

MALDI-TOF 快速准确分析蛋白质 C-末端氨基酸序列

摘要: 本文使用LysC酶解蛋白样品,以TMPP-Ac-OSu对酶解产物进行衍生化修饰,并用DITC树脂进行分离后,以岛津AXIMA Performance检测确定了蛋白C-末端氨基酸序列。

关键词: MALDI C-末端 LysC TMPP DITC

通过肽质量指纹图谱识别蛋白需要将蛋白酶解后,使用质谱来分析酶解产物,然后检索数据库来确认得到的序列片段。然而,通过检索数据库来确定 N-和 C-末端序列却并不容易。原因在于: 1) 处理和翻译后修饰经常导致蛋白质 N-和 C-末端结构发生变化; 2) 离子抑制效应的存在导致部分蛋白序列不可测定。

蛋白 N-末端氨基酸序列可以使用蛋白测序仪(PPSQ-31A/33A)或者蛋白 N-末端测序组件(ORFinder-NB™)来检测。然而,对 C-末端结构来说,检测技术的需求使得蛋白末端氨基酸序列分析变得比以往更为重要。这里以包含有特征 C-末端蛋白的样品为例,介绍一种全新的、以质谱分析氨基酸序列的成功例子。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津AXIMA Performance

1.2 实验步骤

1) 以赖氨酰肽链内切酶(LysC)消解目标蛋白,除了来自于蛋白C-末端的氨基酸,其余都被转化为赖氨酸;

2) 酶解产物与琥珀酰亚胺基[三(2,4,6-三甲氧苯基)磷基]溴乙酸酯(TMPP-Ac-OSu)反应,氨基酸基团选择性的被TMPP-Ac基团修饰;

3) 反应后的产物加入到聚对苯二异硫氰酸酯树脂中(DITC树脂或玻璃),所有ε氨基基团侧链为赖氨酸的肽均被DITC树脂富集,不含自由氨基酸基团的蛋白C-末端多肽则不被富集;

4) 使用MS/MS检测分离出的蛋白C-末端肽链,只有包含有带强正电TMPP的碎片离子可以在质谱图上显示。通过比较不同碎片离子间质量数的不同,并通过基因序列来预测末端氨基酸序列,可以确定蛋白C-末端氨基酸序列。

实验步骤具体流程如图1所示。

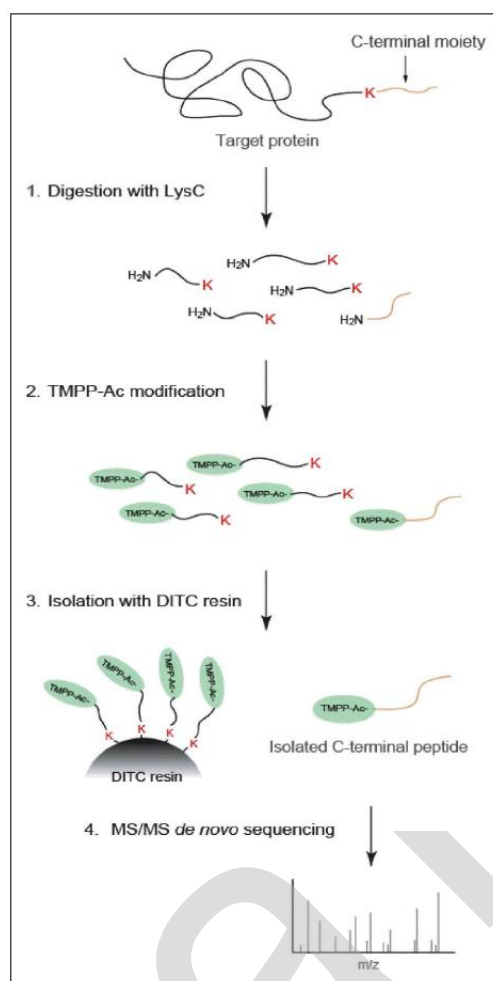


图1 质谱分析蛋白C-末端结构流程图

2. 结果与讨论

2.1 PfuRPA的MALDI质谱图

图2是包含有3种子单元的蛋白重组混合物PfuRPA（样品以LysC消解并以TMPP-Ac衍生修饰后产物）的MALDI-MS谱图。RPA14, RPA32和RPA42这三种由酶解肽段衍生得来的子单元在质谱图上均有显示，但是与C-末端肽段相连的RPA14和RPA32几乎没有显示。

2.2 DITC树脂分离后的C-末端肽段MALDI质谱图

图3显示的是每种C-末端肽段经过LysC酶解，TMPP-Ac修饰和DITC树脂处理后得到的质谱图。所有源自内部序列肽段的衍生化反应产物均被DITC树脂富集，仅有源自于C-末端肽段可以被检测到并显示在质谱图上。

2.3 C-末端肽段氨基酸序列

对源自C-末端的肽段进行二级质谱分析，通过比较不同碎片离子间质量数的不同，并通过基因序列来预测末端氨基酸序列，可以确定每种子单元的C-末端氨基酸序列。图4显示的使用AXIMA Performance以高能CID（碰撞诱导解离）方法进行二级质谱分析得到的m/z 2504碎片峰的例子。

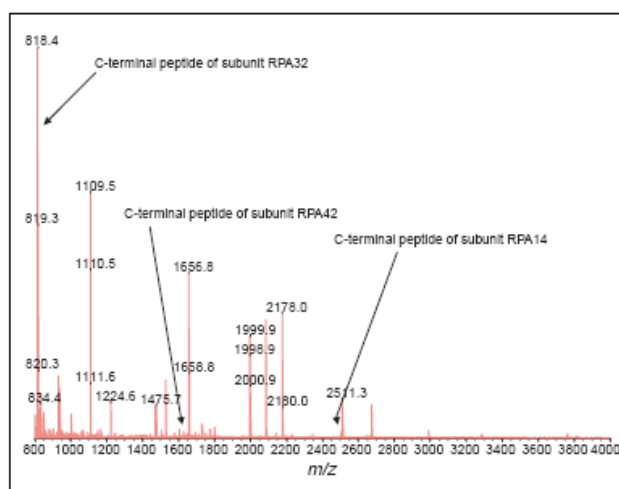


图 2 PfuRPA 蛋白混合物经 LysC 酶解并 TMPP 衍生产物的 MALDI-TOF 谱图

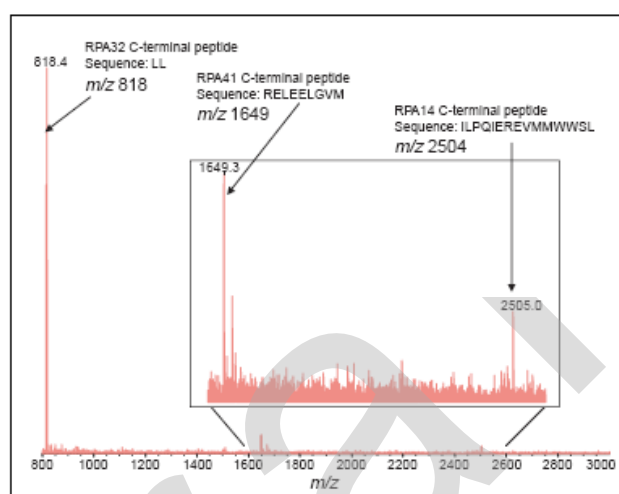


图 3 经 DITC 树脂分离后的三种 C-末端肽段 MALDI-TOF 谱图

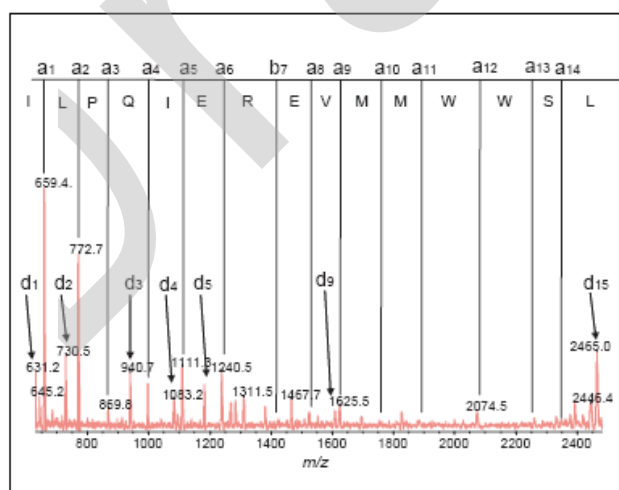


图 4 自 RPA14 分离所得 C-末端肽段的二级质谱图

3. 结论

本文使用 LysC 酶解蛋白样品，以 TMPP-Ac-OSu 对酶解产物进行衍生化修饰，并用 DITC 树脂进行分离后，以岛津 AXIMA Performance 检测确定了蛋白 C-末端氨基酸序列。