

色谱法在胶原蛋白分离、分析中的应用(II)

王 碧^a 贾冬英^a 舒子斌^a 张铭让^{a,b} 王坤余^{a,b*}

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

摘 要 介绍了国外研究者利用凝胶过滤、离子交换和反相色谱等技术分离、分析胶原溴化氰肽的研究进展以及毛细管电泳法在分离、分析胶原 α -链和溴化氰肽等中的应用情况。

关键词 色谱法 毛细管电泳法 胶原蛋白 溴化氰断裂肽

Application of Chromatography in the Separation and Analysis of Collagen(II)

Wang Bi^a, Jia Dongying^a, Shu Zibin^a, Zhang Mingrang^{a,b}, Wang Shenyu^{a,b}

(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 Advance in the application of chromatography in the separation and analysis of collagen and its cyanogens bromide fragments was reviewed. In addition, the application of capillary electrophoresis in the separation and analysis of collagen α -chain and cyanogen bromide fragments was introduced. Capillary electrophoresis is now successfully used to quantitatively analyze collagen marker peptide.

Key words Chromatography, Collagen, Cyanogen bromide peptides, Capillary eletrophoresis

胶原是重要的功能蛋白质, 作为细胞外间质它不仅起支持和保护作用, 而且与细胞增生、分化、运动、细胞免疫、肿瘤转移及关节润滑、伤口愈合、钙化作用和血液凝固等有密切关系, 它同时还是人们进行衰老研究的一种模型蛋白质^[1]。色谱技术不仅广泛用于分离纯化单一类型胶原及其水解多肽^[2], 还可用于分离、分析胶原溴化氰断裂肽、交联氨基酸以及尿羟脯氨酸肽等。通过色谱法分离、测定这些组分, 可分析胶原新陈代谢中结构的变化, 进而用于判断生物活体或死体样品中胶原新陈代谢的先天错误, 帮助诊断因胶原合成、分解、交联或参与胶原代谢的酶等方面发生异常而出现的胶原性疾病。

毛细管电泳法是在传统电泳技术基础上于 20 世纪 60 年代末由 Hjerten 发明的一种分离分析方法, 它利用小的毛细管代替传统的大电泳槽, 使电泳效率提高几十倍。自 1980 年以来, 此技术得到迅速发展, 目前主要用于分离、定性多肽与蛋白质。

本文就色谱技术分离、分析胶原溴化氰断裂肽和毛细管电泳法在胶原 α -链及溴化氰肽分离、分析中的应用作一评述。

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

国家自然科学基金资助项目(298877017)

2002-03-15 收稿, 2002-08-30 修回

1 色谱法在溴化氰肽分离、分析中的应用

多聚胶原都具有不溶性,除采用温和的酶解外,另一方法就是用 CNBr 分解, CNBr 使胶原蛋白分解成母体 α -链的有限片段(在蛋氨酸处断裂),这些肽主要通过以下色谱方法分离。

1.1 凝胶过滤色谱

凝胶过滤色谱也称分子排阻色谱,它是利用多孔凝胶固定相的独特特性而产生的一种主要依据蛋白质及多肽分子大小及形状差异进行分离纯化的一种液相色谱技术,适宜于一些分子量较大的肽或蛋白质的分离分析。据报道许多胶原 CNBr 肽都可在柱尺寸不同的 Bio-Gel A 或 Bio-Gel P 柱上得到分离,早在 1968 年, Piez 就在 Bel-Gel P-105 柱上分离胶原 α 链及 CNBr 片段,用 CaCl_2 溶液洗脱分离出 5 个组分,其分子量依次为 1500、3800、13500、24000 和 95000^[3]; Piez 同时提出了用 Bio-Gel P-6 柱分离分子量低于 2000 组分的方法。1974 年 Chung 等^[4]用 Bio-Gel A 柱纯化了预先经羧甲基纤维素色谱分离的 CNBr 片段,并测定了各组分分子量。1999 年 Miksik 等^[5]在 Sepdex G-15 柱上实现了 I 型胶原 α_1 链、 α_2 链、V 型胶原和 I 型胶原 CNBr 肽的分离。

凝胶过滤色谱是级分蛋白质和测定蛋白质分子量分布的良好方法,其缺点是色谱柱峰容量有限,分离度较低,不宜用于分子大小及组成相似或相差很小组分的分离,通常只用于复杂混合物的初步分级。在适宜条件下 CNBr 能定向剪切胶原蛋白,形成 α -链的有限片段,故该法是分离胶原 CNBr 肽和测定其分子量分布的优良技术。

1.2 离子交换色谱

离子交换色谱主要利用蛋白质或多肽分子与离子交换剂的静电作用,使介质表面可交换离子与带相同电荷的蛋白质或多肽分子发生交换,不同蛋白质或多肽所带电荷不同,与离子交换填料的相互作用也不同,从而使之分离。分离溴化氰肽所用的离子交换色谱主要有羧甲基纤维素色谱和含磷纤维素色谱。在 1960~1980 年期间, Butler^[6]、Miller^[7]和 Chung 等^[4]分别提出了在羧甲基纤维素柱上分离胶原溴化氰肽的方法。Butler 在 pH3.6 的柠檬酸盐缓冲溶液中,用 NaCl 溶液作洗脱液进行线性梯度洗脱,对 V 型胶原 α 链 CNBr 肽进行分离,得到 9 个组分。Miller^[7]采用一种凹形梯度洗脱方式,即用一定浓度的 NaAc 作起始缓冲溶液,柠檬酸盐为终止缓冲溶液分离胶原 CNBr 肽,结果该条件下的分离象许多分离一样,将胶原 CNBr 肽及 α 链衍生组分分离成了三个不同的峰。Chung 等用羧甲基纤维素色谱分离 III 型胶原 α_1 链 CNBr 肽,分离出 9 个组分,其中 7 个组分肽中所含羟脯氨酸的量高于脯氨酸。

Millar 等^[8]率先在含磷纤维素色谱柱上,用 HOAc 溶液作起始缓冲溶液,由起始缓冲溶液制备一定浓度的 NaCl 溶液作终止缓冲溶液,线性梯度洗脱分离。他指出通过改变梯度的斜度,可得到不同目标肽。

1986 年, Bateman 等^[9]报道了用 Mono S 阳离子交换柱分离重要的 I 型胶原 CNBr 肽包括 CB7 和 CB8 肽的方法,分离出 8 个组分。他们还发现在 Mono S 柱上比在羧甲基纤维素柱上洗脱更快,可减少组分的稀释。

离子交换色谱可在近中性条件下,利用 CNBr 肽带电性的不同进行分离纯化。与凝胶过滤色谱相比,分辨率更高,是分离胶原蛋白 CNBr 肽的优良方法。其缺点是柱变化性大,不太稳定;谱峰间距不易控制。

1.3 反相色谱

反相高效液相色谱(RP-HPLC)是根据溶质、极性流动相和非极性固定相表面间的疏水效应建立的一种色谱模式。一般蛋白质或多肽分子中非极性的疏水部分越大,保留值越高。利用 RP-HPLC 分离多肽首先需确定不同结构的多肽在柱上的保留情况,Smolenski 等^[10]研究了在 μ Bondpak 柱上 CNBr 肽的保留行为,反相体系线性梯度洗脱获得了很好的分离。Black 等^[11]研究了在 CN 反相柱上 CNBr 肽的保留情况,从 I、II、III 型胶原 α 链断裂片段中分别分离出 7 个、6 个和 7 个组分。1992 年,Reiser 等^[12]在反相柱上将 CNBr 肽分离为 6 个组分。反相色谱分离蛋白质和多肽过程中离子对非常重要,流动相中离子对的存在能提高蛋白质和多肽在分离时的疏水性。1997 年 Deyl 等在一种 C4 柱上用含七氟丁酸作离子对试剂的 CH_3CN 溶液进行梯度洗脱,应用 RP-HPLC 分离了 CNBr 肽^[13]。

由反相色谱法分离 CNBr 肽的报道可知,通常的烷基键合硅胶反相色谱柱稳定性较高,柱效高,对胶原蛋白 CNBr 肽分离度比其它色谱技术都高,保留机理清楚。但改变流动相时,柱平衡慢;梯度洗脱问题多。

综上所述,一次色谱法很难将胶原 CNBr 肽进行完全分离,因此开展多维色谱在该领域中的应用研究势在必行。胶原蛋白作为新陈代谢研究的模型蛋白质,利用色谱技术分离分析其 CNBr 断裂肽,对于判断其结构变化具有重要意义。

2 毛细管电泳法在分离胶原 α -链及溴化氰断裂肽中的应用

由于 CNBr 肽组成的复杂性以及在研究胶原新陈代谢过程结构变化上的重要性,90 年代以来用毛细管电泳分析胶原 CNBr 肽的报道相对较多,Deyl 领导的研究小组在毛细管电泳分离胶原 α -链及 CNBr 肽领域做了大量工作^[14-22],这些工作分别涉及了毛细管区带电泳、毛细管凝胶电泳和胶束电动毛细管层析等技术。

2.1 毛细管区带电泳

毛细管区带电泳(Capillary Zone Electrophoresis, CZE)法分离多肽类物质主要是依据不同组分中化合物所带电荷不同,且分离效果只由带电性决定,此系统比凝胶电泳更准确。Deyl 等^[14]先在熔融硅毛细管中,采用 pH9.2 硼酸钠缓冲溶液,通过 CZE 法在 15min 内成功分离了 I 型、II 型、V 型、IX 型和 XI 型胶原的 α 、 β 和 γ -链。后来,该研究组^[15]又在 pH2.5 的磷酸盐缓冲溶液中,成功快速地分离了胶原 CNBr 肽,其分离速度较前法快;另外作者还将分离结果与 HPLC 法进行了比较。

CZE 法分离胶原 α 链及 CNBr 肽谱图与反相色谱法分离谱图十分相似,这支持了 CZE 法分离疏水区起决定作用的观点。CZE 法在该领域的利用目前主要存在的问题是样品易与毛细管硅胶柱上的硅醇发生反应,影响峰形及电泳时间。针对这些问题,Deyl 等^[16]做了大量实验进行改进,如调节电泳液的 pH、加入中性表面活性剂(但在电解质中不加)、减少样品与硅醇反应的极性基团、改进毛细管柱材料的组成等。

2.2 毛细管凝胶电泳

毛细管凝胶电泳(Capillary Gel Electrophoresis, CGE)法实际上是增加了凝胶支持介质的区带电泳,它基于分子筛原理,经十二烷基磺酸钠(SDS)处理的蛋白质或多肽在电泳过程中主要

靠分子形状、分子量不同而分离,此电泳法适于含疏水侧链较的多肽的分离。毛细管凝胶电泳法分离不同类型胶原 CNBr 肽与分离完整的胶原 α 链所用的凝胶浓度系统不同。90 年代,胶原 α 链及 CNBr 肽多用非交联、线性的聚丙烯酰胺凝胶柱进行分离。

有报道^[17]表明,与平板凝胶电泳比较,CGE 法用于分离胶原和 CNBr 肽的优势在于:(1)可根据各峰的峰面积,对各对应组分进行定量;(2)提供了在非交联的凝胶上分离分子量 $\geq 300\text{kDa}$ 的链状聚合物的可能性。除此之外,迄今还没有一种方法能为分析此类聚合物提供足够的选择性,在平板凝胶电泳法中将以连续的宽色带出现,而色谱法缺乏足够的选择性。

2.3 胶束电动毛细管层析

胶束电动毛细管层析(Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC)的原理是在电泳液中加入表面活性剂如 SDS,使一些中性分子及带相同电荷分子得以分离。对小分子肽,阴离子和阳离子表面活性剂的应用都可使之形成带有一定电荷的胶束,从而达到很好的分离效果。Deyl 等^[18-19]分别用 pH2.5 的含两种不同浓度 SDS 的磷酸盐溶液作背景电解质,分离了胶原 CNBr 肽。实验发现,在逊胶束溶液中,分离选择性增加;在超胶束溶液中,肽-SDS 结合物存在于胶束中,向阳极移动更快,但选择性更差,可能因该溶液中小分子肽-SDS 结合物在 SDS 中不能形成明显疏水区的缘故,结果导致不同类型胶原的标记肽出峰顺序不严格随疏水区数量而变化。2000 年, Deyl 等^[20]报道的分离 I 型胶原 CNBr 肽的最佳条件是利用 pH2.5 的含 Pluronic F127 共聚物的 Tris-磷酸盐缓冲液。Pluronic 共聚物兼有分子筛效应和表面活性剂功能,它们协同作用促使体系中 CNBr 肽分离。该实验与反相色谱比较,一些分离峰的位置发生了移动。这种同时具有分子筛效应和表面活性剂功能的化合物在毛细管电泳中的利用,为分离开辟了一条新途径。Deyl 等还指出基于毛细管的疏水外层和在缓冲溶液中使用 SDS 胶束的方法,可阻止 CNBr 肽与毛细管壁结合,同时提出了应用一种表面活性剂塞子防止蛋白质或肽被毛细管壁吸附,在毛细管壁和假相胶束通道之间建立分离平衡的方法。

在特定条件的毛细管材料中,利用酸性或碱性缓冲溶液^[14,17]都可使胶原 α 链得到分离。但是,胶原 CNBr 肽可能仅在酸性条件下能得到分离,常用的为 pH2.5 磷酸盐缓冲溶液^[18-21]。在此条件下,小分子量肽能在较短的迁移时间内得到分离。Deyl 等^[21]用 pH2.5 的含修饰聚合物的磷酸盐缓冲溶液作背景电解质,分离出 I 型胶原 CNBr 肽的 13 个组分;Deyl 首次根据标记肽和已纯化的相应类型胶原衍生肽(CNBr 肽)的峰面积,测定了不同组织提取样品中 I、III 和 V 型胶原的含量。研究发现,(1)该法分离 CNBr 肽,对于标记肽定量,结果满意,但事实上该法不能完全分离肽家族的其它成员;(2)相对分子量 $> 13.5\text{kDa}$ 的肽迁移时间随分子量的增加而增加,而相对分子量 $< 4.6\text{kDa}$ 的肽迁移时间与分子量无关。1999 年 Deyl 等^[22]又通过离线荧光光谱和毛细管电泳对活性胶原化合物中多组分进行了分析。

在文献[19]中 Deyl 等还提出了通过调节背景电解质 pH、添加有机溶剂降低缓冲溶液极性和在试验缓冲溶液中添加表面活性剂三种方式提高分离选择性的观点,同时分析了这些条件下胶原衍生肽在毛细管电泳中的分配机理。由此推断,毛细管电泳法分离机理十分复杂,它是建立在离子特性、疏水性、适宜条件下明显的结合特性、分子筛效应等多种相互作用基础上的分离分析方法。

3 结语

综上所述,某些毛细管电泳法与高效液相色谱分离谱图相似,但这两种方法也存在明显差异,不仅在选择性上,而且在分离对象适应范围上都有差异。HPLC 作为胶原蛋白 α 链的分离及衍生肽的快速分级和制备技术,具有明显优势,它在发现新的胶原类型中具有重要作用。毛细管电泳法主要存在以下缺点:制备能力差,光路太短,非高灵敏检测器难以测出样品峰,凝胶填充管需专门的灌制技术,大的截面积可能导致胶原蛋白分离效能下降,吸附将引起电渗变化,进而影响分离重现性等。但是,毛细管电泳法多种效应协同作用的分离模式,使之具有更高的分离效能,用于分离胶原 α 链及衍生肽分离时间短,样品使用量微小,经济、自动等。它的利用有望解决色谱法和常规凝胶电泳法不能完成的分离问题。该法定量分析胶原标记肽的成功,激励着人们探索更有效、更准确定量不同类型胶原 α 链及衍生肽的毛细管电泳技术及条件,预计不久的将来毛细管电泳技术必将成为分离、定性及定量分析胶原蛋白 α 链及衍生肽的有力工具。

参考文献

- [1] 何剑斌,田文儒,贺洪君. 中国兽医杂志,1999,25(10): 42~44.
- [2] 王 碧,贾冬英,舒子斌 等. 化学通报,2002,65(9): W070.
- [3] K A Piez. Anal. Biochem., 1968, 26: 305~312.
- [4] E Chung, E M Keel, E J Miller. Biochemistry, 1974, 13: 3459~3452.
- [5] I Miksik, Z Deyl, J Herget et al. J. Chromatogr. A, 1999, 852(1): 245~253.
- [6] W T Butler, K A Piez, P Bornstein. Biochemistry, 1967, 6: 3771~3774.
- [7] E J Miller. Biochemistry, 1971, 10: 3030~3033.
- [8] E J Miller, J M Lanew, K A Piez. Biochemistry, 1969, 8: 30~33.
- [9] J F Bateman, T Mascara, D Chan et al. Anal. Biochem., 1986, 154: 338~344.
- [10] K A Smolenski, A Fallon, N Light. J. Chromatography, 1984, (287): 29~44.
- [11] C Black, D M Douglas, M L Tanzer. J Chromatography, 1980, (190): 393~400.
- [12] K M Reiser, M A Amigable, J A Last. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(34): 24207~24216.
- [13] Z Deyl, I Miksik, J Zicha et al. Anal Chim Acta, 1997, 352(1~3): 257~270.
- [14] Z Deyl, V Rohlicek, M Adam. J. Chromatogr., 1989, 480: 371~378.
- [15] J Novotna, Z Deyl, I Miksik. J Chromatogr. B: Biomedical Appl., 1996, 681(1): 77~82.
- [16] I Hammikova, I Miksik, Z Deyl et al. J. Chromatogr. A, 1999, 838: 167~177.
- [17] Z Deyl, I Miksik. J. Chromatogr. A, 1995, 698(1~2): 369~373.
- [18] Z Deyl, J Novotna, I Miksik et al. J. Chromatogr. A, 1998, 796(1~2): 181~193.
- [19] I Miksik, Z Deyl. J. Chromatogr. A, 1999, 852(1~2): 325.
- [20] I Miksik, Z Deyl. J. Chromatogr. B: Biomedical Appl, 2000, 739(1): 109~116.
- [21] Z Deyl, J Novotna, I Miksik et al. J. Chromatogr. B: Biomedical-Appl., 1997, 689(1): 181~194.
- [22] Z Deyl, I Miksik, J Zicha. J. Chromatogr. A, 1999, 836(1): 161~171.