

## 两种用于液质联用分析的蛋白质酶解处理效果比较\*

### Comparison of Two Protein In-solution Enzymatic Digestion Methods for LC-MS Analysis

潘丽梅<sup>1</sup>, 韦树根<sup>1</sup>, 付强<sup>2</sup>, 谭芸<sup>3</sup>, 朱佳杰<sup>3\*\*</sup>

PAN Li-mei<sup>1</sup>, WEI Shu-gen<sup>1</sup>, FU Qiang<sup>2</sup>, TAN Yun<sup>3</sup>, ZHU Jia-jie<sup>3</sup>

(1. 广西药用植物园, 广西南宁 530023; 2. 广西大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530004; 3. 广西水产科学研究院, 广西南宁 530001)

(1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning, Guangxi, 530023, China; 2. State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresource, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 3. Guangxi Fisheries Research Institute, Nanning, Guangxi, 530001, China)

**摘要:**【目的】分析和评估两种蛋白质溶液酶解方法,为蛋白质组学研究中的大规模质谱鉴定分析建立一种稳定的样品制备技术。【方法】分别使用 TEAB 法(实验组 A)和 TFE 法(实验组 B)对牛血清白蛋白(BSA)进行还原、烷基化和溶液酶解,再用 LTQ-Orbitrap 高分辨率质谱仪采集 BSA 酶切肽段信息,比较两种方法得到的数据信息,分析肽段数目、可变修饰位点和蛋白质覆盖率。【结果】实验组 A(TEAB 法)获得 36 个肽段、39 个修饰位点,蛋白质平均覆盖率为 59.31%;实验组 B(TFE 法)获得 27 个肽段、27 个修饰位点,蛋白质平均覆盖率为 47.83%,实验组 A 的数据指标与实验组 B 差异显著。【结论】采用 TEAB 法酶切体系能够实现蛋白质高效率酶切,达到获得较高肽段覆盖率的目的,可为蛋白质组学后期的质谱分析鉴定奠定实验基础。

**关键词:** 溶液酶解 蛋白质 液质联用 覆盖率

**中图分类号:** Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2015)06-0612-04

**Abstract:** 【Objective】Two methods of proteins in-solution enzymatic digestion were compared and evaluated to establish a reliable sample preparation protocol for large-scale identification in proteomics research. 【Methods】Bovine serum albumin (BSA) was reduced and alkylated, and subsequently used for in-solution enzymatic digestion according to the protocols of group A (TEAB method) and group B (TFE method). LTQ-Orbitrap mass spectrometer was utilized to obtain the signal of enzymatic peptides. The data obtained from two groups were compared. Peptide categories, variable modification site and protein coverage were analyzed. 【Results】A total of 36 peptides and 39 modification sites were acquired in group A (TEAB method), and the protein coverage was 59.31%; in group B (TFE method), a total of 27 peptides and 27 modification sites were obtained, and the protein coverage was 47.83%. All the statistical comparisons between groups A and B were significantly different. 【Conclusion】TEAB method provided a high efficiency of enzymatic digestion with higher peptide coverage. This method can be served as the experimental basis for MS analysis in proteomics.

**Key words:** in-solution enzymatic digestion, proteins, LC-MS, peptides coverage

收稿日期: 2015-04-30

修回日期: 2015-06-10

作者简介: 潘丽梅(1982—), 女, 助理研究员, 主要从事中药材良种繁育和分子生物学研究。

\* 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室开放课题(GXKL-AQUA-2014-01)和广西壮族自治区水产科学研究院基本科研业务基金项目(GXIF-2014-12)资助。

\*\* 通讯作者: 朱佳杰(1981—), 男, 助理研究员, 主要从事水产分子育种等研究, E-mail: zhujiatie504@sina.com。

## 0 引言

【研究意义】蛋白质是基因功能的执行者,其表达模式和功能分析已成为后基因组时代研究的核心内容之一<sup>[1~3]</sup>。蛋白质组研究重点是针对一类细胞系、一种器官或一个生物体内的所有蛋白质,致力于阐明所有蛋白质种类信息和相互作用关系。通过蛋白质组学研究,可以寻找高灵敏度的生物标记物,鉴定出与疾病发生相关的新蛋白质靶点,再通过蛋白质相互作用的研究,阐明和解释生命活动的分子机理。【前人研究进展】生物体内蛋白质种类复杂,导致蛋白质分离和分析存在诸多困难,因此,发展高通量、高灵敏度、高精度的多肽分析技术是蛋白质组学研究中面临的主要挑战。用于蛋白质鉴定的主要手段是质谱技术,主要借助两种质谱技术实现蛋白质分析和鉴定:基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和电喷雾离子阱质谱(ESI MS)。蛋白质或多肽通过质谱离子源发生电离后,经质量分析器得出蛋白质的分子量或肽质量指纹图谱(PMF),再使用数据库检索出对应的蛋白质或多肽。目前,蛋白质组学研究主要采用两种策略:Bottom-up(自下而上)策略和 Top-down(自上而下)策略<sup>[4]</sup>。在 Bottom-up 策略的蛋白质组研究中,第一步必须将蛋白质混合物酶解成分子量较小的肽段,再用于多肽的多维色谱分离<sup>[5]</sup>,因此,蛋白质酶解效率对于质谱数据的产出有重要影响。【本研究切入点】针对蛋白质组学研究中的多肽样品制备方法,对两种常用的酶切体系进行效率评估,得到最适合液质联用(LC-MS)分析肽段所用的酶切方法。【拟解决的关键问题】分实验组 A(四乙基溴化铵 TEAB 法)和实验组 B(三氟乙醇 TFE 法)对牛血清白蛋白(BSA)进行还原、烷基化和溶液酶解,比较两种方法采集得到的数据信息,软件分析肽段数目、可变修饰位点和蛋白质覆盖率。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试剂和仪器

乙腈(ACN)、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)、三氟乙醇(TFE)、牛血清白蛋白(BSA)等购自 Sigma-Aldrich 公司;四乙基溴化铵(TEAB)、三羧基乙基磷酸盐(TCEP)购自 Thermo Fisher 公司;尿素(Urea),二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)购自 Amersco 公司,其他常规试剂均为进口或进口分装产品。Ziptip C18 脱盐吸头购自 Millipore 公司。LTQ-Orbitrap Elite 液质联用质谱仪为美国 Thermo Fisher 公司生产。

### 1.2 BSA 酶解

取 BSA 标准品溶液两份,每份 50  $\mu$ g,分别加入 3 倍体积丙酮,−20℃沉淀过夜,8000 $\times$ g,30 min 离心,弃去多余的丙酮,蛋白质沉淀分别用于以下两种体系酶解处理。

实验组 A 用 TEAB 法:加入 45  $\mu$ L 100 mM TEAB 复溶 BSA 沉淀,待沉淀完全溶解后,补充 H<sub>2</sub>O 至总体积 100  $\mu$ L,加入 5  $\mu$ L 200 mM TCEP 完全还原二硫键,55℃孵育 1 h,再加入 5  $\mu$ L 375 mM IAA 室温避光孵育 1 h,加入 6 倍体积的丙酮沉淀 2 h,将 BSA 沉淀再次复溶于 100 mM TEAB 中,按 1:25 比例加入胰蛋白酶,37℃酶解过夜。

实验组 B 用 TFE 法:25  $\mu$ L TFE 复溶 BSA 沉淀,加入 2.5  $\mu$ L DTT 200 mM,震荡混匀,60℃孵育 45 min,还原半胱氨酸,加入 10  $\mu$ L 200 mM IAA 室温孵育 30 min,再加入 2.5  $\mu$ L DTT 去除多余的 IAA,加入 300  $\mu$ L H<sub>2</sub>O 稀释至总体积 365  $\mu$ L,再加入 100  $\mu$ L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>将溶液 pH 值升高至 7.5,按照 1:25 比例加入胰蛋白酶,37℃酶切过夜;

### 1.3 LC-MS 分析

将两组酶切后样品真空浓缩至 20  $\mu$ L 左右,使用 ZipTip C18 脱盐枪头纯化酶解后多肽,提取到的多肽在真空抽干后复溶于流动相 A(2%乙腈水溶液中加入 0.1%甲酸)中,经自动进样器上样 2  $\mu$ g 到 Easy-nLC 纳升液相的预柱上,进行梯度洗脱,流动相 B 为 98%乙腈水溶液(加入 0.1%甲酸),流速 250 nL/min,洗脱梯度如下:1)0~5 min,0%~5% B;2)5~60 min,5%~35% B;3)60~65 min,35%~100% B;4)65~70 min,100% B,等度洗脱。经色谱分离的肽段经过 nano ESI 源送入高分辨率的 LTQ-Orbitrap 线性轨道阱组合式质谱仪中进行数据采集。质谱条件:喷雾电压 1.8 kV,质量扫描范围  $m/z$  350~1800;Orbitrap 一级质谱扫描分辨率 60000( $m/z$  400);采用数据依赖的自动化二级分析模式,设置 10 个 LTQ 串联质谱扫描事件,碰撞能量为 35%归一化能量,动态排除次数 2;重复计数 30 s;持续排除时间 40 s。

### 1.4 数据分析

3 组处理样品所有串联谱图通过 Proteome Discoverer 1.3(Sequest 算法)搜索引擎进行数据处理。非冗余的 Bovine 数据库(Uniprot)作为数据库,搜库参数设置如下:Trypsin 酶切,最大允许 2 个漏切位点,一级质谱质量偏差 10 ppm,二级质谱质量偏差 0.6 Da,可变修饰设:半胱氨酸(C)脲甲基化(carbamidomethyl,+57 Da)、甲硫氨酸(M)氧化(Oxidation)

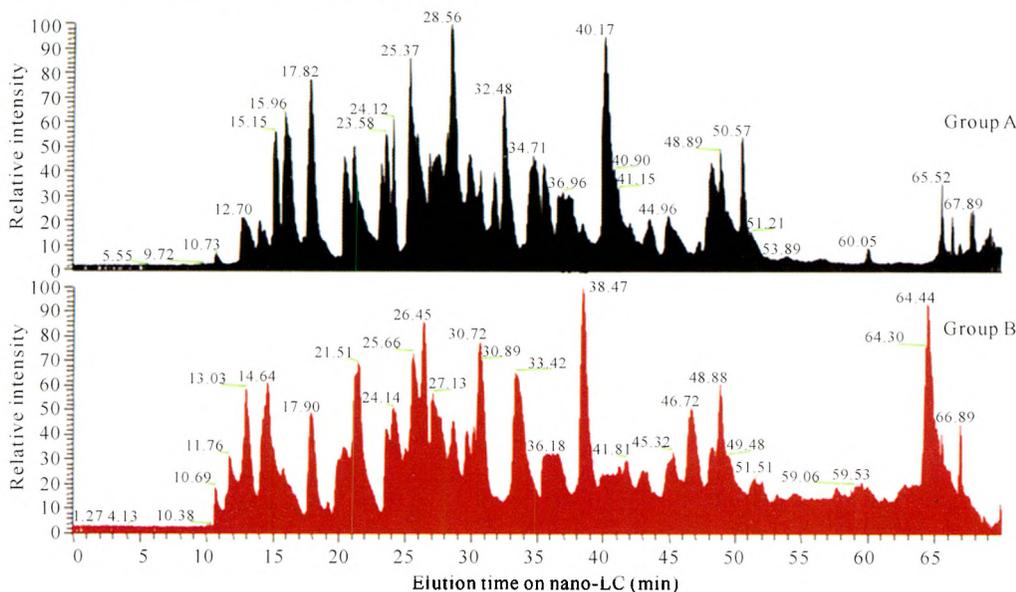
tion, +16 Da), 每张匹配的高置信度谱图通过人工确认。

## 2 结果与分析

### 2.1 两种酶切体系的多肽总离子流

两种体系酶切后的 BSA 样品分别使用纳升液相色谱分析。从图 1 可以看出, 两次进样的色谱主要出峰时间集中在 10~50 min, 对应的液相分离有机相梯度约为 10%~30%, 在此梯度内大部分肽段被均

匀洗脱, 总离子强度约为  $1 \times 10^9$ ; 两种方法得到的肽段在液相色谱峰上表现出较高的一致性, 并且与 BSA 标准品酶切产物的图谱较为接近, 说明这些峰均是 BSA 酶解后的多肽指纹图谱。将两种方法获得的一级质谱峰提取, 发现分离重现性和母离子的保留时间基本一致。通过 Sequest 软件分析, 两种方法均能成功鉴定到由 607 个氨基酸组成的牛血清白蛋白 (Uniprot Accession No. P02769)。



Group A: TEAB enzymatic digestion; Group B: TFE enzymatic digestion

图 1 两种酶切体系的总离子流

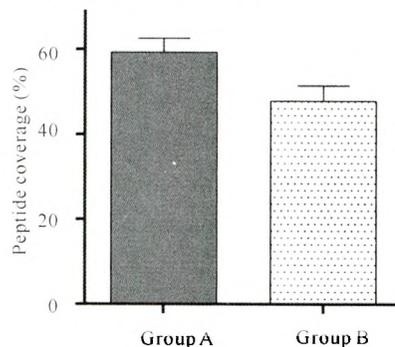
Fig. 1 The total ion current (TIC) from two methods of enzymatic digestion

### 2.2 两种酶切体系得到的多肽数目和覆盖率

溶液酶切方法效率的最重要判断条件是质谱鉴定的肽段覆盖率。TEAB 酶切体系 (实验组 A) 3 次重复获得的肽段覆盖率分别为 58.65%, 65.24% 和 54.04%; TFE 酶切体系 (实验组 B) 3 次重复获得的肽段覆盖率分别为 42.17%, 46.79% 和 54.53%, 经统计分析, 两组的肽段覆盖率差异显著 ( $P < 0.05$ ), 如图 2。

对两种酶切产物的多肽数目比较发现, 实验组 A (TEAB 法) 鉴定得到平均 36 条肽段信息, 实验组 B (TFE 法) 平均采集到 27 条肽段信息, 两种酶切体系共同鉴定到的肽段数为 23 条, 占总肽段数的 56%, 且两种酶切方法获得的肽段信息差异显著。鉴定的修饰位点数量表明, 实验组 A 平均检测到 38.67 个氧化修饰位点 (Oxidation), 实验组 B 平均检测到 26.67 个修饰位点, 差异极显著 (图 3)。实验组 A 和实验组 B 的胰酶漏切位点平均数目为 14 个和 12 个, 差异不显著 (表 1)。以上结果表明, 实验组 A (TEAB

法) 采用的酶切体系在采集的肽段数量、肽段覆盖率和修饰位点数目上均比实验组 B (TFE 法) 有显著提高。蛋白质的酶切更完全, 实现了更高的肽段覆盖率, 有助于发现较多的修饰位点。



Group A: TEAB enzymatic digestion; Group B: TFE enzymatic digestion

图 2 两种酶切体系的肽段覆盖率比较

Fig. 2 The comparison of peptide coverage from two methods of enzymatic digestion

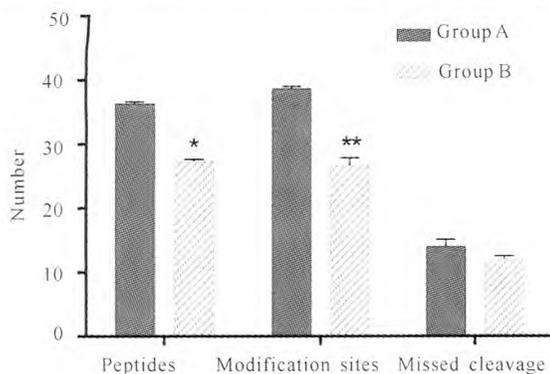
表 1 两种酶切体系鉴定得到的蛋白质信息

Table 1 Information of protein identification obtained from two methods of enzymatic digestion

实验组 Group	平均肽段数 Peptide counts	肽段覆盖率 Peptide coverage(%)	修饰位点数 Number of modification sites	漏切位点数 Number of missed cleavage
A	36.33 ± 0.33 <sup>a</sup>	59.31 ± 3.25 <sup>a</sup>	38.67 ± 0.33 <sup>a'</sup>	14 ± 1.16 <sup>a</sup>
B	27.33 ± 0.33 <sup>b</sup>	47.83 ± 3.61 <sup>b</sup>	26.67 ± 1.20 <sup>b'</sup>	12 ± 0.58 <sup>a</sup>

注: a, b 代表差异显著; a', b' 代表差异极显著。

Note: a and b denote significant difference; a' and b' denote extremely significant difference.



Group A: TEAB enzymatic digestion; Group B: TFE enzymatic digestion

图 3 两种酶切方法获得的肽段数目、修饰位点数目和漏切位点

Fig. 3 The number of peptides, modification sites and missed cleavage obtained from two methods of enzymatic digestion

### 3 讨论

近年来,蛋白质组学的研究手段逐渐由传统的双向电泳法(2-DE)转向多维液相色谱(MDLC),其中具有代表性的方式是 Top-down(自上而下)策略和 Bottom-up(自下而上)策略。Top-down 策略是指以完整蛋白质混合物为研究对象,通过多种组合式手段分离,然后对单个蛋白质进行酶解和质谱分析<sup>[6,7]</sup>。Bottom-up 策略是将蛋白质首先酶解成 20 个氨基酸长度的多肽,形成比蛋白质更为复杂的多肽混合物,经过多维液相色谱正交分离后用于串联质谱鉴定,获得多肽序列,再搜索蛋白质数据库确定最后的鉴定结果<sup>[8]</sup>。在实际的蛋白质组学实验中,不管采用哪种分析策略,都包含蛋白质酶解这一步骤,目前,针对蛋白质分离和鉴定都已有效率可控的程序化方案,但对于蛋白质酶解等样品制备工作缺少评估手段,严重影响蛋白质大规模鉴定的速度。本实验室前期已开展过基于胶内酶解的方法优化研究,已显著提高了双向电泳凝胶的蛋白质鉴定率<sup>[9]</sup>,但是,实验中常用的溶液酶解方法容易受酶解环境、酶活等各个因素影响,需要给方法优化建立稳定可靠的蛋白质酶解方法。

本文评估两种常用的溶液酶解方法,并对酶切肽段的覆盖率进行分析和评估,筛选出适合高通量的蛋白质鉴定的样品制备方法。在酶切反应中,增加了还原烷基化步骤,旨在通过还原剂(DTT 或 TECP)对蛋白质二硫键进行还原,打开二硫键后,为防止二硫键重新结合,再用碘乙酰胺(IAA)进行烷基化加合,从而充满暴露出蛋白质的酶切位点,以保证酶切效率。实验组 A 采用 TEAB(四乙基溴化铵)为溶剂,该溶剂常用于有机合成上的相转移催化剂,具有较好的 pH 稳定性,在高温作用下仍可以保持 pH 值在 7.5~8,为胰酶提供合适的缓冲液环境。TFE(三氟乙醇)是有机化合物,具有醇类的典型性质,具备极好的物理性质和热力学性质,能充分溶解多肽,不会破坏多肽的一级结构,但三氟乙醇溶液呈酸性,需要使用 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 缓冲液保持溶液的 pH 值为 7~8。TEAB 法和 TFE 法是蛋白质组学研究中液体酶解经常使用的溶剂,但 TEAB 法无需介入 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 控制 pH 值,在定量标记蛋白质的研究中应用更为广泛。本实验中发现,使用 TEAB 法的酶解体系获得的肽段数量和肽段覆盖率更高。

### 4 结论

本研究结果表明,在两种常用的溶液酶解方法 TEAB 法与 TFE 法中,TEAB 法能获得更多的肽段信息和修饰位点信息,肽段覆盖率提高至 50% 以上,能实现多肽样品的高效率酶解制备。

#### 参考文献:

- [1] Wilkins M R, Pasquali C, Appel R D, et al. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis [J]. *Biotechnology*, 1996, 14(1): 61-65.
- [2] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes [J]. *Nature*, 2000, 405(6788): 837-846.
- [3] Fields S. Proteomics in genomeland [J]. *Science*, 2001, 291(5507): 1221-1224.

(下转第 619 页 Continue on page 619)

25.  
Lin K, Mo C M, Ma X J, et al. Research progress on the quality safety standard of food additive—mogroside extract[J]. *Modern Scientific Instruments*, 2012, 5: 20-25.
- [4] 陈瑶, 贾恩礼. 罗汉果化学成分和药理作用的研究进展[J]. *解放军药学学报*, 2011, 27(2): 171-174.  
Chen Y, Jia E L. Research progress in chemical constituents and pharmacological actions of *Momordica grosvenori* [J]. *Pharm J Chin PLA*, 2011, 27(2): 171-174.
- [5] 王勤, 覃洪含, 王巍, 等. 罗汉果药理研究进展[J]. *广西中医学院学报*, 2010, 13(3): 75-76.  
Wang Q, Qin H H, Wang W, et al. Pharmacological research progress on *Momordica grosvenori* [J]. *Journal of Guangxi Traditional Chinese Medical University*, 2010, 13(3): 75-76.
- [6] 李学坚, 胡文姬, 邓家刚, 等. 析因分析法研究槲皮素对芒果苷抗炎祛痰作用的影响[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(1): 27-28.  
Li X J, Hu W J, Deng J G, et al. Interaction of anti-inflammatory and expectorant effect between mangiferin and quercetin[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2012, 23(1): 27-28.
- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.  
Xu S Y, Bian R L, Chen X, et al. *Experimental Methodology of Pharmacology* [M]. 3rd. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.

(责任编辑: 尹 闯)

(上接第 615 页 Continue from page 615)

- [4] Chait B T. Mass spectrometry: Bottom-up or top-down? [J]. *Science*, 2006, 314(5796): 65-66.
- [5] Armirotti A. Bottom-up proteomics[J]. *Current Analytical Chemistry*, 2009, 5(2): 116-130.
- [6] Kelleher N L. Top-down proteomics[J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(11): 197-203.
- [7] Yates J R. Mass spectral analysis in proteomics[J]. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 2004, 33: 297-316.
- [8] McDonald W H, Yates J R. Shotgun proteomics and biomarker discovery [J]. *Disease Markers*, 2002, 18(2): 99-105.
- [9] 胡炜, 付强, 朱平川, 等. 用于质谱鉴定蛋白质胶内酶解方法的优化 [J]. *南方农业学报*, 2011, 42(7): 802-805.  
Hu W, Fu Q, Zhu P C, et al. The optimization of in-gel digestion method for mass spectrometry identification [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2011, 42(7): 802-805.

(责任编辑: 尹 闯)