

纳升电喷雾毛细管液相色谱 串联质谱鉴定 K562 细胞株中混合蛋白质

蒙 根 王海龙 刘炳玉 王鸿丽 李卫华 王红霞
魏开华* 张学敏 杨松成

(军事医学科学院国家生物医学分析中心,北京 100850)

岑 坚

(海军总医院血液科,北京 100037)

摘 要 用标准蛋白质混合物建立了一种适用于低丰度混合蛋白质及其异构体分离与鉴定的蛋白质组学方法。通过 IPG 胶条等电聚焦分离蛋白质,染色后进行混合胶内酶切,采用纳升电喷雾毛细管液相色谱 串联质谱“散弹法 (shot-gun)”分析酶切产物,并进行数据库检索鉴定蛋白质。运用该方法从 K562 细胞株样品中鉴定出 14 种具有重要功能的蛋白质,部分蛋白质同时在多个条带中出现,可能是异构体。肽段及其碎片离子的平均质量偏差小于 0.05 U,综合得分大都远远超过有效值。该方法灵敏、准确度高、分辨率高、省时、便于操作,在鉴定蛋白质异构体方面有优势。

关键词 等电聚焦,散弹法,蛋白质组学,串联质谱, K562 细胞株

1 引 言

双向电泳在蛋白质组学研究中得到普遍应用。但该技术仍存在一些不足,如对一些疏水性的膜蛋白和极酸性、极碱性以及分子量极大或极小的蛋白质分离较困难,使许多有生物功能的蛋白质分子被忽略掉^[1]。为了弥补双向电泳的局限,本实验建立了一种基于一维固相 pH 梯度等电聚焦电泳 (Immobilized pH gradient isoelectric focusing, IPG IEF),结合串联质谱技术的混合蛋白质鉴定方法。采用 IPG IEF 进行蛋白质分离,然后进行混合胶内酶切,采用纳升电喷雾毛细管液相色谱 串联质谱“散弹法 (shot-gun)”进行蛋白质鉴定,结果显示本方法分辨率高,在鉴定蛋白质异构体方面有一定的优势。

K562 细胞是一株分化差、恶性程度高的人白血病细胞。是白血病研究中重要的模型细胞。近年来,双向电泳技术研究 K562 细胞耐药后蛋白的改变和 K562 细胞凋亡的蛋白质组的报道很少^[2,3],主要是用肽质量指纹谱鉴定几个差异蛋白质。Le Bihan 等^[4]用二维色谱 质谱技术分析了 K562 细胞总蛋白提取物,鉴定了 25 个蛋白。本实验对 K562 细胞总蛋白提取物等电聚焦的 24 个蛋白条带中 5 个条带进行了分析,鉴定了 14 个可能与白血病相关的重要蛋白质,其中 10 个蛋白与该文献相同。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

固相 pH 梯度等电聚焦电泳仪 IPGphor IEF System (Amersham Biosciences 公司);纳升电喷雾毛细管液相色谱 串联质谱 (NanoSpray CapLC MS/MS)为英国 Micromass 公司的 Q-TOF2;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOFMS)为 Autoflex (Bruker 公司);真空干燥器 (CentriVap Concentrator LABCONCO, USA);固相 pH 梯度干胶条 (IPG strip, pH 3 ~ 10, 24 cm)、覆盖液均为 Amersham Biosciences 公司产品;色谱纯乙腈 (ACN)为美国 Fisher Scientific 公司产品;三氟乙酸 (TFA)为 Fluka 公司产品;牛胰蛋白酶 (Trypsin)为德国 Roche 诊断公司经修饰的测序级酶;细胞裂解液 (8 mmol/L urea, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 65 mmol/L DTT);其它试剂均为国产分析纯。

2.2 样品制备、电泳及酶切条件

2004-11-16 收稿;2005-01-07 接受

本文系国家 863 高技术发展项目 (No. 2001AA233041)

K562细胞株样品的制备: 2×10^7 处于对数生长期 K562细胞,离心,弃去上清液,沉淀用 $1 \times \text{PBS}$ 1 mL 洗两遍,加入细胞裂解液 100 μL ,液氮冻融两次,每次 15 ~ 20 s,加入 RNase A 10 μL ,冰浴 20 min, 14000 r/min 离心 30 min,取少量上清液用 Bradford法测定总蛋白浓度,其余上清液冻存于 -80 备用。

固相 pH梯度等电聚焦电泳条件及染色: 86 μg K562细胞株样品溶液与适量重泡胀缓冲液混合使总体积为 100 μL 。采用 24 cm IPG胶条上样杯上样,等电聚焦在 20 条件下自动进行。电泳结束后,将 IPG胶条于 0.1%考马斯亮蓝 R-250中染色 1h,用脱色液(8%乙酸/25%乙醇/67%水)脱至背景清晰。

胶内酶切条件:切下蛋白条带,用含 50%乙腈 -25 mmol/L 碳酸氢铵溶液脱色,真空干燥脱水。将新配制的 100 μL 含 10 mmol/L DTT的 100 mmol/L 碳酸氢铵溶液加入胶片管内,使胶片水化。在 56 水浴中还原 1h,弃去 DTT溶液,加入 50%乙腈 -25 mmol/L 碳酸氢铵溶液清洗胶片两次,加入乙腈放置 15 min,真空干燥 15 min。加入 100 μL 55 mmol/L 碘乙酰胺的 100 mmol/L 碳酸氢铵溶液,室温暗室中烷基化 1 h,弃去上清液,再加入乙腈放置 15 min,真空干燥 15 min。加入 10 μg /L 胰蛋白酶液适量,4 放置 30 min,再补加 25 mmol/L 碳酸氢铵缓冲液适量,37 保温过夜。加入 5% TFA 20 μL ,37 提取 1 h,吸取上清液,再用 50% ACN-2.5% TFA 溶液于 37 提取 1h,合并两次提取液,真空浓缩至近干。

2.3 质谱和数据库查询条件

酶切样品溶于 5 μL 1%甲酸水溶液中,移入自动进样管中,设置适当的色谱洗脱条件及 MS与 MS/MS之间的切换条件,作全自动分析。毛细管电压 3000 V,碰撞气体为氩气。源温 80 ,采样锥电压 50 V,碰撞能量根据离子电荷与质量由软件自动选择。TOF加速电压 9.1 kV。MCP检测器电压 2200 V。用 Glu-fib的串联质谱碎片峰校正仪器。串联质谱数据由 Proteinlynx 软件处理,蛋白质数据库为 NCB Inr。查询条件:MS/MS离子检索,选用酶 Trypsin,漏切位点 1。肽段单同位素质量偏差为 ± 0.3 U。

MALDI-TOF-MS:源 I电压 20 kV,源 II电压 18 kV,反射正离子检测方式,基质为 氰基-4-羟基肉桂酸,标准混合肽(Bruker公司)外标法校正仪器,采集范围 600 ~ 5000 U,基质抑制 600 U。

3 结果与讨论

3.1 IPG胶条胶内酶切方法的探索和条件优化

IPG胶条条带细,胶呈粘稠状,使胶内酶切操作难度变大。最初采用双向电泳的酶切方法用标准混合蛋白质和 MALDI-TOF-MS肽质量指纹谱(Peptide Mass Fingerprinting, PMF)进行了尝试,均得不到较好的 PMF图,蛋白质鉴定的成功率低,20个蛋白条带仅得到 5个 PMF图,出峰率为 25%,蛋白质鉴定的成功率为 38%。通过增加还原、烷基化等改进和优化步骤,得到了较好的 PMF结果,14个蛋白条带得到了 14个 PMF图,出峰率为 100%,蛋白质鉴定的成功率是 63%,说明此法适合于 IPG胶条的混合蛋白质酶切。

3.2 K562细胞蛋白质鉴定

K562细胞株样品采用 24 cm IPG胶条,蛋白质上样量为 86 μg 。经考马斯亮蓝染色后得 24个条带,仅选取了 1~5个较清晰的条带为研究对象(图 1),进行自动化一级质谱和串联质谱分析(图 2)。通过数据库检索,在 1~4个条带中共鉴定出 14种蛋白质(表 1)。检索出的肽段及其碎片离子的平均质量偏差小于 0.05U,综合得分大都远远超出了有效值。最多时由 7个肽段命中同一个蛋白质,说明鉴定结果具有较高的可信度。其中,单个肽段的离子匹配得分最高为 102分,平均由 3~5个肽段的串联质谱数据鉴定一个蛋白质,在鉴定出的蛋白质中,几种蛋白质具有重要意义,如不均一核糖核蛋白在细胞发生凋亡的过程中亚细胞定位发生改变^[5],还可使 mRNA从细胞核转运到细胞浆,从而实现翻译^[6],并具有选择性剪接和结合 DNA的功能。烯醇化酶 1、磷酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶与细胞的糖代谢和能量代谢有关。不均一核糖核蛋白异构体 A2在 mRNA生物合成和转运中起重要作用,在胰腺癌组织中表达含量高,提示可能与胰腺癌甚至白血病的发病有关,也有可能成为早期诊断标志^[7],值得进一步研究。核糖核蛋白异构体 A2在 4个条带中都出现,只是分值和覆盖率不同。苹果酸脱氢酶在 2和 3号条



图 1 K562细胞株样品经等电聚焦及染色后的胶条局部图(p17-10)

Fig 1 Immobilized pH gradient isoelectric focusing (IPG IEF) (p17-10) of K562 cell extract

带中出现,也是分值和覆盖率不同。在 IPG-IEF 鉴定标准蛋白质的比对研究中,也观察到类似结果,说明本方法在鉴定修饰性蛋白或空间结构差异的蛋白质方面有一定优势。

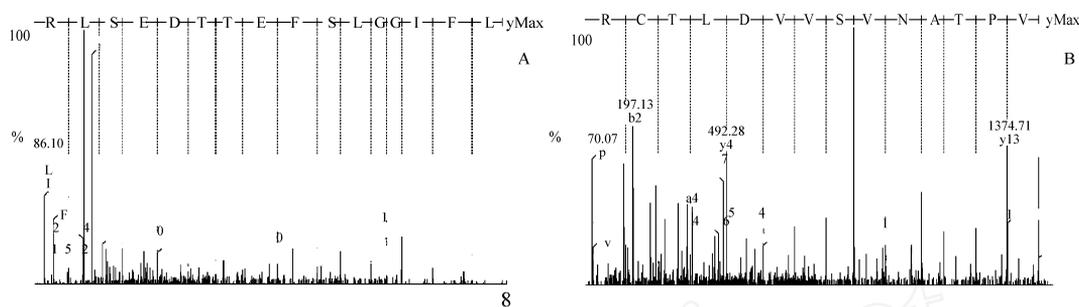


图 2 K562 细胞株样品 IPG IEF 条带的串联质谱序列测定谱

Fig 2 Mass spectrometry (MS) /MS of ions from IPG IEF band of K562 cell

A. doubly charged ion m/z 892.98; B. doubly charged ion m/z 737.89.

表 1 K562 细胞株 IPG 蛋白条带的自动串联质谱鉴定结果

Table 1 Automatic MS/MS database search result of IPG bands from K562 cell line

条带 Band	蛋白质名称 Protein	NCBI 登录号 Accession No	等电点 pI	分子量 MW	序列覆盖率 Sequence coverage (%)	得分 Score
1	烯醇化酶 1 Enolase 1	gi 4503571	7.01	47139	41	215*
	不均一核糖核蛋白异构体 A2 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform A2	gi 4504447	8.67	35984	9	70*
	泛素 Ubiquitin	gi 70637	6.56	8446	45	66*
	磷酸烯醇丙酮酸酯水合酶 Phosphopyruvate hydratase	gi 105934	7.05	46943	10	48*
	旋转异构体菌珠 A 链 Chain A, Rotamer strain	gi 5821952	6.56	8560	44	40*
2	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 31645	8.26	36031	50	378**
	不均一核糖核蛋白异构体 A2 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform A2	gi 4504447	8.67	35984	19	152**
	肌动蛋白 1 Cofilin 1	gi 5031635	8.22	18491	31	110**
	苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	gi 6648067	8.92	35509	15	94**
	甘油醛-3-磷酸脱氢酶类似物 Similar to Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	gi 29741246	9.15	35010	9	65**
3	苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	gi 6648067	8.92	35509	7	59*
	不均一核糖核蛋白异构体 A2 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform A2	gi 4504447	8.67	35984	10	35*
	不均一核糖核蛋白异构体 A1 Heterogeneous ribonuclear particle protein A1, beta	gi 87650	9.27	34131	28	302*
	PTB 蛋白相关富含脯氨酸/谷氨酰胺的剪切因子 Splicing factor proline/glutamine rich polypyrimidine tract binding protein associated	gi 4826998	9.45	76102	10	124*
	不均一核糖核蛋白异构体 A2 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform A2	gi 4504447	8.67	35984	9	84*
4	延长因子 1- Elongation factor 1-alpha	gi 31092	9.10	50095	12	78*
	肽基脯氨酸顺反异构酶 B Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	gi 118090	9.33	22728	6	60*
	H2B 组蛋白家族成员 A H2B histone family, member A	gi 4504257	10.31	13898	11	40*

* 超过 34 分有效 (scores more than 34 are significant); ** 超过 35 分有效 (scores more than 35 are significant)

3.3 结论

肽质量指纹谱不能有效鉴定复杂的混合蛋白质^[8]。等电点或分子量相近的蛋白质以及一些有相互作用的分子常一条带或一个电泳斑点里,不适合用 MALD FTOFMS 鉴定。本实验采用 IPG IEF 与 Nano Spray Cap LC tandem MS 联用方法,与 MALD FTOFMS 方法相比,不仅多了一个液相色谱分离步

骤,更主要的是利用肽段的碎片离子和序列进行数据库检索,特别适合于混合蛋白质的分析。

本方法只采用双向电泳的第一向 IPG IEF,分辨能力可达 0.001 pH^[9,10]。由于没有人工配胶等第二向电泳胶的制备和运行,节省了大量人力物力,提高了重复性,减少了样品损失。结合液相色谱-串联质谱碎片离子蛋白质鉴定可实现高分辨率、高准确度和高自动化复杂蛋白质分析,具有较高的蛋白质鉴定成功率和可信度。用该方法分析人 K562 红白血病细胞株样品的蛋白质提取物,仅在 4 个蛋白条带中就成功地鉴定出 14 种蛋白质,其中部分蛋白质与细胞定位、糖代谢、胰腺癌甚至白血病有关。

References

- 1 Gygi S P, Corthals G L, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2000**, 97(17): 9390~9395
- 2 Wang Yi(王以), Cao Jiang(曹江), Zeng Su(曾苏). *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*(实验生物学报), **2003**, 36(5): 342~346
- 3 Li Rong(李荣), Liu Xiaoli(刘晓力), Du Qingfeng(杜庆锋), Zhang Song(张嵩), Luo Rongcheng(罗荣城), Zhou Shuyun(周淑芸). *Chinese Journal of Hematology*(中华血液学杂志), **2004**, 25(6): 323~327
- 4 Le Bihan T, Duewel H S, Figeys D. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2003**, 14(7): 719~727
- 5 Thiede B, Siejak F, Dimmler C, Rudel T. *Proteomics*, **2002**, 2(8): 996~1006
- 6 Pinol-Roma S, Dreyfuss G. *Nature*, **1992**, 355(6362): 730~732
- 7 Yan-Sanders Y, Hammons G J, Lyn-Cook B D. *Cancer Lett*, **2002**, 183(2): 215~220
- 8 Marvin L, Millar A, Saubt V, Machour N, Charlonet R, Tron F, Lange C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2000**, 14(14): 1287~1292
- 9 Bjellqvist B, Righetti P G, Gianazza E, Gorg A, Westemeier R, Postel W. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1982**, 6(4): 317~339
- 10 Cossu G, Righetti P G. *J. Chromatogr.*, **1987**, 398: 211~216

Identification of Protein Mixtures from K562 Cell by Nano Spray Capillary Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

Meng Gen, Wang Haibng, Liu Bingyu, Wang Hongli, Li Weihua, Wang Hongxia, Wei Kaihua*,

Zhang Xuemin, Yang Songcheng

(National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850)

Cen Jian

(Department of Hematology, General Hospital of Navy, Beijing 100037)

Abstract A new proteomics strategy based on protein standard isoelectric focusing (IEF) and tandem mass spectrometry (MS) "shot-gun" was investigated, which was peculiarly useful for low abundance protein isoform identification. Protein mixtures were separated on immobilized pH gradient (IPG) strips, stained with coomassie brilliant blue and then digested directly by trypsin, the resulting peptide mixtures were applied to nanospray capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Q-TOF2, waters, USA) for automatic MS/MS analysis. Hence, 14 proteins have been successfully identified from extracts of human erythroleukemia cell K562. Mean deviation of mass measurement of peptides and their fragments were low than 0.05 U and database search scores much greater than the significant limits. Some proteins existed in several isoelectric focusing (IEF) bands, they were the isoforms. Some proteins could be important for human erythroleukemia. This strategy was sensitive, accurate, high resolution and less labor-consumed.

Keywords Isoelectric focusing, shot-gun, proteomics, tandem mass spectrometry, K562 cell line

(Received 16 November 2004; accepted 7 January 2005)