

生物样品中含半胱氨酸肽的衍生化分析方法研究

韩宁娟 李欣雨 方欢乐

(西安培华学院 陕西西安 710125)

摘要: 半胱氨酸是一种脂肪族含巯基的氨基酸, 含有半胱氨酸肽和蛋白在体内承担着各种重要的生理学功能。用衍生化分析方法检测生物样品中含半胱氨酸肽可提高检测方法的灵敏度, 提高化合物的离子化效率, 增加其在质谱仪器中的检测信号强度, 有利于生物样品中含半胱氨酸肽的痕量分析。本文对近年来报道的针对含半胱氨酸肽及蛋白中巯基化学衍生化反应进行整理和归纳, 并介绍基于这些衍生化反应针对半胱氨酸肽及蛋白的定性定量、富集及快速筛查方法, 为深入研究生物样品中含半胱氨酸肽及蛋白相关的生物学功能和代谢途径提供依据。

关键词: 衍生化; 含半胱氨酸肽; 生物样品

半胱氨酸 (cysteine, Cys) 是一种内源性氨基酸, 属于含硫氨基酸, 含有半胱氨酸的物质很多如谷胱甘肽、金属硫蛋白、铁硫蛋白等, 据统计 91% 蛋白质中至少含有一个半胱氨酸残基^[1], 能促进伤口愈合、消炎解毒, 提高动物生产性能、增强抗氧化能力和免疫功能, 加速烧伤恢复和化学损伤, 刺激红细胞和白细胞的增殖。化学衍生化方法是一种通过特殊设计的化学衍生化试剂与样本中含有特定官能团的目标分子发生衍生化反应, 对待测物质的某个官能团进行结构修饰, 在保证其骨架结构基本不发生改变的情况下, 使其理化性质发生改变, 从而达到改变目标分子色谱或质谱行为的目的。对待测组分进行衍生后可通过改变目标分子的化学结构, 提高色谱或质谱分析方法的选择性和分离度, 提高离子效率, 消除内源性物质的干扰等优势^[2]。生物样品成分复杂, 干扰多, 要求分析方法具有更高的选择性和灵敏度, 因此, 开发化学衍生方法分析生物样品含半胱氨酸肽具有中药意义。

本文对近年来报道的针对含半胱氨酸肽及蛋白巯基设计的衍生化分析方法, 按反应机理迈克尔加成反应、巯基-二硫化物交换和电荷衍生化学衍生反应进行归纳整理, 介绍基于这些衍生化反应针对半胱氨酸肽及蛋白的定性定量、富集及快速筛查方法。

1 衍生化反应及衍生化试剂

1.1 迈克尔加成反应

迈克尔加成反应 (Michael addition reaction) 是由活泼亚甲基化合物形成的碳负离子, 对 α , β -不饱和羰基化合物的碳碳双键的亲核加成。迈克尔反应速率受到巯基的碱性、碱的强度或溶剂极性, 反应物的立体空间位阻的影响, 当迈克尔反应受体的 α 位和 β 位上存在较大的取代基会阻碍反应。

1.1.1 季铵化衍生试剂

季铵化衍生试剂是一种针对于含半胱氨酸肽和蛋白

巯基的衍生化试剂, 可通过季铵化反应将含有巯基的肽或蛋白转化为具有季铵基团的衍生物。季铵化衍生试剂通常包含具有亲核性的官能团, 例如氯酰胺基 (chloroacetamide) 或氯乙酰基 (chloroacetyl), 这些官能团可以与巯基发生亲核取代反应。在反应过程中, 季铵化试剂的官能团会与巯基形成稳定的化学键, 将巯基转化为具有季铵基团的衍生物, 从而增加化合物的离子化效率和检测灵敏度, 便于质谱分析。季铵化衍生试剂可显著提高肽段的 MALDI-TOF MS 离子化效率。

Ren^[3]等人建立了一种从胰蛋白酶消化物中富集含半胱氨酸肽方法。首先对二硫键进行还原, 然后用 (3-丙烯酰胺基丙基) 三甲基氯化铵对半胱氨酸残基进行衍生化, 再通过强阳离子交换色谱富集, 该方法不仅增加了半胱氨酸肽的电离效率, 还可提高含半胱氨酸肽的灵敏度。

1.1.2 马来酰亚胺类烷基化衍生试剂

马来酰亚胺可与肽或蛋白质的巯基基团的反应可生成硫醚键, 马来酰亚胺类烷基化衍生试剂优点是高特异性、反应性、所得硫醚产物的稳定性以及副产物少, 衍生效率特别高可接近 100%, 对于极性较小的巯基肽段, 可使质谱的离子化效率可提高将近 100 倍, 缺点是这个反应可逆, 可能导致连接子药物 (LD) 在循环中过早释放。

徐鹏遥等^[4]用 4-(N-马来酰亚胺) 苯基三甲基碘化铵 (MPTA) 作为衍生化试剂, 测定大鼠血浆中内源性谷胱甘肽含量的方法, 衍生化后的谷胱甘肽在 3.000 ~ 2.000 ng/mL 范围内线性良好, $r = 0.9971$, 最终定量下限约为 10 pmol/L。

1.1.3 含碘乙酰胺的衍生试剂

Zabet-Moghaddam^[5]等用碘代乙酰苯胺和 N-乙基马来酰亚胺应作为半胱氨酸肽的衍生化试剂, 用于标准肽段 PEP60、PEP13 和 PEP31 质谱分析, 发现 ESI-MS 质

谱离子化效率可提高 5-20 倍。

1.2 巯基-二巯基交换反应

巯基与二巯键之间可以相互转化, 硫醇-二巯键交换反应根据 SN2 反应机理进行, 巯基阴离子 (RS⁻) 攻击二巯键中的一个硫原子, 导致形成新的二巯键并同时释放新的巯基。常用的衍生化试剂 5, 5-二硫双-2-硝基苯甲酸 (DTNB) 可与巯基发生衍生化作用, 生成 5-硫代-2-硝基苯甲酸 (TNBA) 盐黄色阴离子, 在可见光区内具有较强吸收, 故利用分光光度法可测定总巯基含量。朴玉莲等^[6]用衍生试剂 5, 5-二硫硝基苯甲酸 (DTNB) 与 GSH 进行衍生化反应, 用荧光光度法测定了猕猴桃、大枣、酸浆中总巯基含量和 GSH 的含量, 发现猕猴桃和大枣中含有相对较高的 GSH 浓度分布, 可达 0.7092、0.8374mol/g。

2 应用

2.1 与高效液相色谱联用

化学衍生化可以改变化合物的性质, 改变化合物的亲和性和化学性质, 有助于提高色谱分离的效果, 增强其检测性能, 从而提高了高效液相色谱法的检测灵敏度, 也可以减少干扰物质的影响, 将衍生化与高效液相色谱法结合可提高检测灵敏度, 提高分析的准确性和可靠性。邱岳^[7]用 DTNB 衍生化后, 用 HPLC 法和光谱法测定 GSH 的含量, 结果发现柚子籽、南瓜籽、黄瓜子、冬瓜子含有丰富的 GSH。

2.2 与质谱联用

将化学衍生化法与质谱法联用, 可以增加化合物的稳定性, 有助于目标化合物在质谱分析中保持结构完整性, 提高分析结果的准确性, 还可提高化合物的离子化效率, 增强其检测信号强度, 提高方法灵敏度。用马来酰亚胺类烷基化衍生试剂 1-[3-(4-马来酰亚胺苯氧基)丙基]三甲胺溴盐衍生化含半胱氨酸肽, 其衍生化标记效率可接近 100%。

3 总结与展望

生物体内的含半胱氨酸的肽具有抗氧化、螯合重金属、维持体内巯基平衡等生物活性, 在体内的抗氧化酶体系进程中是必不可少的底物活性成分, 是构成抗氧化及抵御各类外源性胁迫的重要防御性物质, 其中还原型 GSH 及游离蛋白巯基 (P-SH) 存在于动、植物体内的细胞质中, 具有促进氨基酸吸收, 重金属解毒, 细胞信号转导, 维持细胞正常的氧化还原环境, 抗衰老, 抗癌等功效。大量研究表明: 生物体因衰老或身患某些疾病,

其体内的自身合成的巯基化合物含量明显降低, 这说明生物体细胞内谷胱甘肽及含有半胱氨酸残基的巯基化合物的水平与许多疾病有着密不可分的关系, 因此它也成为许多病理条件的一个判断标志的靶标物质。

化学衍生化方法分析含半胱氨酸肽的意义在于通过改变化合物结构, 改变化合物性质, 在色谱柱中改变分配系数, 提高目标化合物的色谱分离的效果, 增强其检测性能, 从而提高了高效液相色谱法的检测灵敏度, 减少生物样品中内源性物质的干扰, 将衍生化与高效液相色谱法结合可提高检测灵敏度, 提高分析的准确性和可靠性, 增强其检测灵敏度和特异性, 还可与质谱分析方法联用, 保持结构完整性, 提高电离效率, 增强其检测信号强度, 提高方法灵敏度。使大规模、高通量的生物样品中含半胱氨酸肽或蛋白分析成为可能。总之, 含半胱氨酸肽衍生化分析在蛋白质组学研究中具有重要意义, 可为深入理解蛋白质结构和功能提供了有效的技术手段。

参考文献:

- [1]王艳萍,曾维斌,张力,等.藏羚羊与其他羊种被毛纤维氨基酸含量的比较分析研究[J].中国饲料,2010,35(1):39-41
 - [2]张力文,尚中博,常志显,等.巯基检测方法研究进展[J].河南大学学报(自然科学版),2018,48(04):430-443.
 - [3]Ren D,Julka S,Inerowicz H.D,Regnier F.E.Enrichment of cysteine-containing peptides from tryptic digests using a quaternary amine tag[J]. Anal. Chem. 2004;76:4522-4530.
 - [4]徐鹏遥,杨漾,苏梦翔,等.衍生化 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中内源性谷胱甘肽的含量[J].中国药科大学学报,2018,49(02):209-214.
 - [5]Zabet-Moghaddam M, Kawamura T, Yatagai E, et al. Electrospray ionization mass spectroscopic analysis of peptide-s modified with N-ethylmaleimide or iodoacetanilide[J]. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008, 18: 4891-4895.
 - [6]朴玉莲,沈丽,韩玲,等.衍生化法测定水果中还原型谷胱甘肽 (GSH) 和总巯基含量 [J]. 食品工业科技,2012,33(20):60-64.
 - [7]邱岳.果蔬籽中还原型谷胱甘肽 (GSH) 和蛋白巯基 (P-SH) 含量的测定[D].延边大学,2017.
- 项目支持: 西安培华学院校级科研创新团队专项项目“生物样品中多肽药物的衍生化分析方法研究”(PHJT2310)