

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00241

基于母离子排除的串联质谱数据采集方法的研究

米薇¹ 王晶¹ 应万涛² 贾伟² 蔡耘² 钱小红^{*2}

¹ (中国计量科学研究院生物能源环境所, 北京 100013)

² (北京蛋白质组研究中心, 蛋白质组学国家重点实验室, 北京放射与辐射医学研究所, 北京 102206)

摘要 生物样本中的蛋白质复杂程度很高, 尚无一种分析方法能够全面分析复杂生物样本中的所有蛋白质。实验证明: 重复的质谱分析能增加蛋白质的鉴定数量, 但鉴定到的蛋白质冗余度很高, 高丰度肽段被反复检出。为了降低鉴定冗余度, 提高鉴定效率, 对线性离子阱傅立叶变换离子回旋共振质谱仪的串联质谱采集方法进行了研究, 建立了基于母离子排除的串联质谱采集方法。此方法能极大降低二级质谱采集的冗余度, 提高蛋白质的鉴定效率。

关键词 液相色谱 串联质谱; 母离子排除列表; 串联质谱数据采集

1 引言

蛋白质组采用高通量的蛋白质组学技术研究生物体内尽可能多乃至接近所有的蛋白质, 从而获得对生物体生理、病理等过程的全面认识^[1]。这种研究策略依赖于强大的分离和鉴定技术手段^[2,3]。常用的 2-DE 分离和质谱鉴定联用技术能实现对几千种蛋白的分离分析^[4,5]。但由于其有限的动态范围^[6]、对极端蛋白歧视等因素^[7], 限制了该方法的进一步发展。随着液质联用技术的发展, 基于多维液相色谱串联质谱联用的 Shotgun 技术迅速发展^[8,9], 并广泛应用于蛋白质表达谱、修饰谱等的研究^[10]。

随着质谱仪以及质谱分析技术的发展, 串联质谱的数据采集效率得到了提高, 例如线性离子阱增加了采集到的二级质谱 (MS/MS) 图谱数。液质联用质谱仪采用了智能化的数据采集模式, 利用动态排除技术能对一些低丰度离子进行多级质谱分析^[11,12]。虽然这些技术能增加肽段的鉴定数, 但随着待测生物样本复杂程度的增加, 串联质谱在有限的扫描时间内无法分析所有共洗脱肽段, 质谱分析时的离子抑制效应也越来越显著^[13], 导致无法检测许多肽段。为提高蛋白的鉴定效率, 采用多次重复 LC-MS 实验提高低丰度蛋白的鉴定率^[14]。虽然该方法在一定程度上能有效增加蛋白质鉴定数量, 但冗余度很高, 高丰度蛋白被重复鉴定。有研究利用离子排除列表^[15], 在 MALDI-TOF-TOF 的分析中将一些已经鉴定过的肽段列入排除列表, 提高低丰度离子的鉴定率。

本研究以酵母蛋白酶切肽段为样本, 利用高准确度的线性离子阱傅立叶变换离子回旋共振质谱 (LTQ-FT), 采用母离子排除方式进行串联质谱采集。结果表明, 这种采集方法能成功排除已经鉴定过的肽段, 避免了高丰度蛋白的重复鉴定, 降低了重复实验的冗余度, 提高了质谱的鉴定效率。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

电喷雾线性离子阱傅立叶变换离子回旋共振质谱仪 (ESI-LTQ-FTICR-MS, Thermo Finnigan 公司), 毛细管色谱由安捷伦 1100 系统控制。乙腈 (色谱纯, 美国 J T Baker 公司); 电泳试剂 (GE 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 酵母蛋白样品制备 称取 200 mg 酵母粉于 1 mL 裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 5% SDS, 5% 甘油, 50 mmol/L DTT, 蛋白酶抑制剂) 中, 在冰浴上超声提取酵母蛋白。Bradford 法测定蛋白浓度。样品置于 -80 °C 保存。

2009-08-20 收稿; 2009-11-09 接受

本文系国家高技术研究发展计划 (No. 2006AA02A308)、国家重点基础研究发展计划 (No. 2006CB910801)、国家自然科学基金 (No. 20735005)、国家科技重大专项 (No. 2008ZX08012-003) 和国家科技支撑计划 (No. 2006BAK04A02) 资助

* E-mail: qianxh1@yahoo.com.cn

2.2.2 一维凝胶电泳实验 (SDS-PAGE) 电泳条件为 4% 浓缩胶, 13% 分离胶, 先于 10 mA 恒流运行 0.5 h, 再于 20 mA 运行至溴酚蓝前沿到达分离胶底部。染色方法为考马斯亮蓝 R-250 染色。

2.2.3 蛋白质胶内酶切 用干净的解剖刀将胶粒切成 $1 \sim 2 \text{ mm}^2$ 的胶块。用胰酶进行胶内酶解, 酶切后提取肽段。

2.2.4 LC-MS/MS 分析 色谱洗脱在二元泵系统进行, 洗脱下来的组分经过 ESI 离子源直接进入质谱, 流动相 A: 0.1% 甲酸-98% 水溶液; 流动相 B: 0.1% 甲酸-80% 乙腈溶液。洗脱梯度为: 5% ~ 40% B, 90 min; 40% ~ 100% B, 10 min; 100% B, 5 min; 100% A, 平衡 15 min。上样体积为 20 μL , 流速为 300 nL/min。

从反相柱流出的洗脱组分由纳升级电喷雾接口喷出, 电喷雾电压 1.8 kV, 离子传输毛细管温度 200 $^{\circ}\text{C}$; 串联质谱分析采用全扫描 (Mass range, m/z 400 ~ 2000) 一级质谱数据依赖的二级质谱扫描模式 (Data dependent MS/MS scan), 依次选取一级质谱中离子强度最强的 5 个离子进行 CD 串联质谱, 归一化碰撞能量为 35%; 采用串联质谱扫描的动态排除功能 (Dynamic exclusion), 设置排除时间为 60 s。

2.2.5 数据库检索 原始文件通过软件 DTA SuperCharge 合并成 mgf 文件, 使用 Mascot (版本 1.9) 检索 mgf 文件。检索参数: 数据库为 Swiss-Prot database, 物种为酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*); 半胱氨酸酰基化修饰 (+57.0214 Da), 甲硫氨酸 (Met) 氧化 (+15.99 Da) 设置为可变修饰。最大漏切位点为 1 个, 一级母离子误差 20×10^{-6} , 二级碎片离子误差 0.8 Da。

3 结果与讨论

3.1 制备母离子排除实验样品

样品为经过预分离的酵母蛋白酶切肽段。预分离方法是将酵母蛋白提取物进行电泳分离 (图 1), 考马斯亮蓝染色后选取中间 4 条泳道, 每个泳道切取 7 个条带, 相同位置的条带合并。酶切后样品用于质谱分析。

3.2 母离子排除法方法的建立

重复的 LC-MS/MS 能增加肽段的鉴定数量, 但大部分高丰度肽段被反复测定, 冗余度高, 而低丰度肽段的检出率却没有明显增加。LTQ-FT 系统能够根据一级扫描选择母离子进行二级质谱分析, 这种母离子选择可以根据离子排除列表进行。因此, 基于高可信度的鉴定结果, 设计了应用于线性离子阱离子回旋共振质谱 (LTQ-FT) 的母离子排除串联质谱采集方法, 具体的流程如图 2 所示。排除列表中母离子选择的是第一次 LC-MS/MS 鉴定到的高可信度肽段 (置信度 95%), 以肽段的质荷比 (m/z) 形式表示, 并且设定误差范围。

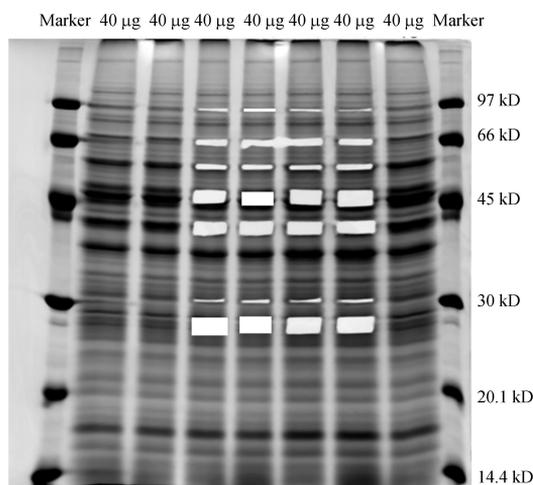


图 1 酵母提取蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig 1 SDS-PAGE of yeast proteins

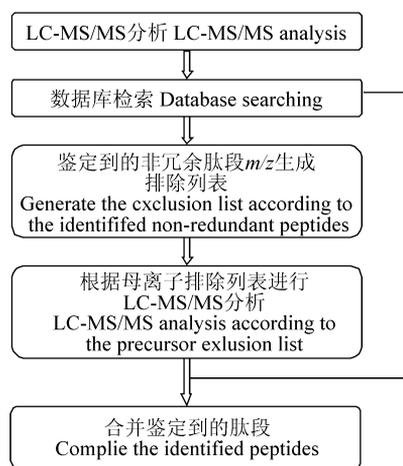


图 2 母离子排除法流程图

Fig 2 Workflow of exclusion list strategy

选取合适的误差范围是基于母离子排除的串联质谱采集方法的关键因素。本研究对 LTQ-FT 的数据进行了分析,大部分肽段的误差范围在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 以内(图 3),这依赖于 LTQ-FT 质谱的高准确度。比较排除列表和用母离子排除后的质谱鉴定结果发现,当误差范围设定为 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 时,排除列表中 297 个母离子中只有 41% 成功排除,而 59% (即 175 个母离子) 被重复鉴定。这可能由于误差范围窗口太窄,不利于母离子排除。而当误差范围设定为 $\pm 20 \times 10^{-6}$ 时,297 个母离子中 87% (即 258 个) 成功排除(图 4)。分析没有被排除的 40 个母离子的质荷比 (m/z),有 33 个是由于母离子电荷状态发生变化造成的。这是因为排除列表中的 m/z 是按照第一次鉴定结果设定的,少部分肽段在第二次质谱分析时带电状态发生了变化。本研究将排除列表中母离子误差范围设定为 $\pm 20 \times 10^{-6}$,建立了母离子排除的质谱采集方法。实验表明,列表中的离子基本上能得到成功排除,鉴定冗余度降低。

3.3 母离子排除法质谱扫描方式与重复 LCMS/MS 法的比较

对酵母肽段的一个组分进行了 LCMS/MS 母离子排除实验和重复实验(图 4)。结果表明,第一次 LCMS/MS 鉴定了非冗余肽段 420 个,在母离子排除实验中鉴定了非冗余肽段 202 个,与第一次结果合并除去重复鉴定到的 50 个肽段,总共鉴定到非冗余肽段 572 个。而重复 LCMS/MS 实验鉴定到了 425 个非冗余肽段,与第一次 LCMS/MS 结果合并,共鉴定非冗余肽段 517 个。实验发现,重复 LCMS/MS 实验鉴定到 338 个重复肽段占质谱鉴定肽段数的 80%,冗余度非常高,一次重复实验只增加了 20% 的肽段数。而母离子排除实验鉴定的冗余肽段很少,只占 12%,肽段数增加了 36%,重复上述比较实验,得出结果类似。可见基于母离子排除的串联质谱采集方式与重复 LCMS/MS 实验的效率相比较,前者更高一些。

3.4 小结

采用酵母蛋白酶切肽段为样本,利用高准确度的 LTQ-FT 对串联质谱的采集方法进行了研究。根据第一次质谱分析鉴定到的高可信度肽段 m/z 值生成母离子排除列表,第二次质谱分析根据列表进行选择性的二级质谱数据采集。比较了误差范围对母离子排除实验的影响,确定了 $\pm 20 \times 10^{-6}$ 的误差范围。采用此误差范围,母离子排除列表中的离子能成功排除。另外还比较了母离子排除实验与重复 LCMS/MS 实验的质谱鉴定效率,结果表明,采用母离子排除列表进行串联质谱采集能降低重复实验带来的高冗余度,可提高蛋白的鉴定效率和序列覆盖率。基于母离子排除的串联质谱数据采集方法可应用于低丰度蛋白以及翻译后修饰蛋白的研究。然而,此方法只利用了母离子的 m/z 值进行肽段排除,可能会造成一些 m/z 值相同的不同肽段未被质谱采集。在以后的研究中,可发展相应软件加入液相保留时间参数,利用高可信度肽段的保留时间和 m/z 值两个参数进行母离子排除,将会提高该方法的准确性和应用性。

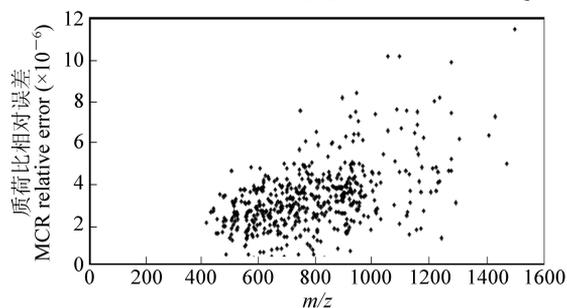


图 3 LTQ-FT 质谱扫描鉴定的肽段的质荷比准确度分布
Fig 3 Mass accuracy distribution of peptides identified by linear ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (LTQ-FT)

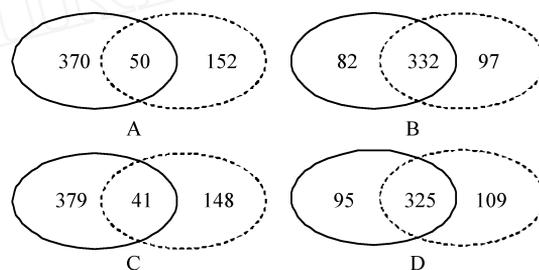


图 4 母离子排除实验与重复实验的效率比较
Fig 4 Comparisons of identification efficiency by employing different MS/MS acquisition method
A. 一次 LCMS/MS (左) 与母离子排除实验鉴定的非冗余肽段 (右) 的比较示意 (The comparison of the unique peptides identified by a LCMS/MS analysis (left) and an exclusion of precursor ions analysis (right), respectively); B. 一次 LCMS/MS (左) 与重复 LCMS/MS 实验鉴定的非冗余肽段 (右) 的比较示意 (The comparison of unique peptides identified by a LCMS/MS analysis (left) and a replicate LCMS/MS analysis (right), respectively); C 和 D 分别为 A 和 B 的重复实验 (C and D were the replicate MS/MS analysis of A and B).

References

- 1 Pan S, Zhang H, Rush J, Eng J, Zhang N, Patterson D, Comb M J, Aebersold R. *Mol Cell Proteomics*, **2005**, 4(2): 182 ~ 190
- 2 ZHANG Guo-An(张国安), XU Xue-Jiao(许雪姣), ZHANG Su-Yan(张素艳), FAN Hui-Zhi(樊惠芝), YANG Peng-Yuan(杨芃原). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2003**, 31(5): 611 ~ 618
- 3 SU I Shao-Hui(隋少卉), WANG Jing-Lan(王京兰), JIA Wei(贾伟), LU Zhuang(卢庄), LU Jin-Feng(刘金凤), SONG Li-Na(宋丽娜), CAI Yun(蔡耘), QIAN Xiao-Hong(钱小红). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(8): 1017 ~ 1023
- 4 Riedel K, Arevab-Ferro C, Reil G, Gorg A, Lottspeich F, Eberl L. *Electrophoresis*, **2003**, 24(4): 740 ~ 750
- 5 Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. *Electrophoresis*, **2000**, 21(6): 1037 ~ 1053
- 6 Corthals G L, Wasinger V C, Hochstrasser D F, Sanchez J C. *Electrophoresis*, **2000**, 21(6): 1104 ~ 1115
- 7 Santoni V, Molloy M, Rabilbud T. *Electrophoresis*, **2000**, 21(6): 1054 ~ 1070
- 8 Washburn M P, Wolters D, Yates J R, 3rd. *Nat Biotechnol*, **2001**, 19(3): 242 ~ 247
- 9 XUE Xiao-Fang(薛晓芳), WU Song-Feng(吴松锋), ZHU Yun-Ping(朱云平), HE Fu-Chu(贺福初). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(1): 19 ~ 24
- 10 WANG Jing-Lan(王京兰), QIAN Xiao-Hong(钱小红). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2005**, 33(7): 1029 ~ 1035
- 11 Davis M T, Spahr C S, McGinley M D, Robinson J H, Bures E J, Beierle J, Mort J, Yu W, Luethy R, Patterson S D. *Proteomics*, **2001**, 1(1): 108 ~ 117
- 12 Kohli B M, Eng J K, Nitsch R M, Konietzko U. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2005**, 19(5): 589 ~ 596
- 13 Mirzaei H, Regnier F. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(12): 4175 ~ 4183
- 14 Durr E, Yu J, Krasinska K M, Carver L A, Yates J R, Testa J E, Oh P, Schnitzer J E. *Nat Biotechnol*, **2004**, 22(8): 985 ~ 992
- 15 Scherl A, Francois P, Converset V, Bento M, Burgess J A, Sanchez J C, Hochstrasser D F, Schrenzel J, Corthals G L. *Proteomics*, **2004**, 4(4): 917 ~ 927

Tandem Mass Spectrometry Acquisition Strategy Based on Exclusion of Precursor Ions

MI Wei¹, WANG Jing¹, YING Wan-Tao², JIA Wei², CAI Yun², QIAN Xiao-Hong^{*2}

¹ (National Institute of Metrology, Division of Biological, Energy and Environment Measurement, Beijing 100013)

² (State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center,
Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206)

Abstract Due to the complexity of proteome samples, comprehensive analysis to characterize all proteins was still not possible with present methodologies. It has been shown that replicate runs could increase the number of identified proteins. However, the redundancy of protein identifications was high. High-abundant peptides tended to be analyzed repeatedly in different runs. To reduce the redundancy and improve the efficiency of identification, we studied the MS/MS acquisition method of linear ion trap Fourier transform ion cyclotron resonance-mass spectrometry (LTQ-FT) and an acquisition strategy based on exclusion of precursor ions was developed. It proved that the strategy could extremely reduce the redundancy of MS/MS acquisition and improve the efficiency of protein identifications.

Keywords Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry/mass spectrometry; Precursor ion exclusion list, Tandem mass spectrometry acquisition

(Received 20 August 2009; accepted 9 November 2009)