

文章编号:1000 - 1573(2003)S0 - 0148 - 04

高效液相色谱(HPLC)分离和检测蛋白质

张淑红¹, 冯 硕¹, 李正平^{1,2}, 方 正¹

(1. 河北农业大学 河北省生物无机化学重点实验室, 河北 保定 071001;

2. 河北大学 化学与环境科学学院, 河北 保定 071002)

摘要: 对近年来利用高效液相色谱(HPLC)分离检测蛋白质的研究作了综述。比较详细地介绍了用于蛋白质分析的各种 HPLC 模式、检测器、以及联用技术的发展情况,肯定了高效液相色谱在蛋白质分离检测中的重要作用。

关键词: 高效液相色谱(HPLC); 蛋白质; 分离模式; 检测器; 联用技术

中图分类号: Q 503

文献标识码: A

The separation and detection of protein by high performance liquid chromatography

ZHANG Shu-hong¹, FENG Shuo¹, LI Zheng-ping^{1,2}, FANG Zheng¹

(1. Key Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071001, China)

Abstract: The review summarized the studies of protein separation and detection by high performance liquid chromatography (HPLC). Various models, detectors and the developments of combined techniques of the HPLC in protein analysis were introduced relatively in detail, and the importance of high performance liquid chromatography in protein separation and detection was confirmed.

Key words: high performance liquid chromatography; protein; separation model; detector; combined technique

蛋白质是生命有机体的主要成分,在生命体生长发育的各个阶段都起着重要作用。所以分离和检测蛋白质一直是人们研究的热点。根据 Regnier 的说法^[1],蛋白质是半僵硬的,大小、形状和表面都不均一,是各有特征的分子。这样就给分离和检测蛋白质赋予了不同的特点。目前,HPLC 技术广泛地应用于蛋白质的分离和检测。这是由于高效液相色谱法具有许多优点:与结晶、过滤等传统分离方法比较,它可以提供更佳的分离效果,并且一次可以得到 2 个以上的高纯度组分;分析速度快,一般可以在 30 min 内完成;样品回收简单,检出范围达 ng 或 pg 级;方法灵活机动,一台高效液相色谱仪只需更换不同的色谱柱和检测器,便可适用于不同的分离要求。近来,随着色谱泵的改进(可产生 105 MPa 的压力)出现了特高效液相色谱(VHPLC),使蛋白质的分离更快速高效^[2]。目前,HPLC 技术日趋成熟,它已成为分离和检测蛋白质的重要工具。

1 分离蛋白质的 HPLC 模式

蛋白质在物理、化学及功能等特征上的差异为蛋白质的分离检测提供了基础。根据蛋白质的大小、形状、电荷、疏水性、功能等特性以及蛋白质的来源、实验要求等可以选择不同的模式来分离目标蛋白质^[3]。

1.1 反相高效液相色谱(Reverse - Phase High - performance Liquid Chromatography, RP - HPLC)

在 HPLC 各种模式中,RP - HPLC 应用最为广泛。其固定相是非极性的,而流动相是比固定相极性更强的溶剂系统。蛋白质分子疏水性的不同使其在两相中的分配不同而得到分离。近 10 几年来,RP - HPLC 以其高分辨力、快速、重复性好等优点广泛应用于蛋白质的分离分析。

有利于蛋白质分离的条件于 1970 年首次提出,即低 pH 值流动相、室温或较高的温度及使用乙腈或异丙醇作为有机部分。三氟乙酸(TFA)作为离子对试剂,是反相色谱中最常用的添加剂。蛋白质的保留性质和选择性还与键合固定相的性质有关,实验证明,大孔硅胶(20 ~ 30 nm)短链烷基(C₄和 C₈)键合固定相适合蛋白质的分离^[4];另外,无孔径载体柱对分子量相差较大和疏水性很强的蛋白质混合物的分离效果很好。从分子量 6 000 的胰岛素到分子量 66 000 的牛血清白蛋白在无孔径载

收稿日期:2003 - 03 - 20

作者简介:张淑红(1978 -),女,河北省赞皇县人,在读硕士研究生,主要从事生物化学研究。

体柱上均能得到良好的分离,并且分离速度很快(一般 2~5 min),较高的柱温还能改善蛋白质混合物的分离^[5];Daniel B. Wall 等利用 C₁₈ 非多孔硅粒载体柱实现了细胞溶菌物中蛋白质的快速分离^[6]。并且,利用这种方法,在 15 min 内大肠杆菌的整个细胞溶菌物水溶液中的蛋白就可以得到很好的分离。

1.2 高效离子交换色谱(High-performance Ion Exchange Chromatography, HPIEC)

HPIEC 是根据蛋白质分子在一定的 pH 和离子强度条件下所带电荷的差异进行分离的方法。这种技术已经成功地用于分离蛋白质,并且,当选择的流动相的 pH 值合适时能维持蛋白质的生物活性。由于 HPIEC 是一吸附性的梯度洗脱过程,所以具有很好的负载力。近几年来 HPIEC 也成为分离检测蛋白质的重要方法。并且,人们的研究证明 HPIEC 与 RP-HPLC 都是分离膜蛋白的首选方法。

在离子交换色谱填料研究方面,聚合物离子交换剂颇受重视。因为这种固定相具有稳定性好、离子交换容量大、对蛋白质的分离有选择性等特点^[7]。

1.3 高效凝胶过滤色谱(High-performance Gel Filtration Chromatography)

凝胶过滤色谱也称体积排阻色谱(Size exclusion chromatography, SEC),是根据分子相对大小进行分离的一种色谱技术。相对于吸附性液相色谱技术而言,SEC 的分辨力和样品负载力都很低。SEC 又是一种温和的技术,可用来平衡柱及分离样品的缓冲液范围较广。所以近年来关于利用 SEC 分离蛋白质的报道也不少。例如,Bunger H 等成功的分离出疏水性肺的表面活性剂蛋白 SP-B、SP-C^[8];另外 SEC 特别适合对蛋白质分子量的研究,利用 SEC 能够快速分离出人血清白蛋白 HAS 的降解产物,结合特定的检测器即可测定其单体和二聚体的分子量^[9]。

1.4 高效亲和色谱(High-performance Affinity Chromatography, HPAFC)

蛋白质在行使功能时必须和底物、受体或抑制剂等分子进行生物专一性结合,这种高度专一性结合特性可用于亲和色谱分离。HPAFC 是蛋白质检测中最专一的分离技术,可以从复杂的混合物中直接分离到目标蛋白质,特别适合疫苗、糖蛋白和抗体等的分离纯化。周冬梅等研究了蛋白 A 高效亲和色谱对水溶液及人血浆中免疫球蛋白 G(HIgG)的特异性吸附和定量测定,方法具有较高的精确度和重复性^[10]。通过 HPAFC 可以分离纯化酶、抗体、抗原、结合蛋白、受体蛋白、辅助蛋白等,也可以分离变性蛋白、化学改性蛋白等,可见 HPAFC 在蛋白质化学中起着重要作用。

1.5 其它液相色谱模式

高效疏水色谱(HIC)是用来分离构象不稳定蛋白质的技术之一,其分离机制类似于反相液相色谱,只是用水性缓冲液代替了有机溶剂;以键合氯化物作固定相,用 SDS 或 CTAB 作流动相的胶束高效液相色谱中,胶束提供了一个溶质溶解的非均相环境,可用于蛋白质的分离^[11];近年来,人们将非线性色谱理论应用于蛋白质分离中^[8],更加完善了高效液相色谱技术。在实际应用中,特别是复杂样品,通常采用几种分离模式结合使用才能获得理想的目标产物^[12]。

2 用于蛋白质分离检测的 HPLC 检测器(HPLCD)

在 HPLC 分析蛋白质中,HPLCD 的优劣对于检测效果有着至关重要的作用。近年来,HPLCD 技术发展很快,其检测蛋白质的灵敏度以及其它性能都得到了很大的提高^[3]。

2.1 紫外吸收检测器(UV Absorption Detection)

UV 检测器是目前应用最广泛的检测器,它灵敏度高,线性范围宽,可用于梯度洗脱。近年来较大的改进包括^[13]:采用高效的光学系统,噪声水平降低;测定波长变宽,可达 190~900 nm;用时间程序切换波长,通过基线调整功能消除基线漂移;极宽的线性范围(2.5 AU)及测量范围(0.0001~4 AUFS);漂移低(小于 1×10^{-4} AU);波长的准确度以及重复性好。HPLC 结合 UV 检测器检测蛋白质的研究很多,主要是应用了其灵敏度高、重复性好等优点。Vickers ER 等建立了利用 UV 检测器检测唾液中舒缓激肽的新方法,此方法操作简单,重复性好^[14];Song H 等将 UV 检测器用于凝血酶抑制剂的检测^[15]。另外用 HPLC 分离检测鼠血清中 CDRI-85/92 时,UV 检测器的应用使检测下限达到 1.25 ng/mL。

2.2 光电二极管阵列检测器(Photodiode Array Detector, PDAD)

PDAD 是 20 世纪 80 年代发展起来的一种新型紫外检测器,它具有以下优点^[13]:可得到任意波长的色谱图;可以在分离时得到各组分的紫外-可见吸收光谱;色谱峰纯度鉴定、光谱图检索等功能,可提供组分的定性信息。PDAD 的应用使得蛋白质检测的灵敏度提高,检测更加方便,并且稳定性增强^[16,17]。

2.3 荧光检测器(Fluorescence Detector)

荧光检测器是一种专用型检测器,具有高的灵敏度和可靠性。一般情况下,荧光检测器比紫外吸收检测器的灵敏度要高出两个数量级,对仪器的稳定性依赖较小,可作梯度洗脱,但是定量分析时线性范围较窄。所以,荧光检测器适于蛋白质的痕量分析,尤其在用荧光衍生剂后。有人利用 HPLC 结合荧光检测器分离和检测人血清中含硒蛋白质,取得了很好的效果,其中采用 2,4-二氨基萘(DAN)作荧光衍生剂^[18]。另外,激光诱导荧光检测器由于其高的灵敏度,在蛋白质的分析中也受到人们的重视和利用^[19]。

2.4 电化学检测器 (Electrochemical Detector, ECD)

ECD 是一种有效的痕量、超痕量的检测器。目前, HPLC - EC 检测在蛋白质科学领域中具有独特的优点: 选择性高; 灵敏度高, 检测限为 ng 或 pg, 线性范围为 4~5 个数量级; 分析快速, 可用于梯度洗脱。

2.5 蒸发散射检测器 (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD)

ELSD 是质量型、高灵敏度的通用高效液相色谱检测器, 对未知物可以得到准确的定量, 灵敏度和稳定性都很好, 并且适用于梯度洗脱。由于它的这些优点, ELSD 开始广泛用于蛋白质检测中。Bunger H 等建立了分离检测肺部表面活性剂蛋白 (SPs) 的新方法, 即利用 SEC - ELSD 来分析 SP - B 和 SP - C, 效果很好^[8]。

2.6 多角激光光散射 (Multi - angle Laser - light - scattering, MALLS)

MALLS 主要是与 SEC 联用测量溶液中蛋白质的分子量以及聚集体的大小。灵敏度极高, 可以检测到是否有聚集体存在, 形成了多少聚集体。MALLS 作为 HPLC 的检测器, 有着广泛的应用。Oliva A 等利用 SEC - MALLS 进行乳球蛋白与 rHGH 分子量的研究^[20], 以及对 HAS 聚集体的研究^[9], 实验证明, 这种技术准确度很高并且检出限很低。

2.7 其它检测器

HPLC 分离检测蛋白质的研究中, 除了上述几种常用的检测器外, 示差折光检测器 (Differential Refraction Detector) 作为一种通用型检测器也不时的被人们利用, 但是它的灵敏度低^[21]; 另外, 放射性检测器也有其特殊的应用, 它可以检测具有放射性标记的蛋白质^[22]。其它那些不常用或者性能不好的检测器本文中不再介绍。

3 蛋白质分离检测的 HPLC 联用技术

为了使蛋白质的检测更加准确方便, 人们研究了各种 HPLC 联用技术。目前常用的比较成功的联用技术主要有: 高效液相色谱 - 质谱 (HPLC - MS)、高效液相色谱 - 毛细管电泳 (HPLC - CE)、高效液相色谱 - 等速电泳 (HPLC - ITP)、高效液相色谱 - 电感耦合等离子体原子发射光谱 (HPLC - ICP - AES)。

3.1 HPLC - MS 联用技术

HPLC - MS 联用技术是近年来研究的热点, 通过质谱可以实现对蛋白质的自动分离检测^[23]。随着电喷雾 (ESI) 接口技术的发展, HPLC - ESI - MS 联用技术为蛋白质的检测提供了强有力的工具。这种技术耗样量少、精确度高、快速方便, 并且可以用于不纯或者复杂混合物的分析。我国研究工作者利用 HPLC - ESI - MS 联用技术对溶菌酶和牛血清蛋白分别进行定性定量分析以及对其混合物进行检测, 取得了较满意的结果^[24]。另外, HPLC - MS - MS 联用因其通用性以及高灵敏度在蛋白质分析中也有着重要的应用^[2, 25]。还有人运用高效液相色谱和电喷雾四极杆离子阱质谱 (HPLC - ESI - QITMS) 联用技术分析了两种天然磷酸化蛋白 (牛 - 酪蛋白和牛髓磷脂碱性蛋白) 的磷酸化位点^[26]。除了这些, 国外科学家还利用高效液相色谱 - 基质辅助解吸/ 电离 - 飞行时间质谱 (HPLC - MALDI - TOFMS) 联用技术来检测细菌蛋白^[6]。

3.2 HPLC - CE 联用技术

HPLC - CE 联用技术特别适合细胞或组织中蛋白质的分离^[12]。在分离检测复杂蛋白质样品时, HPCE 可以作为 HPLC 的补充, 有时利用 HPLC 无法分离的蛋白质在 HPCE 上即可得到很好的分离^[27]。另外, 毛细管区带电泳 (CZE) 与 HPLC 联用也可以很好的分离检测一些蛋白质^[28]。

3.3 HPLC - ITP 联用技术

高效液相色谱和等速电泳都是近年来发展较快的分离分析方法, 二者联用可以分离分析成分和复杂的蛋白质样品。曾经有人将 ITP 作为一种预处理技术与 HPLC 联用, 我国研究工作者建立了新的联用系统, 成功地研究了含蛋白质和一些金属离子的复杂样品的分离分析^[29]。

3.4 HPLC - ICP - AES 联用技术

ICP - AES 是十分重要的化学形态分析技术, HPLC 与 ICP - AES 的结合使之具有多元素同时检测的特性。国外科学家利用此联用技术对人类肝部的金属硫蛋白中的金属分布作了准确的定性定量分析^[30]。

4 小结

HPLC 可将不同的蛋白质分离并检测, 不但有很高的灵敏度且实现了分析自动化, 对医药、临床病理、预防学等蛋白质化学领域的研究提供了强有力的手段。同时也看到, 很难找到一种符合全部要求的理想的检测器以及 HPLC 柱, 并且联用技术也待完善。所以利用 HPLC 分离检测蛋白质的研究还将继续, 以出现更方便快速、灵敏度极高、通用性极好的 HPLC 分析方法, 推动蛋白质化学的研究。

参考文献:

- [1] KATNA YAKE C K. Lateral interaction between electrostatically absorbed and covalently immobilized proteins on the surface of cation - ex

- change sorbents [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 743: 25 - 32.
- [2] LUKE TOLLEY, JAMES W JORGENSON, M ARTHUR MOSELEY. Very High Pressure Gradient LC/MS/MS [J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73: 2985 - 2991.
- [3] 林炳承, 邹雄, 韩培祯. 高效液相色谱在生命科学中的应用[M]. 济南:山东科学技术出版社, 1996. 30 - 47, 190 - 193.
- [4] 张华, 王俊德, 钟虹敏, 等. 反相高效液相色谱分离蛋白质的研究 [J]. *色谱*, 1998, 16(3): 220 - 221.
- [5] 张丽华, 屠红敏, 吴高德, 等. HPLC 无孔径载体柱用于快速分离蛋白质和多肽 [J]. *高技术通讯*, 1995, 2: 45 - 47.
- [6] DANIEL B WALL, DAVID M IUBMAN, SHANNON J FL YNN. Rapid Profiling of Induced Proteins in Bacteria Using MALDI-TOF Mass Spectrometric Detection of Nonporous RP HPLC - Separated Whole Cell Lysates [J]. *Analytical Chemistry*, 1999, 71: 3894 - 3900.
- [7] KATNA YAKE C K. Study of protein binding to a silica support with a polymeric cation - exchange coating [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 743: 15 - 23.
- [8] BUNGER H, KAUFNER L, PISON U. Quantitative analysis of hydrophobic pulmonary surfactant protein by high - performance liquid chromatography with light - scattering detection [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 870(1 - 2): 363 - 369.
- [9] OLIVA A, SANTOVENA A, LLABRES M, *et al.* Stability study of human serum albumin pharmaceutical preparation [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1999, 51(4): 385 - 392.
- [10] 杨敏, 宋晓锐, 罗宗铭. 蛋白质分析方法的新进展 [J]. *广州化工*, 2000, 28(4): 121 - 124.
- [11] 傅若农. 高效液相色谱近年进展(下) [J]. *国外分析仪器*, 1997, 2: 1 - 11.
- [12] ISSAQ H J. The role of separation science in proteomics research [J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(17): 3629 - 3638.
- [13] 谢孟斌, 刘媛, 丁雅韵. 高效液相色谱仪器的进展和在生命科学中的应用 [J]. *现代仪器*, 2001, 1: 30 - 32.
- [14] VICKERS ER, GOEBEL C, MATHER LE, *et al.* High - performance liquid chromatographic determination of bradykinin in saliva: a critical review and a new method [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, 755(1 - 2): 101 - 110.
- [15] SONG H, GU X, RIFFEL K, *et al.* Determination of a novel thrombin inhibitor in human plasma and urine utilizing liquid chromatography with tandem mass spectrometric and ultraviolet detection [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, 738(1): 83 - 91.
- [16] LEIBENGUTH P, LE GUELLEC C, BESNIER J M, *et al.* Therapeutic drug monitoring of HIV protease inhibitors using high - performance liquid chromatography with ultraviolet or photodiode array detection [J]. *Ther Drug Monit*, 2001, 23(6): 679 - 688.
- [17] DE LA VIEJA A, CALERO M, SANTISTEBAN P, *et al.* Identification and quantitation of iodotyrosines and iodothyronines in proteins using high - performance liquid chromatography by photodiode - array ultraviolet - visible detection [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, 688(1): 143 - 149.
- [18] GAO Y, WANG Z. Separation and detection of selenium - containing proteins in human serum [J]. *Fresenius J Anal Chem*, 2000, 367(1): 60 - 64.
- [19] OZBAL C C, SKIPPER P L, YU M C, *et al.* Quantification of (7S,8R) - dihydroxy - (9R,10S) - epoxy - 7,8,9,10 - tetrahydrobenzo[a]pyrene adducts in human serum albumin by laser - induced fluorescence: implications for the in vivo metabolism of benzo[a]pyrene [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000, 9(7): 733 - 739.
- [20] OLIVA A, LLABRES M, FARINA J B. Comparative study of protein molecular weights by size - exclusion chromatography and laser - light scattering [J]. *J Pharm Biomed Anal* 2001, 25(5 - 6): 833 - 841.
- [21] STUTING H H, KRULL I S. Complete on - line determination of biopolymer molecular weight via high - performance liquid chromatography coupled to low - angle laser light scattering, ultraviolet, and differential refractive index detection [J]. *Anal Chem*, 1990, 62(19): 2107 - 2114.
- [22] SCHEPKY A G, MEINHARDT G, AUSTERMANN S, *et al.* Specific determination of trosine - phosphorylated proteins and peptides by differential iodination [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 743(2): 273 - 282.
- [23] VOGEL JS, GRANT PG, BUCHHOLZ BA, *et al.* Attomole quantitation of protein separations with accelerator mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(10): 2037 - 2045.
- [24] 谷胜, 沈金灿, 庄峙厦, 等. 高效液相色谱 - 电喷雾 - 质谱法测定蛋白质混合物 [J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2001, 40(5): 1067 - 1072.
- [25] WANG Z, HOP C E, LEUNG KH, *et al.* Determination of in vitro permeability of drug candidates through a caco - 2 cell monolayer by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 2000, 35(1): 71 - 76.
- [26] 车发云, 邵晓霞, 夏其昌. 高效液相色谱 - 电喷雾四极杆离子阱质谱鉴定蛋白质磷酸化位点 [J]. *中国科学(C辑)*, 2000, 30(4): 421 - 427.
- [27] APFFEL A, CHAKEL J, UDIAVAR S, *et al.* Application of new analytical technology to the production of a "well - characterized biological" [J]. *Dev Biol Stand*, 1998, 96: 11 - 25.
- [28] DOLNIK V. Capillary zone electrophoresis of proteins [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(12 - 13): 2353 - 2361.
- [29] 阮源萍, 刘文远, 胡荣宗, 等. 等速电泳 - 高效液相色谱联用分离复杂样品的研究 [J]. *色谱*, 1999, 17: 49 - 51.
- [30] WOLF C, ROSICK U, BRATTER P. Quantification of the metal distribution in metallothioneins of the human liver by HPLC coupled with ICP - AES [J]. *Fresenius J Anal Chem*, 2000, 368(8): 839 - 843.

(编辑:李川)