

另辟蹊径——串联质谱肽段断裂的新军“电子捕获解离”

贾伟^{1, 2, 3}, 应万涛^{1, 2}, 钱小红^{1, 2}

(1. 北京蛋白质组研究中心, 北京 102206; 2. 军事医学科学院放射与辐射研究所, 北京 100850;
3. 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要:一种新型的串联质谱断裂方式——电子捕获解离, 以其完全不同于其他串联质谱肽段断裂的机理, 提供了全新的肽段序列标签。它集众多优点于一身: 对蛋白质和多肽的主链断裂无偏好; 高断裂覆盖度; 优先断裂二硫键; 保留翻译后修饰基团; 中性丢失少、可区分亮氨酸和异亮氨酸等。这些特点使电子捕获解离充满魅力, 特别在 Top Down 技术和翻译后修饰中具有广阔的应用前景。

关键词:多肽与蛋白质生物化学; 电子捕获解离; 傅立叶变换离子回旋共振质谱

中图分类号: O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2007)01-55-10

New Technology for Tandem MS Analysis of Peptide: Electron Capture Dissociation

JIA Wei^{1, 2, 3}, YING Wan-tao^{1, 2}, QIAN Xiao-hong^{1, 2}

(1. *Beijing Proteome Research Centre, Beijing 102206, China;*

2. *Department of Genomics and Proteomics, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China;*

3. *Institute of Biophysics Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*)

Abstract: Electron capture dissociation provides whole new kinds of peptides tags for its mechanism which is absolutely different from other tandem mass spectrometry's. It has many advantages; more random cleavage, extensive sequence coverage, preferential fragmentation of S-S band, few neutral loss, preserving labile posttranslational modification, distinguishing Ile with Leu. All of these make ECD charming, especially in the field of Top Down strategy and post translational modification characterization.

Key words: peptide and protein biochemistry; electron capture dissociation (ECD); fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FTICR MS)

1 ECD 简要机理

产生蛋白或多肽串联质谱的常用方法如碰

撞活化解离 (CAD, collision-activated dissociation)^[1], 碰撞诱导解离 (CID, collision-induced

收稿日期: 2006-03-16; 修回日期: 2006-09-14

基金项目: 国家自然科学基金 (青年基金) (项目编号: 20405017); 国家自然科学基金 (青年基金) (项目编号: 20505018); 国家自然科学基金 (青年基金) (项目编号: 20505019)

作者简介: 贾伟 (1981~), 男 (汉族), 山西人, 硕博连读研究生, 生物化学与分子生物学专业。E-mail: jiawee@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: qianxh1@yahoo.com.cn

dissociation)^[2]以及新发展的红外多光子解离(IRMPD, infrared multiphoton dissociation)^[3]和黑体红外辐射解离(BIRD, blackbody infrared radioactive dissociation)等^[4]被统称为“慢热技术”(slow-heating techniques)。它们都是基于震动激发(VE, vibration excitation)模型,通常认为是经历多态(ergodic)的过程。在这个模型中,分子接收碰撞或其他形式的能量输入后,会发生分子内振动能量重新分布(IVR, intramolecular vibrational energy redistribution)的现象,而且能量重排先于断裂反应进行。如果只考虑单键情况,那么振动激发引起的断裂总是发生在能量最低的化学键,这使基于振动激发模型下的各种技术所产生碎裂片断的形式仅依赖于母离子吸收能量的多少,而与能量接收方式无关^[5],导致基于振动激发模型的不同断裂技术所生成的串联质谱图是相似的。

电子捕获解离(ECD, electron capture dissociation)^[6]简单地说是通过自由电子与因携带多个质子而带正电荷的蛋白或多肽结合,进而产生肽段碎片的过程。在 ECD 过程中,由电喷雾(ESI)产生的携带多电荷的离子进入含有磁场和静电场的傅立叶变换离子回旋共振(FTICR, fourier transform ion cyclotron resonance)腔中,与阴极发射的电子束相遇,电子被正离子捕获,离子发生断裂。在标准 ECD 中,电子能量一般 ≤ 0.2 eV。电子捕获解离是基于非多态性(non-ergodic)理论。当母离子捕获电子时会发生断裂,但在这个过程中断裂反应先于分子内振动能量重新分布进行。因此,虽然 ECD 与其他串联质谱技术中参加反应的母离子相同,但其产生的碎裂片断却迥然不同。关于 ECD 的机理还不完全明了,但通过对反应时间上可能性的认识,可以理解为什么 ECD 和其他串联质谱方法会经历截然不同的断裂过程^[7]。

当电子与正离子接近时,两者相互受到静电库仑力吸引。吸引导致电子被阳离子捕获,而阳离子必须在小于 10^{-14} s 内释放出多余能量^[8]。那么这些多余的能量将会通过怎样的方式释放呢?首先,因为电子内部缺少可利用的自由度,所以不能成为多余能量的释放途径;其次,虽然离子中的原子运动可以吸收这部分多余的能量,但是这种吸收方式在这里显得有些慢,它需要大约 10^{-13} s 来完成;再次,通过辐射也就是释放光

子消耗能量需要 $\geq 10^{-9}$ s,更不可行;另外,因为没有合适的途径,离子中原子的重新排列更是极难发生的。在这种情况下,对于多原子的阳离子来说还有一个可行的方法,那就是发生断裂来稳定电子,这个过程只需要 $10^{-16} \sim 10^{-15}$ s^[8]。

迄今为止,ECD 主要是在傅立叶变换离子回旋共振质谱(FTICR-MS)中实现的。原因主要有两点:①在 ECD 过程中,母离子捕获电子需要几个毫秒,时间上的要求超出了许多质量分析器的容忍度,包括飞行时间质谱和四极杆质谱等;②要想使 ECD 的效率最大,则要求电子的能量小于 1 eV,这在四极杆等质量分析器中也是难以实现的^[9]。除常见的磁场强度为 6 T 以上的傅立叶变换离子回旋共振质谱仪外,ECD 已经在 3 T 的磁场中得到应用^[10],说明 ECD 的实现与磁场强度关系不大^[9]。

2 ECD 的主要特点

2.1 ECD 断裂产物——“奇”

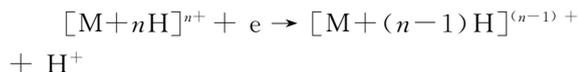
基于相同的断裂机理,在串联质谱的常用技术中,碰撞活化解离(CAD)、碰撞诱导解离(CID)、红外多光子解离(IRMPD)、黑体红外辐射解离(BIRD)等,都是通过低能量键断裂——肽键断裂,也就是产生常见的 b、y 离子。这些技术的一个缺点是在肽键断裂时对某低能量的肽键有偏好,如脯氨酸残基的氨基端和天冬氨酸残基的羧基端。

一般情况下在 ECD 中,其最主要产物是 $[M+nH]^{(n-1)+\cdot}$,也就是单纯的母离子捕获一个电子,但不发生断裂(方程 1)。另一个常见的产物是母离子的质子丢失 $[M+(n-1)H]^{(n-1)+}$ (方程 2)。但这些产物对研究的意义不大,而且这两种反应的存在消耗了大量的母离子,在一定程度上降低了 ECD 的灵敏度。

方程 1:



方程 2:



在 ECD 的断裂产物中,最主要的是 c、z(或 c、z)离子,也就是主链上的 N-C(α)键断裂(图 1)。这就使 ECD 产生的图谱与以往串联质谱的方法在数据上有很好的互补性^[11-12]。但只是数据的互补还远不能使 ECD 技术得到目前如此的

关注和期待,这里要提到它在数据上呈现的优势是:ECD产生的主链断裂片段,除由于脯氨酸这个亚氨基酸的氨基端呈环阻碍 ECD 外,对于其他氨基酸残基间的断裂 ECD 没有偏好性(实际上 ECD 在脯氨酸氨基端造成断裂在某些多肽中已经观察到^[13])。另外,在 ECD 过程中,产物会发生二次断裂,产生 a、y 离子(图 2),一般来说 a、y 离子产生的量很少,但在某些情况下会成为主要产物^[14]。

为什么在 ECD 中不产生常规的 b、y 离子

呢?主要有以下原因^[7]:一方面,肽键断裂需要较长的时间,大约几毫秒,而 ECD 要求的时间极短,只能通过直接的断裂达到;另一个更加重要的原因是 ECD 导致的断裂是基于富含质子的阳离子基团,而不是通常串联质谱模型中的偶电子离子(even-electron ions)。富含质子的阳离子基团的出现改变了邻近键的强度,羰基氧捕获的额外氢原子所产生的基团位点诱导断裂效应被认为是 N-C(α)键断裂的主要原因^[15]。

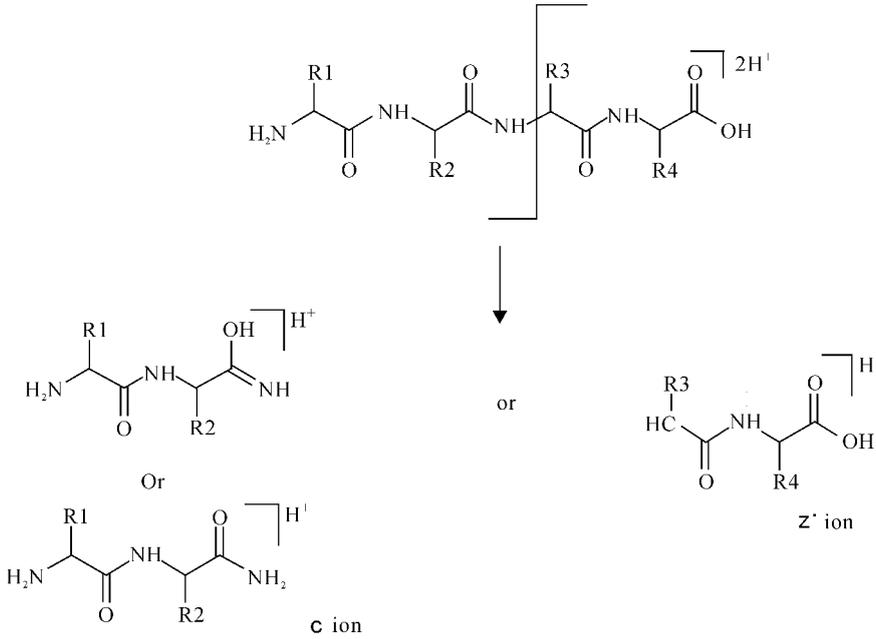


图 1 肽段的 ECD 断裂产物:c、z 离子

Fig. 1 Fragmentation products of peptides from ECD, c and z ions

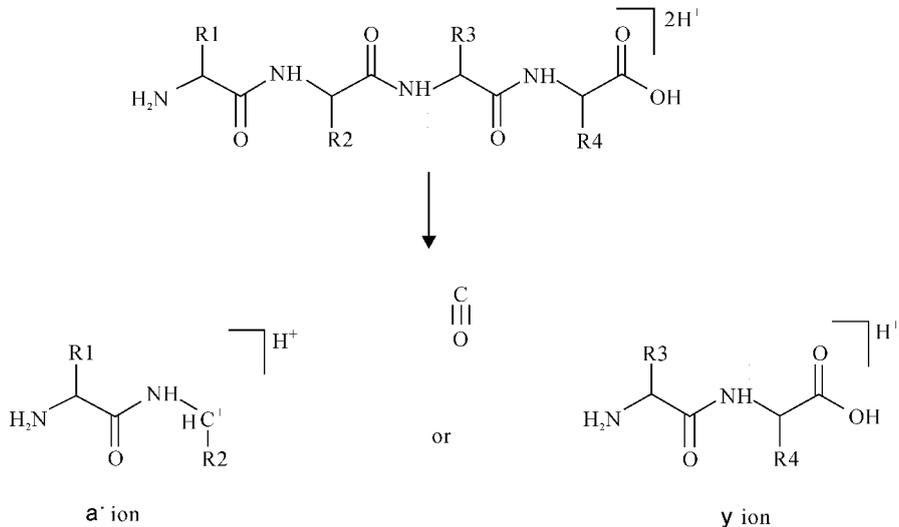


图 2 肽段的 ECD 断裂产物:a、y 离子

Fig. 2 Fragmentation products of peptides from ECD, a and y ions

下面详细讲述在某些条件下,热电子捕获解离(HECD, hot ECD)会造成氨基酸残基侧链的断裂,这也是 ECD 技术的优势之一。因为通过它可以对亮氨酸和异亮氨酸这对同分异构体进行区分^[16],这在以往的串联质谱技术中是做不到的,这些特点在 Top-Down 技术路线中有着重要的意义。现在已经观察到的氨基酸侧链断裂还有:精氨酸(掉落侧链; CH_4N_2 44.037 Da、 CH_5N_3 59.048 Da、 $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_3$ 101.095 Da);组氨酸($\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2$ 82.053 Da);天冬酰胺(CH_3NO 45.022 Da、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}$ 59.037 Da);谷氨酰胺(CH_3NO 45.022 Da、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}$ 59.037 Da);甲硫氨酸($\text{C}_3\text{H}_6\text{S}$ 74.019 Da);赖氨酸($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}$ 73.089 Da);色氨酸 $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}$ (131.074 Da);酪氨酸($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$ 108.058 Da)^[17-18]。

2.2 ECD 断裂二硫键 ——“优”

ECD 还有一个重要的独特之处——优先断裂二硫键^[15]。在其他串联质谱技术中,因为无法使二硫键断开,致使不同的序列标签连接在一起,造成不能获得有效的肽段信息。一般采用将样品还原烷基化等前处理方法来排除二硫键的影响。但这消耗了时间,提高了费用,而 ECD 却能够使二硫键优先断开。通过计算,不带电荷的二硫键是不能捕获电子的^[15],那么二硫键是怎样断开的呢? Zubarev 等^[15]认为携带多质子的蛋白或多肽捕获电子是一个高能过程,并会释放出活化的氢原子。活化的氢原子在分子内移动,并在移动碰撞中消耗能量,直到被蛋白上的基团捕获。是否能捕获氢原子取决于基团与氢原子间的亲和性强弱,而与移动距离等因素无关。二硫键与氢原子的亲和性最强,所以两者最容易结合,并在与氢原子结合后二硫键断开,形成 RSH 和 $\cdot\text{SR}'$ 。但在另一方面,二硫键的存在与主链羰基竞争氢原子,一定程度上抑制了主链断裂。

2.3 ECD 断裂覆盖程度 ——“高”

上面介绍了 ECD 产生断裂产物的一些主要特点,那么它造成的蛋白或多肽中的断裂程度,也就是断裂的覆盖度(实际断裂位点数与可断裂位点数的比)怎样呢?

在对 substance P (约 1.3 kDa)的分析中, ECD 位点达到完全序列覆盖^[19]。ubiquitin(8.6 kDa)、cytochrome c(12.4 kDa)、apomyoglobin

(约 17 kDa)、carbonic anhydrase (约 29 kDa)的 ECD 断裂覆盖度分别为 67/75、75/103、30/152 和 0^[20]。在对一些 1~3 kDa 大小的多肽进行 ECD 分析,得到的覆盖度都相当高^[20-21]。从中可以看出随质量数的增加, ECD 产生碎裂片段的能力明显下降,特别是在 20 kDa 以上的蛋白质 ECD 的断裂作用就更微乎其微了。这是因为 ECD 的另一个重要特点——ECD 不能使非共价键断开^[22]。ECD 的这个特点有其两面性:一方面它阻碍了对高分子量蛋白的断裂;另一方面它又使 ECD 具有其独特的角度对蛋白进行研究,包括对蛋白质折叠的研究^[23]。对于研究中的弱点,科学家们已经开发出一些新的方法来排除,这些方法将在下文详细讲述。

2.4 ECD 的灵敏度 ——“低”

生物串联质谱的应用至今为止,灵敏度最高的是低能量 CID,是由 Q-TOF 串联质谱实现的,达到了 10^{-18} mol^[24]。但因为 CID 存在断裂主链的偏好、较差的断裂覆盖度、中性丢失以及不能打开二硫键等^[25],不能产生高质量和较长的序列信息,而这正是 ECD 的长处。但 ECD 也有缺点:首先, ECD 不能对单电荷的母离子分析,因为单电荷母离子捕获电子后会发生中和而不显电性,致使无法分析;其次, ECD 母离子转化为碎片的效率大约为 5%~30%,而且要想得到一个母离子较为完整的序列标签,本身就需要大量的母离子参加反应来产生各个部分的序列标签;再次, ECD 所需时间较长,大约几个毫秒,导致了其要求的样品量较常规串联质谱多。Hakansson 等^[26]在对纯肽段 neurotensin、substance P 和 LHRH(luteinising hormone releasing hormone)实验时使用 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,前两个达到了全序列覆盖(除脯氨酸氨基端),LHRH 只有两处没有断裂。Hakansson 还对一个 28 kDa 蛋白的胰蛋白酶酶切产物中的两个肽段进行 ECD 分析,喷雾 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,断裂覆盖度分别为 6/12 和 8/21。在这些实验中样品总量为:纯肽段约 50 fmol、酶切肽段 300 fmol。这样的样本总量使 ECD 可以对银染或考马斯亮蓝染色的二维电泳分离获得的样本进行分析,而作为蛋白质鉴定的研究手段。

3 ECD 的强项——“Top Down”和翻译后修饰 (PTMs)

在 Top Down 蛋白质鉴定策略中,完整蛋白被选作质谱分析的对象,而不经化学断裂或酶解。它相对于 Bottom-Up 的弱点 (Bottom-Up 蛋白质序列不能被完整的覆盖,限制其对点突变以及翻译后修饰的鉴定) 有显著的优越性。

3.1 Top Down 和 ECD

目前常规的通过生物质谱对蛋白质或多肽进行分析的方法是:通过电泳 (特别是二维电泳) 或高效液相色谱使样品分离纯化,蛋白酶解后,由生物质谱产生样品的肽质量指纹图谱或更加精确的串联质谱数据,用数据库检索,得到鉴定结果。理论上大于 6 个氨基酸残基的序列就可以从数据库中鉴定蛋白,这种方法被称为“由下而上 (Bottom Up)”路线^[27]。

与之相反的是“从上至下 (Top Down)”策略^[28]。它使用准确度极高的傅立叶变换离子回旋共振质谱 (FTICR MS),目标是通过多级质谱分析直接对完整蛋白质的一级结构包括翻译后修饰位点进行的鉴定。这种策略最理想的结果是全序列都得到测定,即 de novo 分析。ECD 以其高覆盖度和断裂的无偏好性 (脯氨酸氨基端除外),在 Top Down 策略中显示出了明显的优势。但为了获得更加丰富的肽序列标签信息,科学家们对其不断进行创新和改进。其中热电子捕获解离 (HECD, hot ECD) 产生出了更多种类的断裂片断,活化离子 ECD (Activated Ion ECD, AI-ECD) 和等离子体 ECD (Plasm ECD) 则通过对电子捕获环境的改变有效地解决了较大分子量蛋白高级空间结构对断裂肽段的阻碍问题。

3.1.1 “热电子捕获解离” (HECD) 前面已经提到的“热电子捕获解离” (HECD, hot ECD) 技术,即当电子携带高能量时 (约 10 eV),可以使氨基酸残基的侧链断裂,而在很少造成侧链断裂的标准 ECD 中,电子携带能量一般为 ≤ 0.2 eV。研究发现当电子携带能量从 1 eV 降至 0.2 eV 时,离子对其捕获效率会提高三个数量级^[29],这也就是标准 ECD 中电子携带能量一般为 0.2 eV 的原因。但在另一项研究中发现,当电子携带能量大约 10 eV 时,电子与母离子云的重叠面积达到最大,两者重叠范围是低能量时的

100 倍左右,且断裂碎片与标准 ECD 基本相同^[30]。在 2001 年,电子灯丝式 (electron filament) 电子发射器被间接加热式阴极 (indirect heated cathode) 取代^[31],新型电子发射器不但使电子发射时间从约 30 秒缩短至几毫秒,而且能产生巨大的电子束。电子束半径的提升使因电子携带高能量而造成的捕获效率损失得到弥补。HECD 产生的断裂片断与标准 ECD 方法基本相同,而其较标准 ECD 高出的能量可以使氨基酸残基的侧链断裂。已经观察到的侧链断裂产生的离子有由 z 型离子断裂产生的 w 和 u 型离子、 a 型离子断裂产生的 d 型离子^[16,30,32-33]。在这些侧链断裂中,最重要的应用就是使亮氨酸和异亮氨酸得到区分。

此外电子激发解离 (EED, Electronic Excitation Dissociation)^[34] 和电子脱离解离 (EDD, Electron Detachment Dissociation) 等^[35] 一些基于电子捕获解离的技术所产生的肽段碎片也各有特点。

3.1.2 活化离子 ECD (Activated Ion ECD, AI-ECD) 和等离子体 ECD (Plasm ECD) 前面在讲到 ECD 断裂覆盖度时,已经看到当蛋白质分子量不断增大时,ECD 的断裂效率明显降低,特别是分子量超过 20 kDa 后几乎没有断裂^[27]。这主要是因为 ECD 虽然可以使蛋白质主链断开,但它却不能使维持高级结构的非共价键打开。也就是说蛋白质的高级结构会阻碍相当数量的内部氨基酸残基对电子的捕获,从而不能发生解离。有些时候,即使通过 ECD 过程,虽然已经造成了一些主链上的断裂,但这些已经断开的肽段仍然通过非共价键连接在一起。这种情况在紧密折叠的多肽中也被观察到^[33-36],此现象的存在使质谱仪无法分析较高分子量的蛋白和多肽。为解决这些问题,科学家已经发展了一些 ECD 的延伸技术,主要有活化离子 ECD^[28,39] 和等离子体 ECD^[39]。

在活化离子 ECD^[28,37] 中,使用氮气脉冲 (或红外照射 infrared irradiation、黑体辐射 black-body irradiation 等) 对大分子量的母离子进行碰撞,使离子在电子捕获前高级结构被破坏——也就是经过一个活化过程。对几个分子质量为 17 ~ 45 kDa 的蛋白分析表明,断裂覆盖度有了明

显的提高。目前报道的使用 AI ECD 方法鉴定的最大分子质量为 45 kDa 的蛋白^[28]。

等离子 ECD^[39],是在允许母离子进入 ICR 腔前,使电子(0.1~15 eV)与脉冲氮气进行碰撞产生等离子体环境,在等离子体环境中进行的 ECD 反应显著地提高了断裂覆盖度。

3.2 翻译后修饰和 ECD

蛋白的翻译后修饰在生物体中存在着广泛而重要的作用。目前对翻译后修饰的质谱鉴定主要集中在糖基化、磷酸化等。传统的串联质谱方法对蛋白或多肽进行翻译后修饰鉴定时存在两方面不足:一、对主链的断裂存在偏好,造成一定范围序列标签的空白区,这一点在分子量的多肽和蛋白中尤为明显;二、在传统方法中修饰基团丢失优先于主链断裂,所以这种策略下的翻译后修饰鉴定是间接的。

通过 ECD 对不同的修饰基团的鉴定已有一些研究。在这些研究中发现,ECD 在造成蛋白或多肽主链断裂的情况下可以保留修饰基团,也就是产生了携带修饰基团的肽序列标签,这为质谱研究提供了直接确定修饰基团和位点的途径。在一些研究中,ECD 技术与其他质谱方法相互补充,得到了更加丰富准确的数据。

蛋白质糖基化主要可分为 *N*-连接糖基化和 *O*-糖基化。*N*-连接糖基化是 *N*-乙酰葡萄糖胺与天冬酰胺相连,一般见于 Asn-Xxx-Ser/Thr 序列中(Xxx 为脯氨酸以外的氨基酸),*O*-糖基化是糖链与 Ser/Thr 相连,不像 *N*-连接糖基化,它没有特定的序列,但一般多见于富含丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、甘氨酸和丙氨酸的蛋白中,且糖链结构也更加复杂。在传统串联质谱中,面对 *N*-连接糖基化的修饰时,因为其特定序列的存在,使鉴定较为可行,但对于 *O*-糖基化,传统的方法就显得有些无力了。Hakansson 等^[33]对酶解后的 *N*-糖基化蛋白使用 ECD 与 IRMPD 联合分析,结果 ECD 产生了 *c*、*z* 粒子序列标签而没有造成糖链的丢失以及单糖单位间的断裂,也就是确定了 *N*-连接糖基化位点。IRMPD 对蛋白主链基本没有影响,但可使糖苷键断开,完整地分析了糖链的结构。两者结合全面的分析了这个 *N*-连接糖蛋白的糖基修饰位点和糖链具体结构。传统 CID 方法对 *O*-连接糖的鉴定非常困

难,只能产生弱的糖链信号或根本没有信号,这主要是因为糖链在 CID 中不如肽键稳定。Zubarev 等^[40]首次将 ECD 应用于 *O*-连接糖基化的研究,他们成功鉴定了一些分子量大约 3 kDa 的糖基化肽段。ECD 技术对糖基化蛋白的研究应用正在深入中^[41-42]。

磷酸化在细胞信号转导等生命过程中起着不可替代的作用,是生命科学领域研究的热点。在对蛋白或多肽磷酸化修饰的研究中,ECD 不造成磷酸基团的丢失。在对 β -casein(24 kDa)的研究中,AI ECD 鉴定了 5 个磷酸化位点中的 1 个^[43],而等离子体 ECD 找到了所有 5 个磷酸化位点^[39]。ECD 在其翻译后修饰鉴定中也表现出了广泛的应用前景^[44],已经有报道的还包括甲硫氨酸氧化^[45]、酰化^[46]、泛素化^[47]、硫酸脂化作用^[37]分析等。

3.3 ECD 在 Top Down 策略中的应用

如前所述,Top Down 策略的目标是通过多级质谱分析直接对完整蛋白质的一级结构包括翻译后修饰位点进行的鉴定。翻译后修饰是 Top Down 策略中重要的一部分。使用 ECD 进行 Top Down 策略分析的蛋白质最大分子质量已达 45 kDa^[28],研究范围涉及多种蛋白质,如 biomarker^[48]、分泌蛋白^[49]等。最近对 HeLa 细胞中的组蛋白(Histone)研究又一次显示出了 ECD 技术的优越性。在对 Histone2B 蛋白家族的分析中,直接鉴定了 H2B. Q, H2B. A, H2B. K/T, H2B. J, H2B. E, H2B. B, H2B. F 和 H2B. A,以及它们在各个细胞周期的表达变化和翻译后修饰情况^[50]。实验中的一个难点是,混杂在一起的质谱峰是种类众多的 H2B 蛋白家族的不同成员还是某个或几个蛋白的不同修饰状态所产生的。通过侧链基团替换,特别是利用 ECD 产生种类众多的碎裂片断,最终确定这些繁杂的质谱峰是产生于不同的蛋白质家族的成员(其中只有 H2B. A 是被修饰的),并确定了它们的相对表达量。对 Histone3^[51]和 Histone2A^[52]蛋白家族也进行了分析,分别得到了它们的甲基化、乙酰化、磷酸化等修饰位点随细胞周期变化的信息和相对表达量等。在采用 Bottom Up 策略时,虽然可以对单独的翻译后修饰位点进行间接的高灵敏度的鉴定,但无法做到

利用 ECD 技术在 Top Down 策略下,对一种蛋白整体水平上的修饰位点情况的综合分析和相对含量分析。

4 ECD 在组学水平上的探索

间接加热式阴极取代电子灯丝式电子发射器^[31],使 ECD 所需的时间从约 30 秒缩短至几毫秒,为与高效液相色谱联用和在线分析样品提供的基本条件。Palmlblad 等^[53]使用 LC-ECD FT-ICR MS 对标准多肽混合物(Substance P, melinttin, neurotensin, oxidized insulin chain B) 以及 BSA 酶解混合物进行分析,在多肽混合物的鉴定中,除 neurotensin (没有主链断定)外,都产生了序列标签,在对酶解产物 BSA 的分析中也产生了一些序列标签足以鉴定这个蛋白。Helen J 等^[54]最近对从 SDS-PAGE 上切下的条带中的蛋白使用高分辨率、高准确度的傅立叶变换离子回旋共振进行一级扫描后,对一级谱中两个最强峰进行 ECD 的二级碎裂,成功地完成了数据依赖的 ECD 串联分析。此外,为了使这种解离方式降低使用成本,以便更广泛地应用于蛋白质组学研究,新近发展起来了电子转移解离(ETD, electron transfer dissociation)^[55]技术,这个技术的肽段断裂方式和特点与 ECD 相同,所不同的是这个技术通过某些化学物质携带电子,通过化学物质的传送,使在离子阱质谱仪条件下就可以使肽段进行电子捕获,从而完成与 ECD 相同的解离。Thermo、Agilent 等公司已经有基于 ETD 技术的质谱仪投入市场。

5 总 结

ECD 以其完全不同于其他生物串联质谱的独特视角,提供了全新的二级序列标签。它集众多优点于一身:对蛋白质和多肽的主链断裂无偏好性;主链断裂覆盖度高;优先断裂二硫键;保留翻译后修饰基团;基本无中性丢失;可区分亮氨酸和异亮氨酸等。当然它也表现出一些缺点如:灵敏度不高;在傅立叶变换离子回旋共振质谱仪中应用费用昂贵;ECD 的相关软件还不如传统串联质谱的强大便捷等。综合 ECD 的优缺点,ECD 充满魅力,它提供的信息别具一格,在 Top Down 研究和翻译后修饰研究中具有广阔的应

用前景,关于 ECD 技术 Marshall 等^[56]已经发表了全面的综述,寄希望于它在将来能够独挡一面,也期待着它与传统串联质谱的联合能够谱写出更加全面、准确、可信的质谱乐章。

参考文献:

- [1] LOO J A, UDSETH H R, SMITH R D. Collision effects on the charge distribution of ions from large molecules formed by Electrospray Ionization-Mass Spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1988, 2: 207-210.
- [2] HAYES R N, GROSS M L. Collision-induced dissociation[J]. *Methods Enzymol*, 1990, 193: 237-263.
- [3] WOODLIN R L, BOMSE D S, BEAUCHAMP J L. Multiphoton dissociation of molecules with low power continuous wave infrared laser radiation[J]. *J Am Chem Soc*, 1978, 100(10): 3 248-3 250.
- [4] PRICE W D, SCHNIER P D, WILLIAMS E R. Tandem mass spectrometry of large biomolecule ions by blackbody infrared radiative dissociation [J]. *Anal Chem* 1996, 68(5): 859-866.
- [5] ZUBAREV R A, HASELMANN K F, BOGDAN B, et al. Towards an understanding of the mechanism of electron-capture dissociation [J]. *Eur J Mass Spectrom*, 2002, 8: 337-349.
- [6] ZUBAREV R A, KELLEHER N L, MCLAFFERTY F W. ECD of multiply charged protein cations a nonergodic process[J]. *J Am Chem Soc*, 1998, 120(13): 3 265-3 266.
- [7] ZUBAREV R A, Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2003, 22(1): 57-77.
- [8] BARDSLEY J N, BIONDI M A. *Advances in atomic and molecular physics*[M]. New York: Academic Press, 1970: 1-57.
- [9] ZUBAREV R A. Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, 15(1): 12-16.
- [10] POLFER N C, HASELMANN K F, ZUBAREV R A, et al. ECD of polypeptides using a 3 T FT-ICR mass spectrometer[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16: 936-943.
- [11] LEYMARIE N M, BERG E A, MCCOMB M E, et al. Tandem MS for structural characterization of proline-rich proteins[J]. *Anal Chem*, 2002,

- 74;4 124-4 132.
- [12] NIELSEN M L, SAVITSKI M M, ZUBAREV R A. Improving protein identification using complementary fragmentation techniques in fourier transform mass spectrometry[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(6): 835-845.
- [13] HELEN J, COOPERA, MARSHALL A G, et al. Secondary fragmentation of linear peptides in electron capture dissociation [J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2003, 228: 723-728.
- [14] COOPER H J, HUDGINS R R, MARSHALL A G. Electron capture dissociation of cyclodepsipeptides, branched peptides and e-peptides[J]. *Int J Mass Spectrom* 2004, 234: 24-35.
- [15] ZUBAREV R A, KRUGER N A, FRIDRIKSSON E K. Electron capture dissociation of gaseous multiply-charged proteins is favored at disulfide bonds and other sites of high hydrogen atom affinity[J]. *J Am Chem Soc*, 1999, 121(12): 2 857-2 862.
- [16] KJELDSEN F, HASELMANN K F, ZUBAREV R A, et al. Distinguishing of Ile/Leu amino acid residues in the PP3 protein by (hot) electron capture dissociation in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2003, 75(6): 1 267-1 274.
- [17] COOPER H J, HAKANSSON K, MARSHALL A G, et al. Characterization of amino acid side chain losses in ECD[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2002, 13: 241-249.
- [18] HASELMANN K F, BUDNIK B A, ZUBAREV R A, et al. Can the (m, -X) region in electron capture dissociation provide reliable information on amino acid composition of polypeptides [J]. *Eur J Mass Spectrom*, 2002, 8: 461-469.
- [19] AXELSSON J, PALMBLAD M, HAKANSSON P, et al. ECD of substance P using a commercially available FTICR mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom*[J]. 1999, 13: 474-477.
- [20] ZUBAREV R A, NIELSEN M L, BUDNIK B A. Tandem ionization mass spectrometry of biomolecules[J]. *Eur J Mass Spectrom*, 2000, 6: 235-240.
- [21] KRUGER N A, ZUBAREV R A, MCLAFFERTY F W, et al. ECD of multiply charged peptide cations[J]. *Int J Mass Spectrom*, 1999: 185-187, 787-793.
- [22] HASELMANN K F, JENSEN F, ZUBAREV R A, et al. ECD of weakly bound polypeptide polycationic complexes [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16: 2 260-2 265.
- [23] HORN D M, BREUKER K, MCLAFFERTY F W, et al. Kinetic intermediates in the folding of gaseous protein ions characterized by electron capture dissociation[J]. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 9 792-9 799.
- [24] MORRIS H R, PAXTON T, PANICO M, et al. A Novel Geometry Mass Spectrometer, the Q-TOF, for Low-Femtomole/Attomole — Range Biopolymer Sequencing [J]. *Journal of Protein Chemistry*, 1997, 16: 469-479.
- [25] LOO J A, EDMONDS C G, UDSETH H R, et al. Effect of reducing disulfide-containing proteins on ESI mass spectra[J]. *Anal Chem*, 1990, 62: 693-698.
- [26] HAKANSSON K, EMMETT M R, MARSHALL AG, et al. High sensitivity ECD tandem FTICR mass spectrometry of microelectrosprayed peptides[J]. *Anal Chem*, 2001, 73: 3 605-3 610.
- [27] KELLEHER N L, LIN H Y, MCLAFFERTY F W, et al. Top Down versus bottom up protein characterization by tandem high-resolution mass spectrometry[J]. *J Am Chem Soc*, 1999, 121: 806-812.
- [28] GE Y, LAWHORN B G, MCLAFFERTY F W, et al. Top Down characterization of larger proteins by ECD mass spectrometry[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 672-678.
- [29] ZUBAREV R A, HORN D M, MCLAFFERTY F W, et al. Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations[J]. *Anal Chem*, 2000, 72(3): 563-573.
- [30] KJELDSEN F, HASELMANN K F, ZUBAREV R A, et al. Dissociative capture of hot (3-13 eV) electrons by polypeptide polycations[J]. *Chem Phys Lett*, 2002, 356: 201-206.
- [31] TSYBIN Y O, HAKANSSON P, ZUBAREV R A. Improved low-energy electron injection systems for high rate electron capture dissociation in

- Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2001, 15: 1 849-1 854.
- [32] KJELDSEN F, ZUBAREV R A. Secondary losses via g-lactam formation in hot electron capture dissociation[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 6 628-6 629.
- [33] HAKANSSON K, CHALMERS M J, MARSHALL A G. Combined ECD and IRMPD for multi-stage MS/MS in a FTICR mass spectrometer[J]. *Anal Chem*, 2003, 75: 3 256-3 262.
- [34] NIELSEN M L, BUDNIK B A, HASELMANN K F, et al. Intramolecular hydrogen atom transfer in hydrogen deficient polypeptide radical cations[J]. *Chem Phys Lett*, 2000, 330: 558-562.
- [35] BUDNIK B A, ZUBAREV R A. MH^{2+} ion production from protonated polypeptides by electron impact[J]. *Chem Phys Lett*, 2000, 316: 19-23.
- [36] COOPER H J, CASE M A, MARSHALL A G. ESI FT-ICR mass spectrometric analysis of metal-ion selected dynamic protein libraries[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 5 331-5 339.
- [37] HORN D M, GE Y, MCLAFFERTY F W. Activated ion electron capture dissociation for mass spectral sequencing of larger (42 kDa) proteins[J]. *Anal Chem*, 2000, 72: 4 778-4 784.
- [38] SZE S K, GE Y, MCLAFFERTY F W, et al. Top-down characterization of a 29 kDa protein for characterization of any post-translational modification to within one residue[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99: 1 774-1 779.
- [39] SZE S K, GE Y, OH H, et al. Plasma ECD for the characterization of large proteins by top-down mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2003, 75: 1 599-1 603.
- [40] MIRGORODSKAYA E, ROEPSTORFF P, ZUBAREV R A. Localization of O-glycosylation sites in peptides by electron capture dissociation in a fourier transform mass spectrometer[J]. *Anal Chem*, 1999: 71: 4 431-4 436.
- [41] HASELMANN K F, BUDNIK B A, ZUBAREV R A, et al. Advantages of external accumulation for ECD in FTMS[J]. *Anal Chem*, 2001, 73: 2 998-3 005.
- [42] MACEK B, MORMANN M, PETER K J, et al. ECD versus CID mass spectrometry in structural studies of protein O-fucosylation[C]. //Proceedings of 50th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics Orlando, 2002.
- [43] SHI S H, HEMLING M E, MCLAFFERTY F W, et al. Phosphopeptide/phosphoprotein mapping by ECD mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2001, 73: 19-22.
- [44] BAKHTIAR R, GUAN Z. Electron capture dissociation mass spectrometry in characterization of post-translational modifications[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(1): 1-8.
- [45] GUAN Z, YATES N A, BAKHTIAR R. Detection and characterization of methionine oxidation in peptides by collision-induced dissociation and electron capture dissociation[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2003, 14(6): 605-613.
- [46] GUAN Z. Identification and localization of the fatty acid modification in ghrelin by ECD[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2002, 13(12): 1 443-1 447.
- [47] COOPER H J, HEATH J K, MARSHALL A G, et al. Identification of sites of ubiquitination in proteins[J]. *Anal Chem*, 2004, 76: 6 982-6 988.
- [48] DEMIREV P A, RAMIREZ J, FENSELAU C. Tandem mass spectrometry of intact proteins for characterization of biomarkers from *Bacillus cereus* T spores[J]. *Anal Chem*, 2001, 73(23): 5 725-5 731.
- [49] GE Y, BEGLEY T, MCLAFFERTY F W, et al. Top Down characterization of secreted proteins from mycobacterium tuberculosis by ECD mass spectrometry[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2003, 14: 253-261.
- [50] NERTILA S, MICHAEL J R, CRAIG A M, et al. Gene-specific characterization of human histone H2B by electron capture dissociation[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(2): 233-239.
- [51] THOMAS C E, NEIL L K, CRAIG A M. Mass spectrometric characterization of human histone H3[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(2): 240-247.
- [52] MICHAEL T B, JAMES J P, CRAIG A M, et al. Precise characterization of human histones in

- the H2A gene family by Top Down mass spectrometry[J]. Journal of Proteome Research, 2006, 5(2): 248-253.
- [53] PALMBLAD M, TSYBIN Y O, HAKANSSON P, et al. LC and ECD in FTICR mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002 (10), 16: 988-992.
- [54] COOPER H J, AKBARZADEH S, ZELLER M. Data-dependent electron capture dissociation FT-ICR mass spectrometry for proteomic analyses [J]. J Proteome Res, 2005, 4(5): 1 538-1 544.
- [55] SYKA J E, COON J J, HUNT D F, et al. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 9 528-9 533.
- [56] HELEN J, COOPER, KRISTINA H, et al. The role of electron capture dissociation in biomolecular analysis[J]. Mass Spectrom Rev[J]. 2005, 24: 201-222.

讣告

著名化学家和教育学家、中国科学院院士、我国稳定同位素化学的奠基人、北京大学化学学院教授、中国共产党优秀党员张青莲先生,因病医治无效,不幸于 2006 年 12 月 14 日晚上 7 点 3 分在北京逝世。享年 99 岁。

张青莲先生原籍江苏常熟,1930 年毕业于光华大学,1931 年就读于清华大学研究生院,1936 年获德国柏林大学博士学位,之后前往瑞典物理化学研究所从事科研工作,1937 年回国,先后任中央研究院副研究员、光华大学教授、西南联合大学教授、清华大学教授,1952 年起任北京大学化学系教授。曾任《化学学报》主编、教育部化学教材编审委员会副主任、质谱学会理事长、国际纯粹与应用化学联合会原子量与同位素丰度委员会衔称委员、北京大学化学系主任等职,1955 年被聘为中国科学院首批学部委员。

张青莲先生是我国稳定同位素化学的先驱和奠基人。半个多世纪的科研工作取得了举世瞩目的成果,尤其在重水性质的研究方面一直处于国际领先地位,1949 年发表在英国《自然》杂志上的重水密度值一直被世人所引用,1991 年起历时十余年对铟等 10 种元素的原子量进行精确测定,测定结果逐一被国际原子量委员会正式确认为这 10 种元素原子量的新值;主编了 18 卷的《无机化学丛书》巨著,为我国无机化学的发展做出了不可磨灭的贡献。他将毕生的精力贡献给了我国的科学与教育事业。

张青莲教授治丧办公室

2006 年 12 月 15 日