

含二硫键多肽的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱研究

仇晓燕^{1,2}, 崔 勳¹, 宋凤瑞¹, 刘志强¹, 刘淑莹¹

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春质谱中心, 吉林 长春 130022; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

Study of Disulfide-bonded Peptides Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry

QIU Xiao-yan^{1,2}, CUI Meng¹, SONG Feng-rui¹, LIU Zhi-qiang¹, LIU Shu-ying¹

(1. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun Center of Mass Spectrometry, Changchun 130022, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The determination of disulfide bonds becomes an important aspect of obtaining a comprehensive understanding of the chemical structure of a protein. Numerous experimental methods have been developed for the determination of disulfide bonds in proteins. Modern mass spectrometry has developed as an important tool for the analysis of disulfide bond patterns due to its advantages of being simple, rapid and sensitive. The dissociations of the disulfide bonds were detected during the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) analysis. These fragment ions were attributed to prompt fragmentation or “in-source decay” rather than “post-source decay”. For the double disulfide bonds, ions of plus sulfur and minus sulfur atoms corresponding to cleavages at different sites within the carbon-sulfur-sulfur-carbon disulfide bonds were also observed.

Key words: MALDI-MS; disulfide bond; prompt fragment

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2008) 增刊-96-02

二硫键是一种常见的蛋白质翻译后修饰, 对稳定蛋白质的空间结构, 保持及调节其生物活性等都有着非常重要的作用。因此确定二硫键在蛋白质中的位置是全面了解含二硫键蛋白化学结构的重要方面。在众多二硫键定位实验方法中, 现代质谱技术因其操作简单、快速、灵敏等优点而成为分析二硫键的重要手段。本实验利用MALDI-MS分析了一些蛋白酶解后生成的含二硫键肽段。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

人胰岛素: 购自 Sigma-Aldrich 公司; β 2-微球蛋白 (β 2-microglobulin): 购自 Calbiochem 公司; TPCK 修饰的测序级胰酶: 购自 Promega 公司; α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA): 购于 Sigma 公司; 乙腈、三氟乙酸 (TFA, HPLC grade): 购于 Fisher 公司; 所有实验用水均来自 MilliQ (Millipore) 超纯水发生装置 (电阻率 18.2 M Ω ·cm); 其他试剂均是分析纯。

1.2 实验条件

将 0.5 μ L 样品溶液与 0.5 μ L 基质溶液混合, 点样于样品靶上, 自然干燥。在 Voyager DE STR MALDI-TOF 质谱仪 (Applied Biosystems) 上进行检测。质谱条件: 20 kV, 阳离子反射模式, 每张谱图累积 50 次, 延迟时间 100 ns, 每个样品采集 3~5 个谱图。

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30672600, 20873137); 吉林省重点科技发展计划项目(批准号: 20060902)资助

通信作者: 刘淑莹 (1943~), 女 (汉族), 黑龙江人, 研究员, 博士生导师, 从事天然药物化学和有机质谱学研究。E-mail: mslab@ciac.jl.cn

2 结果与讨论

将蛋白质在 37 °C 条件下用胰蛋白酶进行酶解 (酶解缓冲液: 50 mmol·L⁻¹ NH₄HCO₃, pH 7.8), 得到的混合肽段样品在正离子反射模式下进行 MALDI-MS 分析, 示于图 1。

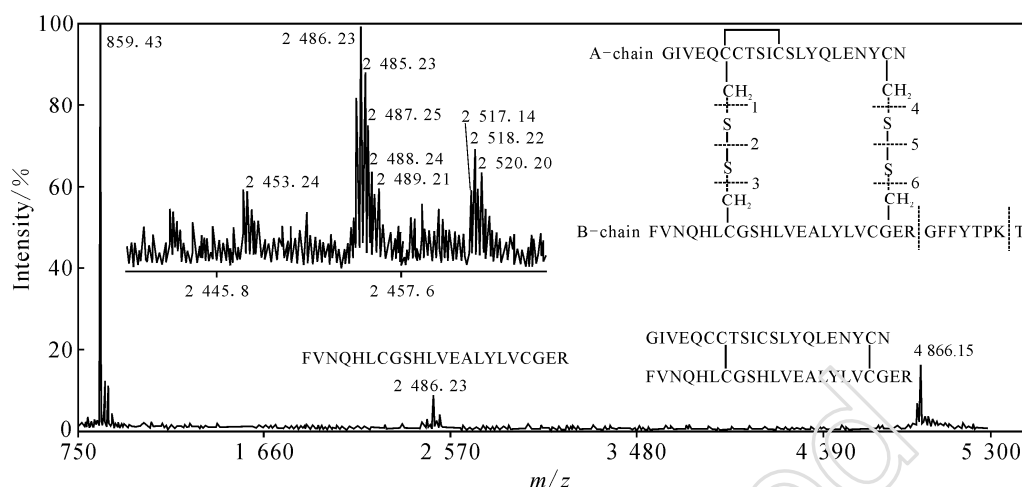


图 1 人胰岛素胰蛋白酶酶解肽段混合物的 MALDI-TOF 质谱图

Fig.1 MALDI-TOF mass spectrum generated from insulin tryptic digest

3 结论

本研究采用 MALDI-MS 技术分析一些酶解后生成的含二硫键肽段, 发现实际上 MALDI 电离并不是非常的软, 蛋白质/多肽在 MALDI 源中会在二硫键处断裂生成 prompt 离子, 这是除了反射式 MALDI-TOF 的 PSD 以外的另一种形式的碎裂离子。另外, 发现的相差 32 Da 的不同丰度的“triplet”离子是由于多肽在二硫键中—C—S—S—C—的不同位点处断裂且在 S—S 处优先断裂而产生的。这就要求在分析含二硫键肽的谱图时要特别小心以免做出错误的判断, 当然另一方面这也可以成为获得有关蛋白质/多肽二硫键信息的简便方法。与 MS/MS 中二硫键的选择性断裂类似, 这些都将有助于对蛋白质中二硫键的分析与鉴定。

参考文献:

- [1] FAGERQUIST C K. Rapid Commun. Mass Spectrom, 2004, 18: 685-700.
- [2] BYKOVA N V, IGAMBERDIEV A U, ENS W, et al. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 347: 301-309.
- [3] ZHOU J, ENSW, POPPE-SCHRIEMER N, et al. Int J Mass Spectrom Ion Processes, 1993, 126: 115-122.

(上接第 95 页)

参考文献:

- [1] 崔树德. 中药大全[M]. 黑龙江: 黑龙江科学技术出版社, 1989: 148.
- [2] XIN X. Determination of ephedrine hydrochloride in Dibiye by UV spectrophotometer[J]. Chin Pharm Bull, 1987, 22(2): 74.
- [3] CHENG Y, FENG Q, WANG H R, et al. Determination of ephedrine alkaloid in Mahuang by thin layer spectroscopy[J]. Chin Tradit Pat Med, 1990, 12(6): 15.
- [4] YAMASAKI K, FUJITA K, SAKAMOTO M, et al. Separation and quantitative analysis of ephedrine alkaloids by gas-spectrography and its application to evaluation of some ephedraspecies collected around Himalaya[J]. Chem Pharm Bull, 1974, 22(12): 2 898.