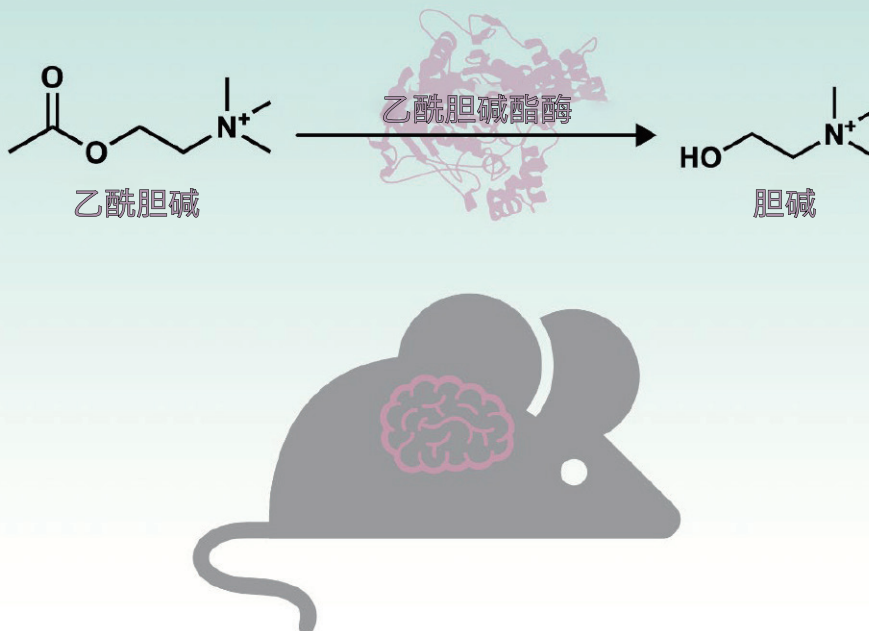


利用质谱成像研究酶组织化学

新闻秀一^{1,2,3}、竹尾映美¹、中川薰、山本卓志、福崎英一郎^{1,2,3}



■ 摘要

检测酶促反应时，通常使底物和酶先发生反应，然后使反应产物进一步发生显色反应，并测量吸光度来实现。在现有方法中，需要底物和酶先进行一次反应，然后通过二次反应显色。在新方法中，使用质谱仪检测反应产物，以取代显色反应。此外，通过在组织表面进行检测，可以实现酶活性的可视化。本文将介绍使用高分辨质谱成像系统 iMScope™ 进行酶组织化学分析的新技术。

1. 引言

酶在组织中的分布通常使用免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 方法来测定。IHC 可以观察是否存在酶蛋白，但无法确定是否具有酶活性。酶组织化学作为一种成熟的方法，能够可视化分析酶活性，这是无法通过 IHC 分析实现的^{1)、2)}。酶组织化学可在样品切片表面发生基于酶活性的化学反应，从而获得酶活性是否存在及其强度的图像。可视化分析通常将反应底物涂敷在组织切片上，并

对内源酶催化反应产生的物质进行显色实现的。这种方法需要针对每种化合物分别建立显色反应步骤，以实现可视化。因此，在很多情况下，仅通过涂敷底物不能轻易获得酶活性分布。本研究考察了使用质谱成像技术 (mass spectrometry imaging, MSI) 取代传统的酶组织化学中的显色反应，直接检测小鼠大脑切片和果蝇全身切片中酶促反应生成产物的方法³⁾。

2. 实验

本研究中尝试使用野生型小鼠大脑切片和野生型果蝇全身切片，实现乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 活性分布的可视化。AChE 是一种以乙酰胆碱为底物将其分解为胆碱和乙酸的酶。因此，在样品表面涂敷乙酰胆碱并检测其降解产物胆碱。为了将其与内源性胆碱区分开来，使用了氘标记的乙酰胆碱-d9 作为底物来检测胆碱-d9 (图 1)。另外，底物是使用喷枪手动涂敷上去的。本研究还考察了进行半定量分析的反应时间和方法。

¹ 大阪大学大学院工学研究科生物工程专业

² 大阪大学·岛津分析创新协作研究所

³ 大阪大学先导性跨学科研究机构

使用的基质为 α - 氰基 -4- 羟基肉桂酸 (CHCA、西格玛·奥尔德里奇), 基质涂敷采用基质升华仪 iMLayer™ (图 2) 升华和 CHCA 溶液喷雾相组合的两步升华法 (专利: 6153139) ⁴⁾。

使用成像质谱显微镜 iMScope QT 进行 MSI 检测 (图 3), 并使用质谱成像数据分析软件 IMAGEREVEAL™ MS 进行数据分析 (图 4)。iMScope QT 实验参数如表 1 所示。

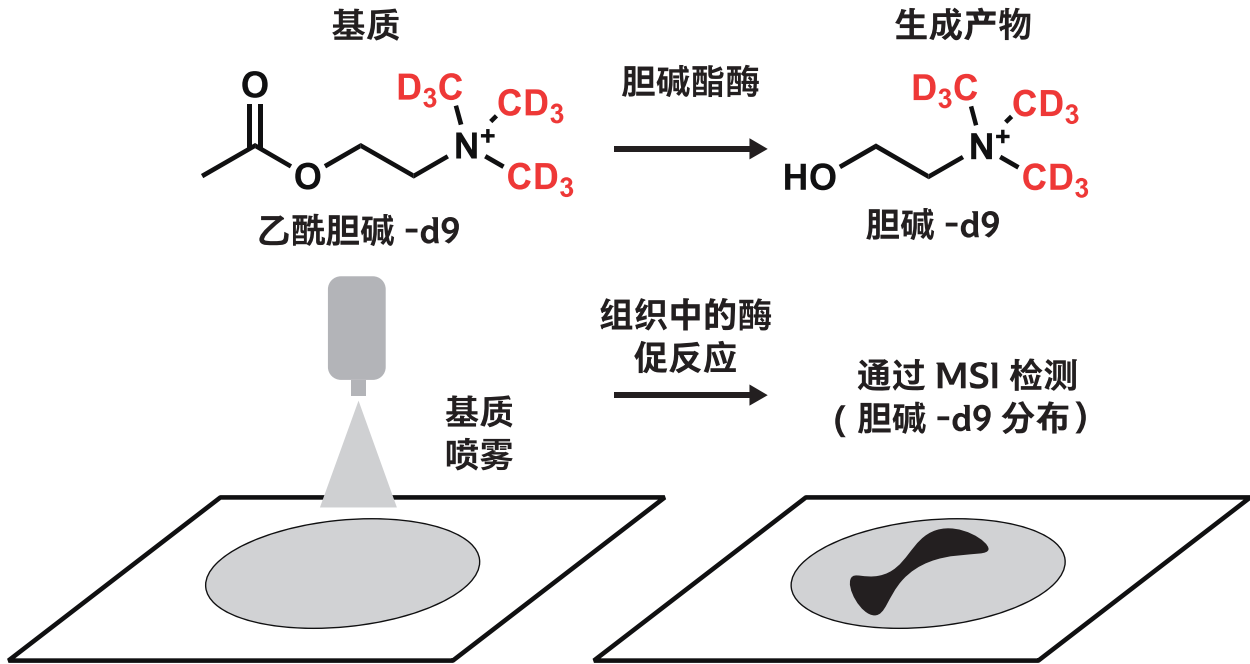


图 1 使用 MSI 的酶组织化学概述
将标记的底物涂敷在样品表面, 通过质谱分析检测和可视化酶促反应后的产物。



图 2 基质升华仪 iMLayer™



图 3 成像质谱显微镜 iMScope™ QT

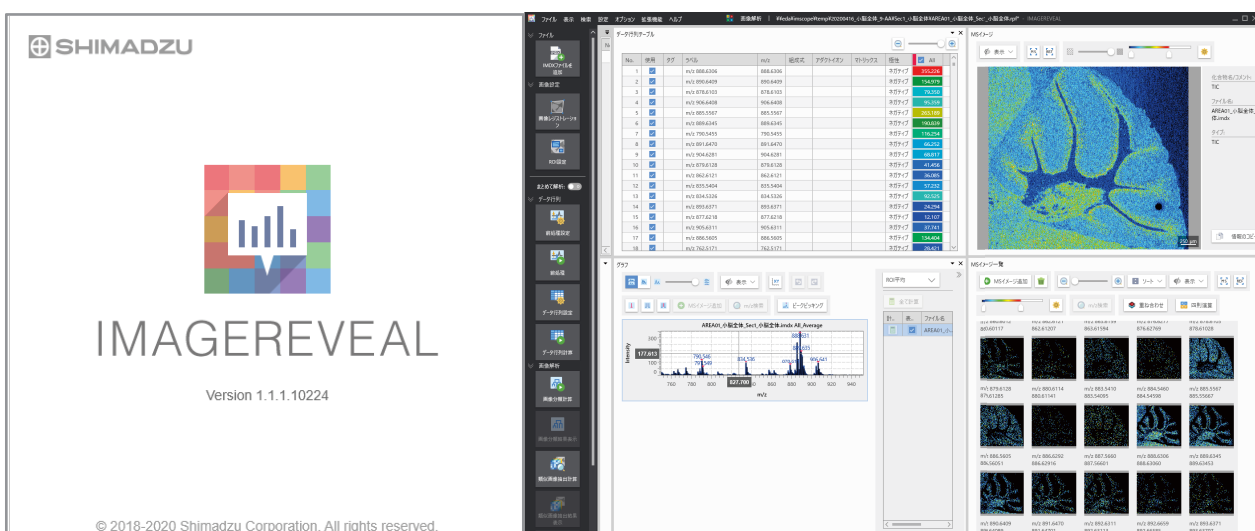


图 4 质谱成像数据分析软件 IMAGEREVEAL™ MS

表 1 MSI 分析参数

MS 分析条件	
离子种类	正离子模式
m/z 测定范围	100-160
平均采集次数	1 次
样品电压	3.50 kV
检测器电压	2.10 kV
MS 级数	1
激光照射条件	
照射次数	100 次
重复频率	1000 Hz
照射直径设定值	0 (约 5 μm) or 1 (约 10 μm)
激光强度	20 or 45

$$\text{转化率}(\%) = 100 \times \frac{I_{\text{choline-d9}}}{I_{\text{ACh-d9}} + I_{\text{choline-d9}}} \quad \dots \textcircled{1}$$

$$\text{相对ChE活性}(\text{au}) = 100 \times \frac{\varepsilon I_{\text{choline-d9}}}{I_{\text{ACh-d9}} + \varepsilon I_{\text{choline-d9}}} \quad \dots \textcircled{2}$$

I: 强度
ε = 3

图 5 底物转化率的运算公式和酶活性的运算公式

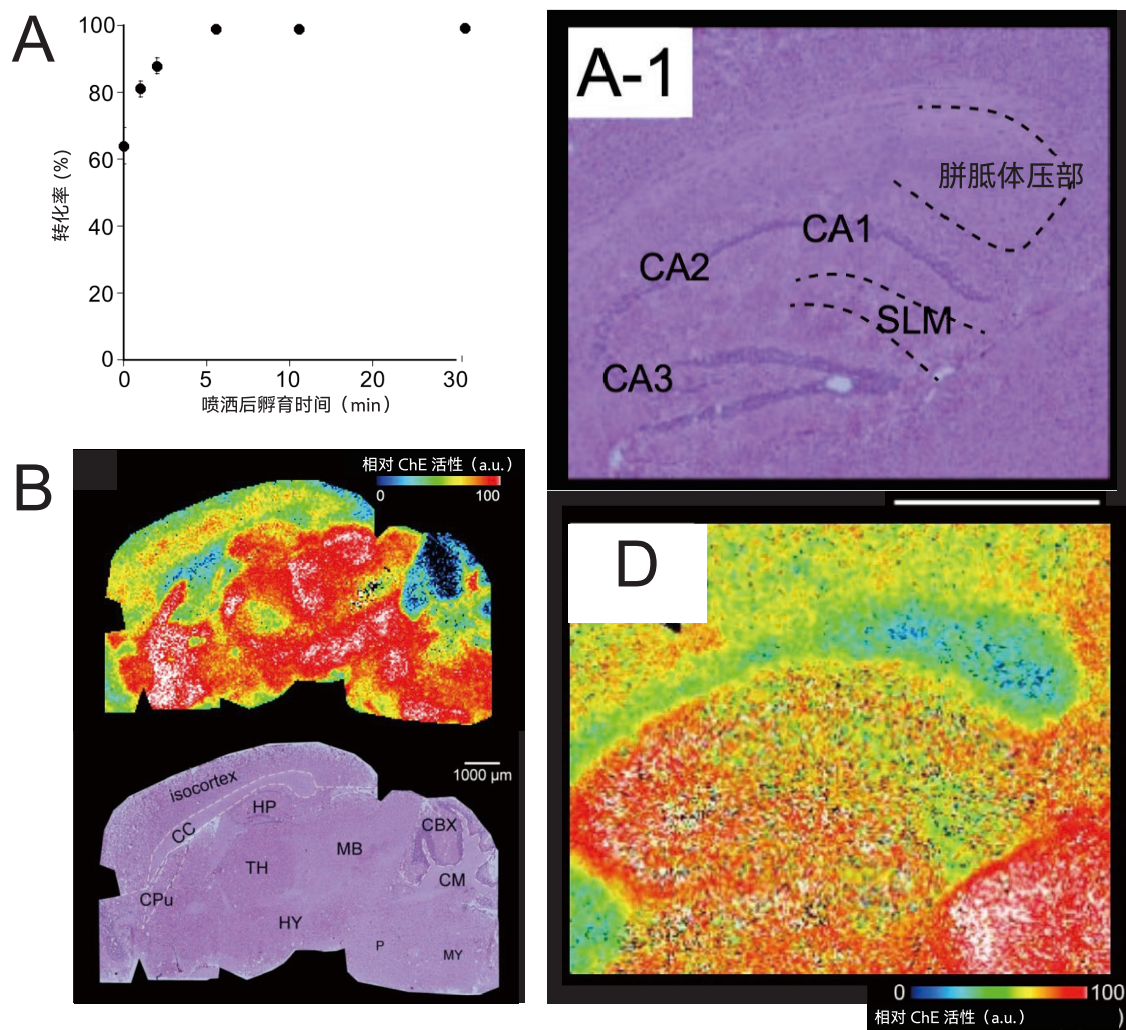


图 6 (A) 样本组织表面底物转化比例与酶反应时间关系。从底物涂敷 0 分钟开始绘制曲线，乙酰胆碱 -d9 (底物) 在 5 分钟之内全部转化为胆碱 -d9。
 (B) 小鼠脑组织中的胆碱酯酶活性分布。MSI 结合 HE 染色分析结果显示，酶活性在纹状体 (CPu)、海马体 (HP) 和下丘脑 (TH) 中较高，而在胼胝体 (CC) 和小脑皮层 (CBX) 中较低。
 (C, D) 小鼠海马体的 HE 染色和高空间分辨率成像结果表明 CA3 区域中酶活性较高。比例尺：1 mm

3. 结果与讨论

根据图 5 ①的公式计算底物转化率并绘制转化率与反应时间的关系图表明，乙酰胆碱 -d9 在涂敷于样品表面后迅速开始分解为胆碱 -d9，在反应时间 5 分钟时达到稳态，乙酰胆碱 -d9 耗尽 (图 6A)。因此，不到 5 分钟的反应时间就足以测定酶的活性。由于组织位置造成的生物基质效应会给半定量分析带来影响。因此，我们设计了一种考虑到乙酰胆碱 -d9 和胆碱 -d9 电离效率的归一化方法，采用图 5 ②的公式计算。

使用质谱成像数据分析软件 IMAGEREVEAL MS 提取 m/z 155.17 乙酰胆碱 -d9 和 m/z 113.16 胆碱 -d9 的质谱图像，通过 IMAGEREVEAL MS 的四则运算功能，根据公式 (2) 计算胆碱酯酶活性分布的图像 (图 6B 和图 6D)。结果显示，AChE 活性在纹状体 (CPu)、海马体 (HP) 和下丘脑 (TH) 中较高，在胼胝体 (CC) 和小脑皮层 (CBX) 中较低 (图 6B)。

这些结果与传统酶组织化学方法高度匹配，证明了该技术的可靠性。另外，利用 iMScope 高空间分辨率成像的特点，还可以实现大海马体区域的酶活性可视化 (图 6C、6D)。

由于哺乳动物除 AChE 外还产生丁酰胆碱酯酶 (BuChE)，因此尝试对不同胆碱酯酶的活性分布进行可视化研究。BuChE 将乙酰胆碱和各种其他胆碱酯转化为胆碱。将抑制 BuChE 活性的四异丙基焦磷酸酰胺 (iso-OMPA) 与底物乙酰胆碱一起涂敷于样品表面，利用 MSI 观察 AChE 活性的特异性分布。针对 BuChE 活性的特异性分布，也通过在一系列组织切片涂敷底物乙酰胆碱和 AChE 活性抑制剂加兰他敏 (galantamine) 进行研究。结果表明，在没有抑制剂的情况下检测到的胼胝体中的活性在 iso-OMPA 的存在下受到了极大的抑制，这表明胼胝体中的大部分胆碱酯酶活性来自于 BuChE (图 7A)。

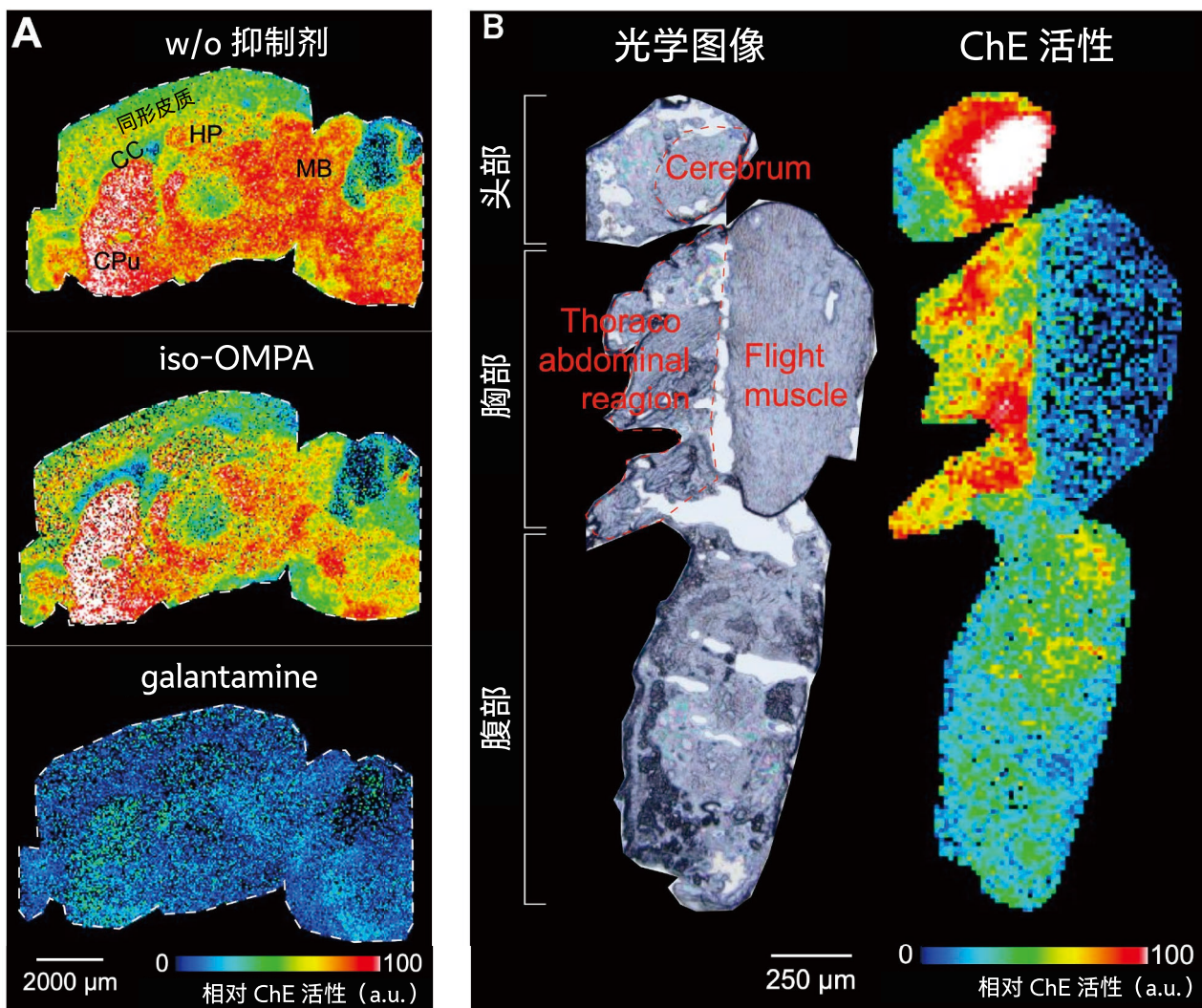


图7 在小鼠脑切片中使用抑制剂进行酶活性可视化的结果，以及果蝇全身切片中胆碱酯酶活性分布的MSI。
 (A) 使用抑制剂可视化观察酶活性。Iso-OMPA 抑制丁酰胆碱酯酶活性实现特异性检测乙酰胆碱酯酶活性，加兰他敏抑制乙酰胆碱酯酶活性实现特异性检测丁酰胆碱酯酶活性；
 (B) 果蝇中胆碱酯酶活性的分布。尽管果蝇属于不同的门类，但该方法同样适用，并揭示了大脑和胸腹区的酶活性。尤其是在胸腹区，检测到了可溶性酶活性，表明该方法可提供常规酶组织化学难以获得的结果。

因此，将标记稳定同位素的底物与抑制剂一同涂敷于组织样本表面是一种更精确的酶组织化学研究方法。

本方法甚至可以用于果蝇（一种不同门的动物）的研究。如图7B所示，ChE活性在整个果蝇中分布不均匀，在大脑中ChE活性极高，在胸腹区ChE活性也较高。果蝇头部具有极高酶活性的结果与先前报告一致⁵⁾，表明活性来自中枢神经系统中头神经节的胆碱能神经中的AChE。相比之下，胸腹区的ChE活性很可能不是由中枢神经系统中的AChE引起的。报告显示除中枢神经系统外，血液淋巴中也存在AChE⁶⁾，并且Zador等人观察到可溶性AChE的存在，其结构与神经系统中的膜结合AChE不同⁷⁾。胸腹区的AChE活性与以往报告一致，证明本方法可有效进行ChE活性定位的研究。

4. 结论

本文描述了一种基于MSI进行酶组织化学的新方法。结果显示MSI无需显色反应即可获得酶活性的半定量分布结果。该方法同时还被用于果蝇切片分析，可有效可视化分析膜结合AChE和可溶性AChE的活性。尤其是可溶性酶活性的分布难以通过传统方法获得，这显示了本方法的优越性。对于其他酶（不仅包括水解酶，还包括转移酶），我们还将开发更多的可视化分析方法。

致谢

诚挚感谢京都工业大学应用生物科学系染色体工程实验室的山口政光教授（研究时）提供果蝇样本。

< 参考文献 >

- 1) Takamatsu, H. Histochemische Untersuchungen der Phosphatase und deren Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben. Trans. Soc. Path. Japan 29, 429 (1939)
- 2) Gomori, G. Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 42, 23 (1939)
- 3) Takeo E, Fukusaki E, Shimma S. A mass spectrometric enzyme histochemistry method developed for visualizing in situ cholinesterase activity in *Mus musculus* and *Drosophila melanogaster*. Anal. Chem. 92, 12379 (2020)
- 4) Shimma S, Takashima Y, Hashimoto J, Yonemori K, Tamura K, Hamada A. Alternative two-step matrix application method for imaging mass spectrometry to avoid tissue shrinkage and improve ionization efficiency. J Mass Spectrom. 48, 1285 (2013)
- 5) Toutant, J. P., Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. Prog Neurobiol. 32, 423 (1989)
- 6) Chadwick, L. E., Actions on Insects and Other Invertebrates. In Cholinesterases and Anticholinesterase Agents, Koelle, G. B., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1963; pp 741- 798.
- 7) Zador, E., Tissue specific expression of the acetylcholinesterase gene in *Drosophila melanogaster*. Mol Gen Genet. 218, 487 (1989)

岛津应用云



iMLayer、iMScope 和 IMAGEREVEAL 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家 / 地区的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2021 年 09 月