

CZE-MS 方法对蛋白复合物的非变性质谱分析

目的

采用 PS2 型中性涂层毛细管, 通过电渗流驱动的同轴鞘液 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 实现 CZE-MS 对大肠杆菌的 70S 核糖体蛋白的非变性质谱分析。

背景

目前, 对于理解细胞过程或阐明疾病机制来说, 了解蛋白质的结构及蛋白质与金属或配体之间的非共价相互作用是非常必要的。但长期以来, 在分析复杂蛋白体系时, 对蛋白互作的保留和表征一直是一个难题, 目前已有许多分析策略来研究蛋白互作, 包括光谱、显微镜、质谱及其他分子生物学方法。其中质谱虽然可以鉴定单个蛋白质, 但对于蛋白复合物的表征来说, 仍面临不小的挑战。常规分析中, 需要将蛋白变性和酶解处理, 从而导致蛋白配体的解离和蛋白质构象信息的缺失。而非变性质谱方法, 可保留蛋白和配体间的非共价作用, 维持蛋白与金属或配体形成的高级结构。在本实验法中, 使用 PS2 型中性涂层毛细管, 通过 CZE-MS 对大肠杆菌核糖体蛋白进行非变性质谱分析。

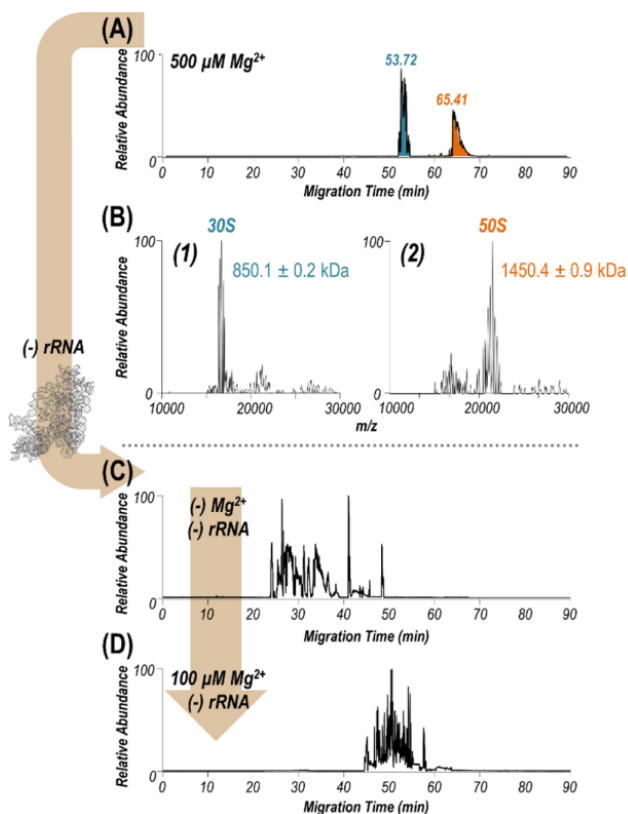


图1. A 为大肠杆菌核糖体蛋白的基峰电泳图, BGE 为含有 500 μM 醋酸镁的溶液; B 为 A 图中两个主要的电泳峰对应的质谱图; C 和 D 为采用不含 Mg²⁺ 和 100 μM Mg²⁺ 的 BGE 所得到的基峰电泳图。

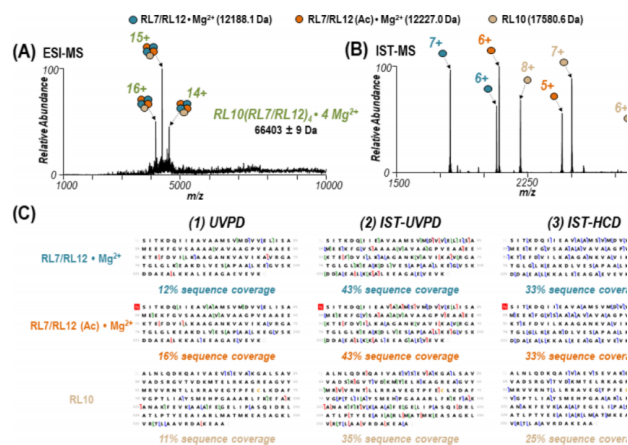


图2. A 为 ESI 模式下得到的大肠杆菌核糖体蛋白聚合体的质谱图; B 为 IST-MS 模式下得到的核糖体蛋白单体的质谱图, C 为不同 MS/MS 模式下得到的核糖体蛋白的序列覆盖度结果。

解决方案

仪器试剂:

CMP Scientific ECE-001 型毛细管电泳仪。EMASS-II 型CE-MS联用离子源 (CMPScientific, P/N: EM3001-T)。100 cm PS2 型中性涂层分离毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-PS2-360/150-50-100-B1)。BGE 为 25mM 醋酸铵, SL 为 10mM 醋酸铵。

实验方法:

样品进样5 psi, 30-45s。分离电压 +30kV, 同时施加 0.5psi 压力。外接电源电喷雾电压 2.4-2.6 kV。

质谱参数:

采集范围 500-2,000m/z。二级质谱分辨率 15,000, AGC 目标值 3E6, 最大离子注入时间 50ms。

样本制备:

核糖体悬浮液中加入 1/4 体积的 100mM 醋酸镁和等体积的冰乙酸, 4°C 孵育 1 小时, 10,000×rpm 离心 5 分钟。去除上清, 并用含有 0 或 100μM 醋酸镁的 25mM 醋酸铵稀释, 最终浓度为 30μg/μL。

结果

本方法通过将毛细管区带电泳与配备有 UVPD 的高分辨质谱仪联用, 实现 CZE-MS 对大肠杆菌 70S 核糖体的非变性质谱分析。图 1 为采用不同浓度醋酸镁作为 BGE 对核糖体蛋白进行 CZE 分离的结果比较。在 500μM 醋酸镁的条件下观察到两个电泳峰, 鉴定结果为完整质量的 30S 和 50S 亚基, 与之前相关研究结果一致。通过沉淀去除 rRNA 后, 样品溶液中的多种蛋白质和蛋白质复合物可被分离鉴定出来。完整的蛋白复合物仅在较高的醋酸镁浓度 (100μM) 下可以被分析出来。图2 显示了采用多种 MS/MS 模式对蛋白复合物进行表征分析的结果, 图2A (对应 图1D) 为 ESI 模式得到的核糖体蛋白聚合体的质谱图。图2B 是在 IST-MS 模式下得到核糖体蛋白单体的质谱图。图2C 为不同 MS/MS 模式下得到的核糖体蛋白的序列覆盖度结果。

总结

本方法采用 ECE-001 型毛细管电泳仪、PS2 型中性涂层毛细管和 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 通过 CZE-MS 对大肠杆菌的 70S 核糖体中的蛋白复合物进行非变性质谱分析, 鉴定出 84 种蛋白复合物。本方法适用于在非变性条件下对复杂、低丰度蛋白复合物的快速准确分析, 为深入了解蛋白间的相互作用奠定基础。