

微电纯化装置用于重组人促红细胞生成素的 质谱分析前样品快速除盐

庞楠楠^{1 2} 周宇¹ 白玉*¹ 廖杰³ 刘虎威¹

¹(北京分子科学国家实验室,教育部生物有机与分子工程重点实验室,

北京大学化学与分子工程学院分析化学研究所,北京 100871)

²(中国科学院新疆理化技术研究所,中国科学院干旱区植物资源化学重点实验室,乌鲁木齐 830011)

³(中国人民解放军总医院,北京 100853)

摘要 利用实验室构建的微电纯化装置(Microelectro purification device,MEPD),采用电喷雾质谱正离子模式检测,在 2 min 之内实现重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin,rhEPO)的在线脱盐,同时和传统的 C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)梯度洗脱以及超滤管除盐结果进行比较。利用 MEPD 除盐后,rhEPO 特征离子信噪比增加,检测灵敏度明显提高,操作时间大大缩短。本方法简单、快速,可作为质谱分析 rhEPO 样品的前处理方法。

关键词 液相色谱;质谱;微电纯化装置;超滤;重组人促红细胞生成素

1 引言

重组人促红细胞生成素(Recombinant human erythropoietin,rhEPO)是一种调控红血球细胞增殖、分化和成熟的糖蛋白激素,临床应用广泛,同时由于其可以提高有氧运动机体的耐受力,而在体育赛事中被滥用为兴奋剂^[1-3]。rhEPO 含有 166 个氨基酸,其中含有多个糖基化位点^[4,5]。检测尿样中的 rhEPO 一直是兴奋剂检测的难题。这是因为尿液的成分较复杂,rhEPO 在其中的浓度又很低(约 10 ng/L),直接检测非常困难^[6]。电喷雾质谱(ESI-MS)和基质辅助激光解析飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)是目前常用的研究蛋白质及其结构,确定其准确分子量的有效手段^[7-13]。尽管质谱进行酶解 rhEPO 肽段研究的检出限可达 0.1 μg/L^[14,15],但完整 rhEPO 的检出限仍然为 g/L 级^[16],因此需要对基质复杂的样品进行除盐等预处理,从而提高 MS 的检测灵敏度,以期实现 rhEPO 的在线直接检测。

对于 ESI-MS 分析,生物样品中存在的大量盐会严重抑制源内的离子化效率,影响检测,因而非常有必要通过除盐和除杂质等操作来提高检测灵敏度。蛋白质样品的传统处理方法包括有机溶剂沉淀、透析、凝胶过滤以及反相色谱法等。沉淀可能导致样品损失以及不可逆沉淀;冷冻干燥相对能保持蛋白质活性,但不能去除无机盐等杂质。超滤是一种温和的、非变性的膜分离技术,适用于蛋白质等大分子溶液的浓缩、纯化以及缓冲体系交换等。在蛋白质纯化过程中,通常最后利用反相-液相色谱(RP-HPLC)^[17]得到无盐样品,缺点是样品生物活性和构型无法保持,极性大的样品回收率低,且样品需要量较大。

Zhou 等^[18]利用连续吸附原理(在垂直电场作用下,固体膜可多层吸附蛋白质)^[19]构建了具有多层吸附功能的微电纯化装置(Microelectro purification device,MEPD)。与常规吸附不同,蛋白质连续吸附不再受固定相键合的功能团数目限制,外加电场可克服多层吸附时引起的蛋白质-蛋白质静电斥力,使多层吸附更加稳定。本实验成功地利用 MEPD 装置在线与质谱联用的方法对 rhEPO 样品进行除盐效果考察,并与传统除盐方法如超滤离心和 RP-HPLC 等方法进行了对比,得到满意的结果。

2010-03-25 收稿;2010-10-14 接受

本文系国家自然科学基金(Nos.20805001,90717002,20775090)和教育部留学回国人员启动基金资助项目

*E-mail: yu. bai@pku.edu.cn

© Editorial Office of Chinese Journal of Analytical Chemistry. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent 1100 HPLC 系统(美国安捷伦科技公司) 配备四元泵、自动脱气机、自动进样器、二极管阵列检测器和柱温箱; Agilent Trap-XCT 离子阱质谱仪(美国安捷伦科技公司) 配备 ESI 源以及相应的 LC-MS 工作站。AL104 十万分之一分析天平(Mettler Toledo 公司)。精密 pH 计(上海雷磁公司)。高速低温离心机 GS-15R(F 3602 Beckman 公司)。Millipore Microcon YM-10 超滤管(Sino-American Biotech. 公司)。

自行组装的微电纯化装置(MEPD) 结构见图 1。在微环境里, 协同电场、膜和多层流体控制以实现在一个微装置内同时或顺序实现包括富集、除盐、去除不带电杂质、分离、溶剂交换和装置再生等多功能操作。采用“三明治”式结构, 主体是带通道的高分子材料基片, 尺寸为 30 mm × 30 mm × 0.6 mm, 上下为缓冲溶液通道基片, 中间为样品通道基片(40 mm 长, 50 μm 宽, 600 μm 深), 通过离子交换膜将 3 层溶液分隔开。为增加通道有效长度, 提高功能区域面积, 将通道制成透迤形, 每片各有出口, 芯片四脚用螺栓紧固, 接口处用环氧树脂进一步密封。

rhEPO(Sigma 公司), 乙腈(农残级, Dikma 公司), NH_4HCO_3 和甲酸(分析纯, 北京化学试剂厂)。实验用水全部采用娃哈哈纯净水。

2.2 实验条件

2.2.1 C_{18} 柱除盐色谱条件 Agela Bonchrom- C_{18} (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 梯度洗脱, 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈, 梯度为 0 ~ 3 min, 100% A; 3 ~ 12 min, 100% B。流速 1 mL/min。柱温 20 °C。

2.2.2 质谱条件 质谱仪离子源前装有一个六通阀, 将 3 min 之后的流出物导向 ESI 离子源。质谱使用正模式, 离子源排斥电极电压 3.5 kV, 毛细管电压 -500 V, 毛细管出口(Capillary Exit) 电压 92.5 V, 锥孔电压 40 V, 阱深 100%, Cut off 阈值为 27%, 扫描范围 m/z 500 ~ 1200。目标离子: m/z 900。离子源雾化气压力 27.6 kPa, 干燥气流量 10 L/min, 干燥气温度 325 °C。

2.2.3 在线 MEPD-ESI-MS 条件 0.1% 甲酸水溶液, 流速 1 mL/min。电压 2.6 V。采用 20% 甲酸洗脱再生。其它质谱条件同 2.2.2 节。

2.3 样品前处理

4.5 mg rhEPO 溶解于 300 μL 水中, 该溶液置于 Microcon YM-10 离心超滤管内离心 10 min (12000 r/min, 4 °C)。水洗 3 次, 每次 100 μL, 离心 15 min。将超滤管反置, 100 mmol/L NH_4HCO_3 洗 3 次(5000 r/min), 每次 100 μL, 离心 3 min。所得溶液用于超滤除盐分析。1.5 g/L rhEPO(溶解于 100 mmol/L NH_4HCO_3) 用于 MEPD 和 C_{18} 反相柱除盐分析。进样量 20 μL。

3 结果与讨论

3.1 rhEPO 的 MEPD 除盐

典型的 MEPD 操作可分 3 个连续操作程序: (1) 将样品通过自动进样器或进样泵载入 MEPD, 同时完成富集、除盐、去除不带电杂质。膜起着双重作用, 既是分子量选择的分离屏障, 又是带电蛋白质的吸附载体, 成为蛋白质连续吸附的模板。垂直的外加电场有利于抑制同种电荷带电大分子多层吸附时所产生的静电排斥作用, 亦有利于提高同种电荷多层吸附的稳定性。小分子杂质在电场作用下透过膜, 并被缓冲液带走, 其它对电场无响应的杂质, 如细胞残核、磷脂等, 由样品流带到废液里。此时样品流路通过六通阀切换到废液, 避免对质谱仪器造成损害。(2) 用适当的溶剂改变微环境, 将馏分直接输入到质谱

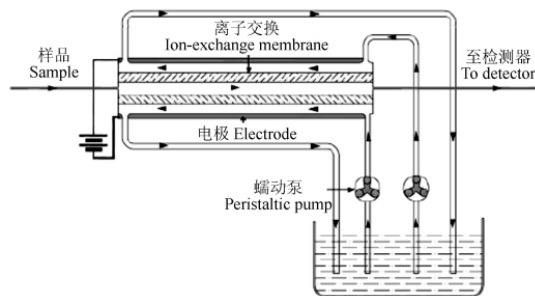


图 1 MEPD 装置图(箭头分别表示样品流动方向以及缓冲液流动方向。常用挥发性缓冲液如 NH_4HCO_3 (10 mmol/L)。温度可控, 可加热亦可冷却。)

Fig. 1 Schematic illustration of microelectro purification device (MEPD) system. Arrows show the direction of sample stream and the circulation of buffer streams, respectively. Typical buffer solution is volatile salt solution such as NH_4HCO_3 (10 mmol/L). The temperature of MEPD can be controlled by heating or cooling.

离子源, 质谱在线检测, 亦可接出馏分从而进行其它分析。(3) 通过改变电场方向或使用高强度溶剂洗脱吸附杂质等实现再生, 此时样品流路通过六通阀切到废液。

rhEPO 样品由 HPLC 自动进样器引入, 流速 1 mL/min, 通过 MEPD 装置后, 施加电压情况下样品中的盐透过膜被缓冲液带走, 除盐后的蛋白质随流路直接进入电喷雾离子源中, 通过质谱分析得到 rhEPO 的电喷雾质谱图(图 2a), 图中的 rhEPO 特征离子和文献 [7] 相吻合。整个过程实现了 rhEPO 在 2 min 内在线脱盐。并且通过溶剂切换增加有机相的浓度, 实现了再生。谱图中 rhEPO 特征离子明显, 化学噪声小, 因此可以避免假阳性的检出, 低的化学噪声也大大提高了检测灵敏度。与分析酶解后的多肽谱图相比, 完整蛋白的谱图携带更丰富的信息, 包括翻译后修饰的磷酸化、糖基化等。而 rhEPO 和内源性 EPO 的差别恰恰在于糖基化程度不同, 因此本装置在此类分析中有一定的应用前景。

3.2 MEPD 除盐效果与其它脱盐方式的比较

本研究将 MEPD 除盐和两种比较成熟的脱盐方式进行了比较, 结果如图 2 所示。未经处理的 rhEPO 样品直接进样, 噪声大, 无法检出(图 2b)。当使用 C_{18} 柱梯度洗脱方式除盐时, 利用 100% 水相带走盐, 100% 有机相洗脱蛋白质, 有一定除盐效果, 但仅检测到一些响应较强的 rhEPO 特征离子, 如 m/z 901(图 2c)。利用 Millipore Microcon 10 超滤管可在一定程度上脱盐, 但也只检测到一部分 rhEPO 的特征离子(图 2d)。使用 MEPD 装置进行除盐, 化学噪声更低, 能够检测到更多的 rhEPO 特征离子, m/z 901 的信噪比为 12.8, 而 C_{18} 柱脱盐后该离子信噪比 3.8, Millipore Microcon YM-10 超滤管脱盐后信噪比为 2.0, 因此 MEPD 脱盐效果更好。

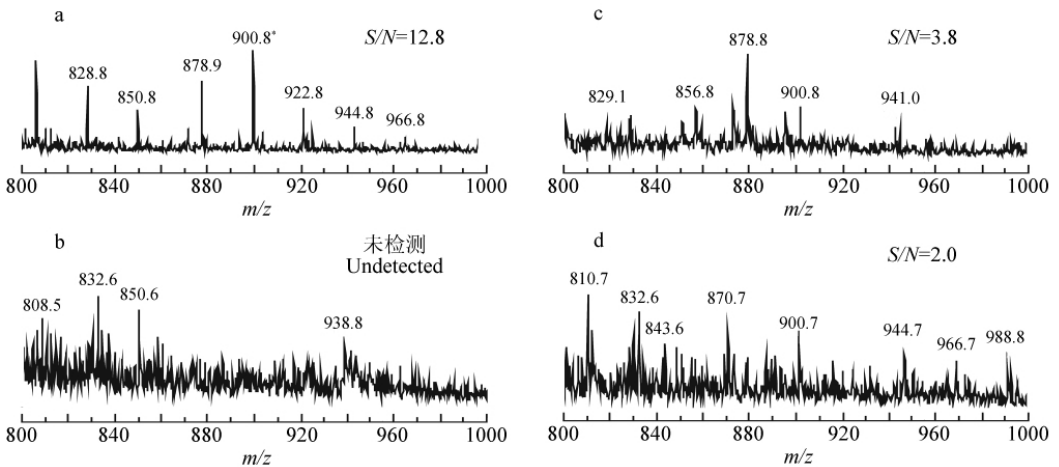


图 2 rhEPO 的 (+) -ESI-MS 谱图

Fig. 2 (+) -ESI-MS spectra of recombinant human erythropoietin (rhEPO)

(a) MEPD 除盐 (Desalting by MEPD); (b) 未经处理直接进样 (Direct injection without pretreatment); (c) C_{18} -RP-HPLC 除盐 (Desalting by C_{18} -RP-HPLC); (d) Micro-10 除盐 (Desalting by Microcon-10)。

与其它两种除盐方式相比较, MEPD 装置还有如下优势: (1) MEPD 装置可以实现在线脱盐, 而 Millipore Microcon-10 超滤管为离线操作, 这意味 MEPD 减少了很多人工处理步骤, 有利于实现高通量分析; (2) Millipore Microcon 10 超滤管为一次性消耗品, C_{18} 柱分析实际生物样品时寿命有限, 而 MEPD 装置可以重复使用; (3) 利用 Millipore Microcon 10 超滤管除盐操作至少需要 2 h, C_{18} 柱除盐至少需要 30 min, MEPD 装置可在 2 min 之内实现样品的在线脱盐, 效率更高。(4) MEPD 处理后所得样品既可保留在水相, 也可保留在有机相中, 能够有效保持样品的生物活性。

综上所述, 由于生物样品中 rhEPO 和内源 EPO 的含量非常低, 同时复杂的基质会干扰检测, 必须去除杂质和盐以提高响应。本研究用实验室搭建的 MEPD 在 2 min 之内实现了 rhEPO 的在线脱盐, 大大提高了检测灵敏度, 得到 rhEPO 的 ESI 多电荷质谱图, 特征离子和文献 [7] 相吻合, 离子信噪比有很大提高。与传统除盐方法相比, MEPD 的在线脱盐效果明显, 在费用、时间、生物活性方面具有很大的优势, 可作为 MS 分析 rhEPO 样品的前处理方法。

Reference

- 1 Mottram D R. *Sports Med.* ,**1999** ,27(1) : 1 ~ 10
- 2 Fisher J W. *Exp. Biol. Med.* ,**2003** ,228(1) : 1 ~ 14
- 3 Choi D , Kim M , Park J. *J. Chromatogr. B* ,**1996** ,687(1) : 189 ~ 199
- 4 Lin F K , Suggs S , Lin C H , Browne J K , Smalling R , Egrie J C , Chen K K , Fox G M , Martin F , Stabinsky Z , Badrawi S M , Lai P H , Goldwasser E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,**1985** ,82(22) : 7580 ~ 7584
- 5 Rush R S , Derby P L , Smith D M , Merry C , Rogers G , Rohde M F , Katta V. *Anal. Chem.* ,**1995** ,67(8) : 1442 ~ 1452
- 6 Lasne F , Martin L , Crepin N , de Ceaurriz J. *Anal. Biochem.* ,**2002** ,311(2) : 119 ~ 126
- 7 Santz-Nebot V , Benavente F , Vallverdú A , Guzman N A , Barbosa J. *Anal. Chem.* ,**2003** ,75(19) : 5220 ~ 5229
- 8 Neustüß C , Demelbauer U , Pelzing M. *Electrophoresis* ,**2005** ,26(7 ~ 8) : 1442 ~ 1450
- 9 Balaguer E , Demelbauer U , Pelzing M , Sanz-Nebot V , Barbosa J , Neustüß C. *Electrophoresis* ,**2006** ,27(13) : 2638 ~ 2650
- 10 Balaguer E , Neustüß C. *Anal. Chem.* ,**2006** ,78(15) : 5384 ~ 5393
- 11 Yu B , Cong H L , Liu H W , Li Y Z , Liu F. *Trends Anal. Chem.* ,**2005** ,24(4) : 350 ~ 357
- 12 Yu B , Cong H L , Liu H W , Li Y Z , Liu F. *J. Sep. Sci.* ,**2005** ,28(17) : 2390 ~ 2400
- 13 Giménez E , Benavente F , Barbosa J , Sanz-Nebot V. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* ,**2007** ,21(16) : 2555 ~ 2563
- 14 Guan F Y , Uboh C E , Soma L R , Birks E , Chen J W , Mitchell J , You Y W , Rudy J , Xu F , Li X Q , Mbuy G. *Anal. Chem.* ,**2007** ,79(12) : 4627 ~ 4635
- 15 Guan F Y , Uboh C E , Soma L R , Birks E , Chen J W , You Y W , Rudy J , Li X Q. *Anal. Chem.* ,**2008** ,80(10) : 3811 ~ 3817
- 16 Balaguer E , Neustüß C. *Chromatographia* ,**2006** ,64(5 ~ 6) : 351 ~ 357
- 17 Pohl T , Kamp R M. *Anal. Biochem.* ,**1987** ,160(2) : 388 ~ 391
- 18 Zhou Y , Shen H L , Yi T , Wen D W , Pang N N , Liao J , Liu H W. *Anal. Chem.* ,**2008** ,80(23) : 8920 ~ 8929
- 19 Ngankam A P , van Tassel P R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,**2007** ,104(4) : 1140 ~ 1145

Rapid Desalting of Recombinant Human Erythropoietin Sample by Microelectro Purification Device for Mass Spectrometric Detection

PANG Nan-Nan^{1,2} , ZHOU Yu¹ , BAI Yu^{* 1} , LIAO Jie³ , LIU Hu-Wei¹

¹(Beijing National Laboratory for Molecular Sciences , the Key Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular Engineering of Ministry of Education , Institute of Analytical Chemistry , College of Chemistry and Molecular Engineering , Peking University , Beijing 100871)

²(Key Laboratory of Plant Resources and Chemistry of Arid Zone ,

Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry , Chinese Academy of Sciences , Urumqi 830011)

³(Medical Experiment & Analysis Center , General Hospital of Chinese People's Liberation Army , Beijing 100853)

Abstract Microelectro purification device (MEPD) constructed by our laboratory could obtain online desalting of recombinant human erythropoietin (rhEPO) in 2 min with high efficiency. Electrospray mass spectrometry with positive ion mode was used for the detection. Compared with traditional methods , such as gradient elution by C₁₈-reversed phase liquid chromatography (150 mm × 4.6 mm , 5 μm) as well as ultra-filtration , MEPD could further enhance the signal to noise ratio of rhEPO and the detection sensitivity. It could also shorten the analysis time dramatically. This simple and rapid method could be a promising pretreatment candidate for the rhEPO analysis of mass spectrometry.

Keywords Liquid chromatography; Mass spectrometry; Microelectro purification device; Ultra-filtration; Recombinant human erythropoietin

(Received 25 March 2010; accepted 14 October 2010)