

基于生物质谱技术的磺酸化修饰策略及其在蛋白质组学中的应用

赵丽艳, 周春喜, 张养军, 蔡 耘, 钱小红

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要:对近几年报道的磺化修饰策略及其应用进行了评述。通过磺化修饰在肽段上引入带负电荷的磺酸基,不仅可以诱导肽段离子的质谱裂解,得到以 y 系列离子为主的序列信息丰富的串联质谱图,有利于肽段从头测序,还可以改变被修饰肽段的电荷分布,通过离子交换色谱法分离富集磺化修饰的肽段,有助于蛋白质鉴定。

关键词:磺酸化; 化学修饰; 蛋白质组学; 生物质谱

中图分类号: Q503; O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2007)03-185-08

Sulfonation Strategy Based on Mass Spectrometry and Its Application in Proteomics Research

ZHAO Li-yan, ZHOU Chun-xi, ZHANG Yang-jun, CAI Yun, QIAN Xiao-hong

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Negatively-charged sulfonic group introduced by sulfonation derivatization not only induced the MS/MS fragmentation of peptides and produced an exclusive series of y -type ion spectrum, but also changed the charge distribution of sulfonated peptides and made the enrichment of target peptides by ion-exchange chromatography possible. This technique enormously facilitates de novo peptide sequencing and protein identification by mass spectrometry. The procedure of sulfonation derivatization and its application in the study of proteomics are reviewed.

Key words: sulfonation; chemical modification; proteomics; biologic mass spectrometry

蛋白质组研究的一个基本目标是对分析体系中的蛋白质进行鉴定和结构表征。以高灵敏度、高准确度和高分辨率为特征的生物质谱技术,已经成为蛋白质组学研究中必不可少的工具^[1-2]。其特点是可在飞摩尔水平检测相对分子

量高达几十万道尔顿的生物大分子,推测及验证蛋白质翻译后的修饰情况、检查突变位点、解析一级序列结构以及对蛋白质组进行相对定量分析。与传统的 Edman 测序法相比,生物质谱不仅具有较高的灵敏度并能提供修饰信息,而且对

收稿日期: 2006-09-18; 修回日期: 2007-03-27

基金项目: 国家重点基础研究规划项目(2004CB520802), 国家自然科学基金重点项目(20635010), 国家自然科学基金(20405017, 20505018, 20505019)和北京市科技计划重大项目(H030230280190)

作者简介: 赵丽艳(1980~), 女(汉族), 山东人, 博士研究生, 药物分析专业。E-mail: zly_06@126.com

通讯作者: 钱小红(1955~), 女(汉族), 江苏人, 研究员, 从事蛋白质组学研究。E-mail: qianxh@nic.bmi.ac.cn

样品纯度要求低、消耗量少、简单快速^[3]。有关蛋白质和多肽的质谱测序及鉴定技术已有很多报道。如基于 MALDI 的阶梯式测序 (ladder sequencing)^[4]、肽质量指纹谱技术 (peptide mass fingerprinting, PMF)^[5-6]、源后衰变技术 (post-source decay, PSD)^[7]、碰撞诱导解离技术 (collision-induced dissociation, CID)^[8] 和电子捕获解离 (electron capture dissociation, ECD)^[9] 等。虽然 CID、PSD 和 ECD 广泛应用在规模化多肽测序/蛋白质鉴定中,但是随着蛋白质组学研究领域的深入,这些解离方式也暴露出一些弱点,主要是对肽链的解离有选择性。例如 P(脯氨酸)的 N 端一侧、酸性氨基酸残基(D,天冬氨酸;E,谷氨酸)的 C 端一侧以及 H(组氨酸)附近的肽键会优先断裂,而其他位置的解离则相应的受到抑制;其次,多肽序列中含有多个碱性氨基酸时会使得多肽主链的随机质子化受到抑制,从而抑制质子催化的肽键断裂;第三,某些翻译后修饰,例如糖基化、磷酸化基团也会优先断裂,使主链的广泛解离受到抑制^[10-11];第四,ECD 会中和一些肽段离子的电荷,降低检测灵敏度。这些缺点使得解离方式给图谱解析带来困难^[12],使其在蛋白质组学研究中的应用受到限制。因此,很多研究小组通过各种化学修饰策略^[13-17]来辅助肽段的解离和质谱测序,其中磺化修饰在解决这些难题时是特别有价值的一种策略。本工作对近几年来报道的磺化修饰策略及其在蛋白质组研究中的应用进行了评述。

1 磺酸基对肽段解离的诱导作用原理

因为 PSD 和 CID 解离方式产生的二级质谱图比较复杂,可能产生内部碎片离子、亚铵离子和 a、b、c、d、x、y、z 离子等多种类型的碎片离子峰^[18],还会产生相应的脱氨峰和脱水峰,使得谱图非常复杂,难以解析。而质谱数据越复杂,蛋

白质鉴定的假阳性率就越高^[19],因此,如果能通过化学修饰控制多肽的二级质谱解离方式并抑制某些碎片离子的形成,使二级质谱图中只出现单一类型的系列离子,便能够方便地从质谱图中推导出肽序列。通过对多肽的 N 端或 C 端进行修饰并引入正电荷或负电荷,使其电荷增强或削弱,有可能达到这种效果^[20]。

Keough 等^[14]首先发现,通过酰化反应在酶切肽段的 N 端引入带一个单位负电荷的磺酸基,可以促进肽链酰胺键的断裂并抑制 N 端碎片离子的生成,产生连续的 y 系列离子,从而有利于肽段的从头测序。根据移动质子模型 (mobile proton model)^[21],来自磺酸基的游离质子与肽键上的酰胺基结合后,可诱导质子化位点处酰胺键的断裂,得到 b 和 y 系列离子;而 b 离子因其 N 端的正电荷被 N 端磺化基团的负电荷取代,因此在正电荷模式下,不能被质谱检测;只有带正电荷的 y 离子能被检测。Keough 等^[14]以此法得到全部为 y 离子组成的串联质谱图并进行数据库检索,当限定碎片离子为 y 离子时,得到 6 个候选蛋白质;而设定离子类型为 a, b, (b + H₂O), (b - NH₃), (b - H₂O), internal 和 y 离子时则得到 239 个候选蛋白质。这些结果表明,放宽限制条件必然增大假阳性检测的可能,而通过磺化修饰控制肽段的质谱解离行为后,既可以简化二级质谱图,又可以提高蛋白质鉴定的可靠性,降低假阳性率。

肽链氨基端的磺化修饰反应示于图 1(以邻磺基苯甲酸环酐为例)。

2 磺酸化修饰基团的引入

可以通过多种方式在肽链中引入磺酸基团,其中主要是通过酰化反应使其结合到多肽的氨基上。

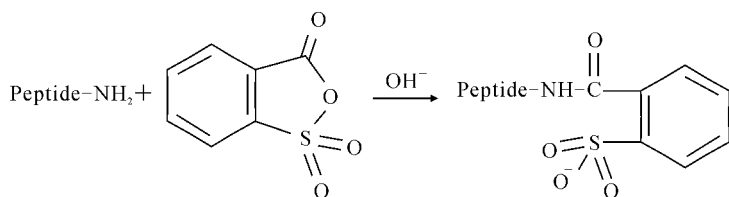


图 1 磺化修饰反应原理图

Fig. 1 Diagram of sulfonated modification reaction principle

2.1 氯磺酰乙酰氯(CSAC)

在 MALDI 源条件下,C 端为 Lys 的肽段比为 Arg 的肽段在质谱中离子信号强度明显小很多^[22],且氨基衍生试剂与肽段反应时,衍生反应既在 N 端发生,也在含 Lys 肽段的 ϵ -氨基上发生^[23]。Keough 等^[24]采用 CSCA 磷酸化时,首先将赖氨酸残基的 ϵ -氨基胍基化,使赖氨酸转变为高精氨酸后,再通过 CSAC 在精氨酸或高精氨酸肽段 N 末端选择性地引入磷酸基,可获得几乎全部由 y 系列离子组成的谱图。CSAC 试剂的缺点是活性太强,在水中很不稳定,容易水解,反应只能在无水环境中进行。

2.2 N-羟基琥珀酰亚胺酯类

磷酸基取代的各种羧酸,经过 N-羟基琥珀酰亚胺活化后,很容易与肽段上的伯氨基反应,从而在肽段上引入磷酸基。这些试剂活性较为温和,反应条件比较简单,有些水溶性较好,可以直接在多肽水溶液中进行修饰。Keough 等^[25-26]用磷酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯对肽段进行衍生化,发现产生裂解碎片的强度是衍生前的 28 倍,显著改善了含 Asp、Glu 或氧化的 Met 肽段的离子阱串联质谱图的质量和信噪比。

另外,将蛋白进行 O-甲基异脲氢硫酸胍基化修饰后,再用 3-丙磷酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯磷酸化衍生,修饰的产物在进行 PSD 测序时得到的也是单一的 y 系列离子^[27],有利于肽段进行从头测序分析。

2.3 邻磺基苯甲酸环酐(SACA)

SACA 是通过酸酐的胺解反应在肽段氨基上引入磷酸基。虽然它不溶于水,但先用四氢呋喃等与水混溶的有机溶剂溶解后,可以加入到肽段的水溶液中进行反应^[14],条件也很温和,操作简单。采用 SACA 修饰后的 N 末端肽段,由于磷酸根的强酸性,修饰后的肽段离子在负离子模式下进行质谱分析时,该离子表现为基峰^[28],因此可被选出进一步进行 MS/MS 分析,从而可以快速确定氨基末端,有利于蛋白质的鉴定。Samyn 等^[29]通过 SACA 对肽段的磷酸化修饰,结合三种不同同源性的搜索算法,从没有获得全基因序列的 *Halorhodospira halophila* 细菌中鉴定到 31 个蛋白质。

2.4 磺苯基异硫氰酸(SPITC)

Gevaert 等^[30]试图通过 4-磺苯基异硫氰酸与伯胺的甲酰化反应在肽段 N 端引入磷酸基,

以达到引入磷酸化基团的目的,但该方法的灵敏度很低,蛋白质起始量达到纳摩尔水平才能被鉴定。Marekov 和 Steinert^[31]对此进行了改进,不仅缩短了反应时间,而且提高了灵敏度,可以分析皮摩尔水平的蛋白质。之后又有人对这类反应作了优化,如用挥发性更强的醋酸胺代替有机溶剂三乙胺,去除了衍生反应中的乙醇,使之更有利于实验操作;加入辅助试剂碳酸氢铵,并对 SPITC 试剂浓度、反应温度和时间进一步完善,使得质谱信号比改进前提高了 9 倍^[32];通过控制 SPITC 试剂用量与调节溶液 pH 值,实现了 N 端氨基的选择性磺化^[33]。在中药处理前后肝脏随体细胞(HSC)的差异蛋白质的鉴定中,通过使用 SPITC 磷酸化修饰的方法找到了一些一般方法无法确定的蛋白质^[34]。

目前这几类磺化试剂中,后三种因比较稳定、操作方便而使用较多。除了对各种磺化反应条件的不断优化外,研究者还对试剂本身进行改进,以期待更好的使用。如 Lee 及 Guillaume 等^[35-36]分别合成了¹³C-SPITC 试剂,与常规的¹²C-SPITC 同时标记不同状态的蛋白质,不仅易于对蛋白质进行从头测序,而且能对其进行相对定量。

3 磷酸化修饰的应用

3.1 MALDI MS 的 PSD 解离方式

Keough 等^[24]以一段天然肽段(VGGY-GYGAK)为模型,比较了其天然状态、胍基化状态和胍基化加磷酸化状态在 MALDI PSD 模式下得到的质谱图,发现不做任何修饰的肽段得到的谱图非常复杂,出现了 N 端的 a、b 离子和 C 端的 y 离子及内部离子;胍基化修饰后也没有提高肽段的解离效率,a、b、y 离子和内部离子仍都存在;而在胍基化后再磺化修饰的肽段,则主要得到 y 离子,此时谱图变得简单,很容易进行从头解析。过去提出许多修饰方法是使用阳离子或含有强碱性基团的衍生剂来提高肽段检测的灵敏度,但他们都没有提高断裂程度或简化解离模式;使用强酸性的磷酸基团则使得到的 PSD 谱图非常简单^[37]。这种方法用到了肌红蛋白和细胞色素 C 的胰蛋白酶酶解混合肽段中,得到了适合于从头测序的修饰肽段的质谱图。

磺化修饰也适用于鉴定胶上分离的蛋白质。Sergeant 等^[38]将胍基化反应改为在胶上进行,

并在胶中酶解、萃取,用 MALDI TOF/TOF MS 比较了胶上胍基化加邻磺基苯甲酸环酐(2-SACA)磺酸化修饰的 PMF 谱图,并鉴定了从 *Shewanella oneidensis* 的 2DE 中分离出的蛋白质。发现不同的方法都能观察到连续的 y 系列离子,都可看到一个磺酸衍生的最初质量丢失($\Delta m=184$ Da);但在胶中胍基化后酶解时,与溶液中酶解相比,得到了更多的肽段数目和随之更高的序列覆盖率。用算法 FASTS 搜索,鉴定到 53 个蛋白质,且有长达 20 个氨基酸残基的肽段序列被确定。在所有鉴定的蛋白质点中,最高得分的蛋白质都来自 *Shewanella* 菌种,较低得分的蛋白质点对应的也都是相关的同源蛋白质。另外,在鼻咽癌相关基因 NAG4 的转染蛋白质差异点的鉴定中,通过磺化辅助修饰结合固相衍生后得到的肽片段,在 PSD 解离方式下测定时产生单一的 y 系列离子,对转染前后的差异蛋白质点的鉴定取得可靠结果。使几个用 PMF 方法鉴定后仍不能确定归属的蛋白经 MALDI MS 的 PSD 解离测序,获得了内部序列结构从而得到确认^[27]。

3.2 ESI MS 的 CID 解离方式

磺酸化修饰不仅使肽段在 MALDI MS 的 PSD 方式下的解离产物变得简单,而且在 ESI MS 的 CID 解离方式下的行为也有改善。Mark 等^[39]首次使用三级四极杆质谱仪和离子阱质谱仪,分析比较了肽段在磺化前后电喷雾质谱下的行为。结果发现未衍生化的单电荷肽离子很难得到有用的串联质谱图,而在磺化后则可得到很完整的 y 系列离子质谱图;对双电荷肽离子,磺化前后则产生相似的谱图。

Lee 等^[33]采用液质联用仪(cRPLC-MS/MS)分析了磺化肽段的色谱与质谱行为,发现 SPITC 修饰后的标准肽段在色谱分离后的峰形更加尖锐。在 ESI 源质谱的 CID 模式中,磺化肽段也可以产生连续的 y 离子,但以 y_{n-1} 离子为主;这种 y_{n-1} 离子的优势在先前的 PSD 试验中并没有观察到。他们还发现,几乎每个以 Lys 结尾的肽段都可看到有内部碎片形成,而每个以 Arg 结尾的肽段则很少产生内部离子峰,可能是精氨酸和赖氨酸的质子亲和力在气相条件(离解能)与液相条件(pKa)下的差别所致。例如,质子的亲和能:Arginine ($298.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), lysine ($282.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$);解离常数:Arginine

(pKa 11), lysine (pKa 7.8)^[40]。较高的质子亲和力和会抑制 y_{n-1} 离子序列裂解。通过模拟数据库检索分析发现,N 端的 SPITC 修饰使质谱鉴定的可信度大大提高。

3.3 定量蛋白质组研究

用质谱进行定量的方法,如稳定同位素代谢标记法(stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC)是将细胞分别在正常培养基和富含某重质同位素(如¹⁵N)的相同培养基中培养,一定时间后将两者混合酶解,然后选择性亲和分离、色谱分离,并进行质谱分析^[41]。这种方法的标记物在早期加入,实验误差被最小化,但样品必须通过细胞培养获得,不能直接分析从组织中提取的细胞或临床样本;同时,对未知序列的肽段,因为不知道其中被标记的准确原子数而无法寻找成对峰进行分析。目前研究者多采用化学结构相同但质量不同的稳定同位素标签,来选择性标记特定氨基酸,进而用质谱定量蛋白质或多肽。如由 Gygi 等^[42]发明的标记半胱氨酸的同位素亲和标签技术(isotope-coded affinity tag, ICAT)是利用 ICAT 试剂预先选择性地标记含半胱氨酸的肽段,分离纯化后通过质谱进行鉴定,最后根据质谱图上不同 ICAT 试剂标记的一对肽段离子峰的强度比例,定量分析它们母体蛋白质的相对丰度。其缺点是不含此特异氨基酸的肽将不被标记,那些功能很重要但不含 Cys 的蛋白质可能会被遗失。而磺酸化试剂做成的同位素标签,因为标记的是肽段的氨基则不存在这种丢失。Lee 等^[35]用¹²C、¹³C-SPITC 同位素试剂标记肽段,利用每对同位素标签 6 Da 的质量差异,用 cRPLC-MS/MS 分析了酵母烯醇酶,通过肽段相对定量,得到结果相对误差小于 13%;Guillaume 等^[36]利用合成的 SPITC 同位素试剂标记蛋白质,对三种标准蛋白的混合物进行同时的鉴定和定量,无论使用 MALDI-TOF/TOF 或 LC-ESI-MS/MS,鉴定和定量都得到了理想的结果。

3.4 蛋白质翻译后修饰研究

泛素化是介导蛋白质降解、参与多种细胞信号传导和功能调节的重要调控机制^[43]。泛素化修饰的蛋白质经胰蛋白酶酶切后会产生泛素化修饰的特征肽。因泛素化修饰的肽在肽链赖氨酸 ϵ -氨基上以异肽键方式连接着泛素的 C 末端片段 GlyGly,而 GlyGly 修饰的肽链被磺酸化修

饰后会在肽链的 N 端和支链的第一个甘氨酸上都分别连接上一个磺酸基团,从而在串联质谱图上看到两种产物的离子簇,与其他非泛素化肽的谱图区别开来。Wang 等^[44]用 MALDI TOF/TOF 分析泛素化的 C 端 Hsc-70 相互作用蛋白,在一百多个肽段中找到了含双甘氨酸支链的三个肽段,又用 Nano ESI-MS/MS 鉴定了三种泛素结合模式蛋白质^[45],为以后两种质谱鉴定含多个泛素化位点的较复杂体系打下了基础。

蛋白质的磺酸化修饰也是目前翻译后修饰研究的重要内容。陈平等^[46]将 SPITC 磺化衍生与固相金属离子亲和色谱结合,选择性地从合成多肽及酪蛋白的胰酶酶解肽段混合物中提取磷酸肽,并成功进行了磺酸化位点的鉴定。这种方法避免了通常磷酸肽分离鉴定中的磷酸酶水解和放射性标记等复杂操作,而且背景清晰,以 y 离子系列为主的谱图极大地提高了位点鉴定的准确性和通量性。

3.5 半胱氨酸肽的富集

Dai 等^[47]利用过甲酸氧化反应,将蛋白质中的二硫键巯基氧化成磺酸基,使其半胱氨酸肽段带上磺酸基。磺酸化比其他肽段正电荷数少,再通过阳离子交换色谱来富集半胱氨酸肽,发现不仅可以通过富集半胱氨酸肽段来降低肽段混合物的复杂程度,还可以促进半胱氨酸肽的质谱解离,有利于蛋白质鉴定。

3.6 蛋白质 N 端序列的快速分析

Zhou 等^[48]通过蛋白质 N 端的选择性磺化,使蛋白质的 N 端带上磺酸基,酶切后只有 N 端肽带有磺酸基,发现在负离子模式下进行 PMF 分析时,磺化后的 N 端肽信号远远大于未被磺化的其他肽段,使 N 端肽很容易被识别。在确定 N 端肽后,再切换到正离子模式下对磺化的 N 端肽进行串联质谱分析,发现二级质谱图上只有连续的 y 系列离子,非常有利于蛋白质 N 端肽段的序列分析。该方法还有一个好处,N 端磺化基本不影响蛋白质的酶切和其他肽段的分析,这样在测出 N 端序列后,还可以对其他肽段进行分析,从而提高蛋白质鉴定与表征的可靠性。

4 结 论

在利用生物质谱进行蛋白质或肽段的序列分析中,最有价值的解离是沿着肽段的主链进行。虽然描述沿着肽段主链解离形成的离子类

型早有命名^[49-50],然而,目前已有的知识不足以准确预测或推断这些键中哪些将会断开或当一个键断开后哪个解离肽段的哪个部位将会保留电荷。磺化试剂选择性地与肽段 N 端氨基反应,衍生后的肽段在质谱检测时会产生唯一的 y 系列离子,在简化谱图复杂性方面具有强大优势。而且化学修饰辅助技术又可以使所有肽键的解离更加均匀,产生更丰富的序列信息,非常有利于蛋白质酶解肽段序列的从头测序分析,这都为蛋白质的准确鉴定提供有力的依据。但是仍有不少问题需要考虑,比如一些磺化试剂的毒性问题、反应效率及副反应问题等,另外,对于 N 端封闭的肽段或蛋白质,磺化反应将不能进行。蛋白质组学的发展对分析技术提出了越来越多的挑战,单凭一种技术无法满足所有要求,必须与其他技术方法结合,相互补充,使每一种方法的最大优势得以充分发挥。

参考文献:

- [1] MCLAFFERTY F W, FRIDRIKSSON E K, HOM D M, et al. Biomolecule mass spectrometry[J]. Science, 1999, 284(5418):1 289-1 290.
- [2] AEBERSOLD R, MANN M. Mass spectrometry-based proteomics[J]. Nature, 2003, 422(6928): 198-207.
- [3] 钱小红,贺福初. 蛋白质组学:理论与方法[M]. 北京:科学出版社,2003:101-116.
- [4] GU Q M, PRESTWICH G D. Efficient peptide ladder sequencing by MALDI-TOF mass spectrometry using allyl isothiocyanate[J]. J Pept Res, 1997, 49(6):484-491.
- [5] MANN M, HOJRUP P, ROEPSTORFF P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases[J]. Biol Mass Spectrom, 1993, 22(6):338-345.
- [6] YATES J R, SPEICHER S, GRIFFIN P R, et al. Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification [J]. Anal Biochem, 1993, 214(2):397-408.
- [7] GEVAERT K, DEMOL H, MARTENS L, et al. Protein identification based on matrix assisted laser desorption/ionization-post source decay-mass spectrometry [J]. Electrophoresis, 2001, 22 (9): 1 645-1 651.
- [8] WELLS J M, MCLUCKETY S A. Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins

- [J]. *Methods Enzymol*, 2005, 402:148-185.
- [9] CJURNOYER J J, LIN C, O'CONNOR P B. Detecting deamidation products in proteins by electron capture dissociation[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(4):1 264-1 271.
- [10] WYSOCKI V H, TSAPRAILS G, SMITH L L, et al. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation[J]. *J Mass Spectrom*, 2000, 35(12): 1 399-1 406.
- [11] MIRGORODSKAYA E, ROEPSTORFF P, ZUBAREY R A. Localization of O-glycosylation sites in peptides by electron capture dissociation in a Fourier transform mass spectrometer[J]. *Anal Chem*, 1999, 71(20): 4 431-4 436.
- [12] SHEVCHENKO A, LOBODA A, ENS W, et al. MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research [J]. *Anal Chem*, 2000, 72(9):2 132-2 141.
- [13] BARTLET-JONES M, JEFFERY W A, HANSEN H F, et al. Peptide ladder sequencing by mass spectrometry using a novel, volatile degradation reagent[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1994, 8(9):737-742.
- [14] KEOUGH T, YOUNGQUIST R S, LACET M P. A method for high-sensitivity peptide sequencing using postsource decay matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96(13):7 131-7 136.
- [15] ZHANG R, SIOMA C S, WANG S, et al. Fractionation of isotopically labeled peptides in quantitative proteomics [J]. *Anal Chem*, 2001, 73 (21):5 142-5 149.
- [16] YEW J Y, DIKLER S, STRETTON A O. De novo sequencing of novel neuropeptides directly from *Ascaris suum* tissue using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17(24): 2 693-2 698.
- [17] GOODLETT D R, KELLER A, WATTS J D, et al. Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2001, 15 (14):1 214-1 221.
- [18] CHAURAND P, LUETZENKIRCHEN F, SPENGLER B. Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1999, 10(2):91-103.
- [19] MANN M, WILM M. Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags[J]. *Anal Chem*, 1994, 66(24): 4 390-4 399.
- [20] ROTH K D, HUANG Z H, SADAGOPAN N, et al. Charge derivatization of peptides for analysis by mass spectrometry [J]. *Mass Spectrom Rev*, 1998, 17(4):255-274.
- [21] DONGRE A R, JONES J L, SOMOGYI A, et al. Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model[J]. *J Am Chem Soc*, 1996, 118: 8 365-8 374.
- [22] KRAUSE E, WENSCHUH H, JUNGBLUT P R. The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins [J]. *Anal Chem*, 1999, 71 (19): 4 160-4 165.
- [23] ZHANG X L, JIN Q K, CARR S A, et al. N-terminal peptide labeling strategy for incorporation of isotope tag: a method for the determination of site specific absolute phosphorylation stoichiometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16(24): 2 325-2 332.
- [24] KEOUGH T, LACEY M P, YOUNGQUIST R S. Derivatization procedures to facilitate de novo sequencing of lysine-terminated tryptic peptides using postsource decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, 14(24):2 348-2 356.
- [25] KEOUGH T, LACEY M P, STRIFE R J. Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption /ionization ion trap mass spectrometry of sulfonic acid derivatized tryptic peptides[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2001, 15(23): 2 227-2 239.
- [26] KEOUGH T, LACEY M P, YOUNGQUIST R S. Solid-phase derivatization of tryptic peptides for rapid protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16 (11):1 003-1 015.
- [27] 陈 平, 聂 松, 谢锦云, 等. 固相化学辅助 MALDI-TOF 质谱源后衰变技术对 2D-胶银染蛋白质点的鉴定[J]. *生物化学与生物物理学报*,

- 2003, 35(7): 635-642.
- [28] 周春喜, 赵丽艳, 张养军, 等. 一种基于化学修饰结合 MALDI-TOF-TOF MS 的蛋白质 N 端序列测定方法[C]//中国蛋白质组学第四届学术大会论文集. 西安: 第四军医大学出版社, 2006: 213-214.
- [29] SAMVN B, SERGEANT K, MEMMIN S, et al. MALDI-TOF/TOF de novo sequence analysis of 2-D PAGE-separated proteins from *Halorhodospira halophila*, a bacterium with unsequenced genome[J]. Electrophoresis, 2006, 27(13): 2 702-2 711.
- [30] GEVAERT K, DEMOL H, MARTENS L, et al. Protein identification based on matrix assisted laser desorption/ionization-post source decay-mass spectrometry[J]. Electrophoresis, 2001, 22(9): 1 645-1 651.
- [31] MAREKOY L N, STEINERT P M. Charge derivatization by 4-sulfophenyl isothiocyanate enhances peptide sequencing by post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2003, 38(4): 373-377.
- [32] WANG D X, KALB S R, COTTER R J. Improved procedures for N-terminal sulfonation of peptides for matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay peptide sequencing[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004, 18(1): 96-102.
- [33] LEE Y H, KIM M S, CHOIE W S, et al. Highly informative proteome analysis by combining improved N-terminal sulfonation for de novo peptide sequencing and online capillary reverse-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Proteomics, 2004, 4(6): 1 684-1 694.
- [34] CHEN P, NIE S MI W, et al. De novo sequencing of tryptic peptides sulfonated by 4-sulfophenyl isothiocyanate for unambiguous protein identification using post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004, 18(2): 191-198.
- [35] LEE Y H, HAN H, CHANG S B, et al. Isotope-coded N-terminal sulfonation of peptides allows quantitative proteomic analysis with increased de novo peptide sequencing capability[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004, 18(24): 3 019-3 027.
- [36] GUILLAUME E, PANCHANUD A, AFFO-LTER M, et al. Differentially isotope-coded N-terminal protein sulphonation: Combining protein identification and quantification[J]. Proteomics, 2006, 6(8): 2 338-2 349.
- [37] KEOUGH T, YOUNGQUIST R S, LACEY M P. Sulfonic Acid Derivatives for Peptide Sequencing by MALDI-MS[J]. Anal Chem, 2003, 75(7): 156A-165A.
- [38] SERGEANT K, SAMYN B, DEBYSER J, et al. De novo sequence analysis of N-terminal sulfonated peptides after in-gel guanidination[J]. Proteomics, 2005, 5(9): 2 369-2 380.
- [39] BAUER M D, SUN Y P, KEOUGH T, et al. Sequencing of sulfonic acid derivatized peptides by electrospray mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2000, 14(10): 924-929.
- [40] RABENSTEIN D, HARI SP, KAERNER A. Determination of acid dissociation constants of peptide side-chain functional groups by two-dimensional NMR[J]. Anal Chem, 1997, 69(21): 4 310-4 316.
- [41] ONG S E, BLAGOEY B, KRATCHMAROVA I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics[J]. Mol Cell Proteomics, 2002, 376-386.
- [42] GYGI S P, RIST B, GERBER S A, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags[J]. Nature Biotech, 1999, 17(10): 994-999.
- [43] PASSMORE L A, BARFORD D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation[J]. Biochem J, 2004, 379(3): 513-525.
- [44] WANG D X, XU W P, MCGRATH S C, et al. Direct identification of ubiquitination sites on ubiquitin-conjugated CHIP using MALDI mass spectrometry[J]. J Proteome Res, 2005, 4(5): 1 554-1 560.
- [45] WANG D X, KALUME D, COTTER R J, et al. Identification of protein ubiquitylation by electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of sulfonated tryptic peptides[J]. Anal Chem, 2006, 78(11): 3 681-3 687.
- [46] 陈 平, 李水明, 刘 宇, 等. 利用磺基异硫氰酸苯酯化学辅助方法鉴定磷酸化肽修饰位点

[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22 (7): 591-598.

[47] DAI J Q, WANG J L, ZHANG Y J, et al. Enrichment and identification of cysteine-containing peptides from tryptic digests of performic oxidized proteins by strong cation exchange LC and MALDI-TOF/TOF MS[J]. Anal Chem, 2005, 77(23):7 594-7 604.

[48] ZHOU C X, ZHANG Y J, QIN P B, et al. A method for rapidly confirming protein N-terminal sequences by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20(19): 2 878-2 884.

[49] ROEPSTORFF P, FOHLMAN J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides[J]. Biomed Mass Spectrom, 1984, 11(11): 601.

[50] BIEMANN K. Mass spectrometry of peptides and proteins[J]. Annu Rev Biochem, 1992, 61: 977-1 010.

=====

关于召开 2007 年全国无机质谱、同位素质谱、
质谱仪器与教育学学术交流会的通知
(第一轮)

中国质谱学会无机质谱、同位素质谱、质谱仪器与教育学学术交流会将于 2007 年 10 月初在湖北省宜昌市召开。本次会议由无机质谱、同位素质谱、质谱仪器与教育三个专业委员会主办。会议将邀请国内、外有经验的质谱专家作大会专题报告,举行分组专题报告交流各个领域最新研究成果及应用经验。欢迎相关领域的科技人员、研究生踊跃参加。

会议征稿内容:凡未公开发表的有关无机质谱、同位素质谱、质谱仪器及质谱教育学的研究成果,包括测量方法研究和应用、质谱仪器研制和改进、质谱新技术、新思维和质谱教育学的心得、体会及综述文章均可投稿。征稿截止日期:2007 年 6 月 30 日(以邮戳为准)。

会议其它详细内容,请参见质谱学会和质谱学报网站信息,或者向相关联系人咨询。

报名内容:姓名、性别、年龄;工作单位及通讯地址、职称及职务,电话和 E-mail;有无参会论文。

会议联系人:

1、无机质谱技术与应用

刘虎生:北京学院路 38 号,北京大学公共卫生学院中心仪器室,邮编 100083;

E-mail:lus-4023@163.com

2、质谱仪器和教育

陈大舟:北京北三环东路 18 号,中国计量科学研究院化学所,邮编 100013;

E-mail:chendz@nim.ac.cn

3、同位素质谱、同位素稀释及其他

赵墨田:北京北三环东路十八号 中国计量科学研究院化学所,邮编 100013;

E-mail:motian_zhao@263.net.cn

主办单位:无机质谱专业组
同位素质谱专业组
仪器与教育专业组