

高效液相色谱法紫外与激光诱导荧光检测蛋白质的分析对比

马丽敏¹ 宋 伦¹ 钱俊红¹ 张凌怡¹ 蓝闽波^{* 1 2} 张维冰^{* 1}

¹(华东理工大学上海市功能性材料化学重点实验室 分析测试中心, 上海 200237)

²(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘 要 将鼠肝肿瘤组织蛋白及其酶解产物经 4-氟-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂恶二唑(NBD-F) 在 50 mmol/L 硼砂缓冲溶液(pH 8.5) 中室温避光衍生 1 h 后, 采用高效液相色谱-激光诱导荧光检测法(HPLC-LIF) 分析($\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$) 并与高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV) 在检测波长 214 nm 所得结果进行对比。对蛋白质酶解产物的分析结果表明, LIF 检测器因其更高的检测灵敏度, 可显著提高检测能力, 多数色谱峰较紫外信号高 10 倍以上, 最终检测到 42 个峰。进一步对鼠肝肿瘤组织蛋白提取液的检测结果进行对比, HPLC-UV 法检测到的组分集中在强极性区域, 说明样品中极性组分的紫外吸收较强; HPLC-LIF 法检测到的组分更多集中在弱极性和非极性区域, 一方面因为衍生化能够改变组分的极性, 另一方面因为弱极性和非极性组分更容易被衍生化。此结果也说明两种方法对样品的检测选择性存在明显差异。通过改变荧光衍生化反应条件(溶液 pH 值、缓冲液介质) 对复杂样品进行选择标记, 有利于实现对低丰度蛋白和多肽的选择性检测。

关键词 蛋白; 多肽; 激光诱导荧光; 高效液相色谱

1 引 言

对具有重要生理或病理功能的低丰度蛋白进行定性与定量分析是蛋白质组学研究的重要内容。目前, 能够与高效液相色谱串联用于复杂生物样品分析的检测方法, 包括质谱法^[1, 2]、紫外法^[3, 4]和荧光法^[5, 6]等。质谱法能够提供丰富的分子片段信息, 是蛋白质定性的首选方法; 但质谱定量过程复杂。与之相比, 光谱法检测不仅操作简便, 而且可以与色谱无损联接, 是快速定量分析的理想选择。最常用的紫外检测器及普通荧光检测器灵敏度相对较低, 限制了其在低丰度蛋白检测中的应用。

激光诱导荧光检测器采用激光作为激发光源, 具有极高的检测灵敏度(比紫外法高 3 ~ 4 个数量级^[7~9]), 甚至可实现单分子检测^[10]。Katzenmeyer 等^[11] 构建了高效液相色谱-激光诱导荧光-质谱(HPLC-LIF-MS) 联用系统, 对抗肿瘤药阿霉素(Doxorubicin) 及两种代谢产物进行了定性与定量分析, LIF 检测器的引入使得药物代谢过程中的实时浓度监测成为可能。Kumar 等^[12] 采用 HPLC-LIF 法对蛋白含量低至 $10^{-15} \sim 10^{-16} \text{ mol}$ 级的乳房组织提取液进行分离检测, 并结合主成分分析(PCA) 对不同试样(正常、恶性、良性及经过处理的样品) 进行分类研究; Bhat 等^[13] 采用类似方法对子宫细胞试样开展研究, 证实 HPLC-LIF 方法灵敏度高、特异性好, 将其与 PCA 等数据处理方法结合有望用于对肿瘤组织的诊断。

本研究以鼠肝肿瘤组织蛋白为研究对象, 比较了高效液相色谱-激光诱导荧光检测法(HPLC-LIF) 及高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV) 的检测灵敏度和选择性, 说明其在复杂生物样品中低丰度蛋白定量分析方面的特征。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

高效液相色谱系统: P230II 高压恒流泵, UV230II 紫外-可见检测器, LIFD230 激光诱导荧光检测器

2010-11-10 收稿; 2010-12-29 接受

本文系国家重点基础研究发展规划(973) 项目(No. 2011CB910400)、上海市科委专项基金(No. 10dz2220500) 和华东理工大学优秀青年教师基金(No. YJ0157/45) 资助项目

* E-mail: minbolan@ecust.edu.cn; weibingzhang@dicp.ac.cn

(大连依利特分析仪器有限公司); Arium611 超纯水仪(德国 Sartorius 公司)。

鼠肝肿瘤组织蛋白提取液(复旦大学提供);牛血清白蛋白和胰蛋白酶(Sigma 公司);4-氟-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂恶二唑(日本 TCI 公司); $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 和 NH_4HCO_3 (分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司);甲醇(色谱纯,上海星可化学试剂有限公司);实验用水均为 Milli-Q 超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 鼠肝肿瘤组织蛋白的酶解 移取 200 μL 鼠肝肿瘤组织蛋白提取液至 1.5 mL 离心管中,将离心管放在 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 10 min 使蛋白失活。待溶液冷却至室温后,向离心管中加入 50 μL 胰蛋白酶水溶液(1 g/L)和 750 μL 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液(pH 8.0),混匀,将装有上述溶液的离心管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡反应 12 h,放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱终止酶解并冷冻保存。

2.2.2 蛋白及其酶解产物的衍生 选用衍生条件温和,反应速率快,荧光量子产率较高的衍生化试剂 4-氟-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂恶二唑(NBD-F)^[14-18]对蛋白质及其酶解产物进行衍生。反应条件:向 500 μL 离心管中依次加入 10 μL 鼠肝肿瘤组织蛋白提取液、10 μL 10 mmol/L NBD-F(溶于色谱纯乙腈)及 80 μL 硼砂缓冲溶液(50 mmol/L, pH 8.5),混匀后于室温避光反应 1 h。采用相同方法对牛血清白蛋白和鼠肝肿瘤组织蛋白酶解产物进行衍生化反应。

2.2.3 HPLC-UV 及 HPLC-LIF 分离-检测条件 紫外检测波长为 214 nm;激光诱导荧光检测的激发波长和发射波长分别为 473 和 525 nm。SinoChrom ODS-BP 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm i. d.)对各种试样进行分离,根据被分析物性质的不同,流动相(流速为 1.0 mL/min)采用不同的洗脱梯度,具体见表 1。

表 1 试样的分离条件

Table 1 Conditions of sample separation

样品(进样量) Samples(Injection volume)	梯度洗脱程序(A:超纯水;B:甲醇,V/V) Gradient elution programs (A: ultra-pure water-B: methanol, V/V)
牛血清白蛋白 BSA (10 μL)	0 ~ 20 min 20% B
牛血清白蛋白的 NBD-F 衍生化产物 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole(NBD-F) labeled BSA (5 μL)	0 ~ 100 min, 15% ~ 80% B
鼠肝肿瘤组织蛋白提取液 Real proteins extracted from rat liver tumor tissues(10 μL)	0 ~ 30 min 2% ~ 20% B; 30 ~ 50 min 20% ~ 100% B
鼠肝肿瘤组织蛋白提取液的 NBD-F 衍生化产物 NBD-F labeled real proteins (5 μL)	0 ~ 20 min, 15% B; 20 ~ 120 min, 15% ~ 80% B
鼠肝肿瘤组织蛋白酶解液 Enzymic hydrolysates of real proteins (10 μL)	0 ~ 30 min 2% ~ 20% B; 30 ~ 50 min 20% ~ 100% B
鼠肝肿瘤组织蛋白酶解液的 NBD-F 衍生化产物 NBD-F labeled enzymic hydrolysates of real proteins (5 μL)	0 ~ 20 min, 15% B; 20 ~ 180 min, 15% ~ 80% B

3 结果与讨论

3.1 衍生化反应温度和时间的确定

考虑到实际试样成分复杂且未知,首先用 NBD-F 对牛血清白蛋白(BSA)标准品进行衍生,并考察了反应温度、反应时间等因素对反应结果的影响。结果表明,提高反应温度能加快衍生化反应速率,但副产物含量同时增大;采用室温避光反应不仅可以有效减少副产物的生成,同时也避免了高温对生物试样的破坏。衍生化反应转化率在 1 h 后达到最大,产物在 4 h 内基本保持稳定。

3.2 牛血清白蛋白的检测

3.2.1 HPLC-UV 法 由 BSA 的 HPLC-UV 色谱图(图 1)可见,BSA 的检测信号在 5 min 左右。检测不同浓度 BSA 的 HPLC-UV 色谱图。当 BSA 浓度在 0.035 ~ 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,两者呈线性关系: $Y = 16.43X + 0.51$ (Y 为峰高, μV ; X 为 BSA 浓度, $\mu\text{mol/L}$; 相关系数 $r = 0.9979$),由 $S/N = 3$ 可求得本方法对 BSA 的检出限为 1.1×10^{-8} mol/L。

3.2.2 HPLC-LIF 法 在实验条件下,NBD-F 与 BSA 衍生化产物在 27.5 min 左右出峰(图 2 中峰 2),尽管 NBD-F 在碱性条件下会水解生成副产物 NBD-OH(峰 1),但该峰的存在对 BSA 的检测无明显影响。根据 BSA 衍生化产物峰强度与 BSA 浓度呈线性关系: $Y = 230.00X + 44.7$ (Y 为峰高, μV ; X 为

BSA 浓度 $\mu\text{g/L}$; 相关系数 $r=0.9972$), 线性范围 $0.035 \sim 1.5 \mu\text{mol/L}$ 。由 $S/N=3$ 求得该法对 BSA 的检测限可达 $1.2 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, 其检测灵敏度比紫外法提高了 10 倍。

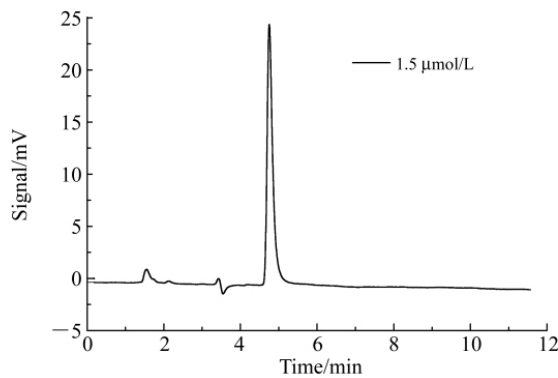


图 1 BSA 的 RP-HPLC-UV 色谱图

Fig. 1 RP-HPLC-UV chromatogram of BSA

分离检测条件见 2.2.3 (Conditions see 2.2.3)。

3.3 鼠肝肿瘤组织蛋白的检测

为了便于比较两种方法所得结果, 根据流动相极性(即流动相中甲醇的含量)将鼠肝肿瘤组织蛋白及其衍生化反应产物大致分为强极性组分、弱极性组分以及非极性组分。表 2 列出了 3 类组分所对应的流动相中甲醇含量及其在 HPLC-UV 法和 HPLC-LIF 法中相应的保留时间。

表 2 组分极性与色谱中保留时间的关系

Table 2 Relationship of polarity of components and retention time in HPLC

分类 Classification	流动相中甲醇含量 Methanol content in mobile phase (V/V)	HPLC-UV 中的保留时间 Retention time in HPLC-UV (min)	HPLC-LIF 中的保留时间 Retention time in HPLC-LIF (min)
强极性(亲水性)组分 Components with strong polarity	$\leq 20\%$	≤ 30	≤ 30
弱极性组分 Components with weak polarity	$20\% \sim 60\%$	$30 \sim 40$	$30 \sim 90$
非极性(疏水性)组分 Components with non-polarity	$\geq 60\%$	≥ 40	≥ 90

3.3.1 HPLC-UV 法 鼠肝肿瘤组织蛋白提取液中含有大量的蛋白保护剂(如苯甲基磺酰氯、硫脲、尿素等), 这些物质在 214 nm 检测波长下具有较强的紫外吸收(如图 3a 中 3~5 min 处的强峰), 对极性蛋白质的检测存在一定干扰。样品在各区域的色谱峰数目为: 强极性区域 27 个(扣除蛋白保护剂), 弱极性区域 1 个, 非极性区域 4 个(图 3), 表明蛋白提取液中强极性组分的紫外吸收较强, 而弱极性组分和非极性组分的紫外吸收较弱。HPLC-UV 法比较适用于该样品中强极性组分的分离检测。

3.3.2 HPLC-LIF 法 图 4 是鼠肝肿瘤组织蛋白荧光衍生化产物的 HPLC-LIF 色谱图(50 mmol/L, pH 8.5 硼砂缓冲溶液)。与图 3 相比, 鼠肝肿瘤组织蛋白提取液在强极性区域检测到的色谱峰的数目有所减少, 但峰的强度明显增强, 最大增强倍数超过 100 倍(如峰 A~E); 在弱极性区域检测到的色谱峰的数目明显增多; 在非极性区域, 不仅峰的数目增

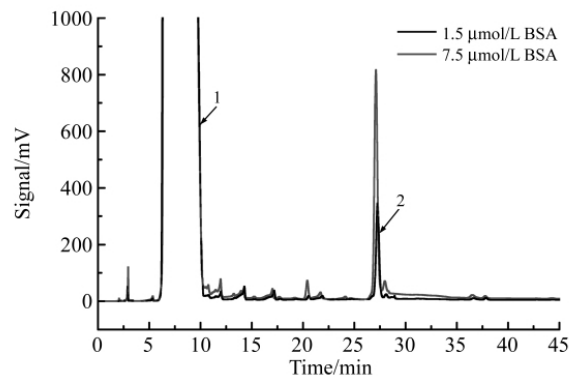


图 2 BSA 与 NBD-F 衍生化产物的 RP-HPLC-LIF 色谱图

Fig. 2 RP-HPLC-laser-induced fluorescence (LIF) chromatogram of NBD-F labeled BSA

分离检测条件见 2.2.3 (Conditions see 2.2.3)。峰 1. 副产物 NBD-OH; 峰 2. BSA 与 NBD-F 的衍生化产物。Peak 1. Side product NBD-OH; Peak 2. NBD-F labeled BSA。

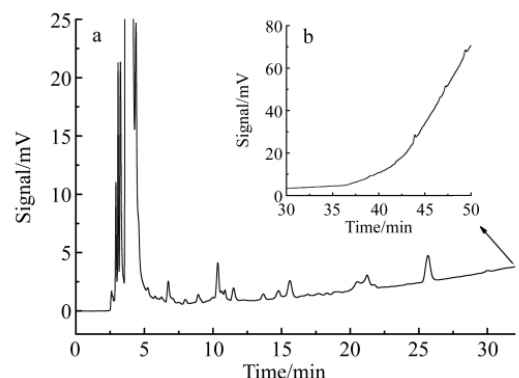


图 3 鼠肝肿瘤组织蛋白提取液的 RP-HPLC-UV 色谱图

Fig. 3 RP-HPLC-UV chromatogram of real proteins extracted from rat liver tumor tissues

(a) 0~30 min; (b) 30~50 min; 分离检测条件见 2.2.3 节 (Conditions see 2.2.3)。

多,而且检测灵敏度也有较大的提高(如峰 F~I 的信号增强倍数均大于 100 倍)。HPLC-LIF 法在强极性区域检测到的峰数目减少,而在弱极性和非极性区域检测到的峰数目增多可能因为:弱极性和非极性组分比强极性组分更易于与荧光衍生化试剂反应;部分强极性组分在被衍生化后极性降低,产物峰的位置出现在弱极性区域。此外,HPLC-LIF 法有效避免了因溶剂吸收而导致的基线漂移现象,在一定程度上也提高了对弱极性和非极性组分的检测灵敏度。

3.4 鼠肝肿瘤组织蛋白酶解产物的检测

将蛋白质大分子酶解成小分子肽段是研究蛋白质结构及生理功能的常用方法,本研究对鼠肝肿瘤组织蛋白酶解产物进行了 HPLC-UV 法和 HPLC-LIF 法分析。以峰高 0.6 mV 为积分阈值时,鼠肝肿瘤组织蛋白酶解产物在 HPLC-UV 图谱上共检测到 63 个峰(图 5);而在 HPLC-LIF

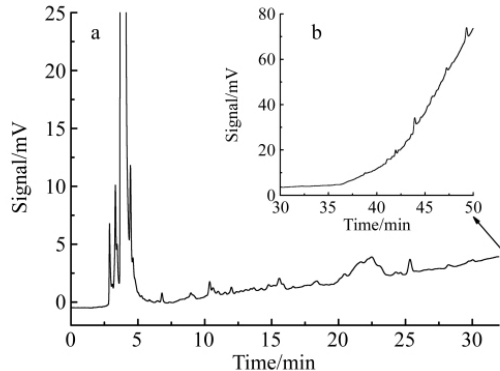


图 5 鼠肝肿瘤组织蛋白酶解产物的 RP-HPLC-UV 色谱图

Fig. 5 RP-HPLC-UV chromatogram of enzymic hydrolysates of real proteins extracted from rat liver tumor tissues

a. 0~30 min; b. 30~50 min; 分离检测条件见 2.2.3 节(Conditions see 2.2.3)。

3.5 衍生条件对选择性的影响

在控制其它衍生化反应条件不变的情况下,考察了缓冲溶液的 pH 值和无机盐介质对鼠肝肿瘤组织蛋白衍生化产物的影响,结果见图 7。随着溶液 pH 值的降低,鼠肝肿瘤组织蛋白在弱极性和非极性区域检测到的色谱峰数目减少、强度降低,表明溶液碱性的降低不利于弱极性和非极性组分与 NBD-F 反应。在 pH 8.5 时,强极性区域检测到的色谱峰数目和强度达最大值,说明弱碱性条件有利于强极性组分的衍生化反应。由图 7 可知,在 NH_4HCO_3 缓冲溶液中,大多数组分的信号强度明显降低。但在 110 min 处出现一新峰(J),说明改变反应介质能调节衍生化反应的选择性。

上述结果表明:复杂试样的衍生化程度和产物种类随着衍生化反应条件的不同而改变。通过改变反应条件可以提高对某些组分的选择性(包括选用不同的荧光衍生化试剂、改变反应温度、调节溶液 pH 值、延长或缩短反应时间等),从而达到对这些组分选择性分析的目的。

HPLC-LIF 检测法对 3 种试样都显示出比 HPLC-UV 法更高的灵敏度,除了因检测原理不同而显示出的技术优越性外,选用反应活性好、荧光量子产率高、激发和发射波长与仪器匹配的荧光试剂对目标

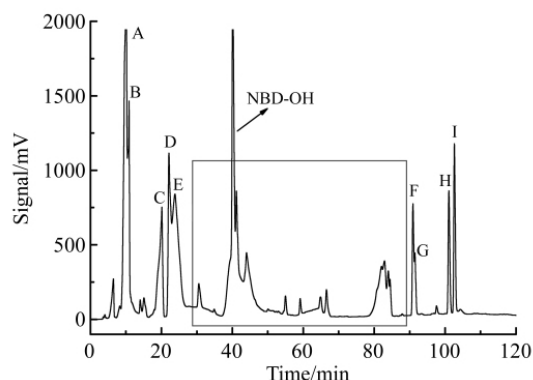


图 4 鼠肝肿瘤组织蛋白提取液与 NBD-F 衍生化产物的 RP-HPLC-LIF 色谱图

Fig. 4 RP-HPLC-LIF chromatogram of NBD-F labeled real proteins extracted from rat liver tumor tissues

分离检测条件见 2.2.3 节(Conditions see 2.2.3)。

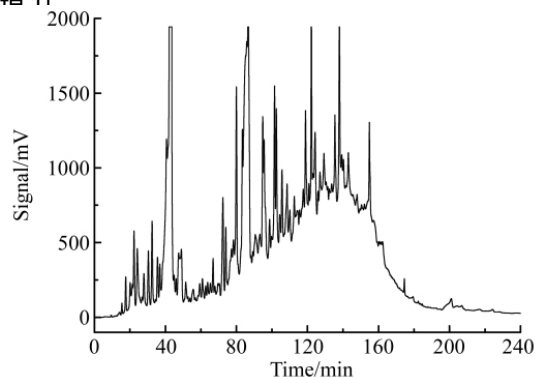


图 6 鼠肝肿瘤组织蛋白酶解液与 NBD-F 衍生化产物的 RP-HPLC-LIF 色谱图

Fig. 6 RP-HPLC-LIF chromatogram of NBD-F labeled enzymic hydrolysates of real proteins extracted from rat liver tumor tissues

分离检测条件见 2.2.3 节(Conditions see 2.2.3)。

分析物进行衍生化是提高检测灵敏度的重要因素。此外, 荧光检测可以有效降低复杂试样的背景干扰, 在一定程度上也提高了对低丰度组分的检测能力。

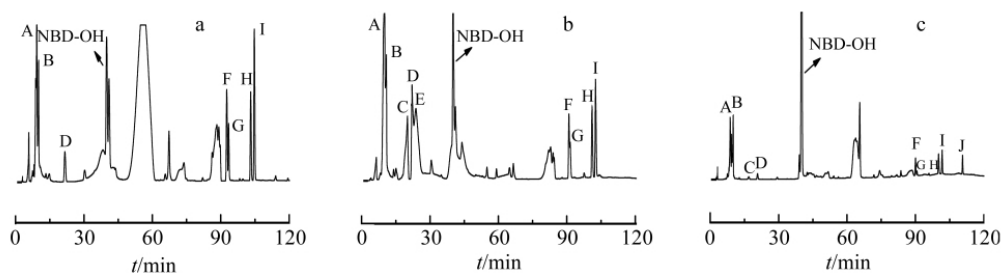


图 7 鼠肝肿瘤组织蛋白提取液在不同衍生化反应介质中的产物的 RP-HPLC-LIF 色谱图

Fig. 7 RP-HPLC-LIF chromatogram of NBD-F labeled real proteins extracted from rat liver tumor tissues under different conditions

衍生反应介质(Medium): a. 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (aq) pH=9; b. 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (aq) pH=8.5; c. 50 mmol/L NH_4HCO_3 (aq) pH=8. 分离检测条件见 2.2.3 节(Conditions see section 2.2.3)。

References

- Gao M X, Zhang J, Deng C H, Yang P Y, Zhang X N. *J. Proteome Res.*, **2006**, 5(10): 2853 ~ 2860
- ZHANG Yi-Fu, QIN Zhao-Yu, LIU Xiao-Hui, LIN Cheng-Zhao, HE Fu-Chu(张一甫, 秦兆宇, 刘晓慧, 林成招, 贺福初). *Journal of Instrumental Analysis*(分析测试学报), **2010**, 29(5): 421 ~ 429
- Horak J, Ronacher A, Lindner W. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217(31): 5092 ~ 5102
- Lin H S, Tringali C, Spatafora C, Wu C, Ho P C. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2010**, 51(3): 679 ~ 684
- GUO Shuai, SHAO Li-Hua, RONG Lin, WANG Xi-Feng, CHI De-Feng(郭帅, 邵丽华, 荣琳, 王希峰, 郝德凤). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2009**, 37(2): 242 ~ 246
- Qiao X Q, Wang L, Ma J F, Deng Q L, Liang Z, Zhang L H, Peng X J, Zhang Y K. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 640(1-2): 114 ~ 120
- XU Xu, GAO Hong-Jun, LIN Bing-Cheng(许旭, 高红军, 林炳承). *Journal of Instrumental Analysis*(分析测试学报), **2005**, 24(5): 122 ~ 129
- Lacroix M, Poinot V, Fournier C, Couderc F. *Electrophoresis*, **2005**, 26(13): 2608 ~ 2621
- MA Li-Min, LAN Min-Bo, ZHANG Wei-Bing(马丽敏, 蓝闽波, 张维冰). *Life Sci. Instrum.*(生命科学仪器), **2008**, 6(6): 3 ~ 10
- Garcia-Campana Ana M, Taverna M, Fabre H. *Electrophoresis*, **2007**, 28(1-2): 208 ~ 232
- Katzenmeyer J B, Eddy C V, Arriaga E A. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(19): 8113 ~ 8120
- Kumar K K, Chowdary M V P, Mathew S, Rao L, Krishna C M, Kurien J. *J. Biophoton.*, **2009**, 2(5): 313 ~ 321
- Bhat S, Patil A, Rai L, Kartha V B, Santhosh C. *J. Chromatogr. B*, **2010**, 878(31): 3225 ~ 3230
- Yoshihiko W, Kazuhiro I. *Anal. Chem.*, **1983**, 55(11): 1786 ~ 1791
- Hiroshi M, Toshimasa T, Kazuhiro I. *Anal. Chim. Acta*, **1985**, 170(1): 81 ~ 87
- Wise E T, Singh N, Hogan B L. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 746(1): 109 ~ 121
- Zhang H Y, Potier I L, Smadja C, Zhang J Y, Taverna M. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, 386(5): 1387 ~ 1394
- Klinker C C, Bowser M T. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(22): 8747 ~ 8754

Comparative Study on Determination of Proteins by High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet or Laser-Induced Fluorescence as Detector

MA Li-Min¹, SONG Lun¹, QIAN Jun-Hong¹, ZHANG Ling-Yi¹, LAN Min-Bo^{*1,2}, ZHANG Wei-Bing^{*1}

¹(Shanghai Key Laboratory of Functional Materials Chemistry, and Research Centre of Analysis and Test, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

²(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract The protein sample extracted from rat liver tumor tissues and its enzymic hydrolysates were detected by high performance liquid chromatography-laser induced fluorescence detector (HPLC-LIF) ($\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$) after labeled with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) in dark at room temperature for 1 h with borate buffer (50 mmol/L, pH = 8.5) as reaction medium, and the results were compared with those obtained from HPLC-UV (at 214 nm) without derivatization. The analysis of enzymic hydrolysates shows that LIF detector can greatly improve the detection by its high sensitivity: the peak intensities of most components are 10 times higher than UV detection and 42 peaks more were observed. For the analysis of protein sample, most of the peaks detected by UV are located in strong polarity area, which indicates that these components with strong polarity have high UV absorption. The signals obtained from LIF are located in weak polarity or non-polarity area. One reason is that derivatization can change the polarity of the components, and the other is that components with weak or non-polarity might be labeled more easily. This result also suggests selectivity difference between these two methods over the real protein sample. In addition, selective label of complex sample by changing reaction conditions (such as pH and reaction media) enables to achieve high sensitive detection of low abundance proteins and peptides with better selectivity.

Keywords Proteins; Peptides; Laser-induced fluorescence; High performance liquid chromatography

(Received 10 November 2010; accepted 29 December 2010)

—————

本刊“研究快报”征稿启事

本刊从 2009 年起增设“研究快报”栏目,该栏目是高水平科研论文快速交流的“绿色通道”,稿件投递之日起 2~3 个月内刊出。投稿要求是论文的创新性强、学术价值高,投稿时需要对文章的学术价值和创新性进行简要地说明,突出论文的创新思想和初步的研究结果。内容包括中英文题目、作者、单位、中英文摘要、关键词、正文、参考文献等;可将篇幅控制在 3000 字左右,并提供全文的英文译稿(在 ScienceDirect 网同步发表),以该项研究成果在更高的学术平台上交流。该论文的发表,不影响后续的工作完整地其他刊物发表。

该栏目的第一篇论文为陈焕文课题组的“鸡蛋中三聚氰胺的表面解吸常压化学电离串联质谱法成像”,论文从收稿到发表仅用了 49 天!

本刊希望将我国的分析化学学者创新性的研究成果通过本刊“研究快报”栏目,以最快的速度发布,推动我国分析化学学科快速发展。迄今该栏目已经发表论文近十篇,编辑希望这个有特色的栏目得到更多关注。有意在此栏目发表的来稿,请注明“研究快报”栏目。