

论文

基于环氧功能基团的杂化硅胶固定化酶反应器

吴帅宾^{①②}, 马俊锋^{①②}, 杨开广^①, 刘晋湘^{①②}, 梁振^①, 张丽华^{①②*}, 张玉奎^{①②}

① 中国科学院大连化学物理研究所, 国家色谱研究分析中心中国科学院分离分析化学重点实验室, 大连 116023;

② 中国科学院研究生院, 北京 100039

* 联系人, E-mail: lihuazhang@dicp.ac.cn

收稿日期: 2010-05-13; 接受日期: 2010-08-17

国家重大科学研究计划(批准号: 2007CB914100)和国家自然科学基金(批准号: 20935004)资助项目

摘要 在蛋白质组学研究中, 为解决自由溶液酶解时间长、蛋白酶自降解等问题, 各种类型的固定化酶反应器引起了人们的关注. 采用溶胶凝胶法, 在 100 μm 内径毛细管内, 以 3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷为功能单体, 以四乙氧基硅烷为交联剂, 制备了一种新型的杂化硅胶整体材料. 并通过在整体柱表面由环氧功能团水解得到的二醇与胰蛋白酶(trypsin)的氨基进行一步反应, 实现了胰蛋白酶固定化. 利用该 IMER, 在 47 s 内实现了牛血清白蛋白的酶解; 经反相色谱分离和质谱鉴定, 序列覆盖率在 35% 以上, 与自由溶液酶解 12 h 的效果相当. 结果表明, 基于亲水性杂化硅胶整体材料的 IMER 有望在蛋白质组学研究中发挥重要作用.

关键词
固定化酶反应器
有机无机杂化整体柱
蛋白质
高效液相色谱-质谱

在基于鸟枪法的蛋白质组学研究中, 蛋白质酶解是必不可少的步骤. 传统的自由溶液酶解存在时间长、自降解、易交叉污染等缺点^[1,2]. 因此, 近年来, 通过酶的固定化制备固定化酶反应器(immobilized enzyme reactor, IMER), 不仅可以有效克服上述问题, 还可以实现和分离鉴定系统的联用. 有助于显著提高蛋白质组分析的通量和系统的自动化程度.

根据基质类型, IMER 主要有纳米颗粒^[3,4]、磁球^[5,6]、渗透膜^[7]、整体柱^[8-12]等形式. 其中基于整体材料的 IMER 由于具备制备简单、反压小的优点受到广泛关注^[11,12]. 根据整体材料的基质, 又可将其分为聚合物^[12]、硅胶^[10]、有机无机杂化^[13]等类型的 IMER. 其中, 聚合物基质和硅胶基质 IMER 分别在强极性溶剂和极端 pH 条件下化学稳定性较差, 容易出现溶胀和溶解等现象. 杂化硅胶整体材料可以有效避免上

述问题, 因此更适合用作 IMER 的基质.

前期工作发展了一种氨基功能化的杂化硅胶整体材料 IMER^[13], 并实现了蛋白质的快速酶解. 但该方法在酶的固定化过程中需要多步反应. 本文报道了一种新型环氧功能化的杂化硅胶整体柱, 无需使用戊二醛作为基质和胰蛋白酶的连接试剂, 可通过一步反应实现酶的固定化. 利用该 IMER, 实现了牛血清白蛋白(BSA)和大肠杆菌提取蛋白质的快速酶解.

1 材料与方法

1.1 试剂

硅胶毛细管(内径 100 μm , 外径 375 μm)购自鑫诺光导纤维厂(河北, 中国). 四乙氧基硅烷(95%, TEOS)和 3-(甲基丙烯酰)丙基三甲氧基硅烷(97%, GLYMO)

购自 Acros organics(Geel, Belgium). 壳寡糖由普陀生物医药有限公司提供. PEG 20000 和 C-myc(97%, EQKLISEEDL)购自大连生物技术有限公司. 胰蛋白酶、BSA、碘代乙酰胺(IAA)和二硫苏糖醇(DTT)购自 Sigma(St. Louis, MO). 有机试剂都为 HPLC 级. 实验用水经 Milli-Q 系统(Millipore, Molsheim, France)纯化.

1.2 仪器

恒流泵(兰格恒流泵有限公司, 河北保定). 温度控制器(ZW-柱炉, 大连依利特分析仪器有限公司). 岛津高效液相色谱系统(Jasco, Tokyo, Japan). GM4 μ HPLC 系统(Michrom Bioresources Inc., Auburn, CA) 和 LCQ^{DUO} 四级杆质谱仪(LCQ-IT MS, Thermo Fisher, San Jose, CA).

1.3 IMER 制备

将 672 μ L TEOS, 200 μ L 甲醇和 10 μ L 0.5 mol/L 盐酸均匀混合, 60 $^{\circ}$ C 反应 15 min. 冷却至室温, 加入 216 μ L 水, 60 $^{\circ}$ C 反应 4 h. 形成的 TEOS 溶胶-20 $^{\circ}$ C 保存备用. 将 60 mg 提纯的壳寡糖(5~6 个单体)溶解在 5940 μ L 双蒸水和 60 μ L 纯乙酸混合液中. 震荡 5 min, 超声 10 min. 溶液 4000 \times g 离心 30 min, 收集(5 mL)上层清液, -80 $^{\circ}$ C 保存备用. 在电磁搅拌下, 将 470 μ L GLYMO 缓慢滴加入冰浴的壳寡糖溶液, 混合均匀, 60 $^{\circ}$ C 反应 18 h, 形成 GLYMO 溶胶. 向 90 μ L GLYMO 溶胶中加入 8 mg 聚乙烯乙二醇 20000(PEG-20000), 超声 10 min. 随后添加 100 μ L TEOS 溶胶, 并在同样条件下震荡和超声. 迅速注入内径为 100 μ m 经过硅羟基活化的内毛细管中, 在 40 $^{\circ}$ C 反应 18 h. 用乙醇和水冲出致孔剂. 在 4 $^{\circ}$ C 下, 直接将 2 mg/mL 胰酶(含有 0.5 mg/mL 苯甲咪)溶液连续通过整体柱 4 h 实现胰酶固定化.

1.4 蛋白质酶解

十肽 C-myc 溶于 50 mmol/L 醋酸铵(pH 8.2), 配制成 3 mg/mL 溶液. 将 1 mg BSA 溶于 120 μ L 8 mol/L 尿素中(含有 20 μ L 200 mmol/L DTT). 56 $^{\circ}$ C 反应 40 min. 冷却至室温, 加入 20 μ L 100 mmol/L IAA. 避光反应 30 min, 将蛋白质浓度稀释至 1 mg/mL. 参照文献[14]方法提取大肠杆菌细胞蛋白. 以 BSA 为标准蛋白, 在紫外波长 595 nm 测定提取的蛋白浓度. 用 C8 (4.6 mm \times 5 cm, 300 \AA)捕集柱除盐后备用. BSA 和 大肠杆菌蛋白自由溶液酶解条件为: 蛋白质和胰蛋

白酶的添加比例分别为 50:1 和 25:1(体积比), 37 $^{\circ}$ C 酶解 16 和 24 h, 添加 1 μ L 甲酸终止反应.

1.5 高效液相色谱和质谱分析

常规液相色谱: 色谱柱(4.6 mm i.d. \times 150 mm), 填充颗粒(ODS, 5 μ m, 80 \AA , 思诺色谱有限公司, 大连, 中国); 流动相: 100%水加 0.1%三氟乙酸(A 流动相), 95%乙腈加 0.1%三氟乙酸(B 流动相); 分离梯度: 0~30 min, 18%~22% B 流动相; 流速: 1 mL/min; 进样体积: 5 μ L; 检测波长: 214 nm. 每次实验重复 2 次.

微柱液相色谱-质谱: BSA 酶解肽段分离梯度: 0 min, 2% B 流动相; 10 min, 2% B 流动相; 15 min, 10% B 流动相; 55 min, 40% B 流动相; 65 min, 80% B 流动相; 70 min, 80% B 流动相; 大肠杆菌酶解肽段分离梯度: 0%~10% B 流动相 10 min; 10%~40% B 流动相 200 min; 40%~80% B 流动相 10 min; 80% B 流动相 20 min. 其他实验条件相同: 进样体积: 2 μ L; 分离柱: 300 μ m i.d. \times 15 cm; 填充颗粒: ODS, 5 μ m, 300 \AA ; 流动相: 2%乙腈加 0.1%甲酸, 98%乙腈加 0.1%甲酸; 流速: 5 μ L/min; 质谱条件: 喷雾电压 3 kV; 加热毛细管温度 150 $^{\circ}$ C; 碰撞能量 35%.

1.6 质谱数据检索

使用 Xcalibur(V 1.4)质谱扫描软件记录离子 MS/MS 谱图, 并在正离子模式下进行质量校正. 1 个全扫描后进行 2 个次级扫描. 动力学排除功能设置如下: 重复计数 2 s, 重复延迟 30 s, 排除延迟 180 s. 使用 Bioworks 软件(版本 3.1)进行蛋白质鉴定和搜索. 肽段搜索采用全胰酶切割肽段和至多 2 个漏切位点进行限制. 母离子质量误差设为 2 Da. 相应碎片离子质量误差设为 1 Da. 半胱氨酸进行烷基化修饰检索, 增加 57.0215 Da. 肽段检索完成后使用以下标准进行蛋白质筛选: 单电荷肽段 Xcorr>1.9, 双电荷肽段 Xcorr>2.2, 三电荷肽段 Xcorr>3.75.

2 结果与讨论

2.1 杂化硅胶整体柱基质性能

利用溶胶凝胶法, 以 GLYMO 为功能单体, TEOS 为交联剂, PEG20000 为致孔剂制备了具有环氧功能基团的杂化硅胶整体材料(图 1). 在基质表面共价固定少量亲水性的壳寡糖改善基质的亲水性, 同

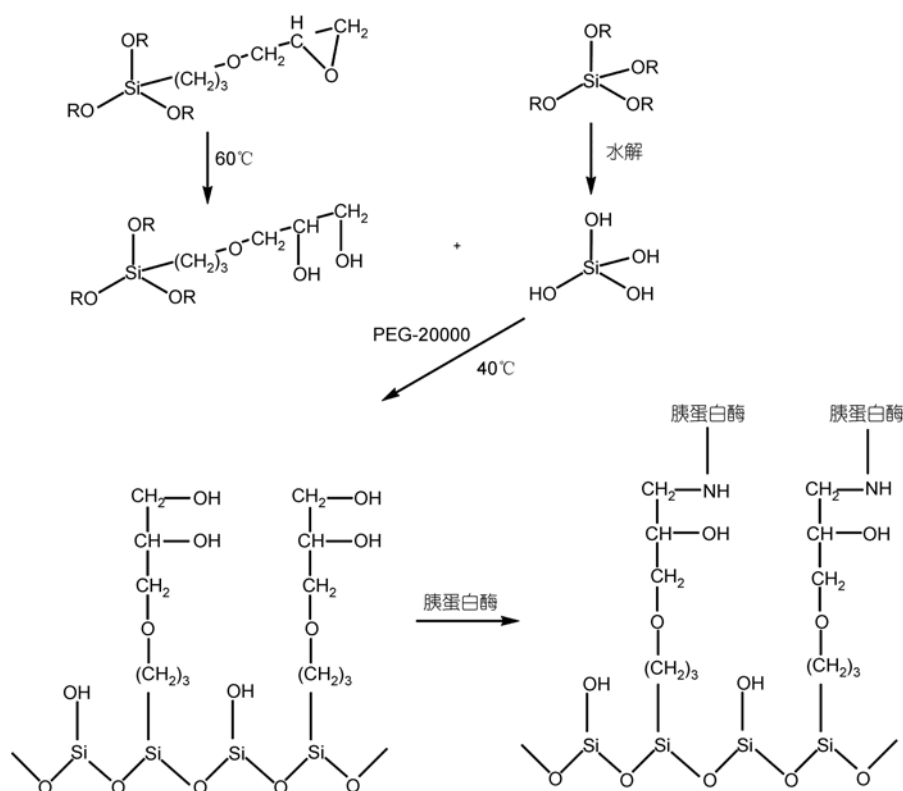


图1 环氧杂化硅胶整体柱制备流程

时将整体材料上的环氧功能基团与胰蛋白酶的氨基直接进行共价反应, 从而实现胰酶的固定化. 无需引入戊二醛做为杂化硅胶基质和胰酶反应的连接试剂. 相比在带氨基的杂化整体材料上固定(24 h)胰蛋白酶^[13], 通过基质上的环氧基团固定胰蛋白酶只需 6 h, 时间缩短到 1/4.

系统优化了两种溶胶的反应比例(表 1). 按照 A 和 B 比例制备的整体柱, 机械强度差, 无法耐受高流速. 按照 D 比例制备的整体柱由于未能形成大量的通透孔, 在 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速下产生的反压过大. 因此, 最终选用 C 比例制备整体材料基质. 使用 Bradford 法以 BSA 为标准蛋白绘制蛋白浓度与相应荧光响应的标准曲线($Y=2.0588X-0.0694$; $R^2=0.9829$), 通过测定

固载胰酶前后胰酶溶液的变化得到杂化硅胶 IMER 的胰酶固载量为 0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 与 PSG-PEG 基质 IMER 的胰蛋白酶固载量相当^[10].

2.2 IMER 酶解能力

选用十肽, C-myc(EQKLISEEDL, 97%), 对制备的 IMER 的酶解能力进行评价. 该肽含有一个赖氨酸切割位点, 可以被胰蛋白酶切割为两个亲水性的肽段. 图 2 显示了 3 mg/mL C-myc 溶液的 HPLC 谱图以及不同 IMER 酶解流速和样品溶剂条件系统下, C-myc 经杂化硅胶 IMER 酶解产物的 HPLC 谱图. 可见, 相比没有酶解的 3 mg/mL C-myc, 当 IMER 酶解流速从 200 nL/min 增加到 800 nL/min 过程中, 只在 800 nL/min (1.7 mm/s) 时, 出现了明显没有酶解的 C-myc 色谱峰. 说明在低于 800 nL/min 的样品流速下, IMER 具有较好的酶解能力. 此外, 对实验缓冲中含有高盐(1 mol/L NH_4Ac)和高有机溶剂(50%乙腈)对 IMER 酶解 C-myc 的影响也进行了考察. 如图 2 所示, 酶活被部分抑制. 在样品中去除高盐和乙腈后, IMER 的酶解能力又得到了恢复. 说明高浓度的盐和

表 1 溶胶比例优化

整体材料	GLYMO 溶胶/ μL	TEOS 溶胶/ μL	PEG20000 /mg	反压/MPa	机械强度
A	120	70	8	<1	较差
B	100	90	8	<1	较差
C	90	100	8	1~5	合适
D	80	110	8	>20	过硬

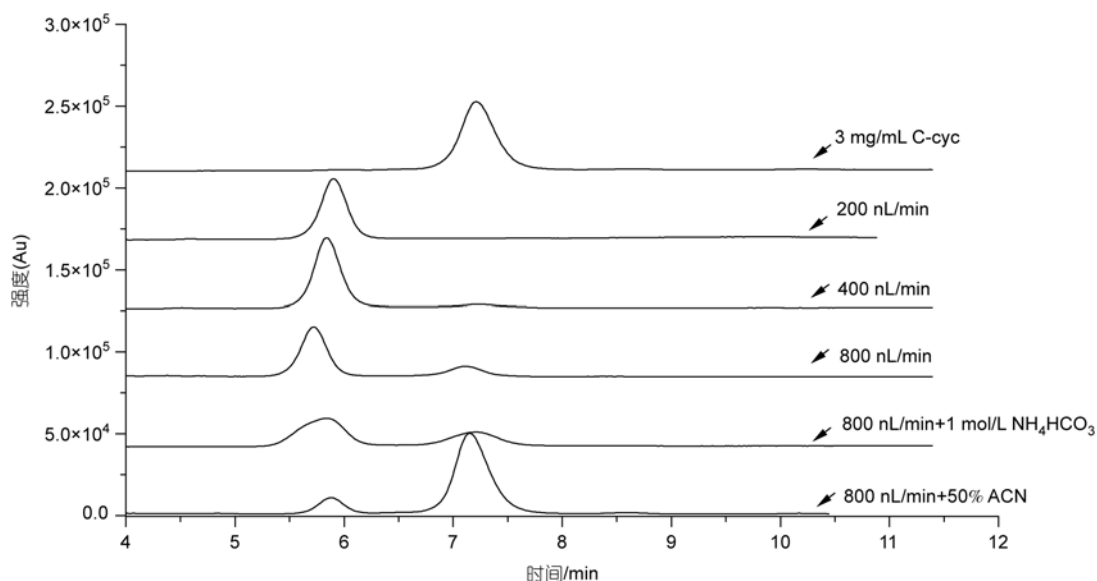


图2 不同条件下, C-myc 酶解产物 HPLC 谱图

实验条件: IMER, 5 cm, 100 μ m i.d. 酶解温度 25 $^{\circ}$ C

乙腈会导致 IMER 酶活的暂时抑制. 因此, 在后续实验中, 尽可能避免引入高浓度的盐或有机溶剂.

选用经过变性、还原、烷基化和除盐后的 BSA 作为样品, 进一步考察该 IMER 的酶解能力. 将 0.1 mg/mL BSA 溶液以不同的流速(100~500 nL/min)通过 IMER, 酶解产物收集后经过 μ RPLC-ESI-MS/MS 分离和鉴定. 如图 3 所示, BSA 在 IMER 中的酶解时间 0.8~3.9 min, 相应的序列覆盖率在 35%~42%; 鉴定到的唯一肽段数目为 17~23 条. 与采用自由溶液酶

解 12 h 获得的结果相当(序列覆盖率为 45%). 酶解趋势显示, 在流速为 200 nL/min 时, BSA 酶解效果最差(图 3). 做为一种有多个切割位点的大蛋白, BSA 在 IMER 中的酶解显示出复杂的动力学过程. 当流速小于 200 nL/min 时, 由于酶解时间的减少, 酶解效果表现为逐步降低. 而当流速大于 200 nL/min 时, 虽然酶解时间还是在减少, 但在整体柱内增大的传质速度反而使得 BSA 与固定化的胰酶在数量上接触的更加充分, 酶解效果反而表现出增大的趋势. 但是, 图 3 同时说明在考察的流速范围内, BSA 可以得到有效的酶解. 此外, 在 300 nL/min 下使用 IMER 3 次酶解 BSA 获得的序列覆盖率的相对标准偏差只有 3.9%. 充分说明, 研制的基于杂化硅胶整体材料的 IMER 具有良好的酶解能力和稳定性.

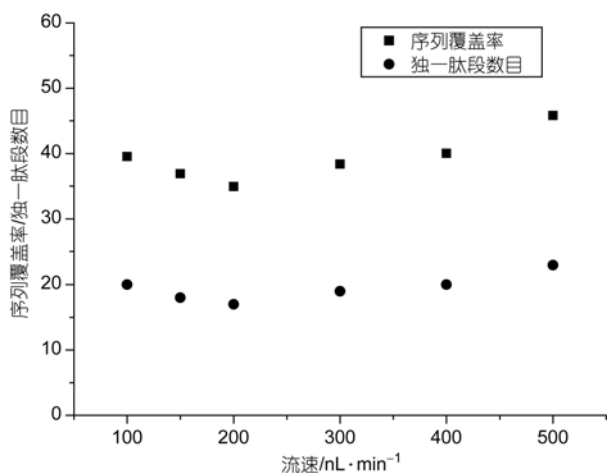


图3 IMER 对 BSA 的酶解效果评价

实验条件: IMER, 5 cm, 100 μ m i.d. 酶解温度为 25 $^{\circ}$ C

2.3 大肠杆菌提取蛋白的酶解

将制备的杂化硅胶 IMER 用于酶解经过变性、还原和烷基化的大肠杆菌提取蛋白. 对应的质谱基峰色谱图如图 4 所示. 酶解产物经过在线除盐, μ RPLC-ESI MS/MS 分析后, 共鉴定到 121 个唯一肽段, 对应 84 种蛋白质; 分子量分布在 4~180 kD, pI 分布在 4.5~10.5. 上述结果表明, 制备的基于环氧官能团的杂化硅胶整体材料的 IMER 可用于实际样品的快速酶解.

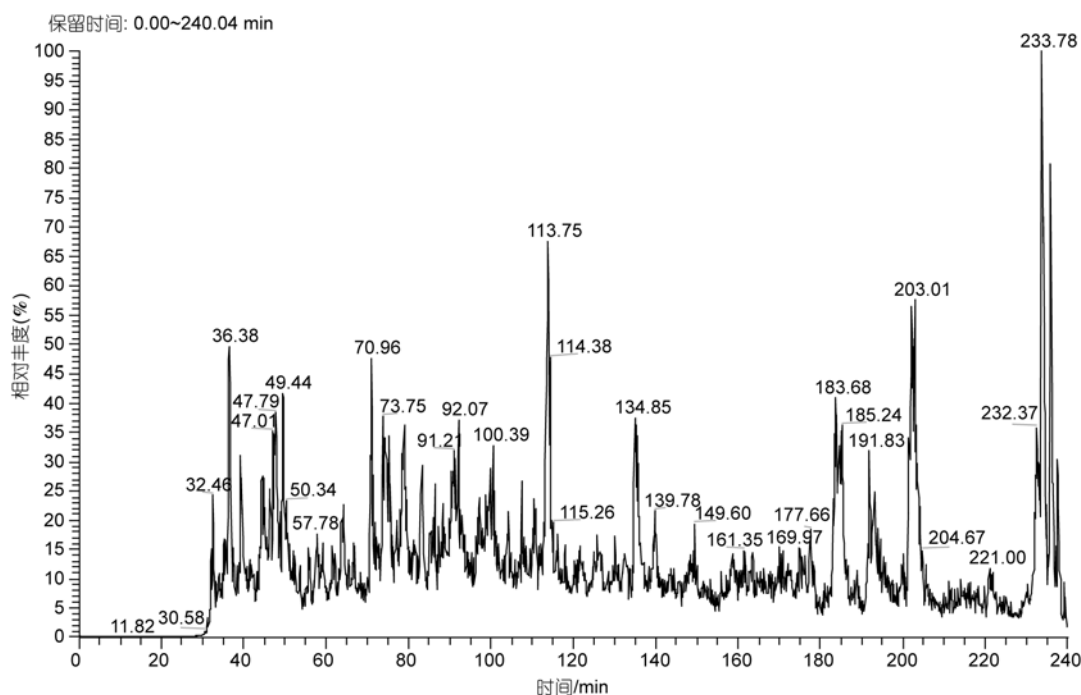


图4 经 IMER 的大肠杆菌提取蛋白酶解产物的基峰色谱

实验条件: IMER, 10 cm, 100 μ m i.d. 酶解温度 25 $^{\circ}$ C

3 结论

成功制备了一种以环氧为功能基团的杂化硅胶整体材料, 显著简化了胰蛋白酶的固定过程. 通过酶

解标准蛋白和大肠杆菌提取蛋白证明这种 IMER 具有较好的酶解能力, 并且可以显著缩短整个酶解流程的时间. 结果表明, 该 IMER 有望提高对蛋白质组样品的酶解效率.

参考文献

- 1 Aaron A K, Michael J M. Effects of modified digestion schemes on the identification of proteins from complex mixtures. *J Proteome Res*, 2006, 5: 695—700
- 2 Hervey, Strader M B, Hurst G B. Comparison of digestion protocols for microgram quantities of enriched protein samples. *J Proteome Res*, 2007, 6: 3054—3061
- 3 Byrne R E, Scanu A M. Soluble and immobilized trypsin as structural probes of human plasma high-density lipoproteins: enzyme properties and kinetics of proteolysis. *Biochemistry*, 1983, 22: 2894—2903
- 4 Li Y, Yan B, Deng C H, et al. Efficient on-chip proteolysis system based on functionalized magnetic silica microspheres. *Proteomics*, 2007, 7: 2330—2339
- 5 Li Y, Xu X Q, Deng C H, et al. Immobilization of trypsin on superparamagnetic nanoparticles for rapid and effective proteolysis. *J Proteome Res*, 2007, 6: 3849—3855
- 6 Li Y, Yan B, Deng C H, et al. On-plate digestion of proteins using novel trypsin-immobilized magnetic nanospheres for MALDI-TOF-MS analysis. *Proteomics*, 2007, 7: 3661—3671
- 7 Cooper G W, Chen J Z, Li Y, et al. Membrane-based nanoscale proteolytic reactor enabling protein digestion, peptide separation, and protein identification using mass spectrometry. *Anal Chem*, 2003, 75: 1067—1074
- 8 Slys G W, Lewis D F, Schriemer D C. Detection and identification of sub-nanogram levels of protein in a nanoLC-trypsin-MS System. *J*

- Proteome Res, 2006, 5: 1959—1966
- 9 Calleri E, Temporini C, Perani E, et al. Trypsin-based monolithic bioreactor coupled on-Line with LC/MS/MS system for protein digestion and variant identification in standard solutions and serum samples. *J Proteome Res*, 2005, 4: 481—490
 - 10 Sakai-Kato K, Kato M, Toyooka T. On-line trypsin-encapsulated enzyme reactor by the sol-gel method integrated into capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 2002, 74: 2943—2949
 - 11 Slysz G W, Schriemer D C. Blending protein separation and peptide analysis through real-time proteolytic digestion. *Anal Chem*, 2005, 77: 1572—1579
 - 12 Duan J C, Sun L L, Liang Z, et al. Rapid protein digestion and identification using monolithic enzymatic microreactor coupled with nano-liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2006, 1106: 165—174
 - 13 Ma J F, Qiao X Q, Deng Q L, et al. Organic-inorganic hybrid silica monolith based immobilized trypsin reactor with high enzymatic activity. *Anal Chem*, 2008, 80: 2949—2956
 - 14 Han M J, Lee S Y. The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. *Microbiol Mol Biol R*, 2006, 7: 362—439

A Novel Organic-Inorganic Hybrid Monolith for Trypsin Immobilization

WU ShuaiBin^{1,2}, MA JunFeng^{1,2}, YANG KaiGuang¹, LIU JinXiang^{1,2},
LIANG Zhen¹, ZHANG LiHua¹ & ZHANG YuKui¹

¹Key Laboratory of Separation Sciences for Analytical Chemistry, National Chromatographic R&A Center,
Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;
²Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

In proteomics, various immobilization enzyme reactors (IMER) have been put more attention for the realization of high throughput digestion. In this report, a novel organic-inorganic hybrid monolith based IMER was prepared in 100 μm i.d. capillary with 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilane (GLYMO) as monomer and Tetraethoxysilane (TEOS) as crosslinker. Trypsin immobilization was achieved via the reaction between vicinal diol groups obtained from epoxy groups' hydrolysis and amino groups of trypsin. By this IMER, BSA was digested well in 47 s. After $\mu\text{RPLC-MS/MS}$ analysis and database searching, beyond 35% sequence coverage was obtained, and the result was comparable to that of 12 h in solution digestion. The present IMER has shown an applicable potential for the high throughput digestion.

IMER, organic-inorganic hybrid monolith, protein identification, HPLC-MS/MS

doi: 10.1360/052010-330