

高效液相色谱法在蛋白质分离检测中的应用

吴少辉, 张成桂, 刘光明

(大理学院药学院, 云南 大理 671000)

摘要:生物活性肽以其独特的吸收机制、极强的活性和多样性成为国内外研究的热点,其分离与分析技术是生物技术实现产业化的重中之重。高效液相色谱法以其重复性好、分辨率高等优势成为最有效、最常用的方法。主要介绍了高效液相色谱技术在多肽类物质分离、分析上的应用。

关键词:多肽;分离检测;高效液相色谱

中图分类号:0657.72

文献标识码:A

文章顺序编号:1672-5190(2011)08-0063-03

Application of High Performance Liquid Chromatography in the Separation and Detection of Protein

WU Shao-hui, ZHANG Cheng-gui, LIU Guang-ming

(College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China)

Abstract: The unique absorption, high activity and diversity of bioactive peptide arouse people's interest in application. It is significant to study the separation and analyses of polypeptides so as contribute to industrialization. High performance liquid chromatography (HPLC) is the effective and normal method because of its good repeatability and high resolution ratio. This paper mainly introduced the application of HPLC in the separation and analysis of polypeptides.

Key words: polypeptides; separation and detection; high performance liquid chromatography (HPLC)

生物活性肽(又称天然肽),广泛存在于自然界中,其结构上的多样性和复杂性不难看出生物活性肽有着多种多样的生物学功能(如免疫调节、抗血栓、抗氧化、抑制细菌和病毒、抗癌等作用)。鉴于此,多肽的开发及研究已逐渐成为一大热点,伴随着分离纯化技术的发展及一些新方法、新思路的应用,使得多肽类物质得到了有效的分离。

依据多肽的物理、化学及生物学特性,已有多种分离手段,如:超滤法、SDS-PAGE、亲和层析等,其中,HPLC 由于具有重复性好、分辨率高等优势^[1],在蛋白质及多肽小分子中得到了广泛的应用。

生物活性肽是指来源于细菌、真菌、动植物等,对生物机体的生命活动有益或有重要生理功能的一类生物活性物质。广泛存在于生物体的各种组织中,结构复杂多样^[2]。

自 1975 年, Hughes 首先报道从动物组织中发现了具有吗啡活性的小肽^[3],1902 年伦敦大学医学院的 Buyliss 等首次发现活性多肽物质以来^[4],已经从动物、植物及微生物中分离出多种生物活性肽。

近一个世纪的研究表明,肽是由 20 个天然氨基酸以不同的组成和排列方式构成的二肽到复杂的线性和环形结构的不同肽类的总称,是源于蛋白质的多功能化合物。活性肽广泛存在于自然界中,生物体很多活性物质都以肽的形式存在,可以从不同的角度分类,例如:按来源分为内源性生物活性肽和外源性生物活性肽;按功能分为生理活性肽和食品感官肽;按取材分为海洋生物活性肽和陆地生物活性肽等。

1 高效液相色谱法分离纯化多肽的研究进展

随着现代科技的飞速发展,从天然产物中获取活性多肽

收稿日期:2011-08-07

基金项目:云南省重点产业创新工程基金项目(2008IF012)。

作者简介:吴少辉(1984—),男,硕士,主要研究方向为天然药物化学。

通讯作者:刘光明(1953—),男,教授,硕士生导师,主要研究方向为天然药物化学。

肽的分离、分析手段也不断得到提高,并出现一些新方法,多肽提取分离常用的方法包括化学萃取法(如醇提、丙酮法)、酶解法、沉淀法、超滤法、逆流分溶法、层析法、电泳法等。

高效液相色谱(HPLC)是生物技术中分离纯化的重要方法,在多肽、蛋白质的分离纯化工艺中显示出优异的性能^[5],RP-HPLC 特别适用于质量不大的蛋白质和多肽物质的分离纯化,主要用于分子量低于 5 000,尤其是 1 000 以下的非极性小分子多肽的分析和纯化,具有十分高的分辨力^[6],常见的有高效离子交换色谱、高效凝胶过滤色谱、反相高效液相色谱和高效亲和液相色谱等。

1.1 反向高效液相色谱 反相高效液相色谱是利用非极性的反相介质为固定相,极性有机溶剂或其水溶液作为流动相,根据溶质疏水性的差别进行分离纯化的洗脱色谱法^[7]。

该方法于 20 世纪 80 年代后应用于蛋白质、多肽、核酸的分离、纯化及鉴定,与其他色谱方法相比,RP-HPLC 具有分辨率和回收率高、重复性好和操作简便等优势。另外,在 RP-HPLC 中,蛋白质分子通过色谱柱时会发生或多或少的去折叠,内部某些疏水残基暴露并与固定相相互作用,从而表现出与其他色谱及电泳方法不同的选择性^[8]。在混合肽的分离中,可通过对流动相和固定相的调控来提高分离效率^[9],包括改变样品的离子对性质、固定相上分布的功能基团、色谱柱规格以及温度、pH 值等^[10],严作廷等通过 HPLC 对奶牛子宫内脱洗样品进行分离,纯化出一个新的抗菌肽分子^[11]。

1.2 高效亲和液相色谱 高效亲和液相色谱是将经典亲和色谱的高特异性同高效液相色谱的快速、高效相结合产生的一种蛋白质的分离技术。多数蛋白质都可以用该方法得到纯化,特别适合糖蛋白、疫苗等的分离纯化,在蛋白质化学中有着广泛的用途^[12],杨祖英等采用高效亲和色谱柱(Pharmacia HI-Trap Protein G 柱),在 pH 值为 2.5 的盐酸条

件下洗脱 IgG 进行测定^[13]。

1.3 高效离子交换色谱 高效离子交换色谱(HPIEC)是根据蛋白质分子在一定 pH 值和离子强度条件下所带电荷的差异进行分离的方法。由于 HPIEC 是一吸附性的梯度洗脱过程,所以具有很好的负载力。李蓉等^[14]采用高效阳离子交换色谱分离纯化蛋清中的溶菌酶,该方法较传统软基质低压离子交换色谱分离速度快、纯化效率高。

1.4 高效凝胶过滤色谱 高效凝胶过滤色谱是根据分子相对大小进行分离的一种色谱技术。该技术较温和,适用范围较广,如:平衡柱、分离样品的缓冲液等。Bunger 等分离出了疏水性的表面活性剂蛋白^[15]。

1.5 超临界流体色谱 超临界流体色谱(SFC)始于 20 世纪 60 年代,是采用接近或超过临界温度和临界压力的高压流体作为流动相的一种新颖的色谱技术^[16],具有分离速度快、柱效高、分离温度低和易保持生物产品的生物活性等特点。主要分为两大类,一类是以向 GC 技术接近并在早期是主流方向的毛细管超临界流体色谱技术(cSFC),另一类是向 HPLC 技术靠近的填充柱超临界流体色谱技术(pSFC),该技术在成分富集、分离纯化的应用上取得了突破^[17]。用于 SFC 分析的天然产品种类比较多,如热不稳定的天然脂类、甾类化合物、多元不饱和脂肪酸及其酯、天然色素、氨基酸、糖类等。

1.6 毛细管电色谱法 毛细管电色谱法(CEC)是近 10 年来综合了现代最新分离技术 HPLC 和毛细管电泳(CE)的优势而发展起来的高效电分离微柱液相色谱技术^[18-20]。1952 年, Mould 和 Synge 首次在色谱分析上以电渗流驱动在薄层色谱分离了胶棉中的多糖化合物^[21],之后该技术于 1974 年由 Pretorius 等首先成功提出,但当时并没有引起足够的重视^[22]。近年来,CEC 技术用于分子生物学领域,将更有效、快速地分离生物分子,特别是在核酸、蛋白质和小肽等方面的应用有着广泛的前景。随着生命科学的发展,新型、快速、高效的蛋白质分离、分析技术对蛋白质组学的发展具有十分重要的意义^[23-24],CEC 的出现为生物样品的分离提供了一条新的途径。赵良娟等^[25]采用反相梯度 Pcec-UV 在 7.5 min 内实现了核糖核酸酶 A、细胞色素 C、溶菌酶和肌红蛋白等 4 种蛋白质的分离。Gucek 等^[26]采用无鞘流式 CEC-纳流 ESI-ESI 对混合肽进行分析,建立了一种高灵敏检测肽类物质的新方法,Fu 等研究用亲水离子 CEC(HI-CEC)很好地分离了 9 种小肽,由于毛细管电色谱高效且选择性高等优势,近十几年来,其应用得到了长足的发展,但整个技术至今尚未标准化^[27],还存在不少问题。

1.7 径向色谱法 径向流色谱的色谱分离利用物质在两相中的分配系数差异来进行分离,当两相作相对移动时,被分离物质在两相间经反复多次分配,原来微小的分配差异便会产生很大的效果,从而使各组分分离^[28],具有操作压力低、线性放大容易、分离效率高等优点,目前,该技术主要集中在离子交换径向流分离纯化蛋白质和核酸方面。郭立安等^[29]利用径向离子交换色谱技术从促性腺激素(HMG)的粗提物中很好地分离纯化了促卵泡激素(FSH)。孙涛等^[30]利用国产膜径向离子交换色谱柱分离纯化了 Nitschmann 组分中凝血酶 III 中的凝血酶原复合物,该色谱的应用,使色谱过

程的流速大为提高。

1.8 多维高效液相色谱法 多维高效液相色谱法(MD-HPLC)系统以其快速、高效、自动化程度高以及容易与质谱等其他技术联用等优势而成为蛋白质组学相关分析技术中研究的热点,也受到食品卫生^[31]以及环保^[32]等领域的重视。该技术是指将样品注入呈正交分布的多个分离体系中,样品中各组分以进样点为原点在多维的分离方向上展开,是目前解决复杂体系分离、分析问题最有前景的手段^[33],尽管多维高效液相色谱最适合分离复杂化合物,但它也适用于对含有相对简单目标化合物的混合物进行快速扫描分析。刘少华等^[34]通过多维高效液相色谱结合动物试验,从舟山黄海葵粗毒中筛选了多种具有强杀虫活性以及低哺乳动物活性的杀虫肽。总之,该技术可以提供很高的峰容量,以满足复杂体系样品分析的需要。

2 高效液相色谱法与其他分离方法的联用

多肽的种类很多而且大多具有相似性,使用单一的分离纯化手段已经不能达到理想的分离纯化效果,HPLC 具有不能大规模制备、费时等缺点,因此与其他分离方法的联用具有巨大的优点。赵晖等^[35]通过阳离子交换柱 SP-Sephacrose、AKTA Superdex 75 及 RP-HPLC 对人精浆中小分子抗菌肽逐级纯化。齐珂珂等^[36]使用氯化铵裂解、超声波破碎、醋酸提取、CM-Sephacrose F F 弱酸性阳离子交换柱 RP-HPLC 等方法,从鸵鸟白细胞中分离纯化出了抗菌肽,同时应用二级质谱(MS/MS)对抗菌肽的分子量和氨基酸序列进行了测定。钟山等^[37]应用 Sephadex DEAE A-50 阴离子交换树脂色谱、Sephadex G25 和 Sephadex LH-20 凝胶过滤色谱及 RP-HPLC 分离纯化水蛭抗凝血活性多肽,并采用 HPLC 及 SDS-PAGE 鉴定了化合物的纯度,并在该基础上,对其分子量及氨基酸组成进行了测定。

HPLC 与其他方法的联用,弥补了各自的不足,在蛋白多肽的分离方面有着广阔的前景^[38-39]。

3 结语与展望

在生物制品分离纯化方面,高效液相无疑有其自身的优势,但是,一种分离手段往往不能达到纯度、量等方面的要求。因此,应该在现有分离技术的基础上,进一步优化组合,将各种分离手段的优势结合起来,在多肽的分离纯化中发挥更强大的作用,同时,更进一步地深入研究各种色谱方法,使得更为复杂的生物样品得到分离,从而对我国药品产业做出贡献。

参考文献:

- [1] JANSION J C, RYDEN L. Protein Purification-Principle, High Resolution Methods and Applications [M]. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1998: 239-282.
- [2] 王浩. 蚕蛹蛋白肽的制备及其功能活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2007.
- [3] HUGHES J T. Isolation of an endogenous compound from the brain with the pharmacological properties similar to morphine [J]. J Brain Res, 1975, 88(3): 295-298.
- [4] BABARCZY E, SZABÓ G, TELEGDY G. Effects of secretin on acute and chronic effects of morphine [J]. Pharmacology Biochemistry Behavior, 1995, 51(2/3): 469-472.

- [5] 韩香,顾军.高效液相色谱法在合成多肽分离与纯化中的应用[J].天津药学,2003,15(16):42-44.
- [6] SANZ-NEBOT V, BENAVENTE F, TORO I, et al. Optimization of HPLC conditions for the separation of complex crude mixtures produced in the synthesis of therapeutic peptide hormones[J].Chromatographia, 2001, 53(1): 167-173.
- [7] SMITH D D, SAHA S, FANG G, et al. Modifications to the N-terminus but not the C-terminus of calcitonin gene-related peptide (8-37) produce an-agonists with increased affinity [J].Med Chem, 2003, 46(12): 2427-2435.
- [8] 白泉,葛小娟.反相液相色谱对多肽的分离、纯化与制备[J].分析化学简报, 2002, 30(9): 1126-1129.
- [9] 于世林.高效液相色谱法及应用[M].北京:化学工业出版社, 2000: 252-258.
- [10] DORSEY J G, COOPER W T, WHEELER J F et al. Liquid chromatography: theory and methodology [J].Anal Chem, 1994, 66(12): 500R-546R.
- [11] 严作廷,米宝明,宗瑞谦,等.奶牛子宫内黏膜黏液抗菌肽的分离纯化[J].中国奶牛, 2010(7): 6-8.
- [12] DAVID S. Hage, high-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding [J].Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2002, 768(1): 3-30.
- [13] 杨祖英,宋书锋.高效亲和色谱法测定初乳素免疫球蛋白 IgG [J].卫生研究, 2003, 32(1): 53.
- [14] 李蓉,陈国亮.高效离子交换色谱法分离纯化蛋清中的溶菌酶[J].色谱, 2002, 20(3): 259-261.
- [15] BUNGER H, KAUFNER L, PISON U. Quantitative analysis of hydrophobic pulmonary surfactant protein by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection [J].J Chromatogr A, 2000, 870(1/2): 363-369.
- [16] HARRIS C M. The SFC comeback [J].Analytical Chemistry, 2002, 74(3): 87-91.
- [17] JIN D P, PENG G P, LU X F. The analysis and preparation of packed-column supercritical fluid chromatography in Chinese medicine [J].Chin Arch Tradit Chin Med, 2006, 24(23): 541-542.
- [18] ZHANG K, YAN C, YAO C Y, et al. Separation of basic drugs using pressurized capillary electrochromatography [J].Chin J Chem, 2003, 21(4): 419.
- [19] ZHANG K, YAN C, ZHANG Z C. Application of gradient pressurized capillary electrochromatography [J].Chin Chem Lett, 2003, 14(6): 611.
- [20] YAN C, GAO R Y. Separation of peptides by reversed phase PCEC [J].J Instrum Anal, 2003, 22(3): 32.
- [21] MOULD D L, SYNGE R L M. Electrokinetic ultrafiltration analysis of polysaccharides. A new approach to the chromatography of large molecule [J].Analyst, 1952, 77 (921): 964-969.
- [22] PRETORIUS V, HOPKINS B J, SCHIEKE J D. Electro-osmosis: A new concept for high-speed liquid chromatography [J].Journal of Chromatography A, 1974, 99: 23-30.
- [23] NEVEROVA I, VANEYKJ E. Role of chromatographic in proteomic analysis [J].J Chromatogr B, 2005, 81(1/2): 51-63.
- [24] HACHEY D L, CHAURAND P J. Proteomics in reproductive medicine: the technology for separation and identification of proteins [J].J Reprod Immunol, 2004, 63(1): 61-73.
- [25] ZHAO L J, ZOU J J, WANG X L, et al. Separation of protein by pressurized capillary electrochromatography [J].Se Pu, 2005, 23 (6): 669-672.
- [26] GUCEK M, GASPARI M, WALHAGEN K, et al. Capillary electrochromatography/nanoelectrospray mass spectrometry for attomole characterization of peptides [J].Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2000, 14(16): 1448-1454.
- [27] FU H, JIN W. Peptides separation in hydrophilic interaction capillary electrochromatography [J].Electrophoresis, 2003, 24 (12/13): 2084-2091.
- [28] 谭天伟.生物化学工程[M].北京:化学工业出版社, 2008: 284.
- [29] 郭立安,阎哲,杨晓东,等.促卵泡激素的径向色谱纯化工艺[J].色谱, 2000, 18 (6): 577-579.
- [30] SUN T, CHEN G, LIU Y P, et al. Purification of human prothrombin from Nitschmann fraction III: using DEAE membrane radial flow chromatography [J].Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2000, 742(1): 109-114.
- [31] MOMOSE T, MURE M, LIDA T, et al. Method for separation of the unconjugates and conjugates of chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid by two-dimensional reversed-phase thin-layer chromatography with methyl β -cyclodextrin [J].J Chromatogr A, 1998: 811(1/2): 171-180.
- [32] PATRICK D W, STRAND D A, CORTES H J. Automation and optimization of multidimensional microcolumn size exclusion chromatography-liquid chromatography for the analysis of photocrosslinkers in Cyclotene 4000 series advanced electronic resins [J].J Sep Sci, 2002, 25(8): 519-526.
- [33] GIDDINGS J C. Two-dimensional separation: concept and promise [J].Anal Chem, 1984, 56: 1258A-1270A.
- [34] 刘少华,杨林,章晨,等.舟山黄海葵杀虫活性多肽的初步研究[J].浙江海洋学院学报:自然科学版, 2010, 29(6): 556-571.
- [35] 赵晖,申吉泓,李文辉,等.人精浆小分子抗菌肽的分离鉴定[J].四川大学学报, 2008, 39(5): 842-846.
- [36] 齐珂珂,康相涛,陈丽颖,等.鸵鸟白细胞抗菌肽的分离纯化及部分性质研究[C]//中国家禽业——机遇与挑战:第十三次全国禽业学术讨论会论文集.北京:中国农业科学技术出版社, 2007: 662-666.
- [37] 钟山,杨得坡,崔征.水蛭抗凝血活性成分的研究[J].中国中药杂志, 2008, 33(23): 2781-2784.
- [38] 陈华友,张春霞,马晓珂,等.蛋白质分离纯化策略[J].安徽农业科学, 2009, 37(36): 17849-17851, 17853.
- [39] 谢云,程朋真,杨赛,等.免疫八肽 HPLC 分析方法研究[J].安徽农业科学, 2010, 38(1): 4-5, 100.

(责任编辑:慕宗杰)