

利用雷射顯微切割/壓力彈射技術和奈米液相層析串聯式質譜儀 (LC/MS/MS) 對死後人類腦組織中的蛋白質進行鑒定

應用文摘

Christian Sauber

安捷倫科技

Bernd Sägmüller

PALM顯微雷射科技

Manuela Neumann 和 Hans A. Kretschmar

慕尼黑路德維希-馬克西米利安大學

導言

大多數的神經退化性疾病，例如帕金森氏症、阿滋海默症等，在分子層面的發病機制現今尚未研究清楚。目前，大多數蛋白質的表現分析都是在以完整組織的均質化製備樣品為基礎上所完成的，用這種方法所製備的樣品，無法提供在特定種類的細胞上所發生之特定改變的相關資訊。本研究的目的即在探討利用雷射顯微切割方法在單一腦組織所取得的細胞能否用於蛋白質表現的分析。

實驗部分

樣品取得

組織樣品來自於德國慕尼黑路德維希-馬克西米利安大學神經病理學系。樣品取自死後的人類小腦，其中並包含了白質和皮質。樣品依神經病理學的方法，以厚度 10-15 μm 代表一層細胞層，並依蘇木精-曙紅標準染色法 (Hematoxylin-Eosin Staining, HE) 進行染色 (如圖 1)

利用雷射顯微切割與壓力彈射技術 (LMPC) 所取得的人腦組織是應用 PALM MicroBeam IP 系統所提供的 337 nm 氮氣雷射來完成的。雷射壓力彈射 (LPC) 與均質化的軟體控制部分則是利用 PALM RoboSoftware 中的自動壓力彈射 (AutoLPC) 功能，先在感興趣的部分描繪出面積分別為 5、10 和 20 mm^2 的輪廓，再



Agilent Technologies



圖1. 小腦組織樣品照片。左邊是白質，右邊是皮質。皮質構造用藍色突出顯示。

從這些部位收集樣品。自動雷射壓力彈射 (AutoLPC) 的網格步寬設為 $5\ \mu\text{m}$ ，使每個細胞至少被脈衝搏動兩次，以保證可靠的均質化效果。

將細胞碎片直接收集到微量離心管蓋裡。進行雷射顯微切割/壓力彈射 (LMPC) 前，在每個管蓋的中心滴入一滴 ($15\ \mu\text{l}$) 蛋白質變性液，蛋白質變性液的表面張力強度足以使液滴可以倒置。將管蓋置於人腦組織樣品上，並儘可能地靠近雷射聚焦點，使雷射彈射所得到的組織能落於變性液中。

組織樣品經雷射壓力彈射 (LPC) 取得之後，立即以兩種不同的方法進行蛋白質降解：一種是標準尿素法，另一種為有機溶劑法。

降解

尿素 / 胰蛋白酶 (Trypsin) 降解方法

樣品直接被彈射至裝有 $15\ \mu\text{l}$ 以 Tris 及 $6\ \text{M}$ 尿素所配置的緩衝液裡，立即進行變性。或利用 PALM 黏性蓋 (AdhesiveCaps) 收集彈射出的細胞，延長收集的時間使得到的細胞量增加，稍後再進行變性。一小時後，在懸浮液中加入 $95\ \mu\text{l}$ 水，然後溫和振動使之混合均勻。

胰蛋白酶降解是在 37°C 的溫度條件下，過夜反應，在每 $10\ \text{mm}^2$ 細胞中加入 $800\ \text{ng}$ 胰蛋白酶 (Trypsin)，即蛋白酶與蛋白質的比為 1:20。反應完成後，再以 1% 的蟻酸 (formic acid) 來終止反應。將樣品凍乾後，再加入 $20\ \mu\text{l}$ 的 0.1% 蟻酸水溶液將樣品回溶，即完成樣品的製備，待後續以 LC/MS 分析。

三氟乙醇 (TFE) / 胰蛋白酶降解方法

樣品直接彈射至 $15\ \mu\text{l}$ 含 pH.8.0 的 $10\ \text{mM}$ DTT (二巰基蘇糖醇) 之 50% TFE (1,1,1-三氟乙醇) 和 50% $30\ \text{mM}$ 重碳酸銨 (ammonium bicarbonate) 的混合水溶液中。樣品也可彈射至 PALM 黏性蓋 (Adhesive Caps) 中，做一段時間的細胞收集，稍後再進行變性。

離心分離後，樣品於 60°C 靜置 45 分鐘。接著將樣品用 $90\ \mu\text{l}$ 的 $30\ \text{mM}$ 重碳酸銨緩衝液 (ammonium bicarbonate buffer) 稀釋。同樣以每 $10\ \text{mm}^2$ 細胞加入 $800\ \text{ng}$ 胰蛋白酶 (Trypsin) 的比例使樣品在 37°C 的溫度條件下過夜反應。再用 1% 蟻酸終止反應後，快速冷凍樣品，再加入 $20\ \mu\text{l}$ 含 0.1% 蟻酸水溶液將樣品回溶，待後續 LC/MS 分析。

液相層析/質譜分析

所有液相層析/質譜分析 (LC/MS) 的實驗都是利用 Agilent Nanoflow Proteomics Solution 所提供的技術來完成的。該方案將樣品先通過一台專用於質譜分析 (MS) 的安捷倫 1100 系列奈米液相層析儀 (Agilent 1100 Series nano-LC)，再經由垂直角噴射的奈米噴霧離子源進入安捷倫 1100 系列液相層析質譜儀 (Agilent 1100 Series LC/MS Trap XCT)。奈米液相層析系統 (nano-LC system) 利用一個 ZORBAX 300SB-C18 ($0.3 \times 50\text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$) 純化管柱對樣品進行純化/脫鹽的處理，並利用 ZORBAX 300 SB-C18 ($75\ \mu\text{m}$, $150\ \text{mm}$) 的奈米級管柱對樣品進行分離，並以起始於 3% 的溶劑 B (含 0.1% 蟻酸的氘甲烷) 與 97% 的溶劑 A (含 0.1% 蟻酸的水) 之混合溶劑來進行梯度分離。

LC/MSD Trap XCT 是在獨特的胜肽掃描 (Peptide Scan) 自動二次質譜模式下操作，胜肽掃描模式可在每秒 8100 u 的掃描速度下得到解析度小於 0.35 u (FWHM) 之單一質譜全掃描圖譜。利用自動的二次質譜掃描，可以每秒 26000 u 的掃描速度，自兩個由一次質譜所得到的最大質譜波峰取得解析度小於 0.6 u (FWHM) 的二次質譜圖。胜肽掃描模式可在高達 +3 電位的同位素解析度及總體速率為每秒一個二次質譜圖的情況下進行帶電狀態質譜偵測。

資料處理

本實驗中所有數據資料都是利用 Agilent Spectrum Mill 質譜蛋白質體學資料分析平台來進行處理，自 NCBI (美國國立生物技術資訊中心) 人類資料庫中搜尋比對而取得。質譜預處理則由 Agilent Spectrum Mill 的提取程式來完成。只有序列標記長度大於 1 的 MS/MS 質譜可被選取來用於資料庫搜查。

結果與討論

與利用雷射顯微切割與壓力彈射技術 (LMPC) 來取得組織中 RNA 的分析做比較 (見安捷倫 5988-9128EN 號出版物)，蛋白質不能以複製放大來改善檢測極限，因此決定取較大面積的組織來進行實驗，實驗中取約 1 到 20 mm² 的面積的組織，而一般認為每 10 mm² 的組織具有 10⁶ 個細胞，每個細胞約包含 4 ng 的蛋白質，因此合計共約取得 400 µg 的蛋白質以進行分析。

在雷射顯微切割與壓力彈射 (LMPC) 過程中，收集 5 mm² 面積的細胞之情況下，蛋白質變性液的蒸發可以忽略不計。然而，組織樣品收集完成後，可選擇性地加入數次 10 µl 的變性液，以保證所有的組織切片都完全浸泡在變性液中。

利用 PALM 黏性蓋 (AdhesiveCaps) 收集細胞以增加細胞收集量 (10 和 20 mm²) 可獲得較佳的蛋白質分析結果。這些黏性蓋上被塗佈了特殊的填充料，使得不需要在黏性蓋裡放置緩衝液即可收集細胞。完成細胞的收集之後，加入變性液再溫和地振動使之混合均勻，隨後利用低速離心來分離液體和細胞切片。

INSTRUMENT CONDITIONS

LC Conditions:

Enrichment

Column:	Zorbax SB-C18, 300A, 0.3 x 5 mm, 5 µm
Mobile phase:	0.1% formic acid in water
Flow rate:	10 µL/min

Analysis

Column:	Zorbax SB-C18, 300A, 0.075 x 150 mm, 3.5 µm
Mobile phase:	A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in acetonitrile (ACN)
Gradient:	0-5 min at 3%B then 0.5%B per minute up to 60% (5-119min) 60% to 85%B over one minute (119-120min) held at 85%B stop time 125min
Flow rate:	250 nL/min
Injection:	16 µL out of 20 µL

MS Conditions

Ionization mode:	Positive nanoelectrospray
Drying gas flow:	5 L/min
Drying gas temperature:	300°C
Skimmer:	30 V
Capillary exit:	75 V
Trap Drive:	85
ICC:	On
Peptide scan mode	
Active exclusion:	3 spectra, 1.5 min
Preferred charge state:	Doubly charged
Number of precursors:	2
Maximum accumulation time:	50 ms
Target:	125,000 (MS) 100,000 (MS/MS)
Scan:	300 – 2200 m/z (MS) 100 – 1800 m/z (MS/MS)

和利用傳統方法以玻璃器皿對組織進行均質化的處理相比，雷射壓力彈射的主要好處在於不接觸樣品就能對明確的組織區域，甚至好幾個區域進行收集。這一過程並可以以內置顯微鏡仔細監督及記錄存檔。借助於 MicroBeam 的自動雷射壓力彈射 (AutoLPC) 功能，單一個細胞在彈射過程中已被雷射脈衝均質化，因而可以直接取得溶解性蛋白質作進一步處理 (圖2, 3)

對兩種蛋白質降解方法進行比較以評估它們對勝肽與蛋白質鑒定的影響。來自組織的複雜蛋白混合物需要精準的降解程序，以確保蛋白質被完全的降解。利用複合有機溶劑進行降解的方法促成了較多的勝肽/蛋白質得到鑒定，這很可能是由於降解前蛋白質被溶解得比較好的原因。

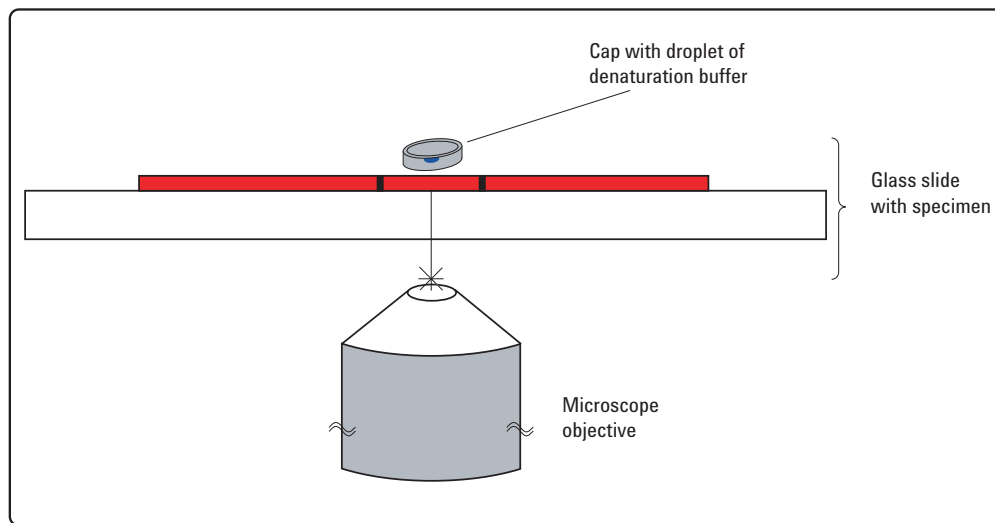


圖2. 雷射顯微切割與壓力彈射 (LMPC) 裝置示意圖



圖3. 在裝有蛋白質變性液之蓋中的雷射顯微切割與壓力彈射 (LMPC) 均質化切片

Agilent Spectrum Mill 的質譜蛋白質體學資料分析平台透過其蛋白質比對報告 (圖 4) 讓我們能夠對單個蛋白質，甚至多個蛋白質或在多個實驗之間進行比較。利用此一報告，在第一步驟裡，來自不同樣品或不同實驗中所感興趣的所有勝肽可被彙集在一起，再進行蛋白質的比對鑒定。接著，每一個來自不同樣品或不同實驗的勝肽被陳列於各個獨立欄位，而所有被鑒定出來的勝肽序列相似度及數目亦被同時顯示出來。

一個 10 mm² 人類死後組織樣品在一維奈米 LC/MS 分析後共有 26 種蛋白質被成功地鑒定 (圖5、圖6)。

由於來自組織樣品降解得到的勝肽的數目較大，質譜儀的基峰層析圖 (BPC) 上出現了數百個波峰。串聯質譜儀 (MS/MS) 總離子層析圖 (TIC) 所示強度亦與 BPC 相若，這是因為勝肽在 XCT 離子阱質譜儀中的斷裂效率非常地接近 100%。有超過 150 個 MS/MS 圖譜自動被進行了勝肽序列比對，而共有 26 個蛋白質在絕對分值大於 15 的情況下被顯示有效地比對成功。未來的工作將包括透過更大的顯微切割區域，與結合多維的 LC 分離技術，以獲取更加深入的組織蛋白質分析圖譜。

PALM\Sample5 # spectra mean intensity	PALM\Sample4 # spectra mean intensity	Database Accession #	%AA Coverage	Distinct Peptides (#)	Distinct Summed MS/MS Search Score	Group #	Protein Name
43 5.61e+007	27 1.12e+007	251802	53	26	413.21	1	glial fibrillary acidic protein
11 2.48e+007	2 4.07e+006	23958133	30	10	134.29	2	Similar to tubulin, beta, 2
11 2.40e+007	2 4.56e+006	16198427	28	9	134.09	3	Tubulin alpha-1 chain (Alpha-tubulin 1)
9 2.64e+007	5 4.08e+006	14250401	26	9	128.52	4	actin, beta
9 2.40e+007	9 4.68e+006	27485731	21	9	126.81	5	similar to ubiquitin C
10 2.29e+007	1 9.00e+006	66925	31	8	124.74	6	creatine kinase (EC 2.7.3.2) chain B
9 6.47e+007	4 7.39e+006	32097	50	5	81.05	7	histone H4
5 2.63e+007	2 4.67e+006	4378804	38	5	73.40	8	hemoglobin beta chain
5 2.23e+007	0 0.00e+000	119339	14	4	60.50	9	Alpha enolase (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (Non-neura
3 1.23e+007	0 0.00e+000	16877874	31	3	46.12	10	Similar to triosephosphate isomerase 1
3 1.55e+007	0 0.00e+000	4261934	30	3	39.34	11	neuropolypeptide h3

圖4. 不同分解方法的比較研究。左列 (5 號樣品) 代表採用 TFE 方法進行分解的蛋白質鑒定結果，右列 (4 號樣品) 代表採用尿素方法分解的蛋白質鑒定結果。欄位中顏色表示蛋白質相對的蛋白質表現量：白色表示沒有檢測到，隨著色彩的加深，表示蛋白質表現量升高。

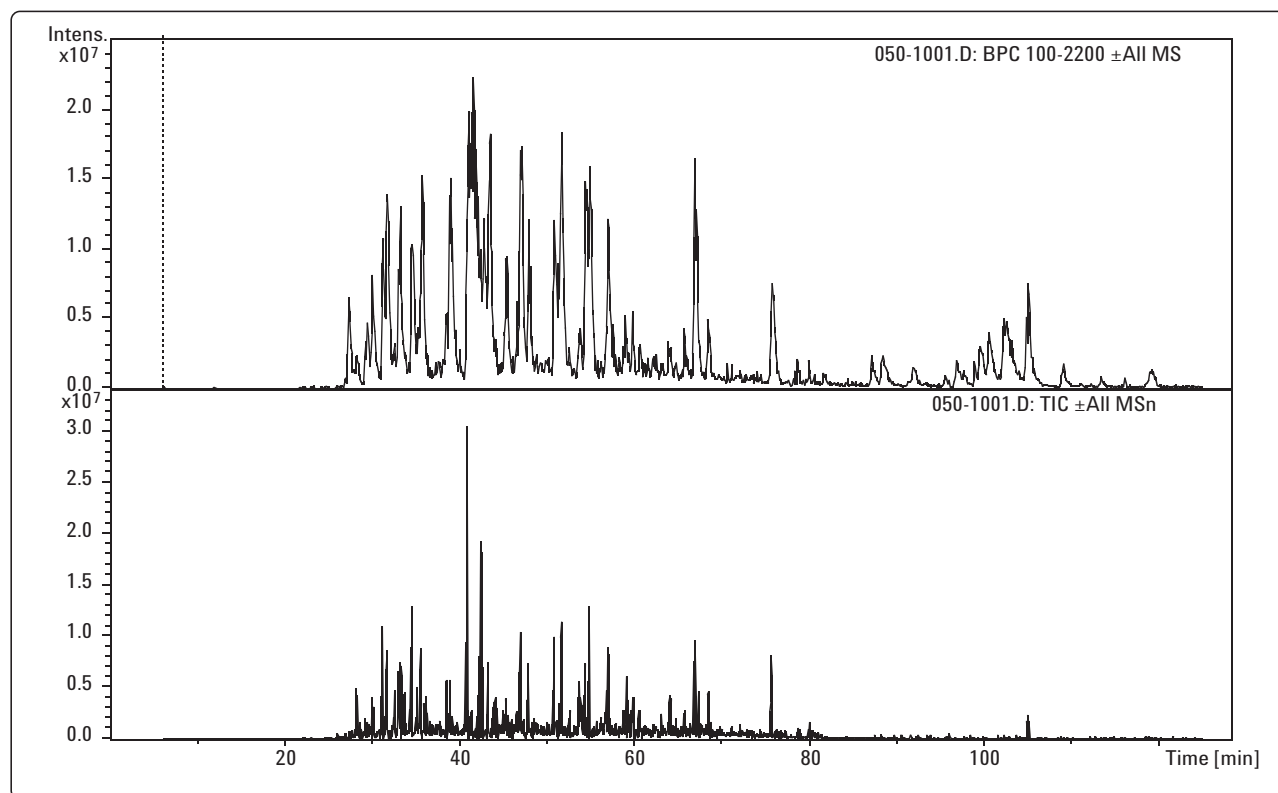


圖5. 10 mm² 組織樣品的基峰層析圖 (MS) 和總離子層析圖 (MS/MS)

結論

利用雷射顯微切割與壓力彈射 (LMPC) 技術所製備的組織樣品使我們能够直接對可溶性蛋白質進行進一步的研究。並且由實驗得知混合有機溶劑的消化方法可得到較好的 LC/MS 序列比對範圍和蛋白質鑒定結果。採用高容量離子阱的一維奈米 LC/MS/MS 質譜儀在僅 5 mm² 區域的組織樣品內可獲得多達 30 種蛋白質的成功鑒定。

Group (#)	Spectra (#)	Distinct Peptides (#)	Summed MS/MS Search Score	% AA Coverage	Mean Peptide Spectral Intensity	Protein MW (Da)	Protein pI	Database Accession #	Protein Name
1	43	25	388.31	50	5.61e+007	49880.5	5.42	251802	glial fibrillary acidic protein
2	11	9	134.09	28	2.40e+007	50151.9	4.94	16198427	Tubulin alpha-1 chain (Alpha-tubulin 1)
3	11	9	125.37	28	2.57e+007	49631.2	4.81	135470	Tubulin beta-5 chain
4	10	8	124.74	31	2.29e+007	42618.4	5.34	180570	creatine kinase
5	9	9	108.54	21	0.00e+000	77028.9	7.16	27485731	similar to ubiquitin C
6	9	7	102.80	23	2.64e+007	40503.6	5.78	16924319	Unknown (protein for IMAGE:3538275)
7	9	5	79.98	50	6.47e+007	11271.3	10.86	32097	histone H4
8	5	5	73.40	38	2.63e+007	15982.4	6.74	6003534	hemoglobin beta subunit variant
9	5	4	60.50	14	2.23e+007	47169.2	7.01	119339	Alpha enolase (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (Non-neura
10	3	3	46.12	22	1.23e+007	26641.6	6.45	17389815	triosephosphate isomerase 1
11	3	3	39.34	30	1.55e+007	15964.1	8.81	4261934	neuropolypeptide h3
12	3	3	36.65	13	1.17e+007	27745.3	4.73	899459	14-3-3 protein zeta/delta (Protein kinase C inhibitor protein-1) (K
13	3	3	34.58	15	3.02e+007	15328.0	11.27	963031	histone H3.3 [validated]
14	5	2	31.85	21	5.32e+007	14091.5	10.90	1749804	Histone H2A.c/d/i/n/p (H2A.1) (H2A/c) (H2A/d) (H2A/i) (H2A/n) (
15	6	2	30.58	20	2.49e+007	13989.3	10.31	7387742	Histone H2B.e (H2B/e)
16	2	2	30.42	9	1.19e+007	36638.7	5.71	1200083	L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) chain H
17	2	2	30.12	8	2.97e+007	35492.9	8.21	35053	uracil DNA glycosylase
18	2	2	28.16	3	1.42e+007	111973.4	5.22	1359715	Na+.K+ ATPase
19	2	2	26.33	3	9.78e+006	68736.3	6.32	21594764	hUNC18b
20	2	2	22.86	7	1.34e+007	40072.8	5.62	232134	Guanine nucleotide-binding protein G(O), alpha subunit 2
21	2	1	18.21	10	1.48e+007	15289.7	8.72	22671717	hemoglobin alpha-2
22	1	1	17.70	2	1.01e+007	57955.9	5.80	4502295	F1 beta subunit
23	1	1	16.67	5	1.15e+007	31544.7	4.47	219894	myristylated alanine-rich protein kinase C substrate
24	1	1	15.72	4	1.48e+007	25035.1	6.00	23274223	Antioxidant protein 2 (1-Cys peroxiredoxin) (1-Cys PRX) (Acidic
25	1	1	15.58	2	9.75e+006	51072.5	5.14	460789	transformation upregulated nuclear protein
26	1	1	15.22	2	1.34e+007	36006.1	8.67	565644	hnRNP protein A2
Totals:		152	113						

圖6. 由 10 mm² 死後人腦細胞組織樣品經 Spectrum Mill 分析的結果

致謝

作者感謝安捷倫科技的 *Jose Meza*, *Steven Fischer* 和 *Christine Miller*, 是他們貢獻了正待發表的三氟乙醇/胰島素降解方法的資料。

作者

Bernd Sägmüller 是 PALM 顯微雷射科技應用專家。**Hans A. Kretschmar** 是神經病理學研究所所長，而 **Manuela Neumann** 是醫學博士 (MD) 和神經病理學家，二位都任職於慕尼黑路德維希-馬克西米利安大學。**Christian Sauber** 是安捷倫科技的一位應用化學家。

www.agilent.com/chem

© 安捷倫科技公司, 2004

本文中所涉及的資訊, 描述, 規格, 如有更改, 恕不另行通告。安捷倫對本資料中出現的錯誤, 以及由於提供, 實施或使用本資料所造成的附帶性損失或間接損失不承擔責任。

2004 年 5 月 31 日於美國印刷出版
5989-0895EN