

HPLC-ESI-MS 对珠蛋白酶解液中的血管紧张素 I 转换酶抑制肽的分离鉴定

余奕珂^{1,2}, 胡建恩¹, 白雪芳¹, 杜昱光^{1,*}, 林炳承¹

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连

116023 2. 中国科学院研究生院, 北京

100049)

摘 要: 本实验利用 ESI-MS/MS 对反相高效液相色谱分离的具有血管紧张素 I 转换酶 (ACE) 抑制活性的珠蛋白小肽的结构进行鉴定。结果表明: 此肽的序列为 Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr (VVYPWT), 位于猪的血红蛋白 β 链的 34-39 氨基酸序列片断, 它对 ACE 有很好的抑制活性, 其 IC_{50} 为 $6.02 \mu\text{mol/L}$ 。

关键词: 反相高效液相色谱; 质谱; 珠蛋白; VVYPWT

Isolation and Identification of Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from Peptic Globin Hydrolysate by HPLC-ESI-MS

YU Yi-ke^{1,2}, HU Jian-en¹, BAI Xue-fang¹, DU Yu-guang^{1,*}, LIN Bing-cheng¹

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian

116023, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing

100049, China)

Abstract: This paper described isolation and identification of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from the peptic globin hydrolysate. After the isolation of ACE inhibitory peptide with reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) on C_{18} column, one active fraction was obtained. The amino acid sequence was identified by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS-MS). The results showed that this peptide is Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr (VVYPWT), corresponding to the 34-39 fragment of the β chain of porcine hemoglobin, with IC_{50} value as $6.02 \mu\text{mol/L}$.

收稿日期 2006-05-10

*通讯作者

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目 (20052162)

作者简介: 余奕珂 (1979-), 女, 博士研究生, 研究方向为天然蛋白小分子肽的制备与生物活性。

化特性及组成结构上都存在明显的区别, 预示着这两者在生物学活性上有差异, 这应该是我们今后深入开发应用的着眼点。

参考文献:

- [1] 刘丽萍. 滇池水华特征及成因分析环境科学研究[J]. 环境科学研究, 1999, 12(5): 36-37.
- [2] 陈宇炜, 秦伯强, 高锡云. 太湖梅梁湾藻类及相关环境因子逐步回归统计和蓝藻水华的初步预测[J]. 湖泊科学, 2001, 13(1): 63-71.
- [3] 杨苏, 陈朝银, 赵声兰. 滇池蓝藻资源综合利用的研究进展[J]. 云南化工, 2006, 33(3): 49-53.
- [4] HAYSAHI T, HAYSAHI K. Calcium *Spirulina*, An inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina*[J]. Natural Product, 1996, 59(1): 83-87.
- [5] 梅秋红, 缪月秋, 张成武, 等. 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* var major) 胞外酸性多糖的分离、纯化及其理化特性的初步研究[J]. 湖泊科学, 2005, 17(12): 323-326.
- [6] 王习达, 吴国荣, 陈景耀, 等. 铜绿微囊藻酸性多糖提取分离及理化性质研究[J]. 中药材, 2003, 26(12): 865-867.
- [7] 唐丽琴, 李鑫. 蒽酮-硫酸比色测定麦冬多糖的含量[J]. 安徽医药, 2003, 7(1): 29-40.
- [8] 魏远安, 方积年. 用HPLC测定多糖的纯度及分子量的研究[J]. 药科学报, 1989, 24: 532.
- [9] KATO T. Effects of *Spirulina* (*S. platensis*) on dietary hypercholesterolemia in rats[J]. J. Jap Soc Food Sci, 1984, 37: 323-332.
- [10] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 121-128.
- [11] 张俐娜, 丁琼, 张平义, 等. 茯苓菌核多糖的分离和结构分析[J]. 高等学校化学学报, 1997, 18(6): 990-993.
- [12] 夏尔宁. 黑木耳多糖的分离、纯化与鉴定[J]. 生物化学与生物物理学报, 1988, 20(6): 613-618.
- [13] DISCHE Z. A new specific color reaction of hexuronic acids[J]. Biol Chem, 1947, 16(7): 189-198.

Key words: RP-HPLC; MS; globin; VVYPWT

中图分类号: Q946.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0248-03

在现代分离方法中, 高效液相色谱法具有多功能性、高分辨能力等特点。电喷雾(ESI)是一种软电离技术, 能够有效地收集离子和提供大量的碎片信息, 易与高效液相色谱联用(HPLC-MS), 这种联用技术具有分离效率高、检测灵敏度高和样品定性方便等特点, 因而在小肽的测定中得到广泛的应用^[1-2]。

血管紧张素 I 转换酶(ACE)在人体肾素-血管紧张素系统(renin angiotensin system, RAS)和激肽释放酶-激肽系统(kallikrein-kinin system, KKS)中, 对血压调节起着重要的作用。ACE 可以去掉血管紧张素 I 末端的 His-Leu 生成具有血管收缩作用的血管紧张素 II, 同时可以使舒缓激肽失活, 从而引起血压升高^[3]。所以抑制 ACE 的活性对降低血压有着积极的影响, 因此研究开发有效的 ACE 抑制剂具有很重要的意义。

对珠蛋白在各种蛋白酶水解下生成的酶解液进行了 ACE 抑制活性的测定, 发现胃蛋白酶水解珠蛋白所得的酶解液对 ACE 有较强的抑制作用, 通过分离, 在高效液相色谱(RP-HPLC)上得到一个 ACE 抑制活性很强的单一组分^[4]。本实验就是对其一级结构用 ESI-MS/MS 进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

经过初步纯化后的高活性组分(珠蛋白被胃蛋白酶水解后所得的酶解液经 Sephadex-LH20 纯化后, 实验室自制); 血管紧张素 I 转换酶(ACE, 生化试剂)、马尿酸组氨酰亮氨酸(Hip-His-Leu, 生化试剂) Sigma 公司; 乙酸铵、甲酸、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、三氟乙酸(TFA)等均为分析纯; 甲醇、乙腈为色谱醇。

1.2 仪器

高效液相色谱、P230 高压恒流泵、Hypersil BDS C_{18} 色谱柱(250×4.6mm, i. d., 5 μm) 大连依利特公司; 离子阱质谱、电喷雾接口、工作站及数据处理系统 美国 Finnigan 公司; 真空浓缩仪 RVC2-18 德国 CHRIST 公司。

1.3 方法

1.3.1 ESI-MS/MS 分析条件

电泳条件: 缓冲液为 50mmol/L 甲酸用 50mmol/L 乙酸铵调节 pH 值为 2.42, 包层液为含有体积分数为 0.5% 甲酸的甲醇-水溶液(50:50, V/V)。质谱条件: 喷雾电压 4.5kV, 加热毛细管温度 200℃, 选择性离子扫描。

1.3.2 ACE 抑制活性的测定

对 ACE 抑制活性的测定采用优化的 Cushman 和 Cheung^[5]的方法, 即用含有 608mmol/L NaCl 的 0.2mol/L 硼酸盐缓冲液(pH8.3), 将 Hip-His-Leu 配成 7.6mmol/L 的溶液。在 0.5ml 的 Eppendorf 管中分别加入 5 μl 样品和 15 μl ACE(60mU/ml)于 37℃下保温 5min, 加入 25 μl 底物也在 37℃下反应 30min, 最后加入 0.1% TFA 溶液终止反应, 冷却至室温。采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)定量 ACE 与底物反应生成马尿酸的量, 通过对 ACE 活性抑制 50% 时所需要的抑制剂的浓度(IC_{50})的高低, 来判断对 ACE 的抑制活性。

$\text{ACE 抑制率}(\%) = (\text{对照的马尿酸峰面积} - \text{样品的马尿酸峰面积}) / \text{对照的马尿酸峰面积} \times 100$

2 结果与分析

2.1 RP-HPLC 分离 ACE 抑制肽

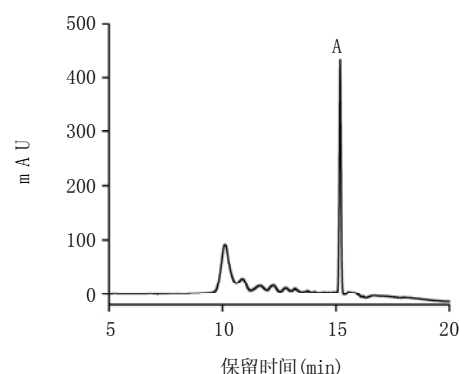


图1 RP-HPLC 分离 ACE 抑制肽
Fig.1 Separation of ACE inhibitory peptide by RP-HPLC

RP-HPLC 分离 ACE 抑制肽如图 1 所示。将经过初步纯化后的高活性组分用 RP-HPLC 分离, 经活性测定, A 组分具有很强的 ACE 抑制活性, 重复进样, 合并每次收集液, 经真空浓缩和冷冻干燥后, 测定其 IC_{50} 为 6.02 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 ESI-MS/MS 测定 A 组分的氨基酸序列

2.2.1 A 组分子量的测定

多肽、蛋白质等生物分子的序列分析, 传统上是用氨基酸序列分析仪, 但这种方法对样品纯度要求高、价格昂贵等。近年来, 随着 FAB、ESI、MALDI 等软电离方法的诞生, 使得质谱在生物领域的应用很快得到发展。研究发现, 肽的断裂遵循一定的规律, 因而从质谱碎片中能得到的肽序列信息^[6]。本方法用正离子模式检测, 在一级全扫描质谱图中, 信号离子峰上的

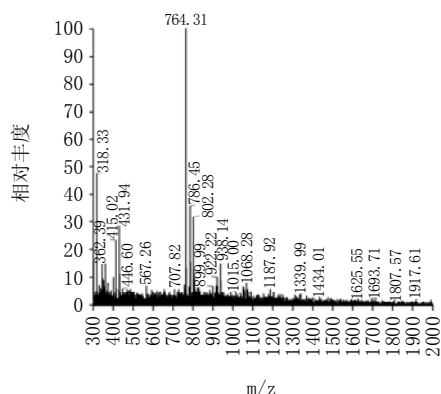


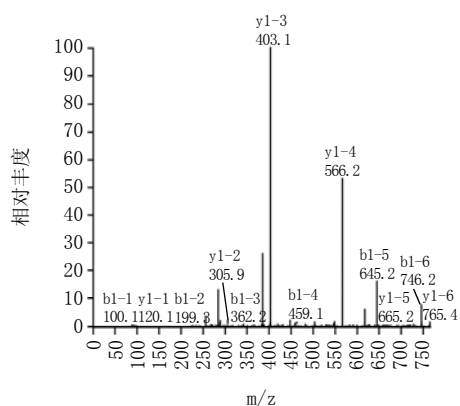
图2 A组分全扫描一级质谱

Fig.2 ESI/MS of fraction A

标注数值为通过软件处理后获知的各成分的 m/z (见图2), 活性组分A的 m/z 值为 $[M+H]^+764.3$ 。

2.2.2 A组分序列测定

为了对A组分进行进一步的鉴定, 对 $[M+H]^+764.3$ 离子峰进行MS/MS研究(如图3所示)。观察到大部分b离子和y'离子及一些脱去小分子(H_2O 和 NH_3)的离子。根据 $y' + b_n - i = MH^+ + 1$, 可计算出 $b_1 = 99$, V。又根据 $b_2 - b_1 = 99$, V; $b_3 - b_2 = 163$, Y; $b_4 - b_3 = 97$, P; $b_5 -$

图3 m/z 764的质谱碎片Fig.3 MS/MS spectrum of ion(m/z 764)

$b_4 = 186$, W; 利用 $y' + b_n - i = MH^+ + 1$, 所以A活性组分的全部序列为VVYPWT。查阅猪的血红蛋白序列可知, 该活性肽是位于猪的血红蛋白β链的34-39氨基酸片段。

2.3 VVYPWT的ACE抑制活性

VVYPWT对ACE具有很好的抑制活性, 其 IC_{50} 为 0.0046 mg/ml ($6.02 \mu\text{mol/L}$), 而经过初步纯化后的高活性组分的 IC_{50} 为 0.10 mg/ml [4], 经过RP-HPLC分离后对ACE的抑制活性提高了21.7倍。VVYPWT是第一次从猪的血红蛋白中分离得到的。在对ACE抑制肽的结构分析中可知, N末端为Val、Ile、Ala等疏水性氨基酸, C末端为Pro、Tyr等有较强的抑制作用。从珠蛋白水解液中分离得到的ACE抑制肽N端为Val, 而且大多数为疏水性氨基酸, 这与前人的研究结果一致。

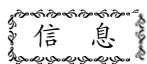
3 结论

3.1 RP-HPLC分离经初步纯化后的ACE抑制高活性组分, 得到一个单一组分A, 其 IC_{50} 为 $6.02 \mu\text{mol/L}$, 此组分的活性比初步纯化组分的活性提高21.7倍。

3.2 A经ESI-MS/MS鉴定后, 确定其序列为Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr(VVYPWT)。

参考文献:

- [1] 梁振, 段继诚, 张维冰, 等. HPLC-ESI-MS/MS对灯盏花提取液中主要成分的分离定性[J]. 分析科学学报, 2004, 20(2): 129-132.
- [2] 梁振, 段继诚, 张维冰, 等. CZE-ESI-MS联用测定小肽混合物的研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(3): 448-450.
- [3] LI G H, LE G W, SHI Y H, et al. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects[J]. Nutrition Research, 2004, 24: 469-486.
- [4] 余奕珂, 胡建恩, 白雪芳, 等. 酶法水解珠蛋白制备血管紧张素I转换酶抑制肽[J]. 河南工业大学学报:自然科学版, 2006, 27(5): 59-61.
- [5] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-I-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20: 1637-1648.
- [6] BRUINS A P. Mechanistic aspects of electrospray ionization[J]. Journal of Chromatography, 1998, 794: 345-357.



英发明“救命瓶” 可把污水数秒内净化为饮用水

英国一名商人最近发明了一种瓶子, 可以把污水在几秒之内净化为饮用水。英国媒体认为, 这一发明也许会改变向灾区供应饮用水的方式。

发明人迈克尔·普利特查德在英国的伊普斯威奇经营水处理业务。在看到有关2004年东南亚大海啸以及随后一年发生在美国路易斯安娜州的卡特里娜飓风的报道后, 他有了研发这种水瓶的构想。

传统的过滤器可以滤除长度大于200纳米的细菌, 但是对于典型长度为25纳米的病毒则无能为力。而普利特查德的瓶子可以净化任何污水, 包括人类排泄物。其使用的过滤器, 可以滤除长度大于15纳米的任何物体, 这意味着无需使用化学药剂就可以把病毒滤掉。