

# 毛细管等电聚焦/加压毛细管电色谱二维分离体系 在多肽分离中的应用

魏娟 谷雪 王彦 阎超\*

(上海交通大学药学院, 上海 200240)

**摘要** 以毛细管等电聚焦(cIEF)为第一维分离模式,以反相加压毛细管电色谱(pCEC)为第二维分离模式,开展离线二维色谱分离研究,并对复杂肽段进行分离。羟丙基纤维素(HPC)涂层的毛细管用于cIEF分离,对6种标准蛋白质的平均分离柱效约为31万。在毛细管末端引进电隔离槽,方便了第一维样品的收集。在加电6kV下,第二维pCEC对多肽的分离比不加电时的分辨率和分离速度提高。实验中用牛血清白蛋白的酶解肽段对cIEF/pCEC二维体系进行考察,理论峰容量约为30000。将该平台用于人血红细胞破碎液酶解多肽的分离,7个片段共检测到约200个峰。结果表明,cIEF/pCEC二维能较好地完成对复杂多肽的分离。

**关键词** 毛细管等电聚焦; 加压毛细管电色谱; 多维分析; 多肽

## 1 引言

随着蛋白质组学研究的不断深入,对复杂生命体系样品分离分析的需要越来越迫切。多维色谱的分析方法因其高峰容量、高分辨率等特点,得到较快发展。多维技术最主要的优势在于将具有正交分离机理的色谱模式联用,获得不同寻常的峰容量。毛细管等电聚焦(cIEF)的方法便是蛋白质/多肽分离中常用的分离模式。cIEF区别于其它毛细管电泳(CE)模式的全柱进样方式及很强的浓缩能力等特点,决定了它特别适合作为多维系统中的第一维。目前,已有以微进样阀为接口的cIEF/毛细管反相液相色谱(CRPLC)联用<sup>[1]</sup>,以微透析中空纤维作接口实现的cIEF/毛细管等速电泳-毛细管区带电泳(CITP-CZE)<sup>[2]</sup>,cIEF/毛细管凝胶电泳(CGE)<sup>[3]</sup>等多种联用模式。

加压毛细管电色谱(pCEC)结合了CE与高效液相色谱(HPLC)的双重优点,采用电压和压力联合驱动力。在双重分离机制的作用下,pCEC对于样品的分辨能力得到了极大提高<sup>[4]</sup>。与HPLC和CE等方法相比,对带电物质,pCEC可以分别优化压力和电压条件,更好地调整分离物的保留和选择性<sup>[5,6]</sup>。pCEC克服了CEC的一些限制因素,可方便地对流动相组成和流速进行调节,抑制气泡的形成,尤其能实现梯度洗脱和定量进样<sup>[6]</sup>。pCEC由于其在复杂样品中的分离优势也被用于多维系统中第二维的分析。强阳离子交换(SCX)/pCEC被用在中药黄柏提取物的分离中<sup>[7]</sup>。Zhang等<sup>[8]</sup>将cIEF与纯CEC联用,用于蛋白质和多肽的分离。本研究将cIEF和pCEC结合,不仅符合机理正交的要求,而且将二者的优势相结合。期望通过多维的分离,实现峰容量的扩增,对复杂多肽样品进行高效分析。本实验以cIEF为第一维分离模式,以pCEC为第二维分离模式,开展二维离线色谱分离研究。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Trisep<sup>TM</sup>-2100GV 毛细管电色谱仪、毛细管电泳仪(美国 Unimicro Technologies 公司);熔融石英毛细管柱(河北永年锐沓色谱器件公司,CHN)。

羟丙基纤维素(HPC,美国 Sigma 公司);载体两性电解质 Pharmalyte(pH 3~10,瑞士 GE Healthcare 公司);溶菌酶(美国 Amresco 公司);细胞色素 C、肌红蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、胰蛋白酶(Trypsin from bovine pancreas,美国 Sigma 公司);核糖核酸酶 A、碳酸酐酶(上海楷洋生物技术,CHN);牛血清白蛋白(BSA,

2010-07-22 收稿;2010-09-07 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20705018)、姑苏创新创业领军人才项目(No. ZGX0727)、国家科技部农业科技成果转化资金(No. 2008902)和上海市科委科学仪器环境条件建设项目(No. 09142200202)资助课题 All rights reserved. <http://www.cnki.net>

\* E-mail: chaoyan@unimicrotech.com

上海申能博彩生物科技, CHN); 乙腈(色谱纯)。其它试剂为分析纯。实验用水为饮用纯净水。

## 2.2 样品处理

**2.2.1 人血红细胞破碎液(Human red blood cell lysate, HRBCL)的制备** 取正常人全血离心弃上清液取细胞,按体积比1:9加入新配制的0.8% (w/V)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液。涡旋振荡使细胞悬浮在溶液中,在冰上放置10 min,使红细胞破碎溶解,离心弃去沉淀。上清液为红细胞的破碎溶解液,4 °C保存待用。用Bradford法测得红细胞破碎液中蛋白质的总浓度约为67.5 g/L<sup>[9]</sup>。

**2.2.2 蛋白质的酶解方法** 取适量BSA或HRBCL样品,用新鲜配制100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  配成相应的浓度(25和6.75 g/L),煮沸2 min,冷至室温,按照蛋白质与酶的质量比50:1加入胰蛋白酶,37 °C反应12~20 h。取出后在4 °C保存待用。

## 2.3 毛细管壁的涂层及电隔离槽的制备

选用内径100  $\mu\text{m}$  毛细管,充满5% HPC(w/V),1.5 MPa下用 $\text{N}_2$ 将HPC吹出。将毛细管置于油浴中,在15 min内以恒定的速度从60 °C升至140 °C,再在140 °C油浴下保存30 min。用氮气吹10 min,室温保存待用。

取55 cm涂层毛细管,在距末端5 cm处用毛细管专用切割刀划一道裂缝,然后轻推断口处使毛细管形成一道裂纹,但不能让断口两端的毛细管错位。接着在断口外滴加3滴含10%醋酸纤维素的丙酮溶液,待丙酮挥发后在表面形成一层醋酸纤维素的薄膜。最后用环氧树脂胶将该段毛细管固定在一塑料圆槽上,即可<sup>[10]</sup>。

## 2.4 实验方法

**2.4.1 cIEF实验** HPC涂层的毛细管(55 cm  $\times$  100  $\mu\text{m}$  i. d.,有效长度35 cm),末端制备电隔离槽。阴极缓冲溶液为20 mmol/L

NaOH(含有0.1% HPC, pH 11.62),阳极缓冲溶液为20 mmol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$ (含0.1% HPC, pH 2.23)。样品含2%两性电解质、0.1% HPC。进样时用微量注射器全柱进样。进样后开启高压电源,cIEF采用动态聚焦法进行聚焦,电压20 kV,紫外检测波长280 nm。分离装置如图1所示。

**2.4.2 pCEC实验条件** 用ODS装填的石英毛细管柱(150  $\mu\text{m}$  i. d.  $\times$  20 cm, 5  $\mu\text{m}$ )作为pCEC的分析柱;流动相A为V(水):V(乙腈)=95:5(含0.1% TFA),流动相B为V(水):V(乙腈)=5:95(含0.1% TFA)。BSA酶解液的分离梯度:0~15 min,0~15% B;15~30 min,15%~25% B;30~40 min,25%~100% B。(HRBCL酶解样品的分离梯度:0~35 min,0~50% B;35~40 min,50%~100% B)。泵流速0.06 mL/min;1  $\mu\text{L}$ 进样环;分流比51:1;检测波长214 nm;电压6 kV。

**2.4.3 cIEF/pCEC二维体系** 将BSA和HRBCL的酶解肽段分别进行二维分析。BSA酶解肽段先进行第一维cIEF分离,按时间每隔8 min收集一次馏分,共8个馏分,馏分收集在装有4  $\mu\text{L}$ 纯水的收集装置中(HRBCL的第一维cIEF每6 min收集一个馏分,共收集7个馏分)。重复进样3次并收集馏分。将相同时间段收集的馏分合并,然后分别进行第二维pCEC分析。进样时,将收集的样品注入进样环后关掉pCEC的分流装置,待压力升到10 MPa,关闭输液泵。由于相对的密闭状态,系统残余的压力在100% A相的条件下将环内样品全部推入到色谱柱内。然后再打开分流阀和泵,待系统稳定后开始梯度洗脱,分析样品。

## 3 结果与讨论

### 3.1 cIEF分离条件的选择和评价

cIEF的毛细管柱选用HPC进行涂层,不仅可以抑制样品的吸附,同时可以将EOF控制在一定范围

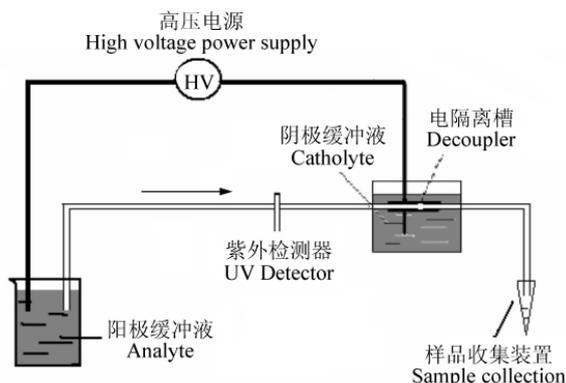


图1 cIEF分离及样品收集示意图

Fig.1 Schematic diagram of capillary isoelectric focusing(cIEF) separation and collection

内,提高 cIEF 的分析效果。与未涂层的毛细管相比,其对蛋白质的分离能力和柱效都有所提高。尤其是对酸性蛋白质的分离效果有明显改善。在缓冲介质中加入 0.1% HPC,又可以进一步减少蛋白质的吸附,维持涂层的稳定。为保证第二维 pCEC 的进样量,cIEF 分离毛细管的内径越大,长度越长进样量也会相应增大;但当内径超过 100  $\mu\text{m}$  时,cIEF 的分辨率会明显下降,并且会出现平头峰<sup>[11]</sup>。长度过长,施加的电压也相应更高,操作难度加大。最终一维 cIEF 选用内径为 100  $\mu\text{m}$  的石英毛细管,两极间的长度为 50 cm。总的进样体积约 4  $\mu\text{L}$ 。聚焦电压 20 kV(400 V/cm)。

本实验中的 cIEF 方法属于一步法,样品的推动依靠电渗流不需要其它的外力,因而不会对 cIEF 的分辨率产生影响,同时也使操作更加简便。用 6 种标准蛋白质和标准蛋白酶解肽段对建立的 cIEF 方法进行考察。图 2a 中 6 种标准蛋白质按照等电点聚焦得到了很好的分离,平均柱效可以达到 31 万。另外,此系统对低浓度的肽段也可以实现高柱效和高分辨率的分离。随着样品复杂程度及样品浓度的增加,样品超载和样品的等电点重合的问题给 cIEF 的精密分离造成一定困难(如图 2b)。因此对复杂样品的分离可以在 cIEF 后引入第二维,提高分离能力。

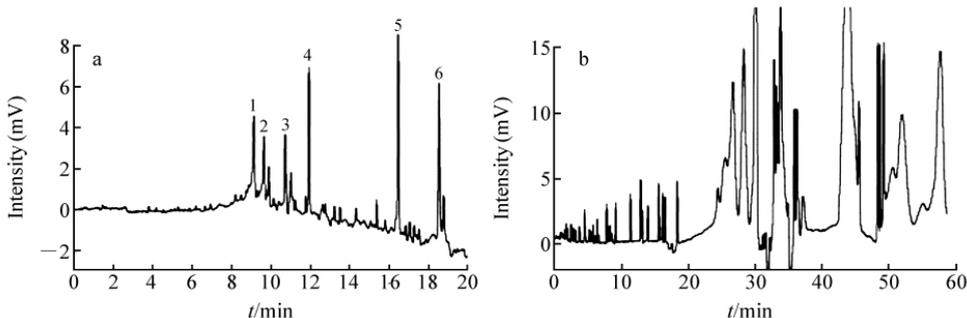


图 2 毛细管等电聚焦分离标准蛋白质(a)和 BSA 酶解肽段(b)图谱

Fig. 2 cIEF separation of 6 standard proteins(a) and BSA digests(b)

a: 1. 溶菌酶(Lysozyme, pI 11.0) 2. 细胞色素 C(Cytochrome C, pI 10.25) 3. 核糖核酸酶 A(RNAase A, pI 9.45) 4. 肌红蛋白(Myoglobin, pI 7.07) 5. 碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, pI 6.6) 6.  $\beta$ -乳球蛋白( $\beta$ -lactoglobulin, pI 5.1)。1~6 浓度分别为(The concentration of 1~6 are respectively) 30, 40, 40, 10, 20, 20 mg/L; b: 8.3 g/L BSA 胰蛋白酶解肽段(Tryptic digests of 8.3 g/L BSA), 检测波长(Detection wavelength) 280 nm。

### 3.2 pCEC 分离多肽条件

选用添加了 0.1% 三氟乙酸的乙腈-水作为流动相。确定合适的梯度后,在硅胶填充柱两端加不同电压进行比较。在 6 kV 时,pCEC 肽段的分离效果最好(图 3),平均柱效约为 180000。比不加电时对肽段的分离在分辨率上有明显改善,分离时间也较短。这可能是因为在酸性的流动相(pH 1.5)中,样品多带正电,在加电的条件下可以产生泳动,为分离提供了更多的动力。在两维分析中,一维收集的样品注入进样环后,在“进样”状态下随着流动相 A 的推动进入 pCEC 柱头,样品中的两性电解质由于极性较大被 A 相很快洗脱,多肽则在反相色谱柱的柱头得到保留形成一定的预富集,使系统更加可靠。

### 3.3 用 BSA 酶解肽段评价 cIEF/pCEC 体系

在 cIEF/pCEC 系统中,第一维的 cIEF 毛细管两端加电压后,两性的样品组分依据等电点(pI)不同,分布在不同的区段实现分离。所以第一维的分离机理是根据样品的等电点进行分离。在 pCEC 中,由于溶质带电情况不同具有不同的电泳淌度,另外自身性质的差别在固定相和流动相中

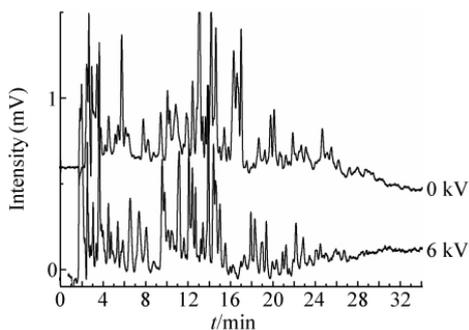


图 3 pCEC 分离 BSA 酶解肽段的图谱

Fig. 3 Prossurized capillary electrochromatographic(pCEC) separation of BSA tryptic digests (Applied voltage): 0 或(or) 6 kV; 检测波长(Detection wavelength): 214 nm; 样品浓度为 8.3 g/L BSA 酶解肽段(The sample is 8.3 g/L BSA digests), 进样环(Sample loop) 1  $\mu\text{L}$ 。http://www.cnki.net

分配系数不同又得到进一步分离。这两种机理和 cIEF 的分离机理完全不同。cIEF/pCEC 是建立在 3 种正交机理上的二维分离体系。cIEF/pCEC 系统的多种分离机理为复杂样品中各组分分离提供了新的方法。

为了方便 cIEF 样品的收集,在 cIEF 毛细管的末端引进电隔离槽。本实验选用多孔高聚物醋酸纤维素膜法<sup>[10]</sup>制作电隔离槽。电隔离槽的引入方便了流出组分的收集,为第二维分析提供了有利条件。一维 cIEF 较强的聚焦能力对样品起到浓缩的作用,其采用的全柱进样的方式更加确保了第二维的样品总量。末端的收集装置在收集样品前都分别预先加入 4  $\mu\text{L}$  纯水,虽然稀释了样品浓度,但保证了第二维的进样体积。cIEF 和 pCEC 单维和样品收集条件确定后,用 BSA 的酶解肽段对建立的 cIEF/pCEC 离线二维平台进行评价。二维分离图谱如图 4 所示。

cIEF 和 pCEC 单维的分离能力都是有限的,峰容量也很难满足复杂样品的分离需求。所以在 cIEF/pCEC 二维体系中,第一维 cIEF 进行粗分,对其流出样品进行切割再进行二维分析,不仅可以实现对未完全分离组分的进一步分离,而且也降低了第二维分离样品的复杂程度。切割的区段越多,分离会越精细,总的峰容量也越高。但同时总的分析的时间会延长,对第二维的检测也增加了挑战。经过优化选择,对 8.3 g/L BSA 酶解肽段的第一维 cIEF 分离一共切割 8 个区段,每次收集 8 min。重复收集 3 次相同区段的样品,保证 pCEC 的信号响应。

在多维分析中总的峰容量应该是对应的单维峰容量的乘积,所以显著提高了分离能力。峰容量的计算方法为:

$$n = 1 + \sqrt{\frac{N}{16}} \times \ln \frac{t_{\omega}}{t_{\alpha}}$$

其中  $n$  是峰容量,  $N$  是理论塔板数,  $t_{\omega}$  是最后一个峰的检测时间,  $t_{\alpha}$  是第一个峰的检测时间。如图 4 所示,8 个片段每个区段都检测到多种组分,共检测到大约 300 个肽段,通过计算理论峰容量约为  $n_{\text{cIEF}}(373) \times n_{\text{pCEC}}(89) = 33197$ 。与单维相比,分离能力有明显提高。

### 3.4 用 cIEF/pCEC 系统分离 HRBCL 的酶解肽段

血红细胞是人体血液中最多种的一种血细胞,对人体正常生理机能的维持起着至关重要的作用。血红细胞中含有丰富的蛋白质。本实验用搭建的 cIEF/pCEC 系统对 HRBCL 的酶解肽段进行分离。二维的分离图谱见图 5。7 个馏分的二维图谱显示该 cIEF/pCEC 二维平台在第一维的基础上对 HRBCL 的酶解肽段进行了更进一步的分离。7 个区段一共检测到约 200 个峰,如果与质谱联用<sup>[12,13]</sup>,可以进一步确证蛋白质的种类。

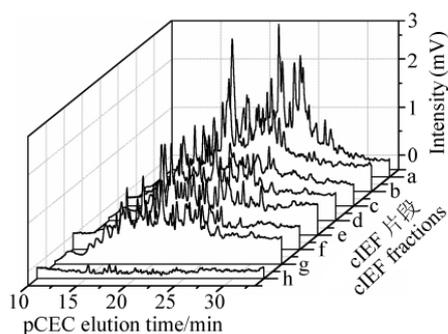


图 4 cIEF/pCEC 分离 BSA 胰蛋白酶酶解肽段图谱

Fig. 4 Electrochromatogram of 8 fractions of BSA tryptic digests by cIEF/pCEC

a ~ h 分别是 cIEF 8 个区段样品的 pCEC 分离图谱,其它条件参照图 3(a ~ h 分别是 cIEF 8 个区段样品的 pCEC 分离图谱,其它条件参照图 3)

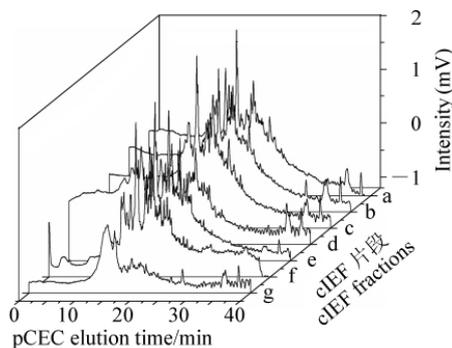


图 5 cIEF/pCEC 分离 HRBCL 酶解肽段图谱

Fig. 5 Electrochromatogram of 7 fractions of human red blood cell lysate (HRBCL) tryptic digests by cIEF/pCEC

a ~ g 分别是 cIEF 7 个区段样品的 pCEC 分离图谱,分离条件见 2.4 节(a ~ g 分别是 cIEF 7 个区段样品的 pCEC 分离图谱,分离条件见 2.4 节)

二维的峰容量有很大的提高。cIEF 的聚焦能力和 pCEC 的双重分离机制使该二维系统在分离生物复杂样品中具有独特优势,可以应用在各种复杂多肽和蛋白质的研究中。

## References

- 1 Chen J, Lee C S, Shen Y, Smith R D, Baehrecke E H. *Electrophoresis*, **2002**, 23( 18): 3143 ~ 3148
- 2 Mohan D, Lee C S. *Electrophoresis*, **2002**, 23( 18): 3160 ~ 3167
- 3 Yang C, Liu H C, Yang Q, Zhang L Y, Zhang W B, Zhang Y K. *Anal. Chem.*, **2003**, 75( 2): 215 ~ 218
- 4 Tsuda T. *Anal. Chem.*, **1988**, 60( 17): 1677 ~ 1680
- 5 Eimer T, Unger K, Tsuda T, Fresenius J. *Anal. Chem.*, **1995**, 352( 1): 649 ~ 653
- 6 Wu J T, Huang P, Lin X, Li M X, Lubman D M. *Anal. Chem.*, **1997**, 69( 15): 2908 ~ 2913
- 7 WU Yi, WANG Yan, GU Xue, ZHANG Lin, YAN Chao( 吴漪, 王彦, 谷雪, 张琳, 阎超). *Chinese Journal of Chromatography( 色谱)*, **2010**, 28( 3): 226 ~ 230
- 8 Zhang M Q, Rassi Z E. *J. Proteome Res.*, **2006**, 5: 2001 ~ 2008
- 9 Bradford M M. *Anal. Biochem.*, **1976**, 72: 24 ~ 32
- 10 Li M J, Zhou J Y, Gu X, Wang Y, Huang X J, Yan C. *J. Sep. Sci.*, **2009**, 32( 2): 267 ~ 274
- 11 Shen Y F, Smith R D. *J. Microcolumn Separations*, **2000**, 12( 3): 135 ~ 141
- 12 Liang Z, Duan J C, Zhang L H, Zhang W B, Zhang Y K, Yan C. *Anal. Chem.*, **2004**, 76( 23): 6935 ~ 6940
- 13 Wu J T, Huang P Q, Li M X, Lubman D M. *Anal. Chem.*, **1997**, 69( 15): 2908 ~ 2913

## Two-Dimensional Separation System by Coupling Capillary Isoelectric Focusing to Pressurized Capillary Electrochromatography for Peptides Separation

WEI Juan, GU Xue\*, WANG Yan, YAN Chao\*

( School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

**Abstract** A novel 2D platform combining capillary isoelectric focusing ( cIEF) with pressurized capillary electrochromatography ( pCEC) has been developed for off-line separation of peptides. The HPC coated capillary of cIEF was applied in the separation of standard proteins, and the average efficiency was around 310000. A homemade partition cell was induced in the end of cIEF capillary to make the collection of the eluting section more convenient. Compared to the capillary reversed phase liquid chromatography ( CRPLC), the 6 kV voltage applied in the pCEC capillary enhanced the resolution of peptides, along with a faster velocity. The separation effectiveness of this cIEF/pCEC system was demonstrated using BSA tryptic digests. Theoretically, peak capacity of more than 30000 could be achieved. Moreover, this system was used for the separation of human red blood cell lysate digests. More than 200 peaks were detected in the 7 fractions from cIEF. The power of this system could be further enhanced by increasing the number of cIEF fractions.

**Keywords** Pressurized capillary electrochromatography; Capillary isoelectric focusing; Multi-dimension; Peptides

( Received 22 July 2010; accepted 7 September 2010)