科 学 通 报
第 39 卷 第 24期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1994 年 12 月

液相色谱、毛细管电泳及质谱用于蛇毒蛋白的分离与鉴定

张玉奎 陈 农 钱小红① 王 磊 杨柏宇 马立人①

(中国科学院大连化学物理研究所,国家色谱研究分析中心,大连 116012; ① 中国人民解放军军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

关键词 蛇毒蛋白、高效毛细管区带电泳、飞行时间质谱

现代分析技术的发展为生物大分子的分离鉴定提供了强有力的手段,因而大大加速了生命科学的研究进展. 近几年,毛细管区带电泳[1—3]和飞行时间质谱[4—10]在分离和鉴定生物大分子方面显示了快速、简便、高效等特点,本文采用毛细管区带电泳和飞行时间质谱,对常压色谱分离得到的蛇毒蛋白中的某些活性组分进行了分离和鉴定,并讨论了三种技术在分离蛇毒蛋白上的差异.

1 实 验 部 分

1.1 常压色谱分离条件

常压色谱采用 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换色谱柱和 Ultrogel AcA-44 凝胶过滤色谱柱,洗脱液为 0.05 mol/L pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液和 0.1 mol/L 的 NH_4Ac 溶液.

1.2 毛细管区带电泳分离条件

毛细管区带电泳采用自制毛细管电泳系统,中国科学院科学仪器厂的 GYW-030 高压电源,改装的 Biotronik BT 3030 可变波长紫外检测器,检测波长: 280 nm, Familic-100 N 微量泵用于毛细管的清洗,国产永年光导纤维厂产毛细管柱,柱有效长度 37 cm, 内径为 50 μm, 载体电解质采用 0.05 mol/L的 pH 10.3 的硼酸缓冲液,虹吸进样,操作电压为 20 kV.

1.3 飞行时间质谱的条件

飞行时间质谱为美国 Linear Scientific Inc. LDI 1700 型质谱仪,介质采用烟酸.

2 结 果 与 讨 论

经 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换柱层析,蛇毒被分为 16 个馏分[2—11], 其中有 2 个馏分具有纤维蛋白溶解活性,5 个馏分具有精氨酸酯酶活性,对此 7 个馏分作凝胶色谱再分离去掉部分杂质,获得进一步纯化的 7 个活性馏分. 对这 7 个馏分,我们采用毛细管区带电泳对其进行纯度分析,图 1 显示了 1(8), 2(2) 馏分的毛细管区带电泳图,毛细管区带电泳所采用的载体电解质为强碱性以减小蛋白质与毛细管管壁之间的吸附. 表 1 显示了具有活性的7 个馏

1993-11-18 收稿, 1994-08-18 收修改稿.

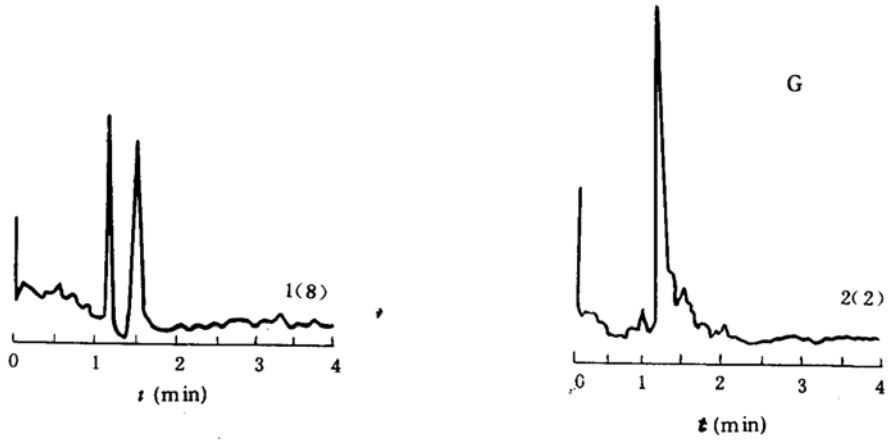

图 1 蛇毒馏分 1(8), 2(2)的毛细管区带电泳谱图
电泳条件参见实验部分

表 1 CZE 分离蛇毒蛋白的结果

馏分[a)]	峰数	迁移时间/min·s
2(2)	3	1′05″, 1′18″, 1′30″
2(5)	2	2′10″, 3′00″
1(8)	2	1′50″, 2′11″
2(10)	3	2′06″, 3′34″, 4′12″
2(11)	3	3′05″, 3′26″, 3′56″
1(12)	4	1′51″, 3′12″, 3′25″, 4′20″
2(12)	3	1′56″, 2′53″, 4′28″

a) 根据常压色谱中峰的次序.

分采用 CZE 的峰个数以及各个峰的迁移时间. 从表中可见: 经二步常压层析得到的 7 个活性馏分, 除主成分外还含有少量杂质, 需采用更加有效的分离手段, 方能获得活性蛋白酶的纯品.

1(8)和 2(2)馏分采用飞行时间质谱的谱图参见图 2, 从图中可见, 飞行时间质谱所得到的结果与毛细管电泳所得到的分离结果相仿, 但在飞行时间质谱中, 试样分子没有裂解成碎片, 可以用来鉴定蛋白质的分子量. 从质谱图上可以看到每一个峰的分子量, 表 2 列出了主成分以及少量杂质峰的峰数及所对应的各个峰的分子量. 从表中可见, 主成

表 2 飞行时间质谱鉴定蛇毒蛋白的结果

馏分	峰数	分子量	主蛋白的分子量
2(2)	5	7669.5, 23025.7, 38230.9 57465.3, 80442.4	23025.7
2(5)	4	10179.2, 13728.8, 30769.6 46043.1	30769.6
1(8)	3	10463.3, 31059.3, 46630.6	31059.3
2(10)	6	7598.8, 8426.1, 9272.0 11593.2, 29301.8, 43973.0	29301.8
2(11)	3	30878.5, 34632.8, 60656.0	34632.8
1(12)	4	11108.4, 16840.5, 34043.7 36783.1	36783.1
2(12)	4	11461.5, 14021.5, 30435.1 37160.4	14021.5

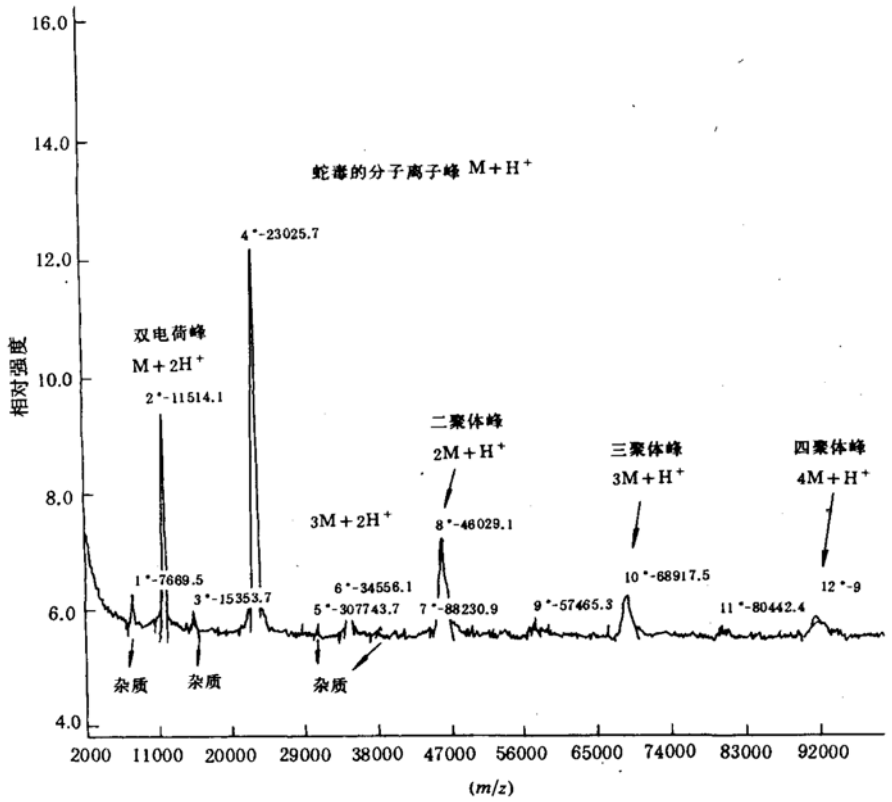

图 2　蛇毒蛋白 2(2)馏分的飞行时间质谱图

分及杂质的分子量分布在 10 000—90 000 左右，其分辨能力及分析结果的直观性均优于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳.

参　考　文　献

[1] Novotny, M. Y., Cobb, K. A., Lia, J., *Electrophoresis*, 1990, **11**: 735.

[2] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. K., *Science*, 1983, **222**: 266.

[3] 张玉奎、陈　农、王　磊，科学通报，1993, **38**(9): 801.

[4] Franz Hillenkiop *et al.*, *Anal. Chem.*, 1991, **63**: 1193A.

[5] Weinberger, S. R., Boernsen, K. O., *Proceedings of the Sixth Symposium on the Protein Society*, Washington, USA, 1992.

[6] Kenndler, E., Kaniansky, D., *J. Chromatogra.*, 1981, **209**: 306.

[7] Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Yonker, C. R. *et al.*, *Anal. Chem.*, 1987, **59**: 1232.

[8] Moseley, M. A., Deteroling, L. J., Tomer, K. B. *et al.*, *Anal. Chem.*, 1993, **63**: 109.

[9] Thompson, T. J., Foret, F., Vouros, P. *et al.*, *Anal. Chem.*, 1993, **65**: 900.

[10] Weinberger, S. R., Chen, N., Wang, L. *et al.*, *Proceedings of Fifth International Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis*, D171, Beijing, 1993.