第 23 卷 第 6 期　　分析测试学报　　Vol. 23 No. 6
2004 年 11 月　　FENXI CESHI XUEBAO(Journal of Instrumental Analysis)　　129～132

Hummel - Dreyer 法在生物分子相互作用分析中的应用

贺　静，曾成鸣

(四川大学 生命科学学院，四川 成都 610064)

摘　要：生物分子间的相互作用具有高度的专一性、目的性和有效性。分析平衡条件下这些相互作用的参数对于了解生物分子的结构特征和作用机制具有重要的意义。近年来发展起来的定量亲和色谱方法由于准确度高、重现性好、易于自动化而备受关注。Hummel - Dreyer(HD)法是基于色谱分离生物大分子复合物和配体的一种测定结合参数的方法。与其他方法比较，HD 法的特点是在整个分析过程中，配体的浓度保持不变，因此可以同时对高亲和性和低亲和性的相互作用进行定量分析。此外，该方法还可测定多种配体与同一大分子的相互作用常数。本文对方法的原理和近年来的应用进展作了简单的介绍。

关键词：亲和色谱；HD 法；亲和常数；生物分子相互作用

中图分类号：O657.7；Q503　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1004 - 4957(2004)06 - 0129 - 04

Application of Hummel - Dreyer Method in the Analysis of Interaction between the Biological Molecules

HE Jing，ZENG Cheng-ming

(The School of Life Science，Sichuan University，Chengdu 610064，China)

Abstract：The analysis of the parameters of the interaction between the biological molecules under equilibrium condition is crucial to understanding the characteristic structure of the biological molecules and the interaction mechanism. The use of quantitative affinity chromatography to obtain the binding parameters has received much attention in the last decades due to its high precision，reproducibility and ease of automation. The Hummel - Dreyer method，based on chromatographic separation of binding complexes and small ligands，can offer an efficient way to determine the binding parameters for protein - ligand equilibrium accurately. Compared to other methods，the feature of the HD method is that the ligand concentration remains constant during the whole analysis process. Thus，it is possible to analyse quantitatively the interaction between the high and low affinity binding sites simultaneously. In addition，it can be used to analyse the interaction between the multi-ligand and the macromolecule. Basic principles and recent applications of this method are briefly reviewed.

Key words：Affinity chromatography；Hummel - Dreyer mehod；Binding constant；Biological interactions

生物体系的各种功能在分子水平上都涉及分子的相互作用，诸如蛋白质 - 核酸、蛋白质 - 蛋白质、蛋白质 - 小分子等之间的相互作用是构成生物反应过程的基本要素，具有高度的专一性、目的性和有效性。在药物筛选研究中，因为药物在进入体内后的转运、储存和代谢都与蛋白质的作用有关，因而蛋白质 - 小分子间的相互作用在药物作用机制的研究中具有重要的意义。测定药物分子与蛋白质分子，特别是与受体蛋白相互作用的结合常数和结合容量是表征一种药物专一性和有效性的重要环节。近十多年来，蛋白质组学和组合化学的飞速发展使新型药物的研究进入了一个崭新的时期，但就如何从成千上万种化合物中经高通量筛选最终确定具有高度专一性和特定的生物效能的药物则是我们面临的挑战。在很多情况下，我们可以用体外实验的方式测定药物分子与受体结合的相关常数，以确定化合物的生物效能。

目前用于上述结合常数测定的方法主要是基于可将小分子配体(L)或者蛋白质(P)与蛋白 - 配体复合物(PL)分离的一些方法，如离心法、透析法、过滤法和色谱法(包括毛细管电泳)等。其中色谱法和毛细

收稿日期：2003 - 10 - 15；**修回日期**：2004 - 07 - 31
基金项目：国家自然科学基金资助项目(20245001)
作者简介：贺　静(1975 -)，女(俄罗斯族)，陕西西安人，博士研究生；曾成鸣，联系人.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

管电泳法由于设备精度高，易于自动化操作和微量化，近年来受到普遍关注。大量有关的研究工作采用将蛋白或配体分子固定在色谱固定相上的方法，这些方法有利于蛋白质或配体重复使用和保持同样的筛选条件。有关文献已经对其理论、方法及其应用作了详尽的阐述[1~7]。

非固定化亲和色谱用于蛋白 - 配体相互作用的定量分析主要以 Hummel - Dreyer 方法(HD 法)为代表。这种方法的特点是蛋白质不会因固定化造成可能的构型改变而导致亲和性变化，并且在蛋白或者配体难于获得的情况下，减少其在分析中的用量。

1 Hummel - Dreyer 方法的原理

1962 年，Hummel 和 Dreyer[8] 首先提出了基于体积排阻色谱测定生物大分子与小分子相互作用的结合常数的方法，即 Hummel - Dreyer 法。这种方法利用凝胶过滤的原理分离蛋白质 - 配体复合物和配体，根据蛋白质结合配体的量计算平衡条件下的结合参数。近年来出现的改进的 HD 方法包括离子交换和反相色谱分离复合物和小分子配体。下面以基于凝胶过滤分离蛋白 - 配体混合体系的色谱方法为例介绍该方法的基本原理。

在 HD 方法中，流动相中含有一定浓度的配体，样品组成为流动相加上已知量的蛋白质，在色谱柱达到平衡后进样。此时由于蛋白质对配体的结合能力尚未达到饱和，样品和流动相混合后，蛋白 - 配体作用会达到新的平衡，蛋白质分子将带走流动相中的部分配体分子，这样在该作用发生的色谱柱内局部流动相中，配体浓度就会减小。如果此时检测器以配体浓度作为检测信号，在经历凝胶对大小分子分离后，蛋白质分子就会带着流动相中的部分配体分子先流出柱外，表现为一个正峰，而配体浓度减小的局部流动相则按小分子的洗脱体积流出，表现为负峰(图 1)。原则上，正峰和负峰的面积相等，可按照当时流动相中配体的浓度计算出蛋白 - 配体复合物中配体的结合量，从而计算出配体对蛋白的亲和常数和结合容量。由于在整个洗脱过程中，配体的浓度保持不变，蛋白结合配体的量为一固定的常数，所以这种方法是一种比较准确地测定平衡条件下生物大分子 - 配体结合参数的方法，特别是对于亲和性较小的相互作用分析，较其它方法准确。该方法的另一个优点是它所需要的样品量较小，这在某些生物样品难于得到的情况下尤其重要。HD 法要求所采取的色谱条件应使复合物和配体的正、负峰能够得到基线分离，同时，在大多数情况下，要求生物大分子的纯化程度比较高。

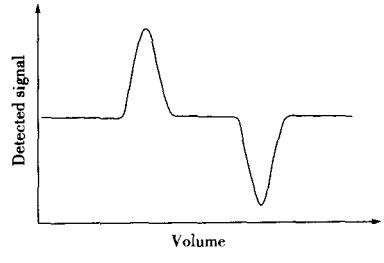

图 1 Hummel - Dreyer 方法色谱流出曲线示意图

Fig. 1 Schematic elution profile of the Hummel - Dryer method

在一般情况下，由于蛋白质具有一定的吸收信号，采用正峰面积进行计算可能影响配体结合量的准确性，故通常采用负峰计算比较适宜。当蛋白质不产生检测信号时，如使用放射性标记配体[9,10]和用原子发射光谱[11,12]测定金属离子与蛋白质相互作用时，也可采用正峰进行定量。配体在大分子上的结合量随着流动相中配体浓度的增加而增大，直至达到饱和，即最大结合容量，此时配体浓度增加不再影响配体的结合量。结合常数的计算与其它方法完全相同。对于生物大分子和小分子特异相互作用来说，例如受体 - 配体相互作用，其亲和参数有如下关系式[13]:

$$B = \sum_{i=1}^{m} n_i \frac{K_i c_L}{1 + K_i c_L}$$

其中 B 表示在配体浓度为 c_L 时，大分子对配体 L 的结合总量，大分子有 i 种不同的结合位点，n_i 为单个大分子结合 L 的位点数，K_i 为位点 i 与配体 L 的结合常数。如果大分子只有一种结合位点，上式经重排后为 Scatchard 关系的线性形式。当同一种配体在蛋白质分子上有多种结合位点时，则需按上式以非线性拟合的方式计算参数值。

2 Hummel - Dreyer 方法的改进及其应用

HD 法在其创立后不断地得到改进，这些改进后的方法为 HD 法拓展了更为广阔的应用范围。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

空白峰法(vacancy peak method),即 VP 法[14,15],可认为是 HD 法的另一种形式。在 VP 法中,流动相中含有蛋白质和配体,当色谱柱达到平衡后,用进样器加入一定体积的空白流动相溶液,即不含蛋白质和配体的流动相,这样就会出现两个负峰,第一个负峰对应于蛋白 - 配体复合物,而第二个负峰则对应于配体。对第二个负峰进行积分即可算出结合常数和结合容量。相对于 HD 法来说,VP 法需要消耗更多的样品,在采用紫外检测时,由于流动相有较高的背景吸收,所以必须对负峰进行标定。

将反相色谱分离机制引入以分子大小分离的凝胶色谱[16,17],则可同时对多种配体对同一种蛋白质的亲和性质进行分析。此时蛋白 - 配体复合物在柱中没有保留,最先被洗脱出来,而不同配体分子由于与疏水性固定相的作用强度不一样,负峰的保留体积也不相同,在达到完全分离的情况下,就可分别计算出各个配体在蛋白上的结合容量及结合常数。无分子大小分离机制的反相色谱也可用于 HD 分析。如用反相色谱分离环糊精 - 类固醇激素复合物和类固醇激素[18,19],当以 HD 法进行分离时,复合物先被洗脱,以正峰出现,随后是对应于流动相中失去的类固醇激素的负峰,以此测定了 β-CD 和 γ-CD 与各种类固醇激素的结合参数。在这种情况下,以正峰进行定量计算可能会带来较大的误差,因为类固醇化合物在与 CD 结合后,其摩尔吸光系数可能发生变化。这种方法在测定药物载体 CD 与药物结合参数时,不失为一种好的选择。

Berger 等人[20] 在测定叶绿体 ATP 酶 CF1 与 ATP 和 ADP 的结合常数时,采用了基于离子交换的 HD 法。在 ATP 和 ADP 得到基线分离的条件下,由 CF1 导致的 ATP 和 ADP 负峰分别用于两种复合物结合参数的计算。由此扩展的 HD 法,可对两种或两种以上的配体与同一种蛋白质的相互作用同时进行分析。当然,在这些配体间存在竞争性配位和非竞争性配位时,其实验方法和计算方式会有所不同。

用色谱方法对蛋白质 - 配体相互作用的定量分析多年来一直局限于水溶性蛋白。但很多配体在细胞膜上的靶点都是膜蛋白。膜蛋白在纯化过程中极易变性失活,特别是在失去膜脂质环境之后。近年来发展起来的生物膜亲和色谱[1,2,21～23]使得用色谱方法定量分析膜蛋白 - 配体相互作用成为可能。同样,生物膜亲和色谱的主要形式是将膜蛋白固定在色谱固定相上,并使其处于类似于生物膜脂质环境以保持其天然活性。固定化膜蛋白的形式包括,将膜蛋白重组入人工脂质体,非完全纯化的膜蛋白,如处于部分膜脂质形成的脂质微球(vesicles),细胞膜碎片以及完整细胞中的膜蛋白等。HD 法同样可以用于膜蛋白 - 配体相互作用的定性和定量分析。样品可采用人工脂质体重组的膜蛋白和细胞膜脂质微球等。该法已经成功用于红细胞膜葡萄糖转运蛋白 Glut1 与其抑制剂的相互作用分析[2,9,10],其结合常数和结合容量是判断 Glut1 在纯化、修饰过程中是否仍具有其天然构型和活性的依据。HD 法中,蛋白的分子构型不受影响,分析过程中能确保蛋白 - 配体作用处于平衡状态,操作简便,对分析的各个步骤标准化后,可有效地用于膜蛋白纯化、重组、修饰过程的控制,这对于探索膜蛋白结晶条件来说具有重要的价值。

HD 法同样可用于毛细管电泳方式测定蛋白质 - 配体相互作用的结合参数,其操作方法与色谱法类似[24]。与色谱法比较,毛细管电泳 HD 分析的数据相对标准偏差较大,而同样基于毛细管电泳的前沿分析则似乎更优越一些[25]。

3　结　语

HD 法的最大特点是,在整个分析过程中,蛋白质 - 配体间的相互作用都处于平衡状态,这对于低亲和性的相互作用分析来说具有优势。其它特点如分析中蛋白用量少,蛋白质分子不论是游离分子还是脂质体中的重组形式,都能保持其所在环境中的天然构型,得到的亲和性参数更加准确可靠。这些特点使得 HD 法在生物大分子 - 配体相互作用分析中为人们提供了一种很好的选择。

参考文献:

[1]　GOTTSCHALK I, LAGERQUIST C, ZUO S, *et al*. [J]. J Chromatogr, B, 2002, 768: 31 - 40.
[2]　LUNDAHL P, ZENG C, LAGERQUIST C, *et al*. [J]. J Chromatogr, B, 1999, 722: 103 - 120.
[3]　LUNDAHL P, LUNDQVIST A, GREIJER E. (Eds) Quantitative analysis of biospecific interactions[D]. Amsterdam: Harwood Academic, 1998.
[4]　YANG Q, LUNDAHL P. [J]. Biochemistry, 1995, 34: 7289 - 7294.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[5] WINZOR D, JACKSON C. In handbook of affinity chromatography(Kline T. Eds)[D]. New York: Marcel Dekker, 1986. 253-298.
[6] SEBILLE B, ZINI R, MADJAR C, *et al*. [J]. J Chromatogr, 1990, 531: 51-77.
[7] MOADDEL R, WAINER I. [J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 30: 1715-1724.
[8] HUMMEL J, DREYER W. [J]. Biochim Biophys Acta, 1962, 63: 530-532.
[9] ZENG C. Approaches in biomembrane chromatography and microchromatographic techniques[D]. Doctoral Thesis, Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala, 1998.
[10] GOTTSCHALK I, LUNDQVIST A, ZENG C, *et al*. [J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 6875-6882.
[11] SANDIER A, AMIEL C, SEBILLE B, *et al*. [J]. J Chromatogr, A, 1997, 776: 93-100.
[12] SANDIER A, AMIEL C, SEBILLE B, *et al*. [J]. Int J Biol Macromol, 1999, 24: 43-48.
[13] KLOTZ I. Introduction to biomolecular energetics. including ligand-receptor reactions[D]. Orlando: Academic Press, 1986.
[14] SEBILLE B, THUAUD N, TILLEMENT J. [J]. J Chromtogr, 1979, 180: 103-110.
[15] THUAUD N, SEBILLE B, LIVERTOUX M, *et al*. [J]. J Chromatogr, 1983, 282: 509-518.
[16] PINKERTON T, KOEPLINGER K. [J]. Anal Chem, 1990, 62: 2114-2122.
[17] ORAVCOVA J, SOJKOVA D. [J]. J Pharm Pharmacol, 1995, 47: 75-78.
[18] SADLEJ-SOSNOWSKA N. [J]. J Pharm Biom Anal, 1995, 13: 701-704.
[19] FLOOD K, REYNOLDS E, SNOW N. [J]. J Chromatagr, A, 2001, 913: 261-268.
[20] BERGER G, GIRAULT G. [J]. J Chromatogr, B, 2002, 768: 167-175.
[21] PIDGEON C, ONG S, LIU H. [J]. J Med Chem, 1995, 38: 590-594.
[22] BERNAL C, PIDGEON C. [J]. J Chromatogr, A, 1996, 67: 755-762.
[23] MOADDEL R, CLOIX J, ERTEM G. [J]. J Chromtagr, B, 1999, 724: 65-72.
[24] QUALIA M, BOSSU E, DELL'AQUILA C, *et al*. [J]. J Pharm Biom Anal, 1997, 15: 1033-1039.
[25] BUSCH M, CARELS L, BOELENS H, *et al*. [J]. J Chromatogr, A, 1997, 777: 311-328.

www.cnki.net

2005 年征订启事

《中国药学文摘》、中国药学文摘数据库网络版、光盘(2005 年)

中国药学文献数据网络系统即《中国药学文摘》刊物、数据库网络版、数据库光盘是国家科技部重点扶植、国家食品药品监督管理局主管的我国药学文献大型检索和查询系统。 该系统于 1981 **年创建, 主要收载国内外公开发行的** 700 **余种医药学及相关学科期刊中的药学文献, 以文摘、简介、题录等形式进行报道。 该系统内容涵盖药学各个领域, 共设十二个栏目: 药学理论与发展动态、生药学和中药材、药物化学、药物生产技术、药剂学和制剂技术、药理学和毒理学、生物药剂学、药物分析、临床应用与药物评价、药品管理、制药设备和工厂设计及包装、药品和新药介绍等。 该系统拥有近** 32 **万多条数据, 本数据库每年以** 3 **万多条数据递增, 且内容丰富, 查询方便, 可为医药生产、科研、教学、流通、医院药房、药店、情报和管理机构服务。 从网络、光盘、文本三种途径查到所需要的文献。 该系统曾获国家科技进步三等奖, 文本版即国内外公开发行的杂志《中国药学文摘》曾多次获得有关部委的奖励。 荣获全国科技信息系统优秀成果二等奖、全国科技检索期刊一等奖、第二届全国优秀科技期刊评比三等奖、全国医药情报成果二等奖、第二届国家期刊奖百种重点期刊奖。《中国药学文摘》为月刊, 内容同中国药学文摘数据库, 16 开本, 每期** 260 **页左右, 每期约** 65 **万字, 全年** 476 **元。**

《中国药品检验文摘》文本版每年两期, 16 开本, 每期正文 240 **页左右, 年报道最新信息量近** 4500 **条, 90 万字, 全年服务费** 160 **元。**

国家食品药品监督管理局信息中心为指导科研, 服务医药, 最新推出:

《动植物药有效成分提取分离和药理活性筛选汇编》(第一集), 本汇编为大 16 **开, 近** 160 **万字, 700 多页。**

《中药资源调查开发利用资料汇编》(第一集), 本汇编为大 16 **开, 近** 160 **万字, 700 多页。**

《药物新剂型产品、新辅料及新技术汇编》(第二集, 分上下册), 本汇编为大 16 **开, 文字** 300 **多万字, 上册、下册各** 600 **多页。**

《生物生化药品工艺与技术汇编》(第二集), 本汇编为大 16 **开, 近** 170 **万字, 700 多页。**

订阅者可直接与国家食品药品监督管理局信息中心《中国药学文摘》编辑部联系。

开户名称: **国家食品药品监督管理局信息中心**

开 户 行: **建设银行北京展览路支行**

账　　号: 6510003042610002517

地　　址: **北京市西城区北礼士路甲** 38 **号(邮编**: 100810)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net