

# 蛋白质辅助基质提高激光解吸/电离多肽离子化率和绝对强度的研究

卓慧钦<sup>1,2</sup>, 黄河清<sup>1,2</sup>, 翁露娜<sup>1,2</sup>, 黄慧英<sup>1,2</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院细胞生物学肿瘤细胞工程教育部重点实验室,

2. 化学化工学院固体表面物理化学国家重点实验室, 厦门 361005)

**摘要** 人血清转铁蛋白 (Human serum transferrin, HTF)、牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA)、鲨鱼肝铁蛋白 (*Sphyrna zygaena* liver ferritin, SZLF)、马脾铁蛋白 (Horse spleen ferritin, HSF) 均能辅助基质提高激光解吸/电离胰岛素 (Insulin, INS) 和海兔酸性多肽 (*Aplysia* acidic peptide, AP) 离子化率和质谱峰的绝对强度 (简称为绝对强度), 其中绝对强度分别提高 10 和 4 倍, 这一现象不依赖于 INS 浓度, 而与蛋白质类型和结构有关. SZLF 和脱铁核 SZLF (apoSZLF) 辅助基质提高 INS 绝对强度的能力几乎相同, 蛋白质中的金属离子含量对这种效应无明显影响, 主要取决于蛋白质的氨基酸组成与结构. 采用胶内酶解和肽指纹技术 (PMF) 鉴定 HTF 过程中, 发现基质中分别添加 SZLF, apoSZLF 和 HSF 后, HTF 肽片段质谱检测的质谱峰数目及绝对强度均有明显增加, 进一步提高了数据库鉴定 HTF 的可信度.

**关键词** MALDI-TOF MS; 多肽; 绝对强度; 辅助基质; 肽指纹图谱

中图分类号 O629.72.Q51

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)05-0889-05

电喷雾电离质谱和基质辅助激光解吸/电离 (MALDI) 质谱是目前用于分析生物大分子过程中最常用的软电离技术, 主要用于分析非挥发性、热不稳定性且相对分子质量较大的生物大分子, 并迅速成为研究生物大分子的组成、结构与功能的关键性分析技术之一<sup>[1,2]</sup>. MALDI MS 分析生物大分子中的一个关键因素是选择合适的基质. 基质主要作用是将来自于 MALDI MS 的脉冲激光能量瞬时传递给待测生物大分子形成分子离子或准分子离子, 并供质谱分析. 目前高效基质的种类很少, 常用于分析多肽和蛋白质的酸性基质有 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB)、芥子酸 (SA)、肉桂酸衍生物 (CHCA) 等, 有关碱性基质的研究也有报道<sup>[3]</sup>, 例如 2-氨基-5-硝基噻唑等. 目前, 已对数百种有机化合物进行基质功能的筛选, 但只有少数化合物适合作为基质, 从而限制了通过选择不同基质的途径达到提高生物大分子离子化率和绝对强度的效果. 尽管如此, 筛选或选择具有耐高盐浓度和高电离率特性的基质一直是提高 MALDI MS 检测多肽、蛋白质信噪比和质谱峰绝对强度的有效方法之一<sup>[4-6]</sup>.

在改善检测多肽与蛋白质分辨率和获得较高灵敏度等的诸多方法中, 去除高丰度蛋白质、降低盐浓度干扰、选择最佳基质及实行表面增强等技术是目前 MALDI MS 的常用方法<sup>[6-8]</sup>. 在扩大检测范围方面, 适当添加果糖、葡萄糖、海藻糖等有机糖能达到提高信噪比的效果, 并扩大基质 DHB 检测多肽与蛋白质的范围<sup>[9]</sup>; 选用聚四氟乙烯作为支撑物, 同样也可以提高  $\alpha$ -氰-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 和 SA 检测蛋白质的范围<sup>[10]</sup>. 目前, 改善 MALDI MS 技术分析混合多肽和蛋白质分辨率、提高灵敏度或信噪比仍然是生物质谱研究领域中的热点课题之一<sup>[8,9]</sup>.

本文选用人血清转铁蛋白、牛血清白蛋白、鲨鱼肝铁蛋白辅助基质提高激光解吸/电离多肽离子化率和绝对强度, 增强 MALDI MS 检测多肽灵敏度和 PMF 技术鉴定蛋白质的可信度, 这一研究具有重要意义和科学价值.

收稿日期: 2006-04-24

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 40276033, 30470372) 和福建省自然科学基金 (批准号: C031006) 资助.

联系人简介: 黄河清 (1956 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 从事蛋白质结构与功能研究. E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Reflex 型 MALDI-TOF 质谱仪 (德国 Bruker 公司); SPECTRA MAX M2 多功能酶标仪; OLYMPUS 荧光显微镜.

人血清转铁蛋白 (HTF)、人胰岛素 (INS) 和马脾铁蛋白 (HSF) 购于 Sigma 公司; 质谱纯的鲨鱼肝铁蛋白 (SZLF) 由本实验室自行制备; 海兔酸性多肽 (*Aplysia* acidic peptide, AP) 由美国伊利诺依大学生物技术中心合成;  $\alpha$ -氰-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 购自于美国 ICN 生物医学公司; 三氟乙酸、乙腈 (纯度为 99%)、连二亚硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) 等其它试剂均为国产分析纯.

### 1.2 实验方法

1.2.1 基质和样品配制 CHCA 饱和溶液 将 CHCA 溶于质量分数为 0.1% 的三氟乙酸和乙腈的混合溶液 (体积比 1:1) 至过饱和, 经过超声和离心处理各 5 min, 收集上清液. 用 pH = 6.5 的二次蒸馏水配制 10  $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$  胰岛素 (分子量 5773.5) 母液, 使用前按 10, 15, 20, 25, 30, 35 倍稀释; 将粉状的 AP (分子量 2961.8) 配成浓度为 1000  $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$  的溶液, 使用前经 26, 30, 34, 38, 42, 46, 58, 60 倍稀释. HTF (1 mg/mL), BSA (1 mg/mL), HSF (77 mg/mL), SZLF (77 mg/mL), apoSZLF (77 mg/mL) 均用二次蒸馏水配制, PEG 20000 (77 mg/mL) 用乙腈配制. 脱铁核铁蛋白 (apoSZLF) 参照文献 [11] 方法制备, 铁释放结束后, 选用截留分子量为 100000 的超滤管反复超滤混合液, 得到去铁铁蛋白.

基质 1 由 CHCA 饱和溶液与二次蒸馏水按 5:1 体积比混匀. 基质 2 由 CHCA 饱和溶液分别与各种按上述浓度配制的添加蛋白溶液 (HTF, BSA, SZLF, apoSZLF), 按 5:1 体积比混匀. 结晶形态在 OLYMPUS 荧光显微镜下观察.

1.2.2 多肽质谱分析 将待测样品和基质 1 或 2 以 1:1 体积比混匀后, 取 0.8  $\mu\text{L}$  混合物直接点滴于样品靶上, 待样品于室温干燥后, 把样品靶放入质谱仪上检测. 选用配置脉冲氮激光 (337 nm) 离子源的 Reflex 型 MALDI-TOF 质谱仪, 线性模式, 加速电压控制在 20 kV, 脉冲宽度 2 ns, 离子延迟时间 20000 ns, 真空度  $5.33 \times 10^{-5}$  Pa, 正离子谱测定, 每个样品随机选择 30 个不同的点 (如果待测样品有质谱峰, 则累积有检测信号的 30 个点, 质谱信号单次扫描累加 10 次), 平均激光脉冲次数在 120 次, 相对激光强度为 50%, 采用外标法标定多肽质谱峰峰位. 分别用相对激光强度为 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40% 的样品进行结晶状况分析.

1.2.3 胶内酶解后的肽片段的质谱分析 通过预实验, 选择胶内酶解结果较稳定的转铁蛋白进行酶解及质谱分析. 采用常规方法进行 SDS-PAGE 分析, 转铁蛋白上样量为 100, 50, 20, 10  $\mu\text{g}$ . 每个样品重复操作 2 次. 银染后, 切下条带进行胶内酶解<sup>[12]</sup>, 收集转铁蛋白肽片段. 同样选择基质 1 和分别含有添加蛋白 SZLF, HSF, apoSZLF 的基质 2 与肽片段提取液混合, 得到共结晶. 采用高分辨率反射模式, 脉冲宽度 0.5 ns, 其它参数设置同线性模式, 数据库在 MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) 检索网站检索, 检索参数: 最大允许肽质量误差 0.5, 允许有 1 个不完全裂解位点, 需要考虑羟甲基 (Hydroxymethyl) 和氧化 (Oxidation) 修饰<sup>[13]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 蛋白质辅助基质提高多肽质谱峰的绝对强度

将 HTF, BSA, SZLF 和 apoSZLF 蛋白溶液分别与 INS (10  $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ) 混匀, 不加入 CHCA 等现有基质的质谱分析发现, 在不同激光强度下, 未检测到 INS 的质谱信号, 所以这些蛋白本身并不具备作为基质的条件, 但可作为 CHCA 辅助剂发挥作用. 图 1 谱线 a 是 INS (0.667  $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ) 质谱图, INS 质荷比 ( $m/z$ ) 为 5773.5, 绝对强度约为 1370. 在相同 INS 浓度条件下, 在基质按 5:1 体积比添加 SZLF 后, INS 的绝对强度提高到  $1.6019 \times 10^4$  (图 1 谱线 b), 比未添加 SZLF 的 INS 的绝对强度高 10 倍左右. 进一步的实验结果表明, 当 INS 母液依次经 10, 15, 20, 25, 30, 35 倍稀释后, 添加 SZLF 组中系列浓度的 INS 绝对强度较加入同体积二次蒸馏水的对照组均有明显提高, 推测这一现象与 INS 样品的浓度无

关, 可能与添加 SZLF 的特殊组成与结构有关. 当 NS 浓度低于  $0.286 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$  时, 在相同条件下 MALD-MS 几乎无法检测到 NS 的质谱峰; 但添加 SZLF 的组中, NS 的绝对强度达到 9629.0 左右, SZLF 不仅可以提高 NS 的绝对强度, 同时还提高 NS 的灵敏度和信噪比, 适合于采用 MALD-MS 技术检测  $10^{-12}$  数量级或更低浓度的 NS 样品.

为了证实上述论点, 选择大分子蛋白质 BSA, HTF, apoSZLF 和 SZLF 作为基质辅助剂, 进一步证实蛋白质能够用于提高 NS 的绝对强度和检测灵敏度. 图 2(A) 表明, 将 NS 浓度控制在  $0.286 \sim 1.0 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$  范围内, NS 离子化率和绝对强度都很低; 随着 NS 浓度的递增, INS 绝对强度亦递增, 但速率仍然呈平缓趋势. 当分别添加 HTF, BSA, SZLF 和 apoSZLF 后, NS 的绝对强度均明显提高, 其中 HTF 提高 NS 绝对强度的效果最为显著. 这一现象说明, 这些蛋白质具有明显改善 NS 离子化率和提高 NS 绝对强度的能力. 在几种蛋白中 HTF 和 SZLF 均属于金属蛋白质类, 为了进一步了解蛋白质中的金属离子是否参与激光能量的接受和传递, 分别研究 SZLF 和 apoSZLF 对基质的辅助作用. 图 2(B) 为不同 NS 浓度下, NS + ddw, NS + SZLF 和 NS + apoSZLF 3 组之间的对比, 可以看出, SZLF 和 apoSZLF 均能提高 NS 的离子化率和绝对强度, 两者增加的幅度和趋势较为相似. SZLF 分子结构由铁核和蛋白壳构成, 位于蛋白壳中心的铁核由数千个铁离子和数百个磷酸盐分子组成, 铁蛋白和脱铁核铁蛋白电泳迁移率均相同, 与铁蛋白是否存在铁核组成无关<sup>[14]</sup>. 实验结果已表明, 铁蛋白中铁核存在与否对 NS 绝对强度的提高并无明显影响 [图 2(B)], 即铁蛋白铁核中的铁离子和无机磷酸盐组分与改善 NS 离子化率无关, 可能与蛋白质特殊亚基组成和结构有关. 由此看来, 多肽绝对强度提高的起因与铁蛋白壳外表层氨基酸残基辅助基质吸收激光能量, 并迅速传递给 NS 形成分子离子的能力有联系.

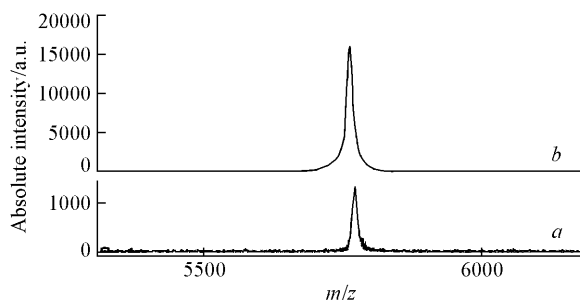


Fig 1 Comparison absolute intensity of NS (a) in the presence of SZLF (b)

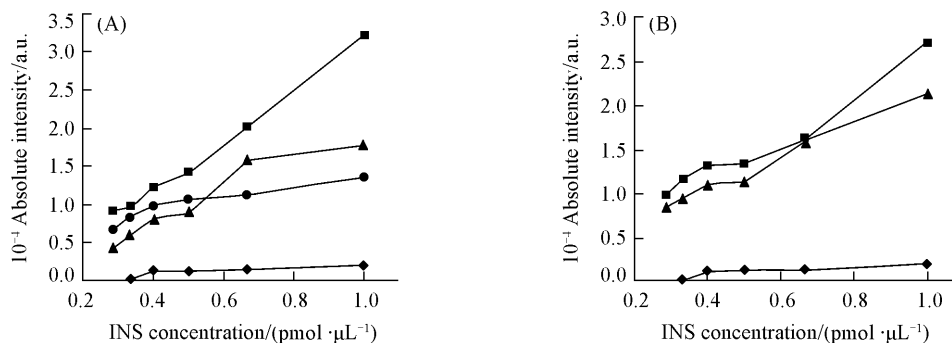


Fig 2 Plot of absolute intensity vs NS concentration in the presence of protein intensifiers

(A) ◆: — NS + H<sub>2</sub>O; ●: — NS + PEG; ■: — NS + HTE; ▲: — NS + BSA  
(B) ◆: — NS + H<sub>2</sub>O; ■: — NS + SZLF; ▲: — NS + apoSZLF

当使用聚合物 PEG 20000 作为添加物与蛋白添加剂进行对照时, 发现 PEG 20000 提高 NS 质谱峰绝对强度与 NS 浓度递增并无明显相关, 即在不同 NS 浓度下, 其绝对强度均保持在一个相似的强度, NS + PEG 组的曲线变化趋于平缓. 由于 PEG 的强吸水性, 使 PEG、基质和样品混合物在靶上的晶体较厚且集中, 一定程度上提高了 NS 的相对浓度, 有利于质谱检测信号的增强, 但这种浓缩作用对 NS 各个浓度的影响效果相近, 因此 NS 绝对强度的增强曲线趋于平缓, 同时也说明晶体结构的改善可能有助于提高 NS 的绝对强度. 然而, PEG 作为添加剂时, PEG 本身的结晶及质谱检测峰会干扰 NS 的检测, 且 NS 在结晶中分布不均匀, 因而 PEG 与其它蛋白添加剂对比, 并不适合作为 NS 增强剂.

## 2.2 INS 基质和蛋白质混合物晶体

CHCA 已被广泛地用作质谱分析的基质, 是因其内部含有  $\pi$  体系, 可吸收激光能量形成分子离子. 而基质形成结晶是链内、链间氢键等的作用下, 构成有规则的晶体结构, 有利于吸收激光能量和

传递给多肽与蛋白质形成分子离子,供 MALDI-MS 检测<sup>[15]</sup>。图 3 是基质、蛋白质和 NS 混合晶体图。从图 3(A)~(D) 可看出, CHCA 分别与 BSA, HSF 和 HTF 形成不同的晶体结构; CHCA、不同蛋白质和 NS 混合后的晶体 [图 3(E)~(H)] 均与图 3(A) 明显不同, 基质晶体形状更不规则, 晶体表面积增大。在图 3(H) 中, 成片紧密相连的晶体薄层提高了能量接受和传递效率, 最终达到提高 INS 绝对强度和灵敏度的效果。通过一系列激光强度的比对, 发现图 3(E)~(H) 形成的致密、均匀的结晶均可接受更高强度的激光, 并提高多肽样品检测的灵敏度。因此提高 INS 离子信号强度的基本要素之一在于基质、NS 和蛋白质均要形成均匀的共晶体, 使蛋白质更有效地辅助基质接受和传递能量给 NS

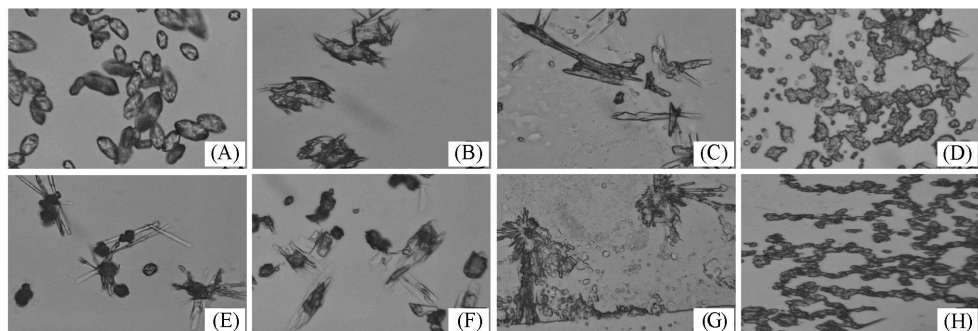


Fig 3 Images of deposited droplets

(A) CHCA; (B) CHCA + BSA; (C) CHCA + HSF; (D) CHCA + HTF; (E) CHCA + NS;  
(F) CHCA + NS + BSA; (G) CHCA + NS + HSF; (H) CHCA + NS + HTF.

### 2.3 不同蛋白质增强酸性多肽的离子化效率

上述 4 种蛋白质对提高多肽绝对强度效果不仅局限于胰岛素, 同样也适合其它多肽。选择海兔酸性多肽 (*Aplysia acilic peptide*, AP), 采用类似的分析方法, 同样也能获得很相似的实验现象 (图 4), 其增强 AP 绝对强度幅度平均提升到 2~4 倍, 但几种蛋白的增强趋势较为相似, 尤其是在 AP 浓度较低时, 3 种蛋白的增强作用极为相似。在不添加任何蛋白质时, 当 AP 浓度低于 17.241 pmol/ $\mu\text{L}$  时, 已无法检测到 AP 的信号强度; 但分别添加 HTF, BSA, SZLF 时, AP 质谱峰绝对强度均有较大幅度的提高。当 AP 浓度降为 16.667 pmol/ $\mu\text{L}$  并含有 BSA 时, 其 AP 质谱峰的绝对强度仍然可高达 3013.8

### 2.4 肽指纹技术鉴定转铁蛋白

运用蛋白质组学技术对转铁蛋白进行肽指纹分析时, 分别选择基质 1 和基质 2 得到一系列肽指纹信息并用于数据库检索, 相应的检索分值、序列覆盖率及匹配峰数目列于表 1。

Table 1 Database search results of transferrin analyzed with peptide mass fingerprinting (PMF) in the presence of protein intensifiers\*

Loading amount/ $\mu\text{g}$	Score	Sequence coverage(%)	Matched No./Searched No
	A/B/C/D	A/B/C/D	A/B/C/D
100	96/103/121/105	27/27/26/25	(18/45)/(19/50)/(20/47)/(17/36)
50	70/84/118/130	24/25/28/37	(12/29)/(16/45)/(17/33)/(20/44)
20	62/86/75/76	22/25/26/19	(13/38)/(19/56)/(16/47)/(15/39)
10	64/110/82/82	22/27/24/28	(10/26)/(18/39)/(14/32)/(15/37)

\* The markers H<sub>2</sub>O (A), HSF (B), SZLF (C) and apoSZLF (D).

通过纵向比较发现随着 HTF 上样量的减小, A 组 HTF 肽片段的检索分值、覆盖率和匹配峰的数目均呈下降趋势, 说明在一定范围内低浓度的蛋白样品不利于肽指纹鉴定, 这与繁琐的步骤造成的蛋白

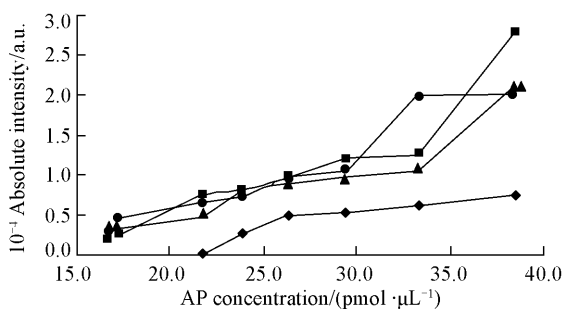


Fig 4 Plot of absolute intensity vs AP concentration in the presence of protein intensifiers

◆: AP + H<sub>2</sub>O; ▲: AP + BSA; ■: AP + HTF  
●: AP + SZLF

损失及最后获得的部分肽片段浓度过低有关. 在 B~D 各组分中别添加 HSF, SZLF, apoSZLF, 发现即使在上样量低时仍能获得很好的检索结果, 即肽片段信息较稳定, 受上样量的多少影响较小; 在同一上样量的各组中, 含有蛋白添加剂的各组蛋白的检索分值、覆盖率、 $m/z$  峰的匹配数目均比 A 组有明显的提高. 因此, HSF, SZLF, apoSZLF 作为蛋白添加剂可有效地提高数据库鉴定蛋白质的可信度.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Vestal M. L., Campbell J. M. . *Methods Enzymol* [ J ], 2005 **402** 79—108
- [ 2 ] Ens W., Standing K. G. . *Methods Enzymol* [ J ], 2005 **402** 49—78
- [ 3 ] ZHOU Lihua(周丽华), DENG HuiMin(邓慧敏), DENG QianYing(邓芹英), *et al.* . *Chem. J Chinese Universities(高等学校化学学报)* [ J ], 2004 **25**( 12 ): 2242—2246
- [ 4 ] Qin S., Ferilnand A. S., Ritchie J. P., *et al.* . *Proteomics* [ J ], 2005 **5**: 3183—3192
- [ 5 ] Hu Y., Zhang S., Yu J., *et al.* . *Breast* [ J ], 2005 **14**(4): 250—255
- [ 6 ] FANG CaiYun(方彩云), ZHAI Jian-Jun(翟建军), LU Feng(刘峰), *et al.* . *Chem. J Chinese Universities(高等学校化学学报)* [ J ], 2005 **26**(4): 660—662
- [ 7 ] YAN Li(颜利), HUANG He-Qing(黄河清), JIN HongWei(金宏伟), *et al.* . *Chem. J Chinese Universities(高等学校化学学报)* [ J ], 2004 **25**(10): 1889—1892
- [ 8 ] XIONG Shao-Xiang(熊少祥), CHEN Wen-Zhang(陈文章), FU Dan(蒲丹), *et al.* . *Chem. J Chinese Universities(高等学校化学学报)* [ J ], 2002 **23**( 10 ): 1868—1872
- [ 9 ] Tsubopoulos A., Karas M., Strupat K., *et al.* . *Anal Chem.* [ J ], 1994 **66**: 2062—2070
- [ 10 ] Botting C. H. . *Rapid Commun. Mass Spectrometry* [ J ], 2003, **17** 598—602
- [ 11 ] Huang H. Q., Xiao Z. Q., Lin Q. M., *et al.* . *Biophysical Chemistry* [ J ], 2004, **111**(1): 213—222
- [ 12 ] Zhu J. Y., Huang H. Q., Bao X. D., *et al.* . *Aquatic Toxicology* [ J ], 2006 **78**( 2 ): 127—135
- [ 13 ] Ying T. Y., Wang H. L., Li M., *et al.* . *Proteomics* [ J ], 2005 **5**: 4777—4793
- [ 14 ] Kong B., Huang H. Q., Lin Q. M., *et al.* . *Journal of Protein Chemistry* [ J ], 2003, **22** 61—70
- [ 15 ] Qian Huifen, Huang Wei . *Molecular Structure* [ J ], 2005 **743** 191—195

## Ionization Rate and Absolute Intensity of Peptides Enhanced with Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization in the Presence of Proteins

ZHUO HuiQin<sup>1,2</sup>, HUANG He-Qing<sup>1,2\*</sup>, WENG Lu-Na<sup>1,2</sup>, HUANG HuiYing<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of the MOD for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences

2. The Key Laboratory of Chemical Biology of Fujian Province, College Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005 China)

**Abstract** Human serum transferrin (HTF), bovine serum albumin (BSA), and horse spleen ferritin (HSF) have capacities of assisting the matrix to enhance ionization rate and absolute intensity both insulin (INS) and *aplysia* acidic peptide (AP) by laser desorption/ionization, and this enhancement can be up to 10 and 4 times respectively. This phenomenon was independent on the concentration of INS, but dependent on these intensifiers strongly. Moreover, the similar enhancing rate of absolute intensity of INS was observed by both SZLF- and apoSZLF-assisted matrix, indicating that this effect was not relative to the metal ions of proteins, but their compositions and structures. The fragment numbers of HTF lysed with endopeptidase and matching rate with reference transferrin were greatly improved in the presence of SZLF, apoSZLF and HSF, when HTF was identified by a combined techniques: lysis enzyme and peptide mass fingerprinting (PMF). This novel effect might play an important role in enhancing the reliability for identifying protein.

**Keywords** MALDI-TOF MS; Peptide; Absolute intensity; Protein-assisted matrix; PMF

(Ed: H, J, Z)