

CZE-MS 联用技术对非变性蛋白质组学的分析

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, 对大肠杆菌蛋白组进行非变性的 CZE-MS 分析。

背景

非变性蛋白组学旨在天然条件下表征复杂的蛋白质组, 并最终对来自于细胞的内源蛋白复合物进行详细分析。这需要新型的分析平台对蛋白复合物先进行高效分离, 之后通过高分辨质谱 (MS) 对分离产物进行鉴定。

在本实验中, 我们构建了体积排阻色谱-毛细管区带电泳-质谱 (SEC-CZE-MS) 联用平台进行非变性蛋白组学分析的方法体系。通过该联用平台, 从大肠杆菌蛋白质组中鉴定出 144 个蛋白质, 672 个蛋白质变体, 以及 23 个蛋白复合物。蛋白复合物包括4种蛋白质同源二聚体、16 种蛋白质-金属复合物、2种蛋白质-[2Fe-2S] 复合物和1种蛋白质-谷氨酰胺复合物。

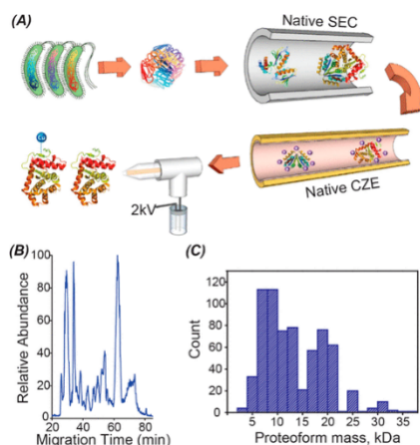


图1. 大肠杆菌裂液通过 SEC-CZE-MS 分析得到的结果。A 为分析工作流程的示意图; B 为实验得到的总离子流电泳图; C 为鉴定到的蛋白变体的质量分布统计图。

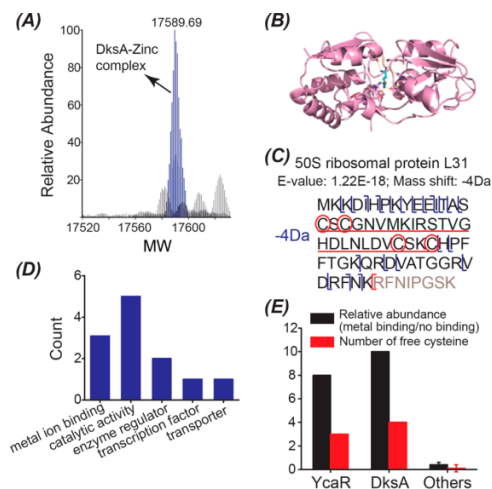


图2. 部分已鉴定的蛋白复合物的详细分析结果。A 为 RNA 聚合酶结合转录因子 DksA 与锌结合的蛋白复合物解卷积的质谱图; B 为胍基蛋白与谷氨酰胺结合的蛋白复合物的晶体结构图; C 为 50S 核糖体蛋白的氨基酸序列及二级碎裂的位点; D 为部分已鉴定蛋白金属复合物的分子功能分布; E 为对某些已鉴定到的蛋白与金属结合情况的统计。

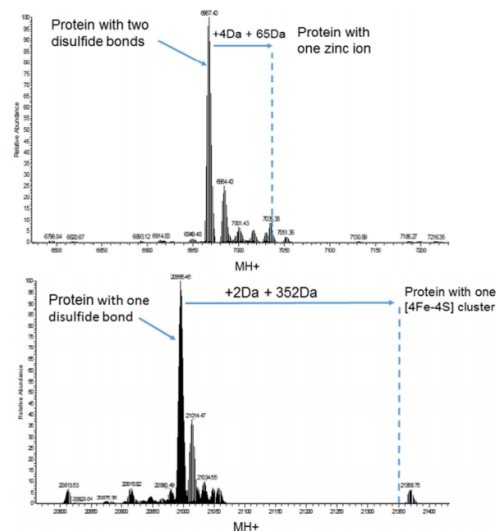


图3. A 为未结合锌的 50S 核糖体蛋白 L31 解卷积后的质谱图; B 为不结合辅助因子的铁硫蛋白 NfuA 解卷积后的质谱图。

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)。100cm 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 50 mM 醋酸铵, SL 为 25mM 醋酸铵。

实验方法:

样品进样 5psi, 20s。分离电离电压 15kV, 同时施加 1psi 压力。外接电源电喷雾电压 2kV。

质谱参数:

采集范围 1,000-4,000 m/z。一级质谱分辨率 240,000, AGC 目标值 3E6, 最大离子注入时间 200ms。二级质谱分辨率 120,000, AGC 目标值 1E6, 最大离子注入时间 500ms。传输毛细管温度 200°C, S-Lens 50, NCE35, 动态排除 30s。

结果

图1 是对大肠杆菌裂解物进行 CZE-MS 分析的结果, 分离窗口为 1 小时, 鉴定到的蛋白质变体分子量分布在 5-35kDa之间。图 2 是部分已鉴定的蛋白复合物的详细结果, A是 DksA-锌复合物经解卷积后的质谱图, B 为谷氨酰胺结合的周质蛋白复合物的晶体结构, C 是 50S 核糖体蛋白 L31 部分氨基酸序列和二级碎裂发生的位点, D 是蛋白-金属复合物的功能分析结果, E是对为某些已鉴定到的蛋白与金属结合情况的统计。图3 为 50S 核糖体蛋白 L31 和铁硫蛋白NfuA的分析结果, 可以看出其中有二硫键的蛋白形式占多数, 表明 50S 核糖体蛋白 L31 和 NfuA 蛋白大部分以载脂蛋白形式存在。

总结

本实验采用体积排阻色谱-毛细管区带电泳-质谱 (SEC-CZE-MS) 联用技术进行非变性蛋白组学分析, 为细胞内源性的蛋白复合物研究提供了高效简单的分析平台, 也为进一步深入探索这些蛋白复合物的生物学意义奠定了基础。



扫一扫, 关注永道致远微信

www.evergauge.cn

www.cmpscientific.com

永道致远科学技术有限公司

上海市浦东新区康新公路3399弄26号楼218室