

傅立叶变换-离子回旋共振质谱法在蛋白质分析中的应用

刘晗青, 郭寅龙*

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032)



[作者简介]: 刘晗青, 2001 年毕业于中国药科大学, 2001 级中科院上海有机化学研究所分析化学专业硕士研究生。主要进行生物质谱方向的研究。在郭寅龙研究员的指导下, 进行生物样品微量分析的高灵敏间歇电喷雾方法学研究, 在《化学学报》等刊物上发表论文两篇。

摘要: 对傅立叶变换-离子回旋共振质谱 (FT/ICRMS) 的仪器特点及 FT/ICRMS 在研究蛋白质结构鉴定、蛋白质翻译后修饰和蛋白组学中的应用等方面进行了综述和讨论。给出参考文献 45 篇。

关键词: 质谱学; 蛋白质分析; 综述; 傅立叶变换-离子回旋共振质谱 (FT/ICRMS)

中图分类号: O 657. 63; Q 512. 7 文献标识码: A
文章编号: 1004-2997(2003)02-363-07

1 傅立叶变换-离子回旋共振质谱的仪器特点

傅立叶变换-离子回旋共振质谱法 (FT/ICRMS) 是离子回旋共振波谱法与现代计算机技术相结合的产物。傅立叶变换-离子回旋共振质谱法是基于离子在均匀磁场中的回旋运动, 离子的回旋频率、半径、速度和能量是离子质量和离子电荷及磁场强度的函数, 当对离子施加与其回旋频率相同的射频场作用时, 离子将同相位加速至一较大的半径回旋, 从而产生可被接受的类似电流的信号。傅立叶变换-离子回旋共振质谱法所采用的射频范围覆盖了欲测定的质量范围, 所有离子同时被激发, 所检测的信号经过傅立叶变换, 转换为质谱图。

傅立叶变换-离子回旋共振质谱仪的优点十分突出^[1], 主要优点如下:

(1) 容易获得高分辨率。FT/ICRMS 的分辨率在一个较宽的质荷比范围内极高, 远远超过其

它类型的质谱仪^[2]。在一定的频率范围内, 只要在足够长的时间内进行采样, 均可获得高分辨数据, 这样就能获得高的质量准确性^[3~5]。用 FT/ICRMS 可得到精度很高的精确质量数, 这对于得到离子的元素组成是很重要的。Schurch 等^[6]用 N-羧基苯邻二甲酰亚胺标记, 鉴于 FT/ICRMS 的高分辨率, 鉴定肽段时质量误差仅为 0.003 D。Kelleher 等^[7]根据 FT/ICRMS 的高分辨率, 设计不用色谱分离直接鉴定出 CH₃/CD₃-标记的肽的方法;

(2) 便于实现串联质谱分析。可完成多级 (时间上) 串联质谱的操作, 由于它可提供高分辨的数据, 因而信息量更丰富。多级串联质谱中采用碰撞诱导解离 (Collision-induced dissociation, CID) 技术, 将待分析的多肽离子在碰撞阱中分离, 选中合适的离子碎成碎片, 并记录片段的离子谱图。理论上, 任何一个多肽的 CID 谱包含了鉴定该蛋白质足够的信息^[8,9] (主要指低碰撞能

收稿日期: 2002-11-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20175034)

作者简介: 作者简介: 刘晗青 (1979~), 女 (汉族), 江苏省常州市人, 硕士研究生, 分析化学专业

* 通讯作者: 郭寅龙 (1962~), 男 (回族), 博士, 研究员, 分析化学专业, E-mail: ylguo@pub.sioc.ac.cn



的 CD)。这种技术不仅可以用于纯蛋白的分析,而且可用于多种蛋白质的酶解混合物分析,理论上每个蛋白质如果至少能有一个多肽离子产生 CD 谱,就能鉴定出该蛋白质。因此,可能简化蛋白质水解前繁复的纯化步骤,并且可以直接分析蛋白质的混合样品,这就恰好满足了蛋白组计划分析大量蛋白质的需要。但到目前为止,CD 谱图的解析仍是蛋白组工作的一个瓶颈。

(3) 便于使用外电离源并与色谱仪器联用。FT/ICRMS 一般采用外离子化源,便于与各种色谱仪器联用。

除此之外,灵敏度高^[10]、质量范围宽、速度快、性能可靠等也是 FT/ICRMS 的优点。

许多研究证明了质谱成功用于蛋白质四种结构的研究,即一级结构(氨基酸的线性序列)、二级结构(氨基酸折叠成定义好的形状)、三级结构(全部的三维折叠)及四级结构(多蛋白复合物中折叠多肽的空间安排)。但是到目前为止,质谱在蛋白组学中的应用主要还是集中于一级结构的研究。

2 傅立叶变换-离子回旋共振质谱在蛋白质一级结构分析中的应用

传统上,蛋白质的鉴定是从头测序,多数是自动的,逐步的化学降解(Edman 降解)蛋白质,然后分离多肽片段^[11]。这些局部顺序依靠重叠的片段拼装组合出整个蛋白质的顺序,但是更多的用于探针从基因库分离出编码该蛋白的基因。随着序列数据库的增大,很明显,即使相对较短或不完善的序列(缺口,模糊的残基)对蛋白质的鉴定都是很有用的。当意识到质谱能比较理想的产生期望的数据时,用从蛋白质或多肽提取的信息和序列数据库相关联的方法,而不是从头测序进行蛋白质鉴定的观念已经逐渐地深入人心^[12]。

2.1 准确质量测定对蛋白质结构分析的应用价值

氨基酸顺序测定的第一步就是蛋白质分子量的确定,这能为测定蛋白质分子中多肽链的数目和用质谱方法测定各个肽段的氨基酸顺序提供最基础的数据。质量准确性的提高不仅能提高数据库搜索的速度,还能大大提高鉴定的可信度^[13-15]。用丰度为 99% 的¹³C 标记物培养基培

养细菌,使磷脂中的¹²C 被¹³C 所取代,一旦 C 原子数已知,有 n 个碳原子质量数就会增加 n,比较分别用 ESI/FT/ICRMS 和(CD)FT/ICRMS 测得的天然和 99% 丰度的¹³C 标记物培养基中磷脂的谱图,准确质量测定使其元素组成为唯一的可能^[16]。Demirev 等^[17]组合使用完整蛋白质的准确质量测定和蛋白组数据库,显著提高了鉴定微生物的特异性。He 等^[18]最近组合使用了高的磁场(9.4 T),大的 Penning 阱的直径(101.6 mm)及低的离子浓度,用 μ -ESI/FT/ICRMS 检测两种肽时质量分辨能力很高,这有可能成为蛋白组学研究的新突破点。ESI/FT/ICRMS 的准确质量测定还能可信的证实不确定的离子组成^[19]。

2.2 蛋白质分子中氨基酸序列的测定

蛋白质一级结构测定的一个最灵敏和最普遍的方式就是先用二维聚乙酰胺凝胶电泳分离蛋白质混合物,以胰蛋白酶消解,质量分析(分辨和分离一个特别的肽段)并最终用质谱方法产生一个至少是部分的氨基酸一级结构。肽质量图谱(Peptide mass mapping)是蛋白质一级结构测定一种最常用的手段。

肽质量图谱是基于序列特异性蛋白酶水解蛋白质衍生出来的肽的一个基团的准确质量的测定,是蛋白质鉴定的一个高效的方法。不同氨基酸序列的蛋白质用序列特异性的蛋白酶水解后将会产生一系列该蛋白独特的质量指纹。因此,如果用选择好的质量数(观察到的肽质量指纹)在一个包含有该特异蛋白的序列数据库中搜索,该蛋白就能依赖这个数据库正确的鉴定了。

采用纳流量液相色谱与傅立叶变换-离子回旋共振质谱联用,提供了一系列的胰蛋白酶消解后的母离子和子离子的质量,质量的准确性达到了 10^{-6} 数量级,从而进一步确证了人肝的三种二乙酰基还原酶^[20]。另外采用 n -ESI/FT/ICRMS 在 pmol 数量级的灵敏度上获得了蛋白质消解物的准确的质量指纹图谱,缩小了数据库的搜索范围并降低了搜索的噪声,测得了该种乙醛氧化酶的序列^[21]。应用 ESI/FT/ICRMS 和红外多光子解离(IR multiphoton dissociation, IRMPD)可对一种糖激酶进行分子量和肽的一级结构的精确测定^[22]。

2.3 蛋白质分子中二硫键位置的确定

蛋白质分子中常有二硫键作为共价键交联

一条多肽链链内或多条多肽链链间的两个半胱氨酸, 确定二硫键的位置对于鉴定蛋白质一级结构有着重要意义。近来 Ge Ying 等^[23]用电子捕获解离 (Electron capture dissociation, ECD) 技术成功地对大肠杆菌的细胞抽提物中催化维生素 B1 生物合成的几种酶进行了二硫键等全面的结构鉴定。

2.4 在分析蛋白质表达上的应用

获得蛋白质表达程度方面的信息是很有价值的, 因为这是一个给定细胞的特征状态, 直接反映了该细胞的生理功能, 并且和信使核糖核酸 (Messenger ribonucleic acid, mRNA) 表达的程度不直接相关。常用的方法是用稳定性同位素标记 (如²H, ¹³C, ¹⁵N 等)。样品中所有的肽以相同的序列对出现, 但是质量不同。因为这些肽对有相同的物化性质, 它们在分离和离子化时就能表现相同的性质。因此, 低质量和高质量成分的信号强度的比就能提供一个可信的准确的这两种肽的相对比例。Smith 等^[24]用贫化天然丰度极低的同位素 (如贫化¹³C, ¹⁵N, ²H) 标记的培养基和普通培养基培养细胞, 为所有待检测的蛋白质提供了“内标”。将用普通的细胞与标记的细胞在样品处理过程前混合, 这样就排除了细胞裂解、分离和质谱分析引入的实验误差。最后, 用 FT/ICR MS 检测并比较了 200 种不同的蛋白质。后来发展了更高效方便的定量方法——同位素编码亲和标记法 (Isotope-coded affinity tags, ICAT)^[25]。这种方法是用重的同位素试剂 (d8) 和一般试剂 (d0) 对半胱氨酸选择性烷基化。混合两种蛋白质的混合物, 用胰蛋白酶水解, 通过一个单体抗生物素蛋白的琼脂糖柱子, 富集有生物素标记的蛋白质。用微毛细管液相色谱-电喷雾电离串联质谱 (LC-ESI/MS/MS) 选择性分离, ICAT-标记的肽对的离子信号强度就可以精确的提供两种蛋白的定量信息, 随后的 MS/MS 可以用来鉴定该种蛋白质。ICAT 试剂的使用同时实现了蛋白质的定性和相对定量^[26]。

3 傅立叶变换-离子回旋共振质谱在研究蛋白质翻译后修饰中的应用

生物活性的肽要表达它们的生物活力, 就要在细胞中通过一系列的生物过程来合成, 这一系列的过程起始于转录, 然后翻译成前体蛋白。新生的前体蛋白再通过内质网, 高尔基复合体等转

运时发生蛋白水解和翻译后修饰生成有活力的肽。重要的翻译后修饰包括蛋白质水解、酰基化、羧基化、糖基化、脂化、胺化、磷酸化和硫酸化。蛋白质经过这样的修饰, 在结合、催化、调节以及物理性质等方面都被赋予了新的功能。

3.1 蛋白质分子中磷酸化肽的序列的分析

仅次于蛋白质水解, 蛋白质磷酸化是最重要和独特的一种翻译后修饰。能进行磷酸化的氨基酸有丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。蛋白质磷酸化和去磷酸化的重要性在于在细胞信号传递过程中的作用及对许多蛋白质、激素、神经递质和肽等保持生物功能的关键性作用。传统的确定磷酸化位点的方法是用³²P-同位素标记, 然后用免疫沉淀或酸提取/沉淀, 再用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 或其它色谱技术分离。分离得到的标记后的蛋白质用化学法或酶法断裂成小肽, 用 Edman 降解法进行磷酸化的蛋白质的鉴定。这样的传统方法既有放射线的危险, 又容易损失样品, 对磷酸化蛋白质的精确定位很容易失败。质谱方法, 以其无法超越的分子特异性, 极高的检测灵敏性和无法比拟的通用性特别适合该项鉴定。Stensballe 等^[27]用纳电喷雾电离-傅立叶变换-离子回旋共振质谱的 ECD 技术建立了可行的磷酸肽顺序分析的方法。合成或自然的磷酸肽的 ECD 谱比碰撞活化解离 (Collision activated dissociation, CAD) 谱的复杂性要小得多, 且没有水, 磷酸盐基团或磷酸从完整的磷酸肽离子或多质子化的磷酸肽离子 ECD 产生的 c-, z-型片段离子上丢失。

3.2 在糖蛋白分析中的应用

蛋白质的糖基化是真核细胞中最常见的翻译后修饰中的一种。曾经有人估计过 60%~90% 的哺乳动物的蛋白质在某个位置是被糖基化的^[28]。这些糖链修饰在无数的生物体系中起着关键性的作用^[28, 29]。糖蛋白的糖链的功能是作为细胞-细胞和细胞-分子相互作用的识别标记。因此, 糖蛋白是许多生物过程的基本物质, 这些过程包括了免疫应答、受精、细胞生长、细胞-细胞的粘着、凝血块的降解、病毒增殖、寄生虫感染和炎症反应等^[29, 30]。

为了推导出糖蛋白的一级结构, 必须先确定以下的信息: (1) 糖基化的位置和糖苷的连接方式 (N-连接或 O-连接); (2) 不同的糖残基的顺序, 包括它们的分枝点; (3) 糖苷连接的位置; (4)

每个糖的端基异构(A n o m e r i c)型(α 或 β); (5) 每个糖的鉴定。糖蛋白的分析一般分为三步: 一, 完整的糖蛋白的分子量的测定; 二, 糖蛋白的多肽骨架用酶裂解、分离和鉴定酶解后的糖肽; 三, 进行一系列的內-或外-糖苷酶消解, 决定糖基侧链的一级结构。

Cancilla 等^[31]用碱降解寡糖和 MALD I-FT/ICRM S 的方法成功地测定了寡糖的顺序和连接。这种碱降解技术是一种化学降解技术, 它只在还原端以 β 消去方式切断糖苷键产生一个新的还原端, 反应产物只需进行很少的处理即可作为 MALD I-FT/ICRM S 的样品来鉴定寡糖的顺序。有关连接的信息则通过新的还原端裂解片段来提供, 片段化可以通过 MALD I 源的片段化或 SOR I-C I D 来实现。M i r g o r o d s k a y a 等^[32]在 1999 年首次将 ECD 技术用于鉴定糖肽的 O-糖基化位置, 克服了源后裂解(Post-source decay, PSD)和 CAD 技术中糖苷键比多肽键更不稳定且更易片段化的缺点。PSD 和 CAD 技术常常导致信号强度很低或带有多糖的片段离子的信号丢失。而 ECD 技术是基于多肽的多质子化和热电子(< 0.2 eV)的部分重组。由于释放到片段里的內能很少, ECD 是一个很温和的片段化技术。Budnik 等^[33]用 $294\text{ }\mu\text{m IR}$ (IR-MALD I)取代原来的 337 nm UV (UV-MALD I), 新技术更适用于研究翻译后修饰的多肽。它是以琥珀酸为基质, 经实验证实灵敏度提高到了 fmol 级, 且离子化更“软”了, 即离子的断裂减少了。O-糖基化和硫酸化的多肽的完整的分子离子都可以在新技术下检测出来, 这为糖蛋白的分析提供了很多方便。

3.3 在蛋白质其它翻译后修饰中的应用

Hasehmann 等^[34]以外累积的 ECD 技术成功的对 60 个氨基酸残基中的 6 个 GaNAC (N 乙酰半乳糖胺), 25 个氨基酸残基中的 5 个唾液酸和 6 个 O-连接的 GaNAC 及 11 个氨基酸残基中的硫酸基团均进行了准确的定位。

4 傅立叶变换-离子回旋共振质谱法在研究蛋白组学中的应用

蛋白质组的概念是 1995 年由 Wasinger 等^[35]首先提出来的, 它是指一个基因组、一个细胞或一种组织所表达的全部蛋白质。蛋白质组研究是一种基因组后的研究, 蛋白质是基因通过转

录、翻译和翻译后修饰的表达产物, 是在分子水平上研究基因的功能, 是从基因组到功能的研究^[36]。蛋白质组计划要求大规模的蛋白质鉴定, 典型的蛋白组鉴定计划的靶蛋白的数量大大超过了传统化学测序方法的容量, 质谱技术相对而言更适合于高通量的蛋白组测序, 然而质谱作为快速产生完整蛋白质的氨基酸序列信息仍是需要进一步发展的^[37~39]。Kelleher 等^[40]用 ALS (Acid labile surfactant, 酸不稳定的表面活性剂)-PAGE/HPLC 的方法分离大小不同的蛋白质, 再以 ESI/FT/ICRM S 分析鉴定了 13 种完整蛋白的混合物, 以 MS/MS 选择离子使其片段化, 最后进行数据分析鉴定蛋白质, 这种高通量的方法很适合于蛋白组的研究。Ge 等^[23]用 ECD 技术提高了蛋白组学中大蛋白质的细节结构鉴定。

另外, 蛋白-蛋白复合物的研究也是现今蛋白组学的一大热点, 因为细胞行使生理功能多数是通过多蛋白复合物进行的, 很少由单个蛋白质独立行使功能。通常我们认为相互作用的蛋白质可能在生物过程中起同样作用。与此研究类似, 研究蛋白质与其它生命物质的复合物也是具有重要意义的。傅立叶变换-离子回旋共振质谱在研究非共价复合物中显示了极高的灵敏度(低于 pmol 到 fmol 数量级)^[41]。Nousiainen 等^[42]以 SOR I-C I D 和电喷雾-傅立叶变换-离子回旋共振质谱研究了钙调蛋白-RS20-Ca₄ 复合物的气相解离, 发现了复合物中可能有非共价的蛋白质相互作用和盐桥的存在。Budnik 等^[33]首次用 MALD I-FT/ICRM S 观察到了非共价复合物(万古霉素和二乙酰-L-Lys-D-Ala-D-Ala)的存在。另外, 最近有人 *n*-ESI/FT/ICRM S 检测到了毫克分子级的寡糖-蛋白的复合物, 并证实了该项技术是用于定量研究寡糖和蛋白单价或多价连接的一个好方法^[43]。

5 结 论

后基因组时代, 整合了生物信息学的生物分析质谱, 将在细胞蛋白组的鉴定和概述分子阶段的活细胞的功能和动力学方面起到一个轴心作用^[11, 36, 44, 45]。傅立叶变换-离子回旋共振质谱以其高分辨率, 易于质谱串联, 便于色谱联用, 高灵敏度等优势, 必将在蛋白质分析鉴定领域起到关键性作用, 推动蛋白质分析鉴定技术的发展。

参考文献:

- [1] Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS. Recent Advances in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry [C]. *Adv Mass Spectrom* 14, Elsevier Science BV: 1998, Chapter 10/221~ Chapter 10/239
- [2] Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: A Primer [J]. *Mass Spectrom Rev*, 1998, 17(1): 1~ 35
- [3] Goodlett David R, Bruce James E, Anderson Gordon A, et al. Protein Identification With a Single Accurate Mass of a Cysteine-Containing Peptide and Constrained Database Searching [J]. *Anal Chem*, 2000, 72(6): 1 112~ 1 118
- [4] Bruce JE, Anderson GA, Brands MD, et al. Obtaining More Accurate Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Measurements Without Internal Standards Using Multiply Charged Ions [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, 11(5): 416 ~ 421
- [5] Bruce James E, Anderson Gordon A, Wen Jenny, et al. High Mass Measurement Accuracy and 100% Sequence Coverage of Enzymatically Digested Bovine Serum Albumin From an ESI-FT-ICR Mass Spectrum [J]. *Anal Chem*, 1999, 71 (14): 2 595~ 2 599
- [6] Schurch Stefan, Scott Jill R, Wilkins Charles L. Alternative Labeling Method for Peptide Ladder Sequencing Using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry [J]. *Int J Mass Spectrom Ion Processes*, 169/170: 141~ 152
- [7] Kelleher Neil L, Niewonger Robb B, Begley Adhig P, et al. Identification of Modification Sites in Large Biomolecules by Stable Isotope Labeling and Tandem High Resolution Mass Spectrometry. The Active Site Nucleophile of Thiaminase II [J]. *J Biol Chem*, 272(51): 32 215~ 32 220
- [8] Susin SA, Lorenzo HK, Zamani N, et al. Molecular Characterization of Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor [J]. *Nature (London)*, 1999, 397 (6718): 441~ 446
- [9] McComack AL, Schiella DM, Goode B, et al. Direct Analysis and Identification of Proteins in Mixtures by LC/MS/MS and Database Searching at the Low-Femtomole Level [J]. *Anal Chem*, 1997, 69(4): 767~ 776
- [10] Belov ME, Gorshkov MV, Udseth HR, et al. Initial Implementation of an Electrodynamical Ion Funnel With Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, 11(1): 19~ 23
- [11] Hewick RM, Hunkapiller MW, Hood LE, et al. A Gas-Liquid Solid Phase Peptide and Protein Sequenator [J]. *J Biol Chem*, 1981, 256(15): 7 990~ 7 997
- [12] Aebersold R, Goodlett D. Mass Spectrometry in Proteomics [J]. *Chem Rev*, 2001, 101(2): 269~ 295
- [13] Jensen ON, Podtelejnikov AV, Mann M. Identification of the Components of Simple Protein Mixtures by High-Accuracy Peptide Mass Mapping and Database Searching [J]. *Anal Chem*, 1997, 69: 4 741~ 4 750
- [14] Jensen ON, Podtelejnikov AV, Mann M. Delayed Extraction Improves Specificity in Database Searches by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Peptide Maps [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1996, 10(11): 1 371~ 1 378
- [15] Bruce JE, Anderson GA, Wen J, et al. High-Mass Measurement Accuracy and 100% Sequence Coverage of Enzymatically Digested Bovine Serum Albumin From an ESI-FT-ICR Mass Spectrum [J]. *Anal Chem*, 1999, 71(14): 2 595~ 2 599
- [16] Rodgers RP, Blumer EN, Hendrickson CL, et al. Stable Isotope Incorporation Triples the Upper Mass Limit for Determination of Elemental Composition by Accurate Mass Measurement [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, 11(10): 835~ 840
- [17] Demirev Plamen A, Ramirez Javier, Fenselau Catherine. Tandem Mass Spectrometry of Intact Proteins for Characterization of Biomarkers From *Bacillus Cereus* T Spores [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(23): 5 725~ 5 731
- [18] He Fei, Hendrickson Christopher L, Marshall Alan G. Baseline Mass Resolution of Peptide Isobars: A Record for Molecular Mass Resolution [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(3): 647~ 650

- [19] Craig AG, Speir JP, Rosamilia S, et al [M + Fe - 5H]²⁺ peptide ion Composition Verified by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Accurate Mass and Tandem Mass Spectrometry Analyses [J] J Am Soc Mass Spectrom, 2000, 11(1): 83~ 87
- [20] Tanaka Yori-hisa, Sato Ikuya, Iwai Chisaki, et al Identification of Human Liver Diacetyl Reductases by Nano-Liquid Chromatography/Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry [J] Anal Biochem, 2001, 293(2): 157~ 168
- [21] Kosaka Toshiyuki, Takazawa Tomoko, Kubota Kazuishi, et al Identification of Rat Liver Aldehyde Oxidase Across Species by Accurate Peptide Mass Fingerprinting and Sequence-Tagging With Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry [J] J Mass Spectrom Soc Jpn, 2000, 48(3): 179~ 186
- [22] Dufresne Craig P, Wood Troy D, Hendrickson Christopher L. High-Resolution Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry With Infrared Multiphoton Dissociation of Glucokinase From *Bacillus Stearothermophilus* [J] J Am Soc Mass Spectrom, 1998, 9(11): 1 222~ 1 225
- [23] Ge Ying, Lawhorn Brian G, ENaggar Mariam, et al Top Down Characterization of Larger Proteins (45 kDa) by Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry [J] J of Am Chem Soc, 2002, 124(4): 672~ 678
- [24] Pasa-Tolic Liljana, Jensen Pamela K, Anderson Gordon A, et al High Throughput Proteome-Wide Precision Measurements of Protein Expression Using Mass Spectrometry [J] J Am Chem Soc, 1999, 121(34): 7 949~ 7 950
- [25] Gygi Steven P, Rist Beate, Gerber Scott A, et al Quantitative Analysis of Complex Protein Mixtures Using Isotope-Coded Affinity Tags [J] Nat Biotechnol, 1999, 17(10): 994~ 999
- [26] Griffin Timothy J, Han David KM, Gygi Steven P, et al Toward a High-throughput Approach to Quantitative Proteomic Analysis: Expression-Dependent Protein Identification by Mass Spectrometry [J] J Am Soc Mass Spectrom, 2001, 12(12): 1 238~ 1 246
- [27] Stensballe Allan, Jensen Ole Norregaard, Olsen Jesper V, et al Electron Capture Dissociation of Singly and Multiply Phosphorylated Peptides [J] Rapid Commun Mass Spectrom, 2000, 14(19): 1 793~ 1 800
- [28] Varki A. Biological Roles of Oligosaccharides: All of the Theories Are Correct [J] Glycobiology, 1993, 3: 97~ 130
- [29] Fukuda M, Bothner B, Ramasamoj P, et al Structures of Sialylated Fucosyl Polylactosaminoglycans Isolated From Chronic Myelogenous Leukemia cells [J] J Biol Chem, 1985, 260: 12 957~ 1 2967
- [30] Dwek RA. Glycobiology-Toward Understanding the Function of Sugars [J] Chem Rev, 1996, 96: 683~ 720
- [31] Cancelli Mark T, Penn Sharron G, Lebrilla Carlito B. Alkaline Degradation of Oligosaccharides Coupled With Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: A Method for Sequencing Oligosaccharides [J] Anal Chem, 1998, 70(4): 663~ 672
- [32] Mirgorodskaya E, Roepstorff P, Zubarev RA. Localization of O-glycosylation Sites in Peptides by Electron Capture Dissociation in a Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer [J] Anal Chem, 1999, 71(20): 4 431 ~ 4 436
- [33] Budnik Bogdan A, Jensen Kenneth B, Jorgensen Thomas JD, et al Benefits of 2 94 mm Infrared Matrix Assisted Laser Desorption Ionization for Analysis of Labile Molecules by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry [J] Rapid Commun Mass Spectrom, 2000, 14(7): 578~ 584
- [34] Haselmann Kim F, Budnik Bogdan A, Olsen Jesper V, et al Advantages of External Accumulation for Electron Capture Dissociation in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry [J] Anal Chem, 2001, 73(13): 2 998~ 3 005
- [35] Valerie C, Wasinger Stuart J, Cordwell J, et al Progress With Gene-Product Mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma Genitalium* [J] Electrophoresis, 1995, 16: 1 090~ 1 094

- [36] Godovac-Zimmermann J, Brown L. Perspectives for Mass Spectrometry and Functional Proteomics[J]. *Mass Spectrom. Rev.*, 2001, 20(1): 1~ 57.
- [37] Zubarev RA, Håkansson P, Sundqvist B. Accuracy Requirements for Peptide Characterization by Monoisotopic Molecular Mass Measurements [J]. *Anal Chem.*, 1996, 68(22): 4 060~ 4 063
- [38] Loo JA, Edmonds CG, Smith RD. Tandem Mass Spectrometry of Very Large Molecules: Serum Albumin Sequence Information From Multiply Charged Ions Formed by Electrospray Ionization [J]. *Anal Chem.*, 1991, 63(21): 2 488~ 2 499
- [39] Zubarev RA, Horn DM, Fridriksson EK, et al. Electron Capture Dissociation for Structural Characterization of Multiply Charged Protein Cations[J]. *Anal Chem.*, 2000, 72(3): 563~ 573
- [40] Meng Fanyu, Cargile Benjamin J, Patrie Steven M, et al. Processing Complex Mixtures of Intact Proteins for Direct Analysis by Mass Spectrometry[J]. *Anal Chem.*, 2002, 74: 2 923~ 2 929
- [41] Schwartz Brenda L, Gale David C, Smith Richard D, et al. Investigation of Non-Covalent Ligand Binding to the Intact Streptavidin Tetramer by Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J]. *J Mass Spectrom.*, 1995, 30(8): 1 095~ 1 102
- [42] Nousiainen Marjaana, Vainio Talo Pirjo, Feng Xidong, et al. Calmodulin-RS20-Ca⁴⁺ Complex in the Gas Phase: Electrospray Ionization and Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance [J]. *European Journal of Mass Spectrometry*, 2001, 7(4&5): 393~ 398
- [43] Kitova Elena N, Kitov Pavel I, Bundle David R, et al. The Observation of Multivalent Complexes of Shiga-Like Toxin With Globotriaoside and the Determination of Their Stoichiometry by Nano-electrospray-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry [J]. *Glycobiology*, 2001, 11(7): 605~ 611
- [44] Pandey Akhilesh, Mann Matthias. Proteomics to Study Genes and Genomes [J]. *Nature (London)*, 2000, 405(6 788): 837~ 846
- [45] Demirev Plamen A, Ramirez Javier, Fenselau Catherine. Tandem Mass Spectrometry of Intact Proteins for Characterization of Biomarkers From *Bacillus Cereus* T Spores [J]. *Anal Chem.*, 2001, 73(23): 5 725~ 5 731

Applications in Analysis of Proteins by Fourier Transform/Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry

L U Han-qing, GUO Yin-long

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract The review with 45 references is focused on characteristics of Fourier transform /ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT/ICRMS) and applications of FT/ICRMS in protein identification. Applications in analysis of primary structures of proteins, post-translational modifications and proteomes are discussed and reviewed in detail.

Key words mass spectrometry; protein analysis; review; fourier transform/ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT/ICRMS)