

应用 ECD 和 CAD 解离技术快速分析与鉴定

骨桥蛋白中的多肽片段

石磊, 蒋鑫萍, 孙燕群, 张学良, 王光宇, 刘潇阳, 段芳芳

(吉林大学公共卫生学院, 吉林 长春 130021)

Rapid Analysis and Identification of the Polypeptide Fragmentations of Osteopontin by ECD & CAD Dissociation

SHI Lei, JIANG Xin-ping, SUN Yan-qun, ZHANG Xue-liang,
WANG Guang-yu, LIU Xiao-yang, DUAN Fang-fang

(College of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: FT-ICR-MS technology was significantly improved its sensitivity and dynamic range, enabling the detection and different fragmentations of peptides and proteins at lower and lower levels. For each peptide selected for MS/MS, two data-files were generated, one for ECD and another one for CAD. They were merged and could be complementary as described and submitted to the Mascot search engine using the protein database. These thresholds ensure almost 100% statistical confidence in the peptide identification. It shows that nano-spray HPLC combined with FT-ICR-MS can be used as an efficient method on polypeptide fragments of OPN.

Key words: ECD; CAD; osteopontin (OPN); polypeptide fragmentations

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2008) 增刊-215-02

傅立叶变换离子回旋共振质谱 (FT-ICR-MS), 以其超高分辨率、超高灵敏度以及高扫描速度等技术优势^[1-2], 广泛地应用到生物大分子的研究中^[3-4]。在目前蛋白质的研究方法中, “Top Down”是在蛋白水平上鉴定和研究蛋白质, 将完整的蛋白质分子离子有效地解离以获得蛋白质和翻译后修饰等结构信息^[5]。而“Bottom Up”是在多肽水平上鉴定和研究蛋白质, 先将蛋白质酶解成多肽片段后再进行分析。FT-ICR-MS 可以利用多重独特的裂解技术, 如碰撞活化解离 (Collisional Activated Dissociation, CAD), 以及电子捕获解离 (Electron Capture Dissociation, ECD), 获得蛋白质酶解后多肽离子的碎片。ECD 不仅可以优先断裂 S—S 和 N—C_α键, 而且还可以对修饰进行定位^[6-8]。根据多肽碎片命名规则并结合 ECD 和 CAD 两种解离机理上的互补性规律, 获得可靠的蛋白质酶解片段解离机理信息^[9-10], 从而更好地确定蛋白质修饰位点及其类型。

1 试验部分

1.1 仪器和试剂

傅立叶变换离子回旋共振质谱仪 (7.0 T FT-ICR-MS): 美国 Finnigan 公司产品; 高效液相色谱: 美国 Waters 公司产品。胰蛋白酶、柠檬酸铵、乙氰等: Sigma 公司产品。

纯化后, 骨桥蛋白样品经酶解后, 利用 Nano-spray 技术, 获得样品的 FT-ICR-MS 质谱图。

2 结果与讨论

电喷雾离子化 (Electrospray Ionization, ESI) 技术, 特别是其中 Nanoelectrospray 技术的引入, 使高分辨率、高质量精度的 FT-ICR-MS 可以分析极微量的生物样品。采用 “Bottom-Up” 并结合

基金项目: 吉林省科技厅白求恩医学专项 (200705391) 资助

作者简介: 石磊 (1968~), 女 (汉族), 吉林长春人, 副教授, 博士, 药物化学专业。E-mail: shilei@ciac.jl.cn

HPLC 等方法、利用 FT-ICR-MS 串联质谱(MS/MS 或 MSⁿ)、母离子的活化采取碰撞激发解离(CAD)和电子捕获诱导解离(ECD)的方式,根据多肽碎片命名规则(图1)以及CAD的C—N肽键断裂和ECD的N—C_α断裂在解离机理上的互补性规律(图2),借助 Mascot 软件数据库将所获得的质谱图进行分析,得到其相关肽片段的质谱信息。分析了 OPN 蛋白中有代表性的双电荷离子为 m/z 483.26 (GDSVVYGLR 肽段,图3)的CAD和ECD的质谱解离规律。

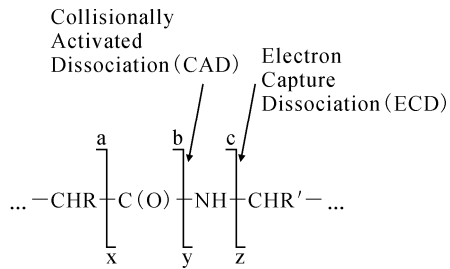


图1 多肽碎片命名规则

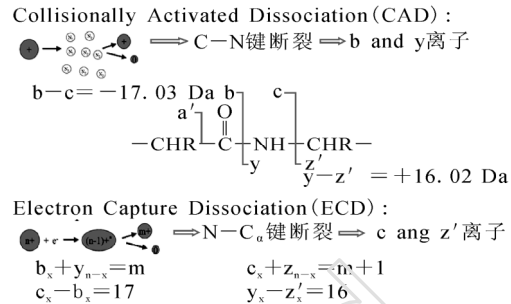


图2 多肽碎片互补裂解机理

Fig. 1 Peptide fragment nomenclature

Fig. 2 Complementary fragment techniques of CAD&ECD

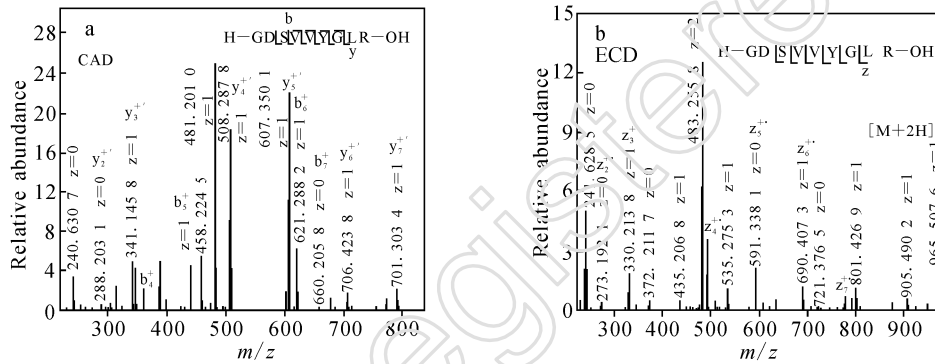


图3 多肽片段 GDSVVYGLR 的 FT-ICR-MS 谱图 (a: CAD 质谱图; b: ECD 质谱图)

Fig. 3 FT-ICR mass spectra of peptide fragment GDSVVYGLR (A: CAD; B: ECD spectrum)

参考文献:

- [1] COMISAROW M B, MAPSHALL A G. Selective-phase ion cyclotron resonance spectroscopy[J]. Chem Phys Lett, 1974, 25: 282-283.
- [2] COOPER H J, HUDGINS R R, HAKANSSON K, et al. Characterization of amino acid side chain losses in electron capture dissociation[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2002, 13: 241-249.
- [3] ZUBAREV R A. Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2003, 22: 57-77.
- [4] ZUBAREV R A, KELLEHER N L, MCLAFFERTY F W. Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. a nonergodic process[J]. Journal of the American Chemical Society, 1998, 120(13): 3 265-3 266.
- [5] HORN D M, GE Y, MCLAFFERTY F W. Activated ion electron capture dissociation for mass spectral sequencing of large(42 kDa) proteins[J]. Analytical Chemistry, 2000, 72(20): 4 778-4 784.
- [6] LOO J A, EDMONDS C G, UDSETH H R, et al. Analytical Chemistry, 1990, 62: 693-698.
- [7] ZUBAREV R A, KRUGER N A, FRIDRIKSSON E K, et al. Electron capture dissociation of gaseous multiply-charged proteins is favored at disulfide bonds and other sites of high hydrogen atom affinity[J]. Journal of the American Chemical Society, 1999, 121(12): 2 857-2 862.
- [8] ZUBAREV R A, HORN D M, FRIDRIKSSON E K, et al. Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations[J]. Analytical Chemistry, 2000, 72: 563-573.