

在线纯化技术应用于MALDI-TOFMS测定溶菌酶的分子量

孙淑清¹, 陈代梅¹, 季怡萍², 刘淑莹²

(1. 天津大学理学院化学系, 天津 300072;
2. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130021)

摘要:在用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOFMS)测定蛋白质分子量的过程中,一些盐和蛋白质变性剂经常大大抑制样品信号,产生一些难以解析的离子峰,因此测试前应尽可能去除样品中的添加剂。为此,本研究建立了MALDI-TOFMS测试中在线纯化蛋白质样品的新方法。采用硝酸纤维素膜作为固相载体,将标准蛋白质溶菌酶制成含6 mol/L 盐酸胍变性剂、2% SDS表面活性剂的100 mmol/L Tris-HCL溶液进行质谱测定。结果表明,新方法简单、快速,可明显增强离子峰的强度,提高测定蛋白质分子量的灵敏度。

关键词:质谱学;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOFMS);溶菌酶;在线纯化
中图分类号:O657.63; Q556.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2004)01-29-03

Application of On-line Purification to Measure The Molecular Weight of Lysozyme by MALDI-TOFMS

SUN Shu-qing¹, CHEN Dai-mei¹, JI Yi-ping², LIU Shu-ying²

(1. Department of Chemistry School of Science, Tianjin University, Tianjin 300072;
2. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130021)

Abstract: Some salt and denaturants suppress the sample signals in the determination of protein molecular weight by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS), producing the ion peaks that is difficult to be explained, thus the additives in samples should be removed before measurement. A new method for on-line purification of samples with MALDI-TOFMS was established. The standard lysozyme was treated into 100 mmol/L Tris-HCL solution containing 6 mol/L guanidine chloride and 2% SDS surfactant with nitrocellulose membrane as stationary phase. The results showed the method is simple, rapid. Meanwhile, the intensity of signal and the sensitivity were obviously enhanced.

Key words: mass spectrometry; matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS); lysozyme; on-line purification

生物化学中,蛋白质的分子量测定有着十分重要的意义。基质辅助激光解吸电离质谱法

(MALDI-MS)自1987年末首次被报道以后,由于其极高的灵敏度、准确度、对杂质的承受力及

收稿日期:2003-05-01;修回日期:2003-09-13

作者简介:孙淑清(1958~),女(汉族),吉林长春人,博士,教授,从事生物质谱研究,E-mail:chendaimei@eyou.com

极高的质量上限,已在生物化学领域得到了广泛的应用^[1~3],特别是用于分析蛋白质^[4],至今已被分析的蛋白质达上千种之多。各种亲水性、疏水性及糖蛋白的分子量均已被测定,还测定了含有一定杂质的蛋白质及蛋白质混合物^[5]。

但在应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOFMS)测定蛋白质分子量的过程中,经常可以观察到一些盐和蛋白质变性剂抑制样品峰的情形,如十二烷基苯磺酸钠(SDS)可以改变样品-基质-溶剂之间的表面张力,从而抑制了样品吸附到基质表面,一些无机盐则与样品竞争结晶,这不但大大抑制样品信号,而且产生一些难以解析的离子峰,因此测试前应尽可能除去样品中的添加剂。Chait等^[6]采用疏水性基质,快速将样品靶在冷水中涮洗以去除样品中水溶性杂质,但该方法效果不佳。我们采用硝酸纤维素膜作为蛋白质的固相载体,在MALDI-TOFMS中测试在线纯化蛋白质样品,取得了较好的效果。

1 实验部分

1.1 主要仪器

LDI-1700 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪:原美国 Linear Scientific 公司产品,氮气激光器,激光波长 337 nm,脉冲宽度 3 ns,质谱信号为 50 次单次扫描累加,加速电压 30 kV,吸引电压 9.3 kV,检测电压 -4.75 kV,真空度 1.0×10^{-6} Pa,以正离子方式检测。

1.2 测试样品的制备

硝酸纤维素膜(孔径 0.2 μm ,厚度 50 μm):购自 Schleicher Schuell 公司,使用前剪成直径为 2.5 mm 的圆形,用双面胶固定在样品靶上,取 5 μL 乙腈将膜充分润湿,稍干后加 2 μL 蛋白质溶液(含 6 mol/L 盐酸胍、2% SDS、100 mmol/L Tris-HCL 缓冲液, pH=8.0),自然干燥后,将靶在去离子水中浸泡 10 s 左右洗去水溶性盐等杂质,加入 2 μL 基质溶液(含 0.5% TFA),自然干燥后进行 MALDI-TOFMS 测定。

2 结果与讨论

2.1 样品测试

在蛋白质样品的处理过程中,常常要使用变性剂(如盐酸胍)、表面活性剂(如 SDS)及缓冲溶液等,往往会对蛋白质分子量的分析带来影

响。我们将标准蛋白质溶菌酶制成含 6 mol/L 盐酸胍变性剂、2% SDS 表面活性剂的 100 mmol/L Tris-HCL 溶液,进行 MALDI 质谱检测,结果示于图 1。谱图中的信号比较弱,它们是 50 次以上扫描的累加结果,说明分子离子的丰度很低。我们按实验部分描述的方法对样品进行了在线纯化处理,再进行质谱检测,结果示于图 2。图 2 中分子离子峰的强度明显提高,不仅能观察到分子离子峰,还可以看到双电荷峰和二聚体峰,两张谱图的显著差别说明用硝酸纤维素膜作为蛋白质载体,在线纯化的方法是很有有效的。因为硝酸纤维素膜能吸附蛋白质和肽,具有较高的吸附量,在操作样品过程中(如冲洗、酶切、化学裂解或修饰)样品不丢失,干燥后的膜上蛋白质能很好地重新溶剂化,蛋白质可在膜表面结晶并干燥。

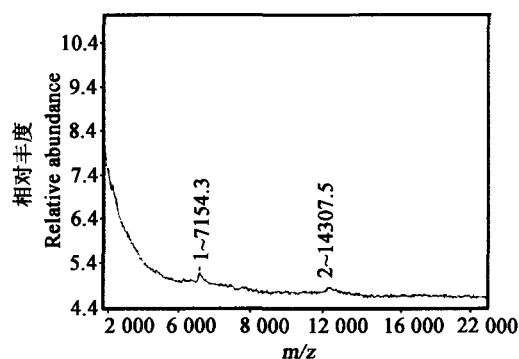


图 1 溶菌酶的 MALDI 质谱图

Fig. 1 MALDI mass spectrum of lysozyme (6 mol/L 盐酸胍变性剂(6 mol/L guanidine chloride); 2% SDS 表面活性剂(2% SDS surface active agent))

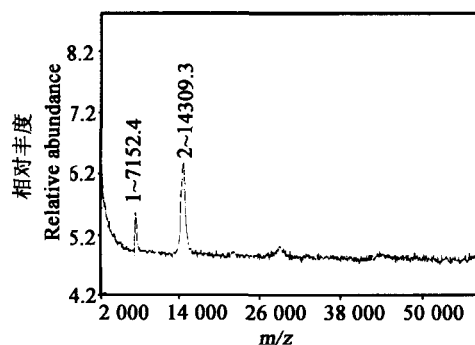


图 2 溶菌酶在线纯化的 MALDI 质谱图

Fig. 2 MALDI mass spectrum of on-line purified lysozyme

2.2 方法的准确度

为探讨方法的准确度, 我们使用标准蛋白质(不含杂质)进行对照测试, 结果示于图 3。由图 2 和图 3 比较可见, 分子量准确度基本不变, 相对偏差为 0.05%, 峰形呈良好的正态分布, 不仅分子离子峰为基峰, 而且双电荷峰也有较高的强度, 但二聚体峰很弱。

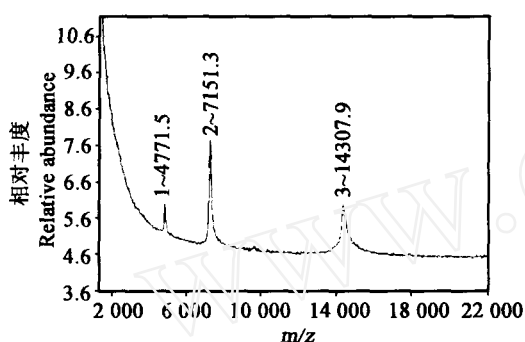


图 3 标准溶菌酶的 MALDI 质谱图

Fig. 3 MALDI mass spectrum of standard lysozyme

3 小 结

从以上工作可以看出, 在 MALDI-TOFMS 测定中, 采用了一种在线纯化蛋白质的新方法, 测量简单、快速, 能够提高蛋白质分子量测定的灵敏度, 各种离子的信噪比和丰度得到改善。

参考文献:

- [1] Roepstorff P. Mass Spectrometry in Protein Studies From Genome to Function[J]. Current Opinion in Biotech, 1997, (8):6~13.
- [2] Fitzgerald MC, Parr GR, Smith LM. Basic Matrices for the Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins and Oligonucleotides [J]. Anal Chem, 1993, (65): 3 204~3 208.
- [3] Helin J, Caldentey J, Kaikkinen N, et al. Analysis of the Multimeric State of Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry After Cross-linking With Glutaraldehyde [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1999, (13):185~190.
- [4] Bordini E, Hamdan M, Righetti PG. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Monitoring Alkylation of β -lactoglobulin Exposed to Aseries of N-substituted Acrylamide Monomers[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1999, (13):2 209~2 215.
- [5] Grozzo D, Cozzolino R, Giorgi SD, et al. Use of Hydroxyacetophenones as Matrices for the Analysis of High Molecular Weight Gluten Mixtures by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1999, (13):2 084~2 089.
- [6] Chait BT. High-accuracy Molecular Mass Determination of Proteins Using Matrix-assisted Laser Desorption Mass Spectrometry [J]. Anal Chem, 1990, 62(17):1 836~1 840.

欢迎订阅 2004 年《质谱学报》

《质谱学报》是经国家科委批准, 中国质谱学会、北京中科科仪技术发展有限责任公司共同主办, 中国原子能科学研究院承办的专业性学术期刊, 中国科学院《核心期刊》之一。季刊, 国内外公开发行。国际标准刊号: ISSN 1004-2997, 国内刊号: CN 11-2979/TH; 国内邮发代号: 82-349, 国外发行代号: Q1717。

《质谱学报》先后被《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》、《中国科学引文数据库》、《中国期刊全文数据库(CJFD)》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中文科技期刊数据库》、《中国无机分析化学文摘》、《方正 Apabi 电子期刊》等收录, 并已入网“万方数据—数字化期刊群”。本刊全文收录网址:

<http://zpxb.chinajournal.net.cn>; <http://zpxb.periodicals.net.cn>。

银行汇款: 工商银行北京房山支行二六六分理处, 中国原子能科学研究院财务处会计科

帐号: 266090088003-76(汇款时请写明汇款用途: 订阅《质谱学报》杂志)

地址: 北京 275 信箱 65 分箱《质谱学报》编辑部 邮编: 102413

电话: 010-69357734; 传真: 010-69357285; E-mail: jcmss401@21cn.com