

高效液相色谱法对重组人甲状旁腺素相关肽的研究

陆静宁¹ 刘景晶¹ 姚 忠²

(1 中国药科大学生命科学与技术学院 南京 210009 2 南京工业大学制药与生命科学学院 南京 210009)

摘要: 针对重组人甲状旁腺素相关肽在反相柱的高效液相色谱中出现的两个峰, 研究两个峰性质并对两个峰是由于一种物质形成了两种构象造成的加以讨论。采用了离子交换柱的高效液相色谱分析、电泳、高效液相色谱和质谱联用分析、SDS 破坏小肽高级结构再进行反相柱的高效液相色谱分析、更换反相柱高效液相色谱分析中的流动相等方法, 结果表明, 从高效液相色谱分析和电泳分析来看, 样品为纯品。同时推测两个峰是由于一种物质形成了两种不同的构象造成的, 且两种构象可以在有酸性离子对试剂的情况下快速达到动态平衡。

关键词: 高效液相色谱; 重组人甲状旁腺素相关肽; 构象

Study of Recombined Human Parathyroid Hormone Related Peptide

LU Jing—ning¹, LIU Jing—jing¹, YAO Zhong²

1 School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2 College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

ABSTRACT: Two peaks, which are showed by reversed—column high performance liquid chromatography (HPLC) under acidic system and formed by two conformations, are studied and discussed, adopting ion—exchange column HPLC, electrophoresis, the combination of HPLC and MS, reversed—column HPLC after advanced structure broken by SDS, and changing liquid phase, etc. The results show that the substance is purity according to HPLC and electrophoresis from which it may be inferred that two peaks are formed by two conformations which will reach balance quickly in acidic ionic system.

Key words: High performance liquid chromatography; Recombined human parathyroid hormone related peptide; Conformation

前言

人甲状旁腺素(human parathormone, PTH)是由甲状旁腺主细胞分泌并合成的。它是由 84 个氨基酸组成的多肽, 最初的转译产物是 115 个氨基酸残基的前甲状旁腺激素原(pre—prohPTH), 在分泌过程中首先在粗面内质网膜周质腔被信号肽酶切除 N 端 25 个氨基酸的信号肽部分成为甲状旁腺激素原(prohPTH), 然后在高尔基体中切掉 6 个氨基酸的前体部分成为 84 肽成熟激素^[1]。而 PTH 发挥生物学活性不需要完整的分子。实验表明: PTH(1—27) 仍保持有一定体外活性, 而 PTH(1—26) 则完全丧失体内、体外活性。hPTH(1—34) 在体内、外保持有完整 PTH 的几乎全部生物活性^[2—4]。PTH 的主要功能是调节钙、磷代谢, 使血钙升高, 血磷降低^[5]。研究表明, 小剂量多次皮下注射 PTH 可刺激成骨细胞的增殖及骨小梁的增长, 不仅能使已丢失的松质骨重建, 骨量明显增加, 而且能改善骨强度, 促进骨膜形成及骨小梁连续性^[6]。因此, 它能很好的治疗骨质疏松, 被誉为治疗骨质疏松的第二代首选药。本实验室已成功构建了甲状旁腺素活性肽段 N 端 1—34 个氨基酸的表达载体, 并将第 11 位突变为精氨酸, 使其达到更好的疗效。通过发酵表达融合蛋白, 对包涵体进行分离纯化, 酸水解得到目的小肽, 再经阳离子交换后冻干得到纯品。由于纯品在用反相柱进行高效液相色谱分析时, 色谱图中显示两个峰, 本文将针对这一现象加以分析和讨论。

作者简介: 陆静宁, (1981—), 女, 硕士, 主要研究方向: 微基因药物

通讯作者: 刘景晶, E—mail: minigenel@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2006—04—13 接受日期: 2006—04—28)

1 实验设备、试剂与方法

1.1 实验设备

高效液相—质谱联用仪: Agilent 1100 LC/MSD

高效液相色谱仪: LC—10A 高效液相色谱仪(日本岛津)

SPD—10A 紫外检测器(日本岛津)

UV—2100 型紫外分光光度计(日本岛津)

N—2000 双通道色谱工作站(浙江大学)

ÄKTA Explorer 100 蛋白质快速纯化系统(瑞典安玛西亚公司)

1.2 试剂

乙腈(TEDIA 公司), 三氟乙酸(MERCK 公司)

甲酸、磷酸、醋酸和十二烷基硫酸钠(SDS)均为分析纯。

水为 2 次蒸馏水。

1.3 实验方法

1.3.1 使用反相柱对重组人甲状旁腺素相关肽进行高效液相色谱分析: 色谱条件: 反相柱为 Shim—pack C18—ODS 6. 0mm ID×15cm, A 相为 0.1% 的三氟乙酸水溶液, B 相为纯乙腈, 梯度为 B 相从 20% 到 70%, 30mins, 流速为 1ml/min, 检测波长为 280nm, 进样量为 20μl 温度为室温。

1.3.2 研究两个峰所代表的物质的性质

1.3.2.1 分析两个峰所代表物质的疏水性: 使用反相柱在酸性离子对试剂的情况下进行高效液相色谱分析。色谱条件: 反相柱为 RESOURCE RPC 柱体积为 3ml, A 相为纯水, 梯度为 B 相从 5% 到 65%, 60mins, 其余与 2.1 的色谱条件相同。

1.3.2.2 分析两个峰所代表物质的带电荷情况“使用离子交换柱进行高效液相色谱分析, 树脂为 SP Sepharose FF。A 相为

40mM 的醋酸—醋酸钠缓冲体系, pH5.0; B 相为 40mM 的醋酸—醋酸钠缓冲+0.5M NaCl, pH5.0; 梯度为 B 相从 0 到 100%, 90mins, 流速为 1ml/min, 检测波长: 280nm, 温度为室温。

1.3.2.3 分析两个峰所代表物质的分子量大小

方法一: SDS—PAGE 电泳, 采用小肽电泳三层胶的方法。

方法二: 高效液相色谱法和质谱联用。色谱条件: A 相为 0.2% 甲酸水溶液, 梯度为 B 相从 10% 到 30%, 其余与 2.1 的色谱条件相同。

质谱条件: Scan m/z 105—2000, Fragmentor: 100V, Drying Gas Flow: 10L/min, Nebulizer Pressure: 40psi, Drying Gas Temperature: 350 °C, Capillary Voltage: 4000V

1.3.2.4 截取峰尖后采用高效液相色谱法进行研究: 截取前一个峰的峰尖, 冻干后再用反相柱进行高效液相色谱分析。色谱条件: 均与 2.1 的色谱条件相同。

1.3.2.5 研究两个峰所代表物质的构象: 样品准备: 将冻干粉溶于含 8% SDS 的水溶液中, 在沸水域中煮 5—10mins, 让 SDS 充分与小肽结合。

色谱条件: 反相柱为 RESOURCE RPC 柱体积为 3ml, 其余与 2.1 的色谱条件相同。

2 实验结果和分析

2.1 使用反相柱对人甲状旁腺素相关肽进行高效液相色谱分析

在室温下, 将样品溶于溶液中, 溶液由 80% 的 A 相和 20% 的 B 相构成, 采用三氟乙酸为离子对试剂增加样品的保留时间, 对样品的分析结果如图 1 所示。

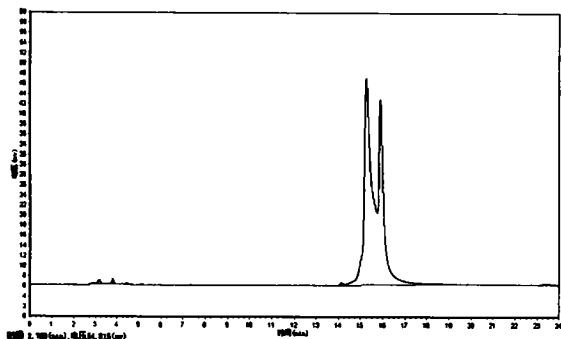


图 1 Pro-Pro-[Arg11]-hPTH(1-34)-Pro-Pro 在 280nm 检测波长下的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of Pro-Pro-[Arg11]-hPTH(1-34)-Pro-Pro at A280nm.

反相柱的高效液相色谱图结果显示, 两个峰的保留时间分别为 15.254min 和 15.879min, 相差 0.625min, 两峰的分度为 1.35。显然两峰没有得到很好的分离。对于两峰是由同一种物质的两种构象形成的, 还是两种物质形成的, 我们进行了讨论。因为它们的保留时间差值很小, 做峰的切线与基线相交, 两峰的面积有很大部分的重叠, 所以初步推测两峰所代表的物质有很相似的疏水性。

2.2 研究两个峰所代表的物质的性质

2.2.1 从疏水性方面分析两个峰所代表的物质的性质: 在不

加酸性离子对试剂的情况下, 样品溶于含 20% 乙腈的水溶液中, 室温下用反相柱进行高效液相色谱分析, 如图 2 所示。

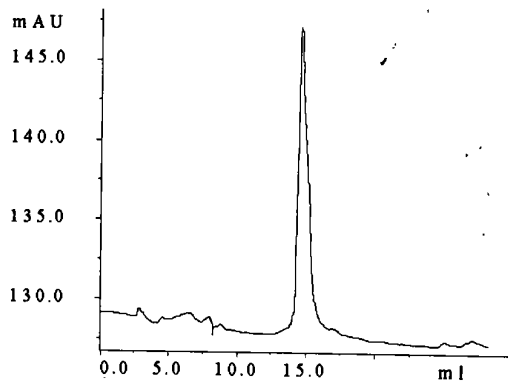


图 2 无酸性离子对试剂时的 Pro-Pro-[Arg11]-hPTH(1-34)-Pro-Pro 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of Pro-Pro-[Arg11]-hPTH(1-34)-Pro-Pro without acid ionic reagent

色谱图显示一个单峰。这里是在中性条件下进行分析, A 相中不含酸性离子对试剂, 因此推测, 在有酸性离子对试剂存在时产生的两个峰, 原因可能是同一种物质出现了两种构象。分析认为, 由于该小肽由 34 个氨基酸组成, 可以形成高级构象, 在酸性条件下, 会影响氨基酸的电离平衡, 同时也减弱了氢键的稳定性, 因此能够形成两种不同的疏水核心, 并且使疏水氨基酸在小肽外表面形成不同分布, 因为反相柱的分离原理是根据树脂与分离物质间的疏水作用力差异来分离的, 因此可能由于样品产生了两种不同的高级构象, 与树脂间的疏水作用力不同, 造成色谱图上出现两个峰; 同时, 在酸水解解释放小肽后, 小肽形成了部分折叠和完全折叠两种构象, 也可能造成色谱图上出现两个峰。但不可能是小肽形成了聚集体造成的, 因为聚集体和单体的疏水性不会相同的。这个结果也说明了该样品在中性体系条件下只形成一种构象, 从高效液相色谱图中显示为单一物质。

2.2.2 从带电荷方面分析两个峰所代表的物质的性质: 将冻干的样品溶于水后, 使用离子交换柱进行高效液相色谱分析, 由于样品是碱性的, 所以溶解于水中的样品带正电荷, 用阳离子交换树脂分析的结果如图 3 所示。

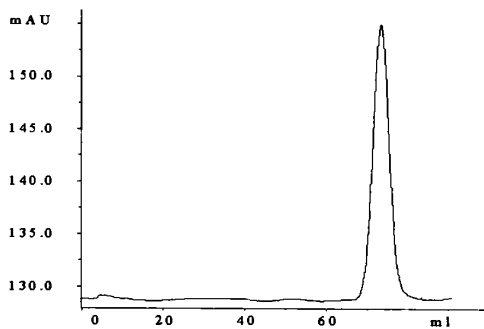


图 3 Pro-Pro-[Arg11]-hPTH(1-34)-Pro-Pro 的离子交换柱的高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of ion-exchange column chromatography

色谱图显示,呈现正态单峰。此法的 pH 值为 5.0 是在弱酸条件下分析的,可得到结论是,如果样品在此条件下形成了聚集体,或是样品不纯,不会呈现完全正态分布的单峰;如果样品形成了两种构象,则两种构象表面分布的带电荷氨基酸数目就完全相等,此种情况不大可能;推测可能在弱酸情况下, H⁺ 对氢键稳定性影响不大,只形成了一种构象,因此呈现单峰。从离子交换的高效液相色谱图看重组人甲状旁腺素相关肽为单一物质。

2.2.3 从分子量方面分析两个峰所代表的物质的性质:根据小肽电泳用三层胶的方法跑 SDS-PAGE 电泳,结果如图 4 所示。

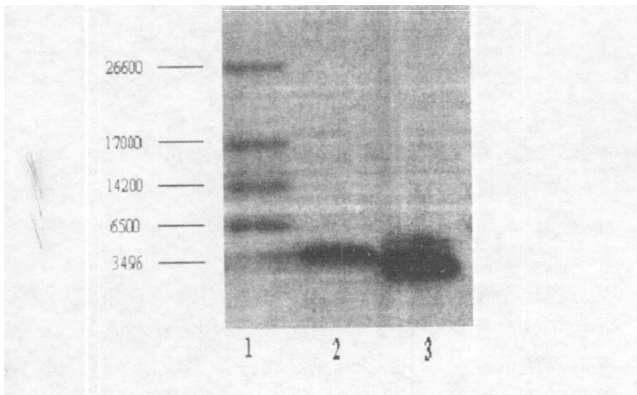


图 4 SDS-PAGE 电泳分析 Pro-Pro-[Arg11]-hPTH(1-34)-Pro-Pro 的电泳图

Fig 4 SDS-PAGE analysis of Pro-Pro-[Arg11]-hPTH(1-34)-Pro-Pro peptide

Lane1 Standard peptide markers Lane2 Pure Pro-Pro-[Arg11]-hPTH(1-34)-Pro-Pro peptide Lane3 Insulin

SDS-PAGE 电泳图显示单条带,证明样品达到了电泳纯。这里电泳缓冲液和上样缓冲液均为碱性,也间接说明了,在反相柱的高效液相色谱分析中,酸性体系对样品结构有一定的影响。得到的电泳单条带,完全可以说明反相柱的高效液相色谱图中两个峰代表的物质分子量相等。

在高效液相色谱-质谱联用中,因为三氟乙酸会减弱质谱中电荷峰的强度,因此在 A 相中加了甲酸,将样品溶于含 10%B 相的流动相中,用反相柱进行高效液相色谱分析,液相色谱图和质谱图如图 5 所示,对两个峰的分析结果如图 6、图 7 所示。

此法用了甲酸,仍然是在酸性条件下进行高效液相色谱分析。液质联用分析得到的两峰分子量分别为 4548.59Da 和 4548.64Da 证明了分子量相等。再根据分子离子峰给出的信息,第一个峰为: 569.5、650.8、759.0、910.7 和 1137.8,第二个峰为 569.5、650.8、759.0、910.7 和 1137.8,比较得出,分子离子峰一致。如果两个峰为两个不同的物质,它们的分子离子峰不会完全一致。两种物质分子量相等的几率很低,分子离子峰完全一致的几率更是极低。此外,我们将小肽样品直接做质谱分析,计算得到的分子量为 4548.66Da,且分子离子峰为 569.5、650.8、759.0、910.7 和 1137.8 两个峰合起来进行质谱分析得到的数据与两个峰分别进行质谱分析得到的数据一致,因此说明了两个峰可能是由于形成了不同构象造成的。

2.2.4 截取峰尖研究后用高效液相色谱研究人甲状旁腺素相关肽:截取前一个峰的峰尖,冻干后再以与 3.1 相同条件进行高效液相色谱分析。结果如图 8 所示。

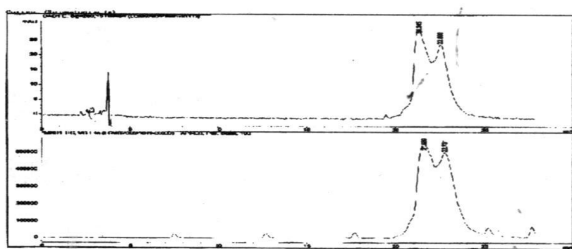


图 5 高效液相色谱图和质谱图

Fig 5 chromatograms of HPLC and MS

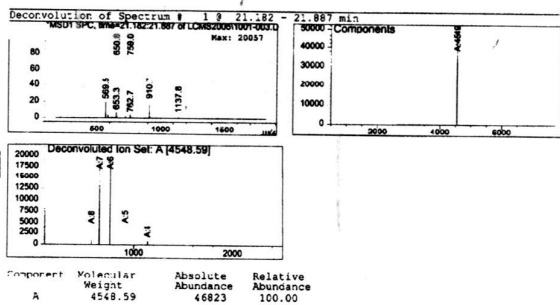


图 6 第一个峰的质谱分析结果

Fig 6 analytic result of the first peak

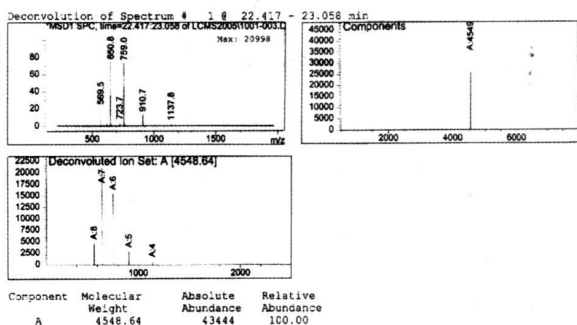


图 7 第二个峰的质谱分析结果

Fig 7 analytic result of the second peak

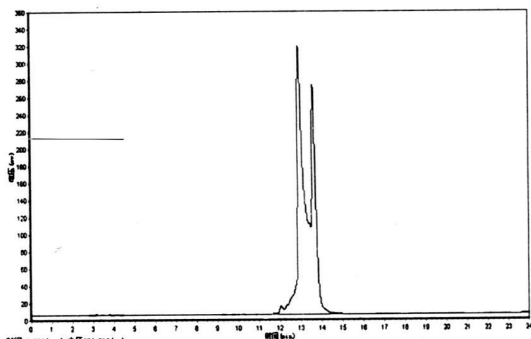


图 8 截取第一个峰尖后分析的 Pro-Pro-[Arg11]-hPTH(1-34)-Pro-Pro 高效液相色谱图

Fig 8 HPLC chromatograms of Pro-Pro-[Arg11]-hPTH(1-34)-Pro-Pro after intercept the first peak

色谱图显示峰形不变, 仍然呈现两个峰。这里由于冻干粉中残存乙腈, 所以保留时间提前, 说明这一种物质可能在酸性离子对试剂存在的情况下快速达到两种构象的动态平衡。由于三氟乙酸酸性很强, 大大降低了氢键的稳定性, 也降低了疏水氨基酸位置变化的活化能, 同时酸性条件也影响了酸性氨基酸的电离平衡, 减弱了离子间强度, 使构象可以快速变化, 因此在截取第一个峰的峰尖后, 再进行高效液相色谱分析, 峰形不变。

2.2.5 研究样品形成了两种构象

十二烷基硫酸钠(SDS)能破裂小肽分子中的氢键和疏水相互作用, 使小肽分子的多肽链处于展开状态。由于小肽中不存在半胱氨酸, 因此没有二硫键, 所以样品制备过程中可不加巯基乙醇。通过 SDS 解开了小肽的高级结构, 在一级结构的基础上进行高效液相色谱分析, 结果如图 9 所示。

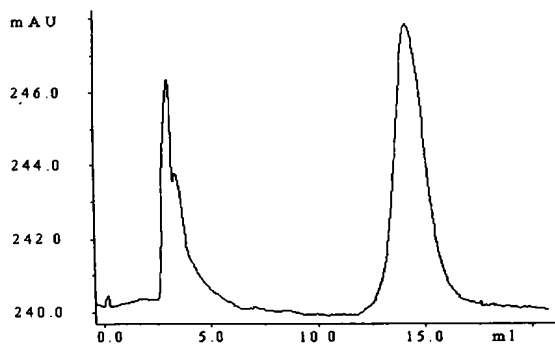


图 9 Pro-Pro-[Arg1]-hPTH(1-34)-Pro-Pro 与 SDS 结合后分析的高效液相色谱图

Fig 9 HPLC chromatograms of Pro-Pro-[Arg1]-hPTH(1-34)-Pro-Pro after boiling with SDS

高效液相色谱图在 3 分钟时由于溶剂替换出了一个溶剂峰, 在 14.091 分钟时出现一个正态单峰。由于高级结构已经解开, 单峰显示两种构象的一级结构是一致的, 有相似的疏水性。实验表明, 将样品加入 8% 的 SDS 水溶液后, 煮沸时间和次数(不超过 3 次)增加, 有利于 SDS 和小肽充分结合, 使高级结构更好的打开。高效液相的单峰峰宽也会变窄。由此方法判断, 两种构象的一级结构相同。也进一步说明了, 在有酸性离子对试剂存在情况下, 色谱图显示两个峰可能是由于小肽两种不同的折叠方式形成的两种构象或是小肽存在完全折叠和不完全折叠造成的。

3 讨论

重组人甲状旁腺素相关肽在中性条件下进行反相柱的高效液相色谱分析为单峰, 离子交换的高效液相色谱分析为单

峰, SDS-PAGE 电泳为单条带, 这里从疏水性、电荷和分子量三方面验证样品为单一物质, 因此我们认为从高效液相色谱分析和电泳分析中看, 样品为纯品。酸性体系下进行反相柱的高效液相色谱图中出现的两个峰, 推测是因为在酸性溶液中形成了两种构象的动态平衡, 因为高效液相色谱和质谱联用分析结果为两峰的分子量和分子离子峰相同, 且破坏高级结构后高效液相色谱分析一级结构相同。截取第一个峰的峰尖冻干后, 在有酸性离子对试剂的情况下进行反相柱的高效液相色谱分析, 峰形不变, 说明很可能重组人甲状旁腺素相关肽在酸性体系下可快速达到构象动态平衡。因为聚集体与单体在疏水性、分子量和电荷方面会有差异, 所以这里不存在聚集体的问题。根据实验结果, 样品在没有酸性离子对试剂存在的情况下, 反相柱的高效液相色谱图呈现单峰, 说明样品在中性条件下是不会产生构象动态平衡的, 由于人体内环境的 pH 为 7, 因此推测, 在人体内, 人甲状旁腺素相关肽是以单一构象存在, 不会因为构象的改变影响药效。

根据本实验, 我们也了解到, 如果蛋白质和小肽类物质, 在高效液相色谱图中出现双峰或多峰, 并不一定表明物质不纯, 它可由不同构象或不同聚集体造成, 因此需要从疏水性、电荷和分子量等多方面加以分析, 利用 SDS 和巯基乙醇拆开高级构象, 可以很好的验证一级结构是否一致; 液质联用可以在分子量方面提供有力证据, 分子离子峰可以很好的验证样品是否为纯品。因此样品不纯、样品由不同构象组成、样品形成了不同聚集体或样品由于溶解在流动相中影响构象都可能造成高效液相色谱图中出现双峰或多峰。

本实验还可以再用其它方法进一步验证样品为纯品, 并使用核磁共振、圆二色谱、x 光衍射等方法进一步检测, 确定构象差异的确切位置, 以验证我们的假设。

参考文献

- [1] 李光富, 张林元, 于明明, 等. 人甲状旁腺激素(1-34)在大肠杆菌中的表达[J]. 中国药科大学学报, 28: 238~242
- [2] Tregear GW, Rietschoten JV, Greene E, et al. Bovine Parathyroid Hormone: Minimum Chain Length of Synthetic Peptide Required for Biological Activity[J]. Endocrinology, 1973, 93: 1349~1353
- [3] Nakagawa S, Tamakashi Y, Ishibashi Y, et al. Production of Human PTH(1-34) via a Recombinant DNA Technique[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994, 200(3): 1735~1741
- [4] Huang M, Hanley DA, Rorstad OP. Parathyroid Hormone Stimulates Adenylate Cyclase in Rat Cerebral Microvessels[J]. Life Sciences, 1983, 32: 1009~1014
- [5] 吴梧桐. 生物化学[M]. 第四版, 北京: 人民卫生出版社, 2001.1
- [6] Nishida, Yamaguchi A, Tanizawa T, et al. Increased bone formation by intermittent parathyroid hormone administration is due to the stimulation of osteoprogenitor cells in bone marrow[J]. Bone, 1994, 15(6): 717~723