

串联飞行时间质谱的碎片离子相对强度在 区分亮氨酸和异亮氨酸残基中的应用

王 勇¹, 高 升², 李水明¹

(1. 深圳大学生命科学学院, 深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室, 广东 深圳 518060;

2. 深圳大学生命科学学院, 深圳市微生物基因工程重点实验室, 广东 深圳 518060)

摘要: 研究肽段从头测序需要解决的问题之一是区分亮氨酸和异亮氨酸残基, 利用基质辅助激光解吸电离-串联飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF)所产生的 w 型离子区分这两种氨基酸残基是目前最常用的方法。本研究以 6 对合成的同分异构肽段(由 7~15 个氨基酸构成)为例, 来说明 w 离子信号强度较低且有时不能产生, 在区分多肽中的亮氨酸和异亮氨酸时受肽段长度和序列的限制。而亮氨酸与异亮氨酸的变化会导致亚胺相关离子、内部断裂离子、b-型和 y-型离子等相对强度的微小变化。通过比较这些骨架断裂变化所产生的微小差异, 可为区分肽段中的亮氨酸和异亮氨酸残基提供新的线索和判据。

关键词: 从头测序; 串联飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF); 亮氨酸; 异亮氨酸

中图分类号: O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2015)04-0302-08

doi: 10.7538/zpxb.youxian.2015.0012

Differentiation of Leucine and Isoleucine Residues Using Relative Intensities of Fragment Ions of MALDI-TOF/TOF

WANG Yong¹, GAO Sheng², LI Shui-ming¹

(1. Shenzhen Key Laboratory of Marine Bioresources and Ecology, College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 2. Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: Differentiation of leucine (Leu) and isoleucine (Ile) is a difficult problem for de novo peptide sequencing. There is a general agreement that backbone cleavage is not capable of discriminating Leu and Ile residues and w-type ions produced by MALDI-TOF/TOF high energy collision-induced dissociation (CID) can provide distinguishable information. The experiment based on six pairs of tryptic-like isomeric peptides which contain 7 to 15 residues, showed that w ions were not always can be observed, while the displacement between Leu and Ile will lead to the change of relative abundance of immonium ions, internal fragment ions, b- and y-types of ions, the degree of changes depends on peptide composition and Leu/Ile position. Therefore, it is possible to distinguish Leu from Ile by comparing the relative intensities of the fragment ions of MALDI-TOF/TOF

收稿日期: 2014-07-08; 修回日期: 2014-08-28

作者简介: 王 勇(1970—), 男(汉族), 吉林人, 副教授, 从事生物质谱分析研究。E-mail: wyong@szu.edu.cn

网络出版时间: 2015-01-30; 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20150130.1553.012.html>

high energy CID spectra.

Key words: de novo peptide sequencing; MALDI-TOF/TOF; Leucine; Isoleucine

数据库搜索和从头测序是基于串联质谱鉴定肽段的两种基本方法^[1-2]。相比于数据库搜索,从头测序的关键是串联质谱数据是否能提供足够的序列信息,其中,亮氨酸和异亮氨酸残基的区分就是亟待解决的问题之一。一般来说,基于氨基酸序列的相似性,局部同源搜索工具(BLAST)可以为从头测序提供区分亮氨酸和异亮氨酸的参考信息^[3-5],然而,该方法不适用于亮氨酸和异亮氨酸的基因发生相互突变的情况^[6]。此外,在人类转录组中,核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)序列也存在广泛的差异,亮氨酸或异亮氨酸也可能通过其他氨基酸的突变产生^[7-8]。因此,对串联质谱数据进行深入地分析非常重要。

在低能碰撞诱导解离模式下,通过分析亮氨酸和异亮氨酸亚胺离子碎片的三级串联质谱可将其有效区分。亮氨酸和异亮氨酸都可以产生 m/z 30 和 m/z 44 离子,然而,亮氨酸由麦氏重排主要断裂成 m/z 43 和 m/z 44 离子,异亮氨酸则通过失去氨和乙烯生成 m/z 69 和 m/z 41 离子^[9-12]。这些信息可用于区分金属离子复合物中的亮氨酸和异亮氨酸^[13]。此外,基质辅助激光解吸电离源内裂解与亚稳态原子活化解析质谱相结合也可区分这两种氨基酸^[14-16]。

高能碰撞诱导解离是通过将前体离子加速后与碰撞池中的气体原子或分子进行碰撞而实现离子碎裂。一次碰撞足以引起前体离子电子的激发,随后的碰撞会产生所有可能的断裂,这在增加串联图谱复杂性的同时,也提高了所获得序列信息的确定性^[17]。高能碰撞诱导解离产生的 w 离子碎片可以区分亮氨酸和异亮氨酸^[18],但是,由于多肽结构、样品浓度和仪器条件等因素的影响,有时观测不到 w 离子。本工作通过研究亮氨酸和异亮氨酸残基之间的取代导致的串联质谱中各碎片离子相对强度的变化,寻找有可能区分出亮氨酸和异亮氨酸残基的新线索。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer 基质辅助

激光解吸电离-串联飞行时间质谱仪;美国 AB Sciex 公司产品;Milli-Q 超纯水处理系统;美国 Millipore 公司产品。

多肽的合成与制备:所有标准肽由强生生物(上海)科技有限公司合成,合成的多肽通过反相 HPLC 纯化,冷冻干燥,并用分析型 HPLC 和质谱确定所有多肽的纯度均在 95% 以上; α -胍基-4-羧基肉桂酸:美国 Sigma 公司产品,使用前重结晶,浓度为 6 g/L。将制备的适量固态多肽溶解在 CH_3CN (分析纯)与去离子水的溶液(1:1, V/V)中,最终形成的多肽溶液浓度范围在 100~500 nmol/L 之间。

1.2 质谱条件

所有实验在 MALDI-TOF/TOF 4800 质谱仪上完成。一级质谱每张谱图累加 800 次。在串联质谱模式中,碰撞诱导解离条件为 1 keV 碰撞能加空气碰撞,碰撞能为 1 000 V,二级加速电压为 15 000 V,最大累积激光发射次数为 2 000 次。通过 MS-Product 程序确定子离子质荷比。

2 结果与讨论

2.1 利用 w 离子区分亮氨酸和异亮氨酸多肽同分异构体的局限性

目前,肽段断裂后所产生离子的命名一般采用 2009 年美国化学会规定的系统命名法,示于图 1。含有亮氨酸和异亮氨酸残基的多肽可由 w 型离子区分,但也存在一些问题,本研究将通过 6 组合成的模拟胰蛋白酶水解肽段(以赖氨酸或精氨酸结尾)加以说明。例如,肽段 HKDLYGK 和 HKDIYGK 的 MALDI-TOF/TOF 串联质谱图非常相似,互补的 y 和 b 系列离子为优势断裂,组氨酸亚胺离子 m/z 110.08 为基峰,虽然能够在放大的谱图上观察到可以区分它们的 w 离子,但是离子强度很低,示于图 2。同样地,在肽段 EQWTEGTIK 放大的串联质谱图上,可以观察到 w_{a2} 离子,但信号强度很低,示于图 3。为了进一步说明该问题,将所有多肽的 w 离子相对强度和信噪比列于表 1。

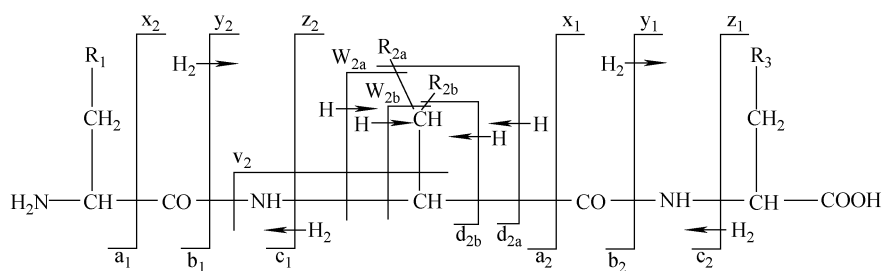
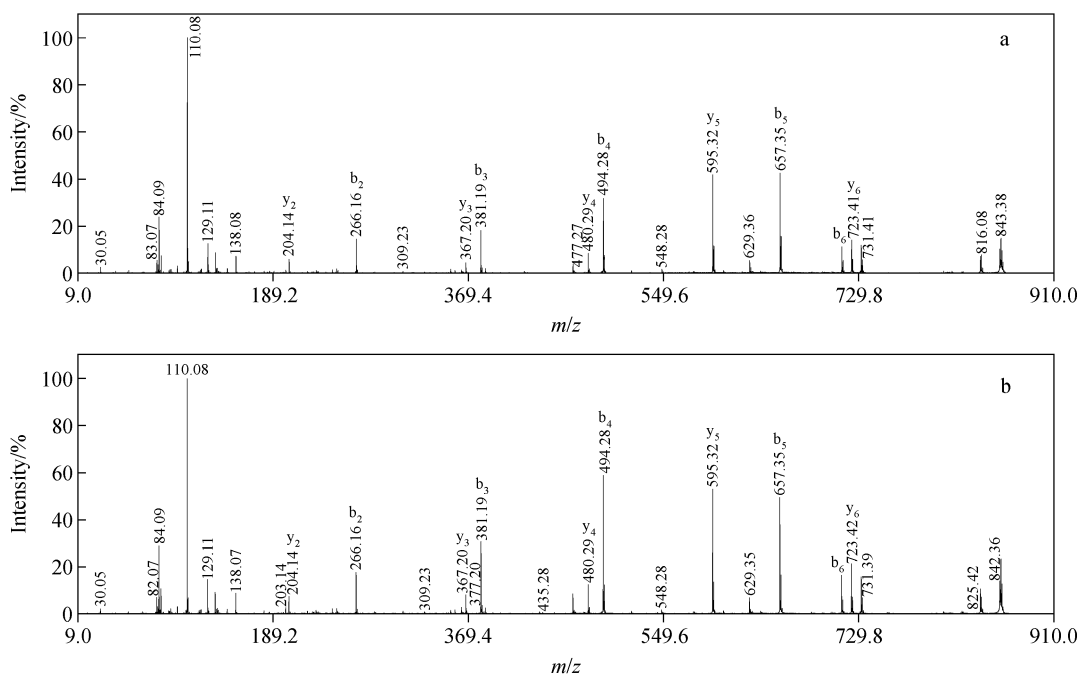
图 1 肽段断裂离子的系统命名法^[14]Fig. 1 Nomenclature of peptide fragment ions^[14]

图 2 500 nmol/L HKDLYGK(a)和 500 nmol/L HKDIYGK(b)的串联飞行时间质谱图

Fig. 2 MALDI-TOF/TOF CID spectrums
of 500 nmol/L HKDLYGK (a) and 500 nmol/L HKDIYGK (b)

表 1 12 种多肽对应的 w 离子和它们的相对强度

Table 1 Summary of the observed w ions and their relative intensity for twelve peptides

肽段序号	肽段序列	w 离子	理论质荷比	检测值	相对强度/%	信噪比
1	HKDLYGK	w _{a4}	421.21	421.26	0.77	30
2	HKDIYGK	w _{a4}	435.22	435.28	0.67	35
		w _{b4}	449.24	449.23	0.37	18
3	FLQPGSPR	w _{a7}	695.35	695.47	1.73	31
4	FIQPGSPR	w _{a7}	709.36	709.48	1.92	46
		w _{b7}	723.38	723.50	0.52	13
5	HQDLLYGK	w _{a4}	421.21	ND		
		w _{a5}	534.29	ND		

续表 1

肽段序号	肽段序列	w 离子	理论质荷比	检测值	相对强度/%	信噪比
6	HQDIYGK	w _{a4}	435.22	ND		
		w _{b4}	449.24	ND		
		w _{a5}	548.31	ND		
		w _{b5}	562.32	ND		
7	EQWTEGTLK	w _{a2}	201.12	201.13	1.9	50
8	EQWTEGTIK	w _{a2}	215.14	215.13	3	87
		w _{b2}	229.15	229.15	0.36	9
9	LHYFNARGR	w _{a9}	1074.52	1074.53	7.33	68
10	IHYFNARGR	w _{a9}	1088.54	ND		
		w _{b9}	1102.55	ND		
11	NLPAELQPFETLLAK	w _{a3}	272.16	ND		
		w _{a4}	385.24	385.22	0.92	8.5
		w _{a14}	1510.82	ND		
12	NIPAEIQPFETIIAK	w _{a3}	286.18	286.16	0.63	9
		w _{b3}	300.19	ND		
		w _{a4}	399.26	399.23	0.92	12
		w _{b4}	413.28	413.20	2.6	20
		w _{b14}	1538.85	ND		

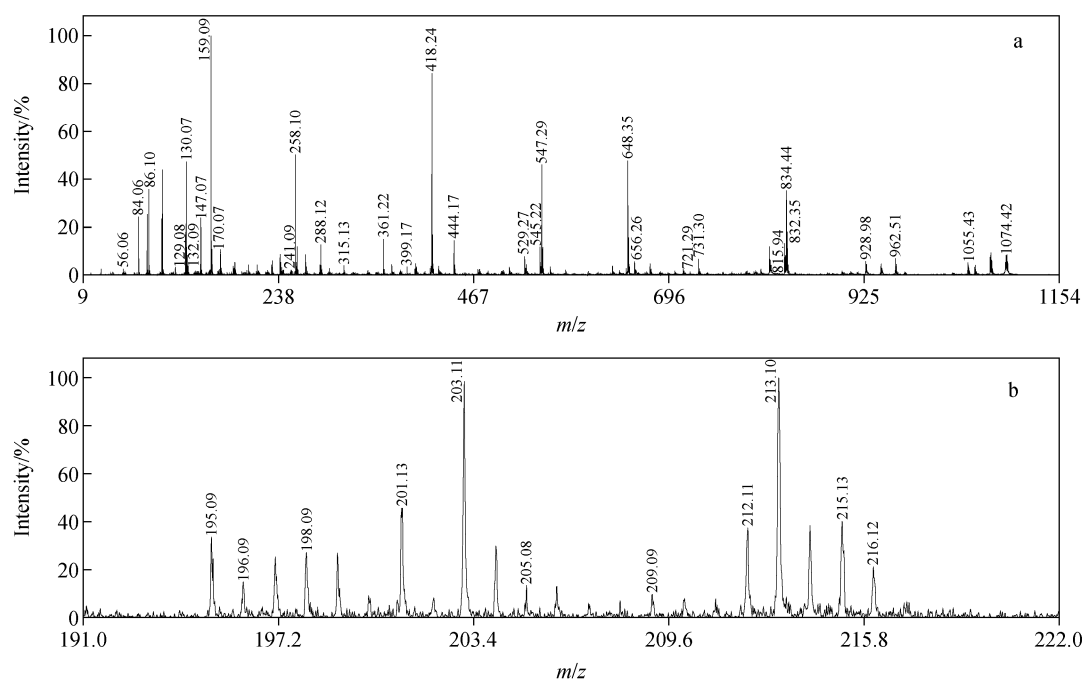


图 3 100 nmol/L EQWTEGTIK 的串联飞行时间质谱图(a)和放大图(b)

Fig. 3 MALDI-TOF/TOF CID spectrums of 100 nmol/L EQWTEGTIK (a) and expand region (b)

如表 1 所示,对于编号为 5、6、10、11 和 12 的肽段未观察到相应的 w 离子,在其他肽段的串联质谱中, w_a 和 w_b 离子的相对强度也很低。氨基酸残基的位置和肽段长度是影响 w 离子能否被检测到的关键因素。对于多肽 NLPAELQPFETLLAK 和 NIPAEELQPFETIIAK,只能检测到 w_{a3} 、 w_{a4} 、 w_{b4} 离子,因为碎片离子在高质量区普遍强度较低,在 N 端第 14 的位置亮氨酸和异亮氨酸难以区分。除了相对较低的强度,利用 w 离子的另一个缺点是在低质量区域的其他碎片离子也可能对 w 离子的检测造成干扰。例如,理论上肽段 EQWTEGTLK 和 EQWTEGTIK 可通过 EQWTEGTLK 的 w_{a2} 离子 m/z 201.12 和 EQWTEGTIK 的 w_{a2} 离子 m/z 215.14、 w_{b2} 离子 m/z 229.15 加以区分,但是,在这 2 个肽段的串联质谱中均检测到了较高强度的 m/z 215.14 离子,来源于它们的内部断裂离子 TI/TL。类似地,并不是所有的亮氨酸和异亮氨酸残基都可以由 157 nm 光解产生的 v 型和 w 型离子进行区分^[19]。综上,虽然侧

链碎片离子可在区分多肽中的亮氨酸或异亮氨酸时发挥重要作用,但其适用性受肽段长度和序列的限制。

2.2 利用亚铵相关离子相对强度区分亮氨酸和异亮氨酸的多肽异构体

相比于亮氨酸,异亮氨酸更易产生亚铵相关离子 m/z 69 和 m/z 41^[20]。Armirotti 等^[14]研究表明,由亮氨酸产生 m/z 69 的亚铵离子需要更多的能量,即亮氨酸亚铵离子必须克服 +305.4 J/mol 的能垒完成重排,并克服 147.3 J/mol 失去氨,而异亮氨酸则只需要 +219.7 J/mol 的能垒完成重排,+76.6 J/mol 进一步产生 m/z 41 离子^[14]。在串联飞行时间质谱中该规律同样适用。对 m/z 41 和 m/z 69 离子的相对强度进行总结,发现在含有异亮氨酸的多肽串联质谱中, m/z 41 和 m/z 69 亚铵离子的相对强度均高于相对应的含有亮氨酸的多肽,结果列于表 2。但在本研究中,当肽段长度大于 10 个氨基酸时,就不会产生 m/z 69 亚铵离子,因此,该判据也有一定的局限性。

表 2 12 个肽段 4 种亚铵相关离子的相对强度

Table 2 The relative intensities of four kinds of immonium related ions of Leu/Ile for twelve peptides

	相对强度/%											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
m/z 41	0.23	0.31	ND	0.76	ND	ND	0.52	0.61	ND	ND	ND	ND
m/z 69	0.36	0.83	0.69	1.27	ND	1.17	0.84	1.42	ND	ND	ND	ND

注:奇数代表含亮氨酸的多肽,偶数代表含异亮氨酸的多肽

2.3 利用 b 和 y 系列离子的相对强度区分亮氨酸和异亮氨酸同分异构多肽

由于亮氨酸和异亮氨酸的同分异构体是在相同的实验条件下进行串联质谱分析的,所以离子强度的差异应来源于这两种氨基酸之间的取代所导致的多肽结构的微小差别。肽段 5~12 的串联质谱各碎片离子的相对强度示于图 4。实验发现,对于肽段 1~6 和 11~12,大多数肽段肽裂解产生含异亮氨酸离子的相对丰度明显高于亮氨酸异构体,因此认为该特征可以用来区分这两种氨基酸残基。例如,在图 2 中,HKDIYGK 的 b_3 、 b_4 离子的相对强度明显高于 HKDLYGK 所产生的 b_3 、 b_4 离子。特别是在肽段 FLQPGSPR 的串联质谱中,母离子

m/z 901.2 为基峰,其他碎片离子的强度也较高;而在肽段 FIQPGSPR 的串联质谱中, m/z 70.08 离子为基峰,其质谱图示于图 5。对于肽段 7~10,其碎片离子的相对强度相差较小,然而,正如上面所提到的,肽段 EQWTEGTLK 和 EQWTEGTIK 可通过 m/z 41 和 m/z 69 离子区分,在肽段 LHYFNARGR 的串联质谱中也检测到了 w_{a9} 离子。对于性质非常相近的肽段,例如含有 IL 或 LI 残基的肽段,虽然预期各碎片离子强度可能很相近,但仍需 w 离子进行区分。

2.4 TOF/TOF 谱形状的相对稳定性

高能碰撞诱导解离谱图被认为具有较好的重复性,这是由于前体离子具有很高的动能,与

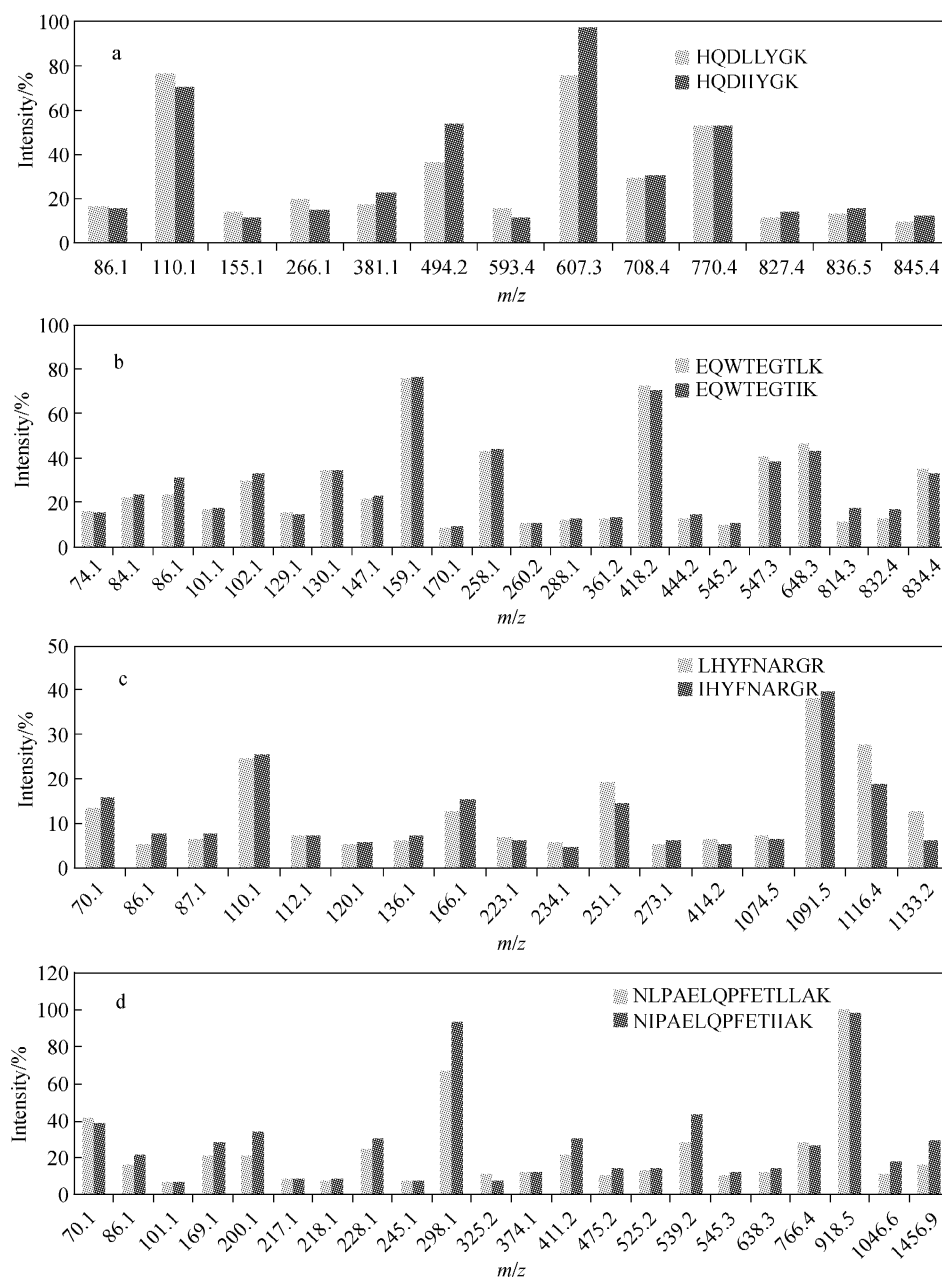


图4 肽段 HQDLL/IYGK(a), EQWTEGTL/IK(b), L/IHYFNARGR(c), NL/IPAEIQPFETLL/IIAK(d)各主要子离子的相对强度

Fig. 4 The relative intensities of the main product ions of HQDLL/IYGK (a), EQWTEGTL/IK (b), L/IHYFNARGR (c) and NL/IPAEIQPFETLL/IIAK (d)

千电子伏前体离子的能量相比,碰撞过程中气体原子的动能可以忽略不计。这意味着,在相同的碰撞条件下,碰撞气种类、气体压力和温度的变化不会明显影响离子分布^[17]。Vestal 和 Campbell 指出 TOF/TOF 高 CID 的动态范围在典型的实验条件下为 3 个数量级^[21]。在一定程度上,离子强度也可以被看作是串联质谱

的本质特征,因为子离子的产生概率与肽结构是高度相关的。因此,离子强度信息可以改善从头测序的准确性^[22],MALDI-TOF/TOF 可以检测到多肽中的 D-氨基酸^[23]。离子的性质决定了最有利的解离通道^[24],即串联质谱的本质依赖于蛋白质的氨基酸组成^[25],但目前尚未见用离子强度区分亮氨酸和异亮氨酸残基的报道。

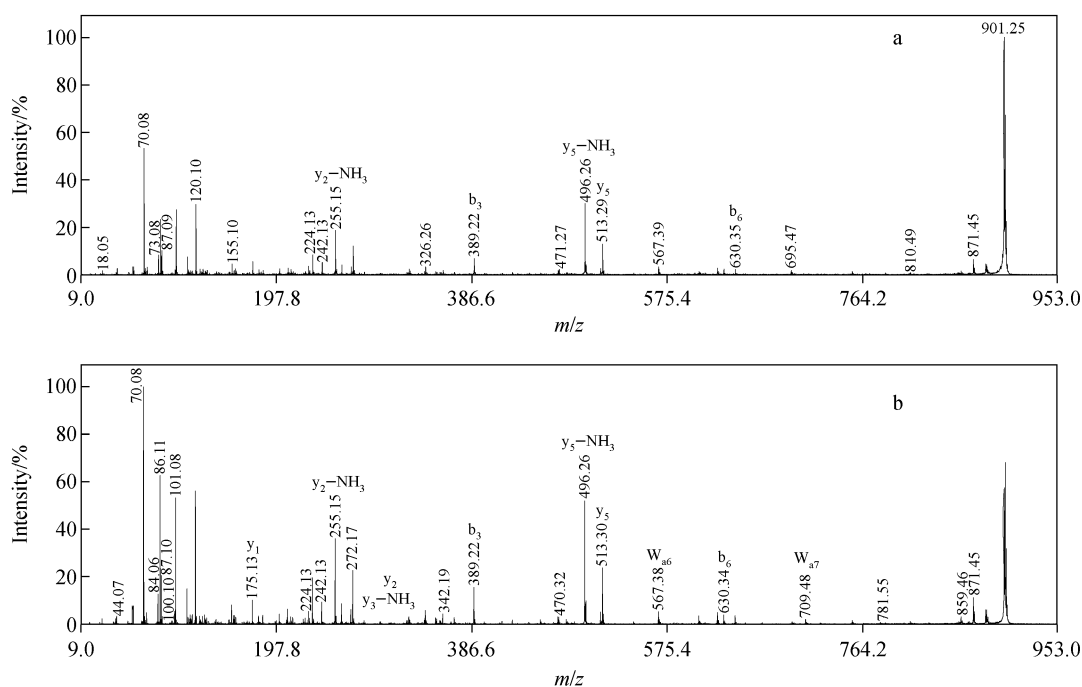


图5 100 nmol/L FLQPGSPR(a)和100 nmol/L FIQPGSPR(b)的串联飞行时间质谱图

Fig. 5 MALDI-TOF/TOF CID spectrums of 100 nmol/L FLQPGSPR (a) and 100 nmol/L FIQPGSPR (b)

3 结论

由于蛋白质序列的多样性,很难找到一个通用的标准从 TOF/TOF 谱中直接确定亮氨酸或异亮氨酸。本研究表明,亮氨酸和异亮氨酸残基同分异构体的差异有可能体现在碎片离子的相对强度上。这种方法的缺点是需要合成肽段比较差异性,并且不适于大规模数据分析。

参考文献:

- [1] PEVTSOV S, FEDULOVA I, MIRZAEI H, et al. Performance evaluation of existing de novo sequencing algorithms[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(11): 3 018-3 028.
- [2] MENSCHAERT G, VANDEKERCKHOVE T T M, BAGGERMAN G, et al. A Hybrid, de novo based, genome-wide database search approach applied to the sea urchin neuropeptidome[J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(2): 990-996.
- [3] SHEVCHENKO A, SUNYAEV S, LOBODO A, et al. Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2001, 73(9): 1 917-1 926.
- [4] SIMEONOVA D D, SUSNEA L S, MOISE A, et al. "Unknown Genome" proteomics: A new NAD(P)-dependent epimerase/dehydratase revealed by N-terminal sequencing, inverted PCR, and high resolution mass spectrometry[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2009, 8(1): 122-131.
- [5] WIELSCH N W, THOMAS H, SURENDRANATH V, et al. De novo sequencing of peptides from the parotid secretion of the cane toad, *Bufo marinus* (*Rhinella marina*)[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(2): 2 448-2 456.
- [6] BROWN A C, MOSS S R, WILSON Z A, et al. An isoleucine to leucine substitution in the ACCase of *Alopecurus myosuroides* (black-grass) is associated with resistance to the herbicide sethoxydim Pestic[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2002, 72(3): 160-168.
- [7] WILLIMS J P, CREESE A J, ROPER D R, et al. Hot electron capture dissociation distinguishes leucine from isoleucine in a novel hemoglobin variant, Hb Askew, $\beta 54(D5) Val \rightarrow Ile$ [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2009, 20(9): 1 707-1 713.
- [8] LI M Y, WANG I X, LI Y, et al. Widespread RNA and DNA sequence differences in the human transcriptome[J]. *Science*, 2011, 333 (6 074):

- 53-58.
- [9] ARMIROTTI A, MILLO E, DAMONATE G, et al. How to discriminate between Leucine and isoleucine by low energy ESI-TRAP MSⁿ [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2007, 18(7): 57-63.
- [10] KRISHNA P, PRABHAKAR S, VAIRAMANI M. Differentiation of derivatized leucine and isoleucine by tandem mass spectrometry under liquid secondary ion mass spectral conditions[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998, 12(20): 1 429-1 434.
- [11] HULST A G, KIENZ C E. Differentiation between the isomeric amino acids leucine and isoleucine using low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 1996, 31(10): 1 188-1 190.
- [12] ARMIROTTI A, SCAPOLLA C, BENATTI U, et al. Electrospray ionization ion trap multiple-stage mass spectrometric fragmentation pathways of leucine and isoleucine: An ab initio computational study[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, 21(19): 3 180-3 184.
- [13] WU L M, LEMR K, AGGERHOLM T, et al. Recognition and quantification of binary and ternary mixtures of isomeric peptides by the kinetic method: Metal ion and ligand effects on the dissociation of metal-bound complexes[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2003, 14(2): 152-160.
- [14] SOLTWISCH J, DREISEWERD K. Discrimination of isobaric leucine and isoleucine residues and analysis of post-translational modifications in peptides by MALDI in-source decay mass spectrometry combined with collisional cooling[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 82(13): 5 628-5 635.
- [15] COOK S L, COLLIN O L, JACKSON G P. Metastable atom-activated dissociation mass spectrometry: Leucine/isoleucine differentiation and ring cleavage of proline residues[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2009, 44(8): 1 211-1 223.
- [16] LEE S S, LIM J, TAN S, et al. Accurate MALDI-TOF/TOF sequencing of one-bead-one-compound peptide libraries with application to the identification of multiligand protein affinity agents using in situ click chemistry screening[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 82(2): 672-679.
- [17] EKMAN R, SILBERRING J, WESTMAN-BRINKMÅLM A, et al. Mass spectrometry instrumentation, interpretation, and applications [J]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, INC, 2008, 89-103.
- [18] HUANG L, BALDWIN M A, MALTBY D A, et al. The identification of protein-protein interactions of the nuclear pore complex of *Saccharomyces cerevisiae* using high throughput matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2002, 1(6): 434-450.
- [19] ZHANG L Y, REILLY J P. Peptide de novo sequencing using 157 nm photodissociation in a tandem time-of-flight mass spectrometer[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 82(3): 898-908.
- [20] GOGICHAEVA N V, WILLIAMS T, ALTERMAN M A. MALDI TOF/TOF tandem mass spectrometry as a new tool for amino acid analysis [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2007, 18(2): 279-284.
- [21] VESTAL M L, CAMPBELL J M. Tandem time-of-flight mass spectrometry[J]. *Methods in Enzymology*, 2005, 402: 79-108.
- [22] KANAZAWA M, ANYOJI H, OGIWARA A, et al. De novo peptide sequencing using ion peak intensity and amino acid cleavage intensity ratio [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(9): 1 068-1 072.
- [23] SACHON E, CLODIC G, GALANTH C, et al. D-amino acid detection in peptides by MALDI-TOF-TOF [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 81(11): 4 389-4 396.
- [24] MCLUCKEY S A, MENTINOVA. M. Ion/ion interactions in tandem mass spectrometry: Do we need them all? Are they enough? [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2011, 22(1): 3-12.
- [25] MEDZIHRADSKY K F, CAMPBELL J M, BALDWIN M A, et al. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2000, 72(3): 552-558.