

蛇毒液中透明质酸酶的电喷雾质谱测定

汪聪慧¹ Supason Pattannargson² 马龙华 John Roboz.

(Div.of Neoplastic Disease, Dept.of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York 10029,USA, ¹公安部物证鉴定中心 北京 100038, ²Dept.of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand)

透明质酸酶(hyaluronidase, hyalase)是活体组织和生物体液中一种普遍存在的酶。从不同来源制备的 hyalase 有不同的作用机理。在蛇毒液中它具有‘扩散因子’的作用,促进毒素扩散到患者的组织中,断裂结缔组织中的葡糖胺聚糖和强化毒素的局部出血作用。有关蛇毒液中 hyalase 分子量测定的情况很少有介绍。目前仅有五步蛇的 hyalase 分子量的报导^[1],使用凝胶色谱和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳方法测出约 33000Da, 和蜥蜴毒液的分子量为 63000Da 左右^[2]。

众所周知, ESI 方法测定生物大分子的分子量,其精度远远高于 SDS PAGE 或者 GPC 方法,前者的质量测定误差在 0.01~0.1%,而后者为 1~10%,即使用 MALDI-TOFMS 法也只能在 0.1%左右。显然,用 ESI 方法测定蛇毒液中 hyalase 具有很大的优势,本文首次报导这方面的结果。

由于没有已知分子量的 hyalase 供使用,我们从市售的来自 bovine testes 和 leeches 制备的 hyalase 作为分析的‘标准物’。表 1 罗列了分析结果,例如 bovine testes VIII 和 IS 分别为 15588Da 和 15583Da, 标准偏差为 2.5Da,用平均偏差表示测定的重复性为 0.013%。上述二个 hyalase 得到了 MALDI-TOFMS 的辅证,测定的数据分别为 15578Da 和 15576Da。同样, leeches 的 hyalase,其分子量约为 28500Da,这是制造商提供的,而 ESIMS 测定的数据 29035Da 应更为正确。

Table1 Molecular weights of “standards” and snake venoms

SAMPLE	MOLECULAR MASS (Da)		REPEATABILITY
	Found	Reference	
“Standard”			
Bovine testes, type VIII	15588	14000	15588±2.5, n=8
Bovine testes, type I-S	15583	14000	
Bovine testes, type VI-S	31770		
Leeches	29035	28500	
<u>Snake Venom</u>			
Black cobra	49377		49377±16.6, n=5
Thai cobra	60265		
Ringhals cobra	49722		

蛇毒液的粗产品用凝胶 HPLC 方法分离,用毛细管电泳技术测定 hyalase 的活性,由此收集所需的馏分,然后用毛细管 HPLC-ESIMS 实现分子量测定。在 black cobra 蛇毒液的凝胶 HPLC 图上,保留时间在 11~12 分钟之间的馏分,称以 NO.11,具有 hyalase 活性。该馏分的 HPLC-ESIMS 的 TIC 图上有二个峰,获得的 ESIMS 多电荷谱经转化

后,分别为 7114Da 和 49395Da 的分子量,前者是属于蛇毒液中存在的低肽物质。因为在有活性的 NO.11 馏分的前后,即 NO.10 和 NO.12 馏分并无活性;49KDa 的成分在它们中并未检测到,但 7KDa 成份均能找到,由此证实 49KDa 的成份为 hyalase 的分子量。49KDa 的成份来自于一个有裂分的峰,经过五次重复实验,得到分子量的平均值为 49377Da,测定的重复性为 0.028%。在 Thai cobra 蛇毒液的凝胶 HPLC 图上,保留时间在 10~11 分钟之间的馏分,标以 NO.10,同样具有 hyalase 的活性。经 HPLC-ESIMS 分析有三个峰。峰 1 (RT2.2 分钟)的分子量为 6706Da,峰 2 (RT2.8 分钟)的分子量为 6740Da,峰 3 (RT4.8 分钟)含有 60265Da 和 31233Da 二个组分。峰 3 在图中为主峰,峰 3 中 60KDa 的组分是主成分。在 C₄ 柱 HPLC-ESIMS 的 TIC 图上,峰 3 的跨度为 4.2~5.2 分钟,在 4.2'处仅有 31KDa 组分,在 5.1'处仅有 60KDa;在凝胶 HPLC 图上,在 NO.10 馏分后面的且没有活性的 NO.11 馏分中,并没有检出 60KDa 的组分,而仅检出 32KDa 的组分,由此证明,NO.10 馏分中峰 3 的 31KDa 的组分不应归属于 hyalase。Thai cobra 蛇毒液中 hyalase 的分子量应为 60Ka。与此同时,用 MALDI-TOFMS 获得 60868Da 的数据也得以辅证。在 ringhals cobra 蛇毒液中也同样获得 NO.11 馏分具有活性。它在 HPLC-ESIMS 图上获 49722Da 的峰,它代表该蛇毒液中 hyalase 的分子量。

ELECTROSPRAY MS OF HYALURONIDASE IN SNAKE VENOMS

T.H.WANG¹, Supason PATTANNARGSON², L.H.MA, John ROBOZ

(Div.of Neoplastic Disease, Dept.of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York 10029, USA,

¹Inst.of Forensic Science, Muxidi Nanli, Beijing 100038, China

²Dept.of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand)

Hyaluronidases (hyalases) from bovine testes and leeches were used as "standard". Constituents of crude snake venoms-hyalases were separated by size exclusion HPLC. Molecular masses of hyalases from snake venoms, determined by on-line capillary HPLC-mass spectrometry with electrospray ionization, were: Naja melanoleuca (black cobra) 49377Da, Naja Kaothia(Thai cobra)60265Da, Sepedon hemachatus (ringhals cobra) 49722Da. Mass determinations were repeatable within 0.03%.