

技术与方法

快原子轰击质谱法测定肽序列

李 滨 张国赏 李世华 杨晓华 王光辉*

(中国科技大学结构成份分析中心,合肥)

黄婉治 孙思泉 王 淳 鲁子贤**

(中国科技大学生物系,合肥)

提 要

本文通过对合成的五肽胃泌素及人类粒细胞慢性白血病蛋白 P_{210} 的抗原簇十肽的研究,探讨了小肽氨基酸序列直接测定的快原子轰击质谱法 (FABMS)。从谱图中可以观察到显著的分子量信息和序列离子,并由此确定出肽的氨基酸序列。结果表明,一般 C-端无碱性氨基酸时肽链比较容易形成 N-端序列离子。

对掺杂有氧化态的还原型谷胱甘肽及其经巯基乙醇处理后的混合物 FAB 谱图的研究表明,后者具有更强的分子离子峰和更完整的序列离子,为含有胱(半胱)氨酸的肽序列分析提供了一个方法。

在生物机体中,蛋白质的功能、作用是以其一级结构(即氨基酸序列)为基础的。因此,研究一级结构的测定方法一直是生物化学家关心的课题。Edman 降解法^[1]自确立以后几乎是测定蛋白质序列的唯一方法,达到了能够测定含 1021 个氨基酸的 β -半乳糖苷酶^[2]的一级结构的水平。七十年代末,随着 DNA 碱基序列测定法^[3,4]的出现,人们开始可以由蛋白质的基因编码序列的测定而导出其一级结构了。但是这两种方法都有其本身不能克服的困难。如 Edman 降解法不仅费时费力、可靠性随着降解过程而减低,而且也不能确定 N 端封闭的蛋白质的 N 端肽段的结构、被修饰的氨基酸残基,以及具有重要的生物学功能的糖肽的结构等;DNA 碱基序列测定中的内含子、启动子等的确定以及其测序的正确性仍须通过直接测定蛋白质的部分序列加以验证,而且蛋白质相应的 DNA 编码序列亦不是总能得到。因此,寻找一

种更为经济方便、快速准确的蛋白质和多肽一级结构的测定方法一直是生物化学家的重要研究课题之一。

质谱法测定肽序列是长期来探索的方法之一。快原子轰击质谱法 (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry, FABMS) 在 1981 年由 Barber 等人^[5]提出后,很快被广泛应用于一些难挥发的极性中、小分子化合物如肽、有机盐和金属有机化合物等的分析测定中,使质谱学得到了长足进展,被称为质谱学发展史上的一个新里程碑。FABMS 之所以成功,是由于它能较容易地安装在一般的磁质谱仪或四极质谱仪上,并且比二次离子质谱和场解吸质谱具有时间更长、更稳定的离子流,从而使谱图的重复性变得更好了。另一方面, FABMS 能够对未经衍生化的肽进行常规分析,在仪器的质量

* 中国科学院北京化学所。

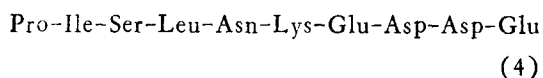
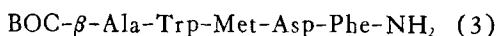
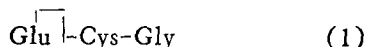
** 中国科学院上海生化所。

范围内即可方便地得到所测肽的准确分子量 ($M + 1$)、氨基酸组成和全部或部分序列信息,而且样品用量仅在 2—20nmol 之间。这就为以质谱为分析工具的肽和蛋白质化学家带来了许多方便之处。近几年,国外用 FABMS 研究肽的序列测定方法已有许多报道^[6-13]。在这些研究中,大多都能给出未经衍生的肽或诸如胰岛素^[7]和胰岛素原^[8]这样一些小蛋白的分子量或部分序列信息;有的需要和碰撞活化、化学降解或酶降解的方法结合起来获得序列信息;另外一些研究工作则是侧重于肽的断裂机理 (Fragmentation Pathways) 研究。国内用质谱法研究肽序列的工作目前尚未普遍开展起来。

本文通过对还原型谷胱甘肽、合成的五肽胃泌素以及合成的人类粒细胞慢性白血病 (Human Chronic Myelogenous Leukaemia, CML) 蛋白 P₂₁₀ 的抗原簇十肽^[14]进行的研究,探讨在 FABMS 中肽的断裂机理、序列测定和混合物中肽序列的多组份同时测定的可能性。

材料和方法

1. 材料与试剂 本实验测定的还原型谷胱甘肽(1)由上海酵母厂生产,含量为 90% 以上,批号 840227;五肽胃泌素系上海生化所胡世全同志提供,样品中同时含有(2)和(3)两种胃泌素,它们的差别仅在于(3)的 N 端多了一个叔丁氧羰基 (BOC) 保护基团;人类粒细胞慢性白血病蛋白 P₂₁₀ 的抗原簇十肽(4)由中国科技大学生物系分子生物实验室唐世平同志提供。实验中的其它溶剂如甘油、乙醇、正丙醇和巯基乙醇均为分析纯试剂。氩气由北京氧气厂生产,纯度为 99.999%。



2. 样品制备 取约 1 μ mol 的五肽胃泌素和十肽分别溶于 50 μ l 甘油-正丙醇 (1:1) 和甘

油-乙醇(1:1)配成的基质中。五肽胃泌素在甘油-正丙醇中呈乳液。另取约 2 μ mol 的还原型谷胱甘肽溶于 50 μ l 巯基乙醇中,100℃ 下放置两分钟,冷却至室温后加入 50 μ l 甘油混匀,用同样的方法制备出巯基乙醇-甘油(1:1)溶剂作为基质空白对照物。用微量注射器取上述样品溶液约 1 μ l 均匀地涂在 FAB 靶上,每次进样约 20nmol。

3. 质谱 上述三肽、五肽和十肽的质谱图是在 VG ZAB-HS 型有机质谱仪上获得的。用 VG 11/250 数据系统采集数据并进行谱图处理;用甘油作质量标尺校正;使用分辨率 1000;加速电压 8kV;轰击原子为氩原子;原子枪加速电压 8kV,放电电流 1mA;离子源气压 3×10^{-6} mbar;靶为不锈钢材料制成,靶面约 $1.5 \times 6\text{mm}^2$,与离子源轴心线的夹角约 75°。

4. 术语 本文采用 P. Roepstorff 建议的术语^[15]来描述序列离子。在正离子谱图中肽链有六种断裂方式 (图 1a),其中 N-端正离子 (A, B, C) 和 C-端正离子 (X, Y, Z) 各有三种。肽链在其断裂过程中,有些离子如 C 和 Y 离子的形成常伴有氢重排发生,有些离子则没有。为区别这些离子,常在其标记字母的右上

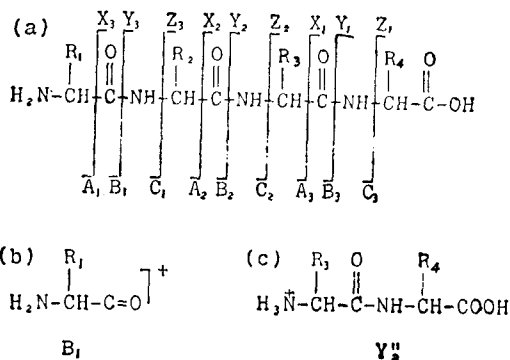


图 1 在 FABMS 谱图中肽序列离子的标记符号

角加上撇号“'”表示有氢原子的迁移,其数目与氢原子的迁移数目相同。标记字母右下角的数字则代表断裂发生的位置,即从 N-端或从 C-端起的第几个氨基酸发生了断裂。例如, B₁ (图 1b)是从 N-端起的第一个氨基酸以 B 方式断裂生成的 N-端正离子,没有氢迁移; Y₁' (图

1c) 是从C端起的第二个氨基酸以 Y 方式断裂,同时有两个氢迁移而形成的 C-端正离子。因此,用这样的命名方式可以描述所有可能的序列离子和 Y'A 或 Y'B 这样的二次断裂离子。

实验结果

1. 还原型谷胱甘肽

此样品因出厂时间较长,部分还原型谷胱甘肽已被氧化,形成硫-硫桥联结的二体,这对序列测定有较大的影响。用巯基乙醇处理后,结果大为改善。其序列离子的相对丰度和质谱

表 1 谷胱甘肽序列离子的相对丰度(%)^a

肽	分子量	[M + H]	A ₁	B ₁	C ₁ '	A ₂	B ₂	C ₂ '
还原型(1)	307	100.0	4.9	45.8	1.0	2.7	12.0	—
衍生物	383	58.6	4.9	45.8	1.0	—	—	0.2
			X ₁	Y ₁ '	Z ₁	X ₂	Y ₂ '	Z ₂
还原型(1)			4.9	21.7 ^b	—	2.7	13.0	3.8
衍生物			4.9	21.7 ^b	—	—	9.7	0.3

a 相对丰度为扣除基质和背景离子峰后所得。
—表示无法与背景峰区别或不存在。
b 其它碎片离子或背景也有贡献。

图分别由表 1 和图 2 所示。经处理的样品中同时含有还原型谷胱甘肽和巯基乙醇取代的谷胱

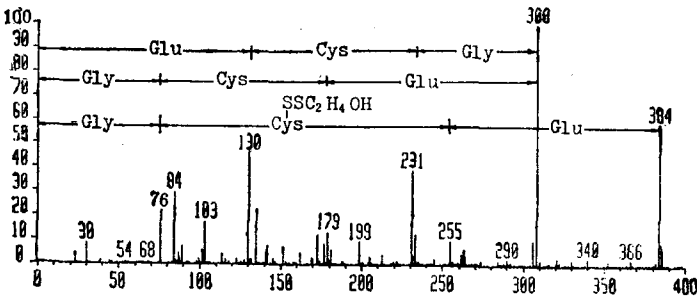


图 2 还原型谷胱甘肽及其巯基乙醇衍生物的 FAB 谱

表 2 五肽胃泌素序列离子的相对丰度(%)^a

肽	分子量	[M + H]	A ₁	B ₁	C ₁ '	A ₂	B ₂	C ₂ '	A ₃	B ₃	C ₃ '	A ₄	B ₄	C ₄ '
2	667	19	—	3	16	10	8	5	2	2	3	—	2	3
3	767	9	20 ^b	10	16	2	—	6	—	—	3	—	—	2
			X ₁	Y ₁ '	Z ₁	X ₂	Y ₂ '	Z ₂	X ₃	Y ₃ '	Z ₃	X ₄	Y ₄ '	Z ₄
2			—	5	5	1	3	2	—	2	1	2	1	1
3			—	5	5	1	3	2	—	2	1	2	1	1

a,b 同表 1。

甘肽两个组份,它们的 [M + H] 分子离子峰分别位于 m/z 308 和 m/z 384。由 B 序列离子 m/z 130, 233 和 Y'' 序列离子 m/z 76, 179 以及分子离子 m/z 308 可得到 Glu-Cys-Gly 这样的序列;由 Y'' 离子 m/z 76, 255 和分子离子 m/z 384 亦可得到巯基乙醇取代的三肽序列 Glu-(Cys-SC₂H₄OH)-Gly。另外谱图中还有一些氨基酸残基的特征碎片离子,如 Gly(m/z 30), Cys(m/z 76), Glu(m/z 84) 以及 Cys-SC₂H₄OH(m/z 152) 等。

2. 五肽胃泌素

表 2 是五肽胃泌素(2)和(3)的序列离子的相对丰度。从其质谱图(图 3)中可清楚地看到它们的 [M + H] 分子离子峰分别位于 m/z 668 和 m/z 768 处,比其邻近峰的丰度高得多。

在肽链的六种断裂方式中,(2)以 B、C 方式为主;(3)则主要以 C 方式断裂。由(2)的 C'' 序列离子 m/z 89, 275, 406, 521 以及分子离子峰 m/z 668 可以得到 Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ 序列。而(3)的 C'' 序列离子 m/z 189, 375, 506, 621 和分子离子峰 m/z 768 同样可以确定上述序列。另外,这两个肽的序

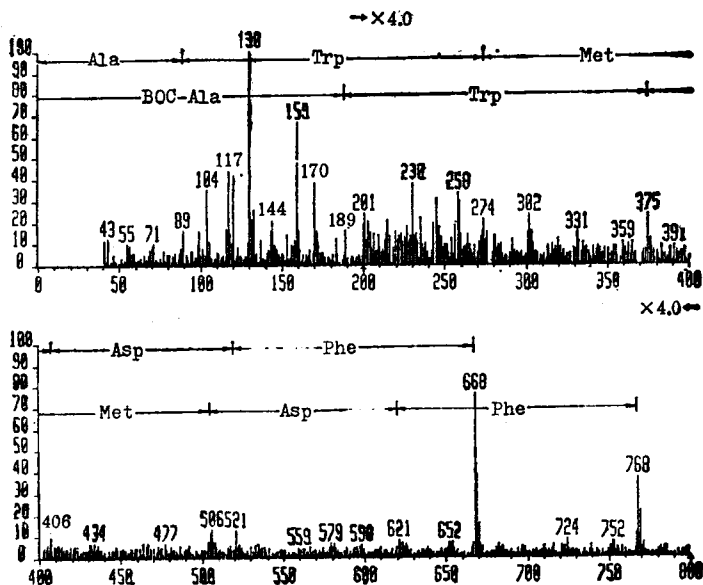


图 3 五肽胃泌素的 FAB 谱

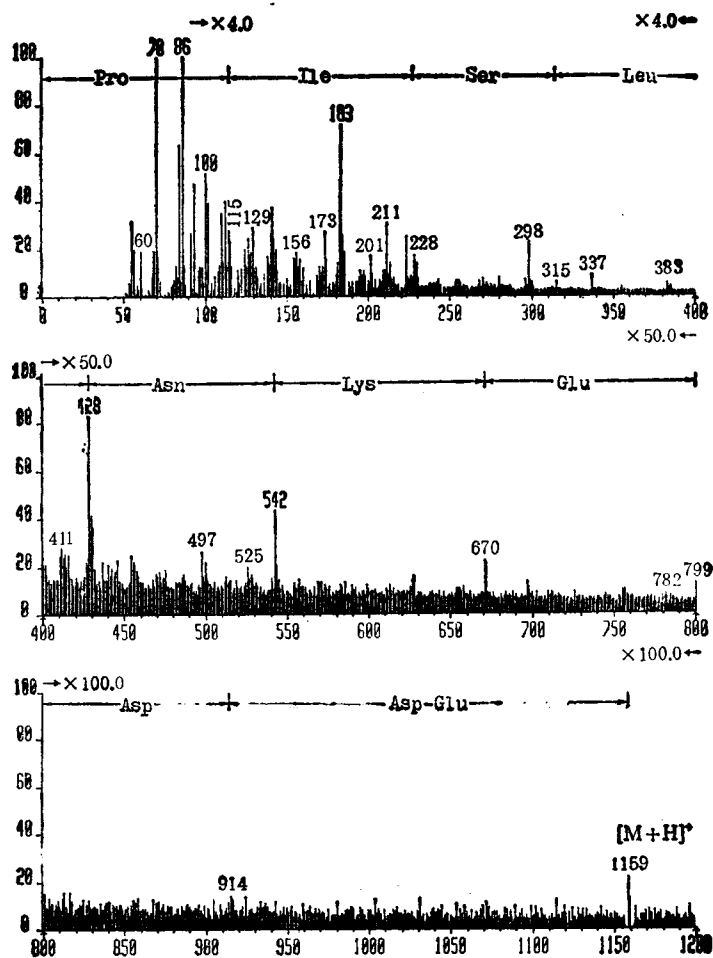


图 4 人类粒细胞慢性白血病蛋白 P₁₁₀ 的抗原肽十肽的 FAB 谱

列是完全一样的,唯一的差别就是N端的不同,所以它们的 C-端序列离子完全相同(见表2)。

(3) N 端的叔丁氧羰基 $((CH_3)_3C-O-C(=O)-)$ 可由碎片离子 m/z 101 和两组 C'' 序列离子的对应离子的差值(100)得到证实。

在谱图的低质量区有许多很强的离子峰,其中有 Y'A 离子 Trp (m/z 159)、Met(m/z 104)、Asp(m/z 88) 和 Phe(m/z 120),还有一些氨基酸的特征碎片离子如 Trp (m/z 117, 130, 144, 170) 和 Phe(m/z 91, 77) 等。

3. CML 蛋白 P₂₁₃ 的抗原簇十肽

该十肽的序列离子和正离子 FAB 谱分别见表3和图4。其断裂方式仍然以C为主,其次是B和A。而以X、Y、Z方式断裂的离子或是很弱,或是没有。 $[M+H]^+$ 分子离子峰亦很明显,丰度为基峰 (m/z 86) 的0.2%,明显高出其邻近的其它离子峰。由 C'' 序列离子可定出该十肽的全部序列为: Pro-Ile(Leu)-Ser-Leu

表3 抗原簇十肽序列离子的相对丰度(%)^a

A	99.5	17.8	1.8	1.4	0.5	0.2	—	—	—
B	12.2	7.6	5.6	0.4	0.4	0.2	0.2	—	—
C''	5.8	4.1 ^b	1.4	1.7	0.9	0.4	0.3	0.1	0.1
X	3.8	0.6	0.2	0.2	0.2	—	—	—	—
Y''	1.2	0.8	0.3	0.2	0.1	—	—	—	—
Z	3.1	0.8	0.3	0.3	0.2	—	—	—	—

^{a,b} 同表1。

(Ile)-Asn-Lys-Glu-Asp-Asp-Glu。在质量小于400时,B和A序列离子较 C'' 离子更强一些,由它们可以容易地确定出前六个氨基酸的序列。谱图中还有其它一些丰度较大的离子,氨基酸残基的碎片离子 Ile/Leu (m/z 69)、Glu/Lys(m/z 84)、Y'A 离子 Ile/Leu (m/z 86)、Ser(m/z 87)、Glu(m/z 102)、Asp(m/z 88)、Ile-Ser/Ser-Leu (m/z 173),以及 Y'B 离子 Lys(m/z 129)、Ile/Leu (m/z 114)、Ile-Ser/Ser-Leu(m/z 201)、Leu-Asn(m/z 228) 等。

讨 论

从实验获得的谱图和数据的研究结果表明对于所研究的小肽来说,FAB谱能比较容易地

得到显著高于化学噪声离子的 $[M+H]^+$ 分子离子峰,即肽的分子量信息。但峰的相对丰度随分子量的增加而迅速减弱。

在 FAB 谱中,不论肽的两端是否被修饰过,肽链中的氨基酸大多都能形成稳定的二次断裂离子 Y'A 或 Y'B (N-端氨基酸形成 YA 或 YB)。除此之外,色氨酸、苯丙氨酸和异亮氨酸等还能产生很强的特征碎片离子^[16]。这些离子的存在对确定肽的氨基酸组成非常有用。它们的形成只与其相应的氨基酸残基在样品中的存在有关,而其丰度与各氨基酸残基在肽链中的分布(位置)和含量似乎没有什么直接的关系。

五肽胃泌素和抗原簇十肽的序列离子说明这些肽比较容易形成N端离子序列,而且以C断裂方式为主,形成很完整的C''序列离子。当然在质量不高的情况下,以A、B或Y断裂方式形成的序列离子也占有相当的地位,在定序过程中起到相互补充的作用。谷胱甘肽就是如此。结合 Roepstorff^[13]、Williams^[10]、Morris^[9] König^[11] 和 Buko^[12] 等人的实验观察,作者认为在 FAB 正离子谱中,若肽的C端无碱性氨基酸则其断裂一般以形成N-端离子为主。

从三肽和五肽的谱图解析中发现,序列测定对样品的纯度要求不高;对于那些含有几种肽的样品,根据不同的分子离子峰和序列信息可判断出各种肽的氨基酸序列,就是说进行多组分序列同时测定也是可能的。

在肽的序列测定中,FABMS 是一种有潜力的、可行的重要技术。若和其它一些方法如化学降解或酶降解、氨基酸分析仪、衍生物制备、高效液相色谱、毛细管气相色谱以及计算机谱图解析系统等联用,在肽的序列测定中 FABMS 将会占有更重要的地位。

本工作承唐世平同志和胡世全同志赠送肽样品,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Edman, P.: *Acta Chem. Scand.*, 1956, 10, 761.
- [2] Fowler, A. V.: *J. Biol. Chem.*, 1978, 253, 5521.
- [3] Maxam, A. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 560.

(下转第379页)

率。果肉中的 LFLP 含量比果皮低得多,30℃贮藏 7 天的淮枝果肉中按单位蛋白质计算的 LFLP 量只为相应果皮的 1/32。

表 2 温度对荔枝贮藏过程中类脂褐素水平的影响

品种	贮藏时间 (天)	LFLP 含量 ($\mu\text{Mev} \times 10^3/\text{mg protein}$)		
		果 皮		果肉
		30℃	1℃	30℃
糯米糍	当天	0	0	NS
	2	0	0	
	4	*88.6 $\pm$ 0.06	*87.4 $\pm$ 0.06	
	7	4146.1 $\pm$ 0.47	170.7 $\pm$ 0.02	
淮枝	当天	0	0	0
	4	148.0 $\pm$ 0.02	*40.2 $\pm$ 0.03	0
	7	3419.6 $\pm$ 0.31	49.2 $\pm$ 0.00	106.6 $\pm$ 0.03

注: NS 未作测定, * $P>0.05$, 其余数字 $P<0.05$ 。

讨 论

荧光性类脂褐素是膜脂过氧化产物——丙二醛与蛋白质、核酸、和磷脂交联形成的带 Schiff 碱的化合物,它是膜脂过氧化作用所致,通常与机体和细胞的衰老密切相关^[10,11]。荔枝果实的果皮及果肉在贮藏老化过程中 LFLP 含量增多,支持了 Maguire 和 Haard^[9] 首次提出的果实(香蕉及桃子)成熟及衰老过程中有 LFLP 积累的论点,也与我们已发现采后 7 天的荔枝果皮中丙二醛含量增加 2—3 倍的结果(植物学报,待发表)相符,进一步证实了膜脂过氧化作用对膜的损伤是导致荔枝果实衰老的原因之一,同时也是衰老的结果。

膜脂过氧化作用通常由自由基(活性氧自由基、有机自由基)进攻膜脂的多不饱和脂肪酸而引发的。一些过渡金属离子如 Fe, Cu 等也能启动多不饱和脂肪酸的自发氧化^[2]。荔枝果实衰老过程中类脂褐素和丙二醛的积累,伴以超氧化物歧化酶活性下降和谷胱甘肽等抗氧化剂的减少(另文报道),推测衰老果实组织内可能存在较高浓度的自由基,由此导致生物膜的变性、组织破坏和衰老。然而,从果皮干粉的有机自由基分析结果来看,只从糯米糍品种中得到证实,而淮枝的情况却相反。两者的差异原因尚不清楚,初步估计可能与所用淮枝果实过熟有关。1℃ 低温延缓了果皮中 LFLP 的积累,表明对荔枝的非伤害低温能抑制果实的过氧化作用与衰老过程,有利于荔枝的贮藏和保鲜,即与保鲜的效果一致。

参 考 文 献

- [1] 林植芳等:《植物学报》, 1984, 26, 605.
- [2] Brennas, T. C.: *Plant Physiol.*, 1977, 59, 411.
- [3] Dhindsa, R. S. et al.: *J. Exp. Bot.* 1981, 32, 90.
- [4] Dhindsa, R. S. et al.: *Physiol. Plant.*, 1982, 56, 453.
- [5] Leshem, Y. Y.: *What's New in Plant Physiol.*, 1981, 12, 1.
- [6] Pauls, K. P. et al.: *Plant Physiol.*, 1984, 75, 1152.
- [7] Wilhelm, J. et al.: *Photosynthesis*, 1981, 15, 55.
- [8] Priestley, D. A. et al.: *Plant Physiol.*, 1980, 66, 715.
- [9] Maguire, Y. P. et al.: *Nature*, 1975, 258, 599.
- [10] Tappel, A. L.: *Pathobiology of Cell Membranes*, Vol. II, Academic Press, New York, 1975, 145—170.
- [11] Swartz, H. M. et al.: 电子自旋共振的生物应用(中译本), 科学出版社, 北京, 1972, 221—239 页.
- [12] 曹锡清:《生物化学与生物物理进展》, 1986, (2), 17.

[本文于 1987 年 8 月 11 日收到]

(上接第 384 页)

- [4] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1980, 143, 161.
- [5] Barber, M. et al.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1981, 325.
- [6] Biemann, K. et al.: *Mass Spectrom. Rev.*, 1987, 6(1), 1.
- [7] Dell, A. and Morris, H. R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, 106, 1456.
- [8] Barber, M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, 110, 753.
- [9] Morris, H. R. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, 101, 623.
- [10] Williams, D. H. et al.: *Biochem. J.*, 1982, 201, 105.

- [11] Köning, W. A. et al.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, 1983, 46, 403.
- [12] Buko, A. M. et al.: *Biomed. Mass Spectrom.*, 1983, 10, 408.
- [13] Roepstorff, P. et al.: *Biomed. Mass Spectrom.*, 1985, 12, 181.
- [14] Shtivelman, E. et al.: *Nature*, 1985, 315, 550.
- [15] Roepstorff, P. et al.: *Biomed. Mass Spectrom.*, 1984, 11, 601.
- [16] Garner, G. V. et al.: *Org. Mass Spectrom.*, 1983, 18, 486.

[本文于 1987 年 7 月 22 日收到]