

蛋白质高效分离二维色谱柱的选择优化

洪广峰¹, 高明霞¹, 晏国全¹, 关霞¹, 陶芊¹, 张祥民^{1, 2*}

(1. 复旦大学化学系, 上海 200433; 2. 复旦大学生物医学研究院, 上海 200433)

摘要: 为了构建高效的离子交换/反相二维液相色谱(IEC/RPLC)分离平台系统, 提高复杂蛋白质样品的分离效率, 对色谱柱进行了评价与筛选。通过对实际人肝蛋白质样品的分离效果的比较, 选择确定了TSKgel DEAE-5PW弱阴离子交换色谱柱(WAX)作为第一维色谱分离柱, 考察了同一规格的10支代表性反相色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 30 nm, C4、C8或C18), 通过评价其对尿嘧啶、硝基苯、萘和苊的分离性能以及对3种标准蛋白质样品的非特异性吸附、对人肝蛋白质样品的WAX馏分的分离效果, 最终确定以Jupiter 300 C4反相色谱柱作为第二维色谱分离柱。对二维色谱柱的选择优化为蛋白质高效分离二维液相色谱平台的搭建提供了可靠基础。

关键词: 蛋白质组学; 多维液相色谱; 蛋白质; Top-down技术

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2010)02-0158-05

Optimization of two-dimensional high performance liquid chromatographic columns for highly efficient separation of intact proteins

HONG Guangfeng¹, GAO Mingxia¹, YAN Guoquan¹, GUAN Xia¹, TAO Qian¹, ZHANG Xiangmin^{1, 2*}

(1. Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: In order to optimize two-dimensional liquid chromatographic (2D-LC) columns for highly efficient separation of proteins, several liquid chromatographic columns were investigated and evaluated. Weak anion-exchange (WAX) column was chosen as the first dimension because of its extensive protein separation power. By comparison of different WAX chromatographic columns for human liver protein separation, TSKgel DEAE-5PW column was selected as the first dimension of a 2D-LC system. For the second dimension, ten typical reversed-phase (RP) LC columns (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 30 nm) were investigated and evaluated. Their silica based RP stationary phases were butyl (C4), octyl (C8) or octadecyl (C18). To evaluate the retention behavior and non-specific protein adsorption ability of these ten columns, four neutral compounds (uracil, nitrobenzene, naphthalene and fluorene) and three standard proteins (cytochrome C, myoglobin and albumin from chicken egg white) were adopted and separated by RPLC. Meantime, WAX fractions were used to investigate the separation ability of different alkyl-bonded silica stationary phase columns for complex protein samples. By comparison of column separation efficiency, adsorption of intact proteins and sample analysis, Jupiter 300 C4 column was finally employed for its excellent separation ability. Optimization of WAX and RPLC columns offers reliable foundation for the construction of 2D-LC protein separation systems.

Key words: proteomics; multidimensional liquid chromatography; intact protein; Top-down

* 通讯联系人: 张祥民, 教授, 博士生导师. Tel: (021) 65643983, E-mail: xmzhang@fudan.edu.cn.

基金项目: 国家重点基础研究发展规划("973")项目(No. 2007CB914100/3)、国家高技术研究发展计划("863")项目(No. 2006AA02A308)和国家自然科学基金项目(No. 20705006).

收稿日期: 2010-01-05

随着人类基因组计划的完成,蛋白质组学已成为后基因组研究的重点。相对于基因组学而言,由于蛋白质表达的多样性和翻译后修饰的复杂性,其研究更加依赖于新技术新方法的发展。生物色谱与质谱技术的进步推动了蛋白质组学研究的迅猛发展,形成了基于完整蛋白质分离的 Top-down 路线和基于肽段串级质谱鉴定的 Bottom-up 路线^[1-4]。双向凝胶电泳技术尽管在蛋白质组学研究中的重要性众所周知,然而其本身仍存在一些难以克服的缺陷,如动态范围有限,对样品中低丰度蛋白质、疏水蛋白质以及极酸极碱性蛋白质的分辨能力较差,操作费时费力等^[5]; Bottom-up 技术路线需先进行蛋白质酶解,此步骤产生了比蛋白质样品更加复杂的酶解肽段,对色谱的分离能力和质谱的鉴定速度提出了挑战,还会损失完整蛋白质的信息^[6]。

高效液相色谱(HPLC)技术具有快速、高效、自动化程度高等优点,根据 Giddings 的多维分离系统数学模型^[7,8],通过有效正交实现联用的多维液相色谱分离技术具有更大的峰容量,可以实现复杂蛋白质样品的高效分离,而且可以通过增大上样量来分离富集中低丰度蛋白质,因而得到了广泛的应用^[9-11]。以往的研究多采用蛋白质酶解肽的多维色谱分离策略,但是越来越多的事实表明,基于蛋白质水平的分离与鉴定更加可靠,而且可以获得蛋白质含量、后修饰等重要信息。高明霞等^[12]利用构建的强阳离子交换色谱/反相高效液相色谱(SCX/RPLC)分离系统,对鼠肝蛋白质进行了两维高效分离并将高丰度蛋白质高效去除,大大提高了蛋白质的鉴定数量和可靠性。通过多维液相色谱高效分离实现 Top-down 技术路线分析正成为研究的主要方法^[13-17]。这种基于完整蛋白质分离的策略其关键还是要提高复杂蛋白质样品的分离效率,而和 SCX 色谱柱比较,弱阴离子交换作为第一维色谱可以减少样品酸化过程的损失,增大蛋白质的上样量;RPLC 对多维液相色谱总峰容量的贡献很大,可以提高复杂蛋白质样品的分辨率,将其作为第二维色谱还可以在线除盐。因此,优化离子交换色谱/RPLC 二维分离系统对于蛋白质的分离有重要的应用意义。本研究对二维分离系统的核心——色谱柱进行了筛选,并系统评价和考察了其分离性能,解决了蛋白质水平两维色谱分离系统中色谱柱的最优化问题。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

岛津 LC-2010 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu

公司)配有泵单元、四元低压梯度单元、溶剂真空脱气机、自动进样器、柱温箱、紫外可见检测器和 CLASS-VP 工作站。十万分之一电子天平(北京赛多利斯天平有限公司),数控超声波清洗器(型号 DS-5510DTH,上海生析超声仪器有限公司)。

甲醇(HPLC 纯,美国 Fisher 公司),乙腈(ACN, HPLC 纯,德国 Merck 公司),三氟乙酸(TFA, HPLC 纯,美国 Sigma 公司);标准蛋白细胞色素 C(cytochrome C, Cyt-C)、马心肌红蛋白(myoglobin, MYO)和鸡卵白蛋白(albumin from chicken egg white, ALB)购自美国 Sigma 公司;用于色谱柱测试的化合物尿嘧啶、硝基苯、萘、苄为分析纯,购自中国医药集团化学试剂公司上海分公司;其他试剂均为国产分析纯试剂;实验用水为 Milli-Q 去离子水。

健康人肝组织样品由中国人肝组织提供。二硫苏糖醇(DTT)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)和苯甲磺酰氟(PMSF)为 Amresco(USA)分装,购自上海华舜生物工程有限公司。考马斯亮蓝 R-250(Bio-Rad, USA)。

样品制备:将人肝组织切成小块,用冰生理盐水(0.9% NaCl 溶液)清洗 3 次以除去体液及血液中一些可能的污染物。然后称重,以 1:8(g:mL)的比例加入提取液(1 mmol/L PMSF, 50 mmol/L DTT, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5),然后置于玻璃匀浆器内进行手动匀浆至组织完全破碎,上述整个匀浆过程在冰浴中进行。匀浆液混旋 30 min,在 4 °C 条件下 15 000 g 离心 30 min,取上清液即为提取蛋白,-80 °C 保存备用,蛋白质提取液用 Bradford 法定量。

1.2 实验步骤

1.2.1 人肝蛋白质样品的一维 WAX 分离

蛋白质弱阴离子交换(WAX)柱:Tosoh TSKgel DEAE-5PW(东京,日本),内径是 7.5 mm,柱长为 75 mm,采用 10 μm, 100 nm 填料,分析柱前加一个 2 cm 长、内径为 4.6 mm 的保护柱以防止污染或堵塞分析柱,保护柱的填料粒径为 20 μm。流动相 A:10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5);流动相 B:10 mmol/L Tris-HCl-500 mmol/L 氯化钠(pH 7.5)。流动相流速设定为 0.5 mL/min。流动相洗脱梯度为:0% B 15 min,于 80 min 内线性上升至 30% B,于 22 min 内线性上升至 100% B,保持 5 min,于 3 min 内降至 0% B。上样量为 2 mg/次,平行进行 3 次实验。收集的馏分经过冷冻干燥后置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.2.2 RPLC 色谱柱柱效测试

以尿嘧啶、硝基苯、萘和芴为标准物质,分别称取一定质量的上述 4 种化合物,以甲醇作为溶剂,配制成 1 g/L 的标准溶液备用。使用时取等体积的上述 4 种标准溶液混合,并加入 30% ACN 水溶液稀释至终质量浓度为 0.1 g/L。RPLC 色谱柱规格: 250 mm × 4.6 mm 粒径 5 μm,孔径 30 nm,硅胶基质,键合固定相为 C4、C8 或 C18,购自国内外不同厂家,详细参数见表 1。柱效评价采用色谱柱出厂报告上的色谱条件,样品进样体积为 5 μL。

表 1 10 支反相色谱柱的参数

Table 1 Parameters of ten RPLC columns

Column* No.	Surface area/(m ² /g)	Stationary phase	Content of C/%	End-capping with TMS	pH
1	170 ± 30	C18	13	Yes	1.5 - 10.0
2	170 ± 30	C4	5	Yes	1.5 - 10.0
3	50	C18	4	Yes	2.0 - 11.0
4	45	C18	2.8	No	1.0 - 8.0
5	100	C18	9	Yes	2.0 - 8.0
6	80	C18	9	Yes	1.5 - 9.0
7	80	C18	-	No	1.0 - 8.5
8	60 - 110	C18	8	Yes	2.0 - 7.0
9	60 - 110	C18	4	Yes	2.0 - 7.5
10	-	C8	4	Yes	2.0 - 7.5

* Size of all columns: 250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 30 nm.

TMS: trimethylsilyl; -: Parameters were not provided by manufacturers.

1.2.3 标准蛋白质的 RPLC 分离

分别称取一定质量的 Cyt-C、MYO 和 ALB 3 种标准蛋白质样品,以去离子水作为溶剂,配制成 10 g/L 的标准溶液备用。使用时取等体积的上述 3 种标准蛋白质溶液混合,并加入去离子水稀释至终质量浓度为 1 g/L。

色谱条件:流动相 A 95% H₂O-5% ACN-0.05% TFA; B 95% ACN-5% H₂O-0.05% TFA。流动相洗脱梯度为:10 min 内由 0% B 线性上升至 25% B, 20 min 内由 25% B 线性升至 40% B, 8 min 内由 40% B 线性升至 80% B, 3 min 内降至 0% B。流速设定为 1 mL/min。检测波长为 215 nm。样品进样体积为 30 μL。定量方法使用面积归一化法。

1.2.4 人肝蛋白质 WAX 馏分的二维 RPLC 分离

样品准备:取一定量的一维 WAX 冻干馏分溶解于 1.2.3 节 RPLC 的流动相 A 相,充分混旋,离心,取上清溶液备用,溶液中蛋白质含量用 Bradford 方法测定,由此确定二维 RPLC 的上样量,保证每根色谱柱的分离分析条件的一致性。色谱条件同 1.2.3 节。

2 结果与讨论

2.1 人肝蛋白质样品的第一维离子交换色谱分离

常用的离子交换色谱柱有阳离子交换柱和阴离子交换柱,阳离子交换色谱通常需在酸性条件下上样,但在中性溶液中提取的蛋白质经过酸化处理会导致大量蛋白质沉淀,使用阴离子交换色谱则能够避免蛋白质沉淀。阴离子交换色谱柱有强阴离子交换和弱阴离子交换两种,在蛋白质分离中应用比较广泛的是弱阴离子交换色谱柱,因此本研究选择了两款弱阴离子交换柱进行比较。如图 1 所示,无孔的弱阴离子交换柱 TSKgel DEAE-NPR (图 1b)尽管对于一些在大孔弱阴离子交换柱 TSKgel DEAE-5PW (图 1a)上强保留的蛋白质分离效果比较好,分离速度也比较快,但色谱柱的样品容量小,不能满足二维色谱分离过程中第二维上样量的需要,因此实验选取了具有更大上样量的弱阴离子交换柱 TSKgel DEAE-5PW 进行人肝蛋白质样品的第一维分离。通过对梯度条件的优化,最终确定了图 1 中使用的流动相梯度条件。1D-WAX 馏分收集采用按色谱峰收集的方法,具体如图 2 中所示,每次上样 2 mg,重复进样 3 次平行收集馏分,然后冻干,置于 -80 °C 冰箱中保存以便进行 2D-RPLC 色谱条件的考察优化。由图 2 也可以看出,在优化后的色谱条件下 3 次平行进样的色谱分离重现性很好。

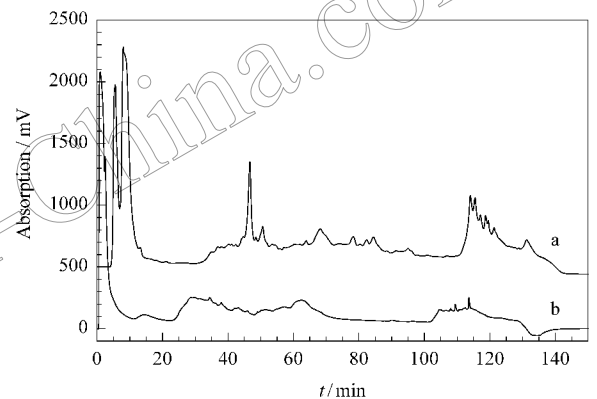


图 1 不同 WAX 色谱柱分离人肝蛋白质样品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of human liver proteins with different WAX chromatographic columns

Columns: a. TSKgel DEAE-5PW analytical column (75 mm × 7.5 mm, 10 μm, 100 nm), TSKguard column DEAE-5PW (20 mm × 4.6 mm, 20 μm); b. TSKgel DEAE-NPR analytical column (35 mm × 4.6 mm, 2.5 μm, non-porous), TSKguard column DEAE-NPR (5 mm × 4.6 mm). Mobile phases: A, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5); B, 10 mmol/L Tris-HCl-500 mmol/L sodium chloride (pH 7.5); elution gradient, 0% B in 15 min, 0% B - 30% B in 80 min, 30% B - 100% B in 22 min, maintained 5 min, 100% B - 0% B in 3 min. Flow rate: 0.5 mL/min. Detection wavelength: 215 nm. Both of the injection volumes were 100 μL.

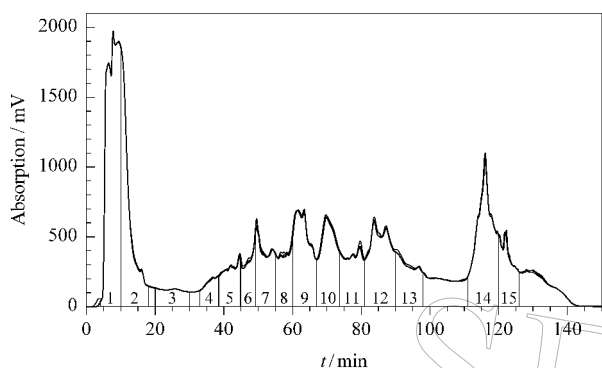


图 2 人肝蛋白质样品的一维 WAX 色谱分离图
Fig. 2 Chromatogram of human liver proteins using 1D-WAX liquid chromatography

Conditions: TSKgel DEAE-5PW column (75 mm × 7.5 mm, 10 μm, 100 nm); loading amount: 2 mg × 3; other conditions are the same as in Fig. 1.

2.2 RPLC 色谱柱柱效测试

2.2.1 柱效评价

以尿嘧啶、硝基苯、萘和茚为标准物质对色谱柱柱效进行评价。液相色谱系统的死时间以尿嘧啶的出峰时间计,理论塔板数按茚来计算,根据岛津 LC-2010 自带的工作站 CLASS-VP 软件,计算色谱峰的不对称因子(A_s)、理论塔板数(N_T)和有效塔板数(N_{eff})等色谱柱参数,具体结果详见表 2。

表 2 10 支反相液相色谱柱柱效评价

Table 2 Column efficiency evaluation of ten RPLC columns

Column No.	A_s	N_T/m^{-1}	N_{eff}/m^{-1}	$\Delta P/MPa$	Non-specific adsorption rate of ALB/%
1	1.21	57090	25143	11.0	1.29
2	1.09	61493	29661	10.9	1.42
3	1.07	57712	26135	10.5	1.62
4	1.14	57805	18855	11.1	0.87
5	1.22	61920	26359	11.3	1.49
6	1.13	76781	36382	12.0	1.97
7	1.08	72030	23924	11.7	1.00
8	1.13	40215	26282	10.6	2.22
9	1.09	44696	16134	11.7	1.79
10	1.15	56357	14997	10.5	0.93

A_s : asymmetry factor; N_T : theoretical plate number; N_{eff} : effective plate number; ΔP : column back pressure (100% mobile phase A); ALB: albumin from chicken egg white.

由上述结果可以看出色谱柱 4、9、10 的柱效较低,由表 1 可以看出它们的填料含碳量较低,色谱柱 6 柱效较高,柱压降也比较高,可能是色谱柱的填料装填比较紧密,色谱柱 1、2、3、5 和 8 的柱效比较接近,需要比较其对标准蛋白质样品的分离情况以作进一步的筛选考察。

2.2.2 非特异性吸附考察

硅胶基质的色谱填料具有传质快、不溶胀、耐高

压等优点。通过多孔硅胶基质表面键合不同的功能基团如氨基、氰基、二醇基、烷基等可以制备具有多种功能性质的色谱填料。反相色谱填料通常是在硅胶基质表面键合上不同长度的烷基链如 C4、C8 和 C18 等,残余的自由硅羟基使用“封尾”试剂如三甲基氯硅烷(TMSCl)进行烷基化处理,以消除其对样品分离过程的不利影响。然而随着烷基化程度的提高,位阻造成的影响使少量硅羟基难以被完全硅烷化,所以不同生产厂家的色谱柱在使用过程中对样品的非特异性吸附也不同,对于珍贵的人肝蛋白质样品来讲,考察不同填料对蛋白质的非特异性吸附非常重要。

本文采用 Cyt-C、MYO 和 ALB 做标准蛋白质进行考察,通过对照空白实验并利用面积归一化法对蛋白质在不同色谱柱上的残留进行计算,结果发现,Cyt-C 与 MYO 在所测试的色谱柱上几乎没有残留,而 ALB 的残留相对比较大,这可能与 ALB 的相对分子质量相对较大而疏水性更强有关,表 2 给出了 ALB 的非特异性吸附的数据。可以看出,色谱柱 4、7 和 10 的非特异性吸附比较弱,色谱柱 6、8 和 9 的非特异性吸附较强,色谱柱 1、2、3 和 5 的测试结果比较接近。综合考虑柱效、柱压降、蛋白质的非特异性吸附以及色谱柱填料的比表面积、含碳量、使用的 pH 范围,选取色谱柱 1 和 2 作进一步的研究。

2.3 标准蛋白质与人肝蛋白质 WAX 馏分的 RPLC 分离

图 3 是 RP 色谱柱 1、2 对标准蛋白质样品 Cyt-C 和 ALB 的分离图,可以看出两款色谱柱对 ALB

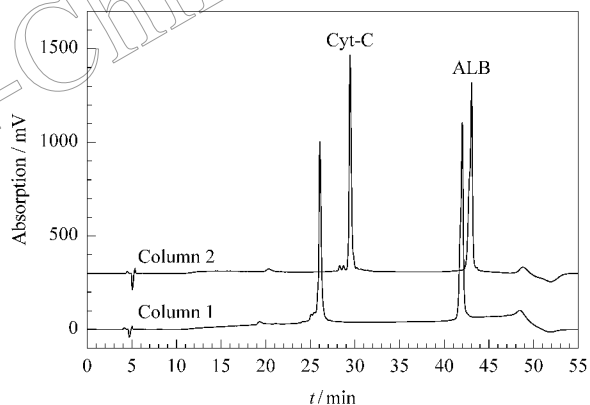


图 3 标准蛋白质样品 Cyt-C 和 ALB 在两支 RP 色谱柱上的分离图

Fig. 3 Chromatograms of Cyt-C and ALB on two RP columns

Mobile phases: A, 95% H₂O-5% ACN-0.05% TFA; B, 95% ACN-5% H₂O-0.05% TFA; elution gradient, 0% B-25% B in 10 min, 25% B-40% B in 20 min, 40% B-80% B in 8 min, 100% B-0% B in 3 min. Flow rate: 1 mL/min. Detection wavelength: 215 nm. Injection volume: 30 μL (1 g/L).

的分离峰形都比较好,但是对于 Cyt-C 的分离,色谱柱 2 具有更好的分离度。

之后,实验选用了 1D-WAX 的馏分 6(见图 2)对两根色谱柱做进一步的考察。通过色谱图(见图 4)的比较可以发现保留能力一般的蛋白质样品在色谱柱 1 和色谱柱 2 上具有相似的分离能力;而对于强保留的蛋白质即疏水性比较强的蛋白质,色谱柱 2 具有更加优越的分离性能。因此色谱柱 2(Jupiter 300 C4,美国 Phenomenex 公司)被选作人肝蛋白质样品多维色谱分离的第二维色谱柱。这样就可以在第一维尽量不损失样品完整性的基础上,最大程度地提高蛋白质在第二维的分离效率,不仅可以得到更多中低丰度蛋白质的峰信息,方便地对蛋白质进行定量,还可以简化后续的液相色谱馏分中蛋白质的复杂程度,提高其质谱鉴定效率。

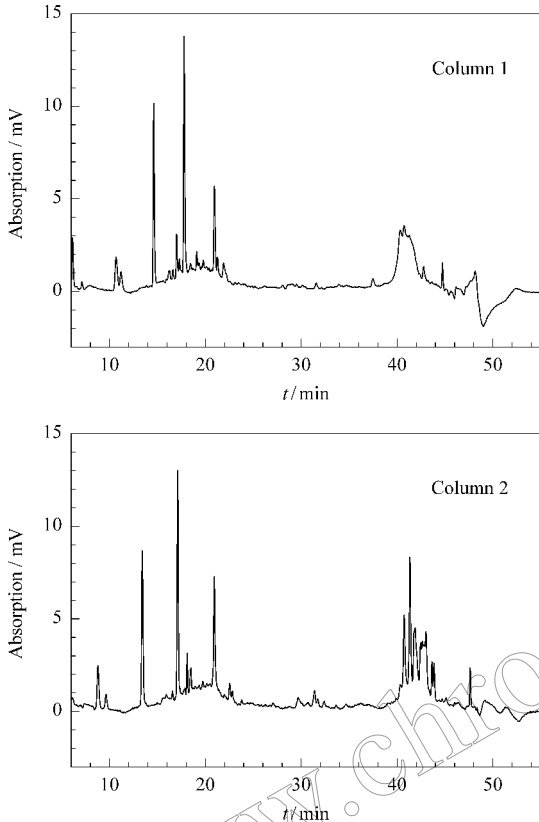


图 4 人肝蛋白质样品 1D-WAX 馏分 6 在 RP 色谱柱 1 和 2 上的分离图

Fig. 4 Chromatograms of 1D-WAX fraction 6 of human liver proteins on RP column 1 and 2

The linear gradient elution conditions and UV detection are the same as in Fig. 3. Both of the injection volumes were 100 μL (0.5 g/L).

3 结论

本文系统考察了蛋白质多维液相色谱分离的色谱柱选择和条件优化。通过分离分析人肝蛋白质样品选择了 Tosoh 公司的具有大上样量的 TSKgel DEAE-5PW 色谱柱作为第一维 WAX 色谱柱;通过对标准样品和人肝蛋白质样品 WAX 馏分的分离条件考察,选择了美国 Phenomenex 公司的 Jupiter 300 C4 反相色谱柱作为第二维 RPLC 色谱柱,构建了离线的 IEC/RPLC 二维蛋白质高效分离模式。这对于复杂生物样品中蛋白质的分离鉴定尤其是中低丰度蛋白质的分离和鉴定是非常重要的。

参考文献:

- [1] Mann M, Hendrickson R C, Pandey A. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70 : 437
- [2] Aebersold R, Mann M. *Nature*, 2003, 422 : 198
- [3] Yates J R III. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2004, 33 : 297
- [4] Domon B, Aebersold R. *Science*, 2006, 312 : 212
- [5] Gygi S P, Corthals G L, Zhang Y, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 : 9390
- [6] Cantin G T, Yates J R III. *J Chromatogr A*, 2004, 1053 : 7
- [7] Giddings J C. *Anal Chem*, 1984, 56 : 1258A
- [8] Giddings J C. *J High Resolut Chromatogr Chromatogr Commun*, 1987, 10 : 319
- [9] Zhu G J, Liang Z, Zhang L H, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (朱贵杰, 梁振, 张丽华, 等. 色谱), 2009, 27(5) : 518
- [10] Wang Y, Gao M X, Gu X, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (王彦, 高明霞, 谷雪, 等. 色谱), 2005, 23 : 41
- [11] Wang Z C, Zhang Q H, Li T, et al. *Science in China Series B : Chemistry* (王智聪, 张庆合, 李彤, 等. 中国科学 B 辑 : 化学), 2006, 36(1) : 64
- [12] Gao M X, Zhang J, Deng C H, et al. *J Proteome Res*, 2006, 5 : 2853
- [13] Millea K M, Krull I S, Cohen S A, et al. *J Proteome Res*, 2006, 5 : 135
- [14] Sharma S, Simpson D C, Tolić N, et al. *J Proteome Res*, 2007, 6 : 602
- [15] Gao M X, Deng C H, Yu W J, et al. *Proteomics*, 2008, 8 : 939
- [16] Wu S, Lourette N M, Tolić N, et al. *J Proteome Res*, 2009, 8 : 1347
- [17] Gao M X, Guan X, Hong G F, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (高明霞, 关霞, 洪广峰, 等. 色谱), 2009, 27(5) : 551