

# HPLC 分离 MALDI-TOF-MS 鉴定合成 多肽的研究\*

熊少祥 赵睿 余晓 赵莹欣 辛斌 王光辉 刘国诠

(北京质谱中心 中国科学院化学研究所分子科学中心 北京 100080)

固相肽合成技术是现代蛋白质化学的一项关键技术,对现代分子生物学和基因工程研究具有重大影响和意义<sup>[1]</sup>。组分单一的多肽可用于蛋白质结构、信号传递、药物作用、免疫反应等研究领域。但是,肽合成过程中往往由于各种因素的影响,难以得到纯度合格的多肽产品。因此,合成多肽的分离提纯和结构鉴定是当前多肽化学研究中不可缺少的部分。

我们建立了利用高效液相色谱(HPLC)除盐、分离、提纯、浓缩微量合成多肽,基质辅助激光解吸电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱分析鉴定的系统和方法。考察了不同基质、激光强度、延时引出时间和电压等因素对质谱分析结果的影响。具有目标肽质谱图易于识别,样品消耗量少,检测灵敏度高为显著优点。已用于近百个合成多肽样品的分析。

## 1 实验部分

合成多肽样品按通用的 Fmoc 固相肽合成方法<sup>[2]</sup>制备,使用前配制成合适浓度的样品溶液。

由岛津 LC-10ATVP 型输液泵、岛津 DGU-14A 型脱气机、岛津 SPD-10A 型紫外检测器、Rheodyne 7725I 进样阀、Phenomenex Nucleosil C18 色谱柱(250×4.6mm I.D.)、WDL-95 型色谱工作站构成 HPLC 分离系统。样品进样后,以 1.0 mL/min 的流速,0~30 分钟内,含 0.1% 三氟乙酸的 5% 乙腈水溶液至含 0.1% 三氟乙酸的 60% 乙腈水溶液线性梯度淋洗,UV220nm 检测的色谱条件,进行分离监测。色谱峰流出液收集于离心管,留待随后的质谱分析。

质谱所用仪器为 Bruker Daltonics 公司 BIFLEX III 型 MALDI-TOF 质谱仪,氮激光器,激光波长 337nm,采用延时引出(Delayed extraction)和反射(Reflection)的工作方式,加速电压 19.5 kV,反射电压 20 kV,延时引出电压 14.5~16.5 kV,延时时间为 50~200 ns,正离子检测。将色谱峰收集液与适量的基质溶液混合后,取约 1 微升溶液,滴加在样品靶上,待溶剂挥发,样品结晶后,送入质谱仪,进行质谱分析,累

\* 中国科学院九五重大项目资助课题

加 10~50 次单次扫描信号得到质谱图。

## 2 结果与讨论

图 1 所示为一合成多肽样品的 HPLC 分离色谱图。在所用的分离条件下，分离成两大三小共 5 个色谱峰。此 5 个色谱峰的具体成份通过 MALDI-TOF 质谱鉴定。含量高的色谱峰收集液可以直接与基质溶液混合，制样后测定。而含量低的色谱峰收集液则用氮气吹干液体后，取若干微升基质溶液将样品从容器壁上洗脱并制样分析。

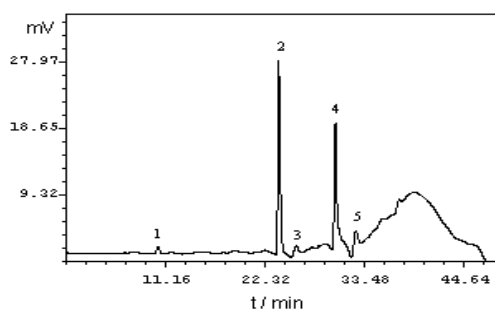


图 1 某合成多肽样品的高效液相色谱图

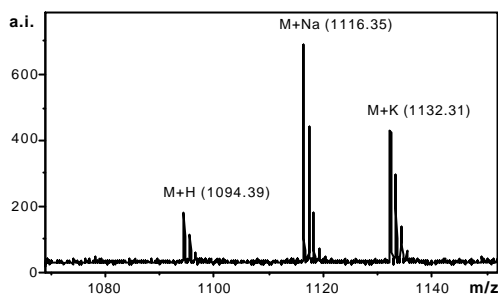


图 2 某分离提纯的合成多肽样品的 MALDI-TOF 图

MALDI-TOF 质谱条件优化实验结果表明：不同基质、检测模式、激光强度、延时引出时间和电压等仪器操作条件对所得质谱有很大的影响。在合适的实验条件下，可以得到分辨率高、同位素峰之间基线分离的多肽样品的质谱图。图 2 所示的质谱图，代表了合成多肽 MALDI-TOF 质谱的一般规律。对应于分子离子的  $M+H$ 、 $M+Na$ 、 $M+K$  峰会同时出现，利用三者之间特有的质量差值，可以非常方便地确定样品的分子量，验证合成的目标多肽正确与否。近百个样品的分析结果表明：本文所示的分离鉴定方法，对合成多肽的分离提纯和结构鉴定非常有效和实用。

## Studies on the Separation and Characterization of Synthetic Peptide Using HPLC and MALDI-TOF-MS

Xiong Shaoxiang, Zhao Rui, Yu Xiao, Zhao Yingxin, Xin Bin, Wang Guanghui, Liu Guoquan

(Beijing Mass Spectrometry Center, Center for Molecular Science, Institute of Chemistry,

Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080)

### Abstract

A method for the separation and characterization of synthetic peptide was established using high performance liquid chromatography and matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. The influences of several factors on its performance were carefully investigated. The method has been successfully used for the analyses of one hundred synthetic peptide samples.