

全柱成像 cIEF 技术在蛋白检测中的应用

李斌, 欧阳伟民, 于世建

(北京绿绵科技有限公司, 北京, 100080)

摘要: 全柱成像检测—毛细管等电聚焦电泳是 1992 年发展起来的一项检测技术, 具有分析速度快、重复性好、测定准确等特点, 是蛋白药物分析、食品蛋白研究强有力的工具。

关键字: 全柱成像检测; 毛细管等电聚焦; 蛋白药物; 食品蛋白

Application of capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection in protein analysis

Li Bin, Ouyang weimin, Yu Shijian

(Beijing Lumiere Tech Limited, Beijing, 100080, China)

Abstract: Capillary isoelectric focusing - Whole column imaging detection is a protein detection technology developed in 1992, It is a strong powerful tool for protein drug analysis and food protein research based on its fast analysis speed, good reproducibility and accurate determination.

Key words: capillary isoelectric focusing; whole column imaging detection; Protein drugs; Food protein

等电点 (isoelectric point, pI) 是蛋白质的最重要理化性质之一, 每一种蛋白质都有其特定的 pI, 其能反应蛋白质的空间结构、均一性以及功能性结构的变化, 准确测定蛋白质的 pI 值在蛋白基础研究、蛋白质药物以及食品功能蛋白表征方面有着重要意义。毛细管等电聚焦 (Capillary Isoelectric Focusing, cIEF) 是一种根据蛋白质等电点 pI 不同而进行分离的技术, 是蛋白质等两性分子分析最有力的工具之一^[1]。传统的 cIEF 采用单点检测方式, 即所有样品在毛细管内分离完成后形成稳定的聚焦区带后再依次到达检测器检测, 通常从形成 pH 梯度到样品聚焦完成通常只需要几分钟, 而聚焦区带依次通过检测器却需要 10~40min^[2]。移动过程不仅使得分析时间变长, 影响了分析的速度和通量, 而且蛋白分离区带还会因为移动发生区带展宽而影响分离度和分辨率, 同时还可能导致蛋白质沉淀。

全柱成像检测—毛细管等电聚焦电泳 (capillary isoelectric focusing electrophoresis- whole column imaging detection, cIEF-WCID) 是 1992 年发展起来的一项检测技术^[3-8]。cIEF-WCID 克服了传统单点检测 cIEF 的不足, 采用一个动态检测器对蛋白质在整个分离通道内不同时间与不同位置上发生的任何变化进行实时监测, 省去了繁琐的区带移动过程, 既缩短了分析

作者信息: 李斌, 男, 技术工程师, bin_li@lumtech.com.cn

时间，又保证了蛋白质的分离度和分辨率，使得蛋白质 pI 值的测定变得简单，目前已成为蛋白质药物、抗体药物研发、蛋白质组学研究和生物相互作用机制探索以及食品蛋白分析的强有力工具。

1. cIEF-WCID 技术

图 1 为 cIEF-WCID 的原理示意图。蛋白质样品与两性电解质载体及添加剂的混合物从毛细管分离柱（长度 5cm）的一端充入，在阳极液与阴极液之间施加分离电压（600V/cm 电场）启动聚焦过程，UV 检测光源通过透镜后由电光源变换为线光源而均匀地分布在整个分离通道（长度 5cm）上，整个聚焦过程大约 5~10min，聚焦过程中蛋白质在分离柱内的任何变化都能通过分离柱上端的动态检测器（CMOS 照相机）得到实时检测。当聚焦完成后，CMOS 相机记录分离柱的最后一个像。cIEF-WCID 的最大优点是整个聚焦过程全程可见。图 2 是某单抗样品的分离过程。从图中可看到，聚焦过程 5 分钟后即完成。与单点检测模式的 cIEF 相比，使用 cIEF-WCID 的全柱检测检测模式能恰到好处地确定最佳的聚焦时间，这可避免聚焦时间过短，也可避免过长。在单点 cIEF 中不易察觉的蛋白质聚焦过程中的沉淀或凝聚现象也能得到观测，便于聚焦方法的优化，一般 3h 至 3 天即可完成方法的开发。

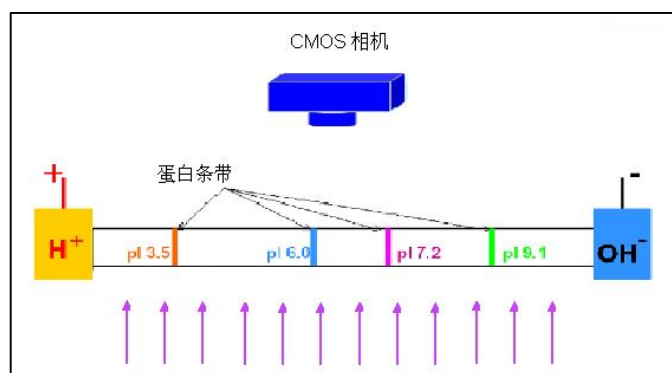
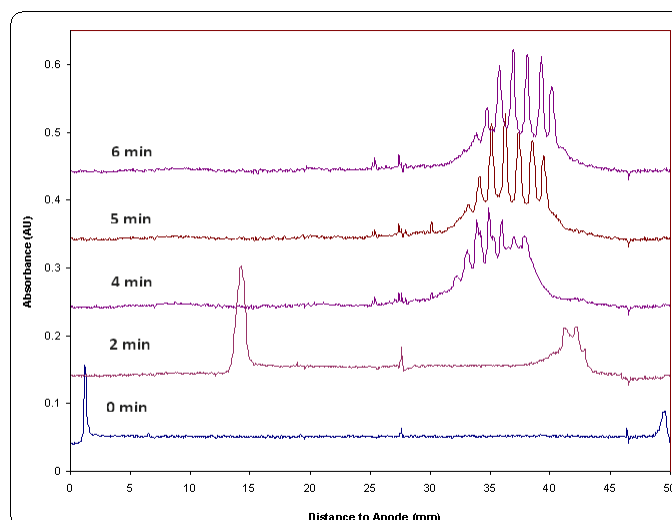


图 1 cIEF-WCID 示意图

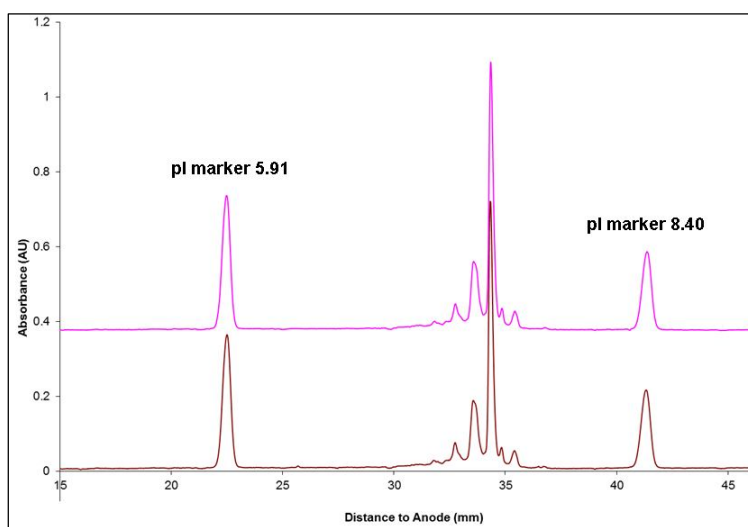


(IEF 条件: 蛋白浓度 0.5mg/ml, 两性电解质载体为 8% pH 3-10 Aeslyte, 电场 600V/min, Urea 浓度 1mol/L, 6min 聚焦, pI marker 6.61 和 9.33)

图 2 某单克隆抗体的动态聚焦过程

2. cIEF-WCID 在生物医药中的应用实例

cIEF-WCID 技术作为一种创新的等电聚焦方法, 可以应用于蛋白质或其他两性物质等电点的测定, 等电点的测定可精确至 0.01 个 pH 单位^[9]。图 3 是 cIEF-WCID 测定某一种单克隆抗体的结果。两个等电点标记物(pI markers) 作为内标被加入到单抗样品中, 通过计算谱图中待测物质峰与 pI markers 峰的相对位置, 即可得到单抗的 pI 信息, 表 1 为该单抗的 pI 测定结果, 结果呈现非常好的重现性。



(IEF 条件: 蛋白浓度 0.4mg/ml, 两性电解质载体为 4% pH 3-10 Aeslyte 和 8% pH 8-10.5 SH, 电场 600V/min, Urea 浓度 4mol/L, 5min 聚焦, pI marker 5.91 和 8.40)

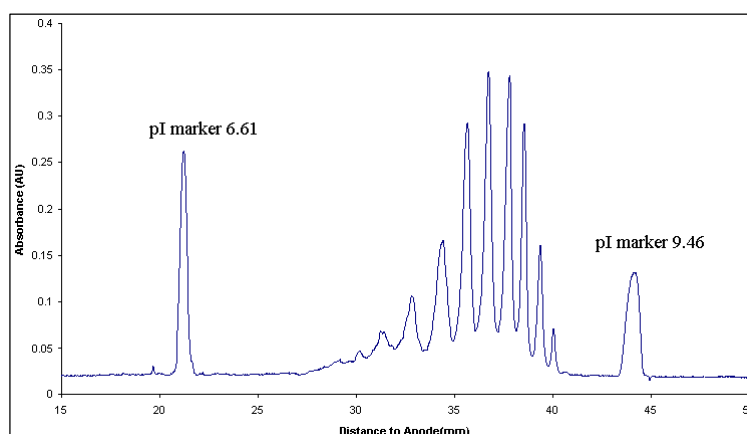
图 3 单克隆抗体 1 的电泳图

表 1 单克隆抗体 1 的 pI 测定结果

	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7
1 Run	714	7.27	7.37	7.48	7.54	7.62	7.79
2 Run	714	7.26	7.37	7.47	7.54	7.62	7.79

药物工业对蛋白质和抗体表征分析的最重要前提是良好的重复性, 影响传统的凝胶电泳和毛细管电泳发展最大的原因之一是其重复性差。而 cIEF-WCID 的分析速度快、pI 测定准确、分辨率高、重复性好等特点使其迅速成为生物制药行业蛋白分析的最佳方法。在生物制药厂的蛋白药物研究中, 蛋白药物电荷不均一性的表征是 cIEF-WCID 最重要的应用领域。蛋白质电荷的不均一性常常是因为蛋白质翻译后修饰的结果。对于蛋白质电荷不均匀一性的

分离，没有其他方法的分辨率能超过 IEF 技术，故 cIEF-WCID 是研究蛋白质翻译后修饰的重要工具。越来越多的生物制药厂的实验室，已将 cIEF-WCID 方法作为一种常规方法，用于生产过程分析、药物制剂研究分析及最终产品的质量控制分析。图 4 是某一种单克隆抗体的电荷不均一性的分离结果，cIEF-WCID 结果表明该蛋白呈现出高度的电荷不均一性，cIEF-WCID 对该类样品有这非常出色的分辨率和重复性。



(IEF 条件: 蛋白浓度 0.25mg/ml, 两性电解质载体为 4% pH 3-10 Aeslyte 和 8% pH 8-10.5 SH, 电场 600V/min, Urea 浓度 4mol/L, 5min 聚焦, pImarker 6.61 和 9.46)

图 4 单克隆抗体 2 的电荷不均一性表征结果

3. cIEF-WCID 在食品功能蛋白表征中的应用实例

3.1 cIEF-WCID 用于奶制品中功能蛋白的表征

牛奶是人类重要的蛋白质来源，其所含的 20 多种氨基酸中有人体必须的 8 种氨基酸。牛奶中蛋白质含量约为 30~35 g/L，是其主要成分。其中 80% 为酪蛋白(CN)，分为酪蛋白、酪蛋白和酪蛋白；15% 为乳清蛋白，是由乳白蛋白，乳球蛋白，白蛋白和免疫球蛋白组成。表 2 列出了牛奶蛋白的组成及其性质。

表 2 牛奶蛋白的组成及其性质

蛋白	含量 (g/L)	分子量	等电点
α 1-Casein (α 1-CN)	12-15	23,615	4.92-5.05
α 2-Casein (α 2-CN)	3-4	25,226	5.00-5.35
β -Casein (β -CN)	9-11	24,092	5.53
κ -Casein (κ -CN)	2-4	19,006	6.07

β -Lactoglobulin (β -LG)	2-4	18,277	5.41
α -Lactalbumin (α -LA) B	0.6-1.7	14,178	4.2-4.5
Lactoferrin (LF)	0.02-0.1	76,110	8.95

正常乳中酪蛋白占乳蛋白的质量比例一般会稳定在 77%~78% 左右，是向牛乳中加入乙酸调 pH 值到酪蛋白等电点 (pI 4.6) 沉淀得到。酪蛋白成分因不同种群存在不同，是国际上乳品掺假检验的主要测试指标。乳清蛋白存在于牛乳用乙酸调 pH 值至 4.6 过滤后的清液中，主要由乳球蛋白、清蛋白、免疫球蛋白和转铁蛋白组成。电泳法是国际上公认分离和测定牛乳中蛋白含量的首选方法。cIEF-WCID 测定蛋白具有准确、快速、仪器简单和重现性好的突出优点，可对牛奶中酪蛋白和乳清蛋白进行高效的分离和分析。

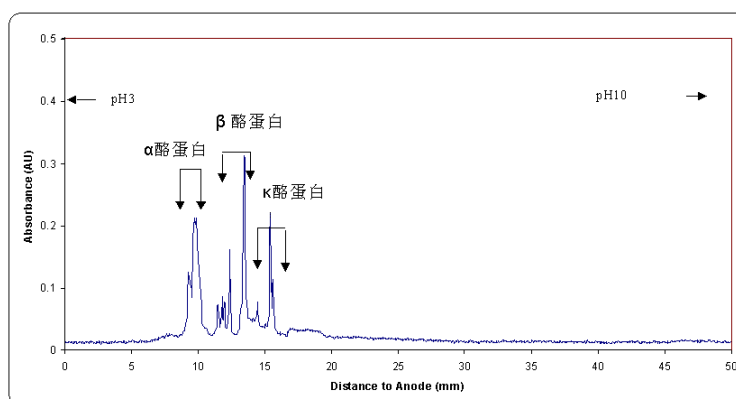


图 5 酪蛋白的 cIEF-WCID 表征结果

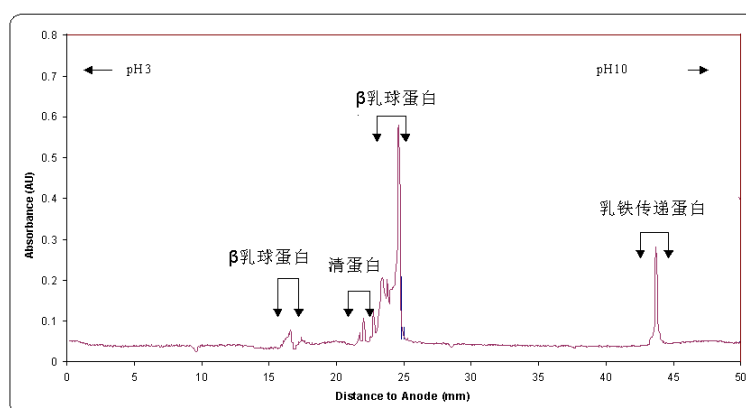


图 6 乳清蛋白的 cIEF-WCID 表征结果

图 5 和图 6 展示了酪蛋白和乳清蛋白的 cIEF-WCID 表征结果。由 cIEF-WCID 提供的等电点信息和峰高、峰面积，可对不同的功能蛋白进行定性（根据已知牛奶蛋白的样品处理方法和其等电点）和定量分析。由于 cIEF-WCID 提供的是分离开的各个蛋白浓度及其总浓度

的信息，除了用于奶品营养成分测定、奶品掺假鉴定，还可用于新奶品的快速研发。

3.2 cIEF-WCID 用于肉类蛋白的表征

肉类的蛋白种类非常多，一般按蛋白的功能和盐溶性分为三大类。肌浆蛋白是可以溶于水和稀盐（0.1M）溶液的蛋白；肌原纤维蛋白是溶于高浓度盐溶液（0.3M 缓冲盐）的蛋白；而基质蛋白是溶于需要加热的盐溶液。表 3 列出肉类蛋白的种类和含量。

表 3 肉类蛋白的种类和含量

蛋白种类	肌肉含量 (%)	主要蛋白	等电点
肌浆蛋白	30	肌红蛋白, 血红蛋白, 酶	2 - 11
肌原纤维蛋白	50-60	肌球蛋白, 肌动蛋白	4.5 - 6.5
基质蛋白	10-20	胶原蛋白, 弹性蛋白	-----

肉类中的不同蛋白都有其各自特定的 pI 值，依据 pI 值可对这些蛋白进行分离及定性分析。图 7 和图 8 展示了猪肉肌浆蛋白和肌动蛋白的 cIEF-WCID 电泳结果。cIEF-WCID 的用于肉类蛋白的分离和表征，不仅能为肉类品质的提高、营养的增加研究提供依据，还可以用于快速鉴定肉类掺假，甄别不同肉种。

不同肉类的功能蛋白（如肌红蛋白和肌动蛋白）因具有不同的氨基酸序列而导致不同等电点。根据特定的前处理方法对不同肉类的功能蛋白进行提取后，cIEF-WCID 就可以根据的等电点差异对肉类种属进行区分。图 9 是猪肉和鸡肉的肌红蛋白在 cIEF-WCID 的电泳结果，两者的 pI 差异明显。

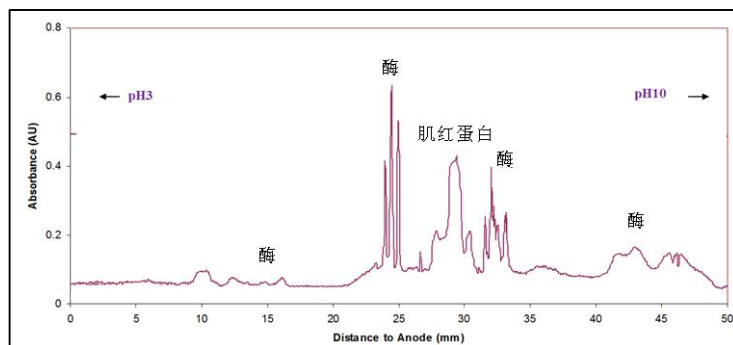


图 7 猪肉肌浆蛋白的 cIEF-WCID 电泳结果

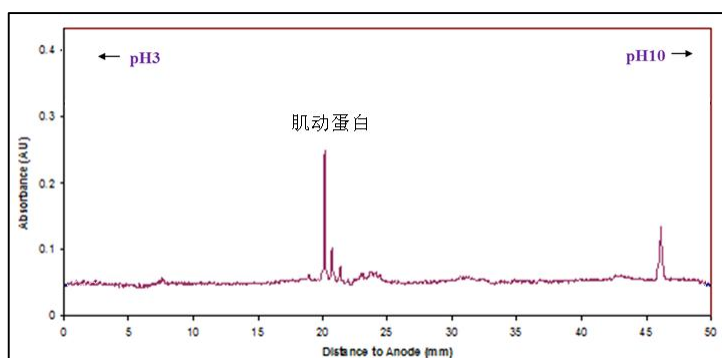


图 8 猪肉肌原蛋白的 cIEF-WCID 电泳结果

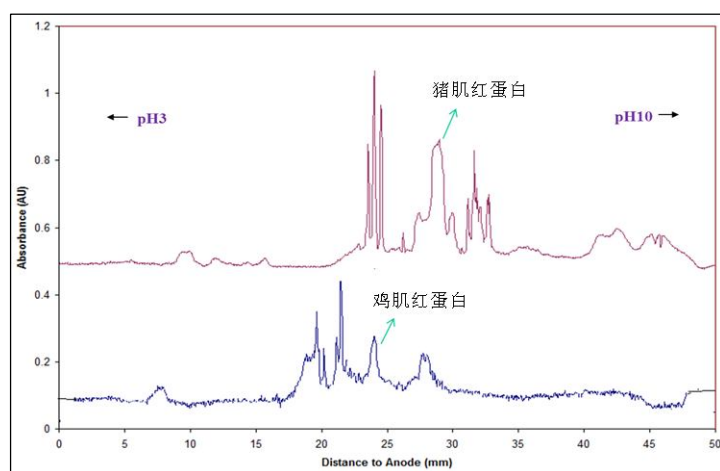


图 9 cIEF-WCID 电泳结果表明猪肉和鸡肉肌红蛋白有着不同的 pI 值

4. 结论

全柱成像检测—毛细管等电聚焦电泳创新的全柱实时检测方式,可观察到蛋白在分离柱内的动态变化,聚焦时间的优化和方法的开发变得简单,取消了传统 cIEF 的移动过程,大大地缩短了分析时间,并保持了蛋白分离的高分辨率。cIEF-WCID 技术使得复杂蛋白质的分离和 pI 点的测定变的异常轻松,在生物医药领域,它已经成为蛋白质药物和抗体药物研发和质量控制的强有力工具,在蛋白质组学基础研究和生物相互作用机制探索中也有着巨大潜力。同时作为一种快速的分析方法,cIEF-WCID 也是奶制品、肉类等食品功能蛋白检测最新的技术手段,既能为食品功能蛋白品质的提高、营养的增加研究提供依据,还能成为食品蛋白真伪鉴别的有效手段。

参考文献:

[1] HJERTENS, ZHUMD. Adaptation of the Equipment for High Performance Electrophoresis to Isoelectric Focusing [J]. Journal of Chromatography, 1985, 346: 265—270.

- [2] 吴家齐. 毛细管等电聚焦电泳(cIEF)及其理论模拟计算新进展 [J]. 计算机应用于化学, 2007, 24(1): 11-15.
- [3] WUJQ, PAWLISZYNJ. High Performance Capillary Isoelectric Focusing with a Concentration Gradient Detector [J]. Analytical Chemistry, 1992, 64: 219—224.
- [4] WUJQ, PAWLISZYNJ. Capillary Isoelectric Focusing with a Universal Concentration Gradient Imaging System Using a Charge Coupled Photodiode Array [J]. Analytical Chemistry, 1992, 64: 2934—2941.
- [5] WUJQ, PAWLISZYNJ. Dual Detection for Capillary Isoelectric Focusing with Refractive Index Gradient and Absorption Imaging Detectors [J]. Analytical Chemistry, 1994, 66: 867—873.
- [6] WUJQ, PAWLISZYNJ. Diode Laser Based Concentration Gradient Imaging Detector for Capillary Isoelectric Focusing [J]. Analytica Chimica Acta, 1995, 299: 337—342.
- [7] WUJQ, PAWLISZYNJ. Absorption Spectra and Multi capillary Imaging Detection for Capillary Isoelectric Focusing Using a Charge Coupled Device Camera [J]. Analyst, 1995, 120: 1567—157.
- [8] WUXZ, WUJNQ, PAWLISZYNJ. Fluorescence Imaging Detection for Capillary Isoelectric Focusing [J]. Electrophoresis, 1995(16): 1474—1478.
- [9] MAOQL, PAWLISZYNJ. Capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection for analysis of protein and peptides [J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1999, 39: 93—110.