

# 利用CID MS<sup>3</sup>质谱的中性丢失分析 多肽糖基化位点

王 辉<sup>1</sup>, 涂宗财<sup>1,2,\*</sup>, 刘光宪<sup>3</sup>, 沙小梅<sup>1</sup>, 肖 辉<sup>4</sup>

(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. 江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022;  
3. 江西省农业科学院, 江西 南昌 330200; 4. 叶史瓦大学美国爱因斯坦医学院, 纽约 10461, 美国)

**摘要:** 蛋白质糖基化修饰位点的定位分析在糖基化蛋白质研究领域至关重要, 本实验建立CID中性丢失引发的多级质谱对多肽糖基化位点分析的方法。以糖基化多肽为研究对象, 采用ESI CID MS对Amadori糖基化多肽进行CID多级激发裂解, MS<sup>3</sup>裂解分别可以由3H<sub>2</sub>O、3H<sub>2</sub>O+HCHO的中性丢失引发, 根据糖基化肽段的分析鉴定, 均可完成对糖基化修饰位点的定位分析, 但是在多级质谱分析中, 3H<sub>2</sub>O中性丢失引发的糖基化肽段的鉴定更加精确, 且在干热条件下, 卵清蛋白中的K227相对K229更易发生糖基化修饰。综上分析, 通过CID MS<sup>3</sup>多步激发质谱技术可以对一糖多肽进行糖基化定位分析。

**关键词:** 糖基化肽; 中性丢失; CID; 多级质谱

## Analysis of Glycated Peptides by Neutral-loss-triggered CID MS<sup>3</sup> Spectrometry

WANG Hui<sup>1</sup>, TU Zong-cai<sup>1,2,\*</sup>, LIU Guang-xian<sup>3</sup>, SHA Xiao-mei<sup>1</sup>, XIAO Hui<sup>4</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;  
2. College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China; 3. Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China; 4. Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, New York 10461, USA)

**Abstract:** Identification of the glycated sites in proteins plays an important role in the field of protein glycation. In the present study, we have established a CID neutral-loss-triggered MS<sup>3</sup> method to analyze the glycated sites in proteins. ESI-CID-MS was used to stimulate multi-site cleavage in glycated Amadori peptides. MS<sup>3</sup> scans triggered by neutral losses of 3H<sub>2</sub>O and 3H<sub>2</sub>O+HCHO produced similar results in terms of glycated peptide identification. However, neutral loss of 3H<sub>2</sub>O resulted in more accurate glycated peptide identification in multi-stage activation experiments. The results showed that the K227 was more easily glycated by D-glucose when compared with the K229 in ovalbumin under dry heating conditions. Overall, the multi-stage activation approach could identify the glycation site in peptides with one glycosylation site.

**Key words:** glycated peptide; neutral-loss; collision-induced dissociation (CID); multi-stage MS

中图分类号: TQ936.16

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0047-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323011

基于Maillard反应初级阶段的蛋白质糖基化修饰常被用于食品蛋白质的糖基化改性<sup>[1-2]</sup>。Maillard反应是食品领域比较常见的化学反应, 由该反应引起的糖基化蛋白质比其他化学修饰得到的蛋白质更安全<sup>[3]</sup>, 且糖基化蛋白质的乳化性、凝胶性较好<sup>[4-7]</sup>, 具有改变食品芳香性、表面活性和组织结构等功效<sup>[8-9]</sup>, 另外, 很多研究表明, Maillard反应产物具有抗氧化<sup>[10-11]</sup>、抗菌<sup>[12-13]</sup>、抗高血压<sup>[14]</sup>、抗癌和抗诱变<sup>[15]</sup>等生理活性。

蛋白质糖基化修饰位点定位为正确理解蛋白质功

能性质、抗氧化活性及营养特性变化机制提供了理论基础。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162u的偏移, 通过观察质谱峰的偏移量是否为162u的倍数就可以对糖基化多肽或蛋白质进行确认<sup>[16-20]</sup>。但是, 一级质谱只能确定多肽是否被糖基化修饰, 采用CID-MS/MS质谱可以对小分子质量的糖基化多肽位点分析, 但是, 在CID裂解过程中, 多肽修饰糖基上产生的多项中性丢失(如H<sub>2</sub>O、2H<sub>2</sub>O、3H<sub>2</sub>O、4H<sub>2</sub>O、

收稿日期: 2013-04-09

基金项目: 国家“973”计划前期研究专项(2012CB126314)

作者简介: 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: wanghui00072@aliyun.com

\*通信作者: 涂宗财(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为极端条件下食品蛋白质营养与安全。E-mail: tuzc\_mail@aliyun.com

$3\text{H}_2\text{O} + \text{HCHO}$  和  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$  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>[21]</sup>。主要是由于在 CID-MS/MS 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, 多肽侧链修饰基团上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  $3\text{H}_2\text{O} + \text{HCHO}$  的形成可以为糖基化肽段中位点的确定提供帮助, 即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>[22-23]</sup>。一般来说, 在 CID 的裂解过程中, 修饰糖基上会丢失  $[3\text{H}_2\text{O}]$ (中性丢失 54u),  $[3\text{H}_2\text{O} + \text{HCHO}]$ (中性丢失 84u), 和丢失  $[3\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{C}_5\text{O}_2]$ (中性丢失 150u), 见图 1。对于单纯的糖基化多肽而言, 通过中性丢失在多肽进行糖基化定位研究方面存在一定的优势, 但是对于在加热条件下产生的糖基化蛋白质来说, 需要采用蛋白酶进行适当的酶解后再通过在线质谱检测, 才可能较好地分析糖基化修饰位点, 本实验利用非特异性胃蛋白酶对糖基化卵清蛋白进行酶解, 使其蛋白质覆盖率比胰蛋白酶等其他特异性酶高出 20% 以上, 采用中性丢失的多级质谱技术对酶解后的糖基化肽  $m/z 921^{3+}$  序列为: FRVASMASEKMKILELPFASGTMSM 进行定位和分析, 从而在精确分子水平上对肽段上的易感位点进行研究。

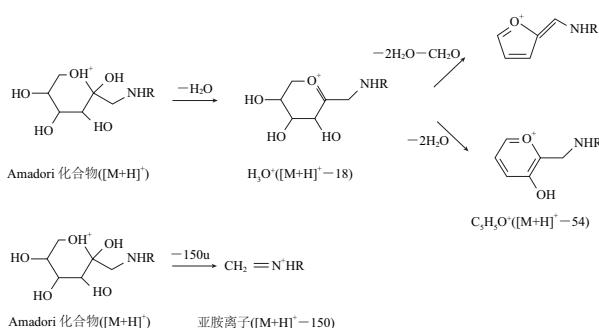


图 1 糖基化修饰在 CID MS/MS 质谱检测过程中的中性丢失

Fig.1 Neutral loss of glycation modification in CID-MS/MS analysis

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

糖基化多肽, 糖基化卵清蛋白经胃蛋白酶酶解所得, 为卵清蛋白上的 AA<sub>218</sub>~AA<sub>242</sub>, 其序列为: FRVASMASEKMKILELPFASGTMSM。

卵清蛋白 IV、D-葡萄糖、胃蛋白酶 美国 Sigma 公司; 乙腈、甲酸(色谱纯) 美国 Fisher 公司; 其他试剂为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

配两个 LC-10AD 泵的液相色谱仪 日本岛津公司; LTQ-ESI CID MS 美国 Thermo Scientific 公司; C<sub>3</sub> 柱子 (1.0 mm × 50 mm) 美国 Micro-Tech Scientific 公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 糖基化多肽的制备及分离

将卵清蛋白和葡萄糖按质量比 1:1 溶于 Tris 缓冲液 (pH7.8) 中, 取 100 μL 混合液移至 0.5 mL 的离心管中, 冷冻干燥。干燥样品置 80°C 条件下加热 30 min, 加入 200 μL 超纯水于干热后的糖基化样品管中, 使完全溶解, 采用 5000 u 分子质量滤膜除去多余葡萄糖。

糖基化卵清蛋白经二硫苏糖醇(DTT)还原后, 移取 0.5 μL 样品溶液于 20 μL、pH2.2 的盐酸溶液中, 添加 5 μL 1% 的胃蛋白酶溶液, 在 0°C 条件下酶解 10 min, 移取 20 μL 酶解液上样, 采用 LC FT-ICR MS 检测和分离, 得到肽段  $m/z 921^{3+}$  及其糖基化多肽。

### 1.3.2 LC FT-ICR MS 检测分析

采用双泵微米级液相进行梯度洗脱, 流动相 A: 5% 乙腈水溶液、0.1% 甲酸水溶液; 流动相 B: 95% 乙腈溶液。洗脱梯度为: 0~5 min, 98% A, 2% B; 6 min, 85% A, 15% B; 15 min, 70% A, 30% B; 16 min, 50% A, 50% B; 17~22 min, 5% A, 95% B; 23 min, 95% A, 5% B; 28 min, STOP。流速为 0.05 mL/min, 进样量 20 μL, 液相设备与 FT-ICR MS 设备直接相连, 在 6 min 时采集图谱, 采集时间为 15 min<sup>[24]</sup>。选取目标肽段, 并进行相对糖基化程度计算和收集。参照 Kislinger 等<sup>[25]</sup>的方法, 进行适当修改, 用下式计算。

$$\text{肽段的相对糖基化程度\%} = \frac{\text{糖基化肽离子峰丰度之和} \times \text{相应的糖基组数量}}{\text{非糖基化肽和糖基化肽离子峰丰度之和}} \times 100$$

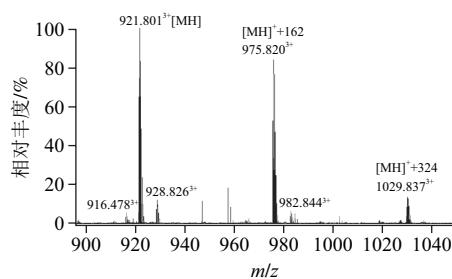
### 1.3.3 LTQ-CID MS<sup>3</sup> 检测分析

采用 LTQ-CID MS<sup>3</sup> 对目标肽段进行多级质谱检测。借助哥伦比亚大学的蛋白质分析工具网站 <http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm> 进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 FT-ICR MS 对糖基化肽的检测分析

通过 LC FT-ICR MS 对糖基化卵清蛋白的胃蛋白酶酶解也进行分离纯化, 在保留时间 9 min 左右出现多肽  $m/z 921^{3+}$  (FRVASMASEKMKILELPFASGTMSM) 的洗脱峰, 质谱图如图 2 所示, 多肽  $m/z 921^{3+}$  的质谱峰非常明显, 同时出现了分别增加 162u 和 324u 的新的质谱峰  $m/z 975^{3+}$  和  $m/z 1029^{3+}$ , 因此可以初步判断, 该部分肽段在加热 30 min 条件下, 发生了部分糖基化, 分别存在一糖肽、二糖肽两个主要糖基化片段, 根据糖基化肽段的离子峰丰度, 利用 1.3.2 节计算肽段的糖基化程度为 28%。由于该肽段中含有易发生 N- 糖基化的氨基酸: 两个 LYS 和一个 ARG, 同时还存在易发生 O- 端糖基化的 SER 和 THR, 而质谱分析得出, 经过糖基化修饰后, 分别被一个和两个糖基修饰, 可能在该条件下存在糖基化敏感和非敏感位点, 对糖基化修饰位点的定位分析至关重要。

图2  $m/z$  921<sup>3+</sup>的肽段及其糖基化多肽的FT-ICR MS图谱Fig.2 FT-ICR MS spectrum of  $m/z$  921<sup>3+</sup> peptide and glycated peptide

## 2.2 糖基化肽中性丢失162u的ESI-CID MS<sup>3</sup>分析

采用中性丢失CID MS<sup>2</sup>进行糖基化肽裂解，选择理想的中性丢失离子—162u ( $C_6H_{10}O_5$ )，—84u( $3H_2O + HCHO$ )，—54u( $-H_2O$ )分别进行CID MS<sup>3</sup>检测，通过数据库工具和多肽序列的综合分析和计算，可以确定糖基化修饰位点。本实验采用LTQ-MS/MS技术对各肽段进行裂解，得到 $m/z$  921<sup>3+</sup>肽段的CID MS/MS裂解碎片，首先采用ESI-CID MS/MS对 $m/z$  921<sup>3+</sup>的序列进行确认(质谱图3A)，其CID裂解碎片质谱图上可以与网站数据库上得到的裂解片段基本完全吻合，因此可以断定 $m/z$  921<sup>3+</sup>的蛋白序列为FRVASMASEKMKILELPFASGTMSM。

通过图2可以确定， $m/z$  975<sup>3+</sup>和 $m/z$  1029<sup>3+</sup>比 $m/z$  921<sup>3+</sup>增加了162.05u和324.1u，根据计算可以确定这两个质谱峰为 $m/z$  921<sup>3+</sup>的一糖多肽和二糖多肽，但是为了进一步确定是否为 $m/z$  921<sup>3+</sup>的糖基化肽，需要MS<sup>3</sup>的质谱分析，如图3B所示。

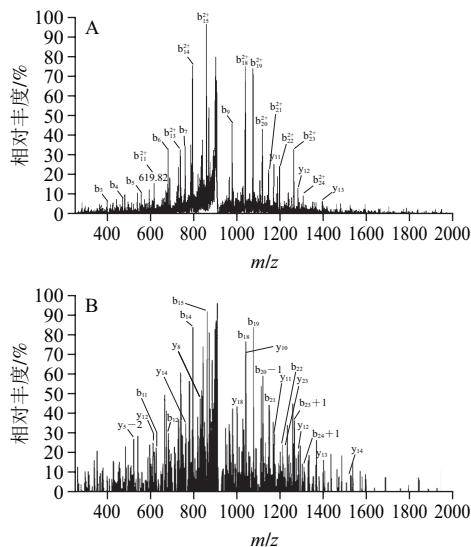
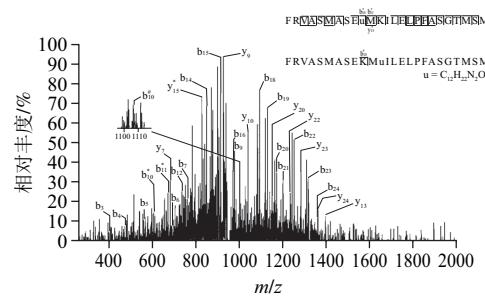
图3  $m/z$  921<sup>3+</sup>的CID MS<sup>2</sup>裂解片段(A)和 $m/z$  975<sup>3+</sup>中性丢失162u离子峰 $m/z$  921<sup>3+</sup>的CID MS<sup>3</sup>裂解片段(B)Fig.3 CID MS<sup>2</sup> spectrum of  $m/z$  921<sup>3+</sup> (A) and CID MS<sup>3</sup> spectrum of  $m/z$  975<sup>3+</sup> (B) with neutral loss 162 u

图3是 $m/z$  975<sup>3+</sup>中性丢失162u的离子峰 $m/z$  921<sup>3+</sup>的CID MS<sup>3</sup>裂解片段，可以看出， $m/z$  921<sup>3+</sup>的三级质谱离子峰碎

片与 $m/z$  921<sup>3+</sup>的CID MS<sup>2</sup>相同，图3A质谱图清晰明了，母离子的裂解片段基本上都可以找到，图3B为糖基化肽在MS-MS过程中中性丢失峰921<sup>3+</sup>的裂解片段，可以看出，其裂解片段可以在图谱中找到大部分，但是，图谱非常复杂，杂峰很多，如果用此质谱图来分析蛋白质氨基酸序列非常困难，但是通过图3B的分析，可以确定 $m/z$  975<sup>3+</sup>为 $m/z$  921<sup>3+</sup>糖基化修饰的质谱峰。由于该序列中含有两个K和1个R，因此，为了对该序列中的糖基化位点进行确定，本研究通过对糖基化肽CID MS<sup>2</sup>中性丢失(54u和84u)片段的MS<sup>3</sup>检测，利用蛋白质组学数据库网站和质谱数据的人工分析，可以对糖基化肽修饰位点进行确定。

## 2.3 糖基化肽中性丢失54u的ESI-CID MS<sup>3</sup>分析



较为清晰，在质谱图中将找到的主要片段已经标出，其中，K227被糖基化修饰的特征峰为 $b_{10}^{2+}$ (593)、 $b_{11}^{2+}$ (658)、 $y_{15}^{2+}$ (828)非常明显，但是，K229被糖基化修饰的特征峰仅 $b_{10}^{+}$ (1107)，且峰值较小，信号较弱，综上分析，在该条件下，卵清蛋白中的K227相对K229更易发生糖基化修饰。

### 3 结 论

FT-ICR MS可以很好地对糖基化多肽进行识别和定量分析；对于 $m/z$ 975<sup>3+</sup>的两个中性丢失( $-54u$ 和 $-84u$ )质谱峰的分析可以发现，两种分析结果得到相同的糖基化修饰位点的结论，即卵清蛋白中的K227相对K229更易发生糖基化修饰；CID MS<sup>3</sup>可以对一糖多肽进行糖基化定位分析，但是二糖多肽很难进行定位分析，可能使用ETD MS等技术可以实现。

### 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]. International Dairy Journal, 2001, 11(1): 145-152.
- [2] HATTORI M, MIYAKAWA S, OHAMA Y, et al. Reduced immunogenicity of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(14): 4546-4553.
- [3] PAN G G, MELTON L D. Nonenzymatic browning of lactose and caseinate during dry heating at different relative humidities[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(24): 10036-10042.
- [4] ACHOURI A, BOYE J I, YAYLAYAN V A. Functional properties of glycated soy 11S glycinin[J]. Journal of Food Science, 2005, 70(4): 269-274.
- [5] 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]. Journal of Food Science and Technology, 2011, 44(4): 811-819.
- [6] HUANG Xiaoqin, TU Zongcai, XIAO Hui, et al. Characteristics and antioxidant activities of ovalbumin glycated with different saccharides under heat moisture treatment[J]. Food Research International, 2012, 48(2): 866-872.
- [7] TU Zongcai, HU Yueming, WANG Hui, et al. Microwave heating enhances antioxidant and emulsifying activities of ovalbumin glycated with glucose in solid-state[J]. Journal of Food Science and Technological, DOI 10.1007/s13197-013-1120-x.
- [8] HONDA A, HURODA N. Functional improvement in dried egg white through the Maillard reaction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(5): 1845-1850.
- [9] NAKAMURA S, KATO A, KOBAYASHI K. Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(11): 735-739.
- [10] RUFIAN-HENARES J A, MORALES F J. Effect of *in vitro* enzymatic digestion on antioxidant activity of coffee melanoidins and fractions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(24): 10016-10021.
- [11] SUN Y, HAYAKAWA S, IZUMORI K. Antioxidative activity and gelling rheological properties of dried egg white glycated with a rare ketohexose through the Maillard reaction[J]. Journal of Food Science, 2004, 69(6): 427-434.
- [12] RUFIAN-HENARES J A, MORALES F J. A new application of a commercial microtiter plate-based assay for assessing the antimicrobial activity of Maillard reaction products[J]. Food Research International, 2006, 39(1): 33-39.
- [13] RUFIAN-HENARES J A, MORALES F J. Antimicrobial activity of melanoidins against *Escherichia coli* is mediated by a membrane damage mechanism[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(7): 2357-2362.
- [14] RUFIAN-HENARES J A, MORALES F J. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of coffee melanoidins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(4): 1480-1485.
- [15] YEN G C, TSAI L C. Antimutagenicity of partially fractionated Maillard reaction product[J]. Food Chemistry, 1993, 47: 11-15.
- [16] LAPOLLA A, FEDELE D, GARBEGLIO M. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, enzymatic digestion, and molecular modeling in the study of nonenzymatic glycation of IgG[J]. Journal of American Society for Mass Spectrometry, 2000, 11(2): 153-159.
- [17] BROCK J W, HINTON D J, COTHAM W E. Proteomic analysis of the site specificity of glycation and carboxymethylation of ribonuclease[J]. Journal of Proteome Research, 2003, 2(5): 506-513.
- [18] HUANG Xiaoqin, TU Zongcai, WANG Hui, et al. Increase of ovalbumin glycation by the Maillard reaction after disruption of the disulfide bridge evaluated by liquid chromatography and high resolution mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(9): 2253-2262.
- [19] WANG Hui, TU Zongcai, LIU Guangxian, et al. Comparison of glycation in conventionally and microwave-heated ovalbumin by high resolution mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 985-991.
- [20] 王辉, 涂宗财, 刘光宪. 传导加热和微波加热对卵清蛋白糖基化产物一级结构的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(9): 86-89.
- [21] ZHANG Q, FROLOV A, TANG N. Application of electron transfer dissociation mass spectrometry in analyses of non-enzymatically glycated peptides[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007, 21(5): 661-666.
- [22] CORZO-MARTÍNEZ M, LEBRÓN-AGUILAR R, VILLAMIL M. 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.
- [23] ZHANG Qibin, PETYUK V A, SCHEPMOES A A. Analysis of non-enzymatically glycated peptides: neutral-lsostriggered MS<sup>3</sup> versus multi-stage activation tandem mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008, 22(19): 3027-3034.
- [24] 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(49): 11664-11677.
- [25] KISLINGER T, HUMENY A, PEICH C C, et al. Relative quantification of  $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl) lysine, imidazolone A, and the Amadori product in glycated lysozyme by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(1): 51-57.