

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.23.026

蛋白质多肽酶解及分离新技术的改进

刘宝阳¹, 张 磊², 范志娟², 田亚琼², 刘树业^{2△}

(1. 天津市宝坻区人民医院检验科/天津医科大学宝坻临床学院, 天津 301800;

2. 天津市第三中心医院检验科 300170)

摘 要:目的 探讨新型蛋白质多肽酶解和分离技术, 以提高蛋白质的质谱鉴定水平, 使其适用于更复杂生物样品, 从而弥补传统蛋白质组学利用的二维电泳-质谱技术所产生的不足。方法 利用美国 promega 和自主修饰 Self-owned 胰蛋白酶, 酶解浓度不同的牛血清清蛋白测定总离子流图(TIC)并通过 Proteome Discoverer 软件进行数据分析, 测定牛血清清蛋白覆盖率。利用 Self-owned 胰蛋白酶酶解牛血清清蛋白, 其中酶切液用自制的二维一体毛细管色谱柱进行分离, 通过高效液相色谱与质谱技术平台, 通过对 TIC、信号强度和保留时间(RT), 观察毛细管色谱柱分离性能和重复性。结果 美国 promega 和 Self-owned 胰蛋白酶酶解浓度不同的牛血清清蛋白结果显示, Self-owned 胰蛋白酶在高效液相色谱与质谱技术鉴定高、中、低浓度牛血清清蛋白覆盖率分别为 38.22%、28.34%、13.18%; 而美国 promega 胰蛋白酶酶解牛血清清蛋白覆盖率分别为 34.93%、26.36%、10.21%。Self-owned 胰蛋白酶和自制的二维一体毛细管色谱柱联用, 用于牛血清清蛋白分析, 通过质谱分析, 结果显示, 在极低浓度条件下, 牛血清清蛋白的覆盖率是 24.22%。在相同的实验条件下重复进行两次实验, 观察自制的二维一体毛细管色谱柱的重复性, 结果显示选用牛血清清蛋白酶切的肽段混合物中质荷比(m/z)740.4 为强度较高的特征肽段, 两次的 RT 是 51.90、51.95 min, 信号强度是 6.77×10^5 、 7.42×10^5 。结论 Self-owned 胰蛋白酶拥有高催化活性, 自制的二维一体毛细管色谱柱具有较高的分离性能和重复性, 将两者联合应用于蛋白质组学技术中, 可以显著增高蛋白质数量的检出率。

关键词:蛋白质组学; 胰蛋白酶; 二维一体毛细管色谱柱**中图法分类号:**R446**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2018)23-3570-03

Improvement of enzymolysis and separation technology in protein

LIU Baoyang¹, ZHANG Lei², FAN Zhijuan², TIAN Yaqiong², LIU Shuye^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Baodi Hospital/Baodi Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 301800, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China)

Abstract: Objective To discuss enzymolysis and separation technology in protein, so as to improve the level of proteins identified by mass spectrometry. **Methods** With Promega and Self-owned trypsin digestion of different concentrations of bull serum albumin (BSA), total ion chromatogram (TIC) were measured. And by Proteome Discoverer software, data processing was analyzed to measure BSA coverage rate. Digested with Self-owned trypsin BSA, two-dimensional liquid enzyme used in this study prepared in one of the capillary column was separated by high performance liquid chromatography and mass spectrometry (nanoHPLC-MS) technology platform. And its capillary column separation performance and reproducibility were measured through TIC, retention time (RT) and signal strength. **Results** With promega and Self-owned trypsin digestion of different concentrations of BSA, high, medium and low concentrations of BSA coverage rates identified by nanoHPLC-MS technique were 38.22%, 28.34% and 13.18%, while, which identified by Promega tryptic were 34.93%, 26.36% and 10.21%. Under the condition of the Self-owned trypsin combined with one-dimensional capillary column for the identification of BSA, and by LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer, identification BSA coverage rate was 24.22%, which was at very low concentrations. Under the same experimental conditions, one-dimensional capillary column reproducibility was observed. Mixture of mass-to-charge ratio(m/z) of 740.4 peptides, twice RT of BSA peptides were 51.90 min and 51.95 min, and signal strength were 6.77×10^5 and 7.42×10^5 respectively. **Conclusion** Self-owned trypsin shows a high catalytic activity, and one-dimensional capillary column has a better separation performance and reproducibility. Combined detection of these two methods in the proteome could improve the detection rate of amount of proteins.

Key words: proteomics; trypsin; two-dimensional capillary chromatographic column

蛋白质组是指“由一个细胞或一个组织的基因组所表达的全部蛋白质”^[1]。蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象,分析细胞内的蛋白质组成成分和表达水平,进一步认识生命活动规律。蛋白质组学分析不仅是一种方法学,而是各种分离技术、鉴定技术、生物信息学技术的有机整合。因此如何提高分离技术,是进行蛋白质组学研究的重要环节。本研究将 Self-owned 胰蛋白酶、强阳离子交换与反相 C18 二维一体毛细管色谱柱联合用于蛋白质组学技术中,旨在探讨其在蛋白质组分析和表达方面的优势,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 选择不同浓度的牛血清清蛋白(BSA),分为高浓度(6.5 μg/mL)、中浓度(6.5 × 10⁻³ μg/mL)、低浓度(6.5 × 10⁻⁶ μg/mL)及极低浓度(6.5 × 10⁻⁸ μg/mL)。

1.2 实验仪器 纳升级高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);LTQ-Orbitrap XL 质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);强阳离子交换与 C18 反相二维一体毛细管色谱柱(北京谱之源公司)。

1.3 方法 分别用 Promega 和自主修饰的 Self-owned 的胰蛋白酶酶解不同浓度的 BSA,观察其不同胰蛋白酶的酶解效能。采用强阳离子交换与反相 C18 二维一体毛细管色谱柱,将不同分离模式的色谱柱以串联方式合并于同一色谱柱中,即在同一色谱柱的前部分填装强阳离子色谱材料,后部分填装 C18 反相液相色谱材料。将所制备的二维一体毛细管色谱柱用于分离标准 BSA 提取液的分离分析,并以峰容量、BSA 鉴定的覆盖率及信号强度作为特征参数,观察其色谱柱的性能差异,评价二维一体毛细管色谱柱的柱能。

2 结 果

2.1 Self-owned 自主修饰胰蛋白酶的性能

2.1.1 高活性 经过修饰的高活性、稳定的分子,无自催化作用,减少自水解产生多余肽段。4 种不同型号的胰蛋白酶(tryp_auto 为国产任一品牌,Pro_10 为美国 Promega 公司生产,HLS_10 及 HLS_5 均为自修饰)无论从蛋白鉴定种类及不同胰酶间鉴定结果相互覆盖的角度,自主修饰的胰蛋白酶酶解效能均好于其他种类胰酶。见图 1。

2.1.2 不自残 经 L-1(对-甲苯磺酰)苯丙胺酰氯甲酮(TPCK)处理,灭活了残留的胰凝乳蛋白酶活性。

2.1.3 高纯度 经多次色谱系统纯化纯度达到最优,其自主修饰 Self-owned 的胰蛋白酶的杂峰远少于 Promega 胰蛋白酶。

2.2 nanoHPLC-MS 技术平台 利用 1D 分离技术获取由自主修饰 Self-owned 与 Promega 胰蛋白酶酶

解不同浓度 BSA 的总离子流图(TIC)。高、中浓度 BSA 经酶解后的 TIC,其两种酶效能持平,具有较好的重复性;在低浓度的 BSA 中发现自主修饰 Self-owned 胰蛋白酶的检出信号要优于 Promega 胰蛋白酶。

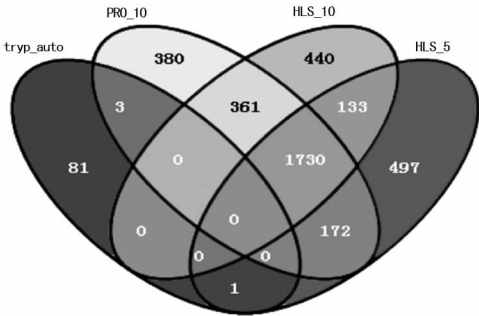


图 1 不同种类胰蛋白酶酶解效能统计图

2.3 鉴定不同浓度 BSA 的覆盖率 利用 Proteome Discoverer 软件分析经胰蛋白酶酶解后不同浓度 BSA 的覆盖率,其经自主修饰 Self-owned 胰蛋白酶酶解的 BSA 的覆盖率略高于 Promega 胰蛋白酶。见表 1。

表 1 不同浓度 BSA 的覆盖率(%)		
BSA 浓度	Self-owned 胰蛋白酶	Promega 胰蛋白酶
高浓度	38.20	34.93
中浓度	28.34	26.36
低浓度	13.18	10.21

2.4 不同胰蛋白酶酶解不同浓度 BSA 的覆盖率 用二维一体毛细管色谱柱将不同胰蛋白酶酶解不同浓度 BSA 酶切液进行分离,即在完全相同的实验条件下,实验结果表明将自主修饰 Self-owned 胰蛋白酶与二维一体毛细管色谱柱整合后,其分离效果更好,具有较高的灵敏度,特别是在上样量极低的情况下。见表 2。

表 2 不同胰蛋白酶酶解不同浓度 BSA 的覆盖率(%)		
BSA 浓度	自主修饰 Self-owned 胰蛋白酶	Promega 胰蛋白酶
中浓度	43.33	30.31
极低浓度	24.22	7.91

表 3 二维一体毛细管色谱柱的重复性		
重复次数	RT(min)	AH(×10 ⁵)
第 1 次	51.90	6.77
第 2 次	51.95	7.42

2.5 二维一体毛细管色谱柱的重复性 分别依照完全相同的分离条件,分析经自主修饰 Self-owned 胰蛋

白酶酶解的 BSA 酶切液,重复做两次,选取 BSA 酶切的肽段混合物中相应强度较高的质荷比(m/z)740.4 为特征肽段,分别记录其保留时间(RT)及信号强度(AH),作为考察色谱柱重复性的指标,结果显示所制备的二维一体毛细管色谱柱具有良好的重复性。见表 3。

3 讨 论

蛋白质组研究的关键技术包括蛋白质分离、鉴定及蛋白质数据库匹配。传统的蛋白质组研究方法是 将二维凝胶电泳技术和质谱技术联合起来^[2-3]。其中蛋白质分离技术包括双向电泳和色谱技术,双向电泳操作简便、快速但也存在诸多缺点,例如拷贝数较低的蛋白质不容易检测、过大或过小的蛋白质分子不容易分离和手工操作不稳定等^[4]。由于双向电泳技术存在的缺陷,科研中需要升级和探索更好的蛋白质分离和鉴定技术。因此越来越多的高效分离技术,如高效液相色谱和毛细管电泳等应用于蛋白质组学研究中^[5]。

胰蛋白酶作为蛋白质组学研究的一部分,其高效和完整的蛋白水解在蛋白质组研究中非常重要^[6]。胰蛋白酶主要由猪或牛胰脏中获取,但胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶均从胰脏制备,通常不容易完全分开,专一性不好。但经对甲苯磺酰氯甲烷(TCPK)修饰后的胰蛋白酶,可以抑制残留的胰凝乳蛋白酶活性提高纯度^[7]。本研究所用的 Self-owned 胰蛋白酶灭活了残留的胰凝乳蛋白酶活性,减少自消化,提高了酶的纯度和催化活性,其充分的酶解更有利于分离技术的提高。蛋白质组研究的关键技术之一就是高效分离,这也是蛋白质组学研究中需要继续追寻的目标^[8]。基于液相色谱-质谱联用的蛋白质组研究分析方法中,大多采用的是毛细管液相色谱分离系统,为此目前研究的关键技术就在于毛细管色谱柱的选择和制备^[9-10]。本研究中自制的二维一体毛细管色谱柱,可以消除键合缺陷造成的样品污染并具有超高分辨率和重复性,目的是有效提高蛋白质组鉴定覆盖率和蛋白质鉴定序列覆盖率。结果表明自制二维一体毛细管色谱柱,具有较高的稳定性和重复性,可以高效分离。

蛋白质组学的研究需要高效分离、高灵敏度、高通量和动态范围宽的分析技术平台。本研究首先利用 Self-owned 胰蛋白酶酶解 BSA,结果证明其酶解效能良好,再利用自制二维一体毛细管色谱柱分离 BSA 观察柱效,经过比较结果表明自制二维一体毛细管色谱柱具有超高分辨率和重复性。

综上所述,将 Self-owned 胰蛋白酶和自制二维一体毛细管色谱柱联合用于蛋白质组学技术中,可以显著增加蛋白质数量的检出率,有助于蛋白质组学的研究,利于大规模高通量蛋白质分析和鉴定。

参考文献

- [1] CAI Z, CHIU J F, HE Q Y, et al. Application of proteomics in the study of tumor metastasis[J]. *Geno Prot Bioinfo*, 2004, 2(3):152-166.
- [2] LEE N P, CHEN L, LIN M C, et al. Proteomic expression signature distinguishes cancerous and nonmalignant tissues in hepatocellular carcinoma[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(3):1293-1303.
- [3] LI N, LONG Y, FAN X, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma tissues[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28(1):122.
- [4] 尹子卉, 吴世容, 李声时, 等. 生物大分子的分析方法——2002 年诺贝尔化学奖简介[J]. *自然杂志*, 2002, 24(6):361-366.
- [5] TAN B C, LIM Y S, LAU S E. Proteomics in commercial crops: An overview[J]. *J Proteomics*, 2017, 169:176-188.
- [6] FAN C, SHI Z, PAN Y, et al. Dual matrix-based immobilized trypsin for complementary proteolytic digestion and fast proteomics analysis with higher protein sequence coverage[J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(4):1930-1937.
- [7] PIOVESANA S, CAPRIOTTI A L, CAVALIERE C, et al. New Magnetic Graphitized Carbon Black TiO₂ Composite for Phosphopeptide Selective Enrichment in Shotgun Phosphoproteomics[J]. *Anal Chem*, 2016, 88(24):12043-12050.
- [8] WASHBURN M P, WOLTERS D, YATES J R, et al. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(3):242-247.
- [9] CAPRIOTTI A L, CAVALIERE C, CAVAZZINI A, et al. A multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry platform to improve protein identification in high-throughput shotgun proteomics[J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1498:176-182.
- [10] GU X, DENG C, YAN G, et al. Capillary array reversed-phase liquid chromatography-based multidimensional separation system coupled with MALDI-TOF-TOF-MS detection for high-throughput proteome analysis[J]. *J Proteome Res*, 2006, 5(11):3186-3196.

(收稿日期:2018-04-22 修回日期:2018-07-06)