

使用配备电子捕获解离的 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统鉴定氨基酸异构体



作者

Rachel Franklin 和
Joseph Meeuwsen
安捷伦科技有限公司

摘要

准确测定氨基酸序列对于了解蛋白质的结构和功能至关重要。然而，区分亮氨酸 (Leu) 和异亮氨酸 (Ile) 是一项挑战，因为它们是位置异构体，无法使用基于碰撞的传统碎裂技术来区分。基于电子的碎裂通过产生侧链碎片提供了一种有前景的解决方案，这些碎片可用于区分 Leu/Ile 和其他异构体残基，例如天冬氨酸 (Asp) 和异天冬氨酸 (isoAsp)。本应用简报展示了如何使用配备 ExD Cell（用于电子捕获解离）的 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统来鉴定多肽和完整蛋白质中的异构体残基。Agilent ExDViewer 软件可以直观地分析 Q-TOF 数据集中的侧链碎片，增强辨别异构体氨基酸的能力。

前言

人类蛋白质组约有六分之一由异构体氨基酸 Leu 或 Ile 组成^[1]。涉及这些氨基酸的序列变异可以显著影响蛋白质的结构和功能。例如，抗体互补性决定区内 Ile 或 Leu 之间的变化会影响靶标结合的强度^[2]。此外，Asp 自发异构化为 isoAsp 与蛋白质老化和各种疾病有关^[3-5]。因此，通过准确确定异构体氨基酸的种类来减少蛋白质序列分析中的不确定性，对于了解蛋白质功能和疾病机制至关重要。

安捷伦的创新电子解离解决方案 ExD Cell 与单独使用碰撞诱导解离 (CID) 相比，能够对蛋白质序列进行更全面、互补的表征。自由基 z 型离子可以发生氨基酸侧链的次级碎裂，产生 w 离子，可用于区分 Leu 和 Ile^[1,6]。Asp 异构化为 isoAsp 会导致羧基发生转移，这可以检测为与预期的 c 和 z 型离子有 57 Da 的偏移^[4-6]。

本应用简报介绍了使用配备 ExD Cell 进行电子捕获解离的 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 对多肽和蛋白质进行快速、高效的裂解。使用合成肽和完整泛素，在 MS/MS 质谱图中鉴定了异构体氨基酸。尽管用于鉴定异构体残基的免费工具非常少，但 ExDViewer 可以简单且易于解析地注释多肽和蛋白质质谱图中的侧链碎片^[7]。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的灵敏度和碎裂能力与 ExDViewer 相结合进行分析，为包括异构体氨基酸鉴定在内的蛋白质序列的全面表征提供了有效的解决方案。

实验部分

试剂与标准品

- 蜂毒肽/调谐混标调谐标准品甲酸，99.0+%，Optima LC/MS 级（部件号 A-117-50），Fisher Chemical
- 乙腈，LCMS 级，99.9%+，OmniSolv（部件号 AX0156-6），Supelco
- REALLYIsoD 合成肽（部件号 4144889），Bachem
- 牛泛素（部件号 U6253），Sigma
- 安捷伦调谐混标 (G1969-85000)

样品前处理

冻干样品储存于 -20 °C 下以待分析。分析前，将样品在 15% 乙腈和 0.01% 甲酸中复溶。样品的最终浓度为 REALLYIsoD 肽 1 μM 和泛素 10 μM。

仪器

- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
- Agilent ExD Cell (G1997AA)

软件

- Agilent ExDControl 软件版本，v3.6
- 用于 LC/TOF 和 LC/Q-TOF 的 Agilent MassHunter 采集软件，v11.0
- Agilent ExDViewer 软件，v4.5.14

质谱方法

所有样品均使用 500 μL 注射器以 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度直接进样。New Era 注射泵（型号 300）用于进样。使用连接手紧密封垫圈的 PEEK 管线将样品引入安捷伦双喷射流 (AJS) 源的雾化器进样口。使用配备 ExD Cell 的 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 进行质谱分析。在 MassHunter 采集软件 v11.0 中设置了靶向采集方法。使用 ExDViewer v4.5.14 分析碎裂结果。6545XT LC/Q-TOF 的详细仪器参数列于表 1 中。

表 1. Q-TOF LC/MS 数据采集参数

参数	值
Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统	
离子源	安捷伦双喷射流电喷雾离子源
极性	正
气体温度	325 °C
干燥气流速	5 L/min
雾化器	20 psi
鞘气温度	275 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	4000 V (泛素), 3200 V (肽)
喷嘴电压	2000 V
碎裂电压	175 V
锥孔电压	45 V
采集速率	1 质谱图/秒
分离窗口	宽 (9 m/z)
MS1 质谱范围	100–3200 m/z
MS2 质谱范围	120–3200 m/z (泛素) 120–2400 m/z (肽)

ExD Cell 操作

ExD Cell 是 6545XT Q-TOF LC/MS 系统的附加模块，可实现电子捕获解离功能。ExD Cell 使用 ExDControl 软件进行控制，该软件是与 MassHunter 采集软件共同运行的独立软件，用于控制 ExD Cell 电压和灯丝加热电流。ExDControl 具有自动调谐算法，可自动调节 ExD Cell 电压以优化传输或电子捕获解离 (ECD) 功能。

以下步骤用于设置 ExD Cell 异构体分析。首先，施加适当的灯丝加热电流，并让其预热 20 分钟。随后，从 B 瓶进样蜂毒肽/调谐混标。对调谐混标离子进行 ExDControl 自动调谐，以调整 ExD Cell 透镜电压，优化 MS1 传输效率。

优化传输后，分离出蜂毒肽 3+ 前体 (949 m/z)。通过对蜂毒肽碎片质量数进行自动调谐，优化 ExD Cell 进行碎裂的电压。针对蜂毒肽的 ECD 进行优化的池电压曲线对大多数多肽都有效，但是，可能需要额外的调谐标准品来实现蛋白质的最佳 ECD。对于泛素，对内置的泛素 ECD 碎片质量数列表进行自动调谐，大大提高泛素碎片的强度（表 2）。在 ExDControl 中建立 MS1 传输和 MS2 ECD 曲线后，MassHunter 切换到采集环境，并创建靶向采集方法。

表 2. 用于优化传输或 ECD 的 ExD Cell 透镜电压的调谐标准品的汇总。ExDControl 自动调谐算法内置了几个质量数列表，包括调谐混标、蜂毒素和泛素的质量数。然而，也可以创建自定义质量数列表来优化用户定义的质量数列表的强度

ExD Cell 调谐标样		
	MS1 传输	MS2 ECD 碎裂
REALLYisoD (1.9 kDa)	调谐混标	蜂毒肽
泛素 (8 kDa)	调谐混标	泛素

使用 ExDViewer 进行靶向分析

ExDViewer 是一款免费的软件工具，可以对 Q-TOF MS/MS 数据中的所有多肽碎片类型进行可靠的分析。ExDViewer 提供了一种快速直观的方法来分析多肽或大型完整蛋白质的复杂碎裂模式。该软件的一个主要特点是支持注释侧链碎裂模式和 isoAsp 离子。

目标物解卷积工作流程用于将碎裂模式与已知序列进行匹配。靶序列使用目标物编辑器定义，其中指定了序列和最小和最大电荷态。定义目标物后，可以将 .d 文件直接加载到 ExDViewer 中进行目标物解卷积。图 1 显示了目标物解卷积工作流程输入页面的屏幕截图。本文档中的谱图数据使用 ExD 碎裂分析的限制性匹配预设进行处理，并对重叠离子进行迭代多遍匹配。

Input Spectrum Selection Peak Picking Deconvolution Matching

Add Spectra: From file From instrument From manual entry

Input File: .d .raw, .mzML, .mgf, .txt .raw (dir)

Agilent, Thermo, and Waters vendor formats are supported along with open-source and text-based formats.

Input data type: profile centroid read from file

Add Target: From Target Editor From MZID No Target

Variable Modification Search

Batch Analysis

BAD peptide: BclBADp_complex; bcl-XL

	Sequence	Monoisotopic Weight
<input type="checkbox"/> Target name		
<input type="checkbox"/> N protein SR domain	.SGSRGGSQASSSSSRNNSRNSTPGSSRGTPSPARMAGNGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGTENLYFQ.	8271.03809
<input type="checkbox"/> bcl-XL	.SASQSNRELVDFLSYKLSQKGWSQFSDVEENRTEAPEGETSEMETPSAINGNPSWHLADSPAVNGATAHSSLDAREVIPMAAVKQALREAGDEFELRYRRAFSQLTSQ	23393.2793
<input type="checkbox"/> REALLY ISO D	.REALLYDELIGHTFLK.	1917.03601
<input type="checkbox"/> Protein G	.MDPYPLPKTDYKULNGKTLKGETTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTFVTEKPEVIDASELTPAVTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAEKAFQYANI	21429.7598
<input type="checkbox"/> IGF	.MFPAMPLSSLFVGPNR ^{LC} (Dehydro)GAELVDALQF ^{VC} (Dehydro)GDRGFYFNPTGYGSSSRAPQTGIV ^{DEC} (Dehydro) ^C (Dehydro)FRSC(Dehydro)DLRRLEMYC ^{CI}	9105.34863
<input type="checkbox"/> Thioredoxin	.TTFNIODGPDFODRVVNSETPVVVDFAOW ^C (Dehydro)GPC(Dehydro)KILGPRLEKMKAVOHGKVVMAKVDDHTDLAEYEVSAPTVLAMKNGDVVKFVGKD	11858.0439

MS1 m/z Tolerance (ppm): 20.0 MS2 m/z Tolerance (ppm): 20.0

Add Tasks and Presets:

Average Spectrum MS1 MS2

RT tolerance (seconds): 5.0

Peak picking Use centroids and noise threshold from input file

Run baseline filter

Correct precursor m/z and charge if un-reacted precursor found during deconvolution

Re-calibrate m/z based on high-confidence MS/MS fragmentation ions

Use presets **[Deconvolution and Matching Settings are now locked]**

Ion Identification Quality Restrictive Default Permissive

Fragmentation CID ExD

Iterative Matching Single-pass Multi-pass (for overlapping ions)

图 1. ExDViewer 目标物解卷积输入页面。预设匹配设置适用于多种多肽和蛋白质分析物

结果与讨论

Leu/Ile 和 Asp/isoAsp 鉴定

自由基驱动的侧链碎裂导致形成 w 型离子，从而实现 Leu/Ile 的区分。Leu 的 w 离子是由异丙基自由基丢失形成的 ($z - 43$ Da)，而 Ile 对应的 w 离子则丢失了一个乙基自由基 ($z - 29$ Da)。

相反，isoAsp 的形成根据涉及多肽主链的结构变化来检测，这导致 Asp 对应的 c 或 z 离子转移 57 Da ($c + 57$ Da, $z - 57$ Da)。在此，使用序列为 REALLYIsoDELIGHTFLK 的合成肽来演示使用基于电子的碎裂进行 Leu/Ile 和 Asp/isoAsp 鉴定（图 2）。

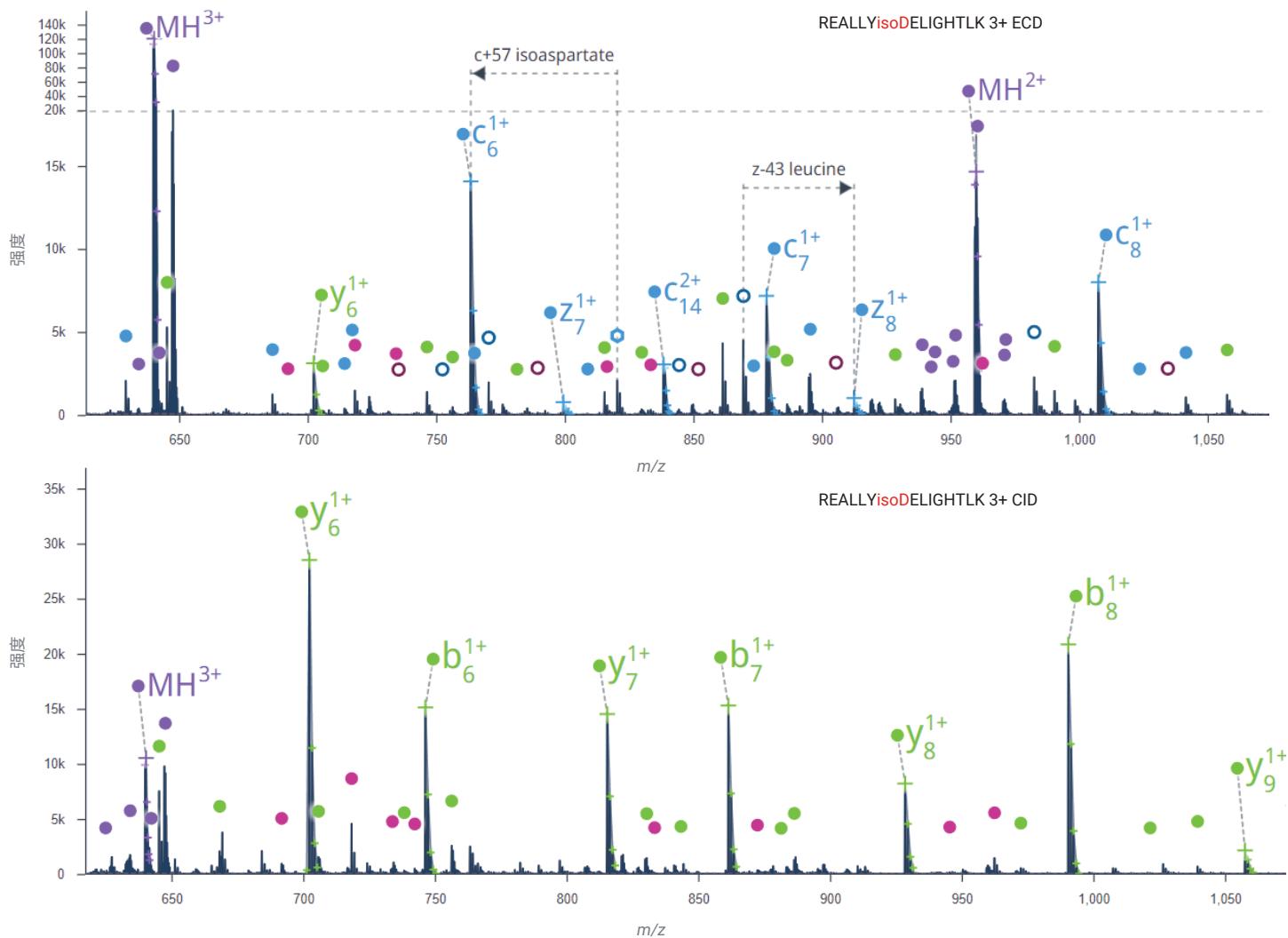


图 2. 顶部质谱图是合成肽 REALLYIsoDELIGHTFLK (1 μ M) 的 ECD 碎裂质谱图。Asp 已被工程化为 isoAsp，并以红色突出显示。异构体碎片证据在质谱图中以文字注释。下图显示的是同一多肽的 CID 质谱图。ECD 类型碎片标记为蓝色，CID 类型碎片标记为绿色，前体离子标记为紫色，a 离子标记为粉色

REALLYIsoDELIGHTFLK 具有五个异构体 Leu/Ile 残基和一个工程化的 isoAsp，可产生 64+ 种具有相同理论 CID 质谱图的可能异构体序列。利用电子碎裂检测侧链碎裂可以唯一地鉴定具有异构体特异性的确切多肽序列。图 2 比较了使用 ECD 或 CID 碎裂的 3+ REALLYIsoDELIGHTFLK 前体的 MS/MS 质谱图。使用 ExDViewer，可以直观地在质谱图中注释 Leu、Ile 和 isoAsp 的诊断离子。电荷减少的前体也得到了注释。

图 3 研究了 ECD 之前的碰撞活化对 Leu/Ile 和 isoAsp 诊断离子检测的影响。在电子捕获之前，对 3+ REALLYIsoDELIGHTFLK 前体施加了一系列碰撞能量。总体而言，随着碰撞能量的增加，离子强度下降。与对碰撞活化更敏感的 4+ 前体相比，3+ 前体的强度下降更为缓慢。这些结果表明，单独使用 ECD 对检测该示例多肽的诊断离子最有效。

自上而下的 MS/MS 异构体测定

与传统的多肽分析不同，自上而下的质谱法涉及整个蛋白质的测序，而无需预先进行酶解。避免酶解可减少样品前处理步骤，节省时间，同时大大降低引入干扰的风险。重要的是，自上而下的分析能够表征无法使用酶解肽混合物来确定的独特蛋白质形式。在此，采用自上而下的分析来表征完整泛素中的异构体。直接进样 10 μ M 泛素，并使用靶向采集方法进行分析。选择 11+ 前体进行分离，并在 ExD Cell 中进行 ECD。以 1 质谱图/秒的速度采集数据，总计 1 分钟。11+ 前体的高效碎裂带来 99% 的序列覆盖率并区分 10/16 个异构体 Leu 和 Ile 残基。此外，还鉴定了 isoAsp 的 c 和 z 离子，表明在氨基酸位置 39 和 52 处存在 isoAsp。图 4 显示了在 ExDViewer 中生成的序列覆盖图，使用户能够以交互方式探索支持目标序列的碎片证据。图 5 突出显示了 350 m/z 宽的泛素碎裂质谱图切片，其中含有丰富的 ECD 离子和 w 离子，可用于鉴定 Leu 和 Asp。

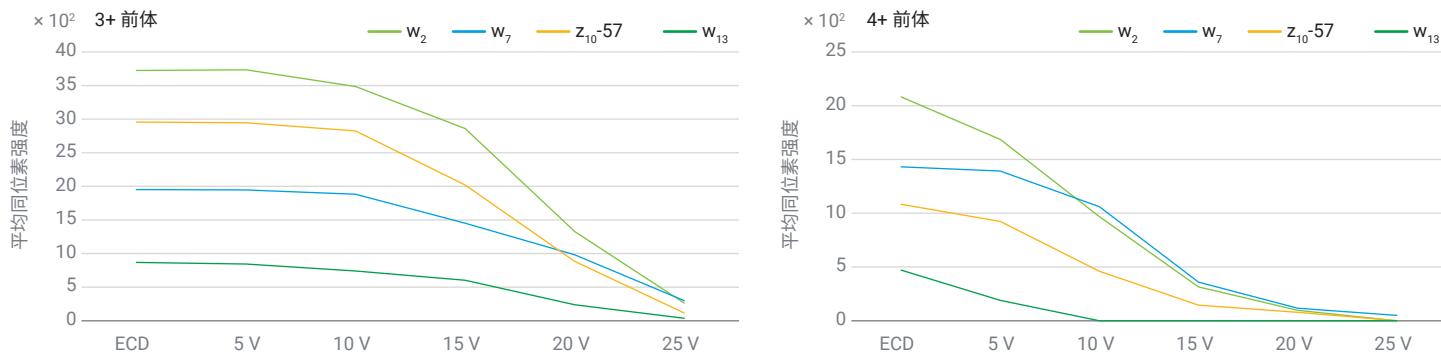


图 3. REALLYIsoDELIGHTFLK 异构体诊断离子强度。W₂、W₇、Z₁₀-57 和 W₁₃ 的平均离子强度被绘制为碰撞能量的函数

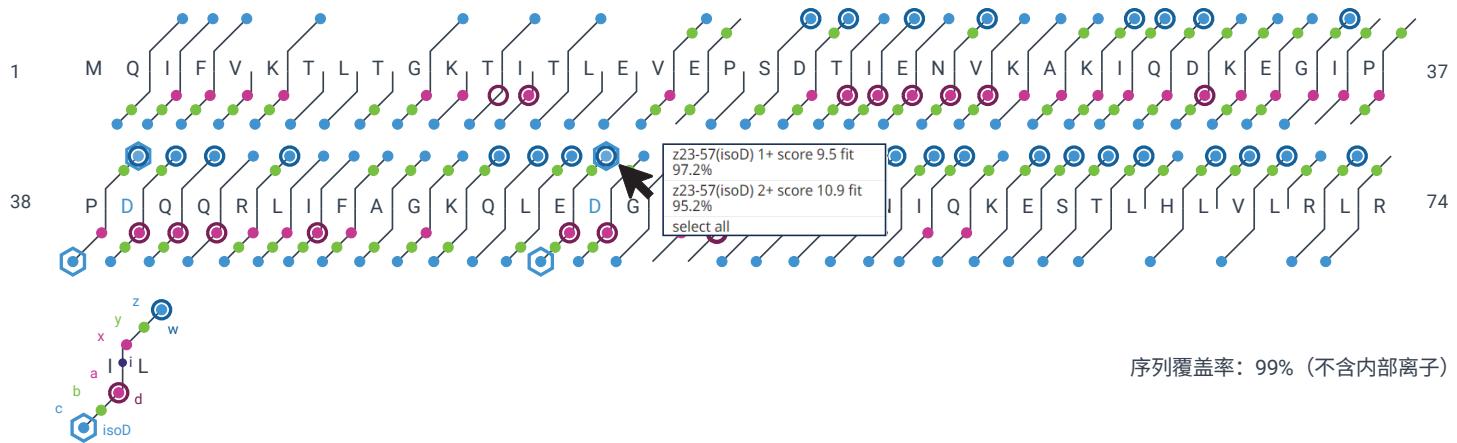


图 4. ExDViewer 生成的序列覆盖图。每个颜色的点代表不同类型的离子。CID 和 ECD 类型主链碎片离子与侧链碎裂和 c/z isoAsp 离子共同注释。信息工具提示显示检出的每个碎片的离子类型、电荷态以及评分。这里，工具提示表明检出了 isoAsp 离子 $z_{23} - 57$ 的两个电荷状态。

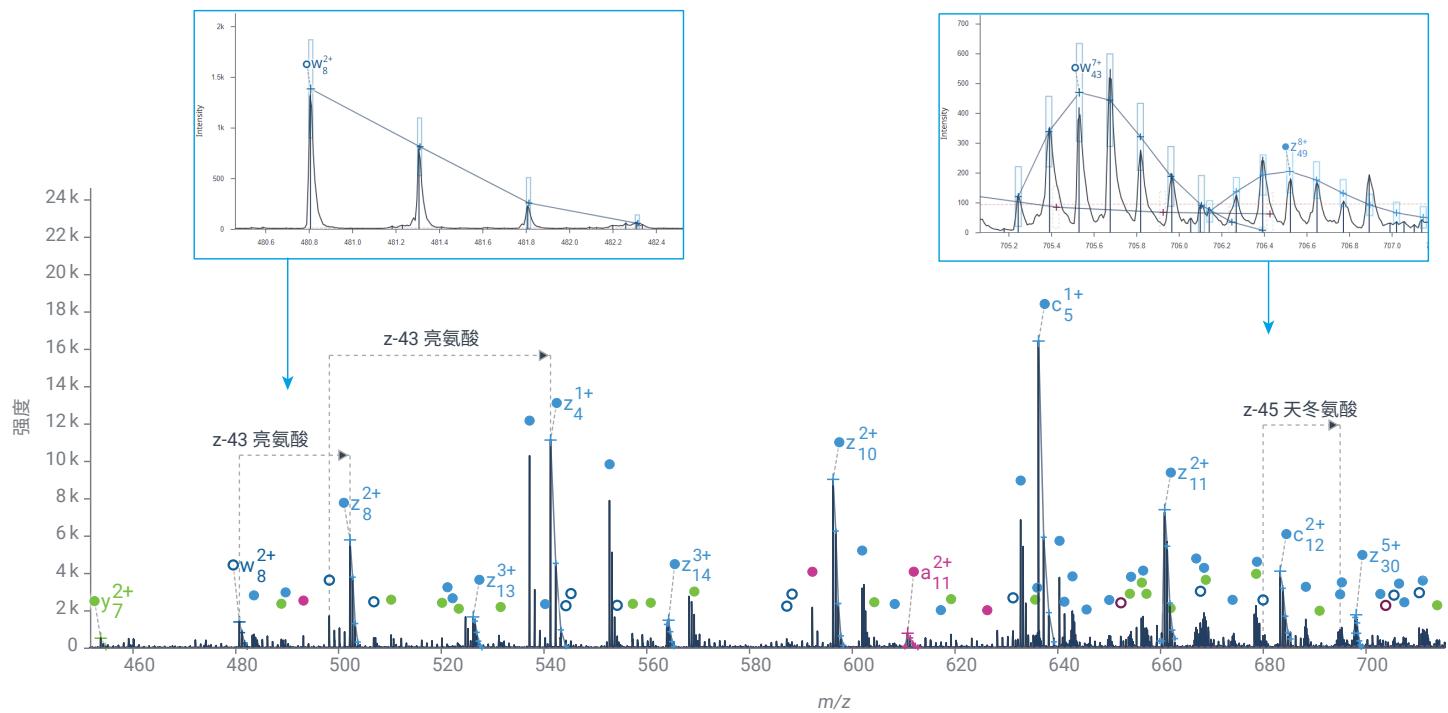


图 5. 11+ 泛素的 ExD 碎裂质谱图。插图中显示了鉴定 Leu 和 Asp 的侧链碎片的证据。异构体证据会自动用虚线和标签进行注释

结论

本应用简报介绍了使用配备 Agilent ExD Cell 和 Agilent ExDViewer 软件工具的 Agilent 6545XT AdvanceBio Q-TOF LC/MS 系统，对异构体氨基酸进行的分析。电子捕获解离是一种强大的碎裂技术，可为 CID 碎裂提供互补信息。这些方法可用于研究一系列分子的多肽主链和侧链碎裂，减少蛋白质序列分析中的不一致。Q-TOF 检测 ECD 碎片的灵敏度与 ExDViewer 结合进行碎片分析，为目标氨基酸异构体鉴定提供了有效的解决方案。

参考文献

1. Kjeldsen, F.; Haselmann, K. F.; Sørensen, E. S.; Zubarev, R. A. Distinguishing of Ile/Leu Amino Acid Residues in the PP3 Protein by (Hot) Electron Capture Dissociation in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2003**, 75(6), 1267–1274.
2. Wakankar, A. A.; Borchardt, R. T.; Eigenbrot, C.; Shia, S.; Wang, Y. J.; Shire, S. J.; Liu, J. L. Aspartate Isomerization in the Complementarity-Determining Regions of Two Closely Related Monoclonal Antibodies. *Biochemistry* **2007**, 46(6), 1534–44.
3. Wang, J.; Mukherjee, S.; Zubarev, R. A. Isoaspartate and Neurodegeneration. *Aging* **2022**, 14(22), 8882–8883.
4. Geiger, T.; Clarke, S. Deamidation, Isomerization, and Racemization at Asparaginyl and Aspartyl Residues in Peptides. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262(2), 785–794.
5. Yang, H.; Zubarev, R. A. Mass Spectrometric Analysis of Asparagine Deamidation and Aspartate Isomerization in Polypeptides. *Electrophoresis* **2010**, 31, 1764–1772.
6. Han, H.; Xia, Y.; McLuckey, S. A. Ion Trap Collisional Activation of c and z' Ions Formed via Gas-Phase Ion/Ion Electron-Transfer Dissociation. *J. Prot. Res.* **2007**, 6(8), 3062–3069.
7. Beckman, J. S.; Voinov, V. G.; Hare, M.; Sturgeon, D.; Vasil'ev, Y.; Oppenheimer, D.; Shaw, J. B.; Wu, S.; Glaskin, R.; Klein, C.; et al. Improved Protein and PTM Characterization with a Practical Electron-Based Fragmentation on Q-TOF Instruments. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2021**, 32(8), 2081–2091.

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE52891173

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2024

2024 年 8 月 7 日, 中国出版

5994-7506ZHCN