

[研究快报]

# 蛋白质荧光标记中协同效应的高效液相色谱

乔晓强, 张琳, 梁振, 张维冰, 张丽华, 张玉奎  
(中国科学院大连化学物理研究所, 国家色谱研究分析中心, 大连 116023)

关键词 荧光标记; 蛋白质; 协同效应; 高效液相色谱

中图分类号 O657 文献标识码 A 文章编号 0251-0790(2007)09-1657-03

荧光检测因具有高灵敏度、高选择性等特点在生命科学及环境科学等许多领域中得到了广泛应用<sup>[1]</sup>. 5-[[[(2-碘代乙酰)胺]乙基]氨基]萘-1-磺酸(1,5-I-AEDANS)作为一种水溶性好且容易与半胱氨酸反应的荧光试剂<sup>[2]</sup>, 在蛋白质的荧光标记方面具有广阔的应用前景. Gorman等<sup>[3]</sup>利用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测到了25 ng 1,5-I-AEDANS标记的牛血清白蛋白. Clements等<sup>[4]</sup>将1,5-I-AEDANS标记的牛血清白蛋白和 $\alpha$ -乳白蛋白的酶解产物利用固定化金属亲和色谱进行选择富集, 实现了半胱氨酸的定量分析.

协同效应是一种普遍存在的自然现象<sup>[5-7]</sup>. 一般认为与非线性过程有关, 或为多种因素综合作用的结果. 本文以牛血清白蛋白和胰岛素为研究对象, 经1,5-I-AEDANS衍生后, 采用高效液相色谱(HPLC)进行分离分析, 发现两者的衍生物存在明显的协同作用.

## 1 实验部分

1.1 仪器与试剂 Jasco PU-1580 高压液相泵(Jasco, 日本); Jasco LG-1580-04 自动梯度控制仪(Jasco, 日本); Jasco FP-1520 荧光检测器(Jasco, 日本); 7725 六通进样阀(Rheodyne 公司, 美国); 色谱柱(C<sub>8</sub>, 5  $\mu$ m, 30 nm, 250 mm  $\times$  4.6 mm); Echrom 98 数据采集器(大连依利特分析仪器有限公司).

乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 碳酸氢铵(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 辽宁省医药工贸公司试剂厂); 牛血清白蛋白(BSA, 上海长阳制药厂); 胰岛素(Insulin, 美国 Sigma 公司); 三氟乙酸(TFA, 美国 Sigma 公司); 1,5-I-AEDANS(美国 Sigma 公司); 尿素(Urea, 沈阳市试剂三厂); 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris, 美国 Sigma 公司); 氯化钠(NaCl, 沈阳市试剂三厂); 乙二胺四乙酸二钠(EDTA, Biobasic 公司).

1.2 衍生化过程 在文献[4]报道的方法基础上, 对衍生化条件加以改进, 衍生时间增加到1 h, 衍生温度提高到50  $^{\circ}$ C, 衍生试剂质量浓度提高到18 mg/mL.

具体衍生过程如下: 取60  $\mu$ L的牛血清白蛋白和胰岛素混合液(50 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8.0), 加入25  $\mu$ L的变性缓冲溶液(8 mol/L Urea, 200 mmol/L Tris, pH 8.5, 200 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA)和15  $\mu$ L 100 mmol/L DTT. 在56  $^{\circ}$ C下搅拌反应30 min后, 加入20  $\mu$ L 18 mg/mL 1,5-I-AEDANS. 继续在50  $^{\circ}$ C下搅拌反应1 h, 使衍生化反应完全. 冷却至室温后进行HPLC分析.

1.3 HPLC分离条件 流动相A: 水, 含体积分数为0.1%的TFA; 流动相B: 乙腈/水(体积比95/5), 含体积分数为0.1%的TFA; 梯度条件: 0 min, 体积分数为20%的B; 40 min, 体积分数为100%的B, 流速1 mL/min, 进样10  $\mu$ L; 柱温: 室温; 荧光激发和发射波长 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 336/490$  nm.

## 2 结果与讨论

2.1 色谱线性范围 分别取50  $\mu$ L 5 mg/mL的BSA和10  $\mu$ L 0.5 mg/mL的胰岛素, 混合后按照1.2节的方法进行衍生反应. 样品中胰岛素和BSA的最终质量浓度分别为0.042和2.1 mg/mL. 将上述样品逐步稀释, 得到一系列质量浓度分别为42.0, 21.0, 10.5, 5.3和2.5  $\mu$ g/mL的胰岛素和2.1, 0.42,

收稿日期: 2007-03-13.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20435020)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(批准号: KJCX2. YW. H09)资助.

联系人简介: 张丽华, 女, 博士, 研究员, 从事液相分离技术与质谱联用及微流控芯片研究. E-mail: lihuazhang@dicp.ac.cn

0.11, 0.05 和 0.02 mg/mL 的 BSA 标准样品溶液. 进样 10  $\mu$ L. 以峰面积为纵坐标 ( $Y$ )、质量浓度为横坐标 ( $X$ ) 进行线性回归, 得到的线性回归方程如下:

$$Y = 108.7X - 94.9 \quad (r = 0.99997)$$

$$Y = 64197.9X - 630.7 \quad (r = 0.9997)$$

结果显示, 胰岛素和 BSA 的质量浓度分别在 2.5 ~ 42.0  $\mu$ g/mL 和 0.02 ~ 2.10 mg/mL 范围内, 响应信号与进样浓度呈良好的线性关系.

2.2 过量 BSA 对胰岛素衍生效果的影响 按照衍生化过程对 BSA 和胰岛素的混合溶液进行衍生化标记. BSA 的质量浓度为 0.83 mg/mL. 通过改变胰岛素的浓度, 考察了 BSA 和胰岛素的浓度比分别为 50:1, 100:1 和 200:1 时衍生物的色谱分析结果 (见表 1). 其中, BSA 和胰岛素的浓度比为 100:1 时的 HPLC 分析结果如图 1 所示. 由表 1 和图 1 可见, 在衍生化过程中, BSA 的存在能够明显增强胰岛素的标记效果. 随着 BSA 和胰岛素浓度比的增加, 这种增强作用越来越显著. 当二者的浓度比达到 200:1 时, 胰岛素的峰面积增加到 4.2 倍. 由于样品浓度在色谱线性范围内, 因此可以排除非线性色谱过程对分析结果的影响. 这一结果证实, 加入 BSA 能够对胰岛素荧光衍生化标记起到正协同作用. 此外, 即使当两者的浓度比达到 1000:1 时, 也可以检测到胰岛素信号, 其信噪比为 8, 而在不添加 BSA 时无法检测到胰岛素.

Table 1 Effect of BSA on the derivatization of insulin

$\rho(\text{BSA}) : \rho(\text{Insulin})$	Peak area of insulin (with BSA)/(mV · s)	Peak area of insulin (without BSA)/(mV · s)	Ratio of peak area (with BSA to without BSA)
50:1	944	456	2.1:1
100:1	556	159	3.5:1
200:1	284	68	4.2:1

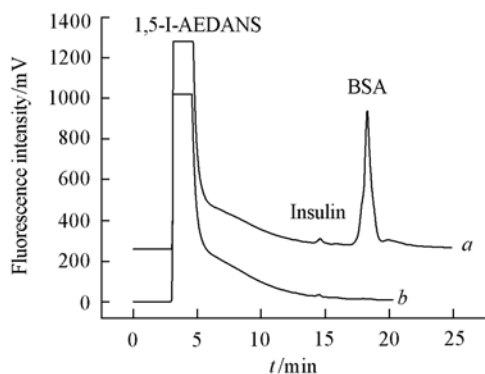


Fig. 1 Effect of BSA on the derivatization of insulin

a. With BSA [ $\rho(\text{BSA}) : \rho(\text{Insulin}) = 100:1$ ];  
b. without BSA.

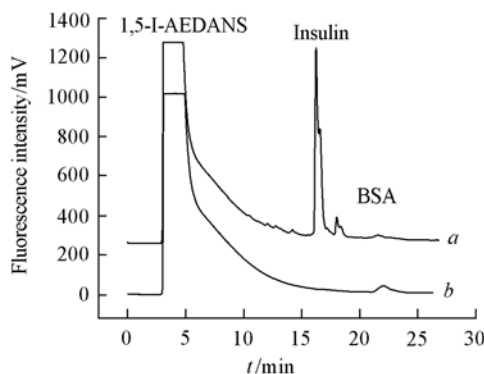


Fig. 2 Effect of insulin on the derivatization of BSA

a. With insulin [ $\rho(\text{Insulin}) : \rho(\text{BSA}) = 8:1$ ];  
b. without insulin.

2.3 过量胰岛素对 BSA 衍生效果的影响 按照衍生化过程, 采用荧光衍生化试剂对胰岛素和 BSA 的混合溶液进行衍生标记反应, 胰岛素的质量浓度为 0.67 mg/mL. 通过改变 BSA 的浓度, 考察了胰岛素和 BSA 的浓度比分别为 2:1, 8:1, 10:1 和 20:1 时衍生物的色谱分析结果 (见表 2). 其中, 胰岛素和 BSA 浓度比为 8:1 时的色谱分离结果如图 2 所示.

Table 2 Effect of insulin on the derivatization of BSA

$\rho(\text{Insulin}) : \rho(\text{BSA})$	Peak area of BSA (with insulin)/(mV · s)	Peak area of BSA (without insulin)/(mV · s)	Ratio of peak area (with insulin to without insulin)
2:1	6920	12963	1:1.9
8:1	1452	2204	2:3.0
10:1	545	1133	1:2.1
20:1	0	150	0

由表 2 和图 2 可以看到, 在 BSA 的衍生化过程中, 加入胰岛素对衍生反应起到一定的抑制作用, 色谱峰面积降低到原来的 2/3 或更低. 当胰岛素和 BSA 的浓度比为 20:1 时, 抑制作用非常明显, 已检

测不到 BSA 的色谱信号. 同理, 可排除非线性色谱过程的影响, 从而证实了胰岛素的存在能够对 BSA 的荧光标记起到负协同作用.

### 3 结 论

采用 1,5-I-AEDANS 衍生了两种蛋白质, 并通过高效液相色谱考察了衍生化效果. 研究表明, 在色谱线性范围内, BSA 对胰岛素的荧光衍生化存在正协同效应, 随着 BSA 和胰岛素的浓度比的增加, 这种正协同效应越来越明显; 相反, 过量胰岛素的存在对 BSA 的标记有负协同效应. 这一结果对于蛋白质组学研究中发展低丰度蛋白质的荧光标记和分析方法具有重要意义.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Toyo'oka T. , Tomoi N. , Oe T. , *et al.* . Analytical Biochemistry[J] , 1999 , **276** : 48—58
- [ 2 ] Hudson E. N. , Weber G. . Biochemistry[J] , 1973 , **12** : 4154—4161
- [ 3 ] Gorman J. J. . Analytical Biochemistry[J] , 1987 , **160** : 376—387
- [ 4 ] Clements A. , Johnston M. V. , Larsen B. S. , *et al.* . Anal. Chem. [J] , 2005 , **77** : 4495—4502
- [ 5 ] Hashidzume A. , Watanabe S. I. , Morishima Y. . Langmuir[J] , 2007 , **23** : 2191—2197
- [ 6 ] Liu G. K. , Ren B. , Gu R. A. , *et al.* . J. Phys. Chem. C[J] , 2007 , **111** : 3417—3426
- [ 7 ] Fishelovitch D. , Hazan C. , Shaik S. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J] , 2007 , **129** : 1602—1611

## Cooperative Effects in the Fluorescent Labeling of Proteins Studied by High-performance Liquid Chromatography

QIAO Xiao-Qiang, ZHANG Lin, LIANG Zhen, ZHANG Wei-Bing, ZHANG Li-Hua\* , ZHANG Yu-Kui  
(National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics,  
Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

**Abstract** To improve the detection sensitivity of low abundance proteins in samples, fluorescence labeling might be a good solution method. In this manuscript, with 5-(2-[(iodoacetyl) amino] ethyl) amino naphthalene-1-sulfonic acid (1,5-I-AEDANS) as the derivatizing reagent, the cooperative effects of insulin and BSA during the derivatization were studied. Through HPLC analysis, it was found that with BSA added, the detection sensitivity of the derivatized insulin could be improved. When the concentration ratio of BSA to insulin reached 200:1, the peak area of insulin was increased by over 4-fold, which demonstrates that the existence of BSA had a positive effect on the derivatization of insulin. Furthermore, even when the ratio reached 1000:1, the *S/N* of insulin was 8, which could not be detected without BSA being added. However, on the contrary, with insulin being added, the peak area of the derivatized BSA was decreased, demonstrating that insulin had a negative effect on that of BSA. All these results might be of great significance to the detection of low abundance proteins in proteome study.

**Keywords** Fluorescent labeling; Protein; Cooperative effect; High-performance liquid chromatography (HPLC)

(Ed. : A, G)