

Limited Proteolysis (LiP) 介绍

-----基于蛋白组大规模研究蛋白构象变化

上海易算生物科技有限公司

目录

1. LiP 技术介绍	2
2. LiP-MS 流程	3
2.1. LiP 样品制备（举例细胞样品）：	3
2.2. Mass Spectrometry 检测：	4
3. 总结：	5
3.1. LiP-MS 研究蛋白构象的优势：	5
3.2. LiP-MS 技术的局限：	5
3.3. LiP-MS 技术的应用：	6
4. 技术支持：	6

1. LiP 技术介绍

许多外界干扰都能影响蛋白质的构象，诸如热刺激，蛋白-蛋白相互作用，化合物结合，翻译后修饰等。蛋白构象的变化包括局部波动，形成更大的结构域，折叠构象与非折叠构象，或者单体与多体间的转换等。蛋白结构的变化会影响蛋白功能，例如变构酶的结构变化调控酶的活性。在淀粉样变性病以及一些神经退行性疾病中，某些蛋白的结构变化会导致其形成不溶性沉淀，对细胞及组织造成伤害。

X-ray 结晶、核磁共振（NMR）以及各种光谱学技术能够在体外研究简单蛋白体系的构象变化，却不能胜任复杂生物体系。Forster 共振能量转移（FRET）以及细胞内的

NMR 技术能够在体内监测特定蛋白的构象变化，但这两种技术都需要对蛋白进行标记，不适合大规模研究。基于质谱的蛋白质组学通常被用来研究蛋白丰度的变化，翻译后修饰以及蛋白-蛋白相互作用，殊不知该技术也能高通量研究复杂生物体系中的蛋白结构的变化，而实现该目的需要结合由瑞士分子系统生物研究所（ETH）的 Paola Picotti 团队开发的 limited proteolysis (LiP) 技术。本文就为您介绍如何结合该技术及 SRM、PRM、DDA、DIA 等蛋白质组学技术研究蛋白结构的变化。

LiP-MS 原理：LiP-MS 检测蛋白构象变化的关键在于 LiP 技术。**该技术的核心是让蛋白处于天然构象的条件下，用广谱性的蛋白酶对其进行酶切。**当蛋白构象发生变化时（例如与小分子结合），会暴露出不同的广谱性蛋白酶酶切位点，产生不同的蛋白酶切片段。一次酶切后再将蛋白样品变性，用胰酶进行二次酶切。通过质谱检测，比较不同处理条件的样品中，全酶切及半酶切肽段（LiP 酶切）的信号强度变化，进而分析蛋白构象变化（图 1）。

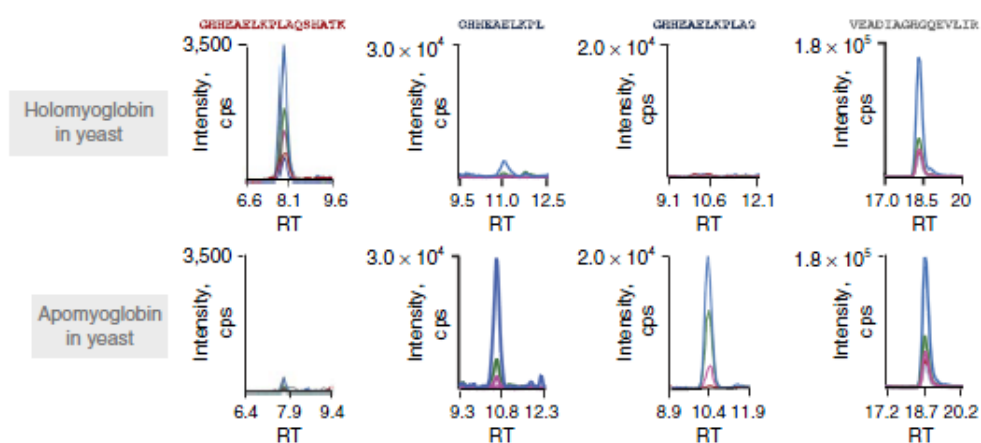


图 1. 不同构象下，全酶切肽段与半酶切肽段信号强度比较

2. LiP-MS 流程

2.1. LiP 样品制备（举例细胞样品）：

1. 准备不同处理条件下的样品。Condition1, Condition2, Condition3...
2. 非变性条件下提取蛋白。

细胞裂解液可以选择 50mM HEPES, 150mM KCl, 1mM MgCl₂, 100mM β-glycerophosphate, 50mM NaF, pH 7.3。机械力破碎或者反复冷冻破碎。3000g, 4s, 离心 2min, 收集上清。

3. 向蛋白样品中加入广谱性的蛋白酶。

例如蛋白酶 K (常用), thermolysin (嗜热菌蛋白酶), subtilisin (枯热杆菌蛋白酶)、papain(木瓜蛋白酶)、糜蛋白酶(chymotrypsin)、或者弹性水解酶(elastase)。这些蛋白酶倾向于剪切未折叠的蛋白区域。酶与蛋白样品的比例要低,例如 1:100。酶解时间要短,例如室温酶解 5min。在广谱性蛋白酶作用下,这些非变形的蛋白样品会被切割成大的蛋白片段(图 2 中红色箭头为广谱性酶作用位点)。

4. 蛋白变性, 终止酶解反应。

向非变性的蛋白样品中,加入盐酸胍至终浓度为 7.4M,并且加热 3min,使蛋白样变性并且终止广谱性酶的酶解反应。

5. 胰酶酶解。

将上述变性的蛋白样品按常规流程进行还原、烷基化、胰酶酶解,即加入 12.5mM DTT, 37°C, 30min, 加入 40mM IAA, 室温避光反应 45min。样品用 100mM NH₄CO₃ 将盐酸胍稀释至 0.5M, 按酶与底物 1:100 (w/w) 加入测序级胰酶, 37°C, 反应 2h, 之后再次加入等量胰酶, 37°C 酶解过夜。

6. 酶解终止。向样品中加入甲酸至 pH<3, 肽段脱盐干燥, 质谱检测。

7. 需要注意的是, 每个条件下蛋白样品均需要设定一个对照组, 该对照组仅按照常规蛋白组样品制备流程进行变性、还原、烷基化和胰酶酶解(步骤 5)。该对照组用于后续数据分析的归一化。不同条件下蛋白构象的变化, 在两步酶切中, 会产生不同酶切形式的肽段, 通过比较肽段的不同酶切模式, 可以研究蛋白构象的变化(图 2)。

2.2. Mass Spectrometry 检测:

LiP 得到的肽段样品, 根据实验目的, 可以依赖多种质谱检测手段进行检测, 包括大规模筛选模式 (DDA, DIA), 或者靶向模式 (SRM, PRM)。液相梯度按照常规 2~3h 分离, 质谱检测参数按照常规 DDA, DIA, SRM 及 PRM 检测模式设置。搜库软件及参数也同常规。需要注意的是, 搜库参数中, 胰酶酶切需要设定为**半酶切模式**。定量时选择半酶切且没有漏切的 unique 肽段, 差异倍数至少 2 倍以上, $q < 0.02$ 。通常经 DDA/DIA 筛选得到的构象变化的肽段, 需要经靶向验证。

1. Label free DDA 定量: 可采用 spectra counting 模式, 也可采用峰面积模式。

2. DIA 定量: 采用峰面积模式。

3. SRM、PRM：采用子离子的峰面积模式。

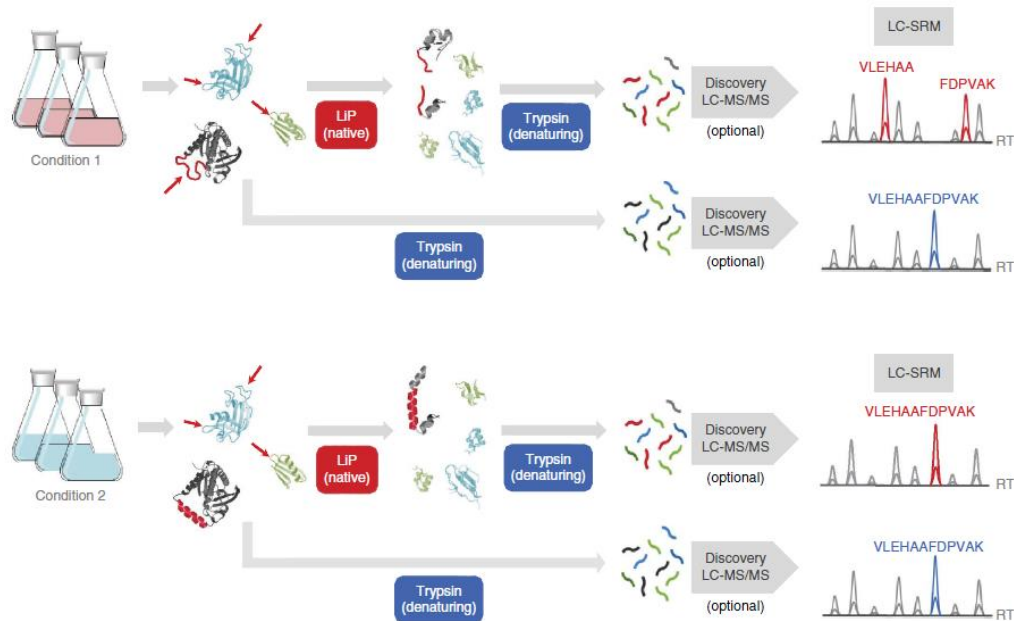


图 2. LiP 工作流程。Condition1 中的蛋白暴露出蛋白酶 K 的酶切位点，因此在质谱中可以检测到两个半酶切的肽段。

3. 总结:

3.1. LiP-MS 研究蛋白构象的优势:

1. 研究体系可以为复杂生物样本，例如细胞、血液、组织。
2. 样本不需要经过富集、提纯及标记。目前在人源细胞中，可检测到约 3500 个 LiP 切割位点，包含约 1200 个蛋白。
3. 可以联合多种质谱检测技术：靶向（PRM,SRM）,定性定量（DDA, DIA）。
4. 可以研究特定蛋白的构象变化，也可以高通量研究蛋白网络中的构象变化。
5. 检测灵敏度高，可以检测显著的结构变化，也可以检测微小的结构变化。如果结合更长色谱梯度，可以检测低丰度蛋白的构象变化。

3.2. LiP-MS 技术应用中的注意要点:

1. LiP 技术必须在非变性条件对蛋白进行酶切，因此只适合与可溶性蛋白，对膜蛋白不适用。
2. 同一体系中，如果某一蛋白存在多种构象，Lip-MS 无法区分各个构象。

-
3. 某些蛋白无论处于何种构象，对 LiP 剪切都不敏感，因此无法进行构象分析。

3.3. LiP-MS 技术的应用：

1. 分析翻译后修饰引起的蛋白构象变化
2. 分析蛋白酶活性的变化（构象变化会导致酶活性的改变）
3. 分析蛋白-蛋白相互作用及网络
4. 分析蛋白-（代谢、药物）小分子的相互作用及网络
5. 疾病生物标志物发现（例如神经退行性疾病，淀粉样蛋白/可溶性蛋白的比例）

4. 技术支持：

Biognosys 拥有 LiP 的专利技术，在不久的将来，将会推出商业化的产品为科研领域提供技术支持。该部分在正式购买我们的方案后另行培训，如在试用阶段需要了解结果质量，欢迎联系我们。Support@omicsolution.com。