

纳升级反相液相色谱-串联质谱法分析锦灯笼提取物中的蛋白质

于海洋^{1,2}, 晏嘉泽², 郭明¹, 靳艳^{2*}

(1. 大连大学环境与化学工程学院, 辽宁 大连 116022; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要: 通过水提、酸沉法得到锦灯笼果实提取物, 其中蛋白质含量为 188 mg/g(以提取物干重计), 共含有 18 种氨基酸, 其中 8 种人体必需氨基酸占氨基酸总量的 31%。基于鸟枪法蛋白质组学的分析方法, 用纳升级反相液相色谱-串联质谱(nano-RPLC-MS/MS)系统分析锦灯笼果实提取物中蛋白质的酶解产物, 结合数据库检索, 共鉴定得到 60 种蛋白质; 通过生物信息学分析, 得到锦灯笼提取物中的蛋白质具有催化活性、抗氧化活性、酶调节活性、养分贮液囊活性、运输活性、结合活性六大生物活性, 其中鉴定到与抗氧化相关的蛋白质有 3 种, 为锦灯笼中蛋白质的功能性质的进一步研究奠定了基础。

关键词: 纳升级反相液相色谱-串联质谱; 蛋白质; 锦灯笼

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2013)04-0362-05

Analysis of proteins in the extracts of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino using nanoflow reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YU Haiyang^{1,2}, YAN Jiaze², GUO Ming¹, JIN Yan^{2*}

(1. Environmental and Chemical Engineering College of Dalian University, Dalian 116022, China;

2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: The protein was extracted from *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino fruit by using water extraction and acid precipitation methods, and it consisted of 188 mg/g of protein on dry basis of the extract. Among 18 amino acids, eight essential amino acids for human account for 31% were found in this extract. Based on shotgun proteomics method, the protein extracted from *Physalis* fruit was analysed by nanoflow reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nano-RPLC-MS/MS) system. Combined with database searches and bioinformatics analysis, the protein species and six molecular functions were identified, including with catalytic activity, antioxidant activity, enzyme regular activity, nutrient reservoir activity, transporter activity and binding activity. And three antioxidant activity-related proteins were identified. These results may lay the foundation for further study of the functional properties of the proteins in *Physalis* fruit.

Key words: nanoflow reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nano-RPLC-MS/MS); protein; *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino

锦灯笼 (*Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino) 又名挂金灯、灯笼果、红灯笼、姑娘等, 为茄科酸浆属多年生宿根草本植物, 多分布在俄罗斯、中国、日本以及朝鲜等国家^[1,2]。锦灯笼在各地均有栽培, 以华北、东北产量最大, 质量最好。锦灯笼为带宿萼的果实, 是我国传统的中药, 其性苦

寒、清热解毒、化痰、利尿。我国历代本草书目均有记载, 《本草纲目》中记载“酸浆利湿除热, 除热故清肺止咳, 利湿故能化痰治疔”。锦灯笼中已发现含有黄酮类^[3-5]、脂类^[6]、生物碱类^[7]、萜类^[8]、多糖类^[9]等活性物质, 表现为调节免疫力、抗菌、抗氧化、降血糖、降血脂等活性^[10-13], 但是鲜见关于锦灯

* 通讯联系人. Tel: (0411) 84379576, E-mail: yanjin@dicp.ac.cn.
基金项目: 中国科学院院地合作项目(XBXJ-2011-034).
收稿日期: 2012-11-28

笼中蛋白质的研究。本文通过水提取、酸沉淀法得到锦灯笼果实中水溶性提取物,再将提取物用纳升级反相液相色谱-质谱(nano-RPLC-MS/MS)系统检测及数据库检索分析,鉴定了该提取物中的蛋白质种类,为进一步研究锦灯笼中蛋白质的生物活性奠定了基础。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

购自辽宁省铁岭市西丰县的新鲜锦灯笼果实, -80 °C 储藏备用。

胰蛋白酶(trypsin)、三氟乙酸(TFA)、乙腈(ACN)、牛血清白蛋白(BSA)购自Sigma公司。二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘代乙酰胺(iodoacetamide, IAA)购自Bio-Rad公司。药品和试剂均为分析纯或色谱纯。实验用水均经双蒸处理并用Milli-Q水处理系统(Millipore公司)进行纯化。

机械式搅拌器(IKA RW20)、恒温水浴锅(龙口先科仪器公司)、UV/vis-分光光度计(V-550, JASCO公司)、nano-RPLC-MS/MS系统由Finnigan Surveyor液相色谱泵和LTQ线性离子阱质谱(Thermo-electron Finnigan公司)组成, Magic C18AQ反相色谱填料(5 μm, 10 nm)购自Michrom BioResources公司, 石英毛细管(120 mm × 75 μm)购自Polymicro Technologies公司。

1.2 样品前处理

将剥去宿萼的锦灯笼果实冷冻干燥后粉碎,按照 $m(\text{干粉}):m(\text{水})=1:20$ 的比例加入去离子水,用2 mol/L NaOH溶液调pH至7.0,于30 °C搅拌提取5 h。过滤后滤液用1 mol/L HCl溶液调pH至4.0以沉淀蛋白,于4 °C以9 500 r/min离心20 min。收集沉淀,得锦灯笼提取物。

1.3 蛋白质及氨基酸含量的测定

委托中国科学院沈阳生态研究所农产品安全与环境质量检测中心,根据GB/T 5009.124-2003、GB/T 5009.5-2003等国家标准,测定锦灯笼提取物中蛋白质含量及氨基酸含量。

1.4 锦灯笼蛋白质的酶解

将1.2节中提取得到的锦灯笼提取物溶解在1 mL 100 mmol/L NH_4HCO_3 缓冲液(pH 8.2,含8 mmol/L尿素)中,加入1 mol/L的DTT使其终浓度为20 mmol/L,于60 °C水浴中保温1 h,然后再向体系中加入IAA,使IAA的终浓度为40 mmol/L,室温下避光反应40 min。用100 mmol/L NH_4HCO_3 缓冲液将尿素浓度稀释至1 mol/L。按照 $m(\text{酶}):m(\text{蛋白质})=1:25$ 的比例加入胰蛋白酶,于37 °C下

酶解20 h,加入10% TFA终止酶解反应。酶解后的样品经固相萃取(SPE)柱除盐,冷冻干燥后备用。

1.5 RPLC-MS/MS分析

将毛细管的一端拉成内径约为5 μm的尖端,通过气压将C18AQ填料压入柱内,填充柱长度在12 cm左右。将毛细管的尖端与质谱相连。所用的流动相A为0.1%甲酸溶液,流动相B为乙腈(含0.1%甲酸),流速为200 nL/min。梯度洗脱程序:0~2 min, 98% A; 2~92 min, 98% A~65% A; 92~95 min, 65% A~20% A; 95~105 min, 20% A; 105~107 min, 20% A~100% A; 107~120 min, 100% A。将1.4节中冷冻干燥后的样品用0.1%甲酸配制为0.1 g/L,取10 μL进行质谱分析。

设置离子传输毛细管的温度为200 °C,电喷雾电压为1.8 kV,归一化碰撞能量为35.0%。均使用数据依赖模式(data-dependent mode)对MS和MS/MS进行图谱采集,扫描模式为全扫描(m/z 450.00~1 800.00),紧接着进行全扫描中丰度最高的6个离子峰的MS/MS扫描,其中动态排除(dynamic exclusion)设置为:重复次数(repeat count)为2,重复容忍时间(repeat duration)为30 s,动态排除时间(exclusion duration)为90 s。利用Xcalibur软件(Version 1.4)(Thermo公司)进行系统控制和数据收集。

对实验得到的质谱数据结果在茄科(Solanaceae)蛋白质数据库(Solanaceae.fasta)中进行检索,数据库下载于<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=solanaceae>,数据库检索软件为SEQUEST。所有肽段设置胰蛋白酶全酶切,最高允许两个漏切位点;固定修饰设定半胱氨酸残基Cys(C)被碘代乙酰胺烷基化(+57 Da)。Met(M)设置为可变修饰+15.994 9 Da。前体离子的质量容忍度设置为2 Da,碎片离子的质量容忍度设置为1 Da。检索数据库的结果通过本实验室创建的软件^[14]进行优化。假阳性率(FDR)利用正库、反库检索的方法进行计算, $\text{FDR} = 2n(\text{rev}) / [n(\text{rev}) + n(\text{forw})]$, $n(\text{forw})$ 和 $n(\text{rev})$ 分别代表在正库和反库中检索得到的肽段数目,假阳性率控制在1%以内,从而验证获得结果的可靠性。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法的优化

以提取液中蛋白质含量为评定指标优化提取条件,得到的最优化条件为 $m(\text{锦灯笼粉末}):m(\text{水})=1:20$, pH=7.0, 温度30 °C, 提取时间5 h。将提取液的pH调至4.0,可使提取物沉淀从而达到浓缩

的目的。经过以上提取、浓缩后 在锦灯笼果实干品中锦灯笼水溶性物质的平均收率为 0.187 g/g。利用凯氏定氮法测得水提物(干重)中蛋白质含量为 188 mg/g,其氨基酸组成见表 1,其中以谷氨酸、精氨酸、天门冬氨酸含量最高。

表 1 锦灯笼提取物中氨基酸的组成
Table 1 Amino acid composition of the extract from *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino

Amino acid	Content ^a / (mg/g)
Asp	7.74
Thr	3.53
Ser	4.08
Glu	12.49
Gly	4.78
Ala	3.76
Cys	2.80
Val	3.82
Met	1.09
Ile	2.95
Leu	4.09
Tyr	3.03
Phe	3.35
Lys	2.98
His	1.72
Arg	8.14
Pro	6.91
Trp	2.93

Contents were based on dry extract.

2.2 质谱分析及数据库检索

将锦灯笼提取物中的蛋白质进行酶解处理后,采用 nano-RPLC-MS/MS 系统进行分析 通过改变流动相 A 和流动相 B 的比例优化色谱分离条件。在优化的 RPLC-MS/MS 条件下最后得到的基峰图见图 1。

将质谱分析的数据在茄科(Solanaceae)蛋白质数据库(Solanaceae. fasta)中进行检索 检索得到锦灯笼蛋白 60 种,蛋白质相对分子质量覆盖范围为 1~110 kDa。在 Universal Protein 数据库中搜索鉴定到锦灯笼提取物中的蛋白质主要有以下几大生物功能:催化活性(catalytic activity)、抗氧化活性(antioxidant activity)、酶调节活性(enzyme regular activity)、养分贮液囊活性(nutrient reservoir activity)、运输活性(transporter activity)以及结合活性(binding activity) 在所鉴定的蛋白质中,有些蛋白质同时具有多重生物功能,如 Malic enzyme 同时具有催化活性和结合活性。蛋白质按功能分类情况如图 2 所示(图 2 中数值代表具有该生物功能的蛋白质数量)。

在鉴定的蛋白质中,suberization-associated anionic peroxidase 1、anionic peroxidase、suberization-associated anionic peroxidase 2 这 3 种蛋白质具有抗氧

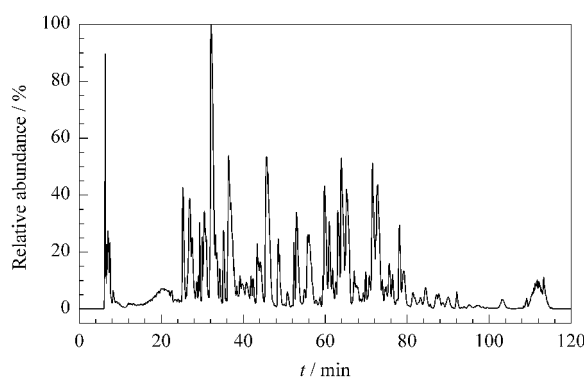


图 1 纳升级反相液相色谱-串联质谱(nano-RPLC-MS/MS)系统分析锦灯笼提取物中蛋白质酶解液的基峰图

Fig. 1 Base peak chromatogram of protein trypsin degradation from *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino by nano-flow reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nano-RPLC-MS/MS)

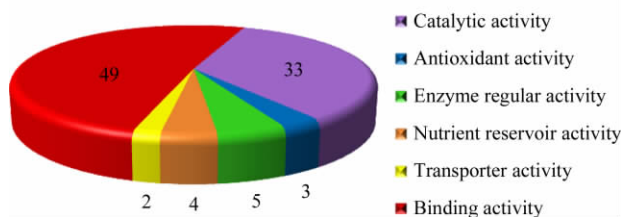


图 2 锦灯笼果实中蛋白质按功能分类情况

Fig. 2 Distribution of the protein in *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino fruit according to the classification of the function in Universal Protein database

化活性。anionic peroxidase 是过氧化物酶中的一类,最为显著的作用是参与活性氧的代谢过程。生物体内 NADH(还原辅酶 I)或 NADPH(还原辅酶 II)能够将氧气还原为 O_2^- ,产生的一部分 O_2^- 进一步歧化为 H_2O_2 和分子氧(O_2),当后者的电子分布发生改变时,就由无毒、无活性的 O_2 变成活性氧——包括过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($\cdot OH$)、超氧阴离子($O_2^{\cdot -}$)等。当这些自由基与细胞膜上的不饱和脂肪酸作用发生脂质过氧化反应,就会产生损害生物膜、酶、活细胞结构的脂质过氧化物^[15],最终导致细胞功能的异常甚至使其失去生物活性^[16]。而 anionic peroxidase 则具有将 H_2O_2 分解为 O_2 和 H_2O 稳定分子的功能,消除了代谢中产生的 H_2O_2 及过剩的自由基,防止了过氧化物对细胞膜系统的伤害,提高了细胞对衰老及不良环境的抗性。鉴定到的这 3 种蛋白质可能与锦灯笼提取物的抗氧化活性具有相关性。

如表 2 所示,在锦灯笼提取物中还鉴定到 20 余种蛋白质具有催化功能。这些蛋白质在生物体新陈

代谢过程中发挥着重要的作用。例如 malate dehydrogenase (MDH) 是生物糖代谢的关键酶之一,它可以催化苹果酸与草酰乙酸之间的氧化脱氢或还原加氢的可逆反应,完成草酰乙酸的再生^[17]。而草酰乙酸作为生物体内生化反应的重要中间产物,在许多

代谢途径中都起着关键作用。此外,MDH 还在细胞的多重生理活动中扮演着重要的角色,涉及线粒体的能量代谢以及植物抗病过程中的活性氧代谢等^[18,19]。

表2 锦灯笼提取物中具有催化活性的蛋白质的分布

Table 2 Distribution of the proteins with catalytic activity in the extract from *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino

Protein function	Protein name
Oxidoreductase activity	NCED, Lox, malic enzyme, LeSSADH, TAP2, anionic peroxidase, MDH, grase, suberization-associated anionic peroxidase 1, GR
Hydrolase activity	pme, CHTB2, endochitinase, chitinase, CHN-B, CHTB4, CHN-A, CHI9, alpha-mannosidase, aspartic protease, beta-1,3-glucanase, sts15, PR4b-Cc, Wound-induced protein, tomQ-a, alpha-galactosidase, A43, TBG5, GN1
Transferase activity	UPTG2, UDP-glucose: protein transglucosylase-like
Lyase activity	THD1_NICAT

还有一些蛋白质具有结合活性(见表3)。其中10余种蛋白具有结合离子(ion binding)的活性,可与亚铁血红素、锌离子、阳离子等相结合;有8种蛋白具有结合DNA(DNA binding)的功能;还有结合脂质(lipid binding)、碳水化合物(carbohydrate binding)以及有机环状化合物(organic cyclic compound binding)和结合辅因子(cofactor binding)功能的蛋白质。一种蛋白质可能同时具有多种生物活性,如chitinase同时具有结合和催化活性,在结合活性中

主要体现在与碳水化合物的作用,Mitsutomi等^[20,21]研究了chitinase对部分N-乙酰化壳聚糖的作用。由于chitinase的专一性,可利用chitinase催化水解几丁质生产寡糖,在氨基寡糖的生理功能越发受到重视的时期,这可谓是生产氨基寡糖的一条捷径。另有文献^[22]报道,高纯度的chitinase可以作为外用药物对人类由真菌引起的疾病进行治疗。因此,在锦灯笼提取物中鉴定到这些蛋白质对人类的生命活动及疾病的治疗均有着重大的意义。

表3 锦灯笼提取物中具有结合活性的蛋白质的分布

Table 3 Distribution of the proteins with binding activity in the extract from *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino

Protein function	Protein name
Ion binding	Lox, malic enzyme, TBG5, beta-glucanase, GN1, tomQ-a, CT148, BAC19.3, TF, beta-1,3-glucanase, putative uncharacterized protein, integrase core domain containing protein, PGPS/NH21, alpha-mannosidase, anionic peroxidase, TAP2, glp suberization-associated anionic peroxidase 1, CT148,
Lipid binding	ATP9, non-specific lipid-transfer protein
DNA binding	EEF38, squamosa promoter binding protein-like protein, histone H3, B34, H3, MPF2-like, integrase core domain containing protein, TF
Carbohydrate binding	TBG5, wound-induced protein, PR4b-Cc, alpha-mannosidase, CHI9, CHN-A, endochitinase 4, CHN-B, chitinase
Organic cyclic compound binding	mMDH, GR, grase, ATP9, malic enzyme, actin-42, disease resistance protein RX4, SH-RGH7, disease resistance protein RGH4, Rx2, ac15, disease resistance protein RGH9, resistance protein PSH-RGH7, RGCl, disease resistance protein RGH3, Disease resistance protein RX3, Disease resistance protein RX5, disease resistance protein RX6
Cofactor binding	malic enzyme, grase, GR, THD1_NICAT

此外,鉴定到的Pest1、CDM1、STC、Sts15、SPI1a具有酶调节活性,在代谢机能的调节、生长发育和分化的控制、生殖机能的调节以及物种的延续等各种生命活动中,都起着极为重要的作用。putative vicilin、putative uncharacterized protein、BAC19.13、glp 4个蛋白质具有养分贮液囊活性。ATP9、TIL具有运输活性,承担起在生命活动过程中小分子及离子的运输活动。

3 结论

本研究以锦灯笼果实为原料,经水提取、酸沉淀得到锦灯笼提取物,利用蛋白质组学的方法鉴定了其中的蛋白质组分,并进一步分析了其生物学功能。结果表明其中含有3种与抗氧化活性相关的蛋白质,该蛋白质可能与提取物的抗氧化活性相关。另外还鉴定到具有催化活性、结合功能、酶调节功能的

蛋白质,这也为研究锦灯笼果实的生物活性提供了依据。

参考文献:

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Part 1. Beijing: Chemical Industry Press (中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. 北京: 化学工业出版社), 2010
- [2] Ge Y, Duan Y F, Fang G Z, et al. Carbohydrate Polymers, 2009, 77(2): 188
- [3] Xu B L, Guan H J, Li H, et al. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (徐保利, 管慧洁, 李慧, 等. 中国实验方剂学杂志), 2011, 17(21): 33
- [4] Wang X L, Zhong F L, Zhang K Y. Journal of Anhui Agricultural Sciences (王晓林, 钟方丽, 张坤瑶. 安徽农业科学), 2011, 39(4): 2091
- [5] Wang L S, Wang H S, Fan Y J, et al. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research (王隶书, 王海生, 范艳君, 等. 时珍国医国药), 2011, 22(1): 74
- [6] Liu C H. Journal of Changchun University (刘春红. 长春大学学报), 2011, 21(4): 55
- [7] Naoki A, Atsushi K, Haruhisa K, et al. Phytochemistry, 1996, 42(3): 719
- [8] Qiu L, Liu H X, Jiang Z H, et al. Journal of Shenyang Pharmaceutical University (邱莉, 刘红霞, 姜志虎, 等. 沈阳药科大学学报), 2008, 25(12): 956
- [9] Han Y H, Gao L, Liu L Y, et al. Food Science (韩阳花, 高莉, 刘丽艳, 等. 食品科学), 2006, 27(2): 154
- [10] Zhang X Z. [MS Thesis]. Changchun: Jilin University (张秀芝. [硕士学位论文]. 长春: 吉林大学), 2008
- [11] Tong H B, Liang Z Y, Wang G Y. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(24): 316
- [12] Yang C Y, Shan J Y, Zheng S Q. Heilongjiang Medicine and Pharmacy (杨春荣, 单静颖, 郑素芹. 黑龙江医药科学), 2008, 31(3): 42
- [13] Liu X D, Pan Z W, Zhuang X G, et al. Chinese Traditional and Herbal Drugs (刘晓丹, 潘振伟, 庄须国, 等. 中草药), 2008, 39(11): 1709
- [14] Jiang X N, Dong X L, Ye M L, et al. Anal Chem, 2008, 80(23): 9326
- [15] Liu H M, Luo Z S, Wei S Z, et al. Chinese Journal of Chromatography (刘惠敏, 骆子生, 魏素珍, 等. 色谱), 2001, 19(5): 475
- [16] Cheng H Y, Cao Y H. Chinese Journal of Chromatography (程宏英, 曹玉华. 色谱), 2007, 25(5): 681
- [17] Fersht A. Enzyme Structure and Mechanism. 2nd ed. Du J Z, et al, transl. Beijing: Beijing University Press (弗斯塔. 酶的结构和作用机制. 2版. 杜锦珠, 等, 译. 北京: 北京大学出版社), 1991
- [18] Mauseth J D. Botany: An Introduction to Plant Biology. Florida: Saunders College Publishing, 1991
- [19] Mehdy M C, Sharma Y K. Physiol Plant, 1996, 98: 365
- [20] Mitsutomi M, Kidoh H, Tomita H, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 1995, 59(3): 529
- [21] Mitsutomi M, Ohtakara A, Fukamizo T, et al. Agric Biol Chem, 1990, 54(4): 871
- [22] Han B Q, Yu C Y, Liu W S, et al. Chinese Journal of Marine Drugs (韩宝芹, 余长纓, 刘万顺, 等. 中国海洋药物), 2001, 83: 41