第 27 卷 增刊
2006 年 8 月

质 谱 学 报
Journal of Chinese Mass Spectrometry Society

Vol. 27 Suppl.
Aug. 2006

# 稀土元素金属螯合标记结合 Q-TOF-MS 的定量蛋白质组新方法

刘慧玲[1,2,3]，张养军[1,2]，钱小红[1,2]

（1. 北京放射医学研究所，北京 100850；2. 北京蛋白质组研究中心，北京 100850；
3. 北京输血医学研究所，北京 100850）

# A New Method for Quantitative Proteomics Research by Using Metal Element Chelated Tags and Q-TOF-MS

LIU Hui-ling[1,2,3], ZHANG Yang-jun[1,2], QIAN Xiao-hong[1,2]

(1. *Beijing Institute of Radiation Medicine*, 27 *Taiping Road*, *Beijing* 100850, *China*;
2. *Beijing Proteome Research Center*, 33 *Zhongguancun Life Park Road*, *Beijing* 102206, *China*;
3. *Beijing Institute of Transfusion Medicine*, 27 *Taiping Road*, *Beijing* 100850, *China*)

**Abstract**: The use of some stable isotope regents has limitations due to relative high price and synthesis difficulties; as a result, we developed a new method for quantitative proteomics research by using metal element chelated tags (MECT) coupled with mass spectrometry. The principle of the method lies that the bicyclic anhydride diethylenetriamine-N, N, N′, N″, N″-pentaacetic is covalently coupled to the primary amines of peptides, and then chelated to rare metal Y and Tb. After peptide modifications, the tagged peptides are mixed and analyzed by LC-ESI-MS/MS. The MECT method was evaluated by using standard proteins as model samples. The experimental results showed that metal-chelate-tagged peptides chromatographically coeluted successfully during the reversed-phase LC analysis. The relative quantitation results were accurate for proteins using MECT. Bicyclic anhydride diethylenetriamine-N, N, N′, N″, N″-pentaacetic modified N-terminal of peptides could promote cleaner fragmentation (only y-series ions) and improve the confidence level of protein identification. The MECT strategy provides a simple, rapid and economical alternative to current mass tagging technologies available.

**Key words**: Quantitative Proteomics; Metal Element Chelated Tags; Mass Spectrometry

**中图分类号**：O657.63　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1004-2997(2006)**增刊**-171-02

**基金项目**：**国家重点基础研究发展规划项目**(2001CB510201, 2004CB520802)，**北京市科研基金项目**(H030230280190)**和国家自然科学基金**(30321003, 20405017, 20505018, 20505019)

**作者简介**：**刘慧玲**(1976～)，**女**(**汉族**)，**助理研究员**，**蛋白质组学**。E-mail: hlliucn@yahoo.com.cn

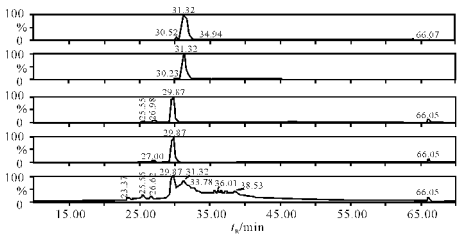


**图 1 胰岛素酶切肽段不同金属离子标记的 LC-MS 共洗脱质谱图**

**Fig. 1 The analysis of the labeled peptide mixture of insulin by LC-MS**

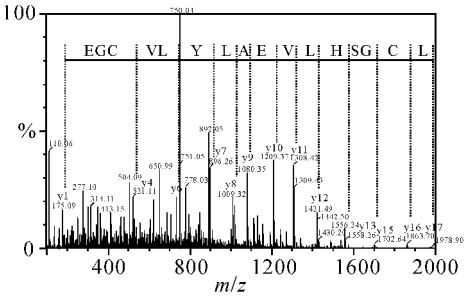


**图 2 Tb 离子标记肽段 FVNQHLCGSHL VEALYLVCGER 的二级质谱图**

**Fig. 2 MS/MS spectrum of Tb-FVNQHL CGSHLVEALYLVCGER peptide**

近年来，定量蛋白质组学主要采用以质谱检测为核心的稳定同位素化学标记方法。但是受到稳定同位素试剂合成困难，价格高等因素的制约。Meares C. F. 等人以化学性质很相近的稀土金属元素作为质量标签，提出了“元素标记亲和标签”（ECAT，Element-coded affinity tags）[1] 针对蛋白质巯基标记的新方法。本文建立了一种以性质很相近的稀土金属为质量标签，特异性标记蛋白质的氨基，结合 MALDI-TOF MS 检测的蛋白质组学相对定量新方法。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与装置

4700 Proteomics Analyzer 型基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱仪（美国应用生物系统公司产品）；Q-TOF Micro（Waters）质谱仪的纳升喷雾源，Waters CapLC 液相系统，分析柱用 C18 毛细管柱（75 μm × 10 cm，LC PACKING）；蛋白质数据库为 Uniprot-SP（version 2.0）；搜索引擎为用本地化的 Mascot（version 1.9）。

### 1.2 主要材料与试剂

二乙三胺五乙酸双酸酐（DTPA 双酸酐，DOJINDO 公司，日本）；$YCl_3$ 和 $TbCl_3$ 均购自 Sigma 公司（美国）；超纯水由 Millipore 纯水系统（Millipore 公司，美国）；乙腈（HPLC 级）购自美国 J. T. Baker 公司；胰蛋白酶（trypsin，bovine pancrease）为美国 Promega 公司产品。

## 2 结果与讨论

二乙三胺五乙酸是一种多氨基多羧基类螯合剂，可以与肽段或蛋白质的 N 端和 Lys 残基侧链上氨基基团发生酰基化反应，同时它含有多个氮原子和氧原子，能与稀土金属有很强的螯合力，形成很稳定的螯合物。本实验是以二乙三胺五乙酸螯合稀土金属元素钇（$^{89}Y$）和铽（$^{159}Tb$）为质量标签，将其用于定量蛋白质组学的研究中来。

实验首先对蛋白质胰岛素酶切产生的肽段进行标记，将标记有不同稀土金属离子的肽段混合物，通过反相 LC-Q-TOF MS/MS 进行分离鉴定。实验结果显示标记有不同稀土金属离子的同一肽段在液相分离中能够被共洗脱（图 1）。在一级质谱图中质量数相差值 70 Da（单电荷，双电荷的离子对的质量数差异为单同位素稀土元素金属的质量数差的 1/2，依此类推）的一对肽段的离子强度比例，也就是相应的两种比较蛋白质的相对比例。当设定的两种样本的混合比例为 1∶1 时，从一级质谱图中标记钇金属离子与标记有铽金属离子肽段的离子强度的平均比例为 0.65∶1，这也许是因为标记有金属铽的肽段对标记有金属钇的肽段有离子抑制现象。在图 2 中可以看到标记有 DTPA 的肽段在二级质谱中产生连续的 Y 系列离子，这样可以减化二级图谱，提高蛋白质鉴定的可信度。另外该方法在设定比例 1.0 到 10 之间是呈线性变化的，线性关系良好，相关系数为 0.99 以上。同时我们对该方法的标记效率、稳定性和灵敏度进行了全面考查，结果表明稀土金属离子作为质量标签可以应用在定量蛋白质组学中。将该方法用于六个蛋白混合物的研究中，对该方法进行了进一步的验证，也得到了令人满意的结果。

## 参考文献：

[1] Whetstone P A, Butlin N G., Corneillie T M, et al. Bioconjugate Chem., 2004, 15: 3-6.

[2] Hnatowich D J, Layne W W, Childs R L, et al. Science. 1983, 220, 613-615.