

原子转移自由基聚合修饰银丝固定化酶反应器的制备 及在蛋白质组鉴定中的应用

周廉淇^{1,2}, 张 姣², 田 芳², 张养军^{2*}, 钱小红²

(1. 安徽医科大学, 安徽 合肥 230032; 2. 蛋白质组学国家重点实验室, 北京蛋白质组研究中心,
军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 102206)

摘要: 针对传统溶液酶解存在的酶解时间较长、酶自切物干扰以及蛋白酶不能重复使用等缺陷, 通过电子转移生成催化剂的原子转移自由基聚合修饰银丝, 并以其为载体制备了一种新型的固定化酶反应器。用质谱考察了银丝固定化酶反应器 (SW-Trypsin) 的酶解效率、重复性和回收率。结果表明: 绒毛状聚合物修饰的 SW-Trypsin 的酶解效率较高, 酶解标准蛋白牛血清白蛋白 (BSA) 20 min 后, 肽段的氨基酸序列覆盖率可达 93%, 高于传统溶液酶解方法酶解 16 h 所得 79% 的覆盖率。使用该固定化酶反应器于一个月内 8 次酶解 BSA 所得的氨基酸序列覆盖率在 89% 到 97% 之间, 平均覆盖率为 94%, 显示出良好的稳定性。另外, 该固定化酶反应器酶解马心肌红蛋白 (MYO) 的回收率为 87.67%。最后, 用 SW-Trypsin 酶解嗜热菌全蛋白 20 min, 所鉴定到的氨基酸序列覆盖率和蛋白数量与同样条件下溶液酶解 16 h 的结果接近, 且零漏切位点肽段的比例更高。加之容易分离的优点, SW-Trypsin 在蛋白质组学的应用中具有良好的前景。

关键词: 原子转移自由基聚合反应; 蛋白质组学; 质谱; 固定化酶反应器; 银丝

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2013)04-0355-07

Preparation of a trypsin immobilized reactor on silver wire modified by atom transfer radical polymer and its application in proteome identification

ZHOU Lianqi^{1,2}, ZHANG Jiao², TIAN Fang², ZHANG Yangjun^{2*}, QIAN Xiaohong²

(1. Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. State Key Laboratory of Proteomics,
Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China)

Abstract: The routine proteolysis of proteins is performed in solution, but it suffers from drawbacks such as long incubation time, enzyme autodigestion, and non-reusability. Therefore we here demonstrated that trypsin could be immobilized on silver wire modified by atom transfer radical polymerization to prepare a new kind of enzyme immobilized reactor. The digestion efficiency, repeatability and recovery of the silver wire-trypsin reactor (SW-Trypsin) were evaluated by mass spectrometry (MS) analysis. Highly efficient digestion was achieved by using SW-Trypsin within only 20 min. Standard protein could be almost completely digested with sequence coverage up to 93%, which is higher than that of 79% sequence coverage obtained by in-solution digestion for 16 h. Bovine serum albumin (BSA) was digested eight times within a month by using the SW-Trypsin. The results of sequence coverage were between 89% to 97%, with an average sequence coverage of 94%, which showed that SW-Trypsin had good stability. In addition, the recovery test by using myoglobin (MYO) showed that the recovery rate was 87.67%. At last, the extract from *Tengchong* thermophilic bacteria was digested by SW-Trypsin in 20 min and in-solution trypsin in 16 h. The results of sequence coverages and the number of identified proteins were similar. Moreover, the ratio of the number of peptides with zero missed cleavages to the number of all identified peptides by using

* 通讯联系人, E-mail: zhangyangjun6314@yahoo.com.cn.

基金项目: 国家重大科学计划项目 (2012CB910603, 2010CB912704); 国家重大科学仪器设备开发专项项目 (2011YQ030139, 2011YQ06008408, 2012YQ12004407); 国家高新技术研究发展计划项目 (2012AA020202); 国家自然科学基金项目 (20735005, 21275159).

收稿日期: 2012-11-05

SW-Trypsin was higher than that by in-solution digestion. Also, the SW-Trypsin was easily removed from the digestion solution. Good performances of SW-Trypsin implied that it has a good prospect in the application in future proteomics research.

Key words: atom transfer radical polymerization; proteomics; mass spectrometry (MS); trypsin immobilized reactor; silver wire

对生物系统中蛋白质组进行研究可为更好地理解复杂的生物机制提供有用信息^[1]。而在蛋白质组学研究中最常用的是“bottom-up”研究策略,其主要有两种工作流程:一种是先在蛋白质水平上分离,再酶解后采用肽质量指纹谱^[2]或采用串联质谱分析^[3];而另一种则是全蛋白在不经任何分离的情况下直接酶解后产生多肽混合物,该混合物经过多维色谱分离后采用串联质谱进行分析,将其产生的串联质谱数据通过搜库软件对蛋白质进行鉴定,该方法又常被称为“鸟枪法”^[4]。鉴于上述两种主要的工作流程中都需要将蛋白质酶解后对其酶解产物进行质谱(MS)分析,Bruening等^[5]就曾在文章中表示蛋白质的鉴定及其翻译后修饰的研究中最常用的方法是将蛋白质酶解后对其酶解产物进行MS分析,蛋白质的酶解在蛋白质组学的研究中发挥着关键作用。

由于胰蛋白酶可以特异性地切断精氨酸或赖氨酸羧基端且酶解形成的肽段的相对分子质量适合于质谱的质量鉴定范围^[6],所以胰蛋白酶成为蛋白质组学研究中最常使用的蛋白酶^[7]。传统的酶解方法是将胰蛋白酶溶解在溶液中使用;为防止胰蛋白酶自身酶解带来的干扰肽段^[8],通常只加入少量的胰蛋白酶,因此需要较长的酶解时间^[9],这就成为高通量蛋白质组学研究中的限速环节^[10]。为了解决溶液酶解过程中存在的问题,蛋白质组学研究中引进并发展了固定化酶技术。固定化酶技术由于其稳定性好、可重复使用、易于分离等优势受到了越来越多的关注^[11]。目前已有许多关于固定化酶反应器的报道,其材料也多种多样,包括纳米金颗粒^[12-14]、包裹二氧化硅的磁性纳米颗粒^[15,16]、氧化石墨烯^[17]、芯片材料^[18,19]、棉纱^[20]、介孔材料^[21,22]、石英毛细管整体柱^[23,24]以及杂化整体柱^[25]等,但绝大部分的载体都会有其缺陷。我们在冯娟娟等^[26]的工作基础上,发展了一种制备简单、容易分离的金属丝固定化酶反应器,采用原子转移自由基聚合反应(ATRP)^[27]生成带有环氧基团的聚合物链,并使用环氧基固定胰蛋白酶。传统的ATRP反应中的催化剂对O₂及H₂O较为敏感,不利于反应的控制;在本研究中,采用了电子转移生成催化

剂的原子转移自由基聚合(AGET-ATRP)^[28]的方法在银丝表面修饰上含有环氧基的聚合物长链,制备了一种极易分离的固定化酶反应器,并将其初步应用于嗜热菌蛋白质组的鉴定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

TSQ Vantage 三重四极杆质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 4800 基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱仪(MALDI-TOF MS, 美国 AB SCIEX 公司); 反相高效液相色谱-电喷雾-线性离子阱-傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(RPLC-ESI-LTQ-ICR-FT MS, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Eksigent nanoLC-2D 液相色谱系统(荷兰 Eksigent 公司); 安捷伦 1100 毛细管色谱系统(美国 Agilent 公司); 3K30 型高效离心机(美国 SIGMA 公司); SC100A Speedvac Plus 真空冰冻干燥机(美国 Thermo Savant 公司); Sartorius CPA225D 分析天平(德国 Sartorius 公司); JY92-II 超声细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); Thermo Heraeus Fresco 21 微量离心机(德国 Heraeus 公司); Nano-Drop 2000c 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

主要试剂: 马心肌红蛋白(MYO)、牛血清白蛋白(BSA)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)、甲酸(FA)、三甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)、11-巯基-1-十一烷醇和 *N,N,N',N'',N'''*-五甲基二乙烯三胺均购自美国 Sigma 公司; 1,4-二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)和胰蛋白酶购自美国 Promega 公司; 色谱级乙腈(ACN)购自美国 J. T. Baker 公司; 氰基硼氢化钠(sodium cyanoborohydride)购自美国 Acros 公司; 尿素和三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自美国 Affymetrix 公司; 其余试剂均购自北京化工厂; 所有实验用水由 Milli-Q 纯水系统提供(美国 Millipore 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 银丝的前处理

截取约 8 cm 长的银丝,绕成弹簧状后置于 1.5 mL eppendorf (EP) 管中,使用 25% (体积分数)的硝

酸去除表面的氧化膜。之后用水清洗3次,再用乙醇清洗3次,置于室温干燥后备用。

1.2.2 银丝固定化酶反应器(SW-Trypsin)的制备

我们对文献^[29,30]中报道的合成引发剂的方法略作改动。将原来室温反应完成后提取及浓缩的步骤改为直接使用滤纸过滤。滤液用 N_2 吹干至略有粘滞感,溶解在无水乙醇中,配制成终浓度为10 mmol/L的反应液。取一根银丝置于含500 μ L反应液的EP管中,置于旋转混合仪上过夜反应。用甲醇清洗掉剩余引发剂后,加入ATRP反应液(含2 mol/L GMA、0.02 mol/L $CuCl$ 、0.03 mol/L N,N,N',N'' -五甲基二乙烯三胺和0.001 mol/L $CuCl_2$ 的环己醇溶液),再加入0.03 mol/L葡萄糖,室温振荡反应24 h。后续反应参见相关文献^[15,16]。SW-Trypsin制备完成后,使用50 mmol/L的Tris-HCl缓冲液清洗4 $^{\circ}C$ 保存。

在固定胰蛋白酶前,采用超微量分光光度计测定胰蛋白酶反应液的蛋白浓度;固定后,重新测定该反应液的浓度,计算得到SW-Trypsin的负载量。

1.2.3 SW-Trypsin 酶解标准蛋白

配制2 g/L的BSA和1 g/L的MYO溶液(溶剂为50 mmol/L Tris-HCl缓冲液)。BSA溶液中加入终浓度为10 mmol/L的DTT,置于沸水中加热变性10 min。冷却至室温后加入终浓度为50 mmol/L的IAA,暗处放置1 h,补加DTT,于37 $^{\circ}C$ 水浴酶解20 min。将SW-Trypsin取出,溶液稀释后点靶进行MALDI-TOF MS分析。由于MYO不含半胱氨酸,不存在二硫键,故直接置于沸水中进行热变性,再用SW-Trypsin于37 $^{\circ}C$ 酶解20 min。将SW-Trypsin取出,溶液稀释后点靶进行MALDI-TOF MS分析。

分别采用SW-Trypsin酶解和传统溶液酶解MYO,使用Eksigent nanoLC-2D-TSQ Vantage联用系统对两种条件下酶解后所得的3条零漏切位点肽段(VEADIAGHGQEVLR, HGTVVLTALGGILK, ALELFR)进行分析,用Pinpoint软件处理数据。

1.2.4 嗜热菌全蛋白的提取

将嗜热菌干粉溶于1 mL裂解液(8 mol/L尿素,50 mmol/L Tris-HCl)中,在冰浴下进行超声提取。超声功率为400 W,脉冲工作模式:工作1 s,间隔2 s,工作60 s后静置3 min,重复以上操作8次。于4 $^{\circ}C$ 下以14 000 r/min离心1 h,上清液即为全蛋白提取液。使用分光光度计测定全蛋白浓度,分装后保存于-80 $^{\circ}C$ 冰箱备用。

1.2.5 SW-Trypsin 酶解嗜热菌全蛋白

取100 μ g的嗜热菌全蛋白,加入终浓度为

10 mmol/L的DTT,于37 $^{\circ}C$ 水浴中还原4 h,冷却至室温,加入终浓度为50 mmol/L的IAA,暗处放置1 h进行烷基化。补加DTT后使用50 mmol/L Tris-HCl缓冲液稀释至终体积为200 μ L。将其分为两份,一份采用传统溶液酶解方法酶解16 h;另外一份加入SW-Trypsin,于37 $^{\circ}C$ 水浴20 min,然后将SW-Trypsin取出。两种方法酶解完成后各取0.5 μ g酶解肽段,脱盐后用RPLC-ESI-LTQ-ICR-FT MS进行分离和鉴定。

1.2.6 色谱及质谱条件

MALDI-TOF MS条件:仪器控制软件为4000 Series ExplorerTM software。用MYO的胰蛋白酶酶解肽段作为标准对仪器进行外标校正,要求相对标准偏差小于 10×10^{-6} 。一级质谱数据采集使用MS-2 kV反射模式,加速电压为20 kV。MYO的酶解产物扫描范围: m/z 620~4 000;BSA的酶解产物扫描范围: m/z 650~4 000。激光能量调整合适,每张谱图由1 600个亚谱累加获得。分别取两种标准蛋白的酶解溶液稀释到0.01 g/L,各取0.8 μ L点到MALDI-TOF MS的靶上,待室温干燥后,点上0.8 μ L CHCA基质结晶后进行MALDI-TOF MS分析。所得质谱数据采用MASCOT检索软件^[31]进行肽质量指纹图谱分析。

Eksigent nanoLC-2D-TSQ Vantage联用系统条件:自动进样器上样,上样量为0.01 μ g。液相色谱条件为:流动相A为含0.1%(体积分数,下同)FA和2% ACN的水溶液,流动相B为含0.1% FA和98% ACN的水溶液。洗脱条件为:0~1 min,5% B~8% B;1~26 min,8% B~35% B;26~28 min,35% B~95% B;28~33 min,95% B;33~35 min,100% A平衡色谱柱。流速为380 nL/min。质谱条件:正离子模式,喷射电压为1 900 V,毛细管温度为240 $^{\circ}C$;采用SRM扫描模式:Q1的分辨率设置为0.7(FWHM),Q2的氦气碰撞压力为1.5 mTorr, Q3的分辨率设置为0.7(FWHM);循环时间为2 s;质谱采集时间为40 min。

RPLC-ESI-LTQ-ICR-FT MS条件:自动进样器上样,上样量为20 μ L(0.5 μ g)。在Agilent 1100系统上进行色谱分离,洗脱的馏分经ESI离子源离子化后进入质谱进行分析。液相色谱条件为:流动相A为含0.1% FA和2% ACN的水溶液,流动相B为含0.1% FA和80% ACN的水溶液。洗脱条件为:0~1 min,0% B~6% B;1~91 min,6% B~40% B;91~101 min,40% B~100% B;101~111 min,100% B;111~112 min,100% B~100% A;112~

120 min, 100% A 平衡色谱柱。流速为 300 nL/min。质谱条件: 正离子模式; 扫描范围为 m/z 375.0 ~ 1 500.0; 质谱采集时间为 110 min; 数据依赖模式为选取一级质谱全扫描的 10 个信号最高的离子进行 MS/MS 分析; 碰撞能量为 35 V, 活化时间为 10 ms; 重复采集谱图 2 次后, 动态排除, 时间为 65 s。MS/MS 谱图数据检索用 pFind^[32] 软件分析, 具体设置包括: 蛋白质水解酶为胰蛋白酶; 允许漏切位点数 2 个; 固定修饰为半胱氨酸烷基化; 可变修饰为甲硫氨酸氧化; 母离子质量偏差为 20 ppm (10^{-6}); 碎片离子质量偏差为 0.8 Da。最后使用 pBuild 软件对搜库结果进行过滤, 使得总体的假阳性率小于 1%。

2 结果与讨论

2.1 SW-Trypsin 的制备与表征

SW-Trypsin 的制备流程如图 1 所示。首先, 依靠引发剂上的巯基将引发剂连接到银丝表面, 使之与 GMA 单体进行 AGET-ATRP 聚合反应。即在银丝表面固定大量的环氧基, 再采用乙二醇与 GMA 进行开环反应使其带上氨基, 最后用戊二醛交联表面的氨基和胰蛋白酶的氨基而将胰蛋白酶固定到银丝表面。

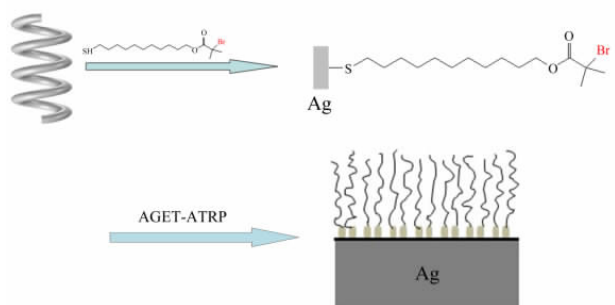


图 1 SW-Trypsin 的制备流程图
Fig. 1 Flow chart for the preparation procedures of silver wire-trypsin reactor (SW-Trypsin)

AGET-ATRP 反应后的银丝有肉眼可见的聚合物层, 利用光电显微镜对聚合物链修饰的银丝以及未经任何处理的银丝进行表面结构表征。从图 2 中可看出, 仅 40 倍放大即可观察到经 AGET-ATRP 反应后银丝表面生成大量均匀的毛发状聚合物修饰, 无明显可见的裸露银丝。毛发状聚合物的修饰提高了银丝的比表面积, 使银丝修饰了高密度的环氧基团, 大幅提高了固定化胰蛋白酶的负载量, 进而通过增加酶量而提高酶解效率。

为进一步考察其负载量, 使用超微量分光光度计测定胰蛋白酶固定前后溶液中 A_{280} 处吸收峰变化, 计算出浓度差。再根据反应液的体积为 0.5 mL

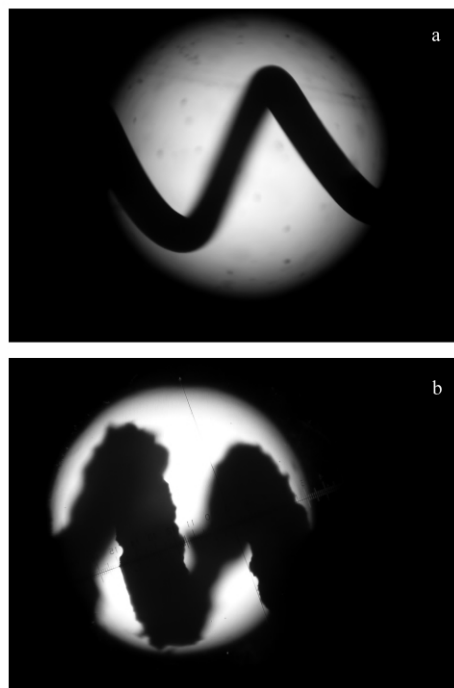


图 2 (a) 未经任何处理的银丝和 (b) 毛发状聚合物包裹的银丝 (SW-Trypsin) 的光电显微镜图 (40 ×)
Fig. 2 Microscope images of (a) silver wire (40 ×) and (b) SW-Trypsin (40 ×)

计算出一根 8 cm 长的银丝的胰蛋白酶负载量。平行试验重复测定 3 次的结果列于表 1 中。胰蛋白酶固定前后平均质量浓度差为 0.732 g/L, 负载量为 0.366 mg, 即每一根 8 cm 长的银丝可固定 0.366 mg 胰蛋白酶。AGET-ATRP 生成的聚合物链上具有的高密度环氧基增加了胰蛋白酶的负载量。

表 1 胰蛋白酶固载量考察
Table 1 Amount of trypsin immobilized on the silver wire

$\rho(\text{Trypsin}) / (\text{g/L})$	
Before immobilization	After immobilization
1.874	1.127
1.861	1.148
1.874	1.138

2.2 SW-Trypsin 的酶解效率考察

我们选取了两种标准蛋白质考察 SW-Trypsin 的酶解效率。一种是被认为对蛋白酶的水解作用具有耐受性的 MYO^[33], 其相对分子质量为 16 900 Da; 另一种是 BSA, 其相对分子质量为 66 430 Da, 由 583 个氨基酸组成, 其中 35 个半胱氨酸形成 17 个二硫键, 在肽链的第 34 位有一自由巯基。两种蛋白质都分别采用 SW-Trypsin 和传统的溶液酶解方法进行酶解, 其中 SW-Trypsin 酶解两种蛋白质仅需 20 min, 而传统的溶液酶解则需要 16 h。

MYO 和 BSA 经 SW-Trypsin 酶解后进行 MAL-

DI-TOF MS 分析的一级质谱图分别如图 3 和图 4 所示。SW-Trypsin 酶解 MYO 和 BSA 的氨基酸序列覆盖率分别可以达到 98% 和 93%。而传统的蛋白质溶液酶解所得氨基酸覆盖率仅分别为 88% 和 79%, 如表 2 所示。

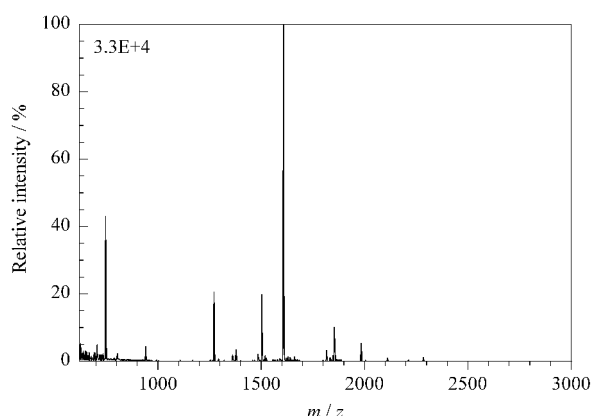


图 3 SW-Trypsin 酶解 MYO 的 MALDI-TOF MS 谱图

Fig. 3 MALDI-TOF mass spectrum of peptides of MYO digested with SW-Trypsin

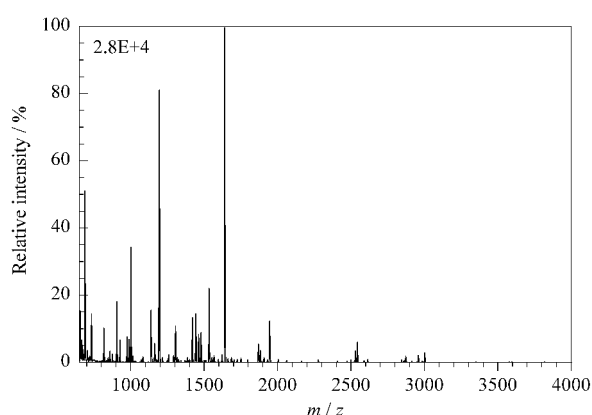


图 4 SW-Trypsin 酶解 BSA 的 MALDI-TOF MS 谱图

Fig. 4 MALDI-TOF mass spectrum of peptides of BSA digested with SW-Trypsin

表 2 传统溶液酶解与 SW-Trypsin 酶解 MYO 和 BSA 所得氨基酸序列覆盖率比较

Table 2 Comparison of sequence coverages between traditional in-solution digestion and SW-Trypsin digestion of MYO and BSA

Method	MYO		BSA	
	Number of identified peptides	Sequence coverage / %	Number of identified peptides	Sequence coverage / %
Free trypsin	23	88	63	79
SW-Trypsin	28	98	104	93

进一步研究了两种蛋白质的肽段鉴定数量。传统溶液酶解 MYO 和 BSA 后,经 MALDI-TOF MS 分析,分别鉴定到 23 条和 63 条肽段。而 MYO 和 BSA 经 SW-Trypsin 酶解后,分别鉴定到 28 条和 104 条肽段。肽段鉴定数量有所提高,这有助于降低蛋白质鉴定的假阳性率。

当传统溶液酶解方法用于¹⁸O 标记时,常常需要通过变性、加热和酸化等方法来避免回交换反应,而 SW-Trypsin 完成酶解后可直接使用镊子夹出。另外,SW-Trypsin 相对溶液酶解具有酶解效率高的优点。由于银丝表面通过 AGET-ATRP 反应生成的聚合物链上带有高密度环氧基,从而使其固定上大量的胰蛋白酶,而且非交联的聚合物链有利于酶与底物的接触。SW-Trypsin 酶解效率接近磁性纳米颗粒,制备的步骤也相似,但制备完成后不存在团聚问题,且分离相对容易;酶解完成后的分离比纳米金颗粒容易;酶解样品的通量明显优于石英毛细管和芯片材料;较整体柱的制备更为容易。

2.3 SW-Trypsin 的稳定性与回收率考察

为考察该固定化酶反应器的稳定性,即是否可以重复使用,用一根 SW-Trypsin 在一个月内酶解 8 份 BSA,酶解后的产物分别进行 MALDI-TOF MS 分析。质谱数据用 MASCOT 检索软件进行肽质量指纹图谱分析,所得氨基酸序列覆盖率在 89% 到 97% 之间,平均覆盖率为 94%,相对标准偏差(RSD)为 3.13%,如图 5 所示。说明 SW-Trypsin 能够多次重复使用,具有较好的稳定性。

考虑到实验中生成的聚合物链可能导致的非特异性吸附,我们还使用 MYO 对该固定化酶的回收率进行了考察。通过选择性反应监测的方法分别对经 SW-Trypsin 酶解和传统溶液酶解后所得的零漏切位点肽段进行定量,最终得到该固定化酶的回收率。选择 3 条零漏切位点肽段(具体信息见表 3),使用 Pinpoint 软件对数据结果进行分析,3 条肽段的总离子流色谱图如图 6 所示。从图 6 中可以看出蛋白质经 SW-Trypsin 酶解的肽段色谱峰保留时间与经传统溶液酶解的结果相比基本无偏移。通过计算得到 3 条肽段回收率(见表 4),平均肽段回收率达

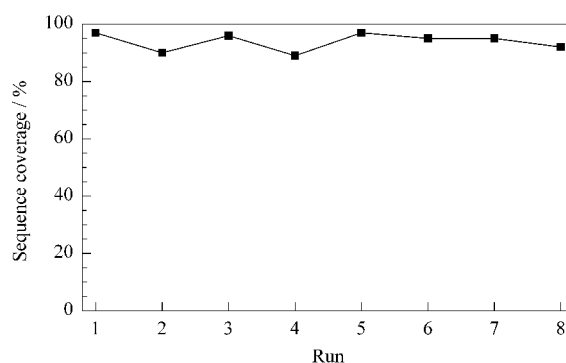


图 5 SW-Trypsin 酶解 BSA 稳定性和重现性考察

Fig. 5 Stability and repeatability tests of SW-Trypsin with BSA

BSA was digested eight times within a month.

到 87.67%。其中氨基酸序列为 HGTVVLTALGGILK 的肽段回收率相对较低,而该肽段也是所有肽段中疏水性最强的肽段。该结果也提示了 SW-Trypsin 可能对疏水性肽段具有一定的吸附能力。另外肽段 ALELFR 的回收率大于 100%,可能是由于仪器误差、溶液酶解的该肽段存在漏切位点或过度酶解所致。

表 3 用于考察回收率的特征肽段及其特征离子对

Table 3 Transitions of unique peptides used for evaluating recovery

Amino acid sequence of peptide	Parent ion (m/z)	Product ions (m/z)	
VEADIAGHGQEVLR	803.931	1192.679	1079.595
		1008.558	951.5365
		814.4776	757.4561
		500.3549	401.2865
HGTVVLTALGGILK	689.9244	1184.761	1083.713
		984.6447	885.5762
		671.4445	487.3233
		430.3018	260.1963
ALELFR	374.7212	322.187	564.3135
		677.3975	435.2709
		175.1184	

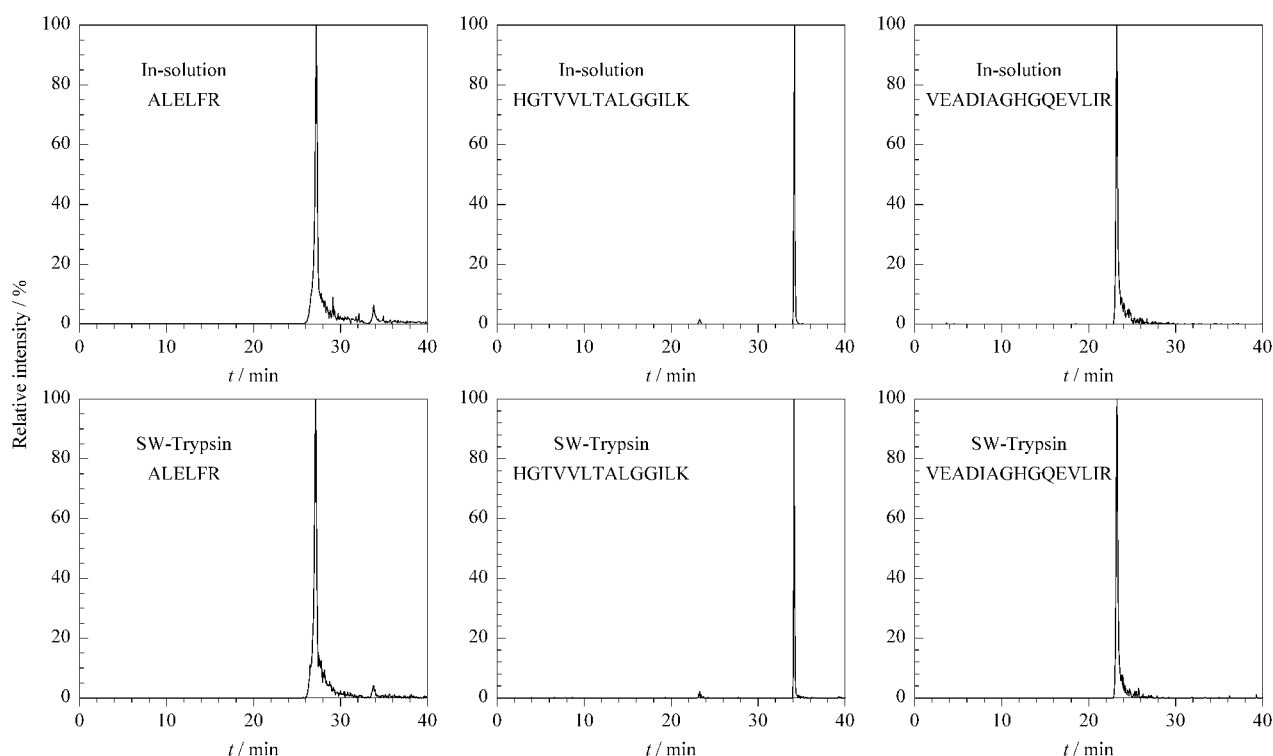


图 6 Pinpoint 软件提取的 3 条肽段的总离子流色谱图

Fig. 6 Total ion chromatograms of three peptides extracted using Pinpoint software

表 4 SW-Trypsin 的回收率考察

Table 4 Recovery of SW-Trypsin

Peptide	Peak areas		Recovery / %
	SW-Trypsin	Free trypsin	
ALELFR	1.895×10^5	1.767×10^5	107
HGTVVLTALGGILK	7.694×10^4	1.220×10^5	63
VEADIAGHGQEVLR	5.640×10^4	6.092×10^4	93

2.4 SW-Trypsin 用于腾冲嗜热菌蛋白质组鉴定

使用腾冲嗜热菌作为实际样品,对 SW-Trypsin 在蛋白质组鉴定中的适用性进行了考察。将腾冲嗜热菌的全蛋白进行提取及变性后,取 50 μ g 的腾冲

嗜热菌蛋白,用一根 SW-Trypsin 酶解 20 min,另取 50 μ g 的腾冲嗜热菌蛋白采用传统溶液酶解方法进行酶解 16 h。用 RPLC-ESI-LTQ-ICR-FT MS 对两份酶解样品进行分析。SW-Trypsin 酶解全蛋白的总离子流图如图 7 所示。使用 pFind 软件检索腾冲嗜热菌蛋白质数据库,结果表明:经 SW-Trypsin 酶解后鉴定到 1 254 条肽段,归属于 489 个蛋白质。其中仅 5 条肽段含两个漏切位点,而含 1 个漏切位点的肽段也只有 151 条。经传统溶液酶解的样品中鉴定到 1 269 条肽段,归属于 437 个蛋白质。值得注意的是其中有 49 条肽段含有两个漏切位点,而含有 1

个漏切位点的肽段有 346 条。以上结果证明 SW-Trypsin 具有高效、快速酶解的能力,可应用于细胞等复杂体系的全蛋白酶解。

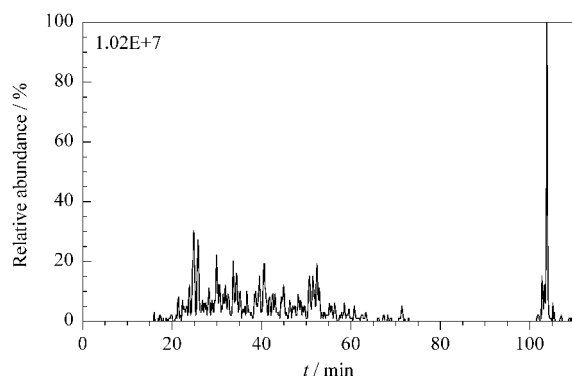


图7 SW-Trypsin 酶解腾冲嗜热菌全蛋白所得肽段的基峰色谱图

Fig. 7 Base peak chromatogram of tryptic digests of *T. tengcongensis* digested by SW-Trypsin

3 结论

本研究制备了一种新型绒毛状聚合物表面修饰的银丝固定化胰蛋白酶反应器。两种标准蛋白 BSA 和 MYO 经 SW-Trypsin 酶解 20 min 后所得的氨基酸序列覆盖率均好于传统溶液酶解方法,实验结果表明该 SW-Trypsin 具有较高的酶解效率。另外,使用 SW-Trypsin 在一个月内 8 次酶解 BSA 所得的平均氨基酸序列覆盖率试验和回收率试验结果表明其具有良好的稳定性和较高的回收率。本研究还将 SW-Trypsin 成功应用于腾冲嗜热菌蛋白质组鉴定。加之 SW-Trypsin 容易分离的优点,使其在蛋白质组学的应用中具有良好的前景。

参考文献:

- [1] Angel T E, Aryal U K, Hengel S M, et al. Chem Soc Rev, 2012, 41(10): 3912
- [2] Mann M, Hojrup P, Roepstorff P. Biol Mass Spectrom, 1993, 22(6): 338
- [3] Ogorzalek L R R, Hayes R, Yang Y, et al. Int J Mass Spectrom, 2005, 240: 317
- [4] McDonald W H, Yates III J R. Curr Opin Mol Ther, 2003, 5: 302
- [5] Xu F, Wang W H, Tan Y J, et al. Anal Chem, 2010, 82(24): 10045
- [6] Jang H B, Sung H W, Nho S W, et al. Anal Chem, 2011, 83(5): 1717
- [7] Ren D, Pipes G D, Liu D, et al. Anal Biochem, 2009, 392(1): 12
- [8] Lazar I M, Ramsey R S, Ramsey J M. Anal Chem, 2001, 73: 1733
- [9] Slys G W, Schriemer D C. Anal Chem, 2005, 77: 1572
- [10] Ma J, Liang Z, Qiao X, et al. Anal Chem, 2008, 80: 2949
- [11] Ma J, Zhang L, Liang Z, et al. J Sep Sci, 2007, 30: 3050
- [12] Hinterwirth H, Lindner W, Lämmerhofer M. Anal Chim Acta, 2012, 733: 90
- [13] Mikšík I, Lacinova K, Zmatlíková Z, et al. J Sep Sci, 2012, 35(8): 994
- [14] Kotal M, Srivastava S K, Maiti T K. J Nanosci Nanotechnol, 2011, 11(11): 10149
- [15] Qin W, Song Z, Fan C, et al. Anal Chem, 2012, 84(7): 3138
- [16] Song Z F, Zhang Q L, Zhang Y J, et al. Chinese Journal of Chromatography (宋子凤, 张庆林, 张养军, 等. 色谱), 2012, 30(6): 549
- [17] Xu G, Chen X, Hu J, Analyst, 2012, 137: 2757
- [18] Zhao Y, Liu Y, Lee I, et al. J Biomed Mater Res A, 2012, 100(1): 103
- [19] Liu J, Lin S, Qi D, et al. J Chromatogr A, 2007, 1176(1/2): 169
- [20] Nikolic T, Kostic M, Praskalo J, et al. Carb Poly, 2010, 82(3): 976
- [21] Yuan H, Zhang L, Hou C, et al. Anal Chem, 2009, 81(21): 8708
- [22] Qian K, Wan J, Qiao L, et al. Anal Chem, 2009, 81(14): 5749
- [23] Liang Y, Tao D, Ma J, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218(20): 2898
- [24] Hu J W, Shen Y H, Qin W J, et al. Chem J Chinese (胡佳薇, 申烨华, 秦伟捷, 等. 高等学校化学学报), 2012, 33(2): 268
- [25] Ma J, Liang Z, Qiao X, et al. Anal Chem, 2008, 80(8): 2949
- [26] Feng J, Sun M, Xu L, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218: 7758
- [27] Matyjaszewski K, Xia J. Chem Rev, 2001, 101: 2921
- [28] Tan Y, Yang Q, Sheng D, et al. e-Polymers, 2008, 25: 1
- [29] Jones D M, Brown A A, Huck W T S, et al. Langmuir, 2002, 18: 1265
- [30] Zhang Z, Chen S F, Chang Y, et al. J Phys Chem B, 2006, 110: 10799
- [31] Perkins D N, Pappin D J C, Creasy D M, et al. Electrophoresis, 1999, 20(18): 3551
- [32] Li D, Fu Y, Sun R, et al. Bioinformatics, 2005, 21(13): 3049
- [33] Wang S, Bao H, Yang P, et al. Anal Chim Acta, 2008, 612(2): 182