

基于质谱的蛋白质深度定性定量分析的策略

应用化学 金正千 1951815

摘要: 本文主要介绍了基于质谱的蛋白质深度定性定量分析的策略,详细阐述了如何鉴定氨基酸序列、修饰及修饰位点,简述了3种标记定量方法的基本原理及标记流程,还有复杂样本深度分析的策略。

关键词: 蛋白质; 质谱分析; 定量分析; 定性分析

Strategies for in-depth, qualitative and quantitative analysis of protein based on mass spectrometry

JIN Zheng-Qian

(College of Chemistry and Engineering ,Tongji University ,Shanghai ,China)

Abstract: This paper mainly introduces the strategy of protein depth qualitative and quantitative analysis based on mass spectrometry, expounds in detail how to identify amino acid sequences, modifications and modification sites, and briefly describes the basic principles and labeling processes of three labeling quantitative methods, as well as the strategy of depth analysis of complex samples.

Keywords: Protein; Mass spectrometry analysis; Quantitative analysis; Qualitative analysis

1. 定性分析: 氨基酸序列、修饰及修饰位点是如何被鉴定的?

蛋白质的鉴定可以通过其特有肽段的序列来识别,质谱(MS)其扫描速度、灵敏度和分析复杂混合物的能力是一种非常合适分析蛋白质的技术,其基本原理是通过蛋白质被胰蛋白酶解,然后用液相色谱(LC)的方法对酶解的肽段进行分离,基质辅助激光电离(MALDI)和电喷雾电离(ESI)是常用的对分离肽段离子的检测的方式,然后肽段离子在液相色谱的电离和洗脱,在质谱仪中确定其分子量,质谱仪会进一步分析其碎片的组成,串联质谱识别它特定的氨基酸序列,再通过蛋白数据库及软件的分析后,就可以得到蛋白的定性和定量的结果。质谱分析的样品制备:用限制性内切酶如胰蛋白酶把蛋白质或裂解液消化成小分子多肽片段。然后蒸发和分析这些多肽片段,以确定其 m/z 值。由于酶切位点是已知的,所以就可以用计算机程序,根据质量确定每个肽段的特定氨基酸序列。质谱可用于多肽和蛋白质的分子量测定,多肽氨基酸序列的确定,和翻译后修饰的检测,以及多肽和蛋白质的相对定量。这种方法不能用于绝对定量。

质谱同时是鉴定蛋白质翻译后修饰的重要方法,其原理是利用蛋白质发生修饰后的质量偏移来实现翻译后修饰位点的鉴定;同时,由于翻译后修饰的蛋白质在样本中含量低且动态范围广,检测前需要对发生修饰的蛋白质或肽段进行富集,然后再进行质谱鉴定。

2. 定量分析: 3种标记定量方法的基本原理及标记流程

①TMT 采用了6标(TMTsixplex™ Isobaric Label Reagent Set)、10标(TMT10plex™ Isobaric Label Reagent Set)、16标(TMTpro 16plex)同位素标签,通过与肽段特异氨基酸位点相连实现不同来源的肽段标记,然后进行串联质谱分析,监测碎裂下来的标签实现肽段定量。TMT 实验中,经过蛋白质提取获得组织细胞中的全蛋白,全蛋白在胰酶作用下被酶解成肽段,TMT 试剂对所获得的全部肽段进行标记。TMT 标签试剂通过肽反应基团与肽段上赖氨酸及N端氨基酸残基相连。被标记肽段经过色谱分离后直接进入串联质谱仪中进行定性及定量检测。一级质谱中,任何一种 TMT 试剂标记的不同样品中的同一肽段表现出相同的质荷比;二级质谱中,报告基团、平衡基团、连接基团之间的化学键断裂释放出 TMT 报告基团和平衡基团。平衡基团发生中性丢失,报告基团被质谱仪检测并记录,在质谱低质量区产生了10个TMT报告离子峰,其强度反应了该肽段在不同样品中的相对表达量信息,另外二级质谱中的肽段碎片离子峰质荷比反应了该肽段的序列信息;这些质谱原始数据经过数据库检索,可得到蛋白质的定性和相对定量信息。

②iTRAQ:采用4种或8种同位素的标签,通过特异性标记多肽的氨基基团,然后进行串联质谱分析。iTRAQ试剂是由3个化学基团组成,分别是反应基团、报告基团和平衡基团。反应基团特

异与肽段的氨基(肽段的 N 端、赖氨酸的氨基)发生结合反应, 报告基团的质量数是不同的, 加上相应的平衡基团后, 保持 iTRAQ 试剂总的质量数固定, 同时保证不同标记的肽段在色谱中的保留时间相同。由于是等质量的, 被不同标记的肽段在一级图谱中表现为一个母离子峰, 进一步碎裂时, 平衡基团发生中性丢失, 报告基团则会产生相应的不同质量数的报告离子, 比较报告离子的丰度值, 可以得到样本的相对丰度比^[1]。

③SILAC: 细胞培养基中加入轻、中或重型稳定同位素标记的必需氨基酸赖氨酸(Lys)和精氨酸(Arg), 在细胞生长过程中使新合成的蛋白会带上稳定同位素标签。等量混合各类型蛋白质, 酶解后进行质谱分析。通过比较一级质谱图中不带标记/带同位素标记质谱峰型的面积大小进行相对定量, 同时二级谱图对肽段进行序列测定从而进行蛋白鉴定。

3. 深度分析: 复杂样本深度分析的策略有哪些? (从样本制备、色谱分离以及质谱分析等三个步骤论述哪些措施可以帮助超低丰度成分的检测)

3.1 复杂样本深度分析的策略有 bottom-up、top-down、middle-down。

自下而上(bottom-up)和自上而下(top-down)是两种基于生物质质谱分析的蛋白质组学方法。自下而上法, 也称为鸟枪法(shotgun), 是蛋白质组学研究中广泛使用的质谱技术, 自下而上法是将大蛋白片段水解/酶解为肽段, 然后进行分析的传统方法。自上而下直接对完整的蛋白质进行分析, 包括翻译后修饰蛋白质和其他大片段蛋白质, 而不仅仅是肽段。中间向下策略分析由有限消化或更具选择性的蛋白酶产生的更大的肽^[2]。

3.2

①样本制备: 具体针对不同对象有各种各样的材料来特异性的富集某一种或者一类的肽段。纳米材料富集低丰度蛋白/多肽, 并一步除盐或者纳米沸石富集磷酸肽。另外使用 AFA 聚焦超声技术处理的细胞可以在一管内完成还原、烷基化及酶解, 所得肽段溶液可以直接进行质谱上样, 无需脱盐处理, 减少样品损失的同时大大缩短实验时间。但其在富集的过程中由于选择性的问题, 容易引入其他的蛋白, 影响目标低丰度蛋白的鉴定。

②色谱分离: 蛋白混合物经过两次或两次以上的分离, 再酶解为肽段用液质联用技术检测。使用多维液相色谱系统即蛋白水平的二维分离与 RPLC-MS/MS 的结合, 蛋白/肽段的总分离维数达到了三维。甚至在此基础上加入在 SCX 上用 pH 梯度洗脱蛋白的单维分离, 将分离维数升高至四维。多维液相色谱分离也可与其他分离技术结合使用, 增加分离能力^[3]。通过构建多维色谱, 极大地提高分离能力; 随着分离系统的维数增多, 样品能进一步得到简化, 增加了质谱的检测效率。还可以使用液滴在微流控芯片上实现液相色谱分离蛋白或者肽段后在线浓缩富集^[4,5]。

③质谱分析: 更换具有的高分辨、高灵敏度和高可靠性的质谱分析仪。或者通过改善测量时的真空环境, 减少离子与管道内残存气体碰撞概率; 使用选择性高灵敏度检测器; 降低仪器系统噪声; 优化实验条件, 对于某一特定的分析方法, 必然有一些实验条件影响待测组分的分析测定。只有在最优化的实验条件下, 该分析方法的灵敏度才会最高。

参考文献

- [1]徐红波. (2012). 基于 iTRAQ 技术筛选抑郁症相关血浆蛋白和氨基酸的初步研究 (Doctoral dissertation, 重庆: 重庆医科大学).
- [2] Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. Chem Rev. 2013; 113(4): 2343-94.
- [3]高明霞, 王轩堂, & 张祥民. (2002). 多维液相色谱分离分析蛋白质复合物的新方法研究. mass spectrometry, 415, 183.
- [4]聂磊. (2013). 生物质谱分析的若干微纳新技术研究 (Doctoral dissertation, 复旦大学).
- [5]徐溢, 申纪伟, 陆嘉莉, & 温志渝. (2008). 蛋白质/多肽的微流控二维芯片电泳. 化学进展, 20(05), 754.