

文章编号 :1009 - 038X(2000)05 - 0484 - 04

## 碱性脂肪酶的高效液相色谱和质谱分析

邬敏辰<sup>1</sup>, 刘为平<sup>2</sup>, 许云敏<sup>2</sup>, 岳贵花<sup>3</sup>, 孙崇荣<sup>1</sup>, 黄伟达<sup>1</sup>

(1. 复旦大学生物化学系, 上海 200433; 2. 复旦大学遗传学研究所, 上海 200433; 3. 复旦大学化学系, 上海 200433)

**摘要:**以常压层析系统纯化的碱性脂肪酶为出发蛋白, 采用高效反相色谱对其进一步分离纯化, 达到 N 末端氨基酸测序及肽谱分析所需的纯度. 用电喷雾质谱测得脂肪酶的相对分子质量为  $27\,217 \pm 1$ . 对该脂肪酶的胰蛋白酶水解条件及肽段的相对分子质量等进行了研究.

**关键词:**碱性脂肪酶; 高效反相色谱; 电喷雾质谱; 紫外吸光系数

中图分类号: TQ925.6

文献标识码: A

### Study on the HPLC and ESIMS of an alkaline lipase

WU Min-chen<sup>1</sup>, LIU Wei-ping<sup>2</sup>, XU Yun-min<sup>2</sup>, YUE Gui-hua<sup>3</sup>,  
SUN Chong-rong<sup>1</sup>, HUANG Wei-da<sup>1</sup>

(1. Department of Biochemistry, Fudan University, Shanghai 200433; 2. Institute of genetics, Fudan University, Shanghai 200433; 3. Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433)

**Abstract:** In order to satisfy the needs of purity of the N-terminal amino acid sequence determination and peptide analysis, an alkaline lipase purified with low-pressure chromatography system was further purified by high pressure reversed phase chromatography. The molecular weight of the lipase was determined exactly to be  $27\,217 \pm 1$  by electrospray ionization mass spectrometry. The enzymatic hydrolysis condition of lipase, extinction coefficient and peptide weight were studied.

**Key words:** alkaline lipase; HPLC; ESIMS; extinction coefficient

到目前为止, 研究较多的产碱性脂肪酶菌主要为假单胞菌族<sup>[1~4]</sup>, 而有关霉菌碱性脂肪酶方面的报道则很少. 李江华等曾分离筛选到一株高产碱性脂肪酶产生菌——圆弧青霉 PG37<sup>[5]</sup>, 作者研究了该酶的发酵和提取等工艺条件<sup>[6,7]</sup>, 并对该菌所产脂肪酶进行了分离纯化及酶学性质研究<sup>[8]</sup>.

作者采用高效反相色谱和电喷雾质谱法对碱性脂肪酶的胰蛋白酶酶解肽谱和相对分子质量进

行了分析, 首次报道了该脂肪酶相对分子质量的测定结果和酶解肽谱的构建.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

乙腈 色谱级, Fluck 公司产品; 三氟乙酸 Merck 公司产品; 胰蛋白酶 比酶活 2 500 U/mg, Sigma 公司产品; 脂肪酶酶粉 常压层析系统纯化,

收稿日期: 1999-12-07; 修订日期: 2000-06-03.

基金项目: 国家“九五”科技攻关项目资助课题(96-C03-02-01).

作者简介: 邬敏辰(1962-), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 高级工程师.

作者所在实验室制备;丙烯酸胺和亚甲双丙烯酰胺, Sigma 公司产品;所用水为超纯水。

## 1.2 仪器

HP-1100 型液相色谱仪 Hewlett Packard 公司产品;API-165 型质谱仪 美国 PE 公司产品;UV-240 分光光度计 日本 Shimadzu 公司产品;C3 冷冻干燥机 美国 VirTis 公司产品;SX-300 快速成像仪 上海四星公司生产;pHS-2C 型精密酸度计 上海雷磁仪器厂生产。

## 1.3 方法

**1.3.1 高效反相色谱分离纯化** 采用 HP-1100 型高效液相色谱仪,反相 Zorbax 300SB-CN 柱,洗脱液 溶剂 A 0.1% TFA-H<sub>2</sub>O 溶剂 B 0.085% TFA-ACN 洗脱液流速:1.0 mL/min。

**1.3.2 电喷雾质谱测定相对分子质量** 采用 API-165 型质谱仪,样品进样速度 0.3 mL/h;ESI 电压:5 100 V;OR 电压 30 V。

**1.3.3 脂肪酶的胰蛋白酶水解** 胰蛋白酶具有选择性地水解多肽链的功能,它能断裂由赖氨酸或精氨酸的羧基参与形成的肽键,可以得到长度合适的肽段<sup>[9]</sup>。

**1.3.4 脂肪酶酶解图谱的构建** 将脂肪酶水解溶液上样于反相 Zorbax 300SB-CN 柱,在 214 nm 和 280 nm 波长下记录脂肪酶肽段的 HPLC 分离图谱。

**1.3.5 紫外吸收扫描** 采用 UV-240 分光光度计测定脂肪酶样品在 200~300 nm 之间的紫外光吸收曲线及 OD<sub>280</sub> 值。

**1.3.6 蛋白质含量测定** 采用 Lowry 法<sup>[10]</sup>进行测定,以牛血清白蛋白作标准。

**1.3.7 聚丙烯酰胺电泳** SDS-PAGE 采用不连续垂直板状电泳系统进行<sup>[11]</sup>,分离胶质量浓度为 15 g/dL。

## 2 结果与讨论

### 2.1 碱性脂肪酶的 HPLC 分离纯化

将待纯化的脂肪酶冷冻干粉配成浓度为 15 mg/mL 的溶液,采用高效反相色谱进行分离纯化。反相色谱采用 Hewlett Packard 公司的 Zorbax 300SB-CN 柱进行,样品上样量 30  $\mu$ L,洗脱条件为:先用溶剂 A 洗涤 5 min,然后采用 0~55% 溶剂 B 进行梯度洗脱 60 min,洗脱液流速 1.0 mL/min。在 280 nm 处检测样品组分的紫外光吸收值并收集洗脱液,分离结果如图 1 所示。

由图 1 可见,HPLC 分离图谱在 45.8 min 处出现一个杂蛋白吸收峰,在 56.7 min 处出现 2 个紧靠

在一起的酶蛋白吸收峰。聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果与文献报道结果<sup>[12]</sup>的比较显示,2 个峰内的组分为脂肪酶同工酶 lipase I 和 lipase II,其中 lipase I 为主成分,集中在后一个峰内,表明 lipase I 和 lipase II 的疏水性很接近,但前者略强于后者。电喷雾质谱分析进一步证实了凝胶电泳的检测结果以及脂肪酶同工酶在 HPLC 上不能完全分离的原因。

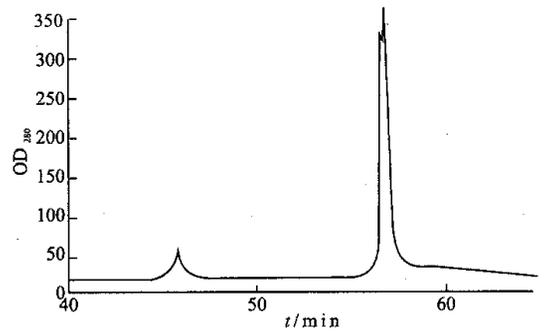
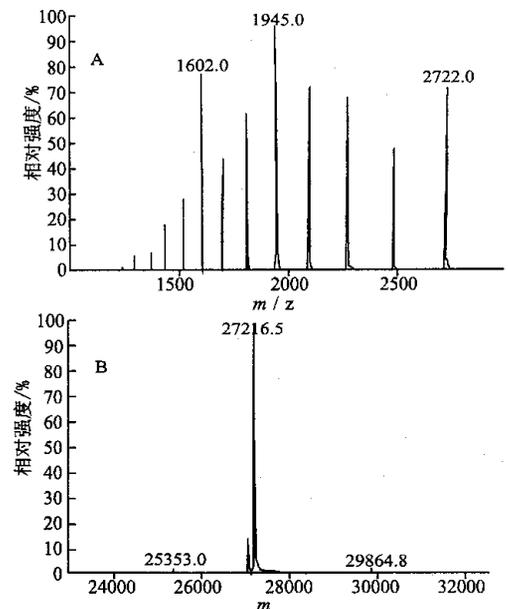


图 1 碱性脂肪酶纯化的高效反相色谱图

Fig.1 HPLC profile of the purification of lipase

### 2.2 酶蛋白的相对分子质量测定

将 HPLC 图谱中出峰时间在 56.7 min 处的收集液直接在电喷雾质谱仪上进行酶蛋白相对分子质量的测定,结果如图 2 所示。



(A) 脂肪酶多电荷谱图 (B) 脂肪酶质量谱图

图 2 碱性脂肪酶的电喷雾质谱分析

Fig.2 ESIMS analysis of an alkaline lipase

图 2(A)为脂肪酶的多电荷谱图(或称质荷比图),图 2(B)为脂肪酶的质量谱图,是由多电荷谱图重组而来,从图 2(B)可得到 Lipase I 的相对分子质

量为 27 216.5 ,同时,还得到一相邻相对分子质量为 27 103.7 的小峰,即 Lipase II.电喷雾质谱分析证实了该样品中 Lipase I 和 Lipase II 二种蛋白相对分子质量仅相差一个氨基酸,加上它们的疏水性相差无几,所以就连分离效果极高的 HPLC 也很难将两者完全分开.文献[8]曾报道采用 SDS-PAGE 测定了脂肪酶同工酶的相对分子质量均为 27 500,其原因是受测定方法精确度的限制,无法将 Lipase I 和 Lipase II 的相对分子质量的微小差别显示出来.

### 2.3 脂肪酶胰蛋白酶酶解肽谱分析

**2.3.1 胰蛋白酶酶解条件的确定** 取2个 1.5 mL 的离心管,分别加入 10  $\mu$ L 脂肪酶溶液(15 mg/mL),3  $\mu$ L 反应缓冲液和 3  $\mu$ L 胰蛋白酶溶液(1.0 mg/mL),用水补足 30  $\mu$ L 反应体积,其中1个离心管内含有 3 mol/L 尿素.将该酶解体系置于 25  $^{\circ}$ C 恒温箱内,在 2、4、6 h 分别从 2 个离心管中各取出 10  $\mu$ L,用 SDS-PAGE 检测蛋白质的水解情况,结果发现酶水解时间对蛋白水解程度的影响不大,而添加尿素的蛋白水解率远大于不加尿素的.比较同一水解时间下添加和不添加尿素的 HPLC 分离图谱后发现,肽段总的吸收峰面积相差不大,但前者的出峰数明显多于后者,而且峰的分离效果也较好.用蛋白酶(例如胰蛋白酶)水解蛋白质,在反应系统中添加 2~4 mol/L 尿素,可使蛋白质发生变性,多肽链松散而成无规则的构象,这样蛋白酶才能作用于原来处在分子内部的肽键,较彻底地水解蛋白质[9].

**2.3.2 碱性脂肪酶肽谱的构建** 采用胰蛋白酶部分水解(断裂由赖氨酸或精氨酸的羧基参与形成的肽键)脂肪酶蛋白质,得到不同长度的肽段.水解条件:20  $\mu$ L 脂肪酶溶液,4  $\mu$ L 反应缓冲液,7.2 mg 尿素和 0.6  $\mu$ L 胰蛋白酶溶液(10 mg/mL),用水补足 40  $\mu$ L 反应体积,在 25  $^{\circ}$ C 反应 4 h.水解结束后,取 30  $\mu$ L 反应液构建脂肪酶的酶解肽谱,结果如图 3 所示.

作者研究了多种蛋白质的胰蛋白酶酶解肽谱,结果发现,在蛋白质水解酶以及水解和分离条件确定的情况下,各种特定的蛋白质有其特定的肽谱.因此,蛋白质酶解肽谱的构建有助于未知蛋白质的确定.同时,可利用已知的多肽链来研究和发现新的蛋白水解酶[13].

比较不同波长(214 nm 和 280 nm)处的 HPLC 谱图,作者还发现检测到的峰数明显多于前者.例如在 214 nm 检测波长下,洗脱时间在 22.850,

24.830,25.311,44.791 min 处出现吸收峰,在 280 nm 却没有吸收峰,说明这几个峰所代表的肽段不含有在 280 nm 处有紫外吸收的氨基酸(包括酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸).

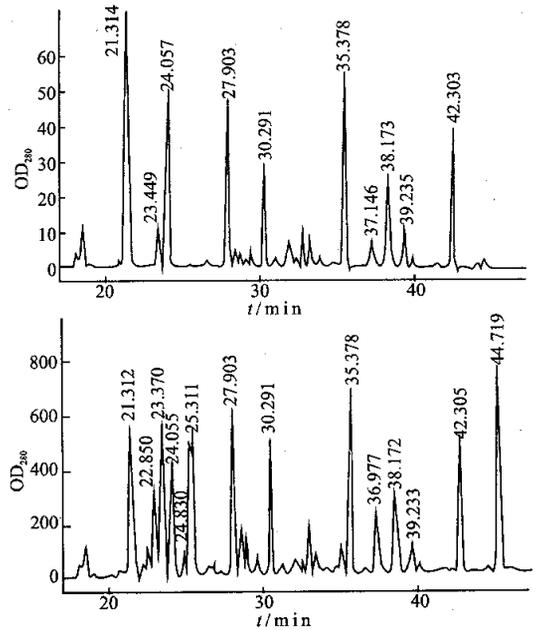


图3 碱性脂肪酶的 HPLC 肽谱(214 nm 和 280 nm)

Fig.3 Peptide mapping of alkaline lipase at 214 nm and 280 nm

**2.3.3 脂肪酶酶解肽段的相对分子质量测定** 收集了脂肪酶酶解液 HPLC 分离吸收峰处的洗脱液,用电喷雾质谱测定了其中具有代表性肽段的相对分子质量,结果见表 1.

表 1 脂肪酶胰蛋白酶水解肽段的相对分子质量

Tab.1 Molecular weight of peptides of lipase hydrolyzed with trypsin

编号	出峰时间/min	峰高度/mAU	相对分子质量
1	21.312	545.97	750.08
2	27.903	608.75	1264.0
3	30.291	504.29	1391.8
4	35.378	681.29	1575.8
5	44.719	914.42	3265.8

### 2.4 脂肪酶紫外光吸收特性

蛋白质在紫外区的吸收光谱,特别是 210~230 nm 区肽键的紫外吸收和 260~280 nm 区芳香族氨基酸的紫外吸收,给蛋白质研究提供了重要的资料.将 50  $\mu$ L 脂肪酶溶液(15 mg/mL)稀释至 1 mL,测定稀释液在 200~300 nm 的扫描曲线(见图 4),由 OD<sub>280</sub> 值计算得到脂肪酶的吸光系数为 8.03.

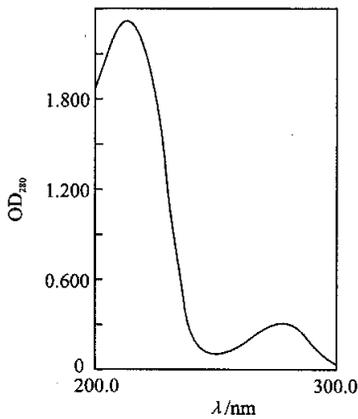


图4 碱性脂肪酶的紫外吸收光谱

Fig. 4 Ultraviolet extinction spectrum of an alkaline lipase

### 3 结论

1) 采用高效反相色谱对常压层析系统纯化的碱性脂肪酶进行了进一步的分离纯化, 结合电喷雾质谱分析, 研究了脂肪酶 2 个同工酶之间包括相对分子质量和疏水性在内的细微差别。

2) 首次测定了圆弧青霉 PG37 碱性脂肪酶 2 个同工酶的准确相对分子质量, 并推测它们之间相差一个氨基酸(亮氨酸或异亮氨酸)。由于 Lipase I 比 Lipase II 多一个疏水性的氨基酸, 所以前者的疏水性略强于后者, HPLC 和 ESIMS 分析结果基本一致。

3) 在确定了脂肪酶酶解条件后, 构建了其肽谱, 对该肽谱进行了分析, 并测定其中 5 个水解肽段的相对分子质量。

### 参考文献

- [1] LIN SF, CHIOU C M, TSAI Y C. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-11[J]. *Appl Environ Micro*, 1996, 62: 1093 ~ 1095.
- [2] YUZO K, MASAAKI Y, TAMIO M. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK 102[J]. *Biosic Biotech Biochem*, 1994, 58: 1564 ~ 1568.
- [3] STUER W, JAEGER K E, WINKLER U K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Bacteriol*, 1986, 168: 1070 ~ 1074.
- [4] GIBERT E J, CORNISH A, JONES C W. Purification properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2[J]. *J Gen Micro*, 1991, 137: 2223 ~ 2229.
- [5] 李江华, 邬敏辰, 陶文沂. 用筛选抗性突变株法选育碱性脂肪酶的高产菌[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(3): 7 ~ 11.
- [6] 邬敏辰, 李江华. 圆弧青霉 PG37 碱性脂肪酶的研究[J]. 江苏食品与发酵, 1997, 4: 2 ~ 7.
- [7] 邬敏辰, 张晓东. 碱性脂肪酶提取的探讨[J]. 江苏食品与发酵, 1995, 4: 4 ~ 8.
- [8] 邬敏辰, 王曙, 黄伟达. 圆弧青霉碱性脂肪酶的分离纯化和特性[J]. 生物化学和生物物理学报, 1999, 31(6): 664 ~ 668.
- [9] 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [10] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265 ~ 275.
- [11] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227: 680 ~ 685.
- [12] 邬敏辰. 脂肪酶凝胶电泳活性条带印迹技术[J]. 江苏食品与发酵, 1999, 3: 18 ~ 23.
- [13] 李民, 沈国祥, 陈长庆. 重组点状产气单胞菌脯氨酰内肽酶的性质[J]. 生物化学和生物物理学报, 1999, 31(6): 685 ~ 688.

(责任编辑 朱 明)