

# 应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 分析马肌红蛋白氨基酸序列

## PPSQ-001

**摘要：**本文应用蛋白质测序仪 PPSQ-53A 测定 PTH-AA( 乙内酰苯硫脲 - 氨基酸 ) 混合标准品，以得到的各 PTH-AA 液相保留时间为基准，测定马肌红蛋白前 22 个氨基酸的序列，实验结果与理论序列一致，验证了此方法的可靠性。

**关键词：**蛋白质测序仪 PPSQ-53A 氨基酸 序列 乙内 酰苯硫脲 - 氨基酸 马肌红蛋白

几乎所有蛋白质合成都起始于 N 端，其序列组成对于蛋白质整体的生物学功能有着重要的影响力。PPSQ-53A 是三重反应 N 端蛋白测序仪，基于经典的 Edman 降解法原理，进行蛋白 N 端测序。它采用岛津 SPD-M30A 光电二极管阵列检测器，灵敏度更高。检测器配有毛细管，光程长度是标准检测池的 8.5 倍，增加了灵敏度，能进行较长序列的蛋白质研究。另外，PPSQ 53A 软件可配置为满足实验室的各种需要，如监管、研究、开发和学术研究。该软件完全可应对 FDA 21 CFR

Part 11 指南对于安全、用户管理和审计追踪的要求。软件操作简便，数据分析功能强大，能进行色谱图的后处理、多重色谱的叠加、色谱减法和氨基酸序列的自动检测。

本文首先使用 PPSQ-53A 分析 PTH-AA 混合标准品，得到各种 PTH-AA 的液相保留时间，之后测定马心肌红蛋白，以各种 PTH-AA 的液相保留时间为基准，测得马肌红蛋白前 22 个氨基酸序列，实验结果与理论序列一致。

## 实验部分

### 1.1 仪器

PPSQ 53A DB 版

### 1.2 试剂和样品

5% phenyl isothiocyanate n-heptane solution (Wako, Code: 161-27341)

12% trimethylamine solution(Wako, Code: 200-20021)

25% trifluoroacetic acid (Wako, Code: 204-20041)

PTH-amino acids mobile phase(Wako, Code: 168-27351)

Trifluoroacetic acid(Wako, Code: 207-20031)

Glass fiber disks, TFA treated(Wako, Code: 072-06461)

Wakopak Wakosil-IIPTH- 4.6 × 250 mm (Wako, Code: 235-63951)

PTH-amino acids mixture standard(Wako, Code: 165-27361)

Ethyl acetate(Wako, Code: 052-09041)

1-chlorobutane(Wako, Code: 033-24371)

37% acetonitrile solution(Wako, Code: 018-26041)

Apomyoglobin from equine skeletal muscle(Sigma, Code: A8673)

Polybrene(Sigma, Code: S2667)

### 1.3 样品配制及上样

1.3.1 PTH-AA 混合标准样品：使用 2 mL 37% 乙腈溶液溶解 PTH-AA 混合标准样品，配制成 10 nmol/mL 的储存液，再使用 37% 乙腈溶液将部分上述溶液稀释 20 倍至 0.5 nmol/mL。取 90  $\mu$ L PTH-AA 混合标准品置于样品管内 ( 分析时使用 50  $\mu$ L)。

1.3.2 马肌红蛋白样品：在试剂瓶内加 5 mM 醋酸水溶液，溶解肌红蛋白，配制成浓度为 10 pmol/mL。将 5  $\mu$ L 样品滴到 PVDF( 聚偏氟乙烯 ) 膜上，使用两片 PTFE( 聚四氟乙烯 ) 膜包夹 PVDF 膜，装入 PPSQ 反应器中，安装好反应器。

## 1.4 PPSQ 分析条件

1.4.1 PTH-AA 混合标准样品：循环次数选择为 1，样品量为 25 pmol，开始号为 1，分析方法选择仪器自带的 PTH-AA demo 方法。

1.4.2 马肌红蛋白样品：循环次数选择为 23，样品量为 50 pmol，开始号为 1，分析方法为校准后 PTH-AA 的分析方法。

## 结果讨论

图 1 是 PTH-AA 混合标准样品的色谱图。得到色谱图数据后，根据分析结果修改分析时所用 ID 表 (图 2) 内的保留时间，执行校准，将此文件保存为分析样品所用的方法。图 3-24 依次是分析马肌红蛋白前 22 个氨基酸的差减色谱图，差减色谱图是后一个色谱图减去前一个色谱图得到的色谱图，差减色谱图能更清晰地显示每个循环色谱图中峰的变化。图 25 是马肌红蛋白前 22 个氨基酸的序列。此序列与马肌红蛋白前 22 个氨基酸理论序列一致，验证了此方法的准确性。

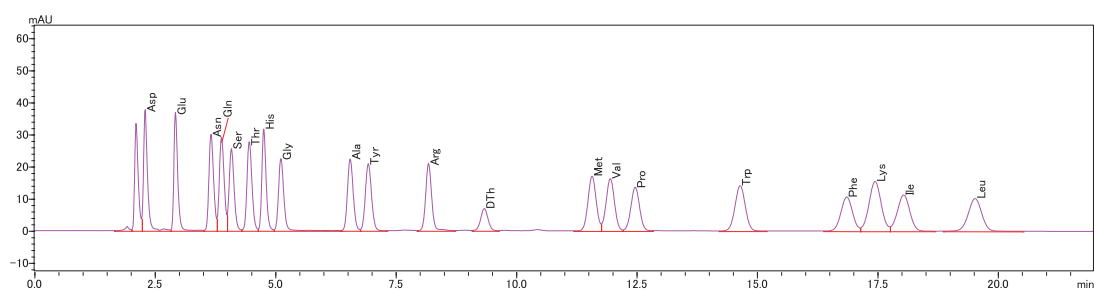


图1 PPSQ-53A分析PTH-AA混合标准品的色谱图

	组分名	时间	浓度
1	Asp	2.382	25.000
2	Glu	2.932	25.000
3	DTT	3.336	未使用
4	Asn	3.667	25.000
5	Gln	3.887	25.000
6	Ser	4.092	25.000
7	Thr	4.457	25.000
8	His	4.763	25.000
9	Gly	5.114	25.000
10	DMPTU	6.120	未使用
11	Ala	6.552	25.000
12	Tyr	6.928	25.000
13	Arg	8.179	25.000
14	DTh	9.310	25.000
15	Met	11.574	25.000
16	Val	11.958	25.000
17	Pro	12.469	25.000
18	DPTU	14.259	未使用
19	Trp	14.648	25.000
20	DPU	15.801	未使用
21	Phe	16.861	25.000
22	Lys	17.448	25.000
23	Ile	18.041	25.000
24	Leu	19.524	25.000

图2 PPSQ-53A分析PTH-AA混合标准品的保留时间和浓度

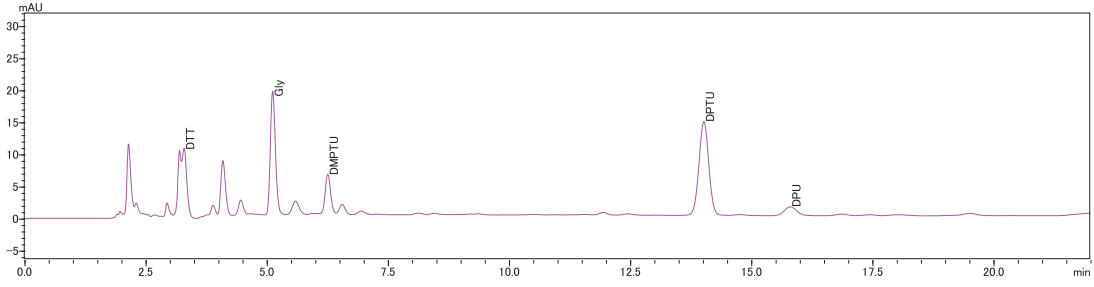


图3 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第1个循环的差减色谱图

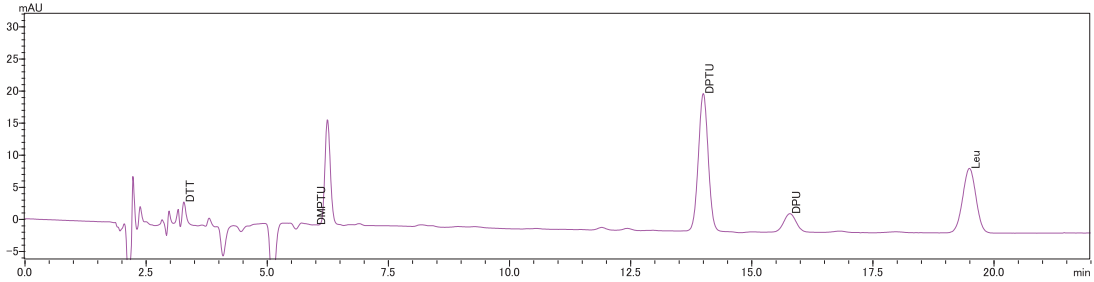


图4 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第2个循环的差减色谱图

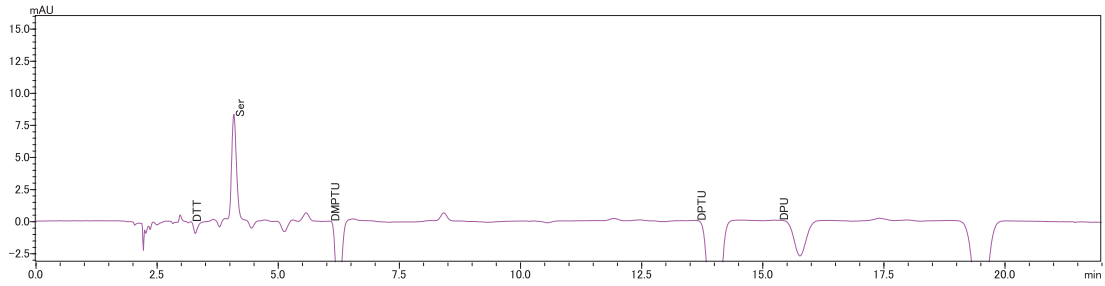


图5 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第3个循环的差减色谱图

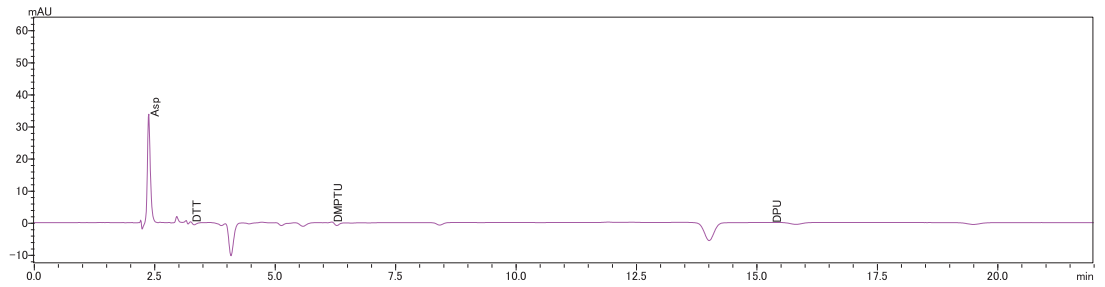


图6 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第4个循环的差减色谱图

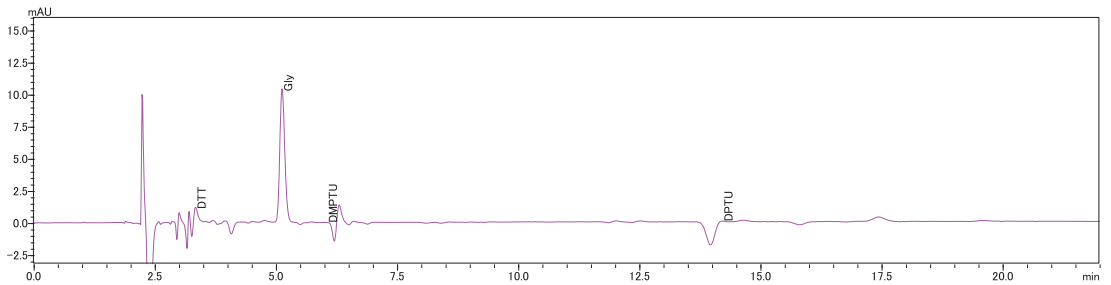


图7 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第5个循环的差减色谱图

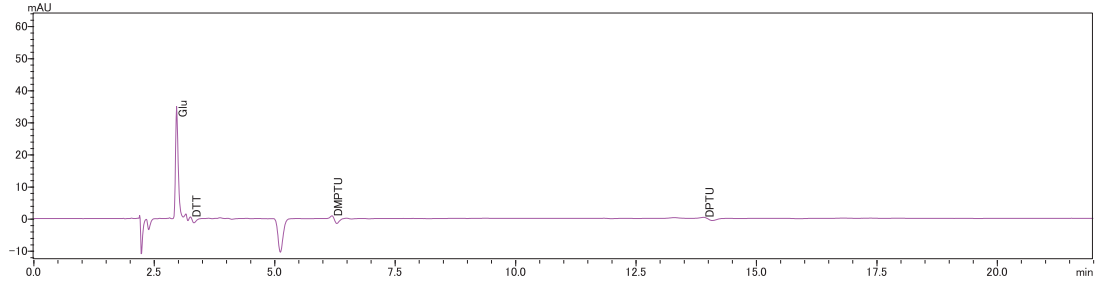


图8 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第6个循环的差减色谱图

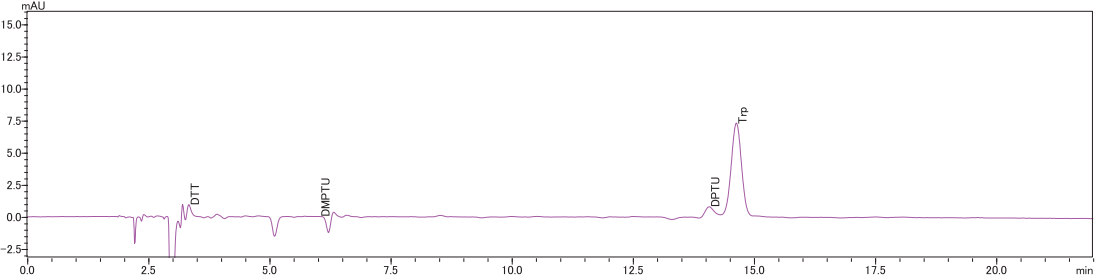


图9 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第7个循环的差减色谱图

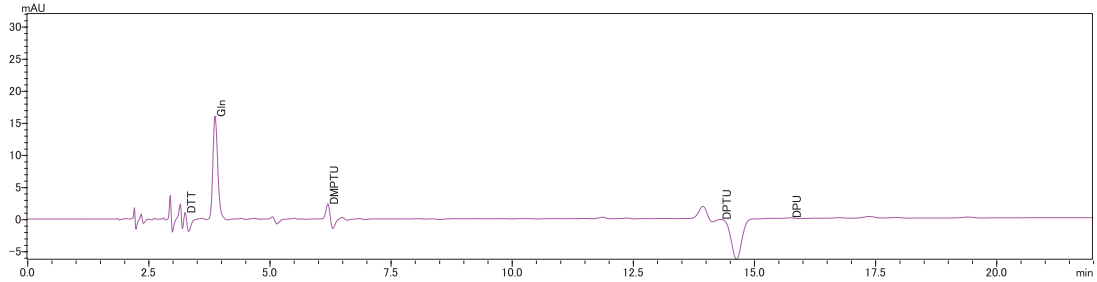


图10 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第8个循环的差减色谱图

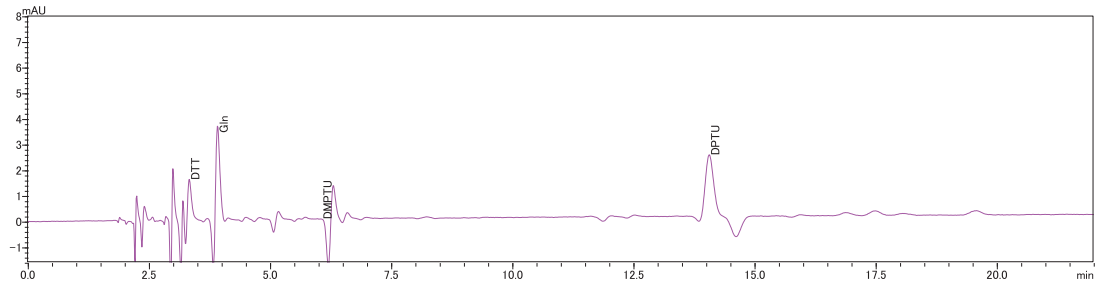


图11 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第9个循环的差减色谱图

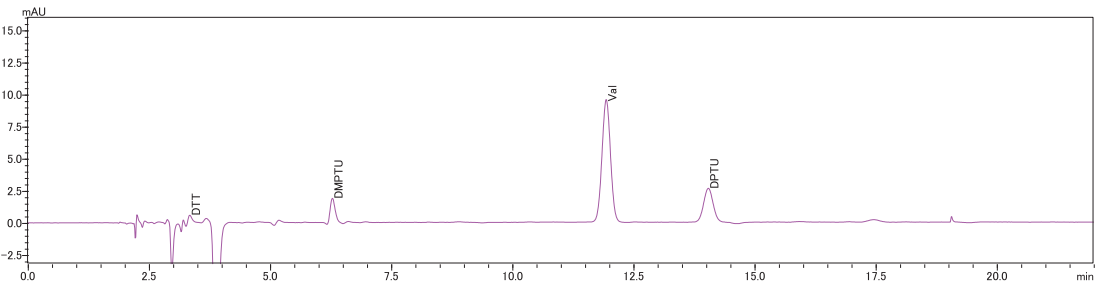


图12 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第10个循环的差减色谱图

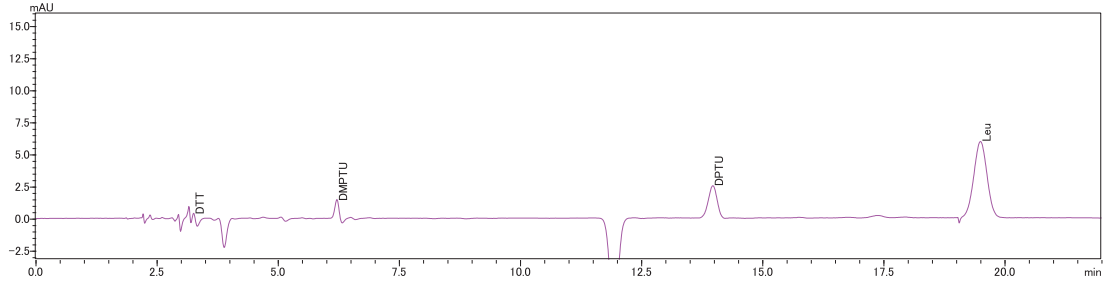


图13 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第11个循环的差减色谱图

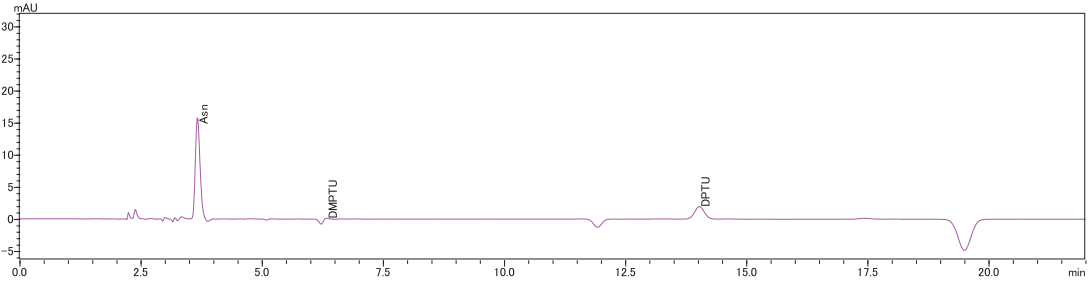


图14 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第12个循环的差减色谱图

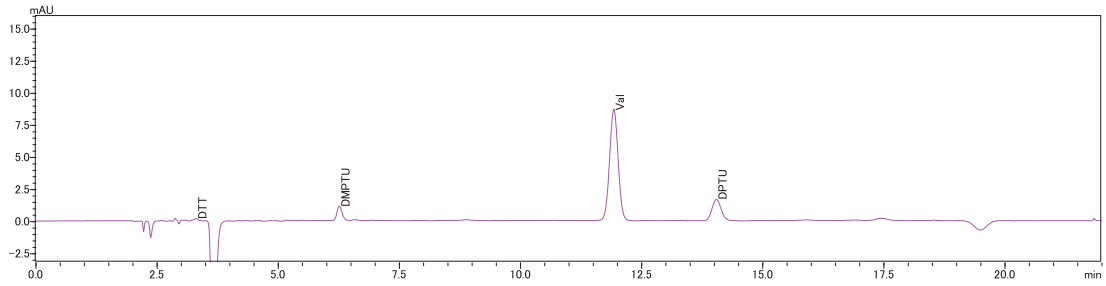


图15 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第13个循环的差减色谱图

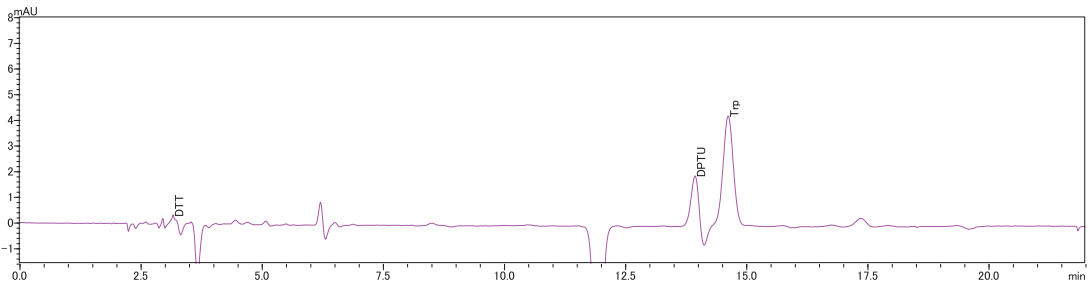


图16 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第14个循环的差减色谱图

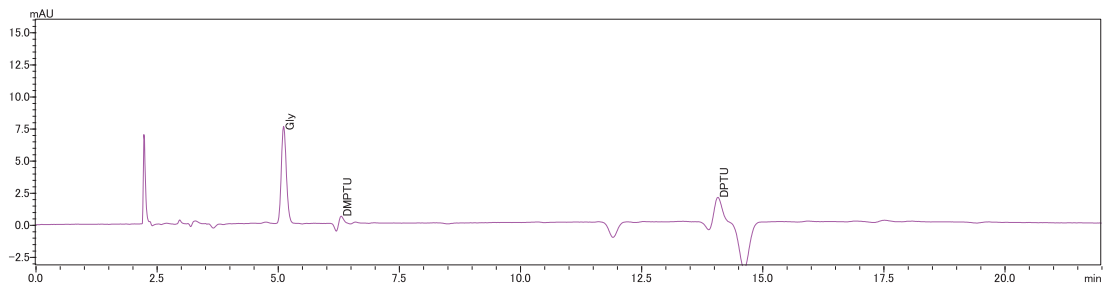


图17 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第15个循环的差减色谱图

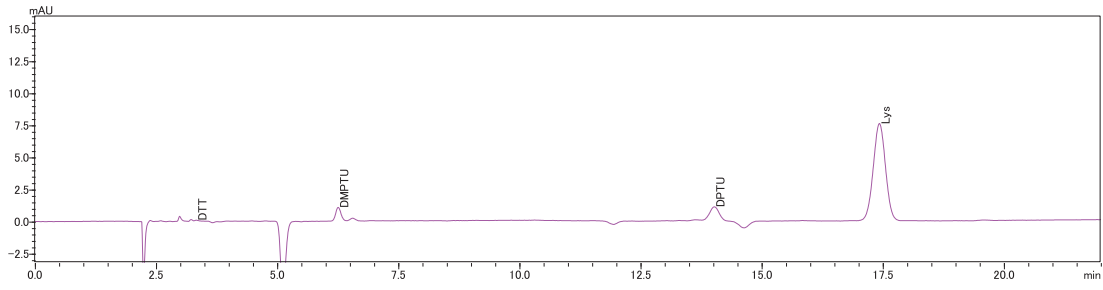


图18 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第16个循环的差减色谱图

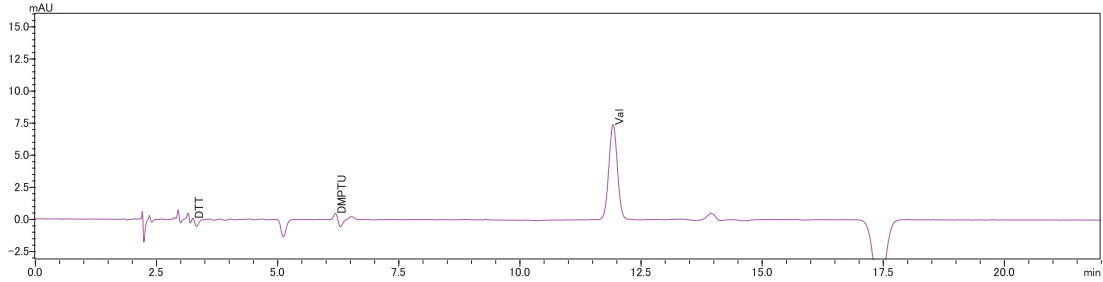


图19 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第17个循环的差减色谱图

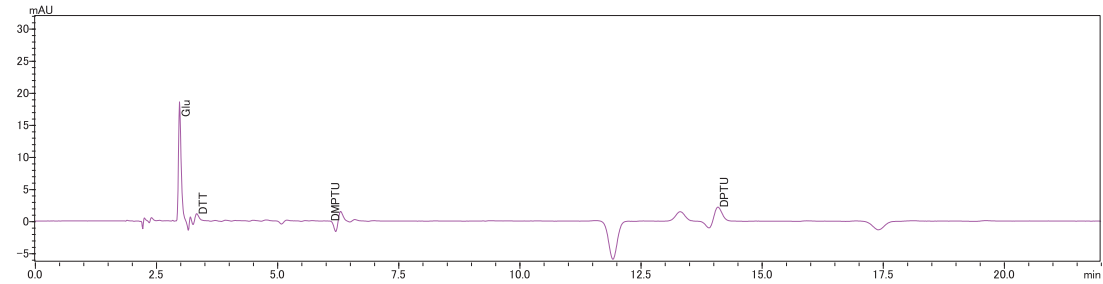


图20 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第18个循环的差减色谱图

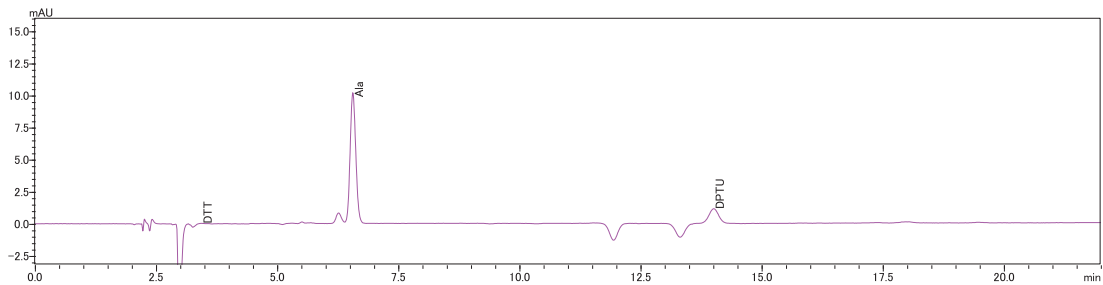


图21 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第19个循环的差减色谱图

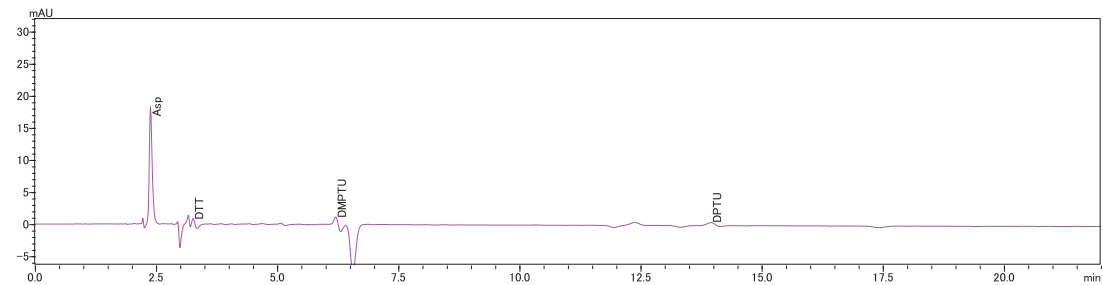


图22 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第20个循环的差减色谱图

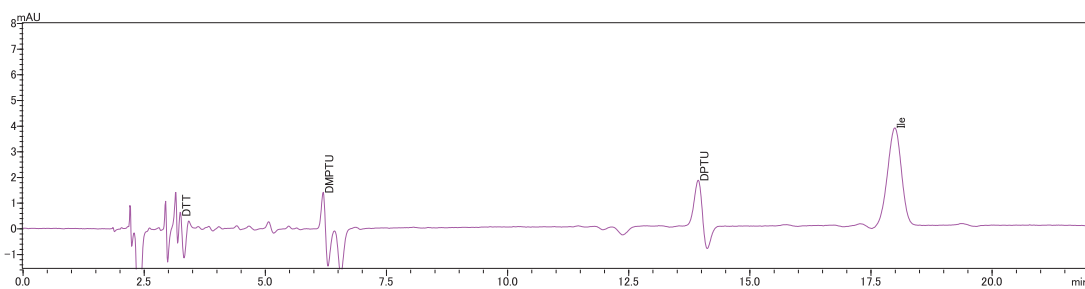


图23 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第21个循环的差减色谱图

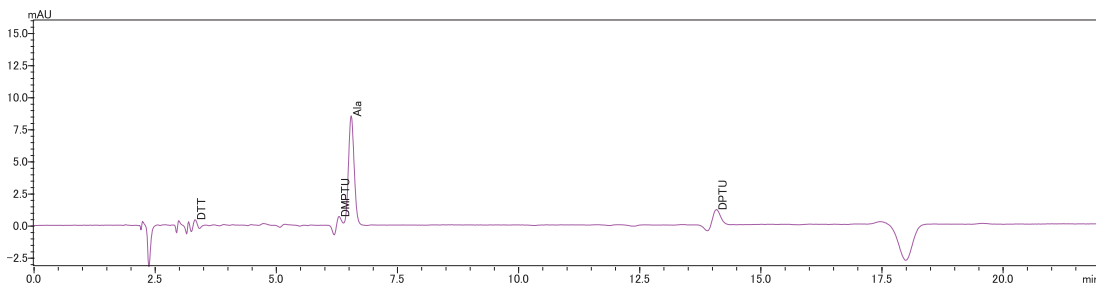


图24 PPSQ检测马肌红蛋白氨基酸序列第22个循环的差减色谱图

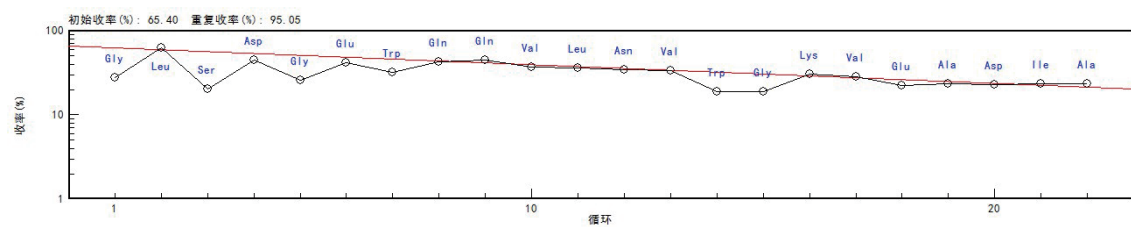


图25 PPSQ检测马肌红蛋白前22个氨基酸序列结果

## 结论

本文应用 PPSQ-53A 检测了马肌红蛋白前 22 个氨基酸序列，且与理论相符，表明此检测手段的可靠性。PPSQ 测定蛋白质氨基酸序列时，得到的是实际每个氨基酸的检测值，是生命科学研究、生物技术药物研发和质控领域有力的检测手段。