

新型同位素标记试剂的设计及其在比较分析中的应用

张 菁, 张 立, 周 颖, 郭寅龙

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海质谱中心, 上海 200032)

Application of a Novel Stable-Isotope Labeling Reagent to Comparative Protein Analysis

ZHANG Jing, ZHANG Li, ZHOU Ying, GUO Yin-long

(Shanghai Mass Spectrometry Center, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: A novel pyrimidine-based stable-isotope labeling reagent, [d₀]-/[d₆]-4,6-dimethoxy-2-(methylsulfonyl)-pyrimidine (DMMSP), which was developed for comparative quantification of proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). One-step labeling strategy combined several desirable properties, such as cysteine-specific labeling, signal amplification and direct analysis with minimum sample handling. All these features not only allowed easy interpretation for protein identification and quantification but also ensured rapid and sensitive progression to MS analysis. Using cysteine, cys-containing peptide, and lysozyme digest as model samples, the labeling methodology was established and the following pilot application for quantitative analysis, which was accomplished with high confidence, accuracy, efficiency and reproducibility. The application of DMMSP-labeling strategy is expected to provide a powerful new tool for comparative proteome research, especially for the analysis of low-abundance proteins.

Key words: 4,6-dimethoxy-2-(methylsulfonyl)pyrimidine; stable-isotope labeling; quantification; proteomics; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1004-2997 (2007) 增刊-13-02

定量蛋白质组学^[1]是一个快速发展的领域, 以稳定同位素为内标的质谱技术^[2-3]的发展和应用显示其已经发展为成熟的技术, 并能介入众多的生物和临床的研究, 在诠释生命基本规律和在生物医学应用方面显示了巨大的潜能。当然, 这些技术还存在许多不完善之处, 比如: 同位素标记试剂高昂的成本, 标记效率的有限性以及后续的分选检测过程引入的定量误差等。

4,6-二甲氧基-2-甲磺基嘧啶 (DMMSP), 作为一种新型的蛋白质修饰试剂^[4], 可以提高待测分子的质谱响应, 同时具有良好的反应活性。利用它的这些优势, 本工作拟进一步将此试剂发展成为一种全新类型的稳定同位素标记试剂, 并且结合 MALDI-TOF MS 分析, 旨在为基于质谱技术的差异蛋白质组学及代谢组学研究提供一种新的快速、有效的手段。

1 新型同位素标记试剂及标记策略的设计

4,6-二甲氧基-2-甲磺基嘧啶 (DMMSP) 分子有 3 个结构单元, 对实现比较分析都是有利用价值的。甲磺基部分, 作为同位素标记的活性部位, 在优化的酸性条件下, 可以特异性的标记蛋白或多肽结构中的半胱氨酸残基, 在碱性条件下, 也可以对目标分子中氨基、酚羟基等活性基团进行选择

性标记,都具有高选择性和反应活性;其次,嘧啶环部分,将其引入目标分子中,在离子化过程中更容易加合质子,能够起到提高质谱信号强度的作用,有助于生物活性物质的检测;最后,两个甲氧基部分,作为同位素标签部分,可以在合成的过程中方便的引入稳定同位素(6个氢/氘),用于基于质谱的比较分析。

结合该试剂的一些特点,设计了一条快速、简便、灵敏的同位素标记策略,充分发挥此试剂的优势,使其成为一种蛋白差异表达分析以及代谢组学差异分析的新选择,为复杂生物样本的差异分析提供更简便的研究方法,同时提供可信用度更高的研究结果。

对于蛋白质的比较分析,为了保证复杂样本标记反应的顺利以及酶解过程的完全,在 DMMSP 同位素标记过程中,采取了先对蛋白质进行酶解,然后再标记的方式,即一对成分相同但含量有差异的生物样本(其中一份为对照样本,另一份为待测样本)。分别进行变性还原和胰蛋白酶的水解,然后调节酶解液的 pH 值至 6.5,对照样本的酶解产物用“轻”同位素标记试剂($[d_0]$ -DMMSP)标记,待测样本的酶解产物用“重”同位素标记试剂($[d_6]$ -DMMSP)标记,反应平行进行。最后,将两个样品等量混合,直接进行 MALDI-TOF MS 检测,进行蛋白质的定性及相对定量研究。

对于代谢组学中的差异分析,可以通过对生物代谢物样本在碱性条件下进行 DMMSP 化学修饰以及进一步的稳定同位素标记。不仅可以提高这一类代谢产物在分析过程中的质谱响应能力,同时在串联质谱(MS/MS)分析时,化学修饰的代谢产物可以得到“二甲氧基嘧啶”这一特征性的碎片信号(m/z 139),以利于进行代谢产物的定性和相对定量研究。

2 新型同位素标记试剂的应用

在以前的工作中发现,反应体系的酸碱性和对于标记试剂的活性起到至关重要的作用,因此以氨基酸、多肽及蛋白质酶解液作为底物,通过调节反应的 pH 条件,来调整标记试剂的反应活性和选择性。结果表明,只有在 pH 6.5 的缓冲条件下,才能够在复杂反应体系内发挥 DMMSP 最大反应活性,同时可以特异性的与半胱氨酸和多肽片断中半胱氨酸残基的巯基侧链发生反应,标记过程快速、完全,标记试剂在反应中以及在质谱中不会给多肽的检测带来不良的影响因素。

为了考察同位素标记方法以及 MALDI-TOF MS 进行相对定量研究的可行性,以氨基酸和多肽作为底物进行比较分析。 $[d_0]$ - $[d_6]$ -DMMSP 标记的氨基酸或多肽在 MALDI-TOF MS 图谱中均产生成对的峰,质荷比相差 6 u,实验测定的相对丰度比与理论值是一致的,相对定量误差分别为 2.6% 和 4.6%。

考虑到色谱分离的耗时性以及普遍存在的同位素效应问题,选择了 MALDI-TOF 质谱仪对标记产物进行直接分析。同 ESI 离子化方式相比, MALDI 方法能够耐受样品中一定浓度杂质,允许样品的直接、快速的分析。同时,离子化过程中往往只产生单电荷离子,图谱更加直观、易于解析。将整个制样、分析过程重复 8 次,发现半胱氨酸和多肽 HW-6 的相对定量结果均有较好的“点间”(spot-to-spot)重现性,误差分别是 -2.6%~5.3% 和 -2.6%~4.6%。

在蛋白质比较分析过程中,以溶菌酶的水解产物作为底物,共有 16 条肽段被检测出,其中有 9 条含有半胱氨酸的多肽。用 $[d_0]$ -DMMSP 标记以后,9 条含有半胱氨酸的多肽质荷比都增加了 138 u,并且反应完全,全部转化为标记状态,同时,其他不含半胱氨酸的多肽出峰位置不变。在整个蛋白质鉴定过程中,DMMSP 的标记没有使质谱图复杂化。在以溶菌酶为代表的蛋白质比较分析过程中,实验结果表明,在质谱图中,质荷比相差 6 u 的多肽信号相对强度的比值很好的反映了样品溶液中溶菌酶的浓度差异,相对定量误差均小于 4%。这种同位素标记方法有望用于复杂生物样本以及低丰度蛋白的研究。

新型同位素标记试剂在代谢组学差异分析中的工作正在进行中,该试剂反应活性高、质谱信号强等优势,对于生物代谢物样本的直接、灵敏、快速的分析有很广阔的应用前景。

(下转第 31 页)

表 1 某进口香水过敏原物质

Table 1 Allergens in one perfume import

序号	化合物名称	分子式	分子量	含量/ mg·kg ⁻¹	限量/ mg·kg ⁻¹
1	<i>d</i> -苧烯	C ₁₀ H ₁₆	136.23	3 156.7	100
2	芳樟醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	3 274.5	100
3	香叶醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	709.5	100
4	α -异甲基紫罗兰酮	C ₁₄ H ₂₂ O	206.32	504.8	100
5	香豆素	C ₉ H ₆ O ₂	146.14	185.6	100

参考文献：

- [1] 蒋瑾华, 陈 胜, 谢钧宪. 10 种有害香料化合物的 GC-FTIR 联用分析方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15 (12):1 415-1 418.
- [2] DEBONNEVILLE C, CHAINTREAU A. Quantitation of suspected allergens in fragrances Part II. Evaluation of comprehensive gas chromatography-conventional mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2004, 1 027(1/2): 109-115.

.....

(上接第 14 页)

参考文献：

- [1] RICHARD D U, CAROLINE A E, ANTHONY D W. Relative quantification in proteomics: new approaches for biochemistry[J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31: 473-484.
- [2] ONG S E, MANN M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative[J]. Nat Chem Biol, 2005, 1: 252-262.
- [3] GYGI S P, RIST B, GERBER S A, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 994-999.
- [4] ZHANG J, GUO Y L. A novel modification reagent for proteins: monitoring by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19: 2 461-2 464.

.....

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

《分析测试学报》

《分析测试学报》是由中国分析测试协会、中国广州分析测试中心共同主办的全国性学术刊物，中文核心期刊。刊登电子显微学、质谱学、光谱学、色谱学、波谱学及电化学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术的研究成果，介绍新仪器装置及在医药、化工、商检、食品检验等方面实用性强的实验技术。适合科研院所、大专院校、医学、卫生以及厂矿企业分析测试工作和管理人员阅读。

《分析测试学报》自 2008 年起变更为月刊，国内外公开发行。大 16 开，单价：12.00 元/册，全年 144 元。请在全国各地邮局订阅，未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。补订办法：邮局汇款至广州市先烈中路 100 号《分析测试学报》编辑部，邮编：510070，写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数。

《分析测试学报》编辑部电话：020-87684776、37656606；E-mail: fxcxsb@china.com。