

## 研究报告

# MALDI-TOF 质谱技术分析加州海兔口腔神经节中超微量 Leu-Leu 多肽酶

黄河清

(厦门大学生命科学学院分析测试中心, 厦门, 361005)

**摘要** 利用丙酮-水-酸(48:50:2 V/V)萃取系统,从加州海兔(*Aplysia California, AC*)口腔神经节中提取 Leu-Leu 多肽酶,并用反相 HPLC 进行纯化。选用具有三对 Leu-Leu 结构的酸性多肽(acidic peptide, AP)作为探针,以基质辅助激光解吸电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱技术研究了海兔口腔神经节中的超微量 Leu-Leu 多肽酶。对 Leu-Leu 多肽酶的活性与类型及温度处理效果进行讨论。本技术也适用于分析其他组织与细胞中存在的各种超微量多肽酶。

**关键词** MALDI-TOF 质谱技术 海兔 酸性多肽 Leu-Leu 多肽酶 超微量分析

## 1 前言

近 10 几年来,发展痕量和超微量分析技术一直是结构生物学研究领域中具有挑战性的课题,尤其是多肽和酶结构分析<sup>[1]</sup>。目前,毛细管电泳仪是生物大分子微量和超微量分析最有效的分离系统之一,它可在纳升级上对混合样品进行分离,得到很纯的单一组分,并且能自动高效测定 DNA 序列等生化参数。尽管如此,毛细管电泳仍然无法准确地预测和鉴定蛋白质和多肽等生物大分子的组成和结构。MALDI-TOF-MS 的检测灵敏度可高达 fmol ( $10^{-15}$ ),质量范围可达 400kDa 以上,具有测定速度快,对样品纯度要求不高等优点,非常适合生物活性物质高通量筛选,是开展蛋白质组学与基因功能组学研究的极为有效的分析技术<sup>[2]</sup>之一。

海兔(*Aplysia*)中枢神经系统,是当今生物医学科学中有关神经信号传导和神经多肽结构研究的一种经典模型。该系统主要由口腔神经节(buccal Ganglion, BG)、大脑神经节(cerebral ganglion,

GB)、腹部神经节(abdominal ganglion, AG)、胸膜和腹部连索等组成。神经节和神经连索内的多肽酶参与信号传导,但多肽酶分子结构不仅复杂,而且含量极微,想分离纯化极为困难,从而限制了对它的结构与功能的深入研究。

如何准确定性和定量分析神经节和神经管内外表层的超微量混合多肽酶的组成和分布一直是分子神经生物学研究中亟待解决的关键性问题<sup>[4,5]</sup>。本文选用美国加州海兔为研究材料,采用丙酮-水-酸有机系统提取海兔口腔神经节多肽酶混合物,用具有三对 Leu-Leu 结构的酸性多肽作为探针,利用 MALDI-TOF 质谱技术研究海兔口腔神经节中超微量 Leu-Leu 多肽酶的活性与类型。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

美国加州海兔(*Aplysia California, AC*),购自美国海兔研究中心。每只海兔净重约在 100~150g 之间。口腔神经节分离前,海兔喂养在人工模拟

14 海水中。酸性多肽(AP)由美国伊利诺大学生物技术中心合成,分子量为2960.5 Da。在弱酸介质中,AP结合一个H<sup>+</sup>,遵[M+H]<sup>+</sup>规律,带单电荷的AP的质荷比(m/z)为2961.5。

基质2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB),购自美国ICN生物医学公司。其他试剂均购自Sigma公司,为分析纯或光谱纯

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 AC口腔神经节(BG)分离

取海兔6只,根据海兔体重,将重量(g)换算成体积(mL),在海兔体内注入氯化镁390mmol/L,约相当于海兔体重一半的体积。等待数分钟后,迅速解剖海兔,取出海兔CNS。在解剖镜下分离出BG,并置于人工海水中备用。每只AC有两个BG,每个体积约为0.002m×0.001m×0.001m。

### 2.2.2 BG匀浆液制备

配制丙酮-水-酸(48:50:2,V/V)提取液,取200μL提取液,与6对BG(总重量约为0.2mg)混合,并置于微量组织捣碎机内,将BG捣碎成匀浆液,最后以8000r/min速度冷冻离心匀浆液,收集上清液,弃去沉淀物。

### 2.2.3 多肽酶分离纯化

取BG匀浆上清液100μL,并通过孔径为0.4μm分离筛进行预分离,收集过滤液,备用。美国Michrom Bioresources公司HPLC C-18色谱分离柱分离样品。

洗脱液A:2%乙腈,98%水,0.1%甲酸和0.02%三氟乙酸(TFA);洗脱液B:95%乙腈,5%水,0.1%甲酸和0.02%三氟乙酸。

样品注入体积为100μL。梯度洗脱所需时间控制在60min,样品收集在15~40个样品管中,每个管中样品体积为400μL。

### 2.2.4 样品的温度处理

根据实验要求,把收集的样品放置在不同温度的水浴恒温器中加热,加热温度35℃,时间2h,随后添加适当水,使每个管中样品总体积保持在400μL。加热的主要目的是去除样品中的丙酮或其他有机变性溶剂,使Leu-Leu多肽酶通过自身折叠,恢复多肽酶活性。酶底物选择具有三对Leu-Leu结构的AP探针,其一级结构为SSGVSLTNSKDEEQRELLKAI-SNLLD,用于分析AC口腔神经节超微量Leu-Leu多肽酶活性与类型。

### 2.2.5 质谱测定条件

美国应用生物系统公司Voyager DE-STR生物质谱仪。脉冲氮激光(337nm)离子解吸电离源。分析模型使用高分辨率延迟引出的反射模型。实验过程中激光强度恒定在2300(内部单位),加速电压控制在20kV,平均每次测定样品的激光脉冲次数100次/s。采用高纯度99%的酸性多肽(m/z 2961.5)标定多肽质谱峰位。

### 2.2.6 AP纯化

在化学合成AP过程中会有一些分解产物<sup>[5]</sup>,为了减少AP分解产物产生干扰,在使用前,应对AP进行纯化,以获得较高纯度。实验步骤:取AP 200μL于透析袋中(透析袋截留分子量为2000);随后将透析袋置于去离子弱酸(pH5.0)水中进行恒温(30℃)透析,除去样品中分子量小于2000μ的AP分解产物或其他杂质;透析过程中采用MALDI-TOF质谱技术监测AP样品的纯度。

### 2.2.7 BG多肽酶活性测定

取样品0.5μL,与0.3μL AP均匀混合,置于30~40℃水浴恒温器中反应30min,随后取0.6μL用于质谱分析<sup>[5]</sup>。采用Paws软件分析AP中Leu-Leu结构被酶解的产物,了解BG中Leu-Leu多肽酶的活性。

## 3 结果与讨论

### 3.1 BG多肽酶制备和活性分析

通常从软体动物中枢神经系统中提取多肽的提取液组成为丙酮-水-酸,体积比为40:60:1<sup>[7]</sup>。作者的实验结果证实,如用这种体积比的提取液提取AC口腔神经节内的Leu-Leu多肽酶或其他酶均无法表达酶活性,因为该提取液中含有高比例有机溶剂,能使多数酶蛋白变性或失活。作者将原提取液(丙酮-水-酸)组成体积比改为45:53:2,大幅度提高原提取系统中弱酸性水的比例,避免高浓度丙酮溶剂引起多肽酶变性。图1是AC口腔神经节粗提液中Leu-Leu多肽酶催化AP产物的质谱图,AP特征质谱峰位于质荷比(m/z)2961.30处。

采用Paws软件对图1中质谱峰所对应的m/z比值进行计算分析,结果表明,未发现Leu-Leu酰氨键被酶解的分解产物。这一现象说明,AC口腔神经节内粗提液中Leu-Leu多肽酶未能表达酶催化活性,这可能与占提取液45%的丙酮有关。丙酮是该酶的变性剂,能强烈地抑制该酶表达活性,使

AC 口腔神经节粗提液中 Leu-Leu 多肽酶无法酶解 AP 的 Leu-Leu 酰氨键。

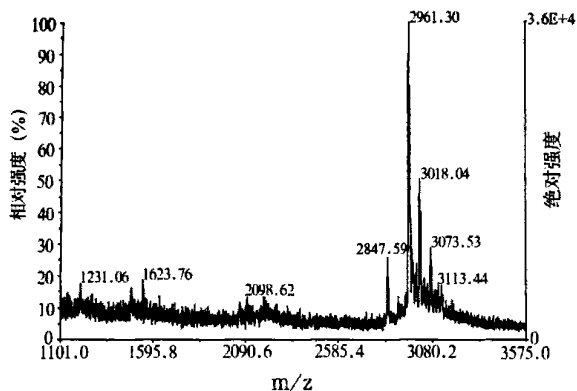


图1 AC口腔神经节粗提液多肽酶催化AP的质谱图

### 3.2 温度处理效果

为了避免高浓度丙酮抑制 AC 口腔神经节粗提液中 Leu-Leu 多肽酶表达活性,作者采用了温度处理技术,在慢速蒸发样品中变性剂的同时,使 Leu-Leu 多肽酶通过自身折叠的方式,恢复活性。图2是 AC 口腔神经节粗提液经温度处理后 Leu-Leu 多肽酶催化 AP 产物的质谱图,AP 特征质谱峰位于质荷比(m/z) 2961.51 处。

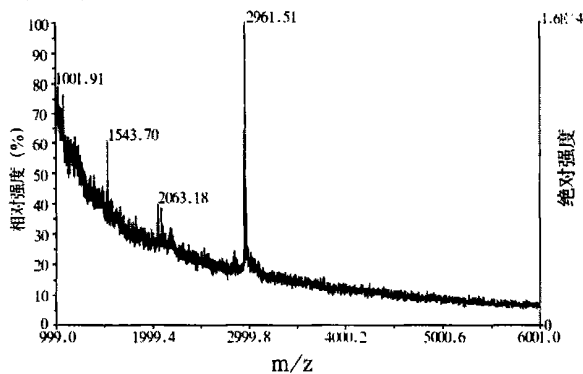


图2 AC口腔神经节粗提液经温度处理后多肽酶催化AP的质谱图

采用 Paws 软件对图2中所显示的其他质谱峰所对应的 m/z 比值进行分析,获得如表1所示的结果。从表1所列出的一级结构可看出,经温度处理后,AC 口腔神经节粗提液中 Leu-Leu 多肽酶表达了催化 AP 活性,其中靠近 AP 的 C 端的 Leu-Leu 酰氨键均能被酶解成具有 m/z 比值为 1001.9 和 1544.5 的分解产物,而靠近 AP 一级结构的 N 端和中部的 Leu-Leu 酰氨键未能被分解。这一现象说明,温度处理在降低粗提液中丙酮含量的同时,使 Leu-Leu

表1 AC 口腔神经节粗提液经温度处理后多肽酶催化 AP 的产物

理论值 (m/z)	测量值 (m/z)	绝对误差 (%)	一级结构
2961.5	2961.5	0.00	SSGVSLLT SNKDEEQ RELLKAISNLLD
1000.2	1001.9	0.169	ELLKAISNL
1542.7	1544.5	0.116	EEQRELLKAISNL

### 3.3 Leu-Leu 多肽酶( )

多肽酶通过自身折叠方式,恢复了酶催化活性,并酶解了 AP 中部分 Leu-Leu 酰氨键,形成不同的分解产物,但无法酶解靠近 AP 一级结构 N 端和中部的 Leu-Leu 酰氨键。由此来看,AC 口腔神经节内可能含有不同类型 Leu-Leu 多肽酶,并专一性地酶解 AP 的 Leu-Leu 酰氨键。粗提液经温度简单处理后,只能活化其中某一种 Leu-Leu 多肽酶,但无法酶解 AP 中的所有 Leu-Leu 酰氨键。Phares<sup>[8]</sup>从 1000 只美国 AC 的大脑神经节中仅分离出 6nmol 大脑多肽,而作者仅使用 6 只 AC 的口腔神经节为研究材料,因此 Leu-Leu 多肽酶含量甚微。采用 RP-HPLC 分离 AC 口腔神经节粗提液中酶蛋白,因受紫外检测器灵敏度的限制,无法检测到超微量酶蛋白被分离的情况,所以只对已收集的 15 个样品实验管,在实施温度处理后,逐一进行了 Leu-Leu 多肽酶活性分析。MALDI-TOF 质谱仪有很高的灵敏度(fmol),具有快速检测超微量 Leu-Leu 多肽酶酶解 AP 形成的各种产物的能力。作者发现,在收集的 15 个样品管中,第4和第6管中含有 Leu-Leu 多肽酶,均能专一性地酶解 AP 中的 Leu-Leu 酰氨键,形成不同的分解产物。为了区别,第4管和第6管中的 Leu-Leu 多肽酶分别称为 Leu-Leu 多肽酶( )和 Leu-Leu 多肽酶( )。图3是第4样品管中 Leu-Leu 多肽酶酶解 AP 的质谱图。

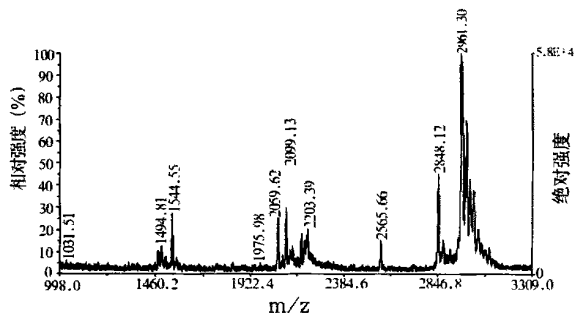


图3多肽酶( )酶解AP的质谱图

根据 AP 一级结构, 图 3 中所示质谱峰所对应的  $m/z$  比值, 采用 Paws 软件分析, 可获得表 2 结果。

表 2 Leu-Leu 多肽酶( ) 酶解 AP 的产物

理论值 ( $m/z$ )	测量值 ( $m/z$ )	绝对误差 (%)	一级结构
2961.5	2961.5	0.068	SSGVSLTTSNKDEEQ RELLKAISNLLD
1542.8	1544.6	0.117	EEQRELLKAISNL
1974.5	1976.0	0.076	LTSNKDEEQRELLK AIS
2201.5	2203.4	0.086	LTSNKDEEQRELLK AISNL

比较图 2、图 3 可以看出, AC 口腔神经节酶粗提液和第 4 样品管中均含有 Leu-Leu 多肽酶, 并以相同的 Leu-Leu 酶切位点酶解 AP, 形成相同的分解产物, 即 EEQRELLKAISNL, 不同之处是后者比前者多获得 2 种新的分解产物, 即 LTSNKDEEQRELLKAIS 和 LTSNKDEEQRELLKAISNL, 但少 1 种 ELLKAISNL 分解产物。显然经纯化的 Leu-Leu 多肽酶能更有效地酶解 AP 中 Leu-Leu 的酰氨键, 形成更多的分解产物, 尤其能酶解 AP 的 N 端 Leu-Leu 酰氨键, 但这两种混合多肽酶体系均无法酶解 AP 中部的 Leu-Leu 的酰氨键。

### 3.4 Leu-Leu 多肽酶( )

在收集的第 6 样品管中同样发现了 Leu-Leu 多肽酶具有活性。图 4 是第 6 管样品中 Leu-Leu 多肽酶酶解 AP 的质谱图。

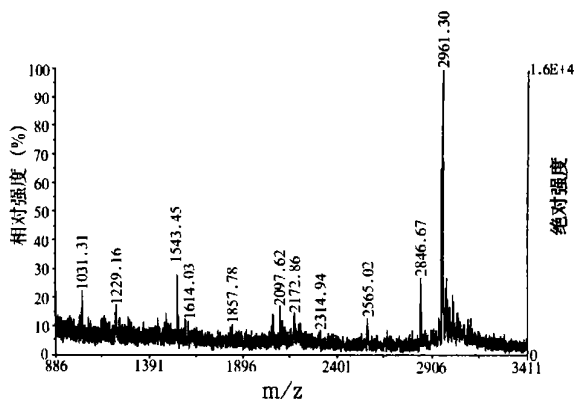


图 4 多肽酶( ) 酶解 AP 的质谱图

根据 AP 一级结构, 图 4 中所显示的质谱峰所对应的  $m/z$  比值, 采用 Paws 软件分析, 可获得表 3 结果。比较表 2、表 3 可以看出, 该多肽酶只能酶解靠

近 AP 一级结构 C 端的 Leu-Leu 酰氨键, 并产生 EEQRELLKAISNL 和 LLTSNKDEEQRELLKAISNL 序列的分解产物, 而无法酶解 AP 的另外 2 对 Leu-Leu 酰氨键, 酶解功能与 Leu-Leu 多肽酶( ) 略微不同。

表 3 Leu-Leu 多肽酶( ) 酶解 AP 的产物

理论值 ( $m/z$ )	测量值 ( $m/z$ )	绝对误差 (%)	一级结构
2961.5	2961.3	0.068	SSGVSLTTSNKDEEQ RELLKAISNLLD
1542.8	1543.5	0.045	EEQRELLKAISNL
2314.6	2314.9	0.013	LLTSNKDEEQRELLK AISNL

为了证实图 3、图 4 和表 2、表 3 结果的真实性, 作者进一步优化了 AC 口腔神经节粗提液的分离条件, 增加了洗脱体积, 收集样品的管数由原来的 15 管增加到 40 管, 并提高了样品纯度。实验结果表明, 在 40 个样品管中, 第 13 管和第 31 管中均含有 Leu-Leu 多肽酶, 其酶解 AP 的 Leu-Leu 酰氨键的能力, 所获得的分解产物, 分别与表 2、表 3 中列出的实验结果很相似, 进一步证实了 AC 口腔神经节中确实含有 2 种执行不同功能的 Leu-Leu 多肽酶。

由于 6 只海兔口腔神经节中 Leu-Leu 两种多肽酶含量极低, 作者对样品进行浓缩后, 采用各种电泳分离技术均无法获得该酶清晰的凝胶层析带。Leu-Leu 多肽酶的分子量、亚基类型和一级结构等生化参数和理化特征, 只能建立在获得大量(数千只)海兔资源的基础上。尽管如此, 具有高分辨率和灵敏度的 MALDI-TOF 质谱分析技术, 仍然可以用于分析生物材料中存在的超微量多肽酶, 具有一定科学研究意义和应用价值。

### 参考文献

- 1 Pennington S R, Dunn M J. Potoemics: from protein sequence to function. BIOS Scientific Publishers Limited, 2001: 01-30
- 2 Yanagida M. Journal of Chromatography B, 2002, 771: 89-106
- 3 林庆梅, 黄河清, 王群力. 分析测试学报, 2003, 22(5): 1-4
- 4 黄河清, Kim W S, Miao H. 中国生物工程杂志, 2003, 23(6): 79-83
- 5 黄河清. 分析仪器, 2003, (1): 37-41

6 黄河清, 林庆梅, Miao H 等. 动物学杂志, 2003, 38(5):

34- 40

Chromatography A, 1999, 830: 105- 113

8 Phares G A, Lloyd P E. Peptides, 1996, 17: 753- 761

7 Floyd P D, Li L J, Moroz T P et al. Journal of

收稿日期: 2003- 04- 16

**Analysis of ultramicro Leu-leu endopeptidase in buccal ganglion of *Aplysia California* by MALDI-TOF mass spectrometry.** Huang Heqing (The Center of Analysis and Testing, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Leu-Leu endopeptidase in buccal ganglion (BG) of *Aplysia California* (AC) was extracted with acetone-water-HCl (48 50 2) system and purified by RP-HPLC. Using acidic peptide with three pairs of Leu-Leu structure as probe, the ultramicro Leu-Leu endopeptidase in BG of AC was analyzed by MALDI-TOF-MS. The activities and kinds of Leu-Leu endopeptidase and the effect of temperature treatment are discussed. The technique is also applicable for analyzing ultramicro endopeptidases in other tissues or cells.

## 仪器分析

# 镍( ) - 血清蛋白配合物极谱催化前波及其应用

韩英强 罗登柏

(中南民族大学化学与生命科学学院, 武汉, 430074)

**摘要** 实验发现, 在 pH8.8 的  $H_3BO_3$ -NaOH 介质中, 镍( ) - 血清蛋白配合物在单扫示波极谱上, 在 -0.60V 处( vs. SCE) 会产生吸附性质的催化前波, 该波二阶导数波高与蛋白质浓度在一定范围内呈线性关系, 对于牛血清蛋白(BSA), 线性范围为 1 ~ 29  $\mu g/mL$ , 检出限为 0.5  $\mu g/mL$ ; 对于人血清蛋白(HSA), 线性范围为 0.8 ~ 26  $\mu g/mL$ , 检出限为 0.4  $\mu g/mL$ 。应用该法测定了人血清样品总蛋白含量。研究了实验条件的选择, 探讨了方法的机理。

**关键词** 镍( ) 牛血清蛋白 人血清蛋白 催化前波

## 1 引言

蛋白质在钴离子、氨-氯化铵溶液中能产生 Brdicka 催化氢波, 镍与钴具有相似性质, 也能产生类似的催化氢波<sup>[1]</sup>, 但催化效应远不如钴离子, 因而在实际工作中没有得到应用。我们发现, 在 pH8.8 的  $H_3BO_3$ -NaOH 介质中, 镍( ) - 血清蛋白配合物在单扫示波极谱上, 在 -0.60V 处会产生具有吸附性质的催化前波。镍-蛋白质配合物催化前波未

见报道。利用该波测量微量蛋白质, 线性范围宽, 灵敏度高, 稳定性好。与 Brdicka 催化氢波比较, 该波电位较正, 有利于低浓度蛋白质的测定。应用该法测定人血清样品中总蛋白含量, 结果满意。本文讨论该波的形成条件, 极谱电流性质和方法的机理。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

JP-303、JP-2 极谱仪(成都仪器厂), 三电极

基金项目: 湖北省自然科学基金(99J063)及中南民族大学自然科学基金(YZZ03003)。

作者简介: 韩英强, 男, 27 岁, 硕士研究生, 现在湖北工学院工作。

通讯联系人: 罗登柏