

# 评价新型稳定同位素赖氨酸标记在定量蛋白质组学中的应用

高东梅, 孙璐, 郭坤, 李岩, 刘银坤, 康晓楠

复旦大学附属中山医院 复旦大学生物医学研究院, 上海 200032

高东梅, 孙璐, 郭坤, 等. 评价新型稳定同位素赖氨酸标记在定量蛋白质组学中的应用. 生物工程学报, 2012, 28(7): 855–864.  
Gao DM, Sun L, Guo K, et al. Evaluation of isotopic labeling of lysine residues of peptides for quantitative proteomics. Chin J Biotech, 2012, 28(7): 855–864.

**摘 要:** 为了评价基于 2-甲氧基-4,5-二氢-1 氢-咪唑稳定同位素试剂在定量蛋白质组学中的应用价值, 合成了轻型 (D0) 和重型 (D4) 的 2-甲氧基-4,5-二氢-1 氢-咪唑, 通过对标准蛋白 BSA 酶解后产物的标记确认标记反应的特异性, 并观察了标记物在 MALDI-TOF-MS 和 LC-ESI-MS 中定量的准确性, 标记肽在串联质谱中的离子特点, 以及对反相液相色谱行为的影响。结果表明, 2-甲氧基-4,5-二氢-1 氢-咪唑只与酶解后的肽段赖氨酸侧链氨基反应, 具有良好的标记特异性; 差异表达蛋白的定量可以通过 MALDI 和 ESI 电离模式实现; 标记肽的串联质谱主要产生 y 离子, 测序更为简便; 反相液相色谱可以保持较好的分离效果, 氘原子的引入不会影响保留时间, 侧链修饰可以用于涉及液相色谱分离的蛋白质组学技术。2-甲氧基-4,5-二氢-1 氢-咪唑稳定同位素试剂可以用于定量蛋白质组学。

**关键词:** 稳定同位素标签, 质谱, 定量蛋白质组学, 咪唑

## Evaluation of isotopic labeling of lysine residues of peptides for quantitative proteomics

Dongmei Gao, Lu Sun, Kun Guo, Yan Li, Yinkun Liu, and Xiaonan Kang

Zhongshan Hospital, Institute of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

**Abstract:** To evaluate the reagent 2-methoxy-4,5-dihydro-1H-imidazole used for isotopic labeling in quantitative

**Received:** November 29, 2011; **Accepted:** March 8, 2012

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB91060), National Natural Science Foundation of China (No. 81101636).

**Corresponding author:** Xiaonan Kang. Tel :+86-21-54237963; E-mail: xnkang7@163.com

Yinkun Liu. Tel: +86-21-64041990-2501; E-mail: liu.yinkun@zshospital.sh.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB9106), 国家自然科学基金 (No. 81101636) 资助。

proteomics, we synthesized 2-methoxy-4,5-dihydro-1H-imidazole and its tetradeuterated analog in three steps. Prior to tryptic cleavage, bovine serum albumin (BSA) was reduced and alkylated. Tryptic peptides were derivatized with an equal volume of either D0 or D4 and D4-derivatized peptides were mixed with at variable ratio (from 10:1 to 1:5) prior to MS and MS/MS analysis. We used Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry (MALDI-MS) and Electro Spray Ionization-Mass Spectrometry (ESI-MS) to evaluate the quantitative capability of labeling. The specificity of the reagent is excellent: only lysine side chains were modified among tryptic peptides. MALDI and ESI ionization modes not only could achieve the quantification of differentially expressed proteins but also facilitate the de novo sequencing. This side-chain modification can be used for quantitative analysis with proteomic strategies involving liquid chromatography. Reverse phase liquid chromatography (RPLC) kept a good resolution, and the introduction of D atoms did not introduce a variation of retention time between heavy and light peptides in RPLC.

**Keywords:** stable isotope coding tag, mass spectrometry, differential proteomics, imidazole

在蛋白质组学研究中,精确测量生物体所有蛋白质在不同状态下表达和蛋白质翻译后修饰水平的动态变化,对于探索蛋白质生物功能,发现疾病生物标志物,寻找药物靶标等都具有十分重要的意义,蛋白质组定量研究已经成为蛋白质组学研究的一个重要前沿和方向<sup>[1]</sup>。目前定量蛋白质组研究建立和发展的技术平台主要有双向荧光差异凝胶电泳 (Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)<sup>[2]</sup>、抗体芯片技术<sup>[3]</sup>及基于同位素标记的质谱分析技术<sup>[4]</sup>等。2D-DIGE 因电泳技术固有的缺点,对低丰度蛋白质、疏水性蛋白质等难以进行有效的分离分析,且操作费时费力,限制了其在定量蛋白质组学研究中的应用。抗体芯片技术操作简便,但是单克隆抗体的种类有限限制了芯片的广泛使用。

基于同位素标记的质谱分析技术是以稳定同位素为内标,将物理化学性质相同、质量不同的同位素掺入到两种样品,混合后不同状态的相同蛋白质(肽)因质量差异在质谱图中表现为一对同位素峰,通过比较同位素峰的相对丰度,精确定量出蛋白质不同状态下表达量的变化,这种方法突破了前两种技术局限性并显示出可同时

精确定量和鉴定的能力,成为当今定量蛋白质组研究技术的主要发展方向,其中化学性标记方法应用最为广泛<sup>[5-7]</sup>。

目前常用的稳定同位素化学标记主要包括同位素编码亲和标签 (Isotope-coded affinity tags, ICAT) 技术及同位素标签相对和绝对定量 (Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 技术<sup>[89]</sup>, ICAT 技术只标记含巯基的多肽和蛋白质,覆盖率低;而 iTRAQ 高额的成本限制了使用的广泛性。

2-甲氧基-4,5-二氢-1 氢-咪唑 (2-methoxy-4,5-dihydro-1H-imidazole, 结构式见图 1) 在一定条件下可以和赖氨酸的侧链氨基发生反应,生成相应的衍生物。胰酶水解蛋白产生以赖氨酸为 C-末端的肽段在 MALDI-MS 中被检测的敏感性较低,而赖氨酸侧链的氨基与 2-甲氧基-4,5-二氢-1 氢-咪唑反应后生成的衍生物不仅在 MALDI-TOF-MS 中电离能力增强,而且 MS/MS 图谱裂解片段的覆盖性也增多,有利于蛋白质的鉴定和从头测序 (De novo)。2-甲氧基-4,5-二氢-1 氢-咪唑 4,5 位的 4 个氢在合成时可以置换成为氘,从而组成一对质量差为 4 的稳定同位素标记

物。本文主要研究这对标记物在定量蛋白质组学中应用的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2-甲氧基-4,5-1 氢-咪唑(D0 reagent)及其衍生物(2-甲氧基-4,5-二氘-1 氢-咪唑, D4 reagent)的合成由欧洲生物与化学研究所(European Institute of Biology and Chemistry)有机组合成并惠赠。牛血清白蛋白(BSA), DTT, 碘乙酰胺, 测序级胰酶及 Glu1-纤维蛋白肽 B 均为 Sigma 产品。所有溶剂均为 HPLC 级别。C18 Zip Tip 为 Millipore 公司产品, MALDI-TOF-MS 和 LC-ESI-MS 均为 Waters 公司产品, LC-ESI-MS 采用 CapLC 系统(75 mm i.d. C18 column)反相色谱柱末端连接纳喷雾针。

### 1.2 配制标准蛋白样品

牛血清白蛋白按 1 g/L 浓度溶解于 25 mmol/L Tris (pH 8.3) 或者含 8 mol/L 尿素的 25 mmol/L Tris (pH 8.3), 加入 65 mmol/L DTT 充分还原 1 h; 加入碘乙酰胺(终浓度为 100 mmol/L)置于室温暗处进行烷基化。之后, 样本被 10 倍稀释, 保证稀释后尿素浓度低于 1 mol/L。加入测序级胰酶室温孵育过夜。

### 1.3 标记反应

8 支 BSA 酶解后的肽溶液, 每份 10  $\mu$ L (0.5  $\mu$ mol/L) 与等体积的 0.8 mol/L D0 reagent 孵育, 另外 8 支 BSA 酶解后的肽溶液, 浓度分别为 0.05、0.1、0.25、0.5、1、1.5、2、2.5  $\mu$ mol/L 作为实验组分别与等体积的 0.8 mol/L D4 reagent 孵育。反应条件: 55  $^{\circ}$ C, 3 h, 然后加入 1  $\mu$ L 三氟乙酸(TFA)终止反应。D0 衍生肽和 D4 衍生

肽按比例(从 10:1 到 1:5)混合, 部分混合用 C18 Zip Tip 除盐后进行 MALDI-TOF-MS 分析, 另一部分直接进行 nano-LC-ESI-MS 分析。

### 1.4 MALDI-TOF-MS 分析

0.75  $\mu$ L 样本与 0.75  $\mu$ L 2 g/L 的  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)基质溶液混合, 点到样本靶上, 空气干燥后送入质谱检测。仪器采用 PEG 混合外标校准(包括 PEG200, 600, 1 000 和 2 000 以及 NaI), 进一步采用 Glu1 纤维蛋白肽 B 为内标校准。在 MALDI-TOF-MS 阳离子模式下进行质谱分析, 加速电压为 20 kV, 获取质量范围在 500~3 000 Da 的谱图。

### 1.5 LC-ESI-MS 分析

HPLC 微分析工作站与 ESI-MS 的电喷雾接口相连。分析物送入样本环, 流动相 A 液为 0.2% 甲酸, 流动相 B 液为 0.2% 甲酸和 80% 乙腈, 线性梯度洗脱程序为: 0~5 min, 0~56% 流动相 B 液; 5~7 min 为 80% 乙腈。氮气作为喷雾气体。谱图以 0.5 谱图/s 的速度获得, 阴离子数阈值为 1。

### 1.6 反相液相色谱分离

HPLC 连接 ESI-MS 观察 D0 和 D4 标记的 BSA 酶解肽在不同色谱峰中的比值, 观察 D0 和 D4 标记肽在反相液相色谱中的分离是否有明显差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 2-甲氧基-4,5-二氢-1 氢-咪唑标记赖氨酸反应的特异性分析

用 2-甲氧基-4,5-二氢-1 氢-咪唑标记赖氨酸侧链, 观察其反应的特异性以及对 MALDI 电离的影响。图 1 显示了赖氨酸侧链与标记物的反应。图 2 显示牛血清白蛋白的胰酶水解肽分别与 D0

试剂衍生反应前后的 MALDI 质谱图。与未衍生的形式比较, 衍生之后可以检测到更多含有赖氨酸的肽。

表 1 显示的是 MALDI 质谱图中各峰值, D0 标记后含有赖氨酸的肽段与原先的肽段相差 68 Da 或者 68 Da 的整数倍, 这取决于肽段上赖氨酸的数目, 而 D4 标记后含有赖氨酸的肽段与

原先的肽段相差 72 Da 或者 72 Da 的整数倍。不含赖氨酸的肽段质量数不变, 说明衍生反应不发生在肽段的 N-末端。从 ESI MS 图谱上, 肽段之间差异的 M/Z 比取决于带  $H^+$  的数量, 一般为 2.0 或 4.0 (表 2)。Peptide1 和 Peptide9 都含有 2 个赖氨酸, 但是 Peptide1 只有 1 个赖氨酸被标记, 可能由于 2 个赖氨酸距离较近, 标记物不容易靠近。

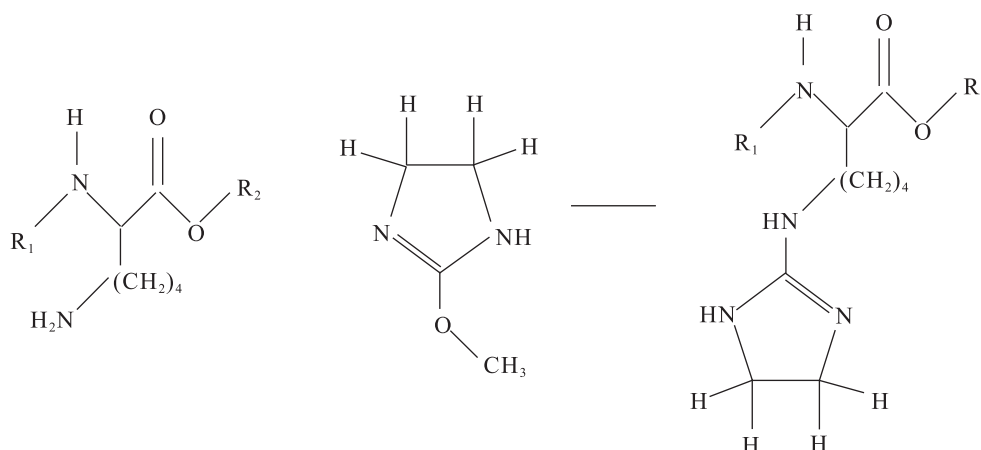


图 1 2-甲基-4,5-2 氢-1 氢咪唑 (D0 型) 与赖氨酸的反应

Fig.1 Modification of lysine residues with 2-methoxy-4,5-dihydro-1H-imidazole.

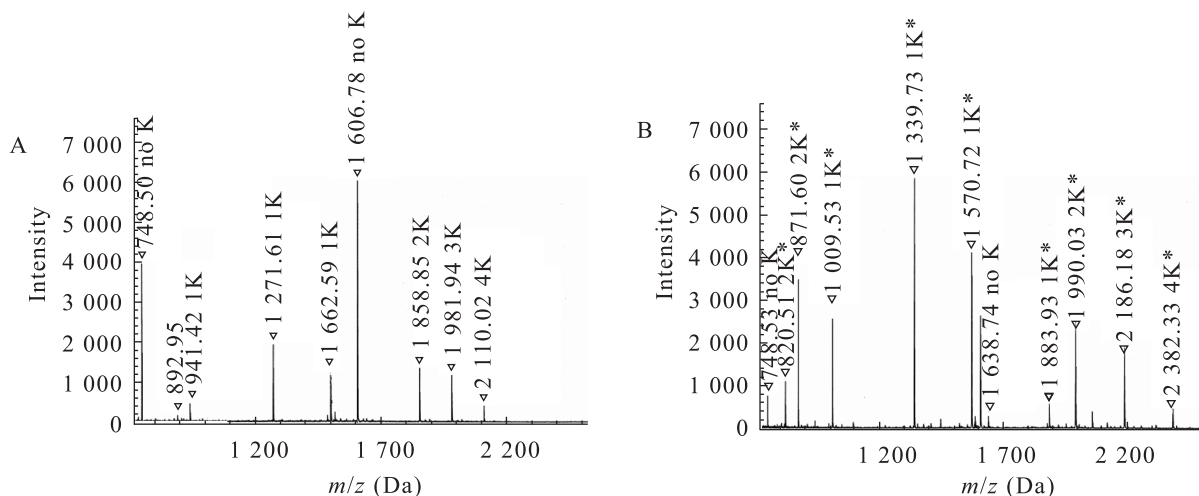


图 2 牛血清白蛋白胰酶水解肽与 2-甲基-4,5-2 氢-1 氢咪唑反应前后 MALDI-MS 图谱的变化

Fig.2 MALDI-MS analysis of BSA tryptic peptides labelled with 2-methoxy-4,5-dihydro-1H-imidazole. (A) No derivatization. (B) After derivatization. K: lysine; K\*: lysine labelled with 2-methoxy-4,5-dihydro-1H-imidazole.

表 1 BSA 酶解肽经过 D0 和 D4 标记后在 MALDI 中的检测结果

Table 1 Summary of D0- and D4- derivative mixture of BSA tryptic peptide detected by MALDI

AA sequence	Expected mass (MH <sup>+</sup> ) (Da)	Observed mass		Number of labelled lysine
		D0-derivative (Da)	D4-derivative (Da)	
KFWGK	665.45	801.45	809.50	2
AEFVEVTK	922.53	990.52	994.55	1
DLGEEHFK	974.51	1 042.51	1 046.50	1
EACFAVEGPK	1 107.55	1 175.55	1 179.57	1
LVNELTEFAK	1 163.67	1 231.66	1 235.69	1
HLDVEPQNLIK	1 305.76	1 373.75	1 377.75	1
FKDLGEEHFK	1 317.74	1 385.70	1 393.70	2
YICDNQDTISSK	1 443.68	1 511.68	1 515.70	1
TVMENFVAFVDK	1 400.73	1 468.71	1 472.71	1
LGEYGFQNALIVR	1 479.79	1 479.79	1 479.79	0

表 2 BSA 酶解肽经过 D0 和 D4 标记后在 ESI 中的检测结果

Table 2 Summary of D0- and D4- derivative mixture of BSA tryptic peptide detected by ESI

AA sequence	Expected mass (MH <sup>+</sup> ) (Da)	Charge	Observed mass		Number of labelled lysine
			D0-derivative (Da)	D4-derivative (Da)	
HKPK	577.39	1	645.03	649.03	1
AEFVEVTK	922.53	2	495.56	497.58	1
LVTDLTK	789.50	1	857.09	861.10	1
HLDVEPQNLIK	1 305.75	2	687.12	689.10	1
DLGEEHFK	974.51	2	521.50	523.47	1
YICDNQDTISSK	1 443.68	2	756.47	758.50	1
TPVSEK	660.34	1	728.05	732.07	1
KVPQVSTPTLVEVSR	1 639.03	2	854.05	856.07	1
FPKAEFVEVTK	1 363.23	2	716.04	720.06	2
NYQEAK	752.12	1	820.03	824.09	1
NYQEAK	752.12	2	410.52	412.54	1
LSQK	476.25	1	544.06	548.08	1
TCVADESHAGCEK	1 463.6	2	766.02	768.04	1

## 2.2 相对定量方法的准确性和稳定性

为了观察该标记反应用于定量的准确性, 我们使用 BSA 胰酶水解物作为标准品分别用 D0 和 D4 标记, 然后进行 MALDI-TOF-MS 和 LC-ESI-MS 分析。

在 MALDI 分析中, 按照从 10 : 1 到 1 : 5 不同的摩尔比混合 D0 和 D4 标记肽, 选择肽段 LVNELTEFAK (图 3 中的 Peak1231 和 Peak1235) 作为代表峰观察定量方法的准确性: MALDI-TOF-MS 图中同位素对峰的强度比值反映了真实的浓度比。图 3 显示同位素标记的肽段

强度比值与原始的浓度比完全一致, 同位素标记峰质量相差 4 Da, 表明存在单一标记, 减去标记的质量数, 这个峰被鉴定为表 1 中的 Peptide5 和 Peptide6。

D0 标记和 D4 标记的 BSA 酶解肽分别按照 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3 和 1 : 5 的比例混合后送入 LC-ESI-MS 检测。图 4 显示混合比例的结果与 MALDI-TOF-MS 的结果几乎一致。在每张谱图上可以发现至少 4 对比值相同的稳定同位素标记峰。MALDI 和 ESI 两种电离方式得到一致的定量结果。

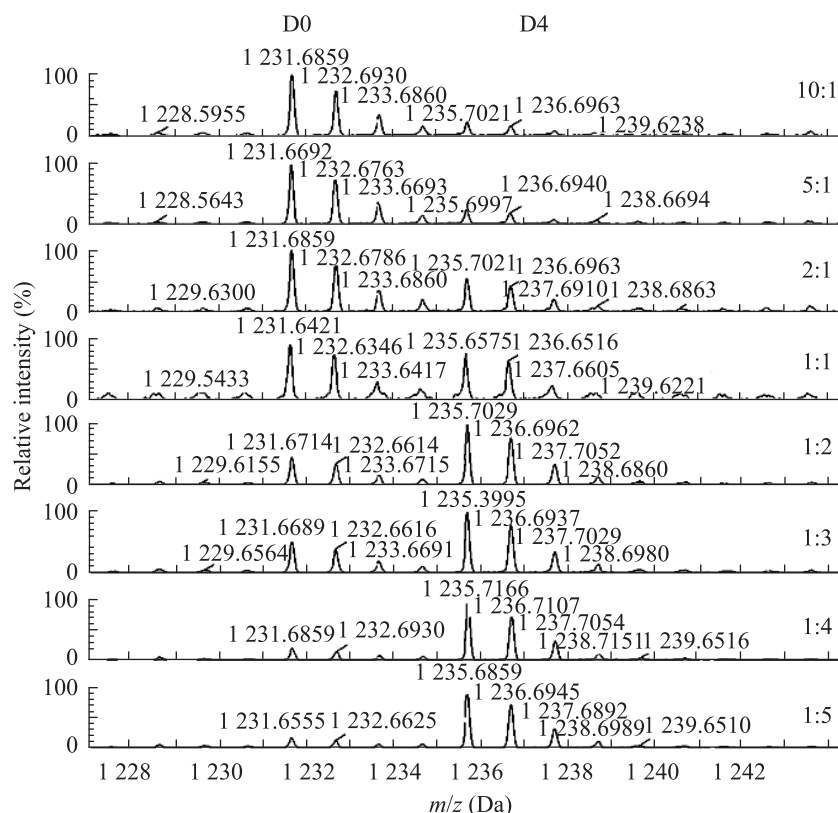


图 3 D0 和 D4 标记的 BSA 酶解肽以不同浓度混合后的 MALDI-MS 图谱

Fig. 3 MALDI spectrum showed the ratio of D0-labeled and D4-labeled BSA tryptic peptides. The serial ratio is from 10:1 to 1:5, the D0-labeled peptide loaded on each target is 125 fmol. The paired peaks 1 231 and 1 235 were showed.

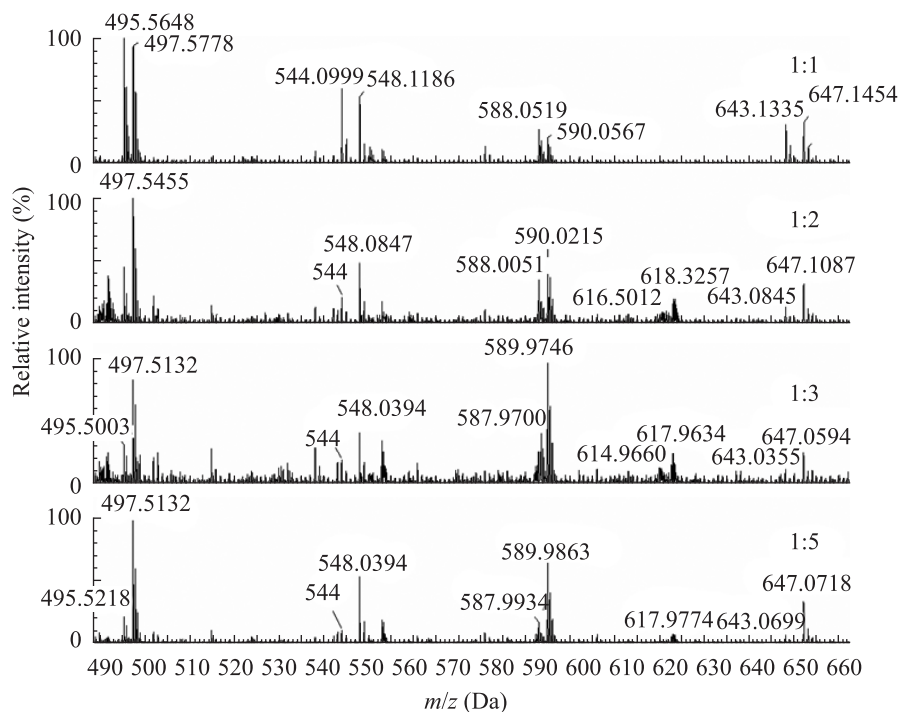


图4 D0和D4标记的BSA酶解肽以不同浓度混合后的ESI-MS图谱

Fig. 4 ESI-mass full scan showed labeled BSA peptides with serial ratio 1:1, 1:2, 1:3, 1:5 from top to bottom.

分别以 D0 标记物和 D4 标记物的理论混合比作为横坐标, 实际测得的丰度比作为纵坐标, 作线性关系图, 得到测量准确性的相关系数  $R = 0.9999$ , 见图 5。每次混合都做 3 次重复实验 ( $n=3$ ), 计算其定量的标准差和变异系数, Peptide5 和 Peptide6 在不同比例下的平均标准差为 0.06, 变异系数为 3.9%, 说明该方法具有良好的稳定性和准确性。

### 2.3 衍生物的串联质谱 (Tandem-MS) 图特点

肽经过衍生之后或者带电荷或者质子亲和性增强<sup>[10-11]</sup>。因此我们观察标记后是否对肽的串联质谱结果有影响。结果发现, 标记后的 MALDI-MS/MS 图谱主要以  $y$  离子为主, 非常有利于谱图的解析, 测序更为简便 (图 6)。在 ESI

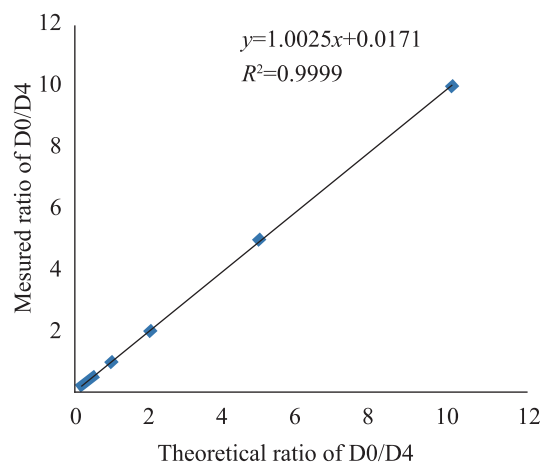


图5 D0和D4标记肽的理论浓度比值和MALDI-MS实际检测比值的线性关系

Fig. 5 Linear relationship between theoretical ratio and measured ratio in MALDI-MS.

电离模式下, ESI-MS 生成双电荷离子峰, ESI-MS/MS 也是以  $y$  离子为主。

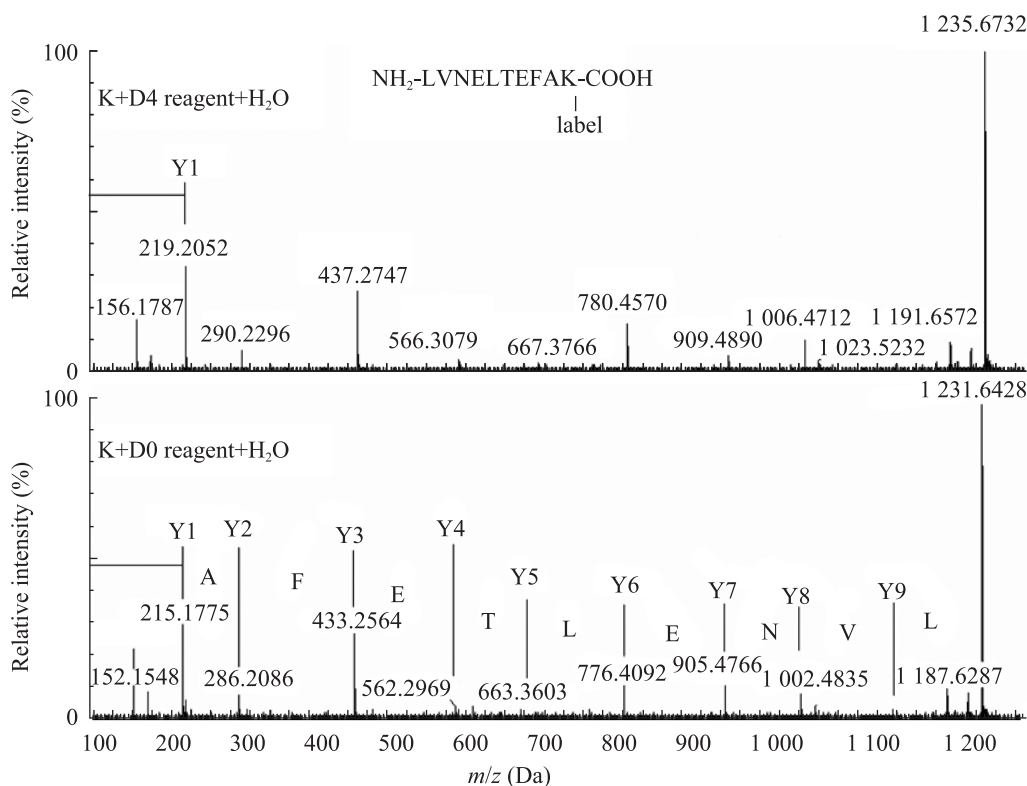


图6 标记后的酶解肽 MALDI-TOF-MS/MS 图谱以 y 离子峰为主

Fig. 6 MALDI-MS/MS fragmentation of a labeled tryptic peptide. In this ionisation mode, fragments belonging to the y ions series are dominant.

## 2.4 标记反应对反相色谱行为的影响

图7显示了经过 RPLC 之后 D0 和 D4 标记肽分离没有差异,在连续扫描下,D0 和 D4 同位素对的比值可以保持一致,从而确定了该标记方法可以用于基于液质联用的定量蛋白质组学。

## 3 讨论

研究发现在 MALDI-TOF-MS 中含精氨酸的肽比含赖氨酸的肽更容易电离,信号可增强 4~18 倍,原因是精氨酸的碱性比赖氨酸要强<sup>[12-14]</sup>,从理论上说如果增强赖氨酸的碱性将有助于增加

其电离能力<sup>[15-16]</sup>。因此通过 2-甲氧基-4,5-二氢-1-氢-咪唑修饰赖氨酸侧链可以增加其碱性改善其电离能力。该标记试剂高度水溶,易于溶解于目的肽溶液,产生的化合物在结构上与胍类似,可增加肽指纹图谱的覆盖性。我们的标记方法是针对赖氨酸侧链氨基。Regnier 实验室研究发现分别被  $^1\text{H}$  和  $^2\text{H}$  稳定同位素试剂标记的肽段在反相液相色谱中的保留时间不一致<sup>[17]</sup>,  $^2\text{H}$  稳定同位素试剂所标记的肽段在反相液相色谱中较早流出,随着试剂中的  $^2\text{H}$  原子数量的增加,  $^1\text{H}$  和  $^2\text{H}$  标记的肽段在反相液相色谱中会完全分离,如果



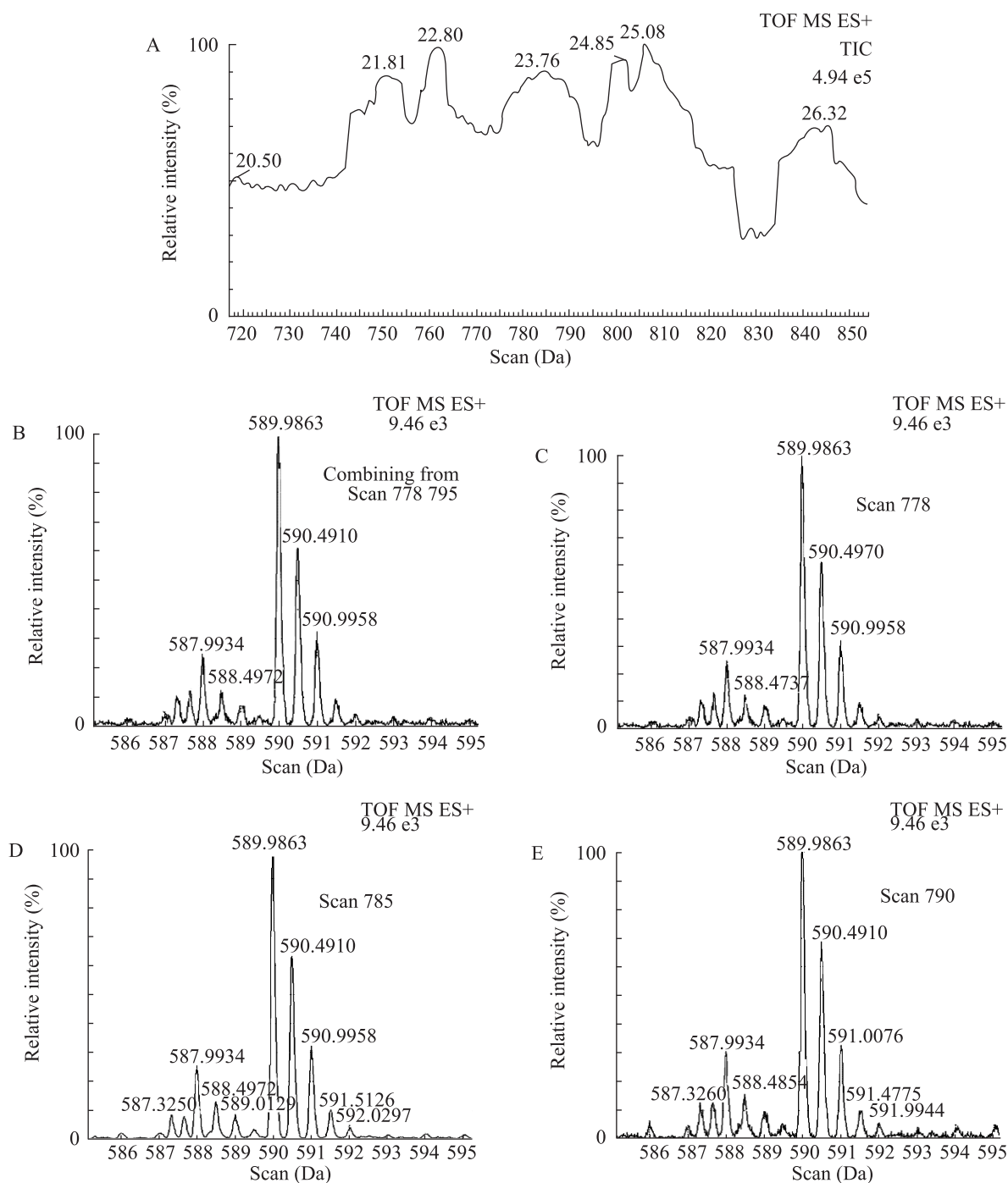


图 7 混合标记酶解肽混合物液相色谱质谱联用离子流图谱

Fig. 7 Ion current chromatography of labeled tryptic peptide mix in LC-ESI-MS. D0 and D4-peptides have same separation during the process, the ratio was kept identical. (A) The total ion current chromatography of labeled tryptic peptide mix in LC-ESI-MS. (B) The combining mass spectrum from scan 778 to 795. (C) The mass spectrum of scan 778. (D) The mass spectrum of scan 784. (E) The mass spectrum of scan 790.

轻型和重型标记物标记的同一肽段在反相液相色谱中的分离效果不同,这会产生最严重的问题,即在同一色谱峰中一对标记肽的峰度比值会不同,从而很难判断哪个比值是分析物真正的比值。因此我们观察了标记肽在 RPLC 中的分离情况。实验证明,氘原子的引入不会影响到标记保留时间, D0 和 D4 衍生物具有相同的保留时间,反相液相色谱中可以保持较好的分离效果,差异表达蛋白的定量可以通过 MALDI 和 ESI 电离模式实现。由于二次电离以产生  $y$  离子为主,所以标记肽的测序更为简便。

致谢:感谢法国欧洲生物与化学研究所 Prof.Jean Marrie Schmitter 的协助和支持。

## REFERENCES

- [1] Pan S, Aebersold R, Chen R, et al. Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications. *J Proteome Res*, 2009, 8(2): 787-797.
- [2] Minden JS, Dowd SR, Meyer HE, et al. Difference gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 2009, 30 (Suppl 1): S156-161.
- [3] Zhu H, Snyder M. Protein chip technology. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7(1): 55-63.
- [4] Gygi SP, Rist B, Gerber SA, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotech*, 1999, 17(10): 994-999.
- [5] Oda Y, Huang K, Cross FR, et al. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(12): 6591-6596.
- [6] Krusemark CJ, Ferguson JT, Wenger CD, et al. Global amine and acid functional group modification of proteins. *Anal Chem*, 2008, 80(3): 713-720.
- [7] Tao WA, Aebersold R. Advances in quantitative proteomics via stable isotope tagging and mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(1): 110-118.
- [8] Han DK, Eng J, Zhou H, Aebersold R. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(10): 946-951.
- [9] Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, et al. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*, 2007, 7(3): 340-350.
- [10] Noga M J, Asperger A, Silberring J. N-terminal H3/D3-acetylation for improved high-throughput peptide sequencing by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with a time-of-flight/time-of-flight analyzer. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(12): 1823-1827.
- [11] Noga MJ, Lewandowski JJ, Suder P, et al. An enhanced method for peptides sequencing by N-terminal derivatization and MS. *Proteomics*, 2005, 5(17): 4367-4375.
- [12] Krause E, Wenschuh H, Jungblut PR. The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. *Anal Chem*, 1999, 71(19): 4160-4165.
- [13] Brancia FL, Oliver SG, Gaskell SJ. Improved matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of tryptic hydrolysates of proteins following guanidination of lysine-containing peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, 14(21): 2070-2073.
- [14] Beardsley RL, Karty JA, Reilly JP. Enhancing the intensities of lysine-terminated tryptic peptide ions in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, 14(23): 2147-2153.
- [15] Hale JE, Butler JP, Knierman MD, et al. Increased sensitivity of tryptic peptide detection by MALDI-TOF mass spectrometry is achieved by conversion of lysine to homoarginine. *Anal Biochem*, 2000, 287(1): 110-117.
- [16] Keough T, Lacey MP, Youngquist RS. Solid-phase derivatization of tryptic peptides for rapid protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, 16(11): 1003-1015.
- [17] Zhang RJ, Sioma CS, Thompson RA, et al. Controlling deuterium isotope effects in comparative proteomics. *Anal Chem*, 2002, 74(15): 3662-3669.