

# 肽类常用的分析技术\*

## COMMON TECHNIQUE OF PEPTIDE ANALYSIS

郭振宇 吴贤汉

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

生命科学研究的迅速发展对生物大分子的分离分析提出了更高的要求,促使人们不断研究和开发新型的高效、快速、灵敏、选择性好的分离分析方法。就以肽类分析来说,不论是组织内提取、利用重组技术表达,或是以化学方法合成肽分子,均存在分离和纯化的问题。蛋白质和多肽的分离分析技术种类繁多,近年来又有很大发展,不少技术也以新的姿态出现,例如双水相体系萃取、超临界流体萃取和反微体体系萃取等技术。但这些技术一般适用于分离提纯的最初阶段。膜滤和纳滤技术十多年前还刚刚用于肽类的分析,但目前已相当普遍。不过,在蛋白质和多肽产品的

精制和分析中应用最广泛的还是色谱和电泳技术。下面就其常用方法及近年的发展作一概括介绍。

### 1 凝胶过滤层析

也称分子排阻层析、分子筛层析或凝胶渗透层析。根据分子大小,将混合物通过多孔的凝胶床而达到分离目的。它的回收率很高,活力不受破坏。使用

---

\* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第3653号。

收稿日期:1998-12-17;修回日期:1998-12-21

的凝胶种类主要有交联葡聚糖凝胶,聚丙烯酰胺凝胶,琼脂糖凝胶等。此后经过几十年不少人的实际应用,使之不断完善,变成了一种可靠的分离纯化及测定生物高分子分子量的方法。使用过程中因其设备简单,结果处理方便,因此应用非常广泛。

在肽类的分离纯化研究中,由于其分子量较小,复杂样品分子量又比较接近,不易寻找单纯一种凝胶及合适的孔径来进行分离,往往需要结合离子交换或HPLC(高压液相色谱)方法,使操作繁琐、工作量大、时间长,并因多次洗涤导致样品丢失,所得结果往往是峰型不明显、峰尖较宽、峰与峰之间界限不够清晰。近来随着分离纯化要求的提高和研究的深入,又有一些新的凝胶种类出现,如 Super Peptide HR 是专为肽分子纯化设计的凝胶过滤预装柱,能配合反相层析做出更精美的肽图。传统的反相层析方法纯化肽类生物分子时,往往需要大量的有机溶剂在酸性下进行分离,而 Pharmacia Biotech 最新推出的 Superdex Peptide HR10/30和 PC3. 2/10凝胶,是特别针对分子量在10 000或以下的肽或小蛋白的分析及小量制备工作而设计,为肽类生物分子纯化提供了一种崭新方法,尤其是分子量在100~7 000范围内选择性非常高,甚至相差仅一两个氨基酸的肽分子亦可以得到很好的分离,而且能够确保生物分子的活性及回收率。如胡克平等对芋螺毒素这种分子量在3 000左右的小肽进行分离纯化,以往文献需经一次分子筛(Sephadex G15)和两次HPLC,筛选活性峰工作量且样品易损失,而用 Superdex Peptide HR10/30初分即可得到11个峰。又有人曾尝试用SDS-PAGE电泳法分析被胰蛋白酶消化过的重组噬菌体 fd-GPGRAF,由于释放出的肽分子量太小而无法被检测到。利用 Superdex Peptide HR 10/30凝胶过滤可以清楚地分析并纯化目标肽,纯化的策略比传统的反相层析法更加简便。朱希灿为了对一种含多肽的蝎毒样品进行检测,比较了样品在 TSKG2000SW7. 5/30柱与 Superdex 75 HR10/30上所做的分离,结果表明,后者明显的分辨率更高,样品峰更尖,更接近基线分离,测得样品中主要含约21 000的多肽。

## 2 凝胶电泳

自从1959~1964年利用聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离人血清蛋白成功以后,此方法为分离蛋白质、多肽和核酸这些大分子化合物提供了极为有力的武器。在此之前利用区带电泳分离仅是根据组分(离子状态)的自由泳动率的差别,因此当自由泳动率差别很

小时就得不到满意的分离效果。如纸电泳的纸只起着支持被分离物质和抗对流作用,而对分离过程本身不起什么作用。凝胶电泳除具有电荷效应外,还具有分子筛的效应。凝胶有较高的粘度,在电泳时产生一定的摩擦阻力,因此它不仅具有防止对流、减低扩散的能力,还能和正在移动的颗粒相互作用,主动参与分离过程。假若凝胶的孔洞平均大小接近于所分离的物质分子大小,那么各种分子通过凝胶孔时所受的阻碍程度是和其大小、形状密切相关的,这样就为分开自由泳动率很相近的分子提供了一种简单而有效的方法。另外不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳还能通过浓缩胶提供一种浓缩效应,使样品在分离前浓缩形成一狭小的中间层,达到更好的分离效果。SDS-PAGE是目前应用最广泛的一种高分辨力的电泳方法,用于蛋白质和多肽的分离鉴定和分子量测定,常用的缓冲液系统是 Tris,近年来文献报道用 Tricine 系统可以改善小分子量蛋白质和肽的分离。不管是 Neville 和 Glossmann 或 Laemmli 的 SDS-PAGE 体系以及 Douglas 后来对它的改进,他们都没有解决分子量10 kD 以下的多肽分离及纯化问题。Hermann Schagger 和 Gebhard von Jajow 利用 Tricine-SDS-PAGE 对分子量范围1~100 kD 之间的多肽分离进行了研究。在不连续的 SDS-PAGE 系统中,Tricine 作为尾随离子较之 Tris 可以使小分子蛋白或多肽在较低浓度丙烯酰胺聚合下得到更高的分辨率,同时分子量范围5~20 kD 的样品可在不使用尿素不需要制备梯度胶的情况下得到很好的分离,这样就为后期的氨基酸测序等工作减少了影响因素,分子量5 kD 以下的电泳分离效果也比 Swank 和 Munkers 的系统好。另外,Anderson 等发展了一种分别利用两种电泳迁移率快的强电解质离子为前导离子及拖尾离子的不连续系统,合并使用8 mol/L 尿素和 SDS,并且含有高百分浓度的交联剂,在样品分子量2 500~90 000范围内能获得较满意的分离效果。

另外,在 SDS-PAGE 系统分离多肽的过程中,快速的固定、染色、脱色对于避免小肽的丢失也是非常必要的。常用的考马斯亮蓝染色对蛋白质很合适,但染色肽时,则在染色和脱色过程中丢失很大。屠其昌等测定过一个20个氨基酸残基的肽,回收仅10%左右,若用金属  $ZnCl_2$  染色,仅2~3 min,且不用脱色,效果颇佳。有文献用 Serva Blue G 染色,另外,1996年 Giovanni Candiano 等人报道利用 MTA(三氯醋酸甲酯)对蛋白进行负染效果也很好,灵敏度可达0.5 ng,且方便易行,最重要的是时间短,固定、染色只需1 h,然后水洗,1 min 后即可看到负染效果,持续30 min,

便于对样品进行后期操作。还有一些在 SDS-PAGE 后不用染料对多肽定位的方法,如在 0~4 °C 下将凝胶冷却产生沉淀,或与钾离子或阳离子表面活性剂保温生成沉淀来观察 SDS-多肽复合物。日渐普及和十分灵敏的方法是首先将大量的样品与一份已与丹磺酰氯反应的样品多肽混合,电泳时丹磺酰化的多肽与其未经修饰的多肽完全一致地同步泳动,电泳后作为标志物在紫外灯下观察凝胶。

### 3 高压液相色谱(HPLC)

70年代中期以来,色谱学家逐步建立起包括反相 HPLC 的一整套色谱方法,并运用这些方法在肽的分离纯化、制备、定性定量分析、分子量测定、肽结构与其色谱保留值关系等方面进行了深入的研究。80年代以来,HPLC 在肽研究领域得到了广泛应用,取得突破性进展。分离纯化肽的最常用方法是反相 HPLC。这是因为:(1)此方法以水为基本组成部分,这与肽的生物化学性质很相宜。虽然流动相中的酸和有机溶剂,以及固定相均可能使肽的天然构象发生变化,但当这些因素除去后,肽的构象一般能恢复原状。因此在反相 HPLC 中,肽的活性回收率是很高的,一般在 80% 以上。(2)与其他分离方法比较,反相 HPLC 的分辨力更强,适用范围更广泛。在利用反相 HPLC 分离肽的多年实践中,已形成了一些乐于被许多实验室采用的色谱系统。比如,色谱柱为 C18 或 C8,流动相为挥发性的三氟醋酸或七氟丁酸和乙腈,梯度洗脱。检测波长多设在 UV210~225 nm 范围,若设在 UV214 nm,可在 pg 分子水平上分离肽。另外,有时用反相 HPLC 分离效果不好的肽,若改用离子交换 HPLC 分离,往往奏效。如 N-端焦谷封闭的肽与酶解去掉其焦谷氨酸后的部分,两者出现电荷差异,分别用强阳离子交换柱(SCX)及 C18 柱分离,结果前者的分离度明显高于后者。常用弱离子交换固定相分离肽,如硅胶基质的烷胺基或烷羧基多孔微粒型固定相。对于小肽,也可用强酸(磺酸)或强碱(季胺)型离子交换剂。新发展的粒径更小,1.5~2.5 μm 的非多孔微粒型离子交换固定相,能做到快速分离肽样品。

目前,生物大分子的 HPLC 研究,取得的经验较为成熟,存在麻烦较少的,或许要算肽分子的 HPLC 研究。综上所述,反相 HPLC 具有分辨力强,以水为流动相基本组份,流动相价格较低廉以及可供选择的固定相品种及流动相多种多样等优点。因此,这一技术已成为分离纯化肽的成熟方法。

近年来,随着 HPLC 应用和研究的不断深入,又

出现了微柱 HPLC 和制备型 HPLC,应用微柱分析或分离样品的优点是:(1)分辨力至少和常规 HPLC 一样。(2)回收率高。样品在柱中填充料上的非专一性吸附比经典的色谱柱少。(3)高灵敏度。由于流速一般为 100~200 μl/min,出峰时间短,即峰型尖窄,从而大大提高了检测灵敏度。(4)消耗溶剂少。以流速 100 μl/min,一个流程 1 h 计算,分析一次样品只需 6 ml 洗脱液。制备型 HPLC 的发展,适用于多肽类激素药物和基因工程产物的分离提纯,可大规模分离纯化多肽蛋白质。虽然设备和消耗费用昂贵,但由于这些产品产值高,HPLC 仍是一种有效的方法。制备型 HPLC 流速一般可达 100~1000 ml/min,柱直径 25.4~50.8 mm。与分析型 HPLC 相比,同样能够取得良好的分离效果。

### 4 毛细管电泳(CE)

传统的电泳技术是目前生物化学及分子生物学实验室中常用的分离分析和制备手段,但它周期长,操作繁琐,难以定量和自动化。毛细管电泳是近年来发展的一种新技术,自 1989 年起已连续举行了几届国际性会议,它除了具备凝胶电泳的高分辨力外,以其快速、定量、重复性好、灵敏度高及自动化程度高等诸多优点在近几年来成为蛋白质、多肽乃至其他生物分子分离分析的一项崭新且重要的技术。目前已用于多肽、蛋白质以及核酸的分离分析,遗传工程产物的鉴定、制药工业、食品工业、农业、水处理以及去垢剂和多聚物化学。众所周知,HPLC 是一种高效的分离、分析方法,但毛细管电泳的理论塔板数比 HPLC 高一到两个数量级,分离效果高两到三倍。现已能将蛋白质结构上的微小种间差异,或遗传工程点突变产物中的一两个净电荷的差异分辨开。毛细管电泳的灵敏度很高,所需样品量极少,一般为 5 nl,浓度可小至 10 μg/ml,分析时间短,只需少量缓冲液。在分离分析多肽时,反相 HPLC 根据多肽的疏水性,而 CE 则根据其带电荷及分子大小,因此,从分离机理上看,CE 和 RPHPLC 是互补的两项技术。

近三四年以来迅速发展起来一项新型分离分析技术——高效毛细管电泳(HPCE),它将电泳方法与色谱技术相结合,具有高效、快速、分析所需样品量少、易自动化等优越性,在分析化学各领域都显示了其应用潜力,并且由于它的理论分离柱效与样品组分扩散系数成反比,使它尤其适合于生物大分子的分析。目前应用高效毛细管电泳分离分析蛋白质、多肽及核酸等生物大分子的研究十分活跃。

McManigill 等对影响蛋白质分离的主要因素进行了总结, Crossman 等仔细研究了 CE 中缓冲液 pH 值及肽组成对分离效率和分离度的影响, 并认为 pH 值是影响分离选择性的主要因素。他们利用 pH4.00 的 20 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液分离两个肽段 (AFKAING 和 AFKADNG) 的效果比用 pH2.50 的 20 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液好。Aeberold 设计了一种柱上电泳富集方法, 使 CE 适用于分析 RP-HPLC 分离后稀浓度的肽段, 认为 CE 是鉴定 HPLC 收集的毫克级以下肽段纯度最有效的方法。Nyberg 证明对于小肽, 其电泳相对迁移时间与  $M^{2/3}/Z$  ( $M$  是分子量、 $Z$  是电荷数) 成正比, 这一结论对某些多肽也成立。Crossman

研究了 40 多种肽在 CE 中的迁移行为, 提出了 CE 中肽迁移率  $u$  的经验公式:  $u = 5.23 \times 10^{-4} \times \ln(q+1) / n^{0.43} + 2.47 \times 10^{-5}$  (其中  $n$  是氨基酸残基数,  $q$  是净电荷数)。

应用 CE 分离蛋白质、多肽具有其独特的优越性, 人们已用 CE 分析了生物合成的人胰岛素、生长素、糖蛋白、红细胞生成素、组蛋白及其他一些生物合成酶、多肽。但 CZE 也存在着峰容量小、难以大量制备等不足, 并不能完全取代其他分析方法, 但至少是一项有效的补充手段, 而且随着其研究和应用的深入, CE 将有望在蛋白质、多肽等生物分子的实际分析中发挥更重要的作用。