

使用蛋白质测序仪检测半胱氨酸和胱氨酸

前言

目前，在蛋白质的分析中，使用质谱仪及利用基因组数据库搜索引擎进行蛋白质鉴定的蛋白质组分析是主流的分析技术。体内表达的蛋白质经过翻译后修饰而具有各种功能，并且前体和成熟蛋白质之间可能具有不同的理论质量数。在不使用数据库的情况下，使用质谱仪鉴定氨基酸序列非常复杂和困难。另一方面，作为常规方法，使用埃德曼降解法的蛋白质测序仪所得到的氨基酸序列结果的可靠性高，即使在数据库不充分的情况下，也可以轻松地鉴定氨基酸序列。本次为您介绍使用蛋白质测序仪 PPSQ™-50A 系统（等度系统和梯度系统）对含有半胱氨酸和胱氨酸的样本进行氨基酸序列分析的实例。

Kuriki

半胱氨酸和胱氨酸的检测

蛋白质构建了其固有的三维结构。蛋白质由氨基酸通过肽键脱水 and 缩合形成的多条肽链组成，肽链中的氨基酸序列称为蛋白质的一级结构。体内表达的成熟蛋白质通过所组成的氨基酸侧链之间的相互作用，形成具有热力学稳定性的特定三维结构而发挥作用。这种蛋白质的高维结构称为高级结构，与一级结构区别开来，分为二级结构、三级结构和四级结构。在保持二级结构的同时，通过氨基酸侧链之间相互作用而形成的三维结构称为三级结构。通过形成具有热力学稳定性的特定三级结构而使该蛋白质具有功能活性。二硫键（S-S 键）就是侧链之间相互作用的形式之一。确定构成二硫键的半胱氨酸的位置，在蛋白质的结构分析中是必要且不可或缺的。通过蛋白质测序仪进行分析的条件如表 1 和表 2 所示。

表 1 分析条件（等度系统）

Column	: Wakopak® Wakosil® PTH-II (250 mmL, 4.6 mm I.D.)
Mobile phase	: PTH-amino Acids Mobile Phase
Flow rate of mobile phase	: 1.0 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Detection	: SPD-M30A (269 nm) with High Sensitivity Flow cell

表 2 分析条件（梯度系统）

Column	: Wakopak® Wakosil® PTH-GR (S-PSQ) (250 mm L, 2.0 mm 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	: 0.3 mL/min
Column temp.	: 35 °C
Detection	: SPD-M30A (269 nm) with High Sensitivity Flow cell

样品分析时使用的是经过聚酰胺处理的玻璃纤维膜。标准氨基酸半胱氨酸及胱氨酸的分析结果如图 1 至 4 所示。

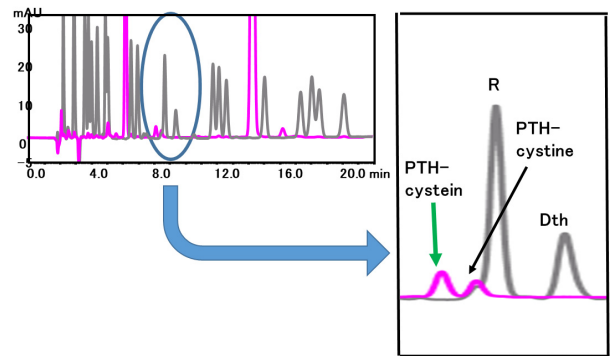


图 1 PTH-氨基酸混合标准品（25 pmol）（灰色）和半胱氨酸（100 pmol）的埃德曼降解色谱图（粉色）以及图 1 中的蓝色部分的放大图（等度系统）

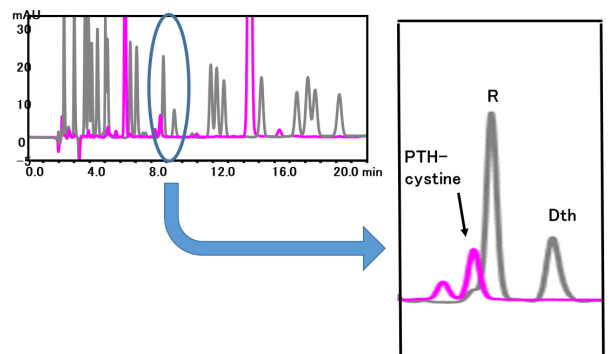


图 2 PTH-氨基酸混合标准品（25 pmol）（灰色）和胱氨酸（100 pmol）的埃德曼降解色谱图（粉色）以及图 2 中的蓝色部分的放大图（等度系统）

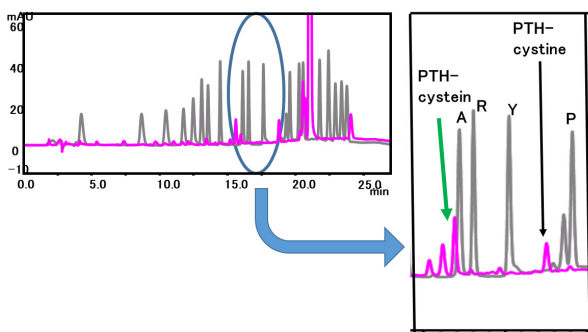


图3 PTH-氨基酸混合标准品 (10 pmol) (灰色) 和半胱氨酸 (50 pmol) 的埃德曼降解色谱图 (粉色) 以及图3中的蓝色部分的放大图 (梯度系统)

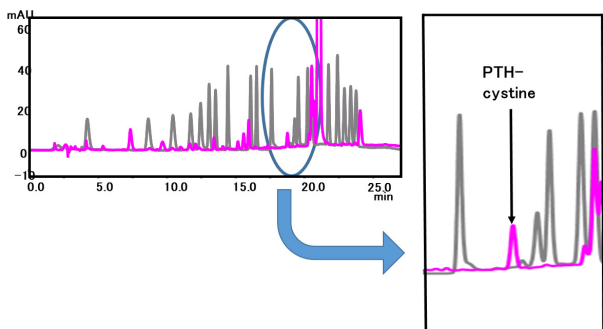


图4 PTH-氨基酸混合标准品 (10 pmol) (灰色) 和胱氨酸 (50 pmol) 的埃德曼降解色谱图 (粉色) 以及图4中的蓝色部分的放大图 (梯度系统)

根据图1至4, 可以确认 PTH-半胱氨酸和 PTH-胱氨酸在各系统中的洗脱位置。从图1和图3来看, 在进行半胱氨酸的序列分析时, 也可以检测到 PTH-胱氨酸, 推测这是因为半胱氨酸在埃德曼降解过程中形成了二硫键。

另外, 在等度系统中, PTH-胱氨酸的洗脱位置位于 PTH-精氨酸附近 (图2), 难以使用软件进行自动推测, 但可以通过目视鉴定。

N 端氨基酸序列分析

本次实验以包含一个分子内二硫键的 100 pmol 人工合成催产素 (肽研 4084-v) 为样品, 使用经过聚酰胺处理的玻璃纤维膜, 通过蛋白质测序仪 PPSQ-50A 系统进行了分析。催产素的氨基酸序列、第1个循环的原始色谱图及第6个循环的差减色谱图如图5所示。第1个循环的半胱氨酸通过二硫键与C端的第6个循环的半胱氨酸连接, 因此, 在该循环中未检测到特异性增加的 PTH-氨基酸。第6个循环检测到 PTH-胱氨酸。在 PPSQ-50A 系统中, 各 PTH-氨基酸的洗脱时间的重现性良好, 因此, 通过获得差减色谱图, 可以轻松地鉴定第6个循环为 PTH-胱氨酸。

总结

蛋白质测序仪 PPSQ-50A 系统可以轻松、准确地鉴定蛋白质的 N 端序列, 同时, 还可以鉴定半胱氨酸和胱氨酸。与其他氨基酸相比, 半胱氨酸和胱氨酸在埃德曼降解过程中被降解, 因此, 在使用蛋白质测序仪确定洗脱位置时, 需要一定程度的样品量。但是, 在对蛋白质组分析中的结构分析以及通过肽合成生成二硫键之前的合成中间体进行评估时, 蛋白质测序仪是一种非常有效的评估工具。

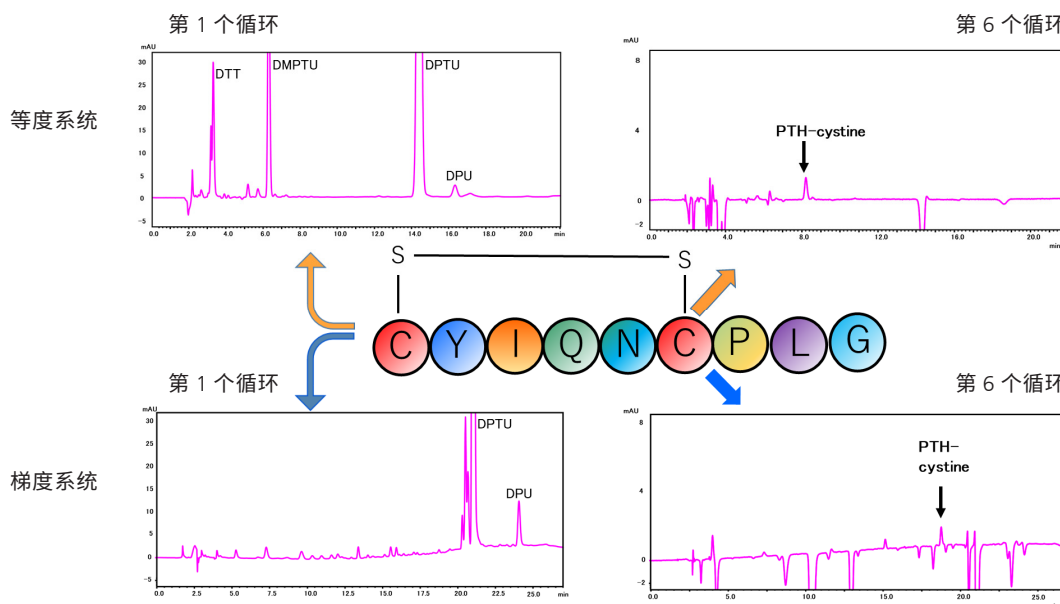


图5 人工合成催产素的氨基酸序列及其色谱图

岛津应用云



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 是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: 2020年3月