

干热条件下形成的磷酸化多肽的质谱分析

涂宗财¹, 王 辉¹, 陈 钢¹, 刘成梅¹, 刘光宪², 肖 辉³

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2.江西省农业科学院食品加工研究开发中心, 江西 南昌 330200; 3.美国叶史瓦大学爱因斯坦医学院, 美国 纽约 10461)

摘 要: 建立两个含有丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和酪氨酸(Y)的多肽模型(肽 A 和肽 B), 采用傅里叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR MS)和电喷雾-电子转移裂解质谱(LTQ-ETD MS-MS)对干热条件下得到的磷酸化多肽进行研究。FT-ICR MS 分析得出, 肽 A 和肽 B 在该条件下均引入一个磷酸根; LTQ-ETD MS-MS 分析得出, 肽 A 的 S 和 Y 被修饰的特征峰较明显, 而 T 被修饰的特征峰与 Y 被修饰的部分特征峰相重叠, 无法判断 T 是否被磷酸化修饰; 磷酸化肽 B 中仅含有 S 和 T, S 具有非常明显的修饰特征峰, 而无 T 被修饰的特征峰。结果表明, S 和 Y 在干热条件下比 T 更易被磷酸化修饰, 这可能与 3 种氨基酸支链上羟基位置有关。

关键词: 磷酸化修饰; 多肽; 傅里叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR MS); 电子转移裂解质谱(ETD MS-MS)

Mass Spectral Analysis of Phosphorylated Peptides Formed under Dry Heating Conditions

TU Zong-cai¹, WANG Hui¹, CHEN Gang¹, LIU Cheng-mei¹, LIU Guang-xian², XIAO Hui³

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Food Research Centre, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China;

3. Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, New York 10461, USA)

Abstract: Two peptide models such as peptide A and peptide B containing serine (S), threonine (T) and tyrosine (Y) were built. The phosphorylation of both peptides was carried out under dry heating conditions. The phosphorylation sites were determined using FT-ICR MS and LTQ-ETD MS/MS. FT-ICR analysis revealed one phosphorylated site in either peptide under dry heating conditions. In addition, LTQ-ETD MS/MS analysis revealed obvious characteristic peaks of phosphorylated S and Y in peptide A. It was difficult to determine the phosphorylation of T due to the overlapped characteristic peaks of phosphorylated Y and T. However, the LTQ-ETD MS/MS spectrum of peptide B only revealed the phosphorylation of S without the phosphorylation of T. In summary, S and Y were easier to be phosphorylated than T in the same peptide under dry heating conditions.

Key words: phosphorylation; peptide; Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS); electron transfer dissociation mass spectrometry-mass spectrometry (ETD MS-MS)

中图分类号: TQ936.16

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0062-04

食品蛋白质不仅是人体健康的重要营养素, 而且其较好的加工性能(如乳化性、凝胶性等)在食品工业中起着非常重要的作用^[1]。蛋白质分子修饰可以大大改善其营养和加工性能, 目前蛋白质修饰的主要方法有糖基化^[2]、酶修饰^[3]、磷酸化^[4]、物理修饰^[5]等技术, 但是, 在这些修饰方法中, 磷酸化修饰被证明是可以提高食品蛋白质功能性质的比较重要和有效的改性修饰技术^[6-8], 且可以提高金属钙的螯合能力, 提高对脂肪的抗氧化能力和免疫活性等^[9]。随着科学技术的不断发展, 蛋白质

磷酸化修饰的方法有化学法、生物酶法等, 采用干热技术对蛋白质进行磷酸化修饰是最近刚刚发展起来的一种方法^[10], 研究表明, 在干热条件下采用焦磷酸钠对蛋白质进行修饰, 可以大大提高蛋白质的功能性质^[11-14]。

目前, 国内外对干热条件下产生的磷酸化蛋白的结构进行了一定的研究^[14], 但是对其磷酸化位点的研究较少, 本实验拟分别采用含有丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和酪氨酸(Y)和 S、T 的两个多肽作为主要研究对象, 将多肽与焦磷酸钠混合均匀干燥, 在干热条件下进行磷酸化修

收稿日期: 2011-03-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(20976078); 国家重点实验室自由探索项目(SKLF-TS-200923)

作者简介: 涂宗财(1965—), 男, 教授, 博士, 主要从事食品生物大分子的改性研究。E-mail: tuzc_mail@yahoo.com.cn

饰,通过傅里叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR MS)和电喷雾-电子转移裂解质谱(LTQ-ETD MS-MS)分别对修饰后磷酸化多肽进行分析,为该条件下天然蛋白质的磷酸化修饰位点的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

肽A(FYTPMSRREV)和肽B(SITKDQII)由美国爱因斯坦医学院提供。

乙腈、甲酸(色谱纯)、焦磷酸钠(分析纯) 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(FT-ICR MS) 美国Varian公司;电喷雾-电子转移裂解质谱仪(LTQ-ETD MS-MS) 美国Thermo Scientific公司;高效液相色谱系统(配两个LC-10AD泵) 日本岛津公司;C₃柱子(5mm×50mm, 1.0mm) 美国Micro-Tech Scientific公司;Zorbax 300SB-C₁₈柱子(75μm×43mm, 5μm) 美国Agilent公司;Zip-tip(C₄, 10μL) 美国Millipore公司。

1.3 方法

1.3.1 磷酸化修饰处理

分别取100mg/mL肽A和肽B各100μL置1.5mL离心管中,真空干燥,在干燥粉末中添加100μL焦磷酸钠水溶液(0.1mol/L, pH4.0),真空干燥,在80℃条件下保温5d,加200μL超纯水溶解备用。

1.3.2 Zip-tip脱盐处理

将处理后样品采用C₄ Zip-tip进行脱盐纯化,50%的色谱纯乙腈洗脱,真空干燥,备用。

1.3.3 LC FT-ICR MS检测分析^[15]

将脱盐后的样品配成50μg/μL的水溶液,取样25μL上液相,采用双泵微米级液相进行梯度洗脱,流动相A:5%乙腈,0.1%甲酸水溶液;流动相B:95%乙腈溶液。洗脱梯度为:0~2min,98%A,2%B;3min,85%A,15%B;8min,70%A,30%B;9min,50%A,50%B;10~13min,5%A,95%B;14min,95%A,5%B;15min,STOP。流速为0.05μL/min,液相设备与FT-ICR直接连接,在0min时采集图谱,采集时间为15min。

1.3.4 LC LTQ-EDT MS-MS的在线检测

脱盐后样品配成5μg/μL的水溶液,取样5μL上液相。采用双泵纳米级液相进行梯度洗脱,流动相A:5%乙腈,0.1%甲酸水溶液;流动相B:95%乙腈溶液。洗脱梯度为:0~15min,95%A,5%B;16min,85%A,15%B;20min,70%A,30%B;25min,50%A,50%B;35~45min,5%A,95%B;46min,

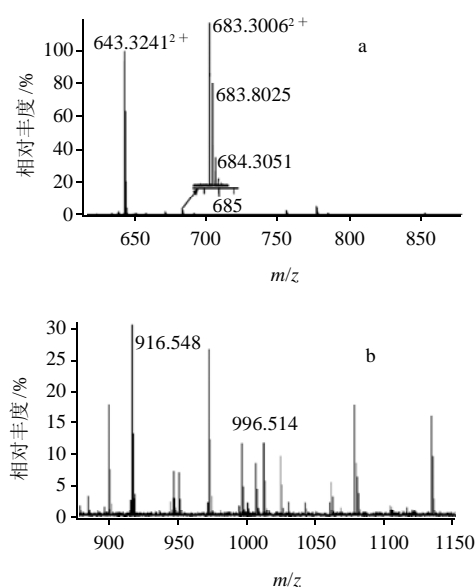
95%A,5%B;50min,STOP。流速为600nL/min,在0min时采集图谱,采集时间为50min。

2 结果与分析

2.1 FT-ICR MS对磷酸化多肽的检测分析

目前,最常见的磷酸化类型是丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和酪氨酸(Y)的磷酸酯化,另外还包括精氨酸、组氨酸和赖氨酸的亚酰胺化,以及天冬氨酸和谷氨酸的酰化。其中S和Y中的一OH位于氨基酸的α位,而T中的一OH位于氨基酸的β位,由于受到空间位阻的影响,3种氨基酸的磷酸化修饰的难易程度不尽相同。本研究分别建立含有S、T和Y的多肽模型,在干热条件下进行磷酸化修饰,采用质谱分析技术研究S、T和Y的磷酸化修饰情况。

质谱技术是研究磷酸化蛋白质的一种灵敏的分析方法,因此磷酸根对蛋白质或多肽的共价修饰可以通过多肽质荷比的质量数增加来测量。Li等^[11]研究发现,如果质谱峰比相应多肽增加分子质量为80、98、162D和180D,则可能是被磷酸化修饰。FT-ICR MS具有独特的专属性和高灵敏度性,其精确度可以达到10⁻⁶,采用FT-ICR MS可以精确检测磷酸化肽的形成,研究发现,在干热条件下得到的磷酸化肽的质谱峰的质荷比与相应多肽的质荷比增加质量数为80D。



a.肽A(FYTPMSRREV); b.肽B(SITKDQII)。

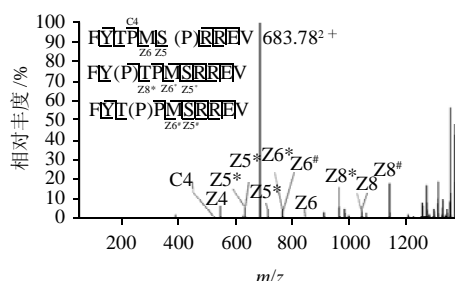
图1 肽A和肽B磷酸化修饰的FT-ICR MS质谱图

Fig.1 FT-ICR MS spectra of phosphorylated peptides A and B

本研究建立了干热条件下,焦磷酸钠对肽A[FYTPMSRREV]和肽B[SITKDQII]进行磷酸化修饰的模型,图1为磷酸化多肽的FT-ICR MS扫描图,其中

m/z 643²⁺ 为肽 A 的 $(M+2H)^{2+}$ 离子峰, m/z 683²⁺ 比 m/z 643²⁺ 增加 80D, 是磷酸化肽 A 的 $(M+2H)^{2+}$ 离子峰, 表明肽 A 被一个磷酸根修饰; m/z 916 为肽 B 的 $(M+H)^+$ 离子峰, m/z 996 与 m/z 916 相差 80D, m/z 996 为磷酸化肽 B 的 $(M+H)^+$ 离子峰, 表明肽 B 被一个磷酸根修饰, 扫描质谱中未发现肽 A 和肽 B 的双磷酸化肽的存在。其原因主要是由于被磷酸化修饰的多肽带有负电荷, 与带负电荷的磷酸根离子相互排斥, 很难在磷酸化多肽上再引入磷酸根^[16]。仅通过一级质谱分析无法对磷酸化修饰的氨基酸位点进行定位, 因此, 为了确定干热条件下, 氨基酸的具体修饰位点, 本研究采用 ETD MS-MS 方法进行分析。

2.2 ETD MS-MS 对肽 A 的定位分析



- [7] ENOMOTO H, HAYASHI Y, LI Canpeng, et al. Glycation and phosphorylation of alpha-lactalbumin by dry-heating: effect on protein structure and physiological functions[J]. J Dairy Sci, 2009, 92(7): 3057-3068.
- [8] ENOMOTO H, LI C P, MORIZANE K, et al. Glycation and phosphorylation of β -lactoglobulin by dry-heating: effect on protein structure and some properties[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(6): 2392-2398.
- [9] KITAZAWA H, HARATA T, UEMURA J, et al. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* [J]. Int J Food Microbiol, 1998, 40(3): 169-175.
- [10] LI Canpeng, HIROFUMI E, YOKO H, et al. Recent advances in phosphorylation of food proteins: a review[J]. LWT-Food Science and Technology, 2010, 43(9):1295-1300.
- [11] LI Canpeng, YOKO H, HIROFUMI E, et al. Phosphorylation of proteins by dry-heating in the presence of pyrophosphate and some characteristics of introduced phosphate groups[J]. Food Chem, 2009, 114(3): 1036-1041.
- [12] LI Canpeng, HISHAM R I, YASUSHI S, et al. Improvement of functional properties of egg white protein through phosphorylation by dry-heating in the presence of pyrophosphate[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(18): 5752-5758.
- [13] LI Canpeng, YOKO H, HIROSHI S, et al. Phosphorylation of ovalbumin by dry-heating in the presence of pyrophosphate: effect on protein structure and some properties[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(12): 4962-4967.
- [14] ENOMOTO H, ISHIMARU T, LI Canpeng, et al. Phosphorylation of ovalbumin by dry-heating in the presence of pyrophosphate: effect of carbohydrate chain on the phosphorylation level and heat stability[J]. Food Chem, 2010, 122(3): 526-532.
- [15] BAINE K M, MENON V, PINARD V P, et al. Distinct pose of discodermolide in Taxol binding pocket drives a complementary mode of microtubule stabilization[J]. Biochemistry, 2009, 48: 11664-11677.
- [16] LI Canpeng, SALVADOR A S, IBRAHIM H R, et al. Phosphorylation of egg white proteins by dry-heating in the presence of phosphate[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(23): 6808-6815.
- [17] YANG Feng, WU Si, STENOIEN D L, et al. Combined pulsed-Q dissociation and electron transfer dissociation for identification and quantification of iTRAQ-labeled phosphopeptides[J]. Anal Chem, 2009, 81(10): 4137-4143.