

基于温敏型材料的固定化酶的制备及其在蛋白质组快速分析中的应用

张倩 郑斐 秦伟捷* 钱小红*

军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 国家蛋白质科学研究中心

蛋白质组学国家重点实验室, 北京蛋白质组研究中心, 北京 102206

摘 要 蛋白质组学通过规模化鉴定、分析从细胞、组织或有机体中提取的蛋白质, 从而获得蛋白表达、修饰、组成和定量的变化信息。在目前最为有效的“鸟枪法”蛋白质组学策略中, 固定化酶试剂基质常用固相载体材料, 该固定化酶试剂在酶解蛋白质时为异相体系, 存在固液界面传质阻力和空间位阻, 限制了酶解效率和样品处理通量。针对这一技术瓶颈, 本研究利用温敏聚合物对外界温度变化的响应能力, 制备了一种新型的基于可溶性温敏聚合物的固定化胰蛋白酶试剂。该固定化酶特有的温度敏感特性, 使其具有“高温均相酶解, 低温异相分离”的特色, 且兼具酶切时间显著缩短、酶可重复利用的优势。BSA 1 min 固定化酶解产物肽段的氨基酸序列覆盖率可达 94%, 高于传统溶液酶解 12 h 所得覆盖率为 4%。进一步将该固定化酶试剂应用于 HeLa 细胞全蛋白质组的酶解, 其酶解效果与相同条件下溶液酶解 12 h 相当。该固定化酶试剂对复杂蛋白质的快速、高效酶解充分证明其在蛋白质组学研究中的应用潜力。

关键词 固定化酶; 温度敏感型聚合物; 质谱鉴定; 蛋白质组学; 快速酶解

1 引 言

蛋白质组学通过对从细胞、组织或有机体中提取的蛋白质进行规模化分析鉴定, 系统性的获得蛋白表达、修饰、组成和定量的变化信息^[1,2], 已成为生物学和医学研究中的热点领域。目前, 蛋白质组学中应用最为广泛的研究策略是基于质谱的“鸟枪法”策略, 该策略利用蛋白酶将蛋白样品酶解为肽段混合物, 然后通过液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 分析鉴定肽段样品, 最后将所得质谱数据在数据库中搜库检索, 从而获得相应蛋白质的详细信息^[3,4]。在这一策略中, 蛋白质的定性、定量信息都是通过对其酶解肽段产物进行分析鉴定得到的, 因此, 蛋白质的酶解成为该研究策略中至关重要的一步。在“鸟枪法”策略中, 目前广泛使用的溶液酶解方法所需时间过长 (2 ~ 24 h), 严重限制了样品的处理速度和通量。而且溶液酶解中的蛋白酶只能单次使用, 无法回收, 导致使用成本较高。固定化蛋白酶试剂可避免蛋白酶自身酶解效应, 并且显著提高了酶与底物的投料比, 缩短了反应时间, 提高了酶解效率; 另外, 固定化蛋白酶可回收重复使用, 大大降低了蛋白酶的使用成本^[5~7]。目前已报道了多种不同的蛋白酶固定化方法及固定化载体材料, 如介孔材料^[8,9]、毛细管石英柱^[10,11]、芯片材料^[12,13]、二氧化硅材料^[14,15]或磁性纳米颗粒^[16,17]。但是, 目前所使用的固定化载体多为固相材料, 固定化蛋白酶与溶液中的蛋白质底物在异相体系中进行酶解反应, 固液界面的传质阻力和固相材料的空间位阻限制了固定化酶与底物的碰撞和酶解效率的进一步提高。

针对上述技术瓶颈, 本研究提出并发展了基于温敏聚合物载体的固定化蛋白酶, 利用温敏聚合物的温度敏感特性, 通过控制温敏聚合物固定化蛋白酶所处环境温度使其在溶解和不溶解间相互转换, 从而在溶液中呈现不同状态, 以达到“均相酶解, 异相分离”的目的。温度敏感型聚合物水溶液通常具有相转变温度, 其中一类为最高临界溶解温度 (UCST) 型, 当环境温度高于其相转变温度时, 聚合物在水溶液中呈完全溶解状态; 当环境温度达到或低于该聚合物的相转变温度时, 聚合物开始聚集, 析出沉淀^[18,19]。本研究以 *N*-丙烯酰甘氨酸 (NAGA) 为温度响应基团, 合成了具有 UCST 温度响应能力的

2016-03-10 收稿, 2016-07-11 接受

本文系国家重点研发计划 (Nos. 2013CB911204, 2016YFA0501403)、国家重大科学仪器设备开发专项 (No. 2011YQ09000504)、国家高技术发展计划 (63) (No. 2014AA020906) 和国家自然科学基金 (Nos. 21275005, 21235001, 21405175, 21675172) 资助

* E-mail: zqianxh1@163.com; aunp_dna@126.com

N-丙烯酰甘氨酸共聚十一烯醛 (poly (NAGA-co-UnAl)) 温敏聚合物, 将该温敏聚合物作为载体材料, 制备得到新型可溶性温敏固定化胰蛋白酶。通过控制反应体系温度使固定化酶对蛋白质样本实现了“高温均相酶解, 低温异相分离”, 消除了固定化蛋白酶酶解时的固液界面传质阻力和空间位阻, 大大缩短了酶解时间, 提高了酶解效率。常用的固定化酶方法大多用固相载体制备, 酶解均在异相体系反应; 相较于此, 本研究制备的固定化酶试剂, 在 37℃ 超声溶解, 与蛋白进行均相反应, 置于冰水浴中, 固定化酶试剂团聚沉淀, 与酶解肽段分离, 达到异相分离, 酶解效率提高, 酶解效果比固相载体高。此固定化蛋白酶试剂在标准蛋白和复杂样本中均取得良好效果, 证明其在蛋白质组学研究中的应用潜力。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

基质辅助激光解析飞行时间质谱 (New ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF-MS), EQUINOX55 型傅里叶红外光谱仪 (T-IR) 均购自德国 Bruker 公司 四极杆-静电场轨道阱组合高分辨串联质谱仪 (Q Exactive Plus Orbitrap MS), 液相色谱 (Easy-nLC 1000), 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

牛血清白蛋白 (BSA, 98%)、胰蛋白酶 (90%)、甘氨酸盐酸盐 (98%)、丙烯酰氯 (98%)、10-十一烯醛 (UnAl, 95%)、氰基硼氢化钠 (99%)、偶氮二异丁腈 (AIBN, 99%), 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 实验用水为 Milli-Q 去离子水。

2.2 实验方法

2.2.1 *N*-丙烯酰甘氨酸 (NAGA) 的合成 温敏单体 NAGA 的具体步骤参考文献 [8]。

2.2.2 UCST 温敏型共聚物 poly (NAGA-co-UnAl) 的合成 控制合成共聚物的单体的起始摩尔比为 NAGA : UnAl = 4 : 1, 利用自由基聚合反应, 合成 UCST 温敏型共聚物 poly (NAGA-co-UnAl)。步骤同文献 [8]。

2.2.3 胰蛋白酶在 poly (NAGA-co-UnAl) 上的固定 将 10 mg poly (NAGA-co-UnAl) 共聚物溶解于 500 μ L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中, 再依次加入 4 mg 胰蛋白酶与 5 mg 氰基硼氢化钠, 将混合体系在 24℃ 下振荡反应 3 h。将体系置于冰水浴中静置 2 min, 待体系出现明显浑浊后, 在 4℃ 以 10000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 将不溶物溶解于 1 mL 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液中, 再次置于冰水浴中降温并高速离心进行分离, 此过程重复 3 次, 以洗去未固定的胰蛋白酶, 得最终产物 poly (NAGA-co-UnAl)-trypsin 固定化酶。收集清洗过程中所有上清液, 用于测定载体材料对胰蛋白酶的固载量。

2.2.4 Poly (NAGA-co-UnAl)-trypsin 固定化酶酶解标准蛋白 将 40 μ g 牛血清白蛋白 (BSA) 溶解于 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液中至 1 μ g/ μ L, 加入二硫苏糖醇 (DTT) 至终浓度为 10 mmol/L, 95℃ 下加热 10 min, 待冷却后加入碘乙酰胺 (IAA) 至终浓度为 50 mmol/L, 暗处放置 1 h。

将变性后的 BSA 溶液加入到 poly (NAGA-co-UnAl)-trypsin 中充分混合, 置于 37℃ 水浴中超声酶解 1 min。然后迅速将混合物置于冰水浴中静置 2 min 后, 在 4℃ 以 10000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 不溶物再用 50 μ L 水清洗, 将上清液与第一次的溶液混合, 脱盐后用于质谱鉴定。不溶物用 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液反复清洗后, 于 4℃ 保存。

2.2.5 对标准蛋白 BSA 酶解产物和人宫颈癌细胞 (HeLa) 全蛋白的酶解的质谱鉴定 使用 MALDI-TOF/TOF-MS 对 BSA 酶解产物进行鉴定, 并使用 Mascot 在线搜库对所得数据进行肽指纹谱图分析。

对 HeLa 细胞全蛋白的固定化酶解操作与上述对 BSA 的步骤相同。所得酶解产物使用 LC-QExactive Plus MS 鉴定后由软件 Protein Discoverer1.3 搜库分析。

3 结果与讨论

本研究中的温敏聚合物 poly (NAGA-co-UnAl) 是通过 *N*-丙烯酰甘氨酸和十一烯醛的自由基聚合反应得到的。其中, *N*-丙烯酰甘氨酸提供具有温度敏感特性的官能团, 十一烯醛提供醛基官能团, 通过醛基与胰蛋白酶 N 端或氨基酸侧链的氨基反应将胰蛋白酶固定到温敏聚合物上。UCST 温敏共聚物固定化胰蛋白酶的制备流程如图 1 所示。

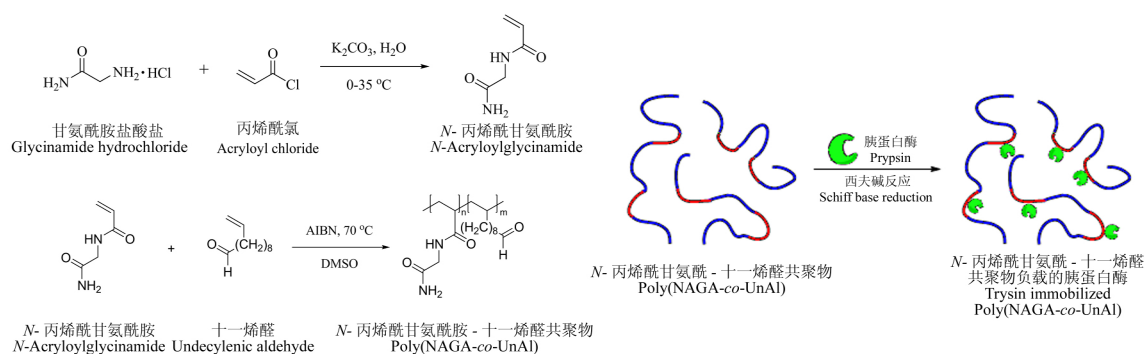


图 1 最高临界溶解温度型温敏共聚物固定化胰蛋白酶的制备流程图

Fig. 1 Schematic diagram of synthesis route of upper critical solution temperature (UCST) thermo-sensitive matrix-immobilized trypsin

本研究制备的 UCST 温敏聚合物固定化胰蛋白酶对蛋白质的酶解过程如图 2 所示。利用此温敏聚合物的温度响应特性,即在体系温度高于 UCST 时处于溶解状态,其与蛋白质样本形成均相体系,消除了固-液界面的传质阻力,并降低了空间位阻,有效提高了固定化酶的酶解效率;在体系温度低于其 UCST 时,团聚析出形成沉淀,便于与酶解产物的有效分离和酶的简便回收,从而实现了“高温均相酶解-低温异相分离”的固定化酶解新策略。

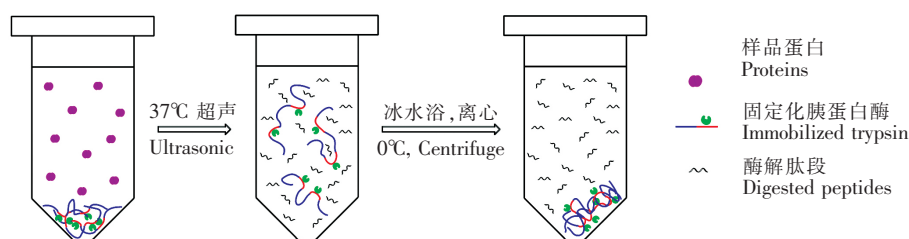


图 2 最高临界溶解温度型温敏型载体固定化胰蛋白酶的酶解示意图

Fig. 2 Schematic diagram of digestion of UCST thermo-sensitive matrix-immobilized trypsin

3.1 UCST 温敏共聚物的表征

3.1.1 红外光谱 (FT-IR) 测定 UCST 温敏聚合物的化学结构 图 3 为温敏聚合物的 FT-IR 谱图, (a) 为 PNAGA 均聚物, (b) 为 poly (NAGA-co-UnAl)。两个红外谱图中均存在的 1550 和 1650 cm^{-1} 两处强烈的吸收峰属于 NAGA 侧基上的 N—H 伸缩振动和 C=O 伸缩振动; 2930 cm^{-1} 处的吸收峰属于聚合物骨架上的 $-\text{CH}_2-$ 伸缩振动; (b) 中出现的 2850 cm^{-1} 处的吸收峰属于醛基的 C—H 键特征吸收峰,表明在与 UnAl 共聚之后,醛基被成功引入。上述结果证明所得聚合物由 NAGA 和 UnAl 两种单体共聚所得,温敏聚合物同时具备温敏响应基团和可用于胰蛋白酶固定的醛基官能团。

3.1.2 UCST 温敏共聚物的温敏性能考察 poly (NAGA-co-UnAl) 在水溶液中的温敏性能如图 4 所示, poly (NAGA-co-UnAl) 温敏聚合物表现出了良好的 UCST 型温度响应能力。在温度处于共聚物的 UCST 以上时,共聚物可完全溶解于水中,形成澄清透明的溶液 (图 4a) 而当温度冷却至其 UCST 以下时,共聚物分子发生缔合,从溶液中析出,体系出现明

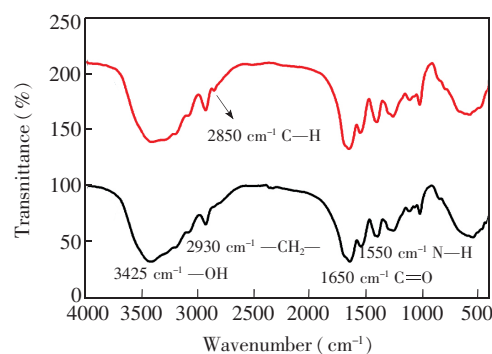


图 3 (a) PNAGA 均聚物, (b) poly (NAGA-co-UnAl) 的红外吸收图谱

Fig. 3 FT-IR spectra of (a) PNAGA homopolymer and (b) poly (N-acryloylglycinamide-10-undecenal) (poly (NAGA-co-UnAl))

显的浑浊 图 4b) 经高速离心后与溶液分离 图 4c), 从而达到“高温均相溶解, 低温异相分离”的目的。

3.1.3 poly (NAGA-co-UnAl) 的胰蛋白酶固载能力测试 为考察 poly (NAGA-co-UnAl) 对胰蛋白酶的固载能力, 采用微量分光光度计测定胰蛋白酶溶液在固定前、后溶液中 A_{280} 处吸光值的变化, 计算出胰蛋白酶固定前、后的浓度差, 再进一步计算得出一定质量温敏聚合物的胰蛋白酶固载量, 测定 poly (NAGA-co-UnAl) 对蛋白酶的固载能力为 $247.7 \mu\text{g}/\text{mg}$ 。

继续考察温敏聚合物固定化胰蛋白酶的酶活性, 使用固定化酶酶解 *N*-苯甲酰-L-精氨酸乙酯 (BAEE), 通过测量不同时间酶解 BAEE 溶液的吸光度, 得到温敏聚合物固定化酶的酶活力为 $228.3 \text{ U}/\text{mg}$, 即单位质量的温敏聚合物上负载的酶能够酶解 228.3 U BAEE。

$$\text{计算公式: } P = \frac{A_1 - A_2}{0.001VTW}$$

其中, P 为每 1 mg 供试品中含胰蛋白酶的量; A_1 为直线上终止的吸光度; A_2 为直线上开始的吸光度;

T 为 $A_1 \sim A_2$ 的读数时间 (min); W 为测定液中含供试品的量 (mg); 0.001 为在上述条件下, 1 mL 底物的吸收度 1 min 改变 0.001 , 即相当于 1 个 BAEE 单位 (U); V 为底物体积 (mL)。胰蛋白酶的单位定义为: 以 BAEE 为底物, 在一定反应条件下, 每分钟使 $\Delta A_{253\text{nm}}$ 增加 0.001 的酶量为 1 U BAEE。

3.2 UCST 温敏共聚物固定化胰蛋白酶的应用

3.2.1 固定化胰蛋白酶的酶解效率 本实验分别使用 UCST 温敏聚合物固定化胰蛋白酶及溶液酶对牛血清白蛋白 (BSA) 进行平行酶解实验, 来考察固定化酶的酶解效率。固定化酶酶解的操作过程如图 2 所示。酶解产物使用 MALDI-TOF/TOF-MS 进行鉴定, 一级质谱图如图 5 所示。1 min 固定化酶解 BSA, 鉴定到 84 条肽段, 氨基酸序列覆盖率可达 94%。而溶液酶解, 虽然经过长达 12 h 孵育, 却只能鉴定到 68 条肽段, 达到 74% 的氨基酸序列覆盖率, 明显低于固定化酶解的结果 (表 1)。相比于溶液酶解所需的孵育时间 12 h, 固定化酶酶解仅需 1 min 即可完成酶解, 具有极大的效率和通量优势。这是由于 UCST 温敏共聚物固定化酶在 37°C 条件下可完全溶解于溶液中, 形成均相体系, 消除了固-液界面的传质阻力并降低了空间位阻, 有效促进了酶与底物蛋白的碰撞。同时, 固定化酶具有超高的酶固载量, 使得体系内的酶-底物蛋白比例远远高于溶液酶解中酶与蛋白比, 在等量蛋白底物存在的情况下, 固定化酶的量远远高于溶液酶的量, 在固定化酶解过程中, 酶与底物蛋白的碰撞几率成倍提高, 从而大大加快了酶解反应的进行。

表 1 固定化酶解与溶液酶解 BSA 鉴定肽段数量及序列覆盖率的比较

Table 1 Comparison of number of peptides and amino acid sequence coverage of BSA digested with immobilized-trypsin or free trypsin

牛血清白蛋白 BSA	固定化酶 Immobilized- trypsin	溶液酶 Free trypsin
鉴定到的肽段数量 Number of identified peptides	84	68
序列覆盖率 Sequence Coverage	94%	74%

3.2.2 固定化胰蛋白酶酶解的稳定性和重现性 称量 10 mg 温敏聚合物 poly (NAGA-co-UnAl), 将其

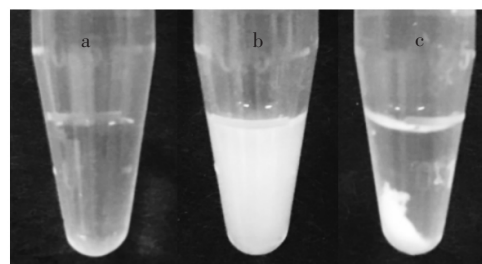


图 4 温敏聚合物 poly (NAGA-co-UnAl) 在水中不同温度下呈现的不同状态 (a) 为加热后形成的澄清透明溶液, (b) 为溶液冰水浴后形成的乳状悬浊液, (c) 为乳状悬浊液经高速离心后形成的团聚沉淀

Fig. 4 Different forms of poly (NAGA-co-UnAl) at different temperature in water: (a) transparent solution after heating, (b) suspension emulsion after ice-water bath incubation, (c) agglomerates formed after high-speed centrifugation of emulsion

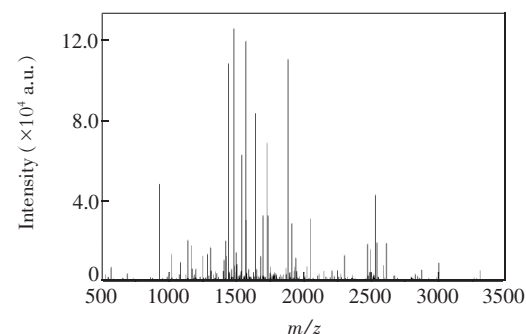


图 5 固定化酶解 BSA 的 MALDI-TOF-MS 谱图

Fig. 5 MALDI-TOF-MS spectrum of BSA digested by immobilized trypsin

固定上胰蛋白酶。将此固定化酶在一个月内存重复15次酶解40 μg BSA。每次所得 BSA 酶解产物经MALDI-TOF 质谱鉴定,15次酶解所得氨基酸序列覆盖率在82%~94%之间(均高于溶液酶解74%的序列覆盖率),波动范围小于10%,平均覆盖率达89%,相对标准偏差(RSD)为3.9%,如图6所示。结果表明,此固定化酶能够多次重复使用,且表现出良好的稳定性和重现性。

3.2.3 HeLa 细胞全蛋白酶解产物质谱鉴定 本实验对 HeLa 细胞全蛋白的固定化酶解操作与上述对 BSA 的步骤相同,固定化酶解产物以及溶液酶解产物均经 LC-QExactive Plus MS 质谱鉴定一次,搜库后结果如表2所示。经1 min 固定化酶解后鉴定到15012条肽段,归属于2659个蛋白。其中368条肽段含两个漏切位点,含1个漏切位点的肽段有3191条。经12 h 溶液酶解后鉴定到16215条肽段,归属于2754个蛋白。其中566条肽段含两个漏切位点,含1个漏切位点的肽段有3624条。综上所述可知,固定化酶具备快速、高效酶解的能力,而且酶解产物鉴定蛋白和肽段数量与溶液酶解相当,但酶解时间缩短720倍,同时带有漏切位点的肽段数量也有所降低。

通过合成 poly (NAGA-co-UnAl) 温敏聚合物,成功制备出 UCST 温敏聚合物固定化胰蛋白酶。该温敏聚合物特有的温度响应特性,使制备的温敏聚合物固定化胰蛋白酶具有“高温均相酶解,低温异相分离”的特色和优势,可以很好地满足当前蛋白质组学研究中,快速、高效、高通量的鉴定需求,同时,作为一种新型通用型载体材料,其在固定化酶领域具有广阔的应用前景。

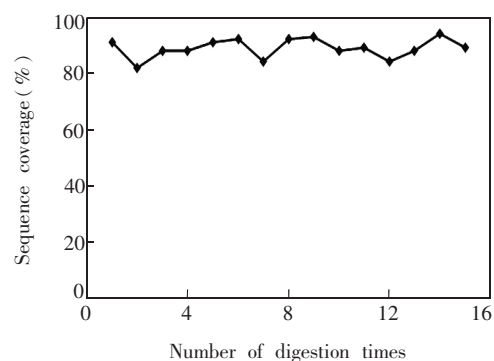


图6 固定化酶解的稳定性、重现性测试

Fig. 6 Stability and reproducibility test of immobilized-trypsin digestion

表2 HeLa 细胞全蛋白经溶液酶解或固定化酶解后鉴定到的蛋白及肽段数量

Table 2 Number of the identified proteins and peptides of HeLa digested by free trypsin or immobilized-trypsin

	溶液酶 Free trypsin	固定化酶 Immobilized-trypsin
鉴定到的蛋白质数量 Number of the identified proteins	2754	2659
鉴定到的肽段数量 Number of the identified peptides	16215	15012
含一个漏切位点的肽段数 Peptides with one missed cleavage site	3624	3191
含两个漏切位点的肽段数 Peptides with two missed cleavage sites	566	368

References

- 1 Wilhelm M, Schlegel J, Hahne H, Moghaddas Gholami A, Lieberenz M, Savitski M M, Ziegler E, Butzmann L, Gessulat S, Marx H, Mathieson T, Lemeier S, Schnatbaum K, Reimer U, Wenschuh H, Mollenhauer M, Slotta-Huspenina J, Boese J H, Bantscheff M, Gerstmair A, Faerber F, Kuster B. *Nature*, **2014**, 509 (502): 582-587
- 2 Aebersold R, Mann M. *Nature*, **2003**, 422 (6928): 198-207
- 3 Zhang Y Y, Fonslow B R, Shan B, Baek M C, Yates J R. *Chem. Rev.*, **2013**, 113 (4): 2343-2394
- 4 Nagaraj N, Kulak N A, Cox J, Neuhauser N, Mayr K, Hoerning O, Vorm O, Mann M. *Mol. Cell. Proteomics*, **2012**, 11 (4): M111.013722
- 5 Hanefeld U, Gardossi L, Magner E. *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38 (1): 453-68
- 6 Ma J F, Zhang L H, Liang Z, Shan Y C, Zhang Y K. *TRAC-Trend Anal. Chem.*, **2011**, 30 (4): 691-702
- 7 Fan C, Shi Z M, Pan Y T, Song Z F, Zhang W J, Zhao X Y, Tian F, Peng B, Qin W J, Cai Y, Qian X H. *Anal. Chem.*, **2014**, 86 (4): 1452-1458
- 8 Calleri E, Temporini C, Gasparrini F, Simone P, Villani C, Ciogli A, Massolini G. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218 (49): 8937-8945

- 9 SONG Zi-Feng, ZHANG Qing-Lin, ZHANG Yang-Jun, QIN Wei-Jie, QIAN Xiao-Hong. *Chinese J. Chromatogr.*, **2012**, 30 (6) :549–554
宋子凤, 张庆林, 张养军, 秦伟捷, 钱小红. 色谱, **2012**, 30 (6) :549–554
- 10 LIU Jing, WANG Fang-Jun, ZHANG Zhen-Bin, ZOU Han-Fa. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41 (1) :10–14
刘 静, 王方军, 张振宾, 邹汉法. 分析化学, **2013**, 41 (1) :10–14
- 11 ZHANG Zhen-Bin, OU Jun-Jie, LIN Hui, LIU Zhong-Shan, DONG Jing, ZOU Han-Fa. *Chem. J. Chinese Universities*, **2013**, 34 (9) :2011–2019
张振宾, 欧俊杰, 林 辉, 刘忠山, 董 靖, 邹汉法. 高等学校化学学报, **2013**, 34 (9) :2011–2019
- 12 Liang Y, Tao D Y, Ma J F, Sun L L, Liang Z, Zhang L H, Zhang Y K. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218 (10) :2898–2905
- 13 Tian R J, Hoa X D, Lambert J-P, Pezacki J P, Veres T, Figeys D. *Anal. Chem.*, **2011**, 83 (1) :4095–4102
- 14 Qin W J, Song Z F, Fan C, Zhang W J, Cai Y, Zhang Y J, Qian X H. *Anal. Chem.*, **2012**, 84 (9) :3138–3144
- 15 Yao J Z, Sun N R, Deng C H, Zhang X M. *Talanta*, **2016**, 150 :296–301
- 16 QIU Juan, ZHANG Ying, LU Hao-Jie, YANG Peng-Yuan. *Acta Chim. Sinica*, **2011**, 69 (8) :2123–2129
仇 娟, 张 莹, 陆豪杰, 杨芃原. 化学学报, **2011**, 69 (8) :2123–2129
- 17 Castilho Mde S, Laube T, Yamanaka H, Alegret S, Pividori M I. *Anal. Chem.*, **2011**, 83 (4) :5570–5577
- 18 Liu F Y, Seuring J, Agarwal S. *Polym. Chem.*, **2013**, 4 (10) :3123–3131
- 19 Seuring J, Bayer F M, Huber K, Agarwal S. *Macromolecules*, **2012**, 45 (1) :374–384

Preparation and Application of Novel Thermo-sensitive Matrix-based Immobilized Enzyme for Fast and Highly Efficient Proteome Study

ZHANG Qian, ZHENG Fei, QIN Wei-Jie*, QIAN Xiao-Hong*

Beijing Institute of Radiation Medicine, National Center for Protein Sciences (Beijing),
State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing 102206, China)

Abstract By massively analyzing proteins extracted from cells, tissues and organisms using mass spectrometry, proteomics is capable of providing information about change in proteins expression, modification, composition and quantification. However, most immobilized enzymes used in mass spectrometry based "shotgun" proteomic strategy are prepared using solid materials as the immobilization matrix and digest the substrate proteins in heterogeneous system. The inherent mass transfer resistance in the solid-liquid interface and steric hindrance of the solid matrix limits the digestion efficiency and sample processing throughput. Here, we prepared a novel immobilized enzyme using soluble thermo-sensitive polymer as the matrix material by exploiting the thermo-responsive ability of the polymer to environmental temperature changes. The thermo-sensitive immobilized trypsin had the feature of "homogeneous digestion at high temperature and heterogeneous separation at low temperature" and the advantage of significantly shortened digestion time and recover and reuse of the enzyme. An amino acid sequence covering up to 94% in 1-min digestion was obtained, which was higher than that of 74% obtained by in-solution digestion for 12 h. Finally, the immobilized trypsin was successfully applied to fast and highly efficient digestion of complex proteome extracted from HeLa cell. The efficiency of immobilized digestion in 1 min was similar to that of solution digestion in 12 h, which sufficiently demonstrated the application potential of this thermo-sensitive immobilized trypsin in proteomics research.

Keywords Immobilized enzyme ; Thermo-sensitive polymer ; Mass spectrometry ; Proteomics ; Fast digestion

(Received 10 March 2016 ; accepted 11 July 2016)

This work was supported by the National Key Program for Basic Research of China (Nos. 2013CB911204, 2016YFA0501403), the National Key Scientific Instrument Development Program of China (No. 2011YQ09000504), the National High-Tech Research and Development Program of China (No. 2014AA020906), and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21275005, 21235001, 21405175 and 21675172).