

碰撞诱导解离和高能碰撞解离方式 进行蛋白质组学分析的比较

王 翌, 孙 伟

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医学院基础学院, 北京 100005)

摘要: 为了比较碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)和高能碰撞解离(high energy collision dissociation, HCD)两种离子裂解模式在蛋白质组学分析方面的差异, 分别应用这两种模式对牛血清白蛋白和细胞裂解物进行分析。通过比较所鉴定到的多肽和蛋白数目, 发现在牛血清白蛋白中, HCD 碎裂方法所得的谱图匹配率和多肽 Mascot 得分均较高, 表明其质谱图质量较好。在复杂样品细胞裂解物分析中, CID 碎裂方法鉴定到的谱图数、多肽数和蛋白数目均较多, 表明该模式的灵敏度较高; HCD 碎裂方法所得的谱图匹配率和 Mascot 得分均较高, 表明其质谱图质量较好。因此, 这两种模式均可用于大规模蛋白质组学分析, CID 模式可提供更高的灵敏度, 而 HCD 模式则可获得更高质量的质谱谱图。

关键词: 质谱; 碰撞诱导解离(CID); 高能碰撞解离(HCD); 蛋白质组学分析

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2016)01-0140-07

doi: 10.7538/zpxb.youxian.2016.0004

Comparison of Collision Induced Dissociation and High Energy Collision Dissociation for Proteomic Analysis

WANG Zhao, SUN Wei

(Institute of Basic Medical Sciences of Chinese Academy of Medical Sciences,
School of Basic Medicine of Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract: To comprehensively compare the difference of collision induced dissociation (CID) and high energy collision dissociation (HCD), the tryptic digests of bovine serum albumin (BSA) and cell lysates were analyzed by LTQ-Velos Orbitrap. The HCD fragmentation identified more peptides and this mode showed higher MS/MS success rate and higher Mascot score in the tryptic digests of BSA. The results demonstrated that the HCD fragmentation has higher MS/MS spectra quality than CID. But in the tryptic digests of cell lysates, the CID fragmentation identified more MS/MS spectra, peptides and proteins, which indicated that it produces higher sensitivity. The HCD fragmenta-

收稿日期: 2015-06-11; 修回日期: 2015-08-11

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2013CB530805, 2014CBA02005); 中国科技部重点基础研究计划(2013FY114100)资助

作者简介: 王 翌(1989—), 女(汉族), 山东人, 硕士研究生, 药理学专业。

E-mail: wangzhao_0508@163.com

通信作者: 孙 伟(1973—), 男(汉族), 吉林人, 副研究员, 从事临床蛋白质组学及生物信息学研究。E-mail: sunwei1018@sina.com

网络出版时间: 2016-01-19; 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20160119.0905.002.html>

tion shows higher MS/MS success rate and higher Mascot score distribution, demonstrating higher quality of MS/MS spectrum. Therefore, based on these findings, both CID and HCD modes could be used for large-scale proteomic analysis. The CID mode has higher sensitivity, and HCD mode can achieve higher quality of MS/MS spectrum.

Key words: mass spectrometry; collision induced dissociation (CID); high energy collision dissociation (HCD); proteomic analysis

目前,蛋白质组学研究中最常用的母离子碎裂方法主要有碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)和高能碰撞解离(high energy collision dissociation, HCD)^[1]。二维线性离子阱质谱(LTQ)的CID模式在蛋白质组学研究中的使用最为广泛,该模式通过CID方法碎裂母离子,然后子离子在LTQ分析器中以低分辨率和精度进行扫描,其扫描速度快,但二级谱图的质量分辨率较低,同时有离子阱的“三分之一效应”,限制了该模式在翻译后修饰以及一些定量分析中的应用。应用傅里叶变换(FT)静电场轨道阱质谱(orbitrap)作为分析器的HCD模式,其碎裂过程类似于三重四级杆质谱^[2-3],可以克服离子阱的“三分之一效应”^[2,4],碎裂效率高,已成功应用于翻译后修饰^[2,4-5]、同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)的研究^[1,6-7]中。

CID和HCD已广泛用于蛋白质组学分析中^[8-12],一些文献直接或间接地比较了这两种碎裂模式的不同^[6,13-15],但并没有全面分析二者在蛋白质组鉴定上的差别以及各自的特点,也没有同时使用不同复杂性、丰度范围组成的蛋白质样品对这两种碎裂模式进行综合比较。因此,本实验拟利用简单样品牛血清白蛋白(BSA)和复杂样品细胞裂解物的酶切产物对CID和HCD模式的性能进行全面地分析比较。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

LTQ-Orbitrap Velos 质谱仪、Advance CaptiveSpray 喷雾源:美国 Thermo 公司产品;Acquity UPLC 液相色谱仪:美国 Waters 公司产品;反相 C18 毛细管液相色谱柱:美国 Michrom Bioresources 公司产品。

HPLC 级乙腈(ACN)、甲酸(FA)、碳酸氢

铵、碘乙酰胺(IAA)、二硫苏糖醇(DTT)、测序级胰蛋白酶、苯甲基磺酰氟(PMSF):均为美国 Sigma-Aldrich 公司产品;牛血清白蛋白(BSA):北京鼎国昌盛生物技术有限公司产品;去离子水:由 Milli-Q 超纯水系统制得。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白样品制备 人肝癌细胞系(Huh7.5.1)在含10%胎牛血清的DMEM培养基(含2 mmol/L L-谷氨酰胺,100 U/mL 青霉素,100 g/L 链霉素)中培养。将细胞收获在50 mL离心管中,以2 000 r/min离心5 min,用磷酸盐缓冲液洗涤5次后,加入裂解液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris),50 mmol/L DTT,1 mmol/L PMSF,1 mmol/L 核糖核酸(RNA)酶,1 mmol/L 脱氧核糖核酸(DNA)酶),冰上裂解。用Bradford法测定细胞蛋白浓度。

1.2.2 蛋白酶切 首先将蛋白样品加入到20 mmol/L DTT中,于95℃还原3~5 min,然后转移至10 ku过滤器中,用8 mol/L 尿素洗涤1次,以12 000 r/min离心40 min;向混合物中加入55 mmol/L IAA,在黑暗条件下进行30 min烷基化反应,然后用8 mol/L 尿素洗涤2次;再用50 mmol/L 碳酸氢铵洗涤蛋白溶液1次,加入胰蛋白酶(1 μg/50 μg 蛋白),于37℃下消化过夜;最后将所得的多肽混合物在Waters Oasis C18 固相萃取柱上脱盐;所有样品都冷冻干燥,待质谱分析。

1.2.3 液相色谱与质谱联用分析 将冻干样品重溶于0.1%甲酸(缓冲液A)中,用反相C18毛细管液相色谱柱(100 μm×150 mm×3 μm)分离;再用5%~30%缓冲液B(0.1%甲酸-99.9%乙腈)进行梯度洗脱,BSA样品洗脱时间为15 min,细胞样品洗脱时间为100 min;使用LTQ-Orbitrap Velos进行样品分析,仪器设置的3种模式列于表1。

表 1 LTQ-Orbitrap Velos 三种模式的参数设置

Table 1 LTQ-Orbitrap Velos parameter settings of three modes

仪器模式	一级质谱 分辨率	二级质谱 分析器	二级质谱 激活 时间/ms	二级质谱 分辨率	自动增益 控制	二级质谱 最大注入 时间/ms	数据依赖 扫描数目	标准化 碰撞能量	二级质谱 触发阈值
FT-LTQ-CID	60000	LTQ	10	单位质量	5000	100	20	35	500
FT-FT-CID	30000	Orbitrap	10	7500	50000	500	10	35	500
FT-FT-HCD	30000	Orbitrap	0.1	7500	50000	500	10	40	5000

其他设置包括:内部质量校正(m/z 445.120 025 离子作为锁定质量且目标锁定质量丰度为0%);电荷状态检查(排除未知带电状态或+1电荷态的母离子);动态排除(排除列表为500个离子,排除持续时间为90 s)。

1.2.4 数据处理 采用 Mascot(Matrix Science, version 2.3.02)对二级质谱结果进行检索,所用数据库为 IPI 数据库(bovine and human, www.ebi.ac.uk/IPI/, version 3.07)。检索条件为:胰酶酶切,允许有2个漏切位点,固定修饰为半胱氨酸+57 u;肽段检索误差为 5×10^{-6} ,子离子容许误差分别为0.5 u(FT-LTQ-CID)、0.02 u(FT-FT-CID, FT-FT-HCD)。鉴定结果的假阳性率均为谱图水平的1%。

2 结果与讨论

2.1 简单样品酶解产物的分析比较

目前,在 LTQ-Orbitrap Velos 质谱仪上进行 CID 和 HCD 两种碎裂方式的比较一般采用 FT-LTQ-CID 和 FT-FT-HCD 两种模式。这两种模式母离子碎裂后的谱图采集方式分别为低分辨离子阱(CID)和高分辨轨道阱(HCD),因此它们的采集模式、采集时间和二级谱图质量均不同。为了排除由于采集方式不同而造成的鉴定结果的不同,本研究尝试用 FT-LTQ-CID, FT-FT-HCD 和 FT-FT-CID 3种模式同时进行分析比较,以全面分析 CID 和 HCD 两种碎裂方式在蛋白质鉴定上的差别。

在 BSA 胰蛋白酶酶解产物分析中,考察了不同上样量(0.1、1、10、100 fmol)在3种模式下的差异,每种上样量重复分析3次,结果示于图1。

由图1a可见,当上样量为1~100 fmol时,FT-FT-HCD模式鉴定到的二级谱图数最

多。由图1c可见,在各上样量条件下,FT-LTQ-CID模式采集到的二级谱图数目均为最多,FT-FT-HCD模式均为最少,表明这3种模式的二级质谱扫描时间存在差异。

在1~100 fmol上样量时,3种模式鉴定到的多肽数无明显差异,示于图1b。而 FT-FT-HCD 和 FT-FT-CID 模式的二级谱图匹配率(鉴定到的二级质谱图数/采集到的二级质谱图数)高于 FT-LTQ-CID,示于图1d,表明前两种模式获得的谱图质量较高。

为了深入地比较这3种模式的差异,选取3种模式中每种上样量条件下都能鉴定到的4种多肽(“CCTESLVNR”, “LVNELTEFAK”, “KVPQVSTPTLVEVSR”, “YICDNQDTISSK”),计算其平均 Mascot 得分,结果示于图1e。结果表明,在1~100 fmol上样量时,FT-FT-CID 和 FT-FT-HCD 模式的得分明显高于 FT-LTQ-CID 模式,进步说明了 FT-FT-CID 和 FT-FT-HCD 模式下获得的二级谱图质量更高。

为了考察实验的重复性,进行了重复实验间 BSA 鉴定二级质谱图数目的变异系数(CV)分析,结果示于图1f。由图可见,在1~100 fmol上样量时,3种模式的 CV 值都小于5%,说明本实验的重复性良好。在最低上样量0.1 fmol时,3种模式的 CV 值分别为66%(FT-FT-CID),30%(FT-LTQ-CID)和15%(FT-FT-HCD)。这表明,FT-FT-CID 和 FT-LTQ-CID 两种模式的最低上样量应高于0.1 fmol,而 FT-FT-HCD 模式的最低上样量可为0.1 fmol。因此,在简单样品分析时,FT-FT-HCD 模式灵敏度最高。

2.2 复杂细胞样品酶解产物的分析比较

本研究选用细胞裂解产物酶切后所得到的肽段进行3种模式的复杂样品分析比较,每种模式重复分析2次,结果列于表2。

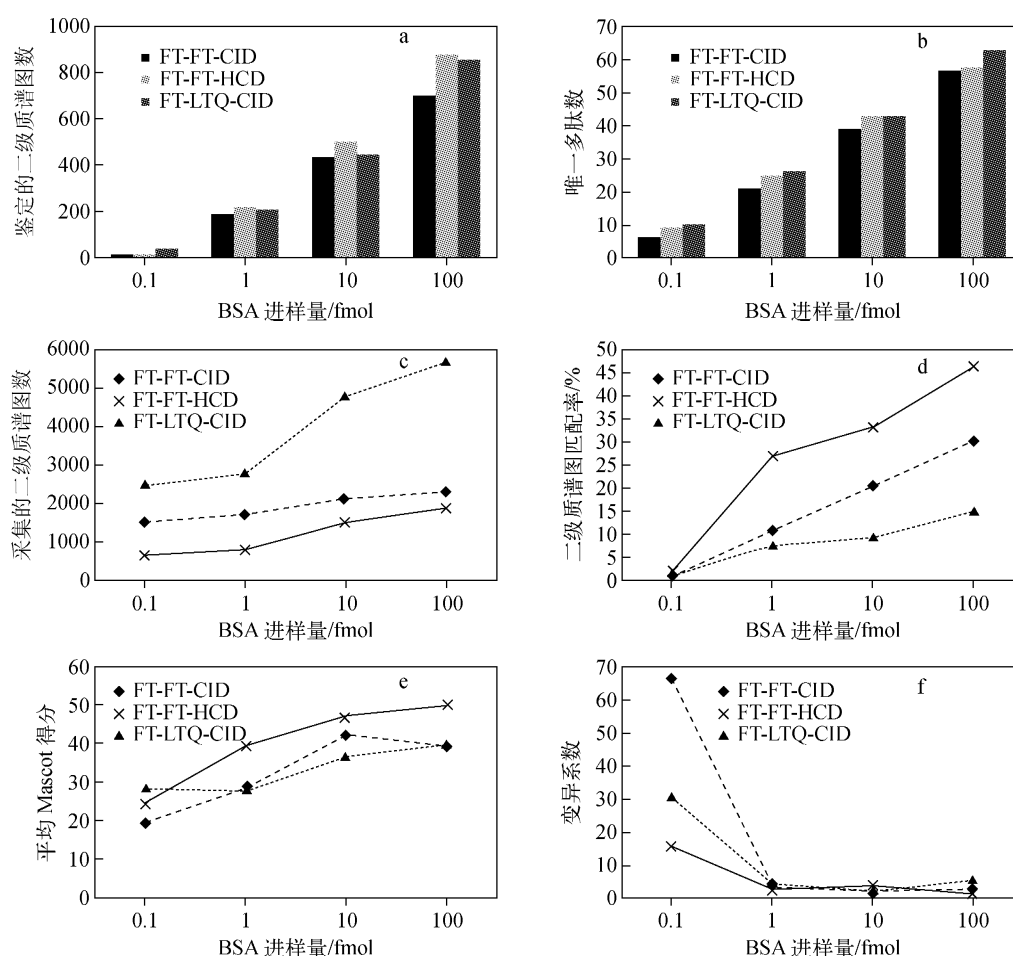


图 1 三种模式分析 BSA 胰蛋白酶酶解产物的结果比较

Fig. 1 Comparison of FT-FT-CID, FT-FT-HCD and FT-LTQ-CID modes on a BSA digest

表 2 三种模式对复杂蛋白样品的分析比较

Table 2 Comparison of FT-FT-CID, FT-FT-HCD and FT-LTQ-CID modes in analysis of complex proteins samples

仪器模式	蛋白数		多肽数 ^b	二级谱图		
	(≥ 1 肽段)	(≥ 2 肽段) ^a		采集的谱图数	鉴定的谱图数	匹配率/% ^c
FT-LTQ-CID	1857	1110	8873	39379	18468	46.90
FT-FT-CID	1460	846	6586	28340	14642	51.67
FT-FT-HCD	1641	978	7757	31909	18312	57.39

注: a. 鉴定到 2 个及以上唯一多肽的蛋白数; b. 唯一多肽数; c. 二级谱图匹配率=鉴定的谱图数/采集的谱图数

由表 2 可见, 3 种模式下, FT-LTQ-CID 模式采集的二级谱图数目、多肽数和蛋白数目均最多, 表明该模式的灵敏度最高。FT-FT-HCD 模式获得的二级谱图总扫描数比 FT-LTQ-CID 模式少 20%, 但二者可成功鉴定的二级质谱图数目却相似, 而且 FT-FT-HCD 的二级质谱图匹配率比 FT-LTQ-CID 模

式高, 表明 HCD 的谱图质量较高。但 FT-FT-HCD 模式鉴定到的蛋白和多肽数比 FT-LTQ-CID 少 10%, 表明该模式的检测灵敏度较低。FT-FT-CID 模式所得的总二级质谱图、蛋白和多肽数目均为最少, 但二级质谱图匹配率却比 FT-LTQ-CID 高, 表明前者的二级质谱图质量较好。

本研究对每种模式进行2次重复实验,结果列于表3。由表3可知,3种模式在蛋白质水平的重复率均超过80%。分别对鉴定到的蛋白和多肽做一元线性回归分析,其线性相关系数 R^2 均大于95%,表明两组实验之间的数据重复性较好。

表3 三种模式分析复杂蛋白样品的重复性实验

Table 3 Repeatability of FT-FT-CID, FT-FT-HCD and FT-LTQ-CID modes for assessing complex proteins samples

仪器模式	蛋白鉴定 重复率/%	多肽鉴定 重复率/%	R^2 /%
FT-LTQ-CID	80.0	75.5	97.1
FT-FT-CID	86.8	84.2	95.8
FT-FT-HCD	87.9	86.2	98.0

利用多肽的 Mascot 得分进一步分析3种模式的二级质谱图质量。3种模式的平均 Mascot 得分分别为68.73(FT-LTQ-CID)、76.63(FT-FT-CID)和74.83(FT-FT-HCD)。为了更好地展现3种模式二级质谱图质量的差别,按 Mascot 得分区段将3种模式鉴定到的多肽进行划分,示于图2。由图可见:FT-LTQ-CID模式在 Mascot 得分小于50的多肽中所占比例最大,在得分大于100的多肽中所占比例最小;

FT-FT-HCD模式在 Mascot 得分小于50的多肽中所占比例最少,而在得分大于100的多肽中所占比例最大。以上结果表明,FT-FT-HCD模式的平均 Mascot 得分比另外两种模式高,进而说明 FT-FT-HCD 模式获得的二级质谱图质量最好。

2.3 讨论

FT-LTQ-CID模式的母离子碎裂和子离子扫描都在离子阱中进行,因此该模式的循环时间最短、扫描速度最快、所得总谱图数量最多;FT-FT-HCD模式先将母离子转移至八极杆中进行碎裂,然后在 Orbitrap 中进行子离子扫描,该模式的扫描时间最长、扫描速度最慢、所得总谱图数量最少;FT-FT-CID模式母离子碎裂在离子阱中进行,子离子扫描在 Orbitrap 中进行,该模式的扫描时间、循环时间、所得总谱图数量均介于 FT-LTQ-CID 模式和 FT-FT-HCD 模式之间^[16-18]。

FT-LTQ-CID模式扫描速度快、循环周期短,采集到的二级质谱图数最多,鉴定到的蛋白和多肽数目最多,但由于扫描时间的限制,该模式所得的二级质谱图质量较低,因此二级质谱图的鉴定率、多肽 Mascot 得分也较低;FT-FT-HCD模式扫描速度慢,所采集到的二级质谱图质量最好,多肽的 Mascot 得分最高,因此具有最高的二级质谱图鉴定率^[19-20]。

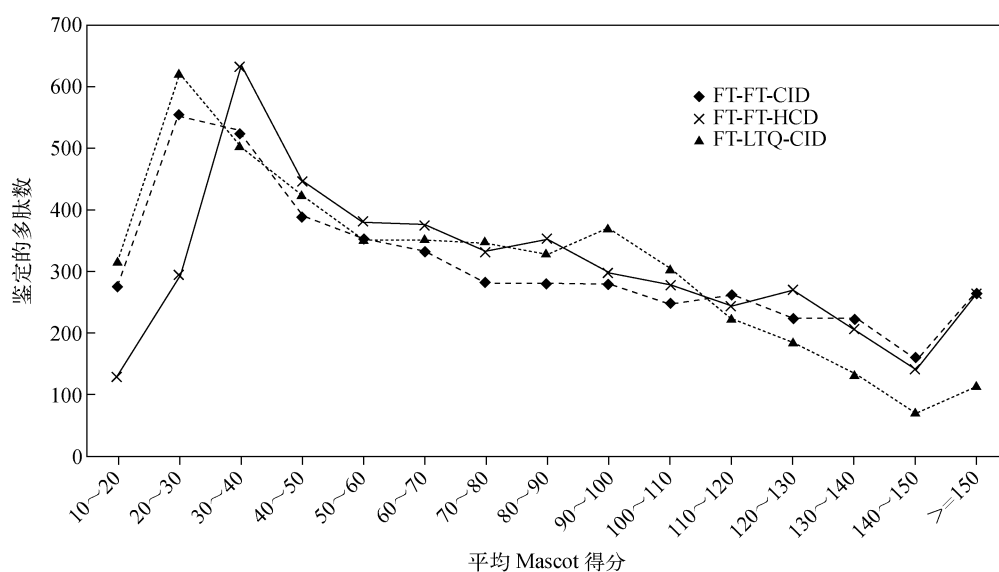


图2 三种模式下,在复杂样品中鉴定到的多肽 Mascot 得分分布

Fig. 2 Mascot score distribution of FT-FT-CID, FT-FT-HCD and FT-LTQ-CID modes from cell lysates

有两个因素可以解释这些现象:首先,FT-FT-HCD模式使用 Orbitrap 作为分析器,其产生的二级谱图具有更高的分辨率和准确性,而在 Mascot 搜索引擎中更容易将二级质谱图分配给多肽,且得分更高;其次,在都使用 Orbitrap 分析器的前提下,FT-FT-HCD模式比 FT-FT-CID模式鉴定到了更多的蛋白质和多肽,而且成功匹配率和 Mascot 得分分布均较高,表明 FT-FT-HCD模式获得的二级质谱图质量比 FT-FT-CID模式好,这可能是由于 HCD 碎裂模式可以克服离子阱的“三分之一效应”,获得了更多的子离子信息,因此比 CID 碎裂更高效。

3 结论

通过对 FT-LTQ-CID、FT-FT-HCD、FT-FT-CID 进行同时分析比较,发现 FT-LTQ-CID 模式的灵敏度最高、扫描速度最快,可用于蛋白质样品的定性和定量分析;而 FT-FT-HCD 模式的碎裂效率更高、二级谱图质量更好,同样也可以用于蛋白质组学分析,特别是细胞培养条件下稳定同位素标记技术(stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC)和 iTRAQ 定量方法中。

参考文献:

- [1] DAYON L, PASQUARELLO C, HOOGLAND C, et al. Combining low- and high-energy tandem mass spectra for optimized peptide quantification with isobaric tags [J]. *J Proteomics*, 2010, 73(4): 769-777.
- [2] OLSEN J V, MACEK B, LANGE O, et al. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis[J]. *Nat Methods*, 2007, 4(9): 709-712.
- [3] MANN M, KELLEHER N L. Precision proteomics: The case for high resolution and high mass accuracy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(47): 18 132-18 138.
- [4] NAGARAJ N, D'SOUZA R C, COX J, et al. Feasibility of large-scale phosphoproteomics with higher energy collisional dissociation fragmentation[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(12): 6 786-6 794.
- [5] ZHANG Y, FICARRO S B, LI S, et al. Optimized Orbitrap HCD for quantitative analysis of phosphopeptides[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20(8): 1 425-1 434.
- [6] MCALISTER G C, PHANSTIEL D, WENGER C D, et al. Analysis of tandem mass spectra by ORBIMS for improved large-scale proteomics with superior protein quantification [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(1): 316-322.
- [7] CASADO-VELA J, MARTINEZ-ESTESO M J, RODRIGUEZ E, et al. iTRAQ-based quantitative analysis of protein mixtures with large fold change and dynamic range[J]. *Proteomics*, 2010, 10(2): 343-347.
- [8] LI Y, WANG X, AO M, et al. Aberrant Mucin5B expression in lung adenocarcinomas detected by iTRAQ labeling quantitative proteomics and immunohistochemistry[J]. *Clin Proteomics*, 2013, 10(1): 15.
- [9] BOJA E S, PHILLIPS D, FRENCH S A, et al. Quantitative mitochondrial phosphoproteomics using iTRAQ on an LTQ-Orbitrap with high energy collision dissociation[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(10): 4 665-4 675.
- [10] MARIMUTHU A, SUBBANNAYYA Y, SAHASRABUDDHE N A, et al. SILAC-based quantitative proteomic analysis of gastric cancer secretome[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2013, 7(5/6): 355-366.
- [11] THIEDE B, KOEHLER C J, STROZYNSKI M, et al. High resolution quantitative proteomics of HeLa cells protein species using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC), two-dimensional gel electrophoresis (2DE) and nano-liquid chromatography coupled to an LTQ-OrbitrapMass spectrometer[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(2): 529-538.
- [12] CAO R, CHEN K, SONG Q. Quantitative proteomic analysis of membrane proteins involved in astroglial differentiation of neural stem cells by SILAC labeling coupled with LC-MS/MS[J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(2): 829-838.
- [13] OLSEN J V, SCHWARTZ J C, GRIEP-RAMING J, et al. A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(12): 2 759-2 769.

- [14] FRESE C K, ALTELAAR A F, HENNRICH M L, et al. Improved peptide identification by targeted fragmentation using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(5): 2 377-2 388.
- [15] SHAO C, ZHANG Y, SUN W. Statistical characterization of HCD fragmentation patterns of tryptic peptides on an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer[J]. *J Proteomics*, 2014, 109: 26-37.
- [16] HU Q, NOLL R J, LI H, et al. The Orbitrap: A new mass spectrometer[J]. *J Mass Spectrom*, 2005, 40(4): 430-443.
- [17] MAKAROV A, DENISOV E, KHOLOMEEV A, et al. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(7): 2 113-2 120.
- [18] MAKAROV A, DENISOV E, LANGE O, et al. Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2006, 17(7): 977-982.
- [19] 李明, 马家辰, 李红梅, 等. 静电场轨道阱质谱的进展[J]. *质谱学报*, 2013, 34(3): 185-192.
- LI Ming, MA Jiachen, LI Hongmei, et al. Progress on electrostatic Orbitrap mass spectrometer[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2013, 34(3): 185-192(in Chinese).
- [20] 王勇为. LTQ-Orbitrap Velos 双分压线性阱和静电场轨道阱组合式高分辨质谱性能及应用[J]. *现代仪器*, 2010, 16(5): 15-19.
- WANG Yongwei. The performance and featured applications of ltq orbitrap velos, a hybrid high resolution mass spectrometer using electrostatic orbital mass analyzer coupled with dual pressure ion trap[J]. *Modern Instruments*, 2010, 16(5): 15-19(in Chinese).