

柱后辅助有机溶剂喷雾对液相色谱-电喷雾-质谱分析的影响

陈 明¹, 王立群¹, 杲修杰¹, 弓景波¹, 钱小红², 钱令嘉¹

(1. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050; 2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 溶剂的组成影响电喷雾离子(ESI)化效率。该研究观察了 ESI 溶剂体系中不同浓度的乙腈(ACN)对 MRFA、Reserpine、MLtramark1621、马肌球蛋白酶切肽段等标准物质的质谱信号响应强度的影响, 发现在溶剂体系中, ACN 浓度达到 70% 时, 上述物质的质谱信号强度具有最大值。根据这一现象, 对传统的反相色谱-电喷雾-质谱(RPLC-ESI-MS)系统进行管路改造, 在分析柱后通过 1 个三通阀引入适当流速的有机溶剂进行辅助喷雾。对马心机蛋白酶切肽段混合物的分析表明, 该方法可以有效提高酶切肽段的检出率, 并提高鉴定蛋白质的序列覆盖率。

关键词: 电喷雾离子化; 肽段; 质谱分析

中图分类号: O 657. 63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2009)06-0321-06

Effect of Auxiliary Electrospray on Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry

CHEN Ming¹, WANG Li-qun¹, GAO Xiu-jie¹,

GONG Jing-bo¹, QIAN Xiao-hong², QIAN Ling-jia¹

(1. Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China;

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

Abstract: The efficiency of electrospray ionization was affected by the component of solvent. The effect of different concentration of ACN on mass spectrometry for MRFA, Reserpine, MLtramark1621 and peptide mixture were observed, and found that all of the chemicals have the max mass spectra signal intensity in 70% ACN. Then, the peptide mixtures from myoglobin were analyzed using CapLC-ESI-LTQ system, which were equipped with auxiliary electrospray by 100% ACN, 0.1% FA. This results show that the detection ratio of peptides and the recovery of protein sequence are remarkable improved.

Key words: electrospray ionization (ESI); peptide; mass spectrometry

蛋白质组学是近年来兴起的一门交叉学科, 其主要目的是研究组织或细胞表达的全套蛋白

质。质谱用于分析生物活性分子, 灵敏度高, 并能最有效的与色谱联用, 适用于复杂体系中痕量

物质的鉴定或结构测定,因此它已经成为解决蛋白质组分析研究的重要手段^[1-2]。近年来随着电喷雾电离技术的广泛应用,多肽与蛋白质分析取得了相当大的成功,特别是以 RPLC-ESI-MS/MS 为主要技术手段的“shotgun”策略,已经成为蛋白质组学研究中的经典方法^[3-8]。蛋白质/肽段经色谱分离并离子化后进入质谱仪,经过惰性气体或电子束的碰撞解离后,形成大小不等的碎片离子,这些子离子由质量分析器分析后,生成包含有蛋白质氨基酸序列信息的质谱图,通过对质谱图的解析从而获得蛋白质的氨基酸序列。很多研究表明,质谱图质量的好坏与鉴定结果的可信与否密切相关,例如质谱峰的强度、信噪比、母离子的碎裂程度等直接影响图谱的解析,因此得到高质量的质谱图是正确解析蛋白质氨基酸序列的前提^[9]。由于生物样品组成相当复杂,因此如何提高色谱的分离效率和检测离子的质谱响应强度成为蛋白质组学研究中需要解决的几个基本问题。本研究通过在色谱分析柱后引入有机溶剂进行辅助喷雾,以有效地提高肽段离子的质谱信号响应强度和鉴定蛋白质的氨基酸序列覆盖率。

1 材料与与方法

1.1 主要仪器

毛细管高效液相色谱-电喷雾-线性离子阱质谱仪(CapLC-ESI-LTQ);美国 Thermo Finnigan 公司产品,配备 Ion MaxTM 源和 Nanospray ionization (NSI)源;毛细管色谱系统由 1 台 Famous 自动上样系统、1 台 Switchs 上样泵(含 1 个十通阀)和 1 台 MLtimate 二元洗脱泵组成;反相色谱柱(C₁₈柱, pepMap300, 5 μm, 300 Å);Dionex 公司产品。质谱数据采集和处理系统为 Xcalibur1.3 工作站和 Bioworks 3.1SR1 软件。

1.2 试剂

乙腈(ACN,色谱纯):购自美国 JTBaker 公司;水(色谱纯):购自美国 Millipore 公司;二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、碳酸氢铵、FA:均购自美国 Sigma 公司;胰酶(修饰、测序级):购自美国 Promega 公司;马心肌蛋白、Respine 等:购于 Amersham Bioscience 公司;MRFA、MLtramark1621 为仪器自带标准品;其他所用试剂均为色谱纯或分析纯。

1.3 样品准备

MRFA 储备液:准确称取 2.6 mg MRFA 样品,溶于 1 mL V(甲醇):V(水)=50:50 的溶液中,得 5 nmol·L⁻¹溶液,取 50 μL 该溶液于 1.45 mL V(甲醇):V(水)=50:50 的溶液中,得 166.7 pmol·L⁻¹ 储液;MLtramark1621 储液:取 10 μL mol·L⁻¹ Ltramark 原液溶于 10 mL ACN 中,得 0.1% mol·L⁻¹ Ltramark 储液;Reserpine 储液:称取 0.1 mg 样品溶于 1 mL 甲醇溶液中;工作液:取 MRFA、Reserpine、MLtramark1621 储液分别溶于 0%、10%、30%、50%、70%、90%、100% ACN 中(含 0.1%FA)。

马肌球蛋白进行溶液酶切获得肽段混合物。酶切条件:蛋白质样品溶于 100 μL 50 mmol·L⁻¹ NH₄HCO₃ 中,加入 1 mol·L⁻¹ DTT 使浓度达到 65 mmol·L⁻¹,于 37 °C 水浴 4 h,然后加入 1 mol·L⁻¹ IAA,使浓度达到 50 mmol·L⁻¹,于室温下暗处放置 1 h,再加入 10% ACN 和 50 mmol·L⁻¹ NH₄HCO₃,以 100:1 加入胰酶,混匀,37 °C 温浴。为了保证酶切效果,2 h 后按 100:1 再加入胰酶,混匀后继续水浴保温 16 h。酶切完成后,反应液用 5%FA 酸化,酶切混合物冷冻干燥,并于 -20 °C 保存,待用。

1.4 实验条件

1.4.1 微喷雾离子源 配备 Ion MaxTM 源。通过蠕动泵由注射器直接上样,流速为 5 μL·min⁻¹,sheath gas 为 10 个单位,Aux gas 为 5 个单位,喷雾电压 3.6 kV,毛细管温度 275 °C。

1.4.2 纳喷雾离子源 配备 Nanospray ionization 源。通过蠕动泵由注射器进样,流速为 200 nL·min⁻¹,喷雾电压 1.8 kV,毛细管温度 200 °C。

1.4.3 柱后有机溶剂辅助喷雾 配备 Nanospray ionization 源。通过 LC-Pakings 高压液相系统上样,上样体积为 19 μL,上样流速为 10 μL·min⁻¹;色谱洗脱在 MLtimate 系统上进行。流动相 A:0.1%FA-2%ACN 水溶液;流动相 B:0.1%FA-80%ACN 溶液。洗脱条件:0~30 min,流动相比比例由 2%B 线性升至 40%B;30~40 min,流动相比比例由 40%B 线性升至 100%B;维持 10 min 后,以 100% 流动相 A 平衡色谱柱 20 min。流动相流速为 200 nL·min⁻¹。在分析柱后接三通阀,引入适当流速的 90%ACN(含 0.1%FA)溶液进行辅助喷雾。从反相柱流出的

洗脱组分由纳升级电喷雾接口喷出,电喷雾电压 1.8 kV,离子传输毛细管温度 200 °C,质谱采用全扫描(m/z 350~1 600)一级质谱数据依赖的二级质谱扫描模式(data dependent MS/MS scan),依次选取一级质谱中离子强度最强的 5 个离子进行 CID 串联质谱,归一化碰撞能量为 35%,采用串联质谱扫描的动态排除功能(dynamic exclusion),设置排除时间为 90 s。

1.5 数据库检索

二级质谱图的数据库检索通过 Bio-works3.1 软件的 SEQUEST 引擎进行。所用数据库为加入马肌球蛋白序列的 12 种标准蛋白质数据库。检索设定肽序列氨基酸可变修饰为 C(+57.02 u)、M(+15.99 u),肽质量误差为 1.5 u。用 Build Summary 软件对得到的 SEQUEST 检索结果进行整合和比较。数据过滤参数设置为: $Xcorr \geq 1.9, 1+$; $Xcorr \geq 2.2, 2+$, $Xcorr \geq 3.75, 3+$, $DeltCn \geq 0.1$; $Rsp \leq 4$ 。

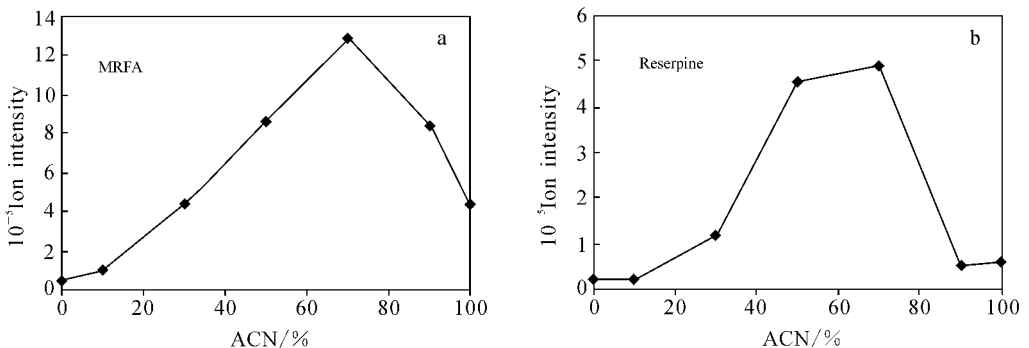
2 结果与讨论

2.1 离子在不同浓度有机体系中的质谱信号响应强度

为了观察离子在不同浓度有机体系下质谱信号响应强度的变化,选用了质谱分析中常用的 3 种标准物质进行实验。MRFA 为 4 个氨基酸组成的小肽(Met-Arg-Phe-Ala),其相对分子质量为 523.65; Reserpine 是一种生物碱,临床上常用作降压药,其相对分子质量为 608.68; 如图 1a, 1b 所示,将 MRFA 和 Reserpine 分别溶于不

同浓度的 ACN 中进行质谱全扫描分析,对 m/z 523.65 和 m/z 608.68 的质谱峰强度进行统计,发现离子的质谱峰强度随着溶剂中 ACN 浓度的升高而升高。当溶剂体系中 ACN 的百分比浓度达到 70% 时,两者的峰强度达到最高值,此时的质谱峰强度是 ACN 浓度为 10% 时的 10 倍左右;当溶剂体系中 ACN 的百分比浓度大于 70% 时,质谱峰强度反而开始下降。这说明在液相体系中,适当增加有机溶剂的浓度可以提高检测峰的强度,从而提高质谱检测的灵敏度。

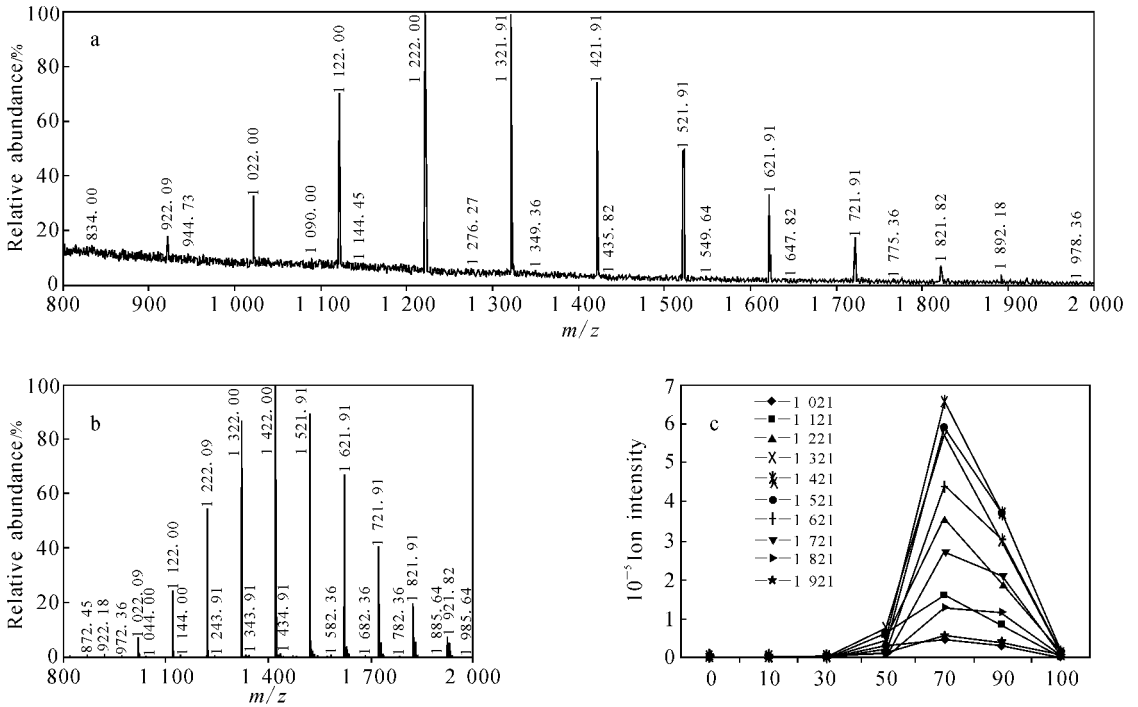
为了进一步观察混合物在不同浓度有机体系中的质谱响应行为,选用 MLtramark1621 作为标准品进行观测。MLtramark1621 是具有质量差为 100 的氟化物混合物,其质量范围为 1 021~1 921。MLtramark1621 在有机相浓度为 10% 时的质谱图示于图 2a,图中 m/z 1 021~1 921 的峰均可被检测到,其归一化的峰强度为 5.9×10^2 。有机相浓度为 70% 时的质谱图示于图 2b,此时归一化的峰强度为 6.16×10^5 ,可以看出有机相浓度为 70% 时的峰强度比 10% 时增加了近 3 个数量级。对各个质量峰强度的统计也表明,溶剂中有机相浓度小于 30% 时,对 MLtramark1621 各质量峰强度几乎无影响;当有机相浓度在 50%~70% 时,对峰强度的影响最大;当有机相浓度大于 70% 时,质谱峰开始受到明显抑制,示于图 2c。以上结果进一步说明,进行质谱分析时,在溶剂体系中添加适当浓度的有机相的必要性。



注:微喷雾,通过蠕动泵由注射器直接上样,流速为 $5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,上样体积为 $50 \mu\text{L}$,共上样 10 min

图 1 有机体系中不同浓度的 ACN 对检测物质谱强度的影响

Fig. 1 Effect of ACN on mass spectrum signal intensity



注:微喷雾,通过蠕动泵由注射器直接上样,流速为 $5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,上样体积为 $50 \mu\text{L}$,共上样 10 min

图 2 有机体系中不同浓度的 ACN 对 MLtramark1621 质谱强度的影响

a. 10% ACN 时的质谱图; b. 70% ACN 时的质谱图; c. MLtramark1621 各质量峰在 ACN 浓度为 0%~100% 有机相中的强度变化曲线

Fig. 2 Effect of ACN on mass spectrum signal intensity of MLtramark1621

a. mass spectra of MLtramark1621 in 10% ACN; b. mass spectra of MLtramark1621 in 70% ACN; c. ions intensity in different concentration of ACN

2.2 柱后辅助有机溶剂对蛋白质鉴定的影响

为了验证以上观察结果,以马肌球蛋白的胰酶酶切肽段混合物为研究对象,观察有机溶剂浓度对相对复杂的肽段混合物质谱响应强度的影响。在溶剂体系中加入 70% 的 ACN 后,各肽段离子的质谱强度响应值至少提高了 1 个数量级,示于图 3。

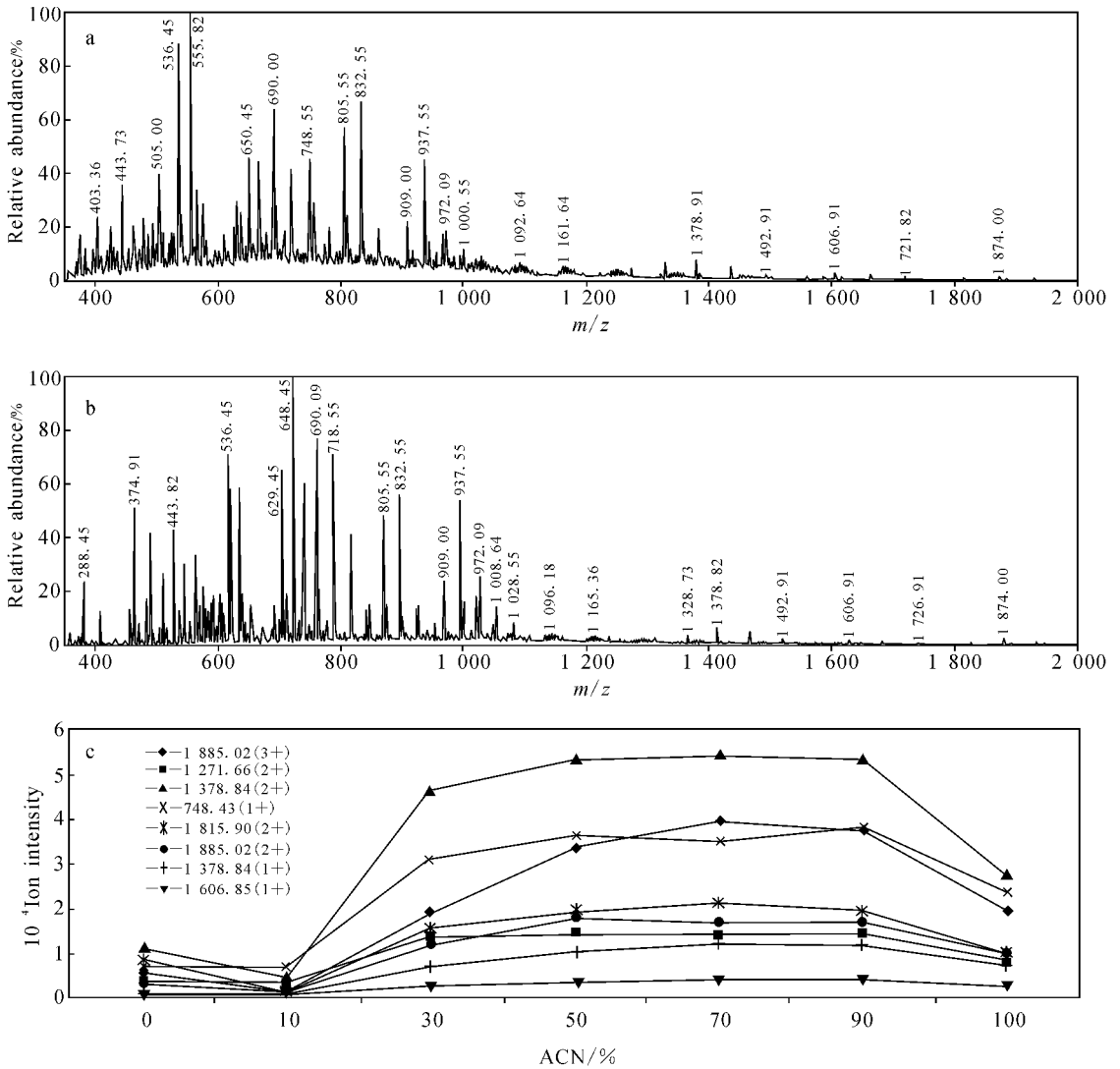
进一步对马肌球蛋白酶切肽段混合物进行 RPLC-ESI-MS/MS 分析,并在分析柱后通过 1 个三通阀,分别引入流速为 $300 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的 100% ACN 和 A 相溶液进行辅助喷雾。对各离子进行检测的结果表明,引进 ACN 辅助喷雾的各离子质谱响应强度均比不引进有机相和引进 A 液做对照组的要高 3~5 倍,示于图 4。从表 1 可以看出,有机相辅助喷雾后质谱鉴定的马肌球蛋白的冗余肽段数和非冗余肽段数以及对鉴定蛋白质的序列覆盖率均比对照组要高。

表 1 柱后辅助喷雾 RPLC-ESI-MS/MS 分析鉴定的肽段数及其蛋白质覆盖率

Table 1 Peptide counts and the sequence recovery rate of identification by auxiliary electropray RPLC-ESI-MS/MS

分析样品	冗余肽段	非冗余肽段	序列覆盖率
add_ACN_1	418	26	86.93%
add_ACN_2	413	25	84.08%
add_ACN_3	422	25	85.21%
add_A_phase_1	245	20	79.08%
add_A_phase_2	218	19	75.16%
add_A_phase_3	226	21	83.01%
control_1	245	20	79.08%
control_2	214	19	75.16%
control_3	214	20	79.08%

在蛋白质组学研究中,LC-MS/MS 已经成为常规分析技术,分析的对象是蛋白质或多肽,特别是当反相色谱技术与质谱联用,体系中有有机溶剂达到 30%~40% 时,90% 以上肽段均可以



注: 纳喷雾, 通过蠕动泵由注射器直接上样, 流速为 $200 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$, 上样体积为 $2 \mu\text{L}$, 共上样 10 min

图 3 有机体系中不同浓度的 ACN 对马肌球蛋白酶切肽段离子质谱强度的影响

a. 10% ACN 时的质谱图; b. 70% ACN 时的质谱图;

c. 肽段混合物各质量峰在 ACN 浓度为 0%~100% 的有机相中的强度变化曲线

Fig. 3 Effect of ACN on mass spectrum signal intensity of peptides from myoglobin

a. mass spectra of peptides mixture in 10% ACN; b. mass spectra of peptides mixture in 70% ACN;

c. peptides ions intensity in different concentration of ACN

从反相柱上完全洗脱^[10-11]。在应用 LC-MS/MS 进行肽段分析时, 如果洗脱的有机相浓度太高则容易造成肽段的共流出, 使反相分离的效率降低, 从而影响质谱鉴定, 同时也造成低丰度肽段的检出困难。本研究应用柱后有机溶剂辅助喷雾技术很好的解决了这一问题, 通过柱后有机溶剂辅助喷雾技术, 既不影响分析柱的分离, 同时也提高了各肽段离子的质谱检测响应值, 一方面提高了谱图的质量, 另一方面也可以提高低丰度

肽段的检出率。但是同时也出现一些不得不注意的问题, 例如, 柱后有机溶剂辅助喷雾导致的色谱峰扩散问题和样品稀释问题, 因此推测柱后有机溶剂辅助喷雾后鉴定肽段的冗余肽段数量的明显增加可能与色谱峰的扩散有关。

3 结 论

本研究对各种离子在不同浓度的有机溶剂中的质谱响应情况进行了考察, 发现在 70%

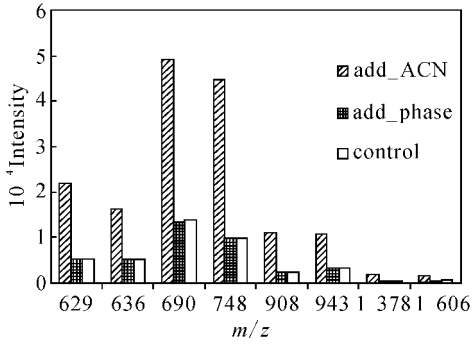


图 4 柱后辅助喷雾对马肌球蛋白酶切肽段离子质谱强度的影响

Fig. 4 Effect of auxiliary electrospray on mass spectrum signal intensity of peptides ion from myoglobin

ACN 溶剂中,各离子具有最高的质谱峰响应值。根据这一现象,对传统的 RPLC-ESI-MS/MS 进行管路改造,在分析柱后通过 1 个三通阀引入适当流速的有机溶剂进行辅助喷雾,该方法可以显著提高酶切肽段的检出率和鉴定蛋白质的序列覆盖率。

参考文献:

- [1] DOMON B, AEBERSOLD R. Mass spectrometry and protein analysis[J]. Science, 2006, 312: 212-217.
- [2] AEBERSOLD R, MANN M. Mass spectrometry-based proteomics [J]. Nature, 2003, 422: 198-207.

- [3] RABILLOUD T. Membrane proteins ride shotgun [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21: 508-510.
- [4] DURR E, YU J, KRASINSKA K M, et al. Direct proteomic mapping of the lung microvascular endothelial cell surface in vivo and in cell culture [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22: 985-992.
- [5] ASHTON D S, BEDDELL C R, GREEN B N, et al. Rapid validation of molecular structures of biological samples by electrospray-mass spectrometry [J]. FEBS Lett, 1994, 342(1):1-6.
- [6] ARNOTT D, SHABANOWITZ T, HUNT D F. Mass spectrometry of proteins and peptides: sensitive and accurate mass measurement and sequence analysis[J]. Clin Chem, 1993, 39(9): 2 005-2 010.
- [7] LINK A J, ENG J, SCHIELTZ D M, et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 676-682.
- [8] WASHBURN M P, WOLTERS D, YATES J R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19: 242-247.
- [9] DOMON B, AEBERSOLD R. Challenges and opportunities in proteomics data analysis[J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5: 1 921-1 926.
- [10] CHEN M, YING W, SONG Y, et al. Analysis of human liver proteome using replicate shotgun strategy [J]. Proteomics, 2007, 7 (14): 2 479-2 488.
- [11] YU L, CONRADS T P, UO T, et al. Global analysis of the cortical neuron proteome [J]. Mol Cell Proteomics, 2004, 3:896-907.

2010 年《分析测试学报》征订启事

《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。国内刊号:CN 44-1318/TH;国际标准刊号:ISSN 1004-4957;国际刊名化代码 CODEN: FCEXES;邮发代号:46-104;国外代号:BM 6013;广告经营许可证:440000100186。

刊登质谱学、光谱学、色谱学、波谱学、电化学、电子显微学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术,介绍新仪器装置在生物、医药、化学化工、商检、食品检验等方面的实验技术。本刊被美国化学文摘、日本科技文献速报、俄罗斯文摘、英国分析文摘(AA)、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计刊源、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊等知名数据库收录)。

本刊为月刊,国内外公开发售。大 16 开,单价:12.00 元/册,全年 144 元。请在全国各地邮局订阅。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,电话:(020)87684776 或 37656606,http://www.fxcsxb.com(可在线投稿),E-mail:fxcsxb@china.com。