

- 3217
- 9 Broccoli D, Young J W, de-Lange T. Telomerase activity in normal malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (20): 9082~ 9086
- 10 Harle B C, Boukamp P. Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortalized and carcinoma derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (13): 6476~ 6481
- 11 Greider C W, Blackburn E H. Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am*, 1996, **274** (2): 92~ 97
- 12 陶慰孙 (Tao W S) 编著. 蛋白质分子基础. 北京: 人民教育出版社, 1981. 93
- 13 Woodring E W, Jerry W S, Mieczyslaw A P. Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucl Acids Res*, 1995, **23** (18): 3794~ 3795

A TRAP Assay on Human Colonic Tumor Telomerase Activity. GU Shao-Hua, JIANG Guang-Ping¹⁾, CAO Ger-Tao²⁾, SHENG Ji-Qun, LIU Jiar-Ping, DAI Jiar-Liang³⁾, LIN Qing, LIN Yuan, LI Shi-Zhong⁴⁾, LIU Wei-Ping, XIE Yi (*Institute of*

Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China; ¹⁾ *Shanghai Clon Biotechnology Corporation Limited, Shanghai 200433, China;* ²⁾ *Shanghai Institute of Cell Biology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;* ³⁾ *Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China;* ⁴⁾ *Hospital of Changhai, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China).*

Abstract A TRAP assay on human colonic tumor telomerase activity is reported. The reliable result is obtained when 1.8 mmol/L Mg^{2+} and 55 °C annealing temperature are adopted. The other two factors affecting reliability are quantity of the extract and contamination of the positive DNA fragments in the reaction.

Key words human colonic tumor tissue, telomerase activity, telomeric repeat amplification protocol

反相高效液相层析在糖化白蛋白肽段 分离纯化中的应用*

梁 逊 李顺子

(南开大学化学系, 天津 300071)

李文兰

(南开大学吸附分离功能高分子材料国家重点实验室, 天津 300071)

摘要 采用一种简单的“甲醇-水-三氟醋酸”作为洗脱体系的反相高效液相层析(简称 RP-HPLC)对通过固相合成方法合成的糖化白蛋白肽段进行了分析鉴定和分离纯化。使用酸敏性 PEG 载体, Fmoc 保护化学法合成了白蛋白八肽 NH_2 -Lys-Gln-Thr-Ala-Leu-Tyr-Tyr-Cys-COOH。对其 N 端 Lys 进行糖化反应后, 经 Sephadex G-10 柱色谱纯化后, 通过 RP-HPLC 分析, 证明得到了糖化八肽的单一峰。使用 Merrifield 树脂, Boc 保护化学法合成了白蛋白七肽 NH_2 -Gln-Thr-Ala-Leu-Tyr-Tyr-Cys-COOH。通过 RP-HPLC 半制备分离提纯后, 得到了所需的肽段。对 N^{α} -Boc-Lys 的 ϵ 氨基进行糖化反应后, 经 RP-HPLC 分析, 证明得到了比较纯的糖化赖氨酸, 与纯化后的白蛋白七肽偶联后, 通过 RP-HPLC 分析, 得到了偶联产物——糖化八肽的单一峰。

关键词 反相高效液相层析, 糖化白蛋白, 糖化赖氨酸

学科分类号 Q5

反相高效液相层析 (RP-HPLC) 特别适用于分子质量不大的蛋白质和多肽物质的分离、纯化和鉴定。与通常的柱层析相比, 具有速度快、灵敏度高、分辨率强的优点, 在生物化学领域起着重要的作用。

糖尿病是当前世界上最常见的代谢内分泌病^[1]。通过对血清糖化蛋白质的研究和临床应

用^[2], 发现随着糖尿病人血糖水平增高, 糖化白蛋白 (glycoalbumin, GA) 的含量也随之增高, 因此 GA 含量的百分数的变化就反映了糖尿病的病情的程度^[3,4]。近年来, 国外有人制备了抗 GA 的单克隆抗体, 并用于 GA 的免疫测定^[5,6], 该方法的建

* 国家自然科学基金资助项目 (29474161)。

收稿日期: 1997-10-10, 修回日期: 1998-04-24

立对糖尿病的监测提供了有效的手段, 在临床上有着重大的意义. 本文利用不同路线合成了制备抗 GA 单抗所需的多肽半抗原——糖化白蛋白特异肽段^[6], 应用 RP-HPLC 技术^[7~9], 采用简单的“甲醇-水-三氟醋酸”洗脱体系进行了较好的分析鉴定和分离纯化.

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器: 高效液相层析仪为美国 Waters 公司产品, 配有 Waters510 HPLC Pump, WatersTM996 Photodiode Array Detector 和 Millennium 2010 色谱工作站.

1.1.2 分析型层析柱: Waters 生产的 Nova-Pak[®] C₁₈ 4 μm 3.9 mm × 150 mm HPLC Column 半制备型层析柱 Waters 生产的 μBONDAPAKTM C₁₈ 7.8 mm × 300 mm 液相层析柱 (Liquid Chromatography Column).

1.1.3 层析溶剂: 甲醇为色谱纯, 天津四友公司产品; 水为经 Milli-Q 制备的超纯水; 三氟醋酸 (TFA) 为 Merck-Schuchardt 产品.

1.1.4 分析测定: 样品溶于一定浓度 (0.1% 或 0.2%) 三氟醋酸水溶液, 用微量进样器 (Hamilton 产品) 取 10~25 μl 进样, 室温 (约 20℃) 下层析, 流速 1 ml/min, 泵压不超过 3 000 Pa.

1.2 方法

1.2.1 白蛋白八肽片段糖化前后的鉴定: 本实验室用 Fmoc 保护化学法合成了白蛋白八肽片段 NH₂-Lys-Gln-Thr-Ala-Leu-Tyr-Tyr-Cys-COOH. 肽链的纯度通过 RP-HPLC 鉴定, 并做了氨基酸组成分析. 将白蛋白八肽与过量葡萄糖反应, 产物经 Sephadex G-10 柱色谱纯化后收集主峰, 冷冻干燥. 做 RP-HPLC 分析.

1.2.2 白蛋白七肽的合成及分离提纯: 用 Merrifield 树脂作载体, 采用 Boc 保护化学法合成了白蛋白七肽 NH₂-Gln-Thr-Ala-Leu-Tyr-Tyr-Cys-COOH, 粗肽用反相 C₁₈ 硅胶常压柱色谱纯化, 得白色固体 (半纯品肽). 对其用 RP-HPLC 鉴定, 然后用反相 C₁₈ 半制备柱经 RP-HPLC 作半制备分离纯化.

1.2.3 糖化赖氨酸的合成及分析鉴定: N^α-Boc-Lys 与过量葡萄糖反应, 糖化反应产物用 Sephadex G-10 纯化, 收集洗脱曲线主峰部分, 旋转蒸发, 冷冻干燥, 通过 RP-HPLC 鉴定其纯度.

1.2.4 白蛋白七肽与糖化赖氨酸的偶联反应及偶联产物的分析鉴定: 白蛋白七肽片段、糖化赖氨酸在混合溶剂中反应 30 min, 冷冻干燥. 用 25% TFA/DCM 溶液脱 Boc 保护基, 冷冻干燥. 将偶联产物用 Sephadex G-10 纯化, 收集主峰后, 通过 RP-HPLC 进行分析鉴定.

2 结果与讨论

2.1 白蛋白八肽和糖化白蛋白八肽的分析鉴定

图 1 显示了白蛋白八肽的单一峰, 证明得到了纯度较高的肽段. 表 1 列出了合成的八肽的氨基酸组成分析, 从表 1 看到, 氨基酸分析的实测值与理论值相当接近, 也证明了产物的均一性.

比较图 1 和图 2, 白蛋白八肽的保留时间 $R_t = 8.8$ min, 而在相同洗脱条件下, 糖化八肽的保留时间 $R_t = 1.47$ min, 即经过糖化反应, 肽段的极性显著增强. 这是因为葡萄糖上有大量的羟基存在, 增强了肽段的极性. 在图 2 中, 保留时间 $R_t = 8.8$ min 处无峰, 说明得到了较高纯度的糖化八肽, 可以作为半抗原使用.

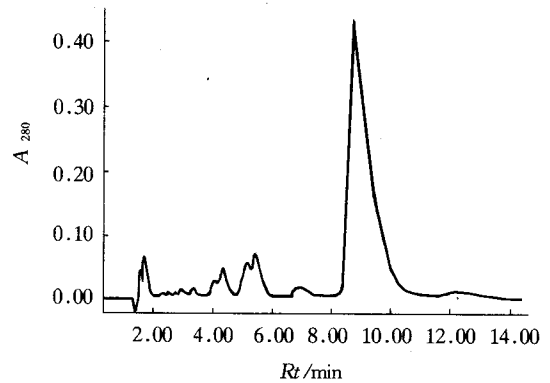


图 1 白蛋白八肽的 RP-HPLC 图
流动相: 36% 甲醇-水 (0.2% TFA) 恒浓度洗脱,
检验波长: 280 nm.

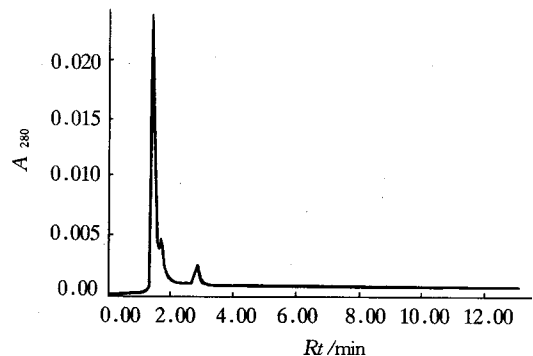


图 2 糖化白蛋白八肽的 RP-HPLC 图
流动相: 36% 甲醇-水 (0.2% TFA) 恒浓度洗脱,
检验波长: 280 nm.

表1 白蛋白八肽的氨基酸分析结果

氨基酸残基	理论值	实测值
Thr	1.00	0.91
Gln	1.00	1.03
Ala	1.00	1.03
Leu	1.00	1.00
Tyr	2.00	1.86
Lys	1.00	1.01

2.2 白蛋白七肽的分离提纯

由图3可知, 当用极性较强的洗脱液为流动相分析半纯品肽时, 出现了A肽和B肽两个主峰,

随着洗脱液极性减弱, A肽和B肽的保留时间都向后延长, 两个峰时间间隔逐渐加大. 由此可见, 当用RP-HPLC对化合物进行分析鉴定时, 应选用与所要分析的样品相适应的一定极性的洗脱液作流动相. 当洗脱液极性太强时, 几种不同化合物的谱图可能呈单一峰或分离不开; 当洗脱液极性太弱时, 分析样品所需时间无谓延长, 浪费时间.

参考图3的洗脱条件, 对半纯品肽进行半制备分离提纯(图4), 分别收集到A肽和B肽. 经氨基酸分析表明, B肽是我们所要的目的肽. 至此, 我们得到了色谱纯的白蛋白七肽片段.

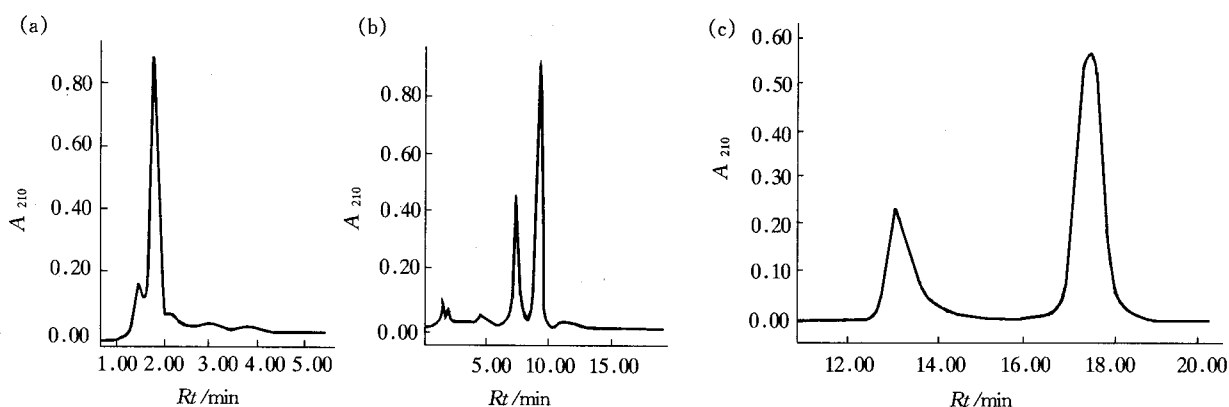


图3 半纯化肽在不同洗脱条件下的RP-HPLC图

(a)60%甲醇水溶液,0.2% TFA;(b)38%甲醇水溶液,0.2% TFA;(c)34%甲醇水溶液,0.2% TFA;检测波长均为210 nm.

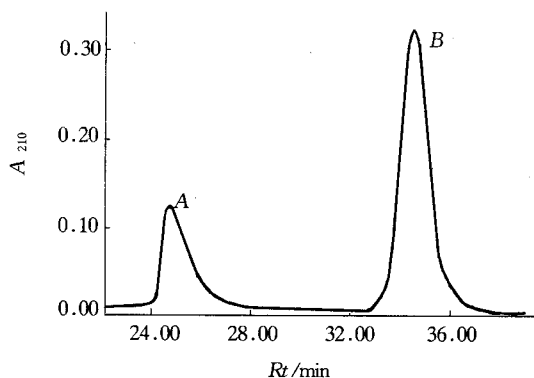


图4 七肽的半制备分离纯化图

流动相: 36% 甲醇-水 (0.2% TFA) 恒浓度洗脱, 流速 2 ml/min, 检验波长: 210 nm.

条件下得到含 N^α-Boc-Lys 的糖化赖氨酸, 其纯度已经合格, 可以用于与白蛋白七肽的偶联.

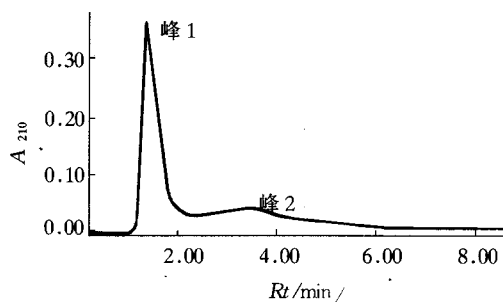


图5 糖化赖氨酸的RP-HPLC图

流动相: 30% 甲醇-水 (0.2% TFA) 恒浓度洗脱, 检验波长: 210 nm.

2.3 糖化赖氨酸的分析鉴定

根据反相 C₁₈ 色谱按分子极性分离物质的原理, 再由茚三酮检测, 图5中峰1为糖化赖氨酸, 峰2为非糖化赖氨酸, 即经 Sephadex G-10 纯化一次得到的糖化赖氨酸中有少量 N^α-Boc-Lys 存在. 虽然我们没有得到纯的糖化赖氨酸, 但在现有纯化

2.4 白蛋白七肽与糖化赖氨酸偶联产物的鉴定

由图6可知, 得到了纯度较高的糖化八肽, 可以作为半抗原使用.

国外用 RP-HPLC 进行多肽的层析时, 基本上都采用分离能力强、洗脱强度高、粘滞度低的乙

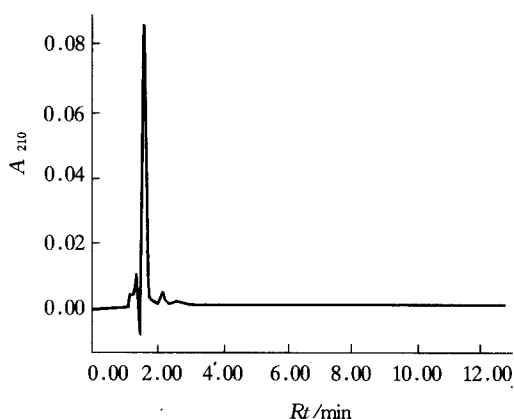


图6 偶联产物——糖化八肽的HPLC图

流动相: 15%~30%甲醇-水 (0.1% TFA) 梯度洗脱, 检测波长: 210 nm.

腈作有机相溶剂. 国内 HPLC 级的乙腈价格昂贵, 而纯化乙腈又较繁复, 因此大量使用有困难. 在我们的实验中, 用国产色谱纯甲醇完全可以替代乙腈, 其洗脱强度大约为乙腈的 2/3, 其价格亦可接受.

采用不同极性的“甲醇-水-三氟醋酸”体系可以令人满意地分析白蛋白肽段和糖化赖氨酸. 其中三氟醋酸不仅作为反离子, 而且可以增强多肽的溶解度, 本身紫外吸收又小, 是目前常用的洗脱溶液中的酸成分.

我们在进行生物化学研究中涉及到许多合成多肽的制备、分离和鉴定, 用现在这个简单的“甲醇-水-三氟醋酸”洗脱体系做 RP-HPLC 分析, 可以简化分析方法, 减少产品用量, 大大缩短分析时间, 提高分析的灵敏度和准确度, 而且对结果解释提供许多有意义的信息.

致谢 本工作进行的过程中, 曾与阎虎生老师进行了有益的讨论, 特此致谢.

参 考 文 献

- 1 Mei Yi, Liu Fu, You Xian, *et al.* Encyclopedia of China. Zhengzhou: Hai Yan Press, 1996 (7): 314~315
- 2 Baydanoff S, Konova E, Dosheva L, *et al.* Non-enzymatic glycosylation of elastin. Glycosylation & Disease, 1994, 1 (1): 53~58
- 3 Neuman R G, Elizabeth H, Margo P C. A marker of glycemic status in rats with experimental diabetes. Laboratory Animals, 1994, 28 (1): 63~69
- 4 Yasukawa K, Abe F, Shida N, *et al.* High-performance affinity chromatography system for the rapid, efficient assay of glycosylated albumin. Journal of Chromatography, 1992, 597 (1~2): 271~

275

- 5 Ohe, Yasuo, Makiko M, Yoshito N, *et al.* Radioimmunoassay of glycosylated albumin with monoclonal antibody to glycytyl-lysine. Clinica Chimica Acta, 1987, 169 (2~3): 229~238
- 6 Knowles W T, Marchesi V T. Preparation of immunogenic peptides and their use for manufacture of monoclonal antibodies to human glycoalbumin for use in assessment of diabetic condition. Eur Pat, C12p, Appl. EP 0257421. 1988-02-03
- 7 Buentemeyer H, Tebbe H, Luetkemeyer D, *et al.* Rapid high-performance liquid chromatographic quantification of recombinant human antithrombin III during production and purification. J Chromatogr B: Biomed Appl, 1994, 662 (2): 209~216
- 8 Cengiz S, Satman I, Ozkok E, *et al.* Comparative micro albumin measurement in urine by HPLC and radio immunoassay: a preliminary report. Turk J Med Sci, 1993, 19 (1): 41~48
- 9 Arai H, Tomizawa S, Maruyama K, *et al.* Reversed-phase HPLC for analysis of urinary proteins: diagnostic significance of α_1 -acid glycoprotein. Nephron, 1994, 66 (3): 278~284

The Application of RP-HPLC in the Analysis and Purification of an Immunogen: Glycoalbumin Fragment. LIANG Xun, LI Shun-Zi (*Department of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China*); LI Wen-Lan (*The State Key Laboratory of Function Polymer Materials for Adsorption and Separation, Nankai University, Tianjin 300071, China*).

Abstract RP-HPLC method with a simple “MeOH-H₂O-TFA” elution system is applied in purification and analysis of human glycoalbumin fragment including the region of lysine 525, which was synthesized by different methods. The peptide fragment of albumin KQTALYYC prepared by acid-labile PEG resin was glycosylated and purified by gel filtration and analysed by RP-HPLC. A single peak demonstrated that the glycosylation of the peptide was successful. Heptapeptide fragment of albumin QTALYYC was synthesized by chloromethyl resin according to the Boc chemistry strategy. The pure heptapeptide was obtained by semi-preparative RP-HPLC. Glycosylated lysine was purified by gel filtration and ascertained by RP-HPLC. The heptapeptide was coupled with glycosylated lysine. RP-HPLC of the product showed that the glycopeptide is qualified as a semi-antigen.

Key words RP-HPLC, glycoalbumin, glycosylated lysine