

阿胶中特异性多肽的分离与液质联用分析

刘 涛, 张贵锋, 孟庆强, 马光辉, 苏志国*

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

Separation of the Unique Peptides from *Colla Corri Asini* and Sequence Determination with High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

LIU Tao, ZHANG Gui-feng, MENG Qing-qiang, MA Guang-hui, SU Zhi-guo*

(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: *Colla corri asini*, as traditional Chinese medicine “Ejiao”, is a kind of donkey-skin gelatin. The main components in *Colla corri asini* include proteins, peptides, polysaccharides and amino acids. In this study, the Ejiao solution was fractionated by fibronectin-sepharose affinity chromatography. After further demineralization and condensation by solid-phase extraction, some unique peptides were obtained. The peptides obtained were separated with high performance liquid chromatography and their sequences were determined with electrospray ionization mass spectrometry.

Key words: Ejiao; fibronectin; peptide; chromatography; mass spectra

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2006)增刊-181-02

阿胶(*Colla corri asini*)是我国的一种传统中药,是由驴皮经煎煮浓缩制成的固体胶,其主要成分为蛋白质和多肽类物质、多糖类物质及其它小分子物质。阿胶的主要功能包括补血、免疫功能调节、抗休克、促进淋巴细胞转化及改善钙代谢等,但作用机理并不十分明确。近年来,关于胶原蛋白及明胶中的活性多肽的相关研究逐步成为研究热点。阿胶中蛋白质和多肽类物质

含量占阿胶物质含量的 80% 以上,主要来自于驴皮胶原蛋白的降解。对阿胶中潜在的特异性多肽进行识别,有助于对阿胶中有效成分的识别,推动阿胶产品的深度开发及剂型改善。

纤维连接蛋白具有多方面的生理功能,如:参与细胞与细胞、细胞与基质之间的粘连,维持细胞正常形态,保持微血管完整性,形成利于细胞运动的暂时性基质,促进细胞分化,参与伤口

的愈合,阻止肿瘤细胞转移,提高网状内皮系统防御功能,调理单核巨噬细胞吞噬外来抗原,并能促进机体清除血中有害物质,包括免疫复合物、损伤的血小板、凝血产物、肿瘤细胞等,纤维连接蛋白在提高机体防病抗病中起到重要作用。为此,本研究利用亲和色谱法,从阿胶中分离得到了能与纤维连接蛋白结合的特异性多肽,并用液相色谱-质谱联用法对所得多肽进行了分析。

首先利用自制琼脂糖凝胶介质,制备了纤维连接蛋白琼脂糖凝胶亲和色谱柱。将 1 mg/mL 纤维连接蛋白溶液(缓冲体系:20 mM PBS,150 mM NaCl,pH 8.3)0.5 mL 加入 2.5 mL NaHCO₃ 缓冲液(0.1 M NaHCO₃,0.5 M NaCl,pH 8.3)中,与洗净的琼脂糖凝胶介质混合,在 4 ℃ 下震荡 12 h。取出,用 NaHCO₃ 缓冲液充分洗胶 3 次。将经过充分洗涤后的凝胶介质与甘氨酸缓冲液(0.2 M Tris-HCl,0.2 M Gly,pH 8.0)混合,于 4 ℃ 下振荡 2 h。取出,分别用 NaHCO₃ 缓冲液和乙酸缓冲液(0.1 M CH₃COOH,0.5 M NaCl,pH 4.0)交替洗胶三次,然后用 0.02 M 磷酸盐缓冲液(20 mM PBS,0.15 M NaCl,pH 7.3)平衡。将平衡后的凝胶介质装于 1.5 mL 色谱柱中。每次使用前分别使用 4 M 脲、纯水、0.02 M PB 冲洗色谱柱。

利用所制备亲和色谱柱,对阿胶中的特异性多肽进行了分离。将固体阿胶样品(山东东阿阿胶股份有限公司)用 NH₄HCO₃ 缓冲液(0.1 M NH₄HCO₃,0.1 mM CaCl₂,pH 8.0)配制为 1 mg/mL 溶液,采取循环上样的方式,上样量 10 mL,流速 0.2 mL/min,上样时间,180 min。上样完成后用 NH₄HCO₃ 缓冲液以 0.2 mL/min 流速平衡 30 min。平衡后采用洗脱缓冲液(8 M 脲,0.5 M Tris-HCl,pH 7.2)洗脱,收集前 25 min 洗脱液 5 mL。

采用 SPE 固相萃取柱对所收集的样品进行脱盐和富集。用 5% 乙腈,3% 三氟乙酸为流动相平衡柱,80% 乙腈洗脱,收集洗脱液 5 mL。所得样品在 60 ℃ 下抽真空干燥,将所收集样品重新溶解,进行液质联用分析。

采用反相高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱对所收集样品进行了分析。液相色谱条件:安捷伦 1100 色谱系统,Agilent zorbax SB-C₁₈ 色谱柱

(2.1×150 mm,5 μm 粒径);流动相 A:H₂O+3% TFA,流动相 B:ACN+3% TFA;梯度洗脱条件:0~20 min,10%~20% B,20~70 min,20%~80% B;流速 0.2 mL/min;进样量 50 μL。质谱条件:菲尼根 LCQ DECAXP 离子阱质谱,电喷雾离子源;喷雾电压为 3.5 kV,加热毛细管温度为 300 ℃,鞘气流速:1.05 L/min;辅助气流速:0.15 L/min;正离子方式检测,采用全扫描一级质谱检测,扫描范围 m/z 500~2 000,同时以 Data Depended Scan 模式进行精确质量数扫描和二级质谱扫描。

由液质联用分析所得到的数据,结合多肽的二级质谱的断裂规律分析,结果表明:利用纤维连接蛋白琼脂糖凝胶亲和色谱柱,从阿胶中分离出了能与纤维连接蛋白特异性结合的多肽,并由上述数据得到了多肽的肽段序列。该类多肽可能对与纤维连接蛋白相关的一系列疾病和生理功能具有潜在的治疗和调节功能,对此类肽段的药效研究及与此相关的阿胶产品的深度开发和剂型改善,还需开展进一步的实验。

参考文献:

- [1] Mitsuo Shimizu, Kazunobu Minakuchi, Mina Moon, et al. Difference in interaction of fibronectin with type I collagen and type IV collagen [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997,1339: 53-61.
- [2] Guifeng Zhang, Aimei Sun, Weijun Li, et al. Mass spectrometric analysis of enzymatic digestion of denatured collagen for identification of collagen type [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006 1114(2):274-277.
- [3] Xiaoyan Gao, Michael J. Groves. Fibronectin-binding peptides. I. Isolation and characterization of two unique fibronectin-binding peptides from gelatin [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998, 45: 275-284.
- [4] Arnaud A Bocquier, Jennifer R Potts, Andrew R Pickford, et al. Solution structure of a pair of modules from the gelatin-binding domain of fibronectin[J]. *Structure*, 1999, 7(12):1 451-1 460.
- [5] Hook Magnus, McGavin, Martin, et al. Fibronectin binding peptide [P]. *United Stated Patent*: 5440014, April. 28, 1994.