

蛋白质立体化学修饰的离子淌度质谱研究进展

许霞¹, 朱致君², 李灵军², 李功玉^{1,3}

(1. 南开大学化学学院分析科学研究中心, 天津市生物传感与分子识别重点实验室, 天津 300071;

2. 威斯康星大学麦迪逊分校化学系和药学院, 威斯康星州 53705;

3. 物质绿色创造与制造海河实验室, 天津 300192)

摘要: 蛋白质立体化学修饰是一类低丰度、与人类多种疾病相关的翻译后修饰, 由于其并未改变蛋白质的分子质量, 难以通过传统的蛋白组学鉴定方法进行发现与鉴定。离子淌度质谱(IM-MS)技术依据不同离子在漂移管中与缓冲气体碰撞后迁移速率的不同而快速分离离子, 提供了一种基于构象、电荷数、尺寸和分子质量的分离手段, 已在蛋白质立体化学修饰的鉴定与分离分析中取得了阶段性进展。本文从非变性离子淌度质谱实验的角度出发, 介绍了漂移管离子淌度仪、行波离子淌度仪、微分迁移率分析仪、高场不对称离子淌度仪以及捕获离子淌度仪等5种商业化离子淌度仪的性能。在此基础上, 总结了立体化学修饰高分辨离子淌度质谱分离分析与鉴定方法的最新研究进展, 同时介绍了立体化学修饰调控的配体-受体相互作用的结构质谱表征策略, 尤其对碰撞诱导去折叠技术在复合物手性构象差异中的研究进行阐述。最后, 展望了基于IM-MS的立体化学修饰鉴定与定量等研究方向, 以为立体化学修饰的下一阶段发展提供参考。

关键词: 离子淌度质谱(IM-MS); 立体化学修饰; D-型突变多肽蛋白; 神经肽受体; 碰撞诱导去折叠

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2022)05-0580-16

doi: 10.7538/zpxb.2022.0081

Recent Progress in Protein Stereochemical Modifications Revealed by Ion Mobility-Mass Spectrometry

XU Xia¹, ZHU Zhi-jun², LI Ling-jun², LI Gong-yu^{1,3}

(1. Tianjin Key Laboratory of Biosensing and Molecular Recognition,

Research Center for Analytical Science, College of Chemistry, Nankai University,

Tianjin 300071, China; 2. School of Pharmacy and Department of Chemistry,

University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53705, USA;

3. Haihe Laboratory of Sustainable Chemical Transformations, Tianjin 300192, China)

Abstract: Protein stereochemical modification (SCM) is a unique type of low-abundance post-translational modification associated with many human diseases. Because it does not change the molecular weight of proteins, traditional proteomics methods are generally not suitable for their discovery and identification. As ions migrate differentially when they collide with the buffer gas in a drift tube, the ions can be separated according to their mass, shape and charge by ion mobility-mass spectrometry (IM-MS), thus

providing a means of conformation-based separation, which enables fast identification and separation of protein SCM. In this review, from the perspective of native IM-MS, the performances of five commercial ion mobility analyzers were introduced and compared, including drift tube ion mobility spectrometer, traveling wave ion mobility spectrometer, differential mobility analyzer, high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometer, and trapped ion mobility spectrometer. It was focused on the recent advances of the analysis and identification for protein SCM *via* native IM-MS, and the role of structural MS strategy in the study of SCM effect on ligand-receptor interactions, especially the application of collision-induced unfolding techniques to the conformational study of chirality-regulated neuropeptide-receptor complexes. Finally, the future directions of IM-MS-based SCM identification and quantification were discussed, and guidelines for the next phase study of protein SCM were offered.

Key words: ion mobility-mass spectrometry (IM-MS); stereochemical modification; *D*-amino acid-containing peptide/protein; neuropeptide receptor; collision-induced unfolding

立体化学修饰的多肽蛋白 (stereochemically modified peptide/protein, SCMP) 是天然存在的一种含量较低, 但与多种疾病相关的蛋白形式。与其他常见的蛋白质翻译后修饰类似, 立体化学修饰 (stereochemical modification, SCM) 调控着一系列重要蛋白的结构和功能。大量研究表明^[1], 信号转导神经肽的修饰直接影响生物活性。因此, 研究以 SCMP 异构体形式存在的神经肽和蛋白质结构对于阐明其构效关系具有重要意义^[2-7]。

多肽蛋白立体化学修饰可导致天然氨基酸空间立体异构化。目前报道最多的 SCMP 是单位点或极少数位点由 *L*-构型异构化为 *D*-型, 这类蛋白和多肽最早被美国伊利诺伊大学香槟分校 Jonathan Sweedler 课题组^[7] 命名为包含 *D*-型氨基酸的多肽/蛋白 (*D*-amino acid-contain-

ing peptide/protein, DAACP)。立体化学修饰数据库正在逐年扩大, 截至目前, 至少有 55 种蛋白多肽体系中存在立体化学修饰, 列于附表 1 (请登录《质谱学报》官网 <http://www.jcmss.com.cn> 下载)。已报道的大部分 SCMP 分子质量集中分布在 400~2 200 u 之间, 少数的分子质量超过 5 000 u; 氨基酸的突变位点大多发生在 N 端的第 2、3 位上, 其中以苯丙氨酸、亮氨酸和丙氨酸的突变数量最多, 示于图 1。突变位点规律性主要取决于宿主生物的酶促体系, 而分子质量分布范围在很大程度上受限于立体化学修饰鉴定手段和仪器设备的灵敏度及适用范围。

这些 SCMP 的发现主要来源于单细胞甲壳类等低等生物, 包括海蛞蝓加利福尼亚海兔^[8-9]、美洲龙虾^[10]、小龙虾克氏原螯虾^[11]、鸭

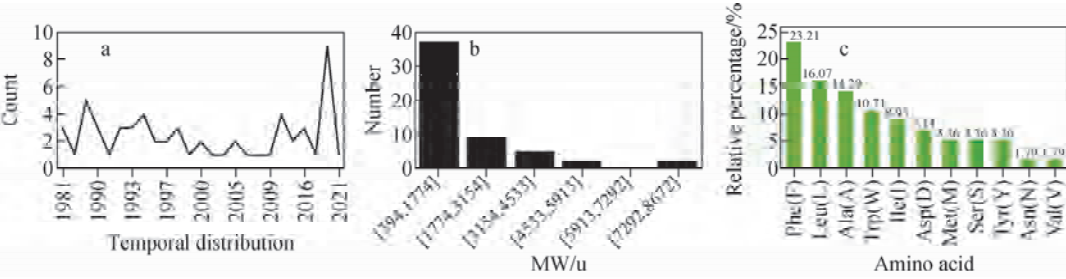


图 1 立体化学修饰多肽蛋白的发现年代(a), 分子质量(b)及突变位点统计(c)分布

Fig. 1 Distributions of temporal (a), molecular weight (b) and mutation site distribution (c) of stereochemically modified peptide/protein

嘴兽^[12]、锥螺的毒液^[13]、漏斗网蜘蛛和南美树蛙^[14-15]等。立体化学修饰经常在动物毒液中被检测到,也有在人类各种组织(包括牙齿、皮肤和大脑)的衰老蛋白中 *D*-异构化氨基酸残基的报道^[16]。由于内源性酶只识别由 *L*-氨基酸组成的蛋白质和肽,而在大多数神经肽中 DAACP 通常含有 1 个 *D*-氨基酸,对内源性酶具有更大的抗性。因此,SCMP 往往比天然蛋白多肽具有更长的寿命^[17-18]。一般认为,动物细胞中大多数 SCMP 的生成与酶促反应相关,与此同时,酶促反应之外的化学调控因子也可能参与人体组织中几种年龄依赖型蛋白的立体化学修饰^[19]。与内源性神经肽相比,在许多情况下,立体化学修饰的神经肽异构体具有更高的生物活性^[7,18]。但也有报道^[20]指出,相比于全位点突变,单位点或者部分位点突变的 DAACP 具有更高的毒性。这表明,增加立体化学修饰的检测和识别能力,对探究 SCMP 的发生过程与机制、化学调控、以及靶向 SCMP 药物开发与设计都起着重要的支撑作用。

与其他修饰不同,立体化学修饰并没有引起蛋白和多肽分子质量的改变,基于质谱的常规蛋白多肽检测技术难以实现对 SCMP 的有效分离与鉴定。离子淌度质谱(ion mobility-mass spectrometry, IM-MS)受益于离子淌度仪在质谱基础上进行的二维分离,不仅具备分析速度快和耗样量少的优点,而且可以根据目标离子的构象与尺寸在毫秒级时间尺度上进行高效分离分析。随着硬件、软件和数据分析等方面的快速发展,近些年来 IM-MS 技术已成为 SCMP 分离分析与快速鉴定的一种重要方法^[2,4,21-27]。

本文将围绕离子淌度质谱和非变性质谱的核心技术,重点介绍多种商业化离子淌度仪的性能差异、SCMP 高分辨离子淌度质谱分离分析与鉴定方法的最新进展、SCMP 与受体相互作用的结构质谱表征策略,并展望立体化学修饰与离子淌度仪的发展方向与应用前景。

1 离子淌度质谱的工作原理与常见类型

1.1 工作原理

离子淌度质谱(也称“离子迁移质谱”)是在常规质谱的基础上串联离子淌度仪,根据

质荷比(m/z)以及离子迁移率实现目标离子的二维在线分离。IM-MS 的基本工作原理是离子在漂移管飞行时与缓冲气体(通常为氮气、氦气和氩气)碰撞,由于离子形状、大小和电荷数不同而受到的阻力不同,在相同电场中通过相同距离漂移管所需要的时间不同,由此实现对目标离子的快速分离。通过一定的物理模型与近似处理,可将迁移时间转换成与离子结构相关的物理参数——碰撞截面积(collisional cross-section, CCS)。与传统质谱相比,离子淌度质谱可以对 m/z 相同的离子在离子淌度维度进行二维分离,提高了构象分析效果。IM-MS 分离的基本原理可以用 Chapman-Enskog 和 Mason-Schamp^[28] 方程的理论来解释,示于式(1)。

$$K = \frac{3}{16} \left(\frac{2\pi}{\mu k_B T} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{ze}{N\Omega} \quad (1)$$

式中, K 为缓冲气体中特定离子的迁移率,提供了有关离子在穿过缓冲气体时所经历的相互作用信息; μ ($\mu = mM/(m+M)$) 为扩散离子(m)和载气分子(M)这一碰撞粒子对的约化质量; k_B 为玻尔兹曼常数; T 为开尔文温度; z 为离子电荷数; e 为元电荷所带的电荷量(C); N 为中性气体数密度(m^{-3}); Ω 为碰撞截面积(m^2)。式(1)给出了离子迁移率 K 与 CCS 之间的直接关系。离子在漂移管中受库仑力和气体分子碰撞阻碍力的作用,其通过漂移管所需的时间(t_d)与 K 直接相关,而这取决于离子的形状、质量和电荷量。在简化模型中, K 取决于离子与气体分子的碰撞频率,该频率与气体数密度(N =每单位体积的气体分子数)有关。因此,离子迁移率与气体压力(p)和温度(T)相关。实验室常用的约化迁移率(K_0)通过式(2)计算:

$$K_0 = K \cdot \frac{N}{N_0} = K \frac{p}{p_0} \cdot \frac{T_0}{T} \quad (2)$$

式中, p 为气体压力, p_0 为 IUPAC 标准压力(即 100 kPa), T_0 为标准温度(即 273.15 K)。根据气体动力学理论,假设漂移管在低电场条件下发生纯弹性碰撞, t_d 可转化为 CCS,示于式(3):

$$\Omega = \frac{(18\pi)^{1/2}}{16} \frac{ze}{(k_B T)^{1/2}} \left[\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right]^{1/2}$$

$$\frac{t_d E}{L} \frac{760}{P} \frac{T}{273.2} \frac{1}{N} \tag{3}$$

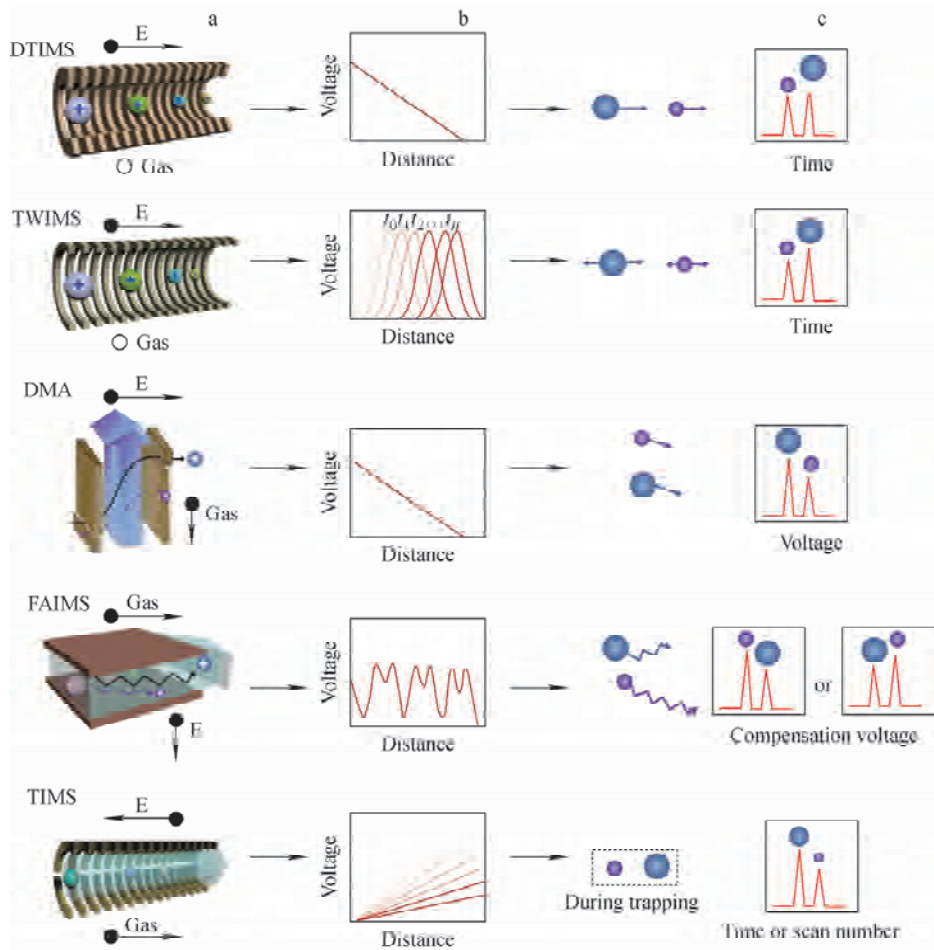
式中,变量 E 、 L 、 P 分别对应电场强度(V/m)、漂移区长度(m)和压力(Torr)。

1.2 常见类型及其性能对比

IM-MS 的仪器构造大部分是将 IMS 连接到 TOF-MS 上,近些年也有将 IMS 连接到 Orbitrap MS 上的报道^[29]。IM-MS 主要根据 IMS 分型进行分类,根据技术特点,离子淌度仪主要分为时间扩散型(time-dispersive)、空间扩散型(spatially dispersive)以及场分散扫描型(field-dispersive scan)^[28,30-31] 3 类。根据基本构造,目前商业化的 IMS 主要包括 5 大类,示于图 2。其中,漂移管离子淌度仪(DTIMS)和行波离子淌度仪(TWIMS)属于时间扩散型,微分迁移率分析仪(DMA)和高场不对称

离子淌度仪(FAIMS)属于空间扩散型,而捕获离子淌度仪(TIMMS)则属于场分散扫描型。提升结构分辨率一直是离子淌度仪发展的主要方向,包括硬件升级改造、原理方法创新以及高级数据采集与分析系统开发等。5 种离子淌度仪的主要特点及分辨率信息列于表 1。

1.2.1 漂移管离子淌度仪 漂移管离子淌度仪(DTIMS)是最早出现、最为经典的 IMS 技术。早在 20 世纪 30 年代,Bradbury 等^[32]就采用 DTIMS 研究气相离子迁移率 K 。DTIMS 由一系列叠环电极组成,在这些电极上,漂移管的轴线上产生了近似均匀的电场。载气和气态样品被引入电离区,而逆流流动的中性气体(主要是氮气、氦气或氩气,被称为漂移气体)从检测区的一侧引入^[33],在漂移管腔体内没有特定



注:a. 构造示意图,由文献[36]改编;b. 气体动力学描述;c. 离子运动规律示意图

图 2 目前市场上 5 种主要离子淌度仪的结构特点示意图

Fig. 2 Schematic diagrams of different types of IM-MS on the market

表 1 目前市场上主要离子淌度仪的基本特征与性能指标
Table 1 Principal characteristics and performance evaluation of the different types of IM-MS on the market

仪器 Instrument	漂移/传输气体 Drift/Transport gas	分类 Classification	电场 Electric field	温度 Temperature/K	压力 Pressure/Pa	线性/非线性 Linear/Nonlinear	分辨率 Resolution	特征 Characteristic
漂移管离子淌度仪 (DTIMS)	固定气体	时间分散	静态电场	300	100	线性	>100	可以直接得出 CCS
行波离子淌度仪 (TWIMS)	固定气体	时间分散	振荡电场	300	0.0025~0.3	线性	~40(cyclic IMS>200)	可以得出大致的 CCS, 条件相对较为温和, 可以实现 CIU 构象分析
微分迁移率分析仪 (DMA)	垂直气流	空间分散	静态电场	302	8~100	线性	>60	高灵敏度和选择性, 无法实现 CCS 测量
高场不对称离子淌度仪 (FAIMS)	平行气流	空间分散	振荡电场	303	100	非线性	>100	连续离子检测,离子 损耗低,高分辨率, 无法实现 CCS 测定
捕获离子淌度仪 (TIMS)	平行气流	场分散	静态电场	304	0.26~0.34	线性	>250	高选择性,高分辨率, 可实现 CCS 测定, 测量条件相对苛刻

的流动方向。离子在有中性气体分子存在的漂移管中通过均匀、连续的电场,以恒定的速度移动。从离子通过漂移管的时间可得离子迁移率 K 。一般来说,CCS 越小、电荷量越高,离子的迁移速度越快。化合物在较高分辨 DTIMS 中能够实现良好的分离,并通过第一性原理可直接得出 CCS 值,实验中,通常在不同电场下多次测量以获得最准确的 CCS 值。由于 DTIMS 分析采用离子脉冲模式,其占空比相较于连续 IMS 要低。

1.2.2 行波离子淌度仪 2006 年,美国 Waters 公司推出首个商业化的基于行波离子淌度仪(TWIMS)的 Synapt HDMS^[34] 离子淌度质谱仪,随后,于 2011 年和 2013 年推出二代基于 TWIMS 的离子淌度质谱仪,分别为 Synapt G2-S 和 Synapt G2-Si。目前,TWIMS 已成为最成熟的 IMS 技术。TWIMS 由施加了行波电压的堆叠环离子导向器组成,将相反相位的射频电压施加到相邻的环形电极以提供径向离子捕获,从而实现高效率传输。脉冲直流电压从设备的一端到另一端连续叠加到每个电极的射频电压上,从而轴向推动离子。在固定的脉冲停留时间后,电压施加到下一个电极对,由此产生行波。针对第一、二代仪器相对较低的分辨率,仪器厂商对 TWIMS 结构进行了优化,如无损离子淌度仪(structure lossless ion manipulation, SLIM)^[24-25,35-36]。SLIM 气相分离的基本原理与 TWIMS 类似。由于 SLIM 中工作气压较低,在射频聚焦电场的辅助下,离子可以在 SLIM 中稳定存储数小时以上,同时实现近乎无损的传输^[37]。TWIMS 能够在比 DTIMS 更小的装置中实现相近分辨率的淌度分离,大大缩小仪器体积。在实现较高分辨率的同时,TWIMS 还可以更好地与商品化质谱仪联用。环状离子淌度仪(cyclic IMS, cIMS)^[38] 是 Waters 公司最新推出的高分辨离子淌度仪,与 TOF MS 联用,实现了超过 200 结构分辨率(基于离子迁移时间计算)的高分辨分离分析,可用于微小结构差异区分。该仪器未来可以改进的空间包括:改善由于多圈扫描引起离子损耗而灵敏度下降的问题、建立完善的多圈扫描后 CCS 校正方法以及提高操作界面用户友好性等方面。

1.2.3 微分迁移率分析仪 微分迁移率分析仪(DMA)是 IMS 的一种特殊结构^[39-40],其工作方式与 DTIMS 类似,都是利用恒定电场,并且均可以测量 K 值。DMA 是基于一个方向的电泳迁移和正交方向的流体驱动迁移在空间上分离离子。在 DMA 中,所有离子必须移动相同的距离到达探测器,只有具有指定迁移率的离子才能从 DMA 的入口穿越到出口。圆柱柱是最常用的 DMA 类型,它由 2 个圆柱形和同心金属电极组成^[41]。DMA 的分离是通过 2 个垂直的力叠加在离子上完成的,2 个阻力分别来自高流速的鞘气和 1 个垂直的电场。利用高鞘流速进行空间分离,可以获得更高的分辨率和灵敏度。DMA 通常用作过滤装置,仅允许在给定的时间传输具有特定淌度值或淌度特性的离子,可以提高分析的选择性,但对于较宽范围的淌度分析,其速度较慢、灵敏度较低。

1.2.4 高场不对称离子淌度仪 高场不对称离子淌度仪(FAIMS)最早是由前苏联人发明的,于 20 世纪 90 年代中期被引入北美后迅速发展。与基于时间分离的 DTIMS 和 TWIMS 不同,FAIMS 是一种空间电迁移谱仪^[42-43]。作为离子迁移谱中较为特殊的一类,FAIMS 是利用离子迁移率在高电场下的非线性变化规律进行分离。在 FAIMS 中,带电粒子暴露于具有相反极性的不对称波形中,这种高电场和低电场周期性交替的非对称波形导致带电粒子在一对等间距的电极之间遵循锯齿形模式运动,并且由于离子迁移率对非线性电场的依赖性而发生分离。FAIMS 具有连续的离子监测能力,并基于离子迁移率正交分离的功能实现高分离选择性;此外,能够同时检测正、负离子,并且具有核心部件小等优点。但在 FAIMS 仪器中检测到的离子丰度相对较低,降低了其检测灵敏度。

1.2.5 捕获离子淌度仪 捕获离子淌度仪(TIMs)是一种相对较新的气相分离仪器^[44],由 Park 等^[45-46]于 2011 年提出,是 Bruker 公司的专利技术。TIMs 将一组电极划分为入口漏斗、TIMs 迁移区和出口漏斗 3 个区域。入口和出口均可控制离子的偏转和聚焦,TIMS 的迁移区域可以通过同向平行气流和反向电场之

间的相互作用来积累、捕获和洗脱目标离子。首先,离子在 TIMS 中被捕获,利用径向约束的射频电场和轴向非均匀电场使离子在气流中保持静止;随后,离子在迁移区受高速气流推动力和反向电场阻力的作用,而反向电场强度随分离区轴线位置呈线性变化,其方向与高速气流相反^[47-48]。当气流速率与离子迁移速率相等时,离子相对于漂移管保持静止,即不同离子根据迁移率 K 的差异分布在不同电场强度的位置。离子截面积越大,离子淌度越小,维持静止所需的电场强度越高,即稳定在高场区域^[47,49]。跨 IMS 隧道区域施加的电压梯度使多种异构体被同时捕获,但在不同的电压值处被富集,通过逐步降低电场释放离子,以实现离子的逐步洗脱。TIMS 通常与四极杆飞行时间质谱联用,在保证灵敏度的前提下,可以有效提高仪器的分离能力。

2 立体化学修饰的多肽蛋白发现流程与高分辨离子淌度质谱分离分析

一般认为,SCMP 的发现基于传统蛋白组多肽组学工作流程^[50],主要包括大规模蛋白多肽提取,样品纯化分析与氨基酸序列鉴定,结构、功能表征并与试管合成标准物比对,立体异构化氨基酸的鉴定与验证 4 个关键步骤,示于图 3。

本文主要关注离子淌度仪在 SCMP 发现过程中的作用,即其在立体异构氨基酸分离分析与鉴定中的应用方法学开发。与其他分离技术,如高效液相色谱(HPLC)^[51],毛细管电泳(CE)^[52]等相比,离子淌度仪可以在更短的时间尺度上对异构体进行分离,同时还可以测定异构体的结构信息^[53]。离子淌度质谱分析的一大挑战是使用传统商业化仪器时往往受

到固有结构分辨率以及总分离时间等因素的影响,难以对大部分 SCMP 混合物实现基线分离。因此,本文将如何提高离子淌度质谱的结构分辨率为主线,围绕串联质谱、硬件改造以及多维差异放大等方面,总结近些年来研究进展。

2.1 基于串联质谱的结构分辨率提升方法

串联质谱是一种快速检测与测序的方法^[54-58]。对于同分异构体的鉴别,一级质谱(MS^1)只能提供相同的 m/z 信息,无法实现异构体的区分;而二级质谱(MS^2),如高能碰撞解离(higher-energy collisional dissociation, HCD)和碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID),可以通过提供不同的碎裂途径生成信息丰富、结构重要的产物离子,为识别和鉴定异构体提供互补的结构信息^[59]。虽然异构体在串联质谱中可能产生难以区分的离子迁移率到达时间相似的碎片离子,但通过 CID 技术结合化学计量学方法可以有效区离子淌度重叠的异构体。Julian 课题组^[57]利用自由基诱导解离(radical directed dissociation, RDD)和 CID 串联质谱技术鉴定多肽异构体,并发现了新的异构化位点。李灵军课题组^[25]开发了液相色谱-串联质谱-行波离子淌度质谱(LC-MS/MS-TWIMS)法快速、可靠地鉴定手性突变多肽中 D -氨基酸位点,示于图 4a。该方法通过反相液相色谱从复杂混合物中分离手性多肽,用离子淌度质谱对其经 CID 产生的 b 、 y 碎片离子进行结构检测,通过评估与 L 型对映体的 b 、 y 碎片离子的漂移时间或者碰撞横截面间的变化差异定位 D -氨基酸残基。研究者使用该方法揭示了龙虾体内甲壳类高血糖激素从 N 端起第 3 个氨基酸(L -苯丙氨酸到 D -苯丙氨酸)的异构

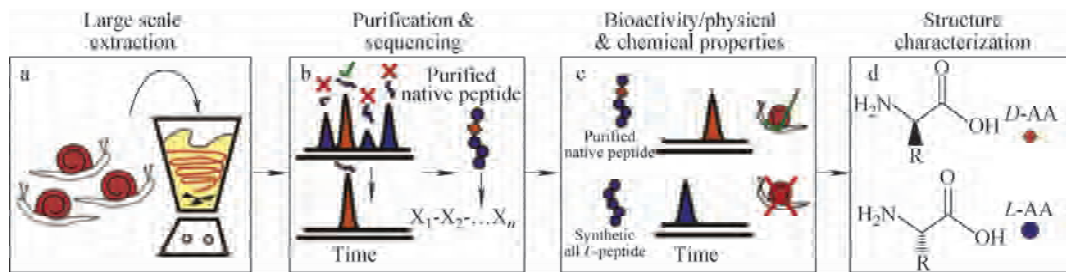
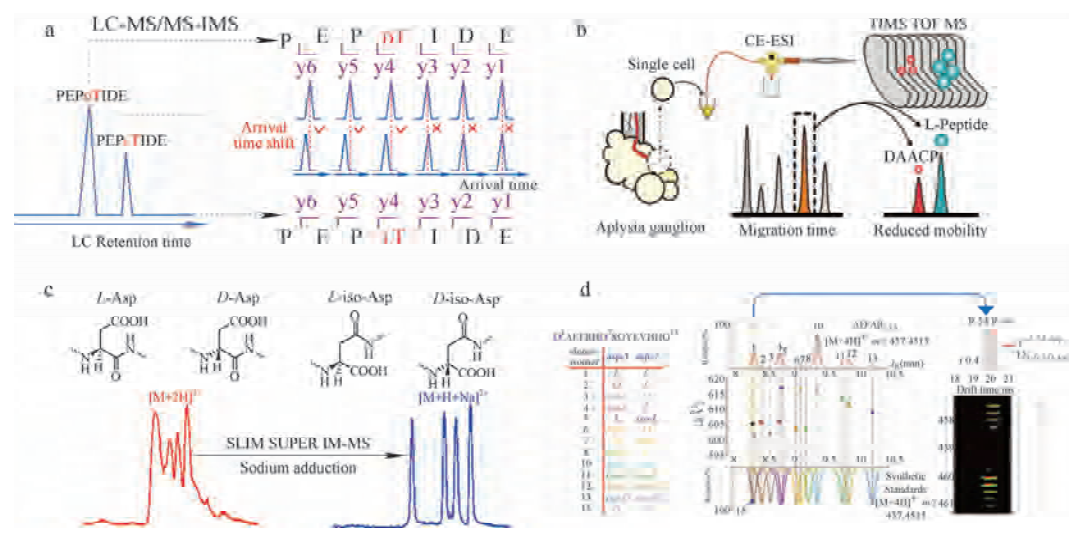


图 3 发现、鉴定 SCMP 的常用工作流程^[50]

Fig. 3 Workflow for discovering and identifying SCMP^[50]



注:a. LC-MS/MS-TWIMS 鉴定手性多肽 *D*-氨基酸残基位点^[25]; b. CE-TIMS-MS 超高分辨分析与鉴定单细胞中多肽立体化学修饰^[62]; c. SLIM SUPER IM-MS 高分辨分离分析 $A\beta_{17-28}$ 多肽差向异构体^[64]; d. 2D-LC-DTIMS-MS 鉴定阿尔兹海默症病人的 $A\beta$ 蛋白片段差向异构体^[68]

图 4 4 种基于离子淌度质谱的手性多肽快速分离分析与鉴定方法
Fig. 4 Fast separation and identification of DAACP based on IM-MS

化。此外,还可以通过串联质谱与金属加合物结合的策略增强 IM-MS 的分离性能,如 DAACP 中 *D*-残基的定位、拓扑异构体鉴别和肽异构体的改进分离等^[22,24,60-61]。

2.2 基于仪器硬件改造与软件升级的结构分辨率提升方法

近年来离子淌度技术发展迅速,在仪器分辨率方面获得了显著提升。Fouque 等^[24]报道了一种利用 TIMS 仪器实现 SCMP 异构体超高分辨率分离分析的方法,其中基于 CCS 值计算的分辨率可达 340。研究者利用 TIMS 对一些 CCS 值差异低至 1% 的手性多肽与其 *L* 型对映体实现了基线分离。以一种含有 29 个氨基酸残基的手性多肽 (GRF) 为例,该方法在 *D/L*-GRF 多肽 400 : 1 的混合物中实现了基线分离和手性定量分析。Mast 等^[62]成功将毛细管电泳技术与 TIMS-MS 联用,并应用于海兔单个神经结细胞中手性多肽的分析,示于图 4b。结果显示,神经组织中来自胸膜前体的 Plrn2 多肽有 44% 存在 *D*-氨基酸残基。Berthias 等^[63]使用 FAIMS 对含有 42 个氨基酸残基的手性多肽及其差向异构体实现了基线分离,最大分辨率可达 159。Nagy 等^[64]将一种基于 TWIMS 的新型超高分辨离子淌度质谱 (TW

SLIM SUPER IM-MS)^[65]用于研究 β 淀粉样蛋白 ($A\beta$) 片段 $A\beta_{17-28}$ 肽段,示于图 4c。由于 Asn₂₇ 可以通过异构化脱酰基生成 Asp,与 Asp₂₃ 相同,均存在 4 种外消旋化异构体,研究者采用直接进样的方法对 16 种 $A\beta_{17-28}$ 多肽异构体进行分离分析。得益于 SLIM 的超高分辨率,在 1 s 内实现了这 16 种异构体钠加合离子 $[M+H+Na]^{2+}$ 的基线分离。此外,Waters 公司研发的基于 TWIMS 的环形离子淌度质谱仪也被应用于手性多肽的研究^[66]。通过与超高效液相色谱联用,在 45 s 色谱保留时间窗口内,通过 4 圈环形离子淌度循环 (~ 50 ms, $R \sim 130$) 使共洗脱的手性多肽达到有效分离。该技术基于保留时间-漂移时间二维分离策略,对 11 种异构化的多肽实现了分离。结合 b、y 碎片离子的漂移时间,成功鉴别出手性多肽的单位点及双位点修饰。

2.3 基于多维差异放大和多维分离技术的结构分辨率提升方法

在无法实现快速更新仪器硬件的情况下,多维手性差异放大和多维分离技术的应用显得尤为重要。在某些情况下,还需要串联其他分离技术 (如 LC 和 CE),以提高复杂混合物中肽异构体的检测覆盖率^[4,67-68],同时结合多维数

据可视化^[69]和计算建模^[70],辅助基于 IM-MS 的多肽异构体结构分析。

本课题组^[61]利用 TWIMS 平台发现,有些 *D*-和 *L*-多肽单体在离子淌度检测中的差异很小,但以寡聚体形式存在的 *D/L* 多肽结构差异比单体更大,放大了单体的手性结构差异。在此基础上,本课题组^[71]提出了一种基于金属离子结合的多维手性差异放大策略,适用于从单体、寡聚到受体相互作用的手性效应研究,被称为复合型手性分析平台(integrative chiral anatomy platform, iCAP)。通过建立以多肽质子化峰、结合 1 个金属峰和结合 2 个金属峰这 3 种形式的以 CCS 为坐标的三维体系,成功放大了多肽的手性效应,将原本在较低分辨率淌度平台难以区分的 *D*-和 *L*-神经肽在三维空间中有效地区分开来。离子淌度数据采集模式的创新提升了分离效果。Agilent 公司将基于阿达玛变换(Hadamard transform)的多重复用离子注射法^[72]应用于 DTIMS,在不需增加数据采集时间和离子淌度扫描范围的前提下,产生了 7~8 倍的信号增益,并且将占空比提高到 50%,离子淌度分辨率从 60 提升到了 180~250^[73]。运用这种新型数据采集方式,Mukherjee 等^[68]搭建了 2D-LC-IMS-MS 平台,从阿尔兹海默症病人的脑组织中检测到了一系列由天冬氨酸异构导致的 A β 手性多肽异构体,示于图 4d。

3 立体化学修饰多肽蛋白与其受体相互作用的结构质谱分析方法

目前,手性神经肽受体分析研究受到广泛关注,例如,全氨基酸手性反转的多肽异构体由于对抗酶消化的显著抗性,有望用于开发新的候选药物^[20,74]。尽管异构化有着独特的功能,但其结构变化往往不显著,这是因为大部分神经肽只有个别氨基酸位点会发生 *D*-异构化^[7]。为了有效解析立体化学修饰对重要蛋白多肽的构效关系,开发高分辨的神经肽异构体结构分析工具是重要的发展方向。

3.1 神经肽受体的常规生物物理研究方法

目前关于 DAACP 的完整生理作用研究较少,尤其是缺乏探讨 DAACP 与其同源受体相互作用方面的报道。Sweedler 课题组^[50]在加利福尼亚海兔中新发现了一种包含 *D*-氨基酸

的多肽(ATRP),该多肽既能激活受体(*G*-蛋白偶联受体),又能激活神经元靶点。与之前报道的 DAACP 及其全 *L*-残基类似物不同,*L*-ATRP 和 *D2*-ATRP 都是 *G*-蛋白偶联受体的强效激动剂,且均在电生理实验中具有活性。在此基础上,该课题组又研究了来自单一神经肽前激素,即海兔素样神经肽前体(apALNP)的几个 DAACP 信号转导与结构的关系。为了深入了解通过 apALNR 的配体信号,该课题组建立了来自 apALNP 的天然和非天然神经肽类似物的数据库,并评估它们在与 apALNR 和混杂的 G α 亚基 G α -16 共转染细胞中的活性。这不仅研究了常规神经肽与受体的作用关系,还对 DAACP 与其神经肽受体的构效关系进行构象研究^[75]。关于 DAACP 三维构象如何影响受体活性,以及 *D*-残基在这些肽构象中发挥作用的研究很少。为了研究构效关系,该课题组使用建立计算模型、DTIMS 分析和受体激活分析相结合的方法创建了简单模型,预测了一系列多肽 GdFFD 类似物的生物活性。该模型有助于建立 GdFFD 类似物结构与活性之间的联系,并强调 GdFFD 受体 apALNR 上 1 号位置肽活性的空间效应。

3.2 碰撞诱导去折叠技术辅助神经肽受体的结构解析

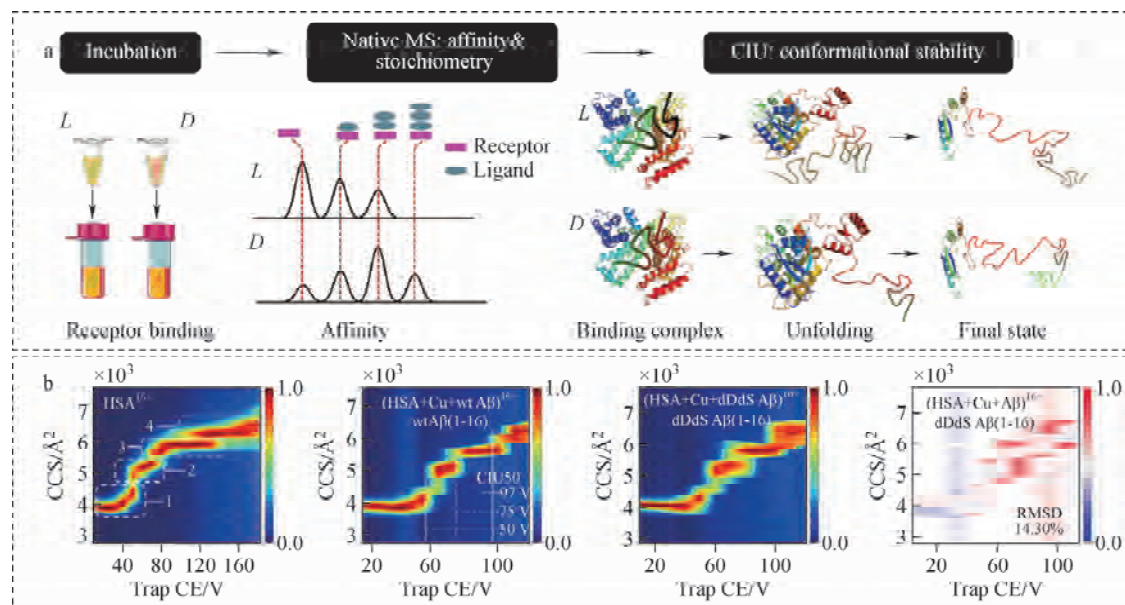
碰撞诱导去折叠(CIU)是非变性离子淌度质谱技术的重要工具,可以实现气相蛋白结构的快速精准操控。目前,基于 CIU-IM-MS 技术的神经肽受体研究报道较少,主要是由于受体来源有限、表达量低,且难以从现有的蛋白生产系统中分离纯化。IM-MS 在包括膜蛋白在内的其他蛋白体系中取得了重要的研究进展,因此,利用 IM-MS 技术对神经肽受体的结构研究将得到越来越多的关注^[76-77]。

由于商用 IM-MS 装置分辨率的限制,在保持对神经肽受体等生物大分子足够的灵敏度的同时,往往需要其他气相结构操纵技术的协助,以获得目标神经肽受体的详细信息^[78]。将 CIU^[79-84]集成到 IM-MS 中可以增加分辨维度,并且能够有效区分 CCS 非常接近的蛋白质构象。当蛋白质离子在气相中受到碰撞加热时,通常遵循特定的去折叠路径,得到结构特异性的 CIU 指纹图谱^[85-86]。因此,CIU 技术有望成

为分析神经肽受体的有力工具。

基于 CIU-IM-MS 的手性多肽与蛋白受体相互作用的研究过程包含溶液相孵育、非变性质谱测定和 CIU 构象操控 3 个关键步骤,示于图 5a。 D/L -构型的多肽与蛋白受体结合后,通过非变性质谱可以观测到显著不同的结合力和结合计量学信息。更重要的是,不同手性的多肽与受体结合形成的复合物可能展示显著不同的气相去折叠路径,这种差异可以通过相关的数据分析软件进行可视化和定量比较。本课题组^[71]通过绘制 CCS 值与碰撞电压的关系图,初步探索了 CIU 技术在立体化学修饰受体作用复合物构象差异分析中的应用方案,示于图 5b。CIU 指纹图谱的特

征条带数量及其变换信息可用于蛋白构象及结构域稳定性的快速分析。图 5b 展示了人血清白蛋白的 CIU 指纹图谱,从中可以推断出至少 4 个主要构象中间体以及 3 个核心结构域信息,这与人血清白蛋白的晶体结构相符。为了定量表征 D/L -构型多肽在受体结合时的结构差异,本课题组使用 Ruotolo 课题组^[87]开发的 CIUSuite 工具包,其中 2 个关键参数是半数构象去折叠电压(CIU_{50})和均方根差(RMSD)。通过对比结果,发现虽然 CIU_{50} 值并没有显著差异,但不同手性多肽结合受体复合物的整体构象与去折叠 CIU 路径却有较显著的差别(RMSD 达到 14.30%,一般基线背景 RMSD 小于 5%)。



注:a. L -和 D -构型多肽与受体结合流程示意图;b. IM-MS 在解决 D/L 构型方面的实例^[71]

图 5 IM-MS 在区分 D/L 构型多肽与受体结合时的工作流程图及实例

Fig. 5 Flow schematic diagrams and examples of IM-MS

in differentiating the binding of D/L peptides to receptors

4 总结与展望

离子淌度质谱联用技术有效加速了蛋白质立体化学修饰的分离分析和定性定量鉴定,在人类疾病相关的蛋白体系方面的应用有了初步进展。但目前立体化学修饰的离子淌度质谱大部分集中在简单体系(如单细胞生物)的研究,相比于其他翻译后修饰的鉴定分析方法,该方法不够成熟,在样品提取、富集分离、仪器参数、

数据采集和可视化分析等方面仍有很大的改进空间。为了绘制人类多种重大疾病相关的蛋白质立体化学修饰图谱,需要进一步开发定量分析方法及其在生物组织内空间分布的测定方法,以获得更全面的生物学信息。

1) 立体化学修饰的定量组学分析:现行大部分离子淌度质谱方法主要集中于纯化体系的研究,在组学水平上的立体化学修饰鉴定方法

仍有较大的改进空间,如开发立体化学修饰特异性、兼容的多重等质量同位素定量标签标记技术,有望实现对不同生物环境下分析物中手性多肽的相对和绝对定量。

2) 立体化学修饰的空间分辨组学分析:将离子淌度与质谱成像相结合,基于手性多肽分析物的碰撞截面信息,可将其与对应的 *L* 型多肽异构体区分开,从而特异地获取其在生物组织切片中的分布,直观地呈现手性多肽产生与作用的区域。与此同时,可以比较手性多肽与其潜在受体在同一组织内的空间分布,探究其与受体相互作用的规律。

3) 立体化学修饰的高分辨仪器开发:随着仪器设备和分析方法的发展,更高分辨率的离子淌度仪可以使较大的手性多肽(>40 残基)及其 *L* 型多肽异构体在不需要酶解的前提下快速拆分和鉴定,简化了分析步骤,并缩短了检测时间。

4) 立体化学修饰的串联质谱分析:近年来,基于新型碎裂模式的串联质谱技术逐渐用于分析手性多肽。RDD 模式对前体离子结构较为敏感,可以根据串联质谱图中碎片离子的相对强度实现对手性多肽的鉴定及定量^[57]。基于碎片离子的相对强度,电子捕获裂解(electron capture dissociation, ECD)也被用于区分多肽中的 Asp 和 isoAsp^[88]。未来还可尝试将紫外光致解离(ultraviolet photodissociation, UVPD)、电子诱导解离(electron induced dissociation, EID)和红外多光子解离(infrared multiple photon dissociation, IRMPD)等串联质谱模式与离子淌度分离相结合,建立更有力的手性多肽鉴定与定量方法。

5) 立体化学修饰的构效关系研究:立体化学修饰的构效关系是其发挥生物学功能的重要分子基础之一。目前,相互作用分析仪在结构分析灵敏度和样品消耗等方面均存在不利于立体化学修饰分析的因素。超高灵敏结构分析技术的开发将大大推进该领域的发展。此外,分子动力学模拟能够从原子层面给出体系的微观演变过程,尤其是结合实验测量数据,如离子淌度质谱指导下的分子动力学模拟,将为解构 SCMP 高分辨三维构象和全景式构象分析提供可能。

参考文献:

- [1] CHECCO J W, ZHANG G, YUAN W D, YU K, YIN S Y, ROBERTS-GALBRAITH R H, YAU P M, ROMANOVA E V, JING J, SWEEDLER J V. Molecular and physiological characterization of a receptor for *D*-amino acid-containing neuropeptides[J]. ACS Chemistry Biology, 2018, 13(5): 1 343-1 352.
- [2] IBRAHIM Y M, SHVARTSBURG A A, SMITH R D, BELOV M E. Ultrasensitive identification of localization variants of modified peptides using ion mobility spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(14): 5 617-5 623.
- [3] JANSSON E T. Strategies for analysis of isomeric peptides[J]. J Sep Sci, 2018, 41(1): 385-397.
- [4] JIA C X, WU Z, LIETZ C B, LIANG Z, CUI Q, LI L J. Gas-phase ion isomer analysis reveals the mechanism of peptide sequence scrambling[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(6): 2 917-2 924.
- [5] OLLIVAUX C, SOYEZ D, TOULLEC J Y. Biogenesis of *D*-amino acid containing peptides/proteins: where, when and how? [J]. J Pept Sci, 2014, 20(8): 595-612.
- [6] SHVARTSBURG A A, CREESE A J, SMITH R D, COOPER H J. Separation of a set of peptide sequence isomers using differential ion mobility spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(18): 6 918-6 923.
- [7] BAI L, SHEELEY S, SWEEDLER J V. Analysis of endogenous *D*-amino acid-containing peptides in metazoa[J]. Bioanal Rev, 2009, 1(1): 7-24.
- [8] BAWAB W, QUERIDO E, CRINE P, DESGROSEILLERS L. Identification and characterization of aminopeptidases from *Aplysia californica* [J]. Biochemistry Journal, 1992, 286: 967-975.
- [9] MORISHITA F, NAKANISHI Y, KAKU S, FURUKAWA Y, OHTA S, HIRATA T, OHTANI M, FUJISAWA Y, MUNEOKA Y, MATSUSHIMA O. A novel *D*-amino-acid-containing peptide isolated from *Aplysia* heart[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 240(2): 354-358.
- [10] SOYEZ D, van HERP F, ROSSIER J, LE CAER J P, TENSEN C P, LAFONT R. Evi-

- dence for a conformational polymorphism of invertebrate neurohormones. *D*-amino acid residue in crustacean hyperglycemic peptides[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(28): 18 295-18 298.
- [11] YASUDA A, YASUDA Y, FUJITA T, NAYA Y. Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): multiplicity of molecular forms by stereoinversion and diverse functions[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1994, 95(3): 387-398.
- [12] IWAKOSHI E, HISADA M, MINAKATA H. Cardioactive peptides isolated from the brain of a Japanese octopus, *Octopus minor*[J]. *Peptides*, 2000, 21(5): 623-630.
- [13] DUTERTRE S, LUMSDEN N G, ALEWOOD P F, LEWIS R J. Isolation and characterisation of conomaph-Vt, a *D*-amino acid containing excitatory peptide from the venom of a vermivorous cone snail[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(16): 3 860-3 866.
- [14] HECK S D, SIOK C J, KRAPCHO K J, KELBAUGH P R, THADEIO P F, WELCH M J, WILLIAMS R D, GANONG A H, KELLY M E, LANZETTI A J. Functional consequences of posttranslational isomerization of Ser46 in a calcium channel toxin[J]. *Science*, 1994, 266(5 187): 1 065-1 068.
- [15] RICHTER K, EGGER R, KREIL G. *D*-alanine in the frog skin peptide dermorphin is derived from *L*-alanine in the precursor[J]. *Science*, 1987, 238(4 824): 200-202.
- [16] RITZ-TIMME S, COLLINS M J. Racemization of aspartic acid in human proteins[J]. *Ageing Research Reviews*, 2002, 1(1): 43-59.
- [17] HA S, KIM I, TAKATA T, KINOUCHI T, ISOYAMA M, SUZUKI M, FUJII N. Identification of *D*-amino acid-containing peptides in human serum[J]. *PloS One*, 2017, 12(12): e0189972.
- [18] EWING M A, WANG J, SHEELEY S A, SWEEDLER J V. Detecting *D*-amino acid-containing neuropeptides using selective enzymatic digestion[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(8): 2 874-2 880.
- [19] FUJII N, KAJI Y, FUJII N. *D*-Amino acids in aged proteins: analysis and biological relevance [J]. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2011, 879(29): 3 141-3 147.
- [20] DUTTA S, FOLEY A R, WARNER C J A, ZHANG X L, ROLANDI M, ABRAMS B, RASKATOV J A. Suppression of oligomer formation and formation of non-toxic fibrils upon addition of mirror-image abeta42 to the natural l-enantiomer[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(38): 11 506-11 510.
- [21] CREESE A J, COOPER H J. Separation and identification of isomeric glycopeptides by high field asymmetric waveform ion mobility spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(5): 2 597-2 601.
- [22] DIT FOUQUE K J, MORENO J, HEGEMANN J D, ZIRAH S, REBUFFAT S, FERNANDEZ-LIMA F. Identification of lasso peptide topologies using native nanoelectrospray ionization-trapped ion mobility spectrometry-mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(8): 5 139-5 146.
- [23] JEANNE DIT FOUQUE K, AFONSO C, ZIRAH S, HEGEMANN J D, ZIMMERMANN M, MARAHIEL M A, REBUFFAT S, LAVANANT H. Ion mobility-mass spectrometry of lasso peptides: signature of a rotaxane topology[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(2): 1 166-1 172.
- [24] JEANNE DIT FOUQUE K, GARABEDIAN A, PORTER J, BAIRD M, PANG X, WILLIAMS T D, LI L, SHVARTSBURG A, FERNANDEZ-LIMA F. Fast and effective ion mobility-mass spectrometry separation of *D*-amino-acid-containing peptides[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(21): 11 787-11 794.
- [25] JIA C X, LIETZ C B, YU Q, LI L J. Site-specific characterization of *D*-amino acid containing peptide epimers by ion mobility spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(6): 2 972-2 981.
- [26] SHVARTSBURG A A, SINGER D, SMITH R D, HOFFMANN R. Ion mobility separation of isomeric phosphopeptides from a protein with variant modification of adjacent residues[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(13): 5 078-5 085.
- [27] 徐一仟, 杨其穆, 蒋丹丹, 厉梅, 王卫国, 陈创, 李

- 海洋. 超高分辨离子迁移谱技术及应用进展[J]. 质谱学报, 2021, 42(5): 609-622.
- XU Yiqian, YANG Qimu, JIANG Dandan, LI Mei, WANG Weiguo, CHEN Chuang, LI Haiyang. Development of ultra-high resolution ion mobility spectrometry and its applications[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2021, 42(5): 609-622(in Chinese).
- [28] CUMERAS R, FIGUERAS E, DAVIS C E, BAUMBACH J I, GRACIA I. Review on ion mobility spectrometry. Part 1: current instrumentation[J]. Analyst, 2015, 140(5): 1 376-1 390.
- [29] POLTASH M L, McCABE J W, SHIRZADEH M, LAGANOWSKY A, CLOWERS B H, RUSSELL D H. Fourier transform-ion mobility-Orbitrap mass spectrometer: a next-generation instrument for native mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2018, 90(17): 10 472-10 478.
- [30] MAY J C, MCLEAN J A. Ion mobility-mass spectrometry: time-dispersive instrumentation [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(3): 1 422-1 436.
- [31] LANUCARA F, HOLMAN S W, GRAY C J, EYERS C E. The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics[J]. Nature Chemistry, 2014, 6(4): 281-294.
- [32] BRADBURY N E, NIELSEN R A. Absolute values of the electron mobility in hydrogen[J]. Physical Review, 1936, 49(5): 388-393.
- [33] HILL H H JR, SIEMS W F, ST LOUIS R H, MCMINN D G. Ion mobility spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 1990, 62(23): 1201A-1209A.
- [34] GILES K, PRINGLE S D, WORTHINGTON K R, LITTLE D, WILDGOOSE J L, BATEMAN R H. Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004, 18(20): 2 401-2 414.
- [35] STOW S M, CAUSON T J, ZHENG X, KURUGAMA R T, MAIRINGER T, MAY J C, RENNIE E E, BAKER E S, SMITH R D, MCLEAN J A, HANN S, FJELDSTED J C. An interlaboratory evaluation of drift tube ion mobility-mass spectrometry collision cross section measurements[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(17): 9 048-9 055.
- [36] LI G Y, DELAFIELD D G, LI L J. Improved structural elucidation of peptide isomers and their receptors using advanced ion mobility-mass spectrometry[J]. TRAC Trends in Analytical Chemistry, 2020, doi: 10.1016/j. trac. 2019. 05. 048.
- [37] ZHANG X Y, GARIMELLA S V, PROST S A, WEBB I K, CHEN T C, TANG K, TOLMACHEV A V, NORHEIM R V, BAKER E S, ANDERSON G A, IBRAHIM Y M, SMITH R D. Ion trapping, storage, and ejection in structures for lossless ion manipulations[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(12): 6 010-6 016.
- [38] GILES K, UJMA J, WILDGOOSE J, PRINGLE S, RICHARDSON K, LANGRIDGE D, GREEN M. A cyclic ion mobility-mass spectrometry system[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(13): 8 564-8 573.
- [39] SHVARTSBERG A A, PRIOR D C, TANG K, SMITH R D. High-resolution differential ion mobility separations using planar analyzers at elevated dispersion fields[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(18): 7 649-7 655.
- [40] PINERO M Y, AMO-GONZALEZ M, BALLESTEROS R D, PEREZ L R, de la MORA G F, ARCE L. Chemical fingerprinting of olive oils by electrospray ionization-differential mobility analysis-mass spectrometry: a new alternative to food authenticity testing[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2020, 31(3): 527-537.
- [41] ALONSO M, SANTOS J P, HONTANON E, RAMIRO E. First differential mobility analysis (DMA) measurements of air ions produced by radioactive source and corona[J]. Aerosol and Air Quality Research, 2009, 9(4): 453-457.
- [42] FULCHER J M, MAKAJU A, MOORE R J, ZHOU M, BENNETT D A, de JAGER P L, QIAN W J, PASA-TOLIC L, PETYUK V A. Enhancing top-down proteomics of brain tissue with FAIMS[J]. Journal of Proteome Research, 2021, 20(5): 2 780-2 795.
- [43] HEBERT A S, PRASAD S, BELFORD M W, BAILEY D J, MCALISTER G C, ABBATIELLO S E, HUGUET R, WOUTERS E R, DUNYACH J J, BRADEMAN D R, WESTPHALL

- M S, COON J J. Comprehensive single-shot proteomics with FAIMS on a hybrid Orbitrap mass spectrometer[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(15): 9 529-9 537.
- [44] LIU F C, RIDGEWAY M E, PARK M A, BLEIHOLDER C. Tandem trapped ion mobility spectrometry[J]. *Analyst*, 2018, 143 (10): 2 249-2 258.
- [45] FERNANDEZ-LIMA F A, KAPLAN D A, PARK M A. Note: integration of trapped ion mobility spectrometry with mass spectrometry [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2011, 82 (12): 126 106.
- [46] FERNANDEZ-LIMA F, KAPLAN D A, SUTTERING J, PARK M A. Gas-phase separation using a trapped ion mobility spectrometer[J]. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry*, 2011, doi: 10.1007/s12127-011-0067-8.
- [47] MICHELMANN K, SILVEIRA J A, RIDGEWAY M E, PARK M A. Fundamentals of trapped ion mobility spectrometry[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2015, 26(1): 14-24.
- [48] SILVEIRA J A, MICHELMANN K, RIDGEWAY M E, PARK M A. Fundamentals of trapped ion mobility spectrometry Part II: fluid dynamics[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2016, 27(4): 585-595.
- [49] RIDGEWAY M E, LUBECK M, JORDENS J, MANN M, PARK M A. Trapped ion mobility spectrometry: a short review[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2018, 425: 22-35.
- [50] MAST D H, CHECCO J W, SWEEDLER J V. Advancing *D*-amino acid-containing peptide discovery in the metazoan[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 2020, 1 869(1): 140 553.
- [51] KREIL G, BARRA D, SIMMACO M, ERSPAMER V, ERSPAMER G F, NEGRI L, SEVERINI C, CORSI R, MELCHIORRI P. Deltorphin, a novel amphibian skin peptide with high selectivity and affinity for delta opioid receptors [J]. *European Journal of Pharmacology*, 1989, 162(1): 123-128.
- [52] HUANG Y, DUAN J P, JIANG X Y, CHEN H Q, CHEN G N. Separation and determination of enkephalin-related peptides using capillary electrophoresis[J]. *Journal of Separation Science*, 2005, 28(18): 2 534-2 539.
- [53] WU C, SIEMS W F, KLASMEIER J, HILL H H. Separation of isomeric peptides using electrospray ionization/high-resolution ion mobility spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(2): 391-395.
- [54] DANIELSEN M, NEBEL C, DALSGAARD T K. Simultaneous determination of *L*- and *D*-amino acids in proteins: a sensitive method using hydrolysis in deuterated acid and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis[J]. *Foods*, 2020, 9(3): 309.
- [55] SONG Y, FENG Y Z, LU X, ZHAO S L, LIU C W, LIU Y M. *D*-Amino acids in rat brain measured by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Neuroscience Letters*, 2008, 445(1): 53-57.
- [56] BARBAS-BERNARDOS C, GARCIA-PEREZ I, LORENZO M P, ALONSO-HERRANZ V, NICHOLSON J, GARCIA A. Development and validation of a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the absolute analysis of 17 α *D*-amino acids in cooked meals[J]. *Journal of Chromatography A*, 2020, 1 611: 460 598.
- [57] TAO Y, JULIAN R R. Identification of amino acid epimerization and isomerization in crystallin proteins by tandem LC-MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(19): 9 733-9 741.
- [58] TAO Y, QUEBBEMANN N R, JULIAN R R. Discriminating *D*-amino acid-containing peptide epimers by radical-directed dissociation mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(15): 6 814-6 820.
- [59] JUVONEN M, BAKX E, SCHOLS H, TENKANEN M. Separation of isomeric cereal-derived arabinoxylan-oligosaccharides by collision induced dissociation-travelling wave ion mobility spectrometry-tandem mass spectrometry (CID-TWIMS-MS/MS)[J]. *Food Chemistry*, 2022, 366: 130 544.
- [60] JEANNE DIT FOUQUE K, LAVANANT H, ZIRAH S, HEGEMANN J D, FAGE C D, MA-RAHIEL M A, REBUFFAT S, AFONSO C. General rules of fragmentation evidencing lasso structures in CID and ETD[J]. *Analyst*, 2018,

- 143(5); 1 157-1 170.
- [61] PANG X Q, JIA C X, CHEN Z W, LI L J. Structural characterization of monomers and oligomers of *D*-amino acid-containing peptides using T-wave ion mobility mass spectrometry[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2017, 28(1): 110-118.
- [62] MAST D H, LIAO H W, ROMANOVA E V, SWEEDLER J V. Analysis of peptide stereochemistry in single cells by capillary electrophoresis-trapped ion mobility spectrometry mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(15): 6 205-6 213.
- [63] BERTHIAS F, BAIRD M A, SHVARTSBURG A A. Differential ion mobility separations of *D/L* peptide epimers[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(8): 4 015-4 022.
- [64] NAGY G, KEDIA K, ATTAH I K, GARIMELLA S V B, IBRAHIM Y M, PETYUK V A, SMITH R D. Separation of β -amyloid tryptic peptide species with isomerized and racemized l-aspartic residues with ion mobility in structures for lossless ion manipulations[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(7): 4 374-4 380.
- [65] DENG L L, WEBB I K, GARIMELLA S V B, HAMID A M, ZHENG X Y, NORHEIM R V, PROST S A, ANDERSON G A, SANDOVAL J A, BAKER E S, IBRAHIM Y M, SMITH R D. Serpentine ultralong path with extended routing (SUPER) high resolution traveling wave ion mobility-MS using structures for lossless ion manipulations[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(8): 4 628-4 634.
- [66] TOMCZYK N, GILES K, RICHARDSON K, UJMA J, PALMER M, NIELSEN P K, HASELMANN K F. Mapping isomeric peptides derived from biopharmaceuticals using high-resolution ion mobility mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(49): 16 379-16 384.
- [67] ZHU R, HUANG Y F, ZHAO J F, ZHONG J Q, MECHREF Y. Isomeric separation of *N*-glycopeptides derived from glycoproteins by porous graphitic carbon (PGC) LC-MS/MS[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(14): 9 556-9 565.
- [68] MUKHERJEE S, PEREZ K A, LAGO L C, KLATT S, MCLEAN C A, BIRCHALL I E, BARNHAM K J, MASTERS C L, ROBERTS B R. Quantification of *N*-terminal amyloid- β isoforms reveals isomers are the most abundant form of the amyloid- β peptide in sporadic Alzheimer's disease[J]. Brain Communications, 2021, doi: 10.1093/braincomms/fcab028.
- [69] FOUQUE K J D, LAVANANT H, ZIRAH S, HEGEMANN J D, ZIMMERMANN M, MARAHIEL M A, REBUFFAT S, AFONSO C. Signatures of mechanically interlocked topology of lasso peptides by ion mobility-mass spectrometry: lessons from a collection of representatives[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2017, 28(2): 315-322.
- [70] LIETZ C B, CHEN Z W, YUN SON C, PANG X Q, CUI Q, LI L J. Multiple gas-phase conformations of proline-containing peptides: is it always *cis/trans* isomerization?[J]. Analyst, 2016, 141(16): 4 863-4 869.
- [71] LI G Y, DELANEY K, LI L J. Molecular basis for chirality-regulated A β self-assembly and receptor recognition revealed by ion mobility-mass spectrometry[J]. Nature Communications, 2019, 10 (1): 5 038.
- [72] CLOWERS B H, SIEMS W F, HILL H H, MASSICK S M. Hadamard transform ion mobility spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2006, 78 (1): 44-51.
- [73] MAY J C, KNOCHENMUSS R, FJELDSTED J C, MCLEAN J A. Resolution of isomeric mixtures in ion mobility using a combined demultiplexing and peak deconvolution technique[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92 (14): 9 482-9 492.
- [74] SIEVERS S A, KARANICOLAS J, CHANG H W, ZHAO A, JIANG L, ZIRAFIO, STEVENS J T, MUNCH J, BAKER D, EISENBERG D. Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation[J]. Nature, 2011, 475(7 354): 96-100.
- [75] DO T D, CHECCO J W, TRO M, SHEA J E, BOWERS M T, SWEEDLER J V. Conformational investigation of the structure-activity relationship of GdFFD and its analogues on an achatin-like neuropeptide receptor of *Aplysia californica* involved in the feeding circuit[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2018, 20 (34): 22 047-22 057.

- [76] HOPPER J T, YU Y T, LI D F, RAYMOND A, BOSTOCK M, LIKO I, MIKHAILOV V, LAGANOWSKY A, BENESCH J L, CAFREY M, NIETLISPACH D, ROBINSON C V. Detergent-free mass spectrometry of membrane protein complexes[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(12): 1 206-1 211.
- [77] RUOTOLO B T, GILES K, CAMPUZANO I, SANDERCOCK A M, BATEMAN R H, ROBINSON C V. Evidence for macromolecular protein rings in the absence of bulk water[J]. *Science*, 2005, 310(5 754): 1 658-1 661.
- [78] DODDS J N, MAY J C, MCLEAN J A. Correlating resolving power, resolution, and collision cross section: unifying cross-platform assessment of separation efficiency in ion mobility spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89 (22): 12 176-12 184.
- [79] DIXIT S M, POLASKY D A, RUOTOLO B T. Collision induced unfolding of isolated proteins in the gas phase: past, present, and future[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2018, 42: 93-100.
- [80] VALLEJO D D, KANG J, COGHLAN J, RAMIREZ C R, POLASKY D A, KURULUGAMA R T, FJELDSTED J C, SCHWENDEMAN A A, RUOTOLO B T. Collision-induced unfolding reveals stability differences in infliximab therapeutics under native and heat stress conditions[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(48): 16 166-16 174.
- [81] HONG S, BUSH M F. Collision-induced unfolding is sensitive to the polarity of proteins and protein complexes[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2019, 30 (11): 2 430-2 437.
- [82] ZHENG X, KURULUGAMA R T, LAGANOWSKY A, RUSSELL D H. Collision-induced unfolding studies of proteins and protein complexes using drift tube ion mobility-mass spectrometer[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(10): 7 218-7 225.
- [83] GADKARI V V, RAMIREZ C R, VALLEJO D D, KURULUGAMA R T, FJELDSTED J C, RUOTOLO B T. Enhanced collision induced unfolding and electron capture dissociation of native-like protein ions[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(23): 15 489-15 496.
- [84] TIAN Y W, RUOTOLO B T. Collision induced unfolding detects subtle differences in intact antibody glycoforms and associated fragments[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2018, 425: 1-9.
- [85] ZHONG Y Y, HAN L J, RUOTOLO B T. Collisional and coulombic unfolding of gas-phase proteins: high correlation to their domain structures in solution[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(35): 9 209-9 212.
- [86] ESCHWEILER J D, MARTINI R M, RUOTOLO B T. Chemical probes and engineered constructs reveal a detailed unfolding mechanism for a solvent-free multidomain protein[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(1): 534-540.
- [87] POLASKY D A, DIXIT S M, FANTIN S M, RUOTOLO B T. CIUSuite 2: next-generation software for the analysis of gas-phase protein unfolding data[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(4): 3 147-3 155.
- [88] SARGAEVA N P, LIN C, O'CONNOR P B. Identification of aspartic and isoaspartic acid residues in amyloid β peptides, including A β 1-42, using electron-ion reactions[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(23): 9 778-9 786.

(收稿日期:2022-04-28;修回日期:2022-06-06)