

蛋白质靶上快速酶解与生物质谱鉴定技术

张祥民, 于文佳, 高明霞, 邓春晖, 杨芃原

(复旦大学化学系, 生物医学研究院, 上海 200433)

On-target Protein Digestion of Proteins for Fast Mass Spectrometric Peptides Mapping and Identification

ZHANG Xiang-min, YU Wen-jia, GAO Ming-xia, DENG Chun-hui, YANG Peng-yuan
(Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: On-target tryptic digestion combined with MALDI-TOF/TOF was studied as a rapid and simple method for the analysis and identification of proteins. Conditions for on-target digestion optimized for temperature, digestion time, and proportion of protein and trypsin. A 15 min reaction time and at 50 °C and 7-100 : 1 of protein vs. trypsin was finally used.

Key words: on-target digestion; proteomics; MALDI-TOF/TOF MS

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2006)增刊-165-02

目前, 质谱尚不能对大多数分离的蛋白质进行直接结构鉴定, 通常采用蛋白质酶解方法得到特定的肽段, 再通过串联质谱和碰撞诱导断裂等技术获得肽段的氨基酸序列, 进而鉴定、确认蛋白质序列结构信息。因此, 蛋白质的高效、快速酶解一直是研究的热点技术。胶上酶解、溶液中酶解有系统研究报道^[1], 将酶固定在特定的载体材料上, 对蛋白质进行在线或离线酶解有大量研究工作^[2-3]。然而, 靶板上的快速酶解仍然有很大优势, 蛋白质经过分离后直接点到靶板上, 酶解可以同时批量、规模化进行, 酶解后的蛋白质/肽不会造成交叉污染, 同时, 靶上酶解还可以进行除盐操作, 对毛细管电泳分离蛋白质样品有独特效果。本研究采用多维高效液相色谱或毛细

管电泳分离数以千计的蛋白质馏分, 在线点样到质谱靶板上, 进而采用发展的快速靶板上酶解和除盐技术进行批量酶解, 随后通过 MALDI-TOF/TOF MS 鉴定其中的蛋白质组分, 获得了从数百到数千种蛋白质不等的鉴定结果。

1 实验部分

(1) 试剂: bovine serum albumin (BSA) 等蛋白质标准样品均购自 Sigma (St. Louis, MO, USA); MALDI 基质 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) 购自 Aldrich (Steinheim, Germany)。TFA 和色谱流动相用乙腈等购于 Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA)。Modified porcine trypsin (测序级) 购于 Pro-

mega (Madison, WI)。纯水采用 Milli-Q Millipore (Bedford, MA) 系统新鲜制备。

(2) 靶上酶解方法: 1 μL 样品溶液 (25 mM NH_4HCO_3) 与 trypsin 混合点到不锈钢靶板上 (192 孔板), 放置于饱和水蒸气的恒温箱中保持 15 min 后取出, 室温下干燥, 放置于点样器中每个样品点加 0.3 μL 5 mg/mL 的 CHCA (1 : 1 ACN/0.2% TFA) 溶液, 自然挥发、干燥, 即可 MALDI-MS 鉴定。

(3) 靶板上除盐: 实验中采用毛细管等电聚焦分离蛋白质后, 流出液在酶解前必须进行除盐 (两性电解质) 处理, 否则会严重干扰质谱图质量。具体方法是, 毛细管流出液点样到靶板上后挥发至干, 然后整块靶板分别放入 0.1% TFA、水和 0.1% NH_4OH 水溶液中 10 s 取出晾干, 在进行上述的靶上酶解操作。

2 结果讨论

(1) 温度对酶解效率的影响 首先考察了温度对酶解效率的影响, 考虑到生物酶的作用环境, 通常蛋白质在溶液或胶中酶解时, 保持在 37 $^{\circ}\text{C}$ 约 6~12 h。靶上酶解保持数小时比较困难,

需要加快酶解反应的速度。实验表明, Trypsin 的工作温度可达 50~60 $^{\circ}\text{C}$, 但在 60 $^{\circ}\text{C}$ 时该酶很容易热变性, 因此本实验选择 50 $^{\circ}\text{C}$ 进行酶解, 在该温度下 trypsin 可以在数小时内保持正常的酶结构状态和生物活性。

(2) 酶解时间 提高酶解温度会加快酶解效率, 缩短酶解时间。在 50 $^{\circ}\text{C}$ 的实验条件下, 靶上酶解在 15 min 时基本达到通常胶上或溶液中 6 h 以上的酶解效果, 因此实验采用了 50 $^{\circ}\text{C}$, 15 min 作为酶解条件。为了保持酶解过程靶上水溶剂的蒸发, 酶解过程放置在 50 $^{\circ}\text{C}$ 饱和水蒸气的容器中进行。反应完成后立即取出自然挥发至干。

(3) 酶与蛋白质比例 实验对不同的 trypsin 酶加入浓度进行了考察。通常蛋白质酶解时酶的用量在 50~100 : 1 (蛋白 : 酶) 的比例, 靶上酶解基本沿用该比例仍然可以获得较好的效果。但是在蛋白质含量较低时 (10 ng 以下), 蛋白 : 酶的比例 7 : 1 可以仍可获得较好的实验结果。图 1 为 0.1 ng BAS 靶上酶解结果, 其中肽段覆盖率为 18%。

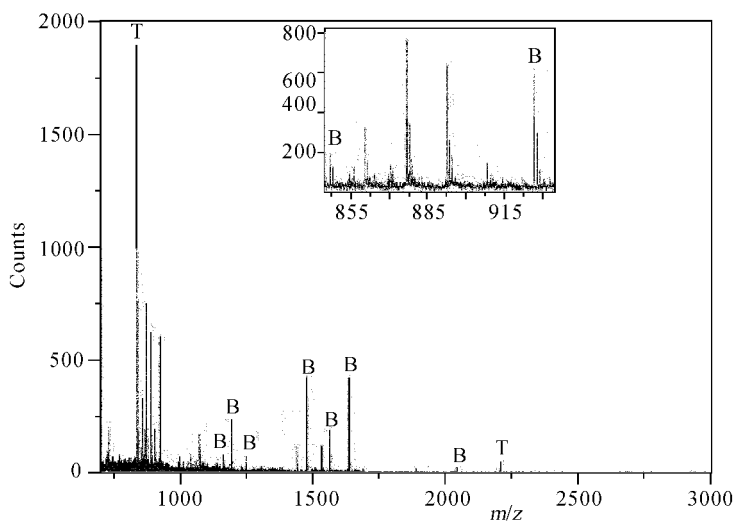


图 1 BSA 靶上酶解肽指纹图谱

B—BAS 酶解肽段峰; T—trypsin 自酶解肽段峰; 插图为放大的前部分质谱图

参考文献:

[1] N Lundell, T. Schreitmuller. Anal. Biochem, 1999, 266: 31.
[2] D Ericsson, S Ekstrom, J Nilsson, et al. Pro-

teomics, 2001, 1: 1 072.

[3] 5. Slys G W, Schriemer D C. Anal. Chem, 2005, 77: 1 572.