

层析凝胶 DEAE Sepharose Fast Flow 分离纯化 5'-混合脱氧单核苷酸

王光柱,陈枢青* (浙江大学药学院生物制药研究室,杭州 310031)

摘要:目的 针对 5'-混合脱氧单核苷酸的理化特性,研究利用 DEAE Sepharose Fast Flow 凝胶分离纯化 5'-混合脱氧单核苷酸。方法 上样缓冲液采用 20 mmol/L Tris, pH 9.0, 上柱量 ≤ 7.5 mg/mL gel, 上柱流速 5 mL/min, 洗脱缓冲液采用 20 mmol/L Tris + 0.025 mol/L NaCl, pH 9.0, 洗脱流速 0.5 mL/min。结果 实验结果发现 dCMP, dAMP, dTMP 的收率为 95% 以上, dGMP 的收率为 85% 以上, 所获得的混合脱氧单核苷酸经高效液相色谱检测色纯度 98% 以上。

关键词:混合脱氧单核苷酸; DEAE Sepharose Fast Flow; 收率; 纯度

中图分类号: TQ464.3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)01-0017-04

Purification of 5'-deoxynucleotides by DEAE Sepharose Fast Flow

WANG Guang-zhu, CHEN Shu-qing* (Department of Biochemistry, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE According to the physical and chemical characteristic of 5'-deoxynucleotides, this study investigated the separating and purifying 5'-deoxynucleotides by DEAE Sepharose Fast Flow. **METHODS** Take 20 mmol/L Tris (pH 9.0) as binding buffer, sample binding ≤ 7.5 mg/mL gel, flow-rate 5 mL/min; Take 20 mmol/L, 0.025 mol/L NaCl (pH 9.0) as elution buffer, flow-rate 0.5 mL/min. **RESULTS** The chromatographic grade purity of the eluate is above 98% by HPLC, the recovery rate of dCMP, dAMP and dTMP is above 95%, the recovery rate of dGMP is above 85%.

KEY WORDS: 5'-deoxynucleotides; DEAE Sepharose Fast Flow; recovery rate; purity

5'-混合脱氧单核苷酸是由脱氧核糖腺嘌呤核苷酸(dAMP)、脱氧核糖鸟嘌呤核苷酸(dGMP)、脱氧核糖胞嘧啶核苷酸(dCMP)和脱氧核糖胸腺嘧啶核苷酸(dTMP)四种脱氧单核苷酸组成的,通常是以生物提取的脱氧核糖核酸(DNA)为原料,经 5'-磷酸二酯酶水解,并经过分离纯化得来的。5'-混合脱氧单核苷酸能够提供细胞和组织修复所必需的核酸营养,参与体内核酸代谢过程。在临床上常用于治疗由各种原因引起的白细胞减少症和血小板减少症、贫血及再生障碍性贫血、各种炎症等多种疾病^[1-3]。

5'-混合脱氧单核苷酸的工业生产中,影响质量和成本主要因素是分离纯化。目前工业上常采用 201 $\times$ 7 阴离子交换树脂^[3]或者 201 $\times$ 8 阴离子交换树脂^[4]进行,也有用 D293 大孔阴离子交换树脂的^[5],还有报道用超滤法^[6]来进行纯化的。这些方法虽然在工业上使用了几十年,但是存在一个共同的缺点:即重复性较差,生产中对经验的依赖性较强,质量缺乏稳定性。笔者试图利用 GE 公司的 DEAE Sepharose Fast Flow 层析凝胶,建立一种快速高效的 5'-混合脱氧单核苷酸的分离纯化方法,为提高 5'-混合脱氧单核苷酸的药品质量而奠定基础。

1 材料

核酸酶 P1 采用桔青霉 *penicillium citrinum* M71 菌株,经固体培养及发酵制得。鱼精 DNA 由杭州国光药业有限公司

提供,纯度为 66.67%。标准品: dCMP, dAMP, dTMP, dGMP 购自上海秋之友生物技术有限公司。769 活性炭购自上海活性炭有限公司。层析凝胶 DEAE Sepharose Fast Flow(弱阴离子琼脂糖凝胶)购自 GE 公司。色谱柱 XK26/20(直径 26 mm)购自 GE 公司。层析仪 AKTA prime 购自 GE。

2 方法

2.1 鱼精 DNA 的纯度测定

按李建武等^[7]方法进行。

2.2 鱼精 DNA 的酶解

将鱼精 DNA 粉末(纯度为 66.67% 左右)用超纯水配成 1% 的水溶液,90℃ 热变性 10 min,调 pH 5.4,加 1/6 体积的核酸酶 P1 溶液,酶活为 168.63 U/mL,在 72℃ 水浴中保温酶解 6 h。

2.3 769 活性炭的预处理

用 1 mol/L 的 NaOH 煮沸 15 min,超纯水洗至中性;再用 1 mol/L 的 HCl 煮沸 15 min,超纯水洗至 pH 3.0,备用。

2.4 DNA 酶解液的预处理

酶解液过滤后调 pH 3.0,上炭柱,再洗脱、收集、旋转浓缩,经 0.45 μ m 过滤。

2.5 DNA 酶解液于层析凝胶 DEAE Sepharose Fast Flow 上的分离纯化

取一定量层析凝胶 DEAE Sepharose Fast Flow,装于色谱

作者简介:王光柱,男,硕士生

* 通讯作者:陈枢青,男,教授 Tel / Fax (0571) 87217406, E-mail: chenshuqing@zju.edu.cn

柱 XK26/20 平衡凝胶用 5 倍柱体积上样缓冲液 (20 mmol/L Tris pH 9.0)、5 倍柱体积洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris + 0.025 mol/L NaCl pH 9.0)、5 倍柱体积上样缓冲液以一定的流速冲洗凝胶。凝胶平衡完毕后, 将经过预处理的混合脱氧单核苷酸酶解液溶解于上样缓冲液中, 以一定的流速上柱, 再以上样缓冲液冲洗柱子, 直到基线达平稳状态, 然后用洗脱缓冲液以一定的流速进行洗脱, 洗脱完毕, 用 20 mmol/L Tris + 1.5 mol/L NaCl 溶液冲洗凝胶进行再生。在柱的出口处定时取样测定浓度, 得到洗脱曲线。

2.6 5'-混合脱氧单核苷酸的纯度测定及收率计算

按陈妙芬等^[8]方法对洗脱液中 5'-混合脱氧单核苷酸进行纯度测定, 并测定上柱液和层析柱洗脱流出液中 4 种脱氧单核苷酸的浓度, 然后分别根据上柱液体积和洗脱流出液体积计算上柱液和洗脱流出液中脱氧单核苷酸的含量, 从而得到混合脱氧单核苷酸的收率。

3 结果与讨论

3.1 DNA 酶解液于层析凝胶 DEAE Sepharose Fast Flow 上的分离纯化

图 1 是利用层析凝胶 DEAE Sepharose Fast Flow 对 DNA 酶解液进行离子交换层析时的洗脱曲线。峰 1 是上样流出液, 基本是杂质, 但上样量超载时会有 5'-混合脱氧单核苷酸流出。峰 2 是 0.025 mol/L NaCl 洗脱峰, 5'-混合脱氧单核苷酸在此时洗脱, 该峰收集液经高效液相色谱测定, 纯度达 98% (图 2)。峰 3 是在同样 0.025 mol/L NaCl 条件下洗脱的杂质峰。峰 4 是用 1.5 mol/L NaCl 对柱子进行彻底洗脱时的洗脱峰, 为杂质峰。5'-混合脱氧单核苷酸的纯度分析见图 2。

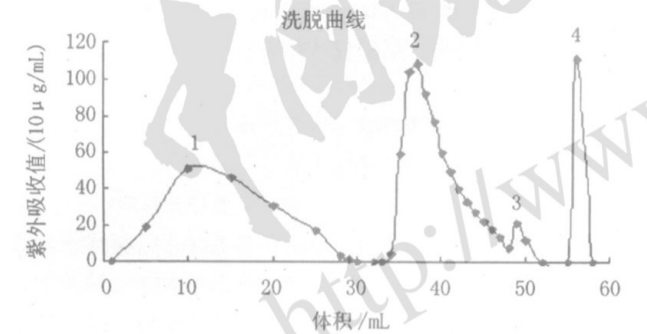


图 1 层析凝胶 DEAE Sepharose Fast Flow 对 DNA 酶解液进行离子交换层析时的洗脱曲线

Fig 1 Elution curve of utilizing DEAE Sepharose Fast Flow to purify enzyme digest of DNA

峰 1: 上样流出液; 峰 2: 0.025 mol/L NaCl 洗脱液前一峰 (5'-混合脱氧单核苷酸峰); 峰 3: 0.025 mol/L NaCl 洗脱液后一峰; 峰 4: 1.5 mol/L NaCl 洗脱液

Peak 1: effluent in loading Peak 2: the previous eluate of 0.025 mol/L NaCl Peak 3: the later eluate of 0.025 mol/L NaCl Peak 4: eluate of 1.5 mol/L NaCl

因此, 利用层析凝胶 DEAE Sepharose Fast Flow 对 DNA 酶解液直接一步离子交换层析就可以得到纯度大于 98% 的 5'-混合脱氧单核苷酸。

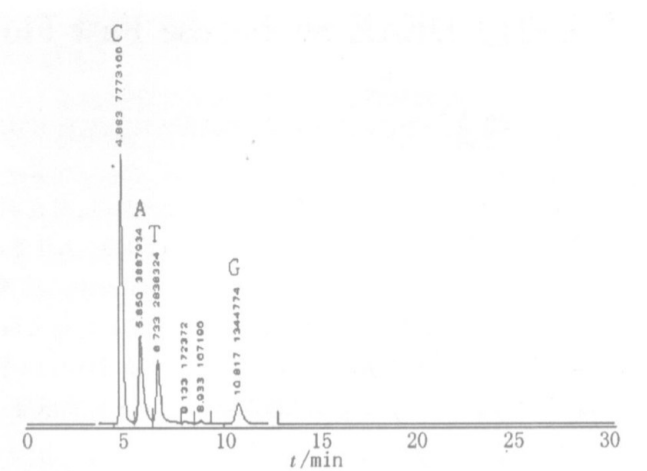


图 2 5'-混合脱氧单核苷酸峰的纯度分析 HPLC 图谱

Fig 2 The chromatogram of HPLC of 5'-Deoxymononucleotides C, A, T, G 分别代表 dCMP, dAMP, dTMP, dGMP

中国药典对 5'-混合脱氧单核苷酸的纯度要求是 70%, 而且对杂质成分没有做任何规定。临床应用时, 混杂的蛋白质成分有可能带来过敏反应等不良反应。如果能够建立一种高效的分离纯化方法, 提高产品的质量水平, 修订产品的质量水平标准, 对提高疗效减少不良反应有积极的意义。目前生产工艺和质量标准制订于 20 年前, 在这 20 年里生物分子的分离纯化技术已经有了很大的发展, 本研究就是在这样一个基础上, 利用新型层析凝胶 DEAE Sepharose Fast Flow, 一步法直接对 DNA 酶解液进行离子交换层析, 结果提示产品 5'-混合脱氧单核苷酸有提高质量水平的潜力。

3.2 讨论

3.2.1 最佳上样量的选择 层析凝胶 DEAE Sepharose Fast Flow 具有一定的动态交换容量, 一旦超过此凝胶的动态交换容量, 凝胶对于样品的吸附以及随后的洗脱的结果会失去原有的良好特性。为此, 在上样液 pH 及上样流速一定的情况下, 考察不同上样量对 5'-脱氧单核苷酸上柱率、收率及纯度的影响。见表 1。

表 1 上样量对上柱率、收率和纯度的影响

Tab 1 Influence of loading capacity of sample on purity, recovery rate and binding rate

上柱量 / (mg/mL · gel)	上柱率 %	收率 %	纯度 %
1.03	100	94.00	98.56
1.21	100	93.43	98.53
2.25	100	93.23	98.43
2.43	100	92.31	98.26
5.00	100	92.25	98.47
5.07	100	92.85	98.38
5.07	100	92.79	98.11
7.41	100	91.42	98.26
8.06	67.58	61.95	74.11
9.60	49.00	44.86	47.53
10.13	40.97	38.64	40.90
15.67	33.65	30.21	53.36
16.31	31.00	28.74	73.79
19.90	20.11	17.93	54.00

由表 1 可知, 当上样量 ≤ 7.5 mg/mL · gel 左右, 5'-脱氧单核苷酸的上柱率、收率、纯度均保持在理想的水平; 一旦上

样量 > 7.5mg/mL·gel 5' 脱氧单核苷酸的上柱率和收率大大下降,洗脱液的纯度也出现下降。实验结果也发现,当上样量 > 7.5mg/mL·gel 时,上样流出液中 dCMP, dAMP, dIMP, dGMP 的含量急剧增加,大大超过了超载的上样量,导致上柱率和收率的急剧下降,而且,在随后的洗脱过程中,凝胶的洗脱特性也发生改变,较低离子强度的洗脱液即能洗脱在正常情况下不被洗脱的杂质,严重降低洗脱液的纯度。综合考虑凝胶利用率、上柱率、收率及洗脱液纯度,层析凝胶 DEAE Sepharose Fast Flow 的最佳上样量为 7.5mg/mL·gel。

3.2.2 最佳 pH 的选择 层析凝胶 DEAE Sepharose Fast Flow 在 Tris 为缓冲溶液的条件下, pH 工作范围在 8 到 9 之间,由于 pH 对 5' 脱氧单核苷酸的解离度有较大的影响,为此,在上样量和上柱流速一定的情况下,考察此 pH 范围内下层析凝胶吸附 5' 混合脱氧单核苷酸的最佳 pH,见表 2。

表 2 pH 对上柱率的影响

Table 2 Influence of pH of binding buffer on binding rate	
样品溶液 pH	上柱率 /%
8.0	90.18%
8.5	94.36%
9.0	100%

由表 2 可知,在 pH 8~9 之间,上柱率随着 pH 的升高而升高,这是由于脱氧单核苷酸带有磷酸基,在碱性环境下,磷酸基解离而带负电荷,随着 pH 的升高,磷酸基解离增加,5' 脱氧单核苷酸带负电荷量增加,与阴离子凝胶之间的结合力增强。因此,在此凝胶正常工作的 pH 范围内,利于样品吸附的最佳上样液 pH 为 9.0。

3.2.3 洗脱缓冲液中最佳 NaCl 浓度的选择 样品吸附于凝胶后,通过增加 NaCl 浓度以增强洗脱强度,从而对吸附于凝胶上的具有不同吸附强度的物质进行洗脱,为此考察了不同 NaCl 浓度对洗脱液纯度的影响,见图 3。

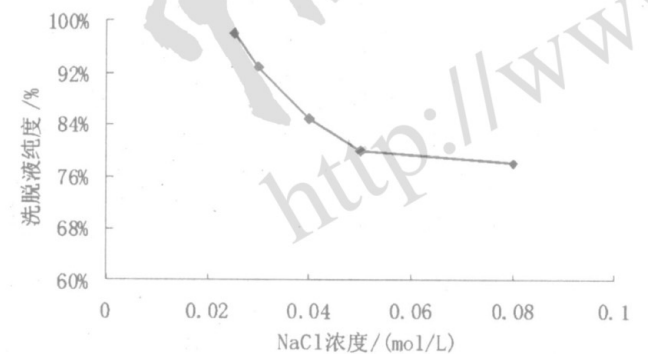


图 3 NaCl 浓度对洗脱液纯度的影响

Fig 3 Influence of the concentration of NaCl on the purity of eluate

由图 3 可知,洗脱液的纯度随着 NaCl 浓度的升高而下降。而实验过程发现,NaCl 浓度过低,洗脱强度不够,洗脱不完全,尤其是 dGMP 浪费严重,降低回收率。因此,选择洗脱缓冲液为 20 mmol/L Tris+ 0.025 mol/L NaCl (pH 9.0),在此 NaCl 浓度下,既可很好的洗脱 dCMP, dAMP, dIMP, dGMP,又可获得高纯度的洗脱液,从而保证洗脱液中混合脱氧单核苷

酸的收率和纯度均达到理想的水平。

3.2.4 最佳洗脱流速的选择 洗脱时,流速过快,洗脱峰之间会出现重叠交叉现象,造成 dGMP 和紧随其后的杂质不能分开的问题。但另一方面,流速过低,工艺过程时间太长,不适用于工业化生产的要求,而且柱内液体易出现纵向返混现象。在洗脱液 NaCl 浓度及 pH 一定的情况下,考察不同洗脱流速对洗脱液纯度的影响,结果见图 4。

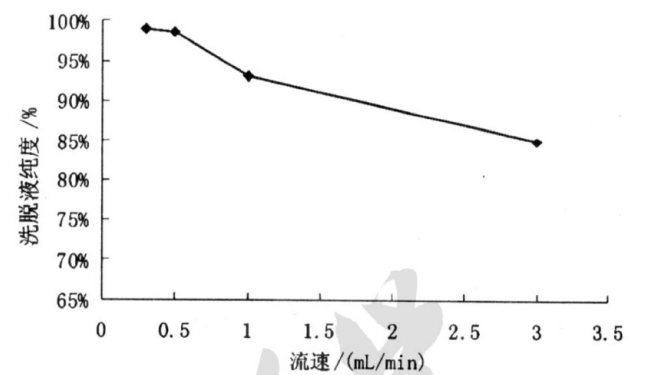


图 4 洗脱流速对洗脱液纯度的影响

Fig 4 Influence of flow-rate of eluent on purity of eluate

由图 4 可知,洗脱液纯度随着洗脱流速的升高而下降。在 0.5 mL/min 的洗脱流速下,洗脱液纯度为 98.65%,当流速从 0.5 下降到 0.3 mL/min 纯度略有提高,不过很有限,考虑到工艺过程时间,选择洗脱流速以 0.5 mL/min 为宜。

4 结论

利用层析凝胶 DEAE Sepharose Fast Flow 分离纯化 5' 混合脱氧单核苷酸的条件为:上样缓冲液为 20 mmol/L Tris, pH 9.0 上柱量 ≤ 7.5 mg/mL·gel 上柱流速 5 mL/min 洗脱缓冲液采用 20 mmol/L Tris+ 0.025 mol/L NaCl pH 9.0 洗脱流速 0.5 mL/min dCMP, dAMP, dIMP 的收率为 95% 以上, dGMP 的收率为 85% 以上,所获得的混合脱氧单核苷酸经高效液相色谱检测测谱纯达 98% 以上。

利用层析凝胶 DEAE Sepharose Fast Flow 对 DNA 酶解液直接一步离子交换层析就可以得到纯度大于 98% 的 5' 混合脱氧单核苷酸,此方法再现性好,回收率高;而且,此凝胶具有优良的物理化学稳定性和流动特性,耐高压加热灭菌,可在较高的流速下操作,柱上再生方便,易于放大生产,具有很好的工业应用前景。

参考文献

[1] WU X F. Curative effect of sodium deoxymononucleotide injection for leukopenia [J]. Theory and Practice of Chinese Medicine (中国医药理论与实践), 2002 (10): 1335

[2] ZHANG Y Y, ZHANG Y H. Observation on curative effect of sodium deoxymononucleotide for the mid and late malignant tumor [J]. J Qiqihar Med Coll (齐齐哈尔医学院学报), 2003 24 (5): 521

[3] LI L Z, LIM Y. Current Technology of Preparation of Biochemical Drug (最新生化药物制备技术) [M]. Beijing: Chinese Medical Scientific Press, 2001: 265

[4] WU H M, ZHANG Z F, LOU Y J et al. Separating and process-

- ing technique of 5'-Deoxymononucleotides from fish spermary of chub mackerel[J]. Journal of fisher of China(水产学报), 2000, 24(3): 275.
- [5] QIU W R, WANG W Y, SHAO Z H, *et al.* Isolation and purification of 5'-Deoxymononucleotides from enzyme digest of DNA by D293 ion exchange resin[J]. Pharm Ind(医药工业), 1986, 17(12): 531.
- [6] QIU Y M, JIANG L Y, XIA Z R, *et al.* Isolation and purification methods of Sodium Deoxymononucleotide from enzyme digest of DNA: China, 3116173.1[P]. 2004-10-13.
- [7] LI J W, YU R Y, YUAN M X, *et al.* Principle and method of biochemical experiment university Press, 1994: 270.
- [8] CHEN M F, HUANG H, KUANG P Y. HPLC Determination of Content of Sodium Deoxyribonucleotide and Its Preparation[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2003, 2003(23): 31.

收稿日期: 2005-10-28