

Application News

No. B93

蛋白质测序仪

利用 PPSQ™-51A/53A 梯度系统分析小鼠 IgG 的 N 末端氨基酸序列

■ 前言

随着基因组分析技术的发展，基因组数据库变得更加全面，作为利用这个数据库进行后基因组分析形式之一的蛋白质组分析也得到了长足发展。随着质谱技术的发展，我们能够通过质谱仪及其数据库实现蛋白质氨基酸测序的高通量分析。虽然在基因组数据库中许多蛋白质被注释为前体蛋白，但在细胞中表达的各种蛋白质是由这些前体蛋白加工为成熟蛋白并运输到体内的。因此，当使用质谱仪及数据库对成熟蛋白的氨基酸序列进行鉴定时，质量数可能与理论值不同，从而导致搜索结果的分较低。而且，对于一些基因组数据库尚未完成的物种而言，使用质谱鉴定氨基酸序列可能比较棘手，所得序列结果也欠缺可信度。另一方面，利用传统的 Edman 降解法进行蛋白质测序，虽然耗费一定的时间，但所得氨基酸序列结果非常可靠，对于尚未建立数据库的样品的氨基酸序列分析非常有效。

本文介绍了利用微量 IgG 蛋白（来自小鼠血清）进行氨基酸测序的方法。PPSQ-51A/53A 梯度系统测序简便、可靠，是蛋白质分析不可缺少的工具。

T. Kuriki

■ PTH-氨基酸的分析

使用 PPSQ-51A/53A 梯度系统，通过梯度洗脱分析了 Edman 降解反应得到的 PTH-氨基酸。分析条件如表 1 所示。在梯度洗脱中，PTH-氨基酸的洗脱顺序与等度洗脱相比有所不同，但通过梯度洗脱检测到的 PTH-氨基酸的色谱峰要比等度洗脱高 3 ~ 5 倍。而且，通过梯度洗脱可以检测分离 500 fmol 的 PTH-氨基酸（图 1）。

表 1 分析条件

Column	: Wakopak® Wakosil® PTH-GR(S-PSQ) (250mm L, 2.0mm I.D.)
Mobile phase	: A: PTH-amino Acids Mobile Phase A (for Gradient Elution) B: PTH-amino Acids Mobile Phase B (for Gradient Elution)
Flow rate of mobile phase	: 0.3mL/min
Column temp	: 35°C
Detection	: SPD-M30A (269nm) with High Sensitivity Flow cell

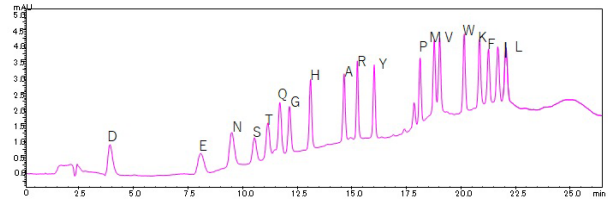


图 1 500 fmol PTH-氨基酸 - 混合标准品的分析

■ 方法

IgG 的基本结构由 2 条 H 链（也称为重链，分子量较大）和 2 条 L 链（也称为轻链，分子量较小）组成。由于完整抗体的分子量较大（约 150 kDa），很难在不进行前处理的情况下直接通过蛋白质测序仪进行 N 末端氨基酸序列分析。在该分析例中，对来自小鼠血清的 IgG (SIGMA-ALDRICH cat#I5381) 进行还原处理，通过 SDS-PAGE（十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳）进行分离并电转印至 PVDF 膜上。对 PVDF 膜进行 CBB 染色后，分别剪切 H 链和 L 链的条带，利用 PPSQ-53A 梯度系统进行分析。

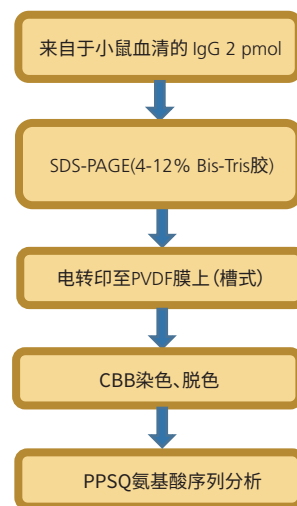


图 2 N 末端氨基酸序列分析步骤

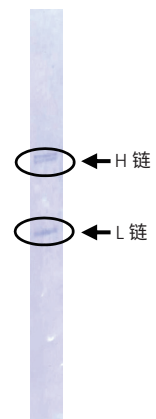


图 3 电转印后的 PVDF 膜

■ N 末端氨基酸序列分析结果

图 4 和图 5 分别是 2 pmol IgG 的 L 链和 H 链的 N 末端氨基酸序列分析的色谱图（循环 1 为原始色谱图，其它为差减色谱图）。由图 4 可知，L 链的 N 末端和第二个循环的氨基酸残基分别被鉴定为天冬氨酸（Asp）以及异亮氨酸（Ile）。分析 15 个循环后，L 链 N 末端到第 13 个氨基酸残基的序列被鉴定为：Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ser-Ala (Val)。数据库检索显示这是免疫球蛋白的轻链。

同样的，H 链的 N 末端氨基酸序列被确定为 Glu-Val-Gln-Leu-Gln-Glu-Ser-Gly-Pro-Glu-Leu-Val-Lys-Pro-Gly，数据库检索显示这是免疫球蛋白的重链。

■ 总结

这些结果表明，蛋白质测序仪 PPSQ-51A/53A 梯度系统可以方便、准确地识别 N 端序列，是一种对痕量样品进行高灵敏度分析的有效系统。

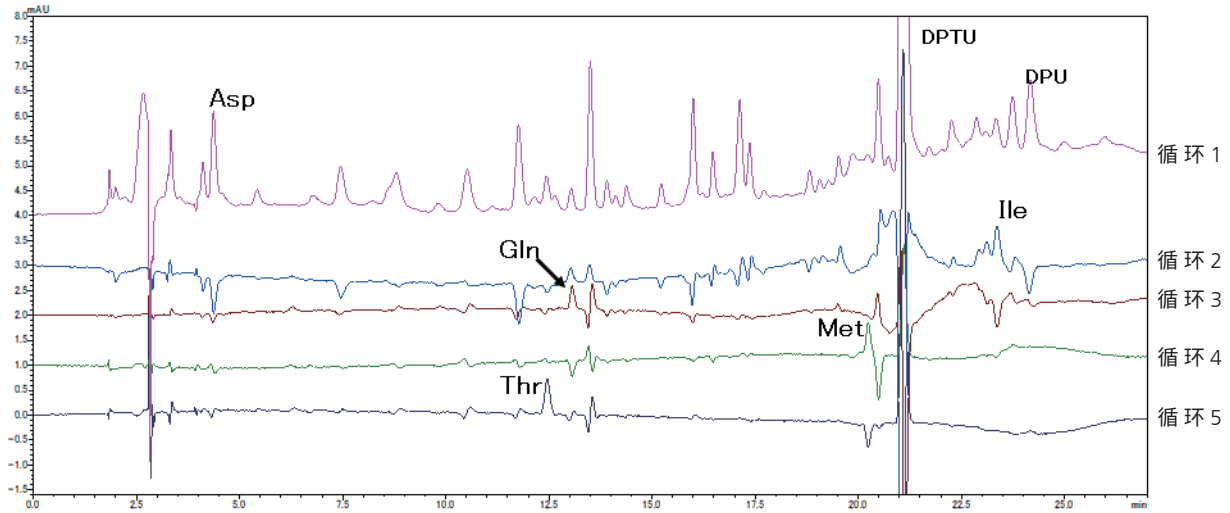


图 4 L 链色谱图（第 1~5 循环）

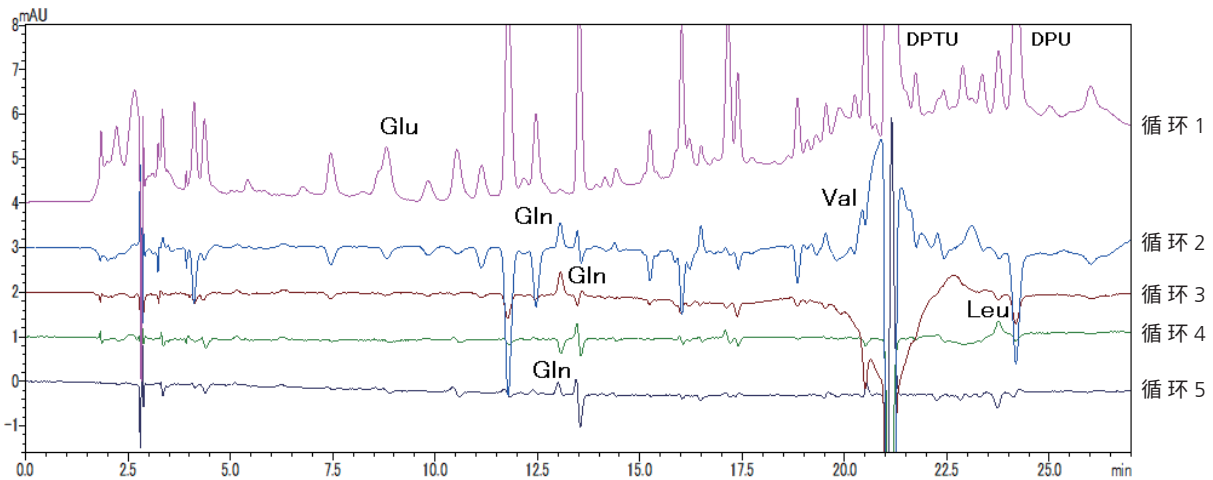


图 5 H 链色谱图（第 1~5 循环）

LabSolutions 为岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。

Wakopak 及 Wakosil 为富士胶片和光纯药株式会社的注册商标。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2019 年 4 月