

糖蛋白结构质谱解析的样品前处理

周 玮, 刘晓慧, 周新文, 申华莉, 杨芃原

(复旦大学生物医学研究院, 上海 200032)

摘要: 基于高分辨率、高精度、高灵敏度及良好表现力的多级质谱, 以标准糖蛋白辣根过氧化物酶(HRP)、核糖核酸酶 B(RNase B)为对象, 探索了糖蛋白质谱分析前样品处理的技术流程。通过对糖蛋白样品前处理的各个步骤(包括蛋白变性方法(RNase B 适合化学变性, HRP 适合热变性)、酶的选择及条件(RNase B 适用内蛋白酶 Lys-C 酶解, HRP 适用胰蛋白酶酶解, 酶解时间控制在 12 ~ 16 h)、提肽液的组成(对于低丰度糖蛋白用 50% 乙腈-5% 三氟乙酸提取)、基质的组成、点样方法(“三明治”式))进行了优化, 形成了简单易行、无需糖肽富集标记的糖蛋白溶液酶解-质谱分析和胶上分离酶解-质谱分析的技术路线, 为实际样品体系中糖蛋白的结构解析提供了可行的方法。

关键词: 糖蛋白结构; 质谱解析; 样品前处理; 条件优化

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2007)05-0623-05 栏目类别: 样品预处理方法专栏

Sample Pre-Processing for Mass Spectrometric Analysis of Glycoprotein Structure

ZHOU Wei, LIU Xiaohui, ZHOU Xinwen, SHEN Huali, YANG Pengyuan

(Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: A novel, simple and fast method based on a quadrupole ion trap (QIT) and a time-of-flight mass spectrograph was developed for the glycosylation site and glycan structure analysis of glycoprotein by in-solution digestion and in-gel digestion which did not need to enrich and label the glycopeptide. Horseradish peroxidase (HRP) and RNase B were utilised to optimize the conditions of sample pre-processing. The effects of the conditions were investigated separately and the optimal conditions were: heat denaturation of RNase B, chemical denaturation of HRP, RNase B digestion with endoproteinase Lys-C, HRP digestion with trypsin, 12 - 16 h of digestion, 50% acetonitrile-5% trifluoroacetic acid of the extraction solution, sandwich spotting method of the sample.

Key words: glycoprotein structure; mass spectrometric analysis; sample pre-preparation; conditions of optimization

糖基化是蛋白质的一种重要的翻译后修饰方式, 约有一半以上的蛋白质发生糖基化。越来越多的文献报道显示, 糖基化对蛋白质的功能有着重要的影响, 如: 对蛋白质的折叠、运输、定位起着重要的作用^[1]; 免疫系统中几乎所有的关键分子都是糖蛋白^[2]; 近来发现蛋白质丝氨酸、苏氨酸残基的乙酰氨基葡萄糖(O-GlcNAc)化与信号转导有密切的关系^[3]; 而蛋白质的糖基化程度及糖链结构的异常变化则常是癌症及其他疾病发生的标志^[4-6]。

以往的糖基化研究多利用薄层色谱法、电泳法结合凝集素进行。这些方法只能鉴定发生了糖基化的蛋白, 看到哪些蛋白发生了糖基化, 或者粗略地看

到某些蛋白发生了哪一类糖基化, 粗略地分析蛋白质的糖基化类型, 且存在一定的假阳性^[7-11]。对发生糖基化的位点和糖链结构没有进行研究。近年来, 随着质谱仪器技术的不断发展, 高灵敏度的多级质谱(MSⁿ)分析已成为现实。这些仪器(如 AXIMA-QIT-MS、MALDI-FT-MS^[10]、MALDI-Qq-TOF-MS^[12])的发展促进了对糖基化位点和糖链结构的深入分析^[12-19]。目前这些研究侧重于糖链部分的分析, 多采用繁琐复杂的糖肽富集方法和标记技术, 较少对实际样品直接进行胶上酶解和糖基化分析。

本文通过实验建立了糖蛋白酶解后不经糖肽富集标记、简单易操作的直接胶上酶解(或溶液酶解)-

质谱分析糖蛋白结构的技术路线,并对质谱分析前的样品前处理条件进行了优化,为天然实际样品的分析做好了准备。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-QIT-TOF-MS)(AXIMA QIT, 岛津公司)。

尿素、十二烷基磺酸钠(SDS)、丙烯酰胺、*N,N*-甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵和二硫苏糖醇(DTT)均购自 Amresco 公司;三氟乙酸(TFA)和碘乙酰胺(IAA)均购自 Fluka 公司;2,5-二羟基苯甲酸(DHB)、标准糖蛋白辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)、核糖核酸酶 B(RNase B)和内蛋白酶 Lys-C 均购自 Sigma 公司;乙腈购自 Merck 公司;测序级胰蛋白酶购自 Promega 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 标准糖蛋白溶液的制备

3.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 RNase B 溶液:将变性的 3.3 mg RNase B 溶于 1 mL 溶解液(8 mol/L 尿素-50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-HCl, pH 9.0 ~ 9.1)中即得。

1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 HRP 溶液:将 1 mg HRP 溶于 1 mL 水中即得。

1.3 溶液酶解糖蛋白

糖蛋白溶液的还原:于 3.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 RNase B 溶液中加入 DTT 10 mg,于 56 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 0.5 ~ 1 h。糖蛋白的烷基化:将 25 mg IAA 加至上述溶液中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光反应 30 min。透析:将 100 μL 上述溶液加至透析袋中,分 3 步透析(用 500 mL 预冷的水透析,每次 1.5 h,透析 2 次;用 500 mL 25 mmol/L 碳酸氢铵透析,每次 2 h,透析 1 次)。酶解:按内蛋白酶 Lys-C 与蛋白质的质量比为 1:50 的比例配料,酶解 12 ~ 16 h。

1.4 胶上酶解糖蛋白

使用 Mini Protein III 电泳仪(Bio-Rad 公司)、12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行糖蛋白的胶上酶解。样品为标准糖蛋白辣根过氧化物酶,上样量分别为 5, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 μg 。考马斯亮蓝染色后取下条带,置于 EP 管中。用 50% 乙腈-25 mmol/L 碳酸氢铵(pH 8.9)脱色。还原:加入适量的 10 mmol/L DTT,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 0.5 ~ 1 h。烷基化:加入 55 mmol/L IAA,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光反应 0.5 h。水洗 2 ~ 3 次,用乙腈干胶后,于测序级胰蛋白酶胶内过夜(12 ~ 16 h)。用提肽液 1(50% 乙腈-5% TFA)或提肽液 2(5% TFA)萃取

HRP 酶解后的胶粒,冻干萃取液,待分析。

1.5 MALDI-QIT-MS 分析

1.5.1 分析基质的制备

分别配制 20% 乙腈-0.1% 三氟乙酸-12.5 mg/mL DHB 和 50% 乙腈-0.1% 三氟乙酸-12.5 mg/mL DHB 溶液,涡旋 30 s 后静置 30 s,取上层清液作分析基质(新配的基质分装后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存)。

1.5.2 点样

方法一(基质-样品-基质,即“三明治”式):在靶板上点上 0.5 μL 基质(点越小越好),干燥后取 0.5 μL 样品点在靶板上,待样品干燥后再点上 0.5 μL 基质,在干燥仪中或真空条件下快速干燥。

方法二(样品-基质):取 0.5 μL 样品点在靶板上(点越小越好),待样品干燥后,再点上 0.5 μL 基质,在干燥仪中或真空条件下快速干燥。

1.5.3 质谱分析

根据不同的需要选择仪器的操作参数,激光强度范围为 60 ~ 110;质量扫描范围分为几个区域:750 + , 2 000 + , 3 000 + ,依据母离子和碎片离子质量选择最佳的质量扫描范围; MS^n 碰撞诱导解离强度:120 ~ 140。

2 结果与讨论

2.1 标准糖蛋白的溶液酶解-质谱分析条件的选择

2.1.1 蛋白变性方法及 RNase B 糖链结构的解析

对于已经商业化且可以得到数量较多、纯度很高的标准糖蛋白可直接进行溶液酶解-质谱分析。为了在质谱分析时得到更多的结构信息,首先要对蛋白进行变性,破坏其二级、三级结构,使蛋白质被更好地打开。蛋白质变性的方法很多,应依据不同的蛋白质选择合适的变性方法,所选择的方法应尽量不影响后面的实验操作(主要是盐分对质谱的影响)。对 HRP 采取热变性的方法较为合适;RNase B 由于其结构对热稳定,故采用溶解液(8 mol/L 尿素-50 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0 ~ 9.1)进行化学变性;对于不熟悉的蛋白质,要采用理论与试验相结合的方法找到合适的变性方法。

RNase B 通过 Lys-C 酶解、四极杆离子阱(QIT)质谱分析,得到了较好的质谱图(见图 1 和图 2),可用于糖蛋白结构的解析。由于糖的不均一性,其分子离子峰在肽质量指纹质谱图上表现为一簇峰,各峰之间约相差一个糖基(相对分子质量为 162,代表甘露糖)。对 RNase 酶 B 的肽质量指纹谱中的含糖肽段进行了串联质谱测定。首先从一级质谱图中选择 m/z 1 934.87 离子在 QIT 中碰撞

产生碎片,从碎片的质荷比推算出此肽段中糖链的组成。由于 *N*-糖蛋白壳二糖核心中与天冬酰胺连接的乙酰葡萄糖胺残基会在碰撞过程中发生跨环断裂,先后产生质荷比相差 120.83 的中性碎片丢失,因此这两个碎片是发现糖基化位点及糖肽的氨基酸序列的标志。通过对糖肽段三级质谱图的分析,可推断出糖肽的理论氨基酸序列(见图 3)。

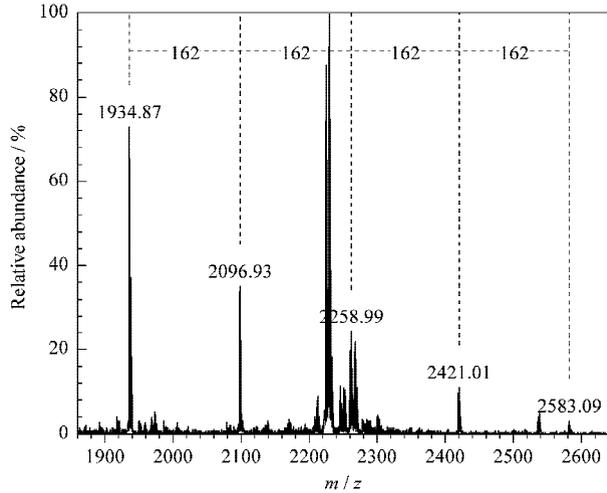


图 1 RNase B 的一级质谱图

Fig. 1 The mass spectrum of RNase B

The protein is digested by Lys-C. The peaks with m/z 1934.87, 2096.93, 2258.99, 2421.01, 2583.09 are the glycopeptides.

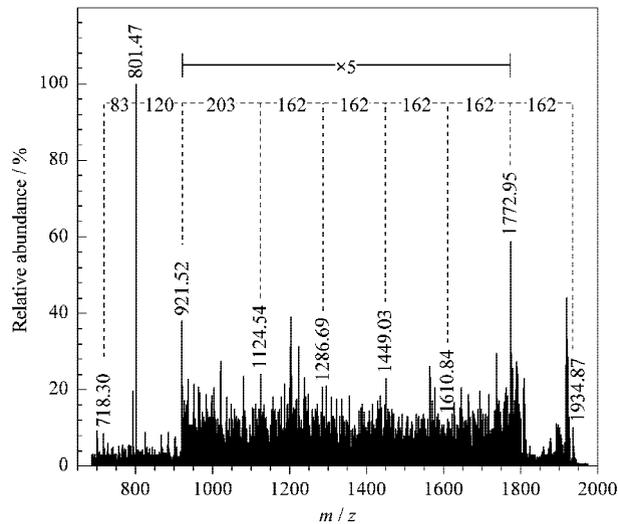


图 2 RNase B 的二级质谱图

Fig. 2 MS/MS spectrum of RNase B

The parent ion is m/z 1934.87 in Fig. 1. From the difference between the peaks, the glycan structure can be inferred.

2.1.2 酶解效率

糖蛋白的酶解效率要高。不同蛋白质应选择最适合的蛋白酶来酶解。对于 RNase B, Lys-C 要比胰蛋白酶的酶解效果好(图 4-a);用胰蛋白酶酶解找不到明显的糖肽峰(m/z 1934.87)(图 4-b)。推

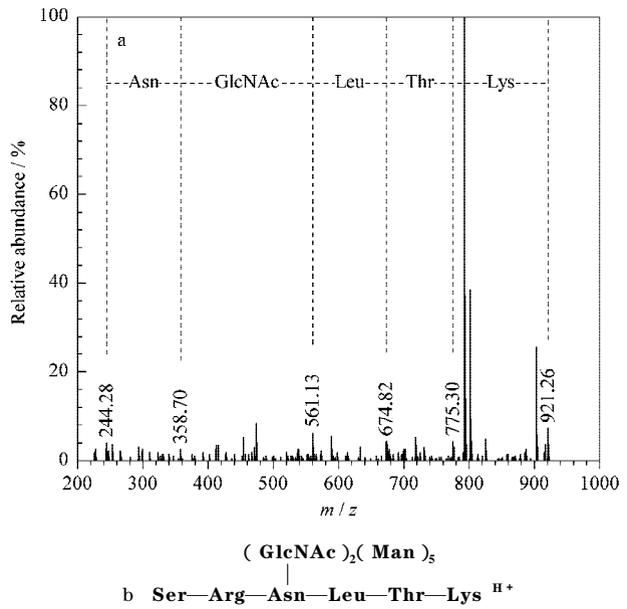


图 3 (a) RNase B 的三级质谱图和 (b) RNase B 的糖肽结构
Fig. 3 (a) MS³ spectrum of RNase B and (b) the inferred glycopeptides structure

The parent ions of MS² and MS³ are 1934.87 in Fig. 1 and 921.52 in Fig. 2, respectively.

测这是由于 Lys-C 的酶切位点为 K,胰蛋白酶的酶切位点为 K 和 R。结合 RNase 的蛋白质序列(见图 5),糖基化位点附近有较多的 K 和 R 氨基酸,胰蛋白酶酶解的肽段可能太小,不利于鉴定,而且由于空间位阻的关系,还会影响到胰蛋白酶的酶切效率。使用 Lys-C 酶解更有利于糖肽的产生和糖肽信号的检出。所以对于一个样品,需要衡量蛋白质序列、空间位阻及酶切位点,有时需要选择不同的蛋白酶或者将几个蛋白酶结合在一起相互印证。蛋白质鉴定所需酶解时间一般在 3~5 h。对于糖蛋白的结构分析,为了得到更多的质谱信息,应使酶解尽量充分,因此将酶解时间控制在 12~16 h。过长的酶解时间会产生酶的自降解峰,从而干扰解析。

2.2 标准糖蛋白胶上酶解-质谱分析条件的选择

2.2.1 胶上酶解提肽液的选择

为了实现天然糖蛋白凝胶电泳分离-胶上酶解-质谱分析结构的技术路线,探索了标准糖蛋白胶上酶解-质谱分析的技术流程。首先,进行胶上酶解提肽液组成的优化。蛋白酶解后的肽段是疏水的,而糖肽由于含羟基是亲水的,故选择组成分别为 50% 乙腈-5% TFA 和 5% TFA 的两种提肽液,在其他条件相同的情况下比较了它们对糖蛋白酶解产物的提糖肽效果,即胶上酶解的 HRP 的最大峰强度和糖肽峰相对强度(见表 1 和表 2)。 m/z (3671 ± 1)是其糖肽峰^[11],其一级质谱图见图 6。选择的质谱条件为激光强度 80;质量扫描范围 2000+。

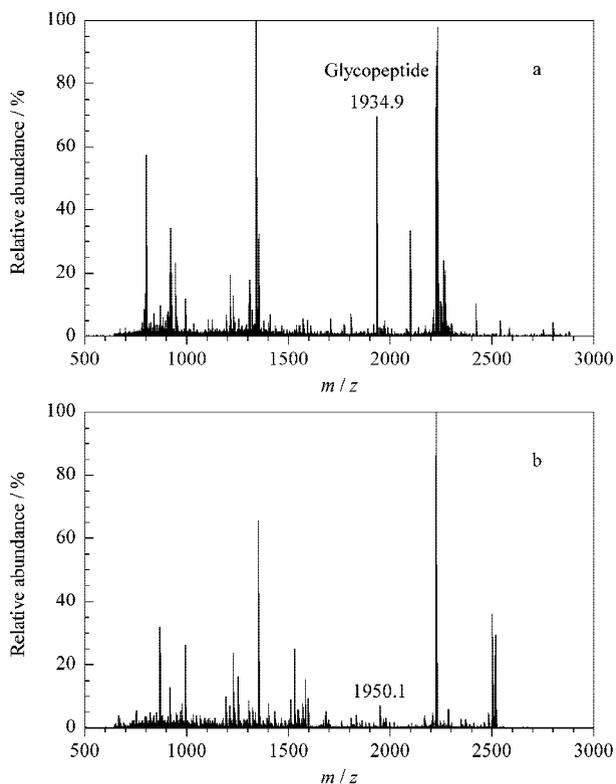


图 4 (a)Lys-C 酶解 RNase B 和 (b)胰蛋白酶酶解 RNase B 的肽质量指纹谱图

Fig. 4 Peptide mass fingerprinting spectra of (a) RNase B digested with Lys-C and (b) RNase B digested with trypsin

1 KETAAAKFERQHMSSTSAASSNYCNQMM 30
 31 KSRNLTKDRCKPVNTFVHESLADVQAVCSQ 60
 61 KNVACKNGQTNCYQSYSTEMSITDCRETGSS 90
 91 KYPNCAYKTTQANKHIIVACEGNPYVPVHF

图 5 RNase B 蛋白质序列及糖肽序列

Fig. 5 The peptide sequence with glycosylated modification

The glycopeptide is highlighted using “=”, and the glycosylation site is marked using “—”.

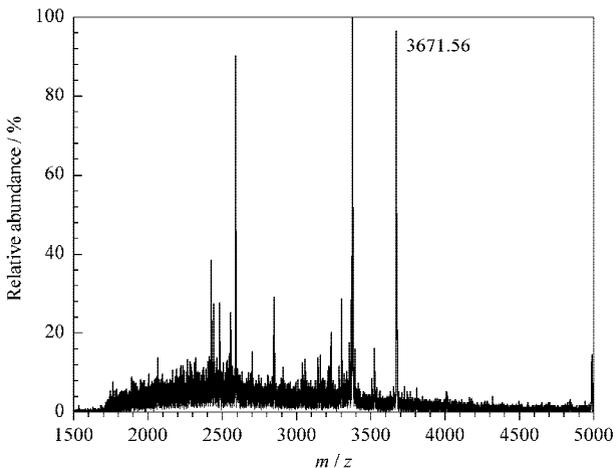


图 6 胰蛋白酶酶解 HRP 的肽质量指纹谱图

Fig. 6 Peptide mass fingerprinting spectrum of HRP digested with trypsin

表 1 采用提肽液 1 和提肽液 2 提取的糖肽的质谱最大峰强度的比较
 Table 1 Comparison of the largest peak intensities of the glycopeptide m/z (3 671 ± 1) in mass spectra using extractions 1 and 2

Amount of HRP/ μg	Extraction solution 1	Extraction solution 2
5.0	135	434
1.0	127	313
0.50	57	126
0.25	28	76
0.10	73	14
0.05	30	13

Extraction solution 1 : 50% acetonitrile-5% trifluoroacetic acid ; extraction solution 2 : 5% trifluoroacetic acid.

表 2 采用提肽液 1 和提肽液 2 提取的糖肽的质谱相对峰强度(糖肽峰强/最高峰强)的比较
 Table 2 Comparison of the relative intensities of the peaks (glycopeptide intensity/largest peak intensity) in the mass spectra using extraction solutions 1 and 2

Amount of HRP/ μg	Extraction solution 1	Extraction solution 2
5.0	0.2963	0.4654
1.0	0.4409	0.1150
0.50	0.4750	0.9604
0.25	0.6428	0.1053
0.10	0.6849	0.7000
0.05	1	0.4385

The glycopeptide is m/z (3 671 ± 1). Extraction solutions are the same as in Table 1.

从表 1 和表 2 可以发现对于量比较大的蛋白质 (0.25 ~ 5 μg),使用不含乙腈的提肽液有利于对糖肽信号的检出。而对于量少的蛋白质(低于 0.25 μg),用含有乙腈和三氟乙酸的提肽液更有利于增强糖肽的信号强度。而通常富集出来的有意义的天然蛋白质质量都是很少的。这意味着对于天然蛋白质采用含有乙腈和三氟乙酸的提肽液更合适。

在噪声方面,一般是采用提肽液 2 得到的样品的噪声会高于提肽液 1(图略)。

2.3 MALDI-QIT-MS 条件的选择

2.3.1 基质的选择

对比了两种基质(50% 乙腈-0.1% 三氟乙酸-12.5 mg/mL DHB 和 20% 乙腈-0.1% 三氟乙酸-12.5 mg/mL DHB)对质谱效果的影响,其他条件相同。对比了几组实验数据,发现基质中 50%和 20%的乙腈对质谱效果的影响不是很明显(数据略)。

2.2.3 点样方式的影响

对比了基质-样品、基质-样品-基质点样方式的影响,其他操作条件相同。后者的质谱效果优于前者(见图 7)。从图 7 可以清晰地看到糖肽峰相对强度明显增强,同时最大强度也有明显增强(前者为 3.1 mV,后者为 410 mV)。这可能是由于最后覆盖的一层基质有利于样品-基质的重结晶,使基质更好

地传递能量,提高样品的离子化效率。样品一般在干燥仪中干燥或真空下干燥。真空干燥更有利于结晶均匀。

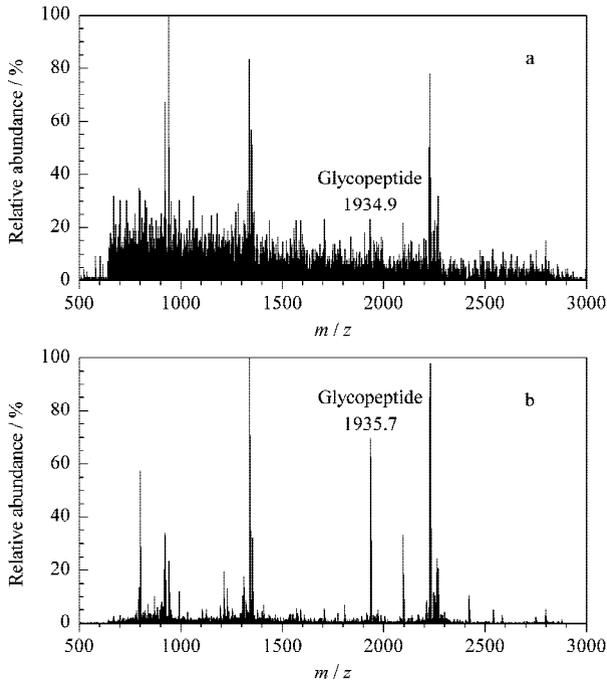


图 7 RNase B 溶液酶解点样方式的质谱效果对比

Fig. 7 The mass spectra of RNase B with different spotting methods

- a. general spotting method, the largest intensity, 3.1 mV;
b. the sandwich spotting method, the largest intensity, 410 mV.

3 结论

通过实验建立了简单易行的、不经糖肽富集标记的糖蛋白溶液酶解-质谱结构分析和胶上酶解-质谱结构分析的技术路线,并对质谱分析前的样品前处理条件进行了探索。按本文建立的流程对糖蛋白进行处理得到了良好的质谱结果。

参考文献:

- [1] Helenius A, Aebi M. *Science*, 2001, 291(5 512): 2 364
- [2] Rudd P M, Elliott T, Cresswell P, Wilson I A, Owek R A. *Science*, 2001, 291(5 512): 2 370
- [3] Wells L, Vosseller K, Hart G W. *Science*, 2001, 291(5 512): 2 376
- [4] Durand G, Seta N. *Clin Chem*, 2000, 46 : 795
- [5] Spiro R G. *Glycobiology*, 2002, 12(4): 43R
- [6] Freeze H H. *Glycobiology*, 2001, 11(12): 129R
- [7] Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1 572 : 232
- [8] Rempel B P, Winter H C, Goldstein I J, Hindsquall O. *Glycoconjugate J*, 2003, 19 : 175
- [9] Sun Q L, Liu Y K, Lu W J, Cheng G, Zhou H J, Zhou X W, Wei L M, Dai Z, Guo K, Lu H J. *Science in China : Series C* (孙强玲, 刘银坤, 卢雯静, 程钢, 周海君, 周信文, 魏黎明, 代哲, 郭坤, 陆皓杰. *中国科学 : C 辑*), 2006, 36(6): 543
- [10] An H J, Peavy T R, Hedrick J L, Lebrilla C B. *Anal Chem*, 2003, 75, 5 628
- [11] Takemori N, Komori N, Natsumoto H. *Electrophoresis*, 2006, 27 : 1 394
- [12] Bykova N V, Rampitsch C, Krokhin O, Standing K G, Ens W. *Anal Chem*, 2006, 78 : 1 093
- [13] Imre T, Schlosser G, Pocsfalui G, Siciliano R, Molnar-Szollosi E, Kremmer T, Malorni A, Vekey K. *J Mass Spectrom*, 2005, 40 : 1 472
- [14] Bunkenborg J, Pilch B J, Podtelejnikov A V, Wisniewski J R. *Proteomics*, 2004, 4 : 454
- [15] Ghesquiere B, van Damme J, Martens L, Vandekerckhove J, Gevaert K. *J Proteome Res*, 2006, 5 : 2 438
- [16] Harazono A, Kawasaki N, Itoh S, Hashii N, Ishii-Wotabe A, Kawanishi T, Hayakawa T. *Anal Biochem*, 2006, 348 : 259
- [17] Martin R L, Brancia F L. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17 : 1 358
- [18] Chen W, Lee P J, Stapels M, Gekler J C. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20 : 313
- [19] Nettleship J E, Aplin R, Aricescu A R, Evans E J, Dowis S J, Crispin M, Dwens R J. *Anal Biochem*, 2007, 361 : 149