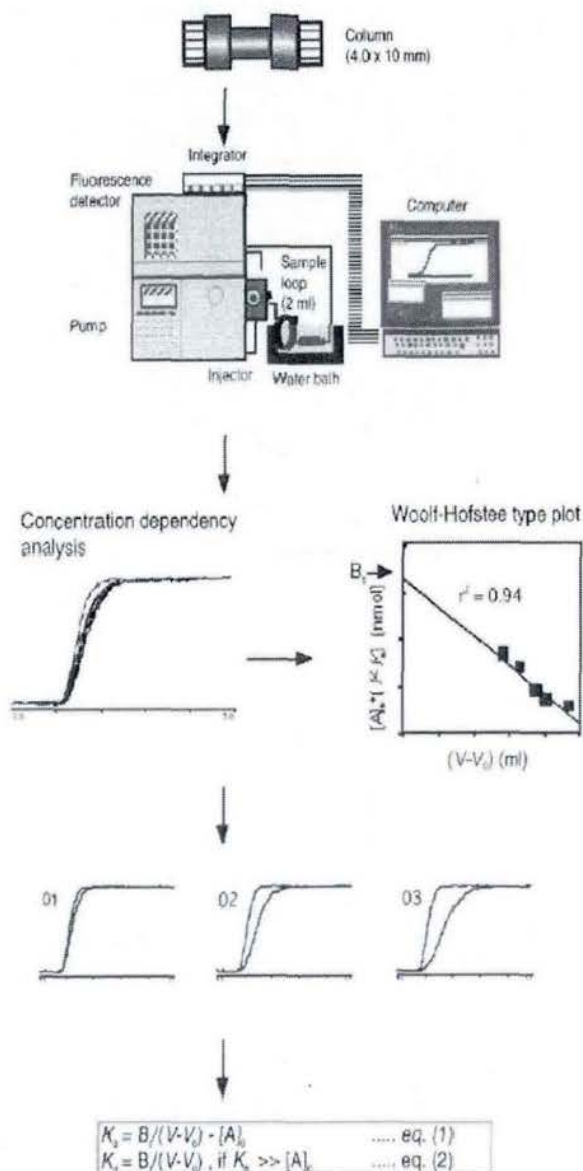


图 1-3 前沿亲和色谱分析过程示意

Fig.1-3. A schematic of the total procedures for the present comprehensive FAC analysis.

根据前沿理论<sup>[61]</sup>, 待测样品在恒定浓度和速度下, 持续注入亲和色谱柱, 使亲和色谱柱饱和后达到平衡状态。若进入亲和色谱柱的不同待测样品与固定在亲和色谱柱里生物大分子有相应的亲和力, 则根据亲和力的不同, 每个化合物在色谱图上会有不同的突破体积 $V_0$ , 即图中 $T_0$ 所对应的洗脱体积。前沿亲和色谱图如图1-4所示。



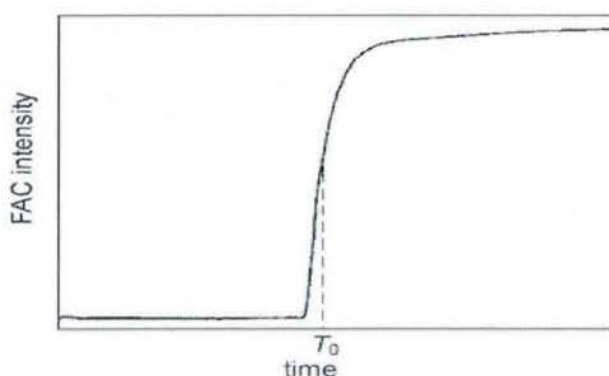


图1-4前沿亲和色谱流出曲线图

Fig.1-4 Frontal affinity chromatography diagram

在实际应用中，亲和柱和检测器可以根据需要配置。本研究中采用的双进样器。两个进样器分别用于淋洗液和样品液，两者之间可以自由切换，而且不容易带进气泡等因素，可以在一定程度上避免实验误差。

色谱柱中固定的靶标物质可以是任何能被固定的生物大分子，如蛋白，受体，抗体，DNA，细胞膜，细胞等。色谱柱的制备过程主要是将生物大分子包埋于载体并装到柱子中去的过程。目前制备前沿亲和色谱柱所用的固定化方法目前主要有化学共价键合法，溶胶-凝胶法等。用化学共价键合的生物大分子较为牢固，但是过程中会发生化学反应从而使固定化的生物大分子活性降低；另外不同大分子固定方法不同，操作难度大；而溶胶-凝胶法操作条件温和简单，可调节孔径大小，能包埋多种生物大分子<sup>[62, 63]</sup>。本实验中所用的前沿亲和色谱柱就是通过溶胶-凝胶法制备的。

前沿亲和色谱的工作方式一般有两类，一是先使用空白试剂，它与柱上的标靶物质没有亲和力，空白试剂过柱后，会得到突破体积( $V_0$ )。再同样得到待测样品的突破体积( $V$ )，若 $V$ 大于 $V_0$ 时，可以初步认为该样品与标靶物质有亲和力；二是指试剂法，指示剂是已知的与标靶物质有亲和力的化合物，让指示试剂和待测样品同时通过亲和柱，当若指示剂突破体积变小，表示待测样品与指示试剂有竞争作用，即与标靶物质有亲和力。

这两种工作方式可以根据待测样品而变化，当所用的检测器不能检测该待测样品时，或者该待测样品与生物大分子有极强的亲和力时，可以使用指示试剂法。本文中，由于采用的检测器为紫外检测器，选用的检测是已知的物质，并且都在检测器范围内，因此本文中的实验采用的都是第一种工作方式。

### 1.4.3 前沿亲和色谱的应用

前沿亲和色谱所用的检测器可以根据待测化合物分子的性质配置，常用的有紫外-可见光( UV-Vis )检测器，荧光检测器，质谱等。UV-Vis 检测器作为通用型检测器，其价格便宜，检测灵敏度较高，大多数化合物可以被检测出；质谱检测灵敏度非常高，可减少所需的样品量，另外还可检测混合物，虽然价格高，但目前也广泛应用于研究工作中。

利用前沿亲和色谱的流出曲线，既可以直观地观察到样品小分子与活性大分子之间的相互作用情况，同时还可以通过计算得到分子之间相应的解离常数  $K_d$ 。根据  $K_d$ ，可以筛选出亲和力较大的配体。此外还可计算出药物靶标分子的结合位点的个数，因此在分子生物学、药物机理研究和药物先导化合物的筛选等领域有极为重要的应用。

Enrica Calleri 等<sup>[64]</sup>以 GPR17 受体（一种 G 蛋白偶联受体）为标靶，将其包埋在固定化人工膜内，采用前沿亲和色谱-质谱联用技术，筛选急性和慢性神经退行性疾病的药物。

于雪等<sup>[65]</sup>采用前沿色谱法测定丹皮酚、阿魏酸、绿原酸和香草酸在 HSA 柱上的吸附量，并应用单、双位点模型以及单位点中的双倒数模型对实验结果进行了拟合及数理分析，得出的结论说明了丹皮酚、阿魏酸、香草酸与固定化 HSA 相互作用时只存在一类结合位点，而绿原酸的结合位点不止一类。

黄燕等<sup>[66]</sup>以壳聚糖微球为载体、戊二醛为载体交联剂，将血管紧张素转化酶( ACE )进行固定化。利用 ACE 抑制剂与 ACE 之间的亲和作用，利用高效液相色谱对亲和前后的体系进行检测，比较两者各组分色谱峰的差异，以此实现快速筛选复杂体系中的 ACE 抑制剂。将方法还应用于中药地龙及山楂筛选，发现共有 5 个组分与 ACE 有亲和作用，并且都能抑制 ACE 酶活性，验证了该方法的可靠性。

前沿亲和色谱作为通用性的研究分子间相互作用力的工具能有效地检测药物分子与标靶酶的结合程度，操作简单，提供的信息量多，可求得分子间相应的解离常数  $K_d$ ，并对各种配体的亲和力大小进行排序，同时可以区分药物靶标分子的多个结合位点，从而很好地提高了药物筛选的成功率。因此，以酶作为标靶与前沿亲和色谱技术结合用于天然药物的筛选已成为当今药物筛选最有效

的方法之一。与典型的高通量模式及传统的植物化学筛选模式相比，基于酶为标靶的前沿亲和色谱技术的筛选模式具有快速高效、灵敏、特异性强等特点。

目前以溶胶-凝胶等多孔材料制成的整体柱前沿亲和色谱主要分为以下四个步骤<sup>[67]</sup>：1、吸附 2、洗脱 3、梯度洗脱 4、平衡。吸附后，未被吸附的成分会被吸附缓冲液洗脱，然后，吸附的成分将被洗脱。通过改变 pH，离子强度，缓冲液的化学组成可以还原到初始状态，可重复利用。同时还要保证柱子的再循环使用。

## 1.5 本课题的研究内容和实验方案设计

### 1.5.1 研究内容

本课题旨在已建立的天然药物活性成分筛选平台的基础上，着手研究酶活性对色谱柱效能的影响情况。以建立更加完善的筛选体系在天然药物活性成分筛选中推广应用。

目前，酶为标靶的分子筛选技术目前国内外已广泛应用。酶作为分子标靶开展筛选，现有的方法主要是考察筛选对象对酶活的抑制作用，因此存在筛选过程对酶活要求高的问题。由于现有技术对酶活要求较高，为得到酶活高的样品，在筛选过程中往往使用的酶需要从病人的病变组织中提取得到的，因而可提供筛选的酶量很少。而基因工程可克隆多种酶，但往往活性较低，按现有技术应用于筛选很困难。

本文以筛选对象与靶酶的分子结合为考察依据，依托前沿亲和色谱技术进行，研究酶活对筛选结果的影响，以活性不高的酶作为筛选标靶，得到一种以酶活低但一级结构完整的酶作为靶标，应用于筛选与酶具有亲和作用的化合物的前沿色谱筛选方法。为天然药物资源利用提供快速有效的方法。

### 1.5.2 实验方案设计

本实验室已构建了以胰蛋白酶为标靶，依托前沿亲和色谱法，应用于抗前列腺癌的植物药效成分筛选平台<sup>[53]</sup>。以经过丙三醇改性的四乙氧基硅烷(TEOS)为制柱载体，将胰蛋白酶包埋于溶胶-凝胶中。筛选结果显示，在苦参碱、苦参素、大豆苷和染料木苷四种化合物中，苦参碱和苦参素与胰蛋白酶的亲和程度

较好，而大豆苷和染料木苷与胰蛋白酶几乎没有亲和力。

在此基础上，本文重点研究酶活对该筛选过程的影响。选用不同酶活的胰蛋白酶( Trypsin )作为标靶，以酶的特异性底物 N- $\alpha$ -苯甲酰-DL-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐( BAPNA )、苦参碱、苦参素为筛选对象，研究不同酶活情况下，筛选结果的变化。考察结果可决定基因工程酶可否应用于药物筛选。同时，在此基础上，将该筛选平台进行进一步的应用。以糖化酶为靶酶，开展糖化酶抑制剂筛选模型研究。此方法可应用于糖尿病天然药物的筛选。

同时，为了检测酶失活后一级结构，还需要关注酶蛋白的结构。蛋白质的功能与结构密切相关。当外界的物理、化学环境发生改变，就会使蛋白质结构发生改变，继而引起其功能的变化。有研究<sup>[68]</sup>通过芦丁作用后酶的紫外差光谱和荧光光谱的变化，从侧面推测芦丁对酶作用的机制。230 nm 处的紫外吸收主要是由肽键 C=O 基的  $n \rightarrow \pi^*$  跃迁引起，因此一般认为 230 nm 以下的紫外差光谱可以反映酶蛋白主链构象的变化；280 nm 处的紫外吸收则是由色氨酸和酪氨酸残基的芳香环的  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁引起。用加热的方法，获得了不同酶活的胰蛋白酶。由于聚丙烯酰胺凝胶具有三维网状结构，能起分子筛作用。用它作电泳支持物，对样品的分离取决于各组分所带电荷的多少及分子大小。蛋白质的迁移率主要取决于它的相对分子质量。所以通过 SDS-PAGE 可以看出加热后酶的肽链有无发生断裂，也就是酶的一级结构有无明显变化。

本文中继续开展对以胰蛋白酶为标靶的前沿亲和色谱筛选效果的研究。胰蛋白酶是由胰腺产生的，它是重要的蛋白消化酶，属于丝氨酸蛋白酶家族，是所有胰脏蛋白酶原的共同激活剂<sup>[69]</sup>。本实验室已完成的研究表明，通过前沿亲和色谱筛选的结果表明，苦参碱和苦参素与胰蛋白酶的结合能力比大豆苷和染料木苷要强，可以作为抗前列腺癌的药效化合物开发<sup>[53]</sup>。苦参碱和苦参素是一类生物碱，具有多方面的药理活性，其中的抗肿瘤作用近年来受到了极大的关注。目前国内外关于苦参碱和氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究显示<sup>[70]</sup>，苦参碱和苦参素通过抑制相关酶的活性、影响肿瘤细胞的正常分裂周期，从而抑制肿瘤细胞 DNA 的合成。也会通过控制相关因子的表达来抑制肿瘤的转移；通过影响端粒酶的活性，肿瘤相关基因的表达等途径，来诱发肿瘤细胞发生凋亡。因此，本实验中选用的药效物质继续沿用苦参碱和苦参素。



在研究了酶活对筛选结果的影响之后。本文中还将此筛选体系应用于以糖化酶为标靶，筛选治疗糖尿病的天然药物中。以此对该方法进行进一步验证。本文选用的天然药物是杨梅黄酮。

糖化酶又称为葡萄糖淀粉酶[Glucoamylase, (EC.3.2.1.3.)]。它既可以从非还原性末端  $\alpha$ -1,4 葡萄糖苷键产生葡萄糖，也能缓慢水解  $\alpha$ -1,6 葡萄糖苷键，使淀粉转化为葡萄糖。同时，糖化酶还能从非还原末端释放  $\beta$ -D-葡萄糖。在实际应用中，糖化酶还用来作培养基，用于各种抗生素、有机酸、氨基酸、维生素的发酵；还可用于大量生产各种规格的葡萄糖。糖化酶的底物专一性很低，能将直链淀粉和支链淀粉都水解为葡萄糖。

杨梅黄酮(Myricetin)又称为杨梅素。分子式  $C_{15}H_{10}O_8$ ，分子量为 318.24。为黄酮类中药提取物，溶于醇，是强抗氧化剂。近年研究表明，杨梅提取物具有以下功效：1. 血小板活化因子(PAF)的拮抗作用。2. 降血糖作用。3. 抗氧化作用。4. 保肝护肝作用。5. 减轻乙醇中毒。同时，杨梅黄酮还具有抗炎、抗肿瘤、抗突变、预防龋齿、抗氧化性、消除体内自由基等多种药理活性。它可以强力抑制酵母  $\alpha$ -葡(萄)糖苷酶、葡(萄)糖苷酶 I、体外葡(萄)糖苷酶 I 和牛奶中的黄嘌呤氧化酶，具有强抗氧化作用。杨梅黄酮还可以作为收敛剂，兴奋剂和催吐剂，用于腹泻、淋巴结核、慢性咽喉炎等。鉴于杨梅黄酮的药理和提取研究较为成熟，也可以利用资源优势，开发从杨梅枝叶和树皮中提取分离杨梅黄酮，并对其进行化学修饰或人工合成等研究以及工业化提取的方案筛选优化等工作。目前，美国 FDA 已将杨梅黄酮广泛应用于医药、食品、保健品和化妆品。例如作为添加剂用作治疗预防关节炎和各种炎症，尤其对怀孕妇女和哺乳期婴儿更加适合，由此杨梅黄酮有望进一步开发为特殊人群的消炎用药，从而减轻西药抗生素对人体的毒副作用。

因此，本文继续对以胰蛋白酶为标靶的溶胶-凝胶前沿亲和色谱筛选体系进行研究。对标靶酶的酶活对小分子药物在该体系中的筛选结果的影响进行重点研究。在得到了结果之后，再将此方法应用于杨梅黄酮与糖化酶的亲和力的检测上。并对糖化酶为标靶的色谱柱的适宜制柱条件进行探索，以获得适宜于制备糖化酶色谱柱的条件。本课题是在已建立的以酶为标靶的溶胶-凝胶法制备的前沿亲和色谱筛选平台上开展的一项新的应用。对进一步建立具有自主知识

产权的高通量的天然药物的筛选方法，解决天然植物成分药物筛选研究中的难题都将具有重要的科学意义和实用价值。同时，本课题将为解决天然药物研究进展缓慢、其中大量独特的药效物质未被发掘利用的问题，通过利用前沿亲和色谱技术来寻找和获得新药的可行性研究，为建立一个筛选天然药物活性成分的快速、有效的技术平台打下基础。



## 第二章 酶的活力对前沿亲和色谱筛选结果的影响

### 2.1 引言

为了获得较好的筛选效果,在以酶为标靶的色谱筛选方法中,一般有两个重要因素:一是需要高纯度的靶酶。二是酶需要较好地固定化<sup>[71]</sup>。因此,在目标药效物质的发现过程中,确定靶蛋白及其活力和纯度是重要任务。在靶蛋白的选择过程中,需要满足的条件有:一、容易处理。也就是蛋白的活性可以容易被衡量,既容易量化。二、有效。即可以通过动物实验或细胞实验,观察到其通过病理过程来发挥作用。很多药物是通过靶蛋白的表型筛选的方法发现的<sup>[72]</sup>。如果靶蛋白不确定,则会给药效物质的筛选带来困难。因此靶蛋白的特性对于药物的筛选来说具有重要意义。

本章实验沿用胰蛋白酶作为靶酶。以酶的特异性底物 N- $\alpha$ -苯甲酰-DL-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐( BAPNA )和已筛选出的天然药效化合物苦参碱和苦参素<sup>[53]</sup>作为应用对象。观察在不同酶活的条件下,通过前沿亲和色谱表征出的样品与酶的结合情况有何变化。

### 2.2 材料与方法

#### 2.2.1 主要试剂及仪器:

四乙氧基硅烷( TEOS ), 3-氨丙基三乙氧基硅烷( APTES ), 氯化四甲基铵: Acros Organics; PEG 600, 苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐( BAEE ), N- $\alpha$ -苯甲酰-DL-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐(BAPNA): 国药集团化学试剂有限公司;  
甘油: 杭州化学试剂有限公司;  
二甲基萘磺酰氯( DNS-Cl ): 上海生工生物工程技术有限公司  
胰蛋白酶: 合肥博美生物科技有限责任公司;  
苦参碱, 苦参素: 西安飞达生物技术有限公司, 含量 98%;

三羟甲基氨基甲烷( Tris ), N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯( BAEE ), 四甲基乙二胺( TEMED ), 丙烯酰胺( Acr ), 溴酚蓝, 考马斯亮蓝 G250, 过硫酸铵: 国药集团化学试剂有限公司;

亚甲双丙烯酰胺(Bis): 天津市化学试剂研究所;

十二烷基硫酸钠( SDS, 99%): 生工生物工程(上海)有限公司;

牛血清白蛋白( BSA ): 上海蓝季科技发展有限公司; SPD-20A UV-Vis spectrophotometer: Shimadzu;

LSP02-1B Longer Pump, TS2-60 Dual-syringe Pump: Longer ;

熔融石英毛细管柱( 内径700 mm ), 毛细管连接器: 郑州英诺高科有限公司;

N2000 色谱工作站: 浙江大学;

KQ2200 型超声清洗器: 昆山市超声仪器有限公司;

DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱: 上海一恒科学仪器有限公司;

BS124s 电子天平: 赛多利科学仪器。

0.5-10  $\mu\text{L}$ , 5-50  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  可调式移液器: 热电(上海)仪器有限公司;

DYCE-24DN 型垂直板电泳仪, DYY-10C 型电泳仪: 北京市六一仪器厂;

25  $\mu\text{L}$  微量进样器: 宁波市镇海玻璃仪器厂;

0.5-10  $\mu\text{L}$ , 5-50  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  可调式移液器: 热电(上海)仪器有限公司。

### 2.2.2 溶液的配制

0.2mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0): 取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.6608 g 和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  6.0844 g 用双蒸水溶解后, 定容至 500 mL;

10% APTES 的乙醇溶液: 取 400  $\mu\text{L}$  的 APTES 与 3.6 mL 的无水乙醇混合;

200 mg PEG600/mL  $\text{H}_2\text{O}$  溶液: 取 2 g PEG600, 用 10 mL 水溶解;

标准液: 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0), 0.1 mol/L 氯化四甲基铵;

淋洗液: 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0) ;

1.5 mol/L Tris-HCl(pH8.8): 称取 18.17 g Tris, 用 50 mL 双蒸水溶解, 用 6mol/L HCl 调 pH 至 8.8 后定容至 100 mL, 储存于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中, 3 个月内有效。

1.0 mol/L Tris-HCl( pH6.8 ): 称取 12.11 g Tris, 用 50 mL 双蒸水溶解, 用

6mol/L HCl 调 pH 至 6.8 后定容至 100 mL, 储存于 4 °C 冰箱中, 3 个月内有效。

30% Acr-Bis 液: 称取丙烯酰胺( Acr ) 29.1 g, 亚甲双丙烯酰胺( Bis ) 0.9 g, 混合后用双蒸水溶解定容至 100 mL, 用滤纸过滤后, 4 °C 棕色瓶储存。

10% SDS: 称取 10.0 g SDS, 用双蒸水溶解定容至 100 mL。

10% Ap: 称取 0.1 g 过硫酸铵(Ap)至 1.5 mL Ep 管中, 加 1 mL 双蒸水溶解, 需现配。

6×SDS 电泳上样缓冲液(pH 自然): 取 1.0 mol/L Tris-HCl( pH6.8 ) 3.75 mL, SDS 1.2 g, 甘油 3.0 mL, 溴酚蓝 12 mg, 用双蒸水溶解定容至 10 mL, 分装至 1.5 mL Ep 管。

10×电泳缓冲液 (pH 自然): 称取 Tris 20.86 g, 甘氨酸 71.43 g, SDS 4.957 g, 用双蒸水溶解定容至 500 mL, 使用前稀释 10 倍。

脱色液: 95%乙醇:冰醋酸:去离子水=4:1:5( V:V:V )。

考马斯亮蓝染色液: 每 100 mL 脱色液中含 0.05 g 考马斯亮蓝 G250。

底物溶液: 每100 mL的0.05 mol/L Tris-HCl( pH8.0 )缓冲液中加0.034 g BAEE和0.222 g CaCl<sub>2</sub>。

0.5 mg/mL胰蛋白酶溶液: 取0.0025 g胰蛋白酶溶5 mL 0.05 mol/L TrisHCl (pH8.0)缓冲液。

碳酸钠缓冲液: 取2.1 g NaHCO<sub>3</sub>, 7.1 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶于200 mL双蒸水后用2 mol/L HCl调pH至9.5, 定容至250 mL。

8 mL 5%的浓缩胶: 5.50 mL 双蒸水, 1.34 mL 30% Acr-Bis 液, 1.0 mL 1.0 M Tris-HCl(pH6.8); 0.08 mL 10% SDS, 0.08 mL 10% Ap, 8 μL TEMED。

15 mL 12%的分离胶: 4.95 mL 双蒸水, 6 mL 30% Acr-Bis 液, 3.75 mL 1.5 M Tris-HCl( pH8.8 ); 0.15 mL 10% SDS, 0.15 mL 10% Ap, 6 μL TEMED。

### 2.2.3 制柱前体 glycerated silane 合成方法

为了提高四乙氧基硅烷的生物亲和性, 根据本实验室已有的研究基础<sup>[73]</sup>, 将对四乙氧基硅烷通过与丙三醇的酯交换反应进行改性。经过丙三醇改性后的四乙氧基硅烷, 乙氧基将被羟基取代, 因此可以获得更好的生物亲和性。

四乙氧基硅烷的改性过程为: 在 250 mL 三口烧瓶中加入 60 mL 乙腈, 0.6 g

Amberlyst (dry), 30 mL 四乙氧基硅烷, 在 40 °C 水浴中搅拌, 并滴加入 4.95 mL 丙三醇, 反应时间为 96 小时。待反应结束后过滤除去催化剂, 将滤液于 25 °C 下减压蒸馏 (真空度低于 300 Pa), 得到透明状固体。

因为四乙氧基硅烷分子式中具有四个相同的乙氧基, 而丙醇中具有三个羟基, 因此合成反应后, 羟基会取代乙氧基, 形成产物 glycerated silane。产物红外表征结果如图 2-1 和 2-2 。

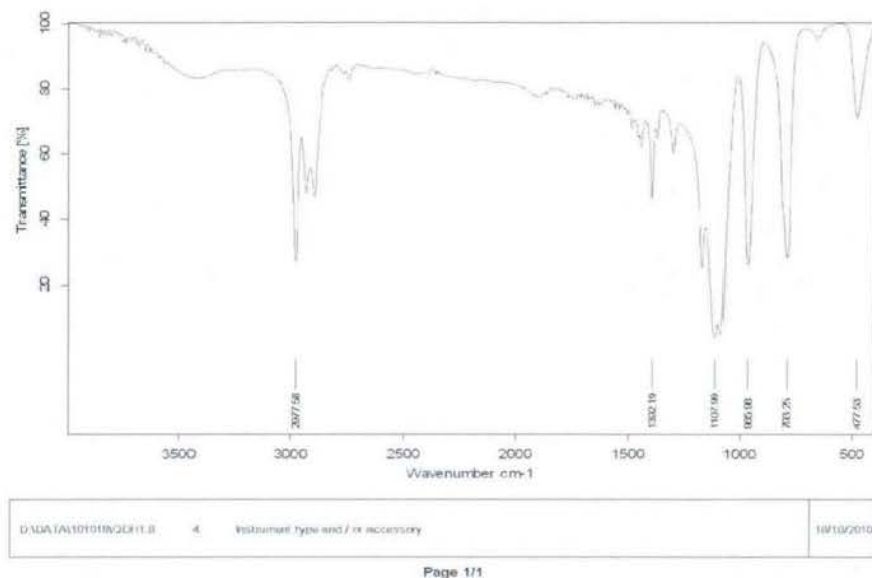


图 2-1 四乙氧基硅烷 (TEOS) 的红外图谱

Fig.2-1 IR spectra of the TEOS

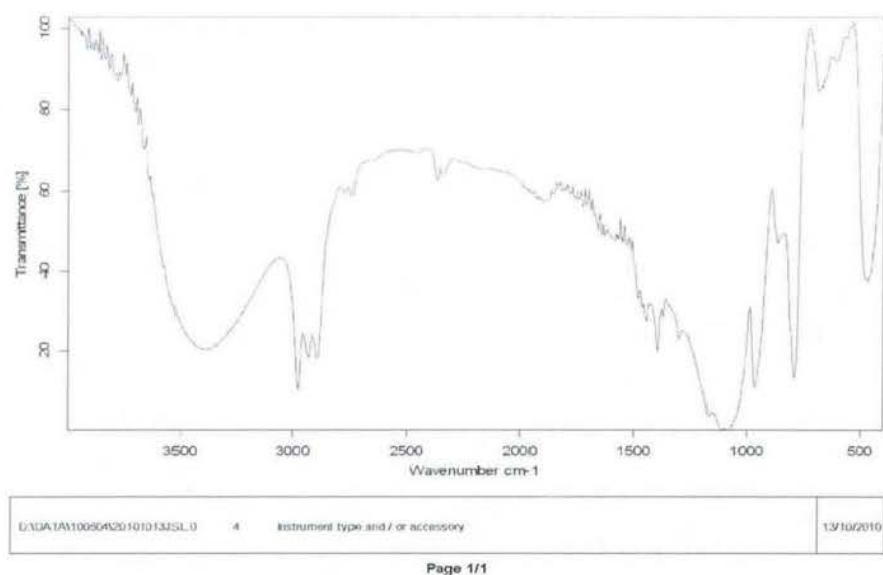


图 2-2 前体 glycerated silane 的红外谱图

Fig 2-2 IR spectra of the glycerated silane

由于游离的醇和酚的羟基峰在 3700-3500( $\text{cm}^{-1}$ )以内, 峰尖而强; 而缔和的



羟基在 3500-3200( $\text{cm}^{-1}$ )以内, 峰形强而宽。由图 2-2 可以判定丙三醇的基团取代了 TEOS 的乙氧基, 而形成了缔合的羟基。

#### 2.2.4 胰蛋白酶活力测定(BAEE-units/mg)方法

胰蛋白酶活力单位的定义规定为: 以BAEE为底物反应液 pH8.0, 25 °C, 反应体积3.0 mL, 光径1 cm的条件下, 测定 $\Delta A_{253}$ , 每分钟使 $\Delta A_{253}$ 增加 0.001, 反应液中所加入的酶量为一个BAEE单位。

本章中胰蛋白酶活力的测定采用BAEE-units/mg方法<sup>[53]</sup>。实验中采用N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯[(BAEE), N-benzoyl-L-arginine ethyl ester]作为底物, 水解反应, 得到水解反应产物N-苯甲酰-L-精氨酸[(BA), benzoyl-L-arginine]。

已知BAEE在波长253nm下的紫外光吸收弱于BA的紫外光吸收。因此在胰蛋白酶的催化下, BAEE随着酯键的水解, 水解产物BA逐渐增多, 反应体系的紫外光吸收亦随之相应增加, 以 $\Delta A_{253}$  nm计算胰蛋白酶的活性。计算公式如下:

$$\begin{aligned}\text{胰蛋白酶溶液的活力单位 (BAEE 单位/毫升)} &= \frac{\Delta A_{253}/\text{min}}{0.001 \times \text{酶液加入体积}} \times \text{稀释倍数} \\ \text{胰蛋白酶比活力 (BAEE 单位/毫克)} &= \frac{\text{胰蛋白酶溶液的活力单位}}{\text{胰蛋白酶浓度 (mg/mL)} \times \text{酶液加入体积}}\end{aligned}$$

本实验具体操作方法: 将酶溶液分别在50 °C、60 °C、70 °C的水浴中加热 20 min、30 min、40 min后待用。取两个光程为 1 cm 的带石英比色杯, 分别加入25 °C预热过的2.7 mL底物溶液( BAEE溶液, pH 8.0)。向一只比色杯中加入 0.3 mL 0.001 mol/L HCl, 作为空白, 校正仪器的253 nm处光吸收零点。再在另一比色杯中加入0.3 mL待测酶液( 酶液浓度为0.5 mg/mL ), 立即混匀并计时, 每30 s读数一次, 共计12次。根据计算公式可以得到酶活。

#### 2.2.5 SDS-PAGE 法鉴定胰蛋白酶一级结构的变化

蛋白质的一级结构即蛋白质多肽链中氨基酸残基的排列顺序是由密码子的排列顺序所决定的。各种氨基酸按密码子的顺序, 通过肽键连接起来, 形成多肽链, 肽键是蛋白质结构中的主键。其一级结构变化, 相应的分子量也会发生变化。改变酶活的方法有很多, 强酸、强碱、加热等方法都会使酶活丧失。当加热的温度超过了酶的最适温度, 酶活的活力会明显降低。但是, 加热一般不



会使蛋白质发生降解，也就很难改变蛋白质的一级结构。

聚丙烯酰胺凝胶电泳的分辨率较高，能检出 $10^{-9} \sim 10^{-12}$  g 样品，适用于分离和测定蛋白质、核酸等生物大分子化合物。它除了能对大分子物质进行定性、定量分析外，还可用以测定分子量。该方法可根据不同蛋白质分子所带电荷的差异及分子大小的不同所产生的不同迁移率将不同蛋白质分离成若干个条带，如果样品中只含有同一种蛋白质，那么经过电泳后，就应只得到一个条带。

精确称取0.004 g 胰蛋白酶溶解于120  $\mu$ L 双蒸水中，分成8管，分别为：1号不加热样品，2号50  $^{\circ}$ C水浴中加热20 min，3号50  $^{\circ}$ C水浴中加热30 min，4号50  $^{\circ}$ C水浴中加热40 min，5号60  $^{\circ}$ C水浴中加热20 min，6号70  $^{\circ}$ C水浴中加热20 min，7号70  $^{\circ}$ C水浴中加热30 min，8号70  $^{\circ}$ C水浴中加热40 min。

上样量：每孔 50  $\mu$ g 胰蛋白酶，即已处理好的 15  $\mu$ L 胰蛋白酶溶液以及 3  $\mu$ L Loading buffer。

上样后，接上电泳仪电极，打开电源，先把电压调至 80 V，待染料前沿进入分离胶成狭窄时，将电压提高 100 V，直到溴酚蓝指示剂迁移到接近凝胶底部立即停止电泳。将电泳后的凝胶板轻轻取下，放入染色液中染色，约 2 h 后，把染色液倒掉，加入脱色液，脱色 4-8 h，其间更换脱色液 3-4 次。可得到清晰条带的凝胶，将凝胶浸于水中便于保存。

## 2.2.6 前沿亲和色谱柱的制备

### 2.2.6.1 毛细管柱的预处理

取 12cm 的熔融石英毛细管柱，分别按顺序用 5 个柱体积的 1 mol/L NaOH,  $H_2O$ , 1 mol/L HCl,  $H_2O$  和无水乙醇进行洗涤。随后将毛细管柱置入体积分数为 10%APTES 的乙醇溶液中，超声 40 min 后，再用适量无水乙醇冲洗，在 50  $^{\circ}$ C 的烘箱中干燥 30 min 备用。

### 2.2.6.2 亲和色谱柱的制备

根据本实验室已建立的筛选平台的色谱柱的制作<sup>[53]</sup>，称取 45mg 胰蛋白酶，加入 128.2  $\mu$ L 双蒸水，120  $\mu$ L PEG600 溶液(200mg/mL)，50  $\mu$ L 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)，以及 1.8  $\mu$ L APTES。放置在 4  $^{\circ}$ C 冰箱中直到完全溶解成均一

溶液，待用。另称取 0.1 g glycerated silane，加入 0.15 mL 双蒸水和 2  $\mu\text{L}$  1 mol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$  水溶液后超声 30 min，使之溶解成均一液体。上述两种溶液等体积混合，摇匀，立即用注射器通过毛细连接器把混合液注入到预先处理好的 12 cm 毛细管柱中去。放置在室温中，3 min 后可以凝固。

根据本实验室之前的研究结果<sup>[73]</sup>，色谱柱制成后需放置在磷酸缓冲液中老化一段时间。老化时间与柱内凝胶孔径的形成以及液体在柱内的流动性能有密切的关系。老化时间越长，流动性能越好。凝胶柱内的孔径需要 7 天的时间才得以形成，可以获得最佳的检测结果。因此凝固后的色谱柱需浸没在 4  $^{\circ}\text{C}$  的磷酸缓冲液中，老化 7 天。使用前切除毛细管柱两头，使柱长为 10 cm。

### 2.2.7 前沿亲和色谱检测

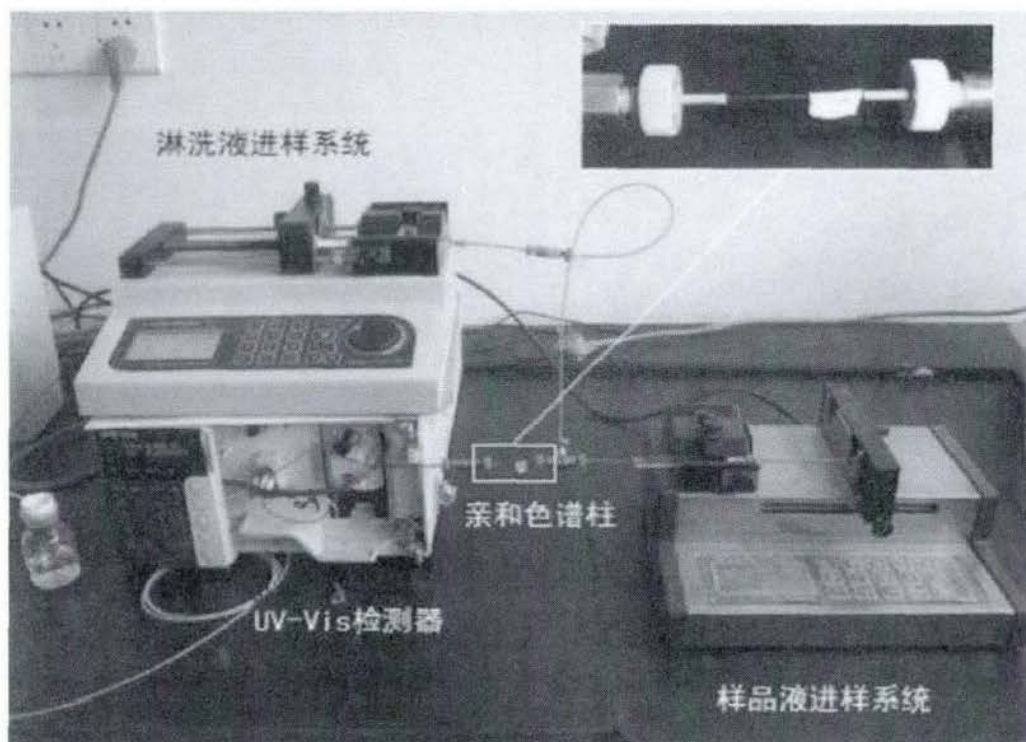


图 2-3 本文中前沿亲和色谱装置实拍图

Fig.2-3 Frontal affinity chromatography system

如图 2-3 所示为本文中所用前沿亲和色谱装置图。本文中前沿亲和色谱实验具体操作方法：在淋洗液进样系统中加入一定量的淋洗液。注意不要带入气泡。在样品液进样系统中加入待检测的样品。安装好色谱柱后。先用淋洗液淋洗色谱柱，一方面可以使去除色谱柱中未被包埋的酶，另一方面，使用淋洗液直至基线平衡。基线平衡后，通入配制好的样品溶液，即可获得样品的流出曲

线。在一个样品检测结束后，再通入淋洗液，洗脱掉结合在靶酶上的样品。基线再次平稳后，可以进行下一个样品的检测。

本实验以苯酚的流出曲线作为死体积  $V_0$  作为空白对照，苯酚与酶没有亲和作用。本章实验中淋洗液为 0.05 mol/L, pH 7.0 的磷酸盐缓冲液。色谱柱为胰蛋白酶色谱柱。通过改变柱中包埋的酶的活力，制得不同酶活的色谱柱。筛选的对象为酶的底物 BAPNA 以及苦参碱和苦参素。各样品溶于标准液(0.05 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液, 0.1 mol/L 氯化四甲基铵)配置成不同浓度后在前沿亲和色谱中检测，通过紫外分光光度仪，在各样品的最大紫外吸收处，得到各浓度样品的流出曲线图，再根据得到的突破体积，根据 1.4.1 中的公式，计算得酶与样品的结合常数  $K_d$ 。每次样品溶液检测前用 0.05 mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液淋洗使基线稳定。检测结束，用 0.05 mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液冲洗色谱柱后，将柱子保存在 4 °C 的磷酸缓冲液中。

实验结果的计算方法，根据 1.4.1 可知，前沿亲和色谱的基本平衡方程为  $K_d = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{B_t}{V - V_0} - [A]_0$  (1)  $K_d$  是解离系数；A 是待测化合物；B 是柱子所固定的生物大分子； $[A]_0$  是待测化合物 A 进入亲和柱中的浓度； $B_t$  是亲和色谱柱中固定的总的生物大分子 B 的量；V 是化合物 A 的洗脱体积； $V_0$  是与前沿色谱柱上生物大分子 B 没有亲和力的化合物的洗脱体积<sup>[53]</sup>。若待测化合物 A 以不同浓度的  $[A]_0$  进入色谱柱，则可得到相应的 V，以  $1/(V - V_0)$  为纵坐标，以  $[A]_0$  为横坐标，可得到一条直线  $y = kx + b$ ， $y = \frac{1}{V - V_0}$ ， $x = [A]_0$ ，那么  $k = \frac{1}{B_t}$ ， $b = \frac{K_d}{B_t}$ ，即  $B_t = \frac{1}{k}$ ， $K_d = \frac{b}{k}$ 。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 不同温度加热后酶活测定结果

按照 2.2.4 的实验操作方法，将酶溶液在不同温度的水浴中加热不同时间后，计算得出酶活均有不同程度的变化。结果如表 2-1。

表 2-1 游离胰蛋白酶在不同温度水浴加热条件下的酶活

Table 2-1 Aactivity of free trypsin in the conditions of different temperature water bath

| 酶<br>加热<br>温度 | 加<br>热<br>活<br>度  | 20 (min)             | 30 (min)         | 40 (min) | 0 (min)                                                             |
|---------------|-------------------|----------------------|------------------|----------|---------------------------------------------------------------------|
|               |                   |                      |                  |          |                                                                     |
| 50(°C)        | 酶活力:              | 酶活力: 1353.33         | 酶活力: 1030±19.58  |          |                                                                     |
|               | 2053.33±52.39U/mL | ±23.97 U/mL          | U/mL             |          |                                                                     |
|               | RSD=2.49%         | RSD=1.53%            | RSD=1.05%        |          |                                                                     |
|               | 比活力: 13688.9 U/g  | 比活力: 9022.22 U/g     | 比活力: 6866.67 U/g |          |                                                                     |
|               | 酶活变化: -30.00%     | 酶活变化: -53.58%        | 酶活变化: -64.89%    |          |                                                                     |
| 60(°C)        | 酶活力: 373.33±7.84  | 酶活力: 100±4.57 U/mL   | 酶活力: 93.99±3.9   |          |                                                                     |
|               | U/mL              | RSD=1.8%             | U/mL             |          |                                                                     |
|               | RSD=2%            | 比活力: 666.67 U/g      | RSD=2.05%        |          |                                                                     |
|               | 比活力: 2488.89 U/g  | 酶活变化: -96.59%        | 比活力: 622.22 U/g  |          |                                                                     |
|               | 酶活变化: -87.27%     |                      | 酶活变化: -96.80%    |          |                                                                     |
| 70(°C)        | 酶活力: 66.67±3.46   | 酶活力: 33.33±1.56 U/mL | 酶活力: 32.33±1.35  |          |                                                                     |
|               | U/mL              | RSD=2.2%             | U/mL             |          |                                                                     |
|               | RSD=2.8%          | 比活力: 222.22 U/g      | RSD=2.1%         |          |                                                                     |
|               | 比活力: 444.44 U/g   | 酶活变化: -98.72%        | 比活力: 220.22 U/g  |          |                                                                     |
|               | 酶活变化: -97.73%     |                      | 酶活变化: -98.86%    |          |                                                                     |
| 对照 (25°C)     |                   |                      |                  |          | 酶活力:<br>2933.33<br>±51.32 U/mL<br>RSD=1.25%<br>比活力:<br>19555.56 U/g |

已知游离的胰蛋白酶最适温度为 37 °C 左右。经过 50 °C 水浴加热 40 min 后，由于温度高，加热时间较长，酶活力明显降低。活力降为原酶活 30% 以下。经过 60 °C 以上的水浴加热后，酶活力降低更加明显。由上表可知，通过水浴加热的方法可以得到不同酶活的胰蛋白酶。



### 2.3.2 SDS-PAGE 法鉴定胰蛋白酶一级结构的变化

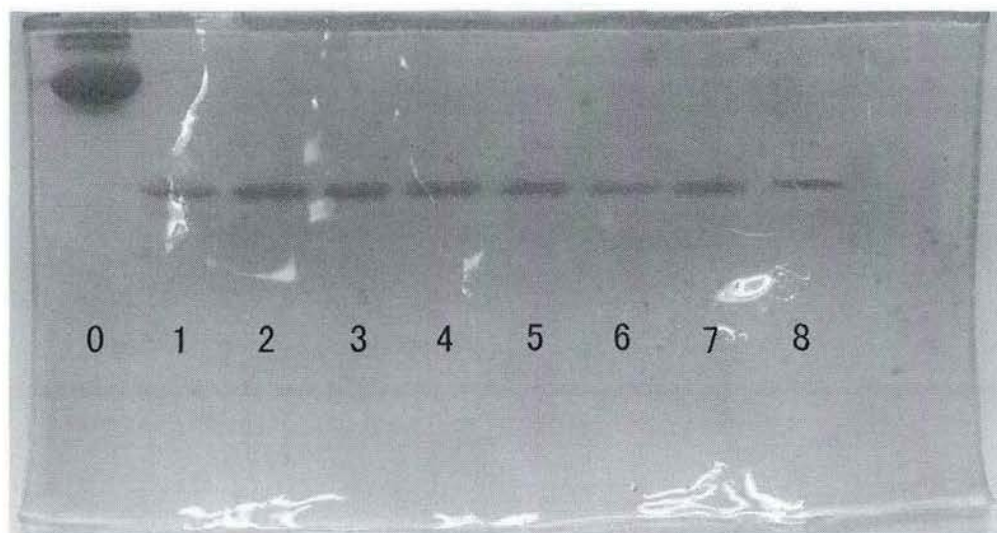


图 2-4 不同温度加热后胰蛋白酶 SDS-PAGE 结果

Fig.2-4 SDS-PAGE after different temperature heating of Trypsin

0: 牛血清白蛋白, 1: 不加热样品(酶活 2933.33U/mL), 2: 50 °C 水浴中加热 20 min( 酶活 2053.33U/mL ), 3: 50 °C 水浴中加热 30 min( 酶活 1353.33U/mL ), 4: 50 °C 水浴中加热 40 min ( 酶活 1030U/mL ), 5: 60 °C 水浴中加热 20 min ( 酶活 373.33U/mL ), 6: 70 °C 水浴中加热 20 min( 酶活 66.67U/mL ), 7: 70 °C 水浴中加热 30 min ( 酶活 33.33U/mL ), 8: 70 °C 水浴中加热 40 min( 酶活 32.33U/mL )

从图 2-4 凝胶电泳结果中可以得知, 不同条件下处理后的与未加热处理的胰蛋白酶经 SDS-PAGE 电泳后其条带处于同一水平上, 没有被降解的条带。由于各种蛋白质-SDS 复合物在电泳时的迁移率, 不受原有电荷和分子形状的影响, 而只与分子量的大小有关, 因此, 该结果可以表明经处理后的胰蛋白酶电泳后没有出现不同分子量的条带。实验过程中, 我们已避免强酸、强碱、强降解剂等能降解胰蛋白酶的物质, 在水浴加热下对胰蛋白酶进行处理。由实验结果可知经过加热后的胰蛋白酶, 虽然酶活发生明显变化, 但是电泳条带没有发生变化, 因此可以认为酶的一级结构没有发生明显改变。

### 2.3.3 前沿亲和色谱筛选结果

老化 7 天后的色谱柱首先用 0.05 mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液进行淋洗, 所耗体积大约 1 mL, 可以去除没有结合在柱子上的残留的甘油、PEG 和没有固定住的胰蛋白酶。两进样器分别承载样品溶液和淋洗液, 流速都为 4  $\mu$ L/min。每



次样品溶液检测前用 0.05 mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液淋洗使基线稳定。各样品溶于标准液(0.05mol/L, pH 7.0 磷酸缓冲液, 0.1mol/L 氯化四甲基铵)配制成不同浓度后在前沿亲和色谱中检测, 通过紫外检测器, 在各样品的最大紫外吸收处, 得到各浓度样品的流出曲线图。检测结束, 用 0.05 mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液冲洗色谱柱后, 将柱子保存在 4 °C 的磷酸缓冲液中。

将待测样品(本实验中样品为BAPNA、苦参碱和苦参素)溶于标准液(0.05 mol/L, pH 7.0磷酸缓冲液, 0.1 mol/L氯化四甲基铵)配置成不同浓度后用注射泵注入固定化酶毛细管柱, 控制流速4  $\mu$ L/min, 样液浓度控制在1 mmol/L以下。将苯酚样品通入色谱柱, 控制流速4  $\mu$ L/m, 可得到浓度突破体积 $V_0$ 。每次试验四个浓度的样液, 四个浓度的样液过柱时待筛选化合物出柱都能得到各自的突破体积 $V$ 。并根据前沿亲和色谱理论, 计算可得 $B_t$ ,  $K_d$ 。如果四个浓度的样品突破体积 $V$ 均相同, 且小于 $V_0$ , 说明该化合物与酶无亲和作用; 如果四个样品的突破体积 $V$ 有差异, 且都大于 $V_0$ , 说明化合物与酶有亲和作用。并且可以利用不同样品的 $K_d$ 来比较各化合物与酶的结合度。 $K_d$ 越小, 酶与该化合物的结合度越大。可由此结果筛选出与酶亲和力较强的目标化合物。

### 2.3.3.1 N- $\alpha$ -苯甲酰-DL-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐(BAPNA)在不同酶活色谱柱中的筛选的结果比较

为了探讨本实验方法对筛选天然药效化合物的应用, 本实验选用胰蛋白酶的底物 BAPNA 作为检测对象。将检测结果与天然药效物质的检测结果做对比, 作为酶的底物, BAPNA 的检测更能反应苦参素及苦参碱与胰蛋白酶的亲和作用方式。根据 2.2.6 中的实验方法制备好酶活为 2933.33 U/mL(室温)及酶活为 33.33 U/mL(酶液在 70 °C 水浴中加热 30 min)的色谱柱, 并老化。两个进样器分别承载样品溶液和淋洗液, 流速都为 4  $\mu$ L/min。每次样品溶液检测前用 0.05 mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液淋洗使基线稳定。实验温度控制在 25 °C。 $V_0$ 为 0.3  $\mu$ mol/L 苯酚在相同实验条件下的突破体积, 作为本实验的突破体积。BAPNA 溶于标准液(0.05 mol/L, pH 7.0 磷酸缓冲液, 0.1 mol/L 氯化四甲基铵), 浓度分别为 200  $\mu$ mol/L, 150  $\mu$ mol/L, 100  $\mu$ mol/L, 50  $\mu$ mol/L。通过紫外分光光度计扫描, 得到 BAPNA 的最大紫外吸收波长为 380 nm 及 227

nm。为了与避免其他物质干预，因此前沿亲和色谱的紫外检测器波长选择 380 nm。

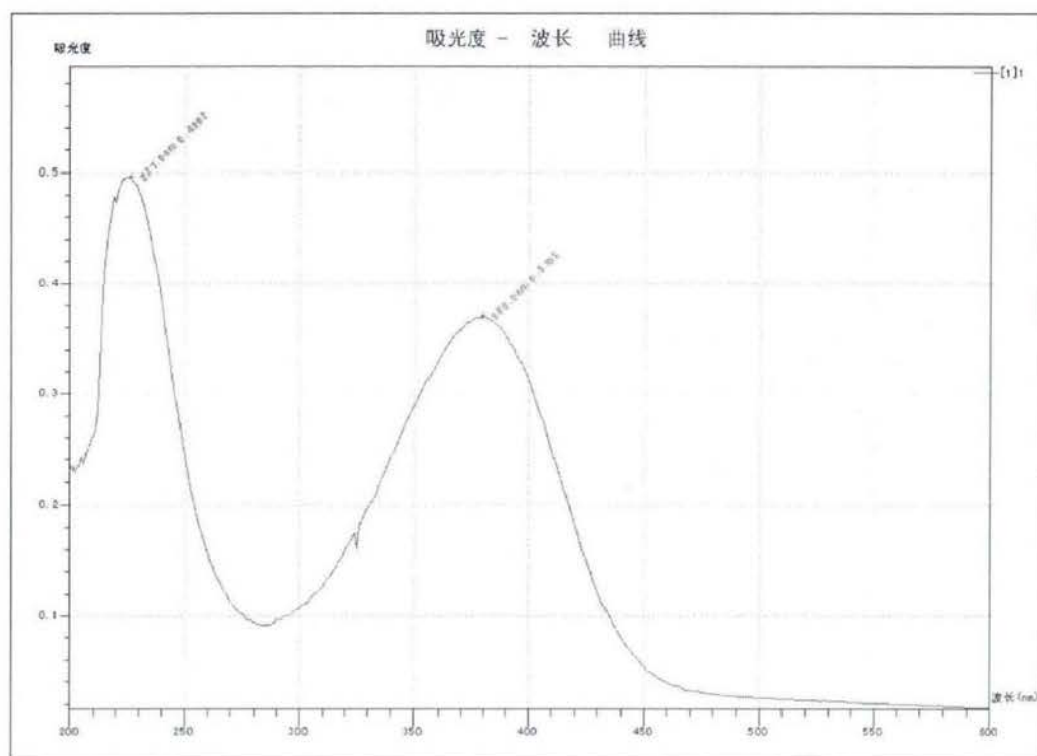


图 2-5 BAPNA 全波长扫描结果

Fig.2-5 Full wavelength scan results of BAPNA

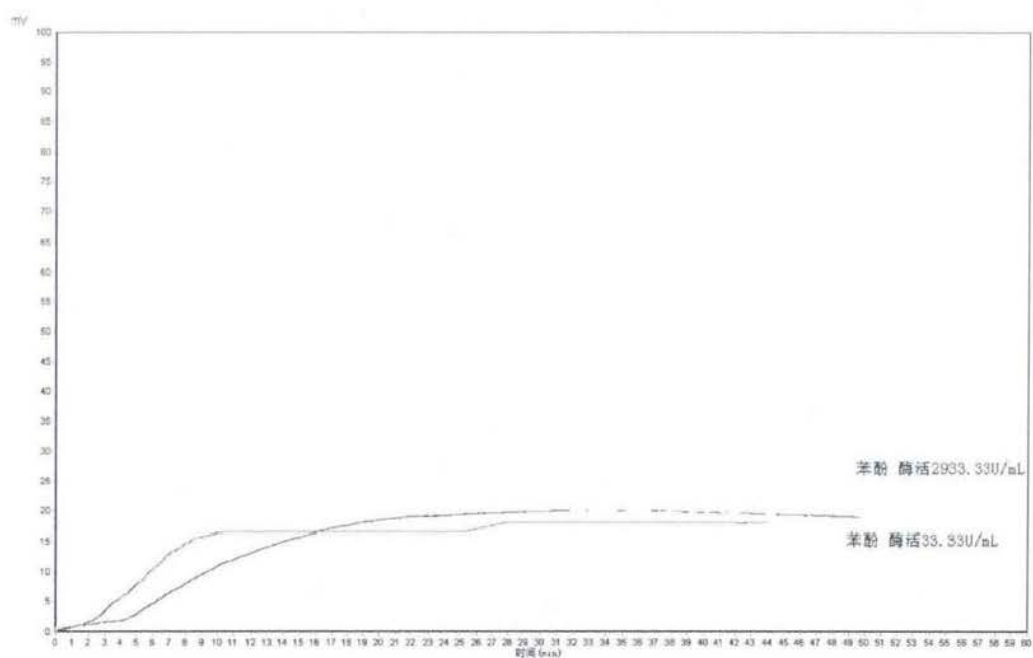


图 2-6 苯酚通过两个柱子的流出曲线

Fig.2-6 Breakthrough curves for Phynol

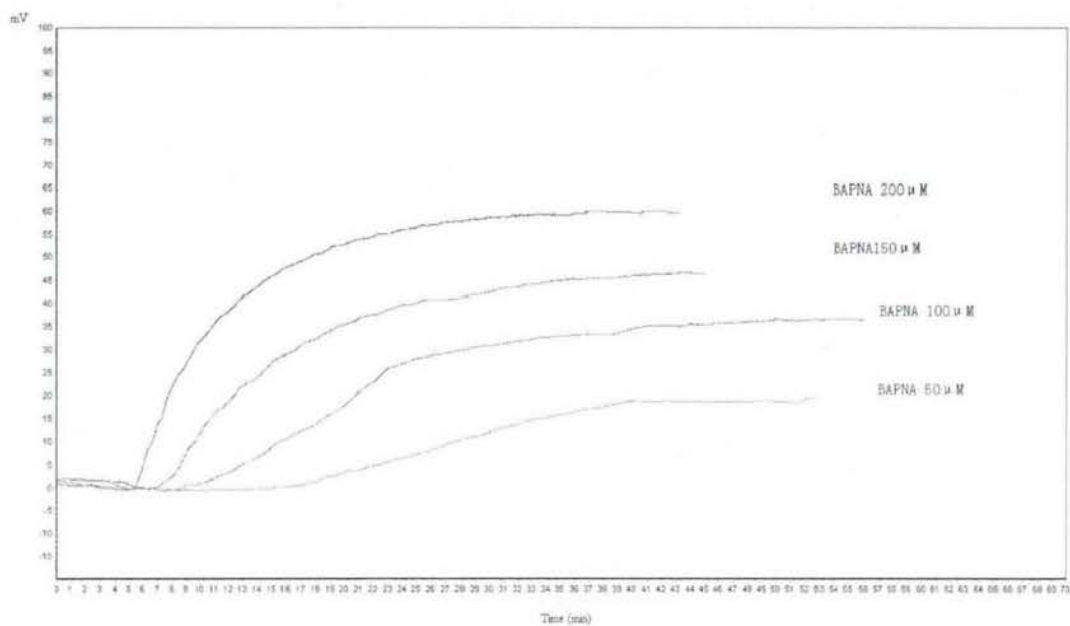


图 2-7 BAPNA 通过酶活为 2933.33 U/mL 的色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-7 Breakthrough curves for BAPNA at activity of tpsin is 2933.33U/mL

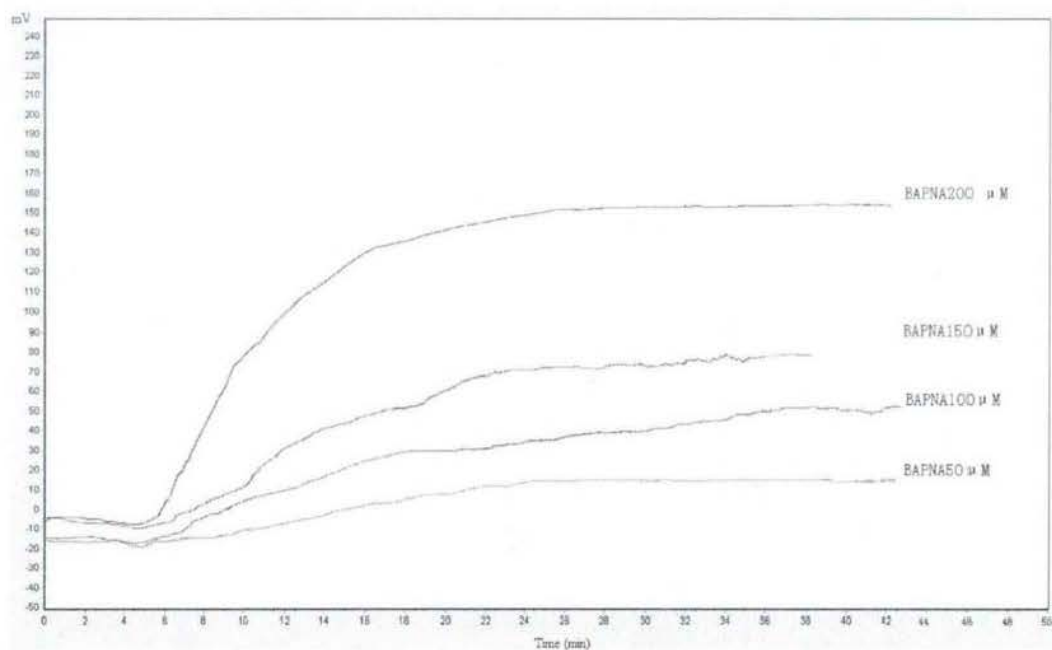


图 2-8 BAPNA 通过酶活为 33.33 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-8 Breakthrough curves for BAPNA at activity of tpsin is 33.33 U/mL

表2-2 BAPNA在不同柱中前沿亲和色谱的计算值

| 样品                                | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{Bt} + \frac{[A]_0}{Bt}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| BAPNA<br>(酶活为<br>2933.33<br>U/mL) | 200                          | 0.0212          | 47.169                                    | $Y=9.307x+4.8870$                                     | 0.107      | 0.525               |
|                                   | 150                          | 0.0388          | 25.752                                    |                                                       |            |                     |
|                                   | 100                          | 0.0445          | 22.451                                    |                                                       |            |                     |
|                                   | 50                           | 0.0580          | 17.246                                    |                                                       |            |                     |
| BAPNA<br>(酶活为<br>33.33<br>U/mL)   | 200                          | 0.0222          | 45.019                                    | $Y=6.933x+13.851$                                     | 0.144      | 1.997               |
|                                   | 150                          | 0.0332          | 30.120                                    |                                                       |            |                     |
|                                   | 100                          | 0.0377          | 26.472                                    |                                                       |            |                     |
|                                   | 50                           | 0.0432          | 23.124                                    |                                                       |            |                     |

由表2-2可知，酶活为33.33 U/mL时，活力仅为室温下酶活的1.28%，BAPNA与酶的Kd为1.997，酶未失活时，Kd为0.525。该结果说明酶经过加热后，酶与BAPNA的Kd增大，也就是结合力减小，亲和程度降低。由实验结果推测可得，当酶经过加热以后，酶活降低，酶发生变性，空间结构发生明显变化，BAPNA与酶的结合受到影响，因此解离常数增大，结合度减小。由酶与底物的“锁匙理论”可知，酶与底物的结合与酶的空间结构有关。BAPNA作为酶的底物，与酶的结合是多位点类型，这一实验结果符合酶与底物的“锁匙理论”，即底物和酶的结合强度与酶的空间结构有关系。虽然制柱的材料和过程均一致，但是由于两个柱子在制作过程中的手工误差及在进样过程中酶的流失，Bt发生了微小变化，结果可以接受。

### 2.3.3.2 苦参素在不同酶活色谱柱中的筛选结果比较

根据 2.2.6 中的实验方法制备好酶活分别为 2933.33 U/mL (室温)、2053.33 U/mL (酶液 50 °C 水浴中加热 20 min)、1353.33 U/mL (酶液 50 °C 水浴中加热 30 min)、1030 U/mL (酶液 50 °C 水浴中加热 40 min)、373.33 U/mL (酶液 60 °C 水

浴中加热 20 min)、66.67 U/mL( 酶液 70 ℃水浴中加热 20 min)、33.33 U/mL( 酶液 70 ℃水浴中加热 30 min)、32.33 U/mL( 酶液 70 ℃水浴中加热 40 min)的色谱柱,并老化。老化后的色谱柱首先用 0.05 mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液进行淋洗。待基线稳定后,将苦参素用标准液( 0.05 mol/L, pH 7.0 磷酸缓冲液, 0.1 mol/L 氯化四甲基铵)配制成浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ 、2  $\mu\text{mol/L}$ 、0.4  $\mu\text{mol/L}$ 、0.08  $\mu\text{mol/L}$  的溶液,用注射泵注入所制备的不同酶活程度的固定化酶毛细管柱,控制流速 4  $\mu\text{L/min}$ 。通过紫外分光光度仪全波长扫描,得到苦参素的紫外吸收最大处为 228 nm。因此前沿亲和色谱的紫外检测器波长选择 228nm。

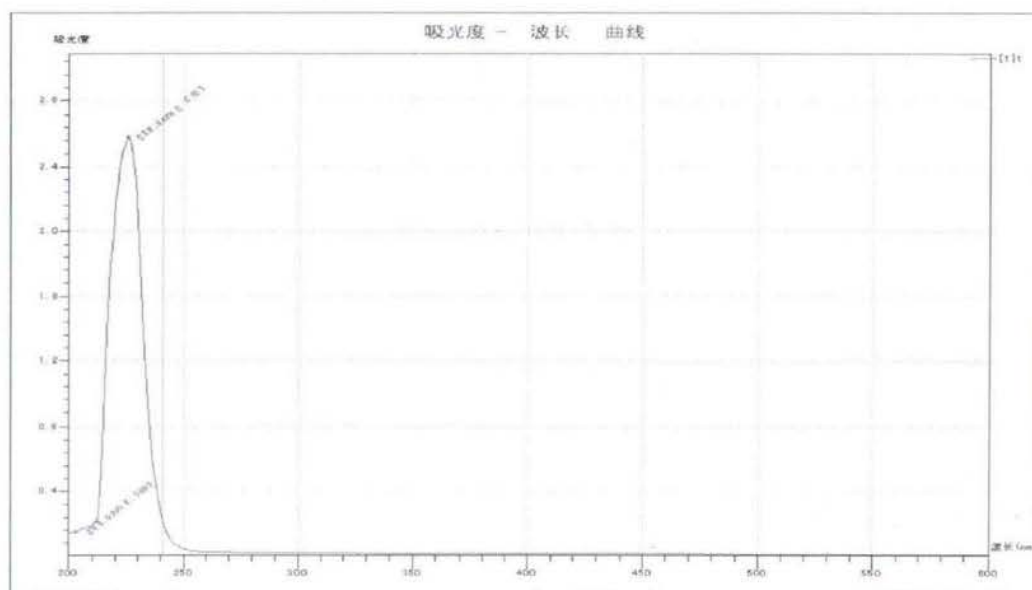


图2-9 苦参素全波长扫描

Fig.2-9 Oxymatrine full wavelength (200 ~ 600nm) UV absorption spectrum scanning

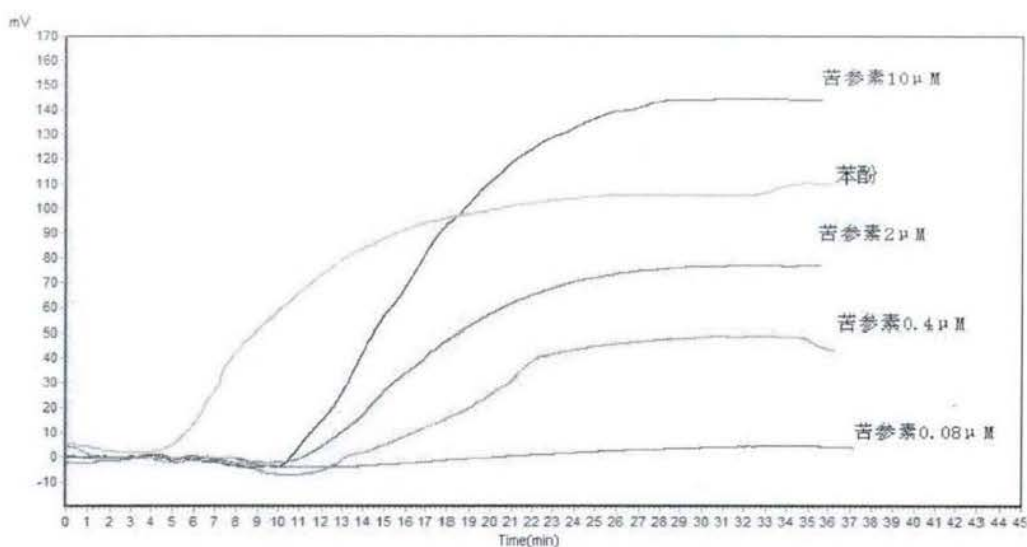


图 2-10 苦参素通过酶活为 2933.33 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-10 Breakthrough curves for Oxymatrine at activity of typsin is 2933.33 U/mL



表 2-3 苦参素在酶活为 2933.33 U/mL 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-3 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Oxymatrine at 100% activity of tpsin is 2933.33 U/mL

| 样品                              | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{B_t} + \frac{[A]_0}{B_t}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参素<br>(酶活为<br>2933.33<br>U/mL) | 10                           | 0.0253          | 39.526                                    | $Y=4.2121x+23.633$                                      | 0.237      | 5.6                 |
|                                 | 2                            | 0.0261          | 38.345                                    |                                                         |            |                     |
|                                 | 0.4                          | 0.0325          | 30.769                                    |                                                         |            |                     |
|                                 | 0.08                         | 0.0357          | 28.011                                    |                                                         |            |                     |

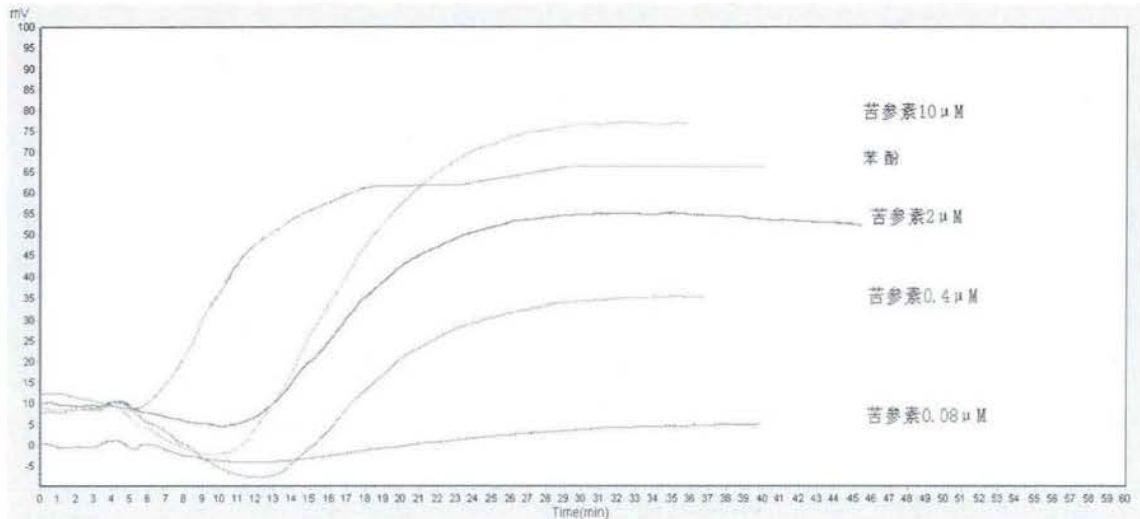


图2-11 苦参素通过酶活为2053.33 U/mL色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-11 Breakthrough curves for Oxymatrine at activity of tpsin is 2053.33 U/mL

表2-4 苦参素在酶活为2053.33 U/mL色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-4 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Oxymatrine at activity of tpsin is 2053.33 U/mL

| 样品                              | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{B_t} + \frac{[A]_0}{B_t}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参素<br>(酶活为<br>2053.33<br>U/mL) | 10                           | 0.0273          | 36.631                                    | $Y=3.8644x+21.23$                                       | 0.258      | 5.49                |
|                                 | 2                            | 0.0301          | 33.222                                    |                                                         |            |                     |
|                                 | 0.4                          | 0.0353          | 28.328                                    |                                                         |            |                     |
|                                 | 0.08                         | 0.0393          | 25.381                                    |                                                         |            |                     |

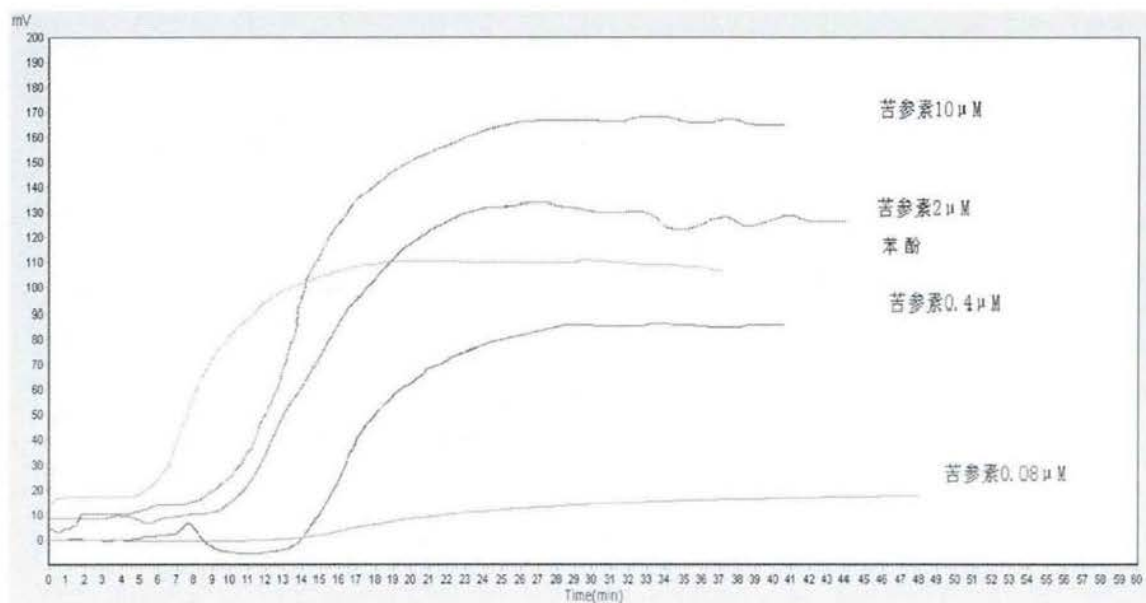


图 2-12 苦参素通过酶活为 1353.33 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-12 Breakthrough curves for Oxymatrine at activity of trypsin is 1353.33 U/mL

表 2-5 苦参素在酶活为 1353.33 U/mL 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-5 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Oxymatrine at activity of trypsin is 1353.33 U/mL

| 样品                              | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{B_t} + \frac{[A]_0}{B_t}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参素<br>(酶活为<br>1353.33<br>U/mL) | 10                           | 0.0303          | 33.003                                    | $Y=3.3965x+19.388$                                      | 0.294      | 5.708               |
|                                 | 2                            | 0.0341          | 29.325                                    |                                                         |            |                     |
|                                 | 0.4                          | 0.0376          | 26.596                                    |                                                         |            |                     |
|                                 | 0.08                         | 0.0442          | 22.591                                    |                                                         |            |                     |

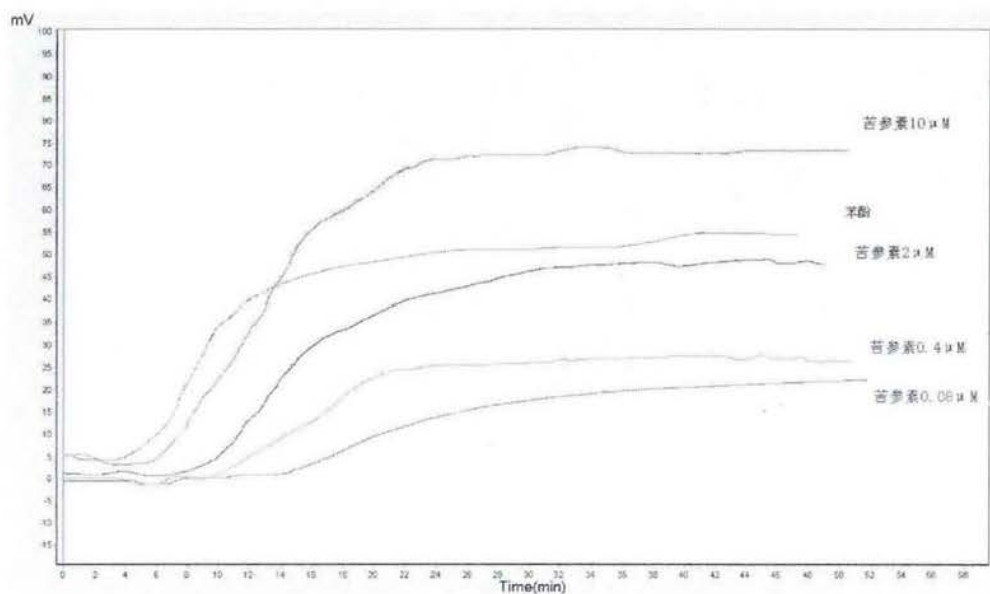


图 2-13 苦参素通过酶活为 1030 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-13 Breakthrough curves for Oxymatrine at activity of typsin is 1030 U/mL

表 2-6 苦参素在酶活为 1030 U/mL 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-6 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Oxymatrine at activity of typsin is 1030 U/mL

| 样品                           | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{B_t} + \frac{[A]_0}{B_t}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参素<br>(酶活为<br>1030<br>U/mL) | 10                           | 0.0252          | 39.683                                    | $Y=4.3451x+22.846$                                      | 0.230      | 5.257               |
|                              | 2                            | 0.0269          | 37.174                                    |                                                         |            |                     |
|                              | 0.4                          | 0.0327          | 30.581                                    |                                                         |            |                     |
|                              | 0.08                         | 0.0365          | 27.397                                    |                                                         |            |                     |

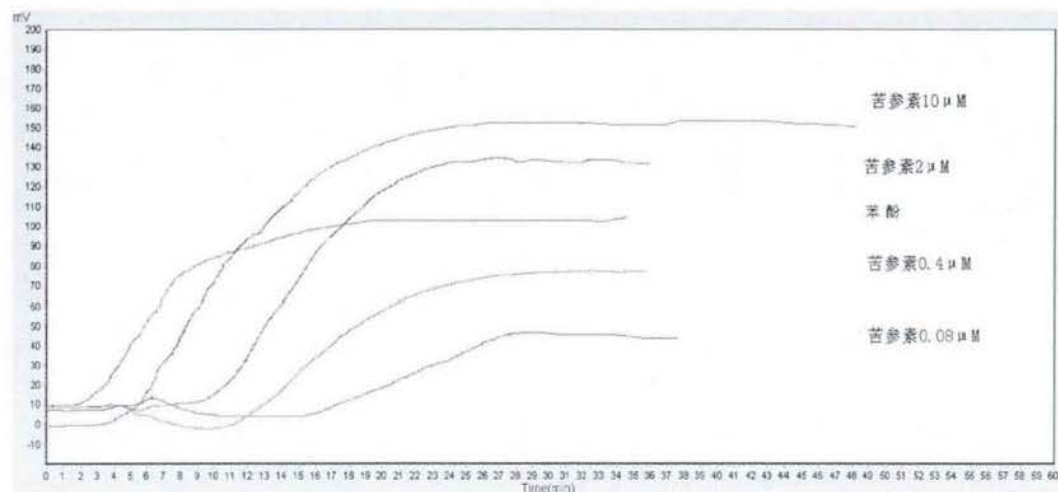


图 2-14 苦参素通过酶活为 373.33 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-14 Breakthrough curves for Oxymatrine at activity of tpsin is 373.33 U/mL

表 2-7 苦参素在酶活为 373.33 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-7 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Oxymatrine at activity of tpsin is 373.33U/mL

| 样品                             | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{B_t} + \frac{[A]_0}{B_t}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参素<br>(酶活为<br>373.33<br>U/mL) | 10                           | 0.0330          | 30.089                                    | $Y=3.1046x+17.602$                                      | 0.322      | 5.669               |
|                                | 2                            | 0.0371          | 26.954                                    |                                                         |            |                     |
|                                | 0.4                          | 0.0425          | 23.529                                    |                                                         |            |                     |
|                                | 0.08                         | 0.0478          | 20.882                                    |                                                         |            |                     |

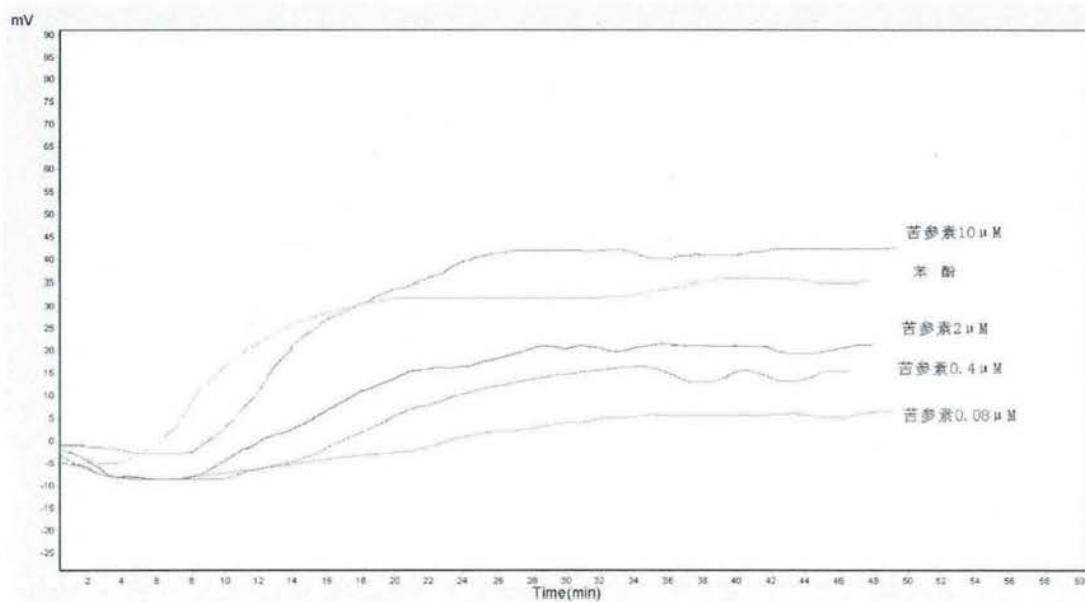


图 2-15 苦参素通过酶活为 66.67 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-15 Breakthrough curves for Oxymatrine at activity of tyrosinase is 66.67 U/mL

表 2-8 苦参素在酶活为 66.67 U/mL 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-8 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Oxymatrine at activity of tyrosinase is 66.67U/mL

| 样品                            | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{B_t} + \frac{[A]_0}{B_t}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参素<br>(酶活为<br>66.67<br>U/mL) | 10                           | 0.0263          | 38.023                                    | $Y=3.8822x+22.254$                                      | 0.257      | 5.732               |
|                               | 2                            | 0.0297          | 33.670                                    |                                                         |            |                     |
|                               | 0.4                          | 0.0336          | 29.762                                    |                                                         |            |                     |
|                               | 0.08                         | 0.0379          | 26.385                                    |                                                         |            |                     |



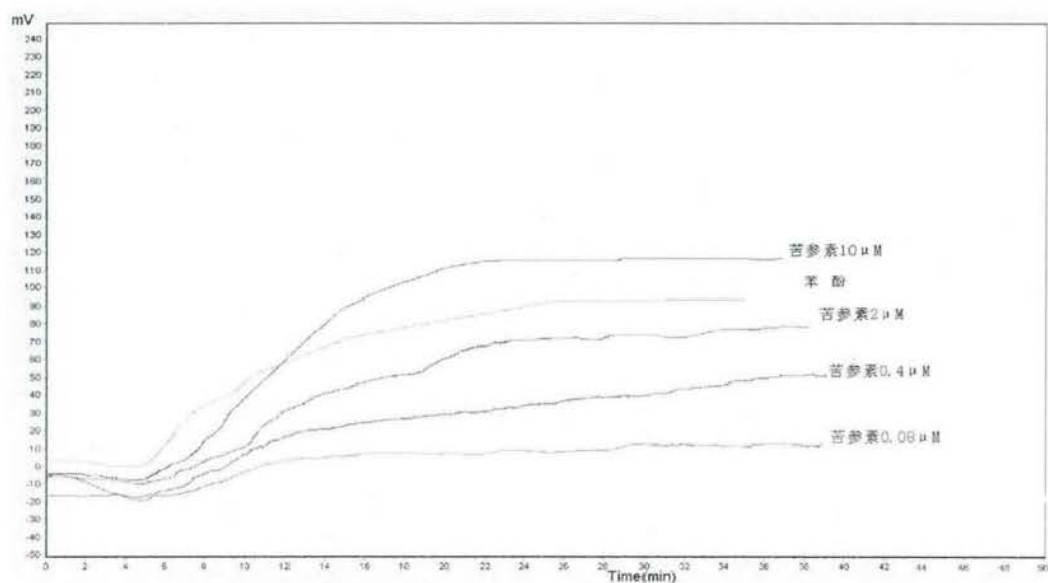


图 2-16 苦参素通过酶活为 33.33 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-16 Breakthrough curves for Oxymatrine at ctivity of typsin is 33.33 U/mL

表 2-9 苦参素在酶活为 33.33 U/mL 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-9 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Oxymatrine at activity of typsin is 33.33U/mL

| 样品                            | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{B_t} + \frac{[A]_0}{B_t}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参素<br>(酶活为<br>33.33<br>U/mL) | 10                           | 0.0277          | 36.101                                    | $Y=3.6521x+20.002$                                      | 0.273      | 5.476               |
|                               | 2                            | 0.0333          | 30.030                                    |                                                         |            |                     |
|                               | 0.4                          | 0.0405          | 24.691                                    |                                                         |            |                     |
|                               | 0.08                         | 0.0389          | 25.707                                    |                                                         |            |                     |

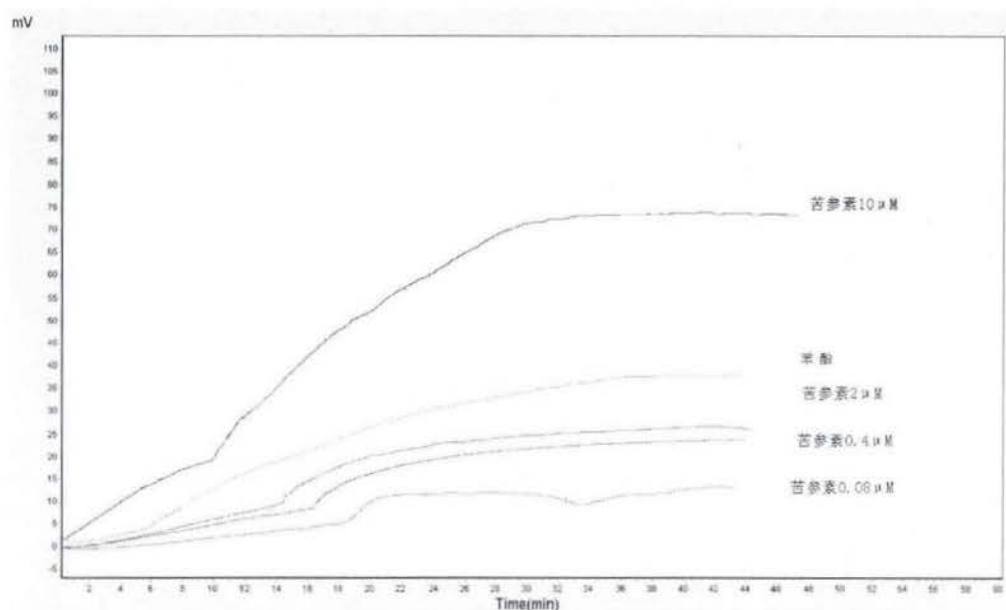


图 2-17 苦参素通过酶活为 32.33 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-17 Breakthrough curves for Oxymatrine at activity of tpsin is 32.33 U/mL

表 2-10 苦参素在酶活为 32.33 U/mL 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-10 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Oxymatrine at activity of tpsin is 32.33 U/mL

| 样品    | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{B_t} + \frac{[A]_0}{B_t}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|-------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参素   | 10                           | 0.0277          | 36.101                                    | $Y=3.8237x+20.002$                                      | 0.262      | 5.231               |
| (酶活为  | 2                            | 0.0315          | 31.746                                    |                                                         |            |                     |
| 32.33 | 0.4                          | 0.0405          | 24.691                                    |                                                         |            |                     |
| U/mL) | 0.08                         | 0.0389          | 25.707                                    |                                                         |            |                     |

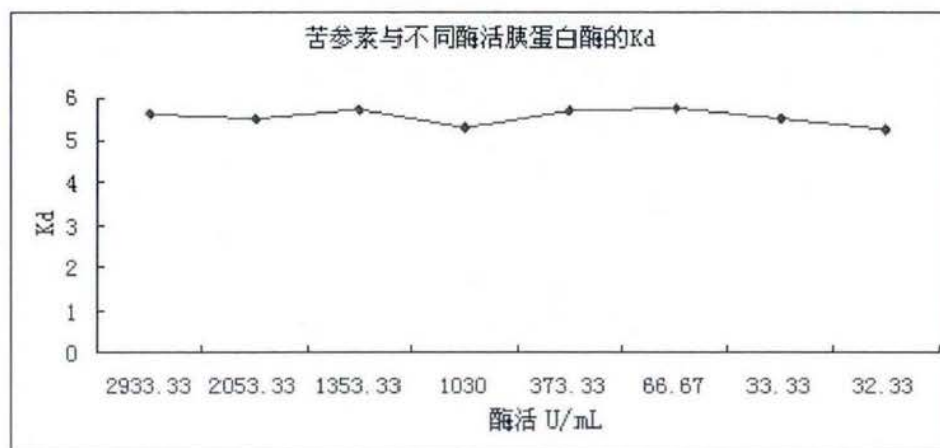


图 2-18 苦参素与不同酶活胰蛋白酶的 Kd 比较

Fig.2-18 Kd of Oxymatrine and trypsin at different activity

前沿亲和色谱检测得到的Bt和Kd值能够清晰地比较出各样品和胰蛋白酶亲和色谱柱结合力的大小。在给定流速的条件下，样品浓度的提高使柱子亲和体饱和得越快。因此，高浓度样品会得到较小的突破体积。本实验温度控制在25℃，使各待测化合物以不同浓度的[A]<sub>0</sub>进入胰蛋白酶亲和色谱柱。根据得到的实验结果，经过前沿亲和色谱的筛选，并且通过实验计算得到的苦参素与酶的解离常数Kd，与酶未失活的色谱柱的Kd在数值上变化非常小。该结果说明，苦参素与酶的结合情况受酶的空间结构改变的影响较小。酶活虽然改变，但是酶的一级结构基本没有发生改变，由此推测苦参素与酶的结合应是单类位点结合，与酶的一级结构相关。因此不同酶活的色谱柱对筛选结果没有明显的影响。在酶失活严重（酶活不到原酶活的2%）的情况下，色谱柱依然能够完成筛选过程，得到有效筛选结果。

### 2.3.3.3 苦参碱在不同酶活色谱柱中的筛选结果比较

按照 2.2.6.2 中的制柱方法制备好酶活分别为 2933.33 U/mL（室温）、2053.33 U/mL（酶液 50℃水浴中加热 20 min）、1353.33 U/mL（酶液 50℃水浴中加热 30 min）、1030 U/mL（酶液 50℃水浴中加热 40 min）、373.33 U/mL（酶液 60℃水浴中加热 20 min）、66.67 U/mL（酶液 70℃水浴中加热 20 min）、33.33 U/mL（酶液 70℃水浴中加热 30 min）、32.33 U/mL（酶液 70℃水浴中加热 40 min）的色谱柱，并老化。老化后的色谱柱首先用 0.05 mol/L，pH 7.0 的磷酸缓冲液进行淋洗。待基线平衡后，将苦参碱用标准液（0.05 mol/L，pH 7.0 磷酸缓冲液，0.1 mol/L

氯化四甲基铵)配制成浓度为  $10\ \mu\text{mol/L}$ 、 $2\ \mu\text{mol/L}$ 、 $0.4\ \mu\text{mol/L}$ 、 $0.08\ \mu\text{mol/L}$  四个不同浓度的溶液,用样品进样器注入所制备的不同酶活程度的固定化酶毛细管柱,控制流速  $4\ \mu\text{L/min}$ 。通过紫外分光光度仪全波长扫描,得到苦参碱的最大紫外吸收处为  $227\ \text{nm}$ 。因此前沿亲和色谱的紫外检测器波长选择  $227\ \text{nm}$ 。

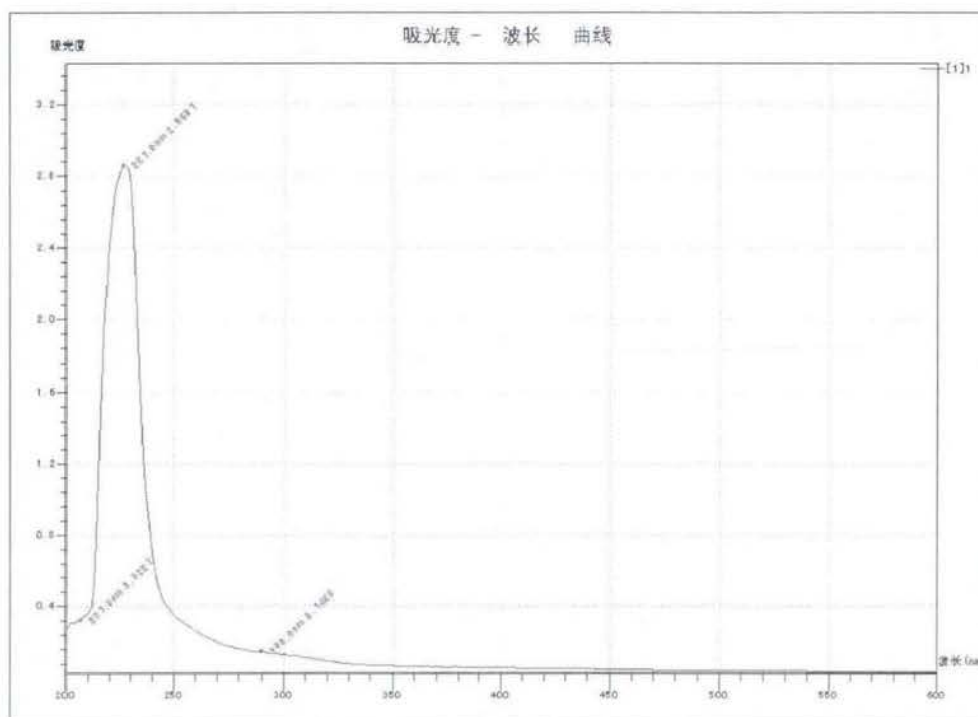


图 2-19 苦参碱全波长扫描结果

Fig.2-19 Full wavelength scan results of Matrine

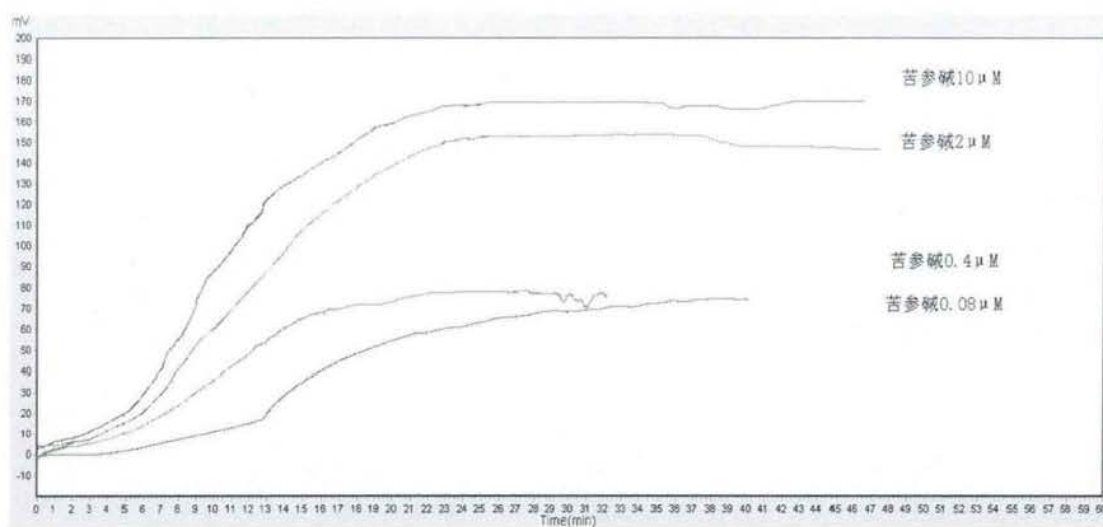


图 2-20 苦参碱通过酶活为  $2933.33\ \text{U/mL}$  色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-20 Breakthrough curves for Matrine at activity of trypsin is  $2933.33\ \text{U/mL}$



表 2-11 苦参碱在酶活为 2933.33 U/mL 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-11 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Matrine at activity of typsin is 2933.33 U/mL

| 样品                              | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{Bt} + \frac{[A]_0}{Bt}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参碱<br>(酶活为<br>2933.33<br>U/mL) | 10                           | 0.0245          | 40.816                                    | $Y=4.7495x+18.48$                                     | 0.211      | 3.89                |
|                                 | 2                            | 0.0257          | 28.011                                    |                                                       |            |                     |
|                                 | 0.4                          | 0.0365          | 27.397                                    |                                                       |            |                     |
|                                 | 0.08                         | 0.0397          | 25.189                                    |                                                       |            |                     |

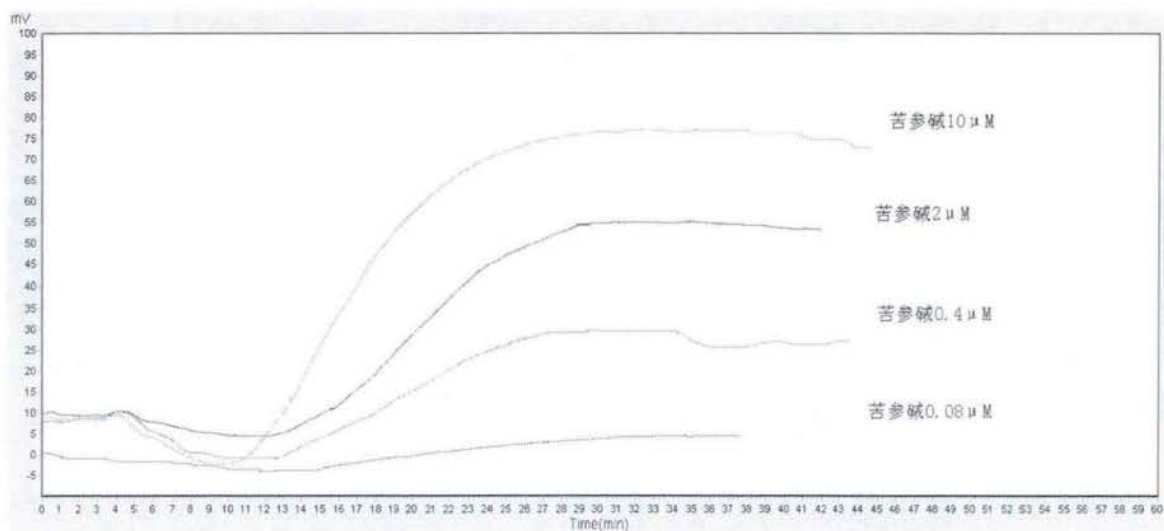


图 2-21 苦参碱通过酶活为 2053.33 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-21 Breakthrough curves for Matrine at activity of typsin is 2053.33 U/mL

表 2-12 苦参碱在酶活为 2053.33 U/mL 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-12 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Matrine at activity of typsin is 2053.33 U/mL

| 样品                              | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{Bt} + \frac{[A]_0}{Bt}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参碱<br>(酶活为<br>2053.33<br>U/mL) | 10                           | 0.0257          | 38.911                                    | $Y=5.5379x+17.772$                                    | 0.181      | 3.209               |
|                                 | 2                            | 0.0273          | 36.630                                    |                                                       |            |                     |
|                                 | 0.4                          | 0.0365          | 27.397                                    |                                                       |            |                     |
|                                 | 0.08                         | 0.0425          | 23.529                                    |                                                       |            |                     |



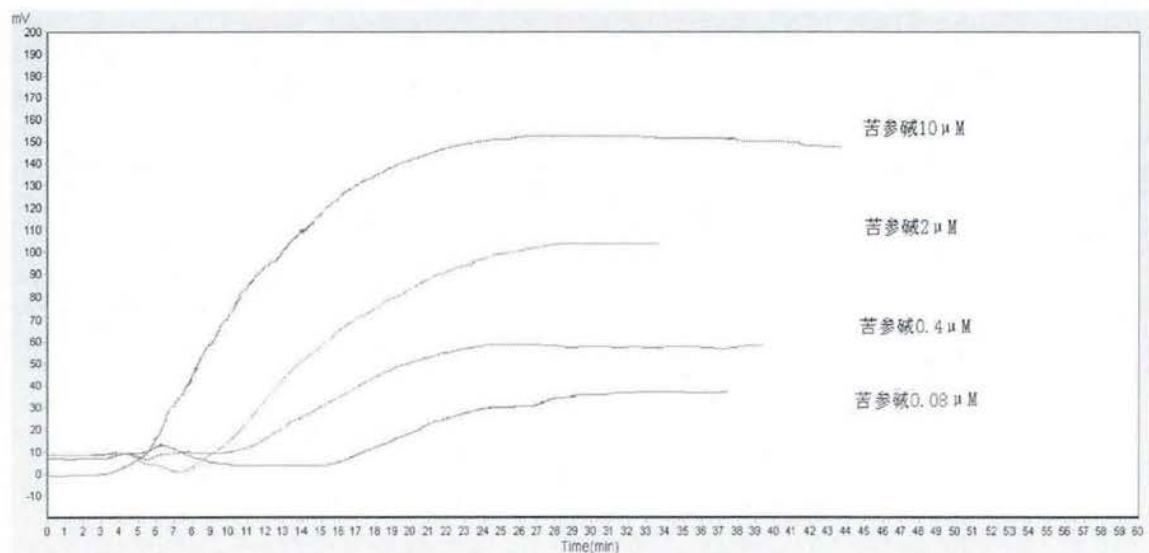


图 2-22 苦参碱通过酶活为 1353.33 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-22 Breakthrough curves for Matrine at activity of typsin is 1353.33 U/mL

表 2-13 苦参碱在酶活为 1353.33 U/mL 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-13 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Matrine at activity of typsin is 1353.33 U/mL

| 样品                              | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{B_t} + \frac{[A]_0}{B_t}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参碱<br>(酶活为<br>1353.33<br>U/mL) | 10                           | 0.0244          | 40.983                                    | $Y=5.1024x+18.902$                                      | 0.195      | 3.705               |
|                                 | 2                            | 0.0312          | 32.051                                    |                                                         |            |                     |
|                                 | 0.4                          | 0.0352          | 28.409                                    |                                                         |            |                     |
|                                 | 0.08                         | 0.0397          | 25.189                                    |                                                         |            |                     |

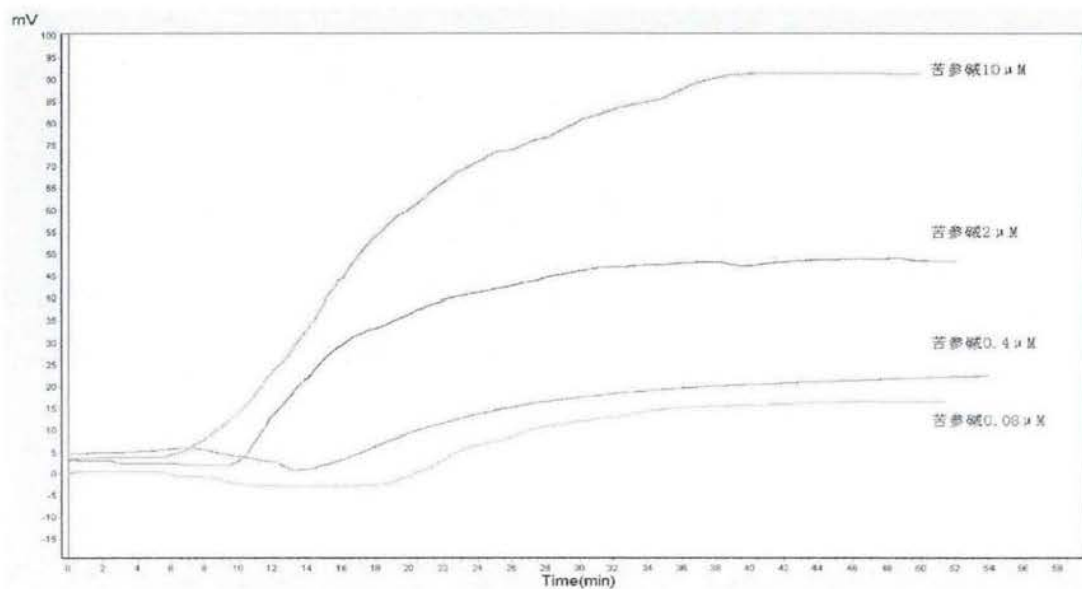


图 2-23 苦参碱通过酶活为 1030 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-23 Breakthrough curves for Matrine at activity of trypsin is 1030 U/mL

表 2-14 苦参碱在酶活为 1030 U/mL 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-14 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Matrine at activity of trypsin is 1030 U/mL

| 样品                           | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{B_t} + \frac{[A]_0}{B_t}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参碱<br>(酶活为<br>1030<br>U/mL) | 10                           | 0.0315          | 31.746                                    | $Y=4.201x+13.338$                                       | 0.238      | 3.175               |
|                              | 2                            | 0.0364          | 27.473                                    |                                                         |            |                     |
|                              | 0.4                          | 0.0404          | 24.752                                    |                                                         |            |                     |
|                              | 0.08                         | 0.0594          | 16.835                                    |                                                         |            |                     |

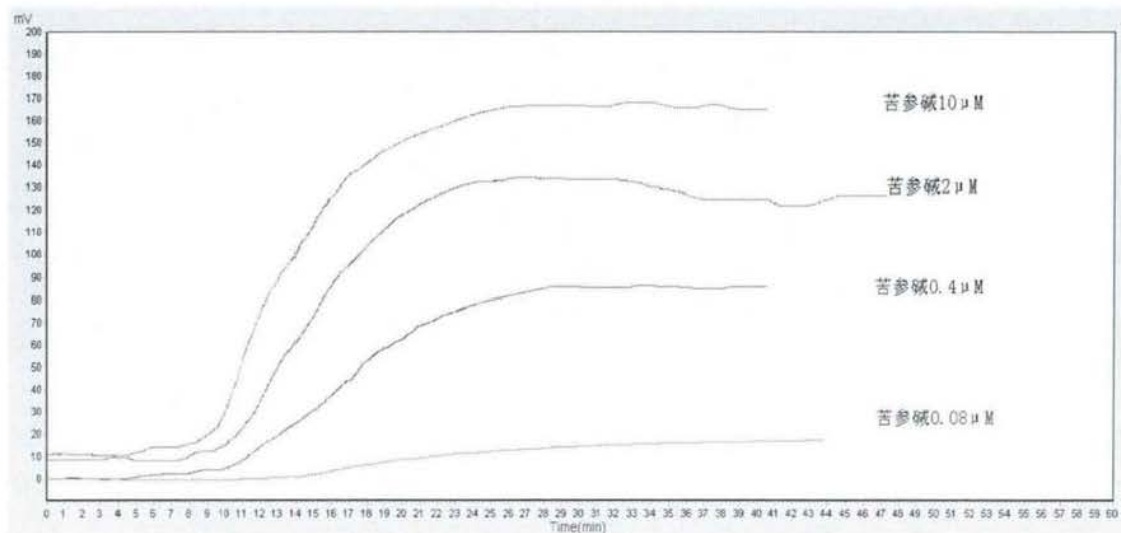


图 2-24 苦参碱通过酶活为 373.33 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-24 Breakthrough curves for Matrine at activity of tpsin is 373.33 U/mL

表 2-15 苦参碱在酶活为 373.33 U/mL 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-15 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Matrine at activity of tpsin is 373.33 U/mL

| 样品                             | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{B_t} + \frac{[A]_0}{B_t}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参碱<br>(酶活为<br>373.33<br>U/mL) | 10                           | 0.0274          | 36.496                                    | $Y=4.4762x+17.293$                                      | 0.223      | 3.86                |
|                                | 2                            | 0.0342          | 29.239                                    |                                                         |            |                     |
|                                | 0.4                          | 0.0395          | 25.316                                    |                                                         |            |                     |
|                                | 0.08                         | 0.0437          | 22.883                                    |                                                         |            |                     |

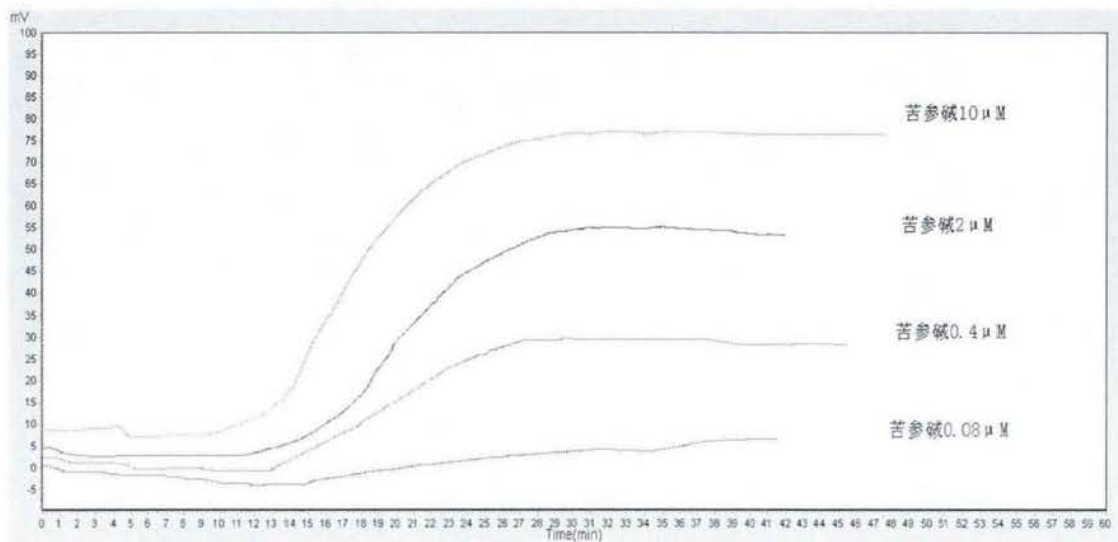


图 2-25 苦参碱通过酶活为 66.67 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-25 Breakthrough curves for Matrine at activity of tyrosinase is 66.67 U/mL

表 2-16 苦参碱在酶活为 66.67 U/mL 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-16 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Matrine at activity of tyrosinase is 66.67

| 样品                            | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{Bt} + \frac{[A]_0}{Bt}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参碱<br>(酶活为<br>66.67<br>U/mL) | 10                           | 0.0315          | 31.746                                    | $Y=4.1642x+14.842$                                    | 0.240      | 3.564               |
|                               | 2                            | 0.0370          | 27.027                                    |                                                       |            |                     |
|                               | 0.4                          | 0.0434          | 23.041                                    |                                                       |            |                     |
|                               | 0.08                         | 0.0521          | 19.194                                    |                                                       |            |                     |

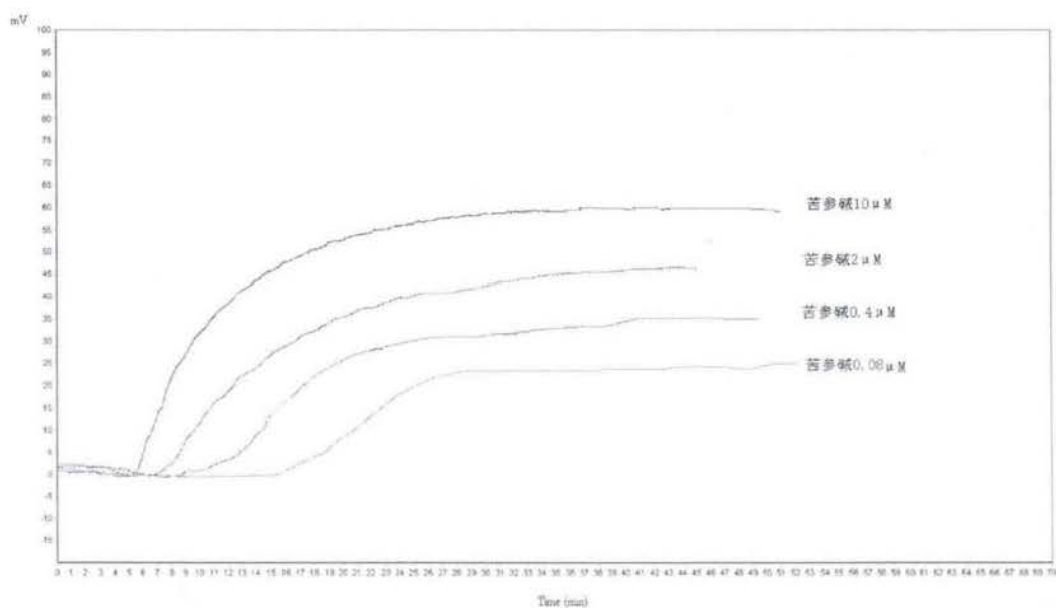


图 2-26 苦参碱通过酶活为 33.33 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-26 Breakthrough curves for Matrine at activity of tpsin is 33.33 U/mL

表 2-17 苦参碱在酶活为 33.33 U/mL 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-17 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Matrine at activity of tpsin is 33.33 U/mL

| 样品                            | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{Bt} + \frac{[A]_0}{Bt}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参碱<br>(酶活为<br>33.33<br>U/mL) | 10                           | 0.0365          | 27.397                                    | $Y=3.7615x+13.376$                                    | 0.266      | 3.556               |
|                               | 2                            | 0.0375          | 26.666                                    |                                                       |            |                     |
|                               | 0.4                          | 0.0501          | 19.960                                    |                                                       |            |                     |
|                               | 0.08                         | 0.0585          | 17.094                                    |                                                       |            |                     |



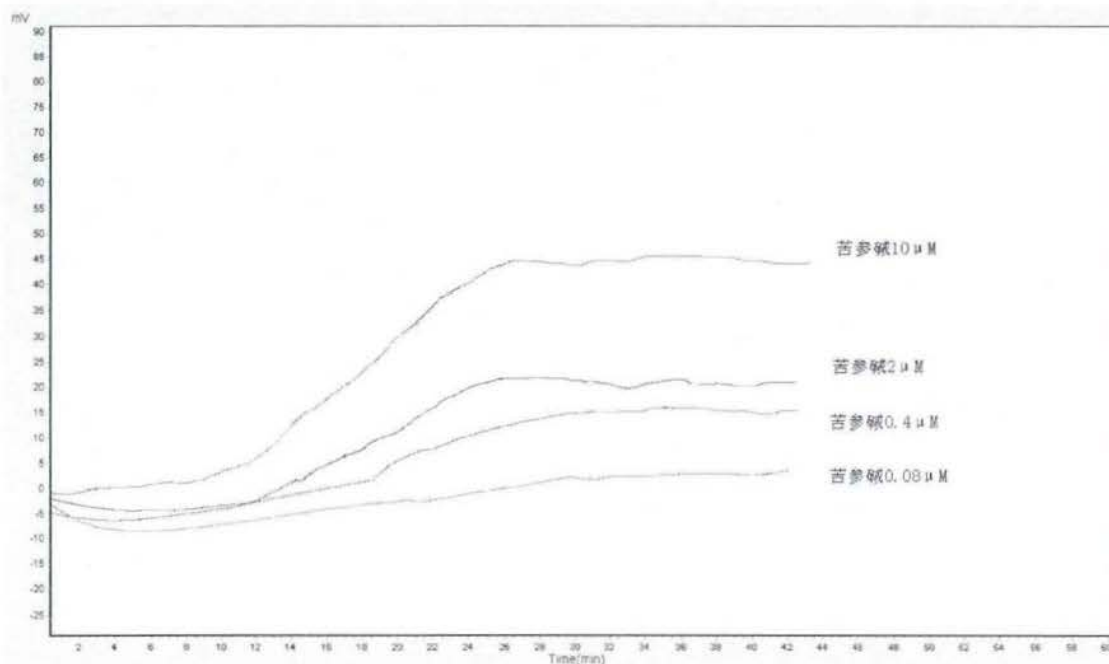


图 2-27 苦参碱通过酶活为 32.33 U/mL 色谱柱的前沿突破曲线

Fig.2-27 Breakthrough curves for Matrine at activity of tpsin is 32.33 U/mL

表 2-18 苦参碱在酶活为 32.33 U/mL 色谱柱中前沿亲和色谱的计算值

Table 2-18 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Matrine at activity of tpsin is 32.33 U/mL

| 样品                            | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{Bt} + \frac{[A]_0}{Bt}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 苦参碱<br>(酶活为<br>32.33<br>U/mL) | 10                           | 0.0395          | 25.316                                    | $Y=3.6943x+11.834$                                    | 0.289      | 3.654               |
|                               | 2                            | 0.0409          | 24.449                                    |                                                       |            |                     |
|                               | 0.4                          | 0.0499          | 20.041                                    |                                                       |            |                     |
|                               | 0.08                         | 0.0691          | 14.471                                    |                                                       |            |                     |

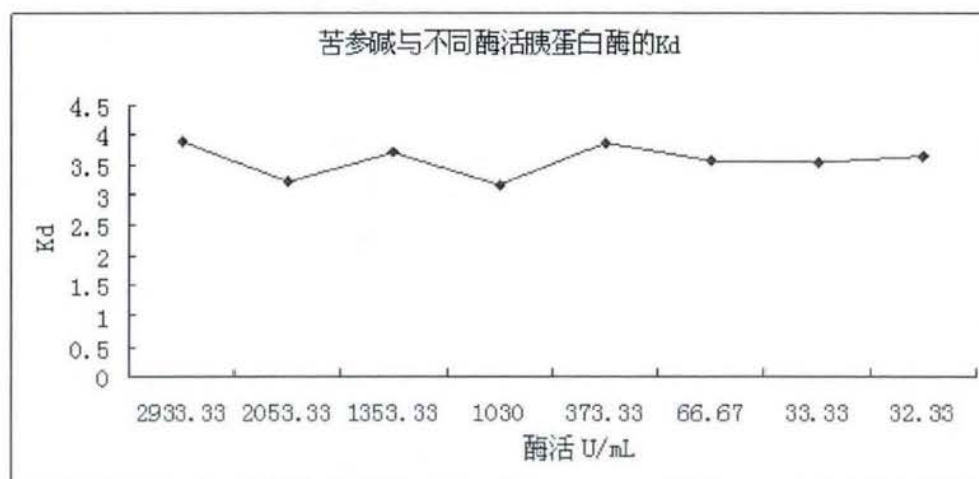


图 2-28 苦参碱与不同酶活胰蛋白酶的 Kd

Fig.2-28 Kd of Matrine and trypsin at different activity

以上实验结果说明,在不同酶活的色谱柱中,通过实验计算得到的苦参碱与酶的解离常数  $K_d$ ,与未加热失活的酶制成的色谱柱的  $K_d$  在数值上有变化,但是变化范围很小。说明,苦参碱样品与色谱柱中的酶结合不受酶的二级结构改变的影响。酶活虽然改变,但是酶的一级结构没有发生改变,由此推测样品与酶的结合应是单类位点结合,与酶的一级结构相关。不同的酶活对于色谱柱的筛选结果没有明显的影响。在酶失活严重(酶活不到室温下酶活的 2%)的情况下,色谱柱依然能够完成筛选过程,得到有效筛选结果。

## 2.4 本章小结

1. 经过水浴加热的游离酶,酶活发生了明显的变化。尤其是经过 50 °C 以上水浴加热 40 min 以上,由于温度高,加热时间较长,活力降为原酶活的 30% 以下。50 °C 以上的高温加热后,酶活降至更低。对不同酶活的游离胰蛋白酶使用 SDS-PAGE 电泳法进行检测,结果显示不同酶活的酶在电泳凝胶中的条带在同一水平线上。可以认为加热后胰蛋白酶的肽链没有发生降解为多条肽链的现象,也就是酶的一级结构没有发生明显变化。

2. BAPNA 通过酶活为 2933.33 U/mL 的色谱柱与酶活为 33.33 U/mL 的色谱柱相比,  $K_d$  从 0.525 增加到 1.997。从实验结果来看,酶加热失活后, BAPNA 与酶的结合度降低。这一结果可以用“锁匙理论”来解释,作为胰蛋白酶的特定底物, BAPNA 与酶的结合与酶的空间结构相关,当酶加热变性后,酶的空间

结构发生改变, 因此 BAPNA 与酶的结合受到影响。这说明实验结果符合理论假设。实验结果也显示, 当酶加热后, 空间结构发生变化, BAPNA 与酶的亲合性受到影响,  $K_d$  就明显增加, 也就是结合度明显减小。

3. 作为胰蛋白酶的小分子抑制剂苦参素、苦参碱, 在通过酶活分别为 2053.33 U/mL (酶液 50 °C 水浴中加热 20 min)、1353.33 U/mL (酶液 50 °C 水浴中加热 30 min)、1030 U/mL (酶液 50 °C 水浴中加热 40 min)、373.33 U/mL (酶液 60 °C 水浴中加热 20 min)、66.67 U/mL (酶液 70 °C 水浴中加热 20 min)、33.33 U/mL (酶液 70 °C 水浴中加热 30 min)、32.33 U/mL (酶液 70 °C 水浴中加热 40 min) 的色谱柱后, 计算可得到样品与酶的解离常数  $K_d$ , 与酶未失活时的色谱柱的  $K_d$  在数值上变化幅度非常小。该结果说明, 虽然酶活发生明显改变, 但是酶的一级结构基本没有发生改变, 苦参碱、苦参素等小分子抑制剂与胰蛋白酶的结合没有受到明显影响, 推测两者结合应是单类位点结合。因此不同酶活的色谱柱对筛选结果没有明显的影响。在酶失活严重 (酶活不到原酶活的 2%) 的情况下, 通过该检测方法得出, 苦参碱与酶的结合力即  $K_d$  值比苦参素要小, 也就说明苦参碱与胰蛋白酶的结合力要比苦参素与酶的结合力强, 这一结果与本实验室之前的实验结果<sup>[53]</sup>一致。因此, 不同酶活的情况下, 色谱柱依然能够完成筛选过程, 得到有效筛选结果。

## 第三章 以糖化酶为标靶的前沿亲和色谱的应用

### 3.1 引言

本章实验的目的是为了将已建立的前沿亲和色谱筛选体系进行进一步应用。以酶活不同、酶纯度不同、选用 PEG 浓度不同、PEG 分子量不同等因素作为不同条件制成不同色谱柱。利用以糖化酶为标靶的前沿亲和色谱柱对杨梅黄酮进行检测,同时也对游离状态下杨梅黄酮与糖化酶的结合情况进行实验。通过分析检测结果,得出通过前沿亲和色谱法筛选结果的有效性以及该天然药物筛选平台的可推广性。

本章中糖化酶酶活测定方法参考 QB746.8 标准,原轻工部部颁标准测定<sup>[74]</sup>。酶活定义:1 g 固体酶粉(或 1 mL 液体酶),于 40 °C、pH=4.6 的条件下,1 h 分解可溶性淀粉产生 1 mg 葡萄糖,即为一个酶活力单位,以 U/g( U/mL )表示。酶活测定方法及试剂配制方法参见文献<sup>[74]</sup>。

### 3.2 材料与方法

#### 3.2.1 主要材料、试剂及仪器

糖化酶:无锡酶制剂厂;

杨梅黄酮(HPLC98%):湖北康宝泰精细化工有限公司;

无水乙醇(分析纯):安徽安特生物化学有限公司;

电子天平 BS124S:赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;

8823B-紫外检测仪:北京宾达英创科技有限公司;

旋转蒸发仪 EYELA:上海爱朗仪器有限公司;

优普超纯水机:上海优普实业有限公司;

数显超声波清洗器 KQ2200:昆山市超声仪器有限公司;

Anke TGL-16G 高速台式离心机:上海安亭科学仪器厂;



LSP02-1B Longer Pump, TS2-60 Dual-syringe Pump: Longer ;

熔融石英毛细管柱(内径 700 mm), 毛细管连接器: 郑州英诺高科有限公司;

N2000 色谱工作站: 浙江大学;

25  $\mu\text{L}$  微量进样器: 宁波市镇海玻璃仪器厂;

0.5-10  $\mu\text{L}$ , 5-50  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  可调式移液器: 热电(上海)仪器有限公司。

本章实验中用于制柱的不同纯度的糖化酶液(0.01 mol/L)的准备方法如下:

未纯化的酶液: 称取粗酶 1 g, 溶于 100 mL 去离子水中, 酶液浓度为 0.01 g/mL。备用。

纯化后的酶液: 称取粗酶 1 g, 溶于 100 mL 去离子水中, 酶液浓度为 0.01 g/mL。将酶液在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下进行离心。速度 4000 r/min, 离心时间 10 m。离心后取上清液, 40 $^{\circ}\text{C}$  水浴中, 旋转蒸发干燥。干燥后称重, 干燥酶的质量为 0.7 g。加入 70 mL 去离子水, 得到纯化后的酶液, 浓度为 0.01 g/mL。备用。

根据以上操作步骤, 得到不同纯度的酶液并根据 3.2.3 的方法测定酶活。酶液待用, 将用于后续实验中糖化酶色谱柱的制备。

### 3.2.2 溶液的配制

乙酸-乙酸钠溶液: 称取乙酸钠( $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 6.7 g, 溶于水中。加冰乙酸( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 2.6 mL。用水定容至 1000 mL, 配好后用 pH 校正。

氢氧化钠溶液( $\text{NaOH}$ )=0.1 mol/mL: 精确称取 0.400 g  $\text{NaOH}$ , 溶于水中, 定容至 100 mL。

200 g/L 氢氧化钠溶液: 称取氢氧化钠 20 g, 用水溶解并定容至 100 mL。

硫酸溶液( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )=2 mol/mL: 量取浓硫酸(密度为 1.84) 5.6 mL 缓缓注入 80 mL 水中。冷却后, 定容至 100 mL。

20 g/L 可溶性淀粉液: 精确称取 2.00 g 淀粉, 溶于水中, 定容至 100 mL。

10 g/L 淀粉指示剂: 精确称取 1.00 g 淀粉, 溶于水中, 定容至 100 mL

$5.0\times 10^{-4}$  mol/L 杨梅黄酮醇溶液: 准确称取 0.0159 g 杨梅黄酮, 溶于 50%乙醇溶液, 定容至 100 mL。

$1.0\times 10^{-4}$  mol/L 杨梅黄酮醇溶液: 准确称取 0.0032 g 杨梅黄酮, 溶于 50%乙醇溶液, 定容至 100 mL。



0.2×10<sup>-4</sup> mol/L 杨梅黄酮醇溶液：准确称取 0.0064 g 杨梅黄酮，溶于 50%乙醇溶液，定容至 100 mL。取其中 10mL 定容至 100 mL。

0.04×10<sup>-4</sup> mol/L 杨梅黄酮醇溶液：准确称取 0.0064 g 杨梅黄酮，溶于 50%乙醇溶液，定容至 100 mL。取其中 2 mL 定容至 100 mL。

150 mg/mL PEG400 水溶液：准确称取 1.50 g PEG400，溶于 10 mL 水中。

150 mg/mL PEG600 水溶液：准确称取 1.50 g PEG600，溶于 10 mL 水中。

150 mg/mL PEG100 水溶液：准确称取 1.50 g PEG1000，溶于 10 mL 水中。

200 mg/mL PEG600 水溶液：准确称取 2.00 g PEG600，溶于 10 mL 水中。

250 mg/mL PEG600 水溶液：准确称取 2.50 g PEG600，溶于 10 mL 水中。

### 3.2.3 糖化酶酶活测定方法

称取 1-2 g 酶粉。精确至 0.0002 g，先用少量的乙酸缓冲液溶解。并用玻璃棒捣研，将上清液小心倾入容量瓶，沉渣部分再加入少量缓冲液，如此捣研 3-4 次，最后全部移入容量瓶内，用缓冲液定容刻度，摇匀。通过四层纱布过滤，滤液供测定用。

与甲、乙两支 50 mL 比色管中，分别加入可溶性淀粉 25.00 mL 及缓冲液 15.00mL，摇匀后，于 40℃±0.2℃恒温水浴中预热 5 分钟。在甲（样品）中加入待测酶液 2.00 mL，立刻摇匀。在此温度下准确反应 30 分钟。立即各加入氢氧化钠溶液 0.20 mL，摇匀。将两管取出，迅速冷却。并于乙管（空白）中补加待测酶液。吸取上述反应液与空白液 5.00 mL，分别置于碘量瓶中，准确加入碘溶液 10.0 mL，再加入氢氧化钠溶液 15.0 mL。摇匀密闭。于暗处反应 15 分钟，取出，加入硫酸溶液 2.0 mL，立即用硫代硫酸钠标准液滴定。直至蓝色刚好消失为其终点。

计算： $X = (A - B)C \times 90.05 \times 32.2 / 5 \times 1/2 \times n \times 2 = 579.9 \times (A - B)C \times n$

X：样品酶活力 U/g (U/mL)；A：空白消耗硫代硫酸钠标准液体积(mL)；B：样品消耗硫代硫酸钠标准液体积( mL )；C：硫代硫酸钠标准液的浓度 (mol/L)；90.05：与 1.00mL 硫代硫酸钠标准液[C(1/2Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)=1.000mol/L]相当的以克表示的葡萄糖的质量；32.2：反应液的总体积(mL)；5：吸取反应液的体积( mL )；1/2：吸取酶液 2.00 mL，以 1.00 mL 计；n：稀释倍数；2：反应 30 分钟，换算成 1 小时的酶活力系数，所得结果表示至整数结果。

### 3.2.4 糖化酶色谱柱的制备

直接用购买的糖化酶粗酶制得的色谱柱:取 128.2  $\mu\text{L}$  糖化酶粗酶溶液( 0.01 g/mL ), 加入 120  $\mu\text{L}$  PEG600 溶液( 200 mg/mL ), 50  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液( pH7.0 ), 1.8  $\mu\text{L}$  APTES, 放置在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中直到完全溶解成均一溶液, 待用。另取 0.1 g glycerated silane, 加入 0.15 mL 双蒸水和 2  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  后超声 30 min, 使之溶解成均一液体。上述两种溶液等体积混合, 摇匀, 立即用注射器通过毛细连接器把混合液注入到预先处理好的毛细管柱中去。放置在室温中, 3 min 左右凝固。凝胶柱浸没在 4  $^{\circ}\text{C}$  的磷酸缓冲液中, 老化 7 天。使用前切除毛细管柱两头, 使柱长为 10 cm。

### 3.2.5 不同 PEG 浓度的糖化酶色谱柱的制备

PEG600 溶液浓度为 150 mg/mL: 取 128.2  $\mu\text{L}$  糖化酶溶液( 0.01 g/mL, 酶活 325.34 U/mL ), 加入 120  $\mu\text{L}$  PEG600 溶液( 150 mg/mL ), 50  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液( pH7.0 ), 1.8  $\mu\text{L}$  APTES, 放置在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中直到完全溶解成均一溶液, 待用。另取 0.1 g glycerated silane, 加入 0.15 mL 双蒸水和 2  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  后超声 30 min, 使之溶解成均一液体。上述两种溶液等体积混合, 摇匀, 立即用注射器通过适应毛细连接器把混合液注入到预先处理好的毛细管柱中去。待凝胶凝固后, 将色谱柱浸没在 4  $^{\circ}\text{C}$  的磷酸缓冲液中, 老化 7 天。使用前切除毛细管柱两头, 使柱长为 10 cm。

PEG600 溶液浓度为 200 mg/mL: 取 128.2  $\mu\text{L}$  糖化酶溶液( 0.01 g/mL, 酶活 325.34 U/mL ), 加入 120  $\mu\text{L}$  PEG600 溶液( 200 mg/mL ), 50  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液( pH7.0 ), 1.8  $\mu\text{L}$  APTES, 放置在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中直到完全溶解成均一溶液, 待用。另取 0.1 g glycerated silane, 加入 0.15 mL 双蒸水和 2  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  后超声 30 min, 使之溶解成均一液体。上述两种溶液等体积混合, 摇匀, 立即用注射器通过毛细连接器把混合液注入到预先处理好的毛细管柱中去。待凝胶凝固后, 将色谱柱浸没在 4  $^{\circ}\text{C}$  的磷酸缓冲液中, 老化 7 天。使用前切除毛细管柱两头, 使柱长为 10 cm。

PEG600 溶液浓度为 250 mg/mL: 取 128.2  $\mu\text{L}$  糖化酶溶液( 0.01 g/mL, 酶活 325.34 U/mL ), 加入 120  $\mu\text{L}$  PEG600 溶液( 250 mg/mL ), 50  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L 磷酸盐

缓冲液(pH7.0), 1.8  $\mu\text{L}$  APTES, 放置在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中直到完全溶解成均一溶液, 待用。另取 0.1 g glycerated silane, 加入 0.15 mL 双蒸水和 2  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  后超声 30 min, 使之溶解成均一液体。上述两种溶液等体积混合, 摇匀, 立即用注射器通过毛细连接器把混合液注入到预先处理好的毛细管柱中去。待凝胶凝固后, 将色谱柱浸没在 4  $^{\circ}\text{C}$  的磷酸缓冲液中, 老化 7 天。使用前切除毛细管柱两头, 使柱长为 10 cm。

### 3.2.6 不同 PEG 分子量的糖化酶色谱柱的制备

PEG400 溶液浓度为 150 mg/mL: 取 128.2  $\mu\text{L}$  糖化酶溶液(0.01 g/mL, 酶活 325.34 U/mL), 加入 120  $\mu\text{L}$  PEG400 溶液(150 mg/mL), 50  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0), 1.8  $\mu\text{L}$  APTES, 放置在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中直到完全溶解成均一溶液, 待用。另取 0.1 g glycerated silane, 加入 0.15 mL 双蒸水和 2  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  后超声 30 min, 使之溶解成均一液体。上述两种溶液等体积混合, 摇匀, 立即用注射器通过毛细连接器把混合液注入到预先处理好的毛细管柱中去。放置在室温中, 3 min 左右凝固。凝胶柱浸没在 4  $^{\circ}\text{C}$  的磷酸缓冲液中, 老化 7 天。使用前切除毛细管柱两头, 使柱长为 10 cm。

PEG600 溶液浓度为 150 mg/mL: 取 128.2  $\mu\text{L}$  糖化酶溶液(0.01 g/mL, 酶活 325.34 U/mL), 加入 120  $\mu\text{L}$  PEG600 溶液(150 mg/mL), 50  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0), 1.8  $\mu\text{L}$  APTES, 放置在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中直到完全溶解成均一溶液, 待用。另取 0.1 g glycerated silane, 加入 0.15 mL 双蒸水和 2  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  后超声 30 min, 使之溶解成均一液体。上述两种溶液等体积混合, 摇匀, 立即用注射器通过适应毛细连接器把混合液注入到预先处理好的毛细管柱中去。放置在室温中, 3 min 左右凝固。凝胶柱浸没在 4  $^{\circ}\text{C}$  的磷酸缓冲液中, 老化 7 天。使用前切除毛细管柱两头, 使柱长为 10 cm。

PEG1000 溶液浓度为 150 mg/mL: 取 128.2  $\mu\text{L}$  糖化酶溶液(0.01 g/mL, 酶活 325.34 U/mL), 加入 120  $\mu\text{L}$  PEG1000 溶液(150 mg/mL), 50  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0), 1.8  $\mu\text{L}$  APTES, 放置在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中直到完全溶解成均一溶液, 待用。另取 0.1 g glycerated silane, 加入 0.15 mL 双蒸水和 2  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  后超声 30 min, 使之溶解成均一液体。上述两种溶液等体积混合, 摇匀, 立即用注射器通过适应毛细连接器把混合液注入到预先处理好的毛细管柱中去。放

置在室温中, 3 min 左右凝固。凝胶柱浸没在 4℃的磷酸缓冲液中, 老化 7 天。使用前切除毛细管柱两头, 使柱长为 10 cm。

### 3.2.7 不同纯度糖化酶色谱柱的制备

由于第二章中所用的胰蛋白酶纯度较高, 因此不存在酶纯度对筛选效果的影响。而糖化酶是由发酵得到, 产品酶中含有较多的纤维等杂质, 导致纯化前后酶的比活力有差异, 因而也可能对筛选结果产生影响。本节将对糖化酶进行提纯, 将纯化后的糖化酶制柱, 对杨梅黄酮进行筛选。与未纯化时的酶做比较。研究酶的纯度对筛选结果的影响。

粗酶: 取 128.2  $\mu\text{L}$  糖化酶溶液( 0.01 g/mL ), 加入 120  $\mu\text{L}$  PEG600 溶液( 200 mg/mL ), 50  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液( pH7.0 ), 1.8  $\mu\text{L}$  APTES, 放置在 4℃冰箱中直到完全溶解成均一溶液, 待用。另取 0.1 g glycerated silane, 加入 0.15 mL 双蒸水和 2  $\mu\text{L}$  1 mol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$  后超声 30 min, 使之溶解成均一液体。上述两种溶液等体积混合, 摇匀, 立即用注射器通过毛细连接器把混合液注入到预先处理好的毛细管柱中去。放置在室温中, 3 min 左右凝固。凝胶柱浸没在 4℃的磷酸缓冲液中, 老化 7 天。使用前切除毛细管柱两头, 使柱长为 10 cm。

纯化后的酶: 取 128.2  $\mu\text{L}$  纯化后( 3.2.1 )糖化酶溶液( 0.01 g/mL ), 加入 120  $\mu\text{L}$  PEG600 溶液( 200mg/mL ), 50  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液( pH7.0 ), 1.8  $\mu\text{L}$  APTES, 放置在 4℃冰箱中直到完全溶解成均一溶液, 待用。另取 0.1 g glycerated silane, 加入 0.15 mL 双蒸水和 2  $\mu\text{L}$  1 mol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$  后超声 30 min, 使之溶解成均一液体。上述两种溶液等体积混合, 摇匀, 立即用注射器通过毛细连接器把混合液注入到预先处理好的毛细管柱中去。放置在室温中, 3 min 左右凝固。凝胶柱浸没在 4℃的磷酸缓冲液中, 老化 7 天。使用前切除毛细管柱两头, 使柱长为 10 cm。

### 3.2.8 不同酶活糖化酶色谱柱的制备

70℃加热 30 min 的酶: 取 128.2  $\mu\text{L}$  糖化酶溶液( 0.01 g/mL ), 加入 120  $\mu\text{L}$  PEG600 溶液( 200 mg/mL ), 50  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液( pH7.0 ), 1.8  $\mu\text{L}$  APTES, 放置在 4℃冰箱中直到完全溶解成均一溶液, 待用。另取 0.1 g glycerated silane, 加入 0.15 mL 双蒸水和 2  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  后超声 30 min, 使之溶解成均一



液体。上述两种溶液等体积混合，摇匀，立即用注射器通过毛细连接器把混合液注入到预先处理好的毛细管柱中去。放置在室温中，3 min 左右凝固。凝胶柱浸没在 4 °C 的磷酸缓冲液中，老化 7 天。使用前切除毛细管柱两头，使柱长为 10 cm。

90 °C 加热 30 min 的酶：取 128.2  $\mu\text{L}$  糖化酶溶液( 0.01g/mL )，加入 120  $\mu\text{L}$  PEG600 溶液( 200 mg/mL )，50  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液( pH7.0 )，1.8  $\mu\text{L}$  APTES，放置在 4°C 冰箱中直到完全溶解成均一溶液，待用。另取 0.1 g glycerated silane，加入 0.15 mL 双蒸水和 2  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  后超声 30 min，使之溶解成均一液体。上述两种溶液等体积混合，摇匀，立即用注射器通过毛细连接器把混合液注入到预先处理好的毛细管柱中去。放置在室温中，3 min 左右凝固。凝胶柱浸没在 4 °C 的磷酸缓冲液中，老化 7 天。使用前切除毛细管柱两头，使柱长为 10 cm。

### 3.2.9 杨梅黄酮在色谱柱中的检测

老化后的色谱柱首先用 0.05 mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液进行淋洗。然后通入 50%乙醇溶液淋洗，控制流速为 35  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。待基线平稳后，将不同浓度的杨梅黄酮溶液( 500  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、4  $\mu\text{mol}/\text{L}$  )，用注射泵注入所制备的固定化酶毛细管柱中，控制流速 4  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。可得到杨梅黄酮的前沿流出曲线。

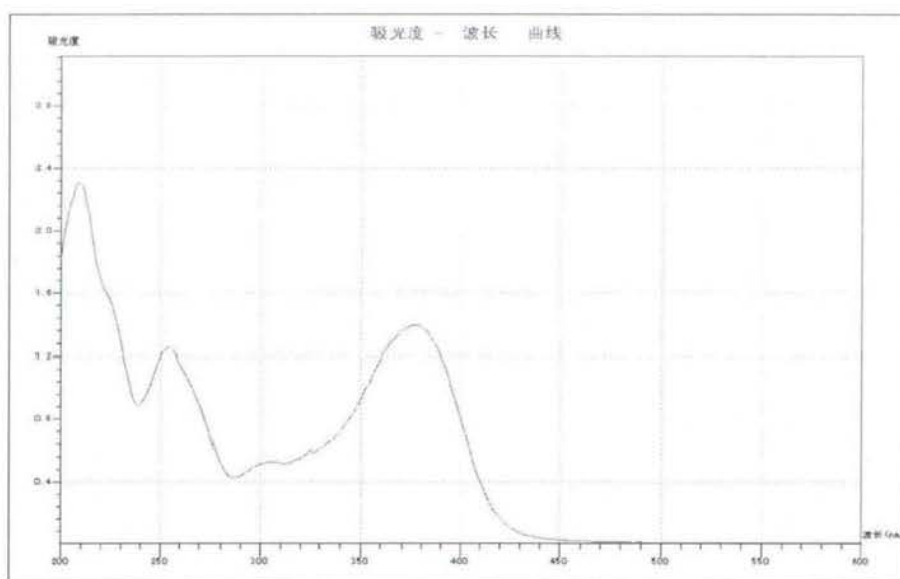


图 3-1 杨梅黄酮全波长扫描图

Fig.3-1 Full wavelength scan results of Myricetin



通过紫外分光光度仪全波长扫描,得到杨梅黄酮的最大紫外吸收波长为 390 nm。因此前沿亲和色谱的紫外检测器波长选择 390 nm。

### 3.2.10 杨梅黄酮与游离糖化酶的相互作用情况

为了观察杨梅黄酮与糖化酶在非固定化条件下的结合情况,即模拟传统的游离酶的筛选方法,与前沿亲和色谱的筛选情况进行比较。实验测定了在游离状态下杨梅黄酮与糖化酶的结合情况。配制不同的浓度的杨梅黄酮醇溶液,与不同浓度的糖化酶溶液,作用不同的时间后,测得酶活的变化,若糖化酶的酶活受到明显抑制,则说明游离状态下两者结合度较好。

实验方法:配制浓度分别为①500  $\mu\text{mol/L}$ , ②100  $\mu\text{mol/L}$  的杨梅黄酮溶液(溶剂为质量分数 50%乙醇溶液),配制浓度为③0.01 g/mL, ④0.005 g/mL 糖化酶水溶液。

(1) 取①溶液 5mL 与等体积 50%乙醇溶液混合,按照 3.2.3 的方法测得酶活。

(2) 溶液①与溶液③各取 5mL,在 40℃水浴中反应 10min,按照 3.2.3 的方法测得酶活。

(4) 溶液①与溶液③各取 5mL,在 40℃水浴中反应 20min,按照 3.2.3 的方法测得酶活。

(5) 溶液②与溶液④各取 5mL,在 40℃水浴中反应 10min,按照 3.2.3 的方法测得酶活。

(6) 溶液③与溶液④各取 5mL,在 40℃水浴中反应 20min,按照 3.2.3 的方法测得酶活。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 糖化酶酶活测定结果

根据 3.2.3 的实验方法,称取 1.0001 g 酶粉,先用少量的乙酸缓冲液 1 溶解。并用玻璃棒捣研,将上清液小心倾入容量瓶,沉渣部分再加入少量缓冲液,捣研至全部移入容量瓶内,用缓冲液定容至 100 mL,摇匀。通过四层纱布过滤,滤液供测定用。

准备五份酶液样品。1 为常温下未纯化酶液,2 为粗酶 70℃加热 30 min,

3 为粗酶 90 ℃加热 30 min, 4、5 为按照 3.2.1 中实验方法纯化后的两种酶。

按照实验方法, 分别测得五份酶液样品的酶活。于两支 50 mL 比色管, 分别加入可溶性淀粉 25.00 mL 及缓冲液 15.00 mL, 摇匀后, 于 40 ℃ $\pm$ 0.2℃恒温水浴中预热 5 min。在其中一支比色管中分别加入待测酶液 2.00 mL, 立刻摇匀。在此温度下准确反应 30 分钟。立即各加入氢氧化钠溶液 0.20 mL, 摇匀。将管取出, 迅速冷却。并于另一管中补加待测酶液。吸取上述反应液与空白液 5.00 mL, 分别置于碘量瓶中, 准确加入碘溶液 10.0 mL, 再加入氢氧化钠溶液 15.0 mL。摇匀密塞。于暗处反应 15 分钟, 取出, 加硫酸溶液 2.0 mL, 立即用硫代硫酸钠标准液滴定。直至蓝色刚好消失为其终点。

表 3-1 糖化酶酶活力测定结果

Table3-1 Activity of Glucoamylase at different condition

| 待测酶液         | 酶活力      |          |          | 均值       | 酶液 (0.01g/ mL)<br>活力 |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------------------|
| 粗酶           | 35605U/g | 34989U/g | 35108U/g | 35234U/g | 325.34U/mL           |
| 70℃加热 30m    | 5390 U/g | 5396 U/g | 5389 U/g | 5392 U/g | 53.92 U/mL           |
| 90℃加热 30m    | 0U/g     | 0U/g     | 0U/g     | 0U/g     | 0U/mL                |
| 4000r/m 纯化的酶 | 49935U/g | 50038U/g | 51029U/g | 50334U/g | 503.34U/mL           |

由表 3-1 可知, 糖化酶溶液经过 70 ℃、90 ℃加热后酶活损失严重。而根据 2.3.2, 加热后的酶虽然活力丧失, 但一级结构基本未发生变化。可以用来制成色谱柱, 并与未加热的酶制成的色谱柱产生对比, 可以将本文的对酶活无要求的前沿亲和色谱检测方法进行应用, 达到本章实验研究的目的。根据 3.2.1 的方法纯化后的酶, 酶的比活力明显提高。将此酶液也制成色谱柱, 与纯化之前的酶进行比较, 作为本章后续实验的制柱材料。

### 3.3.2 杨梅黄酮在未失活酶色谱柱中的检测结果

两个进样器分别承载样品溶液和淋洗液, 流速都为 4  $\mu$ L/min。该实验中使用 50%乙醇溶液作为淋洗液, 使基线稳定。实验温度控制在 25 ℃。 $V_0$  为苯酚在相同实验条件下的突破体积, 作为本实验的死体积。由于杨梅黄酮难溶于谁, 因此将杨梅黄酮溶于 50%质量分数的乙醇溶液, 配制成浓度分别为 500  $\mu$ mol/L,

100  $\mu\text{mol/L}$ , 20  $\mu\text{mol/L}$ , 4  $\mu\text{mol/L}$  的样品液, 进行筛选。

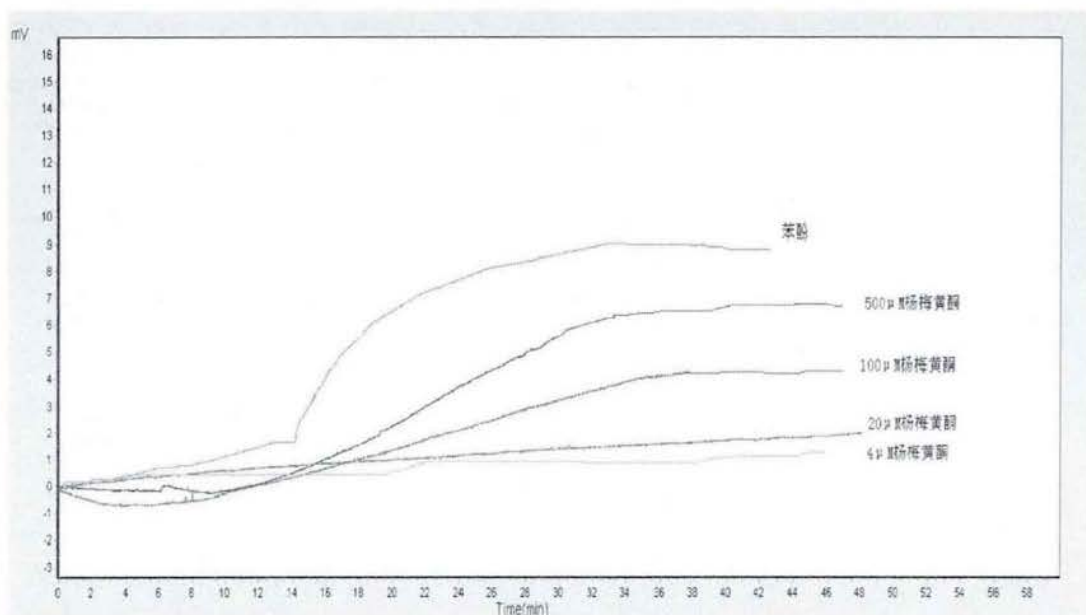


图 3-2 杨梅黄酮在糖化酶（酶活为 325.34U/mL）色谱柱中前沿流出曲线

Fig.3-2 Breakthrough curves for Myricetin at Glucoamylase (325.34U/mL)

表 3-2: 杨梅黄酮在糖化酶（酶活为 325.34U/mL）色谱柱中前沿流出曲线计算值

Table 3-2 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Myricetin at Glucoamylase (325.34U/mL)

| 样品                             | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{B_t} + \frac{[A]_0}{B_t}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 杨梅黄酮<br>(酶活<br>325.34<br>U/mL) | 500                          | 0.0059          | 169.491                                   | $Y=20.47x+87.341$                                       | 0.0488     | 4.27                |
|                                | 100                          | 0.0066          | 151.515                                   |                                                         |            |                     |
|                                | 20                           | 0.0082          | 121.951                                   |                                                         |            |                     |
|                                | 4                            | 0.0090          | 111.111                                   |                                                         |            |                     |

通过图可知, 杨梅黄酮样品的突破体积大于苯酚的突破体积, 也就是说杨梅黄酮与柱中的糖化酶发生亲和作用。并且通过计算可得, 杨梅黄酮在酶活为 325.34 U/mL 的糖化酶色谱柱中, 与固定化酶的亲和度 Kd 为 4.27  $\mu\text{M}$ , 柱中所包含的酶的量 0.0488 nmol。

## 3.3.3 不同 PEG 分子量对检测结果的影响

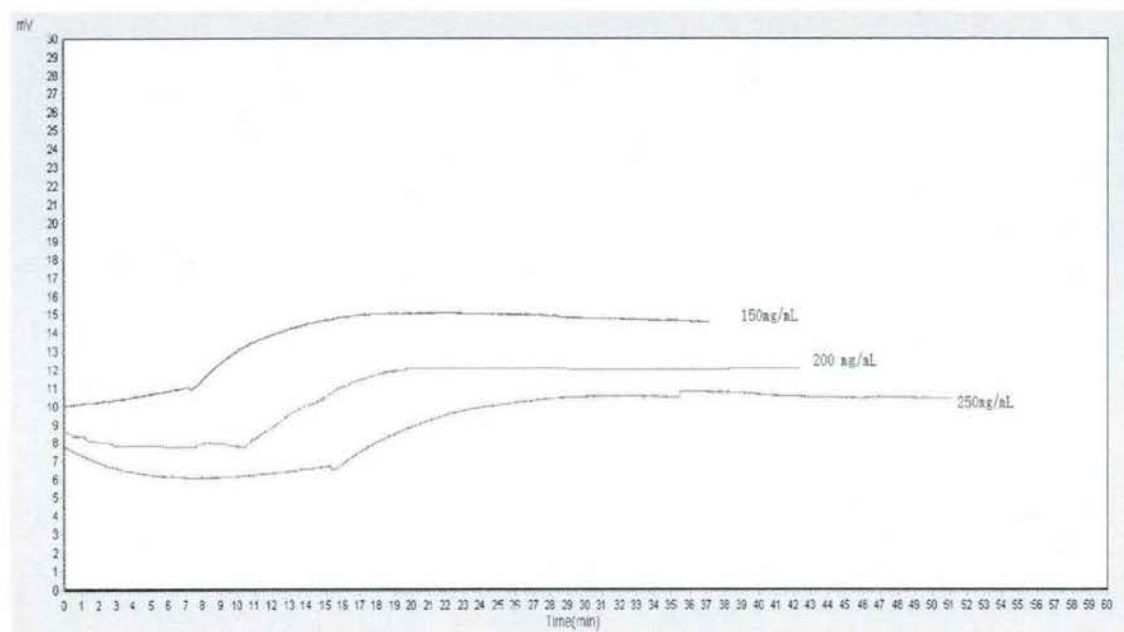


图 3-3 杨梅黄酮在不同 PEG600 浓度色谱柱中的流出曲线

Fig.3-3 Breakthrough curves for Myricetin at Glucoamylase (325.34U/mL) at different concentration of PEG600

PEG 是一种致孔剂，它的分子量和用量多少主要影响柱中凝胶孔的多少以及孔径的大小。柱中的酶的保存量。在分子量相同的情况下，PEG 浓度越大，制成的柱中 PEG 含量就越高，所形成的凝胶的孔就越大<sup>[73]</sup>。由图 3-3 可得，当 PEG 浓度增大时，凝胶柱中孔径增大，糖化酶与杨梅黄酮接触面积增大，因此根据前沿亲和色谱理论，流出曲线的突破点就越滞后，即突破体积就越大。孔径越大，酶的包埋情况不够好，由于样品与酶结合的量较多，会给检测结束后的洗脱工作带来一定难度。而若 PEG 浓度太小，则柱中的凝胶孔径太小，样品不能与酶接触充分。因此，根据以上原因，当 PEG 浓度太大，或者太小，超出检测器的极限范围，都会影响检流出曲线，影响检测结果。因此选择合适范围内的 PEG 浓度都可以获得有效检测结果。由图得，在 150 mg/mL-250mg/mL 的范围内，都是可以获得有效的检测结果的。



## 3.3.4 不同 PEG 浓度对检测结果的影响

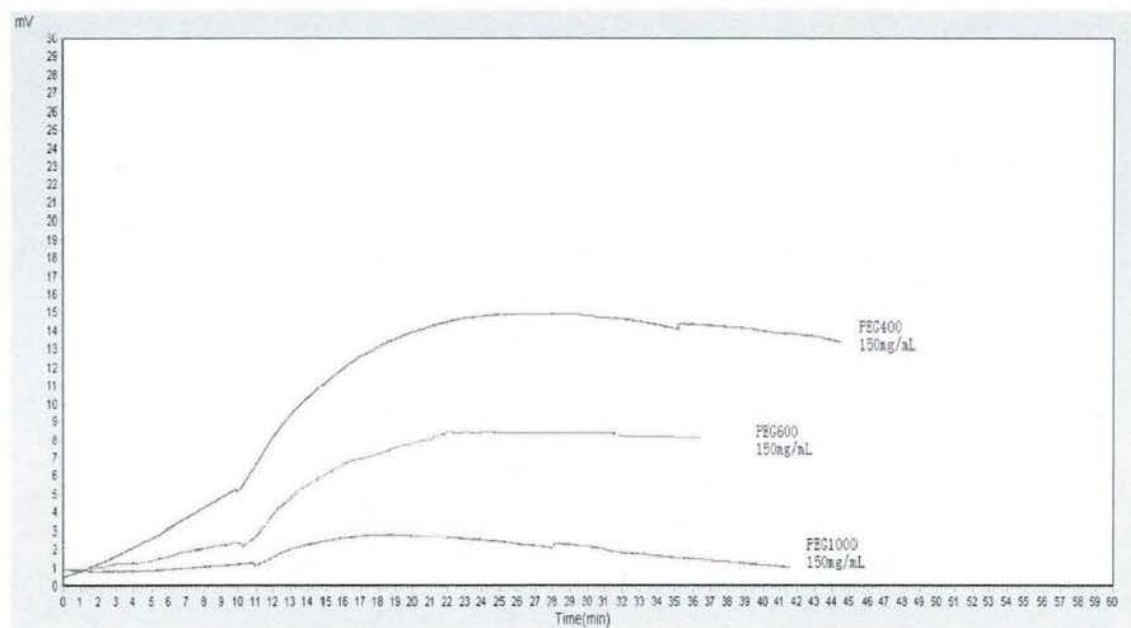


图 3-4 杨梅黄酮在不同 PEG 分子量色谱柱中的流出曲线

Fig.3-4 Breakthrough curves for Myricetin at Glucoamylase (325.340U/mL) at different molecular weight of PEG

根据本实验室之前的研究结果<sup>[73]</sup>, 随着 PEG 分子量的增大, 柱中固定的酶量会减少。酶量过少, 则无法得到较好的筛选结果。因此本实验中选用三个分子量的 PEG 进行比较。分别制作了以 PEG400、PEG600、PEG1000 为制孔剂的色谱柱。得到如图, 同样浓度的杨梅黄酮样品在不同柱中的流出曲线。由图 3-4 可知, 选用的 PEG 分子量在 400-1000 范围内时, 选用 PEG 分子量小时, 能使酶与淋洗液、样品液充分接触, 因此样品液经过柱子的流出曲线 mV 响应值较大, 容易获得明显的检测结果。因此在糖化酶柱制柱过程中选用分子量小的 PEG 作为致孔剂为佳。



## 3.3.5 杨梅黄酮在纯化后谱柱中的检测结果

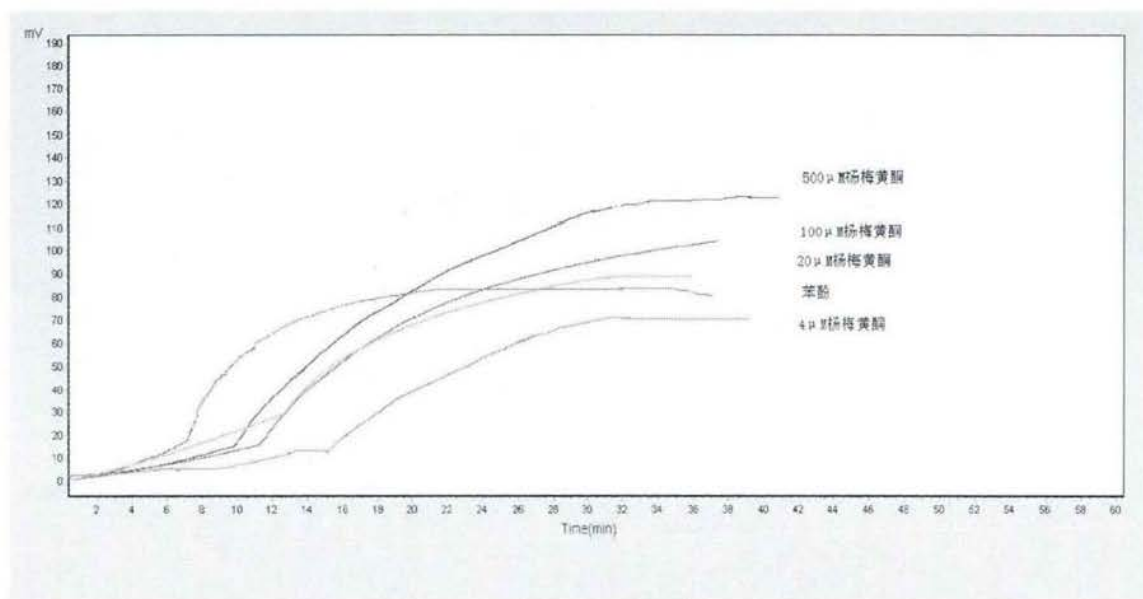


图 3-5 糖化酶纯化后（比酶活为 503.340U/mL）杨梅黄酮流出曲线

Fig.3-5 Breakthrough curves for Myricetin at Glucoamylase after purification (503.340U/mL)

表 3-4 糖化酶纯化后（比酶活为 503.340U/mL）杨梅黄酮流出曲线计算值

Table 3-4 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Myricetin at Glucoamylase after purification (503.34U/mL)

| 样品                             | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{B_t} + \frac{[A]_0}{B_t}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 杨梅黄酮<br>(酶活<br>503.34U/<br>mL) | 500                          | 0.026           | 38.461                                    | $Y=5.055x+16.200$                                       | 0.197      | 3.205               |
|                                | 100                          | 0.036           | 28.067                                    |                                                         |            |                     |
|                                | 20                           | 0.037           | 26.777                                    |                                                         |            |                     |
|                                | 4                            | 0.045           | 22.042                                    |                                                         |            |                     |

由上表可得，纯化后的糖化酶制成的色谱柱的应用中，Bt 为 0.197，明显大于未纯化时的 0.0488。这说明，纯化后，同样体积的酶液所包含的酶的质量增加。同时，糖化酶与样品杨梅黄酮的 Kd 值为 3.205，而由 3.3.2 可得，没有纯化的糖化酶与杨梅黄酮的 Kd 为 4.27。纯化后的酶与杨梅黄酮的 Kd 明显小于未纯化的酶。由于 Kd 为酶与样品的结合度，Kd 越大，则酶与样品的结合度越低。因此，酶纯化后，杨梅黄酮与糖化酶的结合度大大增加，也就是两者结合力更强。酶纯化后，单位酶的纯度提高，酶与样品更容易结合。在前沿亲和色

谱的应用中,酶的纯度会影响酶与样品的结合情况,在条件允许的情况下,应该选择纯度较高的酶或经过纯化后的酶,可以获得更好的筛选效果。由 Bt 可得,柱中所包含的酶量大幅增加。因此,在制柱时,提高靶酶的纯度,可以使柱中包含的具有有效活力的酶量增加,可以获得较好的检测效果。由于第二章中所用的胰蛋白酶纯度较高,因此酶纯度对筛选效果的影响很小,因而不作考虑。而糖化酶是由发酵得到,产品酶中含有较多的纤维等杂质,所以导致纯化前后酶的比活力有较大差异,会对筛选结果产生影响。

### 3.3.6 杨梅黄酮在不同酶活色谱柱中的检测结果

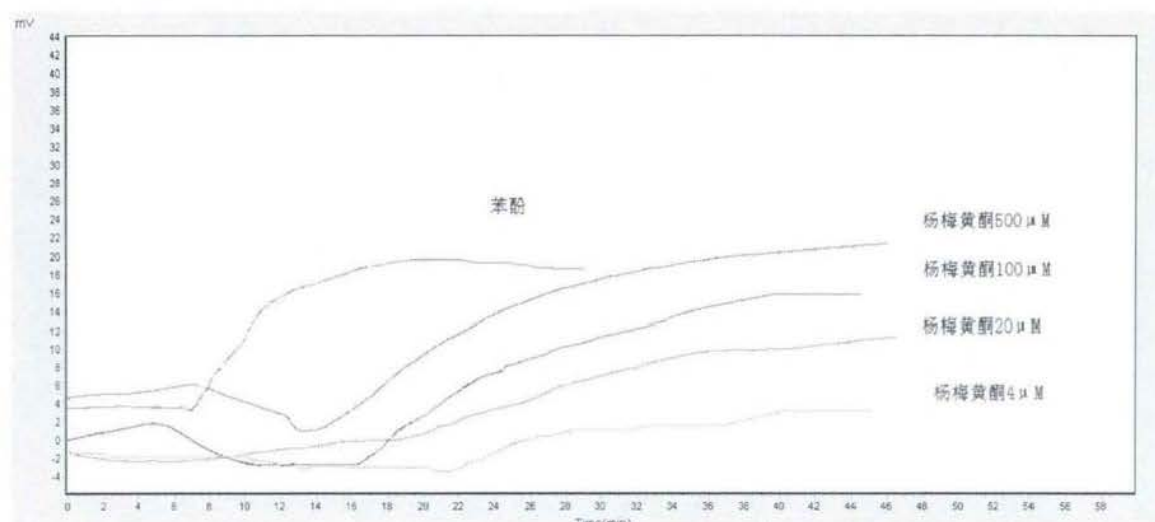


图 3-6 杨梅黄酮在糖化酶（酶活为 53.92 U/mL）色谱柱中前沿流出曲线

Fig.3-6 Breakthrough curves for Myricetin at Glucoamylase (53.92 U/mL)

表 3-5: 杨梅黄酮在糖化酶（酶活为 53.92 U/mL）色谱柱中前沿流出曲线计算值

Table 3-5 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Myricetin at Glucoamylase (53.92 U/mL)

| 样品                            | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{Bt} + \frac{[A]_0}{Bt}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 杨梅黄酮<br>(酶活<br>53.92<br>U/mL) | 500                          | 0.0054          | 182.414                                   | $Y=21.167x+96.462$                                    | 0.0472     | 4.557               |
|                               | 100                          | 0.0062          | 160.250                                   |                                                       |            |                     |
|                               | 20                           | 0.0074          | 134.375                                   |                                                       |            |                     |
|                               | 4                            | 0.0083          | 120.482                                   |                                                       |            |                     |

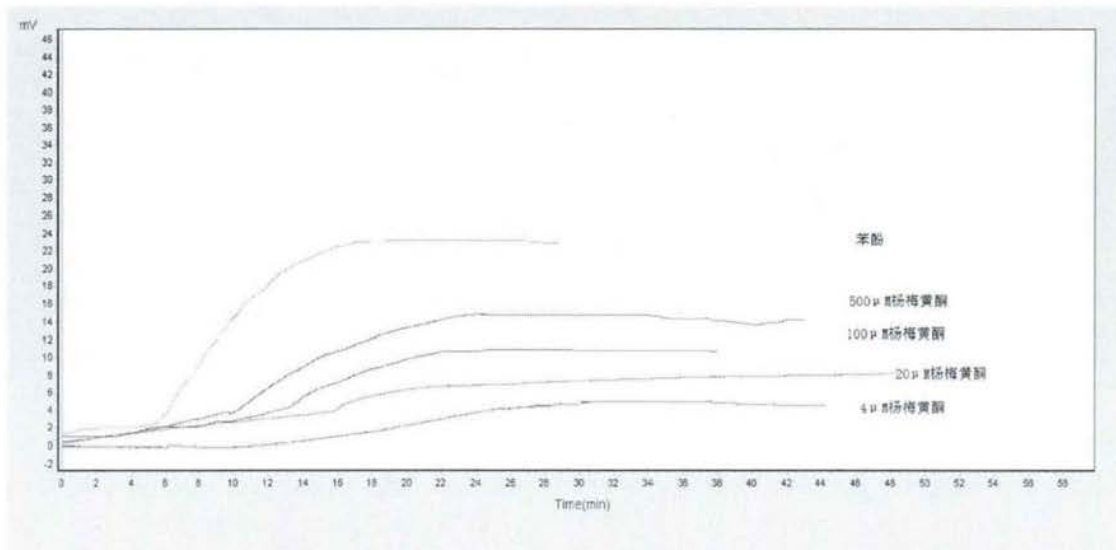


图 3-7 杨梅黄酮在糖化酶（酶活为 0 U/mL）色谱柱中前沿流出曲线

Fig.3-7 Breakthrough curves for Myricetin at Glucoamylase (0 U/mL)

表 3-6: 杨梅黄酮在糖化酶（酶活为 0U/mL）色谱柱中前沿流出曲线计算值

Table 3-6 Determination of Bt for the affinity column and Kd for Myricetin at Glucoamylase (0U/mL)

| 样品                      | $[A]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V-V_0$<br>(mL) | $\frac{1}{V-V_0}$<br>( $\text{mL}^{-1}$ ) | $\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d}{Bt} + \frac{[A]_0}{Bt}$ | Bt<br>nmol | Kd<br>$\mu\text{M}$ |
|-------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------|---------------------|
| 杨梅黄酮<br>(酶活为<br>0 U/mL) | 500                          | 0.0055          | 182.222                                   | $Y=22.706x+93.203$                                    | 0.044      | 4.104               |
|                         | 100                          | 0.0060          | 166.666                                   |                                                       |            |                     |
|                         | 20                           | 0.0075          | 133.333                                   |                                                       |            |                     |
|                         | 4                            | 0.0085          | 117.647                                   |                                                       |            |                     |

由表 3-5 及 3-6 得知，在未失活的糖化酶色谱柱的检测结果中，色谱柱中所包含的酶量是 0.0488 nmol，酶与样品结合的 Kd 为 4.27  $\mu\text{M}$ 。酶经过 70  $^{\circ}\text{C}$  加热 30 min 后，酶活从 325.34 U/mL 减少至 53.92 U/mL，而柱中所包含的酶量为 0.0472 nmol，Kd 为 4.557  $\mu\text{M}$ 。与酶未失活前没有发生较大变化。当酶经过 90  $^{\circ}\text{C}$  加热 30 min 后，糖化酶柱中包含的酶量为 0.044 nmol，酶与样品的 Kd 为 4.104  $\mu\text{M}$ 。这说明，糖化酶完全失活后，杨梅黄酮与糖化酶的 Kd 与糖化酶未失活时没有太大差别。该实验结果说明，杨梅黄酮与柱中的糖化酶的结合情况没有受到酶活的影响。因此可以认为加热后，杨梅黄酮在糖化酶色谱柱中的前沿亲和色谱检测依然获得有效的结果。再一次验证了本文的实验方法中色谱柱在无酶活的



情况下,依然可以完成对小分子酶抑制剂的检测。

### 3.3.7 杨梅黄酮与游离糖化酶的相互作用情况

表 3-7 杨梅黄酮与游离糖化酶反应后的酶活  
Table 3-7 The activity of Glucoamylase after reaction with Myricetin

| 酶<br>样 品 浓 度          | 酶 浓 度<br>活 | 0.01 g/mL | 0.005 g/mL |
|-----------------------|------------|-----------|------------|
|                       |            |           |            |
| 500 $\mu\text{mol/L}$ | 10min      | 50328 U/g | 58717U/g   |
|                       | 20min      | 52725 U/g | 58717U/g   |
| 100 $\mu\text{mol/L}$ | 10min      |           | 56320U/g   |
|                       | 20min      |           | 51527U/g   |

由 3.2.10 的实验步骤,得到糖化酶与杨梅黄酮样品溶液反应后,酶活的变化情况,如表 3-7。由上表可得:(1)在样品浓度相同、反应时间相同的情况下,酶浓度越大,则反应后酶活力越低,很可能是由于酶与样品发生结合,在一定范围内随着酶浓度的增大,两者的结合增加,会对糖化酶水解淀粉作用的影响越大。(2)在样品浓度相同、酶浓度相同的情况下,反应时间对酶活的影响不大,500  $\mu\text{mol/L}$  杨梅黄酮与 0.01 g/mL 酶液反应时,随着时间增加,酶活反而增加,这可能是由于样品对酶水解淀粉作用的激活作用。(3)在酶浓度相同、反应时间相同的情况下,随着样品浓度的增大,酶活略有增加,也可能是由于样品对酶的激活作用。

综上所述,在游离状态下,糖化酶与杨梅黄酮的结合与否很难确认,很难得到杨梅黄酮与糖化酶的亲和力的大小。而根据本文之前的实验,通过前沿亲和色谱法,则可以很容易地得到杨梅黄酮与糖化酶的结合常数  $K_d$ ,并且可以通过曲线观察到随着样品浓度的增加,样品的流出曲线突破体积越大的现象。

## 3.4 本章小结

在以上实验建立的分析方法的基础上,以糖化酶为标靶的筛选糖尿病药效化合物的应用体系作为该分析方法的应用对象。以天然药效物质杨梅黄酮作为

检测对象。以获得在传统的糖尿病药物筛选的方法基础上的革新。

1.通过改变酶活、酶的纯度、改变制柱条件中 PEG 的用量及浓度,获得柱效好并且适用于以糖化酶为靶酶的色谱柱的应用条件。实验结果显示,酶活力明显减小的情况下,杨梅黄酮与酶结合的  $K_d$  不会发生明显的变化。

2. 相同分子量情况下,当 PEG 浓度增大时,凝胶柱中孔径增大,糖化酶与杨梅黄酮接触面积增大,因此根据前沿亲和色谱理论,PEG 浓度越大,流出曲线的突破点就越滞后,即突破体积就越大。此时,酶的包埋情况不够好,并且由于样品与酶结合的量较多,会给检测结束后的洗脱工作带来一定难度。而若 PEG 浓度太小,则柱中的凝胶孔径太小,样品不能与酶接触充分。因此,根据以上原因,可以选择合适的 PEG 浓度。由实验可得,在 150 mg/mL -250 mg/mL 的范围内,都是可以获得有效的检测结果的。PEG 分子量在一定范围内 (400-1000) 时,分子量越小,越能获得较好的流出曲线。

3.由于第二章中所用的胰蛋白酶纯度较高,因此不存在酶纯度对筛选效果的影响。而糖化酶是由发酵得到,产品酶中含有较多的纤维等杂质,所以导致纯化前后酶的比活力有明显差异,会对筛选结果产生影响。纯度提高后,酶的比活力提高,杨梅黄酮与酶结合的  $K_d$  明显减小,这说明两者结合度增加。从理论上分析,酶纯度提高后,单位体积酶液中含有的有效酶活的酶增加,杨梅黄酮与酶的结合位点也增加,因此结合度增大。实验数据也验证了此理论分析。

4.杨梅黄酮与游离的糖化酶在适宜的温度下反应后,测得糖化酶的酶活在杨梅黄酮的浓度、酶的浓度以及反应时间的长短不同的情况下有所不同。但是,很难得到随着各个因素的变化两者结合度的变化规律。并且很难确认在游离状态下糖化酶与杨梅黄酮的结合与否,难以得到杨梅黄酮与糖化酶的亲和力的大小。该实验进一步说明了通过前沿亲和色谱法的筛选能得到两者结合的精确  $K_d$ ,得到的结果比传统的方法更精确,更准确有效。



## 第四章 结论与展望

### 4.1 结论

本方法以筛选对象与酶蛋白的分子结合为考察依据,依托前沿亲和色谱技术进行筛选,研究酶活对筛选结果的影响,以活力较低的酶作为筛选标靶,得到一种标靶酶活低,但酶一级结构完整,可应用于筛选与酶具有亲和作用的化合物的前沿色谱筛选方法。主要得出以下结论:

1. BAPNA 通过酶活为 2933.33 U/mL 的色谱柱与酶活为 33.33U/mL 色谱柱相比,  $K_d$  从 0.525 增加到 1.997。从实验结果来看,酶加热失活后, BAPNA 与酶的结合度降低。这一结果符合“锁匙理论”。作为胰蛋白酶的特定底物, BAPNA 与酶的结合与酶的空间结构相关,当酶加热变性后,酶的空间结构发生改变,因此 BAPNA 与酶的结合受到影响。实验结果符合理论设想。当酶加热后,空间结构发生变化, BAPNA 与酶的亲和性受到影响,  $K_d$  就明显增加,也就是结合度明显减小。

2. 作为与胰蛋白酶的小分子抑制剂苦参素、苦参碱,在不同酶活的色谱柱后,通过实验计算得到的苦参碱与酶的解离常数  $K_d$ ,与酶未失活(2933.33 U/mL)的色谱柱的  $K_d$  在数值上变化非常小。该结果说明,酶活发生明显改变但一级结构未改变的情况下,依然可以获得有效筛选结果。由此推测苦参碱、苦参素等小分子抑制剂与胰蛋白酶的结合应是单类位点结合,与酶的一级结构相关。在酶失活严重(酶活不到原酶活的 2%)的情况下,也可以通过该检测得出苦参碱与酶的结合力比苦参素要强的结果,这一结果与本实验室之前的研究成果一致。因此,酶活不同的情况下,色谱柱依然能够完成筛选过程,得到有效筛选结果。

3.在以上实验建立的分析体系的基础上,以糖化酶作为该分析方法的应用对象。以杨梅黄酮作为检测对象。通过改变酶活、酶的纯度、改变制柱条件中 PEG 的用量及浓度,获得适用于以糖化酶为靶酶的色谱柱的应用条件。实验结

果显示,酶活力明显减小的情况下,杨梅黄酮与酶结合的  $K_d$  不会发生明显的变化。而酶纯化后,比活力提高,杨梅黄酮与酶结合的  $K_d$  明显减小,即两者结合度增加。PEG 分子量在一定范围内(400-1000),分子量越小,越能获得较好的流出曲线;相同分子量情况下,PEG 浓度越大,流出曲线的突破点就越滞后,即突破体积就越大。在 150 mg/mL-250 mg/mL 的范围内,都是可以获得有效的检测结果的。同时还对杨梅黄酮与游离糖化酶的结合作了研究,得到的结果显示在柱外实验中,难以确认在游离状态下糖化酶与杨梅黄酮的结合与否,难以得到杨梅黄酮与糖化酶的亲和力的大小。该实验进一步说明了通过前沿亲和色谱法的筛选结果比传统的方法更精确,更准确有效。

## 4.2 创新点

目前,随着药物筛选研究的发展迅速,新方法、新技术不断涌现以及对药物作用机制的深入研究,酶和受体关系的不断被阐明也为建立特异性的筛选模型奠定了基础。利用无酶活要求的色谱柱,通过前沿亲和色谱用于药效化合物的筛选是本课题的创新点。一般的高通量筛选能快速进行不同样品量的药物筛选,但必须是获得较简单的混合物或单一化合物。以往使用的活性追踪的分离方法,虽然具有目标明确、命中率高的优点,但是在整个过程中需要大量的活性测试,所耗的人力、物力以及时间都非常巨大。前沿亲和色谱对目标分子有特异性的识别作用,选择性强、分离效率高,可获得与目标分子相同及结构相似的系列分子,能提供化合物直接与靶标结合的有关数据如酶靶与药物的结合常数等,筛选准确性高。避免了传统分离提取的非特异性,随着前沿亲和色谱技术的发展,必然在新药开发尤其是天然药物筛选中发挥巨大的作用。

无酶活要求、快速、微量、灵敏、可操作性强和应用面广是以酶为靶标的前沿亲和色谱的优势。目前以酶为靶标的色谱技术正被广泛运用,而无酶活要求的凝胶色谱技术更是给药物筛选平台提供了一种新的思路。为发现更多的新的天然药物提供了可能,这具有从理论基础研究到应用前景探索的清晰脉络,是本文技术路线设计和实验方案形成的特色之处。

### 4.3 展望

以酶为靶，依托前沿亲和色谱技术，进行天然药效化合物的筛选是近年应用广泛的一项技术。该项技术的筛选过程靶向性强、对样品的需要量小，检测速度快，在该项技术中，靶的确定是制备以酶为靶的前沿亲和色谱柱的前提。选择合适的靶酶，为药物筛选提供了大量理想的作用靶点。目前虽然以固定化酶为靶的前沿亲和色谱的研究主要在从合成化合物中筛选药效物质，但随固定化和色谱技术的发展，以酶为靶的前沿亲和色谱的应用范围将不断扩展，会成为天然药物活性成分筛选的重要工具。

以酶为靶的前沿亲和色谱筛选具有很大的研究价值。随着基因工程应用越来越为广泛，无酶活要求的筛选平台越来越成为研究和应用的趋势。本文研究表明，凝胶固定化酶色谱柱在酶活较低的情况下同样具有较好的筛选效果。该方法具有越来越大的实际应用意义和价值。当然还可进行进一步的研究工作。例如靶酶的种类还可进行进一步的发掘，以不同的靶酶制成的色谱柱可以筛选不同的酶抑制剂。可以通过制柱条件的选择，致孔剂用量的控制，制成适合不同分子量的酶的色谱柱，对更多的天然化合物进行筛选。并可通过结果探讨可以得知该化合物与酶是否有结合，以及结合的大致方式。这是研究前沿亲和色谱的一个很好的方向。

通过以酶为靶的技术筛选天然药物中的活性物质，探索前沿亲和色谱技术在天然药物分离靶酶抑制剂中的理论和可行技术，可以解决天然药物研究进展缓慢、大量独特的药效物质难以被发现利用的问题。利用前沿亲和色谱技术来获得新药的研究，将建立起一个筛选天然药物活性成分的快速、有效、通用的技术平台，在我国天然药物资源的开发利用中产生重要作用。

## 参考文献

- [1] 卢时湧, 吴章桂, 叶伟东等. 应用前沿亲和色谱研究分子间相互作用及其应用[J]. 化学进展, 2010, 22(1): 148-152
- [2] 胡娟娟, 杜冠华. 药物筛选模型研究进展[J]. 基础医学与临床, 2001, 21(4): 302-305
- [3] Kasai K, Ishii S. A New Technique for Investigation of Protein-ligand Interaction [J]. Biochem, 1975, 77(1): 261-264
- [4] 李其翔, 张红. 新药药物靶标开发技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006
- [5] 姜骅. 生物碱对胰蛋白酶作用的光谱变化[D]. 成都: 四川大学, 2005
- [6] Zheng Cai, Greene MI, Berezov A. Modulation of biomolecular interactions with complex-binding small molecules [J]. Methods, 2008, 46(1): 39-46
- [7] 张伟. 分子光谱法研究蛋白质与小分子的相互作用及其分析方法研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2005
- [8] 何开大, 冷晓莲, 李黎等. 小檗碱与胰蛋白酶的相互作用探讨, 天然产物研究与开发 2008, 20: 488-490, 544
- [9] Sheng LQ, Yan XY, Xu H J, et al. Study on the interaction between BSA and nicotine[J]. Spectroscopy Spect Anal, 2007, 27: 306-308
- [10] 李会军, 安婧婧, 周建良等. 靶分子亲和-质谱联用技术应用于中药等复杂体系中活性成分的筛选[J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(2): 97-103
- [11] 徐莉, 侯红萍. 酶的固定化方法的研究进展[J]. 酿酒科技, 2010(1): 86-94
- [12] 刘海洲, 张媛媛, 张广柱等. 固定化酶制备技术的研究进展[J]. 化学工业与工程技术, 2009, 30(1): 21-23
- [13] Thongpanchang C, Taweekhai S, Kamchonwongpaisan S, et al. Immobilization of malarial (Plasmodium falciparum) dihydrofolate reductase for the selection of tight-binding inhibitors from combinatorial library [J]. Anal Chem, 2007, 79(13): 5006-5012
- [14] 尹志娜. 固定化酶及其在食品和生物领域的研究进展[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(10): 11-15
- [15] 卢大胜, 吕敬慈, 雍克岚等. 用固定化酶筛选模型从天然产物中筛选  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(12): 1411-1414

- [16] Gottschalk I, Li Y M, Lundahl P. Chromatography on cells: analyses of solute interactions with the glucose transporter Glut1 in human red cells adsorbed on Lectingel beads [J]. *Journal of Chromatogr B*, 2000, 739: 55-62
- [17] 郑成. 酶工程的研究进展简述[J]. 韶关学院学报(自然科学版), 2001, 22(6): 39-44
- [18] Toledo-Sherman L, Deretey D, Slon-Usakiewicz J J, *et al.* Frontal Affinity Chromatography with MS Detection of EphB2 Tyrosine Kinase Receptor. 2. Identification of Small-Molecule Inhibitors via Coupling with Virtual Screening [J]. *J Med Chem*, 2005, 48(9): 3221-3230.
- [19] NgE SM, Yang F, Kameyama A, *et al.* High-throughput screening for enzyme inhibitors using frontal affinity chromatography with liquid chromatography and mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2005, 77(19): 6125-6133
- [20] Hage DS. High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding [J]. *Journal of Chromatography B*, 2002, 768(1): 3-30.
- [21] Arkin M R, Wwlls J A. Small-molecule inhibitors of proeitrn-protein interactions: progressing towards the dream [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004, 3: 301-317
- [22] Gupta R, Chaudhury N K. Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22: 2387-2399
- [23] Zacharis C K, Kalaitzantonakis E A, Podgornik A, *et al.* Sequential injection affinity chromatography utilizing an albumin immobilized monolithic column to study drug-protein interactions [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1144: 126-134
- [24] Moaddel R, Wainer I W. Conformational mobility of immobilized proteins [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 43: 399-406
- [25] Moaddel R, Wainer I W. Development of immobilized membrane-based affinity columns for use in the online characterization of membrane bound proteins and for targeted affinity isolations [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 564: 97-105
- [26] 陈双红, 盛春泉, 徐晓辉等. CYP51 靶酶氨基酸残基 Y118、S378 与新型唑类药物作用机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(9): 1188-1192
- [27] Liu D, Guo J, Luo Y, *et al.* Screening for ligands of human retinoid X receptor- $\alpha$  using ultrafiltration mass spectrometry [J]. *Anal. Chem*, 2007, 79 (24): 9398-9402
- [28] K. Kasai, S. Ishii. Affinity Chromatography of Trypsin and Related Enzymes [J]. *Biochem*,



- 1978, 84(5): 1051-1060
- [29] 李其翔, 张红. 新药药物靶标开发技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006
- [30] 赵睿, 刘国詮. 亲和色谱中配基的筛选与应用[J]. 色谱, 2007, 25(2): 135-141
- [31] 张红丽, 辛欣, 袁洪水等. 中草药桃仁纤溶酶的亲和层析分离[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(11): 998-1002
- [32] 董晓燕, 曹俊, 俞海青. 多肽亲和配基的固相合成及其亲和作用[J]. 天津大学学报, 2006, 39(1): 29-33
- [33] 刘望才, 朱家文. 亲和色谱技术研究进展[J]. 上海化工, 2007, 32(4): 27-29
- [34] 熊宗贵. 生物技术制药[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 135-139
- [35] 饶澄, 黄显. 亲和色谱法在天然药物活性成分筛选中的应用[J]. 中国药业, 2010, 19(12): 19-21
- [36] 刘洁.  $\beta_2$ -肾上腺素受体亲和色谱在黄连活性成分筛选及其相互作用研究中的应用[D]. 西安: 西北大学, 2008
- [37] de Boer AR, Lingeman H, Niessen WMA, et al. Mass spectrometry based biochemical assays for enzyme inhibitor screening [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26(9): 867-883.
- [38] 吴增茹, 徐筱杰. 利用亲和选择筛选法从组合化学库中筛选新药[J]. 分析化学评述与进展, 2002, 30(1): 101-106
- [39] 邱红鑫, 黄庆德, 陈丹等. 生物色谱法在中药研究中的应用进展[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(1): 144-147
- [40] 贺浪冲, 耿信笃. 细胞膜受体色谱法—研究药物与受体作用的新方法, 生物医药色谱新进展, 1996; 3: 8-9
- [41] He LC, Yang GD, Geng XD. Enzymatic activity and chromatographic characteristics of the cell membrane immobilized on silica, Chin Sci Bull 1999; 44(9): 826-31
- [42] He LC, Wang SC, Geng XD. Coating and fusing cell membrane onto a silica surface and their chromatographic characteristics. Chromatographia 2001; 54(1/2): 71-6]
- [43] 邹汉法, 吴明火, 王方军等. 整体柱制备技术的新进展及其在蛋白质组学中的应用[J]. 色谱, 2009, 27 (5): 526-53
- [44] Hage DS. Affinity chromatography: a review of clinical applications [J]. Clinical Chemistry, 1999, 45 (5): 593-615
- [45] Jun Hirabayashi, Yoichiro Arata, Ken-ichi Kasai Reinforcement of frontal affinity

- chromatography for effective analysis of lectin-oligosaccharide interactions [J]. *Chromatogr A*, 2000, 890(2): 261-271
- [46] 李其翔, 张红. 新药药物靶标开发技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006
- [47] 王瑜, 李鹏, 齐帆. 高通量筛选与药物创新[J]. *上海医药*, 2004, 25(2): 67-69
- [48] Zheng Cai, Greene MI, Berezov A. Modulation of biomolecular interactions with complex-binding small molecules [J]. *Methods*, 2008, 46(1): 39-46
- [49] Fabian MA, Biggs WH, Treiber DK, et al. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors [J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(3): 329-336
- [50] Zhu LL, Xu XJ. The Novel Application of Polyclonal Antibodies in Recognizing AntiEGFR Inhibitors Directly from Herb [J]. *Acta Phys Chim Sin*, 2003, 19(5): 385-388
- [51] Zhu LL, Chen LR, Luo HP, et al. Frontal Affinity Chromatography Combined on-line with Mass Spectrometry: A Tool for the Binding Study of Different Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors [J]. *Anal Chem*, 2003, 75(23): 6388-6393
- [52] Zhang B, Palcic MM, Schriemer DC, et al. Frontal Affinity Chromatography Coupled to Mass Spectrometry for Screening Mixtures of Enzyme Inhibitors [J]. *Analytical Biochemistry*, 2001, 299(2): 173-182
- [53] 张铮. 前沿亲和色谱筛选抗前列腺癌的植物药效成分[D]. 杭州: 浙江工业大学生药学, 2010
- [54] Zhang B, Palcic MM, Schriemer DC, et al. Frontal affinity chromatography coupled to mass spectrometry for screening mixtures of enzyme inhibitors [J]. *Anal Biochem*, 2001, 299(2): 173-182
- [55] Kim HS, Wainer IW. Rapid analysis of the interactions between drugs and human serum albumin (HSA) using high-performance affinity chromatography (HPAC) [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 870(1): 22-26
- [56] Chan NWC, Lewis DF, Rosner PJ, et al. Frontal affinity chromatography- mass spectrometry assay technology for multiple stages of drug discovery: applications of chromatographic biosensor [J]. *Anal Biochem*, 2003, 319(1): 1-12
- [57] Chan NWC, Lewis DF, Hewko S, et al. Frontal affinity chromatography for the screening of mixtures [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2002, 5 (5): 395-406
- [58] E. Calleri, C. Temporini, G. Massolini. Frontal affinity chromatography in characterizing

- immobilized receptor [J] J Pharm Biomed Anal. 2011, 54(5): 911-25
- [59] Zenghan Tong, K.S.Joseph, David S. Hage Detection of heterogeneous drug-protein binding by frontal analysis and high-performance affinity chromatography [J] J Chromatogr A, 2011, 1218(49): 8915-24
- [60] Jun Hirabayashi, Yoichiro Arata. Reinforcement of frontal affinity chromatography for effective analysis of lectin-oligosaccharide interactions [J]. Journal of Chromatography A, 2000, 890( 2): 261-271
- [61] Slon-Usakiewicz JJ, Ng W, Dai JR, et al.Frontal affinity chromatography with MS detection (FAC-MS) in drug discovery[J]. Drug Discovery Today, 2005, 10(6): 409-416.
- [62] Hage DS. High-performance affinity chromatography:a powerful tool for studying serum protein binding[J]. Journal of Chromatography B, 2002, 768(1): 3-30
- [63] Li W, Fries DP, Malik A. Sol-gel stationary phases for capillary electro- chromatography[J]. Journal of Chromatography A , 2004, 1044(1-2): 23-52
- [64] Enrica Calleri, Stefania Ceruti, Gloria Cristalli, et al. Frontal Affinity Chromatography-Mass Spectrometry Useful for Characterization of New Ligands for GPR17 receptor [J].Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 53(9): 3489-3501
- [65] 于雪. 高效亲和色谱法对四种中药活性成分与人血清白蛋白相互作用的研究[D]. 西安: 西北大学分析化学, 2010
- [66] 黄燕, 田清清, 李谭瑶等. 亲和色谱法筛选中药中血管紧张素转化酶抑制剂[J]. 中国科学(B 辑:化学), 2009, 39(8): 760-766
- [67] Ma. Montesinosa, Armando Tejeda-Mansirb, Roberto Guzm. et al. Analysis and simulation of frontal affinity chromatography of proteins [J]. Separation and Purification Technology 2005, 42(1):75-84
- [68] 邓静. 几种小分子物质对胰蛋白酶部分性质的影响研究[D] 成都: 四川大学生物化学与分子生物学, 2007
- [69] 李黎, 谭进, 刘志芳等. 曲酸与胰蛋白酶相互作用的光谱学研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2009, 5(46): 1466-1472
- [70] 申晓东, 宋关斌, 严润彬等. 苦参碱和氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究进展[J]. 重庆大学学报, 2005, 28(6): 125-128
- [71] Michael D. Scholle, Frank R. Collart, Brian K. Kaya, In vivo biotinylated proteins as targets

- for phage-display selection experiments [J]. Protein Expression and Purification, 2004, 37(1): 243-252
- [72] Marcus Bantscheff, Gerard Drewes Cellzome AG, Meyerhofstrasse. Chemoproteomic approaches to drug target identification and drug profiling [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012, 20(6): 1973-1978
- [73] Shi-Yong Lu, Sheng-Lan Jiang, Jun-Qing Qian, et al. A new trypsin affinity monolithic caoillary column prepaed glycerylsilane precursor through sol-gel method [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2011, 34(9): 690-704
- [74] 中华人民共和国国家标准. GB/T 8538-1995, 63

## 致 谢

离开校园两年后再次踏上求学之路，我知道，这将是我人生中又一段难以忘怀的旅程。三年时间，转瞬即逝。这三年走得辛苦却收获满囊，在论文即将付梓之际，我谨向所有关心、爱护、帮助我成长的人们表示由衷的感谢与美好的祝愿。

首先，我要衷心地向我的导师钱俊青教授表达最诚挚的感谢！感谢钱老师一直以来对我的关心和悉心指导。从论文的选题、方案的制定、实验过程中的指导到论文的撰写，都倾注了极大的心血。三年来，钱老师渊博的知识、严谨的治学态度、实事求是的作风和科研中的孜孜以求都深深地影响和教育着我。在钱老师的谆谆教导下，我接受了新的科研观念，领会了正确的科研思考方式。同时对于钱老师对我生活上的关心和人生道路上的指引，我也心怀感恩，并将这些铭记于心！

其次，我要衷心地感谢本实验室的郭辉老师、章华伟老师和杨胜利老师。正是常常有你们的指导和无私帮助，才使我的实验得以顺利完成。同时还要感谢在实验室一起工作学习的黄瑛、魏敏、崔立超、陈长春、张江柳、王文涛、胡晨、张中玉、王士诚、周峰、宋大威、朱军敏、陈律伸等同学。在三年的研究工作和学习生活中，我们建立起了兄弟姐妹的深厚情谊，感谢你们给予我的关心、鼓励和帮助。感谢卢时湧师兄、张铮师姐对我实验上和生活上的关心和帮助。虽然相处的时间很短，但这份情谊会永存。感谢张祎师弟、胡园园师妹给我实验上的很多帮助。

最后，我要特别感谢我的父母二十多年来一直无私的关爱、培养我。你们默默的奉献让我无以为报，唯有不断努力进步。

回首往昔，奋斗和辛劳成为点滴记忆；而今，甜美与欢笑也都将尘埃落定。



## 攻读学位期间发表的学术论文

- [1] Shi-Yong Lu, Sheng-Lan Jiang, Jun-Qing Qian, et al. A new trypsin affinity monolithic capillary column prepared by glycerylsilane precursor through sol-gel method [J] Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2011, 34 (9) : 690-704
- [2] 钱俊青, 蒋盛蓝, 秦德怀, 郭辉, 凌春英 214 型离子交换树脂固定化假丝酵母脂肪酶的研究[J], 浙江工业大学学报 已录用