

AXIMA-CFR

基质辅助激光离子化飞行时间型质谱仪

应用文集 No. 2



多肽质谱指纹图 (Peptide Mass Fingerprint)

1. 要点
2. 大肠杆菌提取物的二维电泳
3. 凝胶上的蛋白或多肽斑点水解
4. AXIMA-CFR 分析
5. 数据库检索
6. 采用胰蛋白酶消解物进行质量校准
7. 蛋白质鉴定实例

1. 要点

近年来, 采用 MALDI-TOF MS 进行蛋白质分析, 大多数采用 PMF(Peptide Mass Fingerprinter)的方法进行, 即将蛋白质进行二维电泳分离, 采用在胶上进行酶消解后分析, 所获得的碎片离子的分子量信息对照数据库, 进行蛋白质的鉴定。本文将介绍使用 AXIMA-CFR 进行 PMF 分析。

2. 将大肠杆菌提取物进行二维电泳处理

图 1 显示了, 一个大肠杆菌提取物进行二维电泳的展开图, 将各个斑点切下, 用胰蛋白酶进行在凝胶上进行消解。

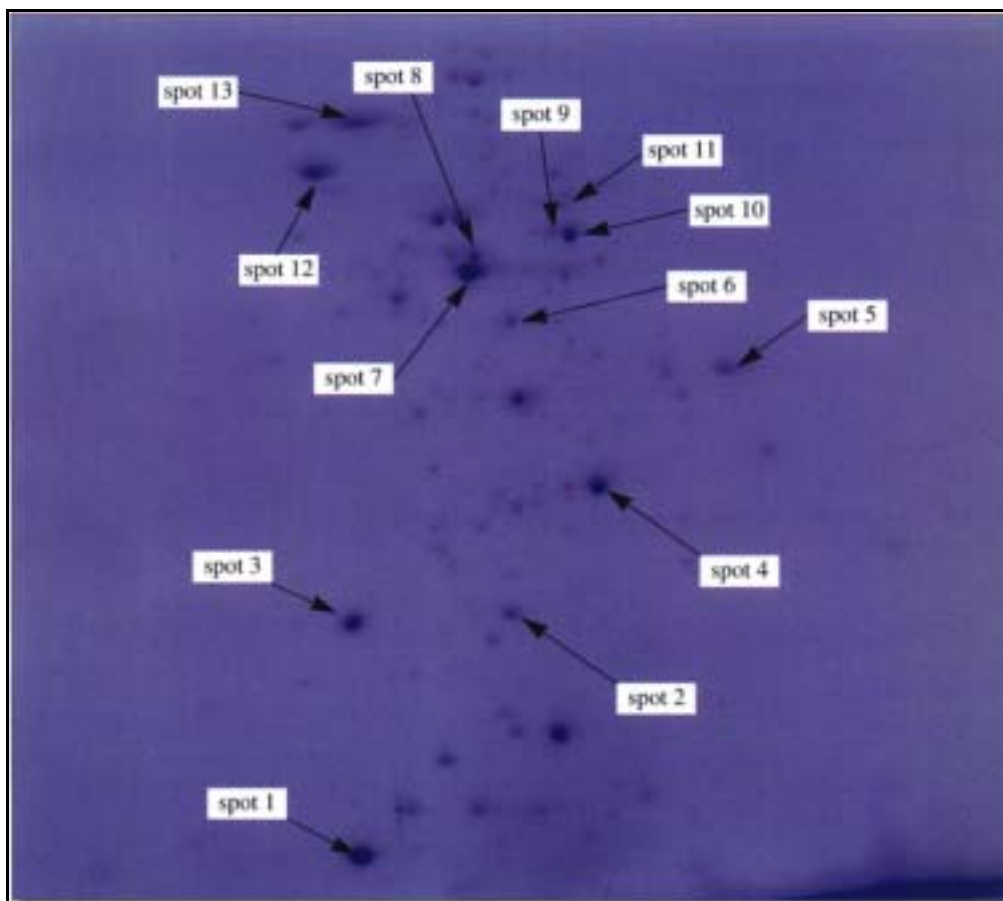


图 1: 大肠杆菌提取物进行二维电泳的展开图

3. 凝胶上的蛋白或多肽斑点的消解

在凝胶上的蛋白或多肽斑点的消解, 按照下面的步骤进行:

对凝胶进行脱水处理:

- 1) 将切下的点移入微型试管。
- 2) 加入 100 μ l 的乙腈 (室温下连续搅拌 10 分钟)
- 3) 除去溶剂
- 4) 对凝胶进行离心干燥

还原和烷基化:

- 5) 加入 100 μ l 的含有 10mM DTT 的 100mM NH_4HCO_3 溶液, 56 $^\circ\text{C}$ 下连续搅拌 1 小时
- 6) 将温度回落到室温
- 7) 除去溶剂
- 8) 加入 100 μ l 含有 55mM $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ 的 100mM NH_4HCO_3 溶液, 室温下连续搅拌 45 分钟

除去 DTT 和 $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$:

- 9) 除去溶剂
- 10) 加入 100 μl 的 100mM NH_4HCO_3 溶液, 室温下连续搅拌 10 分钟
- 11) 除去溶剂
- 12) 加入 100 μl 的乙腈, 室温下连续搅拌 10 分钟
- 13) 除去溶剂
- 14) 重复步骤第 10 ~ 13 步
- 15) 对凝胶进行离心干燥

消解 :

- 16) 冷却至 4
- 17) 加入 100 μl 的酶溶液, 即: 50 mM NH_4HCO_3 /5mM CaCl_2 /12.5ng 胰蛋白酶溶液
- 18) 在 4 下, 保持 45 分钟
- 19) 除去溶剂
- 20) 加入 10 μl 的 50 mM NH_4HCO_3 和 5mM CaCl_2 混合溶液
- 21) 在 37 下, 培养孵育 16 小时

萃取 :

- 22) 加入 100 μl 的 20 mM NH_4HCO_3 1 溶液, 在室温下连续搅拌 20 分钟
- 23) 回收溶液
- 24) 加入 5% 甲酸、50% 乙腈溶液各 100 μl , 在室温下连续搅拌 20 分钟
- 25) 回收溶液
- 26) 重复步骤第 24 ~ 25 步两次, 第二次进行超声波处理
- 27) 将回收的溶液进行离心干燥

4 . AXIMA-CFR 分析

将经过凝胶上酶消解的样品经 ZipTip C18 柱(Millipore)进行脱盐后, 就可以进行 MALDI-TOF MS 分析。基质中使用的 α -cyano-4-hydroxy-cinnamic 溶解于 0.1% 三氟乙酸和乙腈 混合液(1:1)的饱和溶液。分析时采用 AXIMA-CFR 的 Reflectron 分析方式进行, 质量校正采用了胰岛素 β 链和基质峰。图 2 中所表示的是图 1 中的 Spot 1 经凝胶上酶消解后, 在 AXIMA-CFR 上分析所获得的质谱图。带有“O”标记的峰的分子量将进行数据库检索。

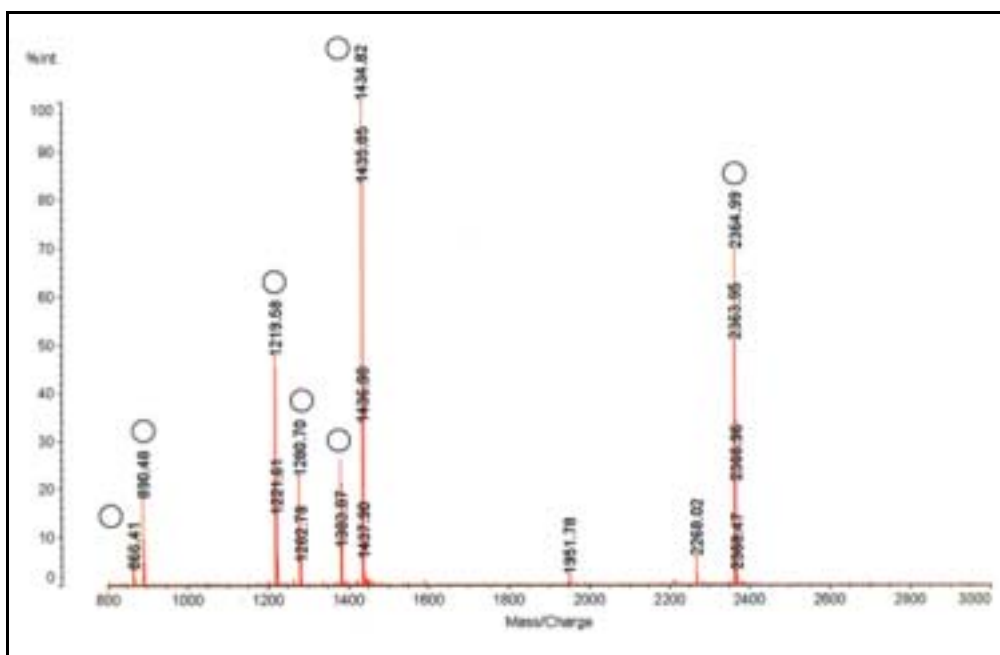


图 2 : 图 1 中的 Spot 1 在凝胶上酶消解后的质谱图

Mascot: Peptide Mass Fingerprint

Your name Email

Search title

Database

Taxonomy

Enzyme

Allow as in

Fixed modifications

Variable modifications

Protein mass

Peptide tol.

Mass values ☒ MH⁺ ☐ M

Monoisotopic ☐ Average ☐

Data file

Query

Overview ☐

Reset form

Start Search

Copyright © 2000 John Wiley Ltd. All Rights Reserved. Last Update: 11/06/00 11:00:00

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 57 are significant ($p < 0.05$).

Probability Based Mowse Score	Number of Hits
20	35
30	15
120	1

Protein Summary Report

To create a bookmark for this report, right click this link: [Protein Summary Report \(spot1\)](#)

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 485832	14332	121	14.3 KD PROTEIN IN SRB-UNG INTERGENIC REGION
2.	gi 11131724	23283	29	(A/251312) ribosomal protein subunit 4 [Leucocelis merziesii]
3.	gi 7184440	60234	29	(AE002211) CTP synthase [Chlamydomonas reinhardtii ATCC]
4.	gi 7019796	5173	29	(A/272190) putative Sex combs reduced [Pachymeris ferrugineus]
5.	gi 7225856	50779	28	(AE002418) peptide chain release factor 3 [Neisseria meningitidis MCS8]

Genosys Tech-Trading Co., Ltd.

表 1：Spot 1 的被认定的碎片

测定值[M+H] ⁺	理论值[M+H] ⁺	差	氨基酸残基	未消解部分	氨基酸序列
865.43	865.44	-0.01	49-55	0	LGDI EYR
890.50	890.51	-0.01	93-99	0	YPQLTIR
1219.59	1219.61	-0.02	107-116	0	FNSLTPEQQR
1280.72	1280.72	0.00	56-66	0	EVPVEVPEVR
1381.73	1381.76	-0.03	89-99	1	HPEKYPQLTIR
1434.76	1434.78	-0.02	67-79	0	VEGGQH LNVNVL R
2363.97	2364.15	-0.18	10-30	1	AANDDLLNSFWLLDSEKGEAR

6. 采用胰蛋白酶消解物进行质量校准

在进行酶消解时，胰蛋白酶(Porcine)也同时被消解，通过检测混合在样品消解物中的胰蛋白酶消解物碎片，来进行质量校准工作。表 2 列出了胰蛋白酶消解物的碎片。

表 2：胰蛋白酶消解物的碎片

理论值[M+H] ⁺	氨基酸残基	氨基酸序列
262.15	52-53	SR
515.33	54-57	IQVR
842.51	108-115	VATVSLPR
906.50	209-216	NKPGVYTK
1006.49	148-157	APVLSDS SCK
1045.56	98-107	LSSPATLNSR
1469.73	134-147	SSGSSYPSLLQCLK
2211.10	58-77	LGEHNIDVLEGNEQFINAAK
2283.18	78-97	IITHPNFNGNTLDNDIMLIK
3013.32	179-208	DSCQGD SGG ... SWGYGCAQK

在使用 MALDI-TOF MS 进行分析时，将这些自己消解物作为内标进行质量校正可以进行高精度的分析。图 5 表示了 Spot 10 的胰蛋白酶消解物在 AXIMA-CFR 分析获得的质谱图。

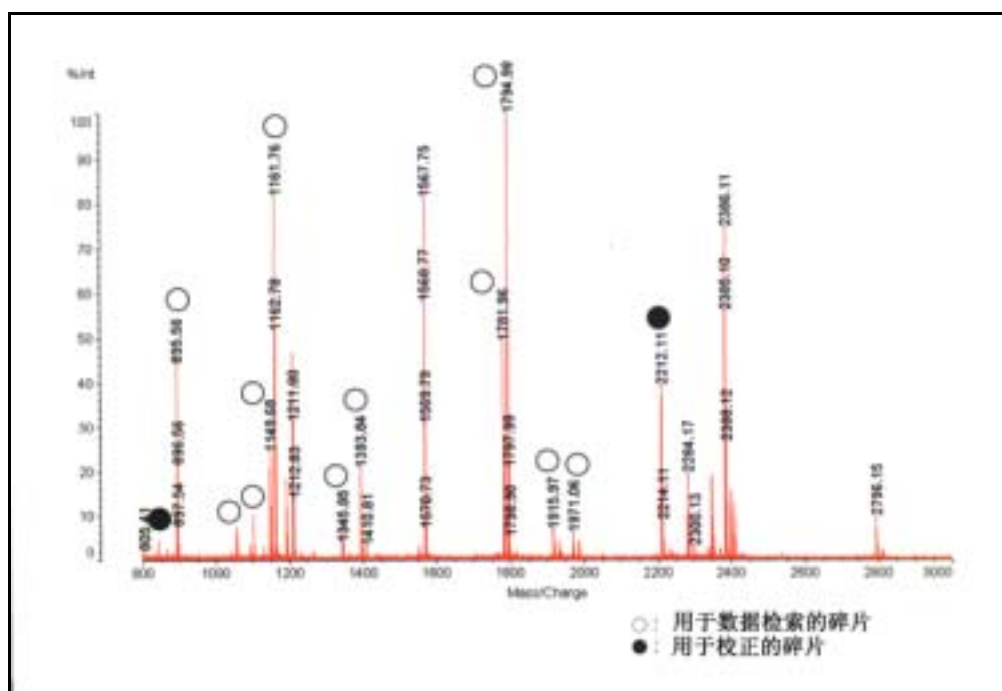


图 5：Spot 10 胰蛋白酶消解后的质谱图

图 6 表示了将图 5 分析结果进行检索的结果。在“Mascot”上，横坐标是检索的分数(Scores)，纵坐标是计数(Hit)的蛋白质数构成的图来表示。在检索结果图框外被计数的分数的蛋白质其被认定的确实性也高(有关分数，请参照“Mascot”的说明)。图 1 中的 Spot 1 以 132 分被认定为色氨酸酶(Tryptophanase)。在表 3 列出了被认定的碎片的测定值、理论值、误差、碎片的序列位置和其氨基酸序列。色氨酸酶的 11 个碎片被认定，占整个序列的 28%。

表 3：Spot 10 被鉴定的碎片

测定值[M+H] ⁺	理论值[M+H] ⁺	差	氨基酸残基	未消解部分	氨基酸序列
895.56	895.48	0.08	6-12	0	HLPEPFR
1055.62	1055.54	0.08	451-459	0	GLTFTYPEPK
1102.62	1102.56	0.06	231-239	0	FAENAYFIK
1149.68	1149.55	0.13	169-178	0	GNFDLEGLER
1161.76	1161.66	0.10	393-403	0	AVEIGSFLGR
1343.83	1343.79	0.04	104-115	0	GAEQIYIPVLIK
1393.84	1393.71	0.13	219-230	1	KYDIPVVMDSAR
1781.96	1781.87	0.09	242-255	1	EAEYKDWITIEQITR
1794.98	1794.89	0.09	80-103	0	NIFGYQYTIPTHQGR
1915.97	1915.93	0.04	425-440	0	ATYTQTHMDFIIEAFK
1970.03	1969.98	0.05	318-334	0	LAVGLYDGMNLDWLAYR

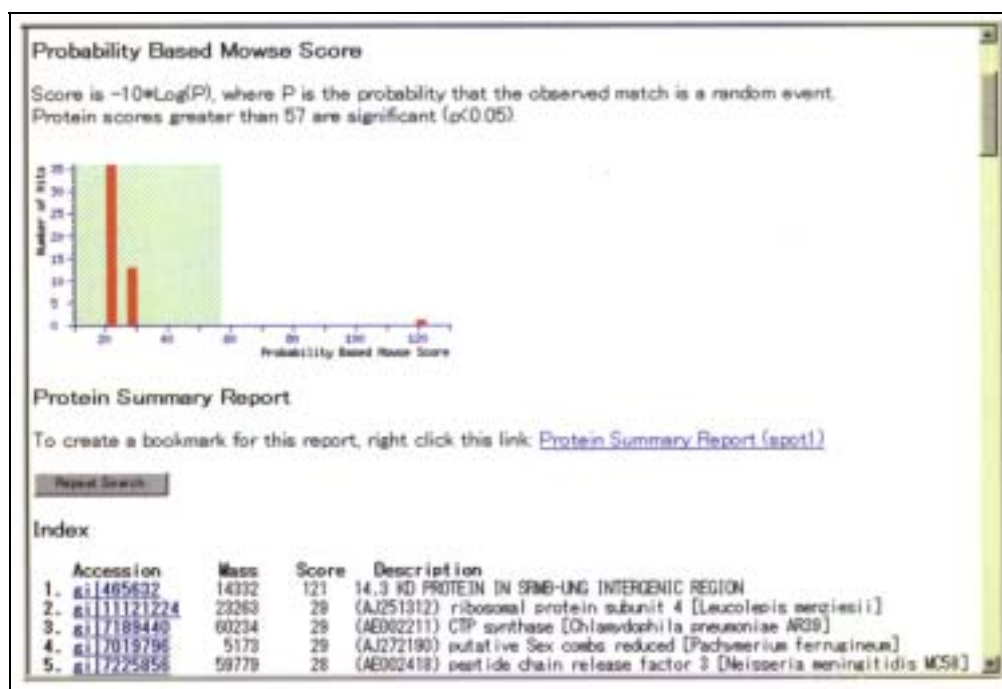


图 6：Spot 10 胰蛋白酶消解物的检索结果

7. 用 PMF 法对蛋白质鉴定的实例

将从大肠杆菌中萃取的蛋白质经过二维电泳分离，形成图 1 上的各个斑点。Spot 1 及 Spot 10 同样采用 PMF 法被认定，结果如表 4 所示。

表 4：用 PMF 法对蛋白质鉴定的实例结果

Spot No.	鉴定蛋白质实例
1	14.3KD PROTEIN IN SRMB-UNG INTERGENIC REGION
2	Superoxide Dismutase
3	HYDROPEROXIDE REDUCTASE C22 PROTEIN
4	D-Ribose-Binding Protein
5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
6	Fructose-Bisphosphate Aldolase
7	Elongation Factor
8	Enolase
9	Tryptophanase
10	Tryptophanase
11	DOHYDROLIPOAMIDE DEHYDROGENASE (V01498) coding sequence of gene lpd
12	GroEL protein
13	DNAK PROTEIN (HEAT SHOCK PROTEIN 70)

参考文献：

- (1) A. Shevchenko, M. Wilm, O.Vorm and M.Mann, Anal Chem, 68 850-858 (1996)
- (2) M.M. Vestling, C.M. Murphy and C. Fenselau, Anal Chem, 62(21)2391-2394 (1990)