

二氧化钛富集磷酸肽方法优化及在腾冲嗜热厌氧菌 磷酸化蛋白质组分析中的应用

林 威^{1,2,3}, 王京兰^{2,3}, 应万涛^{2,3}, 钱小红^{2,3*}

(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, 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; 3. 蛋白质药物国家工程研究中心, 北京 102206)

摘要:为了提高二氧化钛富集磷酸肽法对磷酸肽的富集效率,以 6 种标准蛋白酶切肽段混合物为研究对象,对二氧化钛富集磷酸肽过程中的乙腈比例、三氟乙酸比例、二氧化钛用量等条件分别进行了优化。结果表明在乙腈含量为 80%(v/v),三氟乙酸含量为 1%(v/v),二氧化钛用量与需要富集肽段的质量比为 40:1 的条件下,可以取得较好的富集效果。将优化后的富集方法应用于腾冲嗜热厌氧菌磷酸化蛋白质的分析,初步鉴定到 25 个磷酸化蛋白质,为进一步研究这种极端环境下生存的低等生物的生命活动提供了参考信息。

关键词:液相色谱;质谱;二氧化钛;磷酸肽;富集;腾冲嗜热厌氧菌;蛋白质组

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2012)08-0763-07

Optimization of titanium dioxide enrichment of phosphopeptides and application in the *Thermoanaerobacter* *tengcongensis* phosphoproteome analysis

LIN Wei^{1,2,3}, WANG Jinglan^{2,3}, YING Wantao^{2,3}, QIAN Xiaohong^{2,3*}

(1. College of Life Science and Bio-Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China;

2. State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of

Radiation Medicine, Beijing 102206, China; 3. National Engineering Research

Center for Protein Drugs, Beijing 102206, China)

Abstract: Using titanium dioxide is a very good strategy for the phosphopeptide enrichment. There are many other factors can affect the enrichment efficiency, and the optimization of parameters was needed for better enrichment results. In this study, the peptide mixtures of six standard proteins were used as the model samples to evaluate and optimize the parameters such as the proportion of acetonitrile and trifluoroacetic acid in loading buffer and the TiO₂-to-peptide ratio. The results showed that 80%(v/v) acetonitrile, 1%(v/v) trifluoroacetic acid and 40:1 (m/m) TiO₂-to-peptide ratio were the optimum parameters to obtain the best enrichment selectivity and maximum phosphopeptides identification. For the first time, the optimum enrichment conditions were applied for the phosphoproteome analysis of the *Thermoanaerobacter tengcongensis*, an anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengchong, China, and 25 phosphorylated proteins were identified in the preliminary experiment. The results provided a reference for further study on this organism survived under extreme environment.

Key words: liquid chromatography (LC); mass spectrometry (MS); titanium dioxide; phosphopeptide; enrichment; *Thermoanaerobacter tengcongensis*; proteome

蛋白质磷酸化是生物体内一种非常重要的蛋白质翻译后修饰方式,磷酸化与去磷酸化是可逆的双

* 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。Tel: (010)80727777-1231, E-mail: qianxh1@163.com.

基金项目:国家重大科学仪器开发专项(2011YQ09000504).

收稿日期:2012-04-18

向调节过程,生物体通过这一过程调控多种生命活动,不正常的磷酸化会使生命活动产生紊乱。在哺乳动物生命过程中,非常多的蛋白质会发生磷酸化修饰^[1]。在真核生物中,蛋白质磷酸化修饰绝大部分发生在丝氨酸(占 90%)、苏氨酸(占 9.9%)、酪氨酸(占 0.1%)这 3 种氨基酸残基上^[2]。研究一度认为细菌中磷酸化修饰只发生在组氨酸和天冬氨酸残基上,现在很多的证据表明细菌中同样存在丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸残基的磷酸化修饰^[3]。

随着质谱技术的不断发展,磷酸化蛋白质的定性、定量研究进步迅速。但在磷酸化蛋白质的质谱分析过程中还存在许多问题,如:具有负电性的磷酸化肽段在质谱正离子模式分析时,信号会受到抑制。磷酸化肽段中的磷酸键比起肽键更容易断裂,使谱图解析难度增大。磷酸化肽段的化学计量值低^[4],在质谱检测时,大量的非磷酸化肽段会对磷酸化肽段的信号造成干扰和抑制。这些问题都给磷酸化肽段的鉴定造成了困难,因而在对较为复杂的样本进行分析时,磷酸化肽段的分离和富集过程就显得尤为重要。目前,固相金属离子亲和层析法(IMAC)^[5,6]、强阳离子交换色谱法(SCX)^[7]、金属氧化物亲和色谱法^[8,9]是几种常用的磷酸化肽段分离和富集的方法。金属氧化物亲和色谱法中的二氧化钛(TiO_2)法^[8]因具有操作简单、富集效果好、成本低等优点,得到了广泛的应用。二氧化钛富集磷酸肽过程中会吸附一些特定的非磷酸肽,文献报道,在上样缓冲液中加入谷氨酸^[10]或者天冬氨酸^[11]可以有效地降低非特异性的吸附,提高磷酸肽的富集效率,而且不会造成离子源的污染。在二氧化钛富集磷酸肽的过程中,除了使用非特异性抑制剂外,其他富集条件的改变也会对富集效果产生影响。为了明确这些富集条件对富集效果的影响,筛选出最优富集条件,提高富集效率,本文以 6 种标准蛋白质混合物为研究对象,比较了二氧化钛富集过程中多种因素对磷酸肽富集效果的影响,优化出较好的富集条件,并将其应用于实际样品腾冲嗜热厌氧菌的磷酸化蛋白质研究。腾冲嗜热厌氧菌是在云南腾冲热泉中发现的厌氧、杆状、革兰氏阴性菌,生长环境在 50~80 °C^[12]。Bao 等^[13]通过基因组全测序发现:基因组共编码 2 588 个基因序列,根据同源比对,其中有 1 764 个蛋白质为功能已知蛋白质。目前文献中未见有关腾冲嗜热厌氧菌磷酸化蛋白质的研究,开展这方面的研究有助于增加对这种生命起源早期生物的认识。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(Agilent 公司);线性离子阱傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(LTQ-FTICR, Thermo Finnigan 公司),配纳升级电喷雾源;超声破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);蛋白质定量仪(Smartspec plus, Bio-Rad 公司);冷冻离心干燥机(SC110A Speedvac plus, Thermo Savant 公司);小型离心机(Thermo 公司);LC-18 固相亲和柱(Supelco 公司);纯水系统(美国 Millipore 公司);恒温水浴箱为北京市长风仪器仪表公司产品。

6 种标准蛋白质牛 α -酪蛋白(α -casein)、牛 β -酪蛋白(β -casein)、鸡卵清蛋白(ovalbumin)、马心肌红蛋白(myoglobin)、牛 α -乳清蛋白(α -lactalbumin)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin)均购自美国 Sigma 公司;65 °C 嗜热厌氧菌(华大基因提供);甲酸和碳酸氢铵购自 Fluka 公司;胰蛋白酶(trypsin, 美国 Promega 公司);谷氨酸(北京拜耳迪生物公司);色谱纯乙腈(ACN, Sigma-Aldrich 公司);三氟乙酸(TFA, 纯度为 99%, 比利时 Acros 公司);分析纯硫酸钠和尿素购自北京化学试剂公司;分析纯焦磷酸钠和氟化钠购自国药集团化学试剂有限公司;蛋白质抑制剂鸡尾酒片剂(德国 Roche 公司);碘乙酰胺(IAA)、二硫苏糖醇(DTT)购自美国 Bio-Rad 公司;二氧化钛颗粒(TiO_2 , 20 μm /30 nm, 德国 Sachtleben Chemie 公司)。

1.2 样品制备

1.2.1 标准蛋白质酶切混合物的制备

将 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、卵清蛋白、马心肌红蛋白、 α -乳清蛋白、牛血清白蛋白这 6 种标准蛋白质分别溶于 50 mmol/L 的碳酸氢铵溶液中,各加入 10 mmol/L(终浓度)的 DTT,沸水浴 10 min,然后于 56 °C 水浴 1 h。之后加入 50 mmol/L(终浓度)IAA,室温暗处放置反应 1 h,按酶与蛋白质的质量比 1:50 加入胰蛋白酶,37 °C 水浴酶切 12 h。6 种标准蛋白质分别酶切后,将酶切液均配成 1 g/L,之后等体积混合,形成蛋白酶切混合液备用。

1.2.2 腾冲嗜热厌氧菌蛋白的制备

取适量腾冲嗜热厌氧菌置于 1.5 mL 离心管中,加入 600 μL 裂解液溶解。裂解液的组成如下:9.5 mol/L 尿素、1% DTT、磷酸酶抑制剂(1 mmol/L 硫酸钠、10 mmol/L 焦磷酸钠、5 mmol/L

氯化钠)、蛋白酶抑制剂鸡尾酒(1 mL 裂解液中加入 20 μ L 鸡尾酒)。混匀,室温混合 15 min,先后用 0.1 mol/L 盐酸、0.1 mol/L 氢氧化钠、超纯水洗净超声破碎仪的探针并用无尘纸擦干,将溶解有样品的离心管放置于冰浴的环境,探针深入样品,超声功率设置为满量程的 22%,超声 1 min(超声 1 s 停 1 s,共计 2 min),冰浴 1 min,重复 8 次。超声完成后将样品在 4 $^{\circ}$ C、20 000 g 的条件下离心 30 min,取上清液,并用考马斯亮蓝法(Bradford 法)对所得的蛋白质进行定量,然后将提取的蛋白质分装,置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存备用。

1.2.3 腾冲嗜热厌氧菌蛋白的酶切

向需要酶切的样品中加入适量的碳酸氢铵,使样品中的碳酸氢铵终浓度为 50 mmol/L,加入 10 mmol/L(终浓度)的 DTT,56 $^{\circ}$ C 水浴 4 h。然后加入 55 mmol/L(终浓度)IAA,室温避光反应 1 h,之后用 50 mmol/L 的碳酸氢铵溶液将样品中含有的尿素浓度稀释到 1 mol/L 以下,按酶与蛋白质的质量比 1:50 加入胰蛋白酶,37 $^{\circ}$ C 水浴酶切 16 h。

1.2.4 腾冲嗜热厌氧菌蛋白酶切液脱盐

用 LC-18 固相亲和柱对酶切样品脱盐,先用 1 mL 乙腈活化亲和柱,接着用 1 mL 0.1%(体积分数,以下无特殊说明的均同此)三氟乙酸溶液冲洗,然后将酶切样品溶液的 pH 值用三氟乙酸调整到 3 左右,将样品溶液过脱盐柱,再次用 1 mL 0.1%三氟乙酸溶液冲洗,最后用 500 μ L 80%乙腈/0.1%三氟乙酸溶液洗脱肽段。以上步骤重复 3 次。

1.3 实验方法

1.3.1 磷酸肽富集方法

首先向需要富集的蛋白质样品酶切液中加入适量乙腈和三氟乙酸,将酶切液配成 50%乙腈和 2.5%三氟乙酸溶液。加入适量谷氨酸充分振荡溶解至饱和,用以抑制磷酸肽富集过程中可能发生的非特异性吸附作用。然后弃去沉淀,按富集肽段溶液理论蛋白质 20 倍的质量加入二氧化钛颗粒,室温混合 60 min,使得磷酸化肽段与二氧化钛颗粒充分结合。之后弃去上清液,沉淀先后用 200 μ L 50%乙腈和 0.1%三氟乙酸、200 μ L 50%乙腈各洗 3 遍,洗去二氧化钛颗粒上残留的非磷酸肽。弃去上清液,用 100 μ L 0.3 mmol/L 的氨水(pH 值 10 左右)与沉淀室温混合 15 min,洗脱与二氧化钛颗粒结合的磷酸肽。为使磷酸肽能够得到充分洗脱,此过程重复 3 次。

1.3.2 分析条件

标准蛋白质酶切混合物的色谱条件:流动相 A

为含有 2%乙腈和 0.1%甲酸的水溶液;流动相 B 为含有 80%乙腈和 0.1%甲酸的水溶液,流速为 300 nL/min。梯度设置:0~14 min,100%A;14~15 min,100%A~5%B;15~45 min,5%B~50%B;45~50 min,50%B~100%B;50~55 min,100%B;55~56 min,100%B~100%A;56~65 min,100%A。色谱仪预柱是 C18 柱(5 mm $\times$ 100 μ m,5 μ m),分析柱为美国 New Objective 公司的 PicoFritTM反相色谱柱(BioBasic C18,10 cm $\times$ 75 μ m,5 μ m)。

腾冲嗜热厌氧菌蛋白酶切产物的色谱分析条件:除梯度设置外,其余条件均与标准蛋白酶切混合物色谱条件一致。梯度设置:0~14 min,100%A;14~15 min,100%A~5%B;15~105 min,5%B~50%B;105~115 min,50%B~100%B;115~125 min,100%B;125~126 min,100%B~100%A;126~136 min,100%A。

共同的质谱分析条件:正离子扫描模式;一级质谱全扫描质荷比范围为 375~1 500,二级质谱为数据依赖型模式,选取所得一级图谱中 10 个离子信号最强的离子做二级质谱检测;动态排除时间设置为 30 s。实验重复 3 次。

1.3.3 数据库检索条件

标准蛋白质数据检索条件:运用 Bioworks 3.2 软件的 SEQUEST 引擎对串联质谱数据进行检索,数据库由 6 个标准蛋白质的序列构成,蛋白酶切类型选择 trypsin,允许酶切的肽段漏切位点数设为 2 个。固定修饰选择半胱氨酸的脲甲基化,即 Carbamidomethyl (C);可变修饰选择甲硫氨酸氧化,丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸磷酸化,即 Oxidation (M),Phosphorylation (ST)和 Phosphorylation (Y)。肽段质量允许偏差选择 $\pm 10 \times 10^{-6}$ (± 10 ppm),碎片离子质量允许偏差选择 ± 0.8 Da。将单电荷、二电荷、三电荷肽段的 X_{corr} 值分别设置为 1.5、2.0、2.5 以及 ΔC_n (打分排名前两位肽段得分的差值)设为 0.1 对结果进行过滤。

腾冲嗜热厌氧菌数据检索条件:运用 Mascot 搜索引擎对数据进行检索,数据库为 NCBI 数据库的 NC_003869.fasta,肽段质量允许偏差选择 $\pm 10 \times 10^{-6}$ (± 10 ppm),碎片离子质量允许偏差选择 ± 0.8 Da。固定修饰选择 Carbamidomethyl (C);可变修饰选择 Oxidation (M),Phosphorylation (ST)和 Phosphorylation (Y)。腾冲嗜热厌氧菌数据库为含有反转序列的全库,数据过滤的标准是在图谱水平(spectra)假阳性率(FDR) $\leq 1\%$, ΔC_n 设

为 0.1。

2 结果与讨论

2.1 二氧化钛富集磷酸肽条件的考察

二氧化钛是一种两性物质,在酸性条件下表现为路易斯酸,钛原子与阴离子结合;在碱性条件下,表现为路易斯碱,钛原子与阳离子结合。因此可以通过对 pH 值的调节,让磷酸根与钛原子结合,从而达到富集磷酸肽的目的,操作简单方便。实验以 6 种标准蛋白酶切混合液为实验样品,通过对富集体系中乙腈的比例、三氟乙酸的比例以及二氧化钛的用量这 3 个因素的改变,考察对富集效果产生的影响,从而确定较好的富集条件。在考察过程中,只改变一个被考察条件,保持其他因素不变。以下实验结果均为 3 次重复试验的平均值。

2.1.1 乙腈比例的考察

乙腈是一种非常好用的有机溶剂,能够帮助酶切肽段更好的溶解以及结构的舒展,在磷酸化富集过程中较为常用。但在二氧化钛富集的过程中,乙腈比例的选择并不固定。为了找出较好的乙腈体积比例,选取乙腈含量在 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、97.5% 共 10 个体积比例组别进行考察,磷酸化肽段富集鉴定结果见图 1,图中的“Unique phosphopeptide”表示鉴定到的非冗余的磷酸化肽段数。从图 1 可以看出,乙腈比例从 40% 到 80%,非冗余磷酸肽数具有明显的上升趋势,且在 80% 时达到最大值。实验结果表明在相同的样本条件下,用 80% 的乙腈来富集磷酸肽,质谱分析时能鉴定到更多的磷酸肽。

2.1.2 三氟乙酸用量的考察

二氧化钛富集过程可以简单地表述为酸性富集,碱性洗脱。在富集过程中,由三氟乙酸提供样品体系的酸性环境。在实际操作中,与二氧化钛混合时,富集体系中三氟乙酸比例的选择并不固定,如: Bahl 等^[14]认为 5% 的 TFA 比较合适, Li 等^[15]则选用了 2% 的 TFA。为了考察酸性对二氧化钛富集效果的影响,实验选取三氟乙酸比例 1%、2.5%、5%、7.5%、10% 共 5 个体积比例组别来进行考察。平均富集鉴定结果见图 2,结果发现,三氟乙酸的体积分数从 1% 上升到 10% 这一过程中,鉴定到的磷酸化肽段数呈现下降趋势。这表明富集体系中三氟乙酸比例在 1% 时富集效果更好。

2.1.3 二氧化钛用量的考察

二氧化钛富集过程中,除了二氧化钛自身的规格差异外,二氧化钛的用量也可能对富集效果产生

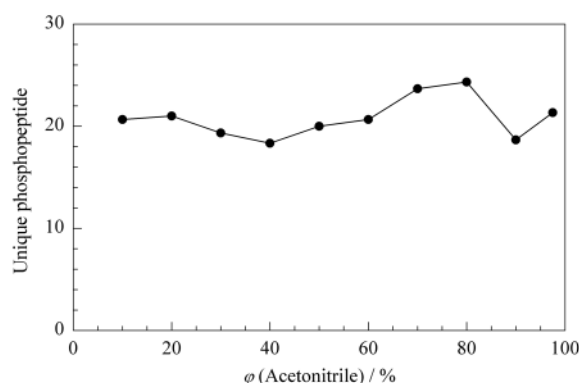


图 1 不同乙腈比例条件下磷酸化肽段的质谱鉴定结果统计

Fig. 1 Unique phosphopeptides identified by mass spectrometry under different acetonitrile contents

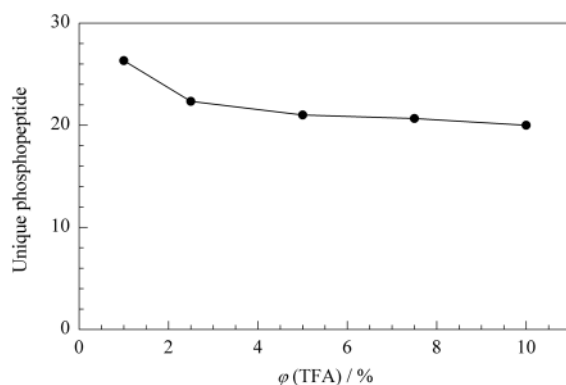


图 2 不同三氟乙酸比例条件下磷酸化肽段质谱鉴定结果统计

Fig. 2 Unique phosphopeptides identified by mass spectrometry under different trifluoroacetic acid (TFA) contents

一定的影响。Li 等^[15]以 HeLa 细胞全蛋白为研究对象,考察了富集过程中不同的样品肽段与 TiO_2 的质量比对富集效果的影响,发现最佳比例为 1:2 ~ 1:8,但同时也指出对于不同的样本,这种比例也会有所不同,需要通过预实验进行考察与评价。我们曾依据文献^[15]中的条件选用 5 倍于肽段质量的二氧化钛来富集标准蛋白质混合液样品,但发现富集效果不太理想,因此本实验选取二氧化钛与富集样品肽段量的质量比 20 倍、40 倍、60 倍、80 倍、100 倍共 5 个组别来进行考察。实验结果见图 3,可以看出,二氧化钛在 40 倍用量时能够取得较好的富集效果。

2.1.4 样品复杂性对富集效果的影响

以上对于乙腈、三氟乙酸、二氧化钛用量条件的考察,是以 α -酪蛋白、 β -酪蛋白等 6 种标准蛋白质的等比例酶切肽段混合物作为研究对象,磷酸肽富集特异性较为理想,各考察组鉴定到的磷酸化肽段图谱数占总肽段图谱数的比例平均大于 90%。本工作也曾以混有 10 倍量 BSA 酶切肽段的 α -酪蛋白、 β -

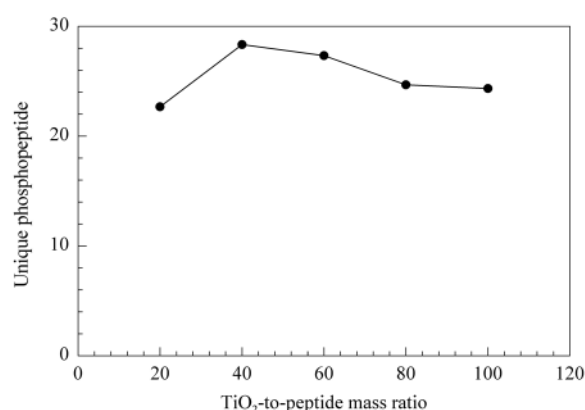


图 3 不同二氧化钛用量条件下磷酸化肽段质谱鉴定结果统计

Fig. 3 Unique phosphopeptides identified by mass spectrometry under different TiO₂-to-peptide ratios

酪蛋白酶切肽段混合物为研究对象,结果发现富集后存在较多非磷酸化肽段,富集特异性不太理想。分析其原因可能是样品中高浓度的 BSA 作为高丰度蛋白质存在,导致了富集过程中非特异性吸附增加造成的。在实际样本中,如果存在某几种较高丰度的蛋白质的干扰,势必也会影响磷酸肽富集的特异性,这种情况下应当考虑高丰度蛋白质去除或增加预分离步骤。

2.2 腾冲嗜热厌氧菌磷酸化蛋白质分析

腾冲嗜热厌氧菌是一种在极端环境下生存的低等生物,对于这种生物的蛋白质磷酸化修饰情况之前很少有文献报导。研究腾冲嗜热厌氧菌体内的蛋白质磷酸化修饰情况,对于进一步了解这种生物的生命活动具有重要的意义。

磷酸肽富集方法使用二氧化钛富集法。通过以

上标准蛋白质考察实验,发现在 80% 乙腈、1% 三氟乙酸、40 倍二氧化钛用量条件下不仅鉴定到的磷酸化肽段数较多,且按冗余磷酸化肽段图谱数计算,富集特异性可达到 90% 以上,富集效果较好。我们将这一优化的富集条件用于腾冲嗜热厌氧菌(65 °C)磷酸化蛋白质修饰情况的研究。由于腾冲嗜热厌氧菌蛋白酶切液中含有尿素,富集前需要预先脱盐,考虑到脱盐、冻干浓缩可能造成的样品损失,实际实验中二氧化钛用量选择理论酶切蛋白量的 20 倍,从而可以保证二氧化钛用量与实际富集蛋白量比例维持在 40 倍左右。富集后的肽段经 LC-LTQ FTICR 串联质谱分析, Mascot 检索鉴定,共鉴定到 25 个磷酸化蛋白质、27 个磷酸化肽段、36 个磷酸化位点,鉴定到的磷酸化蛋白质情况见表 1。

通过对磷酸肽的质谱图分析发现,磷酸化肽段的二级图谱中第一强信号峰通常为母离子失去磷酸分子的中性丢失峰,部分 b, y 离子由于失去磷酸分子的影响,也存在中性丢失峰的形式,这一现象符合在离子阱型质谱仪中磷酸肽的裂解规律。图 4 为鉴定到的磷酸化蛋白 Ferredoxin 的肽段 IAVGMAT@CGIAAGAR(28~43)的二级质谱图,其中 34 位苏氨酸残基是一个磷酸化修饰位点。如图 4 所示,肽段的 b、y 离子匹配情况良好, y₂~y₁₃ 以及 b₈~b₁₄ 出现了连续匹配。图谱中的第一强峰 m/z 700.98 为二电荷母离子 m/z 749.86 失去一分子磷酸的中性丢失峰。由于发生了 β 消除反应,部分苏氨酸残基失去一分子 H₃PO₄,从而使得部分 b₈、b₉、b₁₂、y₉、y₁₀ 等离子也发生了 98 的质量偏移,以中性丢失峰的形式存在。

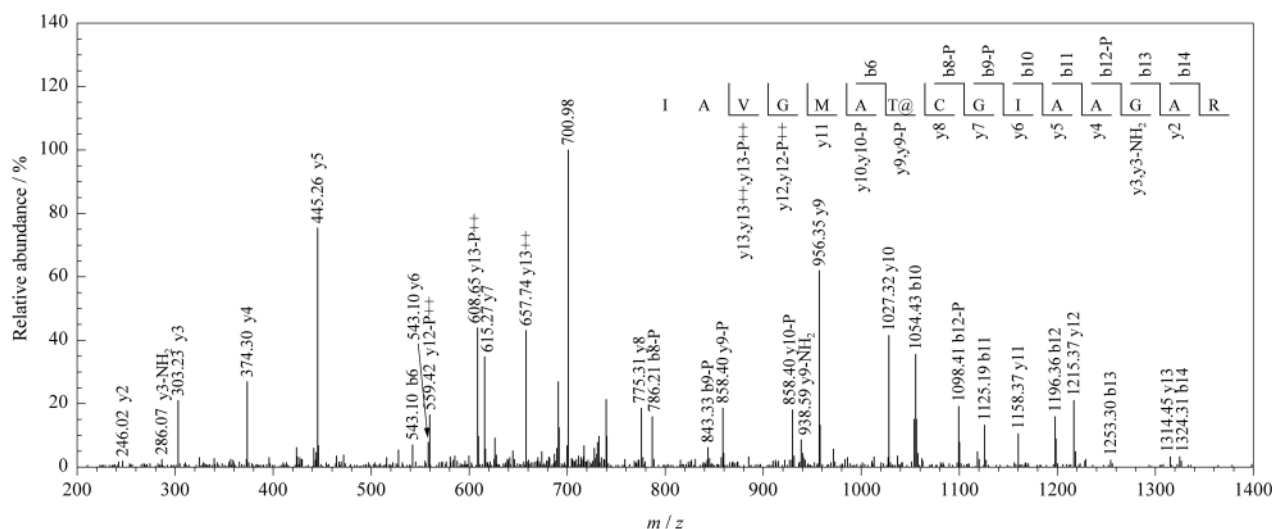


图 4 肽段 IAVGMAT@CGIAAGAR 的二级图谱匹配情况

Fig. 4 MS² spectrum of the peptide IAVGMAT@CGIAAGAR from protein ferredoxin

表 1 腾冲嗜热厌氧菌中鉴定到的磷酸化蛋白质
Table 1 Phosphorylated proteins identified from *Thermoanaerobacter tengcongensis*

gi number	Protein name	Phosphopeptide sequence ¹⁾	No. of phosphorylation site
gi 20806548	α -glucosidases, family 31 of glycosyl hydrolases	DKYGITpYVGK(330–339)	1
gi 20806569	cation transport ATPases	RPIFDMFMTpAVSLAVAAIPEGLPAITITLALGVQKM-SpK(266–304)	2
		RPIFDMFM*TAVSLAVAAIPEGLPAITITpLALGVQKM-SpK(266–304)	2
gi 20806759	putative uncharacterized protein	EVIEFTpSPKSpAPSSWNAYpK(9–28)	3
gi 20806780	hemerythrin	VVEVMQFLKDYpTpVK(42–55)	2
gi 20806945	ABC-type multidrug transport system, ATPase component	GQKTLILAILAFSTNAKLILDEPTpQHLDPATR(130–162)	1
gi 20807192	predicted site-specific integrase-resolvase	MLLSpM*QKVK(1–9)	1
gi 20807358	nicotinic acid phosphoribosyltransferase	LDTPSpERGVTpDLVYELR(246–264)	1
gi 20807371	NADH: ubiquinone oxidoreductase 24 kD subunit	INLCMGTpACYVR(92–103)	1
		INLCM*GTPACYVR(92–103)	1
gi 20807373	ferredoxin	IAVGMTpCGIAAGAR(28–43)	1
		IAVGM*ATpCGIAAGAR(28–43)	1
gi 20807461	phosphoenolpyruvate synthase/pyruvate phosphate dikinase	GGMTpSHAAVVAR(450–461)	1
		GGMTSpHAAVVAR(450–461)	1
		GGM*TpSHAAVVAR(450–461)	1
		GGM*TSpHAAVVAR(450–461)	1
gi 20807470	4Fe-4S binding domain protein	FKAFRVILGTSpFR(43–55)	1
gi 20807595	probable transcriptional regulatory protein TTE1135	HIFDRNGGTpLGAAGSpVTWM*FDKVGIVVEK(115–144)	2
gi 20807698	UPF0297 protein TTE1249	NEQTpIKYTVSK(13–23)	1
gi 20807743	exodeoxyribonuclease 7 large subunit	RNPTVDIM *VVPVLVQGSSpAADEISNALRILNK(160–191)	1
gi 20807956	diaminopimelate epimerase	YVYpEKGIVSK(79–88)	1
gi 20808073	bacterial cell division membrane protein	QLVWAILGFFAM *VFTpM *NVDYLWFKR (48 –	1
gi 20808107	response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a HTH DNA-binding domain	MSQASpNGEEAYR(29–41)	1
		VISpQASNGEEAYR(29–41)	1
gi 20808178	enolase	AMIELDGTpNKSpK(93–105)	1
gi 20808181	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/erythrose-4-phosphate dehydrogenase	AAAVSIPTTTpGAAK(201–215)	1
gi 20808237	phosphotransferase system, HPr-related proteins	SpIM*GIM*SLGVSQGNVVK(46–62)	1
		KVNAKSIM*GIM*SpLGVSQGNVVK(41–62)	1
		SpIMGIMSLGVSQGNVVK(46–62)	1
gi 20808348	putative uncharacterized protein	LSLHSpGSDKFSIYK(195–204)	1
		LSLHSGSpDKFSIYK(195–204)	1
gi 20808383	ABC-type sugar/spermidine/putrescine/iron/thiamine transport systems, ATPase component	ESPVIIADKTASSp(375–387)	1
		TVKESPVIIADKTpASS(372–387)	1
gi 20808656	30S ribosomal protein S19	GHAGSpEK(82–88)	1
gi 20808890	amino acid transporters	DM*NPFLSTM*RFVLPAMTYLTpGFELVAVLAEE-ANM*PVR(200–236)	1
gi 20809047	phosphomannomutase	ATAGIMITASpHNPEYNGYK(135–154)	1

1) M* means methionine oxidation.

目前对于腾冲嗜热厌氧菌蛋白质的功能研究报道较少,我们鉴定的 25 个磷酸化蛋白质在 UniProt 数据库中只有 3 种蛋白质具有明确的功能表述。编号 gi|20807743 的蛋白质名称是“exodeoxyribonuclease 7 large subunit”,为一种脱氧核糖核酸外切酶,可以降解单链脱氧核糖核酸(DNA),最终形成

小的寡核苷酸。编号 gi|20808656 的蛋白质名称为“30S ribosomal protein S19”,可以与强烈结合在 16S 核糖体核糖核酸(RNA)上的蛋白质 S13 组成复合物。编号 gi|20808178 的蛋白质名称是“enolase”,在 UniProt 数据库中的功能描述是催化 2-磷酸甘油酸形成磷酸烯醇丙酮酸的可逆反应,这一反

应是碳水化合物经过糖酵解过程降解所必需的过程。任何有机体的生存都需要能量,三磷酸腺苷(ATP)是主要的功能物质。产生 ATP 的途径主要分为有氧条件及无氧条件两种情况。对于腾冲嗜热厌氧菌,无需氧分子参加的情况下降解葡萄糖产生 ATP 的糖酵解过程显得尤为重要。能量的代谢是各种生命活动的基础,因此 enolase 蛋白在腾冲嗜热厌氧菌体内发挥着重要的作用。

目前我们在腾冲嗜热厌氧菌中一共鉴定出 25 个磷酸化蛋白质,这个数字和已发表的真核生物磷酸化蛋白质组数据相比数量是非常少的,分析可能有以下两方面的原因:首先,腾冲嗜热厌氧菌是一种简单的原核生物,原核生物相对于真核生物而言修饰更加的保守,因此含有的磷酸化修饰偏少^[16]。而且原核生物中磷酸化修饰很多发生在组氨酸和天冬氨酸残基上,这种类型的磷酸化修饰在色谱分析的酸性条件下易水解,不易被检测出来。近些年逐渐有研究证据表明细菌中同样存在丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸残基的磷酸化修饰^[3],但从规模和数量上看还是比较少的。另一方面,从技术策略上来看,对于复杂的实际样本中的磷酸化修饰分析,任何一种单一的富集、分离手段都是不能满足要求的,为了获得更完整的腾冲嗜热厌氧菌磷酸化修饰蛋白质谱,今后要考虑在磷酸肽的亲富集前增加蛋白质水平或肽段水平的预分离步骤,以降低每一组分的复杂程度,使富集更有效率。

3 结论

二氧化钛富集法以其操作简便、成本低廉的优势得到了广泛的应用,通过选择适当的富集条件,可以得到较好的富集效果。以 6 种标准蛋白酶切肽段混合物为研究对象,对二氧化钛富集法中的乙腈比例、三氟乙酸比例、二氧化钛用量进行了系统考察。结果表明 80%乙腈、1%三氟乙酸、40 倍二氧化钛用

量时可以取得较好的富集效果。同时将优化后的富集方法应用于腾冲嗜热厌氧菌磷酸化蛋白质的分析,初步鉴定到 25 个磷酸化蛋白质。本实验可以为富集样品量不在商品化富集小柱载量范围内或者需要灵活变换样品量且用二氧化钛颗粒直接富集的实验提供一定的参考和借鉴。

致谢:感谢中国科学院北京基因组研究所刘斯奇教授提供腾冲嗜热厌氧菌。

参考文献:

- [1] Cohen P. Nat Cell Biol, 2002, 4(5): E127
- [2] Nghiem H O, Bettendorff L, Changeux J P. FASEB J, 2000, 14(3): 543
- [3] Macek B, Mijakovic I, Olsen J V, et al. Mol Cell Proteomics, 2007, 6(4): 697
- [4] Chalmers M J, Kolch W, Emmett M R, et al. J Chromatogr B, 2004, 803(1): 111
- [5] Villén J, Gygi S P. Nat Protoc, 2008, 3(10): 1630
- [6] Hou C Y, Ma J F, Tao D Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (侯春彦, 马俊锋, 陶定银, 等. 色谱), 2011, 29(9): 851
- [7] Mohammed S, Heck A Jr. Curr Opin Biotechnol, 2011, 22(1): 9
- [8] Zarei M, Sprenger A, Metzger F, et al. J Proteome Res, 2011, 10(8): 3474
- [9] Kweon H K, Hakansson K. Anal Chem, 2006, 78(6): 1743
- [10] Wu J, Shakey Q, Liu W, et al. J Proteome Res, 2007, 6(12): 4684
- [11] Chi M, Bi W, Lu Z, et al. Chinese Journal of Chromatography (迟明, 毕伟, 卢庄, 等. 色谱), 2010, 28(2): 152
- [12] Xue Y F, Xu Y, Liu Y, et al. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51: 1335
- [13] Bao Q Y, Tian Y Q, Li W, et al. Genome Res, 2002, 12(5): 689
- [14] Bahl J M C, Jensen S S, Larsen M R, et al. Anal Chem, 2008, 80(16): 6308
- [15] Li Q R, Ning Z B, Tang J S, et al. J Proteome Res, 2009, 8(11): 5375
- [16] Macek B, Gnäd F, Soufi B, et al. Mol Cell Proteomics, 2008, 7(2): 299