

转印到膜上的蛋白质的质谱分析

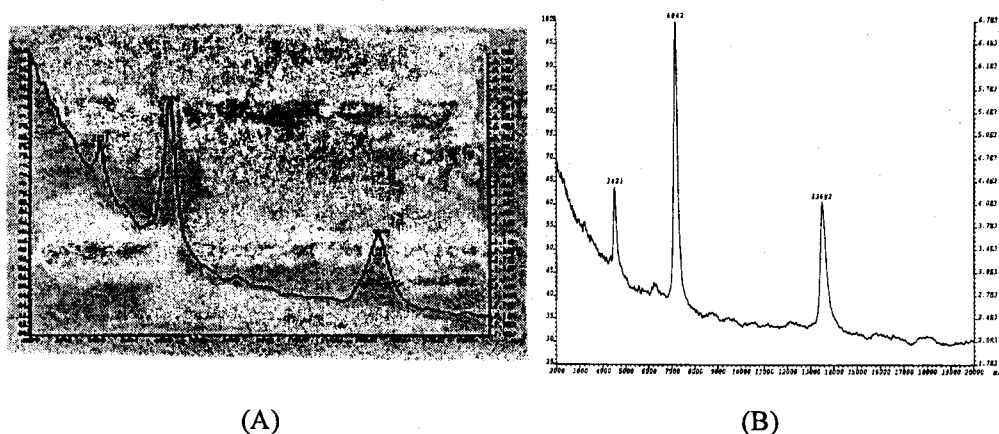
魏开华 杨松成 王红霞 蔡 耘 钱小红

(军事医学科学院国家生物医学分析中心 北京 100850)

二维电泳是蛋白质组研究计划中的核心分离技术,对胶内斑点(蛋白质)的准确、快速鉴定是该计划的重要的要求之一。经胶内酶切建立的“肽质量指纹谱”是蛋白质鉴定不可缺少的依据,但所得目标蛋白质有时较多。因此,获得胶内蛋白质的准确分子量可大大减少候选蛋白质的范围。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)正是测定蛋白质分子量的优秀工具。目前还难以直接测定胶内蛋白质的分子量,如果采用提取法获得蛋白质样品,SDS和一些缓冲用盐会干扰实验。而将胶内蛋白质转印到聚合物膜上后,可方便地洗去干扰物,提高测量的灵敏度和准确度。本文探讨了转印到硝酸纤维素膜(NC)和聚二氟乙烯膜(PVDF)上的蛋白质的MALDI-TOF-MS,比较了“提取法”、“溶解——沉淀法”和“直接法”的效果。

1 实验部分

蛋白质的电泳按文献方法进行,丙烯酰胺浓度为 12%,考马斯亮兰染色。电转印在 Bio-Rad mini-Blot 上进行,缓冲液不含 SDS 和甲醇,一般采用慢转印方式。将膜上蛋白质脱色(一般为 35%乙睛的碳酸氢铵溶液),并进行“提取法”、“溶解——沉淀法”和“准溶解法(直接法)”处理,再用 MALDI-TOF-MS 测定分子量。



2 结果与讨论

对细胞色素 C, 马心肌球蛋白, 核糖核酸酶 A, 胰酶酶原及一个天然蛋白质进行了 SDS-PAGE 分离, 转印到 NC 膜和 PVDF 膜, 最后用 MALDI-TOF-MS 测试。用装备紫外激光器 MALDI-TOF 质谱仪直接测定转印到膜上的蛋白质的分子量是可能的(图 1A), 效果比将蛋白质吸附(Dot-Blot)到 NC 膜上要好, 但比吸附到 PVDF 上的方法灵敏度和分辨率较低, 这可能是与少量残余的染色剂、转印时蛋白质渗透深度及蛋白质性能有关。采用可逆染色剂和慢转印有利于提高谱图质量。从膜上回收蛋白质并进行分子量

采用可逆染色剂和慢转印有利于提高谱图质量。从膜上回收蛋白质并进行分子量测定是一种较为实用的方法。本文采用酸性介质的“提取法”可减少蛋白质的降解和变性,而且图谱质量与膜的种类关系不明显(图 1C,D),说明该法确实具有较好的通用性,电泳中的 SDS 和缓冲剂等干扰物可顺利在转印后除去。对于转印到 NC 膜上的蛋白质,首选的解吸附方法是“溶解——沉淀法”。直接将脱色后的蛋白质条带溶解于丙酮,充分搅拌使蛋白质从膜上解吸附,然后慢慢滴加 1%TFA 以便将 NC 沉淀下去而蛋白质溶解在上清液中,从而将蛋白质分离出来。浓缩后直接测定分子量,图谱效果与 MALDI-TOF-MS 标准方法没有明显差异(图 1E),与“直接溶解法”(丙酮挥发快且不容易成液滴,点靶较难)相比操作过程简单、快速。

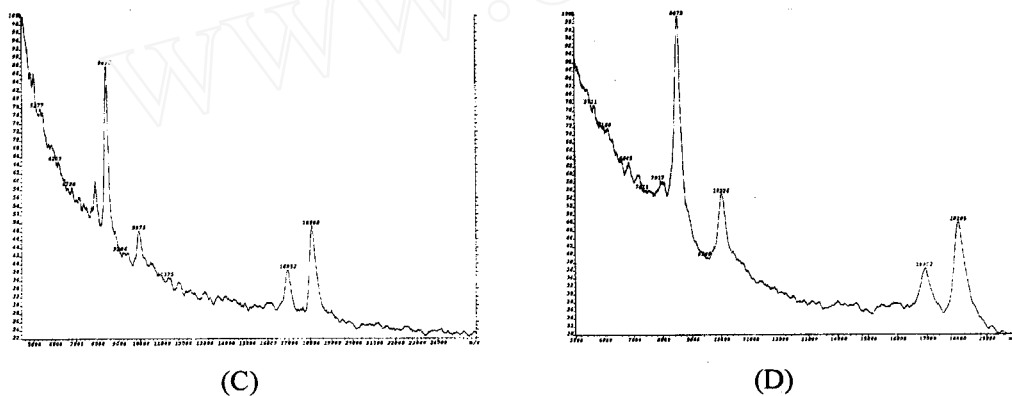


Fig. 1 MALDI-TOF spectra of on-membrane proteins. (A): cytochrome C on PVDF, method 1. (B): ribonuclease A on NC, method 2. (C),(D): a natural protein on PVDF and NC respectively, method 3. Measured on ToFSpec of Micromass Inc. Matrix: 4-HCCA, linear mode, Acc. Voltage: 23608V, MCP

MASS SPECTROMETRY OF PROTEINS ELECTROBLOTTED ONTO MEMBRANES

WEI Kaihua, YANG Songcheng, WANG Hongxia, CAI Yun, QIAN Xiaohong
(National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850 China)

Three methods to determine the molecular weight of a protein electroblotted onto PVDF or NC membrane have been investigated in this paper. The “Pseudo-dissolution Method”(direct method) is able to directly analyze proteins on membrane provided a good staining-destaining process and a gentle transferring strategy were carried out. The “Extraction Method” is suitable for various kinds of membranes, its reproducibility, sensitivity, and resolution are high. The “Dissolution-Precipitation Method” is the best among these methods. The quality of MALDI-TOF spectrum using this simple method is the same as the routine strategy of MALDI.