

# 应用液-液双水相抽提技术分离纯化甘油激酶、

## $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶及心肌黄酶

卞祖宁 周金耀 徐景娣 胡莹书 熊振平

(上海医药工业研究院, 上海)

用液-液双水相抽提技术分别从嗜热脂肪芽胞杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 菌体、兔肌及猪心肌匀浆液中分离甘油激酶、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶及心肌黄酶, 研究了 pH、匀浆液的量、氯化钠浓度及丙酮等因素对分配系数、上下相体积之比、酶活性回收率及分离效果等参数的影响, 并确定了抽提上述三种酶的最佳相组成系统。

用本文的工艺抽提甘油激酶、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶及心肌黄酶有下列优点:

1. 酶活回收率较高, 分别为90%、95%及70% 2. 分离效果较好, 通常提纯三、四倍以上 3. 各酶均存留在下相, 即磷酸钾盐富相中, 故可省去聚乙二醇 (PEG) 的分离工序而直接与后继精制工艺衔接, 简化了工艺, 在实验室及工业生产中均有实用价值。

**关键词** 液-液双水相抽提技术; 相组成系统; 甘油激酶;  $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶; 心肌黄酶

在中试或扩大生产中要使酶与菌体、细胞或它们的碎片分离是件困难的事, 这是酶及其它生物活性大分子物质的后处理工艺中亟待解决的棘手问题之一。70年代起研究与开发的液-液双水相抽提技术即因此应运而生的, 应用此技术不仅使固-液达到分离, 而且由于酶、多糖、核酸等物质在液-液双水相中的分配系数不同, 也就是说在固-液分离的同时, 还可使酶获得纯化。应用此技术分离纯化的酶已有数十种<sup>[1]</sup>, 而且这些酶多来源于微生物, 在应用聚乙二醇-磷酸盐作液-液双水相抽提时, 酶多数分配在上相聚乙二醇富相中。本文在研究与观察影响液-液双水相抽提的分配系数 (K)、上下相体积之比 (VB/VT)、酶活回收率 (R) 及提纯效果 (P) 的某些因素的基础上, 将此技术的应用范围由分离纯化微生物来源的酶扩展到分离提纯动物脏器组织来源的酶, 同时, 设计了酶直接分配在磷酸盐富相的相组成系

统, 使抽提后不需进行酶与PEG的分离即可直接与后继提纯工艺衔接, 工艺流程得以简化。

## 材料和方 法

### (一) 材料

1. 甘油激酶匀浆液: 嗜热脂肪芽胞杆菌 (*Bacillus stearothermophilus* SIPI 1,687) 经超声波振荡器处理后制得。

2. 兔肌匀浆液: 去除结缔组织及脂肪组织的新鲜兔腿肌经绞切器绞碎后, 加入二倍量 (W/W) 预冷至4°C的含1.5mmol/LEDTA的50mmol/L、pH8.0磷酸缓冲液, 用玻璃匀浆器制成匀浆, 继续在冰浴中搅拌0.5h。

3. 猪心肌匀浆液: 去除结缔组织及脂肪组织的新鲜冷冻猪心经绞切器绞切

本文于1987年6月24日收到。

宛敏和朱学工同志参加部分试探性研究在此表示感谢。

后, 用预冷至 4℃ 的自来水充分洗涤后装入尼龙袋中绞干, 称重, 按 1:3 (W/W) 加入预冷至 4℃ 的磷酸氢二钠溶液用玻璃匀浆器制成匀浆。

4. NADH, NAD 系 B<sup>o</sup>ehringer mannheim 产品, 2-(4-磺苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-苯基四唑氯化物 (简称 INT) 系 Fluka 产品,  $\alpha$ -甘油磷酸为本室化学组合成, 其它有关试剂均为国产化学纯。

## (二) 方法

1. 甘油激酶活力的测定: 按 Wieland<sup>[2]</sup> 的方法稍有改动, 1.175ml、pH 9.8 甘氨酸-水合肼反应缓冲液中含有甘油激酶 50 $\mu$ l, ATP 1mg、NAD 0.5mg、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶 1.5u 和甘油 0.23mg, 于 30℃, 在 340nm 测定光吸收度变化, 在上述条件下, 每分钟转化 1 微克分子底物所需的酶量为一个酶活力单位。

2.  $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶活力的测定: 1ml 含有  $\alpha$ -甘油磷酸 17mg 及 NAD 0.5mg 的 25mmol/L、pH 10.0 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, 于 25℃ 保温 3min 后, 加入 0.1ml  $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶液, 在 340nm 测定光吸收度变化。在上述条件下, 每分钟转化 1 微克分子  $\alpha$ -甘油磷酸所需的酶量定为一个酶活力单位。

3. 心肌黄酶活力的测定: 2.1ml 含有 INT 1mg 及 NADH 1.2mg 的 0.1mol/L、pH 7.5 三乙醇胺-盐酸缓冲液, 于 37℃ 保温 5min 后, 加入 0.1ml 心肌黄酶液, 反应 5 min, 立即加入 1.0ml 0.2mol/L HCl 中止酶反应, 在 500nm 测定吸光度。在上述条件下, 每分钟还原 1 微克分子的 INT 所需的酶量定为一个酶活力单位。

4. 蛋白测定: 紫外吸收法<sup>[3]</sup>。

5. 液-液双水相抽提: 取适量的酶液与所选择的液-液双水相系统混合, 振

摇 10—20min, 于 10—30℃ 下放置 15—40 h, 使其自然分层, 上相为聚乙二醇富相, 下相为磷酸钾盐富相。由于本文研究的目的之一是在于酶分配在下相的磷酸盐富相中, 故为叙述方便起见分配系数及上、下相体积之比分别以它们的倒数表示之。

## 结 果

### (一) pH 对有关参数的影响

pH 可明显地影响甘油激酶,  $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶及心肌黄酶在液-液双水相系统中的分配情况, 即可明显地影响 1/K, R, P 及 VB/VT 等四个有关参数, 尤其是 K, P 及 VB/VT。换言之, pH 是决定酶

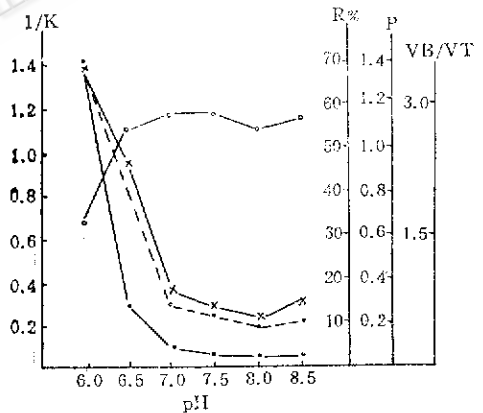


图 1 pH 对甘油激酶分配系数、活性回收, 提纯效果及上、下相体积之比的影响

Fig. 1 The effect of pH on partition coefficient, activity recovery, purification fold, volume proportion of top phase to bottom phase for glycerokinase

液-液双水相组成 The composition of liquid-liquid two-phase (% W/W): 聚乙二醇 (PEG 6000) 10, 磷酸钾盐 K-PO<sub>4</sub> 16, NaCl 0, 粗提取液 Crude extract 1

- 分配系数 K (Partition coefficient)
- - - × - - - 活性回收 R (Activity recovery)
- × - × 提纯效果 P (Purification fold)
- 上、下相体积之比 VB/VT (Bottom phase volume: top phase volume)

分配在上相还是下相的关键因素。图1结果表明,当pH为6.0时,甘油激酶主要分配在下相,随pH增加酶则转而分配在上相。对 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶及心肌黄酶来说,仅当pH分别为6.5及7.0时,方可被分配在下相(图2和图3)。

(二) 匀浆液的量对有关参数的影响

被抽提的粗提液或匀浆液的量对酶在液-液双水相系统的上、下相中分配的情况是有影响的,但是影响的程度是因酶而异的。对 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶而言,随被抽提匀浆液量增加,酶分配在下相中的1/K、R、P及VB/VT均降低,而对甘油激酶及心肌黄酶而言,被抽提液的量过高及过低,均不利于酶分配在下相,仅在抽提液的量分别为2.4%及16%时酶在下相中的分配情况最佳(图4、图5和图6)。

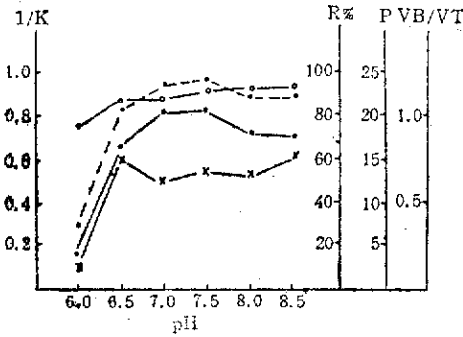


图2 pH对 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶分配系数、活性回收、提纯效果及上、下相体积之比的影响

Fig.2 The effect of pH on partition coefficient, activity recovery, purification fold, volume proportion of top phase to bottom phase for  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase

液-液双水相组成 The composition of liquid-liquid two-phase (% W/W): 聚乙二醇(PEG 6000) 8, 磷酸钾盐  $K_2PO_4$  15, NaCl 0, 匀浆液 Homogenate 10 图例同图 1. Legend is as in figure 1

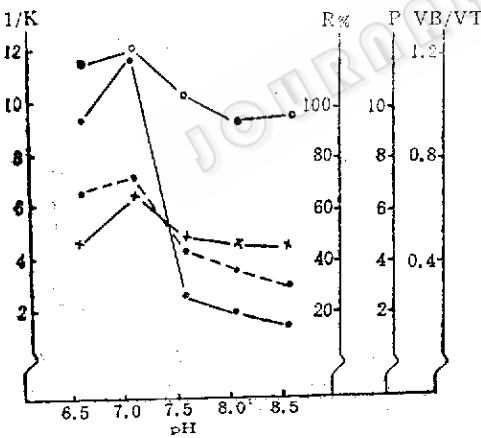


图3 pH对心肌黄酶分配系数、活性回收、提纯效果及上、下相体积之比的影响

Fig.3 The effect of pH on partition coefficient, activity recovery, purification fold, volume proportion of top phase to bottom phase for diaphorase

液-液双水相组成 The composition of liquid-liquid two-phase (% W/W): 聚乙二醇(PEG 6000) 8, 磷酸钾盐  $K_2PO_4$  10, NaCl 0, 匀浆液 Homogenate 10 图例同图 1 Legend is as in figure 1

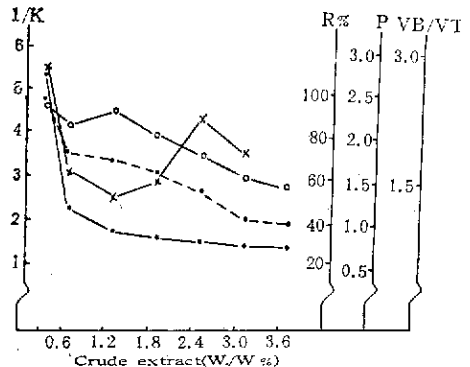


图4 粗提取液的量对甘油激酶分配系数、活性回收、提纯效果及上、下相体积之比的影响

Fig.4 The effect of the amounts of crude extract on partition coefficient, activity recovery, purification fold, volume proportion of top phase to bottom phase for glycerokinase

液-液双水相组成 The composition of liquid-liquid two-phase (% W/W): 聚乙二醇(PEG 6000) 10, 磷酸钾盐  $K_2PO_4$  16, pH6.0 图例同图 1 Legend is as in figure 1

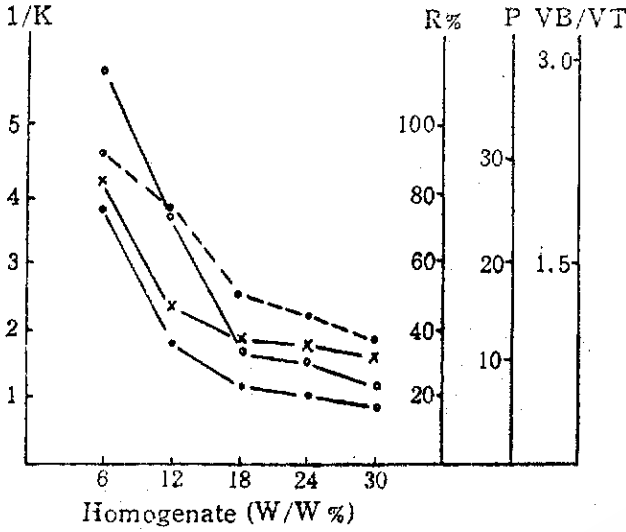


图5 匀浆液的量对 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶分配系数、活性回收、提纯效果及上、下相体积之比的影响

Fig.5 The effect of the amounts of homogenate on partition coefficient, activity recovery, purification fold, volume proportion of top phase to bottom phase for  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase

液-液双水相组成 The composition of liquid-liquid two-phase (%W/W): 聚乙二醇 (PEG 6000) 8, 磷酸钾盐  $K_2PO_4$  15, pH 7.5  
图例同图 1. Legend is as in figure 1

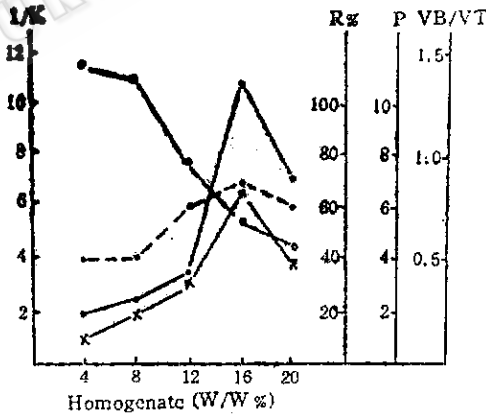


图6 匀浆液的量对心肌黄酶分配系数、活性回收、提纯效果及上、下相体积之比的影响

Fig.6 The effect of the amounts of homogenate on partition coefficient, activity recovery, purification fold, volume proportion of top phase to bottom phase for diaphorase

液-液双水相组成 The composition of liquid-liquid two-phase (%W/W): 聚乙二醇 (PEG 6000) 8, 磷酸钾盐  $K_2PO_4$  10, pH 7.0

图例同图 1. Legend is as in figure 1

(三) 氯化钠浓度对有关参数的影响

氯化钠浓度可影响酶在液-液双水相系统中分配的情况, 如图7, 图8当液-液

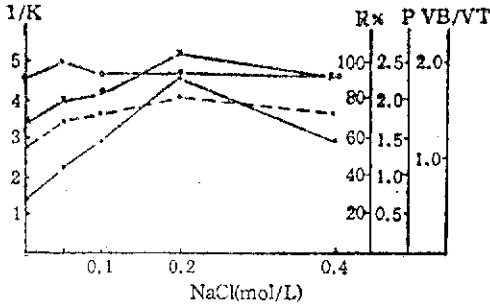


图7 氯化钠浓度对甘油激酶分配系数、活性回收、提纯效果及上、下相体积之比的影响

Fig.7 The effect of NaCl concentration on partition coefficient, activity recovery, purification fold, volume proportion of top phase to bottom phase for glycerokinase

液-液双水相组成 The composition of liquid-liquid two-phase (%W/W): 聚乙二醇(PEG 6000) 10, 磷酸钾盐 K-PO<sub>4</sub> 16, 粗提取液Crude extract 2, pH 6.0

图例同图 1 Legend is as figure 1

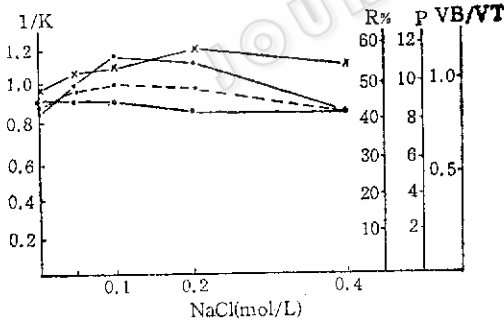


图8 氯化钠浓度对α-甘油磷酸脱氢酶分配系数、活性回收、提纯效果及上、下相体积之比的影响

Fig.8 The effect of NaCl concentration on partition coefficient, activity recovery, purification fold, volume proportion of top phase to bottom phase for α-glycerophosphate dehydrogenase

液-液双水相组成 The composition of liquid-liquid two-phase(%W/W): 聚乙二醇(PEG 6000) 8, 磷酸钾盐 K-PO<sub>4</sub> 15, 匀浆液 Homogenate 10, pH 6.5

图例同图 1 Legend is as figure 1

双水相抽提系统中含有的氯化钠浓度分别为0.2mol/L及0.1mol/L 时甘油激酶和心肌黄酶在下相中的1/K、R、P及VB/VT 分别为4.5, 78%, 1.75、1.8和8、60%、3及1.6。即在此时, 两酶主要分配在下相, 有最理想的分配情况。但是在抽提α-甘油磷酸脱氢酶时, 氯化钠的浓度对分配时的各参数影响并不显著(图9)。

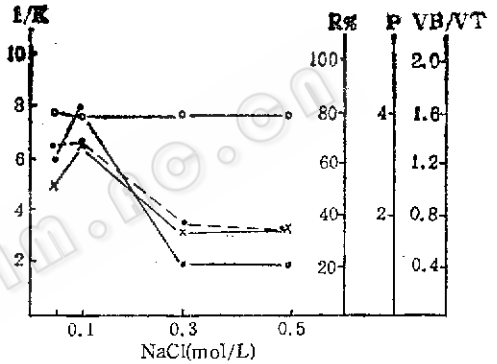


图9 氯化钠浓度对心肌黄酶分配系数、活性回收、提纯效果及上、下相体积之比的影响

Fig.9 The effect of NaCl concentration on partition coefficient, activity recovery, purification fold, volume proportion of top phase to bottom phase for diaphorase

液-液双水相组成 The composition of liquid-liquid two-phase (%W/W): 聚乙二醇(PEG 6000) 8, 磷酸钾盐 K-PO<sub>4</sub> 10, 匀浆液 Homogenate 10%, pH 7.0

图例同图 1 Legend is as figure 1

(四) 丙酮对心肌黄酶有关参数的影响

图10结果表明, 丙酮可影响心肌黄酶在液-液双水相系统中分配时的1/K、R、及VB/VT, 但对P的影响不显著。在本实验条件下, 当丙酮含量由0.1% (W/W) 递增至0.7%时, 1/K及R也递增, 即在下相中的分配量增加。

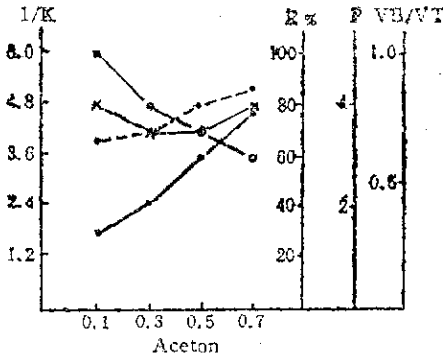


图10 丙酮对心肌黄酶分配系数、活性回收、提纯效果及上、下相体积之比的影响

Fig.10 The effect of acetone on partition coefficient, activity recovery, purification fold, volume proportion of top phase to bottom phase for diaphorase

液-液双水相组成 The composition of liquid-liquid two-phase (% W/W): 聚乙二醇(PEG 6000) 8, 磷酸钾盐  $K_2PO_4$  10, 匀浆液 Homogenate 10, pH 7.0

图例同图 1 Legend is as figure 1

### (五) 分离提纯甘油激酶、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶及心肌黄酶时的液-液双水相组成

在研究了 pH、被提取物的量、氯化

表 1 纯化甘油激酶、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶及心肌黄酶的液-液双水相抽提系统的成分

Table 1: The compositions of liquid-liquid two-phase extraction systems for purification of glycerokinase,  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and diaphorase

Enzymes	两相的成份配比 The compositions of two-phase systems(% W/W)				
	粗提取液 Crude extract	聚乙二醇 6000 PEG 6000	磷酸钾盐 $K_2PO_4$	氯化钠 NaCl	丙酮 Ac- etone
甘油激酶 Glycerokinase	2	10	16	1.1	6.0
$\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶 GPDH	15	8	15		6.5
心肌黄酶 Diaphorase	20	8	10	0.5	7.0

GPDH ( $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase)

钠浓度及丙酮等因素对甘油激酶、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶及心肌黄酶在液-液双水相系

统中分配情况影响的基础上，确定了抽提上述三酶的双水相系统的组成(表1)，应用此液-液双水相系统抽提的结果是满意的，甘油激酶、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶和心肌黄酶的回收率分别为90%、95%和70%，三种酶纯化倍数分别为3—4、3—4和6—7倍。

## 讨 论

1. 常见的液-液双水相抽提的相组成系统有两类，即聚乙二醇-右旋糖酐(dextran)及聚乙二醇-磷酸钾盐。由于右旋糖酐溶液粘度较大，处理时有一定的困难，加之右旋糖酐的价格高于磷酸钾盐，现在多采用后一类系统。在应用聚乙二醇-磷酸钾盐时，多数情况下酶是被分配在上相，即聚乙二醇富相中，我们考虑到在生产中应尽可能减少处理步骤，因此本文重点在如何使酶分配在下相，即磷酸钾盐富相，以便于抽提后直接与进一步纯化的后继工艺相衔接。研究的结果表明，pH、被提取物的量、氯化钠浓度可影响酶在液-液双水相系统中的分配。通过选择合适的pH氯化钠浓度及被提取物的量，是可以较为满意地将酶分配到所期望的相中的。

2. 本文尚发现丙酮对心肌黄酶的分配系数，酶活力回收及上、下相体积之比均有影响，此情况在文献中从未见到报道。根据Abertsson P. Å 的看法<sup>[4]</sup>，认为分配系数受多种因素影响，其中也包括疏水力的影响。丙酮可增加心肌黄酶在磷酸钾盐富相中的分配是否与疏水力的改变有关，尚待继续研究之。但是，根据在猪心肌匀浆液中加入同样量的丙酮并不能使高速冷冻离心后上清液中的心肌黄酶增加，反之正丁醇可使高速冷冻离心后上清液中

的心肌黄酶增加,却不能改变心肌黄酶在液-液双水相系统中的分配情况,故我们认为一定量的丙酮可增加心肌黄酶在磷酸

钾盐富相中的分配并非是丙酮改变了该酶溶解度所致。

### 参 考 文 献

- [1] Kula, M. R., et al.: *Advances in Biochemical Engineering* (Fiechter, A., ed.) Vol. 24, Springer-Verlag, Berlin, pp. 73—118, 1982.
- [2] Wieland, O.: *Methods of Enzymatic Analysis* (Sergmeyer, H. U., ed.), Vol. III, Academic Press, New York, pp. 1404—1414, 1974.
- [3] Kresze, G. B.: *Methods of Enzymatic Analysis Vol. I*, (3rd ed.), Verlag Chemie, Weinheim, 1974.
- [4] Albertsson, P. A.: *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, 2nd ed., Almqvist & Wiksell, Stockholm, Wiley, New York, 1971.

## PURIFICATION OF GLYCEROKINASE, $\alpha$ -GLYCEROPHOSPHATE DEHYDROGENASE AND DIAPHORASE BY USING LIQUID-LIQUID TWO PHASE EXTRACTION

Bian Zuning Zhou Jinyao Xu Jindi Hu Yinshu Xiong Zhenping  
(Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai)

The influences of pH, quantity of homogenate, concentration of NaCl and acetone on the distribution coefficient, volume proportion of top phase to bottom phase, activity recovery and separation efficiency were studied. The optimum conditions of liquid-liquid two phase extraction for separating glycerokinase,  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and diaphorase from homogenates of *Bacillus stearothermophilus* cells, rabbit muscle and porcine heart are described.

The advantages of our processes to extract glycerokinase,  $\alpha$ -gly-cerophosphate dehydrogenase and diaphorase have been shown as follows:

1. High recoveries of enzyme activity, 90%, 95% and 70%, respectively were obtained. 2. Better separation efficiency, over 3—4 folds of purification. 3. As enzyme could be remained in the bottom phase (phosphate rich phase), and it is easy to connect the enzyme solution to the following purification steps without additional separation of PEG from solution.

### Key words

Liquid-liquid two-phase extraction; the compositions of two-phase systems; glycerokinase;  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase; diaphorase