

吸附于膜上的蛋白质的 MALDI-TOF-MS 直接分析

* 魏开华 杨松成 钱小红 蔡 耘 王 杰 王京兰
(军事医学科学院国家生物医学分析中心 北京 100850)

[摘要]直接将细胞色素 C 吸附在硝酸纤维素(NC)膜上,进行了基质辅助激光解吸电离-飞行时间-质谱(MALDI-TOF-MS)分析。质量准确度和重现性没有明显的降低,检测极限可达 1pmol 。扫描电镜结果表明,本文所用 NC 膜具有孔径均匀、孔深适宜的特点,允许蛋白质和基质在膜上形成良好的“包裹型”或“包围型”结晶。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 蛋白质 硝酸纤维素膜 扫描电镜

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)以其高灵敏度、分子量范围宽、能测定混合物和允许样品含有一定量的盐等特点而成为蛋白质分子量测定的重要手段。样品的结果好坏是MALDI-MS测试成功与否的关键。事实上,经常可以观察到一些盐和蛋白质变性剂抑制样品峰的情况形。如十二烷基苯磺酸钠(SDS)就可以改变样品-基质-溶剂之间的表面张力,从而限制了样品吸附到基质表面上。一些无机盐则与样品竞争结晶,这不但会大大抑制样品信号,而且会产生一些难以解析的离子峰。因此,测试前应尽可能除去样品中的添加剂。

Chait^[1]等曾采用水不溶的基质并快速将样品靶在冷水中涮洗来除掉水溶性杂质,但该方法效果并不好。有人^[2]通过电喷雾的方法将硝酸纤维素(NC)涂覆在金属靶上形成惰性膜,显然本方法有一定的实验难度。将蛋白质吸附或印迹在转移膜上进行蛋白质氨基酸组分分析和测序虽然已有十余年历史^[3],但直接将膜固定在金属靶上进行MALDI-MS测试,则是近几年的事^[4-8]。中山大学曾探讨过将聚合物膜为样品支持物用于自制MALDI-TOF-MS^[10]。

一个理想的转移膜应满足以下要求:能吸附蛋白质和肽;在操作样品过程中(如冲洗,酶切,化学裂解或修饰)样品不丢失;干燥后的膜上蛋白质应能很好地重新溶剂化;蛋白质

1999-02-05 收

* 通讯联系人

通讯地址:北京市海淀区太平路 27 号, E-mail: wkh@163.net



可在膜表面结晶并干燥。硝酸纤维素膜具有较高吸附量、可再溶剂化、低价格等特点, 本文将蛋白质直接吸附在硝酸纤维素膜上来测定分子量, 并探讨了方法的准确度、灵敏度和重现性。用扫描电镜研究了膜的表面性能与共结晶的关系, 这在国内少有报道。

1 材料与方法

1.1 硝酸纤维素膜: 孔径为 $0.45\mu\text{m}$, 厚度为 $50\mu\text{m}$ 。美国 Sigma 公司出品。使用前剪成 $3\times 3\text{mm}$ 的方块, 用双面胶固定在样品靶上。

1.2 样品与基质: 蛋白质为细胞色素 C (Sigma 公司), 溶剂为含 0.1% TFA 的 50% 乙腈水, 浓度为 $1\sim 100\text{pmol}$ 。基质为 α - 氰- 4- 羟基肉桂酸 (Sigma 公司), 新鲜配制其饱和溶液。

1.3 制样过程: 取 $3\sim 5\mu\text{l}$ 甲醇或乙腈将膜充分润湿, 稍干后加 $1\sim 3\mu\text{l}$ 蛋白质溶液, 自然干燥后, 将靶在去离子水中浸泡 $5\sim 10$ 秒以洗去水溶性盐等杂质。再加 $2\mu\text{l}$ 溶剂将蛋白质重新溶剂化, 并及时加入 $1\mu\text{l}$ 基质溶液, 充分干燥。必要时, 重复溶剂化以获取好的结晶。

1.4 MALDI-TOFMS: 仪器为 ToFSpec, 英国 Micromass 公司出品。装备有氮激光器 (337nm , 3ns 脉冲) 和微通道板检测器 (MCP)。加速电压为 $+23608\text{V}$, MCP 电压为 -1850V 。线性方式。分辨率为 400 (细胞色素 C)。

1.5 扫描电镜: 在样品上喷涂一层金粉后, 选择不同放大倍数, 用 Philips SEM 505 扫描电镜仪进行表面形态观察。

2 结果与讨论

2.1 准确度与分辨率

将细胞色素 C 吸附在 NC 膜上与标准 MALDI-TOFMS 分析相比, 分子量准确度基本不变, 相对偏差仅为 0.05% (图 1)。峰呈良好的正态分布, 不仅分子离子峰为基峰, 而且双电荷峰也有较高的强度, 但三电荷峰很弱。从两种方法所得信号的相对强度来看, NC 膜可能对基质诱导细胞色素 C 的离子化效果有一定的影响, 而且更有利于单电荷分子的产生。与聚偏氟乙烯 (PVDF) 和尼龙膜类似, 采用 NC 膜可能导致峰加宽 (峰值基本不变), 说明分辨率有所下降。有人建议采用红外激光源或其它非极性聚合物如聚乙烯, 可改善图谱质量^[5]。与 ZetaBind (尼龙膜) 不同, 我们没有观察到 NC 膜导致离子飞行时间延长的现象, 这可能与 NC 膜较高的导电性有关, 膜的厚度也是不可忽略的因素, 因为膜两侧的电势降实际降低了加速电压, 可通过膜上内标或外标来克服。

2.2 灵敏度与重现性

用金属靶时, 本仪器可得到 0.5pmol 蛋白质的优良图谱。但在 NC 膜上, 样品信号较低 (信噪比 < 4)。将样品量增加到 1.0pmol (加 $2\mu\text{L}$ 样品溶液), 信噪比明显改善 (图 2)。比较等量样品情况下不同靶的图谱质量, 质量准确度, 可知, 用 NC 膜进行蛋白质的 MALDI-TOFMS 分析, 具有较好的“靶-靶 (target-to-target)”重现性。由于膜上的蛋白质样品趋于自我聚集在少数区域, 它们的浓度和结晶略有不同, 信号强弱有所差异, 但质量准确度基本不变, 因此, 也具有一定的“点-点 (spot-to-spot)”重现性。

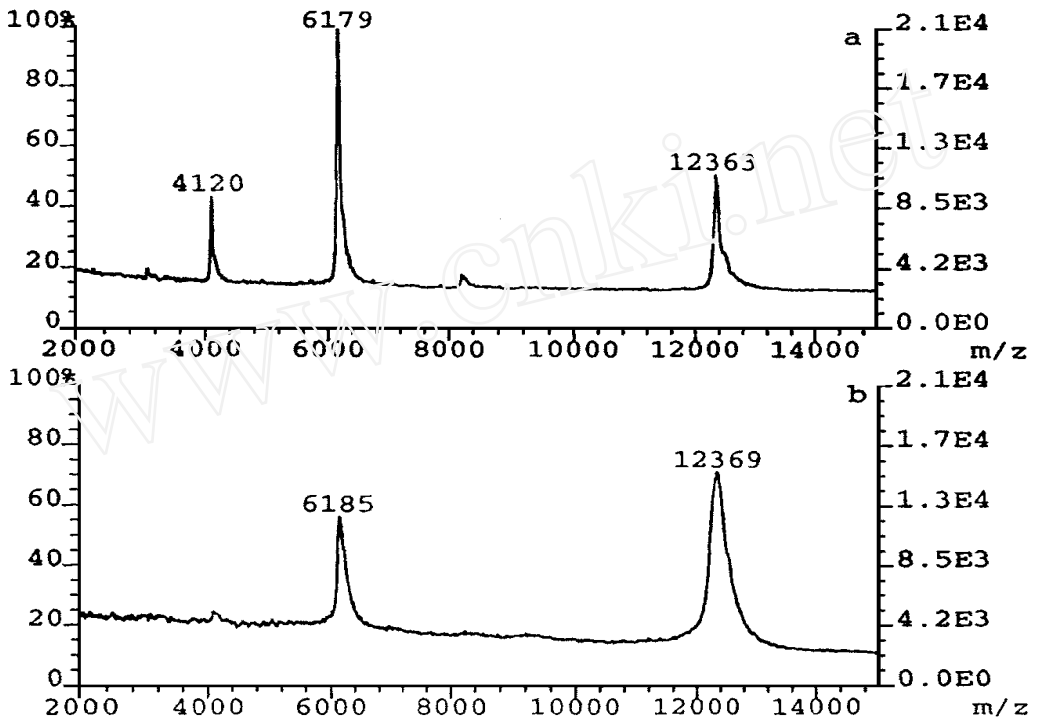


图1 细胞色素C的MALD FTOFMS分析

a: 金属靶 b: NS膜

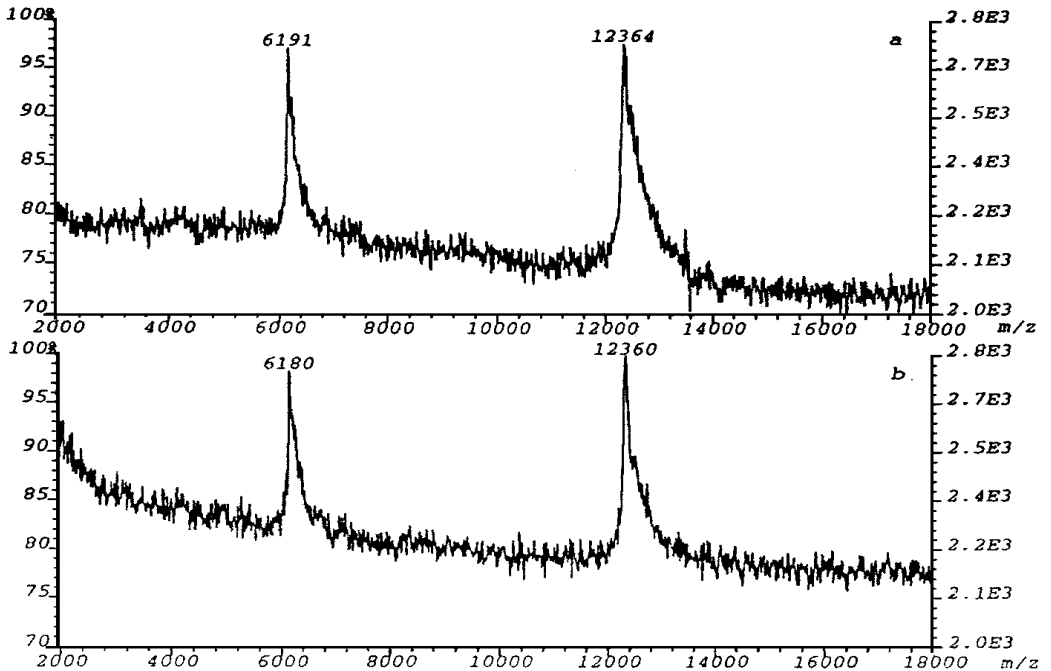


图2 NC膜上MALD FTOFMS的重现性

样品为细胞色素C a: 1号靶 b: 2号靶

2.3 共结晶与膜的物理性能

共结晶效果是MALDI-TOF-MS的关键,“包裹型”(样品包裹基质或基质包裹样品)共结晶最适合于MALDI测试。就细胞色素C而言,容易形成较大的晶体,因此,共结晶时,基质被包裹在蛋白质晶体中(图3a)。“包围型”(基质晶体环绕在样品晶体周围,图3b)也获得了良好的质谱图。“孤立型”(基质晶体基本与样品晶体分开,图3c)不能测到样品信号。

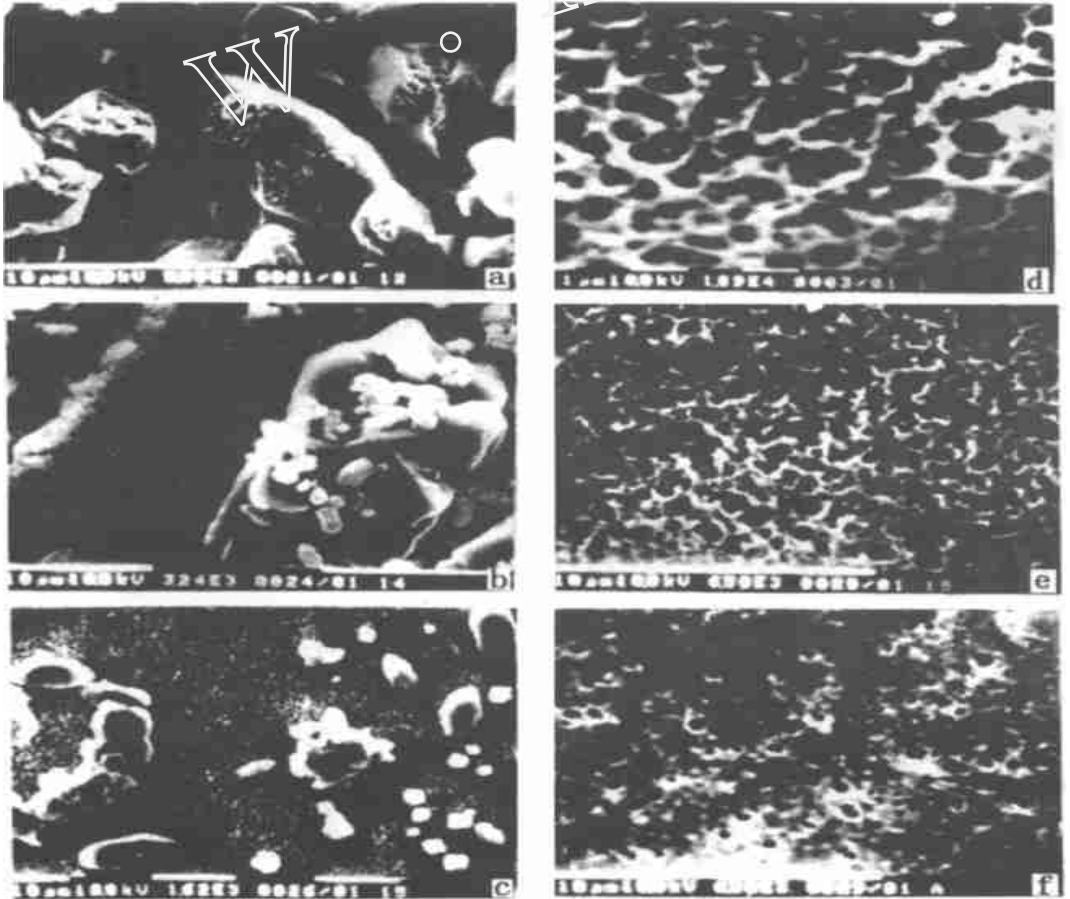


图3 膜及膜上晶体的扫描电子显微镜照片

a:“包裹型”共结晶 b:“包围型”晶体 c:“孤立型”晶体
d, e: 润湿后NC膜表面 f: 润湿前NC膜表面

膜表面的物理、化学性能对蛋白质膜上MALDI-TOF-MS无疑影响很大。尼龙、PVDF和NC这些常用的转移膜究竟谁好谁差,至今尚无定论。甚至,有人认为,聚乙烯膜比直接用金属靶还好^[6]。最初的分析是将10pmol蛋白质滴加在Immobilon P(一种改性PVDF)膜上,再滴加靛肉桂酸基质饱和溶液,可观察到基质的离子峰,但只观测到极弱的样品信号。虽然Immobilon P的平均孔径为0.45 μm ,但实际孔径分布为1~10 μm ,而且

有大的“洞穴(cavern)”^[6],而NC膜的孔径分布才0.2~1.5 μm (图3d),样品更容易吸附在NC膜的浅表面,而不是深深地渗进去。从结合容量和吸附力(用10% SDS冲洗后的蛋白质残留率描述)的方面说,PVDF优于NC和尼龙,适合于蛋白质电印迹后的膜上序列分析,但不一定适用于MALDI-TOF-MS,因为强吸附可能导致蛋白质难以重新溶剂化和与基质共结晶。因此,合适的结合容量、吸附力、孔径分布和孔深是非常重要的。

值得注意的是,润湿前后膜上孔的形态有明显变化。润湿前,不仅孔小,而且稀疏;润湿后,孔大而密,这有利于蛋白质的吸附和再溶剂化,特别是,溶胀后的孔不会因膜的干燥而缩小。至于采用甲醇还是乙腈来润湿膜,有不同的看法。有人认为应采用甲醇,并强调不宜用乙腈^[9]。我们认为,其所用为聚偏氟乙烯膜,其它膜不一定受此限制。事实上,对于NC膜,两种溶剂均可,而且,乙腈是MALDI-TOF-MS中最常用的溶剂,因而用乙腈充分润湿NC膜后再滴加样品溶液,获得了较好的图谱。

致谢 本文的电镜照片由军事医学科学院电镜室汪宝珍和张得添老师拍摄,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 B T Chait High-Accuracy Molecular Mass Determination of Proteins Using Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry, *Anal Chem*, 1990; 62(17): 1836
- 2 K K Mock Sample Immobilization Protocols for Matrix-Assisted Laser-Desorption Mass Spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1992; 6(4): 233
- 3 D W Speicher Microsequencing with PVDF Membranes: Efficient Electroblothing, Direct Protein Adsorption and Sequencer Program Modifications, in: T E Hugli, *Techniques in Protein Chemistry*, Academic Press, NC 1989, 24
- 4 J T Watson, *et al* Direct Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometric Analysis of Proteins Immobilized on Nylon-M based membrane, *J Am Soc Mass Spectrom*, 1994; 5: 230
- 5 K Strupat, *et al* Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Proteins Electroblooded after Polyacrylamide Gel Electrophoresis, *Anal Chem*, 1994; 66: 464
- 6 J A Blackledge and A J Alexander Polyethylene Membrane as a Sample Support for Direct matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Analysis of High Mass Proteins, *Anal Chem*, 1995; 67: 843
- 7 Jiang W u A Strategy to Locate Cysteine Residues in Proteins by Specific Chemical Cleavage Followed by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal Biochem*, 1996; 235: 161
- 8 J T Watson Optimization of the Cleavage Reaction for Cyanylated Cysteiny proteins for Efficient and Simplified Mass Mapping, *Anal Biochem*, 1998; 258: 268
- 9 M M Vestling and C Fenselau Poly(vinylidene difluoride) Membranes as the Interface between Laser Desorption Mass Spectrometry, Gel Electrophoresis, and in Situ Proteolysis, *Anal Chem*, 1994; 66: 471
- 10 赵善楷 质谱学报, 1998, 19(1): 1

Preliminary Study on Direct Mass Spectrometric Analysis of Proteins Absorbed on Membrane

Wei Kaihua, Yang Songcheng, Qian Xiaohong, Cai Yun, Wang Jie, Wang Jinglan
(National Center of Biomedical Analysis, Academy of
Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Received 1999-02-05

Abstract

Cytochrome C absorbed on nitrocellulose (NC) membrane was directly analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS). Mass accuracy and reproducibility are the same as those of standard sample preparation with the detection limitation of 1 pmol. Scanning electron microscopy showed that NC membrane enabled formation of protein matrix co-crystalline because of its low mean pore sizes and not-too-deep pores.

Key Words: MALDI-TOFMS, protein, nitrocellulose membrane, scanning electron microscopy