

米糠类阿片拮抗肽的氨基酸序列分析

陈季旺¹, 陶冠军², 姚惠源³, 黄桃菊¹, 夏文水¹

(1. 武汉工业学院食品学院, 湖北 武汉 430023; 2. 江南大学分析测试中心, 江苏 无锡 214036;

3. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 采用氨基酸分析仪、LC-MS 对米糠类阿片拮抗肽的结构进行了分析, 米糠类阿片拮抗肽由 Asp、Gly、Ser、Val 和 Arg 组成, 它的氨基酸序列为 Asp—Gly—Ser—Val—Arg。

关键词: 米糠; 类阿片拮抗肽; 氨基酸; 序列分析

Amino Acid Sequence Analysis of Opioid Antagonist Peptides from Rice Bran

CHEN Ji-wang¹, TAO Guan-jun², YAO Hui-yuan³, HUANG Tao-ju¹, XIA Wen-shui¹

(1. Food School of Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China

2. Analytical Center of Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

3. Food School of Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The structure of opioid antagonist peptide from rice bran was analysed by using amino acid analyzer and RP-HPLC. The results showed that it was made up of Asp, Gly, Ser, Val and Arg, and its amino acid sequence was finally identified as Asp-Gly-Ser-Val-Arg.

Key words: rice bran; opioid antagonist peptide; amino acid; sequence analysis

中图分类号: Q517

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0107-04

氨基酸序列分析是研究生物活性肽结构和功能关系的基础, 一般采用质谱和蛋白质顺序测定仪来鉴定生物活性肽的氨基酸序列^[1,2], 目前应用较多的质谱电离方法是基质辅助激光解吸离子化(MALDI)和电喷雾离子化(ESI)^[3~14]。与其他离子化方法相比, 电喷雾离子化(ESI)有三个显著特征: 一、电喷雾离子化(ESI)可以形成多电荷离子, 所以除了小分子化合物的测定外, 还可以用质荷比(m/z)有限的质量分析器分析强极性、热不稳定的大分子化合物; 二、在电喷雾离子化(ESI)中, 样品以溶液导入, 这使得它与高压液相色谱和毛细管电泳等液相分离技术的直接连用变得十分有利; 三、电喷雾

离子化(ESI)过程极为温和, 使电喷雾离子化(ESI)能够在气相状态下研究溶液中分子之间的非共价作用, 甚至于分子的三维空间构型, 因此电喷雾离子化(ESI)在近年来获得了迅速的发展和广泛的应用^[15,16]。本文采用电喷雾离子化质谱(ESI)和氨基酸组成分析来解析米糠类阿片拮抗肽的氨基酸序列。

1 材料与方法

1.1 实验材料

自制米糠类阿片拮抗肽(A312)^[17]。

1.2 实验方法

收稿日期: 2005-05-30

作者简介: 陈季旺(1971-), 男, 讲师, 博士, 研究方向为生物技术食品中的应用。

[15] 温朗聪, 袁杰利, 卢行安, 等. 冻干微生物与保护剂[J]. 中国微生态学杂志, 1997, 9(1): 56.

[16] Carvalho AS, Silva J, Ho P, et al. Effect of various factors upon thermotolerance and survival during storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* [J]. Journal of

Food Science, 2003, 68(8): 2538-2541.

[17] Font de Vald é G, de Giori G, de Ruiz Holgada A p, et al. Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried *Lactic acid bacteria* [J]. Appl Environ Microbiol, 1985, 49: 413-415.

1.2.1 氨基酸组成分析

将样品置于水解管中, 加入6mol/L的盐酸溶液, 真空封口。在110℃下水解24h, 冷却后定容、过滤和蒸干, 再加入0.02mol/L的盐酸溶液在空气中放置30min, 测定除色氨酸以外的氨基酸含量。采用835-50氨基酸自动分析仪(日本Hitachi公司)。

1.2.2 液质联用(LC-MS)仪分析

1.2.2.1 液相色谱条件

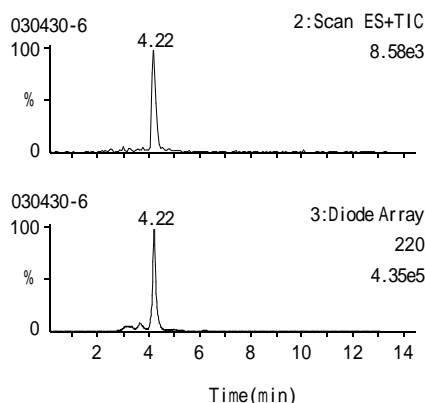
色谱仪: Waters 2690; 检测器: Waters 996; 分析柱: Lichrospher C-18 (2.6×250mm); 流动相: 甲醇-水-1%乙酸, 梯度洗脱; 检测波长: 220nm; 流速: 0.3ml/min; 柱温: 30℃, 进样量: 10μl。

1.2.2.2 质谱条件

质谱仪: Waters Platform ZMD 4000; 离子方式: ESI⁺, 毛细管电压: 3.88kV; 锥孔电压: 38V, Gas Flow: 4.2L/h; 离子源温度: 120℃, 脱溶剂气温度: 250℃; 质量范围: 200~1000m/z, 光电倍增器电压: 650V; Analyser Vacuum: 2.6e~5mBar。

2 结果与讨论

2.1 反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析 A312



色谱仪: Waters 2690, 检测器: Waters 996, 分析柱: Lichrospher C-18(2.6×250mm); 流动相: 甲醇-水-1%乙酸梯度洗脱, 柱温: 30℃, 流速: 0.3ml/min, 进样量: 10μl。

图1 A312的RP-HPLC洗脱图谱和总离子流图
Fig.1 RP-HPLC and TIC of A312

A312的RP-HPLC图谱和总离子流图见图1, 从RP-HPLC图中可以看出, A312只有一个主要组分, 再观察总离子流图, 发现A312中只含有一个肽段, 因此更进一步说明A312为单一组分, 可以用质谱法鉴定它的一级结构^[17]。

2.2 A312的氨基酸组成分析

图2是A312的氨基酸组成分析结果。从表中可以

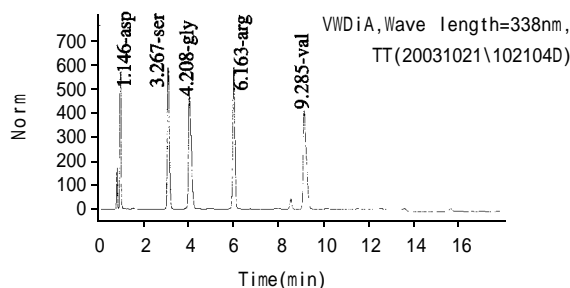


图2 A312的氨基酸组成

Fig.2 Amino acid composition of A312

看出, A312主要含有天冬氨酸(Asp)、甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、缬氨酸(Val)和精氨酸(Arg), 且它们的相对摩尔比例接近1:1:1:1:1(见表1)。

表1 A312的氨基酸组成
Table 1 Amino acid composition of A312

氨基酸	简写	相对摩尔比
天冬氨酸	Asp	1.08(1)
甘氨酸	Gly	0.98(1)
丝氨酸	Ser	1.00(1)
缬氨酸	Val	0.96(1)
精氨酸	Arg	1.06(1)

2.3 质谱解析

电喷雾离子化(ESI)质谱可分为正离子质谱和负离子质谱, 一般而言, 生物活性肽的电喷雾离子化(ESI)质谱分析总是以正离子方式进行, 这是因为碱性氨基酸(精氨酸和赖氨酸)NH₂末端具有足够大的离解常数, 以确保生物活性肽在酸性溶液中最可能地多重质子化。负离子质谱一般用于具有酸性官能团(如羧基、磷酸基等)的分子如核苷酸, 通常比正离子质谱低^[15,16]。用质谱法测定肽或蛋白质的序列是根据质谱中的碎片离子来推导的, 质谱中出现的序列信息碎片主要是通过酰胺键(肽键)断裂所形成, 图3为肽主链断裂的片段示意图^[16]。

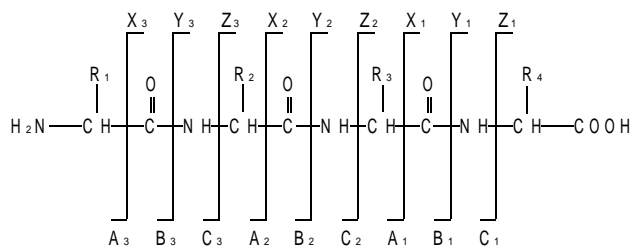
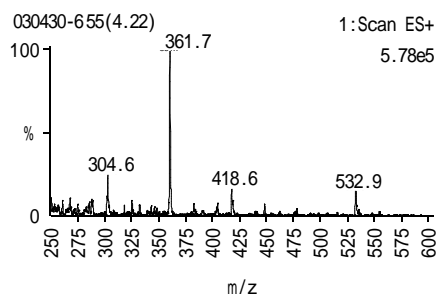


图3 肽链骨架断裂及其碎片命名

Fig.3 Fragmentation of peptide backbone and nomenclature

根据P. Roepstorff和J. Fohlman提出的命名系统^[20](由Biemann等修正), N端碎片离子用英文字母a, b, c等表示, C端离子用字母x, y, z等表示(见图3)。其中, y型离子的一般结构为 $^+H_2-(HNCHRCO)_nOH$, b

型离子为 $H(HNCHRCO)_n^+$, a 型离子为 $H(HNCHRCO)_{n-1}N=CHR_n^+$, 下标代表氨基酸残基所处的位置, 由于这几组碎裂峰的丰度相对较高, 因此它们是确定氨基酸序列的主要依据。



质谱仪: Waters Platform ZMD 4000; 离子方式: ESI⁺; 毛细管电压: 3.88V; 锥孔电压: 38V; 离子源温度: 120℃; 脱溶剂气温度: 250℃; 质量范围: 200~1000m/z; 光电倍增器电压: 650V; Analyser Vacuum: 2.6e~5mBar; Gas Flow: 4.2L/h。

图4 A312的电喷雾离子化(ESI)质谱

Fig.4 ESI mass spectrum of A312

对RP-HPLC分离得到的A312进行质谱鉴定, 结果见图4。解析质谱图发现, 质荷比为361.7和532.9的肽段有可能是组分A312的分子离子峰。采用SE-HPLC分析组分A312相对分子质量的结果表明, 它的相对分子质量为546Da^[17], 氨基酸组成分析表明A312主要由天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸和精氨酸组成, 这几种氨基酸组成五肽的相对分子质量为532.6Da, 因此认为质荷比为532.9的肽段是A312的分子离子峰。

Associated Spectrum Datafile:030430-6
Mass Window=0.30 amu, Threshold=1.50%
Average Mass=532.5391, Monoisotopic Mass=532.2500
Residues:1-5 proposed
N-Terminus=H, C-Terminus=OH

a	88.0	145.1	232.1	331.2	-
b	116.0	173.0	260.1	359.1	-
c	133.1	190.1	277.1	376.2	-
i	88.0	30.0	60.0	72.1	129.1
	1	2	3	4	5
	Asp	Gly	Ser	Val	Arg
	5	4	3	2	1
x	-	444.2	387.2	300.2	201.1
y	-	418.2	361.2	274.2	175.1
z	-	401.2	344.2	257.2	158.1

表2 A312的氨基酸序列

Table 2 Amino acid sequence of A312

实验采用的质谱仪配备一个快速软件分析系统, 根据特定小肽分子离子的质量数, 可以计算出小肽的氨基酸组成和序列, 并找到小肽在质谱中可能出现的碎片离

子。结合氨基酸组成分析, 可以确定组分A312的氨基酸序列, 见表2。从表中可以看出, 分子离子532.9可能的氨基酸序列为Asp-Gly-Ser-Val-Arg, a, b, c以及x, y, z是这种肽可能出现的碎片离子, i为天冬氨酸或精氨酸的亚基离子。碱性氨基酸对肽键断裂具有特殊的作用, 它们的质子亲和能较高, 具有使质子在肽链或碎片上定位的倾向。如果精氨酸在肽链的N端, 碎裂中倾向于产生N端离子, 精氨酸在C端则倾向于产生C端离子^{[18][20]}。由于胰蛋白酶水解作用的专一性较强, 只断裂赖氨酸或精氨酸羧基末端参与形成的肽键, 精氨酸应在肽链的C末端, 因此质谱图中应是y系列的离子(见图3)。

观察表2中数据还发现, i中质量数为88.0的碎片离子与Asp亚基离子的质量数87.6相一致, 说明Asp应为五肽的N末端。除有相对应的亚基离子外, 从表2中还可以看出质量数为361.2和418.2的碎片离子与质谱中碎片离子361.7、418.6相一致, 前面的氨基酸组成分析也表明, A312中主要含有天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸和精氨酸这五种氨基酸, 且它们的相对摩尔比接近1:1:1:1:1, 因此可以确定分子离子532.9为五肽, 它的氨基酸序列为Asp-Gly-Ser-Val-Arg。A312的氨基酸组成、相对分子质量和质谱分析结果见表3。

表3 A312的分析结果
Table 3 Analytical results of A312

组分 A312	分析结果
氨基酸组成	Asp(1.08):Gly(0.98):Ser(1):Val(0.96):Arg(1.06)
理论相对分子质量	532.6
质谱质量分析(M+H)	532.9
氨基酸序列	Asp-Gly-Ser-Val-Arg

3 结 论

本文采用RP-HPLC、质谱分析证明A312为单一组分, 氨基酸组成分析结果表明A312由天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸和精氨酸组成, 它们的相对摩尔比例接近1:1:1:1:1, 质谱鉴定A312的相对分子质量为531.9Da, 最终确定A312的氨基酸序列为Asp-Gly-Ser-Val-Arg。

参考文献:

- [1] 吴冠芸, 潘华珍, 等. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [2] 卞则梁, 王光辉. 质谱与生命科学[J]. 化学通报, 1994, 7: 40-46.
- [3] 董方霆, 杨松成. 质量肽谱在蛋白质结构研究中的应用[J]. 生物工程进展, 2000, 20(6): 84-87.
- [4] 马广慈. 药物分析方法与应用[J]. 北京: 科学出版社, 2000.

- [5] J A Brindisi, J D Parker, et al. Chemical profiles of hydrolyzed milk samples after treatment with commercial enzymes [J]. J of Food Sci, 2001, 66(8): 1100-1107.
- [6] E Soeryapranata, J R Power, et al. Matrix-assisted Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry method for the quantification of β -casein fragment (f193-209) [J]. J of Food Sci, 67(2): 534-538.
- [7] C Combes, E Paterson, et al. Isolation of low molecular weight peptides from emmental cheese [J]. J of Food Sci, 2001, 67(2): 553-559.
- [8] C P Mcatee, Y F Zhang, et al. Purification and characterization of a recombinant hepatitis E protein vaccine candidate by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J of Chromatogr B, 1996, 685(1): 91-95.
- [9] R P Brow, R T Applin, et al. Inhibition of TEM-2 β -lactamase from *Escherichia coli* by clavulanic acid: observation of intermediates by electrospray ionization mass spectrometry [J]. Biochem, 1996, 35: 12421-12427.
- [10] Peter sporns, Jian wang. Exploring new frontiers in food analysis using MALDI-MS [J]. Food Res Int, 1998, 31(3): 181-189.
- [11] R D Smith, A L Joseph, et al. New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization [J]. Anal Biochem, 1990, 62: 882-889.
- [12] P A D Agostino, J R Hancock, et al. Analysis of bioactive peptides by liquid chromatography-high resolution electrospray mass spectrometry [J]. J of chromatogr A, 1997, 767: 77-85.
- [13] U Bahr, stahl-Zeng, et al. Delayed extraction time-of-flight MALDI mass spectrometry of proteins about 25000 Da [J]. J of Mass Spectr, 1997, 32: 1111-1116.
- [14] R M 坎普, 等著. 蛋白质结构分析: 制备、鉴定与微量测序 [M]. 施蕴渝, 等译. 北京: 科学出版社, 2000.
- [15] 桑志红, 杨松成. 电喷雾电离质谱及其在蛋白质化学研究中的应用 [J]. 国外医学药学分册, 2000, 27(1): 38-41.
- [16] 韩俊, 杨仲元, 等. 电喷雾离子化质谱法及其在药物与生物大分子分析中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2001, 21(3): 212-217.
- [17] 陈季旺, 陶冠军, 等. 米糠类阿片拮抗肽的分离纯化 [J]. 食品科学, 2005.
- [18] 陈耀祖, 涂亚平. 有机质谱原理及应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [19] P Roepstorff, J Fohlman. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides [J]. Biomed Mass Spectrom, 1984, 11: 601-602.
- [20] 陈晶, 付华, 等. 质谱在肽和蛋白质序列分析中的应用 [J]. 有机化学, 2002, 22(2): 81-90.

《食品科学》撰稿要求

- 稿件(附软盘或电子邮件)要求论点明确, 论据可靠, 数据准确, 文字通顺、简练。
- 引用他人成果时, 请按《著作权法》有关规定说明出处。内容应未曾发表过或被其他出版物刊载过, 且无一稿两投。英文稿件可接收, 但应把题目、作者、单位、摘要、关键词译成中文。
- 稿件要求6000字以内, 须有中图分类号, 文献标识码, 第一作者简介, 中、英文标题, 中英文单位、作者, 并做200字左右的中、英文摘要和3~8个关键词, 表题、图题请用中英文对照。
- 凡属于重大科技获奖的论文和国家级省部级资助项目的研究报告、论文, 请来稿注明批准号, 本刊将优先刊登。
- 来稿内容涉及配方时, 须写明配料的名称和配比, 勿用代号; 工艺过程要完整, 不要省略; 插图、表格需放在正文的相应地方, 不要集中; 引用图表要有出处, 计量要用法定单位。
- 文稿中的参考文献不得超过40条, 其格式请按如下规定表达:
[期刊]主要责任者. 文献题名[J]. 刊名, 年, 卷(期): 起止页码.
[书籍]主要责任者. 文献题名[文献类型标识]. 出版地: 出版者, 出版年. 起止页码(任选).
附 文献类型标识
专著[M]、论文集[C]、报纸文章[N]、期刊文章[J]、学位论文[D]、报告[R]、标准[S]、专利[P]
- 来稿请注明详细地址和电话, 便于通知联系。
- 电子信箱(E-mail): chnfood@chnfood.cn
- 来稿请寄: 100076 北京市南苑西红门路8号《食品科学》编辑部
- 稿件查询电话 010-60256914/24/34/44/54-0