

利用可视化软件工具鉴定 LC-MS 实验中的蛋白翻译后修饰 (PTM) 和伪修饰

Harald Pettersen¹, Lennart Björksten¹ and Matthias Berg^{2*}
GE Healthcare, ¹ Uppsala, Sweden ² Freiburg, Germany

前言

传统 LC-MS 数据分析通常通过观察色谱图及相应的单同位素峰谱和平均同位素峰谱(single or averaged mass spectra)来实现,显然相当费时费力。当对多个蛋白质组样品进行分析时,这部分分析工作通常被省略,仅对那些已被鉴定的蛋白作一些回顾性分析,这通常会导致无谓的工作或甚至矛盾的结果。使用最新的 DeCyder™ MS 软件将 LC-MS 数据以图像的形式显示出来,可以很方便地解读传统方法很难分析的 LC-MS 数据;并且通过排除杂质,显著提高了结果的质量。

方法

采用 Ettan™ MDLC 系统(GE Healthcare)的高通量设置,直接连接至 Finnigan LTQ™ 系统(Thermo Electron Corp.)对样品进行 1D LC-MS 分析。用 trap 柱(Zorbax™ 300 SB C18 0.3 x 5 mm, 5 μm, Agilent)脱盐后,结合的肽用 RPC 柱(Zorbax 300 SB C18 0.075 x 150 mm, 3.5 μm, Agilent)分离。以 Profile 模式进行质谱全谱扫描,以 centroid 模式进行串连质谱分析。使用 DeCyder™ MS 对质谱全扫描数据进行肽谱检测和密度图比较,用串连质谱信息和 TurboSEQUENT™ 鉴定肽段。所有电荷状态分别是 1+, 2+, 3+ 的肽段对应 Xcorr 值满足 1.5, 2, 2.5 时,认为被可靠鉴定。

结果

评估 LC-MS 数据

以二维密度图的方式将 LC-MS 数据进行可视化分析可以全面了解样品的复杂程度,而且可以辨别可能的污染,如 PEG 的污染等(图1)。内含的红色星形标记显示肽段进行了串连质谱实验,使我们可以轻易掌控诸如样品复杂性和质谱方法设置等实验条件(图2)。这个例子清晰地显示了串连质谱分析了所有主要的 m/z 信号,而没有对大多数次要的信号进行测定。基于这个观察,我们认为对每一个样品的实验设置都可以从 LC 方法和 MS 方法同时进行优化。

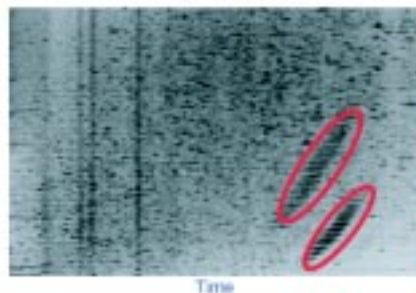


图1. 用 DeCyder MS 将 LC-MS 数据可视化成二维密度图。红圈内显示样品被 PEG 污染。

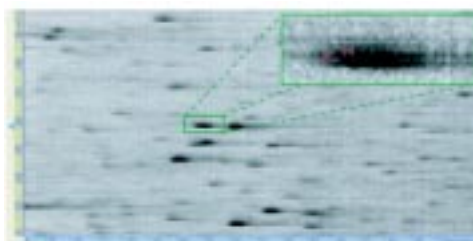


图2. 红色星形标记显示肽段进行了串连质谱实验,可供判断实验设置。

用二维密度图确证和鉴定翻译后修饰 (PTM)

我们可以观测例如甲硫氨酸氧化和脱酰胺化等翻译后修饰,以及它们在 LC-MS 分析中的结果显示。电荷决定了 m/z 值的改变(对于价态为(M+H)⁺的肽段,甲硫氨酸氧化后的 m/z 的变化值为 +16, 价态为(M+2H)²⁺ 则变化值为 +8; 对于价态为(M+H)⁺的肽段,脱酰胺化后 m/z 变化值为 +1, 价态为(M+2H)²⁺ 则变化值为 +0.5)。



图3. 二维密度图的局部放大,对比显示经甲硫氨酸氧化修饰和未修饰的多肽的反相层析数据(RPC)。

即使发生修饰的肽和未发生修饰的肽之间的保留时间的改变类似于不同序列的多肽之间保留时间的差别,我们仍然可以通过二维密度图来确认甚至鉴定是否是翻译后修饰 (PTM)。

甲硫氨酸氧化修饰的例子 (图 3) 清晰地显示出经甲硫氨酸氧化修饰的多肽比未修饰的多肽提前几分钟被洗脱出来。

在RPC反相层析中,天冬氨酸的脱酰胺化修饰使得其洗脱时间改变了约 1 分钟 (图 4)。使用TurboSEQUEST 检索却没有能够鉴定脱酰胺化修饰,而是将分离得很好的,明显差异 1 Da 的两个多肽确定为相同的多肽序列。

化作用而形成,而另外分子质量的改变 (22 和 38) 应该是由序列中的 H⁺ 被 Na⁺ 和 K⁺ 所取代而形成的。



图 5. 二维密度图的局部放大,显示在离子化过程中发生伪修饰的肽被共洗脱。

Peak	Protein	Sequence	(M+H) ⁺	Xcorr
1	GOX	ISDAILEDYASMQ	1456.6	4.2
2	GOX	ISDAILEDYASMo _x Q	1472.6	3
3	GOX	ISDAILEDYASMo _x Q	1472.6	2.7
4	RecA protein	TTLALHVVANAQKK	1494.7	2.7
5	GMP Synthase	FFAALSGVTDPEQK	1510.7	2.8

表 1. 图 5 中显示和被标记峰的TurboSEQUEST 搜索结果。

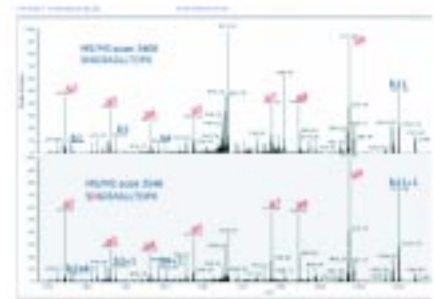
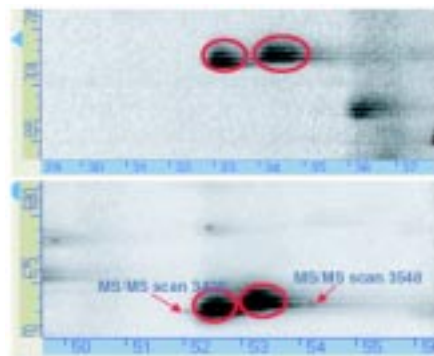


图 4. 二维密度图的局部放大,显示经脱酰胺化修饰的多肽的RPC 数据。下图是 3408 和 3548 扫描MS/MS 质谱,对比 3548 扫描的 b 片段离子和 3408 扫描的 b₂ 离子,显示了天冬氨酸的脱酰胺化修饰。

使用 DeCyder MS 鉴定伪修饰

从RPC柱上洗脱的肽在离子化过程中可能产生伪修饰,例如形成非共价化合物、非共价二聚体以及片段断裂等。这些伪修饰的肽由于能够和修饰前的肽共洗脱,因而很容易通过二维密度图加以鉴定。

图 5 为一个典型的例子。TurboSEQUEST 软件将标注的峰 1 鉴定为来源于葡萄糖氧化酶的带有甲硫氨酸的多肽 (见表 1), 峰 2 为该肽的氧化形式。借助 2D 密度图可以轻易地发现峰 3, 4, 5 和峰 1 被共洗脱下来,说明他们可能是在离子化过程中产生的伪点。TurboSEQUEST 软件对这些信号的搜索结果被列在表 1 中,其中峰 3 被鉴定为峰 1 的氧化形式,而峰 4 和峰 5 被鉴定为来源于其他蛋白的非相关多肽。

对不同峰的 MS/MS 数据的手工解析清晰地揭示了氨基酸序列为 ISDAILEDYASMQ 的峰 1 是母离子肽,而峰 3, 4 和 5 是在离子化过程中产生了伪修饰后所生成的。TurboSEQUEST 软件鉴定的结果明显有误,图中增加的 16 amu 有可能是由于氧

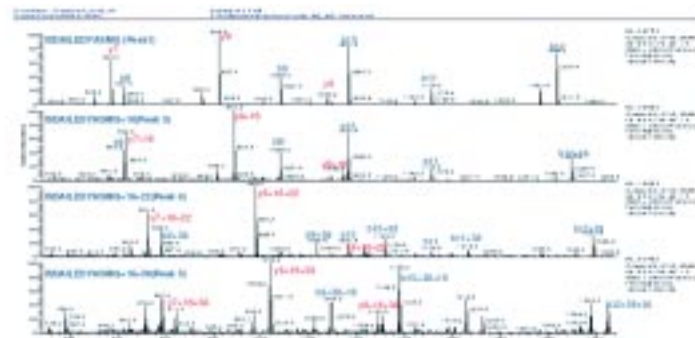


图 6. 图 5 中标记为 1, 3, 4 和 5 号峰的 y 和 b 离子的 MS/MS 数据。

结论

- 结合 MS/MS 数据,用二维密度图可视化显示 LC-MS 原始数据为 LC-MS 的结果解析提供了一种杰出的手段。
- 诸如 PEG 等的样品污染可以被轻易观测到。
- MS/MS 数据标记可帮助判断每一个样品的 MS 设置。
- 通过识别相应的二维密度图可以判定和鉴别 PTM。
- 在离子化过程中产生的诸如非共价加合物等伪修饰能够被二维密度图清晰地显示出来,该信息可用于甄别 TurboSEQUEST 软件的判定是否正确。