

溶剂诱导黑色素瘤抗原基因-2 特定表位多肽异构的 LC/MS 研究

周 伟, 吴玉章, 边 疆, 贾正才, 唐 艳, 邹丽云

(第三军医大学全军免疫学研究所, 重庆 400038)

摘要: 研究乙醇、甲醇两种常用溶剂系统对固相合成的黑色素瘤抗原基因-2 (MAGE-2) 的特定表位多肽 (171-179) 异构的影响。分别运用乙醇、甲醇溶剂体系以及极性溶剂二甲基亚砜 (DMSO) 作对照预处理固相合成的黑色素瘤抗原特异性 MAGE-2 表位多肽 (171~179), 然后用反相高效液相色谱/质谱联用技术 (RP-HPLC/MS) 对合成的表位多肽的 m/z 进行 Q1 正离子监测扫描分析, 观察其在不同溶剂系统预处理下的异构情况, 以选择合理的预处理条件。结果发现采用乙醇及甲醇溶样时 MAGE-2 表位多肽有异构体产生, 极性溶剂 DMSO 溶样的表位多肽未有异构现象发生, 采用 50% (体积分数) 的乙醇及 50% (体积分数) 的甲醇时也未监测到异构体产生; 同时发现将已发生异构的乙醇及甲醇溶样溶液用三氟乙酸酸化处理后, 异构多肽可发生较大的逆转。

关键词: 液相色谱/质谱联用; 黑色素瘤抗原基因-2; 表位多肽; 异构体; 溶剂; 诱导

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-871X(2001)05-0449-05

1 前言

近年来随着黑色素瘤特异性免疫治疗研究的不断深入, 其肿瘤特异性抗原的发现及其细胞毒性 T 细胞 (CTL) 表位的预测及鉴定成为特异性免疫治疗及多肽疫苗研制的重要前提。预测黑色素瘤抗原基因-2 (MAGE-2) 的 HLA-A2 限制性 CTL 表位的方法也日渐成熟^[1], 预测出的表位多肽组成通常为含 10 个左右氨基酸的多肽^[2], 随后进行固相合成。因不同氨基酸活化方式及偶联效率的差异, 通常对合成的表位多肽进行梯度反相高效液相色谱 (RP-HPLC/UV) 分析制备^[3], 以确保下一步细胞功能性研究即细胞杀伤验证的特异性; MAGE-2 的众多表位多肽都表现较强的疏水性, 虽然分析制备前可供疏水肽选择的有机溶剂系统较多, 但乙醇及甲醇溶剂系统可能最具代表性。用乙醇或甲醇溶解 MAGE-2 疏水性表位多肽样品进行色谱分析时发现, 合成的 MAGE-2 表位多肽在检测波长为 214 nm 时峰面积的百分比都偏小, 显示其合成时氨基酸偶联率较低, 由此结果推出的低偶联率与理论上单个氨基酸的平均偶联率 (99.5%) 差距太大; 下一步骤表位多肽的氨基酸组成分析也未发现有诸如半胱氨酸等可能导致折叠异构的氨基酸存在。为了解除这一困惑, 本实验随机选用了固相合成的 MAGE-2 表位多肽 (171~179), 通过不同溶剂处理后, 利用 LC/MS 技术对其反相色谱行为作了初步的研究。

2 实验部分

2.1 主要仪器及试剂

HP1100 高效液相色谱仪; PE API 2000 LC/

MS/MS 仪; PE SCIEX Analyst 1.1 质谱分析软件; Waters Symmetry C₁₈ 分析柱 (粒度 5 μ m, 孔径 10 nm, 柱内径 3.9 mm, 柱长 150 mm); 乙腈 (HPLC 级, 浙江临海); 三氟乙酸 (TFA, HPLC 级, 美国 Sigma 公司); 乙醇 (分析纯, 重庆东方试剂厂); 甲醇 (HPLC 级, 浙江临海); 二甲基亚砜 (DMSO) (分析纯, 苏州正兴化工研究所); 十万分之一电子天平 (德国 Sartorius)。

2.2 样品预处理

电子天平精确称量 1 mg 固相合成的疏水性 MAGE-2 表位多肽 (171-179), 其氨基酸组成为脯氨酸-异亮氨酸-丝氨酸-组氨酸-亮氨酸-酪氨酸-异亮氨酸-亮氨酸-缬氨酸, 理论上的相对分子质量为 1 054, 分别溶于 2 mL 乙醇、甲醇、二甲基亚砜、50% (体积分数) 乙醇、50% (体积分数) 甲醇中, 配成质量浓度为 0.5 g/L 的上样溶液, 待用, 然后再从配好的乙醇、甲醇溶样样品中各取 1 mL 加 1 μ L 的 TFA 酸化处理后待上样^[4]。

2.3 LC/MS 方法

HP1100 HPLC 反相色谱条件: 流动相 A, 15% (体积分数) 乙腈水溶液, 含 0.1% (体积分数) TFA; 流动相 B, 45% (体积分数) 乙腈水溶液, 含 0.1% (体积分数) TFA; 梯度洗脱程序: 0% B $\xrightarrow{15 \text{ min}}$ 100% B, 流速 1 mL/min; 柱后 1/5 分流 (即 200 μ L/min) 到电喷雾离子源 (ESI)。PE API2000 质谱条件: 扫描 Q1 正离子, 质谱扫描范围为 400 amu ~ 1 200 amu; GAS1: 45 L/min; GAS2: 80 L/min; CUR: 40 L/min; TEM: 350 $^{\circ}$ C; CAD: 0 V; IS: 4 800 V; NC: 2 μ A; DP: 30 V; FP: 350 V; EP: -10 V; DF: 0 V;

CEM :1 800 V^[5]。分别取样 20 μL 上样 ,重复 2 次。

3 结果与讨论

分析发现乙醇或甲醇预处理后的 MAGE-2 表位多肽在紫外 214 nm 处检测得到的色谱图与质谱检测的总离子流色谱图表现出类似的结果,见图 1 及图 2(以下甲醇溶样 LC/MS 图略)。从两种图谱中可以看到,因紫外检测器在前、质量检测器在后,故保留时间略有差异。从总离子流中提取 MAGE-2 表位多肽带单正电荷的子离子流图谱可以明显观察到 10.22 min 主峰之前有异构体出现(见图 2)样品子离子流色谱图与总离子流色谱图形态相似,这也说明合成的 MAGE-2 表位多肽纯度较高;同时由图 2-b 单正电荷子离子流谱图可以看到 1.41 min 出现

样品穿过峰;图 3 为有异构代表性的保留时间为 1.41 min,9.43 min 及 10.02 min 三峰的 MS 图谱。

观察 DMSO 及 50% 乙醇溶样样品的离子流色谱图(图 4、图 5),发现其反相色谱图主峰前无异构体出现,主峰离子信号强度明显增强;且经 DMSO 预处理的样品未发生样品穿过,同时根据保留时间的比较可知,MAGE-2 表位多肽在反相柱上的色谱保留行为并未受到影响。因此,用乙醇、甲醇预处理 MAGE-2 表位多肽后作 RP-HPLC/UV 分析时若仅从紫外检测色谱图分析,其分析结果将严重失真。

将乙醇、甲醇溶样样品酸化后进行 LC/MS 分析,发现其异构程度大为降低,样品进样时色谱穿过峰消失,带单正电荷的子离子流的色谱峰信号强度增强(见图 6)。

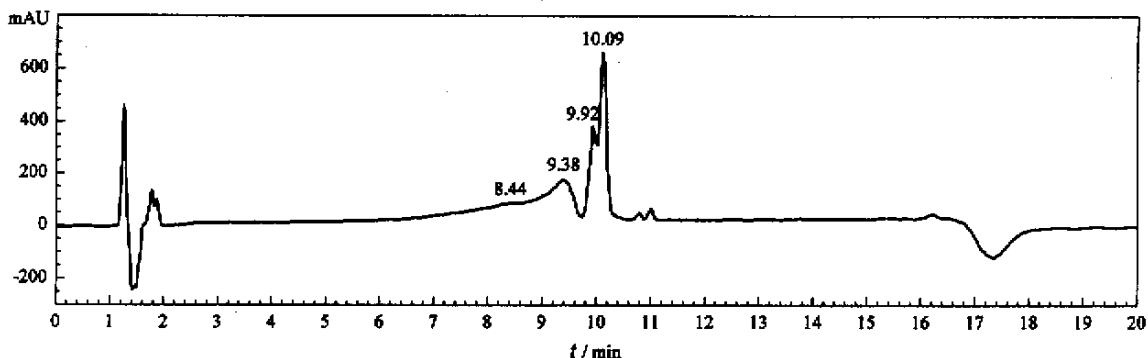


图 1 乙醇溶解的表位多肽在检测波长为 214 nm 的色谱图

Fig.1 Chromatogram of epitope peptide dissolved with ethanol and detected at 214 nm

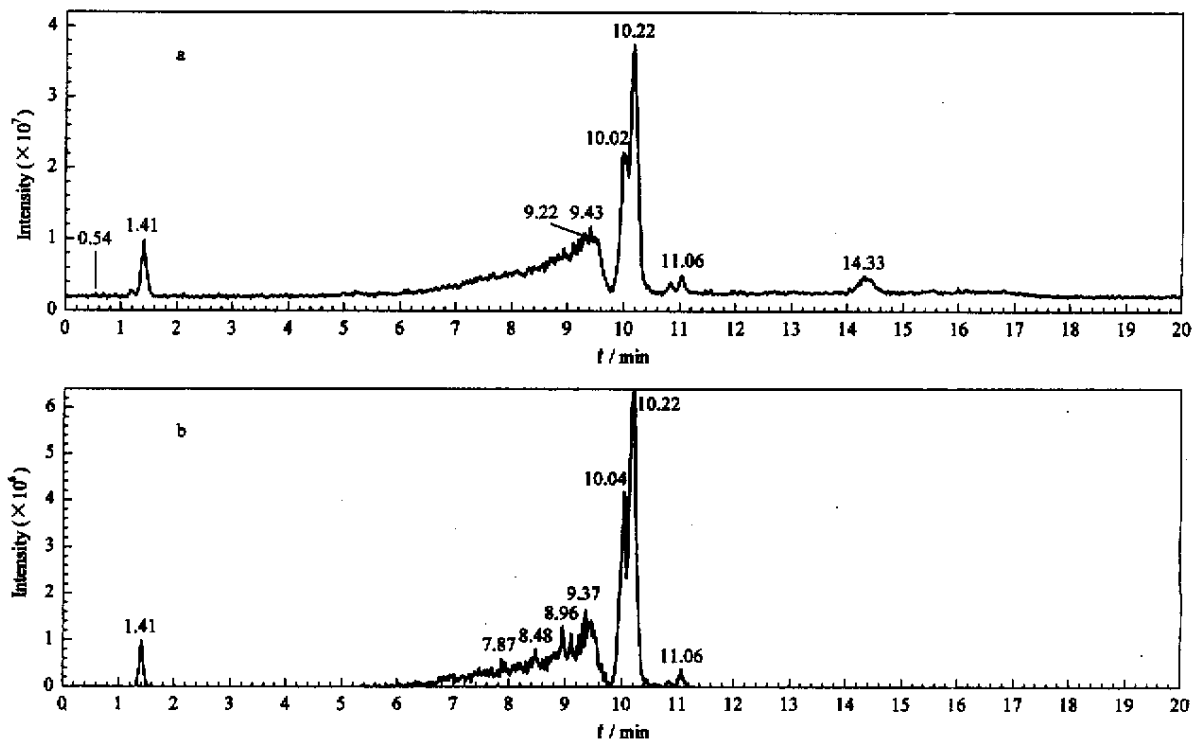


图 2 乙醇溶解的表位多肽的总离子流色谱图(a)及子离子流色谱图(b)

Fig.2 Total ion chromatogram (a) and daughter ion chromatogram (b) of epitope peptide dissolved with ethanol

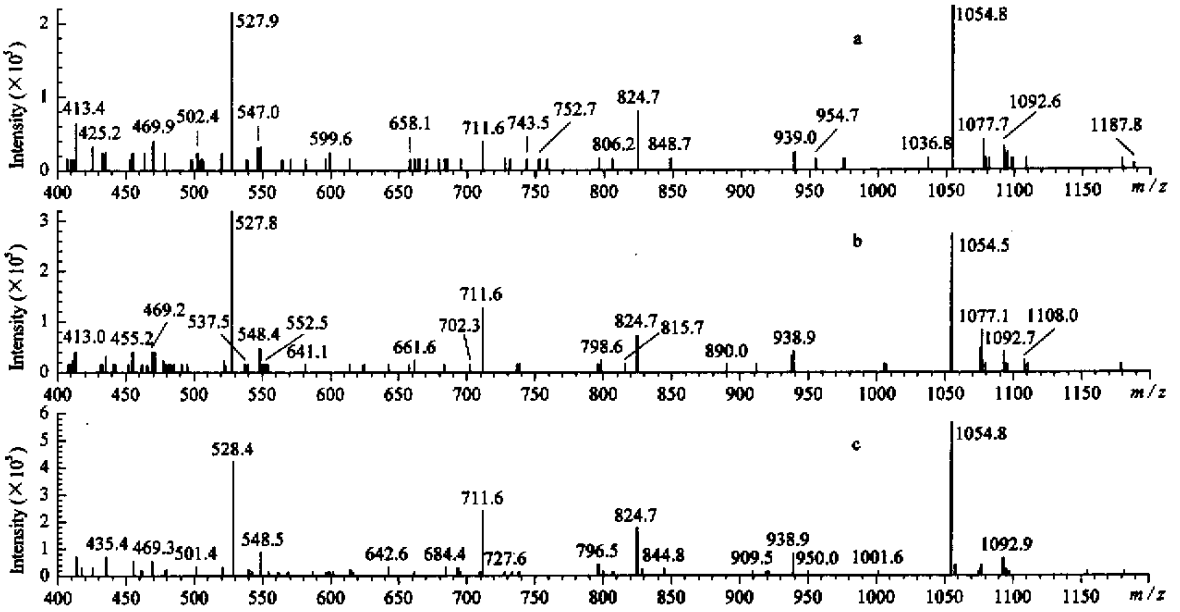


图 3 图 2-a 中保留时间分别为 1.41 min (a) , 9.43 min (b) 及 10.02 min (c) 的色谱峰的质谱图

Fig.3 Mass spectra of peaks with retention times of 1.41 min (a) , 9.43 min (b) and 10.02 min (c) in Fig. 2-a

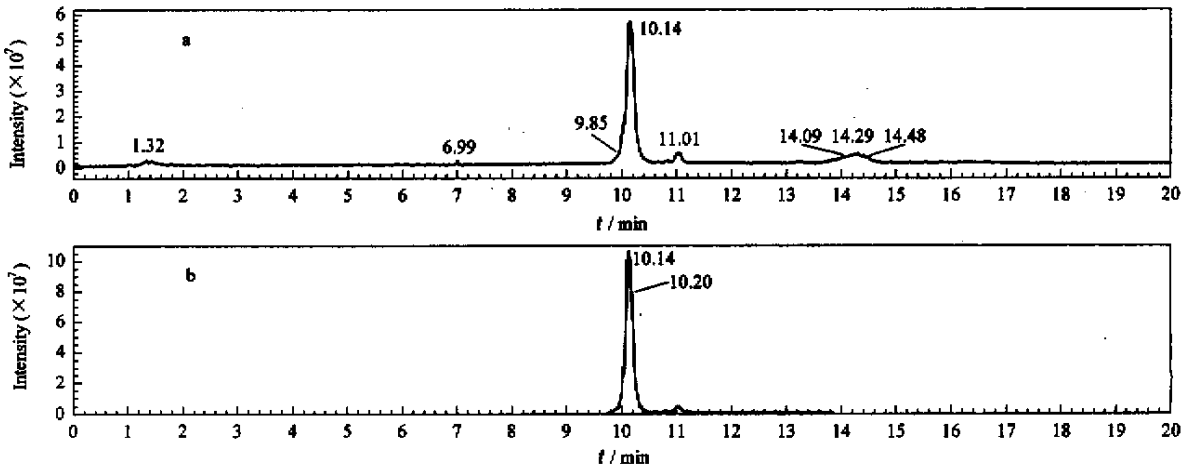


图 4 DMSO 溶解的表位多肽的总离子流色谱图 (a) 及子离子流色谱图 (b)

Fig.4 Total ion chromatogram (a) and daughter ion chromatogram (b) of epitope peptide dissolved with DMSO

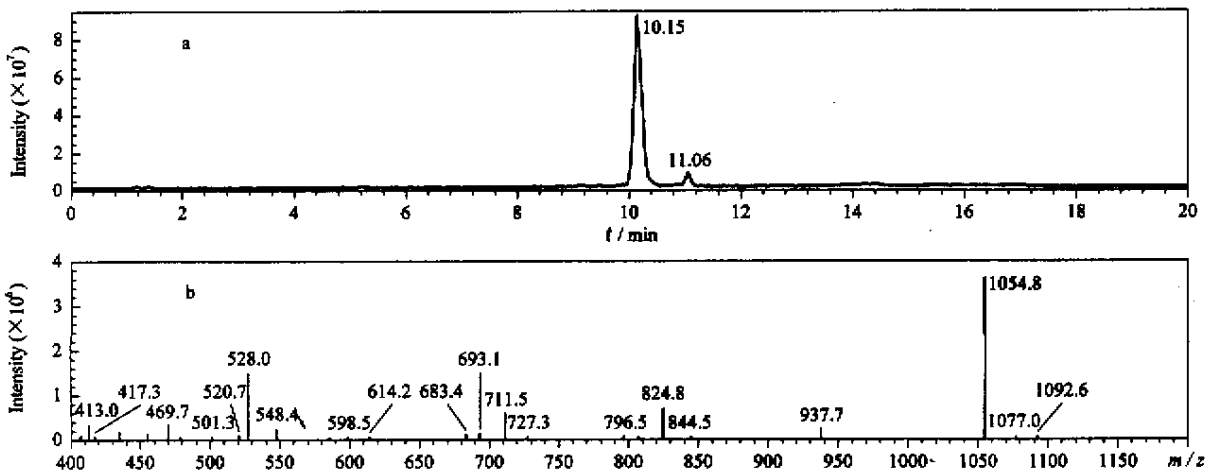


图 5 50% 乙醇水溶液溶解的表位多肽的总离子流色谱图 (a) 及质谱图 (b)

Fig.5 Total ion chromatogram (a) and mass spectrum (b) dissolved with 50% aqueous ethanol solution of epitope peptide

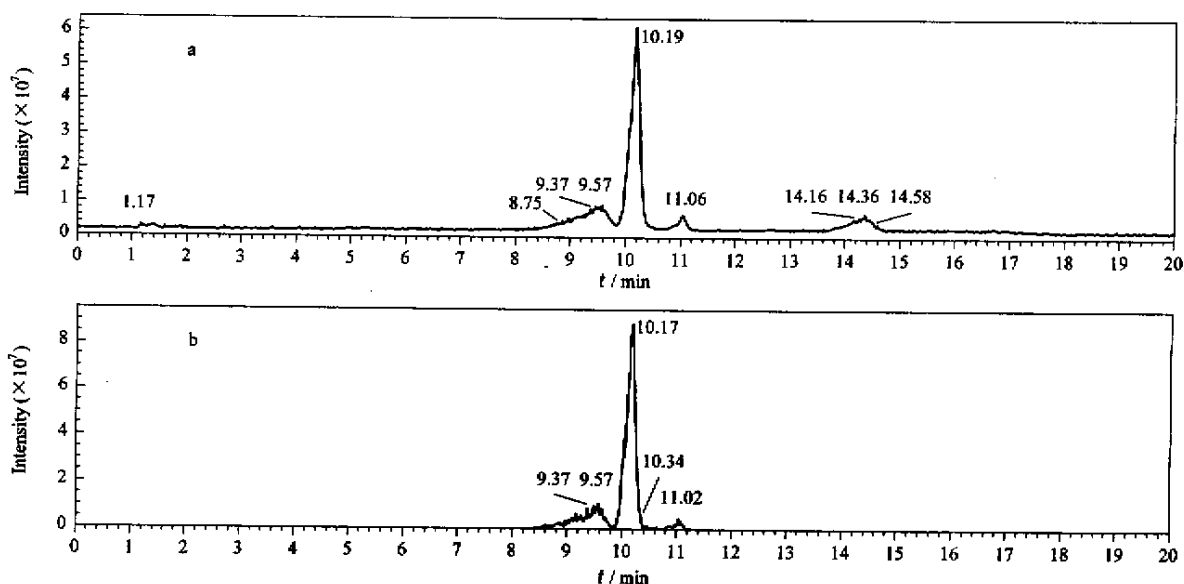


图 6 乙醇溶解的表位多肽酸化后的总离子流色谱图(a)及子离子流色谱图(b)

Fig.6 Total ion chromatogram (a) and daughter ion chromatogram (b) of acidified epitope peptide dissolved with alcohol

综上所述,本实验利用 LC/MS 技术通过对随机选取的固相合成的 MAGE-2 疏水性表位多肽 Q1 正离子扫描发现:用乙醇、甲醇预处理 MAGE-2 表位多肽(171~179)后进行 RP-HPLC 分析仅从 UV 214 nm 检测得到的峰面积积分估算其多肽合成效率将导致分析结果的严重偏差,这种偏差会将错误的信息反馈给前期多肽固相合成阶段,因此若以此溶剂体系预处理样品然后进行 RP-HPLC 纯化,无疑会因溶剂诱导的异构而丢失大量目的肽样品,造成一定程度的经济损失。既往研究表明,固相合成的含脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)或酪氨酸(Tyr)的表位多肽都有类似的现象发生,核磁共振分析显示线性多肽的异构与其组成中 Pro 环的形成以及 Phe、Tyr 中的芳香环存在有关^[6]。这可能与多肽在不同溶剂条件下产生的构象不同有关。从本实验异构现象在反相色谱柱上的表现分析,异构的可能原因是 MAGE-2 表位多肽中 Pro 使多肽链在乙醇或甲醇溶剂中的走向形成不同的折角,这种构象的变化影响了其在反相柱上的洗脱特性,从而产生液相上的异质性,乙醇及甲醇诱导的这种异构在酸化后可得到较大程度的逆转。而 50%(体积分数)的水相或强极性的有机溶剂 DMSO 则抑制了这种异构的发生,这可能与溶剂的极性或 DMSO 强的抗氧化性能有关。

本实验运用 LC/MS 技术分析证实了 MAGE-2 表位多肽(171~179)在乙醇及甲醇溶样后,采用常规的 UV 检测器在 214 nm 检测多肽肽键的吸收存在失真、少算目的肽的现象。说明对含 Pro、Phe 或

Tyr 残基的疏水性表位多肽,采用酸化的乙醇、甲醇溶样为好,在不影响样品色谱方法分辨率的前提下,采用极性溶剂 DMSO 溶样也不失为一种选择,对溶解性较好的疏水多肽应适当降低有机相的含量。总之,本研究提示在小肽,尤其是小于 50 个氨基酸的线性多肽的 RP-HPLC/UV 分析及制备时,应注意其溶剂系统的选择,让表位多肽溶于极性或非极性的溶液以防止可能的异构现象发生^[7],使固相合成疏水性表位多肽有一个真实的色谱评价。

参考文献:

- [1] GENG Miao, JIA Zheng-cai, WAN Ying, et al. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2000, 22(10): 934-936
耿 淼,贾正才,万 瑛,等. 第三军医大学学报, 2000, 22(10): 934-936
- [2] Madden D R. Ann Rev Immunol, 1995, 13: 587-593
- [3] Tbarbosa J, Sanz Nebot V, Toro I. J Chromatogr A, 1996, 725(2): 249-253
- [4] Boyes B E, Coates S W. HP Application Note. 228-372
- [5] ZHOU Wei, WU Yu-zhang, BIAN Jiang, et al. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2000, 22(10): 972-973
周 伟,吴玉章,边 疆,等. 第三军医大学学报, 2000, 22(10): 972-973
- [6] Yao J, Dyson H J, Wright P E. J Mol Biol, 1994, 243(4): 754-766
- [7] Higgins K A, Bicknell W, Keah H H, et al. J Pept Res, 1997, 50(6): 421-435

LC/MS Research on the Isomers of Special Melanoma Antigen-Encoding Gene-2 Epitope Peptide Induced by Solvent

ZHOU Wei , WU Yu-zhang , BIAN Jiang ,
JIA Zheng-cai , TANG Yan , ZOU Li-yun

(Institute of Immunology PLA , The Third Military Medical University , Chongqing 400038 , China)

Abstract : To study the influence of different solvent systems on the isomers of melanoma antigen-encoding gene -2(MAGE-2) epitope peptide synthesized by Merrifield 's solid synthesis method , MAGE-2(171-179) epitope peptides were pre-treated using ethanol and methanol systems respectively , and then analysed by RP-HPLC/MS , with dimethyl-sulphoxide(DMSO) as control solvent. Results demonstrated that 100% ethanol and 100% methanol solvents could induce the production of isomers of MAGE-2 , while 100% DMSO , 50% ethanol and 50% methanol could not. These isomeric peptides could be reversed greatly if treated with trifluoroacetic acid (TFA). The results also showed that the analysis would be distorted and the yield of peptides would decrease dramatically if the peptides were pre-treated with high concentrations of ethanol and methanol before RP-HPLC analysis and preparation. Thus it is suggested that it might be better to decrease the concentration of organic phase in the solvent system for the resolvable hydrophobic peptides , acidified ethanol and methanol might also be better for the highly hydrophobic peptides , and DMSO would be a good solvent for hydrophobic peptides analysis provided that it would not influence the resolving power of chromatography.

Key words : liquid chromatography/mass spectrometry ; melanoma antigen-encoding gene-2 ; epitope peptide ; isomer ; solvent ; induced

2001 科学实验室设备及分析测试仪器(广州)展览会

地 点 : 广州(番禺)贸促展览中心	时 间 : 2001 年 12 月 24 日 ~ 26 日
主办单位 : 中国国际贸易促进委员会番禺支会 广东省高新技术产业商会	承办单位 : 广东亚展科技信息有限公司 番禺贸促展览中心
协办单位 : 广东省应用材料学会 中国国际商会番禺商会	支持单位 : 中国分析测试学会 广东省分析测试学会 广东省无损检测学会 广东省仪器仪表学会

参展范围

1. 各类科研实验设备 : 实验平台、实验培养箱、生物安全柜、药品柜、操作员介面、各种实验室设备、实验家具、环境实验设备、实验室超纯水系列、实验室校准装置、特种光源、电源、变压器、放大镜、显微镜、记录器及显示装置、电子装备、万用表、玻璃器皿及仪器等实验室装置。
2. 各类科学分析检测测试仪器仪表 : 光谱仪、色谱仪、质谱仪、光度仪、光度计、电子天平、TOC 仪、pH 仪、电导仪、酶标仪、水质仪、环境污染监测仪、化学分析仪、粒度分析仪、校验仪、计量泵、测绘仪、衡器、量具、工业检测仪、测厚仪、医疗分析仪器、分析检测系统、电化学分析仪、能谱仪、计数器、信号发生器以及探伤仪等无损检测设备技术。
3. 其他分析测试相关仪器仪表、装置及技术等。
4. 科学实验分析软件、设计软件等。

组委会联络方式

通讯处地址 : 广州市广花五路 79 号 802 室(邮编 510410)	手 机 : 013025171538
接待处地点 : 广州番禺市桥富华路 2 号百越广场 C4-23	电 话 : (020) 86432759(10 线) 86432576
联 系 人 : 吴 凡	传 真 : (020) 86432759

组委会将通过专业媒介杂志、行业协会等各种渠道寄发 8 万份邀请函和 20 万份参观券, 广泛组织邀请国内外各科研机构、实验室、高等院校、冶金、化工、食品、医药、商检、机械、建筑、公路、汽车、环保、电子、生物技术、农业、海洋、光电子等行业人士前来参观、采购、洽谈合作。