

HPLC 分析胰岛素开链反应的教学实验设计

白 晨^a, 吴 刚^a, 张 翼^a, 黄铮宇^b, 陆 红^a

(复旦大学 a 生物科学教学实验中心生物化学实验室; b 信息科学与工程学院, 上海 200433)

摘 要:设计 DTT 还原胰岛素, HPLC 再现 A、B 链开链反应过程的生物化学实验。筛选出最适还原反应条件, 最佳 HPLC 分离条件。通过质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析确定了产物的结构。实验操作简便, 结果稳定, 再现性好, 通过本实验学生能更好地理解 and 掌握 HPLC 的分析原理、操作方法及其在生命科学研究中的重要意义。

关键词:高效液相色谱; 胰岛素; 二硫苏糖醇

中图分类号: Q5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006 - 7167 (2008) 09 - 0017 - 03

A Teaching Experiment on HPLC Analysis of Insulin Unfolding

BAI Chen^a, WU Gang^a, ZHANG Yi^a, HUANG Zheng-yu^b, LU Hong^a

(a Laboratory of Biochemistry, Teaching Center of Biology; b School of Information Science and Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: This article designed an experiment where insulin was first reduced and unfolded by DTT, and then HPLC was used to represent the A and B chains. It developed the most probable conditions for the reduction reaction, found the best HPLC isolation method, and made a confirmation of each sample using MALDI-TOF-MS. The experiment is easy to perform, the result is invariable, and in addition, it has a desired reproducibility. It is helpful for college students to have a better understanding of the HPLC principles, to master the ways to operate it, and the importance of its role in life science research.

Key words: HPLC; insulin; DTT

CLC number: Q5 **Document code:** A **Article ID:** 1006 - 7167 (2008) 09 - 0017 - 03

高效液相色谱 (HPLC) 具有分离速度快, 灵敏度高, 是现代表器分析的重要组成部分。无论在环境科学、生命科学、医学研究中都显示出其优越性, 现已成为自然科学研究中必不可少的基本仪器^[1]。近几年, 多数高校的生物化学教学增添了 HPLC 分析原理、基本操作方法等理论教学内容。部分院系为增加学生的感性认识还采用多媒体教学、计算机虚拟实验系统^[2]让学生完成 HPLC 的实验演练。但是上述教学内容这很难让学生真正理解和掌握仪器高效率、高灵敏度特征, 更不可能达到熟练操作的目的。由于 HPLC 属于高价科研仪器, 在管理、实验内容上较为复

杂, 目前尚未见到将其应用于本科生教学实验的报道。

为了顺应生命科学的快速发展, 设计一例简便易行、结果明显、稳定并能与生物化学理论知识紧密结合的 HPLC 本科生教学实验显得非常必要。

胰岛素不仅是重要的生物学活性蛋白质, 同时具有分子量低、结构简单、性质稳定、已商品化生产、纯品价格便宜等特点, 是非常适合本科生生物化学教学实验的蛋白质原料。学生对胰岛素非常熟悉, 国内常用生物化学教材中的糖代谢、糖尿病部分都涉及到了胰岛素。Sanger 测定胰岛素序列的方法是生物化学教材中蛋白质测序章节的经典范例。我国合成结晶牛胰岛素的研究过程是蛋白质合成部分的生动教学案例。通过理论教学学生对胰岛素的物理化学性质、生理生化特性理解得较为全面、透彻。

RP-HPLC 主要根据疏水性差异分离蛋白质, 是目前分离、鉴定蛋白质和多肽最常用的方法之一^[3], 并

收稿日期: 2008 - 01 - 02

基金项目: 国家基础科学人才培养基金 (J0630643) 资助

作者简介: 白 晨 (1969 -), 女, 博士, 副教授, Tel: 021-65643674;

E-mail: baichen@fudan.edu.cn

被用于人工合成及生物体内胰岛素含量的精确定量^[4,5]、胰岛素在细胞内的降解途径分析等研究中^[6]。欧洲和美国的药典已将 HPLC 作为胰岛素鉴定的标准方法^[7]。

本文首先用高浓度 DTT 充分还原胰岛素。为排出了中间体和不稳定 A 链对实验结果的干扰,将分析结果锁定稳定性较高的 B 链^[8]。通过质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析 HPLC 洗脱峰确立了反应条件。通过优化 HPLC 洗脱条件得到了稳定、明显、对称的产物洗脱峰。整个实验时间控制在 6 h 以内,操作简便,可重复性高非常适合在本科生实验教学中应用。

1 实验部分

1.1 实验流程

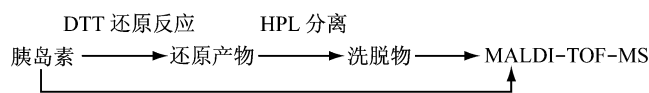


图 1 实验流程

1.2 仪器与试剂

(1) 仪器。Agilent 1100 LC 高效液相仪, ZORBAX 300SB-C₁₈ 高效液相柱, AXMA-Q II 质谱仪 (ASHLEIGH MADZU GROUP COMPANY), 精密电子天平, 真空干燥箱, 电热恒温水浴锅, pH 计。

(2) 试剂。猪胰岛素为分析纯 (徐州万邦生化制药有限公司), ACN 为色谱纯, TFA 为分析纯 (SIGMA), DTT 为分析纯, BHD (2,5-dihydroxybenzoic acid) 为色谱纯, 蒸馏水为色谱纯。

1.3 实验步骤

(1) DTT 还原胰岛素。胰岛素溶液为 1 mg/mL 胰岛素溶液, 用 2 N 盐酸调 pH 至 2.5。DTT 还原试剂为 200 mM DTT, 0.01 M 乙酸钠, 用 2 N 盐酸调 pH 至 2.5。分别取 50 μL 胰岛素溶液及 DTT 还原试剂于 Eppendorf 管中混匀, 往管中充满氮气, 用 parafilm 膜密封管口, 37 °C 水浴 3 h。

(2) HPLC 分析胰岛素还原产物。洗脱液平衡 HPLC 30 分后取还原反应液 5 μL 进样分析, 收集洗脱峰。取胰岛素标准品溶液 10 μL 作对照分析。HPLC 洗脱条件: 流动相为 34% 的乙腈水溶液 (含 0.1% TFA); 柱温为 25 °C; 流速为 0.8 mL/min; 检测波长为 230 nm。

2 实验结果

胰岛素标准品洗脱峰如图 2 所示, 保留时间为 4.319 min。DTT 还原后的胰岛素洗脱峰如图 3 所示。对照二次 HPLC 分析结果可以发现图 3 中 4.319 min 处已无明显出峰, 说明胰岛素已经被 DTT 完全还原开链, 产物中已无完整的胰岛素分子存在。除 3.681 min

处的 DTT 洗脱峰外, 产物的洗脱峰出现在 9 到 15 min, 其中胰岛素 B 链保留时间为 13.551 min

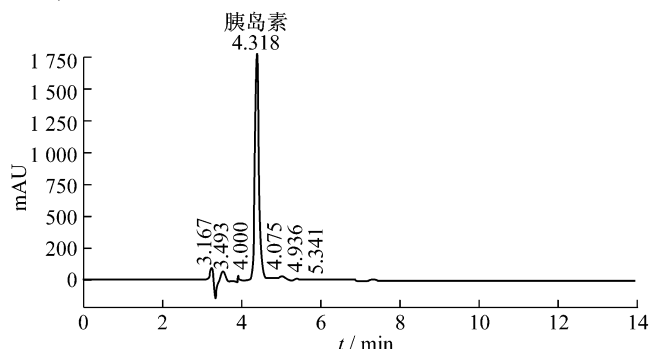


图 2 胰岛素标准品洗脱峰

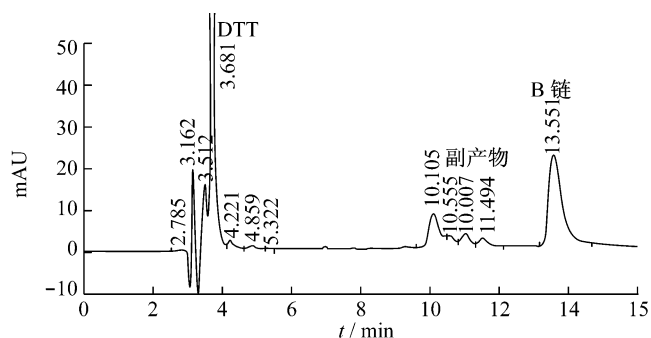


图 3 DTT 处理后的胰岛素洗脱峰

3 讨论

本科生教学实验必须具有理论依据明确、操作步骤简便、结果稳定、再现性高等特点。本实验设计中为了达到上述要求, 对 DTT 还原反应条件、HPLC 洗脱条件、洗脱产物的确定三个关键部分做了深入细致地探讨。

3.1 DTT 还原反应条件的确定

由于胰岛素在酸性条件下溶解性较好, 本实验选择在酸性条件下还原胰岛素, 反应体系 pH 值为 2.5。在此条件下, DTT 的用量比常规用量有所增加。但是鉴于 DTT 还原二硫键的速度与溶液 pH 值、温度呈正相关, 为加快反应速度将反应温度定为 37 °C。

董标^[8]等在毛细管区带电泳监测牛胰岛素的去折叠过程研究中发现用 DTT 处理胰岛素除了生成 A、B 链外, 还有不稳定的中间体。中间体的种类和含量跟 DTT 浓度, pH 值, 温度和反应时间相关。开链后 A 链十分不稳定, 其有无与反应时间相关, 超过一定的反应时间后胰岛素的 A 链会完全消失。本实验研究中发现同样问题, A 链十分不易检测, 导致不同实验组实验结果出现较大差异, 增加了学生操作实验和分析实验结果的难度。为此, 我们通过对比实验筛选了 DTT 还原胰岛素反应的最佳保温时间。具体操作是将胰岛素和 DTT 的反应混合物在 37 °C 温育, 利用 HPLC 分析反应时间分别为 0.5, 1, 2, 3, 4 h 的反应产物。结果发

现温育 3 h 后, HPLC 洗脱杂峰少, B 链洗脱峰明显, 实验结果稳定。故选择 3 h 作为还原时间, 并将产物峰单一锁定 B 链峰, 排出 A 链峰对实验结果的干扰。

3.2 HPLC 洗脱条件的优化

HPLC 洗脱条件的优化包括洗脱液配比, UV 检测波长确定两个部分。董方霆^[9]等报道了用 HPLC 分析 DTT 还原胰岛素的方法。但 HPLC 洗脱峰不明显, 峰形不对称, 为获得更为清晰稳定的 HPLC 产物峰, 我们将 HPLC 洗脱条件进行了一系列的优化。通过调节洗脱液中乙腈的浓度将总洗脱时间控制在 20 min 以内, 最后出现的 B 链峰保留时间约为 14 min。通过添加 TFA 稳定基线、使副产物与产物峰达到完全分离, 最后将 HPLC 洗脱液配比确定为: 34% 乙腈水溶液 (含 0.1% TFA)。在 UV 检测波长的选择方面, 我们也作了相关探讨。将胰岛素和其还原产物作连续波长扫描发现, 在 230 nm 处样品峰最明显, 杂峰最小, 故选择 230 nm 作为 HPLC 检测波长。

3.3 洗脱产物的确定

本实验采用的实验室最为常用的 ODS 反相 HPLC 层析柱, 其分离效果与样品的疏水性、分子量大小均有相关性。胰岛素经 DTT 处理开链后分子量减小, 疏基暴露可能使产物的保留时间小于完整的胰岛素分子。但是分子内部的疏水侧链暴露又可能引起增保留时间的延长。为了确定 HPLC 洗脱峰确系胰岛素和胰岛素 B 链, 我们将洗脱峰作了质谱分析。结果表明 4.319 min 洗脱峰为分子量 5734.01 (见图 4), 13.551 min 洗脱峰分子量为 3400.57 (见图 5), 分别与胰岛素及胰岛素 B 链分子量准确相符。

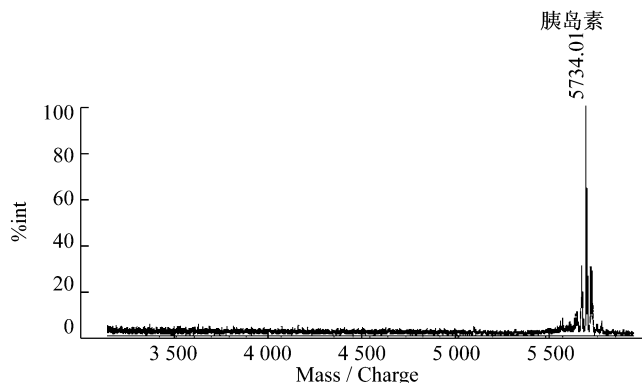


图 4 胰岛素标准品质谱鉴定结果

在胰岛素还原产物中, 除了 B 链和 DTT 外, 还发现有其它产物。如图 2 所示, 在 10 min-12 min 间出现

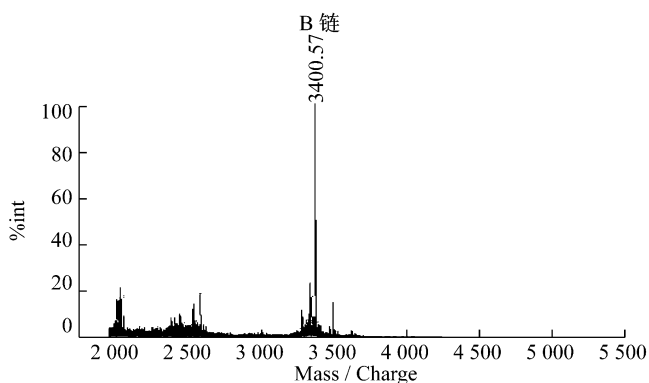


图 5 胰岛素 B 链质谱鉴定结果

了一些小峰。这些物质可能是反应中间体^[8,9], 也可能是残留的 A 链^[8]。质谱结果显示, 该时间段流出物质在 2000~3500 范围内检测到多个分子离子峰, 但是在 mass/charge 5734 处没有分子离子信号, 在 A 链理论分子量 2334 处也没有明显的分子离子信号, 可以初步推断这些物质不存在 A 链, 极可能是反应副产物。

参考文献 (References):

- [1] 谢一凡. 重视高效液相色谱法的实验教学 [J]. 山西医科大学学报 (基础医学教育版), 2003, 5 (3): 291.
- [2] 周 标, 朱亚东. 大型分析仪器的虚拟实验 [J]. 计算机与应用化学, 2003, 20 (3): 348-350.
- [3] Aguilar M I. HPLC of peptides and proteins: basic theory and methodology [J]. Methods in Molecular Biology, 2004, 251 (2004): 3-8.
- [4] Khaksa G, Nalini K *et al*. High-performance liquid chromatographic determination of insulin in rat and human plasma [J]. Analytical Biochemistry, 1998, 260 (1): 92-95.
- [5] Moslemi P, Najafabadi A R *et al*. A rapid and sensitive method for simultaneous determination of insulin and A21-desamido insulin by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 33 (1): 45-51.
- [6] Hamel F G, Peavy D E *et al*. HPLC analysis of insulin degradation products from isolated hepatocytes. Effects of inhibitors suggest intracellular and extracellular pathways [J]. Diabetes, 1987, 36 (6): 702-708.
- [7] Samento B, Ribeiro A *et al*. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of insulin from nanoparticulate systems [J]. Biomed Chromatogr, 2006, 20 (9): 898-903.
- [8] 董 标, 董方霆. 毛细管区带电泳监测牛胰岛素的去折叠过程 [J]. 分析化学研究简报, 2001, 29 (5): 538-541.
- [9] 董方霆, 廖 杰. 牛胰岛素去折叠过程的高效液相色谱法分析 [J]. 色谱, 1997, 15 (5): 420-422.

从人才培养体系整体出发, 建立以能力培养为主线, 分层次、多模块、相互衔接的科学系统的实验教学体系。

摘自《教高 [2005] 8 号文件》