

## 梯度加压毛细管电色谱分离蛋白质

赵良娟<sup>1</sup>, 邹娟娟<sup>3</sup>, 王秀丽<sup>3</sup>, 阎超<sup>3</sup>, 高如瑜<sup>2</sup>, 刘明羽<sup>4</sup>, 吕宪禹<sup>1</sup>

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 南开大学元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071;  
3. 通微(上海)分析技术有限公司, 上海 201203; 4. 中国农业大学, 北京 100094)

**摘要**: 以 1.5  $\mu\text{m}$  无孔硅胶颗粒 (non-porous silica, NPS) 为固定相, 采用电压和压力联合驱动流动相, 用反相梯度加压毛细管电色谱 (p-CEC) 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 种蛋白质的快速、高效的分离。比较了梯度加压毛细管电色谱和微柱液相色谱 ( $\mu\text{-HPLC}$ ) 分离蛋白质的结果, 同时考察了固定相、离子对试剂三氟醋酸 (TFA) 浓度和电压等条件对梯度加压毛细管电色谱分离蛋白质的影响。结果表明, 梯度 p-CEC 可以通过调节电压精细调节带电溶质的保留, 提高分离选择性, 缩短分离时间, 得到较高的柱效。该方法在蛋白质分离分析及蛋白质组学的研究中具有很大的应用潜力, 为高效快速地分离蛋白质开辟了新的途径。

**关键词**: 梯度洗脱; 加压毛细管电色谱; 反相色谱; 蛋白质

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2005)06-0669-04

## Separation of Proteins by Gradient Pressurized Capillary Electrochromatography

ZHAO Liangjuan<sup>1</sup>, ZOU Juanjuan<sup>3</sup>, WANG Xiuli<sup>3</sup>, YAN Chao<sup>3</sup>,  
GAO Ruyun<sup>2</sup>, LIU Mingyu<sup>4</sup>, LÜ Xianyu<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. State Key Laboratory of Elemento-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. Unimicro (Shanghai) Technologies Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 4. China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract**: The separation of four proteins including RNase A, cytochrome C, lysozyme and myoglobin was investigated by reversed-phase gradient pressurized capillary electrochromatography (p-CEC) with 1.5  $\mu\text{m}$  non-porous silica  $\text{C}_{18}$  stationary phase. This mode was compared with micro-high performance liquid chromatography ( $\mu\text{-HPLC}$ ) and the effects of applied voltage, stationary phase and concentration of ion-pairing agent (trifluoroacetic acid, TFA) on the gradient p-CEC were also studied. This separation was performed rapidly on a new CEC instrument Trisep<sup>TM</sup> 2010 GV. The results showed that the retention mechanism of proteins in p-CEC mode is based on both chromatographic partitioning and electrophoretic migration. The results also demonstrated that p-CEC may have great potential for fast and efficient separation of proteins.

**Key words**: gradient elution; pressurized capillary electrochromatography; reversed-phase chromatography; proteins

随着生命科学的迅猛发展, 蛋白质组学已成为当今的前沿科学, 其重要性和战略意义日益显著。发展新型、快速、高效的蛋白质分离分析技术对蛋白质组学及整个生命科学的发展具有十分重要的意义<sup>[1, 2]</sup>。尽管高效液相色谱 (HPLC) 被公认是有效的分离手段之一, 但由于蛋白质结构的复杂性, 常常导致其色谱行为不理想。毛细管电泳 (CE) 作为新型的分离技术, 具有较高的分离效率, 在大分子的分

离方面显示出卓越的分性能, 但其缺乏对分离物的多种选择性, 限制了分离潜力的发挥。因此, 关于蛋白质快速、高效的新型分离方法的研究备受关注。毛细管电色谱 (capillary electrochromatography, CEC) 结合了毛细管电泳的高效性和高效液相色谱的高选择性, 是一种新型的微柱分离分析技术<sup>[3]</sup>, 具有快速、高选择性、溶剂消耗少、样品上样量少、易于与质谱联用等优越性能, 已成为对蛋白质等生物

大分子分离分析极具吸引力的方法,它的出现为蛋白质的分离分析提供了一条新的有效途径<sup>[4]</sup>。但目前 CEC 主要是以电驱动流动相为分离模式<sup>[5,6]</sup>,操作中易产生气泡,使其使用受到很大的限制<sup>[7]</sup>。加压毛细管电色谱(pressurized capillary electrochromatography, p-CEC)的出现解决了长限制 CEC 广泛使用的问题。p-CEC 克服了仅靠电渗流驱动的一些限制因素,可方便地对流动相组成、性质、流速进行调节,抑制气泡的形成,尤其能实现梯度洗脱,是 CEC 发展的重要方向<sup>[8,9]</sup>。目前,采用梯度加压毛细管电色谱已成功地分离了碱性药物<sup>[10]</sup>和多肽混合物<sup>[11,12]</sup>,取得了很好的分离效果。

本文以 1.5  $\mu\text{m}$  无孔硅胶(non-porous silica)  $\text{C}_{18}$  柱为固定相,采用反相梯度 p-CEC,在 7.5 min 内成功地分离了核糖核酸酶 A、细胞色素 C、溶菌酶和肌红蛋白等 4 种蛋白质混合物。结果表明,梯度 p-CEC 用于蛋白质的快速高效分离具有很大潜力。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Trisep<sup>TM</sup>-2010 GV 三用电色谱仪(Unimicro Technologies, Inc., Pleasanton, CA, USA)。1.5  $\mu\text{m}$  无孔硅胶  $\text{C}_{18}$  柱,采用电填充法制备(Unimicro Technologies, Inc., 通辽)。

三氟乙酸(TFA)购于上海化学试剂厂。乙腈(色谱纯)购于 Merck 公司。核糖核酸酶 A(RNase A, Sigma 分装),肌红蛋白(myoglobin, Sigma 分装),溶菌酶(lysozyme, 上海生化所东风生化技术公司),细胞色素 C(cytochrome C, Sigma 分装)。水为二次蒸馏水。

### 1.2 样品制备

分别将蛋白质样品用水配制成 1 g/L 溶液,在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下保存。将 4 种蛋白质溶液混合,并稀释成每种蛋白质质量浓度均为 125 mg/L 的混合样品。

### 1.3 电色谱条件

流动相 A 为 0.1% TFA-5% 乙腈,流动相 B 为 0.1% TFA-80% 乙腈;采用双泵调节实现梯度洗脱,梯度程序为 75% A  $\xrightarrow{10 \text{ min}}$  20% A,流速 0.05 mL/min。施加在毛细管柱上的压力为 16.0 MPa;工作电压为 -5 kV;检测波长为 214 nm,柱上检测;进样体积为 20 nL。

## 2 结果与讨论

### 2.1 梯度加压毛细管电色谱与微柱液相色谱分离蛋白质的比较

实验比较了 p-CEC 和微柱液相色谱( $\mu$ -

HPLC)在梯度洗脱条件下对核糖核酸酶 A、细胞色素 C、溶菌酶和肌红蛋白的分离情况,结果见图 1。在梯度 p-CEC 模式下,由于电渗流与压力流的叠加,柱内流速会比单纯采用压力流时的流速快。在实验条件下,4 种蛋白质都带正电荷,因此电渗流、压力流和电泳方向都是相同的。从图 1 中可看到,用  $\mu$ -HPLC 在 9 min 内可实现 4 种蛋白质的分离,而 p-CEC 只需 7.5 min,分离速度明显比  $\mu$ -HPLC 快,而且 p-CEC 分离蛋白质的峰形尖锐,灵敏度高,甚至能分离一些小杂质峰。

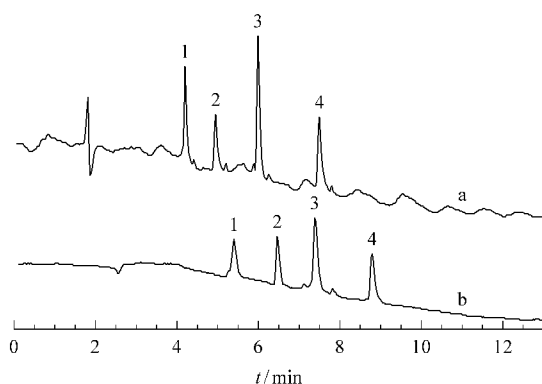


图 1 加压毛细管电色谱(a)和微柱液相色谱(b)分离蛋白质的色谱图

Fig. 1 Comparison of p-CEC (a) and  $\mu$ -HPLC (b) for the separation of four proteins

Experimental conditions: column, 1.5  $\mu\text{m}$  non-porous silica  $\text{C}_{18}$ ; mobile phase A, 0.1% TFA in 5% acetonitrile; mobile phase B, 0.1% TFA in 80% acetonitrile; linear gradient, mobile phase A from 75% to 20% in 10 min; voltage, a. -5 kV, b. 0 V; UV-Vis detection at 214 nm; injection volume, 20 nL; pressure, 16.0 MPa.

Peaks: 1. RNase A; 2. cytochrome C; 3. lysozyme; 4. myoglobin.

通过色谱软件计算分别得到在 p-CEC 和  $\mu$ -HPLC 条件下分离 4 种蛋白质的柱效,结果见图 2。从图 2 可看出, p-CEC 分离 4 种蛋白质的柱效明显高于  $\mu$ -HPLC,其中用 p-CEC 分离溶菌酶的柱效是用  $\mu$ -HPLC 分离时的 1.8 倍。结果说明, p-CEC 对于蛋白质的分离具有更高的柱效。

以上的实验结果说明,与  $\mu$ -HPLC 相比, p-CEC 可以通过调节电压精细调节带电溶质的保留,缩短分离时间,获得更高的柱效,使蛋白质样品在更短的时间内得到快速和高效的分离。

### 2.2 1.5 $\mu\text{m}$ 无孔硅胶色谱柱的优越性

小粒径的无孔微球在肽和蛋白质的分离中表现出明显的优势,在蛋白质的普通液相色谱分离方面具有很大的应用潜力。但随着填料颗粒的变小,液相色谱的操作压力也随之升高,限制了它在液相色谱中的应用。由于毛细管电色谱中用电驱动流动相,因此不存在 HPLC 反压升高问题,这就使得应用

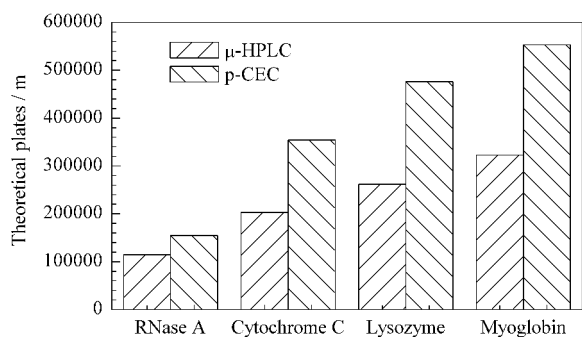


图 2 微柱液相色谱和加压毛细管电色谱分离 4 种蛋白质的柱效比较图

Fig. 2 Column efficiencies for the separation of the four proteins with p-CEC and  $\mu$ -HPLC

For experimental conditions, see Fig. 1.

固定相粒度更小的小粒径 ( $1 \sim 2 \mu\text{m}$ ) 无孔微球毛细管电色谱柱成为可能。

实验比较了采用梯度 p-CEC, 在  $1.5 \mu\text{m}$  无孔硅胶  $C_{18}$  和  $3 \mu\text{m}$  普通  $C_{18}$  两种电色谱柱上分离核糖核酸酶 A、细胞色素 C、溶菌酶和肌红蛋白等 4 种蛋白质混合物的分离结果, 结果见图 3。从图 3 中可看出, 在 p-CEC 分离方式下  $3 \mu\text{m}$  普通  $C_{18}$  柱洗脱 4 种蛋白质需近 10 min, 而  $1.5 \mu\text{m}$  无孔硅胶  $C_{18}$  柱只需 7.5 min; 而且  $3 \mu\text{m}$  普通  $C_{18}$  柱对 4 种蛋白质的分离效果不如  $1.5 \mu\text{m}$  无孔硅胶  $C_{18}$  柱好, 尤其是肌红蛋白吸附于固定相上, 不能很好地洗脱下来而产生明显的拖尾。这主要是由于在 p-CEC 中,  $1.5 \mu\text{m}$  无孔硅胶  $C_{18}$  柱利用小粒径无孔微球的外表面代替多孔介质的内表面, 用微球间的间隙作为大分子的通道, 大大加快了传质速率, 同时避免了蛋白质在多孔材料孔内的吸附, 使分离速度提高, 分离峰变得尖锐。结果表明,  $1.5 \mu\text{m}$  无孔硅胶  $C_{18}$  柱分离蛋白质具有分离快速、峰形尖锐的优势, 在蛋白质的 p-CEC 分离中有很大的应用潜力。

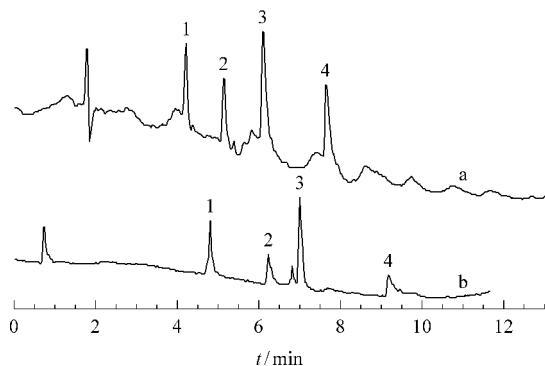


图 3 采用梯度 p-CEC 在  $1.5 \mu\text{m}$  无孔硅胶  $C_{18}$  柱 (a) 和  $3 \mu\text{m}$  普通  $C_{18}$  柱 (b) 上分离 4 种蛋白质的色谱图

Fig. 3 Separation of the four proteins using  $1.5 \mu\text{m}$  non-porous  $C_{18}$  silica (a) and  $3 \mu\text{m}$  ordinary  $C_{18}$  silica (b) in p-CEC

For experimental conditions and peaks, see Fig. 1-a.

## 2.3 TFA 浓度(体积分数)对 p-CEC 分离的影响

TFA 是反相 HPLC 分离多肽和蛋白质研究中最常使用的离子对试剂。由于蛋白质与 TFA 可形成离子对, 增加了蛋白质的疏水性, 因而可增加蛋白质在  $C_{18}$  柱上的保留。TFA 还可改善色谱峰的峰形和分离度。实验中分别以 0.03%、0.05% 和 0.1% 的 TFA 为离子对试剂, 考察了 TFA 浓度变化对 p-CEC 分离蛋白质的影响, 结果见图 4。从图 4 中可看到, TFA 浓度变化对蛋白质的保留、分离度和峰形有一定的影响。随着 TFA 浓度的提高, 4 种蛋白质的峰形变锐, 分离度提高, 一些小杂质峰也能被分离; 在 0.1% TFA 条件下 4 种蛋白质的分离效果最好。这主要是由于低浓度的 TFA 不能有效地抑制硅醇基解离, 因而使得碱性蛋白质吸附于固定相上, 引起峰拖尾, 使峰形展宽; 在一定的浓度范围内, 高浓度的 TFA 能有效地抑制硅醇基解离, 使蛋白质很好地洗脱下来, 色谱峰尖锐。实验结果表明, 0.1% TFA 作为离子对试剂是梯度 p-CEC 分离蛋白质的较好选择。

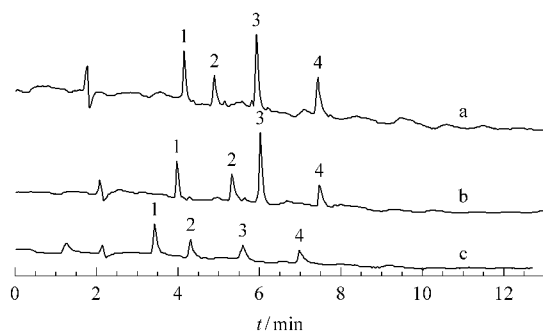


图 4 TFA 浓度对 4 种蛋白质分离的影响

Fig. 4 Chromatograms of the four proteins by gradient p-CEC in different concentrations of TFA

Fraction volumes of TFA: a. 0.1%; b. 0.05%; c. 0.03%. Mobile phase A: TFA in 5% acetonitrile; mobile phase B: TFA in 80% acetonitrile. For other conditions and peaks, see Fig. 1-a.

从图 4 中还可看出, TFA 浓度对蛋白质保留的影响与反相 HPLC 中有所不同。在 TFA 浓度从 0.03% 增加到 0.05% 时, 随着浓度的提高, 蛋白质的保留增强, 分离时间增加; 而当 TFA 浓度从 0.05% 增加到 0.1% 时, 浓度的变化对蛋白质的保留影响不大, 甚至随着 TFA 浓度的增加, 细胞色素 C 和溶菌酶的保留反而减弱, 洗脱时间提前。这可能是由于电压的作用改变了蛋白质的保留, 使其与 HPLC 的保留有所不同。结果进一步说明, p-CEC 的保留机理不同于单纯的液相色谱分配机理, 它的保留机理符合液相色谱分配和电泳迁移的双重机理。

## 2.4 电压对 p-CEC 分离的影响

在 p-CEC 分离蛋白质的过程中, 通过调节电压

可改变蛋白质样品的保留和分离。图 5 显示在采用 p-CEC 分离蛋白质的过程中,以 0.1% TFA 为离子对试剂时,分离电压对 4 种蛋白质保留时间的影响。以电压为横坐标,保留时间的倒数为纵坐标,结果可看出,随着电压的增高,蛋白质的保留时间缩短,分离速度加快。这是由于在实验条件下,4 种蛋白质都带正电荷,电渗流、压力流和电泳方向都是相同的,分离过程包括色谱分配和电泳迁移双重机理。随着电压的升高,电场强度增强,蛋白质的电泳迁移速率增大,因而保留时间缩短,分离速度提高。

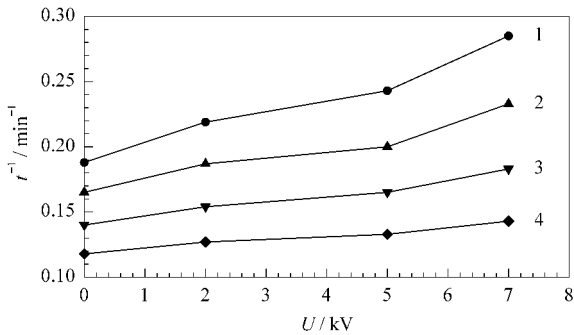


图 5 分离电压对蛋白质保留时间的影响  
Fig.5 Effect of voltages on retention time of the four proteins

For other experimental conditions, see Fig. 1-a.  
Curves: 1. RNase A; 2. cytochrome C; 3. lysozyme; 4. myoglobin.

图 6 为以 0.03% TFA 为离子对试剂时,采用 p-CEC 在不同分离电压下分离 4 种蛋白质的色谱图。从图 6 中可以看出,在不加电压的条件下(如图 6-b),溶菌酶因严重吸附在疏水性固定相上而不能被洗脱下来,因此其色谱峰不明显;而在施加 -5 kV 电压条件下(如图 6-a),溶菌酶被很好地洗脱下来,

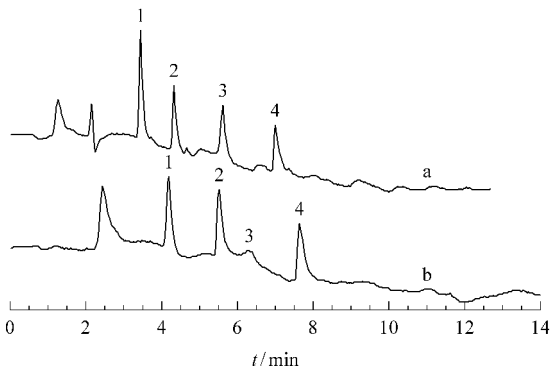


图 6 分离电压对蛋白质分离的影响  
Fig.6 Chromatograms of the four proteins by gradient p-CEC at different voltages

Mobile phase: A. 0.03% TFA in 5% acetonitrile; B. 0.03% TFA in 80% acetonitrile. Voltage: a. -5 kV; b. 0 V. For other conditions and peaks, see Fig. 1-a.

基本实现了基线分离。而且在 -5 kV 电压条件下,4 种蛋白质的洗脱时间缩短,分离速度提高,色谱峰形变得尖锐。

以上的结果说明,p-CEC 可以通过调节电压来精细调节蛋白质的保留,提高分离的选择性,缩短蛋白质的保留时间,改善峰形,提高蛋白质的分离度。同时,实验结果也表明,使用低浓度的 TFA 为离子对试剂,通过电压的调节,能够实现蛋白质的有效分离,从而减少 TFA 对硅胶色谱柱的腐蚀,增加色谱柱的使用寿命,有利于加压电色谱体系的稳定。

### 3 结论

以 1.5 μm 无孔硅胶 C<sub>18</sub> 为固定相,用反相梯度加压毛细管电色谱在 7.5 min 内实现了 4 种蛋白质的有效分离。通过和 3 μm 普通 C<sub>18</sub> 柱的对比,表明了 1.5 μm 无孔硅胶 C<sub>18</sub> 在 p-CEC 模式下分离蛋白质等生物大分子方面的优势。通过和微径液相色谱分离蛋白质的结果进行比较,表明梯度 p-CEC 的分离柱效和分离速度都优于微径液相色谱。p-CEC 可通过调节电压来精细调节带电溶质的保留,改变蛋白质样品的迁移速率,提高选择性,缩短蛋白质的分离时间。梯度加压毛细管电色谱在蛋白质的快速高效的分离分析中,具有很大的应用潜力。

### 参考文献:

[ 1 ] Neverova I, Van Eyk J E. J Chromatogr B, 2005, 815 : 51  
 [ 2 ] Hachey D L, Chaurand P J. Reproductive Immunology, 2004, 63 : 61  
 [ 3 ] Wu R A, Zou H F, Ye M L, Lei Z D, Ni J Y. Anal Chem, 2001, 73 : 4 918  
 [ 4 ] Fu H J, Huang X D, Jin W H, Zou H F. Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14 : 96  
 [ 5 ] Pyell U. J Chromatogr A, 2000, 892 : 257  
 [ 6 ] Wu Ren 'an, Zou Hanfa, Ye Mingliang, Lei Zhendeng, Ni Jianyi. Chemical Journal of Chinese Universities( 吴仁安, 邹汉法, 叶明亮, 雷振登, 倪坚毅. 高等学校化学学报), 2002, 23( 2 ): 213  
 [ 7 ] Tang Q L, Lee M L. Trends Anal Chem, 2000, 19( 11 ): 648  
 [ 8 ] Alexander J N, Poli J B, Markides K E. Anal Chem, 1999, 71 : 2 398  
 [ 9 ] Colon L A, Burgos G, Maloney T D, Gnttron J M, Rodriguez R L. Electrophoresis, 2000, 21 : 3 965  
 [ 10 ] Zhang K, Yan C, Yao C Y, Jiang Z J, Zhang Z C, Wang Q S, Gao R Y. Chinese Journal of Chemistry, 2003, 21( 4 ): 419  
 [ 11 ] Zhang K, Gao R Y, Jiang Z J, Yao C Y, Zhang Z C, Wang Q S, Yan C. J Sep Sci, 2003, 26 : 1 389  
 [ 12 ] Zhang K, Jiang Z J, Yao C Y, Zhang Z C, Wang Q S, Gao R Y, Yan C. J Chromatogr A, 2003, 987 : 453