

## CZE-MS/MS 方法对组蛋白进行 Top-Down 蛋白质组学的分析

### 目的

采用电渗流驱动鞘流液的 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源，结合 SEC 色谱技术，通过 CZE-MS/MS 对牛组蛋白进行 top-down 蛋白组学的分析。

### 背景

组蛋白作为核小体的关键组件，在维持染色质结构和调节表观遗传调控方面具有重要意义，其N端会发生各种翻译后修饰(PTMs)，如甲基化、乙酰化和磷酸化，这些修饰在调节基因表达中起核心作用，同时也增加了组蛋白编码的复杂性。自上而下的蛋白质组学(TDP)可直接表征完整的组蛋白变体，保存并提供组蛋白变体各种PTM信息，因此，TDP是解读组蛋白编码的理想方法。TDP通常采用反相液相色谱(RPLC)-串联质谱(MS/MS)来进行分析。但由于组蛋白变体数量众多且极为复杂，需要开发具有更好分离能力和更高灵敏度的分析方法。

毛细管区带电泳-串联质谱(CZE-MS/MS)的分析性能已在TDP研究中得到验证，目前已有采用CZE-MS/MS方法表征完整组蛋白的报道。本实验通过电渗流驱动鞘流液EMASS-II型离子源接口，结合SEC色谱技术，通过CZE-MS/MS对牛组蛋白进行top-down蛋白组学的分析。可鉴定出约400个组蛋白变体。在蛋白鉴定数一致时，CZE-MS/MS与RPLC-MS/MS相比，所需样本量更少，分离能力和灵敏度更高。



图1. CZE-MS方法对组蛋白变体分析的流程示意图。

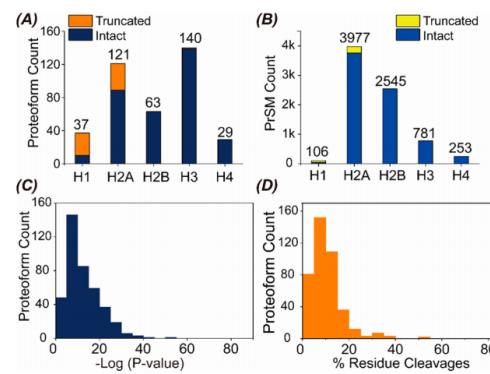


图2. SEC-CZE-MS/MS 分析得到的数据结果。A 为组蛋白变体数目分布图；B 为组蛋白变体PrSM（蛋白变体匹配到的图谱）的统计图；C 为鉴定到的组蛋白变体P值分布图；D 为组蛋白变体的序列覆盖率统计图。

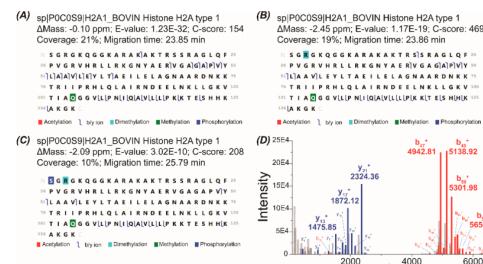


图3. A-C为三种不同翻译后修饰的H2A I型组蛋白的氨基酸序列和碎裂模式。D为A图里的蛋白变体的二级图谱，x轴为解卷积后的m/z，y轴为响应强度。

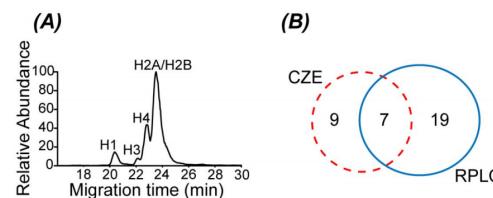


图4. A为组蛋白变体的CZE-MS分析结果；B为CZE和RPLC鉴定到的组蛋白H3.1变体形式的比较结果。

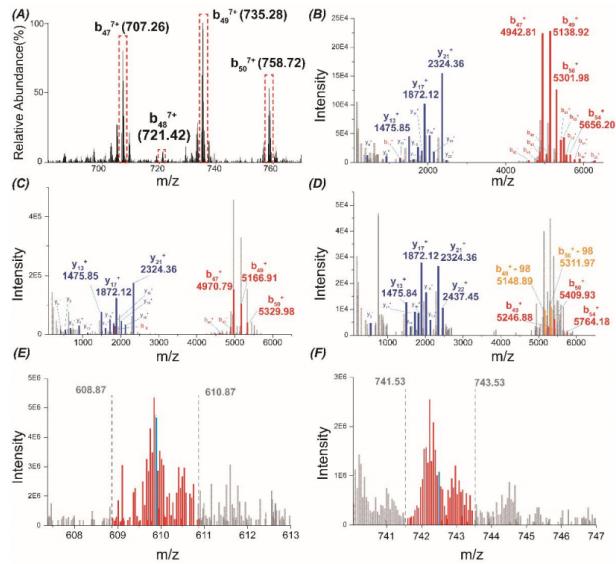


图5. A 为图3A 的蛋白的二级图谱。B-D为图3 A-C中蛋白的二级图谱。E-F 分别为图3B 和图3C 的两个蛋白所选取的母离子的隔离窗口(2 Da)。

## 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(CMP Scientific, P/N: EM3001-T)。100 cm PS2分离毛细管(CMP Scientific, P/N:E-SC-PS2-360/150-50-100-B1); BGE为5%乙酸, SL为0.2%甲酸和10%甲醇。

### 实验方法:

样品进样: 5 psi, 5秒(进样量为 25nL)。分离电压: 30 kV。ESI电压: 2.2 kV。毛细管到喷针尖端距离为 0.3mm, 喷针尖端到质谱的距离为 2mm。

### 质谱参数:

MS采集范围 400-1,500 m/z, 分辨率为12,000, AGC目标值为1E6, 最大离子注入时间为50ms。MS/MS的采集范围 200-2,000m/z, 分辨率为 60,000, AGC目标值为1E6, 最大离子注入时间为 400 ms。NCE stepping为 12%、16% 和 20%。动态排除设置为50秒。质谱仪其他参数设置为默认值。

## 结果

图1 为 CZE-MS 方法对组蛋白变体分析的流程示意图。CZE-MS/MS 对组蛋白的鉴定结果见 图2, 鉴定了 140 种H3型, 121 种 H2A 型, 63 种 H2B 型, 37 种 H1 型和 29种H4型的组蛋白变体, 其中 H2A 型的丰度最高。图3 显示的是三种不同翻译后修饰的 H2A I型组蛋白的氨基酸序列和碎裂模式。图5 展示了这三种蛋白解卷积后的二级图谱, 并对响应较高的碎片离子进行了注释。图4 为组蛋白变体的 CZE-MS 分析结果, 在 30 分钟内可以完成快速高效的分离。跟 RPLC 的分析结果相比, 约三分之一的蛋白变体仅能通过CZE鉴定得到。

## 总结

在实验中, 结合SEC和EMASS-II型CZE-MS/MS联用技术, 通过Top-down蛋白组学的方法实现了对组蛋白变体的分析。本方法具有高灵敏度, 高分辨率, 高通量的优势, 可从完整蛋白形态中鉴定出携带各种翻译后修饰(PTMs)的组蛋白变体, 如乙酰化、甲基化、磷酸化和琥珀酰化。本方法可以与其他分析方法形成互补, 共同实现组蛋白变体的全面表征分析。



以质谱之道 致生命之远

扫一扫, 关注永道致远微信

[www.evergauge.cn](http://www.evergauge.cn)

[www.cmpscientific.com](http://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