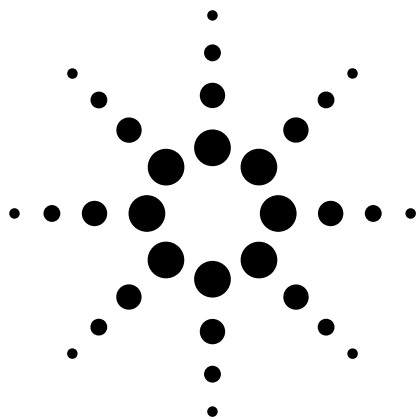




用离子阱液相 / 质谱 / 质谱及蛋白数据库分析多肽磷酸化的位置

液相 / 离子阱质谱

应用简报 5988-0897CHCN

前言

毛细管液相 / 自动质谱 / 质谱越来越被广泛地用于后转移修饰蛋白质的分析。分析过程一般包括蛋白质酶解, 酶解的肽段用毛细管液相分离。当每一个肽段流出时, 智能化的, 相关数据扫描功能可以选择相应的母离子进行碰撞解离(CID)。然后使用概率算法自动的将未解析的蛋白质及肽段质谱 / 质谱与蛋白质和核酸数

据库关联起来, 进行检索。这种技术不仅可以进行自动, 高通量的数据分析, 还可以进行数据库检索, 因为质谱 / 质谱图可以提供指纹水平的氨基酸序列信息。

本文使用上述方法分析磷酸化蛋白质分解消化产物, 从而检测在肽段上磷酸化的位置。



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

实验条件

所有的实验都是在1100毛细管液相/离子阱质谱(LC/MSD Trap)上进行的,其中液相包括毛细管液相泵,自动进样器,柱温箱和真空在线脱气机。离子阱质谱采用的是正离子模式的电喷雾电离源(ESI)。β-酪蛋白(从Sigma购买),用溶解在200 mM碳酸氢铵的胰蛋白酶(从Promega购买)在370℃反应18小时。酶解产物的浓度是42 pmol/μl。

结果与讨论

LC/MSD Trap的一些功能可以改进数据相关性的采集结果。为了尽可能分析最大数目的肽,应设定的域值恰好大于化学噪音。在每一个扫描中最强的肽离子被自动选择进行质谱/质谱分析。如果色谱极其复杂,可能有共流出干扰物,因此相关的多肽就不能被分析。为了解决此问题,母离子的数目可选2,这样,质谱/质谱就可以分析两个最强的母离子。若有必要,离子的数目可以设定更高。

设定一个3 m/z的同位素-排除窗口以防止质谱/质谱采集¹³C的多肽离子。使用“母离子的数目”及同位素-排除大大减少了重复,从而提高了数据采集效率。

因此,在质谱/质谱分析过程中,大大增加了被选择的多肽离子,包括以前常常被遗漏的低强度的离子。

图1所示为牛β-酪蛋白的胰蛋白酶酶解产物的毛细管液相/自动多极质谱的色谱图。总进样量为4 pmol。图1A是液相/质谱的酶解产物基峰色谱图。

分析方法	
液相/质谱/质谱	
色谱柱:	ZORBAX 300SB-C18, 150 x 0.3 mm, 5 μm
流速:	5.5 μl/min
进样体积:	100 nl
流动相:	A = 0.1% 甲酸溶液 B = 0.1% 甲酸的乙腈
梯度:	梯度5% B 在0分钟, 在55分钟至55% B, 从55分钟至57分钟85% B
二极管阵列检测器:	检测波长 206, 10 nm 参比波长 450, 80 nm
质谱条件	
电离源模式:	电喷雾电离源
干燥气:	7 L/min
雾化气压力:	15 psi
干燥气温度:	250℃
锥型体1:	15 V
毛细管出口补偿:	50 V
平均(average):	2
ICC:	on
最大积聚时间:	300 ms
目标 (target):	50000
离子化模式:	正离子化
自动质谱/质谱:	选择母离子的数目: 2
分离离子峰宽:	m/z 1.5
碰撞断裂振幅:	1.0 V

紫外检测波长为206 nm,如图1B所示,肽段在12-39分钟流出。磷酸肽FQpSEEQQQTEDELQDK的出峰时间是17.5分钟。图2及3是m/z 1032的二价离子的质谱和质谱/质谱图。

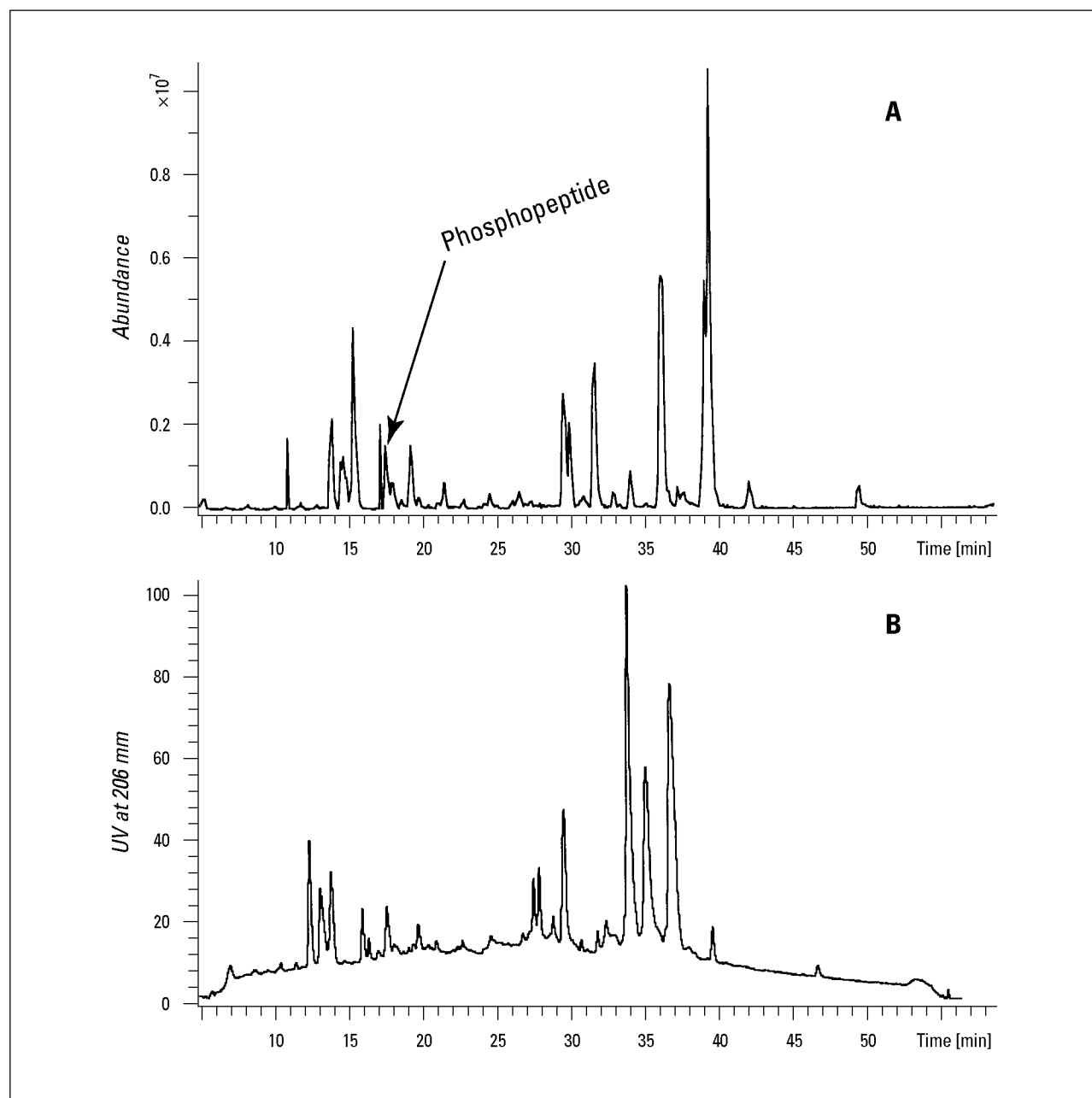


图 1. (A)牛 β -酪蛋白的胰蛋白酶酶解产物的毛细管液相/自动多极质谱的基峰色谱图;(B)在 206 nm 的紫外吸收色谱

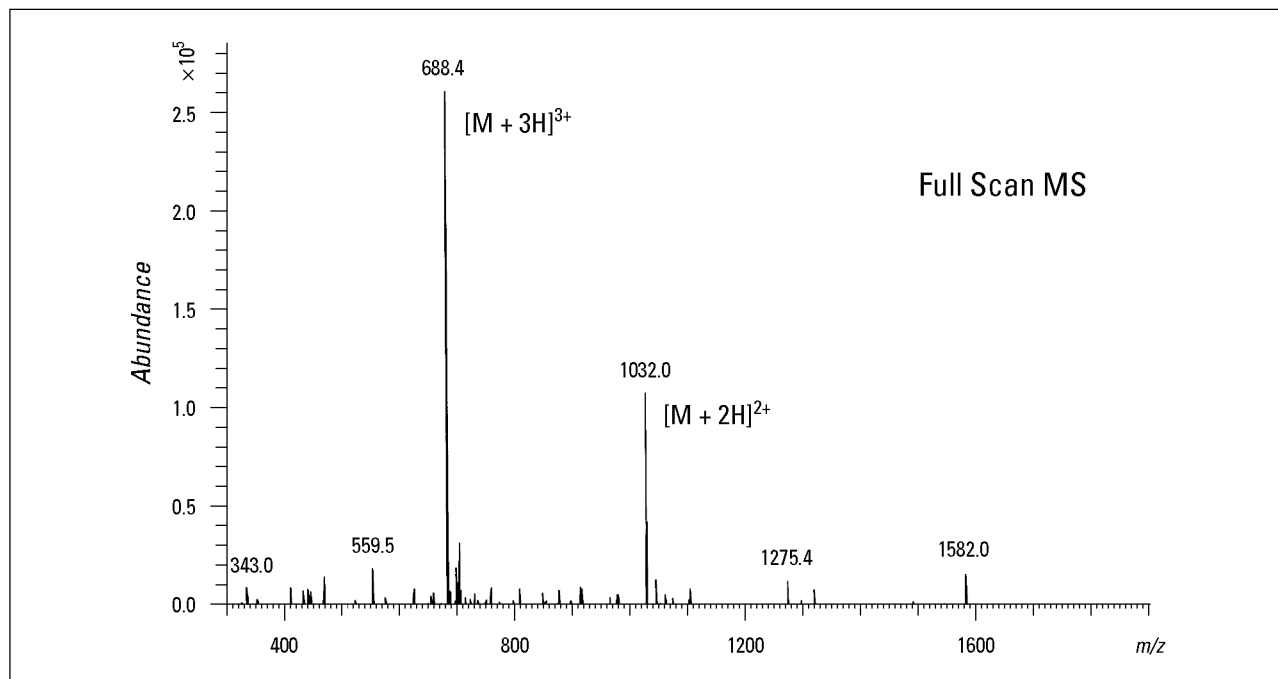


图 2. 牛 β -酪蛋白的胰蛋白酶酶解产物在保留时间 17.5 分钟的峰的质谱 / 质谱图

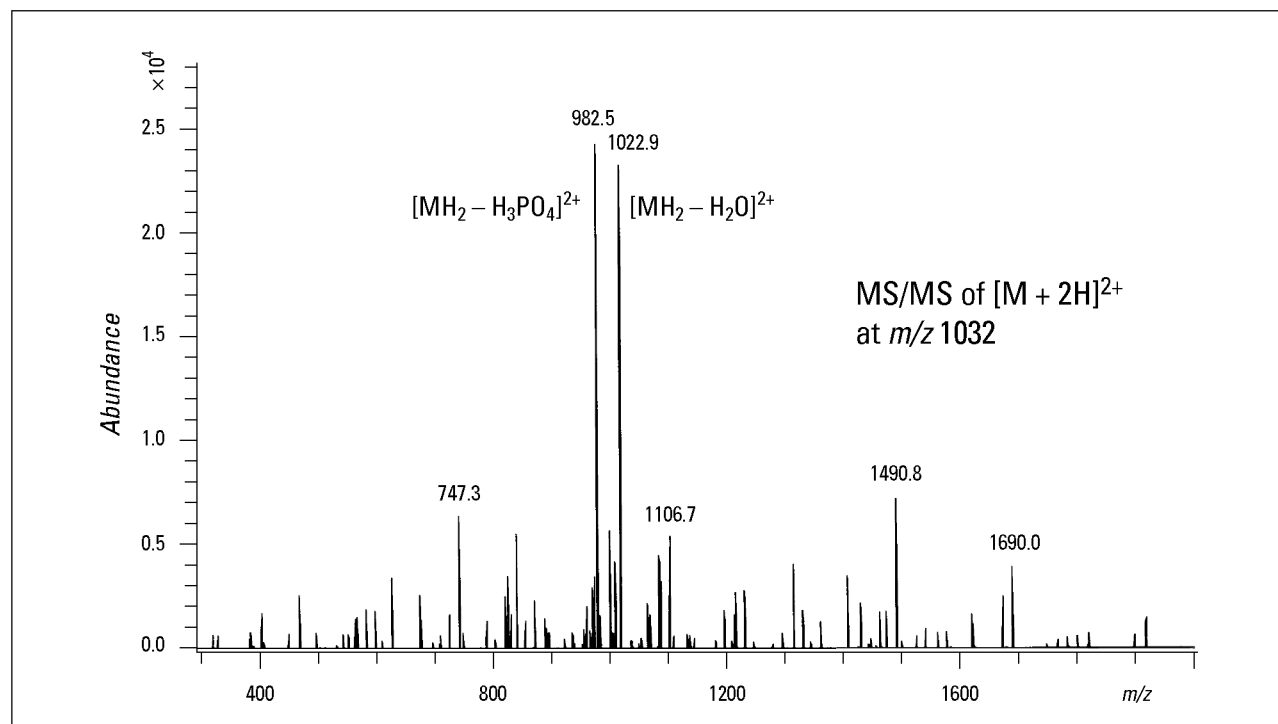


图 3. 磷酸肽 FQpSEEQQQTEDELQDK, m/z 1032 的二价离子 $[M + 2H]^{2+}$ 的全扫描。质谱 / 质谱图, m/z 982.5 为丢失一个 H_2PO_4 , 而 m/z 1022.9 为丢失一个 H_2O

使用MASCOT数据检索程序对得到的质谱/质谱图进行检索。设定的参数尽可能考虑在丝氨酸, 苏氨酸或酪氨酸的磷酸化位置。胰蛋白酶是一种特定性酶。自动MASCOT 检索结果得到唯一一个匹配很高的蛋白质,

牛β-酪蛋白(如图4所示), 以及自动确定单磷酸肽的磷酸化位置, QpSEEQQQTEDELQDK, 如表1 所示。理论计算的被胰蛋白酶酶切的肽段, m/z 2061.89 u与测量到的 m/z 2061.89 u非常一致。

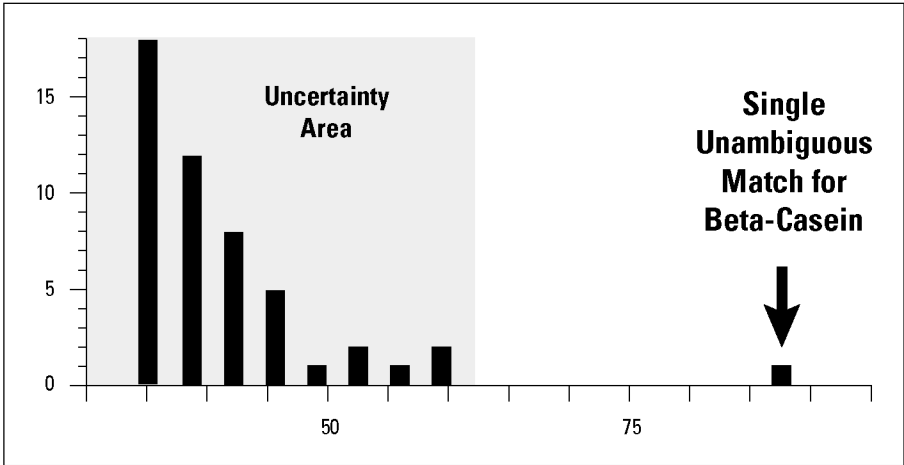


图 4. MASCOT 检索结果显示是牛β-酪蛋白

表 1. MASCOT 数据库检索结果可以鉴定出牛 β-酪蛋白磷酸肽中的磷酸化丝氨酸

Residues	Experimental Mass	Calculated Mass	Sequence
41 – 43	373.29	373.23	INK
44 – 47	516.49	516.33	KIEK
48 – 63	1981.29	1980.85	FQSEEQQQTEDELQDK
48 – 63	2061.89	2061.87	FQpSEEQQQTEDELQDK
113 – 120	872.69	872.48	VKEAMAPK
121 – 128	1013.09	1012.52	HKEMPFPK
192 – 198	829.69	829.44	AVPYPQR
218 – 224	741.59	741.44	GPFPVIV

结论

毛细管液相/离子阱/质谱/质谱及蛋白数据库是非常有效的分析手段。此技术可以在一次色谱分离过程中,进行快速,自动的检测蛋白质和多肽中的磷酸化的位置。相关数据的质谱/质谱采集技术可以增加“母离子数目”用于质谱/质谱分析。计算机算法程序可以根据肽段离子的质谱/质谱图,检测蛋白质和多肽中的磷酸化的位置。

作者

Christine A. Miller and **Linda L. Lopez** are applications chemists at Agilent Technologies in Palo Alto, California, U.S.A.

www.agilent.com/chem

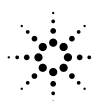
安捷伦科技公司对本材料可能存在的错误或与装置、性能及材料使用有关内容而带来的意外伤害和问题不负任何责任。

本资料中的信息,如有改变,恕不另行通知。

安捷伦科技公司版权所有®, 2001

2001 月 11 月 28 日中国印刷

出版号: 5988-0897EN



Agilent Technologies

Innovating the HP Way