

色谱法在胶原蛋白分离、分析中的应用 (I)

——胶原及其水解多肽的分离纯化

王 碧¹ 贾冬英¹ 舒子斌¹ 张铭让^{1,2*}

(¹ 四川大学皮革化学与工程教育部重点实验室 ² 四川大学生物质研究所 成都 610065)

摘 要 本文介绍了胶原蛋白的提取方法, 着重介绍色谱法在胶原及水解胶原多肽分离纯化中的应用。

关键词 色谱法 分离纯化 胶原蛋白 胶原多肽

Application of Chromatography in the Separation and Analysis of Collagen(I)—The Separation and Purification of Collagen and its Hydrolysed Polypeptides

Wang Bi¹, Jia Dongying¹, Shu Zibin¹, Zhang Mingrang^{1,2}

(¹ The Key Laboratory of Leather Chemistry and Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610065)

(² Research Center for Biomass of Sichuan University, Chengdu 610065)

Abstract Research progress in the application of chromatography in the separation of collagen and its hydrolyzed polypeptides was reviewed, and the collagen extraction methods were also introduced.

Key words Chromatography, Separation, Collagen, Collagen polypeptides

胶原蛋白是自然界最为丰富的蛋白质之一, 它广泛存在于从低等脊椎动物线虫、蚯蚓等体表面的角质层, 到哺乳动物机体的一切组织中, 尤其富含于动物的结缔组织——皮、骨、肌腱、韧带、血管中。由于胶原分子的天然独特骨架, 过去在产业中动物皮胶原大量用于制革, 骨胶原大量用于制明胶。近 20 年, 随着研究手段的日益现代化, 人们在研究胶原结构、物理、化学及生化性质的同时, 逐渐认识到胶原不仅具有合成高分子不可比拟的生物相容性、生物降解性和低抗原性, 而且具有一系列重要的生物学功能, 为此广泛开发胶原新的应用领域, 将其转化为高附加值的生物医学材料、食品、营养保健品、化妆品等已逐渐引起人们注意^[1~3]。

胶原具有如下特征:

(1) 具有特有的左旋 α -链相互缠绕构成的右手复合螺旋结构, 这一区段称为螺旋区段, 该区段的最大特征是氨基酸呈现(Gly-X-Y)_n周期性排列, 在 X 及 Y 位置上多是脯氨酸(Pro)(按遗传因子排列为 GGNCCNCCN);

(2) 在细胞外基体中起功能作用;

王 碧 女, 38 岁, 博士生, 副教授, 现从事胶原蛋白的色谱分离研究。*联系人

教育部博士点基金项目和国家自然科学基金资助项目 (298877017)

2001-11-12 收稿

(3) 与别的基本成份相互作用, 构成原纤维或网状结构的高分子复合体。

目前已发现的胶原至少有 19 种不同类型, 最常见的是 I、II、III 型胶原, 其中 I 型胶原含量最高, 占胶原总量的 80% 以上, 有关它的研究深受化学家关注。胶原的单体是原胶原 (procollagen), 原胶原分子为细长的三股螺旋结构, 它由三条肽链组成, 组成 I 型胶原分子的是两条 $\alpha_1(I)$ 链和一条 $\alpha_2(I)$ 链, 即 $\alpha_1(I)_2 \alpha_2(I)$ 。两条 α 链形成的肽链二聚物叫 β 肽链 (如 $\alpha_1(I)\alpha_1(I)$, $\alpha_1(I)\alpha_2(I)$), 三条肽链构成的三聚物 $\alpha_1(I)_2 \alpha_2(I)$ 称为 γ -肽链, γ -肽链实际上是原胶原分子。

要高附加值地开发胶原新产品, 深入了解胶原多肽特性, 不可避免地涉及到胶原蛋白、胶原多肽的分离纯化工作, 任何蛋白质的分离都必然建立在独特的机理上, 要得到好的分离结果, 需要常规的手段和必要的特殊方法。色谱技术和电泳技术是实践中分离纯化蛋白质最重要的和最常用的方法, 为更好地利用色谱技术研究水解胶原多肽的分离、分析法, 研制和深度开发新型胶原制品, 本文介绍胶原蛋白的一般提取方法, 着重系统地综述液相色谱在分离纯化单一类型胶原及水解胶原多肽中的应用。

1 胶原蛋白的一般提取分离方法

据报道, 在非变性情况下, 从成熟组织中, 提取 I 型胶原最容易, 它可用酸或盐溶液从动物结缔组织中部分提取出, 而其它类型胶原只有通过控制蛋白水解作用部分盐析出 (胚胎组织例外)。以提取皮胶原为例, 可将提取胶原的一般流程表示如下:

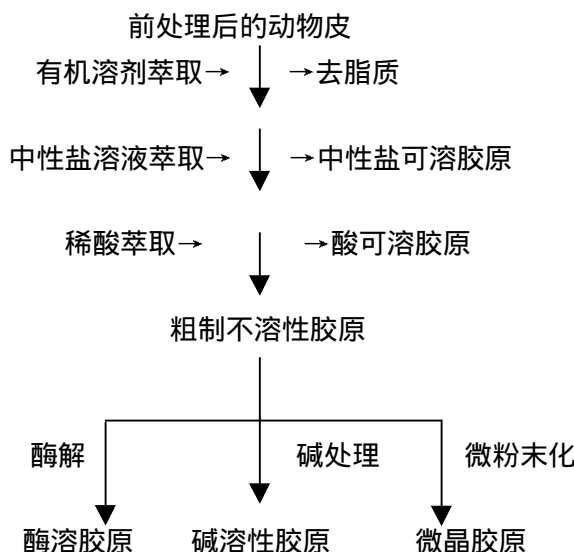


图 1 皮胶原提取法

Fig1 Extraction of skin collagen

胶原类型不同, 其氨基酸组成存在差异, 其分子尺寸和配糖的含量也不同, 它们在不同酸度和盐浓度下可盐析分离出 (表 1), 但用这种手段并不能得到纯的单一类型胶原, 只有通过色谱过程才能得到完全纯化。

表 1 I-XI型胶原盐析条件表

Tab.1 Survey of molecular properties and precipitation conditions of different collagen types

类型	分子组成	相关 α -链的分子量	C(NaCl)/mol·L ⁻¹	
			酸性条件下盐析	中性条件下盐析
I	$\alpha_1(\text{I})_2 \alpha_2(\text{I})$	95	0.7~0.9	2.6
I 三聚物	$\alpha_1(\text{I})_3$		0.7~0.9	4.0
II	$\alpha_1(\text{II})_3$	95	0.7~0.9	3.5~4.0
III	$\alpha_1(\text{III})_3$	100-95	0.7~0.9	1.5~1.7
	$\alpha_1(\text{II})_3 \alpha_2(\text{II})_3$			
IV	$\alpha_1(\text{IV})_3$	180-75		
	$\alpha_1(\text{IV})_3 \alpha_2(\text{IV})_3$			
V	$\alpha_1(\text{V})_2 \alpha_2(\text{V})$	200-130		
	$\alpha_1(\text{V})_3$	200-130	1.2	3.6~4.5
VI	$\alpha_1(\text{VI}) \alpha_2(\text{VI}) \alpha_3(\text{VI})$	240-140	2.0	
VII	$\alpha_1(\text{VII})_3$	>170		
VIII	$\alpha_1(\text{VIII})_3$	61		
IX	$\alpha_1(\text{IX}) \alpha_2(\text{IX}) \alpha_3(\text{IX})$	85		
X		59	2.0	1.0
XI	$\alpha_1(\text{XI})_2 \alpha_2(\text{IX})$	95	1.2	

2 胶原及其水解多肽的色谱分离法

至今已发现 19 种不同类型胶原, 这些胶原在组织内的分布具有一定特异性, 如: 皮肤、血管壁、各种软组织同时含 I、III 型胶原, 但在不同器官中比例不同, 软骨中主要含 II 型胶原, IV 型胶原只分布在基膜中等。在胶原生理作用研究中, 最令人感兴趣的是不同类型胶原、基膜成分对内皮细胞表现型的研究, 使它成为血管发生过程的诱导信号。这些事实足以说明, 不同类型胶原生理功能存在差异, 因此色谱法用于纯化单一类型胶原及其水解多肽有重要意义。

2.1 区域析出色谱法

正如通过部分盐析能分离出某些单一类型胶原一样, 区域析出色谱也是用于初步分离胶原单一类型的有效技术, 上世纪 70 年代末期 Ehrlich 报道了利用该技术对胶原初步分型的方法, 将样品注入预先用 30% NaCl 平衡过的 Sephadex G-200 柱上, 用含 Tris 缓冲溶液的一定浓度和体积的 NaCl 溶液间断的逐步洗脱, 分段收集馏分, 结果分离出了 I、II、III 和 V 型胶原 4 个组分。他还指出该分离也可在 Bio-Rad P 柱上完成。因区域析出色谱技术不能使胶原完全纯化, 故该技术现已少见使用了。

2.2 离子交换色谱

迄今为止, 离子交换色谱被认为是在低到中压条件下, 纯化单一类型胶原及其水解多肽的较好方法。已见报道用于胶原分离的离子交换柱主要有 DEAE-纤维素柱和 CM-纤维素柱两种。

早在 70 年代, Miller 在 DEAE-纤维素柱上, 用含 Tris-HCl 缓冲溶液的 NaCl 溶液梯度洗脱分离胶原, 得到了两个峰, 除去了 I、III 型胶原中所混的其它蛋白多糖。后来 Byers 等将用上述方法除去了其它蛋白多糖的胶原混合物, 进一步在 DEAE-纤维素柱上分离, 先用含 Tris-HCl 缓冲溶液的 NaCl 溶液线形梯度洗脱, 再用尿素-NaCl 溶液二元梯度洗脱, 分离出了 I、III 和 V 型胶原两个组分。上世纪 80 年代有研究者利用 DEAE-纤维素色谱从胶原中分离出了 α 链。1990 年 Kirsch 等^[4]在 DEAE-纤维素柱上, 用含 Tris-HCl 缓冲溶液的 NaCl 溶液作洗脱液, 分离了来

自于软骨的 X 型胶原, 并实现了基膜的 IV 型胶原片段和 X 型胶原的分离。国内仅见前几年许祖德等^[5]在 DEAE-52 纤维素柱上对人胎盘 V 型胶原进行纯化的报道。

CM-纤维素色谱可用于分离不同的胶原类型和它们组成的多肽链。上世纪 70 年代国外有研究者在 CM-纤维素柱上, 用含尿素的 NaAc 溶液梯度洗脱, 非变性条件下, 使胃酶溶解的胶原中的 III、IV 型胶原得到了分离。随着研究的不断深入, 更多的报道是在 CM-纤维素柱上分离水解的胶原多肽链及其片段。例如: 1980 年 Dixit 等^[6]在 CM-纤维素柱上, 将用胃酶去端肽的 IV 型胶原分离成了三个组分, 经 Bio-Gel A 柱鉴定, 分子量分别为 140kDa、120kDa、和 75kDa。但是, 一些研究表明: 用 CM-纤维素色谱难以完全将一种单一类型胶原的 α 链、原胶原、P-胶原链分开, 有研究者在 CM-纤维素柱上从 I 型胶原中分离出了: pN α_1 、pro $\alpha_1 + \alpha_2$ 、pro α_1 、pC α_1 、 $\alpha_1 + \alpha_2$ 、 α_2 母体。1993 年金贵仙等^[7]用 NaAc 溶液作起始缓冲溶液, 含 NaAc 的 NaCl 溶液作终止缓冲溶液, 在 CM-52 阳离子纤维素柱上, 从水解胶原中分离出了 4 个组分, 后来岳爱兵等也在该柱上对明胶中的不同构象组分进行了分离。

2.3 凝胶过滤色谱

凝胶过滤色谱是级分胶原蛋白和测定胶原蛋白分子量分布的良好方法。从文献来看, 利用该技术分离胶原和变性胶原明胶使用最多的填料是琼脂糖凝胶, 国外一些研究者在 Bio-Gel A 柱上从水解胶原中分离出 α 链、 β 链和 γ 链三个组分。近 10 年内, 国外有在 Superose 12 柱上纯化来自于牛胎盘 X 型胶原的报道。

自上世纪 70 年代起, 国内研究者开始逐渐利用凝胶色谱法测定明胶与胶原水解产物分子量分布, 如韩秀萍等用凝胶色谱法对胶原水解产物进行了两次分离, 并用该法测定了经预先级分的明胶的分子量分布。1994 年蒋挺大等^[8]在琼脂糖柱上, 以含叠氮化钠的蒸馏水为流动相, 宽分布 T_{10} 和 T_{70} 葡聚糖为标样, 用水凝胶色谱法测定了从铬革渣中按不同条件提取的胶原蛋白的分子量及分子量分布。

2.4 亲和色谱

由于生物亲和色谱对柱条件要求苛刻, 一般实验室难以达到, 至今尚未见国内有研究者报道, 国外的报道也不多见。迄今为止, 从文献报道可以看到: 国外研究者在亲和色谱法分离胶原蛋白中所使用的填料主要有伴刀豆球蛋白 (Concanavalin) A-琼脂糖、硫醇活化的琼脂糖、肝素 (Heparin) 琼脂糖三种, 这些填料分别适用于分离不同类型胶原或胶原多肽。

1980 年 Uitto 等^[9]用含 10mm MEM 和 0.3mol/L PMFS 的 0.04mol/L NaCl-Tris-HCl 溶液作洗脱液 (样品溶解于含 5mmol/L CaCl_2 的同一缓冲溶液中), 在伴刀豆球蛋白 (Concanavalin) A-琼脂糖柱上, 先用该溶液洗脱至 230nm 处的吸收恢复至初始水平, 然后在同一缓冲溶液中使用 0.05mol/L α -甲基-D-甘露糖甙溶液连续洗脱一段时间, 再用含 1mol/L CaCl_2 -0.05mol/L Tris-HCl (pH=7.5) 的溶液洗脱可得到原胶原, 他们还指出该方法特别适合从 III 型原胶原中除去非糖蛋白。近年又有研究者在伴刀豆球蛋白 A-琼脂糖柱上实现了 III 型原胶原和 X VI 型胶原的分离。

据 Sykes 报道用硫醇活化的琼脂糖不仅可从缺乏半胱氨酸的材料中分离出原胶原, 而且可分离出 pC-胶原和 pN-胶原。例如应用该法分离 II 型原胶原和 p-胶原步骤大致如下: 将 II 型胶原样品溶解于适量 NaCl、EDTA、Tris-HCl 组成的混合液中, 并加入一定量二硫代苏糖醇, 在 60°C

下加热 30min, 之后在 Sephadex G-25 柱上, 用同一缓冲溶液作流动相, 除去过量的二硫代苏糖醇, 接着将降解的原胶原同活性的硫醇类琼脂糖一起, 在 42°C 下, 温和地振摇 2h。再将悬浮物倾入到经预先加温的柱子上, 用起始缓冲溶液洗脱, II 型 p-N 胶原和原胶原被分离出; 最后一步是先将柱子用含 5.0mmol/L 二硫代苏糖醇的起始缓冲溶液平衡, 然后用 1.0mol/L NaCl 的起始缓冲溶液作洗脱液, 洗脱过程中, 停止加入流动相 40min, 使之交换完全后, 再连续洗脱, 从该柱上产生 II 型原胶原和 p-C 胶原。作者同时指出该方法也适宜用于分离 I 型原胶原, 但不适用分离 III 型原胶原, 因为在这种类型胶原中 Pro- α 链和 α 链通过二硫键连接在一起。

上世纪 80 年代开始出现应用肝素-琼脂糖柱分离胶原蛋白的报道, 一些研究表明^[10,11]该柱适合分离 I、V 型胶原(洗脱液组成、酸度和离子强度接近于生理环境)和 V 型胶原的 α 、 β 、 γ 链; 特殊条件下该柱也可分离 III 型胶原, 而 IX 型胶原将牢固地键合在该柱上难以洗脱。

2.5 疏水作用色谱

迄今为止, 少见用疏水作用色谱分离纯化胶原蛋白的报道, 1988 年 Macek 等^[12]在 Separon HEMA 1000 Bio 柱上, 用一定浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 洗脱, 从不同软骨胶原中分离出了 IX 型胶原。

2.6 高效液相色谱

HPLC 色谱法用于分离胶原及其水解产物与经典的低压色谱比较速度较快, 但由于胶原水解产物的复杂性, 迄今, 国内外用该法分离的报道甚少。现所见报道主要是高效凝胶色谱法对胶原级分或测定分子量分布, 此外仅偶见几例反相色谱分离胶原及水解多肽的报道。

1982 年 Deyl 等^[13]在 Separon HEMA 1000 Glc(乙烯同丙烯酸盐及葡聚糖共聚而成的填料)柱上, 用含 Tris-HCl 的尿素溶液作洗脱液, 成功地从胃酶溶解的 I 型胶原中分离出了 α 、 β 、 γ 三个组分, 并测定了相应分子量, 同时作者在该柱上分离了来自于基膜的 IV 型胶原, 结果得到 α_1 (IV) 和 α_2 (IV) 两个未完全分开的峰。国内陈祥舫等先将一根 μ -Bondgel E 500 及一根 μ -Bondgel F 1000 柱串联, 在该柱上测定了明胶及改性明胶的分子量分布, 后来又进一步将三根 μ -Bondgel E-linear 柱串联, 在该柱上分离并测定了明胶的分子量分布^[14]。1995 年 Sato 等^[15]在 Bakerbond PEI Scout 柱上, 用反相 HPLC 法对 V 型胶原亚单元进行了分离; Condell 等^[16]在 Bio-Gel TSK 60XL 柱上, 用 NaCl-HAc 溶液洗脱, 通过高效凝胶过滤色谱法对天然皮胶原单体、低聚体进行了分离, 并考察了多种因素对分离的影响。1996 年 Mechling 等^[17]用高效凝胶色谱法, 在 TSK-2000SW 柱上(用 0.1% 三氟乙酸为流动相), 对 IX 型胶原多肽进行分离得到了 α_1 、 α_2 、 α_3 三个组分。

上世纪 80 年代 Fallon 等在一种甾基柱上, 用吡啶-HAc 为洗脱液, 从人胶原中分离出了 I、II、III 型三个组分; Skinner^[18]在由正烷基硅组成的 Lichrospher 柱上, 用水-乙腈梯度洗脱, 使人胶原的 α_1 (I)、 α_2 (I)、 α_1 (II) 和 α_1 (III) 得到了分离。Deyl 等^[19]在一种海泡石(含铝的硅酸镁)柱上, 用 NaAc 缓冲溶液作流动相, 分别对酸溶胶原和酶解胶原进行了分离, 结果得 α 、 β 、 γ 、 δ 4 个组分(δ 组份是超过三聚的链多聚体)。

1995 年 Fields 等^[20]用反相 HPLC 分离分析了人工合成的三股螺旋小型胶原, 通过实验比较发现: 在二苯基或无孔反相 C18 柱上, 用水- CH_3CN 梯度洗脱能很好地分离人工合成的“小型胶原”, 使之得到纯化。

综上所述, 色谱法在胶原水解产物的分离中, 国外研究者所做工作相对较多, 但所用方法绝大多数只能从水解胶原中分离出 α 、 β 、 γ 三个链组分或折分出独立的 α 链, 除溴化氰断裂肽外, 至今少见对水解片段的进一步分离, 显然这种分离远不够深入, 国内在此领域所做工作更少, 几乎是空白。因此, 可以说色谱法在该领域的研究工作空间广阔。用温和的接近生理组成的缓冲溶液作流动相, 结合多维色谱从组成极其复杂的水解胶原中分离并制备出具有特殊生物功能的胶原多肽, 是今后的一个研究方向。

另一方面, 如前所述, 随着人们对胶原功能性质越来越深入的认识, 胶原蛋白、水解胶原多肽越来越多地应用于医药、食品、高档化妆品等领域, 这也对分析工作者提出了更高的要求, 利用色谱法分离、分析水解胶原多肽, 测定胶原多肽的分子量分布、组成并分析与生物学功能、理化性能的相关性, 从而指导胶原多肽的生产工艺, 进一步分离出特殊功能性胶原多肽, 对开发高附加值的胶原新型医药品、美容保健品, 更有效地利用天然动物皮资源、回用制革副废物具有重要意义。

参考文献

- [1] 王 碧, 林 炜, 马春辉 等. 皮革化工, 2001, 18(3):10~14.
- [2] 穆畅道, 林 炜, 王坤余 等. 中国皮革, 2001, 30(9):37~40.
- [3] 张铭让, 林 炜, 穆畅道. 北京皮革, 2000,(5):42~45.
- [4] Kirsch T, von der Mark K. Biochem. J, 1990, 265:453.
- [5] 许祖德, 张月娥, 陈年忠 等. 上海医科大学学报, 1994, 21(1):77~79.
- [6] Dixit S N, Glanville R W. Ed. By. Furthmavr H. Immunochemistry of the ExtracellularMatrix, CRC Press, Boca Raton, FL, 1982:61.
- [7] 金贵仙, 彭必先. 感光科学与光化学, 1993, 11(3):204~208.
- [8] 蒋挺大, 张春萍, 甘友新 等. 环境科学, 1994, 15(2):11~14.
- [9] Uitto J, Booth B A, Pollak K L. Biochim. Biophys.Acta, 1980,624:545~561.
- [10] Yaoi Y, Hashimoto K, Koitabashi H et al. Biochim. Biophys.Acta, 1990,1035:139~145.
- [11] Mizuno K, Hayashi T, J. Biochem., 1994, 116:1257~1263.
- [12] Macek K, Lichy J A, Tesarova E et al. J. Chromatogr., 1988, 434:423~427.
- [13] Deyl Z, Macek K. J. Chromatogr., 1982, 230:409~414.
- [14] 陈祥舫, 彭必先. 明胶科学与技术, 1984, 1:7~14.
- [15] Sato K, Taira T, Takayama R et al. J. Chromatogr., 1995,663:25~33.
- [16] Condell R A, Hanko V P, Larenes E A et al. Anal. Biochem., 1993, 212(2):436~445.
- [17] Mechling D E, Gambeet J E, Morris N P et al. J. Boil.chem., 1996, 271(23):13781~13785.
- [18] Skinner S J M. J. Chromatogr., 1984,308:111~119.
- [19] Deyl Z, Horakova M, Macek K. J. Chromatogr., 1988,426:162~168.
- [20] Fields C G, Grab B, Lauer J L et al. Anal. Biochem., 1995, 231:57~64.