维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)04-0485-04

肝癌细胞线粒体蛋白的 MALDI-TOF 质谱鉴定方法研究

蒋代凤[1], 邱宗荫[1], 李 兴[1], 黄开顺[2], 滕永真[2], 张晓萍[2]

(1.重庆医科大学医学检验系实验诊断教研室,重庆 400016;2.重庆医科大学基础医学研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:探索胶上蛋白原位酶切、肽质量指纹图(PMF)分析以及数据库检索方法的优化条件,建立适合于亚细胞比较蛋白质组学研究的质谱鉴定策略。方法:从考马斯亮蓝染色的 2-DE 胶上取下牛血清白蛋白(BSA)标准蛋白进行胶内原位酶切,与基质(CHCA)混匀后进行 MALDI-TOF MS 分析;对来源于人肝细胞癌细胞株 QGY-7703 线粒体的差异表达的候选蛋白点 L9,按照通过 BSA 标准蛋白优化的条件进行 MALDI-TOF 质谱鉴定;其肽质量指纹图(PMF)经 MS-Fit 检索。结果:经数据库检索,BSA 的肽质量指纹图(PMF)匹配肽质量数为 10/11,序列覆盖率为 19%,说明实验条件完全可信。候选蛋白点 L9 的 PMF 数据经数据库检索后,排名前两位的蛋白均为 OXCT(3-oxoacid CoA transferase 1 precursor),其匹配肽段为 9/13,序列覆盖率为 24%;且 OXCT 的理论分子量(56kda),理论等电点(7.1),与胶上 L9 蛋白的位置相符。故候选蛋白点 L9 确认为 OXCT(3-oxoacid CoA transferase 1 precursor)。结论:本文所确定的鉴定策略适用于线粒体比较蛋白质组学的研究。

【关键词】线粒体;蛋白质组学;肽质量指纹图(PMF);基质辅助激光解吸离子化-飞行时间质谱(MALDI-TOF MASS);二维电泳(2-DE)

【中国图书分类法分类号】R329.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-01-05

MALDI-TOF MS identification of protein of mitochondria from cultured hepatoma cells

JIANG Daifeng, et al

(*Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the optimal conditions associated with proteolytic digestion in 2-DE gel, PMF analysis and database inquiry, and to construct a mass identification strategy in research for mitochondrial comparative proteomics. *Methods*: The BSA standard protein was incised from 2-DE gel by Coomassie Brilliant Blue dyeing and was mixed with matrix (CHCA), then analyzed by MALDI-TOF MS. The differentially expressed mitochondria protein L9, an unknown protein obtained from hepatoma cells QGY-7703, was identified by condition with BSA optimizing. The PMF was inquired by MS-Fit database. *Results*: The BSA was identified in Masses Matched number 10/11 and Sequence Overcast 19% of PMF, which proved to the reliability of experimental conditions. By database Inquiry about PMF from L9 protein, OXCT(3-oxoacid CoA transferase 1 precursor) was identified with Masses Matched number 9/13 and Sequence Overcast 24%. The OXCT was in accord with position on gel. *Conclusion*: This method is applicable to research for mitochondrial comparative proteomics.

【Key words】Mitochondria; Proteomics; Peptide mass fingerprinting(PMF); Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectroscopy(MALDI-TOF MS); Two-dimensional electrophoresis(2-DE)

生物质谱鉴定技术同二维电泳(2-DE)分离技术构成了蛋白质组学研究的两大支柱技术,而生物质谱技术又以基质辅助激光解吸离子化(MALDI-TOF)和电喷雾电离(ESI)这两项软电离技术为常用手段。MALDI-TOF MS 基于蛋白质各自独特的一级结构,通过对候选蛋白经酶切后产生的肽片段的相对质量数进行质谱分析,可得到肽质量指纹图(PMF)数据,通过比对数据库中该蛋白的理论酶解质量数,可对候选蛋白进行鉴定。该技术具有高灵敏度(可检测 fmol 水平的标准样品)、高准确度(肽片段的质量数准确度可达到 ppm 水平)和高通量(一次可分析数十至数百个样品)的特点,能够满足

作者介绍:蒋代凤(1973-),女,博士,副教授,主要研究方向:蛋白质组学。

基金项目:国家自然科学基金项目(No:30476021);教育部博士点基金项目(教技发中心函[2004]166 号)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

蛋白质组学研究的需要。

本文利用具有延迟提取功能的 Voyager DE－PRO MALDI－TOF 质谱仪，对 2－DE 分离的胶上蛋白进行 PMF 分析，结合数据库查询，成功鉴定了标准蛋白以及未知的候选蛋白，建立了经 2－DE 分离的肝癌线粒体蛋白的 MALDI－TOF 质谱鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

人肝细胞癌细胞株 QGY－7703 来自我校感染性疾病分子生物学实验室。Voyager DE－PRO MALDI－TOF 质谱仪 (ABI 公司)，点样板为 100 孔不锈钢金属板。外标混合液 Mixture 2[包括以下片段：Angiotensin I 1297.51；ACTH(1－17)2094.46；ACTH(18－39)2466.72；ACTH(7－38)3660.19；insulin 5734.59(+1)，2867.80(+2)]由 ABI 公司提供；C18 Zip Tip 柱购自 Millipore 公司。低分子量牛血清白蛋白标准 (BSA)购自 Amersham Bioscience (Uppsala, Sweden)公司。碳酸氢铵、基质(α－氰基－4－羟基肉桂酸，CHCA)购自 Sigma 公司。胰蛋白酶(Promega 测序级，修饰的胰蛋白酶 1)购自 Promega 公司。三氟醋酸购自 Fluka 公司。乙腈(ACN)购自 Fisher 公司。标准蛋白经 2－DE 分离、用于质谱分析的样品来源于 QGY1－7703 细胞线粒体经 2－DE 分离后的差异表达候选蛋白斑点[1]。

1.2 样品制备

将胶块切成 $1mm^3$ 左右的小块，装入 Eppendorf 管中，水洗 3 次。用 50% ACN/25mmol/L NH_4HCO_3(400μl，pH8.0)脱色 15min。反复 3 次，直至将颜色脱尽。将胶块浸入 100% ACN(ACN 中不能有酸性物)中 5min，脱水，胶块变白。然后室温抽干。加 10～15μl 胰蛋白酶液(0～15μg/ml，pH8.0，25mmol/L NH_4HCO_3)覆盖胶块，等待 30min，吸胀后，适当补入酶液，37℃ 保温 16～20h 左右。吸出反应液，加入 50% ACN /5% TFA 30～50μl，轻微振荡萃取约时间 30～60min，共 2 次。合并萃取液和反应液，抽干约 1h。加入 3μl 0.5% TFA/50% ACN 溶解。用 Ziptip C18 脱盐。直接用 3～5μl 基质液(CHCA 在 50% ACN/0.1% TFA 中过饱和)洗脱，取 1μl 点样于 100 孔不锈钢金属板，风干后进行质谱分析。

1.3 质谱分析

制备好的样品用美国 ABI 公司的 Voyager DE－PRO MALDI－TOF 质谱仪分析。参数设置如下：反射模式，正离子谱测定，N_2 激光源波长为 337nm，真空度 8×10^{-8} Torr，离子源加速电压为 20kV，脉冲宽度为 3ns，离子延迟时间 100ns，Grid 75%，Guide Wire 0.003%，基质为 CHCA，激光强度为 850～1200 内部单位，质谱信号单次扫描累加 150 次。外标采用混合的 Mixture 2 标准液进行相邻校正，内标采用胰蛋白酶的自切峰(MH^+：2211.10 Da 或 2283.18Da 或 2299.18Da 和 842.51 Da)进行两点或单点校正。

1.4 数据库查询

经 MALDI－TOF 分析后得到的 PMF 数据采用 MS－Fit 软件(http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm)进行数据库搜索。数据库查询参数设定为：肽段准确度 0.5Da，允许 1 个可能的未切开位点(Miss cleavage sites)，最低匹配肽段数目为 6 个，标准蛋白不限定分子量、等电点和种属，样品的种属为人。在进行 MS－Fit 查询时，半胱氨酸丙烯酰化，蛋氨酸被氧化(Oxidation of M)，肽 N－端 Gln 变为 pyroGlu (Peptide N－terminal Gln to pyroGlu)，蛋白 N－端乙酰化 (Protein N－terminus Acetylated)。

2 结 果

从考马斯亮蓝染色的 2－DE 胶上取下 BSA 标准蛋白进行胶内原位酶切，与基质 CHCA 混匀后进行 MALDI－TOF MS 分析，先用外标混合液进行 PMF 分析，建立外标文件，用于样品的相邻校正；进一步获得 BSA 的 PMF 图谱，再进行胰蛋白酶自切峰的内标校正，显示 800～3000 之间的肽质量数，得到的数据去掉噪声后即为 BSA 的 PMF 图谱(图 1)。合并同位素峰，去除胰蛋白酶的自切峰后选取肽质量数(927.77，1399.02，1439.65，1480.60，1567.46，1570.45，1724.38，1738.35，1894.26，1921.65，2044.21)进行数据库检索，最多显示 5 个结果，检索结果见表 1。其中，得分排名前 4 位的均与牛血清白蛋白有关，而前 4 位的得分与第 5 位之间差距较大，且第 5 位蛋白的分子量与 2－DE 胶明显不符，序列覆盖率为 19%，匹配的肽质量数为 10/11，故可以肯定：该鉴定蛋白为排名第一的 BSA。

在同样条件下，对人肝细胞癌细胞株和正常肝细胞的线粒体蛋白经 2－DE 分离，考马斯亮蓝染色后有显著差异的候选蛋白点 L9[1]进行胶内原位酶切，进一步作 MALDI－TOF MS 分析，得到的 PMF 图谱见于图 2。候选蛋白点 L9 的 PMF 数据(1617.94，1923.10，2101.14，2216.07，2223.09，2233.06，2360.992，2378.056，2379.06，2405.03，2421.00，2596.06，2808.01)经数据库检索后结果见于表 2，排名前两位的蛋白均为 OXCT(3－oxoacid CoA transferase 1 precursor)，前两位的得分与第三位之间差异明显，匹配肽段为 9/13，序列覆盖率为 24%，OXCT 的理论分子量为 56kDa，理论等电点为 7.1，与胶上 L9 蛋白的位置相符。

维普资讯 http://www.cqvip.com

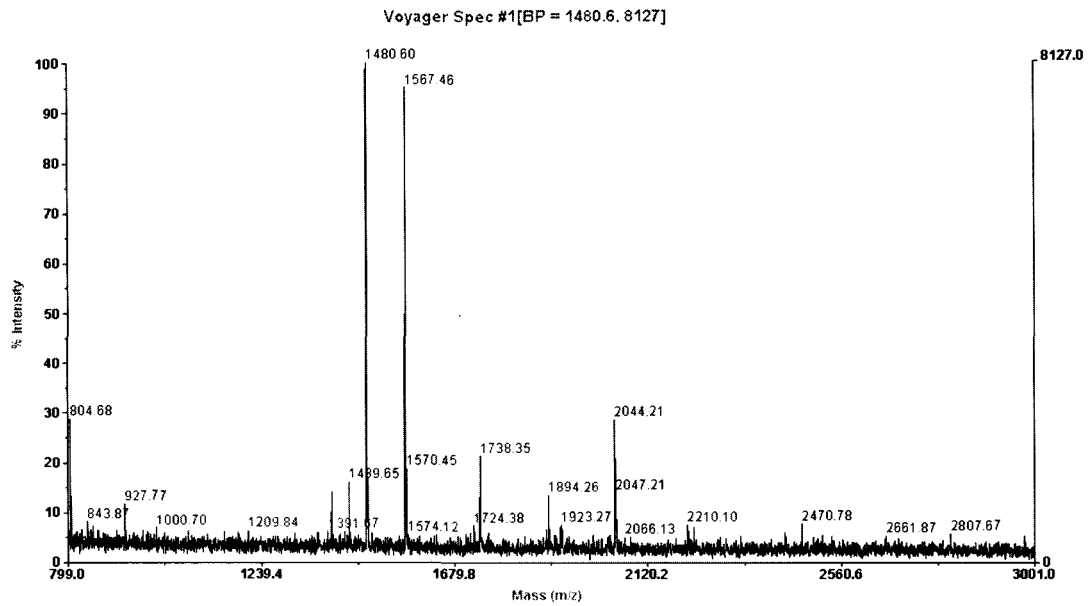


图 1 标准蛋白 BSA 的 PMF 图谱

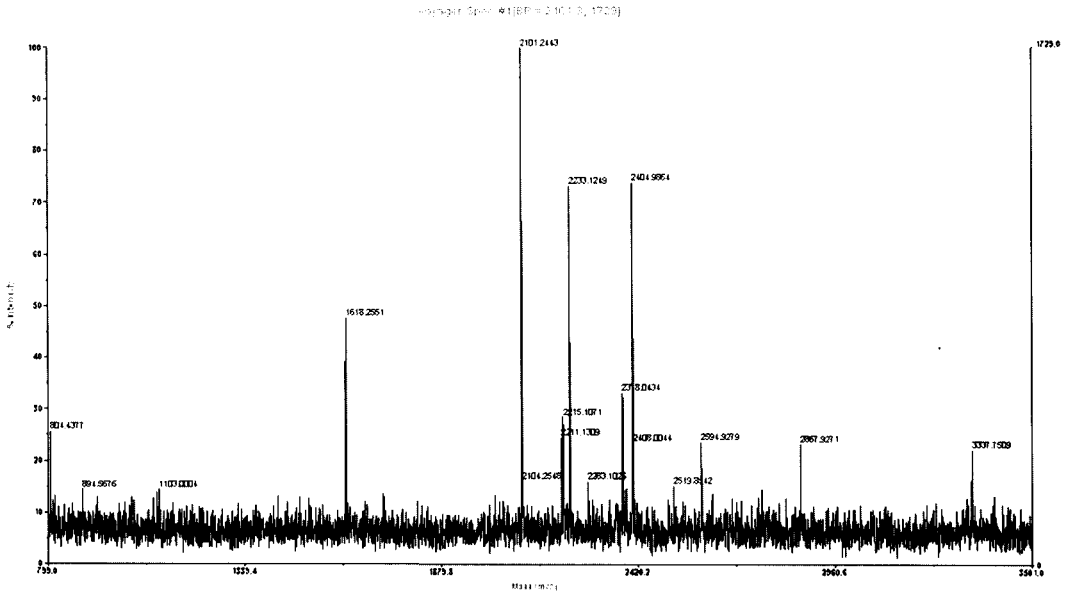


图 2 侯选蛋白 L9 的 PMF 图谱

表 1 BSA 的 PMF 数据库查询结果

	MOWSE Score	# /11(%) Masses Matched	Cov(%)	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Species	Protein Name
1	2.094e+05	10(90)	19.0	69271/5.8	418694	BOVINE	Serum albumin precursor
2	2.094e+05	10(90)	19.0	69294/5.8	1351907	BOVIN	Serum albumin precursor
3	2.093e+05	10(90)	19.0	69324/5.8	30794280	UNREA	DABLE albumin [Bos taurus]
4	2.034e+04	8(72)	15.0	66141/5.4	229552	UNREA	DABLE albumin
5	5185	10(90)	2.0	803448/6.7	37999878	CVMJH	Replicase polyprotein 1ab

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 候选蛋白 L9 的 PMF 数据库查询结果

	MOWSE Score	#/13(%) Masses Matched	Cov(%)	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Species	Protein Name
1	1.167e+08	9(69)	24.0	56158/7.1	4557817 M	UNREADABLE	3-oxoacid CoA transferase 1 precursor[Homo sapiens]
2	1.166e+08	9(69)	24.0	56192/7.1	48146215	HOMO SAPIENS	OXCT
3	5069	4(30)	8.0	62658/5.6	2135585 M	HUMAN	LZTR-1
4	4374	6(46)	20.0	57332/5.5	41350933	HOMO SAPIENS	Unknown
5	3545	7(53)	6.0	97437/5.1	48429194	HUMAN	Tyrosine-protein kinase receptor, UFO precursor (AXL oncogene)

3 讨 论

二维电泳(2-DE)结合基质辅助激光解吸离子化-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术已经成为蛋白质组学研究的常用组合技术。而生物质谱鉴定技术近年来发展迅速,已经成为鉴定生物大分子不可或缺的重要技术手段。在本研究中,我们采用了 Voyager DE-PRO MALDI-TOF 质谱仪的延迟提取(delayed extraction, DE)与反射镜(reflectron)技术,前者减小了具有相同质量离子的动能分散;而后者校正了具有相同质量离子的速度分布,且飞行长度从 1.3m 增加到 2m。两项技术的结合,提高了离子的质量分辨率和测量结果的准确性。因此,在对标准样品和标本进行分析时,将 MALDI-TOF 分析得到的 PMF 数据进行数据库检索,肽质量数的准确度可达 0.5Da 以内,这就大大提高了鉴定的可靠性。在进行标准蛋白的 MALDI-TOF 分析时,我们还比较了线性模式(linear mode)(数据未显示)和反射模式(reflected mode)的鉴定可信性,结果表明,用线性模式得到的 PMF 数据准确度在 1.0Da 以内,明显低于反射模式。因此,我们选用了反射模式。总之,对 BSA 标准蛋白的鉴定结果表明,本研究确定了可信度高的鉴定策略,足以保证对未知样品的鉴别。

在进行预实验时,对标本分别进行了 ZiptipC18 脱盐和不脱盐处理,结果表明,标本脱盐后再进行 MALDI-TOF MS 分析,可减少噪音,且出现的肽片段更多,信号更强[2]。

在进行 MALDI-TOF MS 分析时,为了保证 PMF 数据的准确度,校正这一环节相当重要,同时采用内标和外标法校正可显著提高肽质量数的精确度,会明显提高数据库搜索时特异性和可靠性。

对未知蛋白的 MALDI-TOF MS 分析和数据库鉴定时,并不是所有的蛋白都能从数据库得到明确的结果,据报道大概只有 50% 的成功率,尤其是样品量较低时,检索的结果并不令人满意。从理论上讲,MALDI-TOF MS 可以分析 fmol 水平的蛋白,但根据我们的实际经验,能够得到较好 PMF 图谱的蛋白点往往需要在 2D 胶上肉眼清晰可见。

利用 PMF 数据进行生物信息学数据库查询是确认候选蛋白归属的重要的一环。在进行数据库查询时,往往会碰到特异性不高的情况,即有多个候选蛋白的得分接近,无法拉开得分差距,这时需要通过几种查询软件进行搜索,比对所得结果。在本研究中,我们曾使用 Mascot、PeptIdenthe、MS-Fit 等几种软件查询系统,最终确定 MS-Fit 比较适用[3]。此外,还应结合蛋白点在 2-DE 胶上的等电点和分子量来进行推测,如果仍然无法,就需要借助其它手段来验证。目前,结合 PMF 分析和序列标签肽段 LC MS/MS 扫描测序可能是一种有效的策略[4]。

参 考 文 献

[1] 李 兴,邱宗荫,潘 卫,等.肝癌细胞线粒体的纯化及双向凝胶电泳分析[J].重庆医科大学学报,2005;30(2)163-165.

[2] R.J.辛普森著.蛋白质与蛋白质组学实验指南[M](影印版).北京:科学出版社,2003;149.

[3] 郑 珩,王 非.药物生物信息学[M].北京:化学工业出版社,2004;50-61.

[4] Mogjiborahman S, Vincenzo DB, Davide C, et al. Sequence tag scanning: A new explorative strategy for recognition of unexpected protein alterations by nanoelectrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. Proteomics, 2005;5(3):667-674.