基于离子液体的蛋白质组样品制备新方法研究进展

郑诗颖^{1,2}, 褚宏伟^{1,3}, 赵群^{1,2}, 赵宝锋^{1,2}, 张丽华^{1,2*}, 张玉奎^{1,2,3}

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

2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 大连理工大学张大煜学院, 大连 116024

*通讯作者, E-mail: lihuazhang@dicp.ac.cn

收稿日期: 2021-04-13; 接受日期: 2021-06-07; 网络版发表日期: 2021-09-17

国家自然科学基金(编号: 21834006, 21725506)和国家重点基础研究发展计划(编号: 2016YFA0501401)资助项目

摘要 蛋白质组的深度覆盖分析可以全景式地呈现蛋白质的动态变化, 对于揭示疾病的发生发展机制以及发现新的药物靶点具有重要意义。样品制备是蛋白质组分析的重要环节, 其中蛋白质提取至关重要, 影响着蛋白质组定性定量的覆盖度。然而, 现有提取试剂对疏水性蛋白质溶解能力不够, 造成其在样品制备过程中损失严重。因此亟需发展对蛋白质, 尤其是疏水性蛋白质, 具有强溶解能力的提取试剂, 并同时需要确保和后续酶解以及液质联用分析的兼容性。近年来, 离子液体(ionic liquids, ILs)由于具有强溶解能力, 已逐渐被应用于单一蛋白质的溶解、提取、分离等, 并开始在复杂的蛋白质组样品制备中展露锋芒。本文系统总结了ILs辅助的样品制备方法在膜蛋白质组、全蛋白质组和蛋白质翻译后修饰分析方面的研究进展, 探索了ILs与蛋白质的相互作用机理, 并对其在蛋白质组分析中的应用前景进行了展望。

关键词 蛋白质组, 离子液体, 膜蛋白质组, 翻译后修饰, 生物学

1 引言

蛋白质组的深度覆盖分析可以系统地阐述蛋白质表达量的动态变化, 为深入研究蛋白质的功能, 进而揭示生命活动本质提供科学依据。蛋白质样品制备是蛋白质组分析的重要步骤, 影响着整个蛋白质组定性定量分析的覆盖度和准确度。然而, 由于膜蛋白质等疏水性蛋白质在样品制备过程中难以提取, 损失严重^[1,2], 因此发展具有强溶解能力的新型蛋白质提取溶

剂对于提高蛋白质组分析的覆盖度至关重要。

蛋白质的高效提取是样品制备的先决步骤。理想的蛋白质提取体系应满足三个条件: 对蛋白质的溶解性能好, 酶活兼容性好, 易去除、不影响后续的色谱分离及质谱鉴定^[3]。目前, 常见的蛋白质提取体系主要有尿素、十二烷基硫酸钠(SDS)、Rapigest等^[4]。其中, 尿素对大多数疏水蛋白质有较好的溶解能力, 但对含多个跨膜结构域的整合膜蛋白(integral membrane proteins, IMPs)的溶解能力差。此外, 当温度超过37℃时,

引用格式: Zheng S, Chu H, Zhao Q, Zhao B, Zhang L, Zhang Y. Advances of ionic liquids-based novel methods for proteomic sample preparation. *Sci Sin Chim*, 2021, 51: 1373–1381, doi: 10.1360/SSC-2021-0087

尿素对蛋白质的N端和赖氨酸残基的氨甲酰化作用加剧, 不利于蛋白质的鉴定^[5]. SDS对蛋白质的溶解能力好, 但其酶活兼容性差, 并且不易去除, 通常需要繁琐的洗脱步骤, 耗时且样品回收率低^[6]. Rapigest的酶解相容性好且质谱干扰小, 但低pH条件下易与蛋白质的疏水部分发生共沉淀, 导致疏水性肽段的损失^[7]. 因此亟需发展新型蛋白质提取体系, 以满足对蛋白质组的深度覆盖分析要求.

离子液体(ionic liquids, ILs)指由阴、阳离子组成, 在低温(低于100℃)条件下呈液态的熔融盐^[8]. 与传统有机溶剂相比, ILs具有熔点低、化学稳定性高、溶解能力强、结构可调等特性^[9,10]. Phillips等^[11]尝试将丝素蛋白溶解在氯化-1-乙基-3-甲基咪唑(BMIM Cl)中来提高蛋白质的溶解度, 开启了ILs在蛋白质溶解领域中的应用. Fujita等^[12]设计的水合胆碱磷酸二氢IL ([ch][dhp])对细胞色素C蛋白具有良好的溶解性, 并且溶解后蛋白质的活性位点和二级结构仍维持原状. 在此基础上, Fujita等^[13]进一步将[ch][dhp]用于在大肠杆菌中表达的聚合重组蛋白CcCel6A的直接溶解和接近天然状态的重新折叠, 为开发水合ILs辅助的聚合重组蛋白质复性方法奠定了基础. Cheng等^[14]报道了IL 1-丁基-3-三甲基硅咪唑六氟磷酸盐(BtmsimPF₆)对血红蛋白的选择性提取. 在没有任何共存添加剂/萃取剂的情况下, 实现了100 ng L⁻¹及以下浓度水平的血红蛋白的定量提取. Zeng等^[15]建立了一种基于四甲基胍丙烯酸酯类ILs和磷酸氢盐溶液的双相体系提取蛋白质的方法. 在最佳工艺条件下, 该体系对牛血清白蛋白的提取效率可达99.6243%. 尽管上述研究仅局限于ILs对单一蛋白质的提取和构象保持, 但已初步显示出ILs在生物大分子研究领域的应用前景.

本文总结了本课题组发展的基于ILs的蛋白质组样品制备方法及其在蛋白质组深度覆盖分析中的应用. 此外, 还阐述了ILs与蛋白质相互作用的机理, 并对这一研究领域面临的挑战及未来发展方向进行了展望.

2 ILs辅助的膜蛋白质组样品制备方法

膜蛋白质是生物膜功能的主要执行者, 与细胞交流、离子转运、信号传导等多种生物过程相关. 在药物研发领域, 有超过60%的药物靶点为膜蛋白质^[16].

因此, 开展膜蛋白质组的深度覆盖分析对于揭示疾病的发生机制和发现新的药物靶点具有重要意义. 然而, 由于膜蛋白质疏水性强, 提取效率低, 严重制约了膜蛋白质组的研究进程. 因此, 发展提取效率高、酶解兼容性好以及不干扰质谱联用分析的样品制备方法, 是实现膜蛋白质组深度覆盖分析的关键.

本课题组在国际上率先提出基于ILs的膜蛋白质组样品制备策略^[4]. 使用1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐(BMIM BF₄)辅助碳酸氢铵溶液(pH 8.3)提取大鼠脑组织中的整合膜蛋白(IMP), 并与常见的蛋白质样品制备方法进行了比较. 其中, 与基于Rapigest和尿素的提取方法相比, 采用BMIM BF₄提取法鉴定出的IMP数量分别提高了25%和80%; 与SDS和甲醇制备法相比, IMPs的鉴定数目提高了3倍以上, 显示出BMIM BF₄在膜蛋白质组分析方面的应用潜力. 为了进一步提高膜蛋白质的鉴定能力, Zhao等^[17]通过优化BMIM BF₄辅助提取的膜蛋白质分离的条件, 提出了基于弱保留的C8色谱柱分离方式, 相较于传统的C18色谱柱, 将鉴定出的疏水性多肽数量提高了29%.

为确保基于自下而上分析策略的蛋白质组分析的覆盖度, 理想的蛋白质提取体系应兼具优异的蛋白质溶解性能和酶活兼容性. 因此, Zhao等^[18]考察了不同结构的ILs对膜蛋白质溶解性能和胰蛋白酶活性的影响. 首先测定了具有7个跨膜区的蛋白质——细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)在不同阴离子(Cl⁻、Br⁻、BF₄⁻、Ac⁻、SO₃CF₃⁻)和不同烷基链长度(C4、C8、C12)的咪唑类ILs中的溶解度. 结果发现, 氯化-1-十二烷基-3-甲基咪唑(C12Im-Cl)对BR的溶解性能最好, 其对BR的相对溶解度是BMIM BF₄的7倍. 通过进一步考察C12Im-Cl的酶活兼容性发现, 与SDS和甲醇等常见的提取体系相比, C12Im-Cl提取体系中胰蛋白酶的活性最高(图1), 说明C12Im-Cl提取体系兼具优异的蛋白质溶解性能和酶活兼容性, 有望成为蛋白质样品制备的新型提取体系. Sui等^[19]针对软骨蛋白质组分析时高丰度蛋白多糖干扰严重的问题, 将C12Im-Cl用于鹿茸软骨膜蛋白质的提取. 结果发现, 与Vincourt等^[20]开发的氯化十六烷基吡啶(CPC)提取法相比, 采用C12Im-Cl提取法鉴定的膜蛋白质数量是CPC法的2.4倍(663 vs. 279). Fang等^[21]为降低高丰度蛋白质对低丰度膜蛋白质的抑制作用, 提高膜蛋白质的鉴定覆盖率, 发展了基于C12Im-Cl辅助的顺序提取的膜蛋白质原位分级

方法(图2). 通过依次使用具有不同溶解能力的提取试剂, 可降低所提取蛋白质组分的复杂程度, 进而显著提

图1 (a) C12Im-Cl体系与常见蛋白质提取体系溶解能力比较; (b) C12Im-Cl体系与常见蛋白质提取体系对胰蛋白酶活性影响比较^[18] (网络版彩图)

Figure 1 Comparison of the solubility (a) and the effect on trypsin activity (b) of C12Im-Cl and common protein extraction systems ^[18] (color online).

图2 基于C12Im-Cl辅助的顺序提取膜蛋白质原位分级分析方法流程图^[21] (网络版彩图)

Figure 2 Flowchart of *in-situ* fractional analysis method for sequentially extracted membrane proteins based on C12Im-Cl ^[21] (color online).

高低丰度膜蛋白质的鉴定能力, 实现HeLa细胞中5553个膜蛋白质(对应4419个基因)和2573个整合膜蛋白质(对应2183个基因)的高覆盖度鉴定, 是目前HeLa细胞系最为全面的膜蛋白质组数据集.

综上, 基于ILs的膜蛋白质组提取体系不仅具有很强的溶解能力, 还具有与后续酶解和质谱分析的兼容性, 可以实现具有强疏水性的膜蛋白质的规模化分析. 目前, 虽然膜蛋白质组的深度覆盖分析取得了一定的进展, 但是现有的方法是基于目前商品化ILs进行筛选的. 在深入开展理论研究的基础上, 如果能对ILs进行理性设计合成, 有望进一步提高膜蛋白质组分析的覆盖度.

3 ILs在全蛋白质组深度覆盖分析中的应用进展

鉴于ILs在膜蛋白质组提取上的优势, 将其进一步应用于全蛋白质组深度覆盖分析, 对于绘制完整的蛋白质组图、揭示生命活动的本质具有重要意义.

Zhao等^[22]结合前期开发的顺序提取策略, 将C12Im-Cl与常规的8M尿素提取体系相结合, 用于HeLa细胞全蛋白质组的深度覆盖分析. 结果显示, C12Im-Cl提取步骤可以回收8M尿素提取时丢失的强疏水性、低丰度膜蛋白质, 可降低高丰度蛋白的抑制作用, 提高蛋白质组的鉴定覆盖率(图3). 采用该方法共鉴定出11313个蛋白质(对应9810个基因), 丰度跨越8个数量级, 显著优于Mann课题组^[23]基于SDS的滤膜辅助样品预处理方法(FASP)的鉴定结果(10255个蛋白质, 对应9207个基因). 鉴于C12Im-Cl在蛋白质高效提取方面的突出优势, Zhao等^[24]进一步发展了基于C12Im-Cl的滤膜原位样品处理方法(*i*-FASP), 实现了微量HeLa细胞(1000个)中3329±41 ($n=3$)个蛋白质的高效鉴定. 由于低浓度C12Im-Cl对胰蛋白酶具有优良的兼容性, 并且酶解后无需额外的脱盐步骤, 减少了多次洗脱造成的样品损失. 因此, *i*-FASP法的样品制备时间比FASP法缩短了约4 h (图4a, b), 同时蛋白质的鉴定数目提高了53%, 为实现高通量的蛋白质组规模化分析提供了技术支持. 进而, 该方法被成功用于人肝癌和癌旁组织样品的无标定量分析, 发现了NES、CAP1等与肝癌转移密切相关的关键靶标分子.

同工酶是分子结构不同但催化相同反应的酶^[25], 同工酶的准确鉴定对于实现全蛋白质组的深度覆盖分

图3 C12Im-Cl对于强疏水性和低丰度蛋白质的分析性能示意图(插图为DPY19L4、SLC35A3和ALG10的拓扑结构)^[22] (网络版彩图)

Figure 3 Schematic diagram of analytical performance of C12Im-Cl for highly hydrophobic and low abundance proteins (The insets displayed the topological structure of DPY19L4, SLC35A3, and ALG10) ^[22] (color online).

图4 基于C12Im-Cl的滤膜原位样品处理方法(*i*-FASP)的流程图(a)及其与FASP方法的比较(b)^[24] (网络版彩图)

Figure 4 Flowchart of C12Im-Cl based filter-aided sample preparation (*i*-FASP) (a) and comparison with FASP method (b) ^[24] (color online).

析具有重要意义。细胞色素P450酶(CYPs)和尿苷二磷酸葡萄糖醛酸酰基转移酶(UGTs)是哺乳动物体内常见的两类同工酶, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离和凝胶内酶解是其常用的预处理策略^[26]。然而, SDS的酶活兼容性差, 且干扰后续质谱分析, 凝胶内酶解不利于肽段的回收, 影响CYPs和UGTs的鉴定准确性。针对这一问题, Sun等^[27]使用基于BMIM BF₄提取体系的样品制备方法对人肝微粒体蛋白质组

进行分析, 共鉴定出27个CYPs和12个UGTs。该结果中展示出的高平均序列覆盖率(30.99%、25.07%)和特异肽段匹配数(7、4)使得序列相似性为91%的同工酶CYP2C9与CYP2C19也被成功区分, 保证了CYPs、UGTs同工酶之间的可靠识别。

此外, Liu等^[28]开发了一种基于C12Im-Cl的溶液快速消解法, 并将其成功应用于福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)的肝癌组织切片中蛋白质的提取和快速酶解。与传统的FASP法相比, 该方法的蛋白质酶解时间大大缩短(仅需1 h), 并且鉴定出的蛋白质和肽段数量与FASP法基本接近, 显示出该方法在FFPE组织的蛋白质组分析中的潜在应用价值。Taoka等^[6]建立了一种将IL辅助提取蛋白质与基于微珠的有机介质辅助蛋白质酶解策略(BOPs)联合的聚合蛋白质组样品制备方法。该方法使用IL 1-丁基-3-甲基咪唑硫氰酸([bmim][SCN])辅助提取fer-15突变的衰老线虫中沉积的不溶性聚合蛋白质, 共鉴定出176个蛋白质, 其中包含12个跨膜蛋白质, 高于70%甲酸提取剂的鉴定结果(2个跨膜蛋白质), 显示出[bmim][SCN]在疏水蛋白质提取方面的优势。基于ILs与蛋白质结合后的荧光淬灭现象, Chen等^[29]利用咪唑类ILs-CdTe量子点(QDs)偶联物作为半选择性受体, 建立了IL@QDs/QDs荧光传感阵列系统。该检测系统可实现人尿液中6种蛋白质的准确区分, 在生物样品中蛋白质的准确鉴别方面具有良好的应用前景。

由此可见, ILs作为新型蛋白质提取体系, 展示出在全蛋白质组的深度覆盖分析方面的突出优势。然而, 目前基于ILs的提取体系用于全蛋白质组分析仍处于初期阶段, 仍有待在食品安全、环境毒理、司法鉴定等诸多领域不断拓展应用。

4 ILs在蛋白质翻译后修饰深度覆盖分析中的应用进展

蛋白质翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)是指蛋白质在核糖体中完成翻译后, 在其侧链或主链上发生的化学变化^[30], 对蛋白质的结构和功能至关重要。蛋白质的翻译后修饰在生物体内时刻都在发生, 并且种类多样, 但由于其丰度低, 因此在进行样品分析时易受高丰度蛋白质的干扰。本课题组将前期发展的基于ILs的蛋白质样品预制备方法用于蛋

白质组的PTMs分析, 提高了分析的覆盖度.

蛋白质糖基化修饰作为生物体内最常见的翻译后修饰之一, 与分子识别、受体激活、信号转导等多种生物进程有关^[31]. Qiao等^[32]建立了基于BMIM BF₄的鼠脑N-糖基化蛋白质组鉴定策略, 成功鉴定出462个非冗余N-糖蛋白, 其中包含316个跨膜糖蛋白. 在这462个糖蛋白中, 共识别出849个独特的N-糖苷, 其中267个糖基化位点之前尚未被报道过. 该方法为脑部N-糖基化修饰的深入研究, 特别是候选药物靶点和生物标志物的发现提供了技术支持.

此外, 基于ILs的蛋白质样品制备技术在磷酸化蛋白质组学研究中也得到了广泛的应用. 为确定蛋白磷酸酶2A (PP2A)在肝脏疾病发展中的调节作用, Chen等^[33]对采用C12Im-Cl辅助的顺序提取法对肝细胞特异性缺失Ppp2r1a基因(编码PP2A A α 亚基)的小鼠肝脏组织进行了磷酸化蛋白质组学分析, 共鉴定出351个与纤维化相关的磷酸化蛋白质, 其中有108个蛋白质之前未被报道过, 推测可能是参与肝纤维化起始的磷酸化蛋白质. 进一步的蛋白质组学和功能分析表明, PP2A缺失后表皮生长因子受(EGFR1)信号通路的异常调节是介导肝纤维化的关键. Li等^[34]则针对植物样品破壁困难, 蛋白质提取效率低, 开发了基于C12Im-Cl的大量植物样本制备方法, 并发展了基于双(三氟甲烷)磺酰亚胺锂((CF₃SO₂)₂NLi)进行离子交换介导的高效C12Im-Cl沉淀去除策略, 使得酶解得到的肽段与后续液相分离质谱鉴定相兼容(图5a). 与常用8M尿素提取方法相比, 该方法对烟叶组织的蛋白质提取能力提高了1.9倍(图5b). 结合固定化金属离子亲和层析(IMAC)的富集方法, 从10 mg烟叶样品中鉴定到14441条磷酸肽(5153个磷酸化蛋白质), 这是目前最为全面的烟草的磷酸化蛋白质数据集, 极大地推动了对植物磷酸化蛋白质功能的系统阐释.

综上所述, 基于ILs的蛋白质样品制备方法提高了蛋白质的提取效率, 保证了翻译后修饰蛋白质组的深度覆盖和精准定量分析.

5 ILs与蛋白质相互作用机理研究

ILs作为新型蛋白质提取体系, 受到越来越多的关注. 然而, 目前ILs与蛋白质的相互作用机理尚未明确. 由于ILs可通过调节阴、阳离子的种类进行组合, 可设

图5 (a) 基于C12Im-Cl辅助提取的植物组织磷酸化蛋白质分析方法; (b) 与现有提取体系对于烟草蛋白提取效率的比较^[34] (网络版彩图)

Figure 5 (a) Analysis method of plant tissue phosphorylated protein based on C12Im-Cl assisted extraction; (b) comparison of extraction efficiency of tobacco proteins with existing extraction systems ^[34] (color online).

计性强, 理论上可能的离子组合多达 10^{18} 种^[10]. 然而, 合成和纯化所有潜在的ILs难度巨大, 并且实验的测试范围有限, 难以完成规模如此庞大的ILs筛选. 因此, 本课题组试图通过分子模拟和理论计算来指导ILs的筛选, 并对ILs与蛋白质的相互作用机理进行了深入研究.

Zhao等^[18]考察了BR在几种不同阳离子/阴离子组合的ILs中的溶解度, 筛选出BR溶解效果最好的C12Im-Cl, 并揭示了以疏水相互作用为主导的IL溶解膜蛋白质的机理. 在此基础上, Fang等^[24]建立了分子动力学模拟系统, 模拟小分子与蛋白质之间的相互作用, 进一步阐明ILs对膜蛋白质溶解和胰蛋白酶活性保持的作用机制. 该系统模拟了BR与含不同阳离子基团的ILs的相互作用体系. 由表1的结果可知, IL的阳离子基团与BR的范德华能对总相互作用能的贡献最大, 说明ILs对BR的溶解能力主要取决于ILs的阳离子部分与BR的范德华相互作用. 根据不同烷基链长度的甲基咪唑氯IL与BR的相互作用能模拟结果, IL-BR体系的总相互作用能随烷基链的延长而增加, 当碳链长度增至

表 1 细菌视紫红质(BR)与含不同阳离子基团的ILs的相互作用能^[24]
Table 1 Interaction energies between the bacteriorhodopsin (BR) and various ionic liquids with different cation groups ^[24]

离子液体 ^{a)} (1%, w/v)	静电相互作用力 ([A] ⁺ -BR) (KJ/mol)	范德华能 ([A] ⁺ -BR) (KJ/mol)	静电相互作用力 ([Cl] ⁻ -BR) (KJ/mol)	范德华能 ([Cl] ⁻ -BR) (KJ/mol)	$E_{\text{ele+vdW}}$ ^{b)} (KJ/mol)
MTBA-Cl	-19.84	-683.69	-31.44	0.64	-734.33
MTBP-Cl	-33.23	-470.22	-34.48	0.07	-537.86
C12Im-Cl	-74.771	-744.038	-45.275	-0.159	-864.243
C12Py-Cl	-134.49	-687.45	-34.8	-0.11	-856.85

a) MTBA-Cl: 甲基三丁基氯化铵(methyltributylammonium chloride); MTBP-Cl: 甲基三丁基氯化磷(methyltributylphosphonium chloride); C12Im-Cl: 1-十二烷基-3-甲基咪唑氯(l-dodecyl-3-methylimidazolium chloride); C12Py-Cl: 1-十二烷基-3-甲基吡啶氯(l-dodecyl-3-methylpyridinium chloride); b) $E_{\text{ele+vdW}}$: BR与ILs的总相互作用能

12及以上时, 总相互作用能大小趋于稳定(图6), 证明了疏水相互作用是IL溶解蛋白质的主要作用力, 并成功筛选出水溶性好且对膜蛋白质溶解能力强的IL C12Im-Cl. 从BR-C12Im-Cl模拟体系的构象可以看出(图7), 吸附在BR表面的是C12Im-Cl的烷基链, 说明C12Im-Cl主要与膜蛋白质暴露的疏水氨基酸残基发生作用. 此外, 为阐明C12Im-Cl维持胰蛋白酶活性的内部机制, 该系统模拟了胰蛋白酶在水、C12Im-Cl和SDS中的构象. 结果发现, 胰蛋白酶溶解在水和C12Im-Cl体系中的构象与天然晶构相似, 并且C12Im-Cl体系中催化三联体的位置和取向也与天然晶体保持一致, 这解释了该种离子液体很好的酶活兼容性. 而当胰蛋白酶溶解在SDS中时, α 螺旋的位置发生了很大的变化, 严重影响酶的活性.

此外, Bisht等^[35]考察了新型胆碱二羧酸类ILs体系提高细胞色素C (Cyt c)催化活性及结构稳定性的作用机理. 根据胆碱二羧酸类ILs存在下Cyt c的近紫外圆二色光谱(250~300 nm)结果, 与在磷酸盐缓冲液(PBS)中相比, Cyt c特征吸收带的位置保持不变, 证明ILs体系不影响Cyt c的构象及辅基血红素铁的微环境. 分子对接分析结果表明, 二羧酸阴离子通过氢键作用和静电作用与Cyt c催化活性中心附近的氨基酸相互作用, 增强了Cyt c的催化活性. Sahoo等^[36]的研究进一步证明, 低浓度的氨基酸基ILs (胆碱脯氨酸浓度<10 mM、脯氨酸硝酸盐<1 mM)可通过阴阳离子的静电作用以及氨基酸阳离子的烷基链与Cyt c疏水氨基酸残基的疏水相互作用共同维持Cyt c的构象和稳定性. Song等^[37]使用胆碱氨基酸类([Ch][AA])ILs与聚丙二醇400 (PPG400)制备了新型双水相体系(ATPS)用于牛血清白蛋白(BSA)的提取. 研究表明, BSA在新型ATPS体系中

图 6 细菌视紫红质(BR)与不同烷基链长的甲基咪唑氯ILs的相互作用能(红色点代表烷基咪唑阳离子[CnIm]⁺与BR之间的范德华作用能, 蓝色点代表ILs与BR之间的总相互作用能)^[24] (网络版彩图)

Figure 6 Interaction energies between the bacteriorhodopsin (BR) and methylimidazolium chloride with different length of alkyl side chains (The Van der Waals force between [CnIm]⁺ and BR is shown in red spots, the interaction energies between ILs and BR is shown in blue spots) ^[24] (color online).

图 7 C12Im-Cl增溶膜蛋白机制的分子动力学模拟(BR显示为紫色, C12Im-Cl显示为青色)^[24] (网络版彩图)

Figure 7 Molecular dynamics simulation of the mechanism of C12Im-Cl solubilized membrane proteins (The bacteriorhodopsin is shown in violet, C12Im-Cl is shown in cyan) ^[24] (color online).

的分配行为受到蛋白质与体系组分之间疏水相互作用的影响, BSA对由疏水性较低的[AA]阴离子组成的富ILs相表现出更大的亲和力. 因此, 可以通过改变[AA]阴离子的种类来调节ILs的疏水性, 进而调节蛋白质在ATPS体系中的分配行为, 可实现对蛋白质的高效提取. 由以上分析可知, ILs与蛋白质的相互作用体系中可能存在氢键作用、静电作用以及疏水相互作用, 其中疏水相互作用的影响较大, 可以通过改变ILs的结构调节相互作用的强弱, 有望实现蛋白质的高效提取.

综上, 通过分子动力学模拟系统的建立, 可以探索IL与蛋白质的相互作用机理, 进而指导阴阳离子的结构设计和性质优化, 设计合成新型ILs, 同时结合实验考察新型ILs体系提取蛋白质的可行性, 必将极大地推动蛋白质组, 尤其是质膜蛋白质组的深度覆盖定性和定量分析.

6 基于ILs提取的蛋白质组分析在生物医学方面的应用进展

近年来, 蛋白质组分析极大地推动了生物医学领域的研究进程. 通过对比生物体在正常及病理状态下的蛋白质组信息, 可以为全面揭示疾病发生机制、药物靶点发现、耐药机制研究等提供重要的理论支撑及技术支持.

Sun等^[38]利用基于C12Im-Cl提取体系的膜蛋白质深度覆盖定量分析新方法, 结合二甲基化标记定量对肝癌5-氟尿嘧啶耐药细胞株Bel/5Fu和敏感细胞株Bel7402进行蛋白质组定量分析, 发现103个差异表达蛋白, 其中膜蛋白质EPHX1与Bel/5Fu细胞耐药密切相关. 进一步研究发现下调EPHX1蛋白表达可以降低肝癌的化疗耐药性. Chu等^[39]为深入了解肝癌细胞索拉非尼耐药的潜在机制, 采用本课题组发展的基于C12Im-Cl的*i*-FASP蛋白质样品预处理技术, 对肝癌细胞株Huh7及其耐药细胞株Huh7-R进行定量蛋白质组学分析, 共发现89个显著差异表达蛋白质, 其中膜蛋白质叶酸受体 α (FOLR1)的表达在耐药细胞中显著上调. 进一步的生物学实验结果表明, FOLR1通过诱导自噬作用驱动肝癌细胞产生耐药性, 为揭示肝癌索拉非尼耐药机制提供了新的见解. Wang等^[40]同样采用*i*-FASP提取体系研究了肝癌细胞HepG2及其索拉非尼耐药细胞株HepG2-R之间的差异表达蛋白质, 发现微粒体谷

胱甘肽s-转移酶1 (MGST1)的下调可以降低HepG2-R细胞对索拉非尼的耐药性, 有望成为治疗肝癌细胞索拉非尼耐药的新靶点.

Liu等^[41]将C12Im-Cl用于肺癌上皮-间质转化(EMT)过程中蛋白质的高效提取, 并对转化生长因子 β (TGF- β)诱导的肺腺癌A549细胞株EMT过程相关的蛋白质进行定量分析, 定量到7206个蛋白质, 其中有368个差异表达蛋白质. 通过功能分析发现, 这些蛋白质参与了细胞骨架重组、细胞黏附与迁移等多种与EMT相关的调控过程. 因此, 基于ILs的提取体系可实现蛋白质的动态变化深度覆盖分析, 有助于发现潜在的关键蛋白质, 为药物开发和医学诊断提供新思路.

血液透析是尿毒症患者最重要的治疗方法之一, 然而伴随血液透析治疗的各种并发症影响了患者的预后, 威胁着患者的生命. Yang等^[42]利用C12Im-Cl辅助的蛋白质样品制备的方法对血液透析膜进行预处理. 对吸附蛋白的定性、定量分析结果表明, 吸附在透析膜上的蛋白质与补体活化、血液凝固、白细胞相关的生物过程有关, 进而推测透析膜上吸附的蛋白质是导致血液透析并发症的关键因素之一. Han等^[43]进一步应用C12Im-Cl辅助的蛋白质样品制备方法分析了相同材料、不同通量的两种商品化透析膜上吸附的蛋白质组, 并对比了两组蛋白质在等电点、分子量和蛋白质类别上的差异. 该研究为透析膜的生物相容性评价提供了一种有效的方法.

鉴于ILs在蛋白质提取方面的优势, 相信随着研究的深入, 基于ILs提取的蛋白质组分析方法将在生物医学领域具有很好的应用前景.

7 总结与展望

由于现有的蛋白质提取体系难以兼顾蛋白质的溶解度、酶活以及色质联用的兼容性, 因此, 发展新型蛋白质提取体系十分重要. 鉴于ILs溶解性能好、结构可调等优点, 本课题组发展了多种基于ILs的蛋白质样品制备方法, 推动了深度覆盖的膜蛋白质组、全蛋白质组学以及翻译后修饰蛋白质组学的研究, 并且为药物研发、疾病诊疗等生物医学领域提供了技术支持. 此外, 采用分子模拟和理论计算的方法可以阐明ILs与蛋白质的相互作用机理, 为设计合成新型ILs奠定了基础.

然而, 基于ILs的蛋白质组学研究仍面临着诸多挑战. 首先, 目前ILs与蛋白质的相互作用机理的研究覆盖范围还不够广泛, ILs与不同类蛋白质之间的作用机理是否存在特异性还需进一步验证^[3]. 其次, 在蛋白质组学研究领域, ILs的设计主要集中在如何提高对不同蛋白质的溶解效率, 针对ILs对特定性质蛋白质是否存在提取偏好的研究却鲜有报道. 此外, 现阶段基于ILs的提取体系主要应用于蛋白质组的深度覆盖分析方面, 而在蛋白质相互作用复合体方面的研究还尚无涉及.

在后续研究中, 我们将继续利用分子动力学模拟等技术, 深入研究ILs与不同类型蛋白质之间的相互作用机理, 设计新型ILs用于靶向蛋白质组学研究, 拓展ILs的应用范围. 此外, 在理论指导下, 构建基于ILs的新型蛋白质复合体提取体系, 在保持其结构稳定的前提下提高其提取效率, 实现蛋白质复合体的精准解析. 我们深信, 随着研究的深入, 会有更多性能优异的ILs被发现, 相应的蛋白质提取策略也将更加完善, 进一步推动蛋白质组学从简单到复杂, 从定性定量分析到蛋白质相互作用网络的发展.

参考文献

- 1 Shevchenko G, Musunuri S, Wetterhall M, Bergquist J. *J Proteome Res*, 2012, 11: 2441–2451
- 2 Brown KA, Tucholski T, Alpert AJ, Eken C, Wesemann L, Kyriasilis A, Jin S, Ge Y. *Anal Chem*, 2020, 92: 15726–15735
- 3 Zhao Q, Chu H, Zhao B, Liang Z, Zhang L, Zhang Y. *TrAC Trends Anal Chem*, 2018, 108: 239–246
- 4 Sun L, Tao D, Han B, Ma J, Zhu G, Liang Z, Shan Y, Zhang L, Zhang Y. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399: 3387–3397
- 5 Betancourt LH, Sanchez A, Pla I, Kuras M, Zhou Q, Andersson R, Marko-Varga G. *J Proteome Res*, 2018, 17: 2556–2561
- 6 Taoka M, Horita K, Takekiyo T, Uekita T, Yoshimura Y, Ichimura T. *Anal Chem*, 2019, 91: 13494–13500
- 7 Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. *J Proteome Res*, 2008, 7: 731–740
- 8 Egorova KS, Gordeev EG, Ananikov VP. *Chem Rev*, 2017, 117: 7132–7189
- 9 Ventura SPM, e Silva FA, Quental MV, Mondal D, Freire MG, Coutinho JAP. *Chem Rev*, 2017, 117: 6984–7052
- 10 Trujillo-Rodríguez MJ, Nan H, Varona M, Emaus MN, Souza ID, Anderson JL. *Anal Chem*, 2019, 91: 505–531
- 11 Phillips DM, Drummy LF, Conrady DG, Fox DM, Naik RR, Stone MO, Trulove PC, De Long HC, Mantz RA. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 14350–14351
- 12 Fujita K, Ohno H. *Biopolymers*, 2010, 93: 1093–1099
- 13 Fujita K, Kajiyama M, Liu Y, Nakamura N, Ohno H. *Chem Commun*, 2016, 52: 13491–13494
- 14 Cheng D, Chen X, Shu Y, Wang J. *Talanta*, 2008, 75: 1270–1278
- 15 Zeng Q, Wang Y, Li N, Huang X, Ding X, Lin X, Huang S, Liu X. *Talanta*, 2013, 116: 409–416
- 16 Verkman AS, Anderson MO, Papadopoulos MC. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13: 259–277
- 17 Zhao Q, Sun L, Liang Y, Wu Q, Yuan H, Liang Z, Zhang L, Zhang Y. *Talanta*, 2012, 88: 567–572
- 18 Zhao Q, Fang F, Liang Y, Yuan H, Yang K, Wu Q, Liang Z, Zhang L, Zhang Y. *Anal Chem*, 2014, 86: 7544–7550
- 19 Sui Z, Weng Y, Zhao Q, Deng N, Fang F, Zhu X, Shan Y, Zhang L, Zhang Y. *Talanta*, 2016, 161: 541–546
- 20 Vincourt JB, Lionneton F, Kratassiouk G, Guillemin F, Netter P, Mainard D, Magdalou J. *Mol Cell Proteom*, 2006, 5: 1984–1995
- 21 Fang F, Zhao Q, Li X, Liang Z, Zhang L, Zhang Y. *Anal Chim Acta*, 2016, 945: 39–46
- 22 Zhao Q, Fang F, Shan Y, Sui Z, Zhao B, Liang Z, Zhang L, Zhang Y. *Anal Chem*, 2017, 89: 5179–5185
- 23 Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, Cox J, Kircher M, Kelso J, Pääbo S, Mann M. *Mol Syst Biol*, 2011, 7: 548
- 24 Fang F, Zhao Q, Chu H, Liu M, Zhao B, Liang Z, Zhang L, Li G, Wang L, Qin J, Zhang Y. *Mol Cell Proteom*, 2020, 19: 1724–1737
- 25 Markert CL, Möller F. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1959, 45: 753–763
- 26 Seibert C, Davidson BR, Fuller BJ, Patterson LH, Griffiths WJ, Wang Y. *J Proteom Res*, 2009, 8: 1672–1681
- 27 Sun L, Zhang Y, Tao D, Zhu G, Zhao Q, Wu Q, Liang Z, Yang L, Zhang L, Zhang Y. *Proteomics*, 2012, 12: 3464–3469
- 28 Liu C, Si X, Yan S, Zhao X, Qian X, Ying W, Zhao L. *Anal Methods*, 2021, 13: 776–781
- 29 Chen S, Wei L, Chen XW, Wang JH. *Anal Chem*, 2015, 87: 10902–10909
- 30 Kokkinidis M, Glykos NM, Fadoulglou VE. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2020, 122: 97–125

- 31 Ohtsubo K, Marth JD. *Cell*, 2006, 126: 855–867
- 32 Qiao X, Tao D, Qu Y, Sun L, Gao L, Zhang X, Liang Z, Zhang L, Zhang Y. *Proteomics*, 2011, 11: 4274–4278
- 33 Chen L, Guo P, Li W, Fang F, Zhu W, Fan J, Wang F, Gao Y, Zhao Q, Wang Q, Xiao Y, Xing X, Li D, Shi T, Yu D, Aschner M, Zhang L, Chen W. *Hepatology*, 2021, 73: 1551–1569
- 34 Li Y, Fang F, Sun M, Zhao Q, Hu Y, Sui Z, Liang Z, Zhang L, Zhang Y. *Talanta*, 2020, 213: 120848
- 35 Bisht M, Mondal D, Pereira MM, Freire MG, Venkatesu P, Coutinho JAP. *Green Chem*, 2017, 19: 4900–4911
- 36 Sahoo DK, Jena S, Tulsian KD, Dutta J, Chakrabarty S, Biswal HS. *J Phys Chem B*, 2019, 123: 10100–10109
- 37 Song CP, Ramanan RN, Vijayaraghavan R, MacFarlane DR, Chan ES, Ooi CW. *ACS Sustain Chem Eng*, 2015, 3: 3291–3298
- 38 Sun R, Dong C, Li R, Chu H, Liu J, Hao D, Zhang L, Zhao B, Wang L, Zhang Y. *Prot Clin Appl*, 2020, 14: 1900080
- 39 Chu H, Wu C, Zhao Q, Sun R, Yang K, Zhao B, Liu Y, Liang Z, Zhong S, Zhang L, Zhang Y. *Curr Alzheimer Rescinnogenesis*, 2021, 42: 753–761
- 40 Wang ZX, Chu HW, Yang KG, Zhao BF, Liang Z, Zhang LH, Zhang YK. *J Anal Test*, 2021, doi: 10.1007/s41664-021-00176-x
- 41 Liu J, Zhou Y, Shan Y, Zhao B, Hu Y, Sui Z, Liang Z, Zhang L, Zhang Y. *Anal Chem*, 2019, 91: 3921–3928
- 42 Yang K, Liu J, Sun J, Zhou Y, Zhao Q, Li S, Liu L, Zhang L, Zhao J, Zhang Y. *Sci Bull*, 2017, 62: 1251–1255
- 43 Han S, Yang K, Sun J, Liu J, Zhang L, Zhao J. *Prot Clin Appl*, 2017, 11: 1700079

Advances of ionic liquids-based novel methods for proteomic sample preparation

Shiying Zheng^{1,2}, Hongwei Chu^{1,3}, Qun Zhao^{1,2}, Baofeng Zhao^{1,2}, Lihua Zhang^{1,2*}, Yukui Zhang^{1,2,3}

¹ CAS Key Laboratory of Separation Sciences for Analytical Chemistry, National Chromatographic R.&A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ Zhang Dayu School of Chemistry, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

*Corresponding author (email: lihuazhang@dicp.ac.cn)

Abstract: In-depth coverage analysis of proteome can detect the dynamic changes of protein expression in a panoramic view, which is of great significance for revealing the mechanisms of disease occurrence and development to discover new drug targets. Sample preparation is the prerequisite for proteomic analysis, in which protein extraction is crucial and affects the coverage of qualitative and quantitative analysis for proteome. However, the existing extraction reagents have insufficient dissolution ability for hydrophobic proteins, resulting in serious losses during sample preparation. Therefore, it is urgent to develop extraction reagents with strong dissolution ability for proteins, especially for hydrophobic proteins, and at the same time with good compatibility to subsequent enzymatic hydrolysis and liquid chromatography-mass spectrometry analysis. Recently, due to the strong dissolution ability, ionic liquids (ILs) have gradually been used for dissolving, extracting, and separating individual proteins. ILs have also shown their advantages in the preparation of complex proteomic samples, demonstrating excellent proteome extraction performance. Herein, we systematically summarize the IL-based sample preparation methods for membrane proteome, whole proteome and post-translational modification proteome and further explore the interaction mechanism between ILs and proteins. The wide application of ILs in proteomic analysis is also prospected in this review.

Keywords: proteome, ionic liquids, membrane proteome, post-translational modification, biomedicine

doi: [10.1360/SSC-2021-0087](https://doi.org/10.1360/SSC-2021-0087)