

可预测等电点的高分辨的分步收集多肽

—— 高分辨的流程，在自动的质谱鉴定中用多肽的等电点先去除假阳性结果

Kristina Uhlén, Jesper J. Hedberg, Lars Fögelström, David Fenyo, and Bengt Bjellqvist
GE Healthcare/Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden

摘要

为保证充分的鉴定和定量蛋白，尤其对于低丰度蛋白，高分辨预分级复杂的生物样品是必要的。另外，自动的多肽/蛋白质质谱图解析的常见问题是如何得到准确的鉴定结果。因此，我们采用高分辨等电聚焦方法先分步收集多肽，再进行反相液相色谱分离，同时进行在线串联质谱分析。等电聚焦分离方法具有不可比拟的高重复性和等电点预测能力。而且多肽等电点的预测可先去除假阳性结果，显著提高最终输出数据的质量。在最初的试验中，等电聚焦分步收集胰蛋白酶酶切酵母多肽，鉴定产生 3927 个独特的多肽和 1253 个唯一的蛋白。结合串联质谱鉴定结果和 pI 过滤可生成高可信度的鉴定结果。

实验流程

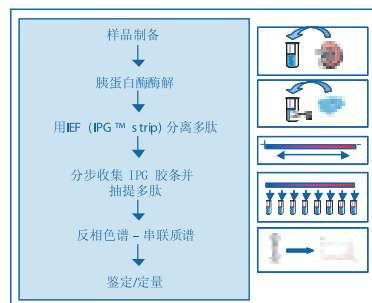


图 1 用于分步收集多肽流程的样品是酶切的蛋白。生成的多肽第一向用 Immobiline™ 干胶条进行等电聚焦分离。聚焦后胶条分成多个组分，每个组分从胶中抽提分离的多肽到液相。抽提的多肽进一步用在线的反相色谱串联质谱系统分离和分析 [1]。得到的串联质谱图用于数据库检索。

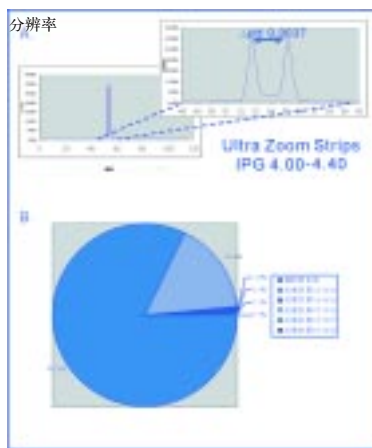


图 2. A. 采用 Immobiline 干胶条得到高分辨率结果，聚焦的 Cy5- 标记多肽的荧光强度谱图显示等电点差异 0.0037 pH 单位的多肽都可分开。

B. 纵览从一根 Immobiline 干胶条的七个组分鉴定的多肽。每个组分对应于大约 0.02 pH 单位，超过 3mm。这个例子的组分覆盖 24 cm 胶条中的 2 cm，pH 范围是 4.50-4.60。80% 鉴定的多肽都是唯一的，意味着他们仅存在于一个组分，显示了这个技术的卓越的分离能力。

参考文献

- [1] Cargile et al; Electrophoresis, 2004, 25, 936-945
- [2] López-Ferrer et al; Analytical Chemistry, 2004, 76, 6853-6860
- [3] Craig and Beavis; Rapid Commun. Mass Spectrom., 2003, 17, 2310

结论

- 该方法对复杂的蛋白质组样品而言，是上 LC 前的非常好的预分级步骤
- 这个流程生成的多肽信息，可早期去除假阳性结果，显著提高输出数据的质量
- 这个流程包含高分辨率、高载样量 (>10 mg 多肽 / 220 mm) 和高重复性的分离方法
- pI 预测的误差在 +/- 0.05 pH 单位 (到目前为止) 根本上提高了数据库检索的准确性。

预测等电点

像其它基于蛋白质组方法的质谱技术一样，自动多肽/蛋白的质谱图解析问题是难以分辨正确的或假阳性的鉴定结果。因此需要得到更可信结果的方法 [2]。采用等电聚焦分离方法，预测的等电点可作为一个标准。与该标准相结合，可确定鉴定结果的可靠性，减少样品的复杂性。分步收集后，每个组分的 pH- 范围是已知，这些 pH- 范围可用于过滤鉴定结果。任何等电点超出理论 pH- 范围的多肽，可以非常可信的被认为是假阳性结果。



图 3. 举例说明根据已知的 pH 范围从一个组分已鉴定的多肽中去除假阳性结果

多肽抽提

为分析分离的 Immobiline 干胶条的凝胶组分，样品需从 Immobiline 干胶条的凝胶相转移到液相。把干胶条分成合适数目的分离组分，每个组分的多肽才能比较容易的被抽提。

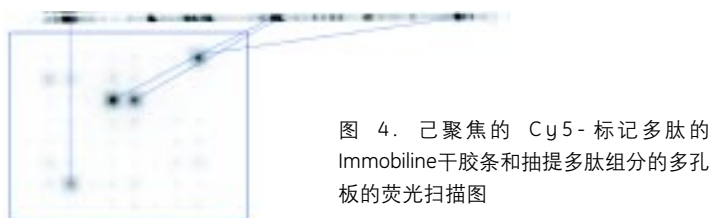


图 4. 已聚焦的 Cy5- 标记多肽的 Immobiline 干胶条和抽提多肽组分的多孔板的荧光扫描图

结果

采用这个方法，从胰蛋白酶切 *Saccharomyces cerevisiae* 分步收集的多肽，仅分析了 1/3 生成的多肽就鉴定了 3927 个独特的多肽和 1253 个唯一的蛋白。结合串联质谱 [3] 鉴定结果，经等电点过滤后可得到非常可信的多肽和蛋白鉴定结果。