

蛋白质在线酶切液相色谱仪 Perfinity iDP 和三重四极杆质谱联用分析人胰岛素

LCMSMS-180

摘要: Perfinity iDP 系统是岛津最近推出的蛋白质在线酶切液相色谱仪, 将 Perfinity iDP 与三重四极杆质谱联用, 可以扩大其应用领域, 例如能够进行定量蛋白质组学的研究。本文演示了 Perfinity iDP 和三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用分析人胰岛素标准蛋白样品, 得到的结果与蛋白质数据库中理论结果吻合, 表明 Perfinity iDP 和三重四极杆质谱联用可以实现对蛋白质样品的准确分析。

关键词: 蛋白质在线酶切液相色谱仪 Perfinity iDP 三重四极杆质谱人胰岛素 Insulin

Perfinity iDP (Integrated Digestion Platform) 是自动化的在线蛋白质酶切液相色谱, 具有 3 柱系统, 包括自动酶解柱、脱盐柱、反向色谱柱。Perfinity iDP 的主要特点包括: 高效的酶解效率 (1 分钟)、优良的重现性 (<10%) 和界面友好的软件。Perfinity iDP 采用高效率的胰蛋白酶固定化色谱柱, 对样品中的蛋白质进行在线酶切。通过使用已最优化的专用胰蛋白酶消解缓冲液, 提高了消解效率, 实现了最快 1 分钟完成的在线酶切。而传统的手工酶解方法则需要 18-24 小时。在重现性方面, 由于 Perfinity iDP 系统将从酶切到肽段分析的一系列过程在线自动化, 通过在检测部分追加 LCMS, 可实现直到质谱分析的一系列流程的自动化, 因此, 与以往的手动

处理相比, 可以统一控制酶反应、浓缩、脱盐等处理, 降低了人为误差, 提高了分析精度。关于控制系统的软件, 在从胰蛋白酶消解、脱盐直到 HPLC 分析的一系列过程中, 专用的 Perfinity iDP 软件支持方法选择和制作。只需输入酶切时间、分析色谱柱尺寸、梯度时间等最小限度的项目便可自动最优化分析所需的各种参数。

这里演示了 Perfinity iDP 和三重四极杆质谱 LCMS-8040 联合应用对人胰岛素进行了分析。将质谱所得结果与蛋白质数据库中信息进行对比, 本文所得结果合理。

实验部分

1.1 仪器

Perfinity iDP 系统, 包括 LC-20ADXR×2 (输液泵), SIL-20ACHT (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱), FCV-36AH×2, CBM-20A (系统控制器), DGU-20A₅ (脱气机), LC-20AD+LPGE, SPD-20A (紫外检测器), Perfinity iDP V 1.0.0.30 (工作站), LabSolution V5.65 SP1 (工作站)。

三重四极杆质谱 LCMS-8040

1.2 试剂

流动相 A: 将 490 mL 水、1 mL 乙腈及 0.5 mL 甲酸混合。脱气。

流动相 B: 将 50 mL 水、450 mL 乙腈及 0.5 mL 甲酸混合。脱气。

流动相 C-A: 将预处理 Kit 中 “Wash Solution Concentrate” 加到烧杯中, 加 1 L 水充分混合、溶解。将配好溶液转移至流动相瓶中。脱气。

流动相 C-B: 将预处理 Kit 中 “Digest Buffer Concentrate” 加到烧杯中, 加 500 mL 水和 20 mL 异丙醇充分混合、溶解。加水至 900 mL, 调整 pH

值至 8.4 (可接受范围: 7.9~8.4)。转移到容量瓶中, 加水定容至 1 L。将配好溶液转移至流动相瓶中。脱气。

流动相 C-D: 将预处理 Kit 中 “Re-equilibration Concentrate” 加到烧杯中, 加 600 mL 水和 250 mL 异丙醇充分混合、溶解。转移到容量瓶中, 加水定容至 1 L。将配好溶液转移至流动相瓶中。脱气。

人 Insulin 标准样品: 加入 10 mg Insulin 于小瓶中, 加入 1 mL 流动相 A, 溶解作为 stock 溶液。取 50 μ L 的 stock 溶液和 4.95 mL “Digest Buffer Concentrate” 在小瓶中混合。混匀后加 1 mL 溶液到 1.5 mL 样品瓶中。

1.3 分析步骤

1.3.1 系统连接

使用 Labsolution V5.65, 配制 Instrument 001 为 Perfinity iDP, Instrument 002 为 MS-8040 (MS Only)。

1.3.2 使用 Perfinity iDP 软件设计参数如表 1 所示。

表 1 Perfinity iDP 参数

Digestion Time	4 min
Reversed Phase Column Diameter	2.1 mm
Reversed Phase Column Length	100 mm
Reversed Phase Flow Rate	0.5 mL/min
Reversed Phase Initial	10% B
Reversed Phase Final	50% B
Gradient Length	5 min
Oven Temperature	40

1.3.3 用 Perfinity iDP 软件设置批表, 见表 2。

表 2 Perfinity iDP 批表

Method	Sample Name	File Name	Vial	Inj. Vol
Select the method saved in the previous step	Data-01	Data-01	-1	50
Select the method saved in the previous step	Data-02	Data-02	-1	50
Select the method saved in the previous step	Data-03	Data-03	1	50

1.3.4 建立质谱方法如表 3 所示。

表 3 质谱方法

Type	Event#	+/-	Compound Name m/z
Q3 Scan	1	+	150:1500
- Product Ion Scan	2	+	>150:1500
- Product Ion Scan	3	+	>150:1500
- Product Ion Scan	4	+	>150:1500

1.3.5 建立 MS only 批表如表 4 所示。

表 4 MS only 批表

Method	Sample Name	File Name	Vial	Inj. Vol
Select the method saved in the previous step	Data-01	Data-01	-1	50
Select the method saved in the previous step	Data-02	Data-02	-1	50
Select the method saved in the previous step	Data-03	Data-03	1	50

1.3.6 提交 MS only 批表。

1.3.7 执行 Perfinity iDP 批表。

■ 结果讨论

实验结果如图 1 和图 2 所示。根据数据库 [Http://www.expasy.org](http://www.expasy.org)，搜索 Insulin 被 Trypsin 酶切质谱分析得到的信息如图 3 所示。数据库显示 Insulin 的酶切产物质谱分析得到两种产物，其中 GFFYTPK 肽的 Mass 值是 430.2211，实验结果 Peak 1 的 m/z 430 与其符合，说明 Peak 1 的 m/z 430 与 Insulin GFFYTPK 的 $[M+2H]^{2+}$ 对应，而 Peak 1 的 m/z 859 与 Insulin GFFYTPK 的 $[M+H]^+$ 对应。根据数据库搜索结果，Insulin 酶切之后得到的另一个产物的 $[M+2H]^{2+}$ 峰的 m/z 为 2426.1119，由于其超过质谱的响应范围，并且未发现此产物的带更多电荷的峰，故这里只得到酶切产物 GFFYTPK 的质谱图。

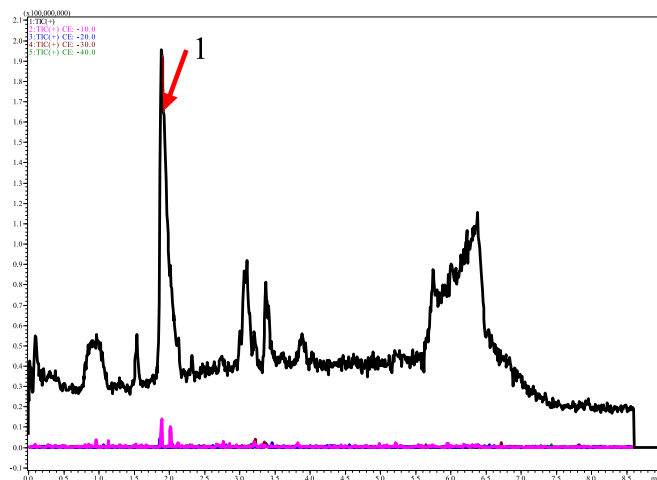


图 1 在线酶切 Insulin(LCMS-8040)

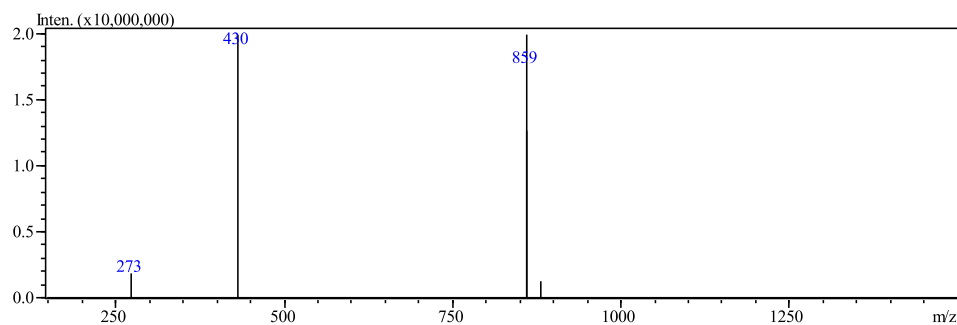


图 2 图 1 中 Peak 1 的 MS 图

The entered sequence is:

10 20 30 40 50
GIVEQCCTSI CSLYQLENYC NFNQHLGGS HLVEALYLVC GERGFFYTPK T

The selected enzyme is: Trypsin

Maximum number of missed cleavages (MC): 0

All cysteines in reduced form.

Methionines have not been oxidized.

Displaying peptides with a mass bigger than 500 Dalton.

Using monoisotopic masses of the occurring amino acid residues and giving peptide masses as $[M+2H]^{2+}$.

The peptide masses from your sequence are:

[Theoretical pI: 5.39 / Mw (average mass): 5795.65 / Mw (monoisotopic mass): 5791.67]

mass	position	#MC	modifications	peptide sequence
2426.1119	1-43	0		GIVEQCCTSI CSLYQLENYC NFNQHLGGS HLVEALYLVC GER
430.2211	44-50	0		GFFYTPK

98.0% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 500 Da or > 100000000000 Da):

10 20 30 40 50
GIVEQCCTSI CSLYQLENYC NFNQHLGGS HLVEALYLVC GERGFFYTPK t

图3 蛋白数据库中 Insulin 被 Trypsin 酶切质谱分析信息

结论

本文应用蛋白质在线酶切液相色谱仪 Perfinity iDP 和三重四极杆质谱对人胰岛素进行了分析，得到的结果和理论相符。本方法为定量蛋白质组学的研究提供了一种新的分析手段。