

糖蛋白和其降解形式的色谱分析

T. Graner, R. Bhikhabhai, and J. Zou
GE Healthcare, SE-751 84 Uppsala, Sweden

在离子交换色谱中，优化其色谱条件就可以用来分离糖蛋白和它的各种降解形式。不同结构形式的糖蛋白的洗脱行为可以通过凝胶过滤来研究。我们选择了三种含有不同糖苷链的糖蛋白(如抗生物素蛋白、核糖核酸酶 A、核糖核酸酶 B)作为模型蛋白。前面提到的方法对于定性的研究糖蛋白的糖基化程度和检查不同糖蛋白的保留性质是一种很好的方式。

介绍

可以预料到，随着糖工程的发展重组糖蛋白纯化的需求会越来越高。为了确保批次之间得到的蛋白的一致性，对这些蛋白的糖基化程度和保留性质的了解将变得非常必要和关键。这篇文章向大家展示了各种糖基化的模型蛋白及其降解形式的色谱分析，这种分析主要是利用不同的色谱技术来研究各种不同糖基化形式蛋白的保留性质。这个研究中所选的每一个蛋白都含有不同的糖苷链(如表1所示)。

原料和方法

模型蛋白、酶和化学品都购于Sigma-Aldrich，抗生物素蛋白通过 α -甘露糖苷酶和内糖苷酶H来降解。AKTAexplorer™ 10色谱系统，采用的预装柱为Mini s™ 4.6/50 PE 和Superdex™ 75 10/300。

表1 模型蛋白的性质

| 性质 | 蛋白 | Rnase A | Rnase B |
|----------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| 等电点(pI) | Avidin | 9.6 | 9.6 |
| 糖基化 | yes | no | yes |
| 糖基化氨基酸 | Asn17 | - | Asn34 |
| 氨基酸的数目 | 128 | 124 | 124 |
| 分子量(M _r) | 58440 to 63760 | 13683 | 14899 to 15547 |
| 糖基化的程度(%) | 10 | 0 | 8 to 12 |
| 糖残基的类型和数目 | 4 to 5 | 0 | 5 to 9 |
| | | 甘露糖 3N连接的甘露糖 | 甘露糖 2N连接的甘露糖 |

在离子交换色谱中，首先要优化缓冲液的pH，并利用优化好的pH来调整盐的洗脱梯度，从而获得好的分辨率。对于凝胶过滤而言，要使得糖基化的蛋白和其降解形式获得好的分离，可以串联两根凝胶柱并降低流速来进行。每一个蛋白首先单独进行分析，然后混合后分析。

离子交换色谱分析

在这个研究中，糖蛋白抗生物素蛋白和核糖核酸酶 B蛋白都含有一个中性多糖。生物素和牛胰腺的核

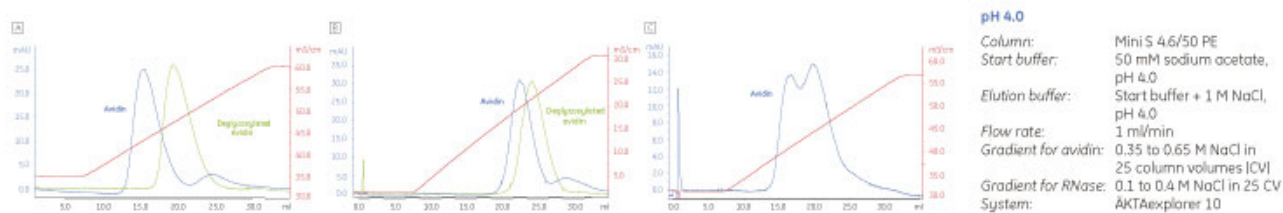


Fig 1. Ion exchange separation of avidin and deglycosylated avidin at (A) pH 4.0 and (B) pH 7.0. (C) Separation of a mixture of avidin and deglycosylated avidin at pH 4.0.

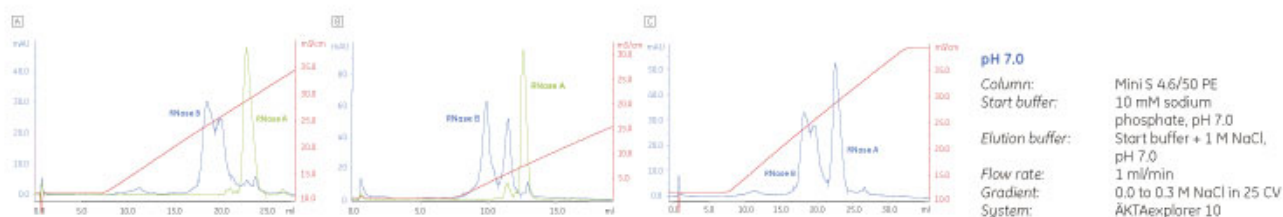


Fig 2. Ion exchange separation of RNase B and RNase A at (A) pH 4.0 and (B) pH 7.0. (C) Separation of a mixture of RNase A and RNase B at pH 4.0.

糖核糖酶B都含有N连接的甘露糖,由中性糖组成。因为生物素和核糖核糖酶属于碱性蛋白(PI分别10和9.6),所以采用阳离子交换剂Mini S来优化分离各种形式的糖蛋白。对于其他蛋白,如转铁蛋白,N连接的多糖族带有负电荷的硅酸残基。这种情况下,采用阴离子交换色谱Mono Q就可以分离各种不同的sialylated形式。

当分别进行分析时,糖基化的生物素比降解的生物素糖蛋白先洗脱下来(图1 A和B),表明带电荷的氨基酸越多同离子交换剂的相互作用越强。单一两种蛋白的保留行为和这两种蛋白的混合物在分离中的保留行为会有所不同(图1 C)。

对于核糖核糖酶A和核糖核糖酶B的分析中,无论是在pH 4.0和7.0进行单独分析时,还是在pH 4.0的混合物中,都有着截然不同的峰存在。在图2C中,可以看到核糖核糖酶B有两个峰存在,可能是由于天冬氨酸67的酰胺化形成(1)。

凝胶过滤色谱分析

为了观察糖基化蛋白和其降解形式在尺寸上的轻微不同,我们把两根凝胶柱串联起来,并采用低的流速为0.25 ml/min来分析。采用参考蛋白可以进行尺寸校正,并对生物素、核糖核糖酶A和核糖核糖酶B来进行分析。利用凝胶过滤分析,计算各种蛋白的stokes半径,以用来测定糖基化蛋白和其降解形式的水力体积。

核糖核糖酶A和核糖核糖酶B在单独分析和混合分析中都可以看到明显的峰(图3)。生物素的不同形式在分别检测时都可以看到明显不同的峰,然而在混合物分离中洗脱出了一个很宽的峰,表明这两种形式存在相互作用(图4)。

结论

这个实验表明了离子交换色谱可以用来优化分析不同糖基化蛋白之间微小的差异。通过凝胶过滤,糖

基化蛋白和其降解形式的水力体积可以利用stoke's半径来测定。糖基化蛋白和其降解形式蛋白的Stoke's半径的不同反映了每种蛋白水力体积的不同。

参考文献

1.Gottle G.et al.Glycosylation and specific deamidation of ribonuclease B affect the formation of three-dimensional domain-swapped. Oligomers.J.Biol.Chem.278,46241-46251(2003).

表2 参考蛋白的Stoke's半径和分子量和计算的生物素和核糖核糖酶各种糖基化形式的Stoke's半径。

| 参考蛋白 | 分子量 | Stoke's 半径 |
|-----------|-------|------------|
| 细胞色素C | 12400 | 16.50 |
| 胰凝乳蛋白酶A | 25000 | 20.90 |
| 碳酸脱水酶 | 30000 | 23.80 |
| 卵清蛋白 | 43000 | 30.50 |
| 牛血清白蛋白 | 67000 | 35.50 |
| 参考蛋白 | 分子量 | Stoke's 半径 |
| 抗生物素蛋白 | 63760 | 33.72 |
| 降解的抗生物素蛋白 | 58440 | 31.50 |
| 核糖核糖酶B | 14930 | 19.58 |
| 核糖核糖酶A | 13700 | 17.50 |

订购信息

| 产品 | 货号 |
|---------------------------------|------------|
| Mini S 4.6/50 PE(1 x 0.8 ml) | 17-5178-01 |
| Mono Q 5/50 GL(1 x 1.0 ml) | 17-5168-01 |
| Superdex 75 10/300 GL(1 x 24ml) | 17-5174-01 |
| AKTA explorer 10 | 18-1300-00 |

要了解这片文章中关于层析柱的更多信息,请登录
www.gelifsciences.com/protein-purification.
 关于AKTA得更多信息,请登录www.gelifsciences.com/akta.

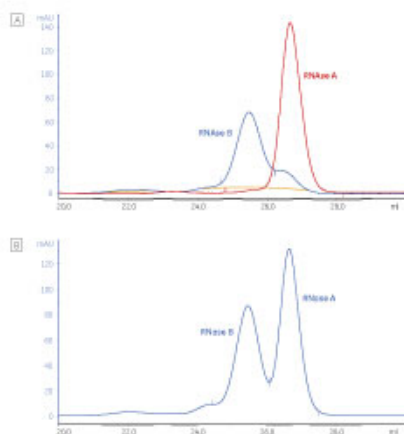


Fig 3. (A) Overlay chromatograms of RNase B and RNase A separated by gel filtration. (B) A mixture of RNase A and RNase B separated by gel filtration.

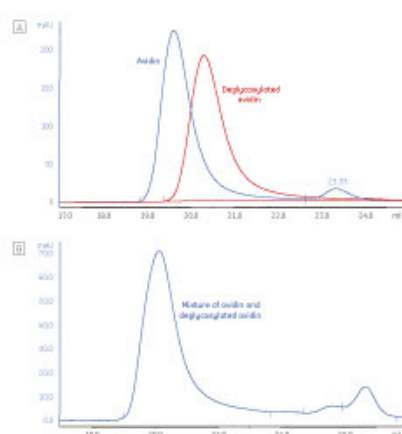


Fig 4. (A) Overlay chromatograms of avidin and deglycosylated avidin separated by gel filtration. (B) A mixture of avidin and deglycosylated avidin separated by gel filtration revealed a different elution profile.