DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.055

技术方法

文章编号:1000-5404(2002)10-1248-02

乙肝治疗性疏水肽胰蛋白酶消化肽图的LC-MS验证

Identification of trypsin digested peptide map of HBV therapeutic hydrophobic peptide by LC-MS

周 伟,吴玉章 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 验证乙肝治疗性疏水肽胰蛋白酶消化反相高效液相色谱(RP-HPLC)特征肽图的可信度。方法 采用液质联用的方法对胰蛋白消化后的多肽片断进行质量解析。结果 乙肝治疗性疏水肽的胰蛋白酶切片段与理论上计算值相符。结论 通过直接采用疏水肽悬液制作乙肝治疗性疏水肽胰蛋白酶RP-HPLC肽图的方法切实可行。

肽图(Peptide map)是能反映多肽一级结构的指纹图谱,不同的多肽具有不同的肽图,因而可用于定性多肽,因此肽图分析(Peptide mapping)是在肽疫苗生产工艺稳定性评价中有重要意义。目前常用的方法有CNBr裂解法、SDS PAGE微量肽图法和胰蛋白酶切反相高压液相(RP-HPLC)肽图法[1]。其中因胰蛋白酶切RP-HPLC法具有较高的分辨率及检测灵敏度,且因HPLC色谱仪的较为普及而应用最广泛。胰蛋白酶其特异性表现为能在37 ℃,pH 8.0左右的碱性条件下水解多肽中赖氨酸(K)或精氨酸(R)C末端肽键。我所自主研发的乙肝治疗性多肽εPA44的氨基酸序列中含有这两种氨基酸,理论上,经胰蛋白酶完全消化后应产生特定的多肽片段,在RP-HPLC 214nm紫外检测时应表现为特征的肽指纹色谱图谱。但在实验中发现,因εPA44有很强的疏水性,完全不溶于胰蛋白酶水溶液,使其胰蛋白酶肽图的制备显得非常棘手;若加大有机相促溶,又将导致胰蛋白酶的灭活。能否不经过滤,直接对胰蛋白酶水溶液中处于大颗粒悬浮溶液状态的εPA44进行胰蛋白酶消化来制作RP-HPLC肽图?本实验将通过液质联用技术(LC-MS)对该方法产生的εPA44胰蛋白酶消化液进行多肽片断质量解析[2],以验证及评价该方法的可行性,为乙肝治疗性多肽εPA44的胰蛋白酶RP-HPLC肽图质量研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

PE API 2000 LC-MS-MS质谱仪;PE SCIEX Analyst 1.1质谱分析软件;Client PAWS蛋白质分析软件(Proteometrics Inc.);SPD121型多肽处理仪;色谱柱:Waters SymmetryC18分析柱(粒度5μm,孔径100Å,柱直径3.9 mm,柱长150 mm)及保护柱(粒度5μm,孔径100Å,柱直径3.9 mm,柱长20 mm);乙腈(HPLC级CH_3CN,美国TEDIA公司);三氟乙酸(HPLC级TFA,美国TEDIA公司)。胰蛋白酶溶液(测序级,美国Promega公司)。0.1 mol碳酸氢氨溶液;50% 乙醇10 mmol/L磷酸溶液;超纯水(德国PureLab Plus超纯水仪制备)。

1.2 液相及质谱条件

流动相A:100% H_2O 0.1%TFA;流动相B:100% CH_3CN 0.1% TFA;线性梯度:0% B~90% B;梯度时间:45 min;流速:1 ml/min;柱温:25 ℃。质谱条件:色谱柱后1/10分流(即100μl)进入质谱仪,Q1正离子扫描,扫描质量范围:100~1 800 m/z;扫描时间:45 min。GAS1:40,GAS2:80,CUR:40,TEM:50 ℃,CAD:0,IS:5 000,NC:2,DP:30,FP:350,EP:−10,DF:0,CEM:1 800。

1.3 样品

反相制备的乙肝疫苗εPA44原液。

1.4 实验操作步骤

1.4.1 软件理论推导 将εPA44氨基酸序列输入Client PAWS软件并用软件的化学基团修饰模块完成其N末端K(Lysine residues)的棕榈酰(Palmitoyl)化修饰,然后再调用软件的酶切模块对εPA44进行理论上胰蛋白酶消化分析。

1.4.2 LC-MS对εPA44胰蛋白酶消化后多肽片断的实验验证过程 用5 ml试管取εPA44原液1 ml,于多肽处理仪上真空减压,将样品的溶剂抽干。用0.1 mol/L NH_4HCO_3 1 ml重悬εPA44,可观察到εPA44呈颗粒悬浮状,随后加入8μl胰蛋白酶溶液,然后混匀悬液,用封口膜密封试管口后置37 ℃摇床水浴过夜,控制胰蛋白酶消化时间在16 h左右。次日反应管中液体已变澄清,在反应管中加入10μl TFA终止消化。取样20μl消化液按以上液质设定的条件进行反相高效液相质谱(RP-HPLC-MS)分析。

2 结果

2.1 软件计算酶切片断结果

PAWS软件计算出εPA44分子量为4 946.76,通过软件的酶切模块对εPA44氨基酸序列酶切位点分析,计算出理论上εPA44经胰蛋白酶完全酶解后应产生6个多肽片断,见表1。

表1 理论推测的εPA44胰蛋白酶消化后肽片断

肽段编号	氨基酸数量	肽段质量
(1)	1	384.60
(2)	6	724.81
(3)	2	273.34
(4)	4	418.45
(5)	25	2 568.86
(6)	6	666.77

基金项目:国家科技部新药研发项目(1999);国家高技术计划生物技术领域青年基金资助项目("863"项目);重庆市科委产业化项目(2001)
作者简介:周 伟(1968-),男,重庆市人,实验师,主要从事多肽及蛋白质分析、纯化及鉴定方面的研究。电话:(023)68752236
通信作者:吴玉章,电话:(023)68752680
收稿日期:2002-05-10;修回日期:2002-07-03
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 LC-MS 实验验证结果

经质量解析后的 εPA44 胰蛋白酶消化液总离子流色谱图(TIC)，见图 1。从图 1 可以发现，有 4 段与理论上酶解后片段相吻合，即理论上的(3)[418.45]、(4)[2 568.86]、(5)[273.34]、(6)[666.77] 片断。实际质量图谱中没有发现片断(1)及片断(2)，但经仔细的片断间质量电荷比(m/z)分析能发现未酶解的片断(1)加片断(2)的质量片断。

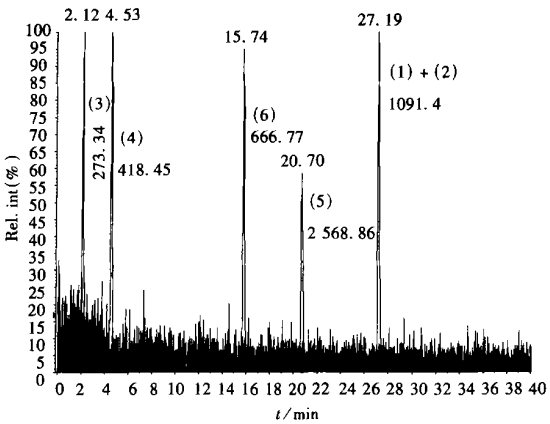


图 1　总离子流色谱图及其各峰理论归属

3　讨论

从图 1 可见，εPA44 胰蛋白酶消化后产生的(3)[418.45]、(4)[2 568.86]、(5)[273.34]、(6)[666.77] 片断 MS 分析结果与理论推导完全一致。对于导致胰蛋白酶没有对 εPA44 N 端的 K 进行切割的原因，经仔细分析 εPA44 的氨基酸序列，以及结合既往的研究后找到了答案。其中胰蛋白酶自身的 K 经类似的化学修饰后，能产生具有强的抗自我降解的新型高效胰蛋白酶的实验最具代表性[3]。εPA44 氨基酸序列 N 末端的 K 被棕榈酰化后，一方面导致其疏水性较大程度的增强，另外更重要的一方面是，因其 N 末端的 K 被棕榈酰修饰后其空间构象或表面电荷发生了改变，这种化学修饰显然增强了其抵抗胰蛋白酶酶解的能力，从而逃避了胰蛋白酶对其的降解。综上所述，因乙肝治疗性多肽 εPA44 具有很强的疏水性，使其胰蛋白酶消化肽图的制作很具挑战性，本实验通过恒温持续振荡，直接对处于大颗粒悬浮溶液状态的乙肝治疗性疏水肽 εPA44 进行胰蛋白酶消化，运用比 RP-HPLC 多肽色谱指纹图谱技术更具特异性的 LC-MS 多肽质量图谱解析技术，验证了使用该方法产生的 εPA44 的 RP-HPLC 胰蛋白酶肽特征图谱的可信度，同时消除了因 PAWS 蛋白质分析软件设计的缺陷而产生的误导，即忽视了经化学修饰后的 K 其抵抗胰蛋白酶酶解能力增强的现象，为乙肝治疗性多肽 εPA44 的 RP-HPLC 胰蛋白酶肽图谱的质量研究奠定了基础；整个 LC-MS 验证方法具普遍性，可运用于类似多肽药物的肽图谱可信度研究。

关键词：乙肝治疗性多肽；肽图；液质联用
中图法分类号：R345.16　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 饶春明，张　翊，韩春梅，等. 重组人白细胞介素-11 的胰蛋白酶切肽图分析[J]. 药学学报，2000，35(5)：378－380
[2] Eric C H，Jack D H. LC/MS and LC/MS/MS determination of protein tryptic digests[J]. J Am Soc Mass Spectr，1990(2)：158－165.
[3] Christian E，Sibylla G，Sebastian B，*et al*. Effects of chemical modification of lysine residues in trypsin[J]. J Mol Catal B-Enzym，2000(8)：193－200

（编辑　王　红）

文章编号：1000-5404(2002)10-1049-02

技术方法

体外培养的新生小牛冠状动脉内皮细胞释放 NO、ET-1 和 PGI_2 的实验研究

Experimental studies on the release of endothelin-1, nitric oxide and prostacyclin from cultured bovine coronary artery endothelial cells

廖卫公，许蜀闽，严　俊，万　强，谢增柱　（第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室、全军高原生理与高原病研究重点实验室，重庆 400038）

提　要：目的　建立新生小牛冠状动脉内皮细胞体外培养模型，并观测其对 NO、ET-1 和 PGI_2 的分泌。方法　采用机械分离方法，通过内皮细胞Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色和其在倒置相差显微镜下的形态进行鉴别。用放免法和比色法测定培养液中 ET-1、PGI_2、NO 浓度。结果　新生小牛冠状动脉内皮细胞在体外生长曲线呈“S”形，并能分泌 ET-1、PGI_2 和 NO。结论　新生小牛冠状动脉内皮细胞能够进行体外培养，并能分泌 ET-1、PGI_2 和 NO。

内皮细胞具有多种重要功能，它能分泌血管活性物质调节血管张力。冠状动脉内皮细胞在冠脉血流调节中有重要作用。大量在体研究表明冠状动脉内皮细

作者简介：廖卫公(1970－)，男，重庆市人，硕士，讲师，主要从事低氧与心血管方面的研究。电话：(023)68752339-8202
收稿日期：2001-05-18；修回日期：2002-02-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net