

反相高效液相色谱双梯度洗脱分离肽混合物及质谱分析

马 岩^{1,2}, 张万军², 卫军营², 牛 明², 林虹君²,
秦伟捷², 张养军^{2*}, 钱小红^{2*}

(1. 北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100022 ; 2. 蛋白质组学国家重点实验室,
军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 北京 102206)

摘要 : 复杂肽段混合物的有效分离是高覆盖率地鉴定蛋白质混合物的前提。“鸟枪法”(Shotgun)蛋白质组学研究策略通常采用蛋白酶切、二维液相色谱-串联质谱分析肽段混合物从而鉴定蛋白质,其中高效率地分离肽段混合物是关键步骤之一。本文通过pH梯度结合有机溶剂梯度的反相高效液相色谱(RP-HPLC)进行一维液相色谱分离,按等时间间隔收集馏分并将一个梯度的前段的一个馏分与后段一个馏分混合,然后进行纳升级液相色谱-质谱联用(nanoRPLC-MS/MS)分析。将该方法应用于酵母蛋白质的分离和鉴定,实验结果为:与常规的强阳离子色谱-反相液相色谱-质谱分离鉴定方法相比,采用pH梯度结合有机相梯度的RP-HPLC-RPLC-MS分离鉴定方法多鉴定到567个酵母蛋白质(簇,含有3 035个唯一肽段);其中鉴定到肽段的pI分布范围为3.42~12.01,相对分子质量范围为587.67~3 499.79;蛋白质的pI分布范围为3.82~12.19,相对分子质量范围为3 446.55~432 905。该结果表明这种方法在复杂体系蛋白质组分离鉴定中具有明显的优势,在蛋白质组学研究中有很好的应用前景。

关键词 : 反相高效液相色谱;pH梯度洗脱;有机溶剂梯度洗脱;纳升级反相高效液相色谱-串联质谱;肽混合物;酵母中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2011)03-0205-07

Reversed-phase liquid chromatography with double gradient elution for the separation and mass spectrometric analysis of peptides

MA Yan^{1,2}, ZHANG Wanjun², WEI Junying², NIU Ming², LIN Hongjun²,
QIN Weijie², ZHANG Yangjun^{2*}, QIAN Xiaohong^{2*}

(1. College of Life Science and Bio-Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China ;
2. State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Institute of Radiation Medicine,
Beijing Proteome Research Center, Beijing 102206, China)

Abstract : Highly effective separation of complex peptide mixture is a prerequisite for protein identification with high coverage in proteomics. Currently, peptide mixture is separated by two-dimensional liquid chromatography (2D-LC), ion exchange chromatography as the first dimension and reversed-phase chromatography as the second dimension, in Shotgun proteomics. Though the 2D-LC is now widely used, its separation efficiency still needs further improvement. In this work, the first dimensional separation was performed by the pH and organic solvent double-gradient elution. And then the two fractions, one from the early eluted section and the other from the later eluted section (with equal time intervals) were pooled and analyzed by MS/MS. The experimental results from the protein mixture of *Saccharomyces cerevisiae* lysate showed that the separation by pH and organic solvent double-gradient elution, RP-HPLC-nanoRPLC coupled with MS/MS identified 567 more yeast protein groups (3 035 peptides) over strong cation exchange chromatography-nanoRPLC coupled with MS/MS. The pI values and relative molecular masses of identified peptides ranged from 3.42 to 12.01, and from 587.67 to

* 通讯联系人: 钱小红, 研究员, 博士生导师, 研究方向为蛋白质组学. E-mail: qianxhl@yahoo.com.cn.

张养军, 博士, 硕士生导师, 研究方向为蛋白质组学新方法与新技术. E-mail: zhangyangjun6314@yahoo.com.cn.

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2006AA02A308)、国家自然科学基金(30621063, 20635010, 20735005, 20875101, 20905077)和“973”计划(2007CB914104, 2010CB912701, 2011CB910603)项目.

收稿日期: 2010-11-09

3 499.79 , respectively. The *pI* values and relative molecular masses of identified proteins ranged from 3.82 to 12.19 and from 3 446.55 to 432 905 , respectively. These results indicated that this new 2DLC-MS method has the advantages over the conventional Shotgun method , and were expected to be applied in the separation of complex samples for proteomic studies in the future.

Key words : reversed-phase liquid chromatography (RPLC) ; pH gradient elution ; organic solvent gradient elution ; nano reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nanoRPLC-MS/MS) ; peptides ; *saccharomyces cerevisiae*

蛋白质组学研究的目的是规模化地鉴定细胞、组织、体液及亚细胞中的蛋白质。而高分辨率的分离分析策略与高覆盖率地鉴定蛋白质息息相关^[1,2]。蛋白质和肽混合物的高效分离技术是蛋白质组学方法研究的重要内容之一。虽然常用的双向电泳(2-DE)技术可以有效地结合胶上提取酶切和质谱技术,实现对几千种蛋白质的分离和分析^[3,4],但该策略存在许多固有的缺点,如自动化程度低、无法检测低丰度蛋白质、对极酸和极碱性蛋白质以及膜蛋白的提取分离效果差、胶内酶解肽段回收率低等^[5]。采用多维液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术的“鸟枪法”(Shotgun)蛋白质组学策略近年来取得了长足的发展,一次分析可以鉴定出上千个蛋白质^[6]。在广泛采用的“鸟枪法”技术路线的基础上,出现了许多改进的方法,如高亮等^[7]发展了一种基于二维弱阴离子交换色谱-反相液相色谱(2D-WAX-RPLC)的蛋白质水平分离的比较蛋白质组学研究方法,并将其成功应用于4个不同生长时期的鹿茸蛋白质的差异分析,共从9个蛋白质差异峰中鉴定得到了22个差异蛋白质,表明这种基于蛋白质水平的液相色谱分离方法具有很好的重现性和鉴定差异蛋白质的能力。郑兆彬等^[8]研究了离线、线性pH梯度分离肽段混合物的色谱方法。他们在对缓冲体系pH值进行理论计算的基础上,优化了乙酸-乙酸铵体系线性pH梯度配合低盐梯度离子交换色谱方法,以及柠檬酸-氨水体系线性pH梯度的离子交换色谱方法,并将这两种方法应用于牛血清白蛋白酶切产物的分离取得了与常规强阳离子交换色谱相似的分离效果。Song等^[9]发展了一种新的二维色谱分离磷酸肽的方法,即RPLC-RPLC。他们收集在高pH条件下从第一维RPLC分离出的90个馏分,然后将相等时间间隔的前段梯度和后段梯度的两个馏分混合(前段梯度洗脱出的馏分即第1~45个馏分,后段梯度洗脱出的馏分即第46~90个馏分),然后对混合的馏分在低pH条件下进行RPLC-MS/MS分析,发现这种二维分离收集馏分的方法具

有高正交性,与常规的RPLC-RPLC方法相比,可以多鉴定到30%的磷酸肽。Kaliszan等^[10]研究发现RP-HPLC的pH梯度洗脱分离是一种新的分离极性化合物的有效方法,即在RP-HPLC系统上,通过pH的线性增加或减少,实现pH梯度洗脱分离,增加混合物的分离程度,减小峰宽。并在理论和实验上研究了pH梯度和有机相梯度RPLC的分离方法^[11],比较了pH梯度和有机溶剂梯度中含有多个pH梯度的RPLC分离模式下一系列肽段的保留参数,发现影响肽段洗脱的因素涉及肽段的疏水性和等电点^[12]。本文在上述研究基础上,建立了pH梯度结合有机相梯度的双梯度洗脱RP-HPLC进行分离,收集馏分并将相等时间间隔的前段梯度和后段梯度的两个馏分混合,进行纳升级(nano)RPLC-MS/MS分析的方法,并将该方法应用于酵母蛋白酶切产物的分离和质谱鉴定,结果表明该策略可显著提高蛋白质组的鉴定覆盖率。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

230型高效液相色谱仪,包括两台P230高压恒流泵、一台UV230紫外-可见检测器和EC2000色谱数据处理系统V1.3(大连依利特分析仪器有限公司);纳升级毛细管高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱仪(LTQ,美国Thermo Fisher公司);Millipore超纯水设备;奥立龙81801 pH计(美国Thermo公司);XBridge C18色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 3.5 μm; Waters公司)。

牛胰蛋白酶(trypsin)、二硫苏糖醇(DTT)为美国Promega公司产品;碘乙酰胺(IAA)购自比利时Acros公司;乙腈(ACN, HPLC级)为美国J. T. Baker公司产品;甲酸(FA)为德国Fluka公司产品;氨水、NH₄HCO₃及尿素(分析纯)为北京化工厂产品;牛血清白蛋白(BSA)为美国Sigma公司产品;酿酒酵母(*saccharomyces cerevisiae*)为美国Sigma公司产品。

1.2 样本制备

将 BSA 溶于 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液中, BSA 质量浓度为 2 mg/mL。在 50 μL 上述 BSA 溶液中加入 5.5 μL 100 mmol/L DTT, 在沸水浴中加热 10 min 进行蛋白质还原变性。然后加入 6.2 μL 1 mol/L IAA, 在室温下置于暗处反应 1 h 进行烷基化处理。按照胰蛋白酶与 BSA 的质量比为 1:50 的比例, 将胰蛋白酶(2 μg)加入到 BSA 溶液中, 在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中孵育 12 h 以上。

将 300 mg 酵母置于 1 mL 9.5 mol/L 尿素裂解液(其中加入 DTT 10 mg、蛋白酶抑制剂 20 μL)中, 在冰浴上超声裂解 2 min(每超声 1 s, 暂停 1 s)。室温下静置 30 min 后, 将裂解液在 4 $^\circ\text{C}$ 、20 000 g 下离心 30 min, 提取上清液。上清液用 Bradford 法测定蛋白质质量浓度为 23.58 mg/mL。

在酵母蛋白提取物(100 μg , 4.5 μL)中加入 25 μL 溶于 50 mmol/L NH_4HCO_3 的 10 mol/L 尿素溶液, 进行蛋白变性后, 加入 3.28 μL 100 mmol/L DTT, 在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中反应 4 h, 再加入 3.64 μL 1 mol/L IAA, 在室温下置于暗处反应 1 h。再用 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液稀释(加入 215 μL NH_4HCO_3), 使尿素的最终浓度小于 1 mol/L, 按照酶与蛋白质的质量比为 1:50 的比例, 将胰蛋白酶加入到蛋白质溶液中, 在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中孵育过夜。

1.3 色谱条件

利用 BioBasic 强阳离子交换(SCX)色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm ; Thermo 公司)和 XBridge C18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 3.5 μm ; Waters 公司), 分别在流动相 pH 3、pH 10 和 pH 3~10 的梯度条件下分离 BSA 和酵母的酶切产物。

(1) SCX 分离: 流动相 A 为 5 mmol/L KH_2PO_4 + 30% ACN(pH 2.7); 流动相 B 为 5 mmol/L KH_2PO_4 + 1 mol/L KCl + 30% ACN(pH 2.7)。

(2) pH 3 条件下 RPLC 分离: 流动相 A 为 2% 乙腈 + 98% H_2O (用甲酸调 pH 3); 流动相 B 为 98% 乙腈 + 2% H_2O (用甲酸调 pH 3)。

(3) pH 10 条件下 RPLC 分离: 流动相 A 为 2% 乙腈 + 98% H_2O (用氨水调 pH 10); 流动相 B 为 98% 乙腈 + 2% H_2O (用氨水调 pH 10)。

(4) pH 3~10 条件下 RPLC 分离: 流动相 A 为 2% 乙腈 + 98% H_2O (用甲酸调 pH 3); 流动相 B 为 98% 乙腈 + 2% H_2O (用氨水调 pH 10)。

洗脱梯度程序: 0~10 min, 100% A; 10~55 min, 100% A~30% B; 55~65 min, 30% B~100% B; 65~70 min, 100% B; 70~73 min, 100% B~5% B; 73~88

min, 5% B。流速 0.8 mL/min; 检测波长 214 nm。BSA 酶切产物上样量为 10 μg , 酵母蛋白酶切产物上样量分别为 10 和 50 μg 。实验重复两次。

1.4 nanoRPLC-MS/MS 分析

将第一维 SCX 色谱分离出的酵母蛋白酶切产物馏分进行收集。从出峰时间开始每 30 s 收集一次, 共收集 52 个馏分。对每个馏分进行脱盐, 然后进行 nanoRPLC-MS/MS 分析。

将 pH 3 和 pH 3~10 条件下的 RPLC 分离出的酵母蛋白酶切产物馏分分别进行收集。在洗脱梯度 100% A~30% B(45 min)、30% B~100% B(10 min)和 100% B(5 min)过程中收集分离馏分, 每 30 s 收集一次, 共收集 120 个馏分。将馏分分为 2 个部分: 前段梯度洗脱馏分(1、2、3、...、60)和后段梯度洗脱馏分(61、62、63、...、120)。将馏分 1 和 61、馏分 2 和 62、...、馏分 59 和 119、馏分 60 和 120 分别混合, 然后分别进行 nanoRPLC-MS/MS 分析。所用流动相 A 为 98% H_2O + 2% 乙腈 + 0.1% 甲酸; 流动相 B 为 80% 乙腈 + 20% H_2O + 0.1% 甲酸。溶剂梯度为 0~60 min, 5% B~50% B, 流速为 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$, 毛细管色谱柱为 C_{18} 反相色谱柱(100 mm \times 75 μm , 内装 Thermo Hypersil BioBasic-18 填料, 粒径为 5 μm , 孔径为 30 nm)。

MS/MS 条件: 电喷雾电压为 2.0 kV, 正离子模式, 归一化碰撞能量设置为 35%, 质量扫描范围为 m/z 400~2 000, 在一级质谱图中选取最强的 5 个母离子进行串联质谱分析。实验重复两次。

1.5 数据库检索

采集的质谱数据用 Bioworks 3.2 软件检索酵母蛋白质数据库(含有 11 081 个蛋白质, 2010 年 7 月从 <http://downloads.yeastgenome.org/sequence/GenBank/> 下载)。为了考察数据的假阳性率, 将蛋白质的氨基酸序列反转做成反库, 将正库和反库整合在一起检索。检索参数: trypsin 全酶切, 2 个漏切位点, 半胱氨酸设置为碘乙酰氨乙酰化可变修饰, 蛋氨酸设置为氧化可变修饰, 母离子相对分子质量误差为 1.5, 碎片离子相对分子质量误差为 0.8。搜库的数据结果用 pBuild 软件合并计算, 软件参数设置: 假阳性率(FDR) \leq 1%, $\Delta C_n \geq$ 0.1(ΔC_n 为匹配肽段相似度差)。

2 结果与讨论

2.1 SCX 和不同 pH 条件下 RPLC 对 BSA 酶切产物的分离

在上样量 10 μg 和 1.3 节所述的色谱条件下,

分别采用 SCX 色谱和不同 pH 条件下 RPLC 对 BSA 的胰蛋白酶酶切产物进行分离。如图 1 所示,总体而言,不同 pH 条件下的 BSA 酶切产物的 RPLC 分离(图 1b、1c、1d)比 SCX 色谱分离(图 1a)具有更高的分离度。另外,从图 1b、1c、1d 中可以看出,pH 3 时的峰容量为 57, pH 10 时的峰容量为 53, pH 3 ~ 10 时的峰容量为 66,表明 pH 3 ~ 10 梯度结合有机溶剂梯度构成的双梯度洗脱的 RPLC 具有更好的分离效果,且在有效时间内色谱峰的分布相对均匀。因此,与选择的其他色谱条件相比,pH 3 ~ 10 梯度结合有机溶剂梯度构成的双梯度洗脱 RPLC 分离具有明显的优势。

2.2 SCX 和不同 pH 条件下 RPLC 对酵母蛋白酶切产物的分离

为了考察更复杂的生物样本情况下 SCX 和不同 pH 条件下 RPLC 的分离效果,选择酵母蛋白的胰蛋白酶酶切产物进行实验。从图 2 可以看出,分离酵母蛋白酶切产物与分离 BSA 酶切产物有类似的结果,即 RPLC 分离获得的峰容量明显高于 SCX 分离的峰容量,表明其具有更强的分离能力。另外,在其他色谱条件相同的情况下,采用 RPLC 进行分离,pH 3 ~ 10 梯度结合有机溶剂梯度构成的双梯度洗脱的分离结果比固定 pH 3 和 pH 10 而仅采用有机溶剂梯度分离的效果好。这种 pH 梯度和有机相梯度的结合可以有效地改变肽段的疏水性,因而影响其保留行为,从而提高了肽混合物的分离度。实验结果进一步说明 pH 3 ~ 10 梯度和有机溶剂梯度构成的双梯度洗脱可对复杂样本进行有效分离,减小其复杂程度。

2.3 SCX 预分离与双梯度洗脱 RPLC 预分离结合串联质谱对酵母蛋白质的鉴定

在比较不同色谱条件对肽段混合物的分离效率的基础上,为了进一步检验 SCX 色谱预分离和 pH 3 ~ 10 梯度结合有机溶剂梯度构成的双梯度洗脱的 RPLC 预分离与纳升级反相色谱-串联质谱结合对实际生物样本蛋白质鉴定覆盖率的影响,将 50 μ g 酵母蛋白酶切产物分别进行 SCX 色谱预分离和 pH 3 ~ 10 梯度结合有机溶剂梯度构成的双梯度洗脱的 RPLC 预分离,并对收集的馏分再分别进行 nanoRPLC-MS/MS 分离鉴定。

将获得的质谱数据用 Bioworks 3.2 软件检索酵母蛋白质数据库,用 pBuild 进行检索结果合并,输出鉴定结果时设定假阳性率为 1%,鉴定结果列于表 1。

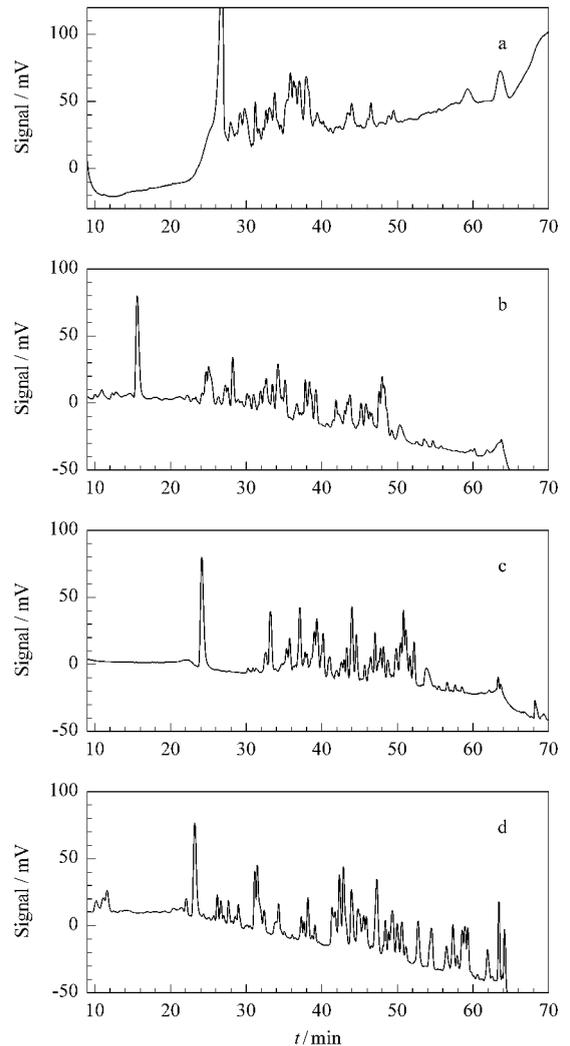


图 1 SCX 和不同 pH 条件 RPLC 对 BSA 酶切产物的预分离色谱图

Fig. 1 Chromatograms of tryptic digest products of BSA by SCX and RPLC at different pHs

a. chromatographic conditions of SCX separation: mobile phase A, 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.7) + 30% (v/v) ACN; mobile phase B, 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.7) + 1 mol/L KCl + 30% (v/v) ACN; flow rate, 0.8 mL/min; detection wavelength, 214 nm; elution gradient: 0 - 10 min, 100% A; 10 - 55 min, 100% A - 30% B; 55 - 65 min, 30% B - 100% B; 65 - 70 min, 100% B; 70 - 73 min, 100% B - 5% B; 73 - 88 min, 5% B.

b. chromatographic conditions of RPLC at pH 3: mobile phase A, 2% (v/v) ACN + 98% (v/v) H_2O (pH 3); mobile phase B, 98% (v/v) ACN + 2% (v/v) H_2O (pH 3). Flow rate, detection wavelength and elution gradient are the same as in Fig. 1a.

c. chromatographic conditions of RPLC at pH 10: mobile phase A, 2% (v/v) ACN + 98% (v/v) H_2O (pH 10); mobile phase B, 98% (v/v) ACN + 2% (v/v) H_2O (pH 10). Flow rate, detection wavelength and elution gradient are the same as in Fig. 1a.

d. chromatographic conditions of RPLC at pH 3 - 10: mobile phase A, 2% (v/v) ACN + 98% (v/v) H_2O (pH 3); mobile phase B, 98% (v/v) ACN + 2% (v/v) H_2O (pH 10). Flow rate, detection wavelength and elution gradient are the same as in Fig. 1a.

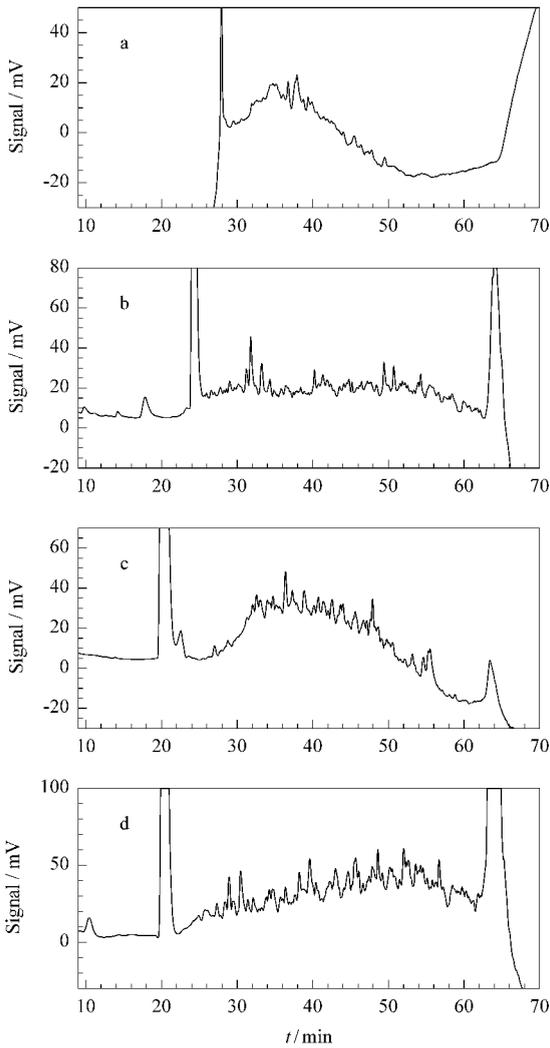


图 2 SCX 和不同 pH 条件 RPLC 对酵母蛋白酶切产物的预分离色谱图

Fig. 2 Chromatograms of tryptic digest products of protein mixture of *saccharomyces cerevisiae* lysate by SCX and RPLC at different pHs

The a - d chromatographic conditions are the same as in Fig. 1a - d , respectively.

从表 1 可以看出 ,通过 nanoRPLC-MS/MS 鉴定 酵母蛋白酶切产物经 pH 3 ~ 10 梯度结合有机溶剂梯度构成的双梯度洗脱 RPLC 预分离 ,比采用 SCX 预分离多鉴定到 567 个蛋白质(簇 ,含有 3 035

表 1 酵母蛋白酶切产物的 SCX 预分离与 pH 3 ~ 10 梯度结合有机溶剂梯度构成的双梯度洗脱的 RPLC 预分离馏分的纳升级 RPLC-MS/MS 鉴定结果

Table 1 Identified results of nanoRPLC-MS/MS of tryptic digest products of protein mixture of *saccharomyces cerevisiae* lysate by SCX and double gradient RPLC

Method	Identified peptide	Identified protein group
SCX-nanoRPLC-MS/MS	1210	766
Double gradient RPLC-nanoRPLC-MS/MS	4245	1333

个唯一肽段)。这主要是由于 pH 3 ~ 10 梯度结合有机溶剂梯度构成的双梯度洗脱的 RPLC 预分离不仅提高了分离效率 ,而且在 nanoRPLC-MS/MS 分析时 ,不同组分在梯度时间内均匀分布 ,相对延长了质谱的捕获时间 ,因而增加了鉴定效率。

2.4 鉴定的酵母蛋白质酶切肽段的等电点(pI)、相对分子质量和疏水性分布

对鉴定的酵母蛋白质酶切肽段的理论等电点、相对分子质量和疏水性进行计算(软件为“ Compute pI/Mw ”和“ ProtParam ”,来自于 <http://www.expasy.org>) 然后对其进行比较分析。pH 3 ~ 10 梯度结合有机溶剂梯度 RPLC-nanoRPLC-MS/MS 鉴定的酵母蛋白质酶切肽段的理论等电点的分布如图 3 所示 ,肽段的 pI 分布范围为 3.42 ~ 12.01。对鉴定的酵母蛋白质酶切肽段的等电点、相对分子质量和疏水性分布采用条形图表示 ,即选定范围的唯一肽段数占总鉴定唯一肽段数的百分比。如图 3 所示 ,SCX-nano RPLC-MS/MS 鉴定到较多的等电点为碱性的肽段 ;双梯度洗脱 RPLC-nanoRPLC-MS/MS 鉴定到较多的等电点为酸性的肽段 ,这两种方法有一定的互补性。

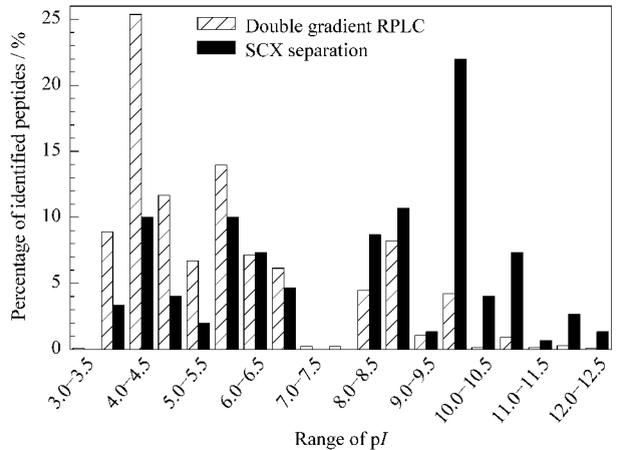


图 3 不同分离方法获得的肽段的 pI 分布

Fig. 3 pI distribution of identified peptides with different separation methods

肽段的相对分子质量分布如图 4 所示 ,双梯度洗脱 RPLC-nanoRPLC-MS/MS 方法鉴定的肽段的相对分子质量范围为 587.67 ~ 3 499.79 ,与 SCX-nanoRPLC-MS/MS 方法鉴定的肽段的相对分子质量分布类似 ;在相对分子质量小于 1 000 的范围 ,双梯度洗脱 RPLC-nanoRPLC-MS/MS 方法鉴定的肽段的百分比要高于 SCX-nanoRPLC-MS/MS 方法 ;在相对分子质量大于 3 000 的范围 ,SCX-nanoRPLC-MS/MS 方法没有鉴定到肽段。

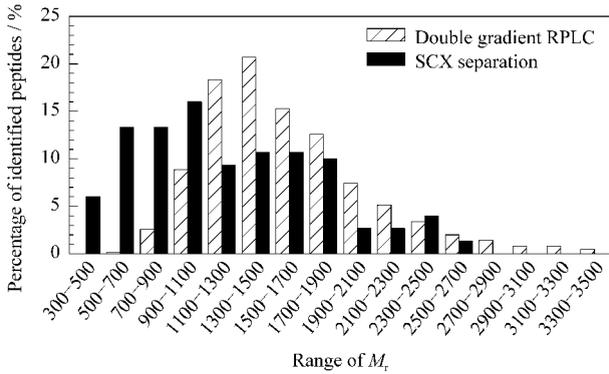


图 4 不同分离方法获得的肽段的相对分子质量的分布
Fig. 4 Relative molecular mass (M_r) distribution of identified peptides with different separation methods

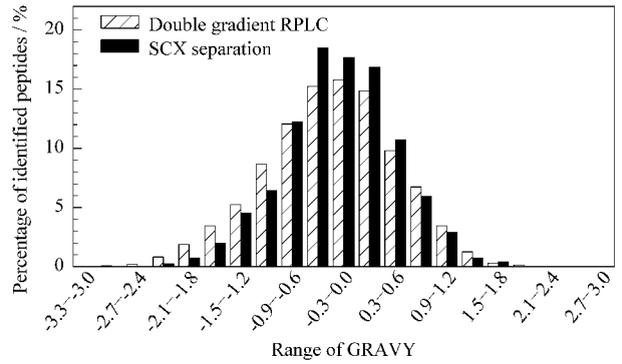


图 5 不同分离方法获得的肽段的疏水性参数的分布
Fig. 5 Hydrophobicity (GRAVY) distribution of identified peptides with different separation methods

图 5 展示了鉴定的肽段的疏水性分布。双梯度洗脱 RPLC-nanoRPLC-MS/MS 方法鉴定的肽段的疏水性参数(GRAVY 值)的分布与 SCX-nanoRPLC-MS/MS 方法鉴定的肽段的 GRAVY 值的分布类似。但双梯度洗脱 RPLC-nanoRPLC-MS/MS 方法鉴定的肽段的疏水性范围比 SCX-nanoRPLC-MS/MS 方法鉴定的肽段的疏水性范围要宽,且 GRAVY 值 > 1.8 的范围内采用双梯度洗脱 RPLC-nanoRPLC-MS/MS 方法可以鉴定到的肽段,用 SCX-nanoRPLC-MS/MS 方法没有能鉴定到,说明双梯度洗脱 RPLC-nanoRPLC-MS/MS 方法可以鉴定更多的疏

水性肽段,而且可以鉴定到 SCX-nanoRPLC-MS/MS 方法中无法检测到的疏水性肽段。

2.5 双梯度洗脱 RPLC 分离鉴定的酵母蛋白质的等电点和相对分子质量分布的分析

对采用双梯度洗脱 RPLC 分离方法所鉴定的酵母蛋白质的理化性质的统计分析结果如图 6 所示,蛋白质的 pI 分布范围为 3.82 ~ 12.19,并以 pI 6.0 和 9.0 为中心,形成“驼峰”分布,与文献[13]报道的蛋白质的 pI 值分布规律结果相符合。

图 7 为鉴定蛋白质的相对分子质量分布,其中鉴定的蛋白质的相对分子质量范围为 3 446.55 ~

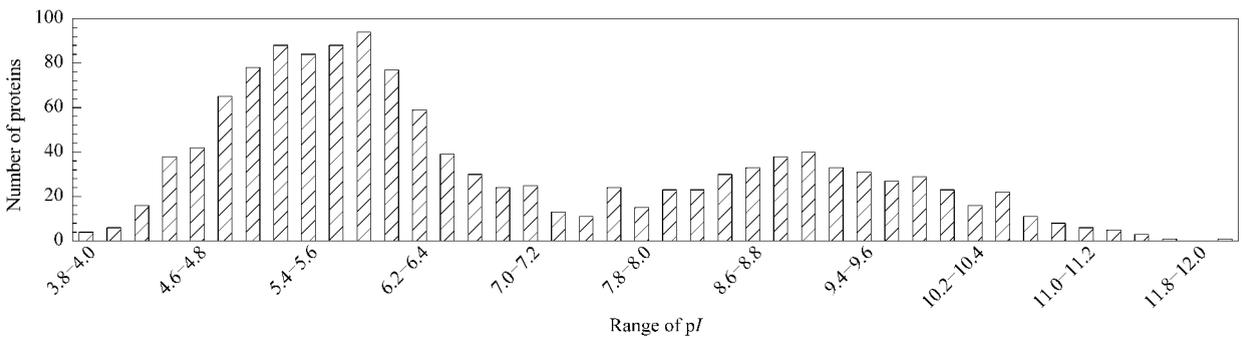


图 6 双梯度洗脱 RPLC 分离鉴定的酵母蛋白质的 pI 分布
Fig. 6 pI distribution of identified proteins with double gradient RPLC separation

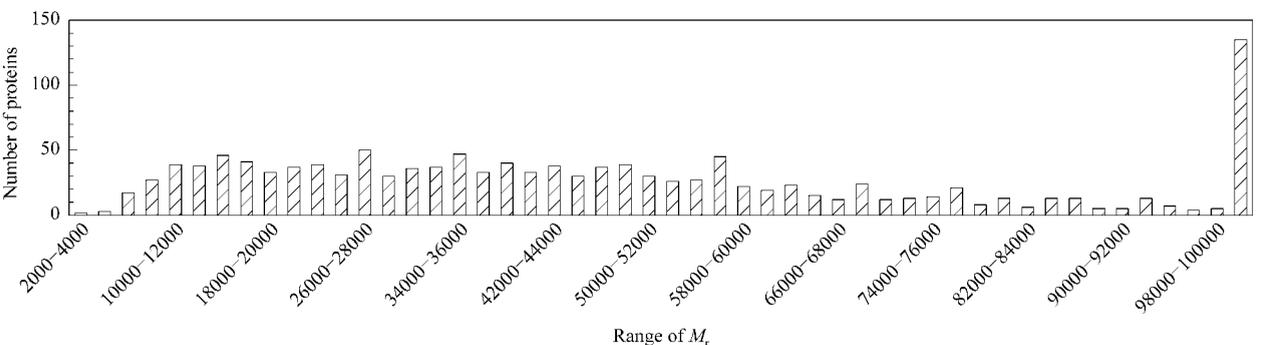


图 7 双梯度洗脱 RPLC 分离鉴定的酵母蛋白质的相对分子质量分布
Fig. 7 M_r distribution of identified proteins with double gradient RPLC separation

432 905,而大于 100 000 的蛋白质占所鉴定蛋白质的 10.1%。

由此可看出,双梯度洗脱 RPLC-nanoRPLC-MS/MS 方法高于两维凝胶电泳分离蛋白质的等电点和相对分子质量范围(一般两维凝胶电泳分离的蛋白质的等电点为 3~10,相对分子质量为 10~100 000)^[14],表明双梯度洗脱 RPLC-nanoRPLC-MS/MS 方法可以克服两维凝胶电泳分离鉴定蛋白质在相对分子质量和 pI 方面的歧视效应。

3 结论

本研究建立了 pH 梯度结合有机相梯度 RPLC 分离肽段混合物的方法。此方法不仅提高了峰容量,而且使色谱峰在 nanoRPLC-MS/MS 分离鉴定的时间内均匀分布,相对而言延长了质谱捕获时间,从而增加了鉴定效率,在复杂体系蛋白质组研究中有较好的应用前景。

参考文献:

[1] Tyers M, Mann M. *Nature*, 2003, 422(6928): 193

[2] Liu H B, Sadygov R G, Yates J R. *Anal Chem*, 2004, 76(14): 4193

[3] Görg A, Obermaier C, Boguth G, et al. *Electrophoresis*, 2000, 21(6): 1037

[4] Cordwell S J, Nouwens A S, Walsh B J. *Proteomics*, 2001, 1(4): 461

[5] Zhou G, Li H M, De Camp D, et al. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(2): 117

[6] Washburn M P, Wolters D, Yates J R. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(3): 242

[7] Gao L, Qiao X Q, Liang Z, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (高亮,乔晓强,梁振,等. 色谱), 2010, 28(2): 146

[8] Zheng Z B, Ying W T, Cai Y, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (郑兆彬,应万涛,蔡耘,等. 色谱), 2007, 25(6): 804

[9] Song C X, Ye M L, Han G H, et al. *Anal Chem*, 2010, 82(1): 53

[10] Kaliszan R, Wiczling P, Markuszewski M J. *Anal Chem*, 2004, 76(3): 749

[11] Wiczling P, Markuszewski M J, Kaliszan M, et al. *Anal Chem*, 2005, 77(2): 449

[12] Baćzek T, Walijewski Ł, Kaliszan R. *Talanta*, 2008, 75(1): 76

[13] Van Bogelen R A, Abshire K Z, Moldover B, et al. *Electrophoresis*, 1997, 18(8): 1243

[14] Zhang Y J, Li W R, Meng Q F, et al. *Life Sciences Instruments* (张养军,李文瑞,孟庆芳,等. 生命科学仪器), 2005, 3(2): 25