

金属硫蛋白异构体及亚型异构体的液相色谱分离与质谱鉴别

卢素格¹, 沈金灿¹, 庄峙厦^{1,2}, 王小如^{1,2}

(1. 厦门大学化学化工学院化学系 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 国家海洋局第一海洋研究所 现代分析技术及中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061)

摘要: 建立了金属硫蛋白(MT)异构体及亚型异构体的色谱分离与质谱鉴别方法。将金属硫蛋白混合物通过弱阴离子 DEAE Sephadex A-25 离子交换柱, 结合离线电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)对锌诱导金属硫蛋白的两个异构体 MT-1 和 MT-2 进行分离和检测; 利用 Sephadex G-25 凝胶排阻色谱柱对得到的两个金属硫蛋白异构体进行脱盐; 探索脱盐后的金属硫蛋白异构体在不同色谱条件下的 C_{18} 反相色谱柱上的保留行为, 进而实现各个亚型异构体的分离; 通过在线电喷雾质谱检测实现了对金属硫蛋白各个亚型异构体的鉴别。结果表明, 通过优化色谱条件, 由离子交换色谱及凝胶排阻色谱得到的金属硫蛋白各亚型异构体在酸性条件下均得到了良好的分离, 质谱检测结果与前人的文献报道结果一致。该方法可使金属硫蛋白各异构体均达到最佳的分离效果。

关键词: 离子交换色谱; 凝胶排阻色谱; 反相高效液相色谱; 金属硫蛋白; 异构体

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2005)02-0104-04

Separation and Identification of Metallothionein Isoforms and Sub-isoforms by Liquid Chromatography

LU Suge¹, SHEN Jincan¹, ZHUANG Zhixia^{1,2}, WANG Xiaoru^{1,2}

(1. Department of Chemistry and the Key Laboratory of Analytical Science of the Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Qingdao Key Laboratory of Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicine, the First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

Abstract A method has been established for the separation and identification of metallothionein (MT) isoforms and sub-isoforms by liquid chromatography. A mixture of rabbit liver MT was separated on a DEAE A-25 weak anion-exchange chromatographic (AEC) column. Inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICP-MS) was used for off-line detection of Zn in each fraction. The two main MT isoforms, MT-1 and MT-2, were isolated. The collected MT isoform fractions were then desalted by a homemade Sephadex G-25 size exclusion chromatographic (SEC) column. Afterwards, the sample was separated on a C_{18} reversed-phase column with UV detection at 210 nm. Different separation conditions were discussed and several sub-isoforms of MT were well separated at pH 2.0. The sub-isoforms were finally characterized by on-line HPLC-ESI/MS. The isoforms and sub-isoforms were well separated on a reversed-phase column under optimized chromatographic conditions and the detection results of ESI/MS were in agreement with the data found in literature. The method developed can be well used for the separation of metallothionein isoforms and sub-isoforms.

Key words ion-exchange chromatography, gel exclusion chromatography, reversed-phase, high performance liquid chromatography, metallothioneins, isoforms

金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 是自然界中广泛存在并具有许多重要生理功能的富含半胱氨酸 (占氨基酸总量的 30%)、不含芳香氨基酸的一类热稳定的蛋白质。1957年, Margoshes 和 Vallee^[1]

在研究镉的生物学作用时, 首次从马肾中发现含镉 MT。迄今的大量研究表明: MT 在重金属 (如: Cd, Hg) 解毒、调节微量元素 (如: Zn, Cu) 代谢以及清除自由基等方面起着重要的作用。由于 MT 基因的多

收稿日期: 2004-03-30

作者简介: 卢素格, 女, 硕士研究生, E-mail: lusug@sina.com.cn

通讯联系人: 庄峙厦, 男, 高级工程师, 主要从事生物芯片及蛋白质研究, Tel: (0592) 2184510 E-mail: zzhuang@xmu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 20175022), 福建省重大科技项目 (No. 2003Y005 和 No. 2003X003). <http://www.cnki.net>

态性, 决定了 MT 在组织中存在着不同的亚型异构体^[2,3], MT 不同的亚型异构体的结构是 MT 发挥其生物作用的基础, 因此研究 MT 亚型异构体的最佳分离方法具有重要的意义。已有文献^[4-11]报道, MT 异构体之间存在着电荷差异, 因而可通过离子交换色谱进行分离, 国内外也有不少学者通过反相液相色谱对 MT 亚型异构体进行分离^[10-13], 结果各有差异。本文结合离子交换色谱、反相液相色谱及质谱等几种分离检测技术, 比较系统地研究了 MT 异构体及亚型异构体在不同色谱条件下的最佳分离行为, 并利用质谱检测技术对金属硫蛋白的各个亚型异构体进行鉴别。所建立的 MT 测定方法能对 MT 异构体及亚型异构体进行有效的分离和鉴别。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪: 配置二元梯度泵, 脱气机, 柱温箱, 二极管阵列紫外检测器 (DAD) (Agilent USA); 进样阀: 7725 型手动进样器; Agilent 1100 LC/MSD 液相色谱-质谱联用仪; BS-100A 自动部分收集器 (上海沪西分析仪器厂); BT00-30M 蠕动泵 (保定兰格恒流泵有限公司); 真空冷冻干燥机 (EZ-Dry Kinetics lyophilizer, USA)。

二乙胺乙基葡聚糖凝胶 (DEAE Sephadex A-25, Pharmacia), 葡聚糖凝胶 (Sephadex G-25, Pharmacia); Zn 诱导兔肝 MT (湖南麓谷生物技术公司, 纯度 $\geq 60\%$), Cd 诱导兔肝 MT 异构体 MT-1 和 MT-2 精品 (Sigma 公司); 三氟乙酸 (TFA)、乙腈、甲醇均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯; 实验所用为 Millipore 超纯水, 并经过氮气脱气。

1.2 溶液配制

将 Zn 诱导兔肝 MT 及 Cd 诱导兔肝 MT 异构体 MT-1, MT-2 分别配制成 5 g/L 和 1 g/L 的水溶液作为储备液, 于 4 °C 条件下冷藏备用。

1.3 MT 异构体的制备及脱盐

依据 MT 异构体在离子交换色谱中的洗脱顺序分别将其称为 MT-1 和 MT-2。MT 异构体的分离与制备采用自制的玻璃离子交换柱 (26 mm i.d. \times 60 mm): 内填 DEAE Sephadex A-25 填料, 流动相为 25 mmol/L 和 250 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 90 min 内以 0~100% 250 mmol/L Tris-HCl 进行线性梯度洗脱, 流速 1.1 mL/min。收集第 66~99 mL (MT-1) 和第 118~155 mL (MT-2) 的洗脱液。整个操作过程用氮气保护, 真空条件下冷冻干燥浓缩 MT-1 和 MT-2 组分洗脱液。

(12 mm i.d. \times 232 mm): 内填 Sephadex G-25 填料, 流动相为超纯水, 流速 1.1 mL/min。收集第 20~28 min (MT-1 或 MT-2) 的洗脱液。真空条件下冷冻干燥浓缩脱盐后的 MT-1 和 MT-2 组分洗脱液。

1.4 MT 异构体的液相色谱分离

用反相液相色谱柱对 MT-1 和 MT-2 进行分离。分离条件: 色谱柱 Zorbax 300SB C₁₈ (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 5 μ m, 30 nm); 流速 0.25 mL/min; 紫外检测波长分别为 210 nm 和 254 nm; 柱温 25 °C。为了使 MT 各亚型异构体得到有效分离, 实验比较了不同色谱条件下对 MT 各亚型异构体的分离情况, 其流动相及洗脱条件分别如下:

a) 流动相 A 0.1% TFA 水溶液 (pH 2.0), 流动相 B 0.1% TFA 乙腈溶液; 30 min 内以 1% B~2% B 溶液线性梯度洗脱。

b) 流动相 A 0.1% TFA 水溶液 (pH 2.0), 流动相 B 0.1% TFA 甲醇溶液; 30 min 内以 3% B~5% B 溶液线性梯度洗脱。

c) 流动相 A 5 mmol/L 乙酸铵水溶液 (pH 7.0), 流动相 B 5 mmol/L 乙酸铵乙腈-水 (体积比为 1:1) 溶液; 30 min 内以 8% B~23% B 溶液线性梯度洗脱。

1.5 MT 亚型异构体的质谱检测

经过反相柱分离后, 将得到的 MT 各亚型异构体在线进行质谱检测。质谱检测条件: 正离子检测模式; 扫描范围为 700~1800 m/z; 电喷雾电压 4 kV; 用 Agilent LC/MSD 软件处理数据。

2 结果与讨论

2.1 MT 异构体的分离与制备

在 MT 的两个主要异构体中, MT-2 比 MT-1 少一个精氨酸和一个苏氨酸, 同时多一个丝氨酸和一个赖氨酸, 故在溶液中 MT-1 比 MT-2 少一个负电荷, 可采用离子交换色谱将二者分开。有许多缓冲体系可被用于 MT 异构体的分离, Tris-HCl 是离子交换色谱中分离金属硫蛋白异构体常用的缓冲液。选择 Tris-HCl 缓冲液为流动相, 既可防止 MT 在分离时脱去金属, 还能降低 MT 与柱填料的相互作用。本试验采用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0), 通过梯度洗脱分离混合蛋白中的 MT。由于 Tris-HCl 缓冲液在紫外区有比较强的吸收, 难以用紫外检测器进行检测, 故实验采用离线收集、电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 检测混合蛋白中所含的主要金属 Zn, 实验结果如图 1 所示。在所选择的实验条件下, MT 的两个异构体 MT-1 和 MT-2 得到了良好的分离。为了进一步分离和鉴别同一 MT 异构体中不同的亚

型异构体,分别收集图 1 中 a 区和 b 区对应的流出物,真空条件下冷冻干燥浓缩,利用 Sephadex G-25 凝胶排阻色谱柱对得到的两个金属硫蛋白异构体进行脱盐浓缩后存放于 4 °C 冰箱中。

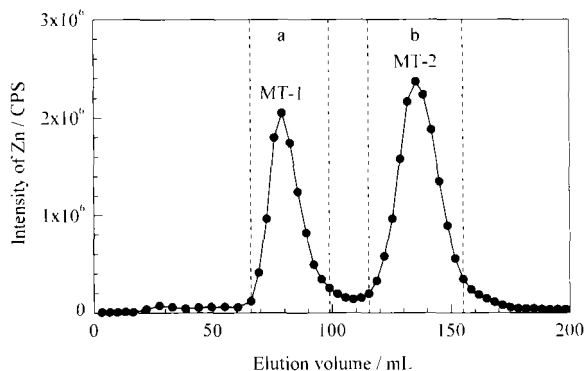


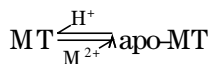
图 1 兔肝金属硫蛋白异构体的离子交换色谱图
Fig 1 Chromatogram of rabbit liver MT isoforms by ion-exchange chromatography with off-line ICP-MS detection for Zn

2 2 MT 亚型异构体的液相色谱分离

反相高效液相色谱具有高效的分离能力, MT 的不同亚型异构体由于疏水性的不同使得其在反相色谱柱上的保留行为稍有区别,故采用反相高效液相色谱可以实现对 MT 不同亚型异构体的分离。实验首先考察了流动相的 pH 值及不同的流动相对 MT 分离的影响。

2 2 1 流动相 pH 值对分离的影响

流动相的 pH 值对 MT 在溶液中的构型有很大的影响,不同的 pH 值会改变 MT 在溶液中的存在状态。MT 在酸性 (pH 2.0) 溶液中会脱去其结合的金属形成脱金属硫蛋白 (apo-MT),用方程式^[14]表示为:



MT 在中性溶液 (pH 7.0) 中主要以结合金属的形式存在, 巯基与某些金属离子通过巯基四面体配位成特定的空间配位结构, 每个 MT 能结合 7 个 Zn²⁺ 或 Cd²⁺ 形成两个结构域。为了形成四面体配位, 肽链各形成 3 个回折, 彼此单独呈球形, 通过第 31 位氨基酸-赖氨酸连接使整个分子呈哑铃状^[15]。我们比较了优化分离条件后, 分别以 0.1% TFA 水溶液 (pH 2.0)、0.1% TFA 乙腈溶液和 5 mmol/L 乙酸铵水溶液 (pH 7.0)、5 mmol/L 乙酸铵乙腈-水 (体积比为 1:1) 溶液为流动相对 MT 进行分离, 结果分别如图 2-a b 所示。由图 2 可看出, pH 2.0 时 MT 各个亚型异构体比 pH 7.0 时的分离情况好。这主要是由于中性条件下 MT 的折叠结构使得亚型异构体结构间微弱的差异难以通过其在色谱柱上的保留体现出来, 而在酸性条件下的去折叠结构使得它们能充分与 C₁₈ 柱上的碳链相互作用, 彼此氨基酸系列间的微弱差异致使它们在色谱柱上的保留有所不同, 使得各个亚型异构体得到了良好的分离。故实验条件选择 pH 为 2.0。

2 2 2 流动相的选择

MT 缺少芳香氨基酸, 脱金属后的 MT 在 254 和 280 nm 处均没有吸收, 紫外检测主要是检测 210 nm 处肽键的紫外吸收。实验比较了分别以甲醇和乙腈为流动相, 优化分离条件后在 pH 2.0 时对 MT 的分离情况, 结果分别如图 2-c 和图 2-a 所示。由图 2-c 可看出, 甲醇作流动相进行分离时, 在 210 nm 处的响应低, 谱峰宽, 且甲醇在 210 nm 有比较强的吸收, 酸性条件下甲醇与 MT 容易在色谱柱上沉积^[16]; 而用乙腈作流动相 (图 2-a) 进行分离时, 响应高, 谱峰窄。故分离 MT 时选择乙腈作流动相, 不仅可以提高检测的灵敏度, 同时还能使 MT 各个亚型异构体得到更好的分离。

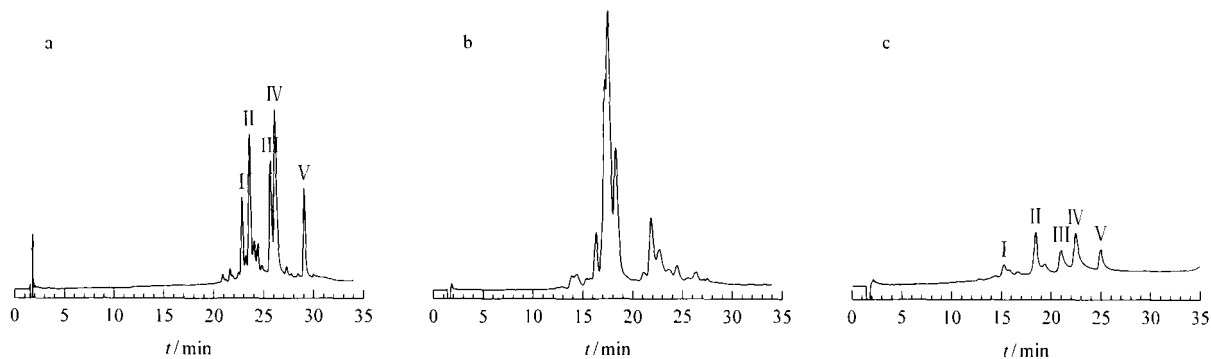


图 2 金属硫蛋白的液相色谱图

Fig 2 Chromatograms of MT by reversed-phase HPLC

Mobile phase a 0.1% (v/v) TFA in water (pH 2.0), 0.1% TFA in acetonitrile linear gradient elution; b 5 mmol/L ammonium acetate in water (pH 7.0), 5 mmol/L ammonium acetate in acetonitrile-water (1:1 v/v) linear gradient elution; c 0.1% (v/v) TFA in water (pH 2.0), 0.1% TFA in methanol linear gradient elution. UV detection at 210 nm.

The peaks - are MT sub-isoforms

2.2.3 MT-1 和 MT-2 的液相色谱分离

实验选择酸性 (pH 2.0) 条件下, 以 0.1% TFA 水溶液及 0.1% TFA 乙腈溶液为流动相, 分离 MT (见图 2-a) 及 MT-1 (见图 3-a) 和 MT-2 (见图 3-b)。我们还用建立的分离方法对 Sigma 公司的 MT-1、MT-2 进行分离 (数据未显示), 结果发现 Sigma 公司的 MT-1 与“1.3”节中制得的 MT-1 比较相似, 均含有 3 个主要的亚型异构体; Sigma 公司的 MT-2 所含主要的亚型异构体为图 2-a 中的组分, 比“1.3”节中制得的 MT-2 少了一个主要的亚型异构体 (指图 2-a 中的组分)。

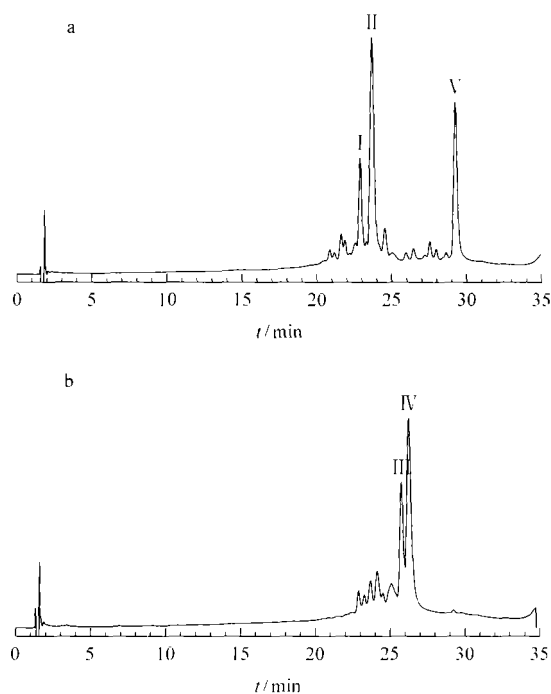


图 3 金属硫蛋白异构体 MT-1(a) 和 MT-2(b) 的色谱图
Fig 3 Chromatograms of MT-1(a) and MT-2(b) by reversed-phase HPLC

UV detection at 210 nm. Formobile phase as in Fig 2-a
For peaks - , see Fig 2

2.3 MT 亚型异构体的质谱鉴别

为了确认实验结果, 并进一步鉴别分离后的各个亚型异构体, 对 MT 的色谱流出物进行在线电喷雾质谱检测, 测得脱金属后 MT-1 和 MT-2 的各个主要亚型异构体的相对分子质量 (见表 1)。由表 1 所得的质谱结果可看出, 各个亚型异构体均得到了很好的鉴别。MT-1 的 3 个主要亚型异构体, , 分别对应于 MT-1 α , MT-1 δ , MT-1 ϵ ; MT-2 的两个主要亚型异构体, 分别对应于 MT-2 δ , MT-2 β 。

表 1 金属硫蛋白亚型异构体相对分子质量的确认和分子构型的推断

Table 1 Relative molecular mass identification and tentative formula of MT sub-isoforms based on the mass spectra of ES/MS and the reference data

Isoform	Sub-isoform ¹⁾	M _r		Tentative formula
		found	reference ^[13]	
MT-1		6143.6	6144	apo-MT-1 α
		6215.2	6215	apo-MT-1 δ
		6242.4	6242	apo-MT-1 ϵ
MT-2		6155.6	6156	apo-MT-2 δ
		6125.2	6125	apo-MT-2 β

1) For sub-isoforms - , see Fig 3.

参考文献:

- [1] Margoshes M, Vallee B L. *J Am Chem Soc*, 1957, 79(17): 4813
- [2] Kojima Y, Hunziker P E. *Methods Enzymol*, 1991, 205: 419
- [3] Hunziker P E. *Methods Enzymol*, 1991, 205: 422
- [4] Das K, Jacob V, Bouquegneau JM. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol*, 2002, 131C(3): 245
- [5] Olsvik P A, Gundersen P, Andersen R A, Zachariassen K E. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol*, 2001, 128C(2): 189
- [6] Muto N, Ren H W, Hwang G S, Tomiyama S, Itoh N, Tanaka K. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol*, 1999, 122C(1): 75
- [7] Ogra Y, Suzuki K T. *J Chromatogr B*, 1999, 735(1): 17
- [8] Nöstelbacher K, Kirchgessner M, Stangl G I. *J Chromatogr B*, 2000, 744(2): 273
- [9] Ma Hongbao, Tong Xiangjun, Li Lingyuan, Min Guangwei, Zhai Zhonghe, Ru Binggen. *Acta Biophysica Sinica* (马宏宝, 佟向军, 李令媛, 闵光伟, 翟中和, 茹炳根. *生物物理学报*), 1994, 10(4): 529
- [10] Lehman L D, Klaassen C D. *Anal Biochem*, 1986, 153(2): 305
- [11] Zhao Rui, Ji Jianguo, Yuan Hongsheng, Guan Huashi, Ru Binggen. *Chemical Journal of Chinese Universities* (赵锐, 纪建国, 袁洪生, 管华诗, 茹炳根. *高等学校化学学报*), 2002, 23(6): 1086
- [12] Chassigne H, Lobiński R. *Fresenius J Anal Chem*, 1998, 361: 267
- [13] Chassigne H, Lobiński R. *J Chromatogr A*, 1998, 829: 127
- [14] Wang Kui. *Biological Inorganic Chemistry*. Beijing: Tsinghua University Press (王夔. *生物无机化学*. 北京: 清华大学出版社), 1988: 217
- [15] Schultze P, Woergoetter E, Braun W, Wagner G, Vasak M, Kaegi J H R, Wuehrlich K. *J Mol Biol*, 1988, 203(1): 251
- [16] Hunziker P E, Kaur P, Wang M, Kanzig A. *Biochem J*, 1995, 306(1): 265