

## 抗性家蚕血液中与 BmNPV 抗性相关铜化合物的分离方法研究

李龙<sup>1,2</sup>, 孙慧<sup>1,2</sup>, 刘泽玉<sup>1,2</sup>, 徐安英<sup>2</sup>, 钱荷英<sup>2</sup>, 武国华<sup>1,2\*</sup>

(1. 江苏科技大学蚕业研究所, 江苏镇江 212018; 2. 农业部蚕桑产品及食用昆虫质量安全风险评估实验室, 江苏镇江 212018)

**摘要** [目的]探究家蚕血淋巴中与 BmNPV 抗性相关铜化合物的分离方法。[方法]选取对 BmNPV 具有抗性的家蚕品种和非抗性品种为研究对象, 对它们进行添食 BmNPV 病毒处理。提取家蚕的血淋巴, 运用 SEC-ICP-MS 对 2 组样品中 Cu 化合物进行分离和检测。[结果]筛选出优化的体积排阻色谱分离条件: YarraTM SEC-2000 分离柱, 30 mmol/L Tris-醋酸为流动相 (pH 7.4), 流速 0.5 mL/min。建立了分离与检测家蚕血液中 Cu 化合物的 SEC-ICP-MS 联用技术。BmNPV 抗性和非抗性家蚕血液中 Cu 化合物主要的差异是位于 7.6 min 的组分。[结论]制备了葡聚糖 G100 凝胶柱分离并收集可能与 BmNPV 抗性相关的家蚕血液分离液, 为家蚕金属蛋白的分离提供更简便有效的方法。

**关键词** 家蚕; BmNPV; 抗性; 体积排阻色谱; 电感耦合等离子体质谱

**中图分类号** S881.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)20-0111-06

Study on the Separation Methods of Copper Compounds Related to BmNPV Resistance in Hemolymph of *Bombyx mori*

LI Long<sup>1,2</sup>, SUN Hui<sup>1,2</sup>, LIU Ze-yu<sup>1,2</sup>, WU Guo-hua<sup>1,2\*</sup> et al (1. Sericultural Research Institute, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018; 2. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Sericultural Products and Edible Insects, Ministry of Agriculture, Zhenjiang, Jiangsu 212018)

**Abstract** [Objective] To study the separation methods of copper compounds related to BmNPV resistance in hemolymph of *Bombyx mori*. [Method] *B. mori* cultivars with and without BmNPV resistance were selected as research objects to feed BmNPV virus. Cu compounds was extracting and determined from hemolymph of two groups *B. mori* by SEC-ICP-MS. [Result] The optimal separation conditions for size exclusion chromatography were as follows: YarraTM SEC-2000, 30 mmol/L Tris-acetic acid (pH 7.4) as mobile phase, flow rate of 0.5 mL/min. SEC-ICP-MS technology for separating and detecting copper compounds in hemolymph of *B. mori* was established. The main differences of copper compounds between resistant cultivars of *B. mori* and non-resistant cultivars of *B. mori* was the compounds with the retention time of 7.6 min. [Conclusion] The separation liquid of hemolymph of *Bombyx mori* might be related with BmNPV resistance separated and collected by glucan G100 gel column was prepared. The research can provide simpler and more effective methods for the separation of metal proteins in *B. mori*.

**Key words** *Bombyx mori*; BmNPV; Resistance; Size exclusion chromatography; ICP-MS

蚕丝产业在我国已有 5 000 多年的历史, 长久以来为中华民族文化、经济和社会发展做出了重大贡献<sup>[1]</sup>。然而, 每年因蚕病感染造成的损失占蚕业生产总收入的 20% 左右<sup>[2]</sup>, 其中因为家蚕核型多角体病毒 (BmNPV) 感染带来的家蚕核型多角体病毒病在家蚕的生长中非常常见, 对蚕业生产的危害极大, 大约占蚕病给蚕业造成经济损失的 70%<sup>[3]</sup>。在过去的几十年, 对 BmNPV 的研究主要集中在鉴定、分类<sup>[4]</sup>、感染途径<sup>[5]</sup>、生物反应器<sup>[6]</sup>和杀虫剂<sup>[7]</sup>的研究, 在家蚕抗病毒感染机制方面的研究甚少。徐安英等<sup>[8]</sup>利用从家蚕种质资源中筛选出的具有抗 BmNPV 病的显性基因, 采用杂交、回交及系统选育的方法, 培育出适应不同季节、蚕区的抗 BmNPV 品种, 即华康 1 号、华康 2 号。科学家们在筛选出抗 BmNPV 家蚕品种的同时, 也深入研究了家蚕对 BmNPV 抗性的分子机制。2013 年, Feng 等<sup>[9]</sup>筛选出对 BmNPV 抗性家蚕 NB 品种, 并对其遗传规律进行了重新分析, 结果发现抗性表现出单基因控制的遗传规律, 认为这些规律可能是由于抗性品种的不断筛选, 使得家蚕的主效基因被强化, 微效基因的作用则愈

加不明显。

迄今为止, 科学家们获得许多与家蚕对 BmNPV 抗性有关的分子标记信息, 但目前还不能利用分子标记和图位克隆的方法定位抗性基因, 因此, 人们考虑从不同的组学研究方法入手进行相关机理的探索, 尤其是蛋白质组学。关于家蚕抗 NPV 蛋白质组水平研究还处于起步阶段, 目前各研究小组通过多种高通量组学方法获得了一些家蚕抗 BmNPV 的差异表达基因和蛋白质, 这些不同方法获得的数据可以相互验证、相互补充。例如, 无论是在蛋白水平还是在 mRNA 水平, 感性品系中的家蚕胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶 (Trypsin-like serine protease)、家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 5 (Bmserpine-5) 和家蚕胰凝乳蛋白酶抑制剂 CI-8A (Chymotrypsin inhibitor CI-8A) 在添毒后没有明显变化。但是, 这些酶在抗性家蚕中肠和脂肪体中的表达显著上调, 表明与这些因子相关的酚氧化酶级联途径在家蚕抗 BmNPV 的过程中确实起到一定的作用<sup>[10-12]</sup>。

金属组学是蛋白质组学的重要组成部分, 生物体内约 1/3 的蛋白质与微量元素 (主要是金属元素) 结合形成金属蛋白或金属酶<sup>[13]</sup>。这些金属元素的存在对于蛋白结构的稳定和功能的发挥是必不可少的。体内微量元素水平的反常、存在形态的变化以及特定的金属酶、金属蛋白的表达、定位、结构、功能等的变化常常与某些病理状态相关, 甚至是关键的病理环节。金属蛋白在结构维持、金属离子存储和转运、电子传递、分子识别与催化、基因表达调控、信号转导、氧化应激等方面都发挥着非常重要的作用<sup>[14]</sup>。目前, 对家蚕金属

**基金项目** 江苏特聘教授项目 (苏教师 [2015] 17); 2017 年农业部农产品风险评估项目; “十二五”现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-18)。

**作者简介** 李龙 (1960—), 男, 四川成都人, 研究员, 从事蚕业科学研究。\* 通讯作者, 研究员, 从事现代分析仪器在生物领域中的应用研究。

**收稿日期** 2017-04-26

蛋白的研究报道较少,已有的报道主要涉及金属酶和一些金属蛋白的分离纯化及部分性质的研究。目前,已经鉴定出的家蚕金属蛋白酶包括过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)以及过氧化物酶(POD)<sup>[15-17]</sup>。研究表明,某些金属元素会影响家蚕体内其他酶[如碱性磷酸酶(AKP)和家蚕丙氨酸转氨酶(ALT)等]的活性作用<sup>[18-19]</sup>,但是由于分离与纯化技术的限制,这些金属蛋白酶的作用机制尚不明确。

为了探明各金属蛋白在不同生化过程中的作用机理和在生物体的不同生物功能,研究这些金属蛋白的结构、含量及其在生物组织中的分布与变化规律往往是十分必要的,而金属蛋白的提取和分离又是实现准确的金属蛋白结构预测和定量分析的前提<sup>[20]</sup>。常用的蛋白分离技术包括高效液相色谱(HPLC)、毛细管电泳(CE)和电泳等技术。其中,高效液相色谱用于分离金属蛋白时,对金属与蛋白的结合影响较小,保证了金属蛋白在分离过程中的完整性。Yang等<sup>[21]</sup>建立了体积排阻色谱-电感耦合等离子体质谱法,同时测定了印度芥菜中镉、铜、锌形态分析方法,并检测到3种金属的4种结合肽形态。赵艳芳等<sup>[22]</sup>运用体积排阻色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术分析高镉累积扇贝中镉与蛋白质或肽的结合形态,共检测到3种镉形态:金属硫蛋白(MT)-Cd、谷胱甘肽(GSH)-Cd、半胱氨酸(Cys)-Cd。为了满足复杂生物样品的分离,目前还发展了多维HPLC技术。多维HPLC是利用2种或2种以上的分离机理不同的模式对复杂样品进行分离的一种技术,它是将由第1种分离模式分离的全部或部分组分转入到另1种或几种不同类型的分离模式中进行进一步分离,从而大大提高了整个系统的分离效果和峰容量<sup>[23-24]</sup>。Barnett等<sup>[25]</sup>利用离线的二维SEC/SAX(阴离子交换色谱)模式分离蓝藻体内金属蛋白,并与用凝胶电泳法分离的金属蛋白进行了对比,结果发现二维SEC/SAX分离后质谱得到了更多的预期和非预期金属结合蛋白,同时展现出色谱方法分离金属蛋白的优势,即不需标记、可保持蛋白活性以及分离速度快等。

Cu是许多酶中的必需元素,Cu与有机配体形成的配合物不仅具有氧化、还原、催化、超分子化合物结构控制等重要作用,而且具有抗菌、抗癌、抗病毒等生物活性<sup>[26]</sup>。家蚕体内血淋巴中的Cu元素含量在0.5 μg/mL左右,中肠和脂肪体中含量更高<sup>[27]</sup>。因此,笔者尝试从Cu金属化合物层面,分析家蚕抗性与某些Cu金属化合物的潜在联系,为研究家蚕对BmNPV的抗性机制提供线索。笔者选取对BmNPV具有抗性的家蚕品种和非抗性品种为研究对象,对其进行添食BmNPV病毒处理,提取供试家蚕的血淋巴,用SEC-ICP-MS联用技术对2组样品中Cu金属化合物进行分离和检测,同时考察了体积排阻色谱流动相的组成、色谱柱填料和流速等对家蚕血淋巴中铜化合物分离效果的影响,筛选出优化的分离条件。另外,建立了HPLC结合葡聚糖凝胶柱的方法,分离出可能与家蚕抗BmNPV相关的Cu化合物组分,旨在为今后这些可能与抗性相关Cu化合物的鉴定提供更加有效的分离方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料、仪器与试剂

**1.1.1 供试材料。**家蚕品种和白玉N由中国农业科学院蚕业研究所保存,白玉N为抗病品种,白玉为其非抗性非抗性品种,抗性品种的遗传背景与非抗性品种的相似度为99.9%;BmNPV由中国农业科学院蚕业研究所病理组提供,浓度为 $1.0 \times 10^9$ 多角体/mL。

**1.1.2 仪器。**e2695高效液相色谱仪,为美国Waters公司产品;TSK-GEL G3000SWxL色谱柱,为日本TOSOH公司产品;Yarra™ SEC-2000色谱柱,为美国菲罗门公司产品;ICP-MS X Series 2型电感耦合等离子体质谱仪,为美国Thermo Fisher公司产品;MilliQ超纯水仪,为法国Millipore公司产品;MS303S分析天平,为瑞士Mettler Toledo仪器有限公司产品;Allegra X-22R多功能高速离心机,为美国Beckman Coulter公司产品;EL20 PH计,为瑞士Mettler Toledo仪器有限公司产品;Waters Fraction Collector,为美国Waters公司产品。

**1.1.3 试剂。**Tris、醋酸、盐酸、醋酸铵,均为分析纯;甲醇为色谱纯;葡聚糖G100购自上海阿拉丁试剂有限公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 样品制备及前处理。**将饲养至5龄的抗性和非抗性家蚕分别分成2组:1组在5龄第1天接种BmNPV病毒(10 μL/头)(将病毒涂抹在叶子上,稍微晾干,喂食家蚕);另1组为对照组。供试家蚕被分为4组:抗性对照组、抗性染毒组、非抗性品种对照组、非抗性染毒组。添食病毒后4组家蚕喂食无病毒桑叶饲养至5龄第5天,剪破第二腹足取每组家蚕血液,于4℃下10 000 r/min离心20 min,取上清液,置于-80℃冰箱中保存,备用。使用前解冻,并用0.22 μm滤膜过滤。

**1.2.2 SEC-ICP-MS法检测家蚕血液中Cu金属化合物的差异。**

**1.2.2.1 体积排阻-高效液相色谱条件的选择。**为了使家蚕血淋巴中Cu金属化合物得到更好的分离效果,选取3种流动相、2种色谱柱和4种流速进行比较,筛选出良好的色谱分离条件。3种流动相分别为A(30 mmol/L醋酸铵缓冲液,pH 7.4)、B(30 mmol/L Tris-HCl缓冲液,pH 7.4)、C(30 mmol/L Tris-醋酸缓冲液,pH 7.4)。2种不同填料的色谱柱:TSK-GEL G3000SWx(300 mm×7.8 mm,5 μm)和Yarra™ SEC-2000(300 mm×7.8 mm,3 μm)。流速分别为0.4、0.5、0.6、0.7和0.8 mL/min。使用紫外检测器,检测波长280 nm,柱温25℃,进样量50 μL。

**1.2.2.2 SEC-ICP-MS分离检测家蚕血液中的Cu金属化合物。**配制10 mg/L Li、Co、In、U多元素混合质谱调谐液调节ICP-MS的灵敏度,用PEEK管将HPLC与ICP-MS的雾化器连接起来,组成SEC-ICP-MS联用系统。4组家蚕血液过0.22 μm滤膜,注入SEC-ICP-MS联用系统,将ICP-MS作为检测器,在线监测家蚕血液中Cu金属化合物。HPLC的流动相为30 mmol/L Tris-醋酸缓冲液(pH 7.4),Yarra™ SEC-2000色谱柱,流速0.7 mL/min,柱温25℃,进

样量 50  $\mu\text{L}$ 。ICP-MS 的工作条件如表 1 所示。

表 1 电感耦合等离子体质谱工作条件

Table 1 Operating parameters of ICP-MS

参数 Parameters	设定值 Set value	参数 Parameters	设定值 Set value
提取透镜电压//V	-125.0	模拟电压//V	1 830.0
Lens 1 电压//V	-1 120.0	检测器电压//V	3 373.0
Lens 2 电压//V	-81.6	Lens 3 电压//V	-189.0
聚焦电压//V	12.2	正向功率//W	1 040.0
四级杆偏转电压//V	-4.0	冷却气流量//L/min	13.0
六级杆偏转电压//V	-3.2	辅助气流量//L/min	0.8
雾化器流量//L/min	1.0		

### 1.2.3 特定馏分的 Cu 金属化合物的收集方法的选择。

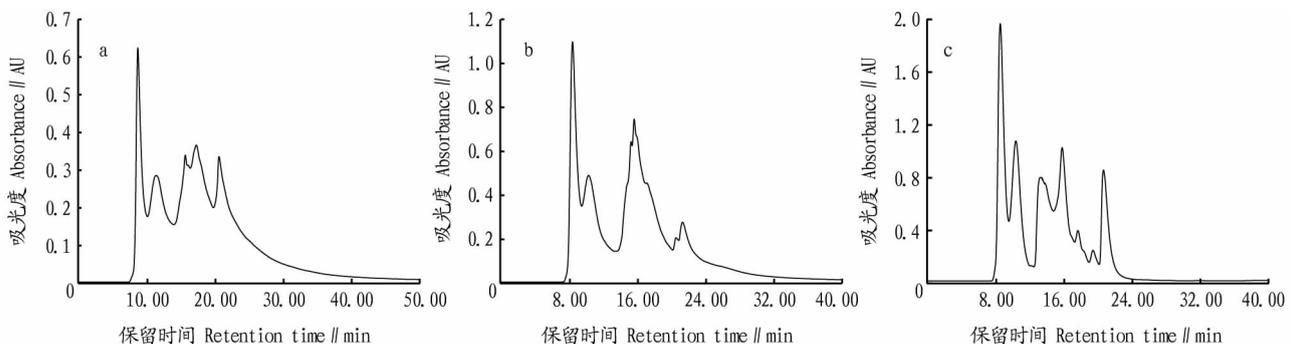
**1.2.3.1** SEC-HPLC 结合馏分收集器手动收集 7.6 min 馏分。以 30 mmol/L Tris-醋酸缓冲液 (pH 7.4) 为流动相,用 Yarra<sup>TM</sup> SEC-2000 色谱柱与馏分收集器,以 0.7 mL/min 流速,在 waters 高效液相色谱仪上对家蚕血液进行 SEC 分离,检测波长 280 nm,柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量 50  $\mu\text{L}$ 。馏分收集器手动收集 7.6 min 谱峰馏分,收集的馏分再次以相同的 SEC 条件进行色谱分离。

**1.2.3.2** 葡聚糖 G100 凝胶柱分离收集目标 Cu 金属化合物馏分。称取 5 g 葡聚糖 G100 用 200 mL 纯水浸泡 24 h,倒去上层水,制成凝胶备用。用凝胶等体积的 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液浸泡凝胶 3 h,加水后轻轻搅拌,静置 5 min 后倒掉上层水及未沉淀的细颗粒,如此反复 3~5 次,然后将凝胶沿着搅拌棒逐次缓慢的加入柱中。组装完成后,将血液样品缓慢加入到层析柱中,同时利用泵以固定流速加入洗脱液 (30 mmol/L 的 Tris-盐酸,流速 1.0 mL/min),每分钟收取 1 次分离液。收取的分离液以 30 mmol/L Tris-醋酸缓冲液

(pH 7.4) 为流动相,用 Yarra<sup>TM</sup> SEC-2000 色谱柱,以 0.7 mL/min 流速,检测波长 280 nm,柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量 50  $\mu\text{L}$ ,在 waters 高效液相色谱仪上对家蚕血液进行 SEC 分离,检测收集的组分的出峰时间和峰高。

## 2 结果与分析

**2.1 体积排阻-高效液相色谱条件的选择** 目前,家蚕血液蛋白质组学已取得很大的研究进展,但由于蛋白分离技术的限制,仍有很大的研究探索空间。目前蛋白质分离的传统主流技术是双向凝胶电泳技术,但是其具有重复性差、灵敏度低等缺点,而逐步发展的液相色谱等新型分离技术有补充和取代双向凝胶电泳的趋势。体积排阻色谱 (SEC) 分离蛋白质回收率高,不会造成蛋白的损失,是最常用的初步筛选未知样品中化合物的方法<sup>[28]</sup>。影响体积排阻色谱法分离效果的因素有很多,包括色谱柱填料、流动相、pH、流速等。金属与生物大分子生成的络合物和金属离子之间的平衡与溶液的 pH 密切相关,在分析体液时,常用相当于生理状态的缓冲液 (pH 7.4)<sup>[29]</sup>,因此,该试验选用分离家蚕血液的体积排阻色谱流动相的 pH 为 7.4。同时,考察了不同的色谱柱、流动相以及流速对分离效果的影响。SEC 所用的流动相一般为水相,以防止金属蛋白被破坏或蛋白变性。最常用的分离体液的缓冲液是 10~50 mmol/L Tris-HCl 和 Tris-醋酸,也有少数文献使用 Tris-醋酸铵。因此,比较了这 3 种缓冲液 (30 mmol/L, pH 7.4) 的对抗性对照组家蚕血淋巴的分离效果。从图 1 可以看出,3 种流动相均可以对对照组家蚕血淋巴成分进行分离,但通过比较三者的峰型、峰的数量发现,流动相 30 mmol/L Tris-醋酸缓冲液、pH 7.4 对家蚕血淋巴蛋白组分的分离效果较好 (图 1c),因此选取 30 mmol/L Tris-醋酸缓冲液、pH 7.4 作为家蚕血淋巴金属化合物分离的流动相。



注:a. Tris-醋酸铵;b. Tris-HCl;c. Tris-醋酸

Note: a. Tris-ammonium acetate; b. Tris-hydrochloric acid; c. Tris-acetic acid

图 1 3 种流动相的家蚕血淋巴 SEC-HPLC 分离色谱图

Fig. 1 SEC-HPLC chromatograms with three kinds of mobile phase for blood hemolymph of silkworm

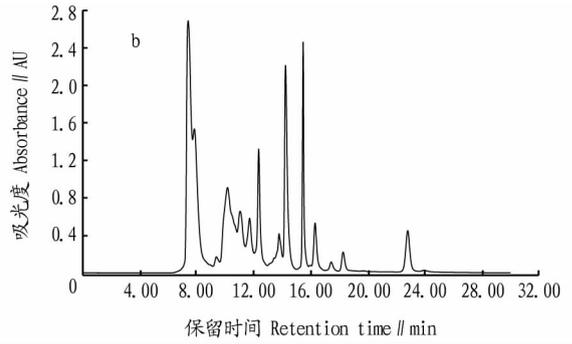
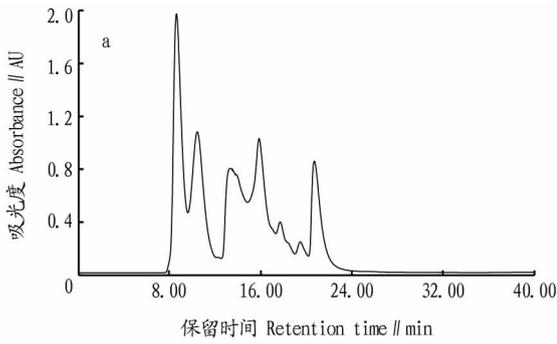
缓冲液的洗脱流速也是影响分离效果的重要因素。考察了流速分别为 0.4、0.5、0.6、0.7 和 0.8 mL/min 时对抗性对照组家蚕血液分离的影响。结果表明,当流速为 0.7 mL/min 时样品在色谱柱中的扩散效应影响较小,并且分离度较高 (图 1c),因此选择流速为 0.7 mL/min。

理想的排阻色谱样品与固定相之间应该没有相互作用力,固定相表面应为亲水性的羟基,但是由于填料合成时实

验条件的限制,固定相表面不可避免的存在一些羧基、氨基等带电基团,因此溶质与固定相表面会有一些静电作用力<sup>[30]</sup>。因此,考察了 TSK-GEL G3000SWx (300 mm  $\times$  7.8 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 和 Yarra<sup>TM</sup> SEC-2000 (300 mm  $\times$  7.8 mm 3  $\mu\text{m}$ ) 2 种不同型号的体积排阻色谱柱对抗性对照组家蚕血液化合物分离的影响,结果如图 2 所示。比较二者的峰形、峰的数量可以看出, Yarra<sup>TM</sup> SEC-2000 色谱柱的分离效果较好。因此,最终选择的

分离条件如下:Yarra™ SEC-2000 分离柱,流动相 30 mmol/L

Tris-醋酸缓冲液(pH 7.4),流速 0.7 mL/min。



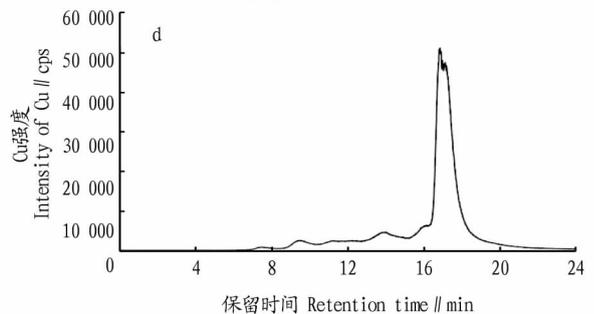
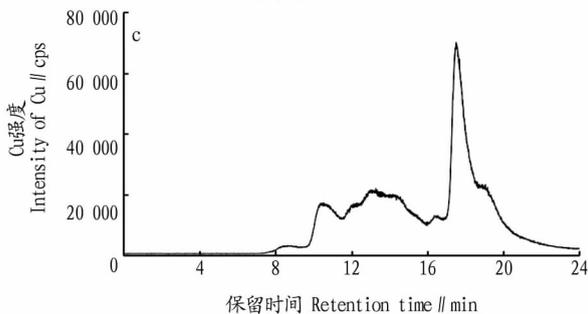
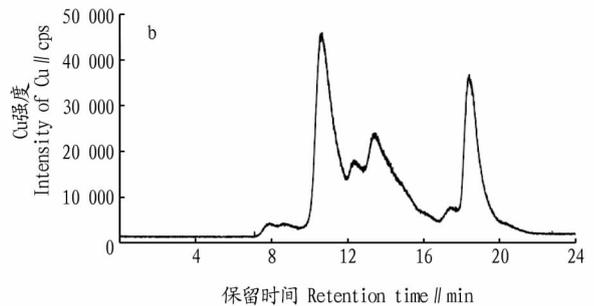
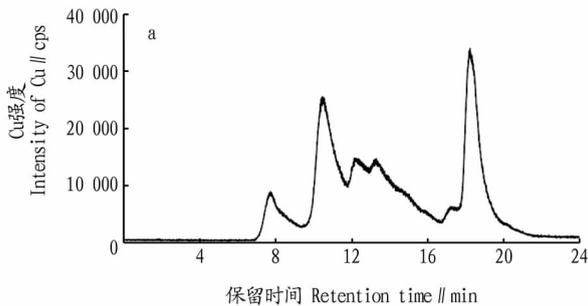
注:a. TSK-GEL G3000SWx(300 mm×7.8 mm),5 μm;b. Yarra™ SEC-2000(300 mm×7.8 mm),3 μm

图2 2种填料的体积排阻色谱柱分离色谱图

Fig.2 Separation chromatogram of two kinds of filler exclusion columns

**2.2 4组家蚕血液中的Cu金属化合物的差异比较** ICP-MS具有高灵敏度以及可多元素同时分析等特点,已成为金属蛋白中金属元素分析必不可少的方法<sup>[31]</sup>。ICP-MS可直接用于经液相色谱分离后的金属蛋白中金属元素种类及含量的检测,且因其具有分析同位素比值的能力,结合同位素稀释法可以对色谱分离所得到的未知金属元素进行准确定量<sup>[32-33]</sup>。采用SEC-ICP-MS方法测定了家蚕血液中Cu金属化合物,分离结果如图3所示。体积排阻色谱是根据分子量大小分离样品的,大分子物质在柱内的保留时间短,所以先出峰,分子量小的蛋白在柱内的保留时间长而后出峰。结合抗性对照组家蚕血淋巴蛋白在SEC中的出峰时间(图2b),比较Cu金属与抗性对照组家蚕血液中化合物的结合情

况(图3a)可知,Cu元素在家蚕血液的多数出峰时间内都可以被检测到,说明Cu结合的化合物分子量范围较广,与大分子和小分子化合物均有结合。对比添食病毒前后抗性和非抗性家蚕血淋巴Cu元素的金属谱峰(图3)可知,4组家蚕血淋巴Cu结合化合物有明显差异。抗性正常组(图3a)有3处明显峰:7.6、11.0、和18.0 min,12.0~14.0 min检测到2个信号强度很弱的谱峰。非抗性正常组(图3b)有2处明显峰:11.0和18.0 min,12.5和13.5 min谱峰不明显。抗性家蚕组的18.0 min峰的Cu金属信号强度明显强于非抗性家蚕。抗性家蚕在被喂食BmNPV 5 d后,7.6 min峰消失,11.0 min峰的金属信号强度和峰面积都明显降低,峰的形状也不明显(图3c);非抗性家蚕感染BmNPV 5 d后,0~



注:a.抗性正常组;b.非抗性正常组;c.抗性染毒组;d.非抗性染毒组

Note:a. silkworm group with BmNPV resistance;b. silkworm group without BmNPV resistance;c. silkworm group with BmNPV resistance inoculated with BmNPV;d. silkworm group without BmNPV resistance inoculated with BmNPV

图3 4组家蚕血淋巴Cu金属化合物的SEC-ICP-MS检测结果

Fig.3 Detection results of Cu metal compounds in blood of four groups by SEC-ICP-MS

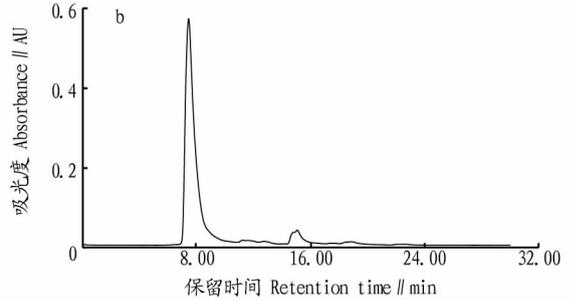
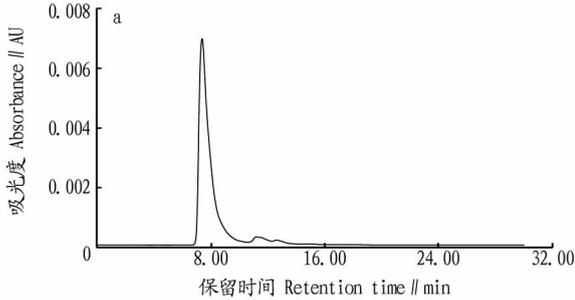
16.0 min几乎检测不到峰,只出现一个18.0 min峰(图3d)。因此,抗性和非抗性家蚕血液中Cu化合物主要的差异在

7.6 min峰。

**2.3 葡聚糖 G100 凝胶柱分离收集特定 Cu 金属化合物馏分** 4 组家蚕血淋巴的 Cu 金属化合物的 SEC-ICP-MS 分离结果表明,正常的抗性和非抗性家蚕血液中 Cu 化合物主要的差异在 7.6 min 峰,而抗性家蚕喂食 BmNPV 后也几乎检测不到 7.6 min 峰,据此推测这种差异可能与家蚕对 BmNPV 的抗性有关。为了后续的检测鉴定,需要分离并收集 7.6 min 馏分,借助质谱手段对其做定性分析。常用的方法是利用馏分收集器,根据液相色谱仪的检测信号手动收集样品

馏出液,多次收集,合并馏分,减压浓缩后借助质谱手段定性分析。这个方法要求准确计算样品流出液从色谱柱到馏分收集器的时间。从家蚕血液的 SEC-HPLC 色谱分离图可以看出,分离的 7.6 min 峰的出峰时间只有 1 min,因此色谱柱到馏分收集器的时间计算准确度对结果的影响较大。此外,与葡聚糖凝胶柱分离相比,HPLC 的进样量较少,直接利用 HPLC 收集得到的馏分样品浓度太低(图 4a)。

图 4 是抗性正常组家蚕血液的分离液的 SEC-HPLC 的



注:a. HPLC-馏分收集器;b. 葡聚糖 G100 凝胶柱

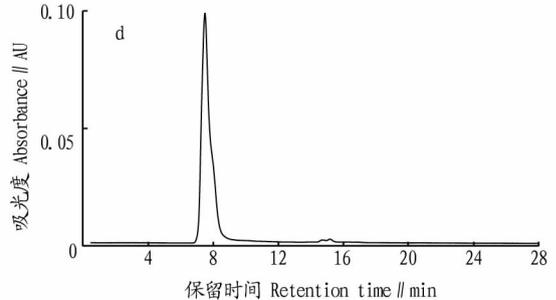
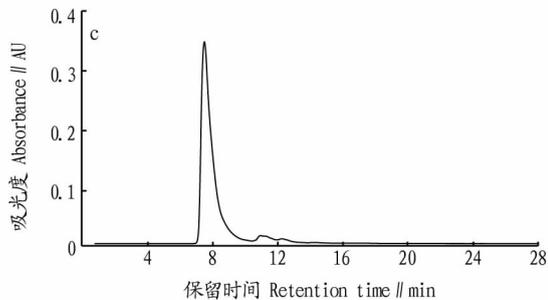
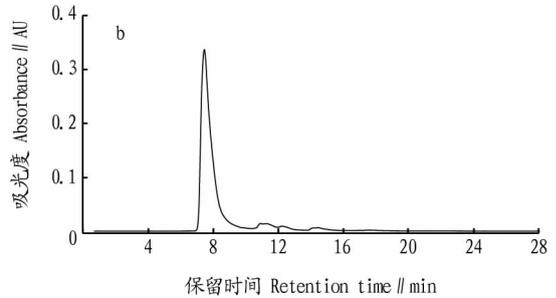
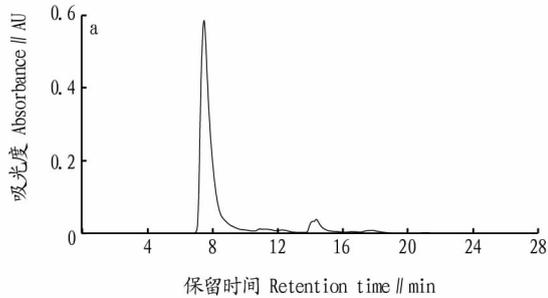
Note:a. HPLC-fraction collector ;b. Dextran G100 gel column

图 4 不同方法收集分离液的 SEC-HPLC 检测

Fig. 4 Determination results of secondary liquid by different methods

分离效果图。图 4a 是直接利用馏分收集器从 HPLC 手动收集的家蚕血液馏分分离图,图 4b 是葡聚糖凝胶柱分离家蚕血液并手动收集 7.6 min 分离液的 SEC-HPLC 分离效果图。图 4a 图中峰高和峰面积明显小于图 4b。因此,直接利用馏分收集器从 HPLC 手动收集的家蚕血液馏分需要多次收集合并,并对馏分进行浓缩才可以进行质谱鉴定。这种方法工作量繁琐,同时浓缩的过程中可能会破坏 Cu 结合金属化合物。

因此,用葡聚糖 G100 凝胶柱结合 HPLC 的方法分离并收集目标 Cu 金属化合物馏分,分离所得的分离液经 HPLC 法进行纯度检测,检测结果如图 5 所示。4 组家蚕血液的分离液在 0~30 min 时间内只出现一个 7.6 min 谱峰,说明收集的家蚕血液分离液成分相对简单,至少分子量相似。4 组家蚕血液分离液的 7.6 min 谱峰中抗性正常组最高,非抗性染毒组最低,这种差异趋势与 SEC-ICP-MS 分离结果相一致。



注:a. 抗性对照组;b. 抗性染毒组;c. 非抗性对照组;d. 非抗性染毒组

Note:a. silkworm with BmNPV resistance;b. silkworm without BmNPV resistance;c. silkworm with BmNPV resistance inoculated with BmNPV;d. silkworm without BmNPV resistance inoculated with BmNPV

图 5 4 组家蚕血液分离液的 SEC-HPLC 分离结果

Fig. 5 SEC-HPLC separation of four groups of silkworm blood separation

### 3 结论

笔者筛选出相对优化的体积排阻色谱分离条件,建立了SEC-ICP-MS联用技术来分离与检测家蚕血液中的Cu金属化合物。结果表明,BmNPV抗性和非抗性家蚕血液中Cu化合物主要的差异是位于7.6 min的组分。同时,利用葡聚糖G100凝胶柱重点对7.6 min组分进行了分离并收集分离液。此方法比传统的HPLC-馏分收集器收集的馏分浓度高,可省去再次对馏分进行合并和浓缩等步骤,是家蚕金属化合物分离较为简便和有效方法。

### 参考文献

- [1] 浙江大学. 家蚕病理学[M]. 北京: 农业出版社, 2001: 36-53.
- [2] 向仲怀. 家蚕遗传育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994.
- [3] BLISSARD G W, ROHRMANN G F. Baculovirus diversity and molecular biology[J]. Annual review of entomology, 1990, 35(35): 127-155.
- [4] SRIRAM S, PALHAN V B, GOPINATHAN K P. Heterologous promoter recognition leading to high-level expression of cloned foreign genes in *Bombyx mori* cell lines and larvae[J]. Gene, 1997, 190(1): 181-189.
- [5] 邢东旭. 家蚕抗核型多角体病毒病研究进展[J]. 广东蚕业, 2012, 46(3): 40-43.
- [6] CAO C P. Construction of a BmNPV Polyhedrin-plus Bac-to-Bac System for the Silkworm, *Bombyx mori*[J]. Science of sericulture, 2008, 34(2): 237-243.
- [7] 张忠信. 广谱昆虫杆状病毒生物农药研究与应用进展[J]. 华中昆虫研究, 2015, 11(00): 65-69.
- [8] 徐安英, 钱荷英, 刘明珠, 等. 家蚕抗血液型脓病品种“华康2号”[J]. 中国蚕业, 2016, 37(1): 86-88.
- [9] FENG F, HU P, CHEN K P. Progress of antiviral mechanisms in the mulberry silkworm: A review[J]. African journal of microbiology research, 2013, 7(14): 1173-1178.
- [10] HEROLD P, DAGHISH M, JELAKOVIC S, et al. Trypsin-like serine protease inhibitors, and their preparation and use; US8598206[P]. 2013.
- [11] 赵远. 家蚕抗核型多角体病毒病的微卫星分子标记筛选、定位及其病毒侵染家蚕中肠组织的差异蛋白质表达图谱研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2007.
- [12] 吕鹏, 潘晔, 王鹏, 等. 家蚕抗核型多角体病毒的研究进展[J]. 科学通报, 2015, 60(14): 1285-1297.
- [13] 李玉锋. 金属组学[M]. 北京: 科学出版社, 2016.
- [14] 金伟, 牟颖, 金钦汉. 金属组学、代谢组学及其它[J]. 理化检验-化学分册, 2005, 41(4): 296-299.
- [15] LU C, XIANG Z H, TANG Y M. Isolation, purification and some properties of copper/zinc superoxide dismutase in silkworm[J]. Acta sericologica sinica, 2001, 27(2): 96-99.
- [16] 马晓春, 韩宏岩, 许维岸. 家蚕表皮多酚氧化酶的分离纯化及酶学性质研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(17): 7870-7871.
- [17] 赵沼, 夏菊, 陶丽丹, 等. 重金属镉对家蚕生长发育及体内过氧化酶和乙酰胆碱酯酶活性的影响[J]. 蚕业科学, 2014(3): 462-467.
- [18] 许敏, 罗英, 黄毅, 等. 家蚕碱性磷酸酶的功能基因研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2005, 30(5): 925-929.
- [19] 戴玉锦. 家蚕丙氨酸转氨酶理化性质的研究[J]. 生物技术, 2004, 14(4): 42-43.
- [20] ECKER J S, ZORIY M V, PICKHARDT C, et al. Imaging of copper, zinc, and other elements in thin section of human brain samples (hippocampus) by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Analytical chemistry, 2005, 77(10): 3208.
- [21] YANG H X, LIU W, BING L I, et al. Speciation analysis of cadmium in indian mustard (*Brassica juncea*) by size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Chinese journal of analytical chemistry, 2009, 37(10): 1511-1514.
- [22] 赵艳芳, 尚德荣, 宁劲松, 等. 体积排阻高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定海产贝类中镉的形态[J]. 分析化学, 2012, 40(5): 681-686.
- [23] GAO M X, GUAN X, HONG G F, et al. Advances in multidimensional high performance liquid chromatography for separation technology in proteomic study [J]. Se pu, 2009, 27(5): 551-555.
- [24] 张罗敷, 胡晓芳, 徐学敏. 多维液相色谱分离技术在复杂蛋白质组学样品鉴定中的应用[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(1): 161-166.
- [25] BARNETT J P, SCANLAN D J, BLINDAUER C A. Fractionation and identification of metalloproteins from a marine cyanobacterium[J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2012, 402(10): 3371-3377.
- [26] 江桂斌, 何滨. 金属组学及其研究方法与前景[J]. 中国科学基金, 2005, 19(3): 151-155.
- [27] 李丽娜. 等电聚焦电泳与同步辐射X荧光联用技术研究生物样品内的微量元素[D]. 包头: 内蒙古科技大学包头医学院, 2007.
- [28] 高晓阳, 李龙, 武国华. 电感耦合等离子体质谱法测定家蚕五龄幼虫不同组织中铜[C]//全国理化测试学术研讨会暨《理化检验》创刊50周年大会. 上海: 中国机械工程学会, 2012.
- [29] 彭晓敏, 张金超, 高愈希, 等. 金属蛋白的提取分离技术[J]. 化学进展, 2012, 24(5): 834-843.
- [30] 张琳, 徐绍纲, 富泽洋, 等. 新型2 μm尺寸排阻色谱柱的性能评价及在单抗药物高通量高分辨分析中的应用[C]//第二十届全国色谱学术报告会及仪器展览会论文集. 北京: 中国化学会, 2015.
- [31] 史俊稳, 丰伟悦, 王萌, 等. 高效液相色谱-同位素稀释-电感耦合等离子体质谱法研究大鼠体内的汞结合蛋白[J]. 分析化学, 2007, 35(6): 803-808.
- [32] 王华建. 生物体系内金属的原位成像及形态分析[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2011.
- [33] LEE J Y, COLE T B, PALMITER R D, et al. Contribution by synaptic Zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish Mutant APP transgenic mice[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2002, 99(11): 7705-7710.

## 科技论文写作规范——标点符号

标点符号按照 GB/T 15834—2011 执行, 每个标点占 1 格 (破折号占 2 格)。外文中的标点符号按照外文的规范和习惯。外文字母、阿拉伯数字、百分号等并列时, 其间用“,”, 不用顿号“、”。注意破折号“——”、一字线“—”(浪纹线“~”)和短横线“-”的不同用法。破折号又称两字线或双连划, 占 2 个字身位置; 一字线占 1 个字身位置, 短横线又称半字线或对开划, 占半个字身位置。破折号可作文中的补充性说明(如注释、插入语等), 或用于公式或图表的说明文字中。一字线“—”(浪纹线“~”)用于表示标示相关项目(如时间、地域等)的起止。例如 1949—1986 年, 北京—上海特别旅客快车。参考文献范围号用“-”。短横线用于连接词组, 或用于连接化合物名称与其前面的符号或位序, 或用于公式、表格、插图、插图、型号、样本等的编号。外文中的破折号(Dash)的字身与 m 宽, 俗称 m Dash, 其用法与中文中的破折号相当。外文的连接符俗称哈芬(hyphen)。其中, 对开哈芬的字身为 m 字身的一半, 相当于中文中范围号的用法; 三开哈芬的字身为 m 字母的 1/3, 相当于中文中的短横线的用法。