

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞!

用 *N,N*-二甲基六烷基溴化铵涂层的毛细管对重组促红细胞生长素及其酶解产物进行毛细管电泳和毛细管电泳-电喷雾质谱分析

于 冰, 丛海林, 刘虎威, 李元宗, 刘 锋

(北京大学化学与分子工程学院 生物有机与分子工程教育部重点实验室, 北京 100871)

摘要: 采用毛细管电泳技术研究了重组促红细胞生长素(rhEPO)的分离问题。用 *N,N*-二甲基六烷基溴化铵(6- β -ionene)涂层的毛细管测定了 rhEPO 中唾液酸的微多相性,同时采用毛细管电泳-质谱(CE-MS)联用技术在 22 min 内鉴定了 rhEPO 20 段胰酶消化肽中的 11 段。该方法简单快捷,重现性好,可用于蛋白质一级结构的测定。

关键词: 毛细管电泳; 毛细管电泳-质谱联用; *N,N*-二甲基六烷基溴化铵涂层; 重组促红细胞生长素; 酶解产物; 微多相性; 肽图

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2005)05-0487-05

Analysis of Recombinant Erythropoietin and Its Tryptic Digest by Capillary Electrophoresis and Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Using Capillary Coated with 6- β -Ionene

YU Bing, CONG Hailin, LIU Huwei, LI Yuanzong, LIU Feng

(The Key Lab of Bioorganic Chemistry and Molecular Engineering of Ministry of Education, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: The microheterogeneity of recombinant human erythropoietin (rhEPO) was analyzed by capillary electrophoresis (CE) using a capillary coated with 6- β -ionene. The applicability of a volatile electrolyte for fast analysis of tryptic fragments of rhEPO with online CE-electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) was investigated, resulting in a reproducible separation of eleven rhEPO tryptic fragments within 22 min under the following conditions: running buffer 300 mmol/L acetic acid-ammonium acetate (HAc-NH₄Ac), pH 4.80, separation voltage -15 kV and capillary temperature 25 °C. The proposed method is rapid and effective, and can be used for the structural analysis of related proteins.

Key words: capillary electrophoresis; capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization-mass spectrometry; 6- β -ionene coating; recombinant human erythropoietin; tryptic digest; microheterogeneity; tryptic mapping

人促红细胞生长素(uEPO)是一种唾液酸化的糖蛋白,作为一种主要由人肾脏细胞分泌的荷尔蒙,对于调控红血球的形成和生长具有重要的作用^[1]。随着生物工程和基因技术的发展,已经实现了利用动物细胞(如仓鼠卵巢细胞)构筑基因重组生产线来制备重组促红细胞生长素(rhEPO)。由于基因重组和天然内源性的促红细胞生长素的生物学活性基本相同,而且理化性质也十分相近,因而被广泛用于治疗贫血等疾病^[2-4]。然而,一些运动员为了提

高自行车、长跑等耐力项目的比赛成绩,利用rhEPO的某些药用性能而将rhEPO作为兴奋剂使用^[5-7]。

医学和生物学方面的研究表明:促红细胞生长素(EPO)是高度糖基化的糖蛋白,唾液酸存在于糖链的末端,EPO分子中糖基化程度,特别是唾液酸含量的多少对其体内生物学活性高低起决定性的作用^[8]。而其中糖基化链的含量、结构、尺寸、唾液酸化程度的差异使得EPO具有微多相性,这种微多相性的存在为EPO的分离和检测提供了重要依据^[9]。

收稿日期 2005-05-08

作者简介:于冰,女,博士研究生,Tel (010)62754976,E-mail:yubing@pku.edu.cn.

通讯联系人:刘虎威,男,教授,博士生导师,Tel (010)62754976,Fax (010)62751708,E-mail:hwliu@pku.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金重点项目(No. 20335010).

随着仪器科学的发展,采用现代化的仪器分析手段分析 EPO 越来越受到生物医药界和兴奋剂检测界的关注^[10]。关于 rhEPO 的毛细管电泳分离检测,已有一些文献^[11-13]报道,其中采用未涂层毛细管大多需要较长的平衡时间^[14],并且因为 rhEPO 在毛细管壁的吸附问题而导致分辨率降低,结果的重现性差;而采用涂层毛细管,例如腐胺动态涂层柱,虽然可实现基线分离,但检测时间长,并且因为所用缓冲溶液体系中尿素含量过高而无法采用质谱联用技术^[15]。本文采用毛细管电泳法(CE),用自制的 *N,N*-二甲基六烷基溴化铵(6,6-ionene)涂层毛细管测定了影响 rhEPO 体内活性的唾液酸的微多相性,并且采用毛细管电泳-电喷雾质谱联用技术(CE-ESI-MS)分析了 rhEPO 的胰蛋白酶消解肽图。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

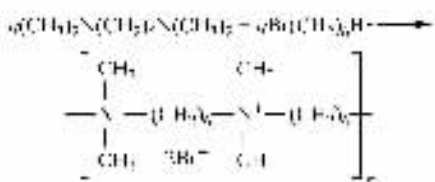
Agilent HP^{3D} CE, Agilent Trap-XCT 离子阱质谱仪,采用电喷雾离子源,配有 CE-ESI-MS 接口,以及相应的毛细管电泳-质谱工作站。

醋酸(HAc)、氨水、二甲基甲酰胺(DMF)、乙二醇和氢氧化钠(NaOH)均为分析纯,购于北京化学试剂厂;乙腈(MeCN)为色谱纯,购于 Fisher 公司;醋酸铵(NH₄AC, 99.995%)、1,6-二溴己烷(分析纯)和胰蛋白酶均购于 Aldrich 公司。四甲基己二胺为分析纯,购于 Acros 公司。实验室用水全部采用经 Aquapro 纯化系统(重庆艾科普仪器公司)重新纯化过的去离子水(电阻率大于 18 MΩ·cm)。rhEPO 购于宝依朴生化公司,质量浓度为 1.5 g/L,纯度大于 98.5%。未涂层的弹性石英毛细管由河北永年锐沓色谱器件公司提供。

1.2 聚阳离子 6,6-ionene 的合成

本实验所用毛细管涂层 6,6-ionene 是通过 DMF-H₂O 混合溶剂中四甲基己二胺和 1,6-二溴己烷的连续 Menshutkin 反应制备的^[16,17]。具体条件是:DMF-H₂O(体积比为 80:20)的混合溶剂中加入等物质的量的四甲基己二胺和 1,6-二溴己烷,浓度为 1.3 mol/L,于 50 °C 下反应 48 h,以丙酮为沉淀剂将聚合物沉淀出来。用丙酮洗 3 次,真空干燥,产率约 85%。

6,6-ionene 的聚合反应式为:



所合成的 6,6-ionene 的重均分子量(M_w)由凝胶渗透色谱(GPC, Waters 208)测定,结果约为 1.9×10^4 g/mol。

1.3 rhEPO 的胰酶消化

将 2 mg 胰蛋白酶溶于 50 mL 水中,然后移取 100 μL 注入 0.1 mL 质量浓度为 1.5 g/L 的 rhEPO 样品中,于 37 °C 条件下恒温消解 20 h 后,再注入 100 μL 上述胰蛋白酶溶液,恒温消解 4 h 后,取出置于 -70 °C 冰箱中 1 h,中止反应,然后于 4 °C 条件下冷藏备用。

1.4 毛细管电泳操作条件

实验前,将未涂层的毛细管(57 cm × 50 μm i. d.,有效长度 48.5 cm)先用 1 mol/L NaOH 冲洗 30 min 后,再用水冲洗 30 min,然后用涂层液和分离缓冲溶液先后冲洗各 45 min,压力进样(3.35 kPa, 5 s)。分离电压 -10 kV,毛细管柱温 25 °C。涂层液由质量浓度为 50 g/L 的 6,6-ionene 和体积分数为 2% 的乙二醇组成。分离缓冲溶液为 300 mmol/L HAc-NH₄AC, pH 为 4.80。紫外检测波长 214 nm。

1.5 毛细管电泳-质谱联用条件

毛细管尺寸为 79 cm × 50 μm i. d.,紫外检测窗口开在距离入口端 21.5 cm 处,压力进样(5 kPa, 10 s),分离电压 -15 kV,毛细管柱温 25 °C。质谱分析采用负离子模式检测,毛细管电压 4.5 kV,碎裂电压 -40 V,质谱扫描范围 m/z 300 ~ 2200。雾化气(N₂)压力 68.95 kPa,流量 4 L/min,温度 325 °C。鞘液为含 5 mmol/L NH₄AC 的乙腈-水(体积比为 1:1)溶液,流速 10 μL/min。

2 结果与讨论

2.1 毛细管电泳分析 rhEPO 样品

为了减少 rhEPO 样品在裸露的毛细管壁上的吸附,按“1.2”节所述合成 6,6-ionene 作为涂层。6,6-ionene 作为一种聚电解质,在主链上含有大量的铵正离子,因而可以稳定地吸附在带负电的毛细管内壁上,形成永久涂层。这种带有正电荷的涂层会使电渗流(EOF)的方向发生反转从而指向正极,因而毛细管入口端为负极,出口端为正极^[18-20]。由于在 pH 值为 4.80 时, rhEPO 的各糖化体均带负电,并且所带的负电荷数随唾液酸化程度的增加而增加,故可根据唾液酸含量的多少,通过电泳加以分离^[21-23]。如图 1 所示,根据糖蛋白中唾液酸的微多相性,利用 6,6-ionene 涂层毛细管在 15 min 之内分离出了 rhEPO 的 7 个峰,它们均在 EOF 标志峰(图 1 中较大的负峰)之前通过检测窗口。

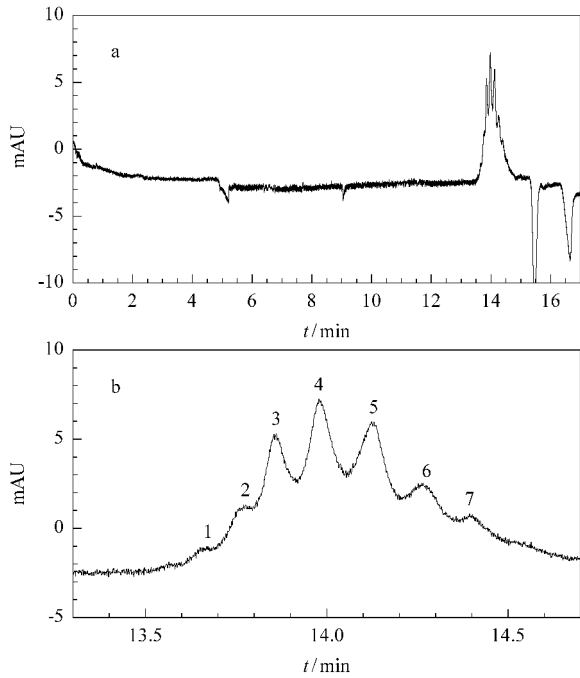


图 1 rhEPO 在 6 β -ionene 涂层的毛细管柱上的电泳分离图 (a) 及其局部放大图 (b)
Fig. 1 Capillary electropherogram of rhEPO glycoforms using a capillary permanently coated with 6 β -ionene (a) and its partial enlarged drawing (b)
UV detection wavelength : 214 nm.

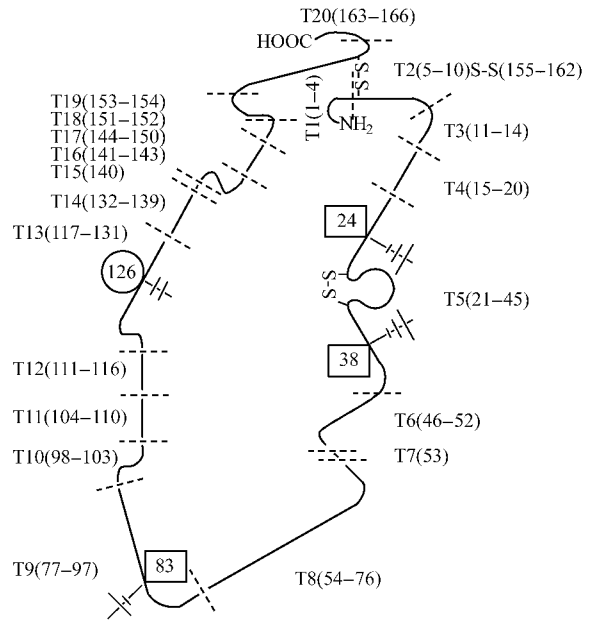


图 2 重组促红细胞生成素的预测结构
Fig. 2 Predicted structure of rhEPO

T1 - T20 are peptides generated by trypsin. The amino acid residue numbers are indicated in parentheses.

此外,利用同一根 6 β -ionene 涂层毛细管,连续 3 d 每天进样 6 次,测定 7 个峰的迁移时间的相对标准偏差 (RSD)。结果日内 RSD 均小于 0.2%, 日间 RSD 均小于 0.5%,说明该检测方法的重现性较好。与文献 [11 ~ 15] 方法相比,本文所采用的 6 β -ionene 涂层毛细管的方法,可以有效地减少 rhEPO 在毛细管壁上的吸附,因而具有检测时间短、重现性好的特点,并且因为使用了低盐含量的缓冲溶液,可以实现与质谱的联用。

2.2 rhEPO 的胰蛋白酶消解肽图分析

rhEPO 是由 166 个氨基酸残基组成的糖基化蛋白质,有两对由半胱 7-半胱 161 和半胱 29-半胱 33 组成的二硫键,糖基化位点为天胺 24、天胺 38、天胺 83 和丝 126^[24]。图 2 所示为 rhEPO 的预测结构。由于胰蛋白酶可特异性断裂精氨酸 (R) 和赖氨酸 (K) 所形成的肽键,故 rhEPO 经胰蛋白酶消化后的产物从理论上讲由 20 个肽段组成。其中 T5, T9 和 T13 是糖基化肽, T2 和 T5 肽段中包含二硫键。

图 3 是 rhEPO 的胰蛋白酶消解产物的 CE-ESI-MS 图谱。从质谱的总离子流图 (TIC) 上检测到了从 a 至 h 共 8 个产物峰 (见图 3 上图),它们分别对应于电泳紫外检测器检测到的 a 至 h 峰 (见图 3 下图)。因为电泳紫外检测窗口在距离毛细管入口端 21.5 cm 处,有效分离距离较短,致使 a, b 和 g, h 峰

未能在 UV 检测窗口处分开,但在质谱检测窗口处 (79 cm) 可以实现较好的分离检测效果。

图 3 中 a ~ h 各电泳峰所对应的质谱图分别如图 4-a ~ h 所示,表 1 为 rhEPO 胰蛋白酶消解肽段的理论相对分子质量 (M_r) 与图 4 对应的各峰的质荷比 (m/z) 的汇总数据。结合表 1 可看出,图 4-a 和 b 确证了糖肽 T13 的微多相性及在肽图中的位置;根据文献 [24] 报道, T13 主要含有 (NeuAc)₂ · Hex · HexNAc 和 NeuAc · Hex · HexNAc 两种糖基,其 M_r 分别为 2 412 和 2 121,我们分别在图 3 流出峰 a 和 b 的质谱图 (即图 4-a 和 b) 中检测到了其双电荷分子离子峰 1 205.1 和 1 059.5。依此类推,图 4-c 和 d 确证了 T2, T3, T4 和 T14 肽段在肽图中的位置,它们对应于图 3 中的流出峰 c 和 d。图 4-e 确证了 T11 和 T17 肽段在肽图中的位置,它们对应于图 3 中的流出峰 e。图 4-f 确证了 T10 和 T12 肽段在肽图中的位置,它们对应于图 3 中的流出峰 f。图 4-g 和 h 分别确证了 T16 和 T1 肽段在肽图中的位置,它们分别对应于图 3 中的流出峰 g 和 h。

由于 T5 和 T9 糖肽的糖基部分结构复杂、形式多,并且 T5 中含有两个糖基化位点,故其 CE 流出峰和质谱图难以解析。在 CE-MS 联用技术中,由于样品的进样量很小 (纳升级),加之 MS 的检测灵敏度有限,所以未检测到 T6 和 T20 肽段。T7, T8, T15, T18 和 T19 肽段则是因其 M_r 超出了质谱扫描范围 (m/z 300 ~ 2 200),因而也未能检测到。除上述肽段外,其余肽段均用该方法得到了确证。

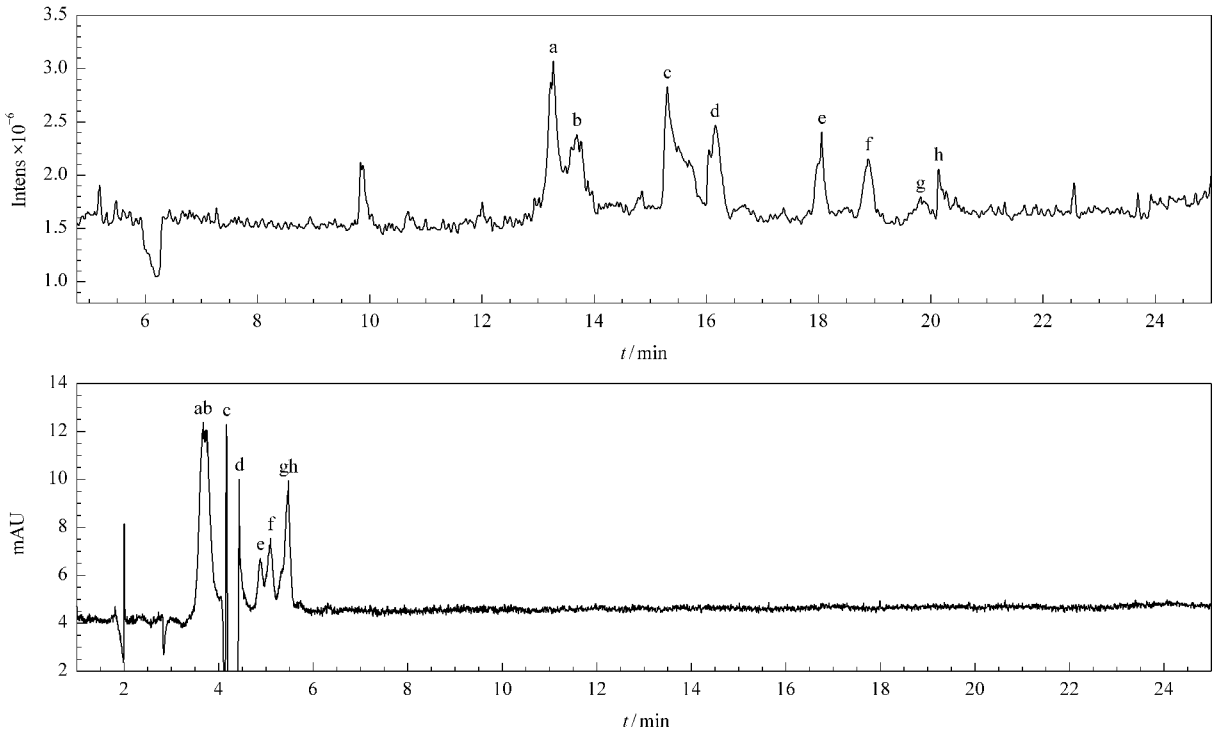


图 3 重组促红细胞生成素的胰蛋白酶消解产物的总离子流电泳图(上图)和紫外检测电泳图(下图)

Fig.3 Total ion current electropherogram (top) and UV electropherogram (bottom) of rhEPO tryptic digests

Migration times of the peaks in TIC : a. 13.1 – 13.3 min ; b. 13.6 – 13.8 min ; c. 15.2 – 15.9 min ; d. 15.9 – 16.4 min ; e. 17.8 – 18.1 min ; f. 18.7 – 19.0 min ; g. 19.6 – 20.0 min ; h. 20.0 – 20.3 min.

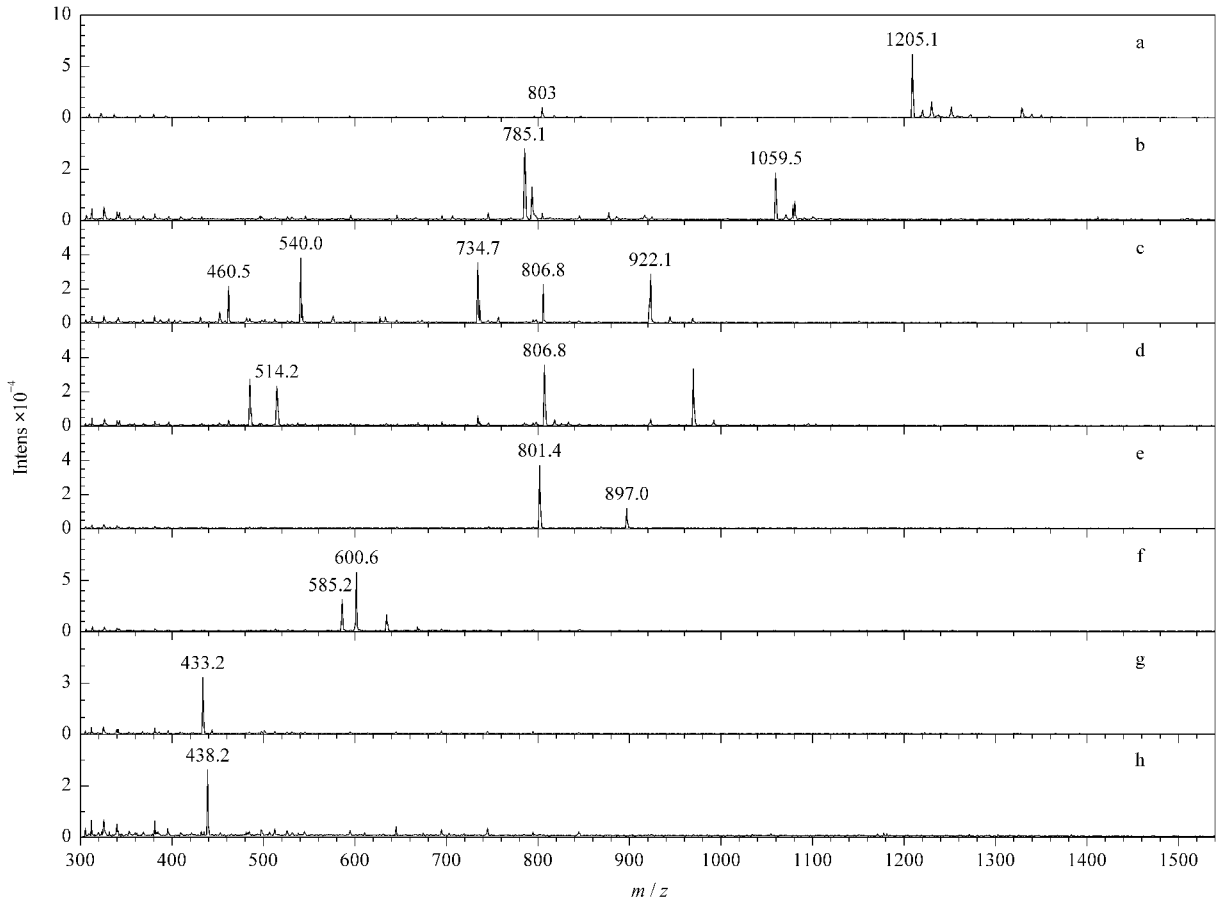


图 4 图 3 的总离子流电泳图中峰 a ~ h 的质谱图

Fig.4 Mass spectra of the peaks a ~ h in TIC of Fig.3

表 1 CE-ESI-MS 分析 rhEPO 胰蛋白酶消化产物的结果
Table 1 CE-ESI-MS analysis of the rhEPO tryptic digests

Peptide No. in Fig. 2	Sequence	Molecular mass (M_r)	Observed (m/z)		Peak No. in Fig. 3
			[$M - H$] ⁻	[$M - 2H$] ²⁻	
T1	APPR	439.5	438.2		h
T2	LICDSRLYTGEACR	1615.8		806.8	c, d
T3	VLER	515.6	514.2		d
T4	YLLEAK	735.9	734.7		c
T5	EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK				-
T6	VNFYAWK	927.1			-
T7	R	174.2			-
T8	MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	2525.3			-
T9	GQALLVNSSQPWEPLQLHVDK				-
T10	AVSGLR	601.7	600.6		f
T11	SLTTLLR	802.5	801.4		e
T12	ALGAQK	586.3	585.2		f
T13	EAISPPDAASAAPLR				
	NeuAc · Hex · HexNAc	2121		1059.5	b
	(NeuAc) ₂ · Hex · HexNAc	2412		1205.1	a
T14	TITADTFR	923.0	922.1	460.5	c
T15	K	146.2			-
T16	LFR	434.5	433.2		g
T17	YSNFLR	898.0	897.0		e
T18	GK	203.2			-
T19	LK	259.3			-
T20	TGDR	447.4			-

- : uncharacterized. T5, T9 and T13 are glycopeptides.

3 结论

综上所述,本文利用 6,6-ionene 涂层毛细管,采用 CE 法在 15 min 之内测定了 rhEPO 中唾液酸的微多相性,按 rhEPO 唾液酸含量的多少,将其分离成 7 个峰,具有检测时间短,重现性好,分辨率高,能实现质谱联用的特点。并利用该涂层毛细管,采用 CE-ESI-MS 法在 22 min 之内鉴定了 rhEPO 20 段胰酶消化肽中的 11 段,表明该法是快速而又有效的蛋白质一级结构测定方法。

致谢 感谢安捷伦科技有限公司为本研究工作提供 CE-ESI-MS 仪器。

参考文献:

- [1] Kranz S. *Blood*, 1991, 77 : 419
- [2] Crommelin D J A, Sindelar R D. *Pharmaceutical Biotechnology: an Introduction for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997. 25
- [3] Markham A, Bryson H M. *Drugs*, 1995, 49(2) : 232
- [4] Fisher J W. *Exp Biol Med*, 2003, 228(1) : 1
- [5] Rivier L, Saugy M. *J Toxicol-Toxin Rev*, 1999, 18(2) : 145
- [6] Parisotto R, Wu M T, Ashenden M J, Emslie K R, Gore C J, Howe C, Kazlauskas R, Sharpe K, Trout G J, Xie M H, Hahn A G. *Haematologica*, 2001, 86(2) : 128
- [7] Lasne F, de Ceaurriz J. *Nature*, 2000, 405(6 787) : 635
- [8] Higuchi M, Oh-eda M, Kuboniwa H, Tomonoh K, Shimomaka Y, Ochi N. *J Biol Chem*, 1992, 267(11) : 7 703
- [9] Rush R S, Derby P L, Smith D M, Merry C, Rogers G, Rohde M F, Katta V. *Anal Chem*, 1995, 67(8) : 1 442
- [10] Yu B, Cong H L, Liu H W, Li Y Z, Liu F. *TrAC*, 2005, 24(4) : 350
- [11] Watson E, Yao F. *Anal Biochem*, 1993, 210(2) : 389
- [12] European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). *European Pharmacopoeia*. 4th ed. Strasbourg: EDQM of the Council of Europe, 2002. 1 123, 1 316
- [13] Boss H J, Watson D B, Rush R S. *Electrophoresis*, 1998, 19(15) : 2 654
- [14] Tran A D, Park S G, Lisi P J, Huynh O T, Ryall R R, Lane P A. *J Chromatogr A*, 1991, 542(2) : 459
- [15] Choi D, Kim M, Park J. *J Chromatogr B*, 1996, 687(1) : 189
- [16] Zheng X L, Cao W X. *European Polymer Journal*, 2001, 37(11) : 2 259
- [17] Rambaum A, Noguchi H. *Macromolecules*, 1972, 5 : 261
- [18] Wiktorowicz J E, Colburn J C. *Electrophoresis*, 1990, 11(9) : 769
- [19] Cordova E, Gao J M, Whitesides G M. *Anal Chem*, 1997, 69(7) : 1 370
- [20] Tran A, Barker H, Levi V, Kunitani M. *Anal Chem*, 1998, 70(18) : 3 809
- [21] Sanz-Nebot V, Benavente F, Vallverdu A, Guzman N A, Barbosa J. *Anal Chem*, 2003, 75(19) : 5 220
- [22] Cifuentes A, Moreno-Arribas M V, de Frutos M, Diez-Masa J C. *J Chromatogr A*, 1999, 830(2) : 453
- [23] Zhou Guohua, Luo Guoan, Zhou Yong, Zhou Keyu, Song Qinxin. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (周国华, 罗国安, 周勇, 周克瑜, 宋沁馨. 分析化学), 1998, 26(3) : 249
- [24] Zhou G H, Lou G A, Zhou Y, Zhou K Y, Zhang X D, Huang L Q. *Electrophoresis*, 1998, 19(13) : 2 348