

小型微波谐振腔用于蛋白质微波辅助酶解

窦文超, 郝廷富, 张志权, 张华容, 王超, 李明, 冯国栋, 金钦汉

(吉林省光谱分析仪器工程技术研究中心, 吉林大学化学学院, 长春 130023)

摘要 采用微波谐振腔对细胞色素 c 以及牛血清白蛋白进行微波辅助酶解, 通过电喷雾三级四极杆质谱对得到的肽段进行分析, 证明该方法可用很低的微波功率将蛋白质彻底酶解为多肽. 通过调整微波条件可以使蛋白质的酶解效率基本达到 100%, 细胞色素 c 和牛血清白蛋白的序列覆盖率分别为 45% 和 26%. 该方法不但可将蛋白酶解时间由传统方法的 16 h 缩短为 20 min, 还将功率由使用微波炉时的数百瓦降至 20 W.

关键词 微波谐振腔; 微波辅助酶解; 质谱; 选择性酶切

中图分类号 O652.7

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)02-0238-04

肽质量指纹图谱法 (Peptide mass fingerprint, PMF) 是研究蛋白质结构信息和鉴定蛋白质的最常用的快速方法. 使用肽质量指纹图谱法分析蛋白质的结构需要将蛋白分解成肽段, 然后用 LC-ESI-MS 或 MALDI-MS 分析多肽混合物^[1,2]. 传统的蛋白酶解方法往往需要过夜, 这大大限制了蛋白质分析的速度. 微波辅助化学反应方法以其快速和节能的特点已经在化学领域中得到广泛的应用^[3~6]. 最近已见到使用微波辅助加速蛋白质的酶解方法的报道^[7~11], 利用该法酶解蛋白质一般只需十几分钟. 报道的微波方法采用微波炉, 其功率一般都在数百瓦到几千瓦, 而一般蛋白质分析的样品量都只有几百微升, 所以在进行微波分解蛋白质时, 通常在微波炉中放一盆水来吸收多余的微波. 鉴于传统方法和上面微波方法的不足, 本组提出一种新的微波辅助酶解方法, 即使用 3/4 波长微波谐振腔^[12,13]对蛋白质进行微波辅助酶解, 这样既保持了微波方法快速高效的特点, 又避免了使用微波炉能源浪费的问题. 实验中用细胞色素 c (CC) 和牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准蛋白考察了本方法对蛋白质的酶解效果.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

牛血清白蛋白 (BSA) 和细胞色素 c 均购自北京鼎国生物技术有限公司; 胰蛋白酶购自 Fluka 公司; 实验用水为二次蒸馏水.

WGY-20 微波功率源 (吉大·小天鹅仪器有限公司); 3/4 波长谐振腔 (实验室自制); Q-Trap 三级四极杆质谱 (Applied Biosystems Sciex, Foster City, USA); 荧光光谱仪 (RF-5301PC, 岛津). 本实验的最佳蛋白酶解条件如表 1 所示.

Table 1 The prime parameters of this experiment

Microwave power/W	20	Digestion time/min	20 (BSA)
Sample volume/mL	1.0		10 (CC)

质谱条件: 气帘气和雾化气均为 N₂ 气, 压力分别为 206.8 和 241.3 kPa; 喷雾电压分别为 3500 (细胞色素 c) 和 3000 V (BSA); 解簇电压分别为 50 (细胞色素 c) 和 60 V (BSA); 入口电压为 10 V; 碰撞能量为 10 eV; 进样速度 5 μL/min; 数据采集 1 min 后取平均值.

1.2 蛋白质样品酶解

所使用的 3/4 波长谐振腔是一个由黄铜做成的双管同轴结构 (图 1), 外面是柱形罩, 里面有上下两个与外管同轴的内管, 下面的内管与微波源相联, 上面的内管可以上下调节, 起到调协的作用, 微

收稿日期: 2006-06-21.

联系人简介: 冯国栋 (1977 年出生), 男, 博士, 讲师, 主要从事光谱及生物研究. E-mail: fenggd@jlu.edu.cn;

金钦汉 (1937 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事光谱分析方法和仪器研究. E-mail: qhjin@jlu.edu.cn

波在两管中间区域聚集. 样品管是一个直径为 1 cm、长为 5 cm 的玻璃管, 样品管从中空的内管上面伸入到谐振腔中, 通过调节调协旋钮可以使得微波耦合到样品上.

细胞色素 c 的酶解: 在样品管中加入 0.1 mL 0.84 mg/mL 的细胞色素 c, 再加入 0.8 mL H₂O, 将样品管放入 3/4 微波谐振腔, 在 50 W 的功率下变性 5 min; 加入 0.1 mL 的胰蛋白酶储备液, 使蛋白质和酶的质量比为 20:1, 滴加稀氨水使溶液的 pH = 8; 然后在 20 W 的微波功率下酶解反应 10 min. 反应完成后放入 -20 °C 的冰箱中冷冻终止反应. 牛血清白蛋白的酶解步骤同上(牛血清白蛋白的质量浓度为 10 mg/mL, 酶解时间为 20 min). 最后应用 ESI-MS 对酶解产物进行多肽序列分析.

2 结果与讨论

酶解体系的 pH 值以本实验采用的胰蛋白酶最佳活性的 pH 值为依据, 确定本实验体系的 pH 值为 8, 在酶解过程中采用稀氨水调节.

实验中一个比较难解决的问题是如何使得微波完全被样品吸收, 即降低反射功率. 通过研究不同样品体积与反射功率的关系发现, 样品体积对反射功率影响很大(如图 2 所示), 当样品体积在 1.0 ~ 1.3 mL 之间时, 反射功率最低(<2 mW). 综合实验具体操作, 选择 1 mL 作为蛋白酶解的样品体积.

考察了 BSA 在微波功率 20 W 下随着酶解时间增加荧光强度的改变, BSA 的荧光激发波长为 280 nm. 如图 3 所示, 微波作用时间为 20 min 时 BSA 酶解的效果比较理想, 与体系中只加入酶时的荧光强度基本相同. 同时考察了细胞色素 c 的酶解时间, 酶解 10 min 时细胞色素 c 基本酶解完全. 因此, 本实验 BSA 的微波辅助酶解时间定为 20 min, 细胞色素 c 的微波辅助酶解时间定为 10 min(细胞色素 c 分子量 12300, BSA 分子量 66000).

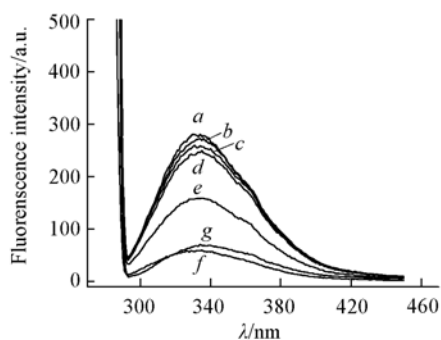


Fig. 3 Fluorescence spectra of the sample in different reaction time

Reaction time/min: a. 0; b. 3; c. 6; d. 10; e. 15; f. 20. g. Enzyme.

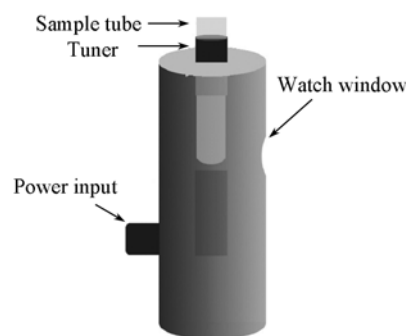


Fig. 1 Schematic diagram of the microwave resonance cavity and the sample tube

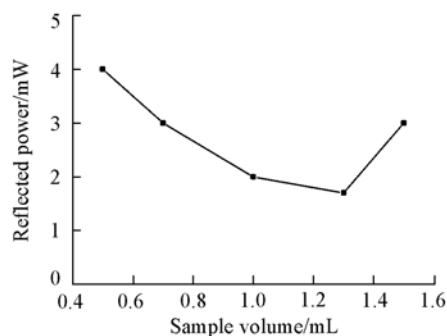


Fig. 2 Curve of reflected power follow the different sample volumes

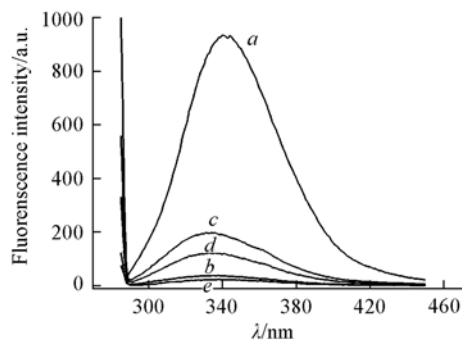


Fig. 4 Fluorescence spectra of the sample at different microwave powers

Microwave power/W: a. 0; b. 20; c. 30; d. 40. e. Enzyme.

在实验过程中, 通过检测 BSA 在不同微波功率(20, 30 和 40 W)下酶解 20 min 前后的荧光强度变化来选择本实验的最佳微波功率, BSA 荧光的激发波长定为 280 nm. 如图 4 所示, 微波功率为 20 W 时 BSA 酶解的效果比较理想, 与体系中只加入酶的荧光强度基本相同. BSA 在微波功率为 30 和 40 W 下酶解 20 min 后, BSA 仍有一定的荧光强度, 这说明 BSA 酶解不完全. 细胞色素 c 也已得到类似的结果. 产生这种现象的原因可能有两点: (1) 在较大微波功率作用下可能会导致酶变性, 从而影响到

BSA 酶解的效果; (2) 在低的微波功率作用下, 由于微波存在一定的非热效应和不易使酶变性, 从而对 BSA 的酶解有一定的促进效果. 由于实验中所用微波源稳定工作的最低功率为 20 W, 所以本实验选用 20 W 作为蛋白酶解的微波功率.

应用 ABI 公司的电喷雾四极杆质谱仪对微波辅助酶解所得多肽混合物进行检测, 得到的质谱中没有出现蛋白的多电荷峰(图 5, 图 6), 表明实验中蛋白已被彻底酶解为多肽, 该方法对蛋白的酶解效率接近 100%.

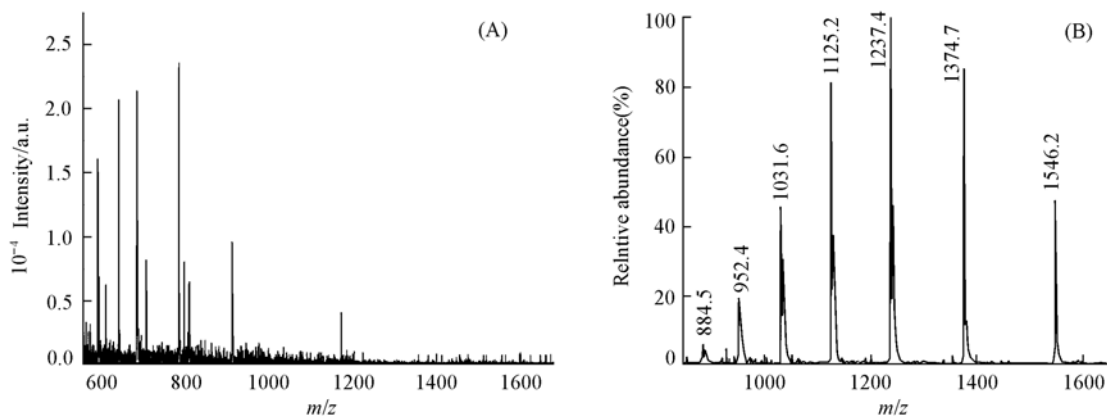


Fig. 5 ESI-MS of tryptic fragments of cytochrome c after 10 min of microwave irradiation(A) and ESI-MS of cytochrome c(B)

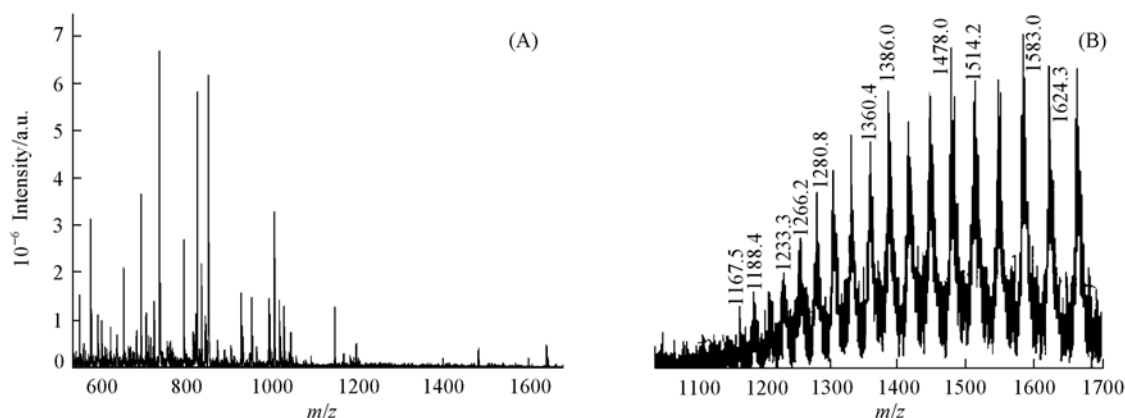


Fig. 6 ESI-MS of tryptic fragments of BSA after 20 min of microwave irradiation(A) and ESI-MS of BSA(B)

表 2 和表 3 分别列出质谱图中细胞色素 c 和牛血清白蛋白的酶解肽段, 细胞色素 c 的序列覆盖率约为 45%, 牛血清白蛋白的序列覆盖率为 26%. 据文献[10]报道, 细胞色素 c 的微波酶解效率为 96%, 序列覆盖率为 89%; 文献[11]中使用微波辅助酸水解蛋白的方法得到牛血清白蛋白序列覆盖率为 37%. 相对于文献报道, 本工作中为了加快蛋白质酶解速度, 省去了加二硫苏糖醇(DTT)对二硫键进行还原和加碘代乙酰胺对巯基进行羧甲基化的步骤, 所以序列覆盖率相对于其它方法略低, 但此序列覆盖率已能完全满足蛋白质鉴定的需要, 并且该方法对蛋白质样品酶解最短时间只需要 20 min, 极大地加快了对蛋白质指纹图谱分析的速度.

Table 2 Tryptic digests of horse cytochrome c

No.	m/z	C^*	Start—end	Sequence	No.	m/z	C^*	Start—end	Sequence
1	585.2	1168.3	28—38	TGPNLHGLFGR	5	678.8	677.8	74—79	YIPGTK
2	588.9	1176.0	1—5	Acetyl-GDVEK	6	780.0	779.0	80—86	MIFAGIK
3	604.9	603.7	56—60	GITWK	7	908.1	907.2	80—87	MIFAGIKK
4	634.9	633.8	9—13	IFVQK	8	1169.2	1168.3	28—38	TGPNLHGLFGR

* C : Calculated monoisotopic mass.

Table 3 Tryptic digests of BSA

No.	<i>m/z</i>	<i>C</i> *	Start—end	Sequence	No.	<i>m/z</i>	<i>C</i> *	Start—end	Sequence
1	545.7	544.3	101—105	VASLR	11	989.0	987.6	490—498	TPVSEKVTK
2	689.9	688.4	236—241	AWSVAR	12	1001.9	1000.6	233—241	ALKAWSVAR
3	720.8	1438.8	360—371	RHPEYAVSVLLR	13	1015.0	1013.6	549—557	QTALVECK
4	789.9	788.5	257—263	LVTDLTK	14	1024.9	1023.4	499—507	CCTESLVNR
5	817.9	817.4	562—568	SLGKVGTR	15	1031.0	2059.1	434—451	YTRKVPQVSTPTLVEVSR
6	821.0	1638.9	437—451	KVPQVSTPTLVEVSR	16	1164.4	1162.6	66—75	LVNELTEFAK
7	841.9	840.5	483—489	LCVLHEK	17	1193.2	1192.6	25—34	DTHKSEIAHR
8	848.0	846.5	242—248	LSQKFPK	18	1480.4	1478.8	421—433	LGEYGFQNALIVR
9	922.9	922.5	249—256	AEFVEVTK	19	1640.3	1638.9	437—451	KVPQVSTPTLVEVSR
10	928.0	926.5	161—167	YLYEIAR					

* *C*: Calculated monoisotopic mass.

参 考 文 献

- [1] Chowdhury S. K. , Katta V. , Chait B. T. . Biochem. Biophys. Res. Commun. [J] , 1990 , **167** : 686—692
- [2] Nguyen D. N. , Becker G. W. , Riggan R. N. . J. Chromatography A [J] , 1995 , **705** : 21—45
- [3] Giguere R. J. , Bray T. L. , Duncan S. C. , *et al.* . Tetrahedron Lett. [J] , 1986 , **27** : 4945—4948
- [4] Lew A. , Krutzik P. O. , Hart M. E. , *et al.* . J. Comb. Chem. [J] , 2002 , **4** : 95—105
- [5] WANG Zi-Ming(汪子明) , ZHOU Xin(周新) , ZHENG Jian(郑健) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J] , 2005 , **26**(9) : 1623—1626
- [6] CHEN Lei(陈雷) , YANG Yi(杨屹) , ZHANG Xin-Xiang(张新祥) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J] , 2004 , **25**(1) : 35—38
- [7] Chen S. T. , Chiou S. H. , Wang K. T. . J. Chin. Chem. Soc. [J] , 1991 , **38** : 85—91
- [8] Chen S. T. , Tseng P. H. , Yu H. M. , *et al.* . J. Chin. Chem. Soc. [J] , 1997 , **44** : 169—182
- [9] Pramanik B. N. , Mirza U. A. , Ning H. Y. , *et al.* . Protein Sci. [J] , 2002 , **11** : 2676—2687
- [10] Lin S. S. , Wu C. H. , Sun M. C. , *et al.* . J. Am. Soc. Mass Spectrom [J] , 2005 , **16** : 581—588
- [11] Lin H. , Teck Y. L. , Siu K. S. . Proteomics [J] , 2006 , **6** : 586—591
- [12] JIN Qin-Han(金钦汉) , DAI Shu-Shan(戴树珊) , HUANG Ka-Ma(黄卡玛) . Microwave Chemistry(微波化学) [M] , Beijing: Science Press, 1999: 188—196
- [13] DING Lan(丁兰) , LI Yi(李毅) , LI Min-Jing(李敏晶) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J] , 2003 , **24**(8) : 1403—1405

Mini Microwave Resonance Cavity Used for Microwave-accelerated Protein-enzymolysis in Protein Mapping by Mass Spectrometry

DOU Wen-Chao, HUAN Yan-Fu, ZHANG Zhi-Quan, ZHANG Hua-Rong, WANG Chao,
LI Ming, FENG Guo-Dong*, JIN Qin-Han*

(Jilin Province Research Center for Engineering and Technology of Spectral Instruments,
College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract A mini microwave resonance cavity was used to accelerate proteolytic cleavage of cytochrome c and bovine serum albumin. The resulting mixture were then analyzed by electrospray ionization mass spectrometer (ESI-MS). The digestion efficiencies of proteins was 100%, the sequence coverages of cytochrome c and bovine serum albumin were 45% and 26%, respectively. This approach not only speeds up the digestion process to 20 minutes *versus* 16 h by using traditional methods, but also reduced the power of microwave to 20 W *versus* hundreds Watt by using other microwave-assisted enzymatic digest methods.

Keywords Microwave resonance cavity; Microwave-accelerated protein digestion; Mass spectrometry; Selective endoprotease reactions

(Ed.: A, G)