科学通报 2008 年 第 53 卷 第 5 期: 614 ~ 616
快 讯
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

活性蛋白液相色谱快速分离新方法

柯从玉, 耿信笃*

西北大学现代分离科学研究所, 现代分离科学省级重点实验室, 教育部合成与天然功能分子化学重点实验室, 西安 710069
* 联系人, E-mail: xdgeng@nwu.edu.cn

2007-10-08 收稿, 2007-12-09 接受
国家自然科学基金(批准号: 20475042)资助项目

摘要 提出了用一根色谱柱来实现离子交换和疏水色谱快速分离整体蛋白的新方法. 在选择合适的固定相、流动相、缓冲液交换方法及二次进样的条件下, 在 1 h 内用同一根色谱柱完成了通常用两根色谱柱和在两种流动相条件才能实现的"二维色谱"分离, 并且能维持蛋白原有的三维和四维分子结构. 预计该法能用于未知样品中蛋白的快速预分离, 特别是为在蛋白组学研究中, 在样品来源极其有限的情况下, 进行活性蛋白预分离提供了一种新的解决思路.

关键词
蛋白质组学
蛋白预分离
二维液相色谱
疏水相互作用色谱
离子交换色谱

蛋白质组学的早期研究是将未知功能蛋白降解为多肽后, 以基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)方法对肽原片段进行解析, 然后从活性肽片段中找出原功能蛋白并确定其蛋白的分子结构. 另一种是近来多为采用的方法, 即先找出功能蛋白, 再将其降解以寻找功能肽原段. 因后者勿需对非功能蛋白进行进一步降解及分析, 大大减少了工作量 [1]. 然而这种预分离必须保持蛋白固有的三维或四维分子结构不变, 要求必须在温和的色谱条件下对整体蛋白分子(intact protein molecules)进行尽可能快的预分离 [2,3], 以防止分离过程太长而使蛋白变性. 虽然二维电泳(2DE)或二维液相色谱(2DLC)及多维液相色谱(MDLC)可用于这种预分离, 但或因在分离过程中蛋白变性, 或因分离速度慢, 或因成本高等缺点, 使得该法目前仍为国内外蛋白质组学及色谱研究的热点之一 [3~6].

依其分子相互作用力的性质而论, 液相色谱(LC)有多种类型, 包括疏水色谱(HIC)、反相液相色谱(RPLC)、离子交换色谱(IEC)、尺寸排阻色谱(SEC)和亲和色谱(AFC). 前四者为通用型色谱, 原则上可用于所有蛋白的分离, 而AFC为专用型色谱, 一般不适合对未知样品中整体蛋白的"预分离", 因此只有前四者可供选择. 从分离度来衡量, SEC最差. 虽然RPLC是HPLC中分离度最高的, 文献报道的 2DLC分离, 在多数情况下RPLC是作为第二种色谱使用的 [3], 但在经RPLC分离后, 许多蛋白在强的疏水作用力条件下会失去其固有的分子立体结构或变性. 只有用HIC-IEC或IEC-HIC的 2DLC才会成为实现整体活性蛋白快速分离的最佳选择 [7].

通常的这种 2DLC是使用两种作用力性质完全不同的色谱柱, 通过一种接口转换, 再经样品缓冲液交换, 并在严格限制样品溶液体积等条件下进行分离的 [4], 整个过程耗时长. 如果有一种特殊的色谱固定相, 能同时具备HIC和IEC两种好的色谱分离功能, 就有可能用一根色谱柱来进行该特殊模式的 2DLC蛋白分离. Kennedy等 [8]和Melander等 [9]曾指出IEC具有HIC性质, 卫引茂等 [10]也发现HIC柱也同时具有IEC机理, 统称为混合保留机理, 或混合类色谱填料, 但多以一种功能为主, 另一种为辅的色谱填料, 如IEC带有HIC性质但仍称其为IEC色谱柱等, 也有如Pall Life Science 公司生产的MEP Hypercell AFC-IEC双机理柱等. 但迄今为止, 尚未发现其中的任何一种色谱柱可以分别用其以两种完全不同的功能对蛋白进行 2DLC分离以得到所要求的分离效果.

为实现此目的, 该特殊的色谱柱必须同时满足以下 3 个条件: (1) 该色谱柱单独作为 HIC 和 IEC 使用时各自都有很好的分离能力, 并且分离后所得到的整体蛋白能够维持其原有的三维或四维分子结构不变; (2) 通过交换合适流动相中强和弱洗脱液的顺序, 相同的流动相可以

分别用于这两种不同保留机理的色谱分离; (3) 方便二次进样和样品与流动相中不同缓冲液的交换. 本文探索了用一种新的具有疏水和弱阳离子交换色谱固定相(硅胶基质: 平均孔径 30 nm, 平均颗粒直径 7 μm)来实现这一目标的可能性.

本实验使用的色谱填料同时带有这两种基团, 因此在流动相中低盐浓度时它便是 IEC 柱, 而在高盐浓度时则变成了HIC柱. 图1为在该色谱柱上, 以改变流动相中硫酸铵浓度的方式, 在 1 h 内实现的 IEC 和 HIC 的 2DLC 标准蛋白分离图, 虚线为硫酸铵浓度梯度洗脱模式, 其浓度以右纵坐标表示. 整个色谱过程只需要进两次原样(图中分别用垂直箭头 I 和 II 表示)即可.

当蛋白以 IEC 模式在第一次进样分离后, 虽然在盐梯度洗脱条件下流动相中的盐浓度在不断升高, 但实际上硫酸铵浓度还是不到 0.50 mol/L, 仍小于通常要求的在 HIC 中弱洗脱液中硫酸铵的浓度为 3.0 mol/L, 因此即便在流动相中强(B)和弱(A)两种洗脱液互换后, 仍需至少 5 min 的柱平衡时间才能达到在第二次进样时色谱柱已被 3.0 mol/L 硫酸铵平衡的要求.

从图1看出, 在左边的IEC和右边的 HIC 两种分离模式下均显示出对这几种蛋白很好的分离效果, 的确实现了用同一根色谱柱, 用相同的洗脱液 A 和 B, 但只要求在梯度洗脱时以改变二者顺序的方式便能完成在通常情况下的2DLC分离. 这就为用一根色谱柱解析一个未知的混合蛋白或实际样品的2DLC分离模式奠定了理论上和方法学上的基础.

2DLC 的特点是将含有从第一维色谱未能达到分离的蛋白收集液再进样到第二维色谱中进行再分离. 图 2 表示在 IEC 模式下进样的 6 种混合蛋白的色谱分离图. 因α-淀粉酶和胰岛素(峰 1)为酸性蛋白, 肌红蛋白(峰 2)为中性蛋白, 在 IEC 模式下三者不保留或保留很弱, 从而随溶剂峰一起流出, 然后把含有该三种组分的全部收集液(约 4 mL) 分 7 次以累积模式进样到被 3.0 mol/L 硫酸铵平衡好的该色谱柱上, 从图 2 看出, 这两种酸性蛋白(6′, 7′)和中性蛋白 2′在 HIC 模式下达到了完全的分离. 因此, 如果样品来源有限, 便可以再进样到 HIC 中, 以得到该原样中所有蛋白的完全分离.

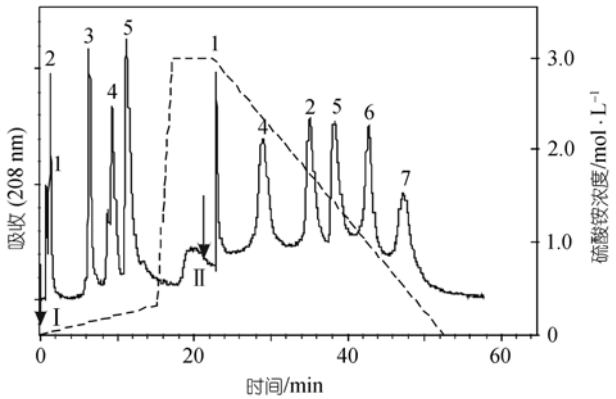

图 1　二次原样进样的 IEC-HIC 标准蛋白分离图

色谱柱: 50 mm × 4.6 mm I.D. (西安奥岚科技公司, 西安), 垂直箭头 I 和 II 分别表示两次进样. 流动相, A: 20 mmol/L KH_2PO_4 (pH=6.5), B: 3.0 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ + 20 mmol/L KH_2PO_4 (pH=6.5); 对于 IEC 模式, B 液中硫酸铵的浓度为 1.0 mol/L, 流速, 1 mL/min; 检测波长, 280 nm; 蛋白总量 0.35 mg: 1, 溶剂峰; 2, 肌红蛋白; 3, 核糖核酸酶; 4, 细胞色素-C; 5, 溶菌酶; 6, α-淀粉酶; 7, 胰岛素. 虚线表示硫酸铵梯度洗脱模式, 浓度以右纵坐标表示

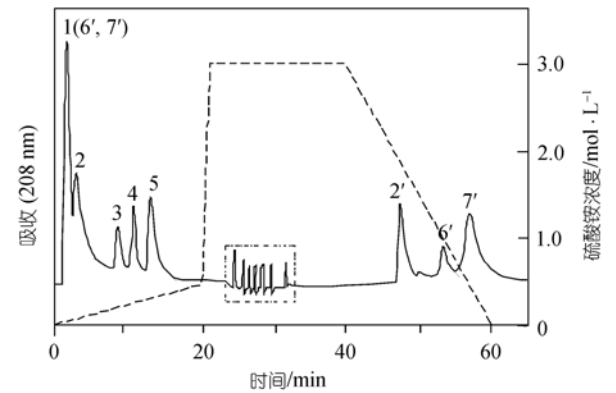

图 2　一次原样和收集馏分累积进样的 IEC-HIC 标准蛋白分离图

色谱条件: 除了对 IEC 收集的馏分通过 7 次累积进样到第二维色谱中, 以及非线性梯度洗脱模式不同外, 其他色谱条件同图 1. 总蛋白量 0.16 mg, 1, 溶剂峰+ α-淀粉酶 + 胰岛素; 2, 肌红蛋白; 3, 核糖核酸酶; 4, 细胞色素-C; 5, Lys 溶菌酶; 2′, 肌红蛋白; 6′, α-淀粉酶; 7′, 胰岛素. 梯度洗脱模式以虚线表示

这里存在一个色谱柱的二次平衡和样品缓冲液交换的难题. 在IEC模式下收集的馏分盐浓度较小(一般低于 1.0 mol/L), 如果收样体积较多又要求一次进样到 HIC 柱上, 便会发生样品直接穿透色谱柱的不利情况, 因此可采取如图2所示的累积进样, 或直接向该收集液中加入固体硫酸铵以增加收集液的盐浓度, 然后用泵连续进样到该色谱柱上, 以

便进行如上所述的2DLC分离. 为说明在二次进样的过程中由于从第一维收集的组分体积较大, 及用累积进样是否会造成峰形展宽而导致分离度减小和组分质量损失的问题, 在保证与图1和图2中的疏水模式梯度条件完全相同的情况下, 分别测定了其各自的分离度和蛋白质量回收率, 峰 2 和峰 6 的分离度由 2.51 降为 2.45, 而峰 6 与峰 7 则由 1.11 降为 1.09, 平均减小了 2.31%. 同时也测定了峰1和峰2的面积之和, 在扣除溶剂峰的面积后, 计算得到其蛋白质量回收率高达 96.7%. 该结果说明有损失存在, 但影响甚微.

从上面的实验结果说明, 有可能用 IEC-HIC 模式, 或相反的 HIC-IEC 模式对蛋白进行 2DLC 分离, 也可用 HIC-IEC-IEC 的 MDLC 模式进行分离. 还可以 IEC-HIC(样品 1)-HIC-IEC(样品 2)…(IEC-HIC)$_n$(n为样品个数)模式对多个不同的样品进行分离. 虽然该色谱柱在单一 IEC 和 HIC 模式下的分离效果可能不如最好的一根 IEC 和 HIC 商品柱的效果好, 但用于蛋白组学中快速的蛋白预分离仍是相当满意的.

致谢 诚挚感谢西安奥岚科技有限公司赠送本研究所用的新型色谱柱.

参考文献

1 Roy I, Mondal K, Gupta M N. Leveraging protein purification strate-gies in proteomics. J Chromatogr B, 2007, 849: 32—42[doi]

2 Shi Y, Xiang R, Horvath C, et al. The role of liquid chromatography in proteomics. J Chromatogr A, 2004, 1053: 27—36

3 Hoffman S A, Joo W A, Echan L A, et al. Higher dimensional (Hi-D) separation strategies dramatically improve the potential for cancer biomarker detection in serum and plasma. J Chromatg, B, 2007, 849: 43—52[doi]

4 Stoll D R, Li X P, Wang X L, et al. Fast comprehensive two-dimensional liquid chromatography. J Chromatogr A, 2007, 1168: 3—43[doi]

5 王智聪, 张庆合, 李彤, 等. 二维液相色谱(SCX/RP)系统的构建及对珠蛋白水解产物的研究. 中国科学 B 辑: 化学, 2006, 36(1): 64—67

6 张养军, 蔡耘, 王京兰, 等. 蛋白质组学研究中的色谱分离技术. 色谱, 2003, 21: 20—26

7 Andrews J A B A. Is there a rational method to purify proteins? From expert systems to proteomis. J Mol Recognit, 2004, 17: 236—247[doi]

8 Kennedy L A, Kopaciewicz W, Regnier F E. Multimodal liquid chromatography columns for the separation of proteins in either the anion-exchange or hydrophobic-interaction mode. J Chromatogr A, 1986, 359: 73—84[doi]

9 Melander W R, Rassi Z E, Horvath C. Interplay of hydrophobic and electrostatic interactions in biopolymer chromatography: Effect of salts on the retention of proteins. J Chromatogr, 1989, 469: 3—27[doi]

10 Wei Y M, Luo Q Z, Liu T, et al. Retention model of protein for mixed-mode interaction mechanism in ion exchange and hydrophobic interaction chromatography. Chin J Chem, 2000, 18: 60—65