

## 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\*

孙瑞祥<sup>1)\*\*</sup> 董梦秋<sup>2)\*\*</sup> 迟浩<sup>1)</sup> 杨兵<sup>2)</sup> 秀丽蕴<sup>1)</sup> 王乐珩<sup>1)</sup> 付岩<sup>1)</sup> 贺思敏<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>中国科学院计算技术研究所, 智能信息处理重点实验室, 北京 100190; <sup>2)</sup>北京生命科学研究所, 北京 102206)

**摘要** 蛋白质组学的兴起带动了质谱技术的快速发展, 而质谱技术的进步则拓宽了蛋白质组学研究问题的广度. 最近 10 年内, 肽段或完整蛋白质在质谱仪中的裂解技术——电子捕获裂解(electron capture dissociation, ECD)与电子转运裂解(electron transfer dissociation, ETD)逐渐发展起来. ECD 和 ETD 在蛋白质组学中的应用, 特别是在蛋白质的翻译后修饰鉴定和“自顶而下(Top-down)”的完整蛋白质裂解研究中已经展示出了诱人的前景. 对 ECD 和 ETD 的基本原理、质谱特点、仪器实现、数据解析算法与软件开发, 以及在蛋白质组学中的应用进展等方面进行了比较系统全面的阐述, 并对当前的研究问题、面临的技术挑战与未来的发展趋势等方面作了深入剖析.

**关键词** 电子捕获裂解, 电子转运裂解, 碰撞诱导裂解, 串联质谱技术, 计算蛋白质组学

**学科分类号** Q51, TP39

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00352

质谱技术已经成为当前蛋白质组学研究中不可或缺的平台, 质谱数据的信息质量直接决定了蛋白质鉴定的可靠性和鉴定数量. 目前, 蛋白质鉴定最主要的方法是利用串联质谱检索蛋白质序列数据库<sup>[1]</sup>. 虽然它可以较好地解决大部分简单或中低复杂程度的蛋白质鉴定问题, 但随着人们对复杂的蛋白质翻译后修饰鉴定需求的提高, 由碰撞诱导裂解(collision induced dissociation, CID)方式获得的串联质谱在鉴定翻译后修饰问题上遇到了很多技术困难, 如由于显著的中性丢失而导致质谱中与氨基酸序列相关的离子信息减少、难以确定修饰位点等. 1998 年发现的电子捕获裂解(electron capture dissociation, ECD)<sup>[2]</sup>和 2004 年发现的电子转运裂解(electron transfer dissociation, ETD)<sup>[3]</sup>可以很好地解决这个问题. 这两项质谱新技术的应用为蛋白质组学的发展带来了新的曙光, 基于电子的碎裂技术的时代已经到来.

本文对 ECD 和 ETD 技术分别从基本原理、质谱特点、仪器开发、基础研究进展、数据处理算法与软件开发等方面进行了详细的阐述, 并对当前的研究问题和未来的发展趋势进行了综合分析.

### 1 基于电子的碎裂技术简介

在当前的蛋白质鉴定中, CID 是最常用的肽段碎裂技术, CID 常应用于采用胰蛋白酶(trypsin)酶

切、在质谱仪中离子化的肽段. 肽碎裂过程主要产生 b 和 y 类型的离子, 如图 1 所示<sup>[4]</sup>. 相应地, 常用的蛋白质鉴定软件也主要是利用这两种类型的离子峰信息与理论质谱进行匹配, 可靠的匹配结果一般依赖于匹配上较多的强度较高的连续谱峰. CID 在蛋白质鉴定中已经有很多成功的应用, 但随着蛋白质组学研究的逐渐深入, 人们对肽段或蛋白质的碎裂提出了更多更高的要求. 如对于非胰蛋白酶酶切的较长肽段, 或者发生翻译后修饰的肽段, CID 的碎裂途径往往受到很大的抑制, 导致产生的质谱有用信息相对于未修饰的肽段减少, 使得鉴定结果的可靠性显著降低. 因此, 寻求新的更有效的碎裂方法最近几年已成为蛋白质质谱领域的一个重要研究方向.

1998 年, McLafferty 等<sup>[2]</sup>意外发现了蛋白质电子捕获碎裂的现象, 进而应用到蛋白质鉴定领域<sup>[2,4]</sup>, 这标志着蛋白质基于电子的碎裂技术时代的

\* 国家高技术研究发展计划(863)(2008AA02Z309, 2007AA02Z315, 2007AA02Z1A7), 国家重点基础研究发展计划(973)(2010CB912701)和中国科学院知识创新计划(KGGX1-YW-13)资助项目.

\*\* 通讯联系人. Tel: 010-62601018

孙瑞祥. E-mail: rxsun@ict.ac.cn

董梦秋. E-mail: dongmengqiu@nibs.ac.cn

收稿日期: 2009-06-05, 接受日期: 2009-09-04

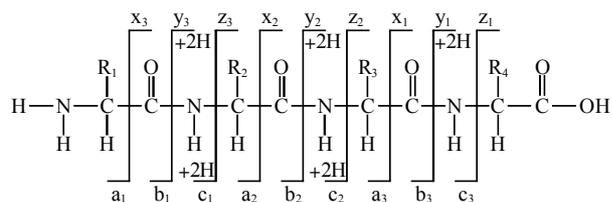


Fig. 1 Cleavage sites of the peptide bonds

图 1 肽链碎裂点示意图

开始. 与 CID 基于碰撞能量再分配的基本机理完全不同, ECD 一般是通过低能量的自由电子与质子化的多电荷蛋白质或肽离子, 在相互作用的过程中由于放热而瞬间产生碎裂, 它是一个非各态历经(nonergodic)的过程, 主要产生由 N—C $\alpha$  键的断裂而形成的 c 和 z 类型离子(图 1). 由于要同时容纳多电荷蛋白质或肽离子与自由电子在离子阱质谱仪中技术上所面临的困难, ECD 从产生开始就主要应用在傅立叶变换质谱仪(fourier transform mass spectrometer, FTMS)上<sup>[5]</sup>. 由于 FTMS 仪器价格昂贵、运行维护成本高等因素, ECD 的应用仅局限于拥有 FTMS 仪器的少数实验室中, ECD 在蛋白质组学中的应用受到了仪器方面的限制, 并没有获得广泛的开展.

针对 ECD 在 FTMS 上应用的局限性, Hunt 等受 ECD 的启发, 于 2004 年发现, 通过携带一个电子的阴离子(anion)与肽阳离子(cation)相互作用, 也可以产生类似 ECD 的碎裂行为, 他们称之为“电子转运裂解”(electron transfer dissociation, ETD), 进而, 他们通过改进已有的线性离子阱(linear ion trap)质谱仪, 在原有仪器的后端添加了通过化学离子化的方法引入携带电子的阴离子, 然后与肽阳离子在离子阱中相互作用而产生碎裂, 发明了一套完整的 ETD 技术<sup>[3]</sup>. 由于线性离子阱质谱仪具有高灵敏性、快速扫描特点和仪器的性价比较高优势, 它已在蛋白质组学实验室中被广泛采用, 因此 ETD 技术的发明使得基于电子的碎裂方式在蛋白质组学研究领域中有了更广泛的用武之地, 为下一代蛋白质组学的发展带来了新的“曙光”, 基于电子的碎裂方式开始在蛋白质组学领域中获得广泛的应用. 除了 ECD 和 ETD 以外, 其他基于电子的碎裂技术还有电子分离裂解(electron detachment dissociation)<sup>[6]</sup>, 电子激励裂解(electronic excitation dissociation)<sup>[7]</sup>等. 相对于 ECD 和 ETD, 这些技术当前在蛋白质组学中的应用还很少.

考察一项新技术的影响, 还可以通过检索发表的论文. 图 2 是 PubMed 上发表的以 ECD 或 ETD 为研究内容的论文数量随年度的变化关系. 查询时间段为: ECD(1998-01-01~2009-04-15), ETD(2004-01-01~2009-04-15). 查询内容为论文题目或摘要中含有“electron capture dissociation”或“electron transfer dissociation”. 从图 2 中可看出, 以研究 ECD 或 ETD 为内容的论文数量最近几年出现了较快的增长趋势, 特别是 2009 年, 仅三个半月时间, 发表 ETD 方面的论文数量就已经超过了 2008 年全年的总数.

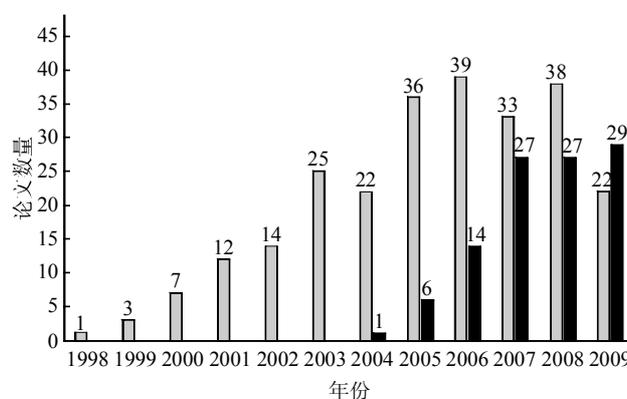


Fig. 2 Publications of ECD and ETD on PubMed

图 2 PubMed 上检索到的 ECD 和 ETD

发表论文数量与年度的关系

□: ECD; ■: ETD.

## 2 ECD/ETD 串联质谱的特点

ECD 或 ETD 是电子与带多电荷的肽段或蛋白质阳离子进行相互反应的过程中而产生碎裂的, 电子在碎裂过程中起到了至关重要的核心作用, 它们之间的主要差别是 ECD 的电子是自由电子, 而 ETD 中的电子是通过小分子的阴离子提供的. ECD 与 ETD 的碎裂机理是类似的, 目前还基本没有报道它们之间有什么显著的差异, 但与 CID 的碎裂机理却迥然不同, CID 主要是基于碰撞能量再分配的原理, 结合能小的键容易断裂, 在时间尺度上比 ECD/ETD 要慢, 因此通常也称为“慢热”(slow-heating)碎裂. 碎裂机理上的不同导致了 ECD/ETD 与 CID 串联质谱的行为特征上存在着很大的差异.

### 2.1 离子类型的差异

CID 主要断裂肽键, 产生以 b 和 y 类型为主的离子峰, 而 ECD/ETD 则主要碎裂 N—C $\alpha$  键, 产生以 c 和 z 类型为主的离子峰. 如图 3a 和 3b 分别为

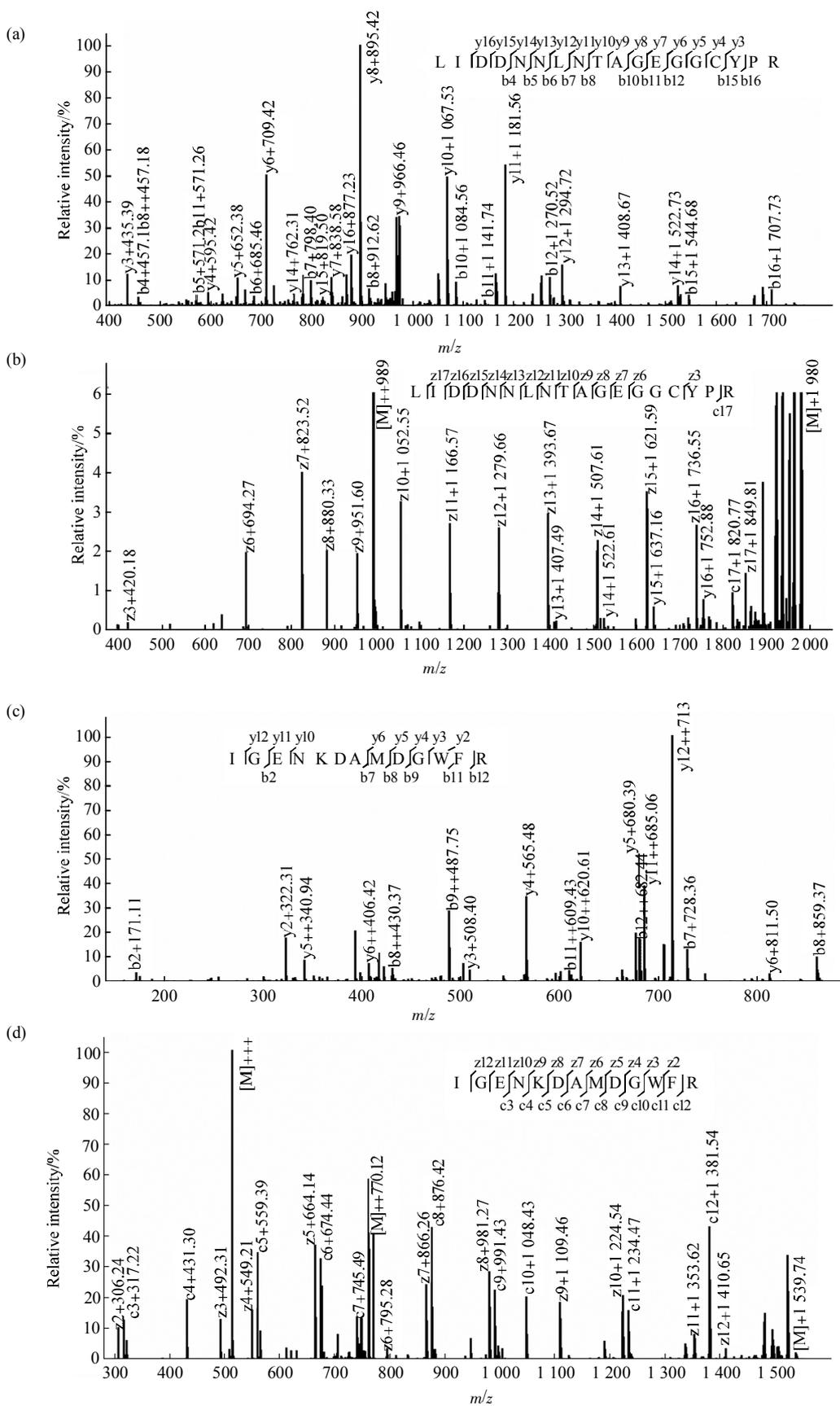


Fig. 3 Example of CID and ETD spectra

图3 CID与ETD质谱特点的比较

(a) 带2个电荷肽段 LIDDNNLNTAGEGGCYPR 的 CID 质谱. (b) 带2个电荷肽段 LIDDNNLNTAGEGGCYPR 的 ETD 质谱. (c) 带3个电荷肽段 IGENK DAMD G W F R 的 CID 质谱. (d) 带3个电荷肽段 IGENK DAMD G W F R 的 ETD 质谱.

带 2 个电荷的肽段 LIDDNNLNTAGEGGCYPR 的 CID 谱和 ETD 谱, 对于用胰蛋白酶酶切的带 2 个电荷肽段的多数 ETD 谱, 由于仅在肽段的 C 端出现碱性的赖氨酸 K 或精氨酸 R, ETD 谱中 z 离子要远远多于 c 离子, 但在出现遗漏酶切或者肽段含有组氨酸的情况下, 则 c 离子的出现会相对增多。

图 3c 和 3d 分别是带 3 个电荷肽段 IGENKD-AMDGWFR 的 CID 谱和 ETD 谱, 带 3 个电荷的肽段中除 C 端的氨基酸外, 一般还会含有另外的碱性氨基酸, c 离子的出现机会增多。另外, 还有少量的 a 和 y 类型的离子。

## 2.2 与氨基酸序列依赖关系的差异

CID 在某些氨基酸组成的断裂点上常表现出断裂的倾向性, 如脯氨酸 P 的 N 端断裂容易产生强度较高的谱峰, 如图 4a 中的  $b_5-y_7$ ,  $b_7-y_5$ ,  $b_{10}-y_2$  均对应于 P 的 N 端断裂, 而 ECD/ETD 由于断裂的是 N—C $_{\alpha}$  键, P 的侧链环状结构导致 P 的 N 端断裂碎片基本没有观测到, 而 P 的 C 端断裂则有碎片产生, 如图 4b 所示,  $z_2$ ,  $z_5$ ,  $z_7$  均未出现, 而  $z_4$ ,  $z_6$  则比较明显。由于离子阱质谱仪的“三分之一”效应, 通常  $z_1$  观测不到。

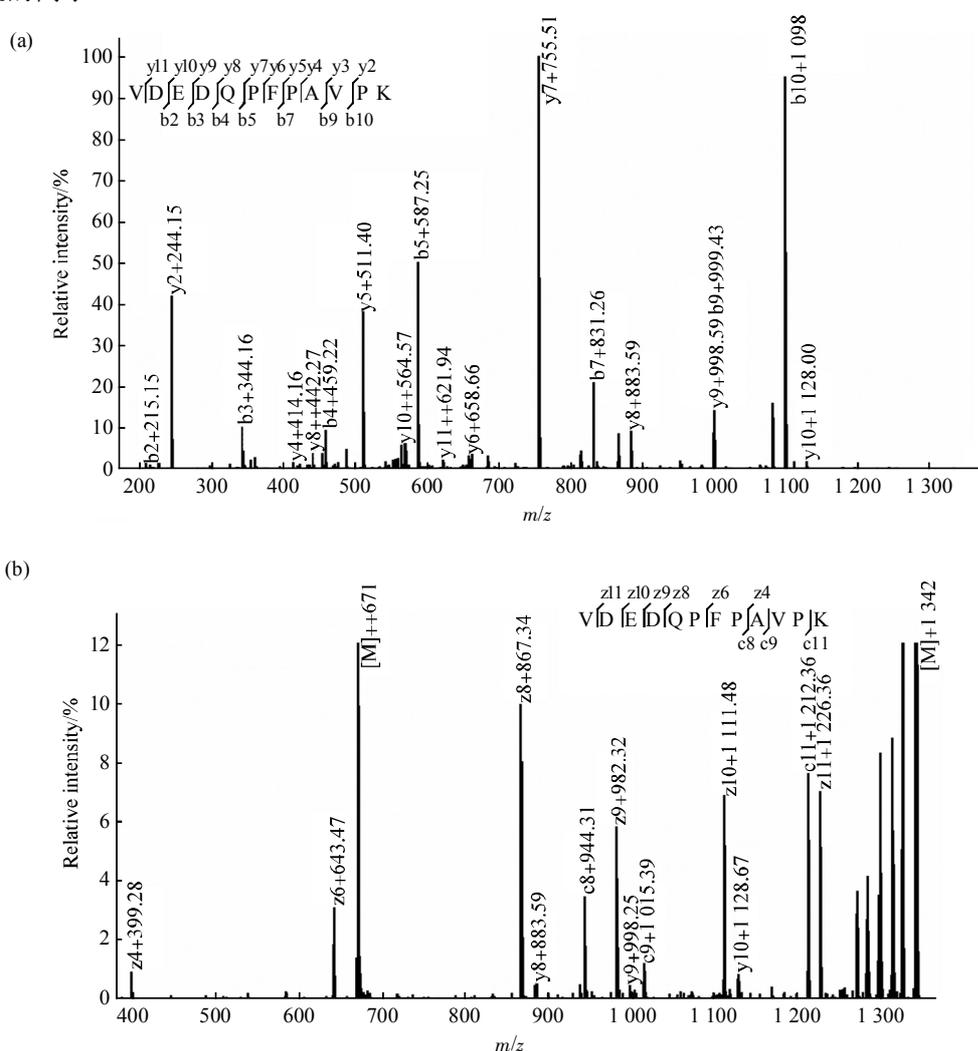


Fig. 4 Difference between CID and ETD spectra

图 4 CID 和 ETD 的碎裂特征比较

(a) CID. (b) ETD.

## 2.3 侧链丢失的差异

在 CID 谱中, 经常观测到碎片离子失水或失氮的情况, 而在 ECD/ETD 中则不典型, 很少出现, 但 ECD/ETD 的母离子携带电子后导致电荷减少, 经常出现完整肽段的侧链丢失情况, 如图 3b,d

和图 4b 中的右侧未标注系列高峰簇就对应于母离子(带电子)的侧链小分子丢失系列峰。此外, 在 ECD 中, 随着电子能量的增加, 由侧链断裂而生成的离子, 如 w 离子出现的机会增多。

## 2.4 翻译后修饰的差异

对于常见的磷酸化、糖基化等翻译后修饰, CID 谱中发生修饰基团的中性丢失比较常见, 如磷酸化 80 u 或 98 u 对应磷酸基团的丢失, 而 ECD/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为翻译后修饰位点的鉴定提供了重要信息. 因此, 最近几年, ECD/ETD 在翻译后修饰鉴定的应用研究上开始越来越广泛.

上述总结的 CID 与 ECD/ETD 的四点主要差异也反映出他们之间的互补特性, 将二者各自的优势相互结合起来, 可以在蛋白质鉴定中提供更加丰富的肽段和蛋白质信息. 这种互补特性主要表现在如下四个方面:

a. CID 适合于氨基酸序列长度较短的、带 2 个或 3 个电荷为主的肽段碎裂, 而 ECD 和 ETD 更适合于氨基酸序列长度较长的、带 3 个或 3 个以上电荷为主的肽段碎裂. 二者的有机结合可以显著提高蛋白质鉴定的序列覆盖度<sup>[8]</sup>.

b. CID 对于氨基酸序列的依赖性较强, 而 ECD/ETD 对于氨基酸的序列依赖相对较弱(除了一般观测不到由氨基酸 P 的 N 端断裂而形成的谱峰), 能够产生更多的连续离子系列峰.

c. 根据 CID 对于常见的磷酸化和糖基化等容易形成中性丢失, 而 ECD/ETD 可以保留完整的修饰基团的特点, 可以先利用 CID 判定修饰的存在, 然后利用 ECD/ETD 鉴定修饰的位点.

d. CID 适合使用胰蛋白酶酶切的肽段, 这样的肽段一般仅在两端带有碱性基团(N 端的自由氨基和 C 端赖氨酸或精氨酸的碱性侧链基团); 而 ECD/ETD 更适合用 Lys-C 等产生碱性氨基酸较多的酶来酶切蛋白质, 生成的肽段碎裂质量较高.

鉴于 ECD/ETD 的上述特点, 开发带有 ECD 或 ETD 功能的质谱仪器已经成为各质谱仪厂商角逐的“战场”.

## 3 ECD/ETD 的仪器开发

由于最初发现 ECD 的现象是在傅立叶离子回旋共振质谱仪 FTICR 上进行的, 因此, ECD 主要是应用在 FTICR 仪器上. 前文提及, 由于该仪器的高昂价格和运行维护的高要求, ECD 仅在少数实验中获得应用. 要将 ECD 推广应用到离子阱质谱仪上, 面临的一个技术难题是同时将电子和阳离子限制在离子阱中的困难, 电子仅能在离子阱中存在很短的时间, 不能与阳离子进行充分地反应. 因

此, 最近几年, 研究如何解决这个问题, 使得 ECD 可以应用在离子阱质谱仪上成为一个应用的需求. 日立公司<sup>[9]</sup>和岛津公司<sup>[10-11]</sup>等分别实现了 ECD 应用在离子阱类型的质谱仪上, 由于碎裂效率相对较低, 这些仪器并没有获得较大范围的推广, 而开发和应用更多的是 ETD 在离子阱仪器上的实现技术.

ETD 主要是应用在离子阱型的质谱仪器上, 开发带有 ETD 功能的质谱仪最近几年处于十分激烈的竞争状态. 在最近 4 年内, 各个生产离子阱质谱仪的厂商都已经预见到了 ETD 技术在离子阱质谱仪市场上的商业价值. 2006 年 ETD 的全球市场价值已经达到 3 000 万美元, 占据了整个离子阱质谱仪份额的 15%, 2007 年增长到了 25%, 预计最近几年将以每年 20% 的速度增长.

当前, 能够制造离子阱质谱仪的 Thermo Scientific, Bruker, Agilent 和 ABI 四大公司都开发出了带有 ETD 功能的质谱仪, 或者在实验室内进行改造, 使之具备 ETD 的功能(ABI 的 QTRAP 质谱仪). 在 ETD 技术发明后的第二年(2005 年), Thermo Scientific 公司就首先推出了带有 ETD 功能的 LTQ 型质谱仪, 之后又推出了改良型的 LTQ XL 质谱仪, 2008 年继续推出可同时支持高分辨率和低分辨率测量 ETD 碎片质量的 LTQ-Orbitrap(轨道离子阱)XL 质谱仪<sup>[12]</sup>, 它是目前市场上最高端的具有 ETD 功能的质谱仪. 提出使用反转数据库方法评价肽鉴定可靠性的哈佛大学蛋白质组学科学家 Gygi 认为: “在 LTQ-Orbitrap 中引入 ETD 技术对于蛋白质组学领域将是一个里程碑式的事件. ETD 将是下一代蛋白质组学的主流和前沿技术, 它的应用将如此广泛, 以致于我难以想象今后研究或核心质谱实验室中无用不到该新技术的系统.” 另外, Bruker 公司于 2006 年, 在美国 Pittcon 展会上推出了带有 CID 和 ETD 的 HCT PTM Discovery System. Agilent 公司也推出了带有 ETD 功能的 Agilent 6340 质谱仪. 另外, 也有研究在 FTMS 上的 ETD 实现技术<sup>[13]</sup>. 由此可见, 国外质谱仪厂商对于 ETD 市场竞争的激烈程度. 仪器的开发必将极大地促进未来对于 ECD 和 ETD 的研究与应用.

## 4 ECD/ETD 的基础研究进展

与应用比较成熟的 CID 相比, 在 ECD 的机理研究上目前还相对较少, 但已有相关的报道<sup>[14]</sup>, 对于 ETD 技术的机理研究则很匮乏, 在国际上还处

于刚刚起步的阶段. ECD 的机理研究主要集中在侧链的丢失、多种离子的类型等内容. ETD 由于发现时间不长, 还完全是一个新生的“幼儿”, 在 ETD 的有关碎裂机理、碎裂行为特征和大规模的质谱数据分析与应用等方面还报道较少, 但这并没有阻挡它在蛋白质组学中的应用步伐, 它已经在茁壮成长, 并初步展示出了独特的魅力, 如在磷酸化鉴定<sup>[15-16]</sup>、糖基化鉴定<sup>[17-18]</sup>、氧化鉴定<sup>[19-20]</sup>、组蛋白编码<sup>[21-24]</sup>等问题的研究上, ETD 显示出了类似 ECD 的优势, 与 CID 具有良好的互补特点.

Good 等<sup>[8]</sup>比较分析了用低分辨率质谱仪(LTQ)产生的 3 287 个肽段的 CID 和 ETD 质谱, 发现仅有 12%的肽段同时被 CID 和 ETD 得到了可靠的鉴定结果, 说明 CID 与 ETD 具有很好的互补性. 同时他们还发现, 电荷密度(平均每个氨基酸上的电荷数)的大小是决定 ETD 碎裂成败的一个至关重要的因素, 电荷密度越大, 碎裂效率越高.

Molina 等<sup>[25]</sup>通过对 19 000 个肽段(来自标准蛋白质混合物和复杂样品)的 CID 和 ETD 质谱实验研究, 发现在得到可靠鉴定结果的 ETD 质谱中, 带 2 个电荷的占到所有电荷的约 60%比例, 不同于 Good 等的实验结果(很少量的带 2 个电荷的 ETD 谱), 这说明不同的仪器、不同的鉴定软件和不同的酶切获得的结果差异较大, 但有一个共同点是都说明了 CID 和 ETD 具有很好的互补性. 有机地综合利用这两种互补的碎裂方式获得的信息, 将比单独使用任何一种收益都大. 关于这一点, Zubarev 和 Coon 等<sup>[26-27]</sup>已有比较详细的论证.

不同于胰蛋白酶的酶切方式, Taouatas 等<sup>[28]</sup>研究了采用 Lys-N 酶切时 ETD 质谱的特点, 发现对于仅含有一个碱性赖氨酸 K 肽段的 ETD 质谱, c 离子会占主导数量, 而 z 离子的出现数量则大大降低, 提出了一套结合强阳离子交换分离等技术的新方法, 它使得在肽从头测序和翻译后修饰的鉴定上处理 ETD 质谱数据变得相对容易, 从而提高了 ETD 质谱数据的分析效果.

Sadygov 等<sup>[29]</sup>通过对大量 ETD 质谱的观测分析, 提出了根据低分辨率下 ETD 质谱的特点预测其对应的母离子电荷数的 Charger 算法. Charger 算法采用了信号处理和线性判别分析的模式识别方法, 已被应用到 Bioworks3.3.1 软件中, 可以显著提高低分辨率下的 ETD 质谱鉴定效率. Carvalho 等<sup>[30]</sup>针对 Charger 算法仍然存在的不可靠性, 用贝叶斯决策理论提出了一种新的预测 ETD 母离子电

荷的方法(charge prediction machine, CPM), 通过测试数据, 预测错误率下降为 Charger 算法的一半. 随着高分辨率质谱仪的应用逐渐增多, ETD 质谱母离子电荷的准确确定已经不再是一个问题, 因而 Charger 和 CPM 算法仅适用于低分辨率下的 ETD 质谱数据分析.

在 ETD 质谱碎裂行为等机理方面的基础研究上却不如上述应用方面的步伐, 已经远远落后, 研究基础非常薄弱. 由于电子与肽离子相互作用过程机理的复杂性, 目前对于 ETD 质谱所表现出来的一些特有行为, 仍有很多无法得到原理上的阐释, 影响了它的有效应用, 国际上已经注意到了这一点. 2003 年, 经瑞典 Uppsala 大学的 Zubarev 教授倡议, 开始在每年的 12 月份召开以 ECD 为专题的 Uppsala 国际会议, 该会从 2005 年起将 ETD 也纳入了会议的主题, 研讨的主要内容分为三个方向: ECD 和 ETD 的基本机理、质谱仪器与应用领域. 随着 ETD 质谱数据产生规模的逐渐增大, 从大量质谱数据出发, 用生物信息学的手段研究 ETD 的碎裂行为已经变得切实可行起来. 为此, Uppsala 国际会议从 2008 年开始已经将 ETD 的生物信息学列为该会新增加的第四个方向. 由此可见, 对于 ETD 质谱的数据分析, 国际上也开始逐渐重视了起来.

相对于国际上对于 ECD/ETD 质谱技术在蛋白质组学领域研究与开发上的快速进展, 我国在此领域目前还基本处于刚刚起步与跟踪的阶段. 据不完全信息检索, 到目前还未曾查阅到有我国的科研机构 and 人员独立完成的研究成果在国际会议或期刊上发表, 在国内期刊上也少有报道, 检索万方查询系统查到两篇 ECD 或 ETD 相关的中文综述论文: 贾伟等<sup>[31]</sup>于 2007 年在《质谱学报》上综述了有关 ECD 技术; 刘科辉等<sup>[32]</sup> 2008 年在《质谱学报》上综述了有关 ETD 技术. 这说明我国已经开始在关注 ECD/ETD 技术, 但目前还未见到研究工作进展上的具体报道.

## 5 ECD/ETD 质谱数据的鉴定算法与软件开发

有了 FTICR 质谱仪(带有 ECD)和多种类型的 ETD 质谱仪器的推出, 必然会促进 ECD/ETD 在蛋白质组学研究中的广泛应用, 随之就会产生高通量的质谱数据, 如何有效地分析和利用这些数据获得生物学知识或结论? 需要与之相配套的、具有

ECD/ETD 质谱鉴定分析功能的软件系统。目前的算法或软件主要有：以 SEQUEST 算法<sup>[33]</sup>为核心的 Bioworks 3.3.1 软件；含有专门用于鉴定 ECD/ETD 质谱的 ZCore 算法的 Proteome Discoverer 1.0 软件，Mascot 2.2 软件<sup>[34]</sup>和 OMSSA 软件<sup>[35]</sup>等。这些软件中除了 ZCore 算法利用了 ECD/ETD 质谱的一些特有碎裂行为外，其他几个软件都是从鉴定 CID 质谱简单移植到 ECD/ETD 质谱的鉴定上来的：主要是将 CID 匹配的 b、y 类型离子调整为 ECD/ETD 的 c、z 类型离子。由于碎裂机理的迥然不同，ECD/ETD 质谱具有很多 CID 所不具备的碎裂行为和复杂特点，如 z 离子常会发生“氢重排”(hydrogen rearrangement, HR)的现象<sup>[36-38]</sup>，结果导致 z 离子的质荷比常会发生增加或渐少 1.0 u。另外，除了主要的 c 和 z 类型的离子外，a 和 y 类型离子也经常会出现于谱图中，以及发生氨基酸的侧链丢失现象<sup>[39]</sup>等。目前的鉴定软件大多还没有很好地考虑这些特有现象，影响到了谱图的鉴定效果。只有将这些碎裂特征有效地引入到鉴定算法和软件中，才能期望显著提高质谱的鉴定性能。与 Mascot 算法一样，ZCore 算法也没有公开发表过，它所嵌入到的 Proteome Discoverer 1.0 软件也不再像以前的 Bioworks 软件那样随质谱仪附带，而是需要单独购买。由此可见，伴随着带有 ECD/ETD 质谱仪的逐渐推广，对于相应鉴定算法与软件的开发也具有了商业价值。

2007 到 2008 年，带有 ECD/ETD 功能的质谱仪开始逐渐进入中国的蛋白质组学实验室，我国已经开始使用 ECD/ETD 质谱仪。特别是 2008 年，北京和上海等地的主要蛋白质组学实验室都已经相继开始使用或订购了多台 ETD 质谱仪，如北京大学、中国协和医科大学、北京生命科学研究所、上海生命科学研究院、复旦大学、中国科学院大连化学与物理研究所等。从 2009 年开始，随着更多质谱仪器的到位运行，我国将会开展较大规模的质谱实验，产生大量的 ECD/ETD 质谱数据。随之而来的一个瓶颈问题是：对于产生的这些质谱数据，我们将如何有效地分析和可靠地利用？如何使 ECD/ETD 技术能够真正发挥出它应有的优势或与 CID 的互补性？这成为生物信息学方向的一项研究内容。

中国科学院计算技术研究所与北京生命科学研究所自 2007 年就开始关注 ETD 技术的发展。随着 LTQ-Orbitrap 和 HCT Ultra 两套都装有 ETD 模块

功能的质谱仪于 2008 年的到位，已经开始产生大规模的 ETD 质谱数据，正式开始了对 ETD 质谱有关碎裂行为的研究工作。另外，我们自主开发的中国第一个实用的蛋白质鉴定软件 pFind<sup>[40-42]</sup>已经具有了 ECD/ETD 质谱的鉴定功能，目前在我们的质谱仪上产生的 2 000 多张 ETD 谱数据上的初步实验结果表明，pFind 2.1 可靠鉴定出 500 张(每张逐一经人工验证和确认)，经过比较实验分析，pFind 2.1 的 ETD 质谱鉴定率已经超过了前文提到的多数简单移植自 CID 的 ECD/ETD 鉴定软件的性能。我们还开发完成了能够可视化 ECD/ETD 质谱鉴定结果的自动大批量质谱标注软件 pLabel(<http://pfind.ict.ac.cn>)。

## 6 未来展望

综上所述，目前国际上对于 ECD/ETD 已经开展的研究在蛋白质组学中的应用较多，对于我们认为更加重要的质谱碎裂特征、算法开发与基本机理等内容，如与氨基酸序列的依赖性、侧链的丢失情况、氢重排的程度、母离子衍生峰的具体化学成分和特异性分析等内容，目前基本上还没有开展起来，但这些内容的研究对提高 ECD/ETD 质谱的认识、对质谱鉴定算法与软件的开发都具有十分重要的理论与应用价值。相信这将成为近期的主流研究内容，并取得较多的研究进展，同时也为进一步利用 ECD/ETD 技术进一步地开展 Top-down(自顶而下)的蛋白质组学<sup>[43-45]</sup>、蛋白质交联<sup>[46]</sup>、定量分析<sup>[47-48]</sup>、肽从头测序<sup>[49]</sup>等具体应用问题的研究而提供重要的技术支持。

## 参 考 文 献

- [1] 孙瑞祥, 付岩, 李德泉, 等. 基于质谱技术的计算蛋白质组学研究. 中国科学 E 辑(信息科学), 2006, **36**(2): 222-234  
Sun R X, Fu Y, Li D Q, *et al.* Science in China (E), 2006, **36**(2): 222-234
- [2] Zubarev R A, Kelleher N L, McLafferty F W. Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. a nonergodic process. J Am Chem Soc, 1998, **120**(13): 3265-3266
- [3] Syka J E P, Coon J J, Schroeder M J, *et al.* Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, **101**(26): 9528-9533
- [4] Zubarev R A, Horn D M, Fridriksson E K, *et al.* Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations. Anal Chem, 2000, **72**(3): 563-573
- [5] Tsybin Y O, Ramstrom M, Witt M, *et al.* Peptide and protein characterization by high-rate electron capture dissociation Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. J Mass

- Spectrom, 2004, **39**(7): 719–729
- [6] Budnik B A, Haselmann K F, Zubarev R A. Electron detachment dissociation of peptide di-anions: an electron-hole recombination phenomenon. *Chemical Physics Letters*, 2001, **342**(7): 299–302
- [7] Haselmann K F, Budnik B A, Kjeldsen F, *et al.* Electronic excitation gives informative fragmentation of polypeptide cations and anions. *Eur J Mass Spectrom*, 2002, **8**(2): 117–121
- [8] Good D M, Wirtala M, McAlister G C, *et al.* Performance characteristics of electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2007, **6**(11): 1942–1951
- [9] Baba T, Hashimoto Y, Hasegawa H, *et al.* Electron capture dissociation in a radio frequency ion trap. *Anal Chem*, 2004, **76**(15): 4263–4266
- [10] Ding L, Brancia F L. Electron capture dissociation in a digital ion trap mass spectrometer. *Anal Chem*, 2006, **78**(6): 1995–2000
- [11] Voinov V G, Deinzer M L, Barofsky D F. Radio-Frequency-Free cell for electron capture dissociation in tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 2009, **81**(3): 1238–1243
- [12] Williams D K, McAlister G C, Good D M, *et al.* Dual electrospray ion source for electron-transfer dissociation on a hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem*, 2007, **79**(20): 7916–7919
- [13] Kaplan D A, Hartmer R, Speir J P, *et al.* Electron transfer dissociation in the hexapole collision cell of a hybrid quadrupole-hexapole Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, **22**(3): 271–278
- [14] Syrstad E A, Turecek F. Toward a general mechanism of electron capture dissociation. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, **16**(2): 208–224
- [15] Molina H, Horn D M, Tang N, *et al.* Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(7): 2199–2204
- [16] Swaney D L, Wenger C D, Thomson J A, *et al.* Human embryonic stem cell phosphoproteome revealed by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(4): 995–1000
- [17] Catalina M I, Koeleman A M, Deelder A M, *et al.* Rapid electron transfer dissociation of N-glycopeptides: loss of the entire N-glycosylated asparagine side chain. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, **21**(6): 1053–1061
- [18] Alley W R, Mechref Y, Novotny M V. Characterization of glycopeptides by combining collision-induced dissociation and electron-transfer dissociation mass spectrometry data. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, **23**(1): 161–170
- [19] Srikanth R, Wilson J, Bridgewater J D, *et al.* Improved sequencing of oxidized cysteine and methionine containing peptides using electron transfer dissociation. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2007, **18**(8): 1499–1506
- [20] Srikanth R, Wilson J, Vacheta R W. Correct identification of oxidized histidine residues using electron-transfer dissociation. *J Mass Spectrom*, 2009, **44**(5): 755–762
- [21] Chang B, Chen Y, Zhao Y, *et al.* JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science*, 2007, **318**(5849): 444–447
- [22] Ueberheide B M, Mollah S. Deciphering the histone code using mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom*, 2007, **259**(1): 46–56
- [23] Garcia B A. Mass spectrometric analysis of histone variants and post-translational modifications. *Frontiers in Bioscience*, 2009(S1): 142–153
- [24] Nicklay J J, Shechter D, Chitta R K, *et al.* Analysis of histones in xenopus laevis II. mass spectrometry reveals an index of cell type-specific modifications on H3 and H4. *J Biol Chem*, 2009, **284**(2): 1075–1085
- [25] Molina H, Matthiesen R, Kandasamy K, *et al.* Comprehensive comparison of collision induced dissociation and electron transfer dissociation. *Anal Chem*, 2008, **80**(13): 4825–4835
- [26] Zubarev R A, Zubarev A R, Savitski M M. Electron capture/transfer versus collisionally activated/induced dissociations: solo or duet?. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2008, **19**(6): 753–761
- [27] Coon J J. Collisions or electrons? protein sequence analysis in the 21st century. *Anal Chem*, 2009, **81**(9): 3208–3215
- [28] Taouatas N, Drugan M M, Heck A J, *et al.* Straightforward ladder sequencing of peptides using a Lys-N metalloendopeptidase. *Nature Methods*, 2008, **5**(5): 405–407
- [29] Sadygov R G, Hao Z, Huhmer F R. Charger: combination of signal processing and statistical learning algorithms for precursor charge-state determination from electron-transfer dissociation spectra. *Anal Chem*, 2008, **80**(2): 376–386
- [30] Carvalho P C, Cociorva D, Wong C L, *et al.* Charge prediction machine: tool for inferring precursor charge states of electron transfer dissociation tandem mass spectra. *Anal Chem*, 2009, **81**(5): 1996–2003
- [31] 贾伟, 应万涛, 钱小红. 另辟蹊径—串联质谱肽段断裂的新军电子捕获解离. *质谱学报*, 2007, **28**(1): 55–64  
Jia W, Ying W T, Qian X H. *J Chin Mass Spectrometry Society*, 2007, **28**(1): 55–64
- [32] 刘科辉, 钱小红. 串联质谱肽段断裂新技术—电子转移解离及其在蛋白质组学中的应用. *质谱学报*, 2008, **29**(2): 115–119  
Liu K H, Qiao X H. *J Chin Mass Spectrometry Society*, 2008, **29**(2): 115–119
- [33] Eng J K, McCormack A L, Yates J R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1994, **5**(11): 976–989
- [34] Perkins D N, Pappin D J, Creasy D M, *et al.* Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 1999, **20**(18): 3551–3567
- [35] Geer L Y, Markey S P, Kowalak J A, *et al.* Open mass spectrometry search algorithm. *J Proteome Res*, 2004, **3**(5): 958–964
- [36] Savitski M. New proteomics methods and fundamental aspects of peptide fragmentation [D]. Sweden: Uppsala University, 2007
- [37] Savitski M, Kjeldsen F, Nielsen M L, *et al.* Hydrogen rearrangement to and from radical z fragments in electron capture dissociation of peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2007, **18**(1): 113–120
- [38] Swaney D L, McAlister G C, Wirtala M, *et al.* Supplemental activation method for high-efficiency electron-transfer dissociation of doubly protonated peptide precursors. *Anal Chem*, 2007, **79**(2): 477–485
- [39] Chalkley R J, Brinkworth C S, Burlingame A L. Side-chain fragmentation of alkylated cysteine residues in electron capture dissociation mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2006,

- 17(9): 1271–1274
- [40] Fu Y, Yang Q, Sun R, *et al.* Exploiting the kernel trick to correlate fragment ions for peptide identification *via* tandem mass spectrometry. *Bioinformatics*, 2004, **20**(12): 1948–1954
- [41] Li D, Fu Y, Sun R, *et al.* pFind: a novel database-searching software system for automated peptide and protein identification *via* tandem mass spectrometry. *Bioinformatics*, 2005, **21**(13): 3049–3050
- [42] Wang L, Li D, Fu Y, *et al.* pFind 2.0: a software package for peptide and protein identification *via* tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, **21** (18): 2985–2991
- [43] Bunker M K, Cargile B J, Ngunjiri A, *et al.* Automated proteomics of *E. coli* *via* top-down electron-transfer dissociation mass spectrometry. *Anal Chem*, 2008, **80**(5): 1459–1467
- [44] Chi A, Bai D L, Geer L Y, *et al.* Analysis of intact proteins on a chromatographic time scale by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom*, 2007, **259**(1–3): 197–203
- [45] Han X, Aslanian A, Yates J R. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, **12**(5): 483–490
- [46] Chrisman P A, Pitteri S J, Hogan J M, *et al.* SO<sub>2</sub><sup>•</sup> Electron transfer ion/ion reactions with disulfide linked polypeptide ions. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, **16**(7): 1020–1030
- [47] Han H, Pappin D J, Ross P L, *et al.* Electron transfer dissociation of iTRAQ labeled peptide ions. *J Proteome Res*, 2008, **7** (9): 3643–3648
- [48] Viner R I, Zhang T, Second T, *et al.* Quantification of post-translationally modified peptides of bovine  $\alpha$ -crystallin using tandem mass tags and electron transfer dissociation. *J Proteomics*, 2009, **72**(5): 874–885
- [49] Horn D M, Zubarev R A, McLafferty F W. Automated de novo sequencing of proteins by tandem high-resolution mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (19): 10313–10317

## ECD/ETD-based Tandem Mass Spectrometry in Proteomics\*

SUN Rui-Xiang<sup>1</sup>\*\*, DONG Meng-Qiu<sup>2</sup>\*\*, CHI Hao<sup>1</sup>, YANG Bing<sup>2</sup>,  
XIU Li-Yun<sup>1</sup>, WANG Le-Heng<sup>1</sup>, FU Yan<sup>1</sup>, HE Si-Min<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Intelligent Information Processing, Institute of Computing Technology,  
The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;

<sup>2</sup>National Institute of Biological Sciences, Beijing 102206, China)

**Abstract** Proteomics has propelled the rapid development of mass spectrometry (MS) in the past ten years. Conversely, the advancement of MS has greatly expanded the horizon of proteomics research by allowing it to address questions never touched before. Standing out among the recent technological innovations in MS are electron capture dissociation (ECD) and electron transfer dissociation (ETD). These electron-based fragmentation methods have shown a great potential for analysis of proteolytic peptides as well as intact proteins. A promising future lies ahead for ECD- or ETD-based techniques in proteomics research, especially in studies of protein post-translational modifications and top-down analysis of intact proteins. The mechanism, instrumentation and application of ECD/ETD, along with the spectral characteristics and data analysis of peptides ECD/ETD spectra were reviewed. The current issues in ECD/ETD applications or method development, the challenges for software development, and the outlook of these techniques in future research were also discussed.

**Key words** electron capture dissociation, electron transfer dissociation, collision induced dissociation, tandem mass spectrometry, computational proteomics

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00352

\*This research was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2008AA02Z309, 2007AA02Z315, 2007AA02Z1A7), National Basic Research Program of China(2010CB912701) and The Chinese Academy of Sciences Knowledge Innovative Project (KGGX1-YW-13).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-10-62601018

SUN Rui-Xiang. E-mail: rxsun@ict.ac.cn

DONG Meng-Qiu. E-mail: dongmengqiu@nibs.ac.cn

Received: June 5, 2009 Accepted: September 4, 2009