

文章编号:1008-9926(2004)03-0174-04 中图分类号:R917 文献标识码:A

液质联用技术鉴定 rLTB 的结构

杨 毅, 田文标, 朱永红, 邹全明

(中国人民解放军第三军医大学, 临床微生物教研室 重庆 400038)

摘要:目的 利用电喷雾离子化为接口(ESI)的高效液相色谱/质谱联用技术(HPLC-MS), 鉴定重组大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位(rLTB)氨基酸序列结构的正确性。方法 利用 SDS-PAGE 分离、呈现蛋白混合物, 胰蛋白酶原位水解 rLTB, HPLC-MS 联机制备肽指纹图, 分析肽指纹图获得 rLTB 氨基酸全序列信息。结果 rLTB 的全序列结构与理论的全序列结构完全一致。结论 改进的 HPLC-MS 测定条件稳定, 提高了质谱灵敏度, 结合肽指纹图的分析结果, 可以验证蛋白质的氨基酸序列。
关键词: rLTB; 原位酶解; HPLC-MS; 肽; 指纹图谱

The Structure Identification of rLTB by HPLC - MS

YANG Jun, TIANG Wen-Biao, ZHU Yong-Hong, ZOU Quan-Ming

(Department of Clinical Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038 China)

ABSTRACT: Aim The correctness of the primary structure of recombinant heat-labile enterotoxin B was identified by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Methods** rLTB in SDS-PAGE gel was digested by trypsin, and its peptide finger mapping was prepared by improved HPLC-MS methods. By analyzing peptide finger mapping, the primary structure of rLTB was identified. **Results** Theoretic and actual primary structure of rLTB is consistent. **Conclusion** Improved HPLC-MS conditions were stable. The sensitivity of MS was increased. Whole amino acid sequence of proteins were detected.

KEY WORDS: rLTB; Tryptic digestion in gel; HPLC-MS; Peptide finger mapping

7), 6.21 ($^1\text{H}, d, J = 15.8\text{Hz}, H8$), 6.84 ($^1\text{H}, d, J = 2.1\text{Hz}, H2'$), 6.62 ($^1\text{H}, d, J = 7.9\text{Hz}, H5'$), 6.60 ($^1\text{H}, dd, J = 2.1, 7.9\text{Hz}, H6'$), 3.02 (2H, m, H7'), 5.21 ($^1\text{H}, m, H8'$)。综合以上分析结果, 结合文献^[4]鉴定该化合物为迷迭香酸。

4 讨论

作者从泽兰的氯仿和乙酸乙酯部位分离并鉴定了6个化合物的结构, 分别为2-羟基熊果酸(2-hydroxylursolic acid, VIII), 胡萝卜苷(daucosterol, IX), 原儿茶醛(proto catechualdehyde, X), 原儿茶酸(proto catechuic acid, XI), 咖啡酸(caffeic acid, XII), 迷迭香酸(rosmarinic acid, XIII)。综合前报的研究结果表明, 泽兰中的主要化学成分为三萜酸类及酚酸类。文献报道三萜酸类具有抗肝炎病毒的药理作用^[5], 酚酸类物质则具有心血管活性^[6]。本研究初步阐明了反

映泽兰临床功效的化学成分, 并为其化学分类学提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 孙连娜, 陈万生, 陶朝阳, 等. 泽兰化学成分的研究 [J]. 第二军医大学学报, 2004 (待发表)
- [2] 从浦珠. 质谱在天然有机化学中的应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1987. 684~686
- [3] Sun Lianna, Hong Yongfu. Studies on the chemical constituents of *Chaenomeles sinensis* (Thouin.) Koehne [J]. *Journal of Chinese pharmaceutical sciences*, 2000, 9(1): 6
- [4] 吴志军, 欧阳明安, 杨崇仁. 茜叶丹参的多酚类化合物 [J]. 云南植物研究, 1999, 21(3): 393
- [5] 刘厚佳, 胡晋红, 孙莲娜, 等. 木瓜中齐墩果酸抗乙型肝炎病毒研究 [J]. 解放军药学报, 2002, 18(5): 272
- [6] 邹正午, 徐理纳, 田金英. 迷迭香酸抗血栓和抗血小板聚集作用 [J]. 药理学, 1993, 28(4): 241

(收稿日期: 2003-12-30; 修回日期: 2004-03-26)

(本文编辑 梁爱君)

基金项目: "863" 生物与现代农业技术领域生物工程技术主题课题, No. 2001AA215161

作者简介: 杨 毅 (1972-), 女, 重庆人, 讲师, 理学硕士。研究方向: 生物制品的纯化、质检和蛋白组分析研究。Tel: (023) 68753590; E-mail: w8301991@263.net

大肠杆菌不耐热肠毒素(heat-labile enterotoxin, LT)是产毒素性大肠杆菌(enterotoxigenic E. coli, ETEC)分泌的一种热不稳定性肠毒素,由A、B二个亚单位组成,其中A亚单位通过其GIP依赖的ADP-核糖基化转移酶活性引发毒素效应,B亚单位可以与真核细胞表面的GM1-神经节苷脂受体特异结合,帮助A亚单位进入细胞,结合到靶细胞上^[1]。由于LT的B亚单位(LTB)的毒性低,粘膜免疫佐剂活性高,在口服蛋白疫苗研究中,作为诱导机体产生粘膜免疫反应的佐剂,引起广泛的兴趣^[2]。

80年代末二种软电离技术的发明,使质谱迈入了生物大分子的研究领域,并极大地推动了蛋白组研究进程。其中一种软电离技术是电喷雾离子化(electrospray ionization, ESI),ESI能产生多电荷峰扩大了分子量的测定范围,同时提高了灵敏度和准确性。HPLC能分离得到较多的蛋白满足后续的鉴定,与质谱(MS)直接连接使用自动化程度高、重复性好^[3]。基于这些优点,随着HPLC-MS的发展和改进,成为了蛋白组学研究的核心技术。

利用DNA重组技术将LTB基因通过合适的载体克隆到易于操作和培养的宿主细胞中进行表达,再分离纯化表达产物,即 α LTB。验证 α LTB氨基酸全序列的正确性是基因工程产品质量控制的重要指标^[4]。肽图谱(peptide mapping)是蛋白质经水解后测定肽段以获得相关的信息,是生物制品高特异的鉴定方法。目前主要有液相肽图和质谱肽图,前者根据肽段在色谱柱上的分离行为差异而获得,主要检测蛋白质制品的稳定性,后者经色谱柱分离后通过质谱分析每个肽段的准确分子量,从而鉴定蛋白质的初级结构^[5]。色谱分离蛋白质和肽最常用最有效的流动相体系是乙腈、水和三氟乙酸,但对于电喷雾质谱(ESI-MS),三氟乙酸根是具有强离子对效应的阴离子,与质子化肽段生成电中性的离子对,抑制多肽ESI-MS的质谱信号^[6]。本文采用了改进色谱条件,直接HPLC-MS联机检测,获得 α LTB的HPLC肽图和HPLC/MS肽图并验证了 α LTB的氨基酸全序列结构。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 色谱纯乙腈、三氟乙酸(TFA)、乙酸(均为美国TEDIA公司产品);超纯水的电阻率为18.2M Ω ;胰蛋白酶[(经TPCK处理)为Promega公司]; α LTB(由本教研室纯化组提供,批号011205)。其余试剂均为分析纯。流动相A:1000ml超纯水。

流动相B:乙腈800ml和水200ml。胰蛋白酶溶液:用缓冲液将胰蛋白酶配制成1mg \cdot ml⁻¹的溶液。1100 HPLC/1946B型液质联用仪:在线脱气机、四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、光二极管阵列紫外可见分光光度检测器、ESI接口的四极质谱检测器(均为Agilent公司)。色谱柱 Zorbax 300SB-C₁₈(5 μ m,2.1mm \times 150mm);保护柱 Zorbax 300SB-C₁₈(5 μ m,2.1mm \times 12.5mm,均为Agilent公司)。

1.2 方法

1.2.1 SDS-PAGE电泳条件 采用15%分离胶,5%浓缩胶, α LTB上样量10 μ g,聚集电压80V,1h,分离电压65V,3h。考马斯亮蓝染色。

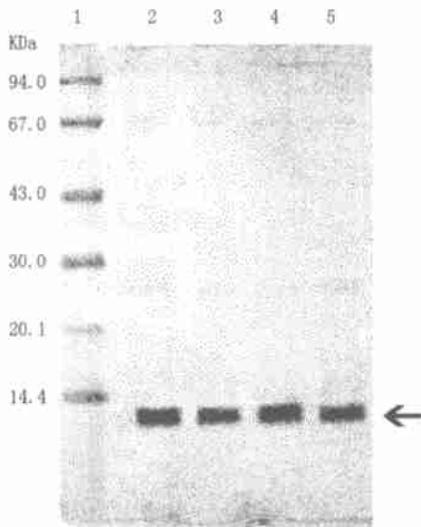
1.2.2 胰蛋白酶水解方法 用刀片从电泳胶上切下目的蛋白带,将其切成1mm²大小的胶块。放入含有50%乙腈,50mmol L⁻¹的NH₄HCO₃溶液中,摇床上250r/min,20min震荡清洗,重复三次。将胶片置鼓风干燥机中70 $^{\circ}$ C干燥,30min。加入20 μ l酶溶液和20 μ l的50mmol L⁻¹的NH₄HCO₃溶液,盖上塞,轻摇,37 $^{\circ}$ C水浴18h。取出加入乙酸20 μ l终止反应。

1.2.3 酶水解产物的HPLC-MS分析 将1.3.2处理过的样品经0.45 μ m孔径的滤膜滤过待用。HPLC色谱条件:流动相A和B;洗脱梯度B相从0%~60%,25min;保护柱和色谱柱;柱温40 $^{\circ}$ C;流速0.25ml/min;上样量10 μ l;检测波长分别为210nm。质谱条件:干燥气流速,12 l/min;辅助雾化气压力,40Pa;干燥气温度,350 $^{\circ}$ C;电喷雾电压,4000V;m/z扫描范围50~3000;裂解电压,120V;质谱扫描间隔0.20Da;扫描周期0.97s。

2 结果

2.1 α LTB的SDS-PAGE电泳和原位酶解 α LTB以包涵体的形式表达,通过包涵体溶解和第二步纯化工序处理,SDS-PAGE电泳分析 α LTB纯化产品的纯度,见图1。 α LTB的分子量为14100,图1箭头所指的条带为 α LTB,其纯度约86%。从图中可见 α LTB纯化产品约有6~7条杂蛋白带。用小刀切下箭头所指的 α LTB条带,按1.2.2方法进行原位酶解。

2.2 α LTB原位酶解结果分析 经TPCK处理的胰蛋白酶专一性酶切位点在肽链中K(Lys)和R(Arg)的羧基端,水解后蛋白产生长短不等的肽段。 α LTB理论氨基酸全序列见图2,共有124个氨基酸,含有16个精氨酸和赖氨酸,胰蛋白酶水解后理论上可以产生17个肽段或氨基酸。图2中T₁₋₁₇为17个肽段的编号及所在位置,标在每个肽段的羧基端。



1 蛋白分子 marker 2~5 rLTB 纯化产物

图1 纯化 rLTB 蛋白 15% SDS - PAGE 电泳分析

Fig 1 15% SDS - PAGE analysis of purified rLTB protein

T₁ T₂ T₃
 NH₂ - MNK VK CYLFTALLSSL YAHGAPQTITLCEYR NTQI
 T₄ T₅ T₆ T₇
 YTINDK LSYTESMAGK R EMVIITFK SGETFQVEVPGSQHID
 T₈ T₉ T₁₀ T₁₁ T₁₂ T₁₃ T₁₄ T₁₅
 SQK K AIER MK D'ILR ITYL'ETEK IDK LCVWNNK TPNS
 T₁₆ T₁₇
 IAAISMK N - COOH

M, K, R 等为氨基酸符号 T₁-₁₇胰蛋白酶水解肽段编号 胰蛋白酶水解位点

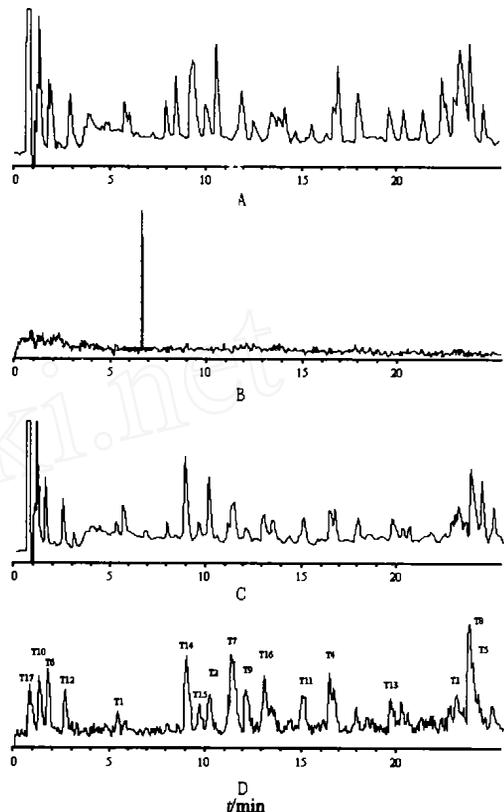
图2 rLTB 的氨基酸序列和胰蛋白酶水解所得肽段

Fig 2 Amino acid sequence chain of rLTB and peptide fragments by trypsin digestion

2.3 酶水解产物的 HPLC - MS 分析结果 在分离多肽混合物时,一般在流动相中加入 TFA (A 相 0.1%, B 相 0.085%),可以获得较好的色谱分离效果。但在液质联机中 TFA 会抑制多肽的 ESI 质谱信号,见图 3。图 3A、3B 分别为流动相中添加 TFA 的色谱肽图和质谱肽图,图 3A 液相肽图中可见胰蛋白酶水解的肽段得到较好的分离,而图 3B 质谱肽图的样品信号几乎完全被抑制了。图 3C、3D 为用乙酸 (A 相 0.1%, B 相 0.1%) 代替 TFA 添加到流动相中的液相肽图和质谱肽图。图 3C 液相肽图中峰的数目和保留时间与图 3A 液相肽图中基本一致,同时获得很好的质谱肽图见图 3D。

2.4 rLTB 质谱肽指纹图的鉴定分析 从图 3D 中提取各肽段质量数,进行肽段归属鉴定分析。表 1 列出 rLTB 胰蛋白酶水解所得肽段的实测质量数和理论质量数,以及二者之间的误差。从表 1 可见,该条

件下通过 HPLC - MS 获得 rLTB 酶解所得的全部 17 个肽,且各肽段的质量数与理论推测的质量数吻合,证实了重组 rLTB 氨基酸序列表达的正确性。



A 含有 TFA 的流动相的 rLTB 液相肽图谱 B 含有 TFA 的流动相的 rLTB 质谱肽图谱 C 改用乙酸的流动相的 rLTB 液相肽图谱 D 改用乙酸的流动相的 rLTB 质谱肽图谱

图3 二种不同流动相的 rLTB 肽指纹图

Fig 3 Peptide mappings of rLTB with two different mobile phases

表1 HPLC-MS 分析 rLTB 胰蛋白酶水解肽段质量数的结果

Tab 1 Masses and assignment of tryptic rLTB peptides observed by HPLC-MS

| 肽段编号 | 理论质量数 (mass/ u) | 实测质量数 (mass/ u) | 误差 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-------|
| T ₁ | 391.2 | 391.3 | 0.1 |
| T ₂ | 245.2 | 245.1 | - 0.1 |
| T ₃ | 3250.6 | 3250.6 | 0 |
| T ₄ | 1208.6 | 1208.8 | 0.2 |
| T ₅ | 1198.6 | 1198.6 | 0 |
| T ₆ | 174.1 | 174.2 | 0.1 |
| T ₇ | 979.5 | 979.3 | - 0.2 |
| T ₈ | 2073.0 | 2073.2 | 0.2 |
| T ₉ | 146.1 | 146.1 | 0 |
| T ₁₀ | 487.3 | 487.3 | 0 |
| T ₁₁ | 277.1 | 276.9 | - 0.2 |
| T ₁₂ | 503.3 | 503.6 | 0.3 |
| T ₁₃ | 967.5 | 967.5 | 0 |
| T ₁₄ | 374.2 | 373.9 | - 0.3 |
| T ₁₅ | 875.4 | 875.2 | - 0.2 |
| T ₁₆ | 1131.6 | 1132.1 | - 0.5 |
| T ₁₇ | 132.1 | 132.1 | 0 |

文章编号:1008-9926(2004)03-0177-04 中图分类号:R943;R967 文献标识码:A

吗啡全抗原的制备及其免疫效果的评价

李琳, 赵文忠, 杨淑琴, 富宁, 徐江平

(中国人民解放军第一军医大学基础部, 药理教研室; 免疫教研室 广东 广州 510515)

摘要:目的 制备吗啡及琥珀酰吗啡的全抗原,评价二种抗原诱导小鼠产生抗体效价的差异及其对吗啡致依赖的戒断症状的影响。方法 采用混合酸酐法制备琥珀酰吗啡,将吗啡及琥珀酰吗啡与 Blue Carrier (BC) 蛋白交联,与福氏佐剂等比例混合免疫小鼠;用 ELISA 法检测小鼠血清中抗体滴度;竞争性抑制实验检测抗体与吗啡的体外结合能力;观察免疫小鼠对吗啡的依赖能力。结果 二种交联物免疫小鼠第9周血清中平均抗吗啡抗体滴度均超过 1 8 000,其中 M6-S-BC 组效价强度较 M-BC 组高,且效价维持时间较长;M-BC 组及 M6-S-BC 组与吗啡依赖组比较 15min 内体重减轻、跳跃次数及潜伏期均有显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。二组抗体对吗啡的抑制率能达 50% 以上。结论 二种载体蛋白交联物都能诱导小鼠产生高滴度的抗吗啡抗体,并使免疫小鼠对吗啡的成瘾性降低。

关键词:吗啡;蛋白交联物;免疫疗法;药物依赖

3 讨论

HPLC-MS 联机技术结合酶解可以检测蛋白质的氨基酸全序列,但对待测蛋白质的纯度要求较高(一般要求达到 98% 以上)。iLTB 包涵体溶解后,经过二步纯化,其纯度虽然达到 85% 以上,仍不能满足液质联机氨基酸序列分析的要求。考虑到杂蛋白较少,见图 1,SDS-PAGE 一维电泳对其分离即可达到目的。我们采用 SDS-PAGE 上的原位酶解方法,即在凝胶中将 iLTB 水解成多个肽段,分子量较小的肽段容易离开聚丙烯酰胺的胶孔到溶液中。该方法蛋白质的水解充分,所得肽段的浓度较高,通过 HPLC-MS 制备出较好的肽指纹图。

蛋白质或多肽的色谱分离常在流动相中加入 TFA,改善了色谱的分离效果,却抑制质谱信号,这对矛盾的存在,使 HPLC-MS 在蛋白质分析方面并不是一个完美的组合,有报道在液相检测器和电喷雾离子化室之间用“TFA-fix”的柱后修饰可以极大地提高质谱检测的灵敏度。但是“TFA-fix”修饰需要一台高精度的溶剂添加泵,增加了检测程序和检测成本。为此本文改变液相流动相的条件,选择不具有强离子对效应的有机酸代替 TFA,可以同时获得良好的色谱和质谱指纹图。通过比较不同比例的甲酸和乙酸,最后筛选出在 A、B 流动相中分别加入

0.1% 的乙酸,达到较好的 HPLC-MS 检测效果。该方法简化了 HPLC-MS 检测步骤,弥补 HPLC-MS 在蛋白质分析方面的局限,可以同时获得较好的色谱和质谱肽指纹图,并通过质量数鉴定分析获得目的蛋白的氨基酸序列结构。

参考文献:

- [1] Cieplak W Jr, Messer RJ, Konkel ME, et al. Role of a potential endoplasmic reticulum retention sequence (RDEL) and the Golgi complex in the cytotoxic activity of Escherichia coli heat-labile enterotoxin [J]. *Mol Microbiol*, 1995, 16(4): 789
- [2] Nashar TO, Webb HM, Eaglestone S, et al. Potent immunogenicity of the B subunits of Escherichia coli heat-labile enterotoxin: receptor binding is essential and induces differential modulation of lymphocyte subsets [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(1): 226
- [3] Zhou H, Watts J D, Aebersold R. A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 375
- [4] 中国生物制品标准化委员会. 中国生物制品规程 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 1~45
- [5] 陈执中, 章月华. 现代生化药物与基因工程药物分析 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 2000. 18~27
- [6] R. M. Kamp, T. Choli - Papadopoulou, B. Wittmann - Liebold. Protein Structure Analysis: Preparation, Characterization and Microsequencing [J]. *Berlin: Springer - Verlag Berlin Heidelberg*, 1997, 199

(收稿日期:2003-07-28;修回日期:2004-04-02)

(本文编辑 梁爱君)

基金项目:广州市科技攻关项目, No. 2002Z3-E4102

作者简介:李琳(1975-),女,辽宁铁岭人,在读硕士,研究方向:神经药理学。Tel:(020)61648235

通讯作者:徐江平(1967-),男,湖北武汉人,博士,副教授,研究方向:神经药理学。Tel:(020)61648236