

猪血管紧张肽的质谱特性*

黄河清^① 林庆梅^① MIAO Hai^② Won-Suk KIM^②

(^①厦门大学生命科学学院 海洋与环境科学教育部重点实验室 361005 厦门;

^②Department of Chemistry and Beckman Institute, University of Illinois, Urbana, IL 61801, USA)

摘要: 选用基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱技术研究不同激光强度对猪血管紧张肽 (Angiotensin I, An I) 解吸离子化的百分率和一级结构的稳定性。结果表明: 激光强度与 An I 解吸离子化百分率有关, An I 多聚体解吸离子化所需的激光强度高于单体。An I 与海兔酸性多肽 (*Aplysia* acidic peptide, AP) 和海兔胰岛素 C_β (*Aplysia* insulin C_β, AI C_β) 混合后, 采用延迟引出技术和激光强度 2 300 IU 分析混合样品, 该激光强度不影响对 An I 和它的多聚体解吸离子化, 但对 AI C_β 影响较大, 相当于丢失了一分子 OH⁻。相同的激光强度对不同结构的多肽多聚体产生不同的解吸离子化百分率, 优化激光强度是准确分析多肽结构信息关键因素之一。

关键词: 猪血管紧张肽; 激光强度; 质谱; 多肽与混合多肽; 解吸离子化

中图分类号: Q617 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)05-34-07

Characterization of Mass Spectrometry of Angiotensin I

HUANG He-Qing^① LIN Qing-Mei^① MIAO Hai^② Won-Suk KIM^②

(^①School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

^②Department of Chemistry and Beckman Institute, University of Illinois, Urbana, IL 61801, USA)

Abstract: The percentage of desorption ionization and the stability of primary structure of angiotensin I (An I) were studied using different laser intensities with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. The results show the relation between both laser intensity and the percentage of desorption ionization. Moreover, the laser intensity for the desorption ionization of the angiotensin I polymer was known to be higher than its monomer. Using a technology of delayed extraction, the results showed that intensity hardly affected desorption ionization of both An I and its polymer after angiotensin I, *Aplysia* acidic peptide and *Aplysia* insulin C_β had been mixed. However,

* 国家自然科学基金(No. 40276033), 厦门市科技项目基金和教育部海洋与环境重点实验室基金资助;

第一作者介绍 黄河清, 男, 46岁, 教授; 研究方向: 蛋白质组学和神经多肽学。

收稿日期: 2002-11-01, 修回日期: 2003-03-17

er, this reaction process greatly affected the desorption ionization of *Aplysia* insulin C_β which caused the possibility that the peptide might release one OH⁻-like molecule. Under the same laser intensity, the peptide polymer with different structure produced a different percentage of desorption ionization, which suggests that the optimization of laser intensity is a key factor for analyzing peptide structure.

Key words: Angiotensin I; Laser intensity; Mass spectrometry; Peptide and its mixture; Desorption ionization

近年来,随着人类基因组图谱的顺利完成,基因组学发生翻天覆地的变化,其中结构基因组学、功能基因组学、蛋白质组学已经迅速发展成为本世纪生命科学最有挑战性和前瞻性的研究领域之一^[1],尤其蛋白质组学、多肽库(peptide bank)及其相关技术的发展规模,均以指数方式逐年上升,它们将胜任功能基因组学无法解决的系列重大科学难题^[2,3]。开展蛋白质组学研究和多肽库建立所需要的基本手段是高效液相色谱分离技术、双向凝胶电泳分离技术和生物质谱分析技术。前两者用于分离细胞释放的全部蛋白质和多肽,后者用于分析蛋白质和多肽的结构信息^[4,5]。目前常用于分析生物大分子结构信息的质谱技术,主要有快原子轰击质谱、电喷雾电离质谱和基质辅助激光解吸离子化飞行时间(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight, MALDI-TOF)质谱等。电喷雾电离质谱的特色是在没有外能输给待测样品的条件下,把生物大分子转化为带多电荷的分子离子,并几乎不产生新的碎片分子离子,有利于化合物结构推导^[6]。MALDI-TOF 质谱技术是在基质辅助下,采用不同激光强度解吸离子化分析物成为分子离子。由于激光、基质和样品之间发生了能量交换,这一过程直接影响了样品的解吸离子化百分率和稳定性。尽管 MALDI 也属于一种软电离技术,与其它软电离技术相比,更容易分解样品成为新的碎片分子离子。针对具体分析某一样品或混合物时,优化分析解吸离子化所需的激光强度是准确分析多肽结构信息关键因素之一^[7]。

本文选用 An I 和 An I 与 AI C_β, AP 的混合物为研究对象,探讨不同的激光强度对多肽化

合物解吸离子化程度的影响和稳定性。这一技术可为今后采用 MALDI 质谱技术准确分析生物大分子结构信息的研究提供理论依据和技术的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料 AP 由美国依利诺依大学生物技术研究中心合成。AP 标准分子量为 2 960.5 u, 一级结构为 SSGVSLTNSNKDEEQRELLKAINLLD, 其中含有三对 LL 键, 一对 SS 键, 一对 EE 键。在偏微弱酸(pH 6.5)条件下, AP 以 [M + H]⁺ 方式显示了相对强度较高的质谱峰, 其质荷比(m/z, 下同)为 2 961.50。

AI 是目前所报道的胰岛素多肽类型中最大的一条, 其分子量为 9 146 u。AI 激素(prohormone)含有两肽, 并位于 A 和 B 链之间, 可分为 C_α 和 C_β。AI C_β 从 AI 激素中分离出, 仅有 15 个氨基酸残基组成, 一级结构序列为 DTENVNDKLRGILLN, 分子量为 1 713.90 u, 含有一对 LL 键。AI C_β 由美国依利诺依大学 Sweedler 实验室提供。

An I 的一级结构由 10 个氨基酸残基组成, 即 DRVYIHPFHL, 分子量为 1 296.5 u。An I 结构特征与 AP 和 AI C_β 不同之处是该短肽不含有 LL 和其它成对氨基酸残基的结构。An I 从美国 Sigma 公司购置。

基质 2, 5 - 二羟基苯甲酸(2, 5-dihydroxybenzoic acid, DHB)购自美国 ICN 生物医学公司, 其他化学药品均采用分析纯。

1.2 方法

1.2.1 样品配制 粉状的 AP 和 AI C_β 用 pH

6.5 左右双重蒸馏水配制, An I 用甲醇配置。这三种样品浓度标配均为 1×10^{-6} mol/L。

1.2.2 基质配制 分析多肽结构的 DHB 用二次重蒸馏水搅拌溶解 30 min, 配制成 DHB 饱和水溶液。样品和基质溶液事先混合 30 ~ 50 s, 然后取 0.8 μ l 混合物直接点滴在 MALDI-TOF 质谱仪专用样品靶样品孔内, 待样品自然干燥后, 随后进行样品分析。

1.2.3 激光强度 通常激光强度单位被认定是以 mJ/cm^2 或 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 方式表示。但是质谱仪激光器所提供的激光强度与该激光器使用时间长短和激光在传输途径的损耗大小有着密切联系。一般需要特殊专业仪器才能检测到激光抵达样品靶上的强度。文中所描述激光强度单位采用质谱仪仪表上所显示的内部单位 (internal unit, IU) 表示。

1.2.4 质谱测定条件 美国应用生物系统公司生产的 Voyager DE-STR 质谱仪, 配置脉冲氮激光 (337 nm) 作为离子解吸电离源。分析模型使用高分辨率线性模型和延迟引出 (delayed extraction) 技术。在实验测试过程中的激光强度变化范围在 1 900 ~ 2 700 IU, 加速电压控制在 23 kV。平均每次测定样品的激光脉冲次数在 120 次之间。采用外标法标定多肽质谱峰位。

1.2.5 多肽混合样品制备 选用微量定量液体取样器, 分别取 AP、AI C₉ 和 An I 样品各 20

μ l, 然后迅速混合 5 min, 随后取出 30 ~ 36 μ l 饱和 DHB 混合均匀, 最后取出 0.8 μ l 混合物滴在 MALDI-TOF 质谱仪样品靶 (98 孔) 上, 等混合样品自然干燥后, 每个样品孔内再加 0.3 μ l 饱和 DHB。DHB 完全干燥后, 把样品靶置于普通低倍 (1×20) 显微镜下观察混合样品与 DHB 晶体率, 以确保样品在测定过程中, 多肽化合物能从基质中获取足够能量, 形成分子离子。

2 结果与讨论

2.1 弱激光强度对 An I 解吸离子化的影响

MALDI 方法分析生物大分子的重要关键因素是选择适当的基质。迄今为止, 有关激光、基质和生物之间的能量传递机理还缺乏较为合理的科学理论给予阐明。样品和噪音质谱峰之间尚未见有权威性的鉴别方法可进行规范和确定, 尤其在分析生物大分子时, 这一规范难度更大。参考美国应用生物系统公司生产的 Voyager DE-STR 质谱仪使用手册可知, 当激光脉冲次数少于 30, 已测样品显示的绝对强度低于 1 000.00 时, 所获得质谱峰图谱, 可视为噪音质谱图谱。图 1 是在激光强度为 1 900 IU 条件下所获得 An I 质谱图谱。由图 1 可见, An I 显示一定强度的质谱峰, 其 m/z 位于 1 296.19 处。在 m/z 为 1 196.75, 1 323.68, 1 447.66, 2 593.77 处也显示质谱峰。从表面看, 图 1 (激光脉冲次数 120 次,

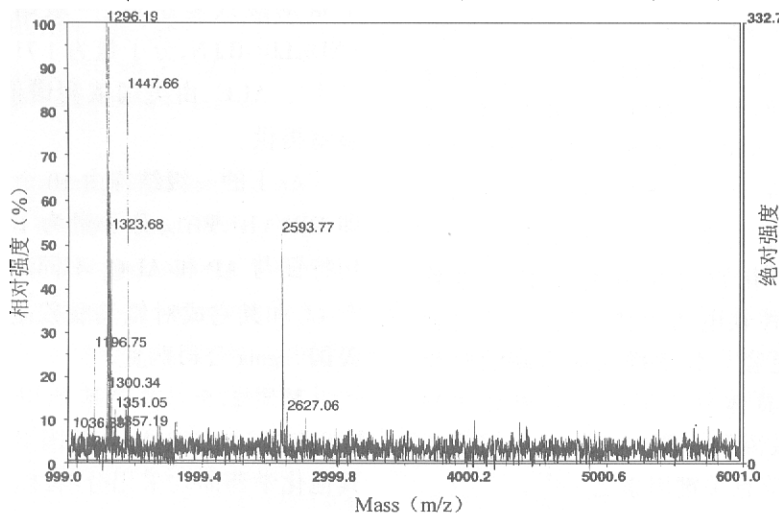


图 1 在激光强度为 1 900 IU 条件下, An I 的质谱图

下同)是一张很普通的 An I 质谱图谱,尽管激光脉冲次数大于 30 次,但图中右侧纵坐标所示的绝对强度仅有 332.7,明显低于 1 000.00。可见,图 1 是一张含有 An I 质谱峰的噪音图谱,其部分噪音信号强度与 An I 相当。由此看来,当激光强度为 1 900 IU,在激光束所覆盖的样品范围内,该激光强度无法完全解吸离子化 An I 成为分子离子,其绝对强度仅有 1 000.00 的三分之一。相对解吸离子化 An I 而言,1 900 IU 是属于弱激光强度。

将激光强度提升 2 000 IU 时,可获得一张与图 1 完全不同的 An I 质谱图谱(图 2)。此时,An I m/z 为 1 297.48,高于理论计算值 1 296.5 的 0.98 质量单位,相对误差为 0.076%。由图 2 可知,提高激光强度 100 IU 时,其 An I 的绝对强度由原 332.7(图 1)迁跃到 16 000,而

其它噪音信号相对强度均低于 20%。显然,图 2 是能真实反映 An I 特性的质谱图谱。在游离状态和甲醇环境下,部分 An I 很容易自身形成多肽聚体,例如:二聚体、三聚体和四聚体。在 m/z 位于 2 588.91 处(图 2),发现一个弱的质谱峰,经计算,认为是 An I 的二聚体,它比理论计算值 2 593.00 少了 4.09 质量单位,相对误差为 0.158%。近期的实验结果表明,An I 能以 $[M]^+$ 、 $[2M]^+$ 、 $[3M]^+$ 和 $[4M]^+$ 方式显示出各自特征质谱峰,其 m/z 分别位于 1 296.5、2 593.0、3 889.5 和 5 186 处,而图 2 却只显示出单体(m/z :1 297.48)和二聚体(2 588.91)的质谱峰。这些现象说明,解吸离子化二聚体所需要的激光强度应高于单体,激光强度 2 000 IU 无法解吸离子化 An I 样品中的三聚体和四聚体。

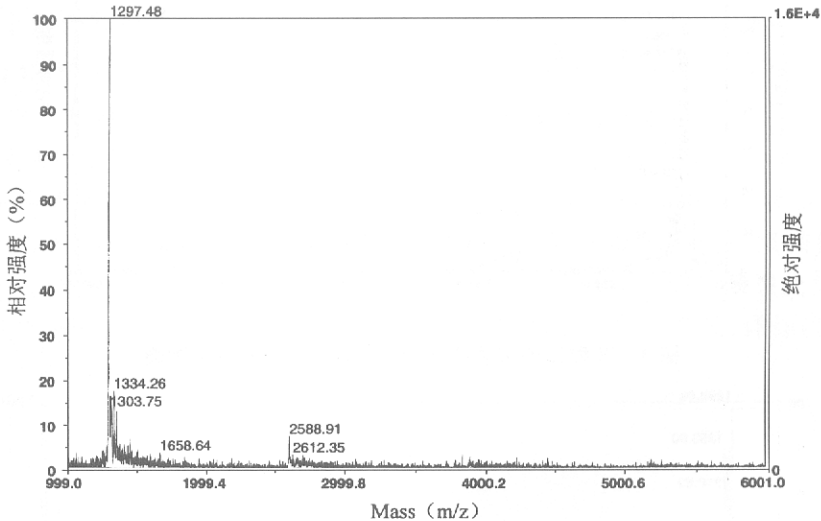


图 2 在激光强度为 2 000 IU 条件下,An I 的质谱图

2.2 中激光强度对 An I 解吸离子化的影响

用 MALDI-TOF 质谱测定生物大分子过程中,基质不仅对分析物起溶剂作用,而且还起着接受激光能量,并在转化成基质离子的同时,传递能量给分析物,形成分子离子等作用^[9,10],因而激光强度高对提高分析物的解吸离子化的百分率起着至关重要的作用。当激光强度提高到 2 200 IU 时,可获得与图 1、2 不同 An I 的质谱图谱(图 3),其 An I 绝对强度由原 332.7

(1 900 IU)剧升到 56 000。此时,An I 以 $[M]^+$ 、 $[2M]^+$ 、 $[3M]^+$ 和 $[4M]^+$ 聚合方式显示出各自特征质谱峰,其 m/z 分别是 1 296.69、2 594.15、3 889.84 和 5 186.20,经计算其理论值和测定值的绝对误差分别为 0.014%、0.121%、0.087% 和 0.003%。这一现象再次说明,多肽多聚体的数目越多,所需要解吸离子化的激光强度越强。

用 MALDI-TOF 质谱测定多肽、酶和蛋白质

过程中会有两种质量歧视:一方面是样品制备的原因,另一方面是仪器的原因^[9,10]。如果考虑到仪器方面的因素,激光强度、加速电压、解吸离子化程度、飞行时间和检测器类型等因素均可能产生质量歧视现象。如果待测分子量分布范围越宽,质量歧视就越严重。图3所显示的4种相同An I分子结构,不同多聚体混合物中,如果某一种多聚体的m/z表现出质量歧视现象,这是一种很正常的质谱行为。如果选用过高的激光强度用于分析物的解吸离子化,其获得质谱峰中所表现的质量歧视现象将随着激光强度提高而趋于明显。

2.3 强激光强度对 An I 解吸离子化的影响

图4是激光强度为2 500 IU条件下所获得 An I 质谱图谱,其中 An I 的绝对强度跃到62 000。实验表明,当激光强度继续上升到 2 600 或 2 700 IU,其 An I 所呈现的绝对强度仍然停留在 62 000 ± 400 范围内,这说明当激光强度为 2 600或 2 700 IU 时,在激光束所能够覆盖的范围内,An I 百分之百被解吸离子化为分子离子。从图4可分析出,过强的激光强度不仅不能提高多肽组成的分辨率,反而引起部分多肽丢失一些基团,由原来的简单的[M]⁺、[2M]⁺、[3M]⁺和[4M]⁺质谱峰形成复杂的质谱峰群,

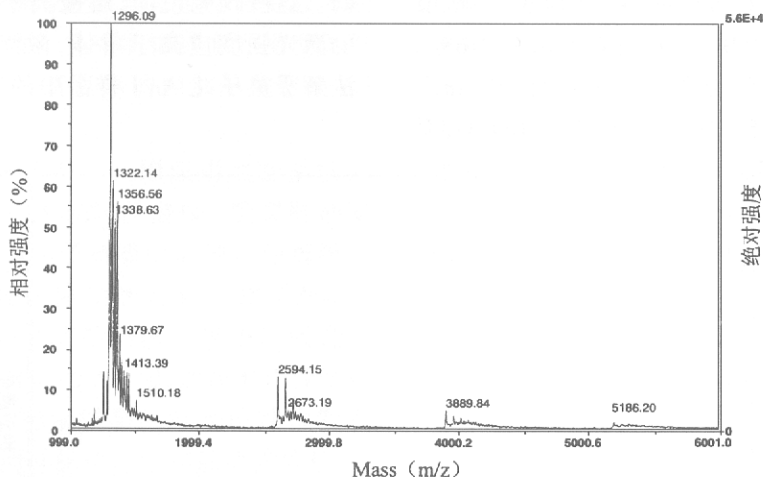


图3 在激光强度为 2 200 IU 条件下,An I 的质谱图

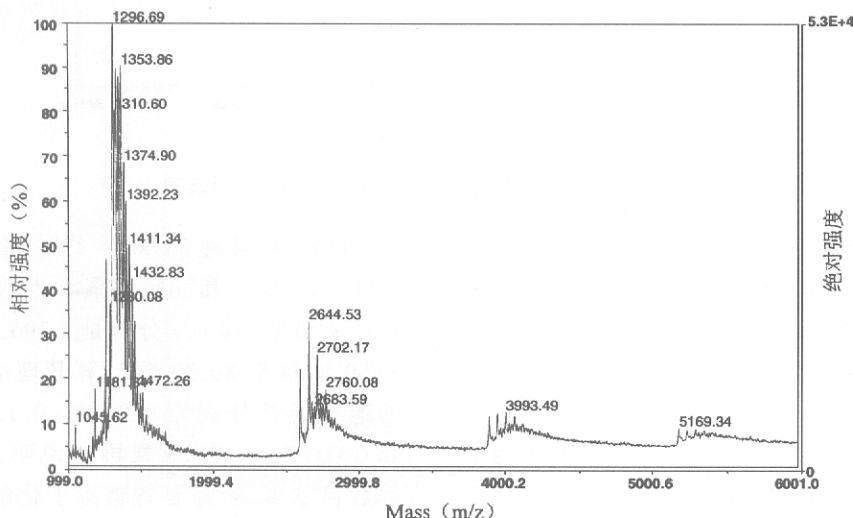


图4 在激光强度为 2 500 IU 条件下,An I 的质谱图

表现出严重的质量歧视现象,并相应地提高噪音强度,给准确性分析样品质谱特性带来一定的难度。这些现象说明,过高的激光强度会引起多肽或者多肽多聚体的分解,形成一系列新的分子离子,呈现许多难以置信的新短肽质谱峰。反之,使用过低的激光强度无法完全解吸离子化多肽成为分子离子,影响测定结果的准确性。在进行 MALDI-TOF 质谱分析过程中,通过分析样品所呈现的绝对强度高和样品质谱峰数目的增减(图 1~4),可较为科学地优化实验过程所需要的最佳激光强度,避免带来人为的实验误差,提高实验准确率。优化激光强度是准确分析样品质谱特性的关键因素之一。

2.4 混合多肽物的质谱特性 AP、AI C₉ 和 An I 三者(单电荷分子离子)所对应的质谱峰峰位位于 m/z 2961.5、1713.9 和 1296.5 处。图 5 是 AP、AI C₉ 和 An I 混合物所显示的激光质谱图。根据 AP、AI C₉ 和 An I 的 m/z 和图 5 结果,可获得表 1。从图 5 和表 1 中可知, MALDI-TOF 质谱技术除了提供分子质量的信息外,还能反映多肽多聚体结构变化和多电荷分子离子的分布情况。AP、AI C₉ 和 An I 混合后,其 An I 呈现了 4 种不同聚合体的多肽质谱峰,其多肽相对强度随着多肽聚合数目递增而显著下降。这一现象说明, An I 容易以聚合肽方式并存,其

多聚体所对应的 m/z 和质谱峰峰位,并不受其它多肽化合物干扰。AI C₉ m/z 是 1713.9, 而图 5 显示的单电荷 AI C₉ m/z 却只有 1695.16, 少了 18~19 质量数,相当于少了一分子 OH⁻ (17 质量数)。近期研究表明,在单一 AI C₉ 体系中,该多肽的分子离子峰位于 1714.9 [M + H]⁺, 而不是位于 1695.5。由此看来,在多肽混合体系中,当 AI C₉ 受激光解吸离子化过程中,可能受其它多肽或因素的影响,瞬时失去了一分子 OH⁻。

表 1 在激光强度为 2300 IU 条件下混合多肽的质谱特性

多肽	结构模型	理论分子量(u)	测量值(m/z)	相对误差(ppm)	绝对误差(%)
An I	[M] ⁺	1296.50	1296.70	154	0.02
	[2M] ⁺	2592.00	2590.77	475	0.05
	[3M] ⁺	3889.50	3889.62	-31	0.003
	[4M] ⁺	5184.00	5186.47	-476	0.05
AP	[M + H] ⁺	2961.50	2961.02	-162	0.016

在多肽混合体系中,2300 IU 的激光强度仍然可引起部分 AP 分解,并被解吸离子化成分子离子。经分析后,形成 3 种新多肽分子离子,显示了 4 种可能的多肽一级结构(图 5,表 2),其中 3 种多肽酰氨键的断裂处集中靠近 AP 一级结构的中部和 N 端处,详细机理有待于进一步研究。

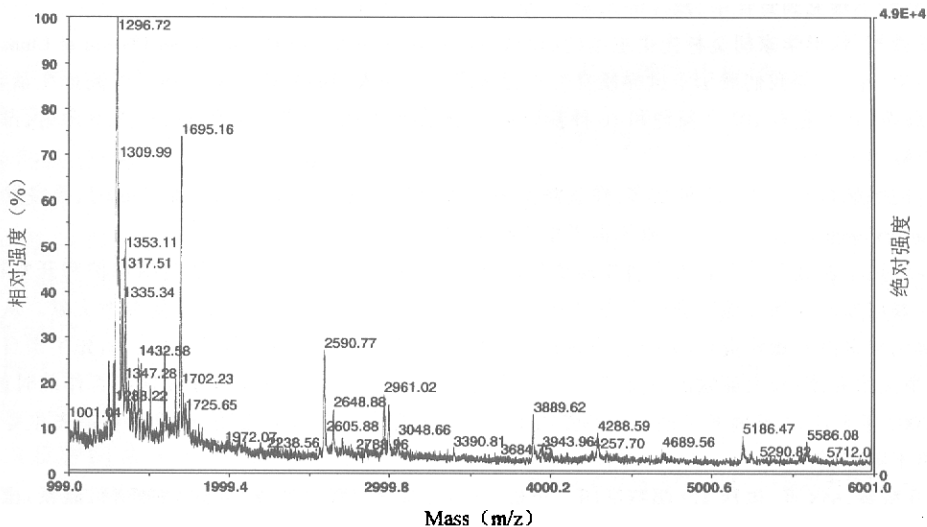


图 5 在激光强度为 2300 IU 条件下,混合多肽的质谱图

表 2 在混合多肽和激光强度为 2 300 IU 条件下, AP 分解产物的特性

理论分子量(u)	测量值(m/z)	相对误差(ppm)	绝对误差(%)	一级结构
2 961.50	2 961.02	162	0.016	SSGVSLTNSNKDEEQRELLKAINLLD
1 315.50	1 317.51	- 1 527	0.157	EEQRELLKAIS
1 432.00	1 432.58	- 405	0.04	DEEQRELLKAIS
1 432.00	1 432.58	- 405	0.04	EEQRELLKAISN
2 645.00	2 648.50	- 1 323	0.132	SGVSLTNSNKDEEQRELLKAISNL

参 考 文 献

- [1] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000, **405**: 837 ~ 846.
- [2] Parekh R. Proteomics and molecular medicine. *Nature Biotechnology*, 1999, **17**: 19 ~ 20.
- [3] Barbacci D C, Edmondson R D, Rusell D H. Evaluation of the variables that affect resolution in delayed extraction MALDI-TOF. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Process*, 1997, **165/166**: 221 ~ 235.
- [4] Hummon A B, Huang H Q, Sweedler J V. A novel prohormone processing site in *Aplysia californica*: the Leu-Leu rule. *J of Neurochemistry*, 2002, **82**: 1 398 ~ 1 405.
- [5] Chaurand P, Luetzenkirchen F. Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization and MALDI-post-source decay time of flight mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1999, **10**: 91 ~ 103.
- [6] Marquet P, Lachatre G. Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. *Journal of Chromatography*, 1999, **773**: 93 ~ 118.
- [7] Costello C E. Bioanalytical applications of mass spectrometry. *Analytical Biotechnology*, 1999, **10**: 22 ~ 28.
- [8] Benard S, Arohold J, Lehener M, et al. Experimental towards quantification of saturated polyunsaturated diacylglycerols by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1999, **100**: 115 ~ 125.
- [9] 何美玉. 离子化方法, 现代有机与生物质谱. 北京: 北京出版社, 2002. 20 ~ 27.
- [10] 黄河清, 孔波, 林庆梅等. MALDI-TOF 质谱技术研究铁蛋白蛋白壳表层的电荷分布. *生物物理学报*, 2002, **18**: 99 ~ 103.