

密级

论文编号:

中国农业科学院

学位论文

极细链格孢菌糖基化激活蛋白的纯化
及其电喷雾质谱的分析

**The Purification and ESI-MS Analysis of a Glycosylated
Activator Protein from *Alternaria tenuissima***

硕士研究生: 李承雷

指导教师: 邱德文 研究员

申请学位类别: 理学硕士

专 业: 生物化学与分子生物学

研 究 方 向: 蛋白质药物工程

培 养 单 位: 中国农业科学院研究生院
植物保护研究所

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES

Master Dissertation

**The Purification and ESI-MS Analysis of a Glycosylated
Activator Protein from *Alternaria tenuissima***

MS Candidate: Li Chenglei

Advisor: Qiu Dewen

Major: Biochemistry and Molecular Biology

Specialty: Biopesticide Engineering

Institute: Graduate School of Chinese

Academy of Agricultural Sciences

Institute of Plant Protection

June 2007

基金来源声明

本学位论文是国家“863”计划（项目编号：2006AA10A210）
和国家“973”计划（项目编号：2003CB114204）的部分内容。

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

摘要

从极细链格孢菌 (*Alternaria tenuissima*) 提取出来的激活蛋白具有诱导植物系统抗性的活性, SDS-PAGE 显示主要有三个蛋白质条带, 分子量分别为 33kD, 42kD 和 66kD。前期研究已证明, 分子量为 66kD 左右的蛋白为糖蛋白, 为了进一步研究该糖蛋白的性质及其作用机理, 本文通过层析法等多种方法对该蛋白进行了纯化, 获得了银染电泳级的纯品; 利用 TFMS 化学法切除了 O-连接的糖基, 分析了其糖基修饰位点; 在标准蛋白高效液相色谱-电喷雾质谱 (HPLC-ESI-MS) 分析技术体系基础上, 建立了该糖基化激活蛋白的 HPLC-ESI-MS 分析体系, 获得了精确分子量, 经蛋白数据库搜索, 初步推测该糖基化激活蛋白为一新型蛋白。具体结果如下:

用硫酸铵沉淀法结合乙醇沉淀法去除了影响蛋白纯化的真菌多糖, 优化了柱层析纯化的缓冲液和洗脱条件, 通过 DEAE 阴离子交换层析技术和梯度洗脱方式, 以及 Superdex75 10/300 凝胶过滤层析纯化, 获得了银染电泳纯的单一蛋白条带; 利用液相等电聚焦结合 SDS-PAGE 技术, 测得该糖基化蛋白的等电点为 4.27。

采用 TFMS 化学法去除了该糖基化激活蛋白 O-连接的糖基, SDS-PAGE 结果显示切除后的蛋白呈现两条带, 初步推测该糖基化激活蛋白至少存在两个糖基修饰位点。

建立了标准蛋白溶菌酶和 BSA 的 HPLC-ESI-MS 蛋白分析体系, 测定了溶菌酶的精确分子量 14310.7Da 和 BSA 酶解片段的 RP-HPLC-ESI-MS 谱图, 并通过 MASCOT 搜索得到正确鉴定。

建立了 HPLC-ESI-MS 分析糖基化激活蛋白的技术体系, 测定了该糖基化激活蛋白的相对分子质量为 50270D, 获得了其 RP-HPLC-ESI-MS 谱图, 经数据库搜索, 没有发现较高匹配, 初步推测其为一新型蛋白。

关键词: 极细链格孢菌, 激活蛋白, 分离纯化, 糖基化, 电喷雾质谱

Abstract

The Activator Proteins extracted from *Alternaria tenuissima* can enhance plant growth and induce disease resistance and show three bands on SDS-PAGE gel, 33kD, 42kD and 66kD, of which 66kD has been proved to be a glycosylated protein. To further study its characteristics and action mechanism, this research separates and purifies this glycosylated protein by chromatography and other techniques and obtains a pure protein showing a single band on the silver-stained SDS-PAGE gel. The O-linked glycans are removed by TFMS chemical method and the glycosylation sites are analysed. Based on the standard protein HPLC-ESI-MS analytical technique, the glycosylated activator protein HPLC-ESI-MS analytical technique is built, and the accurate molecular weight of the glycosylated protein is measured. The MS data search in the protein database shows that this glycosylated protein may be a new protein.

The concentration methods of ammonium sulphate fractionation and cold alcohol precipitation, are used to concentrate the proteins and remove the polysaccharide, which influences the protein purification. The buffer and elution conditions are optimized and the glycosylated activator protein is then purified by anion exchange chromatography and size exclusion chromatography. The result shows that the MES buffer at the pH6.0, which contained 0.2M NaCl, could purify the protein. The elution of the second peak after size exclusion chromatography shows a single band on the silver-stained SDS-PAGE gel. The pI=4.27 of the purified glycosylated activator protein is acquired by liquid isoelectric focusing electrophoresis.

The O-linked glycans of the glycosylated activator protein are removed by TFMS chemical method and the protein shows two bands on the SDS-PAGE gel, which means this glycosylated activator protein may have at least two glycosylation sites.

The standard protein lysozyme and BSA are used to build a HPLC-ESI-MS protein analytical technique. The accurate molecular weight of the lysozyme is measured at 14310.7 dalton. The trypsin digest peptides of BSA are analysed by RP-HPLC-ESI-MS and obtains an accurate identification by MASCOT search.

Based on the standard protein HPLC-ESI-MS analytical technique, the glycosylated protein HPLC-ESI-MS analytical technique is built, and the accurate molecular weight of the glycosylated protein is measured at 50270 dalton. The trypsin digest peptides of the glycosylated activator protein are analyzed by RP-HPLC-ESI-MS and no high score matches are found in MASCOT search, which means this glycosylated protein may be a new protein and needs further study to be proved.

Key words: *Alternaria tenuissima*, Activator Protein, Purification, Glycosylation, Electrospray Ionization Mass Spectrometry

目 录

第一章 绪论	1
1.1 研究概述	1
1.2 蛋白激发子种类及其在国内外研究进展	1
1.2.1 过敏蛋白Harpin	1
1.2.2 激发素Elicitins	2
1.2.3 激活蛋白(Activator).....	3
1.3 糖蛋白的结构功能及糖基化分析方法	3
1.3.1 蛋白质糖基化的主要类型.....	3
1.3.2 糖基化发生的特点及其分析技术的难点	4
1.3.3 蛋白质糖基化研究的内容、技术和策略.....	5
1.3.4 糖蛋白鉴定/糖基化位点确定方法.....	6
1.4 电喷雾质谱在生物样品分析中的应用	7
1.4.1 电喷雾电离过程.....	8
1.4.2 电喷雾电离质谱的分子质量的检测.....	9
1.4.3 电喷雾电离质谱用于多肽与蛋白质分析.....	9
1.5 高效液相色谱-质谱联用在激发子研究中的应用	12
1.6 研究目的和意义	13
第二章 糖基化激活蛋白的纯化及其理化性质的分析.....	14
2.1 材料与仪器	14
2.1.1 试剂与材料.....	14
2.1.2 仪器	15
2.2 方法	15
2.2.1 极细链格孢菌 (<i>Alternaria tenuissima</i>) 的培养与激活蛋白粗提液的制备	15
2.2.2 激活蛋白的粗分离.....	15
2.2.3 蛋白浓度测定方法.....	16
2.2.4 糖基化激活蛋白的等电点分析	17
2.2.5 糖基化激活蛋白柱层析纯化方法的建立.....	19
2.2.6 糖基化激活蛋白的确定与去糖基化.....	21
2.2.7 糖基化激活蛋白的生物活性测定.....	22
2.3 结果与分析	23
2.3.1 糖基化激活蛋白的等电点.....	23
2.3.2 糖基化激活蛋白的柱层析纯化结果.....	23
2.3.3 糖基化激活蛋白的去糖基化.....	26
2.3.4 糖基化激活蛋白的生物活性测定.....	26
2.4 小结	28
第三章 模式蛋白溶菌酶和BSA的高效液相-电喷雾质谱分析	29
3.1 材料与仪器	29
3.1.1 试剂、材料.....	29
3.1.2 仪器	29

3.1.3 生物样品.....	30
3.2 方法.....	30
3.2.1 溶剂及酸度的选择和仪器参数的优化.....	30
3.2.2 标准样品的HPLC分析.....	30
3.2.3 牛血清白蛋白（BSA）的酶解.....	31
3.2.4 标准蛋白的质谱分析条件.....	32
3.3 结果与讨论.....	32
3.3.1 溶剂及酸度的选择.....	32
3.3.2 仪器工作条件优化.....	33
3.3.3 标准蛋白纯品和混合物的HPLC分析结果.....	33
3.3.4 电喷雾质谱测定溶菌酶的相对分子质量.....	35
3.3.5 BSA酶解片段的ESI质谱分析结果.....	36
3.4 小结.....	39
第四章 糖基化激活蛋白的HPLC-ESI-MS分析技术体系的建立.....	40
4.1 材料与仪器.....	40
4.1.1 试剂、材料.....	40
4.1.2 仪器.....	40
4.2 方法.....	40
4.2.1 HPLC分析条件.....	40
4.2.2 质谱条件.....	41
4.2.3 糖基化激活蛋白的酶解.....	41
4.2.4 数据分析.....	41
4.3 结果与讨论.....	41
4.3.1 糖基化激活蛋白的HPLC分析.....	41
4.3.2 利用ESI质谱测定糖基化激活蛋白的相对分子质量.....	42
4.3.3 糖基化激活蛋白酶解产物的RP-HPLC分离及ESI质谱分析.....	43
4.4 小结.....	46
第五章 结论.....	47
参考文献.....	48
致谢.....	54
作者简历.....	55

缩写词与英汉对照

英文缩写	英文全称	中文
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
FPLC	Fast protein liquid chromatography	常压蛋白液相色谱
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高效液相色谱
RP-HPLC	Reversed Phase high performance liquid chromatography	反相高效液相色谱
A.A.	amino acid	氨基酸
ACN	acetonitril	乙腈
BSA	bovine serum albumin	小牛血清白蛋白
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PSD	Post Source Decay	源后裂解
CID	collision induced dissociation	碰撞诱导解离
ddH ₂ O	double distilled water	重蒸水
<i>de novo</i> seq.	de novo sequencing	从头测序
ESI	electrospray ionization	电喷雾
IEF	isoelectric focusing	等点聚焦
IT	ion-trap	离子阱
kDa	kilodalton	千道尔顿
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization	基质辅助激光解析电离
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
TFMS	trifluoromethanesulfonic acid	三氟甲基磺酸
PMF	peptide mass fingerprinting	肽指纹图谱
MS	mass spectrometry	质谱
MS/MS	tandem mass spectrometry	串联质谱
Kb	kilobase	千碱基
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
TEMED	tetramethylethylenediamine	N, N, N, N' 一四甲基乙二胺
Tris	hydroxymethyl aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
PR	Pathogenesis Related Proteins	病程相关蛋白
PNGase F	peptide:N-glycosidase F	肽:N-糖苷酶

第一章 绪论

1.1 研究概述

蛋白激发子是一类能激发植物防御反应基因表达与过敏性反应的特殊信号蛋白活性物质(王金生, 2001)。近 20 年来, 已经从植物病原菌发现多种具有诱导植物广谱抗性和促进生长的多功能激发子类蛋白。其中代表性的蛋白类激发子为: 过敏蛋白(Harpin)、激发素(Elicitins)和激活蛋白(Activator)。激发子能引起抗病基因的诱导表达, 抗病物质的产生, 细胞调亡, 过敏反应(HR)等等。这些反应阻止或限制了病害的发生和发展, 减小其危害。由于激发子的作用在“植物-微生物”互作事件中处于上游, 是其他反应(如与受体结合, 信号传导, 抗病基因诱导表达等)的源头(Numberger & Scheel, 2001), 因此对其研究就显得尤为重要。

利用层析、电泳等多种技术手段纯化这类激发子蛋白, 并采用可与高效液相色谱联用的高灵敏度的电喷雾质谱对其进行鉴定, 序列分析和翻译后修饰等, 可以为分析这类蛋白质的性质, 结构与功能的关系, 及作用机理等的研究提供丰富的信息, 并为更好的将这些能诱导植物广谱抗性和促进生长的多功能激发子类蛋白应用于生物防治领域奠定理论基础。

1.2 蛋白激发子种类及其在国内外研究进展

目前发现的植物蛋白激发子按照来源与特性, 分为过敏蛋白 Harpin、激发素 elicitins、无毒蛋白, 病毒蛋白及激活蛋白 Activator 等。

1.2.1 过敏蛋白 Harpin

1992 年 Wei 等研究表明, Harpin 蛋白是由梨火疫病细菌(*Erwinia amylovora*)hrp N 基因编码的蛋白, 大小为 44kD (Wei *et al.*, 1992)。突变分析表明 harpin 是植物病原细菌诱导非寄主过敏性并在寄主上致病所必需的蛋白因子, 可在烟草上单独诱导产生过敏反应。harpin 基因虽然是来自于病原菌, 但是作为一种非特异性的激发子却能够引起非寄主抗病性的增强以及促进植物的生长。harpinEa 是来自梨火疫病的病原菌 *E.amylovora*, 然而在转 harpinEa 的梨上, harpinEa 也表现出了非常强的抗病。

HarpinEa 具有以下分子特征(1)亲水性; (2)403 个氨基酸残基长度, 分子量 44kD; (3)对热稳定: 100 摄氏度处理 10min 不会使其失活; (4)对蛋白酶 K 和紫外线敏感; (5)富含甘氨酸而缺少半胱氨酸; (6)水溶性酸性蛋白; (7)无四级结构。

1.2.2 激发素 Elicitins

Elicitins 是疫霉属(*Phytophthora*)和腐霉属(*Pythium*)产生的、在烟草上引起过敏反应(HR) 和系统获得抗病性(SAR) 的一类胞外蛋白类激发子的总称。虽然这类激发子在化学性质上各不相同, 但是都具有引发植物防卫反应的特性(Ebel & Cosio, 1994)。自 1977 年观察到(*P. cryptogea*)的菌体提取物和培养滤液能引起烟草叶片坏死性反应以来, 从 *P. cryptogea*、*P. cinnamomi* 和 *P. capsici* 中已纯化了分子量约 10KD 的多种蛋白类激发子 (Ricci *et al.*, 1989)。其中最具有代表性的是由隐地疫霉(*Phytophthora cryptogea*)所分泌的隐地蛋白(cryptogein,Cry)。

Elicitins 氨基酸序列高度相似和保守, 蛋白质前体含 19 或 20 个氨基酸的信号肽, 成熟蛋白质一般含 98 个氨基酸, 分子量一般为 10 kD, 少数 Elicitins 略有不同。迄今已发现 17 种疫霉菌中存在 Elicitin 活性蛋白, 根据等电点和对烟草的激活反应可分为 α -elicitin (酸性) pI 为 3-5 和 β -elicitin (碱性) pI 为 7-9 两类。多数卵菌产生的 elicittins 只有 α 或 β 一种类型, 但致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 等 7 种卵菌分别产生 α 与 β 两种类型的 Elicitins。除了致病疫霉产生的两种 Elicitins α 与 β 型诱导 HR 的能力相同, 其他所有 β 型 Elicitins 的生物活性都高于 α 型。

Cryptogein 在极低浓度(100 pmol/mL)下就能诱导烟草产生 HR, 并使植株获得广谱抗病性, 同时产生与防卫反应相关的物质如乙稀、植保素(PA)、病程相关蛋白(Pathogenesis Related Proteins, PR)等 (Bourque *et al.*, 1999)。Kamoun 等用 cryptogein 和 parasiticein 处理烟草、番茄、莴苣、甘蓝、黄瓜、茄子、辣椒和拟南芥等 61 种植物, 结果发现两种 Elicitins 在烟草、萝卜和芜菁植物上产生 HR, 而在其它植物上则不能, 表明 Elicitins 是一种特异性激发子 (Kamoun *et al.*, 1993)。研究证明, Elicitin 是通过水杨酸介导抗病信号途径, 激发植物获得对真菌、细菌等病原物的系统抗性(SAR), 同时产生活性氧自由基、脂过氧化物、植保素(PA)、病程相关蛋白等防御反应相关物质 (Dong *et al.*,1999)。

国内对 Elicitin 的研究主要集中在基因的克隆和表达上。谢丙炎等在 1998 年系统研究了苾麻疫霉诱抗激发蛋白(Boechemriacin)的理化特性、功能, 并进行了基因结构的分析, 发现该蛋白能诱导辣椒对疫病产生抗性, 并首次发现 Elicitin 基因存在断裂现象。用低浓度的隐地蛋白处理茄科、十字花科等多种非寄主植物可诱导产生 HR, 并使植物获得对病原物的系统抗病性 (谢丙炎等, 1999)。2000 年蒋冬花等研究还发现, 隐地蛋白 13 位上的赖氨酸在诱导细胞死亡中起着关键的作用 (蒋冬花 & 孔世海, 2002)。将克隆的隐地蛋白(cryptogein)基因转化烟草后表现抗黑胫病作用 (蒋冬花等, 2002)。

张宏明从疫霉菌(*Phytophthora palamivora*)Butler 的培养滤液中分离出分子量为 10.6 KD 的不含糖基的耐热蛋白。这种 10.6 KD 蛋白能诱导烟草(*Nicotiana tobacum*)叶片发生过敏性坏死反应。用该蛋白处理烟草叶肉、表皮和保卫细胞, 以及悬浮培养细胞在产生过敏性坏死反应之前, 均有 H₂O₂ 的大量生成, 推测这种 10.6 KD 蛋白也属于 Elicitin 类激发子 (张宏明等, 1999)

1.2.3 激活蛋白 Activator

植物激活蛋白是从葡萄孢菌 (*Botrytis*)、交链孢菌 (*Alternaria*)、黄曲霉菌 (*Asporgillus*)、稻瘟菌 (*Pyrc μ Laria*)、青霉菌 (*Penicillium*)、纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)、木霉菌 (*Trichoderma*)、镰刀菌 (*Fusarium*) 等多种真菌中筛选、分离、纯化出的一系列蛋白激发子 (邱德文, 2002, 2004)。该类蛋白不激发烟草植株的过敏反应, 这与 Harpin 和 Elicitin 的生物活性均基于植物的过敏反应不同 (刘萍萍 & 闰艳春, 2005)。激活蛋白诱导处理种子能够加快黄瓜种子的萌发, 促进幼根的生长; 处理多种瓜果蔬菜均能提高其座果率, 如处理西瓜和番茄可使瓜果数和果重显著提高, 分别达到 77.4% 和 45.7%; 对灰霉病害的防效达 76.92%, 用激活蛋白可湿性粉剂处理桃子与西红柿, 可减少桃子与西红柿灰霉病的发病率和烂果率, 对桃子与西红柿具有保鲜作用。研究表明交链孢菌激活蛋白处理后, 水稻幼苗增强了对稻瘟菌的抗性, 几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性提高, 且酶活性的变化趋势与稻瘟菌抗性的变化趋势相仿, 它们可能介入了交链孢菌激活蛋白诱导的水稻幼苗对稻瘟菌抗性的提高 (赵利辉等, 2005)。

植物激活蛋白主要通过激活植物体内分子免疫系统, 提高植物自身免疫力; 通过激发植物体内的一系列代谢调控, 促进植物根茎叶生长和叶绿素含量提高, 从而达到提高作物产量的目的。由此可见该类激活蛋白具有广泛的应用前景。

植物激活蛋白研究起步较晚, 但是已经成功地从 *Alternaria* 菌 cDNA 表达文库中筛选到了部分植物激活蛋白的 cDNA 序列。徐锋 (2006) 从稻瘟菌 (*Magnaporthe grisea*) 中也纯化了一种激活蛋白, 并获得了其 cDNA 序列。赵利辉 (2005) 和黄丽俊 (2005) 等也利用激活蛋白处理后的水稻基因芯片研究了激活蛋白对水稻基因的影响。

1.3 糖蛋白的结构功能及糖基化分析方法

糖蛋白 (glycoprotein) 是指由比较短, 往往带分支的寡糖与多肽链某些特殊部位的羟基或酰氨基共价连接而成的一类结合蛋白质。它广泛存在于动物、植物、微生物及病毒中。细胞中的糖蛋白有可溶性的, 也有与膜结合的不溶形式, 生物体内大多数蛋白质是糖蛋白 (Varki A, 1993)。近 20 年来的研究发现, 糖蛋白中的糖链在各种生命现象中起着重要的作用, 如细胞识别、粘连与融合; 信号传导、免疫与应答; 细胞转化、分化与反分化等都与糖链的作用有关。自 19 世纪末人们开始提出糖蛋白的概念并加以研究以来, 先后明确了糖蛋白的糖基结构、多糖成分和部分生物学功能, 同时, 也能够识别糖蛋白中的糖苷键类型。

1.3.1 蛋白质糖基化的主要类型

在糖蛋白的高级结构中, 肽链折叠卷曲成特定的空间结构, 肽链上只有某些特殊的氨基酸序列位点才能与糖链结合, 糖链作为侧链和亲水基团暴露在空间结构外面。糖肽键是糖链和肽链的连接键, 是指糖基异头碳原子上的羟基与肽链氨基酸残基上的酰胺基或羟基脱水形成的糖苷键。

可分为 N-糖苷键和 O-糖苷键两大类。参与糖肽键的氨基酸残基主要有:天冬酰胺(Asn)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、羟赖氨酸(Hyl)和羟脯氨酸(Hyp)。它们可以与 N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、木糖、半乳糖及阿拉伯糖形成 5 种主要的糖肽键,分别是: β -N-乙酰葡萄糖胺-天冬酰胺(GlcNAc-Asn)、 α -N-乙酰半乳糖胺-丝氨酸/苏氨酸(GalNAc-Ser/Thr)、 β -木糖-丝氨酸(Xyl-Ser)、 β -半乳糖-羟赖氨酸(Gal-Hyl)、 α -L-阿拉伯糖-羟脯氨酸(Ara-Hyp)。此外,还发现罕见的以 N-末端氨基酸残基为连接点的糖肽键,存在于小鼠血红蛋白 A1c 中。

1.3.1.1 N-糖苷键

N-糖苷键不仅与氨基酸种类有关,而且与氨基酸顺序有关。带糖链的天冬酰胺残基附近往往含有一个苏氨酸或丝氨酸残基,即它具有顺序子结构,称为天冬酰胺顺序子:天冬酰胺-X-苏氨酸(Asn-X-Thr)或天冬酰胺-X-丝氨酸(Asn-X-Ser),其中 X 可代表除脯氨酸以外的任何一种氨基酸残基(吴东儒等,1987)。

研究表明糖蛋白中能与天冬酰胺残基相连的寡糖链数目是有限的,并非所有天冬酰胺顺序子中的天冬酰胺都发生糖基化,如鸡卵清蛋白。天冬酰胺顺序子不仅与糖基化有关,可能对糖链的组成与长短也有控制作用,如顺序子中的 X 为极性氨基酸时,常生成复杂型寡糖链;X 为非极性氨基酸时常形成单纯型寡糖链。

1.3.1.2 O-糖苷键: 主要有 4 种类型(张维杰,1987)。

(1) 以 α -N-乙酰半乳糖胺-丝氨酸/苏氨酸残基为起点,此糖肽键是 3-O-(2-乙酰胺-2-脱氧- α -D-吡喃半乳糖基)-L-丝氨酸或(苏氨酸)。是粘液糖蛋白的特征键,在某些非粘液型糖蛋白中也有发现。

(2) 以木糖-丝氨酸残基为连接点,大多数以木糖残基与肽链上丝氨酸残基结合,形成 O-糖苷键而连接起来。

(3) 以半乳糖-羟赖氨酸残基为连接点,此糖肽键称为 5-O- β -吡喃半乳糖基-5-羟基-L-赖氨酸。是胶原和一些胶原样多聚物的特征结构。在发生糖基化的羟赖氨酸(Hyl)之后,紧接着往往是一个甘氨酸(Gly)。

(4) 以阿拉伯糖-羟脯氨酸残基为连接点,此糖肽键称为 4-O- β -D-吡喃阿拉伯糖基-4-羟-反式-L-脯氨酸,目前仅在高等植物中发现,主要存在于绿色植物和绿藻细胞壁的糖蛋白中。

1.3.2 糖基化发生的特点及其分析技术的难点

蛋白质糖基化的一个重要特点是不均一性,即在糖基化发生过程中会产生一系列结构相关的糖链(微不均一性)以及同一糖蛋白中的不同糖基化位点连接有不同的糖链(点不均一性)。这是由于糖基化的发生不同于多肽链的合成,不受 DNA 的直接控制,而是由糖基化相关的几种酶协调作用完成的,受各种生理生化条件的影响很大,造成即使同一个位点也会有糖基化程度不同的产物(Dell & Morris, 2001; Hirabayashi *et al.*, 2002)。比如人红细胞 CD59 在一个糖基化位点

上有超过 100 种不同的糖链(Rudd *et al.*, 2001;),而在所有符合 N-糖基化位点保守序列的 N-X-S/T 中也只有约三分之一发生了糖基化(Lennarz, 1980; Spellman, 1990),这种糖基化程度的不同使同一肽链因所带糖基的不同而呈现多种多样的“糖形”。糖基化的不均一性给糖蛋白的分离分析带来了很大的困难。首先,不同糖形的同一糖蛋白会在电泳上呈现弥散的条带(SDS-PAGE)或多个深浅不同的点(2DE),造成同一蛋白在不同的点上得到鉴定或者由于信号的分散造成较低丰度的蛋白得不到鉴定(Fryksdale *et al.*, 2002);糖基化的不均一性同样会造成糖蛋白在色谱中不能得到良好的分离(Hardy & Townsend, 1988)。其次,在质谱分析中由于糖基化不均一性的影响,糖蛋白经常表现为一簇分辨率很差的峰,得不到准确的分子量;在利用肽质量指纹图谱(PMF)法鉴定蛋白质时,同一肽段由于带有不同的糖链会表现为多个不同的质荷比(m/z)从而干扰蛋白的鉴定(Karty *et al.*, 2002);在用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法进行蛋白质鉴定时,同一肽段的信号同样会因分散而减弱,得不到好的二级图谱。

蛋白质糖基化研究的另一个难点在于与肽相连的糖基在 CID 或 PSD 的条件下非常脆弱,PSD 或 CID 分析糖肽最常见的碎片离子对应于失去糖基后的完整肽段,其他带糖或不带糖的碎片离子都很少见,提供的结构方面的信息很少,丢失了糖基化位点的信息,也造成了蛋白鉴定的困难(Settineri *et al.*, 1990; Greis *et al.*, 1996)。此外,糖基化程度高的蛋白特别是那些有着成簇的 O-糖链的蛋白经常对蛋白酶作用有抵抗力,造成酶解效率下降而且不能被考马斯亮蓝很好地染色,因而在分析时有可能被忽略(Hanisich *et al.*, 2001)。虽然估计有超过 50%的蛋白发生了糖基化,但现有数据库条目中只有约 10%注释为糖蛋白,也从另一方面反映了蛋白质糖基化研究的难度(Apweiler *et al.*, 1999)。

1.3.3 蛋白质糖基化研究的内容、技术和策略

全面的蛋白质糖基化分析应包括以下几个方面(Spellman, 1990): (1) 蛋白质是否发生了糖基化? (2) 是 O-糖基化、N-糖基化还是其他形式的糖基化? (3) 糖基化位点在哪个氨基酸残基上? (4) 糖基化位点连接的是经过较少加工(高甘露糖型)的糖链还是经过充分加工(复杂型)的糖链? (5) 某一特定位点连接了几种不同的糖链? 此外,要阐明糖链的一级结构还应包含以下几个方面的内容(Spellman, 1990): 糖链的单糖组成;糖苷键在糖环上的连接位置;单糖的差向异构(α 或 β)、绝对构型(D 或 L)以及环型(呋喃糖或吡喃糖);单糖的连接顺序;糖链上非糖取代基(磷酸基或磺酸基等)的连接位置;上述目标使分析工作面临巨大的挑战,目前还没有任何一种分析技术能解决以上所有问题。

在糖链结构解析方面应用最广泛的是质谱(MS)技术和核磁共振(NMR)技术(Harvey, 2001; Spellman, 1990),2 种技术各有利弊,在应用中经常可以互补。MS 的最大优势是其很高的灵敏度,可以精确地测定质量,在某些情况下还可以得到糖链序列方面的信息;但是 MS 不能区分参与糖链构造的各种单糖的同分异构体,也不能提供连接位置、差向异构等结构方面的信息。NMR 是惟一能够提供糖链结构方面所有信息的技术,但灵敏度低,对样品纯度要求高,目前在天然样品的分析中无法得到广泛应用。近年来侧重糖蛋白中糖链部分的分析方法有一些相关报道,但一直没有突破性的进展,当前还不具备规模化直接分析糖链组成、结构的技术条件(Kuster *et al.*,

2001), 这也是长期以来糖类研究滞后于核酸、蛋白研究的一个主要原因。

1.3.4 糖蛋白鉴定/糖基化位点确定方法

目前基于质谱分析的糖蛋白鉴定一般先对糖基化位点进行特异的质量标记, 使之与理论质量有一个差异, 然后通过质谱分析检测到这种差异, 鉴定糖蛋白, 进而通过 MSMS 检测是在哪个氨基酸残基上发生了这种变化从而确定糖基化位点。也可以通过检测在质谱的气相离子反应过程中由糖链引起的特定质量变化(比如中性丢失、特定的子离子的存在)来鉴定样品是否发生了糖基化。

1.3.4.1 PNGase F 酶法

这是目前糖蛋白组学研究中应用最为广泛的一种 N-糖蛋白鉴定方法。肽:N-糖苷酶(peptide:N-glycosidase F, PNGase F)几乎可以作用于所有的 N-糖链, 同时使天冬酰胺转变为天冬氨酸(Tretter *et al.*, 1991; Charlwood *et al.*, 2000), 造成相对分子质量增加 0.98, 从而起到质量标记 N-糖基化位点的作用。PNGase F 去糖基化反应的条件和胰蛋白酶几乎一致, 而且可耐受一定浓度的变性剂, 可以在溶液条件(Bunkenborg *et al.*, 2004; Kaji *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003)下或胶内(Kuster *et al.*, 1998; Van Den Steen *et al.*, 1998)进行顺序酶解, 应用十分方便。这种方法的最大不足在于不能区分自发脱氨基和酶促去糖基化, 这 2 种反应的结果是一样的, 都造成 N 向 D 的转化, 而自发脱氨现象在样品处理中是常见的(Rudd *et al.*, 1999; Wright, 1991)。其次 0.98 的质量差异以某些质谱仪难以区分(Hagglund *et al.*, 2004)。另外, PNGase F 对于 N-糖链五糖核心中与天冬酰胺相连的 GlcNAc 上以 α -1-3 形式连有岩藻糖(fucose)的糖链不起作用(Tretter *et al.*, 1991)。

1.3.4.2 Endo H 酶法

与 PNGase F 不同, 内切- β -N-乙酰葡萄糖胺酶 H(endo- β -N-acetylglucosaminidase H, Endo H)在去糖基化时会将 N-糖链五糖核心中与天冬酰胺相连的 GlcNAc 以外的部分切除, 而在糖基化位点处留下 GlcNAc, 从而起到标记糖基化位点的作用(Arakawa & Muramatsu, 1974; Trimble & Maley, 1984)。糖基化位点处的 GlcNAc 使该天冬酰胺残基相对理论质量增加了 203, 所以对质谱准确度要求不高。Endo H 酶最适 pH 为 5~6, 在 pH4 和 pH8 时仍保持 30%的活力。其性质惊人的稳定, 可抗蛋白酶作用, 反复冻融不影响其活力, 可在 4℃或冻结的状态下长期保存, 耐一定浓度的变性剂, 甚至煮沸亦不能使其完全丧失活性, 因而在糖蛋白研究中应用也比较广泛。Endo H 最近被用于糖蛋白组学中规模化鉴定糖基化位点, 取得了一定的成功(Hagglund *et al.*, 2004)。Endo H 最大的不足在于其狭窄的专一性, 实际上 Endo H 只能作用于高甘露糖型和杂合型 N-糖链。另外, 留在糖基化位点处的 GlcNAc 在 CID 或 PSD 的条件下并不稳定, 经常会脱落, 从而起不到标记糖基化位点的作用。这都在很大程度上限制了它在糖蛋白鉴定中的应用。不过, 可以利用其专一性和 PNGase F 配合使用, 阐明 N-糖基化发生的类型。

1.3.4.3 β -消除-米氏加成反应

对于O-糖蛋白来说, 现在还没有一种能与N-糖蛋白研究中应用的PNGase F相比的酶用以实现去糖基化/质量标记糖基化位点, 所以O-糖基化位点的标记多采用化学法, 其中报道较多的是 β -消除反应法。该方法基于在碱性环境中Ser、Thr上的O-糖基团会发生 β -消除形成1个不饱和的双键, 这个双键可以被亲核试剂攻击发生加成反应, 使Ser或Thr残基的质量相对其理论质量发生一个特定的变化, 也就是使O-糖基化位点被质量标记, 而且这种质量标记在PSD或CID的条件下是稳定的, 从而可以通过串联质谱测序的方法得到糖基化位点的信息。 β -消除反应很早就被广泛应用于糖蛋白的相关研究, 反应条件也不断改进, 比如极性非质子溶剂二甲基亚砜(DMSO)的加入起到了加快反应速度、减少蛋白质的降解以及增强某些难溶亲核试剂的溶解性的作用。加成反应中用的亲核试剂因实验目的的不同而多种多样, 如 Na_2SO_3 、 NaBH_4 、 CH_3SH 、 CH_3NH_2 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 NH_4OH 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$, 也有 β -消除反应完后不进行加成反应直接分析Ser、Thr的消除反应产物2-氨基丙烯酸、2-氨基-2-丁烯酸的。近几年来 β -消除-米氏加成反应与生物质谱技术结合用于O-糖基化位点测定方面已有不少报道(Byford, 1991; Admczyk *et al.*, 2001; Mirgorodskaya *et al.*, 2001; Hanisch *et al.*, 2001; Rademarker *et al.*, 1998; Czeszak *et al.*, 2002; Greis *et al.*, 1996), 大都是针对1个或几个糖蛋白或糖肽进行的方法学方面的研究。除了用于O-糖基化研究外, β -消除-米氏加成反应还更为广泛地用于蛋白质磷酸化富集、位点鉴定研究, 相关报道远比O-糖基化研究要多, 其中许多方法很值得在O-糖基化研究中借鉴。该方法的不足在于非糖基化或磷酸化的Ser、Thr残基的侧链羟基也可能发生 β -消除, 尤其是在较高的温度($>25^\circ\text{C}$)和较高的碱浓度下, 这是该类方法在应用中应该注意的问题。

1.3.4.4 三氟甲基磺酸法

三氟甲基磺酸(trifluoromethanesulfonic acid, TFMS)法可以切除与肽链直接相连的单糖以外的所有糖基, 留下的糖基则起到标记糖基化位点的作用。TFMS法去糖基化是基于这样的发现, 即糖苷键对TFMS非常敏感, 而肽键则在同样的条件下保持稳定, 因而可以在保持蛋白质一级结构完整的同时切除糖链。该法反应温和, 速度很快, 在 -10°C 、90mmol/L苯酚存在的条件下, 无水的TFMS可以在5min内切除辣根过氧化物酶同工酶C中8个N-糖基化位点的所有外围糖基, 且切糖后60%的产物仍保持活性。该法对糖基化类型没有选择性, 可以作用于所有类型的糖链, 这一点对于O-糖基化位点的标记尤为重要。其他翻译后修饰基团如磷酸基、磺酸基、血红素及 Ca^{2+} 、脂肪酰基以及二硫键在TFMS去糖基化过程中都不受影响。利用TFMS法标记确定糖基化位点已有不少相关报道(Paxton *et al.*, 1987; Hefta *et al.*, 1990; Müller *et al.*, 1997; Gerken *et al.*, 1997), 由于该法的温和性, 这些报道多集中于蛋白质糖基化相关的构效关系研究。TFMS法存在的不足在于切糖操作要保持严格的无水条件, 且糖链末端唾液酸的存在会影响反应的效率(Gerken *et al.*, 1992)。

1.4 电喷雾质谱在生物样品分析中的应用

质谱技术是目前蛋白质组研究中发展最快, 也最具活力和潜力的技术。它通过测定蛋白质的质量来判别蛋白质的种类。质谱有多种电离方法, 包括场解吸、等离子体解吸、激光解吸、快速

粒子轰击、电喷雾电离和大气压电离等。

电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 由于可以产生多电荷峰, 与传统的质谱相比扩大了检测的分子质量范围, 同时提高了灵敏度, 使一种 M/Z 限制在一定范围的四极质谱, 就可以分析分子质量超过 200ku 的蛋白质 (Feng & Konishi, 1992)。另外 ESI-MS 方法产生一系列的多电荷峰, 可以得到准确的分子量, 它还可与 HPLC 和高效毛细管电泳 (CE) 分离方法相连接, 扩大了质谱在生物领域的应用。

电喷雾现象的出现可以追溯到两个世纪之前, 但真正把电喷雾作为一种电离方法的创新性的研究是由 Dole 等在大约 30 年前开始的, 他们研究的目的是用电喷雾来产生气态大离子。1984 年 Yamashita 等把大气压电喷雾电离技术与四极质谱结合起来, 同年, Alexandror 把它和磁质谱结合起来。1988 年 Fenn 研究小组报道了用 ESI-MS 得到了带有 45 个正电荷分子量为 40ku 的蛋白质, 随后 ESI-MS 在生物大分子的研究领域进入了一个全新的发展阶段。到目前为止, 该法已经能够分析质量范围大约在 200ku 的蛋白质。

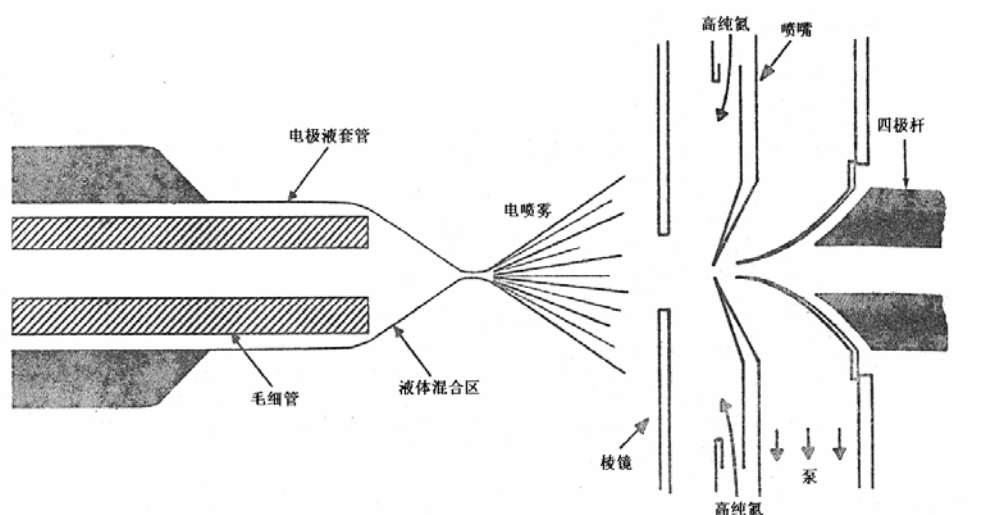


图 1-1 电喷雾质谱的电离接口示意图

Figure1-1 The Sketch Map of the Ionization Interface of ESI

1.4.1 电喷雾电离过程

如图 1-1 所示, 在毛细管管口加一高电压, 作用于经喷雾头进入离子化室的溶液, 再将 3~6kV 的电压加到毛细管和相对的电极之间, 电压导致毛细管末端的液滴表面的电荷增强, 高电压导致液体表面分裂和多电荷液滴的形成, 与毛细管子相对的电极携带的正或负电荷以产生正或负电荷液滴。对于电喷雾的整体而言, 带电液滴的形成是整个电喷雾过程的第一步, 而接下来的离子化是进行电喷雾分析的关键。而带电液滴形成分子离子的机制还不清楚。Iribane 和 Thomson 提出场辅助离子蒸发假设。在这种模型中, 处于液滴表面的离子是由于带电液滴的溶剂在空气中蒸发, 当场力在液滴表面达到临界点时由液相直接进入气相完成离子化的过程。而 Rollgen 等提

出了不同的假设机理，他认为当液滴在大气压下蒸发时，随着溶剂的蒸发，由于液滴直径变小，液滴表面电荷密度增加，当液滴表面电荷达到雷利极限 (Raleigh limit)，液滴进一步裂变，再次达到雷利极限，再一次“爆炸”，如此循环，当溶剂从小液滴中完全蒸发后形成分子离子。Abbas 和 Latham 的实验证实了从液滴生成分子离子的这一假设。

对于大分子化合物离子化过程的形成可用带电残渣模型理论加以解释，该理论认为大分子气相离子的形成是基于溶剂蒸发，由库仑爆裂辅助及较小液滴的相互排斥而导致液滴形成仅含有一个分子离子的气相离子，此过程所需能量很低，不会导致分子裂解。但是通过离子源内离子传输区的碰撞诱导解离 (CID) 电压设置可得到一些有效的碎片离子，但这只对一些不稳定结构有效，并且 ESI-MS 的 CID 质谱与电子轰击质谱 (EI) 及快原子轰击质谱 (FAB) 有一定的不同，可能是由于前者的开裂环境比 EI 及 FAB 源更为复杂，因此在对化合物结构的获得上有一定的制约。随着现代技术的发展，电喷雾与串联质谱 (MS-MS) 相连，即能为化合物提供很多结构信息。

1.4.2 电喷雾电离质谱的分子质量的检测

由于 ESI-MS 的分子离子状态不是由于裂解 (除非在高能量下发生碰撞诱导解离进入真空系统) 而得到，因此对于生物大分子的分子量测定变得比较容易。ESI-MS 得到的是一簇多电荷的质谱峰群，它的分子质量的测定可从以下假设中得出：(1) 两相邻峰相差一个电荷；(2) 电荷是由于分子离子质子化形成的。任何两个峰都可有效地测定分子质量。方程式 (1)，(2) 描述了分子质量 M_r 和多电荷离子 (P_1 , P_2) 以及它们各自所带电荷 (Z_1 , Z_2) 之间的关系。

$$P_1 Z_1 = M_r + M_a Z_1 = M_r + 1.0079 Z_1 \quad (1)$$

$$P_2 Z_2 = M_r + 1.0079 Z_2 \quad (2)$$

当 $P_2 > P_1$ 时解 (1)、(2) 方程，得

$$Z_1 = J (P_2 - 1.0079) / (P_2 - P_1) \quad (3)$$

通过 Z_1 可得到准确的分子质量。于是可将一簇多电荷峰的质谱图转化成化合物 $[M+H]^+$ 或 $[M+H]^-$ 的质谱图。

1.4.3 电喷雾电离质谱用于多肽与蛋白质分析

质谱用于分析生物活性分子的研究，灵敏度高，并能最有效地与色谱联用，适用于复杂体系中痕量物质的鉴定或结构测定。因此它已经成为解决生命科学中分析研究的重要手段。随着电喷雾电离技术的广泛应用，多肽与蛋白质分析近年来取得了相当大的成功 (Domon & Aebersold, 2006; Lin *et al.*, 2003; 唐新科, 2004)。

ESI-MS 可分为正离子 ESI-MS 和负离子 ESI-MS，一般而言，多肽与蛋白质的 ESI-MS 分析总是以正离子方式进行，这是因为蛋白质中含有较多的碱性氨基酸 (Arg, Lys 和 NH_2 端) 具有足够大的离解常数以确保蛋白质在酸性溶液中最可能地多重质子化。而负离子 ESI-MS 一般用于分析拥有酸性

官能团（诸如羧基、磷酸基等）的分子如核苷酸。负离子ESI-MS以 $(M-nH)^{-}$ 的电荷形式出现，通常比正离子ESI-MS的灵敏度低，灵敏度的下降是由于 Na^+ 代替了 H^+ 的原故，当核苷酸分子量增加时，磷酸钠加合物也同时增加。这个结果使峰加宽，灵敏度下降。

大多数蛋白质的ESI-MS的一个特点是平均电荷状态随分子量的增加而呈近似的线性关系。对蛋白质而言，被检测到的最大荷电状态与碱性氨基酸肽段数目加上 $-NH_2$ 端也成近似的线性关系。含有丰富二硫键的蛋白质比那些没有形成二硫键的分子量较小的分子得到的电荷少，可能的原因是在这些蛋白质中交叉连接的肽链不可能完全展开的原因。ESI-MS的主要缺陷是不易处理复杂混合物，因为它们产生一系列复杂的多电荷离子不易分辨。以下是ESI-MS在蛋白质化学研究中的一些应用。

(1) 分子质量的检测

蛋白质的分子质量是一个重要的参数，而目前常用于测定蛋白质分子质量的方法，如凝胶电泳或超速离心法，只有5%的精度，使蛋白质分子质量的估计不可靠。ESI-MS中所形成的多电荷离子可以直接用来准确地和高灵敏度地确定多肽与蛋白质的分子质量。因为ESI-MS不仅可与四极质谱相连，它还能与磁质谱、离子阱、飞行时间质谱及傅里叶变换回旋共振仪相连，在pmol数量级的水平或更少的样品检测中当分辨率为1000时可达0.005%的精度（Smith *et al.*, 1990），降低分辨力，对于肽在四极质谱上的检测限可到30fmol，Green等（1998）用电喷雾电离-傅里叶变换回旋共振质谱仪测定了质量相差很小的蛋白质。当样品量非常少时，在实验中样品的处理成为一个限制因素，这时电喷雾质谱可与液相色谱和毛细管电泳相连来发挥它的优越性。另外由于ESI-MS可以产生多电荷峰使检测的分子质量范围大大扩大，使M/Z限制在一定范围的四极质谱，就可以获得分子量超过200ku的蛋白质，但是，虽然它可检测分子量超过100ku的分子，但是分析非常复杂，这是因为此时的蛋白质的多电荷峰非常复杂，难以分辨，这可能是ESI-MS不能很好地分析复杂糖蛋白的主要原因。因为与普通蛋白不同，糖蛋白分子结构具有不均一性，包括糖链的微不均一性及糖基化位点的不均一性；多羟基结构的糖链使其质子化能力降低；还伴有糖链末端唾液酸的干扰等。这些特点给糖蛋白的质谱测定带来了困难。在进行质谱分析时，与普通蛋白质的质谱峰相比，糖蛋白分子的质谱峰变宽，灵敏度有很大程度的下降。只有应用性能高、灵敏度好的MALDI-TOF-MS或ESI-MS才可以直接测定相对分子质量不大、糖链不十分复杂的糖蛋白如核糖核酸酶B、 $\alpha 1$ 酸性糖蛋白等，而对于相对分子质量大（大于50000D）糖链复杂的糖蛋白如胎球蛋白，就很难直接测定其相对分子质量。

(2) 肽谱

肽谱是一个蛋白质通过酶解，得到的肽片段被分离和分析所得到的。这种方法很多年来一直用来检测蛋白质的一级序列。现在，肽谱与质谱结合称为质量肽谱。它的用途有：（1）确定蛋白质序列，尤其是重组DNA技术生产的蛋白质。这个过程是将胰酶酶解后的肽的分子质量与由从理论计算得到的分子质量相比较。在ESI-MS和MALDI-MS出现以前，序列测定是很复杂的过程，需要HPLC条件的优化，分离所有酶解碎片，通过氨基酸分析，肽序列分析几步来分析所有碎片。这需要很长时间，而现在随着ESI-MS和MALDI-MS及MS-MS的出现，这些过程只需要相当短的时间。

间。Loo 等 (1999) 和 Owens 等 (1998) 用 ESI 电离技术进行了肽的序列分析; (2) 确定和鉴别翻译后的修饰。大多数蛋白质在生物合成后都要进行翻译后修饰, 在许多情况下翻译后修饰对蛋白质生物活性是至关重要的, 目前质谱可能是最好的方法来检测翻译后修饰。Liu 等 (1999) 通过毛细管电泳与电喷雾电离串联质谱相连检测了重组修饰后的蛋白质。(3) 测定蛋白质降解产物, 几乎所有的蛋白质降解产物与原蛋白分子质量上均有变化, 质谱从原理上可以检测这种降解产物, 但是对于 M_r 超过 20ku 的大蛋白质, 质谱不能提供足够的分辨率来测定只有一个分子质量的变化。因此通常是由肽谱和质谱确定蛋白质的降解产物。将蛋白质酶解后的碎片用 ESI-MS 可找出与没降解蛋白质碎片的不同, 来确证蛋白降解产物; (4) 测定蛋白质的代谢产物, Wroblewski 等 (1993) 用 ESI-MS 研究了体外人生长激素的代谢产物和去 (64, 65)-人胰岛素原的代谢产物; (5) 配基结合键, Sall & Kaiser (1993) 用肽谱和 ESI-MS 确定了配基位点。

用现代技术如 ESI-MS 和 MALDI-MS 都可在很短的时间内得到蛋白质酶解后的质量肽谱, ESI-MS 的优点是在肽谱图中能够得到 M_r 低于 400u 的小分子肽段。因此它可以鉴定一些在其他质量肽谱图中不能区分的肽谱。它的另一个特点是能与 HPLC 系统直接相连来分析酶解后的碎片, 不需要任何纯化。ESI-MS 所产生的多电荷离子特别适用于串联质谱分析, 这是因为多电荷离子容易碎裂, 使碰撞活化灵敏度提高并且可以选择感兴趣的离子进行碰撞, 用来检测目标肽段, 可得到完全的序列信息, 因此在质量肽谱中应用 ESI-MS 可提供一种快速证实蛋白质一级结构的方法。

(3) 分析肽的合成产物

ESI-MS 是一种简单、快速的方法, 可用来证实肽的合成产物和确定许多合成副产物, 用质量分析 (1) 确证粗肽混合物中的产品; (2) 指导纯化过程; (3) 证实最终产物的质量和纯度。四级质谱和离子阱仪器广泛应用为化学家提供了很宽的选择范围。

(4) 研究非共价蛋白复合物

由于 ESI-MS 的温和的电离过程可以使以很弱的非极性共价键相互结合的完整的蛋白复合物直接被检测出来 (Loo *et al.*, 1997)。这些蛋白复合物包括蛋白质与肽的复合物, 蛋白质与金属离子的复合物, 蛋白质与核酸的复合物以及亚蛋白质结构之间的结合。用 ESI-MS 分析非共价蛋白复合物具有特殊的灵敏性及快速分析等特点。它在蛋白质/DNA 复合物的研究中具有很高的发展前景, 通常研究蛋白质/DNA 所用的方法是电泳迁移率变动分析 (EMSA), 而 ESI-MS 可以得到由 EMSA 所不容易获得的更详细的结果。色氨酸抑制子 (Potier *et al.*, 1998) 及维他命 D 受体 (Veenstra *et al.*, 1998) 用 ESI-MS 分析, 得到了其它技术所不能获得的信息。免疫缺陷病毒蛋白质复合物也成功地用 ESI-MS 进行了测定 (Loo *et al.*, 1998)。

(5) 寡核苷酸的测定

在 ESI-MS 和 MAILD-MS 出现以前用快原子轰击质谱和等离子体解吸质谱 (PDMS) 只能检测到限制在 10 个碱基以内的寡核苷酸。寡核苷酸的电喷雾质谱是由 Covey 首次测定的。他在负离子模式下检测了 oligomers 达到 14 个碱基。Murray (1996) 在电喷雾中应用铵离子代替钠离子, 寡核苷酸用含有醋酸铵的乙腈水溶液溶解, 被铵盐处理过后, 离子检测可达到 48 个碱基。

(6) 蛋白质折叠过程

蛋白质的折叠是包含多肽链的氨基酸序列的信息转换成一个特定的三维结构的过程。这种信息是如何形成具有生物活性的结构知之甚少。现在 ESI-MS 作为一种新的技术来阐明蛋白质的折叠过程,通过分析电荷状态分布和应用 H/D 交换技术,ESI-MS 被用来展示关于蛋白质的三维结构 (Winston & Fitzgarald, 1997)。最早 Chowdbury 等提出折叠与非折叠蛋白质可产生不同的电荷分布,他们观察到天然蛋白质的电喷雾质谱含有较低的静电荷,而去折叠蛋白质的电喷雾质谱产生一个较宽毓的电荷峰且带较高的电荷。

1.5 高效液相色谱-质谱联用在激发子研究中的应用

要更好的研究病原真菌与植物的相互作用,需要在蛋白和蛋白组学层面对其进行研究,生物质谱引入生命科学领域后,与植物病理学,分子植物病理学结合,取得了重要的研究成果,为更好地研究病原菌与植物的相互作用提供了大量的信息。

早在上世纪 90 年代末国际蛋白组热潮兴起后,各类生物质谱仪器进口呈现井喷趋势,但我国在这方面的整体研究实力还比较落后 (杨芑原等, 2003),特别是在农业上的应用还非常有限。原因如下:

首先,在硬件上:由于生物质谱、相关仪器和生物信息学分析软件还主要依赖进口,价格昂贵,入门门槛高,国内只有为数不多的科研院校早期有能力涉足该领域。

其次,在人员方面:该领域研究人员的缺乏也严重限制其在国内的蓬勃发展。该领域为分析仪器,机械工程,生物化学,微生物,植物病理学等多门类的交叉学科,要求研究人员不仅要具有一定生物学背景知识,还需要有实际操作各种大型质谱,色谱,蛋白纯化仪器的经验,

第三,在国家政策方面,虽然对农业科学基础研究的投入逐年递增,但生物质谱领域还是更为关注与医学健康方面相关的项目,目前中国作为国际人类肝脏蛋白组学计划的牵头单位,国家投入了大量的人力和财力,但在农业相关领域受关注程度较少,某种程度上说还处于空白。

近年来运用生物质谱技术在研究病原菌与植物互作中取得了下面的一些成果:

Magnaporthe grisea 作为世界范围的水稻病害和研究植物真菌病害的模式物种受到了广泛关注,该真菌的基因组序列已于 2005 年 4 月完成 (Dean *et al.*, 2005)。对基因组的分析关注于与真菌致病性相关基因。研究表明该基因编码了大量的分泌蛋白,包含了大量不常见的糖基结合结构域。该真菌还有大量 G 蛋白偶联受体,其中很多是毒性相关 (virulence-associated) 基因,另外还有大量和次级代谢相关的酶类;一些基因在真菌侵染早期相关事件中起重要调控作用。

在 *M. grisea* 全基因组没有完成前,对 *M. grisea* 和水稻体系的研究工作主要集中在基因组已知的水稻中。2003 年韩国科学家 (Sun *et al.*, 2001) 研究了水稻悬浮培养细胞被 *M. grisea* 感染或用其他激发子、信号分子 (如茉莉酸、水杨酸、双氧水) 处理后的差异表达蛋白。蛋白双向电泳分离检测有 43 个蛋白有增加和诱导表达,其中有 6 个基因编码的 12 个蛋白通过 Edman 降解的

491 蛋白测序仪 (Applied Biosystem) 测定氨基酸序列后与 NCBI nr, FASTA, 水稻 EST 数据库比对后成功鉴定, 报括水稻病程相关蛋白 10 (rice pathogen-related protein class 10, OsPR-10) 等。研究工作同样也存在鉴定效率不高的问题。该课题小组 2004 年又发表了一篇文章 (Sun *et al.*, 2004), 是围绕 *M. grisea* 在形成 appressorium 过程中的蛋白组学研究, 鉴定了一些重要蛋白: MgP1, MgP5, SCD, CPY。使用生物质谱技术后在蛋白的鉴定数量和成功率上都有很大的提高, 检测所需要的样品量也在不断减少。

除了 *M. grisea* 水稻体系外, 应用生物质谱技术对其他微生物-植物互作体系也进行了广泛研究, 鉴定和发现了一些与之相关的重要蛋白和病程相关蛋白。运用双向电泳和 MADLI-TOF/TOF 技术, 对粉霉 (*Erysiphe pisi*) 具有不同抗性表型豌豆 (*Pisum sativum*) 蛋白组进行了研究 (Curto, *et al.*, 2006)。发现表达差异较大的蛋白与以下几个类型有关: 光合作用与碳代谢, 产能, 抗逆, 蛋白合成与降解, 信号传导等, 为阐述豌豆对粉霉抗性中的关键蛋白如何作用起了重要作用。Ndimba 等人用两种真菌激发子壳聚糖(chitosan) 和 *Fusarium moniliforme* 提取物处理拟南芥悬浮培养细胞后, 运用 MADLI-TOF 技术检测了相关差异表达蛋白, 发现细胞壁中两种蛋白内切壳多糖酶 (endochitinase)、polygalacturonase, 与两种新蛋白 (受体样蛋白激酶和可能的无孢相关蛋白) 在处理 24h 显著变化。在培养滤液抽提物中鉴定了两重病原激发子应答蛋白: XEG 和过氧化物酶。通过双向电泳的分析还发现了相关胞外磷酸化过程在细胞间的通讯网络中起到重要作用 (Ndimba, 2003)。一个与人小 GTPase Rac 同源的蛋白 OsRac1, 可以诱导水稻植物培养细胞的防御反应 (Fujiwara, 2006), 对该蛋白进行的蛋白组学研究发现由其在水稻培养细胞内诱导的信号传导和代谢相关蛋白在防御反应中起到关键作用。

国内蛋白激发子研究大都是从生测、植物病理学和基因克隆和表达等分子生物学角度出发, 运用高效液相色谱-电喷雾质谱技术对蛋白激发子研究还少有报道。

1.6 研究目的和意义

前期研究初步确定极细链格孢菌中有三种分子量不同的蛋白具有生物活性, 其中之一经鉴定为糖蛋白。郭广君 (2006) 对该糖蛋白的纯化条件和部分性质进行了摸索, 但未能切除糖基, 获得质谱测定的精确分子量和进行质谱鉴定。本研究在其基础上, 拟对分离纯化条件进行优化, 去除该糖蛋白的糖基, 并利用高效液相色谱-电喷雾质谱技术对其进行分析和鉴定。

通过该研究建立一套较为适用的研究糖基修饰激活蛋白的液相色谱-电喷雾质谱联用技术体系, 确立 FPLC-SDS-PAGE+HPLC-ESI-IT-MS/MS 的研究策略, 为下一步研究激活蛋白的作用机理以及激活蛋白与植物的互作关系研究提供可用的技术路线和理论依据。

第二章 糖基化激活蛋白的纯化及其理化性质的分析

自 Eden 公司利用 *Ewinia amylovora* 中提取的 harpin 蛋白激发子成功开发出 Messenger (Wei *et al.*, 1992), 用于多种病虫害的防治以来, 激发子已成为抗病性研究的热点问题。国内外已有多人从多种病原菌中分离纯化出蛋白激发子如从 *Phytophthora* spp. 和 *Pythium* spp. 中提取的 Elicitin (Ricci *et al.*, 1989), 从 *P. boehmeriae* 中提取的 PB90 (Wang *et al.*, 2003), 从稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 中提取的糖蛋白激发子。激发子具有本身无毒却可诱导植物对病虫害产生抗性的优良特性, 使之成为新型生物农药开发的新方向。笔者所在研究室首次从多种病原真菌中分离出具有良好抗病防虫、增强抗逆能力、促进植物生长等生物活性的另一类新型蛋白激发子, 被命名为激活蛋白 (Activator), 正日益被广泛接受。为了研究该蛋白的性质并了解其作用机制, 获得蛋白质纯品是重要前提。本章在前期研究的基础上, 研究极细链格孢菌 (*Alternaria tenaisime*) 中糖基修饰激活蛋白的分离纯化方法和技术路线, 并进行理化性质和生物活性的进一步验证, 为研究激活蛋白的功能及发掘新的激活蛋白奠定技术基础。

2.1 材料与仪器

2.1.1 试剂与材料

2.1.1.1 菌种及培养基

极细链格孢菌 (*Alternaria tenaisime*) 菌株为中国农业科学院植物保护研究所蛋白质药物工程研究室保存, 用 50% 液体石蜡油封存并置于 -70℃ 超低温冰箱中, 小麦种子 (CA0045 中抗)。

培养基: 削皮马铃薯 200 g、葡萄糖 (或蔗糖) 10~20 g、蒸馏水 1000 mL, 将洗净后去皮的马铃薯切碎, 加水 1000 mL 煮沸半个 h, 用四层纱布过滤, 滤液加水补足 1000 mL, 加糖和琼脂后, 用 250 烧瓶按每瓶 120 mL 进行分装, 并调节 pH=7.4, 灭菌 (121℃, 20 min)。灭菌后, 待培养基冷却一段时间, 在无菌操作台缓慢倒入已灭菌的培养皿中 (30 mL/皿), 凝固后, 室温倒置, 放置 3 天后使用。液体 PDA 培养基配方中不加琼脂粉 17~20 g, 不倒平板。方法同上。(培养基所用试剂均为北京双旋微生物培养基制品厂产品);

2.1.1.2 蛋白纯化用材料与试剂

层析柱: 阴离子交换柱 Hitrap™ DEAE FF 1mL (GE Healthcare), 脱盐柱 Hitrap™ 26/10 Desalting 5mL (GE Healthcare), 分子筛柱 Hitrap™ Superdex 75/300 (GE Healthcare), Hitrap™ Q FF (GE Healthcare); MWCO 超滤管 (10 kD, Millipore); Tris-HCl (pH7.5); 硫酸铵, 两性电解质 Bio-lyte ampholyte (Biorad), BCATM Protein Assay Kit (PIERCE), 乙醇 (北京化学试剂厂)。

2.1.1.3 SDS-PAGE 用试剂与溶液

(1) 丙烯酰胺(Acr), 甲叉双丙烯酰胺(Bis), 考马斯亮蓝R-250, 甘氨酸;N,N,N' N'-四甲基乙二胺(TEMED), 十二烷基苯磺酸钠(SDS);

(2) SDS-PAGE 凝胶溶液: A液:丙烯酰胺储存液(29%丙烯酰胺, 2.67% NN'-亚甲基双丙烯酰胺), 4℃避光保存,

(3) 浓缩胶缓冲液: 1.0 M Tris-HCl (pH=6.8), 分离胶缓冲液: 1.5 M Tris-HCl (pH=8.8), 5x电泳缓冲液: 15.1 g Tris, 94 g Gly (pH=8.3), 10% SDS 30 mL, 用去离子水补至1000 mL, 2xSDS凝胶加样缓冲液: SDS 500 mg, 巯基乙醇1 mL, 甘油3 mL, 1 mol/L溴酚蓝4 mg, pH6.8Tris-HCl 2 mL, 用蒸馏水溶解并定容至10 mL, 染色液: 45 mL无水乙醇, 10 mL冰醋酸, 45 mL去离子水, 在其中溶解0.25 g考马斯亮蓝G-250; 脱色液: 45 mL甲醇, 10 mL冰醋酸, 45 mL水; 10%(w/v)SDS; 新配10%过硫酸铵(APS), 以上试剂除单独说明外均为Sigma公司产品

2.1.2. 仪器

Mini-PROTEAN 3 电泳槽 (Bio-rad), PowerPacTM基础电泳仪 (Bio-rad), AKTA Explorer 10 蛋白纯化仪(GE Healthcare), 自动组分收集器Frac-900 (GE Healthcare), 高速冷冻离心机(Biofuge stratas Heraeus公司), 冷冻干燥仪 (Biofuge stratas Heraeus公司), HZQ-Q全温振荡器(哈尔滨东联公司), HPG-280B光照培养箱(哈尔滨东联公司), 超声波破碎仪(SONics Vibro cell), 脱色摇床 Ts-800(中国科工卫仪器仪表公司), 酶标仪 (GF-M2000), 85-I恒温磁力搅拌器 (上海青浦泸西仪器厂), 凝胶成像系统 (M μ Lti Genius SynGene), Biorad Rotofor等电聚焦仪, Thermo Orion 868 型pH计。

2.2 方法

2.2.1 极细链格孢菌 (*Alternaria tenuissima*) 的培养与激活蛋白粗提液的制备

从低温保存的种管挑取少量的菌丝体, 转接到固体PDA培养基上, 培养24h以活化菌种, 将活化的菌种接种到PDA液体培养基中, 180 rpm, 28℃振荡培养约24h, 对培养液进行抽滤, 获得的菌丝体用双蒸水洗涤3次后, -20℃保存备用。

取菌丝体5 g于研钵中用液氮研磨成粉后, 迅速加入提取缓冲液(25 mmol/L磷酸钾缓冲液 pH7.4, 2mmol/L EDTA)10 mL, 然后于震荡器上混匀, 4℃, 12000 rpm离心20 min, 弃沉淀物, 上清液置于-20℃保存备用。

2.2.2 激活蛋白的粗分离

利用上述方法提取的蛋白, 直接加硫酸铵至终浓度为80%以使蛋白充分沉淀, 5000 rpm离心10 min后收集上层悬浮物和下层沉淀, 用提取缓冲液充分溶解后, 15000 rpm离心20 min充分去除

沉淀。按照4:1的比例在获得的蛋白液中加-20℃预冷的乙醇进行有机相沉淀。将加有乙醇的混合液放置于-20℃，沉淀30 min以使蛋白充分沉淀。5000 rpm离心10 min后收集沉淀，并在低温干燥以充分去除乙醇，但要防止过度干燥，以免造成蛋白损失。将蛋白沉淀用提取缓冲液充分溶解后以层析上样缓冲液为介质透析过夜，中间更换缓冲液数次。

2.2.3 蛋白浓度测定方法

按照PIERCE公司的BCA™ Protein Assay Kit，利用酶标仪测定578nm的吸光光度值。

操作步骤如下所述：

(1) 标准曲线的绘制

按照表2-1的比例配制标准浓度蛋白溶液

表2-1 标准浓度蛋白配方

Table2-1 Form μ La of Standard Protein

编号	水的体积	BSA体积	BSA终浓度
A	0 μ L	300 μ L Stock BSA	2000 μ g/mL
B	125 μ L	375 μ L Stock BSA	1500 μ g/mL
C	325 μ L	325 μ L Stock BSA	1000 μ g/ML
D	175 μ L	175 μ L B	750 μ g/mL
E	325 μ L	325 μ L C	500 μ g/mL
F	325 μ L	325 μ L E	250 μ g/mL
G	325 μ L	325 μ L F	125 μ g/mL
H	400 μ L	100 μ L G	25 μ g/mL
I	400 μ L	0	空白

1. 按照50:1的比列混合A、B溶液作为WR工作液。
2. 在酶标板上每空加25 μ L蛋白样品，并加200 μ L的WR工作液
3. 将酶标板密封37℃温育30 min，冷却至室温后测定578nm的吸光光度值。
4. 以578nm的吸光光度值为横坐标，以蛋白浓度为纵坐标做标准曲线。

(2) 蛋白浓度的测定

蛋白浓度测定方法同上述1~3步，并且利用标准曲线计算蛋白浓度。

2.2.4 糖基化激活蛋白的等电点分析

目前测定等电点的方法主要有等电聚焦法和毛细管电泳法，另外在知道一个蛋白的氨基酸序列后可以利用生物信息学的方法计算该蛋白的理论等电点。等电点的确定对蛋白的后续纯化和性质研究非常重要。在蛋白的纯化时，必须知道目的蛋白的等电点，以确定蛋白的起始纯化条件。如要使用阴离子交换树脂纯化蛋白，起始缓冲液的pH设定应从高于蛋白的等电点一个单位开始设定。本文采用液相等电聚焦结合SDS-PAGE的方法测定等电点。

(1) 采用 Biorad Rotofor 等电聚焦仪做等电聚焦

1、样品准备：样品必须处于溶液状态，盐离子浓度不能太高（不高于 10 mM 最佳），两性电解质浓度和样品浓度相关，最佳条件需要摸索。

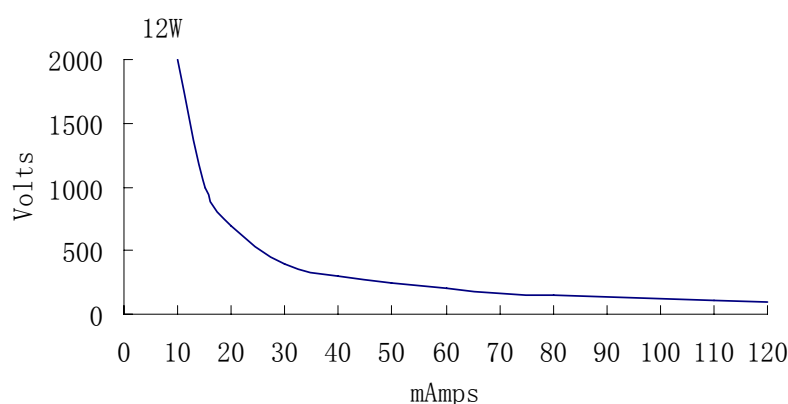
蛋白质/mL	两性电解质浓度 (Bio-lyte ampholyte w/v)
>2mg	2%
1mg	1.5%
0.5mg	1%
0.25mg	0.5%

2、平衡离子交换膜：阴极膜用 0.1M NaOH浸泡；阳极膜用 0.1M H₃PO₄浸泡，平衡过夜。

3、按照仪器说明组装好电泳槽。

4、加样：用一注射器把样品注入聚焦槽腔体，样品会通过一个加样孔弥散到整个腔体。标准型可加 40—55mL，迷你型加 18—20mL。

5、聚焦：将冷却芯接一冷却循环泵，实验温度一般设定在低于样品所需的温度 10℃，本实验设定温度为 4℃。设定功率 12W（迷你型），15W（标准型）开始聚焦。聚焦开始的电流/电压值和样品的盐浓度相关，一般需 3-5hr 电压会达到稳定聚焦状态（电流/电压变化示意图如下），再运行 30min 即可完成聚焦。在聚焦过程中，聚焦槽会慢慢旋转避免样品沉淀。



6、收集：在收集器内装好 20 支 12×75mm 的试管，将收集器和一真空泵连接，打开真空，将收集针快速穿破胶带插入收集面上的收集孔，样品即被收集到 20 个试管里。

7、用 pH 计测定每个管内样品溶液的 pH 值，根据 SDS-PAGE 和生测结果得到目的蛋白的等电点。

(2) SDS-PAGE电泳

SDS—聚丙烯酰胺凝胶的溶液组成见表2-2:

表2-2 SDS聚丙烯酰胺凝胶的溶液组成

Table 2-2 Composition of SDS-PAGE solution

储备液	浓缩胶 (5%) 3mL	分离胶 (12%) 5mL	分离胶 (15%) 5mL
去离子水	2.1	1.6	1.1
双丙烯酰胺—丙烯酰胺 (30%)	0.5	2.0	2.5
浓缩胶缓冲液	—	1.3	1.3
分离胶缓冲液	0.03	0.05	0.05
10%过硫酸铵	0.03	0.05	0.05
10%SDS	0.003	0.002	0.002
TEMED			

1) 将蛋白质样品与5×SDS凝胶加样缓冲液在一个Eppendorf管中混合，100℃加热5 min，使蛋白充分变性，13,000 rpm离心10 min；

2) 用微量注射器将样品各取15μl加入样品孔中，将蛋白样品缓慢加到点样孔的底部；

3) 在室温条件下，浓缩胶恒压80V，时间15 min；分离胶恒压180V，时间55 min；

4) 将电泳完毕的凝胶先用蒸馏水冲洗2-3次，去除凝胶表面的SDS；

5) 染色：

考马斯亮蓝染色：放入考马斯亮蓝染色液中，振荡染色20-30 min，然后在脱色液中脱色直至出现清晰的蛋白条带且无明显背景为止；

蛋白质银染方法：

a) 50%甲醇浸泡2次，每次15 min；

b) 5%甲醇浸泡10 min；

c) 用去离子H₂O迅速洗3次；

d) 在10μmol/L DTT溶液中浸泡20 min；

e) 在0.1%AgNO₃溶液中浸泡20 min；

f) 先用去离子H₂O快速洗1次，然后用显影液洗2次，每次不超过25S；

- g) 在显影液中浸泡数min, 直到显现蛋白质带;
- h) 加入固体柠檬酸(双水合物)每200 mL显影液加10 g柠檬酸, 停止显影;
- i) 用铝箔盖住凝胶(使避光), 继续浸泡10 min;
- j) 用H₂O彻底清洗。凝胶在铝箔下(在暗处)去离子H₂O中浸泡10 min。再置(暗室)水中过夜, 使蛋白条带显色;
- 6) 用凝胶成像仪照相, 并计算蛋白的分子量。

2.2.5 糖基化激活蛋白柱层析纯化方法的建立

采用三步法: 离子交换、疏水层析、凝胶层析筛选蛋白纯化方法。离子交换在纯化蛋白操作时一般作为第一步, 因为离子交换有流量大和浓缩蛋白的作用。在筛选纯化条件时一般采用筛选不同的缓冲液和不同的离子强度使目的蛋白结合在柱填料上。也有文献报道让目的蛋白穿过填料的方法, 但是这样的方法不能达到浓缩蛋白的目的, 所以在初始纯化操作中不采用该方法。

离子交换缓冲液的选择在蛋白纯化中是一个最重要的问题, 最早的Good试剂收录了一系列的离子交换试剂, Amersham公司通过实验提供了整个系列的缓冲液配方和适用的范围, 并区分了阳离子交换和阴离子交换试剂。

阴离子交换试剂

pH interval	Substance	Conc. (mM)	Counter-ion	pKa (25 °C)	d(pKa)/dT (°C)
4.55.0	N-Methylpiperazine*	20	Cl ⁻	4.75	-0.015
5.06.0	Piperazine*	20	Cl ⁻ or HCOO ⁻	5.68	-0.015
5.56.0	L-Histidine*	20	Cl ⁻	6.15	
5.86.4	bis-Tris*	20	Cl ⁻	6.50	-0.017
6.47.3	bis-Tris propane*	20	Cl ⁻	6.80	
7.37.7	Triethanolamine*	20	Cl ⁻ or CH ₃ COO ⁻	7.77	-0.020
7.58.0	Tris*	20	Cl ⁻	8.16	-0.028
8.08.5	N-Methyldiethanolamine*	20	SO ₄ ²⁻	8.54	-0.028
8.08.5	N-Methyldiethanolamine*	50	Cl ⁻ or CH ₃ COO ⁻	8.54	-0.028
8.48.8	Diethanolamine*	20 at pH 8.4	Cl ⁻	8.88	-0.025
8.59.0	1,3-Diaminopropane*	20	Cl ⁻	8.64	-0.031
9.09.5	Ethanolamine*	20	Cl ⁻	9.50	-0.029
9.59.8	Piperazine*	20	Cl ⁻	9.73	-0.026
9.810.3	1,3-Diaminopropane*	20	Cl ⁻	10.47	-0.026
10.611.6	Piperidine	20	Cl ⁻	11.12	-0.031

* Recommended on the basis of experiments in Amersham Biosciences laboratories.

阳离子交换试剂

pH interval	Substance	Conc. (mM)	Counter-ion	pKa (25 °C)	d(pKa)/dT (°C)
1.52.5	Maleic acid	20	Na ⁺	1.83	
2.43.4	Malonic acid	20	Na ⁺ or Li ⁺	2.88	
2.63.6	Citric acid	20	Na ⁺	3.13	-0.0024
3.64.3	Lactic acid	50	Na ⁺	3.08	
3.84.3	Formic acid*	50	Na ⁺ or Li ⁺	3.75	+0.0002
4.34.8	Succinic acid*	50	Na ⁺	4.21	-0.0018
4.85.2	Acetic acid*	50	Na ⁺ or Li ⁺	4.76	+0.0002
5.06.0	Malonic acid*	50	Na ⁺ or Li ⁺	5.68	
5.56.7	MES*	50	Na ⁺ or Li ⁺	6.15	-0.0110
6.77.6	Phosphate*	50	Na ⁺	7.20	-0.0028
7.68.2	HEPES*	50	Na ⁺ or Li ⁺	7.55	-0.0140
8.28.7	BICINE*	50	Na ⁺	8.35	-0.0180

* Recommended on the basis of experiments performed in *Amersham Biosciences* laboratories.

根据目的蛋白的等电点，分别配制pH6.0、6.5的MES缓冲液pH7.0的Triethanolamine 缓冲液和pH7.5、8.0的起始缓冲液，相应的洗脱缓冲液为起始缓冲液加2M的氯化钾。分别以起始缓冲液上样过DEAE Sepharose F.F 1mL预装柱，并用洗脱缓冲液进行步阶梯度洗脱。分别进行电泳检测确定目的蛋白的洗脱条件。

2.2.5.1 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析

采用GE Healthcare公司的Hitrap™ DEAE Fast Flow型离子交换预装柱(DEAE Sepharose F.F 1mL)，内径X床高为7mm/15mm，柱体积1mL，平均颗粒90Pm，适合做工艺优化及实验室规模蛋白制备，耐压0.3MPa，pH值稳定性范围2.0-12.0之间。以上述确定的缓冲液作为纯化用缓冲液。

- 1) 上样前的准备: 所有使用的缓冲液用0.22 μm的滤膜过滤, 并经过真空除气; 样品采用0.45 μm滤膜过滤;
- 2) 上样: 样品为植物激活蛋白初分离液。所用主要参数为: 流速1mL/min, 最高柱压0.5 MPa, 每次上样1mL, 收集体积为1mL;
- 3) 洗脱和收集: 用0mol/L-2mol/L KCl (溶于上述各上样平衡缓冲液中) 梯度洗脱。UPC-900检测器同时进行280nm波长检测, 收集各个蛋白穿透峰和洗脱峰;
- 4) 样品的浓缩: 将收集的穿透峰和洗脱峰装入处理好的透析袋中, 用MWCO超滤管(10kD, Millipore) 浓缩至一定体积, 然后进行蛋白峰的脱盐。脱盐后进行电泳检测和生物活性检测;
- 5) 柱填料的在位清洗与保存: 用1.0mol/L KCl溶液平衡2个柱体积, 再用蒸馏水冲洗2-3个柱体积, 最后用20%乙醇充分平衡。短时间保存可将柱子置于4℃冰箱中。

2.2.5.2 Hiprep™ 26/10 Desalting脱盐层析

采用GE Healthcare公司的HiPrep™ 26/10脱盐柱，内径X床为2.6m/10cm，柱体积53 mL，最大流速40mL/min，适合做工艺优化及实验室规模蛋白制备，耐反压0.3Mpa，pH值稳定性范围2.0-13.0之间。

- 1) 样品的前期处理：将浓缩1倍的蛋白样品，13,000 rpm，离心5 min；
- 2) 上样：样品上样量为1mL，流动相为上样平衡缓冲液，流速为3mL/min；
- 3) 样品收集：用UPC-900检测器280nm在线检测，蛋白峰用自动收集器收集。收集体积为1mL；
- 4) 样品检测：电泳检测各脱盐峰中蛋白的组成；
- 5) 柱填料的在位清洗与保存：蒸馏水冲洗2-3个柱体积，最后用20%乙醇平衡5-10个柱体积，室温保存。

2.2.5.3 Superdex75 10/300 凝胶过滤层析

采用Amersham公司的Superdex75 10/300型凝胶过滤预装柱。内径X床高为10mm/300mm，柱体积27.3mL，平均颗粒34 μm，球蛋白分离范围为1,000-100,000D，能进行蛋白及多肽的制备纯化，耐反压0.15MPa，最高流速为1mL/min；

- 1) 上样：流速0.2mL/min，最高柱压1.8MPa，每次上样0.5mL，洗脱长度为1.5个柱体积；
- 2) 洗脱：用超纯水洗脱，UPC-900检测器检测波长为280nm时紫外吸收值；
- 3) 收集：用自动收集器，每次收集1mL；
- 4) 样品的浓缩：收集的蛋白样品进行生物活性鉴定和电泳检测；
- 5) 柱填料的在位清洗与保存同上。

2.2.6 糖基化激活蛋白的确定与去糖基化

2.2.6.1 糖基化激活蛋白糖基修饰的确定

12%SDS-PAGE 先采用 GelCode Glycoprotein Staining Kit 进行糖蛋白特异性染色，然后进行全蛋白染色。

- 1) 将 SDS-PAGE 胶浸泡于 100mL50%甲醇溶液中，置于水浴摇床中 30 min；
- 2) 用 100mL 3%醋酸溶液将 SDS-PAGE 胶漂洗 10 min，再重复一次；
- 3) 将 SDS-PAGE 胶转移到 25mL 氧化剂溶液中，置于摇床中轻轻摇动 15 min；
- 4) 用 100mL3%醋酸溶液漂洗 5 min.重复上一次操作，漂洗时间为 10 min；
- 5) 放入 25mL 糖蛋白染色液中，于水浴摇床中轻轻摇动 15 min；
- 6) 将 SDS-PAGE 胶转移到 25 mL 还原剂溶液中，置于摇床中轻轻摇动 5 min；

7) 用 3%醋酸溶液漂洗凝胶 1-2 min, 然后用 DDH_2O 漂洗, 待凝胶中显带后, 于 3%醋酸溶液中保存。

2.2.6.2 TFMS 化学法去糖基化

采用Sigma-Aldrich公司的TFMS化学法去糖基化试剂盒。

(1) 将纯化的糖基化激活蛋白1mg在2mL样品瓶内冻干, 1mg的RNase B做对照;

(2) 将TFMS置于2-8℃预冷, 加150 μL 预冷TFMS到每个样品瓶中, 并迅速盖好瓶盖;

(3) 轻轻摇动样品瓶2-5min, 直到糖蛋白彻底溶解(注意不要用vortex, 以免形成烟雾造成蛋白降解);

(4) 将样品瓶置于冰浴或2-8℃孵育25 min, 中间轻摇几次;

(5) 将60%的吡啶溶液和样品瓶置于-15℃的甲醇-干冰浴中冷却, 中间轻摇几次以避免吡啶凝固;

(6) 沿样品瓶壁加入4 μL 0.2%溴酚蓝作为指示剂, 轻轻摇动混合, 此时颜色会变为红色;

(7) 在加入指示剂后, 立即向样品瓶中“逐滴”加入预冷的60%吡啶溶液, 在每滴之间轻轻混合并冷却样品瓶;

(8) 随着吡啶的加入, 溶液pH会升高, 颜色会从红色渐变成黄色;

(9) 在加入大约等量60%吡啶(150 μL)后, 样品瓶内可能会产生沉淀, 如果产生, 可加入20 μL DDH_2O 并轻轻摇动, 沉淀即会溶解;

(10) 继续加入60%吡啶, 直到溶液颜色变成淡紫色或蓝色, 此时pH约为6;

(11) 将去糖基化的蛋白用Hiprep™26/10 Desalting脱盐柱脱盐, 并用SDS-PAGE分析, 也可用于后续的质谱分析。

2.2.7 糖基化激活蛋白的生物活性测定

每个培养皿内放入小麦种子 3.0 g(约 60-63 粒种子), 设 5 组处理, 具体如下:

a. 3 $\mu\text{g/mL}$ 糖基化激活蛋白纯蛋白液

b. 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 糖基化激活蛋白纯蛋白液

c. 0.75 $\mu\text{g/mL}$ 糖基化激活蛋白纯蛋白液

d. 阳性 ck 1.3 $\mu\text{g/mL}$ 植物激活蛋白粉剂液(长沙市普绿通公司提供)

e. 阴性 ck 清水对照

(1) 浸种: 以上每组处理设 3 次重复, 各加入 30mL 相关处理液, 振荡培养皿, 使小麦种子

完全浸在处理液中，于室温下(28℃)浸种 6h，并每隔 2h 振荡一次。

(2) 催芽：6h 后倒掉浸种液，用水冲洗培养皿，滤纸（一张）保湿（倒立培养皿无明水流出），将小麦种子均匀分布于滤纸上，随后置于 28℃光照培养箱中催芽观察。光照培养箱模拟自然条件下光照情景，早晨 8:00 打开培养箱光源，晚上 8:00 关闭光源。（本实验均为下午 3:00 开始浸种，当天晚上 9:00 催芽）

(3) 萌发：催芽后 12h 后每个培养皿加入清水 1 mL，保持培养皿中湿度（小麦种子浸种 12h 后开始萌发），24h 后加入 2 mL 清水/皿，40h 后去掉培养皿上盖（此时，小麦已经基本全部萌发并长到一定高度）并加入清水 2 mL/皿。

48h 后加入清水 8 mL/皿，次日清晨再根据情况补充水分。

四天后可分为早晚加水各 10 mL。

第七天测量植株鲜重，然后把新鲜植株置于 80℃烘箱中烘干，24h 后测量干重。

2.3 结果与分析

2.3.1 糖基化激活蛋白的等电点

图2-1结果表明，极细链格孢菌中的激活蛋白粗提液的等电点大多数集中在酸性区，其中糖基化激活蛋白的等电点为4.27（平均值）。

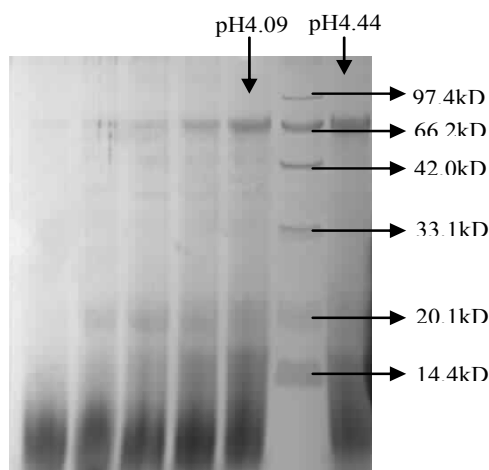


图 2-1 糖基化激活蛋白的等电聚焦 SDS-PAGE 结果

Figure2-1 The Isoelectric Focusing-SDS-PAGE of the Glycosylated Activator Protein

2.3.2 糖基化激活蛋白的柱层析纯化结果

蛋白质粗提液进行离子交换层析时，采用四个浓度梯度(5%、10%、20%、100%)洗脱，获得 3 个峰（图 2-2），对各洗脱峰进行生物活性检测，发现 10%洗脱峰中的蛋白能够显著促进小麦

种子的萌发和生长 (图 2-9), 而穿透峰和其他洗脱峰与相应盐浓度的缓冲液均无活性, 表明 10% 洗脱峰中含目的蛋白, 可被 50 mM KCl 洗脱下来。进一步用分子筛柱对目的蛋白峰溶液进行纯化, 收集到多个峰 (图 2-4), 生物活性试验表明, 第二个洗脱峰中含目的蛋白, SDS-PAGE 检测为单一条带的蛋白 (银染无杂带) (图 2-5), 其表观分子量约为 66kD。

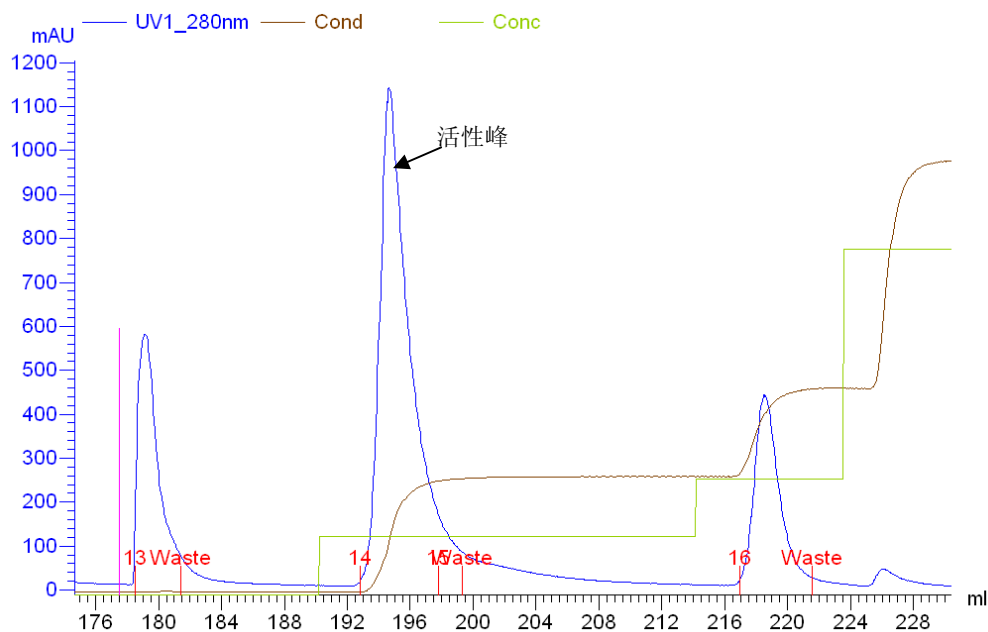


图 2-2 阴离子交换层析结果 (DEAE-sepharose, MES pH6.0+2M KCl, 1mL/min)

Figure 2-2 The Result of Ion-exchange chromatography

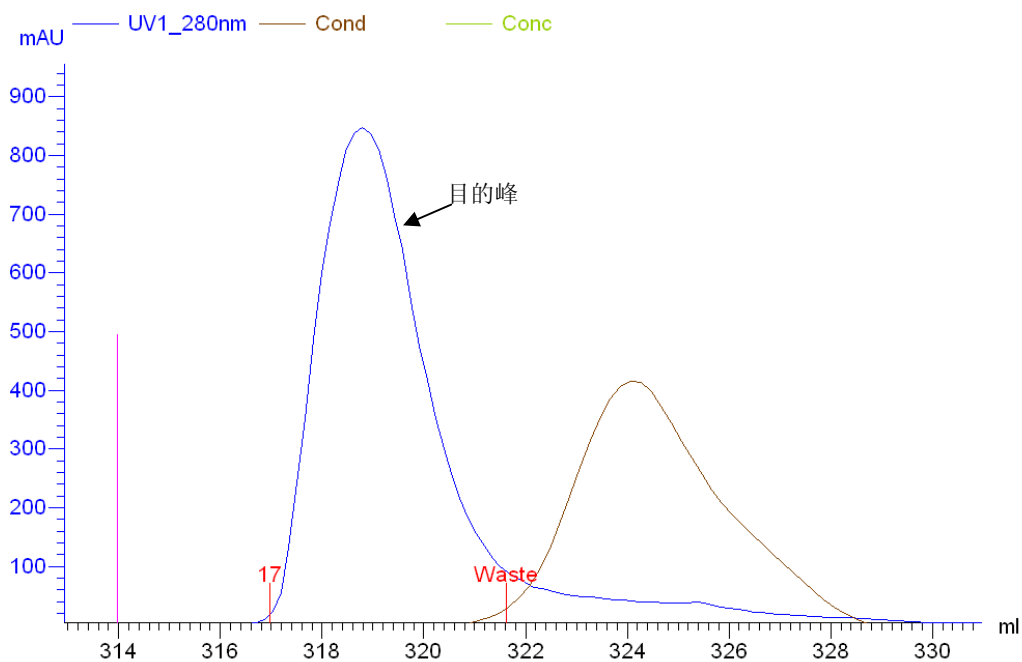


图 2-3 脱盐结果 (Desalting 5mL, H₂O, 3mL/min)

Figure 2-3 The Result of Desalting Chromatography

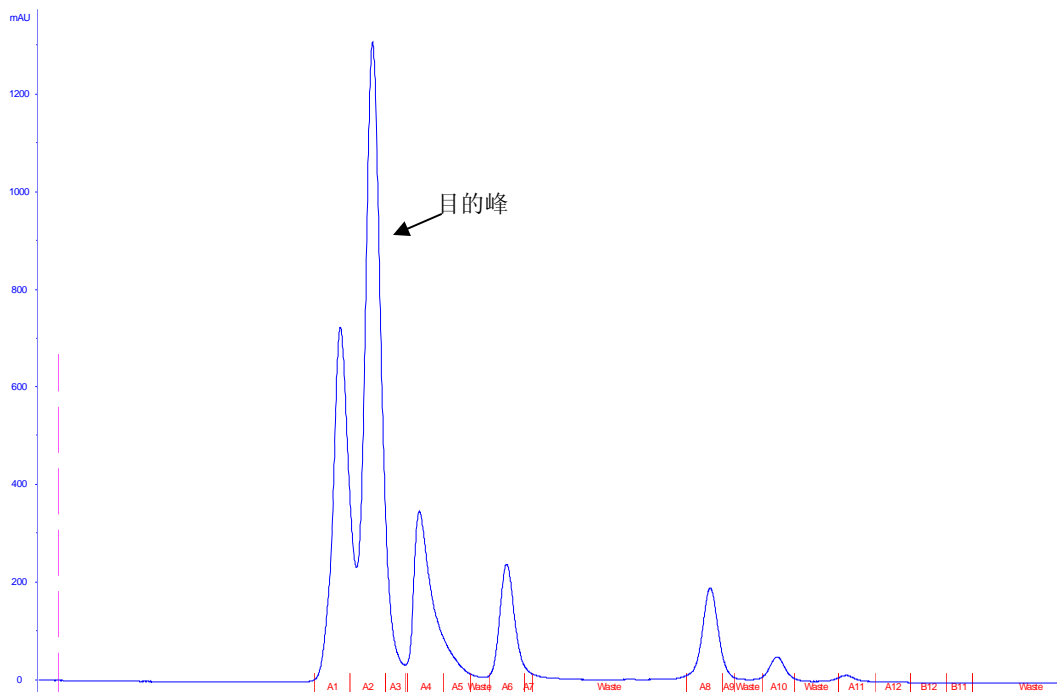


图 2-4 分子筛纯化结果 (Gel filtration Superdex 75/300, H₂O, 0.2mL/min)

Figure 2-4 The Result of Gel Filtration Chromatography

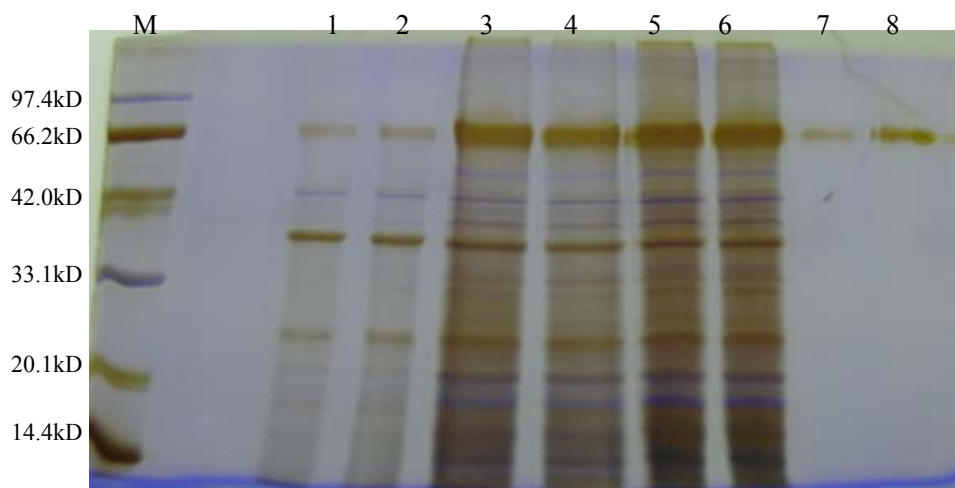


图 2-5 激活蛋白纯化过程电泳图

Fig. 2-5 SDS-PAGE of Glycosylated Activator Protein Purification

(M: Marker; 1, 2: 粗蛋白液; 3, 4: (NH₄)₂SO₄沉淀蛋白; 5, 6: 乙醇沉淀蛋白; 7, 8: 分子筛纯化蛋白)

2.3.3 糖基化激活蛋白的去糖基化

前期研究表明,该糖基化激活蛋白的糖基修饰为 O-连接的修饰(图 2-6A),因此无法用 PNGase F 酶法等切除 N-连接糖基的酶法切除糖基,而一般的化学试剂则在破坏糖基的同时造成蛋白部分的降解。TFMS 化学法则可以在切除糖基的情况下保持蛋白部分的完整,适合本糖基化激活蛋白的分析。从图 2-6B 可以看出,对照 RNase B 去除糖基结果,可以看出去糖基后其分子量迁移了 1.5kD,而且为单一条带,暗示其糖基修饰位点只有一个,这与实际结果一致。而糖基化激活蛋白糖基切除后呈现两条距离很近的条带,表观分子量分别为 33kD 和 34kD,暗示其糖基修饰位点可能为两个图(2-6C)。

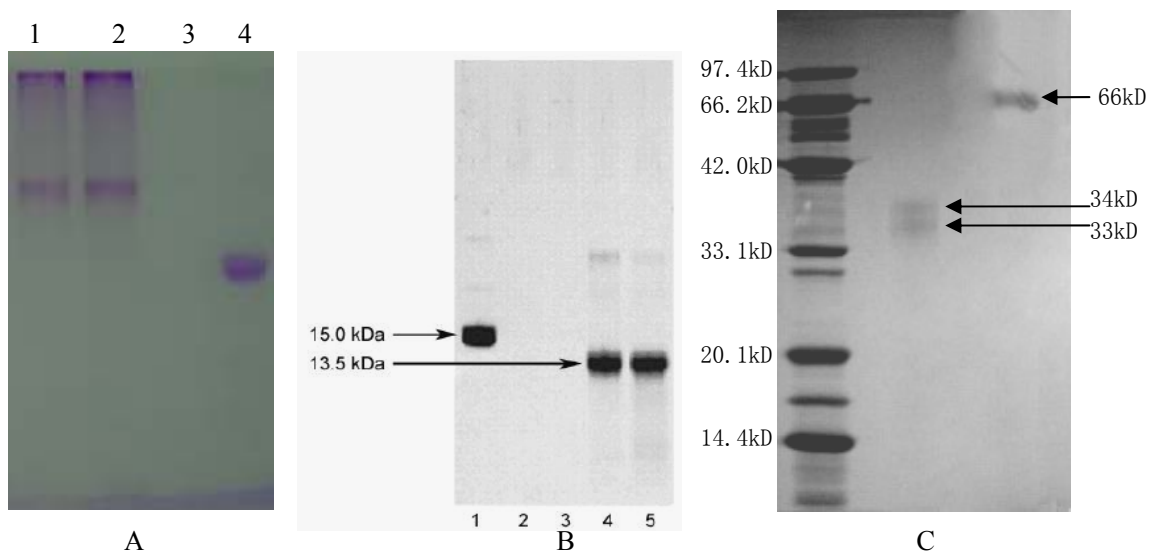


图2-6 糖基化激活蛋白的糖基修饰分析SDS-PAGE结果

Figure 2-6 The SDS-PAGE Result of Glycosylation Analysis of Glycosylated Activator Protein

- A. 糖蛋白特异性染色结果, 1,2: 糖基化激活蛋白; 3: 大豆胰蛋白酶抑制剂阴性对照; 4: 辣根过氧化物酶阳性对照;
 B. RNase B TFMS化学法去糖基化的SDS-PAGE结果, 1: RNase B; 4,5: 去糖基化后RNase B;
 C. 糖基化激活蛋白TFMS化学法去糖基化SDS-PAGE结果。

2.3.4 糖基化激活蛋白的生物活性测定

不同浓度的糖基化激活蛋白均能显著促进小麦生长, 其结果见图 2-7 和图 2-9。图 2-7 的统计分析结果表明, 各处理与阴性 CK 均有显著差异 (F value=157.23, $DF=24$, $\alpha=0.05$, SAS Duncan's Multiple Range Test), 并且经该糖基化激活蛋白处理后的小麦株高一直高于阴性对照, 其中 $0.75 \mu\text{g/mL}$ 蛋白处理与阴性 CK 在第 4d 时差异最大, 株高增加了 80.6%。此后随着时间的延长, 处理与阴性 CK 的差异逐渐缩小, 但第 7d 时, $0.75 \mu\text{g/mL}$ 蛋白处理仍比阴性 CK 提高了 26.9%。

将处理七天的植株测定干湿重, 其结果见图 2-8。统计分析结果表明, 各处理和阳性 CK 的植株干湿重间无明显差异, 但与阴性 CK 有显著差异 (F value= 1152.37, $DF=14$, $\alpha=0.05$, SAS

Duncan's M μ L tiple Range Test)。说明小麦种子经糖基化激活蛋白处理后在有机物、矿质元素积累等方面比阴性对照要多，表明该糖基化激活蛋白能够刺激并促进小麦的初期生长。

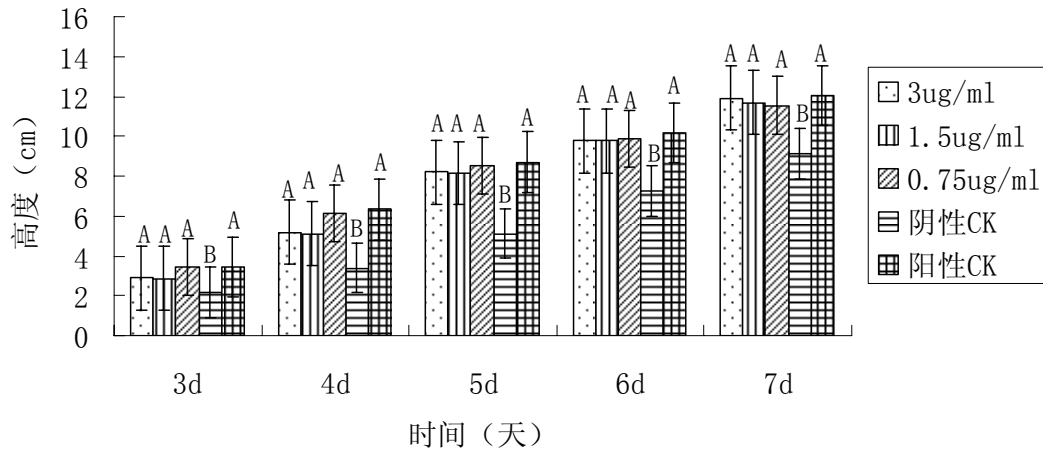


图 2-7 糖基化激活蛋白处理小麦种子对小麦株高的影响

Fig. 2-7 The Effect of Glycosylated Activator Protein on Wheat Height

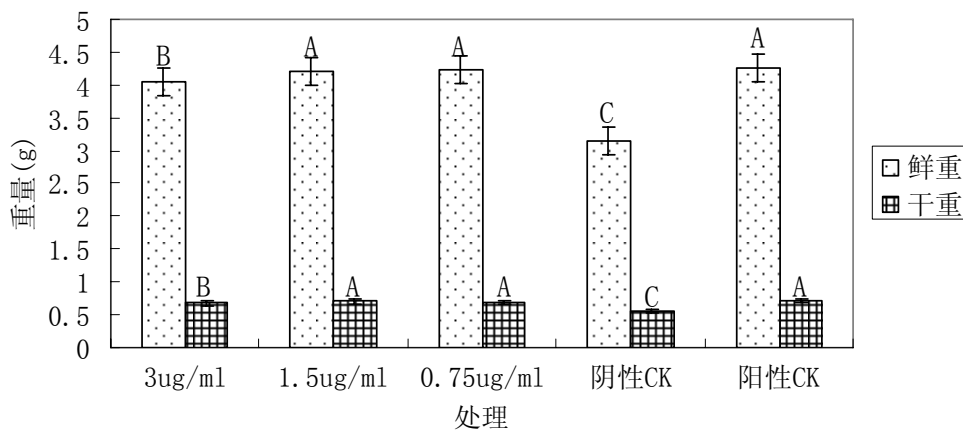


图 2-8 糖基化激活蛋白处理小麦种子对小麦株重的影响

Fig. 2-8 The Effect of Glycosylated Activator Protein on Wheat Weight

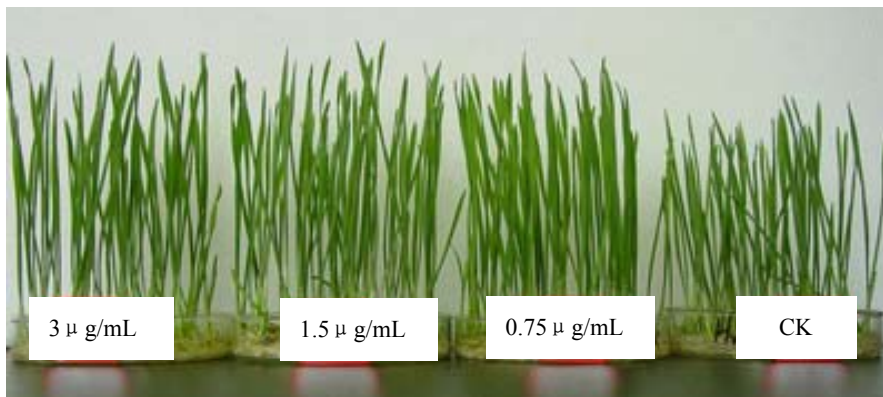


图 2-9 糖基化激活蛋白纯品对小麦的促生长试验结果

Fig. 2-9 The Effect of purified Glycosylated Activator Protein on Wheat Growth Enhancement

2.4 小结与讨论

1、优化了糖基化激活蛋白的分离纯化条件，获得了电泳银染级纯度的糖基化蛋白。尤其是在柱层析纯化前，利用硫酸铵沉淀结合乙醇沉淀的方法去除了影响蛋白纯化的真菌多糖，提高了后续的柱层析的纯化效率。

2、利用液相等电聚焦法获得了糖基化激活蛋白的等电点 4.27，该方法不仅可以用 pH 计直接测定溶液 pH 值得到目的蛋白的等电点信息，同时可以利用蛋白质等电点的不同，将目的蛋白与其他蛋白予以初分离，并且由于蛋白质处于液相非变性状态，得到的蛋白质可以用于后续的活性测定或结构分析。另外，该方法的上样量可以达到 50 mL，可以用于初期的小批量制备。

3、利用 TFMS 法成功的切除了该 O-连接糖基化激活蛋白的糖基部分，并初步确定该蛋白至少具有两个糖基化位点。TFMS 法对 N-连接和 O-连接的糖蛋白都适用，在合适的条件下，可以高效的切除与蛋白连接的所有糖基而不破坏蛋白部分，其缺点是操作过程中要求无水条件，并且糖基切除后蛋白部分和糖基部分以及 TFMS 与吡啶形成的碱较难彻底分离，对后续的质谱分析等造成一定的困难。

4、经纯化后的糖基化激活蛋白对小麦种子的初期生长有促进作用，处理后第 3d-7d 小麦的株高比阴性对照 (H₂O) 平均高出了 42.7%。纯化蛋白 (包括阳性对照) 刺激小麦生长的促进作用随着时间的推移而逐渐缩小，说明该蛋白在种子萌动初期有很强的促进幼苗生长作用，以后可能随着蛋白浓度的降低，药效减小，促进作用逐渐降低，这与本实验室有关激活蛋白对黄瓜的促生诱抗相关酶的影响的研究结果一致。

第三章 模式蛋白溶菌酶和 BSA 的高效液相-电喷雾质谱分析

对分离的蛋白质进行鉴定是蛋白质后续研究的重要内容。传统的蛋白质鉴定方法如基于 Edman 降解的序列分析和氨基酸组成分析等不仅消耗样品较多,而且费时费力,不易实现高通量分析,难以适应现代蛋白质组学研究需要。上世纪 80 年代末,“软电离”技术在质谱分析中的成功应用使蛋白质等生物大分子的质谱分析成为可能。软电离的电喷雾串联质谱鉴定蛋白质具有样品用量少、灵敏度高和分析速度快等特点,不仅可以准确测定蛋白质分子量,而且可以通过 MS/MS 分析获得分子部分结构信息;既可以分析纯化样品,又可以有效地与各种色谱联用直接分析混合物 (Siuzdak, 1996)。

蛋白质的液相色谱-电喷雾串联质谱联用鉴定是近年来发展迅速的新方法。蛋白质酶解后的多肽混合物通过液相色谱分离后直接进入质谱仪分析获得肽片段的分子质量和结构信息,得到的质谱数据可以通过肽质量指纹谱(PMF)搜寻法、未解析 MS/MS 数据(raw MS/MS data)搜寻法和序列搜寻法(sequence query, SQ)进行蛋白质的数据库搜寻鉴定 (www.matrixscience.com)。

在利用高效液相色谱-电喷雾质谱分析未知激活蛋白样品前,首先要建立起一套快速灵敏的 RP-HPLC-ESI-MS 蛋白分析体系。该体系的建立需要用分子量和性质已知的蛋白样品,摸索适宜的检测条件和技术,确定其可靠性。由于糖蛋白分析的难度和质谱图谱的复杂性,很少有模式糖蛋白的 HPLC-ESI-MS 研究的报道,因此本研究仍以溶菌酶和牛血清白蛋白(BSA)为模式分子,摸索一套 RP-HPLC 分析蛋白混合物和与 ESI-MS 联用测定蛋白分子量及肽谱的实验体系,通过优化实验参数和条件,为未知激活蛋白的相关研究打下基础。

3.1 材料与仪器

3.1.1 试剂、材料

对甲苯磺酰苯丙氨酸氯甲酮-胰蛋白酶(TPCK-Trypsin),二硫苏糖醇(DTT),碘乙酰胺和三氟乙酸(TFA),碳酸氢铵,均为 Sigma 公司产品;乙腈(ACN),甲醇为 Fisher 公司产品(HPLC 级),其它试剂均为分析纯试剂,实验中用的水为 Milli-Q 超纯水。实验用的水、甲醇、乙腈经过预处理,即先用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,再经过超声波除气。

3.1.2 仪器

Minni-PROTEAN 3 电泳槽(Bio-rad), PowerPacTM基础电泳仪(Bio-rad), 高效液相色谱(Waters HPLC 2695), 电喷雾质谱(Thermo Finnigan LCQ Advantage), Symmetry C18 反相色谱柱(i. d. 2.1mm \times 150mm, 15 Lm, 300 \sim), Symmetry C18 反相色谱柱(i. d. 4.6mm \times 250mm, 15 Lm, 300 \sim), 微量进样针, 超声波清洗器(厦门李氏和达设备有限公司, HD 0208), 溶剂过滤装置, Milli-Q 50 超纯水制备装置。

3.1.3 生物样品

溶菌酶 (lysozyme) 和小牛血清蛋白 (Bovine Serum Albumin) 为 SIGMA 公司产品。配成的溶菌酶 (1.43 mg/mL) 及牛血清蛋白 (6.60 mg/mL) 标准贮备液置于冰箱冷冻保存。

3.2 方法

3.2.1 溶剂及酸度的选择和仪器参数的优化

利用电喷雾质谱测定蛋白质相对分子质量的影响因素很多, 除了对蛋白质的预处理外, 仪器参数的设置、离子源的灵敏度及离子源的离子化效率对蛋白质的测定都有较大的影响。其中影响离子化效率的仪器参数主要有壳气和辅气的流速、离子源的电压及毛细管的温度等。另外 pH 对 ESI 离子的形成也是及其重要的。本实验在进行样品测定之前首先选择了合适的溶剂及 pH 值, 并优化了仪器的参数, 为下一步样品的测定奠定基础。

配制 60%水+40%甲醇, 70%水+30%甲醇, 80%水+20%甲醇, 90%水+10%甲醇的 4 份待测液, 其中溶菌酶的含量为 0.716 mg/mL, 乙酸含量为 1%。分别进样测定, 比较并选择信号最佳时的甲醇百分含量。同理, 分别配制乙酸含量为 0.1%、0.2%、0.5%、1%的 4 份溶液, 其中溶菌酶的浓度为 0.732 mg/mL, 甲醇-水的百分比为 40%:60%。依次进样测定, 并选择信号最佳时的乙酸浓度。

3.2.2 标准样品的 HPLC 分析

3.2.2.1 标准蛋白纯品及混合物的 HPLC 分析条件

分别配制溶菌酶含量为 0.716 mg/mL, 牛血清蛋白溶液含量为 3.3 mg/mL 的待测溶液, 其中甲醇-水体积百分比为 40%:60%, 乙酸含量为 0.2%, 测定它们的色谱、质谱图。由色谱上的保留时间及质谱图推出的分子量对溶菌酶进行分析, 并做进一步的讨论。

移取 500 μ L 0.716 mg/mL 的溶菌酶溶液, 加入 100 μ L 3.3 mg/mL 的牛血清蛋白溶液, 加入甲醇和乙酸, 使甲醇含量为 40%, 乙酸含量为 0.2%, 定容, 混合均匀。进样, 梯度洗脱, 测定混合液各组份的色谱、质谱信号。对信号图进行分析, 梯度洗脱条件如下图所示。

参数	设置
流动相A	H ₂ O:CH ₃ CN (v/v=9:1) 0.1% TFA
流动相B	H ₂ O:CH ₃ CN (v/v=1:9) 0.1% TFA
梯度洗脱	在40 min内20%B~100%B, 流速为0.2 mL/min
进样体积	10 μ L

3.2.2.2 BSA 酶解多肽的 HPLC 分析条件

流动相 A: 0.2M HoAc, 流动相 B: 0.2M HoAc/70%ACN; 流速 0.2 mL/min, 柱前分流, 分流后

流速约 $20 \mu\text{L}/\text{min}$ 。柱老化, 清洗梯度: 6min, 100%B; 10min, 100%B; 12min, 0%B, 20min, 0%B。标准蛋白分析长梯度: 5min, 5%B; 25min, 50%B; 30min, 100%B; 35min, 100%B; 40min, 0%B; 60min, 0%B。

3.2.3 牛血清白蛋白 (BSA) 的酶解

1. SDS-PAGE

将 BSA 与上样缓冲液混合, 95°C , 5 min, 上样, 上样量为 0.1mol, 考染。

2. 胶内酶切回收

a. 将 SDS-PAGE 或双向电泳分离的目的蛋白用刀片切下来, 尽量少带空胶; 在无样品处切取与目的条带大小相同空胶作对照;

b. 将切下来的条带再切为 1mm^3 大小, 置于 1.5mL EP 管中;

c. 脱色: 考染蛋白胶每管加 1mL 脱色液 ($25\text{mM NH}_4\text{HCO}_3/50\% \text{MeOH}$) 于上脱色 10min, 三次, 如未脱尽, 延长脱色时间,

注: 脱完色的蛋白胶可在纯水中保存数日, 或于 -80°C 中长期保存

d. 酸洗: 每管加 1mL 酸洗液 ($10\% \text{HoAc}/50\% \text{MeOH}$) 于上洗 1h, 三次;

e. 水洗: 每管加 1mL 纯水于上洗 20 min, 两次;

(烷化见后)

f. 将胶块移至 0.5mL EP 管中;

g. 每管加 0.5mL 100% ACN, 轻摇翻转 EP 管数次, 直至胶块完全脱水至白色;

h. 抽干 ACN, 再在 CentriVap 中将胶彻底抽干, 20-30 min;

i. 用 $50 \text{mM NH}_4\text{HCO}_3$ ($\text{pH}=8.0$) 将胰蛋白酶储存液由 $200 \text{ng}/\mu\text{l}$ 稀释为 $10 \text{ng}/\mu\text{l}$ 的酶解液, 根据胶块大小加入 $5-20 \mu\text{l}$ 酶解液, 0.5h 后检查溶液是否没过胶面, 否则补加入适量的 $50 \text{mM NH}_4\text{HCO}_3$;

j. 于 37°C 温箱中酶解 30min 至过夜;

k. 每管加 $25-50 \mu\text{l}$ 抽提液 1 ($50\% \text{ACN}/5\% \text{TFA}$), 轻摇 30-60 min, 不要震荡;

l. 将上清液洗至另一 0.5mL EP 管中;

m. 每管加 $25-50 \mu\text{l}$ 抽提液 2 ($75\% \text{ACN}/0.1\% \text{TFA}$), 轻摇 30-60min;

n. 合并两次的上清, 在 Centri-Vap 中浓缩抽干至约 $15 \mu\text{l}$, 如需保存则彻底抽干, 40°C , 约 1h。

如果需要烷化则在 5、6 步间加入如下步骤:

3.烷化:

- i. 将新配的 1M 的 DTT, IAA 稀释为 20 mM DTT, 55 mM IAA;
- ii. 每管加 20mM DTT, 100 μ l, 56 $^{\circ}$ C, 40min;
- iii. 吸去 DTT, 每管加 55 mM IAA, 100 μ l, 避光, 室温, 反应 1h;
- iv. 吸去 IAA, 水洗。每管加 1mL 纯水洗 20min, 两次

3.2.4 标准蛋白的质谱分析条件

一级质谱分析, 正离子检测模式, 电离电压(spray voltage)2.5kV, 毛细管温度(capillary temp) 275 $^{\circ}$ C, 毛细管电压(capillary voltage) 50V, 壳气(sheath gas) 35arb, 不用辅气(aux gas), 检测范围 350~2000。得到多电荷图采用 ProMass 软件(Novatia)解析。

串连质谱分析, 正离子检测模式, 电离电压(spray voltage)1.8kV, 毛细管温度(capillary temp) 200 $^{\circ}$ C, 毛细管电压(capillary voltage) 50V, 不使用辅气(aux gas)和壳气(sheath gas), 一级质谱检测范围 350~2000, 串连质谱 MS/MS 检测范围 150~2000, 碰撞能量 35%, 一级质谱中前三强肽信号自动做二级质谱。所得谱图用 MASCOT 于 NCBI 中匹配搜索。

3.3 结果与讨论

3.3.1 溶剂及酸度的选择

合适的溶剂可以使生物大分子很容易在电离时形成离子, 并有较高的喷雾率和容易去溶象 H_2O 一类的溶剂虽然可以使分子在溶液中带电荷, 但它的溶解热较高, 结果使分析生物大分子离子的解吸变得相对困难。而甲醇、乙醇、乙腈一类的有机溶剂比较好, 它的溶解热比 H_2O 低, 而离子也易生成, 从而可以改善 ESI 的灵敏度。图 3-1a 显示了不同甲醇含量对信号强度的影响。由图 1a 可知, 随着甲醇含量的增大, 其信号强度也随着增大, 但有机溶剂含量过高容易造成蛋白变性, 所以甲醇的最佳百分含量选择在 40% 左右。

在 HPLC-ESI-MS 联用中, 洗脱液洗脱后的蛋白质既可以在强电场的作用下部分质子化, 也可以经气相分子离子反应, 在 ESI 腔内形成 $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$, $\dots\dots$, $[M+nH]^{n+}$ 等等一系列荷电离子。pH 值对被分析分子是否能带电荷从而被电离有相当重要的作用, 由于 HPLC-ESI-MS 中不允许使用非挥发性的缓冲溶液, 因此一般加入甲酸或乙酸等挥发性有机酸类并控制在一定的浓度, 从而增大离子化效率, 提高灵敏度。图 3-1b 显示了酸度的影响, 当溶液中乙酸浓度在 0.2% 时, 有比较强的信号, 所以取溶液的最佳乙酸浓度在 0.2%。

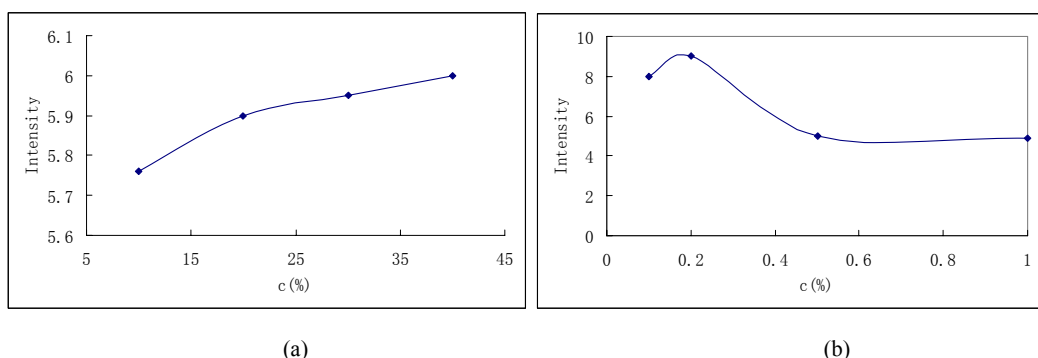
图3-1甲醇含量和乙酸浓度对质谱信号强度的影响(a.CH₃OH; b.CH₃COOH)

Fig.3-1 The effect of methanol content and acetic acid concent on MS signal intensity

3.3.2 仪器工作条件优化

a. 电离电压的影响：电喷雾离子化是应用电场使液滴带电，然后利用离子蒸发将分析物离子送入质量分析器分析，加大电离电压将使离子流强度增大。实验对比了不同电压对离子流强度的影响，在信号饱和前，总离子流强度随电离电压的增大呈近乎线性的增长。经过试验，确定一级质谱的电离电压为 2.5kV，二级质谱的电离电压为 1.8kV。

b. 毛细管温度和壳气、辅气的选择：离子源的壳气和辅气流速及毛细管温度通常根据离子源的流体流速确定，范围一般参考下表。实验中一级质谱的壳气设定为 35arb，辅气流速为 0。优化后的喷雾电压、毛细管电压以及 Skimmer 电压分别为 5kV，30V，50V。

表3-1 不同的高效液相色谱条件对应的质谱条件

Table 3-1 The MS Conditions relative to Different HPLC Conditions

液相流速	建议使用的色谱柱	毛细管温度	壳气	辅气
注射器进样或液相流速 <10 μ L/min	毛细管柱	150-200℃	0 或 5-15 arb	可以不用
液相流速 50-100 μ L/min	ID=1mm	200-275℃	20-40 arb	可以不用
液相流速 200-400 μ L/min	ID=2-3mm	275-350℃	40-60 arb	
液相流速 0.4-1mL/min	ID=4.6mm	350-400℃	60-100 arb	

3.3.3 标准蛋白纯品和混合物的 HPLC 分析结果

3.3.3.1 溶菌酶的HPLC色谱分离结果

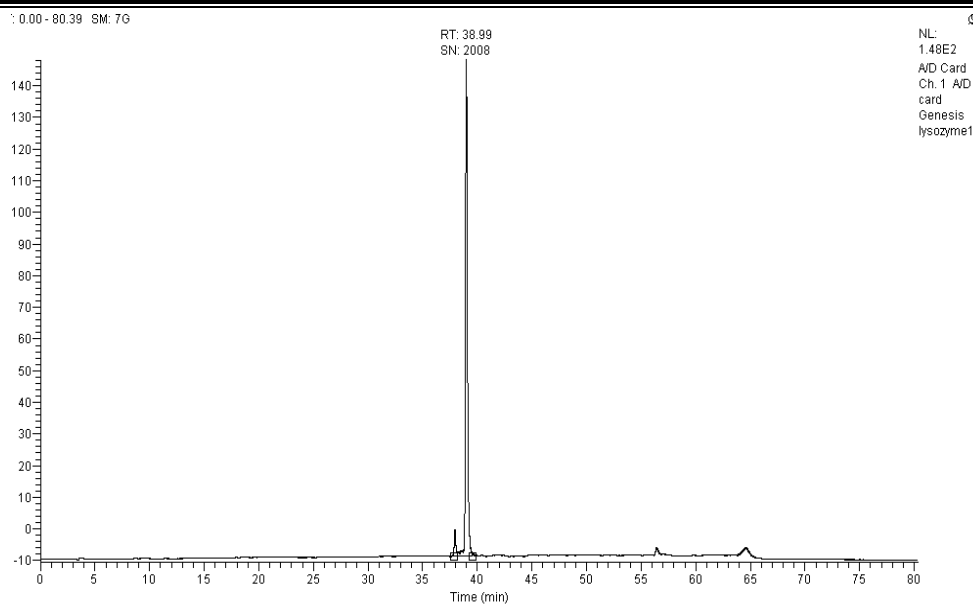


图3-2 溶菌酶的HPLC色谱分离图谱
Fig.3-2 The HPLC Result of Lysozyme

3.3.3.2 BSA 的 HPLC 色谱分离结果

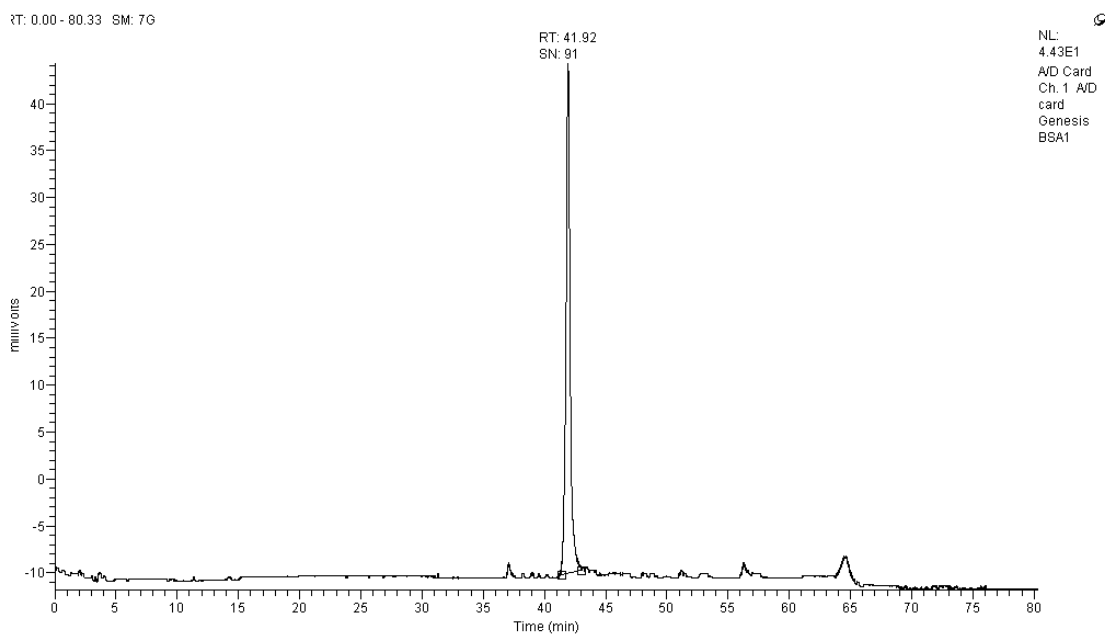


图3-3 BSA的HPLC色谱分离图谱
Fig.3-3 The HPLC Result of BSA

3.3.3.3 溶菌酶和 BSA 混合物的 HPLC 色谱分离结果

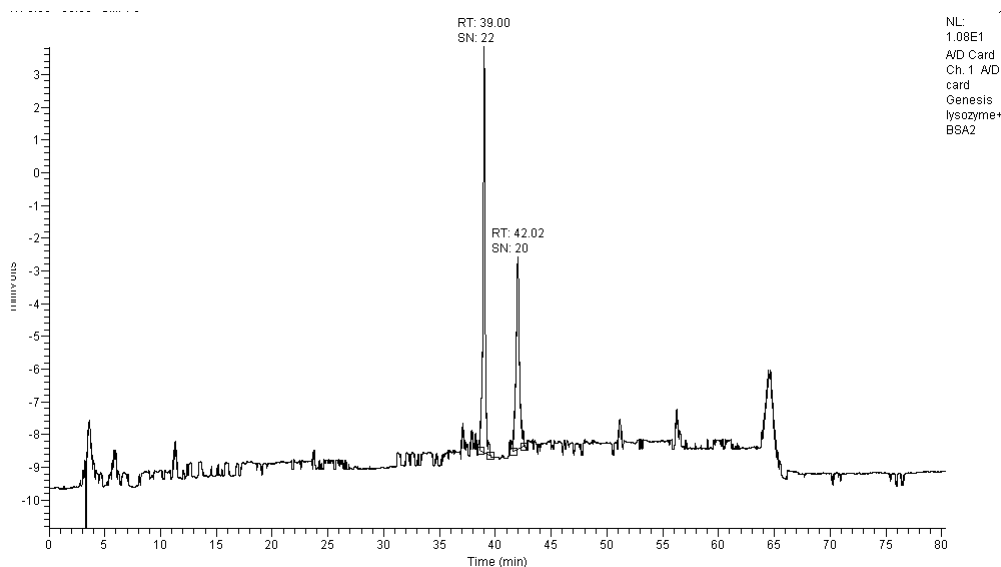


图3-4 BSA和溶菌酶混合物的HPLC色谱分离图谱

Fig.3-4 The HPLC Result of Mixture of BSA and Lysozyme

从图 3-2 中可以看出，溶菌酶纯品在 HPLC 图谱中为一单峰，保留时间为 38.99min，信噪比 S/N 为 2008。图 3-3 表明 BSA 纯品在 HPLC 图谱中也为一单峰，保留时间为 41.92min，S/N 为 91。图 3-4 为溶菌酶和 BSA 混合物的 HPLC 分离结果，可以看出二者得到了比较好的分离，保留时间及 S/N 分别为 39.00min，S/N 22 和 42.02min，S/N 20。以上结果说明该 HPLC 系统设置，Symmetry C18 反相色谱柱(i. d. 4. 6mm×250mm, 15 Lm, 300 ~)及所选的溶剂适合蛋白质混合物的分离，可以用此系统分析未知的激活蛋白样品。

3.3.4 电喷雾质谱测定溶菌酶的相对分子质量

以上HPLC分离虽然得到了单峰，但是要鉴定蛋白质还需要利用质谱得到其相对分子质量。本实验采用的电喷雾质谱ESI电离源产生的是多电荷，谱图经重组后即可得到精确的相对分子质量信息。利用优化的溶剂酸度及一级质谱条件，测定了溶菌酶的相对分子质量，其多电荷图见图3-5，利用Promass软件解旋后的重组图见图3-6，测得的相对分子质量14310. 7Da，与理论值14310Da偏差0. 004%，在实验允许的误差范围内。说明所选择的溶剂条件及一级质谱条件能够得到信号满意的ESI多电荷图，测得的相对分子质量非常准确。

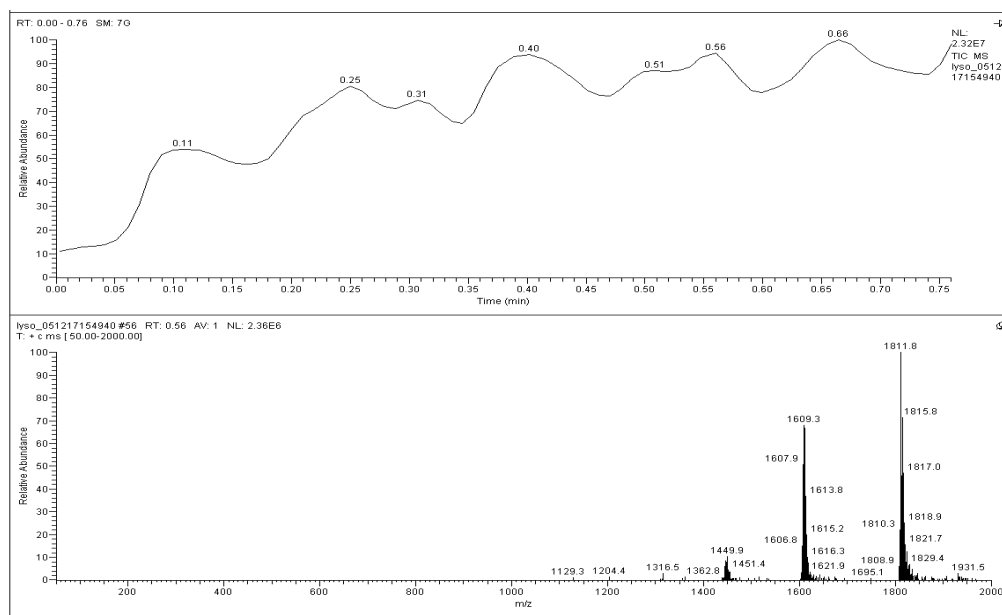


图3-5 溶菌酶的ESI多电荷图

Fig.3-5 The M μ Lti-charge ESI-MS Spectrum of Lysozyme

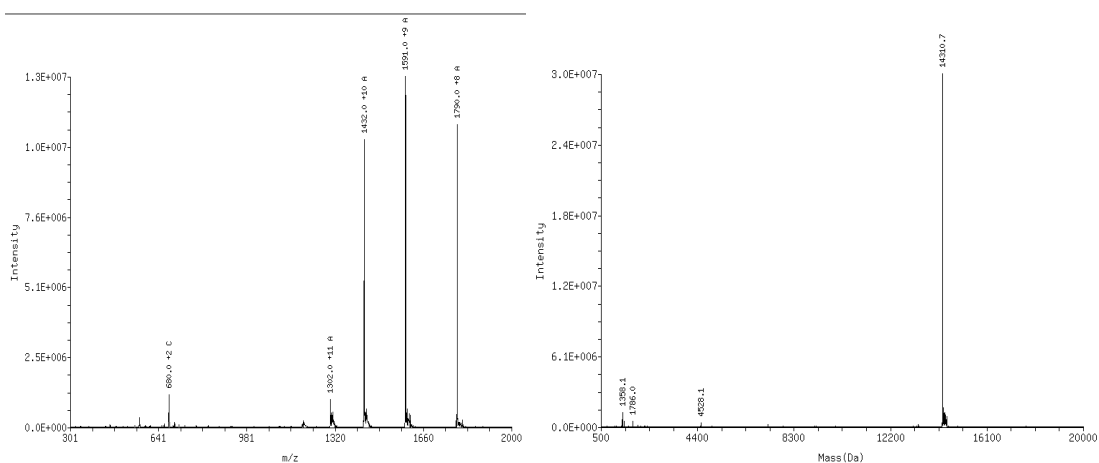


图3-6 溶菌酶的ESI多电荷重组图

Fig.3-6 The Deconvolution Result of Lysozyme MS Spectrum

Base Peak Mass (Da)	Intensity	Spectral Quality
14310.7	3.04E+007	ok

3.3.5 BSA 酶解片段的 ESI 质谱分析结果

图3-7为BSA酶解片段混合物的质谱分析总离子图，用MASCOT搜索比对发现与数据库中的BSA匹配，得分为225。

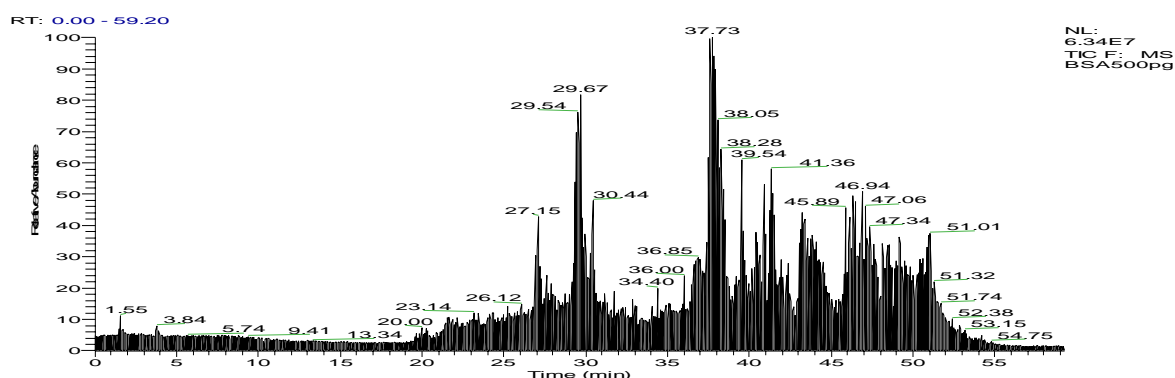


图3-7 BSA胶内回收酶解HPLC-ESI全离子流图

Fig.3-7 The HPLC-ESI,TIC of in-gel digest BSA

Mascot Search Results

Database : NCBI nr 20060414 (3570920 sequences; 1227282874 residues)

Taxonomy : Mammalia (mammals) (305973 sequences)

Significant hits: gi|3318722 Chain E, Leech-Derived Trypsin Inhibitor TRYPSIN COMPLEX

gi|181402 epidermal cytochrome 2 [Homo sapiens]
 gi|28317 unnamed protein product [Homo sapiens]
 gi|55956899 keratin 9 [Homo sapiens]
 gi|17318569 keratin 1 [Homo sapiens]
gi|162648 albumin [Bos taurus]
 gi|18999435 Keratin 5 [Homo sapiens]
 gi|186685 keratin type 16
 gi|46575618 Dermcidin, precursor [Homo sapiens]
 gi|205055 keratin K5
 gi|29649713 protease serine 1 [Homo sapiens]
 gi|2358087 trypsinogen 10 [Mus musculus]

Protein View

Match to: **gi|162648** Score: **225**

albumin [Bos taurus]

Found in search of C:\DOCUME~1\ADMINI~1\LOCALS~1\Temp\mas11A1.tmp

Nominal mass (M_r): **69248**; Calculated pI value: **5.82**

NCBI BLAST search of [gi|162648](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Bos taurus](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:

[gi|162648](#) from [Bos taurus](#)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **18%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHR**FKDLGE EHF**KGLVLIA
 51 FSQYLQCPF DEHV**KLVNEL TEFAK**TCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK
 101 VASLRETYGD MADCCEKQEP ERNECFLSHK **DDSPDL**PKLK PDPNTLCDEF
 151 KADEKKFWGK **YLYEIARRHP YFYAP**ELLYY ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC
 201 LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA RLSQKFPKAE
 251 FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
 301 CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL
 351 GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAKEYEATL EECCAADDPH ACYSTVFDKL
 401 **KHLVDEPQNL IKQ**NCQFEK **LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS**
 451 **RSLGKVGTRC** CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC
 501 TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKK**QT**
 551 **ALVELLKHKP** KATEEQLK**TV MENFVAFVDK** CCAADDKEAC FAVEGPKLVV
 601 STQTALA

Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1638.93

Ions Score: 109 Expect: 1.9e-008

Matches (Bold Red): 30/156 fragment ions using 33 most intense peaks

#	b	b ⁺⁺	b [*]	b ⁺⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y [*]	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	129.10	65.05	112.08	56.54			K							15
2	228.17	114.59	211.14	106.08			V	1511.84	756.43	1494.82	747.91	1493.83	747.42	14
3	325.22	163.12	308.20	154.60			P	1412.77	706.89	1395.75	698.38	1394.76	697.89	13
4	453.28	227.14	436.26	218.63			Q	1315.72	658.36	1298.70	649.85	1297.71	649.36	12
5	552.35	276.68	535.32	268.17			V	1187.66	594.34	1170.64	585.82	1169.65	585.33	11
6	639.38	320.19	622.36	311.68	621.37	311.19	S	1088.59	544.80	1071.57	536.29	1070.58	535.80	10
7	740.43	370.72	723.40	362.21	722.42	361.71	T	1001.56	501.28	984.54	492.77	983.55	492.28	9
8	837.48	419.25	820.46	410.73	819.47	410.24	P	900.51	450.76	883.49	442.25	882.50	441.76	8
9	938.53	469.77	921.50	461.26	920.52	460.76	T	803.46	402.23	786.44	393.72	785.45	393.23	7
10	1051.61	526.31	1034.59	517.80	1033.60	517.31	L	702.41	351.71	685.39	343.20	684.40	342.71	6
11	1150.68	575.85	1133.66	567.33	1132.67	566.84	V	589.33	295.17	572.30	286.66	571.32	286.16	5
12	1279.73	640.37	1262.70	631.85	1261.72	631.36	E	490.26	245.63	473.24	237.12	472.25	236.63	4
13	1378.79	689.90	1361.77	681.39	1360.78	680.90	V	361.22	181.11	344.19	172.60	343.21	172.11	3
14	1465.83	733.42	1448.80	724.90	1447.82	724.41	S	262.15	131.58	245.12	123.07	244.14	122.57	2
15							R	175.12	88.06	158.09	79.55			1

3.4 小结与讨论

本实验利用标准蛋白溶菌酶和 BSA 建立了 HPLC-ESI-MS 分析蛋白质的技术体系，无论是 HPLC 分离检测蛋白还是 ESI 质谱测定蛋白质的相对分子质量，以及利用胰蛋白酶酶解蛋白质并通过 RP-HPLC 和 ESI 质谱鉴定蛋白质，都获得了良好的结果。证明该体系灵敏、高效、可靠，基本满足了蛋白质的分离鉴定要求，可以用于未知激活蛋白的研究。

第四章 糖基化激活蛋白的HPLC-ESI-MS分析技术体系的建立

在上章中利用标准蛋白建立了HPLC-ESI-MS的蛋白分析技术体系,本章在此基础上,建立糖基化激活蛋白的HPLC-ESI-MS分析体系。

4.1 材料与仪器

4.1.1 试剂、材料

对甲苯磺酞苯丙氨酞氯甲酮—胰蛋白酶(TPCK-Trypsin),二硫苏糖醇(DTT),碘乙酰胺和三氟乙酸(TFA),碳酸氢铵,均为Sigma公司产品;乙睛(ACN),甲醇为Fisher公司产品(HPLC级),其它试剂均为分析纯试剂,实验中用的水为Milli-Q超纯水。实验用的水、甲醇、乙睛经过预处理,即先用0.45 μm 的微孔滤膜过滤,再经过超声波除气。

4.1.2 仪器

Minni-PROTEAN 3 电泳槽(Bio-rad),PowerPac™基础电泳仪(Bio-rad),高效液相色谱(Waters HPLC 2695),电喷雾质谱(Thermo Finnigan LCQ Advantage),Symmetry C18反相色谱柱(i. d. 2.1mm \times 150mm, 15 Lm, 300 \sim),Symmetry C18反相色谱柱(i. d. 4.6mm \times 250mm, 15 Lm, 300 \sim),微量进样针,超声波清洗器(厦门李氏和达设备有限公司,HD 0208),溶剂过滤装置,Milli-Q 50超纯水制备装置。

4.2 方法

4.2.1 HPLC分析条件

配制浓度为2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 激活蛋白粗品及浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的糖基化激活蛋白纯品。

蛋白的HPLC色谱分离条件为:流动相A: H₂O:ACN=9:1(含0.1% TFA);流动相B: H₂O:ACN=1:9(含0.085% TFA);柱清洗100% B 20min,平衡100% A 20min,在40min内0% B \sim 80% B,100% B 20min。

与质谱联用的蛋白酶解片段的HPLC分析条件:流动相A:0.2M HoAc,流动相B:0.2M HoAc/70% ACN;流速0.2mL/min,柱前分流,分流后流速约20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。柱老化,清洗梯度:6min,100% B;10 min,100% B;12 min,0% B,20 min,0% B。分析短梯度:17 min,100% B;2 min,100% B;30 min,0% B。

4.2.2 质谱条件

串联质谱分析，正离子检测模式，电离电压(spray voltage)1.8kV，毛细管温度(capillary temp) 200℃，毛细管电压(capillary voltage) 50V，不使用辅气(aux gas)和壳气(sheath gas)，一级质谱检测范围 350~2000，串联质谱 MS/MS 检测范围 150~2000，碰撞能量 35%，一级质谱中前三强肽信号自动做二级质谱。

4.2.3 糖基化激活蛋白的酶解

方法同 3.2.3。

4.2.4 数据分析

所得谱图用 MASCOT “MS/MS Ion Search” 模式搜索，数据库：NCBIInr，蛋白酶选择：胰蛋白酶；最大酶切位点遗漏数：2，可变修饰：M 氧化，如样品有胶内乙酰化处理，加选 K 乙酰化；母离子误差：2.0 Da；MS/MS 误差：0.8Da；电荷：+1,+2 和+3；仪器类型：电喷雾离子阱，结果返回数目：自动。离子得数下限：20。

4.3 结果与讨论

4.3.1 糖基化激活蛋白的 HPLC 分析

糖基化激活蛋白粗品的 HPLC 分离图谱中大约有 14 个峰，其中主峰有四个（图 4-1）。糖基化激活蛋白纯品的 HPLC 分离图谱中有两个峰，其中主峰的保留时间是 18.26 min（图 4-2）。从图 4-2 中可以看出，糖基化激活蛋白已经达到了 HPLC 级的纯度。

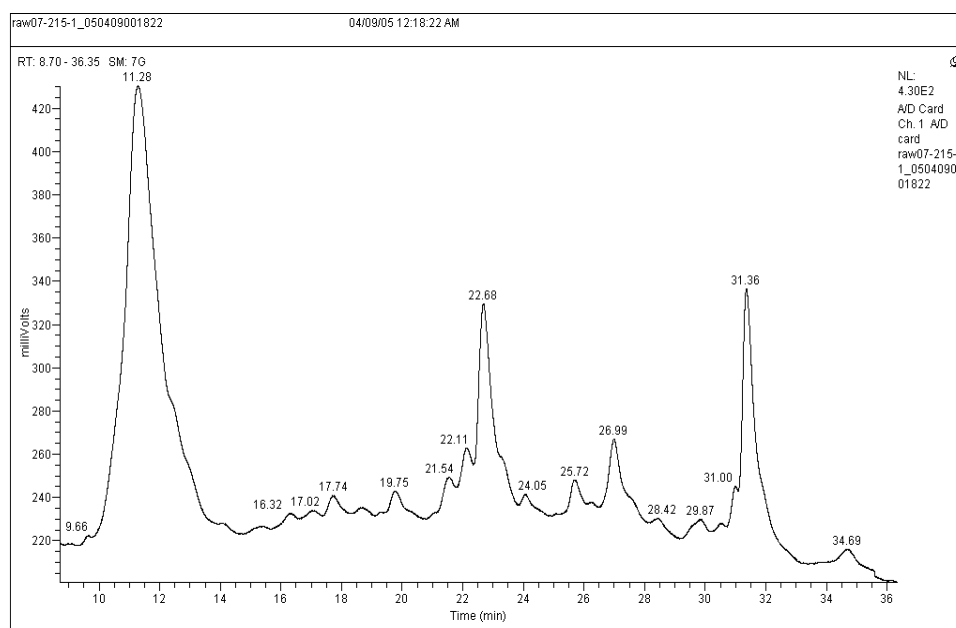


图 4-1 糖基化激活蛋白的粗提样品 HPLC 色谱图

Fig.4-1 The HPLC Result of Crude Sample of Glycosylated Activator Protein

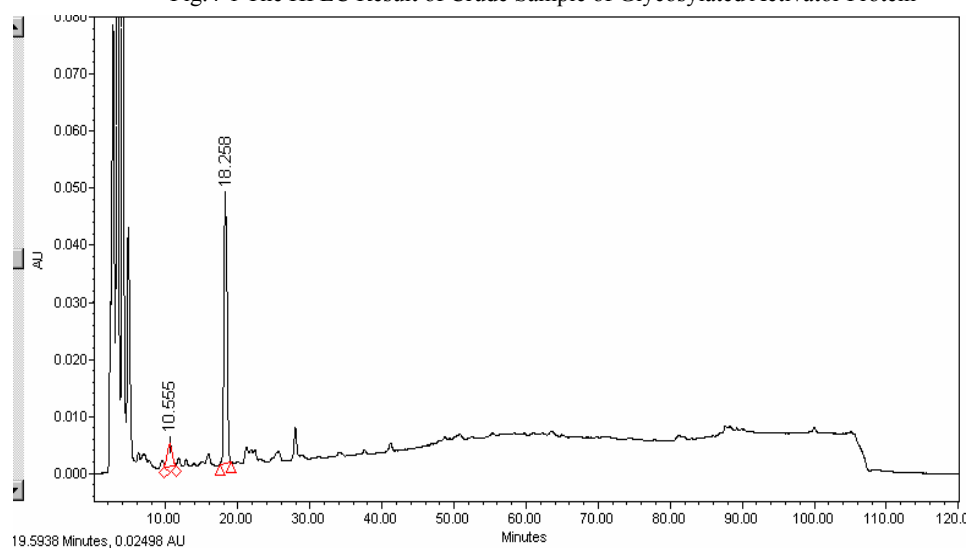


图 4-2 糖基化激活蛋白纯品的 HPLC 色谱图

Fig.4-2 The HPLC Result of Glycosylated Activator Protein

4.3.2 利用 ESI 质谱测定糖基化激活蛋白的相对分子质量

得到 HPLC 级纯度的糖基化激活蛋白后，在已建立的 HPLC-ESI-MS 蛋白分析体系基础上，对糖基化激活蛋白进行了电喷雾质谱（ESI）测定，并优化了相应的质谱参数，最终得到了该糖蛋白的 ESI 多电荷谱图（图 4-3）。从图中可以看出，该糖基化激活蛋白在 ESI 谱图上有 3 组多电荷系列，表明该蛋白的空间结构存在异构体，由于该蛋白是糖蛋白，可能是由于糖基修饰的不一致，使得该蛋白在溶液中的带电分布不一致。这些信息对该糖蛋白的后续结构研究具有重要的意义。经过对多电荷谱图的重组计算得到该蛋白质的相对分子质量为 50270Da。

E:\Xcalibur\66kd

2006-10-9 22:22:51

RT: 0.00 - 28.46

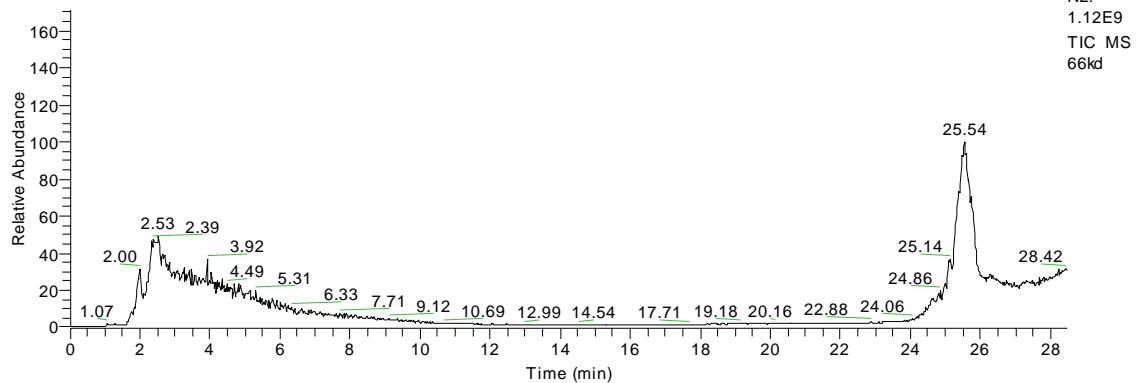
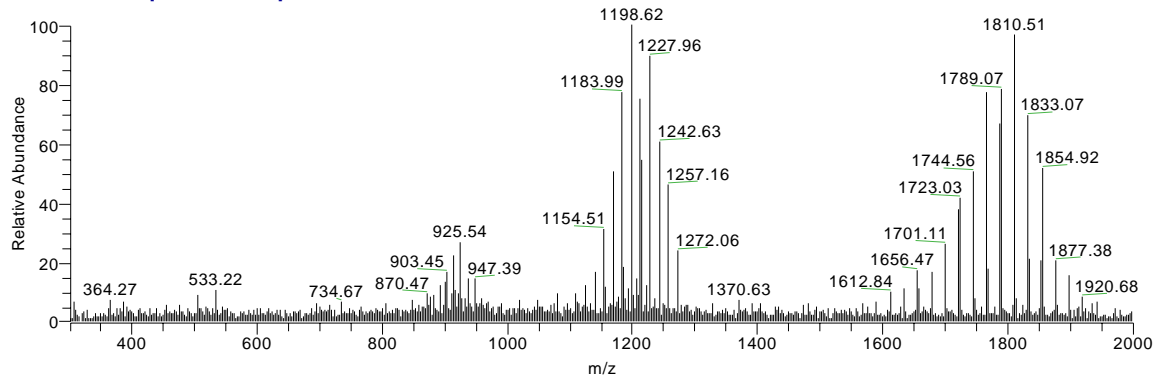
66kd #978-985 RT: 25.00-25.16 AV: 8 NL: 5.66E6
T: + c ESI Full ms [300.00-2000.00]

图 4-3 糖基化激活蛋白的 ESI 多电荷谱图

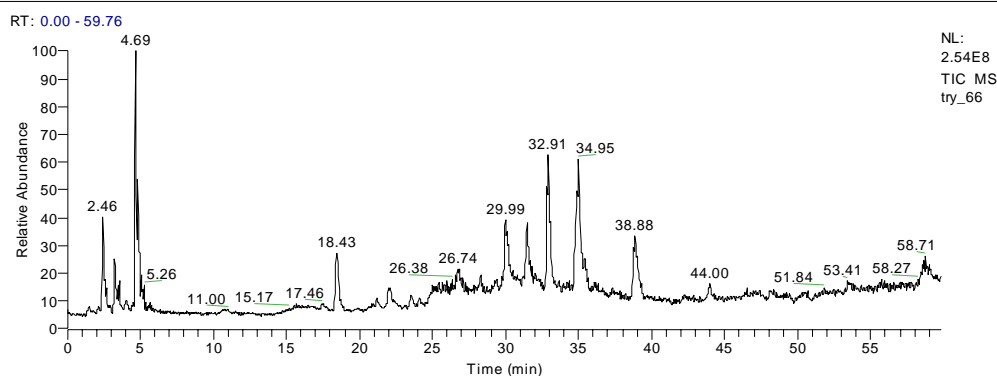
Fig.4-3 The Multi-charge ESI-MS Spectrum of Glycosylated Activator Protein

4.3.3 糖基化激活蛋白酶解产物的 RP-HPLC 分离及 ESI 质谱分析

该糖基化激活蛋白酶解片段混合物的 RP-HPLC 仅分出了 10 多个肽片段峰 (图 4-4), 这可能是由于糖基的存在, 减少了胰蛋白酶的酶切位点, 造成了酶解得到的肽片段较少。图 4.5 为相应的质谱分析总离子图及保留时间为 30.34 min 的肽片段的二级质谱图。用 MASCOT 搜索比对发现肽段除了与数据库中的异旋孢腔菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) 中的过氧化氢酶 (catalase, 得分为 225) 有部分匹配外, 大多数匹配的肽段都是未知功能的蛋白, 初步判断该糖蛋白可能为一新蛋白。

E:\Xcaliburtry_66

2006-10-26 0:38:13



try_66 #1408 RT: 34.93 AV: 1 NL: 6.67E6
T: + c ESI Full ms [300.00-2000.00]

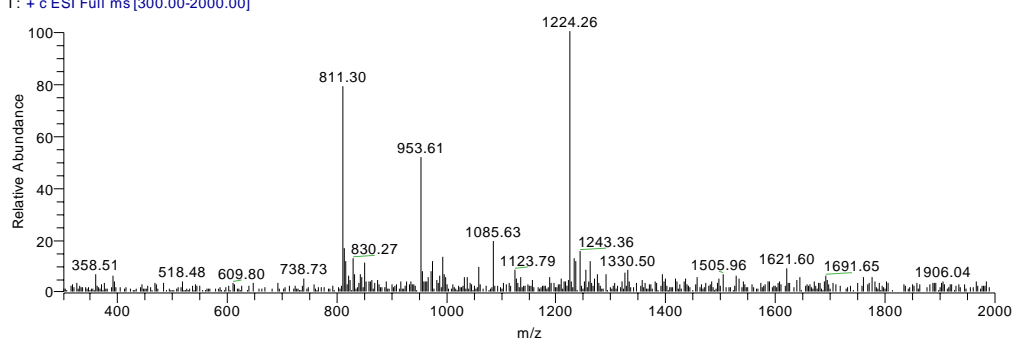
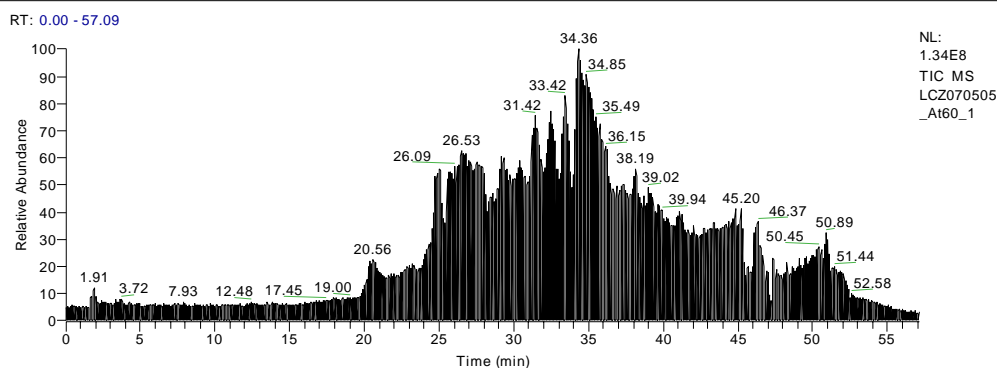


图 4-4 糖基化激活蛋白酶解产物的 RP-HPLC 图谱

Fig.4-4 The RP-HPLC Result of Trypsin Digest of Glycosylated Activator Protein



LCZ070505_At60_1 #4131 RT: 30.34 AV: 1 NL: 3.18E4
T: ITMS + c ESI d Full ms2 498.26@cid35.00 [125.00-1505.00]

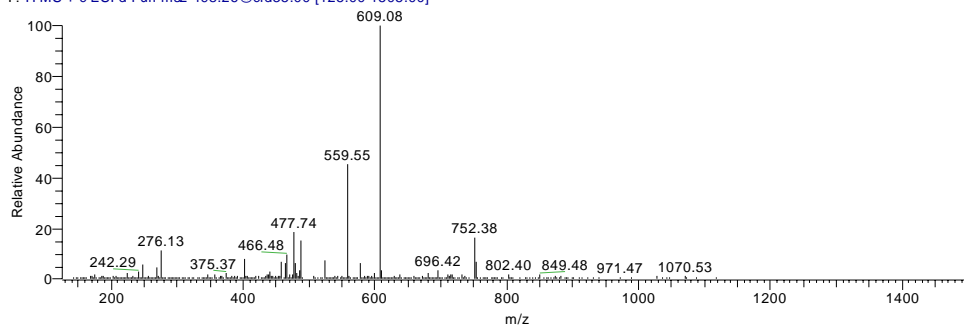


图 4.5 糖基化激活蛋白的质谱总离子流图及肽片段的二级质谱图

Fig.4.5 The ESI-MS TIC Spectrum and MS/MS Spectrum of Peptide of Glycosylated Activator Protein

Mascot Search Results

MS data file : C:\Xcalibur\sequest\ At60_1.mgf

Database : NCBI nr 20070307 (4689070 sequences; 1620466478 residues)

Taxonomy : Fungi (136304 sequences)

Significant hits: [gi|38326689](#) catalase [Cochliobolus heterostrophus]

- [gi|85105484](#) hypothetical protein [Neurospora crassa OR74A]
[gi|39944190](#) hypothetical protein MG04106.4 [Magnaporthe grisea 70-15]
[gi|45190907](#) AER304Cp [Ashbya gossypii ATCC 10895]
[gi|67531559](#) hypothetical protein AN4479.2 [Aspergillus nidulans FGSC A4]
[gi|39977183](#) hypothetical protein MG06494.4 [Magnaporthe grisea 70-15]
[gi|50292485](#) unnamed protein product [Candida glabrata]
[gi|50546915](#) hypothetical protein [Yarrowia lipolytica]
[gi|71006240](#) hypothetical protein UM01639.1 [Ustilago maydis 521]
[gi|39944282](#) hypothetical protein MG04152.4 [Magnaporthe grisea 70-15]
[gi|50546843](#) hypothetical protein [Yarrowia lipolytica]
[gi|71005420](#) hypothetical protein UM01229.1 [Ustilago maydis 521]
[gi|67901930](#) hypothetical protein AN7952.2 [Aspergillus nidulans FGSC A4]
[gi|46124375](#) hypothetical protein FG06565.1 [Gibberella zeae PH-1]
[gi|68473848](#) hypothetical protein CaO19_6065 [Candida albicans SC5314]
[gi|85115565](#) hypothetical protein [Neurospora crassa OR74A]

Peptide Summary Report

Format As Peptide Summary

Significance threshold p < Max. number of hits

Standard scoring MudPIT scoring Ions score cut-off Show sub-sets

Show pop-ups Suppress pop-ups Sort unassigned Require bold red

Error tolerant

1. [gi|38326689](#) Mass: 83180 Score: 137 Queries matched: 17
 catalase [Cochliobolus heterostrophus]
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 178	521.38	520.37	520.30	0.07	0	31	0.22	1	R.GFAVK.F
179	521.51	520.50	520.30	0.20	0	(28)	0.38	7	R.GFAVK.F
983	623.32	622.31	622.31	0.01	0	22	7.2	2	R.GSGAFGK.F
<input checked="" type="checkbox"/> 2261	433.77	865.53	865.47	0.07	0	54	0.0051	1	R.FSTVLGSR.G
<input checked="" type="checkbox"/> 2262	433.78	865.54	865.47	0.08	0	(48)	0.019	1	R.FSTVLGSR.G
<input checked="" type="checkbox"/> 2265	433.98	865.95	865.47	0.49	0	(47)	0.027	1	R.FSTVLGSR.G
<input checked="" type="checkbox"/> 2661	474.68	947.35	947.46	-0.11	0	(31)	1.5	1	K.VNYWPNR.F
<input checked="" type="checkbox"/> 2666	475.49	948.97	947.46	1.51	0	34	0.7	1	K.VNYWPNR.F
<input checked="" type="checkbox"/> 2668	475.53	949.04	947.46	1.58	0	(28)	2.6	1	K.VNYWPNR.F
<input checked="" type="checkbox"/> 2669	475.60	949.18	947.46	1.72	0	(27)	3.5	1	K.VNYWPNR.F
<input checked="" type="checkbox"/> 2671	475.67	949.33	947.46	1.87	0	(29)	2.3	1	K.VNYWPNR.F
3431	559.54	1117.06	1116.58	0.48	0	(24)	7.4	2	R.FQTVPATEK.E
<input checked="" type="checkbox"/> 3433	559.59	1117.17	1116.58	0.59	0	44	0.075	1	R.FQTVPATEK.E
<input checked="" type="checkbox"/> 3434	559.64	1117.26	1116.58	0.68	0	(34)	0.71	1	R.FQTVPATEK.E
<input checked="" type="checkbox"/> 3441	560.25	1118.48	1116.58	1.90	0	(39)	0.19	1	R.FQTVPATEK.E
<input checked="" type="checkbox"/> 4148	625.56	1249.10	1248.67	0.43	0	(64)	0.0006	1	K.AIGGTGEAVSFIK.Q
<input checked="" type="checkbox"/> 4149	625.60	1249.19	1248.67	0.52	0	67	0.00032	1	K.AIGGTGEAVSFIK.Q

4.4 小结与讨论

本文研究的蛋白质为糖基化蛋白,而且是 O-连接糖蛋白,在糖基化发生过程中会产生一系列结构相关的糖链(微不均一性)以及同一糖蛋白中的不同糖基化位点连接有不同的糖链(点不均一性),造成糖基化的不均一性,这是由于糖基化的发生不同于多肽链的合成,不受 DNA 的直接控制,而是由糖基化相关的几种酶协调作用完成的,受各种生理生化条件的影响很大,造成即使同一个位点也会有糖基化程度不同的产物。糖基化的不均一性给糖蛋白的分离分析带来了很大的困难,如电泳上呈现弥散的条带(SDS-PAGE),在色谱中不能得到良好的分离,蛋白酶酶解肽段产物少,质谱中得不到质量高的多电荷图及二级质谱图。这也是虽然超过 50%的蛋白发生了糖基化,但现有数据库条目中只有约 10%注释为糖蛋白的原因。本研究克服了多种困难,优化了色谱分离和质谱条件,最终得到了比较满意的质谱多电荷图,得到了较为准确的分子量。通过 MASCOT 比对发现该蛋白除与数据库中的异旋孢腔菌(*Cochliobolus heterostrophus*)中的过氧化氢酶有部分匹配外,大多数匹配的肽段都是未知功能的蛋白,初步推测该糖基化激活蛋白可能为一新蛋白。下一步需要对该蛋白进行 *de novo* 测序,设计简并引物,从已构建的极细交链孢菌 cDNA 文库中获得该蛋白的编码基因,再研究该蛋白的结构和功能。

第五章 结论

1. 本实验通过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀、乙醇沉淀、透析等方法去除激活蛋白粗提液中的真菌多糖，获得均一度较高的蛋白粗提液，为该类真菌源蛋白的后续纯化奠定了很好的基础；
2. 优化了该糖基化激活蛋白的离子交换和分子筛层析的缓冲液和层析条件，最终得到了银染电泳级的蛋白并确定了其促进小麦生长的功能；
3. 首次利用 TFMS 化学法切除了该糖基化激活蛋白 O-连接的糖基，SDS-PAGE 分析表明糖基切除后有两条带，表明该糖蛋白至少存在两个糖基修饰位点；
4. 利用标准蛋白溶菌酶和 BSA 建立了 HPLC-ESI-MS 蛋白分析体系，测定了溶菌酶的相对分子质量和 BSA 酶解片段的 RP-HPLC-ESI-MS 谱图，并通过 MASCOT 搜索得到正确鉴定；
5. 建立了 HPLC-ESI-MS 分析糖基化激活蛋白的技术体系，获得了其相对分子质量 50270Da，测定了其 RP-HPLC-ESI-MS 谱图，经数据库搜索，没有发现较高匹配，初步推测其为一种新型蛋白。

参考文献

1. 王金生. 分子植物病理学. 北京: 中国农业出版社, 2001
2. 刘萍萍, 闰艳春. 微生物农药研究进展. 山东农业科学, 2005, 2: 78-8
3. 吴东儒主编, 糖类的生物化学. 北京: 高教出版社, 1987, 747~749
4. 张宏明, 蔡以滢, 陈珈. *Phytophthora palmi*分泌的 10.6kD蛋白激发烟草的过敏反应. 植物学报, 1999, 41(11): 1183-1186
5. 张维杰主编, 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科技出版社, 1987, 160~165
6. 杨芑原, 钱小红, 盛龙生. 生物质谱技术与方法. 北京: 科学出版社, 2003
7. 邱德文. 植物用多功能真菌蛋白质. 中国专利, CN1344727A. 2002年04月17日
8. 邱德文. 微生物蛋白农药研究进展. 中国生物防治, 2004, 20(2): 91~94
9. 赵利辉, 邱德文, 刘峥, 等. 植物激活蛋白对水稻抗性相关基因转录水平的影响. 中国农业科学, 2005, 38(7): 1358-1363
10. 唐新科. 色谱质谱联用技术在蛋白质分析鉴定中的应用[硕士学位论文]. 长沙: 湖南师范大学, 2004
11. 徐锋, 稻瘟菌激活蛋白基因克隆及功能解析[博士学位论文]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2006
12. 郭广君, 植物激活蛋白得分离、纯化及结构分析[硕士学位论文]. 合肥: 安徽农业大学, 2006
13. 黄丽俊, 邱德文, 刘峥, 等. 应用表达谱基因芯片筛选植物激活蛋白处理水稻相关差异基因[J]. 科学技术与工程, 2005, 5(24): 1885-1889
14. 蒋冬花, 孔世海. 激发子隐地蛋白(cryptogein)基因的克隆及其植物表达载体的构建[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2002, 28(6): 649-654
15. 蒋冬花, 郭泽建, 郑重. 隐地蛋白(cryptogein)基因定点突变及其广谱抗病烟草转化植株的获得[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(5): 399-406.
16. 谢丙炎, 朱国仁, 罗宽, 等. 苎麻疫霉诱抗激发蛋白的纯化及其特性[J], 菌物系统, 1999, 18(2): 154-158
17. Admczyk M, Gebler JC, Wu J. Selective analysis of phosphopeptides within a protein mixture by chemical modification, reversible biotinylation and mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrometry, 2001, 15(16): 1481
18. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database[J]. Biochem Biophys Acta, 1999, 1473(1): 4
19. Arakawa M, Muramatsu T. Endo-beta-N-acetylglucosamidases acting on the carbohydrate moieties of glycoproteins. The differential specificities of the enzymes from *Streptomyces griseus* and *Diplococcus pneumoniae*[J]. Biochem(Tokyo), 1974, 76(2): 307
20. Bourque S, Binet M-N, Ponchet M, *et al.* Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. J Biol Chem, 1999, 274: 34699~34705
21. Bunkenborg J, Pilch BJ, Podtelejnikov AV, *et al.* Screening for N-glycosylated proteins by liquid

- chromatography mass spectrometry[J]. *Proteomics*, 2004, 4(2):454
22. Byford MF. Rapid and selective modification of phosphoserine residues catalysed by Ba²⁺ ions for their detection during peptide microsequencing[J]. *Biochem J*, 1991, 280(Pt1):261
 23. Charlwood J, Skehel JM, Camilleri P. Analysis of N-linked oligosaccharides released from glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Anal Biochem*, 2000, 284(1):49
 24. Curto M, Camafeita E, Lopez JA, *et al.* A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*). *Proteomics*. 2006,6(Suppl 1): S163-74.
 25. Czeszak X, Ricart G, Tetaert D, *et al.* Identification of substituted sites on MUC5AC mucin motif peptides after enzymatic O-glycosylation combining beta-elimination and fixed-charge derivatization[J]. *Rapid Commun Mass Spectrometry*, 2002, 16(1):27
 26. Dean, R. *et al.* The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*. 2005, 434(7036): 980-6
 27. Dell A, Morris H. Glycoprotein structure determination by mass spectrometry[J]. *Science*, 2001, 291(5512):2351
 28. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006; 312(5771): 212-7
 29. Dong H., Delaney TP, Bauer DW. *et al.* Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIMI gene. *Plant J.*, 1999, 20(2):207~215
 30. Ebel J, Cosio E. Elicitors of plant defense responses. *Int RevCytol* 1994, 148: 1~36
 31. Feng R, Konishi Y. Analysis of antibodies and other large glycoproteins in the mass range of 150,000-200,000Da by electrospray. *Anal Chem*, 1992,64(18): 2090~2095
 32. Fryksdale BG, Jedrzejewski PT, Wong DL, *et al.* Impact of deglycosylation methods on two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry for proteomics analysis[J]. *Electrophoresis*, 2002, 23(14):2128
 33. Fujiwara M, Umemura K, Kawasaki T, *et al.* Proteomics of Rac GTPase signaling reveals its predominant role in elicitor-induced defense response of cultured rice cells. *Plant Physiol*. 2006, 140(2): 734-45
 34. Gerken TA, Gupta R, Jentoft N. A novel approach for chemically deglycosylating O-linked glycoproteins. The deglycosylation of submaxillary and respiratory mucins[J]. *Biochemistry*, 1992, 31(3):639
 35. Gerken TA, Owens CL, Pasumarthy M. Determination of the site-specific O-glycosylation pattern of the porcine submaxillary mucin tandem repeat glycopeptide. Model proposed for the polypeptide:galnac transferase peptide binding site[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(15):9709
 36. Green MK, Vestling MM, Johnston MV, *et al.* Distinguishing small molecular mass differences of proteins by mass spectrometry. *Anal Biochem.*, 1998,260(2):204-211.
 37. Greis KD, Hayes BK, Comer FI, *et al.* Selective detection and site-analysis of O-GlcNAc-modified glycoproteins by beta-elimination and tandem electrospray mass spectrometry[J]. *Anal Biochem*, 1996, 234(1):38

38. Greis KD, Hayes Bk, Comer FI, *et al.* Selective detection and site-analysis of O-GlcNAc-modified glycopeptides by beta-elimination and tandem electrosparry mass spectrometry[J]. *Annl Biochem*, 1996, 234(1):38
39. Hagglund P, Bunkenborg J, Elortza F, *et al.* A new strategy for identification of N-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation[J]. *J Proteome Res*, 2004, 3(3):556
40. Hanisch FG, Jovanovic M, Peter-Katalinic J. Glycoprotein identification and localization of O-glycosylation sites by mass spectrometric analysis of deglycosylated/alkylaminylated peptide fragments[J]. *Aanl Biochem*, 2001, 290(1):47
41. Hanisch FG, Jovanovic M, Peter-Katalinic J. Glycoprotein identification and localization of O-glycosylation sites by mass spectrometric analysis of deglycosylated/alkylaminylated peptide fragments[J]. *Anal Biochem*, 2001, 290(1):47
42. Hardy MR, Townsend RR. Separation of positional isomers of oligosaccharides and glycopeptides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(10):3289
43. Harvey DJ. Identification of protein-bound carbohydrates by mass spectrometry[J]. *Proteomics*, 2001, 1(2):311
44. Hefta SA, Paxton RJ, Shively JE. Sequence and glycosylation site identity of two distinct glycoforms of nonspecific cross-reacting antigen as demonstrated by sequence analysis and fast atom bombardment mass spectrometry[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(15):8618
45. Hirabayashi J, Hashidate T, Kasai K. Glyco-catch method: A lectin affinity technique for glycoproteomics[J]. *J Biomil Tech*, 2002, 13, 205
46. <http://www.matrixscience.com>
47. Kaji H, Saito H, Yamauchi Y, *et al.* Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(6):667
48. Kamoun S, Young M, Glascock CB, *et al.* Extra-cellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1993, 6:15~25
49. Karty JA, Ireland MM, Brun YV, *et al.* Artifacts and unassigned masses encountered in peptide mass mapping[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 782(1-2):363
50. Kuster B, Hunter AP, Wheeler SF, *et al.* Structural determination of N-linked carbohydrates by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass sepectrometry following enzymetic release within sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoresis gels: application to species-specified glycosylation of alphas-acid glycoproteins[J]. *Electrophoresis*, 1998, 19(11):1950
51. Kuster B, Krogh TN, Mortz E, *et al.* Glycosylation analysis of gel-separated proteins[J]. *Proteomics*, 2001, 1(2):350
52. Kuster B, Wheeler SF, Hunter AP, *et al.* Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels: in-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass

- spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 1997, 250(1):82
53. Lennarz WJ. *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*[M]. New York: Plenum, 1980. 35-83
54. Lin, D., Tabb, D. L., Yates, J. R. 3rd. Large-scale protein identification using mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* . 2003, 1646: 1-10
55. Liu T, Shao XX, Zeng R, *et al.* Analysis of recombinant and modified proteins by capillary zone electrophoresis coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J chromatogr A* , 1999,855(2):695-707
56. Loo JA, Holler TP, Foltin SK, *et al.* Application of electrospray ionization mass spectrometry for studying human immunodeficiency virus protein complexes. *Proteins*. 1998,2:28-38
57. Loo JA, Muenster H. Magnetic sector-ion trap mass spectrometry with electrospray ionization for high sensitivity peptide sequencing. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1999;13(1):54-60
58. Mirgorodskaya E, Hassan H, Clausen H, *et al.* Mass spectrometric determination of O-glycosylation sites using beta-elimination and partial acid hydrolysis[J]. *Anal Chem*, 2001, 73(6):1263
59. Muller S, Goletz S, Packer N. Localization of O-glycosylation sites on glycopeptide fragments from lactation-associated MUC1. All putative sites within the tandem repeat are glycosylation targets in vivo[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(40):24780
60. Murray KK. DNA sequencing by mass spectrometry. *J. mass Spectrometry*, 1996, 31(11):1203-1215.
61. Ndimba BK, Chivasa S, Hamilton JM, *et al.* Proteomic analysis of changes in the extracellular matrix of Arabidopsis cell suspension cultures induced by fungal elicitors. *Proteomics*. 2003, 3(6): 1047-59
62. Numberger T & Scheel D. Signal transmission in the plant immunity response . *Trends Plant Sci*, 2001,6:372-379
63. Owens DR, Bothner B, Phung Q, *et al.* Aspects of oligonucleotide and peptide sequencing with MALDI and electrospray mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem*. 1998,6(9):1547-1554.
64. Patel K, Borchardt RT. Chemical pathways of peptide degradation. II. Kinetics of deamidation of an asparaginyl residue in a model hexapeptide[J]. *Pharm Res*, 1990, 7(7):703
65. Paxton RJ, Mooser G, Pande H, *et al.* Sequence analysis of carcinoembryonic antigen: identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin supergene family[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(4):920
66. Potier N, Donald LJ, Chernushevich I, *et al.* Study of a noncovalent trp repressor: DNA operator complex by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Protein Sci*.1998,7(6):1388-1395
67. Rademarker CJ, Pergantis SA, Blok-Tip, *et al.* Mass spectrometric determination of the sites of O-glycan attachment with low picomolar sensitivity[J]. *Anal Biochem*, 1998, 257(2):149

68. Ricci P, Bonnet P, Huet JC, *et al.* Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem* 1989, 183: 555~563
69. Rudd PM, Colominas C, Royle L, *et al.* A high-performance liquid chromatography based strategy for rapid, sensitive sequencing of N-linked oligosaccharide modifications to proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis gel bands[J]. *Proteomics*, 2001, 1(2):285
70. Rudd PM, Endo T, Colominas C, *et al.* Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(23):13044
71. Sall DJ, Kaiser RE. Characterization of the interaction between human alpha-thrombin and methyl 3-(2-methyl-1-oxopropoxy)[1]benzothieno[3,2-b]furan-2-carboxylate⁹LY8063030 using electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J Med Chem*, 1993, 36(16):2350~2355
72. Settineri CA, Medzihradzky KF, Masiarz FR, *et al.* Characterization of O-glycosylation sites in recombinant B-chain of platelet-derived growth factor expressed in yeast using liquid secondary ion mass spectrometry, tandem mass spectrometry and Edman sequence analysis[J]. *Biomed Environ Mass Spectrom*, 1990, 19(11):665
73. Siuzdak G. *Mass Spectrometry for Biotechnology*[M]. San Diego: Academic Press. 1996, 11~17
74. Smith RD, Loo JA, Edmonds CG, *et al.* New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization[J]. *Anal Chem*, 1990, 62(9):882~899.
75. Spellman MW. Carbohydrate characterization of recombinant glycoproteins of pharmaceutical interest[J]. *Anal Chem*, 1990, 62(17):1714
76. Sun Tae Kim, Kyu-Seong Cho, Yu-Sin Jang, *et al.* Two-dimensional Electrophoretic Analysis of Rice Proteins by Polyethylene Glycol Fractionation for Protein Arrays[J]. *Electrophoresis*, 2001, 22, 2103-2109.
77. Sun Tae Kim, Seok Yu, Sang Gon Kim, *et al.* Proteome analysis of rice blast fungus (*Magnaporthe grisea*) proteome during appressorium formation[J]. *Proteomics*, 2004, 4, 3579~3587.
78. Tretter V, Altmann F, Marz L. Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glycosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1-3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue[J]. *Eur J Biochem*, 1991, 199(3):647
79. Trimble RB, Maley F. Optimizing hydrolysis of N-linked high-mannose oligosaccharides by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H[J]. *Anal Biochem*, 1984, 141(2):515
80. Van Den steen P, Rudd PM, Dwek RA, *et al.* Concepts and principles of O-linked glycosylation[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1998, 33(3):151
81. Van Den Steen P, Rudd PM, Proost P, *et al.* Oligosaccharides of recombinant mouse gelatinase B variants[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1425(3):587
82. Varki A. *Glycobiology* [M], 1993, 3 (20) :97~130.
83. Veenstra TD, Benson LM, Craig TA, *et al.* Metal mediated sterol receptor-DNA complex association and dissociation determined by electrospray ionization mass spectrometry. *Nat*

- Biotechnol.1998,16(3):262-266
84. Wang YC, Hu DW, Zhang ZG, *et al.* Purification and immunocytolocalization of a novel *Phytophthora boehmeriae* protein inducing the hypersensitive response and systemic acquired resistance in tobacco and Chinese cabbage. *Physiol & Mol Plant Pathol*, 2003, 63: 223-232
 85. Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, *et al.* Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 1992, 257(5066):85-88
 86. Winston RL, Fitzgerald MC. Mass spectrometry as a readout of protein structure and function. *Mass Spectrometry Reviews*,1997,16(4):165~179
 87. Wright HT. Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1991, 26(1):1
 88. Wroblewski VJ, Kaiser RE, Becker GW. Proteolysis of human growth hormone by rat thyroid gland in vitro: application of electrospray mass spectrometry and N-terminal sequencing to elucidate a metabolic pathway. *Pharm Res*, 1993,10(8):1106~1114
 89. Zhang H, Li XJ, Martin DB, *et al.* Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(6):660

致 谢

在论文的完成过程中，导师邱德文研究员倾注了大量心血，给我创造了一个宽松、良好的工作环境，使我能够最大程度发挥自己的潜能。在研究中导师对研究思路的把握，犹如一盏明灯指引我的航向，使研究一步一个脚印前进；导师治学严谨，诲人不倦，工作忘我，这些都给我留下了深刻的印象，对我人生道路和理想的选择产生了积极的影响，使我终身受益。在论文完成之际，谨向导师表示衷心的感谢和崇高的敬意！感谢邱老师带我进入科研的殿堂并激励我在人生路上严谨求实，勤奋创新。

特别感谢杨秀芬老师、刘峥老师、杨怀文老师、曾红梅老师、袁京京老师、曾凡荣老师、蒋伶活老师在本研究的设计、实验之中给予的指导和帮助；感谢龙承祖师兄、冯飞师兄、徐峰师兄、龚永兴师兄、赵利辉师姐在实验技能和研究思路上的指导。

感谢环发所测试中心为本研究提供高效液相色谱和电喷雾质谱仪器，为本研究的顺利开展提供了莫大的支持，并感谢范中南老师，汪聪慧老师，孙宝利老师，申秀丽等在实验过程中给予的指导和帮助。

在完成论文期间，本研究室仲新华硕士，黄炜硕士，陈梅硕士，龙松华硕士，杨保军硕士，龙承祖硕士，张宁硕士，黄丽俊硕士，刘文平硕士，赵明治硕士，武晓丽硕士，尚威硕士，金鑫硕士，郭广君硕士，顾成波博士，吕素芳硕士，姚庆硕士，毛建军博士，张志刚博士，刘延峰硕士，李明勇硕士，李杰硕士，刘华硕士，张云华博士，高会兰硕士，于江博士，周红运女士等都给予我热情的帮助，能与他们共同工作，在实验室形成了一个轻松、融洽的环境另我倍感荣幸，在此对他们深表感谢。

感谢所有给予我关心和帮助的老师、同学及朋友。三年的硕士生活令我难忘，是我的人生历程中重要的三年，学习新知识，掌握新技术，从未知走向成熟，是我不断成长的过程。期间体味到了成功的喜悦，也品尝了失败的苦恼。我要感谢所有成功和失败，是它们使我成长和成熟。

感谢国家“863”计划(项目编号:2006AA10A210)和国家“973”计划(项目编号:2003CB114204)对本研究的资金支持。

最后，谨已此文献给我最敬爱的父母和爱人肖罗。深深感谢他们对我一贯的支持。祝他们一生平安。感谢所有关心、支持我的人！祝愿他们工作顺利，生活美满！

李承雷

2007年6月

作者简历

个人概况

姓名：李承雷 性别：男 民族：回族 政治面貌：中共党员

出生日期：1981.05.24 专业方向：理学，生物化学与分子生物学

联系电话：010-68919562

通讯地址：北京中关村南大街 12 号中日楼 505 邮编：100081

电子邮件地址：chengleili @163.com

教育背景

2004.09- 中国农业科学院研究生院 北京
✿ 攻读生物化学与分子生物学理学硕士学位

1999.09-2003.06 山东大学生命科学学院 济南
✿ 攻读生物科学理学学士学位

实践经验

2004.09-2007.6 中国农业科学院植物保护研究所 糖基化激活蛋白的纯化与 HPLC-ESI-MS 分析研究

2002.10-2003.12 中国农业科学院生物防治研究所 真菌源激活蛋白的分离技术研究

2000.06-2001.07 山东大学微生物国家重点实验室 甜菜夜蛾致病菌的分离与活性研究