

反相高效液相色谱/基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 分离鉴定螺蛳血管紧张素转换酶抑制肽

夏树华, 王 璋

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要 :运用反相高效液相色谱(RP-HPLC)对酶解螺蛳腹足肌得到的血管紧张素转换酶(ACE)抑制肽进行两步分离提纯, 第一步主要得到 8 个组分; 选取其中活性最高的组分进一步分离, 得到 2 个组分, 其中活性较高组分的 ACE 半抑制浓度为 43.5 $\mu\text{mol/L}$ 基本为单一肽组分。对提纯的组分分别使用高效液相色谱/电喷雾离子质谱法(HPLC/ESI-MS)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS)进行分析, 同时结合氨基酸组成分析结果, 最终得到的肽链一级结构为 Lys-Glu-Ile-Trp(KEIW), 符合已知的高活性 ACE 抑制肽的结构规律。经过对两种方法分析过程的比较, 认为 ESI-MS 可以得到多方面的信息, 但无法确定肽的序列; MALDI-TOF MS 可以得到精确的二级质谱图(m/z 精确至 0.0001), 从而可以得到确定的肽的序列。

关键词 :反相高效液相色谱法; 电喷雾离子质谱; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 血管紧张素转换酶抑制肽; 螺蛳

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2007)01-0058-08 栏目类别: 研究论文

Purification and Identification of a Novel ACE Inhibitory Peptide Derived from the Mud Snail *Bellamya purificata* by RP-HPLC/MALDI-TOF MS

XIA Shuhua, WANG Zhang

(Food Science School, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract : *Bellamya purificata* is one of mud snails in fresh water found in China. The purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide extracted from *Bellamya purificata* hydrolysate are described. The peptide was purified twice with semi-preparative reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) to obtain an active fraction with an inhibitory concentration 50% (IC_{50}) of 43.5 $\mu\text{mol/L}$. The primary structure of the purified peptide was identified by the high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (HPLC/ESI-MS) and the matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) combining with the amino acid composition analysis. Finally, it was identified as a tetrapeptide and sequenced as Lys-Glu-Ile-Trp (KEIW), which has the common characters of ACE inhibitory peptide extracted from selfish muscle. The structure identification results from the two methods were also compared in this study. The results from ESI-MS included a lot of information, such as the total ion current chromatogram and ultraviolet scan spectrum. However, the exact structure could only be from the MALDI-TOF MS analysis, in which the exact MS/MS spectrum could be obtained. Furthermore, the m/z measurement precision of MALDI-TOF MS was 0.0001 and much better than that of 0.1 of ESI-MS.

Key words : reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS); matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS); angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide; *Bellamya purificata*

螺蛳是产自我国长江流域且受到普遍欢迎的贝壳产品,其中最常见的是梨形环棱螺(*Bellamya purificata*)^[1],它的腹足肌(靠近螺蛳外壳开口处致密而富有弹性的肌肉组织)是通常的食用部分。

在人体血压调节系统中,血管紧张素转换酶(angiotensin I-converting enzyme, ACE)可以促进血管紧张素 II(已知最强的收缩血管的物质之一)的生成,同时使舒张血管的舒缓激肽失活,从而引发高血压。ACE 抑制肽能作为 ACE 的竞争性底物阻止血管紧张素 II 的生成,起到降低血压的效果。ACE 抑制肽在食品中广泛存在,已经发现的来源有酪蛋白、大豆蛋白、胶原蛋白、鱼贝类肌肉蛋白等。相比人工合成的 ACE 抑制药物,食品中的 ACE 抑制肽具有无副作用、安全性及稳定性好的优点,是目前生物活性肽方面的研究热点之一。

以螺蛳腹足肌为原料,经过酶解及大孔吸附树脂、离子交换树脂、Sephadex G-15 凝胶分离提纯,得到了具有较高 ACE 抑制活性的肽产物^[2,3]。将所得的混合肽用反相高效液相色谱(RP-HPLC)进一步提纯,然后分别采用液相色谱/电喷雾离子质谱法(LC/ESI-MS)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS)对其一级结构进行测

定,并结合氨基酸组成的测定结果加以分析和比较。到目前为止,笔者尚未查阅到国内外关于螺蛳 ACE 抑制肽鉴定研究的文献。

作为一个新的研究领域,蛋白质组学发展的关键是近年来质谱技术的革新。质谱现在可以作为将各种蛋白质与序列数据库联系起来的桥梁,成为鉴定蛋白质及多肽的首选方法。20 世纪 80 年代末出现了两种适合蛋白质研究的软电离质谱,即电喷雾质谱和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱。前者能提供丰富的结构信息,但即使采用串联质谱,其质量精度最高只能达到 0.1;后者能精确测定肽的相对分子量,测定速度快,效率高,操作较容易,灵敏度可高达 30 ~ 100 fmol(10^{-15} mol)^[4-6],但对样品的纯度要求比较高。质谱法结合具有高分离效能的 RP-HPLC,可以对肽链的一级结构进行有效的测定。

肽段在质谱分析中的断裂是有规律的,主要的断裂方式和形成的碎片类型如图 1 所示。从 N 端开始以 a, b, c 表示,从 C 端开始以 x, y, z 表示。这些碎片还可进一步形成脱水、脱氨的离子,但 b 系列和 y 系列离子出现这种离子的几率较大,这是由于肽链中酰胺键较容易断裂^[7]所致。

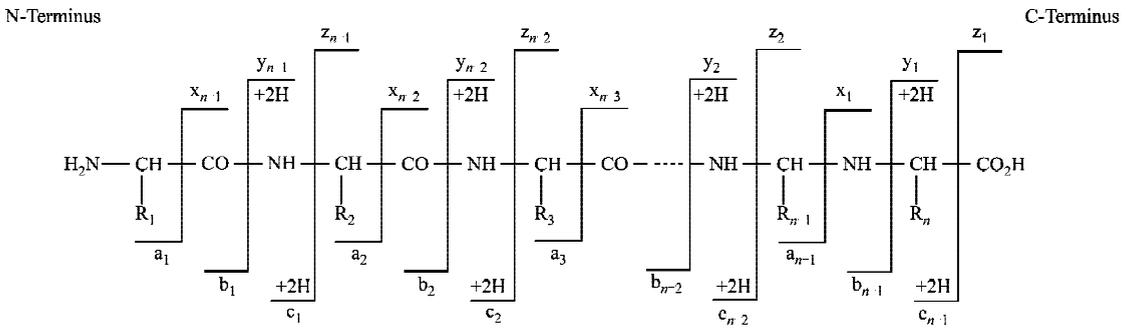


图 1 肽主链碎片及命名
Fig. 1 Sketch map of fragment peptide backbone and the nomenclature

1 实验部分

1.1 原料、仪器与试剂

1.1.1 原料

实验用螺蛳是从无锡青山市场购得的新鲜螺蛳,用 Proleather FG-F 蛋白酶对螺蛳腹足肌进行酶解,经大孔吸附树脂、离子交换树脂、Sephadex G-15 凝胶分离提纯,得到混合肽组分^[2,3],供实验用。

1.1.2 仪器与试剂

WatersTM 600 高效液相色谱仪,配 2487 紫外检测器和 M32 工作站(Waters 公司);Agilent 1100 液相色谱仪(Agilent 公司);Waters Platform ZMD

4000 质谱仪,配 Waters 2690 色谱仪、Waters 996 紫外检测器(Waters 公司);4700 Proteomics Analyzer(Applied Biosystems, USA)。

1.2 实验方法

1.2.1 半制备 RP-HPLC 分离 ACE 抑制肽

HPLC 系统:WatersTM 600 高效液相色谱仪(Waters 公司)。色谱柱:Lichrospher C₁₈ 柱(10.0 mm × 250 mm 5 μm, Hanbon Science & Technology 公司)。流动相:A 5% 乙腈,含 0.05% 三氟乙酸(TFA);B 80% 乙腈,含 0.05% TFA;梯度洗脱程序为 0 ~ 5 min,100% A;5 ~ 20 min,100% A ~ 40% B;20 ~ 30 min,40% B ~ 100% B;30 ~ 34 min,100% B;34 ~ 38 min,100% B ~ 100% A;38 ~ 43 min,100%

A ;流速 :3 mL/min。检测波长 :220 nm ;进样量 :100 μ L。

1.2.2 RP-HPLC 进一步分离 ACE 抑制肽

HPLC 系统 :WatersTM 600 高效液相色谱仪 (Waters 公司)。色谱柱 :Hypersil BDS-C₁₈ 柱 (2.1 mm \times 150 mm ,3 μ m) ;流动相 :A ,5% 乙腈 ,含 0.05% TFA ;B ,80% 乙腈 ,含 0.05% TFA ;梯度洗脱程序为 0 ~ 5 min ,100% A ;5 ~ 20 min ,100% A ~ 40% B ;20 ~ 25 min ,40% B ~ 50% B ;25 ~ 30 min ,50% B ~ 100% B ;30 ~ 33 min ,100% B ;33 ~ 35 min ,100% B ~ 100% A ;35 ~ 40 min ,100% A ;流速 :1 mL/min。检测波长 220 nm。进样量 20 μ L。

1.2.3 ESI-MS 分析

质谱仪 :Waters Platform ZMD 4000 质谱仪 ,配 Waters 2690 色谱仪、Waters 996 紫外检测器 ;分析柱 :Atlantis C₁₈ 柱 (2.1 mm \times 150 mm 3 μ m) ;流动相 :A ,水 ,含 0.1% 甲酸 ;B ,乙腈 ;线性梯度洗脱程序为 100% A $\xrightarrow{30 \text{ min}}$ 100% B ;进样量 :10 μ L。离子化方式 :ESI(+) ;毛细管电压 3.88 kV ;锥孔电压 :60 V ;离子源温度 :100 $^{\circ}$ C ;脱溶剂气温度 250 $^{\circ}$ C ;质量扫描范围 m/z 150 ~ 1 000 ;光电倍增器电压 :700 V ;真空度 2.6 mPa ;雾化气流量 :4.2 L/h。

1.2.4 MALDI-TOF MS 分析

质谱仪 4700 Proteomics Analyzer Applied Biosystems(USA) MALDI-TOF-TOF MS) ;分析软件为 4700 ExplorerTM Software。

点样方式 先点 0.5 μ L 的样品于 MALDI 不锈钢靶板上 ,自然干燥后再点上 0.5 μ L 0.5 g/L α -氰基-4-羟基肉桂酸(CCA)溶液(溶剂为 0.1% TFA + 50% 乙腈) ,在室温下自然干燥。另点 0.5 μ L 0.5 g/L CCA 溶液(不点样品)作为空白对照。

质谱分析 激光源 :355 nm 波长的 Nd :YAG 激光器 ,加速电压 20 kV ,质量扫描范围 m/z 100 ~ 800。

MS 分析参数 碰撞诱导解离(CID) :关 ;相对分子质量范围 :100 ~ 3 000 ;固定激光强度 :6 000 ;数字转换器 :容度 1.0 ns。

MS/MS 分析参数 CID :开 ;前体离子质量窗口 :分辨率相对值为 80%(最高峰的半峰宽) ;固定激光强度 :7 000 ;数字转换器 :容度 0.5 ns。

检索数据库 利用 De Novo Explorer 分析软件进行分析。

1.2.5 氨基酸组成分析

样品制备 :称样品约 20 mg 于水解管中 ,加入含 5% SnCl₂ 的 5 mol/L NaOH(碱水解)或 1 mL 6 mol/L HCl(酸水解) ,抽真空 ,封口 ,于 110 $^{\circ}$ C 下水

解 24 h。转移定容后过滤 ,滤液中加入 6 mol/L HCl 中和(碱水解)或在加 NaOH 的真空干燥器中蒸干并加盐酸溶解(酸水解) ,用邻苯二甲醛(OPA)衍生后待测定。

色谱条件 :Agilent ZORBAX Extend-C₁₈ 柱 (4.0 mm \times 125 mm 5 μ m) 。流动相 :A ,20 mmol/L 醋酸钠液 ;B ,20 mmol/L 醋酸钠液-甲醇-乙腈(体积比为 1:2:2) ;梯度洗脱程序 :0 ~ 25 min ,100% A ~ 50% B ;25 ~ 29 min ,50% B ~ 100% B ;29 ~ 29.5 min ,100% B ;29.5 ~ 31.5 min ,100% B ~ 100% A ;31.5 ~ 40 min ,100% A ;流速 1.0 mL/min。柱温 40 $^{\circ}$ C ;检测波长 :于 262 nm 波长下检测 Pro ;于 338 nm 波长下检测其他氨基酸。

1.2.6 ACE 抑制活性的测定

ACE 抑制肽的活性强弱以 ACE 半抑制浓度 IC₅₀ 值(指抑制 50% ACE 的活性所需抑制剂的浓度)表示。

样品溶于超纯水 ,配制成所需浓度。取 10 μ L 样品和 20 μ L ACE(0.1 U 溶于 1.0 mL pH 8.3 的 0.05 mol/L 硼酸缓冲液 ,其中含 0.3 mol/L NaCl) ,于 37 $^{\circ}$ C 下保温 6 min ,加入 40 μ L 6.5 mmol/L 底物(hippuroyl-L-His-L-Leu 溶于相同的缓冲溶液中) ,于 37 $^{\circ}$ C 下反应 30 min ,加入 80 μ L 1 mol/L 的 HCl 溶液终止反应。冷却至室温后取 10 μ L 反应产物进样 ,通过 RP-HPLC 谱图测定马尿酸的生成量 ,以马尿酸的生成量来判断样品对 ACE 活性的抑制作用 ,同时做空白对照。

样品的 ACE 活性抑制率 = (对照的马尿酸峰面积值 - 样品的马尿酸峰面积值) \times 100% / 对照的马尿酸峰面积值。

色谱条件 :Waters 600 HPLC 仪 ,配二极管阵列检测器(DAD) ;色谱柱为 Symmetry C₁₈ 柱 (3.9 mm \times 150 mm 5 μ m) ;流动相为 12% 乙腈(含 0.5% 乙酸) ;流速为 1.0 mL/min ;检测波长为 238 nm ;进样量为 10 μ L ;柱温为 30 $^{\circ}$ C。

2 结果与讨论

2.1 半制备 RP-HPLC 分离 ACE 活性抑制肽

待分离的混合肽经半制备 RP-HPLC 分离后主要得到 8 个组分(见图 2) ,分别收集并冷冻干燥后测定 ACE 活性抑制率 ,结果如图 3 ,其中组分 8 (F8) 的抑制活性最强。从梯度洗脱程序看 ,在此区域内采用的是降低流动相极性(即降低流动相中水的含量) 的线性梯度洗脱 ,因此可知组分 8 为一疏水性较强或肽链较长的肽段^[8]。

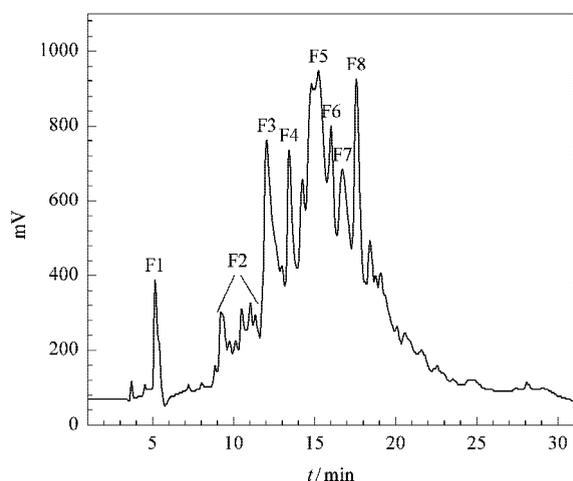


图 2 半制备 RP-HPLC 分离肽组分的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of the peptides separated by semi-preparative RP-HPLC

Column: Lichrospher C₁₈ (10.0 mm × 250 mm, 5 μm); mobile phase: A, 5% acetonitrile containing 0.05% TFA; B, 80% acetonitrile containing 0.05% TFA; gradient elution program: 0–5 min, 100% A; 5–20 min, 100% A–40% B; 20–30 min, 40% B–100% B; 30–34 min, 100% B; 34–38 min, 100% B–100% A; 38–43 min, 100% A; flow rate: 3 mL/min.

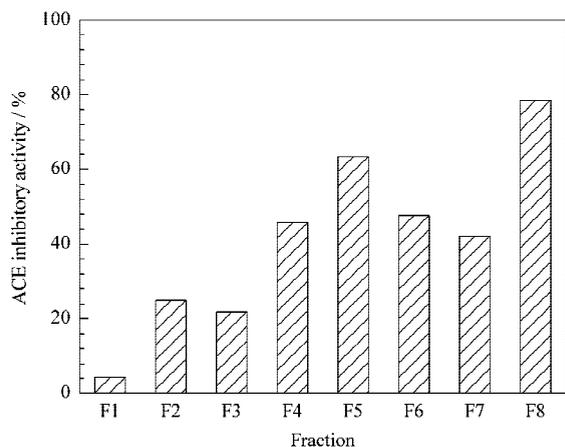


图 3 半制备 RP-HPLC 分离得到的组分的 ACE 活性抑制率 (肽的质量浓度为 0.05 mg/mL)

Fig. 3 ACE inhibitory activity of fractions from semi-preparative RP-HPLC (0.05 mg/mL peptide)

取抑制活性最高的组分 F8, 用分辨率更高的半制备 RP-HPLC 分离后主要得到 2 个组分 (见图 4), 分别收集 2 个组分并测定其 ACE 活性抑制率, 结果表明组分 F8-2 的抑制活性较高 (该组分质量浓度为 0.02 mg/mL 时, ACE 活性抑制率为 43.8%), 进一步测定结果表明其 IC₅₀ 值为 43.5 μmol/L。

2.2 HPLC/ESI-MS 分析结果

取组分 F8-2 进行 ESI-MS 分析, 图 5 为所得到的总离子流色谱图。图 6 为组分 F8-2 的紫外全波长扫描图。从图 6 中可看出除在 224.6 nm 处有强吸收外, 在约 280 nm 处也有一明显的吸收峰, 这说明该组分中含有芳香族氨基酸 (Phe, Trp 或 Tyr)。

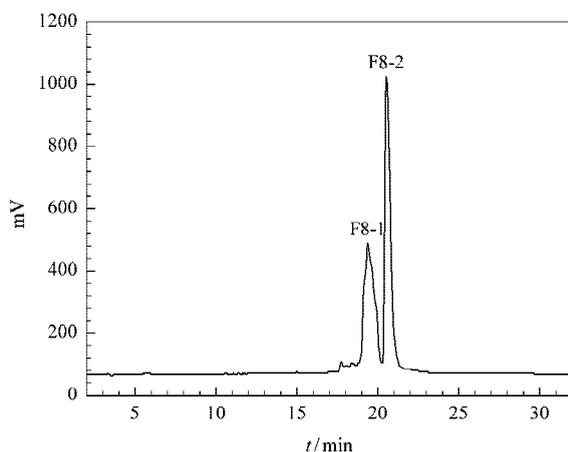


图 4 半制备 RP-HPLC 进一步分离组分 8 的图谱

Fig. 4 Chromatogram of the fraction 8 separated further by semi-preparative RP-HPLC

Column: Hypersil BDS-C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 3 μm); mobile phase: A, 5% acetonitrile containing 0.05% TFA; B, 80% acetonitrile containing 0.05% TFA; gradient elution program: 0–5 min, 100% A; 5–20 min, 100% A–40% B; 20–25 min, 40% B–50% B; 25–30 min, 50% B–100% B; 30–33 min, 100% B; 33–35 min, 100% B–100% A; 35–40 min, 100% A; flow rate: 1 mL/min.

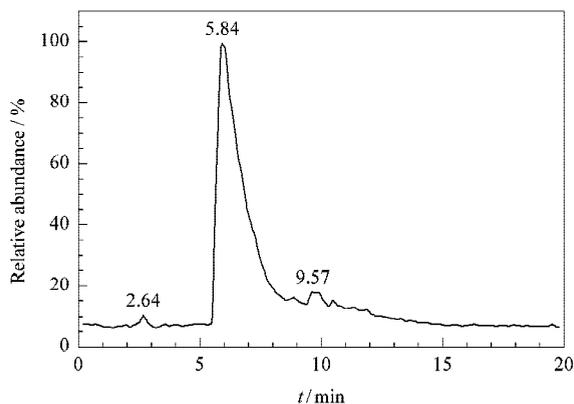


图 5 组分 F8-2 的电喷雾一级质谱总离子流色谱图

Fig. 5 ESI-MS total ions current chromatogram of fraction F8-2

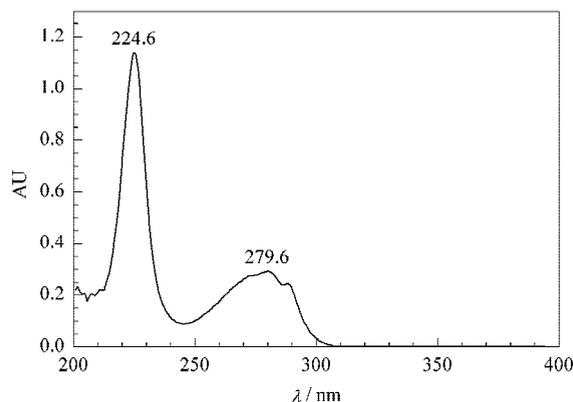


图 6 组分 F8-2 的紫外全波长扫描图

Fig. 6 Ultraviolet full wavelength scan spectrum of fraction F8-2

在组分 F8-2 的 ESI-MS 一级质谱图(见图 7)中, m/z 575.4 峰的丰度最大, 在 m/z 597.3 和 613.4 处分别显示出 $[M + Na]^+$ 和 $[M + K]^+$ 的峰。

由于只显示出单一分子离子峰($[M + H]^+$), 表明经两步 RP-HPLC 分离纯化后所得组分基本为单一肽。此外, 其质荷比精度较低, 只能达到 0.1。

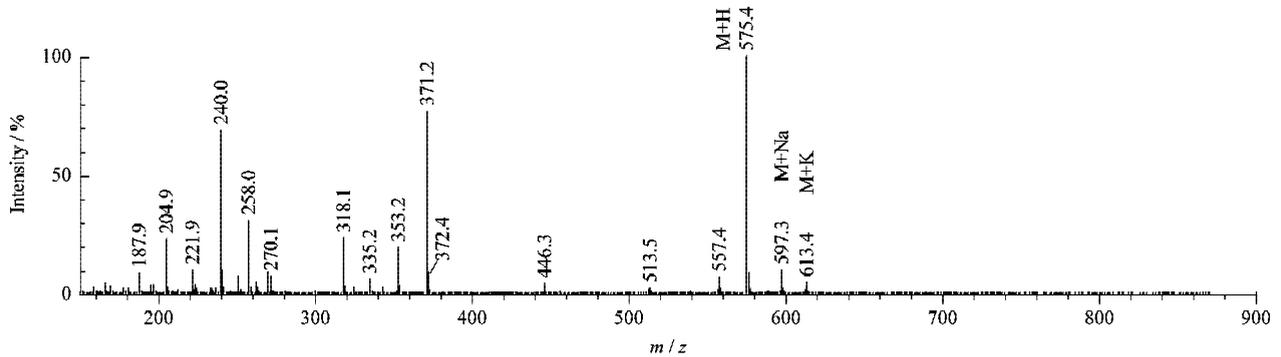


图 7 组分 F8-2 的电喷雾离子化一级质谱图

Fig. 7 ESI-MS spectrum of fraction F8-2

Column : Atlantis C₁₈(2.1 mm × 150 mm , 3 μm); mobile phase : A , 0.1% formic acid solution ; B , acetonitrile ; gradient elution program : 100% A $\xrightarrow{30 \text{ min}}$ 100% B ; mass scan range : m/z 150 - 1 000 ; analyser vacuum : 2.6 mPa (2.6×10^{-5} mbar) ; gas flow rate : 4.2 L/h.

利用电喷雾质谱解析软件(Masslynx 工作站中 Biolynx 软件)分析, 所得氨基酸序列主要有两种可能 : BQLW 和 WALW , 匹配度分别为 100% 和 80%。这个分析结果虽然匹配度很高, 但由于检测精度不高因而序列并不能完全确定, 且分析过程中还发现如果改变分析参数则会得到更多不确定的结果。更重要的是, 对这一组分进行进一步的氨基酸组成分

析, 所得结果(见图 8)与这两种序列都不同。从图 8 中可以看出, 该组分酸水解后主要检出 3 种氨基酸(Glu(E), Ile(I)及 Lys(K)), 碱水解后检出含有 Trp(W) (图 8-b 中后一个峰为在碱水解条件下依然有显示的 Ile)。此外, 碱水解的分析结果也从另一角度确证了分析图 6 时得出的肽段中含有芳香族氨基酸(Trp)的结论。

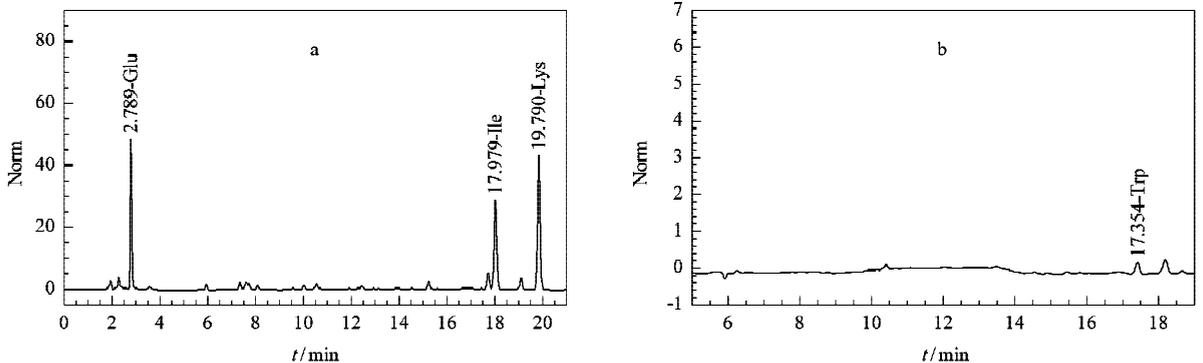


图 8 组分 F8-2 的氨基酸组成分析图谱

Fig. 8 Profile of amino acid compositions of fraction F8-2

a. acid hydrolysis ; b. alkali hydrolysis.

2.3 MALDI-TOF MS 分析结果

鉴于 ESI-MS 分析结果的不精确性且与氨基酸组成分析结果相矛盾, 我们又用精度更高的 MALDI-TOF-TOF MS 进行分析。图 9 为基质和组分 F8-2 的 MALDI-TOF MS 一级质谱图。经比较可看出, 组分 F8-2 的质谱图中 m/z 575.319 8 处有一丰度很高的分子离子峰, 这与 ESI-MS 质谱分析结果 (m/z 575.4) 吻合, 但精度大大提高。

选择该分子离子峰进入二级飞行时间质谱进行

分析, 所得结果如图 10 所示, 其中 m/z 371.445 4 , 318.378 5 和 240.305 6 等处丰度较强的峰在 ESI-MS 谱图中也有出现, 而在更低质荷比区域 ($m/z < 200$) 内, 从峰的丰度来看, 显然 MALDI-TOF-TOF MS 更为灵敏。而从这一区域所显示出的离子特征峰可直接分析出肽段中含有哪种氨基酸残基。

将 $m/z < 200$ 的区域进一步放大(见图 11-a)后可以初步推断有哪些可能存在的残基。经软件分析并标注(见图 11-b), 可以看出在此区域内显示

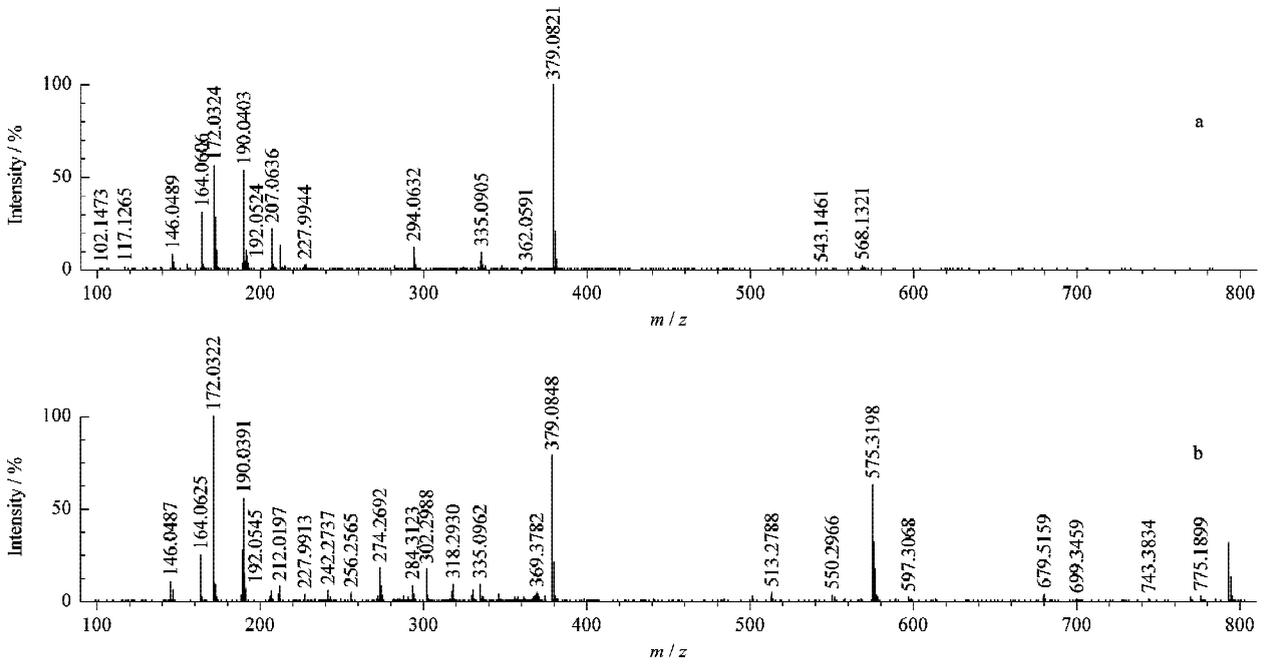


图 9 (a)基质和(b)组分 F8-2 的 MALDI-TOF MS 一级质谱图

Fig. 9 MALDI-TOF MS spectra of (a) matrix and (b) fraction F8-2

CID : off ; mass scan range : m/z 100 - 3 000 ; fixed laser intensity : 6 000 ; digitizer : bin size (1.0 ns).

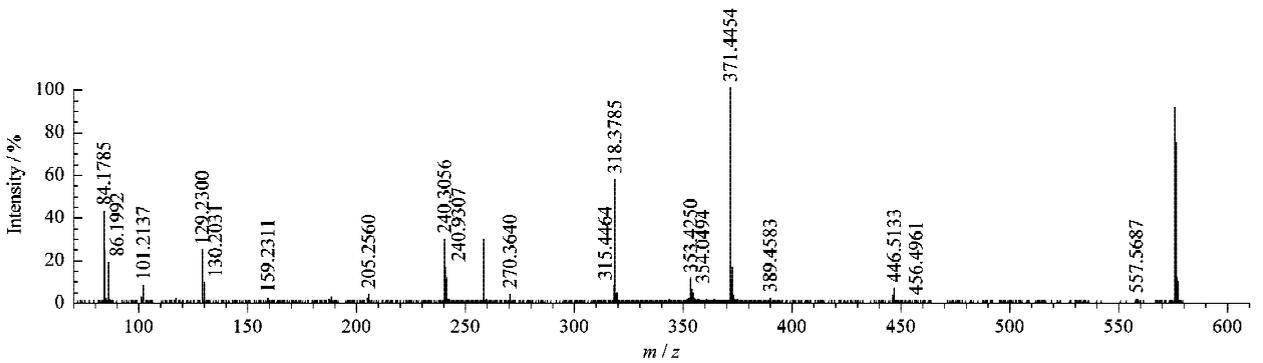


图 10 图 9-b 中 m/z 575.3198 的分子离子的 MALDI-TOF-TOF MS 二级质谱图

Fig. 10 MALDI-TOF-TOF MS spectrum of m/z 575.3198 in Fig. 9-b

CID : on ; precursor mass windows : relative 80% resolution (FWHM) ; fixed laser intensity 7 000 ; digitizer : bin size (0.5 ns).

L(Leu), K(Lys), E(Glu)及 W(Trp)4 种氨基酸的多个相关特征离子峰 ,其中分别标注为 L、K、E 及 W 的 4 个峰所对应的是这 4 种氨基酸的亚氨正离子的质荷比 (氨基酸的种类与相关特征离子峰的对应关系见文献 [9])。其中 L(Leu)与 I(Ile)的相关特征离子峰是完全相同的 ,因此图 11-b 中也有可能反映的是 I 的离子峰。

在得到肽段的氨基酸残基种类的信息之后 ,运用 De Novo Explorer 分析软件对这几种氨基酸排列的顺序进行分析。对应于图 10 ,对相应的碎片进行标注后得到图 12 ,可见其中丰度较强的主要离子峰都可以从结构上进行解释 ,而且质谱图中大部分出现的是 b 和 y 系列碎片 ,这验证了肽链中酰胺键较容易断裂的推断。

经过一系列的分析 ,最后分析软件就这个肽组分给出的氨基酸序列为 KELW。由于软件无法区分 L(Leu)与 I(Ile) ,因此必须结合图 8 中氨基酸组成分析的结果进行鉴别 ,这样可以认定肽段中含有 I(Ile)。

国际上通常要求相对分子质量低于 1 000 的物质的测定值与计算值的误差应在 5×10^{-6} 以内^[10] ,根据这个肽段所得出的精确计算的相对分子质量为 574.3115 ,其分子离子 $[M + H]^+$ 质量则应为 $574.3115 + 1.0078 = 575.3193$,而质谱图中显示实测的相对分子质量为 575.3198 ,误差仅为 8.7×10^{-7} ,从这一角度也说明了就这一结构来讲理论分析与实测结果十分吻合。

综合以上分析 ,可以从质谱和氨基酸组成分析

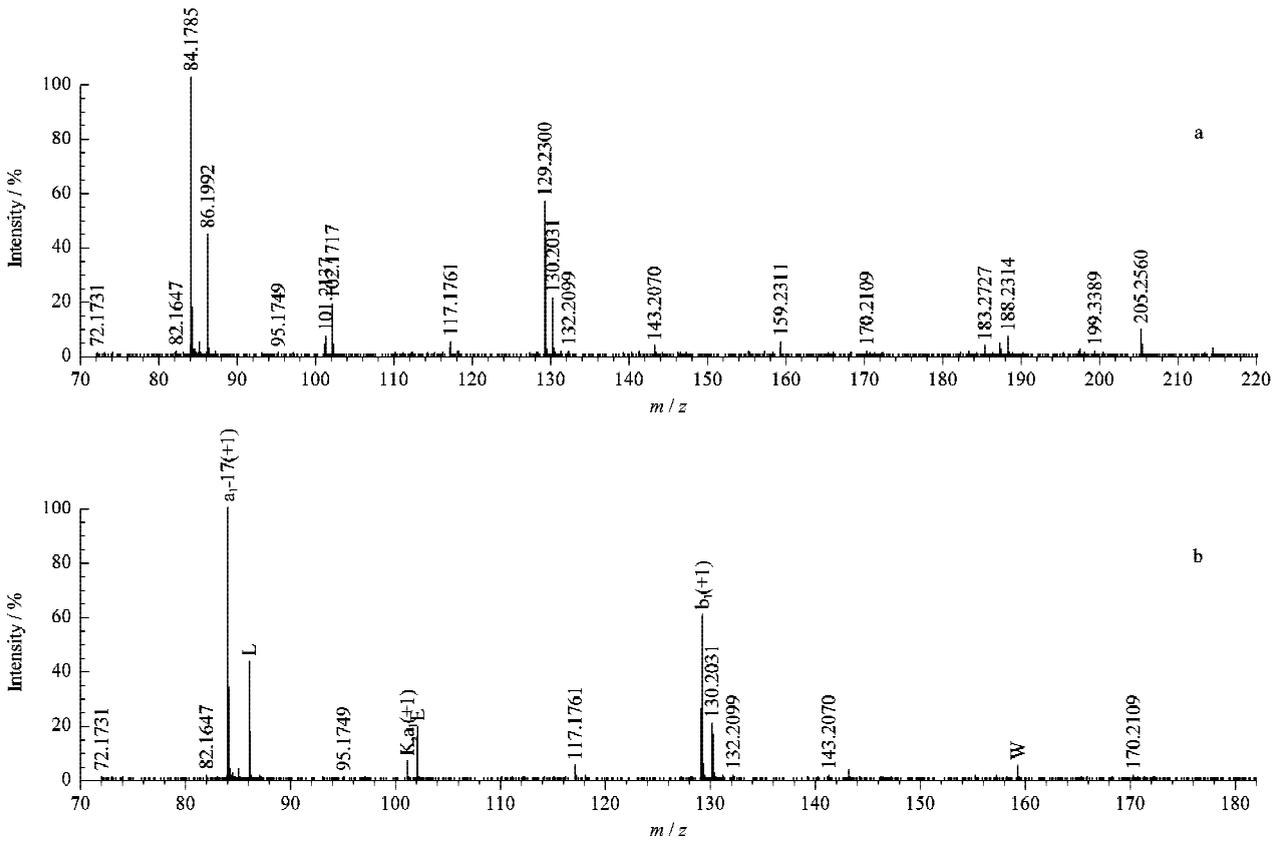


图 11 图 10 中 $m/z < 200$ 区域的 MALDI-TOF-TOF MS 二级质谱图
 Fig. 11 MALDI-TOF-TOF MS spectra of $m/z < 200$ in Fig. 10
 a. enlarged drawing ; b. fragment labeled.

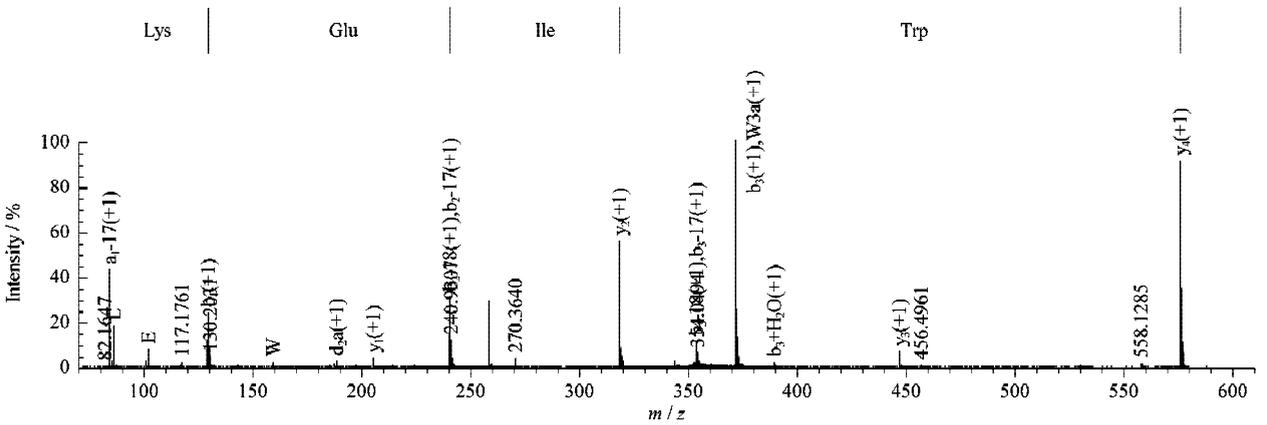


图 12 MALDI-TOF-TOF MS 二级质谱图(残基标注图)
 Fig. 12 MALDI-TOF-TOF MS spectrum (fragment labeled)

两方面确证组分 F8-2 肽段的氨基酸序列为 KEIW (即 Lys-Glu-Ile-Trp)。

对比以上一系列 ESI-MS 和 MALDI-TOF-TOF MS 分析得到的肽组分氨基酸序列的结果,可看出 HPLC/ESI-MS 的分析结果精度不高,质荷比精度只能达到 0.1,而且仅凭所得到的一级质谱图中相对分子质量的信息不能得到确定的肽的序列,且与氨

基酸组成分析的结果相矛盾,但从其一系列图谱中得到总离子流和紫外扫描等图谱信息。MALDI-TOF-TOF MS 的分析结果精度很高,质荷比精度高达 0.0001;与 ESI-MS 最重要的区别是由于能够得到有特征性的二级谱图,可得到确定的氨基酸序列,且方便快捷,但仪器较为昂贵。氨基酸组成分析对于两种方法都是有利的佐证和必要的补充。

2.4 组分 F8-2 肽段的结构与 ACE 活性抑制关系的探讨

ACE 抑制肽的活性与其氨基酸组成密切相关,不同的氨基酸组成的短肽的抑制活性差别很大。有报道称,目前所发现的 ACE 抑制肽都是 2 ~ 15 肽^[11]。Cheung 等^[12]经研究认为 ACE 抑制肽的抑制活性主要取决于 C 端氨基酸。C 端氨基酸为芳香族氨基酸和脯氨酸时其抑制活性较高;N 端为疏水性氨基酸或碱性氨基酸的肽与 ACE 的亲合力较强,抑制活性也较高。另外,Suetsuna 等^[13]分析了来源于 15 种鱼贝类的 ACE 抑制肽的氨基酸组成,发现来源于鱼类的抑制肽含有丰富的 Asp、Glu、Arg、Pro、Ile 和 Lys,来源于贝类的抑制肽则富含 Asp、Glu 和 Lys。

本文所分离和鉴定的四肽 KEIW,C 端为色氨酸,N 端为赖氨酸,是碱性氨基酸中的一种,结构与肽链长度都符合上述规律,同时其疏水性氨基酸的含量也较高,这样的结构和高疏水性都有利于肽段以竞争性抑制方式结合于 ACE 上。同时肽段中含有的 Lys 和 Glu 也与来源于贝壳类水产品螺蛳的特点相吻合。经过对国内外关于已鉴定序列的 ACE 抑制肽的相关报道进行广泛查询,该肽段为首次发现的 ACE 抑制肽。

3 结论

酶解螺蛳腹足肌得到的 ACE 抑制肽产物经树脂及凝胶分离后,两次运用 RP-HPLC 进行提纯,所得产物基本上为单一肽组分。分别使用 ESI-MS 和 MALDI-TOF-TOF MS 对一级结构进行测定,并结合氨基酸组成的测定结果加以分析和比较,发现 ESI-MS 的分析结果精度不高,而且不能得到确定的氨基酸序列,但可得到一系列相关信息。MALDI-TOF-TOF MS 的分析结果精度很高,质荷比精度高达 0.000 1,重要的是可通过二级谱图得到确定的氨

基酸序列,且方便快捷。而氨基酸组成分析结果也有其必要性。最终确定所得的螺蛳 ACE 抑制肽为一种四肽(KEIW),其 ACE 半抑制浓度为 43.5 $\mu\text{mol/L}$ 。经比较分析,该肽一级结构符合已知的高活性 ACE 抑制肽的结构规律。

致谢 衷心感谢江南大学分析测试中心质谱组的陶冠军老师和高效液相色谱组的戴军老师、陈尚卫老师以及上海复旦大学蛋白质组研究中心的周新文老师在实验及分析中给予的指导与帮助。

参考文献:

- [1] Cao Z G, Jiang X P, An Y. Fisheries Science & Technology Information (曹正光,蒋忻坡,安婴.水产科技情报),1996,23(3):108
- [2] Xia S H, Wang Z. Journal of Food Science and Biotechnology (夏树华,王璋.食品与生物技术学报),2006,25(5):91
- [3] Xia S H, Wang Z, Xu S Y. Food and Fermentation Industries (夏树华,王璋,许时婴.食品与发酵工业),2006,32(2):116
- [4] Wang Y W, Wang L, Gu J K, Chen G, Zhong D F, Zhou H. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王英武,王玲,顾景凯,陈刚,钟大放,周慧.分析化学),2003,31(6):709
- [5] Deng H M, Lai Z H, Li J, Cha Q M, Zhao S K. Acta Biochimica et Biophysica Sinica (邓慧敏,赖志辉,黎军,查庆民,赵善楷.生物化学与生物物理学报),2000,32(2):179
- [6] Medzihradsky K F, Adems G W, Burlingame A L, Bateman R H, Grenn M R. J Am Soc Mass Spectrom,1996,7(1):1
- [7] Fenn J B, Mann M, Meng C K, Wong S K. Mass Spectrom Rev,1990,9(1):37
- [8] Purcell A W, Zhao G L, Aguilar M I, Hearn M T. Chromatographia,1999,52(1):43
- [9] Peptide Fragmentation. [2006-04-18]. http://www.matrixscience.com/help/fragmentation_help.html
- [10] Editorial Board of J Am Chem Soc. J Am Chem Soc,1999,121(1):7A
- [11] Li G H, Le G W, Shi Y H, Shrestha S. Nutr Res,2004,27:469
- [12] Cheung H S, Wang F L, Ondetti M A, Sabo E F, Cushman D W. J Biol Chem,1980,255:401
- [13] Suetsuna K, Yamagami M, Kuwata K. Nippon Suisan Gakkaishi,1988,54(10):1852