

牛胰岛素去折叠过程的高效液相色谱法分析*

董方霆 廖 杰 蔡 耘 沈世杰

(军事医学科学院国家生物医学分析中心 北京 100850)

提 要 建立了反相高效液相色谱法动态监测牛胰岛素在二硫苏糖醇存在下去折叠的过程。牛胰岛素在二硫苏糖醇作用下,首先发生构象变化,形成稳定的中间体后进一步断裂分子间的二硫键,形成A链和B链。去折叠过程通过基质辅助激光解吸附质谱得到了鉴定。

关键词 反相高效液相色谱法,基质辅助激光解吸附质谱,牛胰岛素,二硫苏糖醇,去折叠

分类号 O658/Q5

1 前言

蛋白质的折叠状态与其生物活性紧密相关,研究折叠-去折叠的过程是蛋白质科学研究的重要内容^[1]。目前常用的研究方法为圆二色光谱、荧光光谱和振动光谱。但蛋白质折叠-去折叠过程中的构象变化比较复杂,有时是几种构象体同时存在,而上述方法只能提供变化的整体轮廓。用色谱方法可以分离变化过程中的各种异构体,能从另一个角度提供结构信息^[2,3]。为此,我们建立了用高效液相色谱法动态监测牛胰岛素在二硫苏糖醇(DTT)作用下的去折叠过程,并通过基质辅助激光解吸飞行时间质谱对结果进行了验证。

2 实验部分

2.1 样品及试剂

牛胰岛素(Sigma), α -氨基-4-羟基肉桂酸(Sigma),二硫苏糖醇(Sigma),乙腈(国产,HPLC纯),三氟醋酸(TFA)(ABI公司),Milli-Q级去离子水。

2.2 样品处理

精确称取牛胰岛素2.0mg,溶于0.1%TFA水溶液1.6mL中,加DTT80.0mg,置于100℃水浴中,分别于10,20,30,40min取样。

2.3 仪器及分析条件

PE 200/235C 高效液相色谱仪,分析柱为PE-Pack C₁₈ 4.6mm×150mm,流动相为A:0.1%TFA水溶液,B:0.1%TFA乙腈溶液,15%~80%B线性梯度洗脱,流速1.0mL/min,进样量25 μ L,检测波

长280nm, VGT ofspec 反射式基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪, N₂ 激光器, 波长337nm, 线性飞行距离65cm。

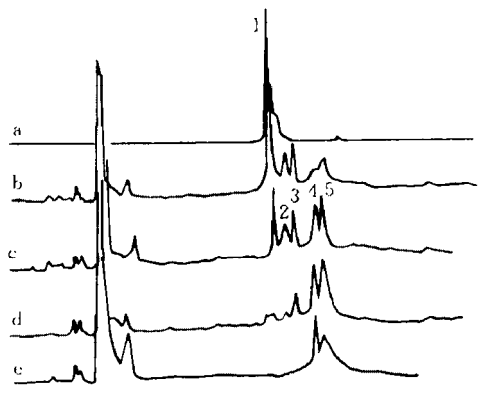


图1 DTT还原不同时间的牛胰岛素高效液相色谱图

Fig. 1 RP-HPLC analysis of insulin treated by DTT in different time

色谱柱: PE-Pack C₁₈ 4.6mm×150mm, 流动相: A) 0.1% TFA-H₂O, B) 0.1% TFA-CH₃CN, 梯度: 15%~80% B, 25min, 检测: UV-280nm。

a: 0min, b: 10min, c: 20min, d: 30min, e: 40min。

1. 胰岛素, 2, 3. 中间体, 4. B链, 5. A链。

Column: PE-Pack C₁₈ 4.6mm×150mm, solvent: A) 0.1% TFA-H₂O, B) 0.1% TFA-CH₃CN, gradient: 15%~80% B 25min, detector: UV-280nm。

1. insulin, 2, 3. intermediates, 4. B chain of insulin, 5. A chain of insulin.

* 本文收稿日期: 1996-07-01, 修回日期: 1996-08-23

3 结果和讨论

(1) 将 DTT 还原不同时间的牛胰岛素进行高效液相色谱法分析(图 1), 结果发现, 还原 10m in 时

(图 1-b)牛胰岛素由单一峰变为 5 个色谱峰, 说明其结构发生了变化; 进一步还原后, 前面 3 个峰逐渐减小, 至 40m in 时完全消失, 后两个峰逐渐增强(图 1-c, d, e); 反应进行至 60m in 时, 仅峰 4 存在。

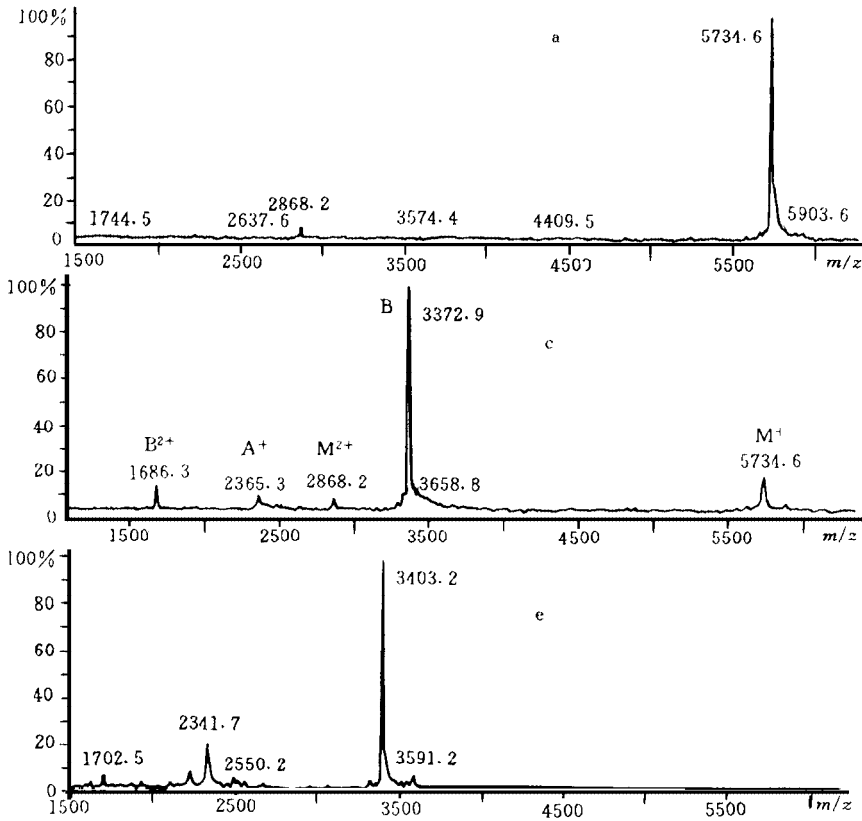


图 2 DTT 还原不同时间的牛胰岛素 MALDI-TOF 图谱

Fig. 2 MALDI-TOF analysis of insulin treated by DTT at different time

a: 反应起始时, c: 反应 20m in, e: 反应 40m in.

M^+ : 胰岛素, A^+ : 胰岛素 A 链, A^{2+} : A 双电荷, B^+ : 胰岛素 B 链, B^{2+} : B 双电荷。

a: 0m in, c: 20m in, e: 40m in.

M^+ : insulin, A^+ : A chain of insulin, A^{2+} : doubly charged A chain, B^+ : B chain of insulin, B^{2+} : doubly charged B chain.

(2) 将还原产物进行质谱分析(图 2), 结果表明, 反应 40m in 时产物(e)有两个物质, 质量数与胰岛素 AB 链的质量数吻合, 中间产物(c)有三个质量数, 分别同胰岛素及其 A 链、B 链相同。反应 60m in 产物(峰 4)其质量数与 B 链相同。

(3) 胰岛素由 51 个氨基酸组成, 分子量为 5734, 分子中两条肽链由两对分子间二硫键链接。由于去折叠后包在分子内部的疏水侧链暴露在分子表面, 所以还原产物在反相色谱上的保留时间延长,

用质谱对 A 链、B 链峰进行了确证。质谱结果显示, c 中只有 3 个组分及其双电荷峰, 而在 HPLC 上则有 5 个色谱峰。Millican^[4]用 CD 分析盐酸胍还原人胰岛素时, 推测在 A 链、B 链断裂之前, 胰岛素的构象已经发生了变化, 随着还原反应的进行, 形成两个稳定的中间体后逐渐转变为终产物。本结果从另一个角度证实了这一推测。DTT 加入后首先产生中间体(峰 2, 峰 3), 随着反应的进行中间体逐渐消失, 形成去折叠后 A 和 B 单链(峰 5, 峰 4), 进一步反应后

A 链被破坏。

4 结论

我们建立了用高效液相色谱法监测牛胰岛素在 DTT 作用下去折叠过程的方法, 动态表现了二硫键的还原过程。本方法简便、快速, 可用于进一步研究蛋白质的构象变化。

参 考 文 献

1 孙崇荣, 李玉民. 蛋白质化学导论. 上海: 复旦大学出

版社, 1991: 97

- 2 Mant C T, Hodges R S. High performance liquid chromatography of peptides and proteins: separation, analysis and conformation. Florida: CRC Press, 1991: 589
- 3 胡红雨, 杜雨苍, 鲁子贤. 生物化学与生物物理进展, 1994; 21(6): 508
- 4 Millican R L, Brem s D N. Biochemistry, 1994; 33(5): 1116

Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Analysis of the Unfolding Procedure of Bovine Insulin

Dong Fangting, Liao Jie, Cai Yun and Shen Shijie

(National Center of Biomedical Analysis, Beijing, 100850)

Abstract A method for measurement of the dynamic unfolding procedure of bovine insulin by reversed-phase HPLC has been established. Insulin contains 51 amino acids and two intrachain disulfide bridges. The denaturation of bovine insulin was carried in dithiothreitol solution at 100°C, and the equilibrium products were examined by HPLC at different reaction time. The results show that the conformation of insulin has changed before cleavage of the disulfide bonds to A and B chains. Bovine insulin, two intermediates and the reduction products A and B chains were well separated on a C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm) with a linear gradient elution of acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid. The conformation of the unfolding intermediates of insulin was indicated by chromatographic method, and the results were verified by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. The method is helpful to reveal the conformation changes in the procedures of protein unfolding.

Key words reversed-phase high performance liquid chromatography, MALDI-TOF, bovine insulin, dithiothreitol, unfolding

