

# 碰撞诱导裂解-电子转移解离(CID-ETD) 质谱对糖基化多肽的分析

刘光宪<sup>1</sup>, 管珊红<sup>1</sup>, 王 辉<sup>2,\*</sup>, 冯健雄<sup>1</sup>

(1.江西省农业科学院,江西 南昌 330200; 2.南昌大学生物质转化教育部工程中心,江西 南昌 330047)

**摘要:**采用碰撞诱导裂解-电子转移解离液相串联质谱(LC LTQ-ESI CID/ETD MS-MS)分析胃蛋白酶酶解后的糖基化卵清蛋白肽。结果表明:碰撞诱导裂解一级质谱(CID MS)可以对糖基化多肽进行初步识别和鉴定;碰撞诱导裂解二级质谱(CID MS-MS)可以作为通过裂解多肽链实现部分糖基化肽位点的定位分析,但峰值较小,杂峰较多,形成了部分中性丢失的新峰。电子转移解离二级质谱(ETD MS-MS)比较适合于氨基酸序列长度为中等,带2个电荷的糖基化修饰肽段的裂解,对于较大分子质量的糖基化修饰肽的ETD(电子转移解离)裂解片段较少,判定方面存在一定困难,因此,需要发展碰撞诱导裂解中性丢失三级质谱(CID-NL-MS<sup>3</sup>)技术对分子质量较大糖基化肽的糖基定位及定性分析。

**关键词:**糖基化肽;卵清蛋白;碰撞诱导裂解;电子转移解离;质谱

## Analysis of Glycated Peptide by CID-ETD Mass Spectrometry

LIU Guang-xian<sup>1</sup>, GUAN Shan-hong<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>2,\*</sup>, FENG Jian-xiong<sup>1</sup>

(1. Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China;

2. Engineering Research Center for Biomass Conversion, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Identification of glycation sites in glycation protein plays an important role in the fields of food science and medicine. In this work, liquid chromatography (LC) coupled with linear ion trap quadrupole-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LTQ-ESI CID/ETD MS-MS) was used to analyze peptides from glycated ovalbumin digested by pepsin. The results indicated that primary identification of glycation peptides was carried out through CID MS spectrometry and site identification through CID MS-MS fragment ions. However, new ion peaks from CID MS-MS analysis were very weak and complex with some various degrees of neutral losses. ETD MS-MS was a technique more suitable for studying glycated peptide with medium molecular weight and 2 charges. Due to larger molecular glycated peptides, it was hard to determine the ETD fragments, so CID-NL-MS<sup>3</sup> technique should be developed for the identification of the glycation site.

**Key words:** glycated peptide; ovalbumin; collision-induced dissociation (CID); electron transfer dissociation (ETD); MS

中图分类号: TQ936.16

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)17-0043-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201317010

蛋白质的糖基化修饰是美拉德反应的初级阶段,即Amadori产物,基于美拉德反应的糖基化修饰是食品蛋白质改性的常用技术,因此其在食品加工过程中起着重要作用<sup>[1-2]</sup>,并且糖基化修饰情况也与糖尿病、肾病及视网膜疾病有直接关系<sup>[3-4]</sup>。对糖基化蛋白质的修饰位点的精确定位是在精确分子水平上理解蛋白质功能性质变化机制的基础<sup>[5]</sup>。采用LC-MS技术可以很好的对蛋白质糖基化修饰进行定位分析,就葡萄糖的修饰而言,其糖基化初级产物的质谱峰会发生质荷比162的偏移,通过观察质

谱峰的偏移量是否为162的倍数就可以对糖基化组装蛋白进行确认<sup>[6-7]</sup>。但一级质谱只能确定多肽是否被糖基化修饰,采用MS-MS质谱可以对糖基化肽进行序列上糖基化位点的精确定位。

碰撞诱导裂解(CID)MS-MS质谱被大量用于对糖基化多肽的定位分析,但在CID裂解过程中,蛋白质肽段裂解之前分子间的振动能量会重新分配,因此,多肽上被修饰部分的最弱的键很容易被打断,导致中性丢失的产生。但是特定的中性丢失如 $3\text{H}_2\text{O} + \text{HCHO}$ 的形成可以为

收稿日期: 2013-04-09

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-14); 江西省科技支撑计划项目(20132BBF60056)

作者简介: 刘光宪(1982—),男,助理研究员,硕士,研究方向为花生蛋白质的改性制备。E-mail: liugx178@163.com

\*通信作者: 王辉(1982—),女,助理研究员,博士,研究方向为蛋白质的化学修饰及改性。E-mail: 503756510@qq.com

糖基化肽段中位点的确定提供帮助，就是采用糖基化肽段的中性丢失触发三级质谱，并通过中性丢失后结构进行糖基化位点的定位分析<sup>[8-9]</sup>。蛋白质糖基上发生的多项中性丢失(如H<sub>2</sub>O、2H<sub>2</sub>O、3H<sub>2</sub>O、4H<sub>2</sub>O、3H<sub>2</sub>O+HCHO和C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)峰为MS-MS图谱中的主要质谱峰，因此肽段裂解片段非常有限甚至很弱<sup>[10-11]</sup>。

最近，电子转移解离(ETD)技术被应用于改进的线性离子阱捕捉质谱中，ETD和ECD比较相似，是依赖于一个电子获得阴离子的，在进行糖基化或磷酸化肽的MS-MS分析时，主要得到大量的c和z族离子，从而根据ETD碎片图谱分析得出多肽的序列<sup>[12]</sup>。研究表明，ETD MS-MS可以生成大量的甚至完全的c和z族离子，相对于CID MS-MS而言，其是研究糖基化肽的序列及糖基化组装位点定位的非常有用的质谱分析技术<sup>[12]</sup>。但这种技术也有一定的局限性，如对于双离子或者m/z大于850的离子效果不是很好，因此其在商业质谱应用中仍然存在一定的局限性，需要将ETD MS-MS、CID NL MS<sup>3</sup>等方法进行结合应用于研究蛋白质的糖基化或磷酸化组装饰<sup>[13-14]</sup>。

通过对蛋白质进行酶解后的多肽进行LC MS-MS扫描可以实现对糖基化位点的定位和半定量分析。虽然糖基化修饰蛋白质的特殊位点可以识别的，但是大部分情况下，糖基化位点的识别是建立在单糖修饰导致的质谱峰的增加，很难对蛋白质组学中的更加复杂的分析进行研究。本研究采用LC LTQ-ESI CID/ETD MS-MS串联质谱分析胃蛋白酶酶解后的糖基化卵清蛋白肽，旨在为糖基化肽或蛋白质的定位分析提供新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

卵清蛋白IV、D-葡萄糖、胃蛋白酶 美国Sigma公司；乙腈、甲酸均为色谱纯 美国Fisher公司。

### 1.2 仪器与设备

LTQ-ESI CID MS 美国Thermo Scientific公司；液相色谱仪(配有LC-10AD泵) 日本岛津公司；C<sub>3</sub>柱(1.0mm×50mm) 美国Micro-Tech Scientific公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 糖基化蛋白质的制备及分离<sup>[15]</sup>

将卵清蛋白和葡萄糖按质量比1:1混合，采用pH7.8的Tris缓冲液完全溶解，取100μL至0.5mL的离心管中，冷冻干燥。将干燥样品置80℃条件下分别加热30min，移取200μL的超纯水添加于糖基化后的样品管中，使固体样品完全溶解，采用5000u分子质量滤膜除去多余葡萄糖，纯化后的糖基化卵清蛋白定容至200μL。

糖基化卵清蛋白经二硫苏糖醇(DTT)还原后，移取0.5μL样品溶液于20μL pH2.2的盐酸溶液中，添加5μL质

量分数为1%的胃蛋白酶溶液，在0℃条件下酶解10min，移取20μL酶解液进行Zip-tip微量层析柱脱盐。

#### 1.3.2 LC LTQ-CID/EDT MS-MS的在线检测

脱盐后样品配成5μg/mL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，分别采用CID和EDT模式检测。

#### 1.3.3 质谱的图谱分析

根据在线监测的色谱和质谱图，选择多肽m/z 589.29<sup>2+</sup>和m/z 713.36<sup>2+</sup>及其糖基化质谱图，借助蛋白质组学数据库网站http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm进行分析，分别比较CID和EDT裂解模式对蛋白质糖基化位点的定位分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 糖基化肽的确定

LTQ Orbitrap XL ETD质谱是高分辨率、高精确度、ETD发射源的质谱设备<sup>[16]</sup>，其拥有ETD和CID等裂解模式，由于CID和ETD可以提供完全的糖基化多肽的结果信息，因此CID和ETD MS-MS的交替全质谱扫描可以全面的完成糖基化肽的分析<sup>[17-18]</sup>。

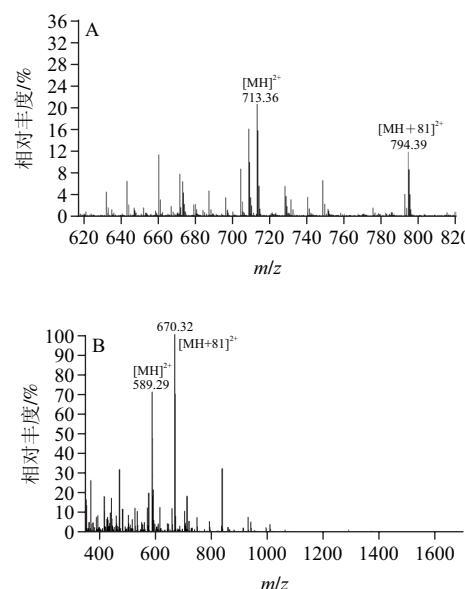


图1 m/z 713.36<sup>2+</sup>和m/z 589.29<sup>2+</sup>的肽段及其糖基化组装饰的LTQ MS 图谱

Fig.1 LTQ MS of m/z 589.29<sup>2+</sup> and m/z 713.36<sup>2+</sup> peptide and glycation peptide

如图1所示,为肽段 $m/z$  589.29<sup>2+</sup>和 $m/z$  713.36<sup>2+</sup>的MS质谱图,根据卵清蛋白序列,结合蛋白质组学数据库,可以断定其序列分别为<sup>60</sup>DKLPGFGDSIE<sup>70</sup>和<sup>363</sup>HPFLFCIKHIAT<sup>374</sup>,同时一级质谱中均出现了增加162u的新质谱峰 $m/z$  670.32<sup>2+</sup>和 $m/z$  794.39<sup>2+</sup>。由于Lys和Arg易发生N-糖基化修饰,Ser和Thr易发生O-端糖基化<sup>[19]</sup>。其中肽段 $m/z$  713.28<sup>2+</sup>中含有一个Lys,其糖基化位点可以初步确定即为卵清蛋白的第370个氨基酸(Lys);而肽段 $m/z$  794.29<sup>2+</sup>中存在一个Lys和一个Ser,因此新质谱峰可能是卵清蛋白第61个氨基酸(Lys)或者第68个氨基酸(Ser)发生糖基化修饰的糖基化多肽,一级质谱无法确认准确的糖基化位点,采用CID和ETD MS-MS交替裂解目标糖基化肽,以进一步对糖基化位点进行定位分析。

## 2.2 糖基化肽CID和EDT MS-MS分析

CID和ETD是两种不同且完全互补的碎片裂解技术,CID是二级质谱中的诱导碰撞裂解方式,通过与中性分子碰撞将能量传递给离子的过程,能量传递足以导致键的开裂和重排,肽裂解过程主要产生b和y类型的离子。ETD是电子转移裂解方式,是一种新的肽段裂解方式,其与CID基于碰撞能量再分配的基本机理完全不同,是利用一个电子转移到多肽离子上,电子与多肽的相互作用使肽键断裂,肽裂解过程主要产生c和z类型的离子,肽链主要裂解点及不同类型离子的生成(图2)。对于多肽上磷酸化、糖基化等修饰位点的定位,CID和ETD各具优势,CID质谱中极易发生修饰基团的丢失,而ETD则可以保留完整的修饰基团,在碎片离子上携带修饰基团,从而为修饰位点的鉴定提供了重要信息<sup>[20]</sup>,因此可以先利用CID判定修饰的存在,然后利用ETD鉴定修饰位点。

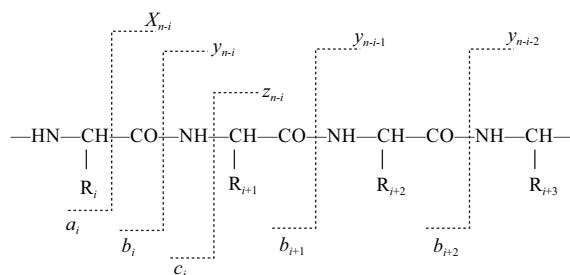


图2 肽链裂解点示意图

Fig.2 Cleavage sites of peptide bonds

实验分别采用CID和ETD交替对糖基化肽进行MS-MS分析,并对二者的测定结果进行比较,其中,由于高分子质量多肽的ETD质谱碎片较少,因此,分别选择 $m/z$  589<sup>2+</sup>、 $m/z$  670<sup>2+</sup>、 $m/z$  713<sup>2+</sup>、 $m/z$  795<sup>2+</sup>的糖基化多肽的CID和ETD质谱图进行比较分析。图3A和图4A分别为 $m/z$  670<sup>2+</sup>和 $m/z$  795<sup>2+</sup>的糖基化肽CID裂解碎片可以发现,在质谱图中出现大量的中性丢失(-18, -54, -84, -150, -162等),但是,在该质谱峰中也可以发现K发

生糖基化修饰的部分y族和b族离子峰,峰值一般较小,且整个质谱图杂峰较多,有用峰值较少,很难判定糖基化肽的位点,或者对糖基化肽进行序列确定,仅可以实现对糖基化肽的定性分析。

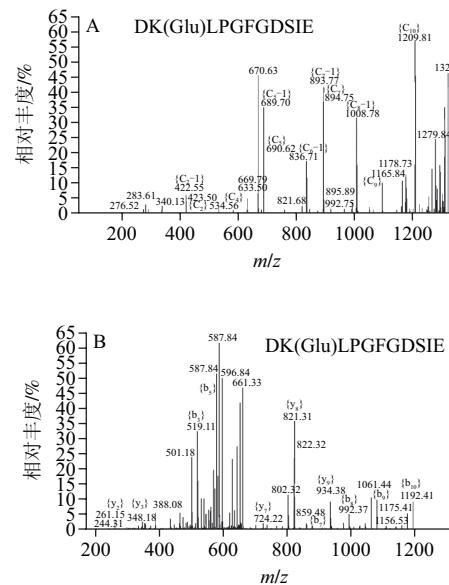


图3  $m/z$  670<sup>2+</sup>糖基化肽的ETD(A)和CID(B)裂解碎片

Fig.3 ETD (A) and CID (B) fractionation of  $m/z$  670<sup>2+</sup> glycation peptide

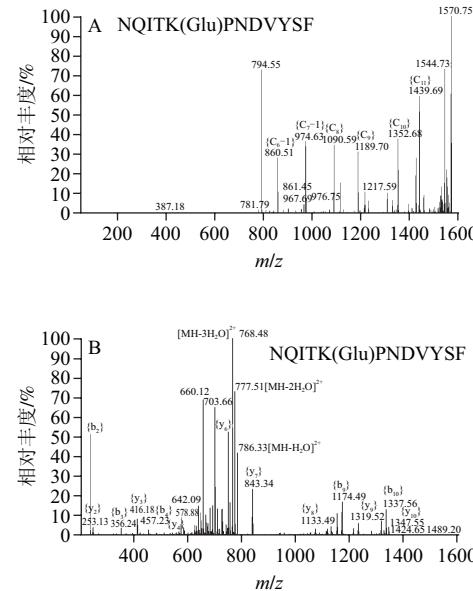


图4  $m/z$  795<sup>2+</sup>糖基化肽的ETD(A)和CID(B)裂解碎片

Fig.4 ETD (A) and CID (B) fractionation of  $m/z$  795<sup>2+</sup> glycation peptide

如图3A和图4A分别为 $m/z$  670<sup>2+</sup>和 $m/z$  795<sup>2+</sup>的糖基化肽ETD裂解碎片,由图中标注可以发现,质谱图的主要特征峰为K被糖基化修饰的c族离子峰,并且整个质谱图中杂峰较少,特征质谱图峰值较高,且比较独立,无其他峰值干扰,通过图4A、B的比较,可以说明,ETD是研

究糖基化多肽定性、糖基定位的较好办法。ETD的结果是有c族和z族离子组成，其片段类型比CID的更加清楚，且可以非常简单的对糖基化位点进行定位<sup>[21]</sup>。但是，通过ETD对酶解肽段进行LC-MS全程扫描发现，对糖基化修饰多肽而言，ETD比较适合于氨基酸序列长度为中等，带2个电荷的糖基化修饰肽段的裂解，对于较大分子质量的糖基化修饰肽的ETD裂解片段较少，判定方面存在一定的困难，但是CID-NL-MS<sup>3</sup>质谱技术及分析方法可以解决分子质量较大糖基化肽的糖基定位及定性分析。

### 3 结 论

3.1 LTQ MS的一级质谱可以对糖基化多肽进行初步识别和鉴定。

3.2 对糖基化修饰多肽而言，ETD比较适合于氨基酸序列长度为中等，带2个电荷的糖基化修饰肽段的裂解，对于较大分子质量的糖基化修饰肽的ETD裂解片段较少，判定方面存在一定的困难。

3.3 糖基化肽的CID裂解碎片中主要为离子峰，由于在裂解过程中极易发生中性丢失，因此其有效裂解碎片的峰值一般较小，且整个质谱图杂峰较多，有用峰值较少，对糖基化的定位分析存在一定难度。

### 参考文献：

- [1] CHEVALIER F, CHOBERT J M, POPINEAU Y, et al. Improvement of functional properties of  $\beta$ -lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar[J]. Int Dairy J, 2001, 11(1): 145-152.
- [2] HILLER B, LORENZEN C P. Properties of set-style skim milk yoghurt as affected by an enzymatic or Maillard reaction induced milk protein oligomerisation[J]. Food Sci Technol, 2011, 44(4): 811-819.
- [3] ZHANG Qibin, FROLOV A, TANG Ning, et al. Application of electron transfer dissociation mass spectrometry in analyses of non-enzymatically glycated peptides[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21: 661-666.
- [4] ZHANG Qibin, AMES J M, SMITH R D, et al. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of proteinglycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease[J]. Journal of Proteome Research 2009, 8: 754-769.
- [5] 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.
- [6] LAPOLLA A, FEDELE D, GARBEGLIO M, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, enzymatic digestion, and molecular modeling in the study of nonenzymatic glycation of IgG[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2000, 11(2): 153-159.
- [7] BROCK J W, HINTON D J, COTHAM W E, et al. Proteomic analysis of the site specificity of glycation and carboxymethylation of ribonuclease[J]. J Proteome Res, 2003, 2(5): 506-513.
- [8] CORZO-MARTÍNEZA M, LEBRÓN-AGUILAR B R, VILLAMIÉLA M, et al. Application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the characterization of galactosylated and tagatosylated  $\beta$ -lactoglobulin peptides derived from *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216: 7205-7212.
- [9] ZHANG Qibin, PETYUK V A, SCHEPMOES A A, et al. Analysis of non-enzymatically glycated peptides: neutral-loss-triggered MS<sup>3</sup> versus multi-stage activation tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22(19): 3027-3034.
- [10] THORNALLEY P J, BATTAH S, AHMED N, et al. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry[J]. Biochem J, 2003, 375(3): 581-592.
- [11] FROLOV A, HOFFMANN P, HOFFMANN R. Fragmentation behavior of glycated peptides derived from D-glucose, D-fructose and D-ribose in tandem mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2006, 41(11): 1459-1469.
- [12] 孙瑞祥, 董梦秋, 迟浩. 基于电子捕获裂解/电子转运裂解串联质谱技术的蛋白质组学研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(1): 94-102.
- [13] KIJEWSK M, KLUCZYK A, STEFANOWICZ P. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of complexes between peptide-derived Amadori products and borate ions[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2009, 23: 4038-4046.
- [14] SAIFUL M C, DU Xiuxia, TOLIC N. Identification of cross-linked peptides after click-based enrichment using sequential collision-induced dissociation and electron transfer dissociation tandem mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2009, 81: 5524-5532.
- [15] 涂宗财, 王辉, 刘光宪, 等. LCFT-ICRMS精确分析卵清蛋白在真空干燥过程中的糖基化修饰[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6): 90-92.
- [16] McALISTER G C, PHANSTIEL D, GOOD D M, et al. Implementation of electron-transfer dissociation on a hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometer[J]. Analytical chemistry, 2007, 79(10): 3525-3534.
- [17] SYKA J E P, COON J J, SCHROEDER M J, et al. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004, 101(26): 9528-9533.
- [18] ALLEY W R, MECHREF Y, NOVOTNY M V. Characterization of glycopeptides by combining collision-induced dissociation and electron-transfer dissociation mass spectrometry data[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009, 23(1): 161-170.
- [19] STEFANOWICZ P, KIJEWSKA M, KLUCZYK A, et al. Detection of glycation sites in proteins by high-resolution mass spectrometry combined with isotopic labeling[J]. Analytical Biochemistry, 2010, 400(2): 237-243.
- [20] FEDOROVA M, FROLOV A, HOFFMANN R. Fragmentation behavior of Amadori-peptides obtained by non-enzymatic glycosylation of 1 lysine residues with ADP-ribose in tandem mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2010, 45: 664-669.
- [21] STEFANOWICZ P, KIJEWSKA M, SZEWCZUK Z. Sequencing of peptide-derived Amadori products by the electron capture dissociation method[J]. J Mass Spectrom, 2009, 44: 1047-1052.