

反相高效液相色谱-质谱联用法测定抑菌肽功能单元的氨基酸序列

陈 兵, 王雅珍, 黄薇薇, 王艳梅, 马宇亮

(黑龙江工业学院 环境工程系, 黑龙江 鸡西 158100)

摘要: 测定乳酸菌发酵液中小分子抑菌肽抑菌功能单元的氨基酸组成序列对于深入理解其抑菌原理并实际应用有重要意义。作者利用 AssayMAP Bravo 蛋白纯化系统平台, 采用色谱-质谱联用法将相对分子质量为 3 500 的抑菌肽样品经过凝胶过滤色谱分离纯化, 两步反相高效液相色谱分离纯化和二维质谱鉴定, 得到高纯度、高抑菌活性的三个抑菌功能单元, 氨基酸组成序列分别为 Phe-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Ala, Asn-Glu-Arg-His 和 Lys-Glu-Ile-Thr-Pro-Ser-Glu-Arg, 即该小肽的功能单元由三个短肽组成。结果表明, 利用该方法, 能够有效地提取并检测该小分子抑菌肽, 其在氨基酸组成上与 Nisin 不同。

关键词: 小分子抑菌肽; 凝胶过滤色谱; 反相高效液相色谱; 二维质谱; 氨基酸序列

中图分类号: Q 51 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)05—0522—06

Determination of Amino Acid Sequence of Antibacterial Peptide Function Units by Using RPHPLC-MS Method

CHEN Bing, WANG Yazhen, HUANG Weiwei, WANG Yanmei, MA Yuliang

(Department of Environmental Engineering, Heilongjiang University of Technology, Jixi 158100, China)

Abstract: The objective of this study is to determine the amino acid sequence of antibacterial peptide function units from *Lacticacid bacteria* fermented liquid, it has important significance for deep understanding of the antibacterial principle and practical application. According to the AssayMAP Bravo protein purification system, the experiment used the RPHPLC-MS method, got three components of high purity and high antibacterial activity from the 3.5 KDa small antibacterial peptide samples by using Gel-Filtration Chromatography, two-steps Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography and two-dimensional Mass Spectrometry. The amino acid sequence of three antibacterial peptide function units had been measured, respectively were Phe-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Ala, Asn-Glu-Arg-His and Lys-Glu-Ile-Thr-Pro-Ser-Glu-Arg. The experimental conclusion is that the antibacterial function units of small peptide consists of three short peptides, using this method can effectively extract and detection of the small antibacterial peptide, and the amino acid composition of 3.5 KDa small antibacterial peptide is different from

收稿日期: 2013-07-30

基金项目: 黑龙江省青年科学基金项目(HC2013C026)。

*通信作者: 陈 兵(1982—), 男, 黑龙江鸡西人, 工学硕士, 副教授, 主要从事生物技术与应用方面的研究。E-mail: ark10@163.com

Nisin.

Keywords: small antibacterial peptide, gel-filtration chromatography, reversed-phase high performance liquid chromatography, two-dimensional mass spectrometry, amino acid sequence

乳酸杆菌(*Lacticacid bacteria*)是食品工业上的常用菌种,其代谢产物及性质一直是科研工作者的研究热点。近些年有报道提取了一类在抑菌方面与 Nisin^[1]类似的混合肽,并测定出其相对分子质量组成大致 3 500、14 000、22 000 三部分^[2],但是关于其氨基酸组成及序列等方面,很少有文献报道。作者将上述混合肽的 3 500 组分进一步分离纯化,采用凝胶色谱-反相高效液相色谱-质谱法,对该小肽的抑菌功能单元进行了氨基酸组成测序,验证其在氨基酸组成上与 Nisin^[1]不同,对于人工模拟合成这类活性物质有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

3 500 小肽干粉^[3]:黑龙江工业学院食品分析实验室;Sephadex G-25:美国 GE 公司;Agilent ZORBAX 300 StableBond-C18 (4.6/250):美国 Agilent 公司;色谱纯乙腈,色谱纯三氟乙酸(TFA),测序级 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA):美国 Sigma 公司;乙酸铵、磷酸盐等化学试剂:均为分析纯。

1.2 仪器设备

Agilent 1200 HPLC 色谱仪, AssayMAP Bravo 蛋白纯化系统:美国 Agilent 公司;MALDI-TOF-MS 串联飞行时间质谱仪:美国 ABI 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 Sephadex G-25 凝胶色谱分离纯化 取 0.1 g 小肽干粉,用 0.01 mol/L Tris-H₃PO₄ 溶解,加入 1.5 mg/mL 胰蛋白酶,在 37 °C 水浴中酶解 1 h。取上清液,在水浴中超纯水萃取 15 min^[4],涡漩 3 次后收集溶液,用 0.05 mol/L 的 pH 7 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液稀释至 10 mg/mL,待上样分离。

将 100 g Sephadex G-25 干胶 1:3 体积加水充分溶胀,装柱。采用 AssayMAP Bravo 蛋白质纯化系统^[5],设定 0.2 mL/min 流速,以 0.05 mol/L、pH 7 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液平衡色谱柱,上样量 10 mL,检测波长 280 nm,等梯度洗脱^[6],以 5 mL 为单位分管收集。

将各接收管进行抑菌试验^[7],对比抑菌效果。选择抑菌效果较强的收集管内溶液进行反相高效液相色谱^[8]分离纯化。

1.3.2 反相高效液相色谱一步分离纯化 将凝胶色谱分离所得的较高抑菌活性组分,利用 Agilent ZORBAX 300 StableBond-C18(4.6/250)反相色谱柱进行进一步分离纯化。设定流速 0.5 mL/min,上样量 2 mL,检测波长 215 nm,流动相 A:10 mmol/L pH 8 的乙酸铵和 2% 的乙腈,流动相 B:70 % 的乙腈,梯度条件:0~40% B(30 min 内)。上样分离,收集洗脱液,将各接收管进行抑菌试验,对比抑菌效果。重复上样,选择收集抑菌效果较强的管内溶液,进行二步分离纯化。

1.3.3 反相高效液相色谱二步分离纯化 经一步分离纯化后,收集得到抑菌活性较强的组分,采用相同色谱柱再次分离纯化。设定流速 0.5 mL/min,上样量 0.5 mL,检测波长 215 nm,流动相 A、B 与一步分离纯化操作相同,梯度条件:0~20% B (15 min 内)。上样分离,收集洗脱液,将各接收管进行抑菌试验,对比抑菌效果。重复上样,选择收集抑菌效果较强的管内组分,进行质谱鉴定。

1.3.4 二维质谱鉴定分析 经反相高效液相色谱两步分离纯化,收集到高纯度、高抑菌活性组分,用串联飞行时间质谱仪 MALDI-TOF-MS 4700 进行二维质谱鉴定^[9]。根据一级质谱^[10]和二级质谱^[11]的鉴定结果分析序列组成。

先将 0.5 μ L 组分样品点在 MALDI 靶盘上,自然晾干。再点用 0.1%TFA 和 50%乙腈为溶剂配置的 0.5 g/L 的 CHCA 基质溶液 0.5 μ L^[12],覆盖于组分样品上,自然晾干。同时点 0.5 g/L 的 CHCA 溶液 0.5 μ L 做空白。选定 Nd:YAG 激光器为质谱激光源,波长 355 nm,电压 20 kV,设定程序为阳离子及自动获取模式进行数据采集。组分样品及基质的肽质量指纹图谱扫描范围为 300~3 500。用 Novo Explorer 软件分析工具从头测序。

采用负离子质谱^[13]跟踪由亮氨酸和异亮氨酸衍生的乙内酰苯硫脲的[M-H]⁻离子,来区分相同分

子质量的不同氨基酸。

2 结果与分析

2.1 Sephadex G-25 凝胶色谱分离纯化

Sephadex G-25 凝胶色谱分离结果见图 1。

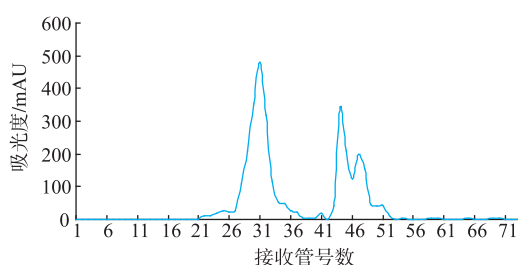


图 1 酶解小肽 Sephadex G-25 凝胶过滤色谱分离图

Fig. 1 Chromatogram of enzymolysis peptide by GFC-25

由图 1 可知,酶解小肽呈现连续吸收谱带,出现三个明显吸收峰,后两个峰没有完全分开。推断该小肽至少由三个功能组分构成,后两个峰的组分的相对分子质量比较接近,需进一步分离纯化。

将各接收管内的液体进行测定抑菌活性,结果见图 2。

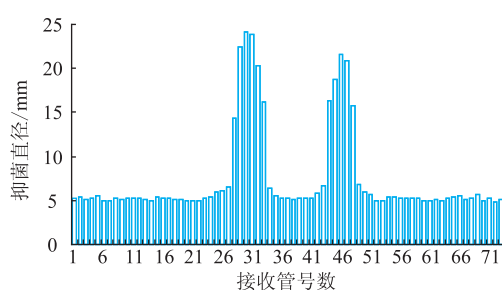


图 2 酶解小肽各洗脱收集管的抑菌效果

Fig. 2 Antibacterial effect of all tube of enzymolysis small peptide

由图 2 可知,酶解小肽经凝胶色谱分离纯化后得到两个强抑菌活性组分,集中在 28~33 号管和 44~48 号管。没有出现第三个抑菌活性较强的组分的原因是,44~48 号管范围内实际包含两个组分,由于相对分子质量接近,靠凝胶色谱分离无法分开。故选定 28~33 号和 44~48 号管进一步分离纯化,分别对应标记为 P-I 和 P-II。

2.2 P-I 反相高效液相色谱一步分离纯化

在 215 nm 检测波长下,分离结果见图 3。因为 Agilent ZORBAX 300 StableBond 反相色谱柱的选择性和分辨率都较高,所以由图 3 可以看出,P-I 组

分经上柱分离后,出现若干个吸收峰,而且峰形基本对称,峰面积较小,表明 P-I 组分物质组成比较复杂。同时,由图 3 可以看出,P-I 组分的分离效果很好,基本没有拖尾现象。

将各接收管内的液体进行抑菌活性测定,结果见图 4。

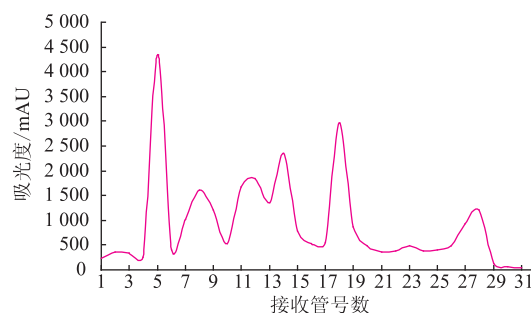


图 3 P-I 反相高效液相色谱一步分离色谱图

Fig. 3 Chromatogram of P-I by 1st RP-HPLC

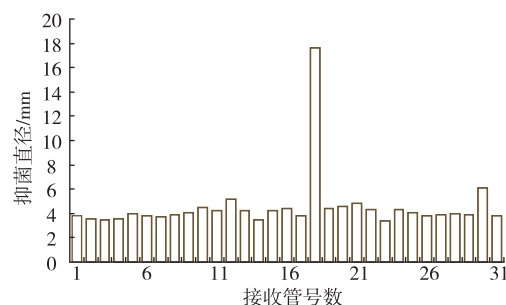


图 4 P-I 一步分离各洗脱收集管的抑菌效果

Fig. 4 Antibacterial effect of P-I all tube by 1st RP-HPLC

由图 4 可知,P-I 经过反相高效液相色谱一步分离后得到一个强抑菌活性组分,集中在第 18 号管,对其标记为 P-I-18,重复上样收集,进行第二步分离纯化,验证其组分是否单一。

2.3 P-I 反相高效液相色谱第二步分离纯化

在 215 nm 检测波长下,分离结果见图 5。

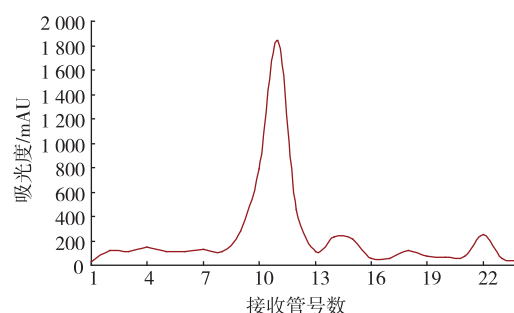


图 5 P-I 反相高效液相色谱第二步分离色谱图

Fig. 5 Chromatogram of P-I by 2nd RP-HPLC

由图5可知,P-I-18组分经过洗脱分离后,得到一个强吸收峰及若干弱吸收峰。这些较弱吸收峰的峰面积远小于强吸收峰,因此可以忽略。图5表明,P-I-18组分经过二步分离纯化后,证实其组成基本单一,无需再进行色谱分离。

将各接收管内的液体进行抑菌活性测定,结果见图6。

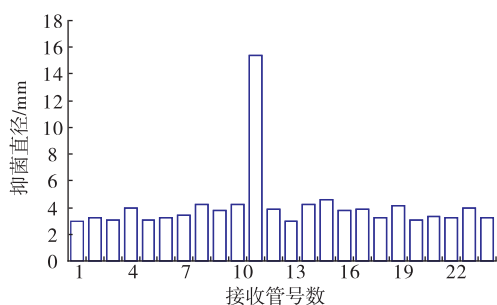


图6 P-I 二步分离各洗脱收集管的抑菌效果

Fig. 6 Antibacterial effect of P-I all tube by 2nd RP-HPLC

由图6可知,P-I-18经过反相高效液相色谱二步分离后只得到一个强抑菌活性组分,集中在第11号管,对其标记为P-I-18-11。同时,图6的抑菌结果也表明了P-I-18确实是单一组分。重复上样收集,进行质谱鉴定。

2.4 P-II 反相高效液相色谱一步分离纯化

在215 nm检测波长下,分离结果见图7。

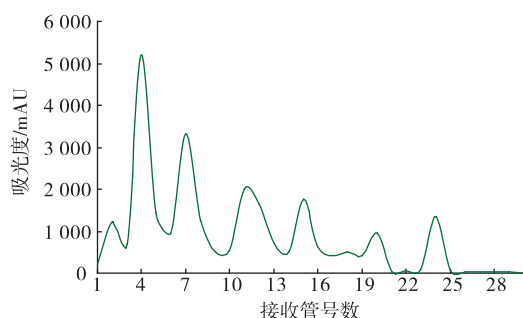


图7 P-II 反相高效液相色谱一步分离色谱图

Fig. 7 Chromatogram of P-II by 1st RP-HPLC

由图7可知,P-II经上柱分离后,出现若干个吸收峰,且峰形基本对称,峰面积较小,表明P-II组分物质组成比较复杂。同时,由图7可以看出,P-II组分的分离效果较好,基本没有拖尾现象。

将各接收管内的液体进行抑菌活性测定,结果见图8。

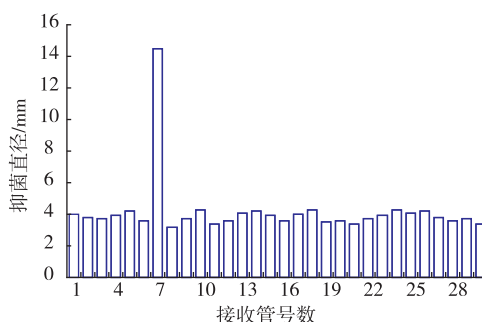


图8 P-II 一步分离各洗脱收集管的抑菌效果

Fig. 8 Antibacterial effect of P-II all tube by 1st RP-HPLC

由图8可知,P-II经过反相高效液相色谱一步分离后得到一个强抑菌活性组分,集中在第7号管,对其标记为P-II-7。重复上样收集,进行二步分离纯化,验证其组分是否单一。

2.5 P-II 反相高效液相色谱二步分离纯化

在215 nm检测波长下,分离结果见图9。

由图9可知,P-II-7组分经过洗脱分离后,得到一个强吸收峰及若干较弱吸收峰。这些较弱吸收峰面积远小于强吸收峰,因此可以忽略。图9表明,P-II-7组分经过二步分离纯化后,证实其组成基本单一,无需再进行色谱分离。

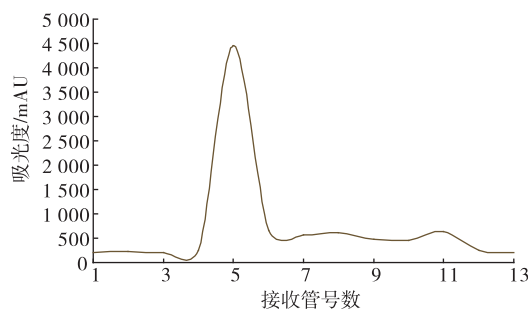


图9 P-II 反相高效液相色谱二步分离色谱图

Fig. 9 Chromatogram of P-II by 2nd RP-HPLC

将各接收管内的液体进行抑菌活性测定,结果见图10。

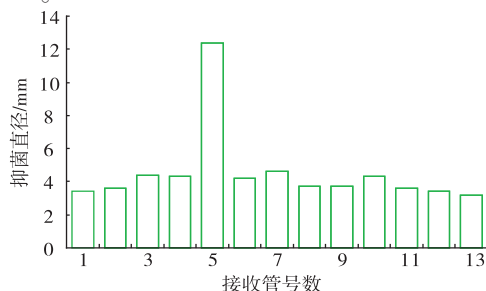


图10 P-II 二步分离各洗脱收集管的抑菌效果

Fig. 10 Antibacterial effect of P-II all tube by 2nd RP-HPLC

由图 10 可知, P-II-7 经过反相高效液相色谱二步分离后只得到一个强抑菌活性组分, 集中在第 5 号管, 对其标记为 P-II-7-5。同时, 图 10 的抑菌结果也表明了 P-II-7 确实是单一组分。重复上样收集, 进行质谱鉴定。

2.6 二维质谱鉴定分析

2.6.1 一级质谱鉴定 组分 P-I-18-11 和 P-II-7-5 经过一级质谱分析, 结果分别见图 11~12。

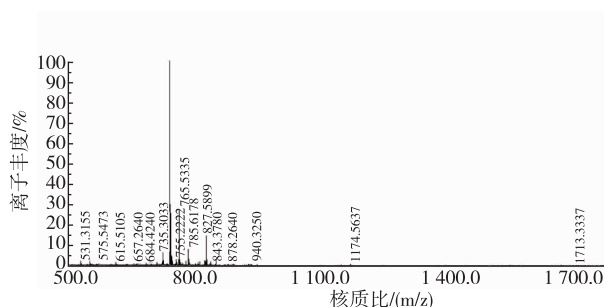


图 11 P-I-18-11 一级质谱图

Fig. 1 Mass Spectrum of P-I-18-11

由图 11 可知, 相对分子质量为 747.57 的肽谱是强度最大的谱带, 该谱带是 3 500 小肽的一个抑菌功能单元, 对其标记为 P-I-18-11- α 。

由图 12 可知, 相对分子质量为 555.30 和 960.60 的肽谱是强度最大的两条谱带, 该这两条谱带是相对分子质量为 3 500 小肽的另外两个抑菌功能单元, 对其分别标记为 P-II-7-5- α 和 P-II-7-5- β 。

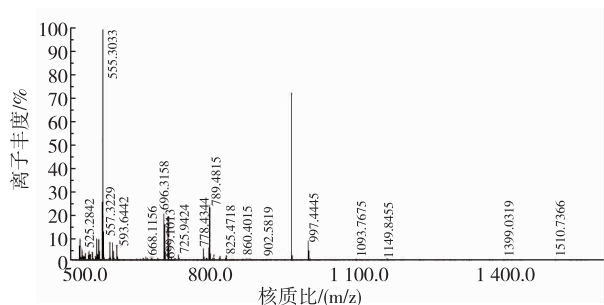


图 12 P-II-7-5 一级质谱图

Fig. 12 Mass Spectrum of P-II-7-5

2.6.2 二级质谱鉴定 P-I-18-11- α , P-II-7-5- α 和 P-II-7-5- β 经过二级质谱分析, 利用软件工具

进行从头测序, 同时采用负离子质谱跟踪鉴定相同相对分子质量的不同氨基酸, 得到上述三个抑菌功能单元的氨基酸组成序列, 结果见表 1。

表 1 抑菌功能单元的氨基酸组成序列

Table 1 Amino acid sequence of antibacterial functional unit

序号	功能单元	氨基酸序列
1	P-I-18-11- α	Phe-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Ala
2	P-II-7-5- α	Asn-Glu-Arg-His
3	P-II-7-5- β	Lys-Glu-Ile-Thr-Pro-Ser-Glu-Arg

3 结 语

对乳酸菌发酵液中的 3 500 小肽经过酶解后进行凝胶色谱纯化分离, 利用 AssayMAP Bravo 蛋白纯化系统平台, 通过反相高效液相色谱-二维质谱联用法对其进行氨基酸组成测序。实验共得到该抑菌小肽的 P-I-18-11- α , P-II-7-5- α 和 P-II-7-5- β 三个抑菌功能单元, 三个单元对应的氨基酸组成序列为: Phe-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Ala, Asn-Glu-Arg-His 和 Lys-Glu-Ile-Thr-Pro-Ser-Glu-Arg。因此初步判定该 3 500 小肽的抑菌功能单元主要由上述三个短肽组成, 分别为一个四肽, 一个六肽和一个八肽, 说明该 3 500 小肽在氨基酸组成上与 Nisin 不同, 对合成该类抑菌活性物质具有一定的指导作用, 对深入理解其抑菌原理并实际应用具有一定的指导意义。

实验只是测定出乳酸菌发酵液抑菌混合肽中 3 500 这个组分的功能单元序列, 而鉴于 14 000 和 22 000 这两个组分的相对分子质量较大, 组成也很复杂, 且分离纯化效果不佳, 没能测得有效序列。其次, 对 3 500 小肽进行酶解处理时, 胰蛋白酶有可能在某种程度上破坏了该小肽的部分有抑菌功能的结构单元, 因而实验最终仅获得三个单元的序列。再者, 该 3 500 小肽来源于乳酸菌发酵液中代谢产物的提纯, 故该小肽中可能含有少量胞外多糖^[14]等杂质, 给抑菌结果和测序带来一定程度的影响。

参考文献:

- [1] 庞瑞霞, 宗楠. Nisin 及其在食品工业中的应用[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(9): 218-220.
PANG Ruixia, ZONG Nan. Nisin and its application in food industry [J]. Food Research and Development, 2011, 32 (9): 218-220. (in Chinese)
- [2] 李秀凉, 雷虹, 张龙丰, 等. 从 L-乳酸菌酸菜发酵液中初步分离肽类抑菌物质[J]. 食品工业科技, 2008, 29(7): 91-93.

- LI Xiuliang, LEI Hong, ZHANG Longfeng, et al. Purification of antimicrobial peptides from juice of sauerkraut fermented by L-lactic acid bacteria[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2008, 29(7): 91-93. (in Chinese)
- [3] 陈兵, 田波, 原韬, 等. 酸菜发酵液中抑菌物质的提取与鉴定[J]. 食品与机械, 2011, 27(5): 123-125, 136.
CHEN Bing, TIAN Bo, YUAN Tao, et al. Extraction and identification of antibacterial substances from sauerkraut juice [J]. **Food and Machinery**, 2011, 27(5): 123-125, 136. (in Chinese)
- [4] 彭咏波, 马永平, 丁世家, 等. 基质辅助激光解析飞行时间质谱分析条件及准确度对蛋白质数据库搜索结果的影响[J]. 分析化学, 2009, 37(3): 319-324.
PENG Yongbo, MA Yongping, DING Shijia, et al. Effect of matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometric analysis conditions and accuracy rating on protein database search in peptide mass fingerprint identify proteins[J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2009, 37(3): 319-324. (in Chinese)
- [5] 胡明冬, 徐剑钺, 周长喜, 等. 甲型副伤寒沙门菌鞭毛蛋白的分离、纯化和鉴定[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25(7): 599-603.
HU Mingdong, XU Jiancheng, ZHOU Changxi, et al. Isolation, purification and identification of flagellar components from *Salmonella paratyphi A*[J]. **Chinese Journal of Microbiology and Immunology**, 2005, 25(7): 599-603. (in Chinese)
- [6] 熊建飞, 周光明, 何强, 等. 离子色谱法测定玄参中的单糖和低聚寡糖[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 340-343.
XIONG Jianfei, ZHOU Guangming, HE Qiang, et al. Determination of monosaccharides and oligosaccharides in figwort root by ion chromatography[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 33(7): 340-343. (in Chinese)
- [7] 吴少辉, 叶伟娟, 黄雪莲, 等. 南五味子抑菌物质的优化提取及抑菌活性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(7): 719-726.
WU Shaohui, YE Weijuan, HUANG Xuelian, et al. Optimum extraction of bioactivity substances and its activity against bacteria and fungus from *Kadsura longipedunculata* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31 (7): 719-726. (in Chinese)
- [8] 王超众, 程速远, 王萌萌, 等. RP-HPLC 法测定注射用尖吻蝮蛇血凝酶的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(1): 22-25.
WANG Chaozhong, CHENG Suyuan, WANG Mengmeng, et al. Content determination of *Heamocoagulase agkistrodon* for injection by RP-HPLC[J]. **Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2013, 33(1): 22-25. (in Chinese)
- [9] 陈晶, 付华, 陈益, 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.
CHEN Jing, FU Hua, CHEN Yi, et al. Application of mass spectrometry on the sequencing of peptides and proteins [J]. **Chinese Journal of Organic Chemistry**, 2002, 22(2): 81-90. (in Chinese)
- [10] 梁振, 张维冰, 张玉奎. 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.
LIANG Zhen, ZHANG Weibing, ZHANG Yukui. Determination of multi-peptide mixture by using CZE coupled with ESI-MS[J]. **Chemical Research In Chinese Universities**, 2004, 25(3): 448-450. (in Chinese)
- [11] 曹书霞, 廖新成, 陈晓岚, 等. 液相色谱/质谱联用分离鉴定小肽混合物[J]. 色谱, 2003, 21(6): 626-626.
CAO Shuxia, LIAO Xincheng, CHEN Xiaolan, et al. Separation of dipeptides by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. **Chinese Journal of Chromatography**, 2003, 21(6): 626-626. (in Chinese)
- [12] 徐昕荣, 朱斌, 马瑜璐, 等. MALDI-TOF-MS 鉴定生物脱氮细菌的方法研究 [J]. 环境科学与技术, 2010, 33 (10): 148-150, 161.
XU Xinrong, ZHU Bin, MA Yulu, et al. Identification of bacteria in wastewater treatment process by MALDI-TOF-mass spectrometry[J]. **Environmental Science and Technology**, 2010, 33(10): 148-150, 161. (in Chinese)
- [13] 罗国安, 王义明, 朱瑛. 质谱在肽和蛋白分析中的应用[J]. 药学学报, 2000, 35(4): 316-320.
LUO Guoan, WANG Yiming, ZHU Ying. Applications of mass spectrometry in analysis of peptides and proteins [J]. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 2000, 35(4): 316-320. (in Chinese)
- [14] 陆冰, 杨贞耐, 张雪, 等. 产胞外多糖乳酸球菌的分离筛选及在 Mozzarella 干酪中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28 (5): 665-669.
LU Bing, YANG Zhennai, ZHANG Xue, et al. Isolation and screening of exopolysaccharide-producing *Lactococci* and their application in *Mozzarella* cheese[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(5): 665-669. (in Chinese)