



应用毛细管区带电泳分离分析蛋白质及多肽

方晓红 朱 涛 孙亦梁*

(北京大学化学系, 100871)

生命科学研究的迅速发展对生物大分子的分离分析提出了更高的要求,促使人们不断研究和开发新型的高效、快速、选择性好的分离分析方法。传统的电泳技术是目前生物化学及分子生物学实验室中常用的分离分析和制备手段,但它周期长,操作繁琐,难以定量和自动化。高效液相色谱法在分析蛋白质、多肽及核酸等生物大分子时,因样品组分扩散系数小,传质阻力加大而分离效率较低。

高效毛细管电泳(HPCE),是近十年特别是近三、四年来迅速发展起来的一项新型分离分析技术。它将电泳方法与色谱技术相结合^[1],具有高效、快速、分析所需样品量少、易自动化等优越性,在分析化学各领域都显示了其应用潜力,并且由于它的理论分离柱效与样品组分扩散系数成反比^[2],使它尤其适合于生物大分子的分析。目前应用高效毛细管电泳分离分析蛋白质、多肽及核酸等生物大分子的研究十分活跃。

已有一些综述总结了 HPCE 在生物样品(蛋白质、肽、氨基酸、核酸组分等)分析中的应用^[3-6]。本文只讨论目前应用最为普遍的毛细管区带电泳(CZE)在蛋白质、多肽分析中的进展和仍然需要解决的一些问题。

一、CZE 分离蛋白质、多肽的理论研究

蛋白质、多肽是多价态、多官能团、带电荷的生物大分子,其形状、大小、电荷数是影响分离的主要内在因素。分离体系中缓冲液种类及其浓度、离子强度、pH 值及各种添加剂都可能对蛋白质、多肽分子上各种官能团产生不同的影响,从而影响其分离过程^[3]。

McManigill 等^[7]对影响蛋白质分离的主要因素进行了总结,Grossman 等^[8]仔细研究了 CZE 中缓冲液 pH 值及肽组成对分离效率和分离度的影响,并认为 pH 值是影响分离选择性的主要因素。

Nyberg^[9]证明对于小肽,其电泳相对迁移时间

与 $M^{2/3}/Z$ (M 是分子量, Z 是电荷数)成正比,这一结论对某些多肽也成立^[10],Grossman^[11]研究了 40 多种肽在 CZE 中的迁移行为,提出 CZE 中肽迁移率 u 的经验公式:

$$u = 5.23 \cdot 10^{-4} \cdot \ln(q + 1)/n^{0.43} + 2.47 \cdot 10^{-5}$$

n 是氨基酸残基数, q 是净电荷数。

Deyl^[10]发现许多蛋白质的 CZE 相对保留时间与其等电点(pI)值之间有近似的线性关系。Compton^[12,13]运用 Debye-Hückel-Henry 理论,提出蛋白质迁移率 u 的半经验公式:

$$u = K(1) \cdot Z_c [K(2) \cdot M^{1/3} + K(3) \cdot I^{1/2} \cdot M^{2/3}]$$

其中 $K(1)$, $K(2)$, $K(3)$ 分别是与蛋白质分子大小,形状及介质的性质有关的常数,并进一步研究了蛋白质计算价态(Z_c)与实际价态(Z_a)关系,认为其比值为蛋白质分子量、电荷数及溶液离子强度 I 的函数,Mosher^[14]则建立了一个蛋白质电泳行为的数学模型,用计算机进行模拟处理。

目前,对于蛋白质、多肽 CZE 分离的理论研究还不成熟,大多为经验或半经验法。

二、CZE 分离蛋白质、多肽应解决的技术问题

(一) 吸附问题

从理论上预测,CZE 对蛋白质等大分子分离效率很高($N:10^6$ 以上),但在实际分析中却难以实现,这主要是由于蛋白质等大分子易吸附于毛细管内壁,不仅造成峰对称性差,大大降低了分离柱效,而且由于吸附改变了毛细管内壁表面结构,使出峰时间和出峰面积都不重现,难以准确地定性和定量。吸附是蛋白质、多肽分离中遇到的严重问题。

Lauer 等^[15]提出蛋白质与毛细管内壁间的非特异性吸附主要来源于毛细管内壁硅羟基离解形成的带负电的吸附点与蛋白质、多肽分子中带正电的官能团之间的静电引力。

许多研究工作正致力于解决吸附问题,其解决途径可分为如下三类:

1. 调节缓冲液 pH 值 采用极端 pH 值的缓冲体系,或是在低 pH 值下($\text{pH} < 3$),抑制硅羟基离解^[16],或是使 pH 值高于所分离的蛋白质的等电点^[15,17],都能减小吸附,如 Lee 等^[17]采用高 pH 值的硼酸盐缓冲体系分离蛋白质,并指出在每次分析间隔中用 1mol/L 的 NaOH 清洗毛细管可提高分离的重现性。由于蛋白质等大分子的多样性,仅调节 pH 值只能解决部分吸附问题,而且限制 pH 的使用范围会限制分析方法的选择性,过高或过低的 pH 值还可能引起蛋白质的变性。

2. 毛细管内壁处理 Jorgenson 等^[18]在早期的 CZE 研究中,借鉴了色谱柱内壁处理法来解决蛋白质的吸附问题,目前已有多种内壁处理方法出现,主要有:(1)直接涂渍法,将涂渍物直接涂在毛细管表面,如两亲化合物涂层^[19,20];或再加入交联剂实现涂渍分子间的交联聚合,提高涂层的稳定性,如甲基纤维素^[21]、聚乙烯亚胺(PEI)^[22]、聚谷氨酸甲酯^[23]涂层。(2)毛细管内壁硅烷化,通过双官能团交联剂,将涂渍物键合到毛细管内壁上,如聚丙烯酰胺^[21,24]、聚乙烯吡咯烷酮^[16]、丙基甘油醚基-甘油^[16]、乙二醇^[18,25]、聚乙二醇(PEG)^[26,27]、麦芽糖^[25]、五氟苯(AFP)^[28]、 α -乳清蛋白^[29]等涂层,此外还有先在毛细管内壁键合上十八烷基硅烷,再涂一层 Tween 或 Brij 系列的非离子表面活性剂^[30]的方法。

大多数涂渍毛细管只能在酸性条件下使用,能适用较宽 pH 使用范围的涂渍方法有 Regnier 等的 PEI 涂层^[22](pH 2—12)及非离子表面活性剂涂层(pH 4—11)^[30]。Novotny^[24]采用改进的聚丙烯酰胺聚合方法,以 $\text{CH}_2=\text{CHMgBr}$ 为偶联剂,通过 Grignard 反应,用 Si—C 键涂层代替 Si—O—Si—C 键合涂层,提高了其稳定性,也扩大 pH 使用范围(pH 2—10.5)。

对于等电点(pI)高的碱性蛋白质,利用可使内壁电荷反号的涂层^[19,22,31],获得了较好的分离效果。

虽然内壁处理法的研究十分活跃,并已有商品化的 HPCE 涂渍毛细管出售,但这种方法也存在局限性:涂层在掩盖吸附点的同时,可能使电渗流大大减小甚至完全消失,这样就限制了所能分离的样品组分的范围,也增加了分析时间;涂渍毛细管寿命较短,硅烷化涂层一般在碱性条件下不稳定;难以使一系列同样方法处理的毛细管得到相同的分析结果。

3. 缓冲液中加入添加剂 Jorgenson 等^[32]发现使用高离子强度的缓冲液能减小蛋白质的吸附,他们^[33]在缓冲液中加入各种碱金属盐进行比较,结果以 K_2SO_4 (0.25mol/L)效果最好。Stover^[34]等也用类

似的方法改善了组氨酸化合物等的分离。然而高离子强度缓冲液也带来一些限制:为了避免产生过量的焦耳热,只能使用较低的分析电压,延长了分析时间,降低了分离柱效;或只能选用内径较细的毛细管,提高了对检测器灵敏度的要求。

Bushey 等^[35]提出使用两性离子添加剂不仅能减小蛋白质与毛细管壁及蛋白质分子之间的相互作用,而且不增加溶液的导电性,对电渗流影响小,为优化蛋白质分离提供了较大的选择范围。他们用含 2mol/L 三甲基甘氨酸内盐及 0.1mol/L K_2SO_4 的缓冲液取得了很好的效果。Waters 公司研制了带季胺基及磺酸基的两性离子^[36]。这些两性离子适用 pH 范围广且 UV 吸收低,用 1mol/L 的两性离子即可有效地减小溶菌酶的吸附。此外还有报道用两性离子(Z60)结合壁涂渍方法分离蛋白质^[37]。目前理想的两性离子种类少且价格较贵。

其它的添加剂还有:用乙二醇改善乳清蛋白等的分离^[38],尿素变性试剂分离膜蛋白^[39],氟化阳离子表面活性剂分离碱性蛋白质^[40]等。

以上各种解决吸附的方法各有利弊,蛋白质、多肽等大分子的多样性使单一的方法不能完全胜任分离需要,吸附问题的彻底解决仍需大量的研究工作。

(二)检测问题

除吸附之外,蛋白质、多肽分析所面临的另一个问题是缺乏灵敏的检测器,常用的检测方法是在 200nm 附近的柱上 UV 吸收法,其灵敏度与光程成正比。尽管已有一些工作对 HPCE 的 UV 检测器进行了改进^[41—43],HPCE 使用内径细小的毛细管仍然限制了 UV 检测的灵敏度。

采用高灵敏度的荧光检测法,对于氨基酸、小肽的衍生化荧光分析法已取得了成功,但对蛋白质、多肽等多官能团结构的组分进行衍生时,则可能使一种组分产生多个荧光标记产物,经 CZE 分离后出现多个峰^[44,45]。为此已有为 CZE 专门设计的柱后反应器出现^[45,46],但柱后反应器往往造成区带扩展,影响分离效率,也有的研究采用柱上衍生^[44]或间接荧光法^[47]。

三、CZE 分离分析蛋白质、多肽的实际应用

虽然蛋白质、多肽的 CZE 分离分析还存在着上述技术上的问题,但仍在应用上取得了一些可喜的成果。目前 CZE 的实际应用主要包括以下几个方面:

(一)蛋白质、多肽的分离及纯度鉴定

CZE 高效、快速、简便的特点使其在蛋白质、多肽分离及纯度鉴定方面应用日益普遍,尤其是生物技术和基因工程中大量生物合成的蛋白质、多肽能

用 CZE 进行有效的分离分析,以确定产品的纯度、均一性及生产过程的可靠性。人们已用 CZE 分析了生物合成的人胰岛素^[48]、生长素^[48-51]、糖蛋白^[6,20,51,52]、红细胞生成素^[53]、组蛋白^[54]及其它一些生物合成酶、多肽^[55-60]。

在蛋白质、多肽的氨基酸顺序测定时,其酶解或化学降解后形成的肽段一般需经 RP-HPLC 分离后再进入氨基酸自动分析仪进行序列测定,用 CZE 可快速扫描 RP-HPLC 分离后的肽段是否为纯肽^[6,61],既节省时间和费用,消耗样品量又少。Aeberold^[61]设计了一种柱上电泳富集方法,使 CZE 适用于分析 RP-HPLC 分离后稀浓度的肽段,认为 CZE 是鉴定 HPLC 收集的毫克级以下肽段纯度最有效的方法。

(二)蛋白质、多肽的结构分析

用 CZE 分离蛋白质、多肽降解产物,得到的“指纹图谱”可提供蛋白质、多肽的结构信息^[48-50,62-65],与 RP-HPLC 相比,CZE 分离选择性有所不同,并能大大减少分析时间^[50]。

CZE 与 MS(质谱)联用为蛋白质结构测定提供了更有力的手段,采用 CE-FAB(快原子轰击离子源)-MS^[66-68]或 CE-ESI(电喷雾离子源)-MS^[69-70]及其它接口(如 CE-API(大气压离子源)-MS)方式^[71]可得到样品或消化产物图中蛋白质的质量和特征信息,采用 CE-MS-MS 可进一步确定组分的结构。

3. 监测蛋白质、多肽的反应过程及结构变化

利用 CZE 快速分析的特点,可用 CZE 监测肽链内二硫键的还原^[6]、蛋白质酶解过程^[72]、酶标记单克隆抗体结合反应^[73]、测定酶活性及酶动力学研究^[57,65]、控制乙肝疫苗的纯化步骤^[74]等蛋白质、多肽反应变化过程。

此外,CZE 还用于免疫、临床、医学等研究中^[6,75-77],如 Gurley 等^[76]利用 CZE 研究由于吸入全氟异丁烯(PFIB)而引起肺部病变的机理,他们把吸入一定量 PFIB 的老鼠杀死后,用生理盐水灌洗其支气管肺泡,将洗出的肺泡内衬液中的蛋白质沉淀下来,做蛋白质的 CZE 分析图,发现其蛋白质(主要是白蛋白、铁转移蛋白和 IgG)的含量比正常的老鼠高,认为 PFIB 引起肺水肿时,使肺部血管中的蛋白质转移到肺泡中。

四、结 语

应用 CZE 分离蛋白质,多肽具有其独特的优越性,但它也存在着峰容量小,难以大量制备等不足,并不能完全取代其它分析方法,但至少是一项有效的补充手段。目前,CZE 在生物大分子领域的分析还

处于起步阶段,随着其研究和应用的深入,CZE 将有望在蛋白质、多肽等生物分子的实际分析中发挥更重要的作用,其应用前景十分广阔。

参 考 文 献

- [1] 陈义,分析仪器,4,40(1991).
- [2] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.*, 53, 1298 (1991).
- [3] M. V. Novotny, K. A. Cobb, J. -P. Liu, *Electrophoresis*, 11, 735(1990).
- [4] B. L. Karger, A. S. Cohen, A. Guttman, *J. Chromatogr.*, 492, 585(1989).
- [5] Z. Deyl, R. Struzinsky, *J. Chromatogr.*, 569, 63(1991).
- [6] P. D. Grossman, J. C. Colburn, H. H. Lauer et al., *Anal. Chem.*, 61, 1186(1989).
- [7] D. McManigill, S. A. Swedberg, "Tech. Protein Chem.", Academic, San Diego, CA, P. 468, 1989.
- [8] P. D. Grossman, K. J. Wilson, G. Petrie, H. H. Lauer, *Anal. Biochem.*, 173, 265(1988).
- [9] F. Nyberg, M. D. Zhu, J. L. Liao, S. Hjerten, in "Electrophoresis '88", C. Shaefer-Nielsen (Editor), VCH Publishers, New York, P. 141, 1988.
- [10] Z. Deyl, V. Rohlicek, R. Struzinsky, *J. Liq. Chromatogr.*, 12, 2515(1989).
- [11] P. D. Grossman, J. C. Colburn, H. H. Lauer. *Anal. Biochem.*, 179, 28(1989).
- [12] B. J. Compton, *J. Chromatogr.*, 559, 357(1991).
- [13] B. J. Compton et al., *Anal. Chem.*, 63, 2597(1991).
- [14] R. A. Mosher, D. Dewey, W. Thormann et al., *Anal. Chem.*, 61, 362(1989).
- [15] H. H. Lauer, D. McManigill, *Anal. Chem.*, 58, 166(1986).
- [16] R. M. McCormick, *Anal. Chem.*, 60, 2322(1988).
- [17] K. -J. Lee, G. S. Heo, *J. Chromatogr.*, 559, 317 (1991).
- [18] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Science*, 222, 266 (1983).
- [19] J. E. Wiktorowicz, J. C. Colburn, *Electrophoresis*, 11, 769(1990).
- [20] K. Tsuji, R. J. Little, *J. Chromatogr.*, 594, 317(1992).
- [21] S. Hjerten, *J. Chromatogr.*, 347, 191(1985).
- [22] J. K. Towns, F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, 516, 69 (1990).
- [23] D. Bentrop, J. Kohr, H. Engelhardt, *Chromatographia*, 32, 171(1991).
- [24] K. A. Cobb, V. Dolnik, M. Novotny, *Anal. Chem.*, 62, 2478(1990).
- [25] G. J. M. Bruin, R. Huisden, J. C. Kraak, H. Poppe, J.

- Chromatogr. ,480,339(1989).
- [26] G. J. M. Bruin, J. P. Chang, R. H. Kuhlman et al. , J. Chromatogr. ,471,429(1989).
- [27] W. Nashabeh, Z. E. Rassi, J. Chromatogr. ,559,367(1991).
- [28] S. A. Swedberg. Anal. ,Biochem. ,185,51(1990).
- [29] Y. -F. Maa, K. J. Hyv r, S. A. Swedberg, HRC 14,65(1991).
- [30] J. K. Towns et al. , Anal. Chem. ,63,1126(1991).
- [31] R. L. Cunico, V. Gruhn, L. Kresin et al. , J. Chromatogr. ,559,467(1991).
- [32] Y. Walbroehl et al. , J. Microcol. Sep. ,1,41(1989).
- [33] J. S. Green et al. , J. Chromatogr. ,478,63(1989).
- [34] F. S. Stover, B. L. Haymore, R. J. McBeath, J. Chromatogr. ,470,241(1989).
- [35] M. M. Bushey, J. W. Jorgenson. , J. Chromatogr. ,480,301(1989).
- [36] M. Merion, B. Bell-Alden, E. Grover, U. Neue, J. Peterson, HPCE' 91, Poster, No, PT-69, San Diego, CA, 1991.
- [37] M. -D. Zhu, R. Rodriguez, D. Hansen, T. Wehr, J. Chromatogr. ,516,123(1990).
- [38] M. J. Gordon, K. -J. Lee, A. A. Arias, R. N. Zare, Anal. Chem. ,63,69(1991).
- [39] D. Josic, K. Zeilinger, W. Reutter et al. , J. Chromatogr. ,516,89(1990).
- [40] A. Emmer, M. Jansson, J. Roeraade, J. Chromatogr. ,547,544(1991).
- [41] S. E. Moring, J. C. Colburn, P. D. Grossman, H. H. Lauer, LC-GC, 8,34(1990).
- [42] Y. Walbroehl, J. W. Jorgenson, J. Chromatogr. ,315,135(1984).
- [43] J. S. Green, J. W. Jorgenson, J. Liq. Chromatogr. ,12,2527(1989).
- [44] D. F. Swaile, M. J. Sepaniak, J. Liq. Chromatogr. ,14,869(1991).
- [45] B. Nickerson, J. W. Jorgenson, J. Chromatogr. ,480,157(1989).
- [46] T. Tsuda, Y. Kobayashi, A. Hori et al. , J. Chromatogr. ,456,375(1988).
- [47] W. G. Kuhr, E. S. Yeung. , Anal. Chem. ,60,2642(1988).
- [48] J. Frenz, S. -L. Wu, W. S. Hancock , J. Chromatogr. ,480,379(1989).
- [49] R. G. Nielsen, G. S. Sittampalam, E. C. Rickard, Anal. Biochem. ,177,20(1989).
- [50] R. G. Nielsen, R. M. Riggan, E. C. Rickard, J. Chromatogr. ,480,393(1989).
- [51] S. -L. Wu, G. Jeshima, J. Cacia, W. S. Hancock, J. Chromatogr. ,516,115(1990).
- [52] K. W. Yim, J. Chromatogr. ,559,401(1991).
- [53] A. D. Tran, S. Park, P. J. Lisi et al. , J. Chromatogr. ,542,459(1991).
- [54] L. R. Gurley, J. E. London, J. G. Valdez, J. Chromatogr. ,559,431(1991).
- [55] E. Wenisch, C. Tauer, A. Jungbauer et al. , J. Chromatogr. ,516,133(1990).
- [56] A. Vinther, S. E. Bj rn, H. H. S rensen, H. S berg, J. Chromatogr. ,516,175(1990).
- [57] N. Banke, K. Hansen, I. Diers, J. Chromatogr. ,559,325(1991).
- [58] J. R. Florance, Z. D. Konteatis, M. J. Macielag et al. , J. Chromatogr. ,559,391(1991).
- [59] A. Pessi, E. Bianchi, L. Chiappinelli et al. , J. Chromatogr. ,557,307(1991).
- [60] H. Ludi, E. Gassmann, H. Grossenbacher, W. Marki. Anal. Chim. Acta, 213,215(1988).
- [61] R. Aebersold, H. D. Morrison, J. Chromatogr. ,516,79(1990).
- [62] W. Nashabeh et al. , J. Chromatogr. ,536,31(1991).
- [63] T. E. Wheat, P. M. Young, N. E. Astephen, J. Liq. Chromatogr. ,14,987(1991).
- [64] M. Castagnola, L. Cassiano, R. Rabino, D. V. Rossetti, J. Chromatogr. ,572,51(1991).
- [65] R. J. Krueger, T. R. Hobbs, K. A. Mihal et al. , J. Chromatogr. ,543,451(1991).
- [66] M. A. Moseley, L. J. Deterding, K. B. Tomer, J. W. Jorgenson, J. Chromatogr. ,480,197(1989).
- [67] R. M. Caprioli, W. T. Moore, M. Martin et al. , J. Chromatogr. ,480,247(1989).
- [68] N. J. Reinhold, E. Schroder, U. R. Tjaden et al. , J. Chromatogr. ,516,147(1990).
- [69] R. D. Smith, J. A. Loo, C. J. Barinaga et al. , J. Chromatogr. ,480,211(1989).
- [70] J. B. Fenn, M. Mann, C. -K. Meng et al. , Science, 246,64(1989).
- [71] I. M. Johansson, E. C. Huang, J. D. Henion, J. Zweigenbaum, J. Chromatogr. ,554,311(1991).
- [72] F. Kilar, S. Hjerten, J. Chromatogr. ,480,351(1989).
- [73] S. J. Harrington, R. Varro, T. M. Li, J. Chromatogr. ,559,385(1991).
- [74] W. M. Hurni, et al. , J. Chromatogr. ,559,337(1991).
- [75] R. G. Nielsen, E. C. Rickard, P. F. Santa et al. , J. Chromatogr. ,539,177(1991).
- [76] L. R. Gurley, J. S. Buchanan, J. E. London et al. , J. Chromatogr. ,559,411(1991).
- [77] A. Saria, J. Chromatogr. ,573,219(1992).