

芋螺毒素 cr5a 的电喷雾四极杆飞行时间串联质谱分析

刘尚义¹, 蔡 耘², 范崇旭¹, 王京兰², 曹 瑛¹, 陈冀胜¹, 钱小红²

(1. 防化研究院第四研究所, 北京 102205; 2. 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要: cr5a 是从中国南海软体动物芋螺的毒液中分离出的一种新的芋螺毒素。为了验证已得到的氨基酸序列分析结果, 利用纳升电喷雾四极杆飞行时间串联质谱对 cr5a 的碘代乙酰胺(IAM)衍生物进行了串联质谱从头测序分析, 采用 MassLynx 3.5 系统进行数据采集与处理, 通过 MassSeq 软件提取串联质谱所得的氨基酸序列。软件提取的序列 CCKFQFLNFCNE 与 N 末端序列分析结果相符, 使得 cr5a 的氨基酸序列得到进一步验证。

关键词: 电喷雾飞行时间串联质谱; 芋螺毒素; 从头测序

中图分类号: O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2007)02-87-05

Analysis of New Conotoxin cr5a by nano Q-ESI-TOF-MS/MS

LIU Shang-yi¹, CAI Yun², FAN Chong-xu¹, WANG Jing-lan², CAO Ying¹,

CHEN Ji-sheng¹, QIAN Xiao-hong²

(1. The 4th Department, Institute of Chemical Defense, Beijing 102205, China;

2. Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract: cr5a is a new conotoxin isolated from the venom of *conus carateristicus*, which is one kind of gastropod mollusks in South China Sea. In order to validate the sequence, the iodoacetamide derivative of cr5a was analyzed by nano quadrupole electrospray ionization time of flight tandem mass spectrometry (nano Q-ESI-TOF-MS/MS). Tandem mass spectral data were acquired and processed with MassLynx 3.5, and then amino acid sequences were deduced with MassSeq software according to the mass differences between y- or b-ion ladder series and confirmed by manual interpretation. The sequence of CCKFQFLNFCNE is identical with the result of N-terminal Edman sequence analysis, and the result is validated further.

Key words: nano quadrupole electrospray ionization time of flight tandem mass spectrometry (nano Q-ESI-TOF-MS/MS); conotoxin; de novo sequencing

氨基酸的排列顺序,即一级结构决定了多肽和蛋白质的高级结构与功能,因此,氨基酸序列分析是进行多肽和蛋白质结构功能研究不可缺少的组成部分。目前,多肽和蛋白质的氨基酸序列分析方法主要采用 N 末端 Edman 降解法^[1]、C 末端化学降解法和 C 末端的羧肽酶酶解法等,这些方法都存在一定的缺陷和局限性。如最常用的 N 末端 Edman 降解法测定速度较慢(每天约 50 个氨基酸残基)难于实现高通量;样品用量相对较大(大于 10 pmol),对低丰度蛋白质鉴定上的灵敏度难于达到要求;对样品纯度要求较高(大于 95%);不适用于 N 末端封闭的多肽和蛋白质以及环肽等;对侧链修饰的氨基酸辨认存在困难;有时难以得到完整的多肽序列;对于衍生得到 PTH-氨基酸分析谱的识别有时较为困难,影响正确辨认等^[2]。C 末端化学降解法技术还不尽完善,其应用还受到偶联试剂和裂解试剂等限制^[2],灵敏度低,速度慢。C 末端的羧肽酶酶解法受所使用的羧肽酶种类和多肽、蛋白质的 C 末端序列本身影响比较大,对不同的多肽或蛋白质需要进行尝试,建立不同的方法。

串联质谱法是近些年发展起来的一种多肽序列分析手段,它主要指生物质谱通过碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)^[3]或源后衰变(post source decay, PSD)^[4]等过程产生一系列碎片离子(如酰胺键断裂产生的 b-离子和 y-离子),并通过对这些碎片离子的解析,得到待测多肽分子的氨基酸序列信息。得到的质谱数据既可以通过仪器提供的软件解析,也可以进行手工解析,这种方法尤其适用于肽混合物和 N 末端封闭的多肽序列分析,具有灵敏度高(pmol 级甚至更低)、结果准确、易于操作和分析快速等优点。

芋螺毒素是存在于海洋软体动物芋螺毒液中的一类生物活性多肽^[5]。芋螺毒素一般含有 10~35 个氨基酸残基,大多数富含半胱氨酸并形成有一定保守性的二硫键骨架。它们构象较稳定,能选择性地作用于离子通道等蛋白受体,从而影响神经传导,产生不同的生理作用。它既为神经科学提供了有效工具,又拓宽了新药开发的领域,具有较大的潜在应用价值。

cr5a 是从中国南海独特芋螺(*conus characteristicus*)毒液中分离得到的一种新的芋螺毒素,通过氨基酸组成分析、N 末端 Edman 降解法

序列分析和 C 末端序列分析鉴定得到其氨基酸序列。为了验证 cr5a 的氨基酸序列,本工作对其进行了固相肽化学合成^[6],并采用电喷雾飞行时间串联质谱(ESI-TOF-MS/MS)对 cr5a 的碘代乙酰胺(IAM)衍生物进行从头测序分析,进一步验证其氨基酸序列。

1 实验部分

1.1 主要仪器

基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS):英国 Micromass 公司产品,配有 MassLynx 3.5 数据采集与处理系统;Q-TOF micro 型正交加速电喷雾飞行时间串联质谱仪:英国 Micromass 公司产品,配有纳升电喷雾离子源(nano ESI)及 MassLynx 3.5 数据采集与处理系统。

1.2 主要材料与试剂

cr5a 是从独特芋螺毒液中经凝胶色谱、HPLC 分离得到。*D,L*-二巯苏糖醇(DTT):上海丽珠东风生物技术有限公司产品;盐酸胍(BR):华美生物工程公司产品;碘代乙酰胺(IAM):Fluka Biochemika 公司产品; α -氰基-4-羟基肉桂酸(CCA):Sigma 公司产品;其余试剂均为分析纯。

1.3 实验条件

1.3.1 cr5a 的还原与衍生 将约 1 nmol cr5a 样品溶于 5 μ L 1 M Tris-HOAc (含 0.01 M EDTA)缓冲液中(pH 8.5),加入 2.9 mg 盐酸胍,37 $^{\circ}$ C 下保温 1.5 h。加入 0.15 mg *D,L*-二巯苏糖醇,充入 N_2 后,在 37 $^{\circ}$ C 下反应 5 h,冷却至室温,加入 0.5 mg 碘代乙酰胺,在暗处反应 20 min 后,用 C_{18} Zip-Tip(美国 Millipore 公司产品)脱盐。对所得衍生物的混合物进行 MALDI-TOF 和 ESI-TOF 质谱分析。

1.3.2 MALDI-TOF 质谱条件 氮激光器,波长 337 nm,加速电压 15 kV,脉冲电压 2 950 V,反射电压 500 V,检测电压 1 850 V。采用 MassLynx 3.5 系统进行数据采集与处理。

1.3.3 ESI-TOF-MS(MS/MS)质谱条件 利用 Q-TOF micro 型串联质谱的纳升喷雾(Nano-Spray)方式对 2 μ L cr5a 的碘代乙酰胺衍生物进行分析。采用 MassLynx 3.5 系统进行数据采集与处理,通过 MassSeq 软件提取串联质谱所得到的氨基酸序列。

采用正离子检测方式:用 Glu-fib 串联质谱碎片进行仪器校正;雾化气为氮气,碰撞气为氦气;源温 80 ℃,锥孔电压 50 V 左右;TOF 加速电压为 9.1 kV;MCP 检测器电压为 2 200 V;毛细管电压为 800~1 000 V。通过实时质谱检测选择母离子后,切入串联质谱方式,调节碰撞能量(约 30 V)可以得到合适的串联质谱图。

2 结果与讨论

通过氨基酸组成分析、N 末端序列分析和 C 末端序列分析得到的 cr5a 氨基酸序列是 CCK-FQFLNFCCNE。为了进一步验证 cr5a 的序列信息,对其 IAM 衍生物进行了串联质谱分析。

2.1 cr5a 及其碘代乙酰胺 (IAM) 衍生物的 MALDI-TOF 质谱分析

图 1 是 cr5a(图 A)及其 IAM 衍生物 cr5a(IAM)(图 B)的 MALDI-TOF 质谱图,二者的 $[M+H]^+$ 分别是 1 594.43 和 1 826.68,相差 232.25,正好约是 $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ (IAM 的衍生基团)相对分子质量 58.03 的 4 倍,这进一步证实了 cr5a 序列中存在 4 个形成二硫键的 Cys 残基。此外,cr5a 质谱图中还有 $[M+Na]^+$ 峰(m/z 1 616.42)和 $[M+K]^+$ 峰(m/z 1 632.39),cr5a(IAM)质谱图中的 $[M+Na]^+$ 峰和 $[M+K]^+$ 峰分别为 m/z 1 838.65 和 m/z 1 864.66。

图 1B 中出现 cr5a 的系列质谱峰,说明 cr5a 的还原与衍生反应未进行完全。

2.2 cr5a 衍生物的 ESI-TOF 质谱分析

cr5a IAM 衍生物的 ESI-TOF 质谱图示于图 2,其中(A)是原始的多电荷质谱图,(B)是经 MaxEnt3 软件转换后的质谱图。图(A)中主要有 cr5a IAM 衍生物的 $[M+2H]^{2+}$ (m/z 913.86)、 $[M+Na+H]^{2+}$ (m/z 924.85)和 $[M+K+H]^{2+}$ (m/z 942.36)等质谱峰,另外还有 cr5a 的 $[M+2H]^{2+}$ (m/z 797.80)等质谱峰,其结果与 MALDI-TOF 质谱分析结果一致。选择双电荷 m/z 913.86 离子进行进一步的串联质谱分析。

2.3 cr5a 衍生物的 ESI-TOF 串联质谱分析

双电荷离子 m/z 913.86 的串联质谱图示于图 3,经 MassEnt3 转换并经 MassSeq 软件解析出其部分序列,配合手工解析得到序列 CCKFD-FLNFCCDE,该序列的相对分子质量计算值为 1 825.70 Da,与测得值 1 825.76 Da 吻合。分析其图谱,除 y-离子系列的 y₁、y₁₂ 离子和 b-离子系列的 b₁ 离子无信号外,其余都有信号出现,并且大部分都是谱图中信号强度大的峰,说明图谱解析是正确的。因此 cr5a 的氨基酸序列通过串联质谱分析得到进一步确认。

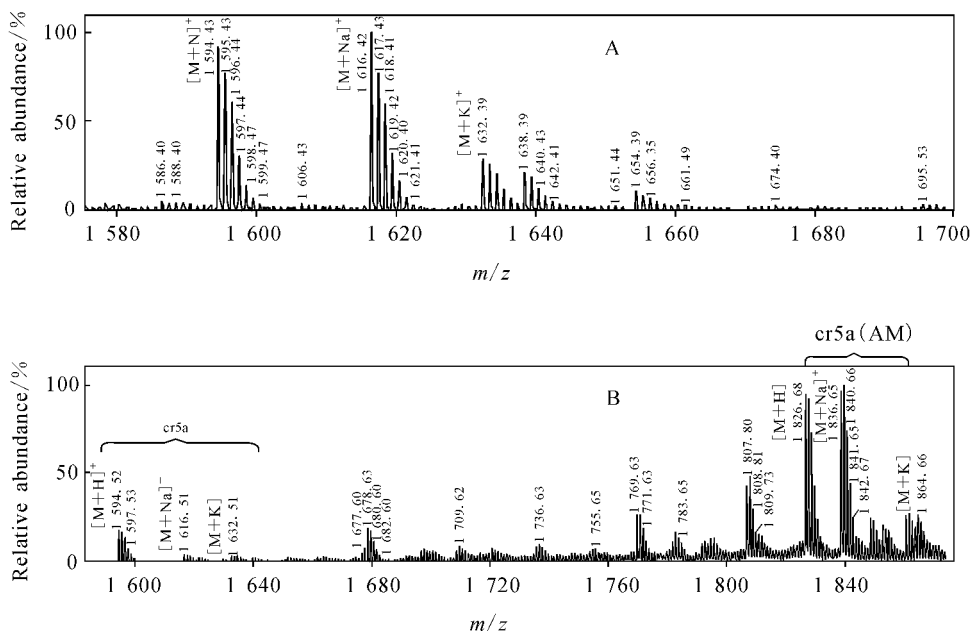


图 1 cr5a(图 A)及其 IAM 衍生物(图 B)的 MALDI-TOF 质谱图

Fig.1 MALDI-TOF-MS of cr5a (A) and its IAM derivative (B)

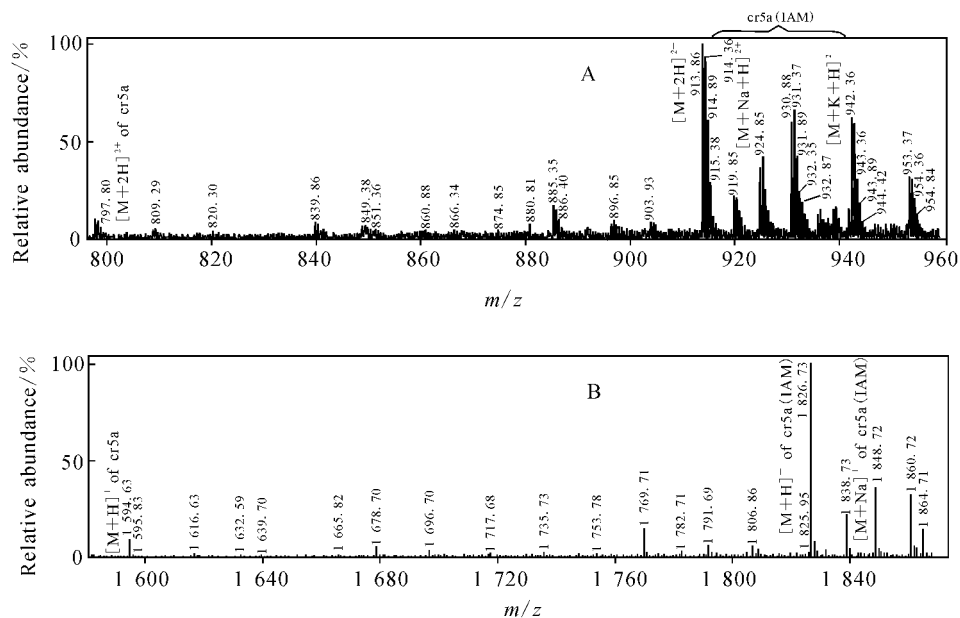


图 2 cr5a IAM 衍生物的 ESI-TOF-MS 图
(A)多电荷质谱图;(B) MaxEnt3 软件转换后的质谱图

Fig. 2 ESI-TOF-MS of cr5a IAM derivative

(A) Mass spectrum of multiply charged ions; (B) Mass spectrum of MaxEnt3 transform

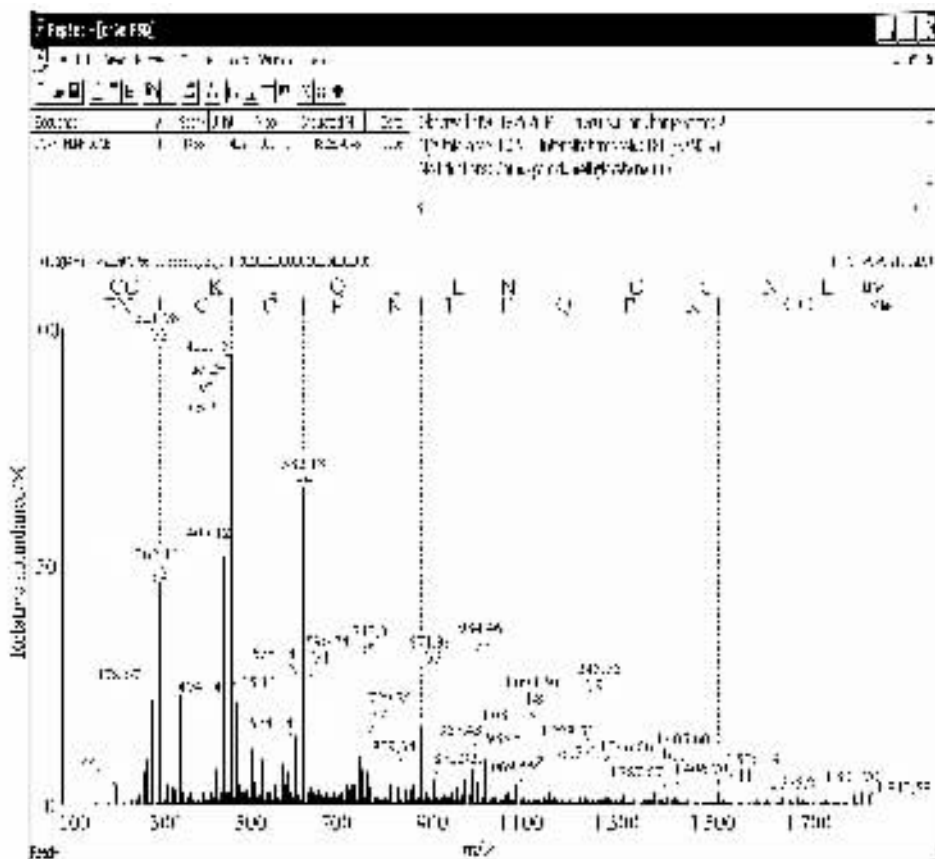


图 3 双电荷离子 m/z 913.86 的 ESI-TOF-MS/MS 图

Fig. 3 ESI-TOF-MS/MS of m/z 913.86

与 N 末端序列分析、C 末端序列分析和 C 末端的羧肽酶酶解法序列分析等几种方法相比,串联质谱法具有灵敏度高、结果准确、易于操作和分析快速等优点,而且还适用于肽混合物和 N 末端封闭的多肽序列分析。同时,它也存在一些不足之处,主要表现在以下几点:1)对于部分分子量较大(如大于 4.5 kDa)或其中含有难以解离序列的多肽分子,不能得到理想的碎裂片段信息;2)对于具有相同相对分子质量的 Leu 和 Ile(都是 113.084 06 Da)或相对分子质量相近的 Lys(128.094 96 Da)和 Gln(128.058 58 Da)残基难以区别;3)有时需要人工解析补充软件解析才能得到理想的结果。在实际工作中,可以根据研究对象的不同选用某种方法或某几种手段结合的方式,以达到氨基酸序列分析的目的。

参考文献:

- [1] Edman P. Method for determinatin of the amino acid sequence in peptides[J]. Acta Chem Scand,

1950, 4: 283-290.

- [2] 夏其昌. 蛋白质化学研究技术与进展[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 80-95.
- [3] KATTA V, CHOWDHURY S K, CHAIT B T. Use of a single-quadrupole mass spectrometer for collision-induced dissociation studies of multiply charged peptide ions produced by electrospray ionization[J]. Anal Chem, 1991, 63(2): 174-178.
- [4] 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.
- [5] GRAY W R, OLIVERA B M, CRUZ L J. Peptide toxins from venomous conus snails[J]. Annu Rev Biochem, 1988, 57: 665-700.
- [6] 刘尚义, 曹 瑛, 赵听友, 等. 一种新型独特芋螺毒素的分离与结构鉴定研究[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(8): 1 482-1 484.

中国有机质谱学第十四次全国学术大会 第一轮通知

中国有机质谱学第十四次全国学术大会将于 2007 年 11 月初在上海举行。本次会议由中国质谱学会有机质谱专业委员会主办。会议将邀请国内外著名质谱学专家作大会学术报告,举行分组专题报告和壁报论文展示,交流有机质谱学的最新研究成果及应用经验,并进行青年学术论坛优秀论文评选。会议期间还将有各质谱仪器公司介绍新产品、新技术及其应用新进展。欢迎有机质谱及其相关领域的科技人员、研究生踊跃参加。

会议议题:1、有机质谱的基础研究;2、生命科学、医学、药学中的质谱应用研究;3、环境科学、农林、化学化工领域的质谱应用研究;4、能源、材料领域的质谱应用研究;5、食品安全、毒物分析和兴奋剂检测中的质谱应用研究;6、有机化合物及生物大分子的质谱分析;7、有机质谱的新技术、新进展等。

会议的更详细内容,请参见质谱学会和药学报等网站信息;或者与联系人咨询。

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. 钟大放研究员,中国科学院上海药物研究所,上海市浦东新区松涛路 646 号,邮编 201203,电话:021-50800738,E-mail: dfzhong@mail.shnc.ac.cn

2. 郭寅龙研究员,中国科学院上海有机化学研究所,上海市徐汇区枫林路 354 号,邮编 200032,电话:021-54925300,E-mail: ylguo@mail.sioc.ac.cn

3. 再帕尔·阿不力孜研究员,中国医学科学院药物研究所,北京市宣武区先农坛街 1 号,邮编 100050,电话:010-63165218,E-mail: zeper@imm.ac.cn

中国质谱学会有机质谱专业委员会

2007 年 3 月 28 日