溴化 1-丁基,3-(3-氨基丙基)咪唑用于羧基衍生: 潜在应用于肽段的高灵敏度质谱鉴定

乔晓强^{①②}, 周愿^①, 侯春彦^①, 张晓丹^①, 杨开广^①, 张丽华^{①*}, 张玉奎^①

① 中国科学院大连化学物理研究所, 中国科学院分离分析化学重点实验室, 大连 116023;

② 河北大学药学院, 河北省药物质量研究重点实验室, 保定 071002

* 联系人, E-mail: lihuazhang@dicp.ac.cn

收稿日期: 2012-07-16; 接受日期: 2012-09-28

国家重大科学研究计划(批准号: 2012CB910604)、国家自然科学基金(批准号: 21205027, 21005079, 20935004)、MOST 分析方法创新计划(批准号: 2010IM030500)和河北省自然科学基金(批准号: B2012201095)资助项目

摘要 本文发展了阳离子衍生化试剂溴化 1-丁基, 3-(3-氨基丙基)咪唑(BAPI), 并应用于肽段的羧基衍生化. 以合成肽段 RVYVHPI(RI-7)作为样品, 其衍生化标记效率可接近 100%. 此外, 肽段衍生物在含 0.1% 的三氟乙酸水溶液或乙腈/水(体积比 1:1)溶液中至少可稳定保存 1 周. 进一步研究了 BAPI 衍生对肽段离子化效率的影响. 结合基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)分析, 模式肽段 RI-7 的检测灵敏度可提高 42 倍以上, 优于商品化哌嗪试剂的衍生效果. 此外, 衍生肽段在电喷雾质谱(ESI MS)中的离子带电荷数也得到显著提高. 上述结果表明, BAPI 是一种具有潜在优势的衍生化试剂, 有望应用于肽段的高灵敏度质谱鉴定研究.

关键词

溴化 1-丁基,3-(3-氨基丙基)咪唑
离子化效率
多肽
质谱分析
衍生

在后基因组学时代, 蛋白质研究受到越来越广泛的关注. 由于复杂蛋白质样品具有组成极端复杂和动态范围宽的特点, 使得其检测灵敏度仍旧不能满足现代分析方法的要求. 特别是诸多具有重要生物学功能的蛋白质(如生物标记物或药物靶点蛋白质)往往为低丰度蛋白质, 难于实现有效的检测^[1,2]. 因此, 改进蛋白质/多肽的检测灵敏度具有重要的意义. 预富集技术广泛应用于增强待测物的检测灵敏度^[3,4].

例如, Foote 等人^[5]将多孔硅胶薄膜应用于荧光标记后蛋白质的富集, 结合毛细管凝胶电泳分析, 蛋白质的检测灵敏度可提高约 600 倍. 近年来, 化学衍生技术作为一种行之有效的技术受到关注, 已广泛应用于蛋白质/多肽的高效分析, 并与多种检测技术实现了有效的结合^[6-10].

目前为止, 质谱技术已经成为多肽分析必不可少的工具^[11]. 为了增强多肽, 特别是低丰度多肽或

引用格式: 乔晓强, 周愿, 侯春彦, 等. 溴化 1-丁基,3-(3-氨基丙基)咪唑用于羧基衍生: 潜在应用于肽段的高灵敏度质谱鉴定. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 96-102, doi: 10.1360/052012-253

英文版见: Qiao X Q, Zhou Y, Hou C Y, et al. 1-butyl, 3-(3-aminopropyl)imidazolium bromide for carboxyl group derivatization: potential applications in high sensitivity peptide identification by mass spectrometry. Sci China Life Sci, 2013, 56, in press, doi: 10.1007/s11427-013-4446-8

难于离子化多肽的质谱检测灵敏度, 针对多肽中氨基^[12-15]、巯基^[16-18]或羟基^[19,20]的化学衍生试剂得到发展和应用. Kulevich 等人^[14]将活性醛基衍生试剂正丁醛和正己醛应用于肽段中氨基的烷基化衍生以增强肽段的离子化效率和质谱检测灵敏度, 通过结合同时分析衍生和未衍生的肽段, 蛋白质细胞色素 *c*, β -乳球蛋白 A 和牛血清白蛋白的序列覆盖率显著提高. 阳离子衍生化试剂通常包含一个永久正电荷^[9,17,18], 因此可在衍生化的肽段中引入永久性正价, 可显著提高肽段在质谱中的离子带电荷数, 增强肽段的离子化效率. 中国科学院化学研究所的马会民实验室^[17]将阳离子衍生化试剂 1-[3-(4-马来酰苯氧基)丙基]三甲基溴化铵应用于肽段的巯基衍生化, 其中极性较高的肽段经衍生后其检测灵敏度可提高约 3~5 倍, 而极性较弱的肽段检测灵敏度可提高 100 倍以上. Vasicek 和 Brodbelt^[18]将阳离子衍生化试剂(3-丙烯酰胺丙基)三甲基氯化铵应用于含半胱氨酸肽段的烷基化衍生. 衍生化肽段在电子转移裂解(ETD)质谱中的带电荷数以及蛋白质的序列覆盖率均显著提高, 通过进一步分析牛血清白蛋白酶切产物, 蛋白质的 SEQUEST 得分值从 582 增加到 3700, 实现了高可信度的蛋白质鉴定.

基于羧基的多肽衍生策略具有诸多潜在的优势^[21]. 近年来, 多种中性的衍生化试剂得到开发并进一步应用于肽段的羧基衍生化^[22-24]. 复旦大学陆豪杰实验室^[22]将中性试剂 1-(2-噻啉)哌嗪应用于磷酸化肽段的衍生, 其富集选择性和质谱离子化效率均得到显著改善. Zhang 等人^[23]将 2-硝基苯肼应用于肽段的羧基衍生化, 模式肽段的质谱检测灵敏度可提高 15 倍. 在本实验室前期工作中, 发展了哌嗪衍生化试剂 1-(2-吡啶)-哌嗪、1-(2-噻啉)-哌嗪、1-(4-吡啶)哌嗪和 1-(1-甲基-4-哌啶基)哌嗪, 并一步应用于肽段的羧基衍生化, 其中具有低分子量和高等电点的肽段经 1-(2-吡啶)-哌嗪或 1-(2-噻啉)-哌嗪衍生后其离子化效率显著增加^[24].

本实验将阳离子衍生化试剂溴化 1-丁基, 3-(3-氨基丙基)咪唑(BAPI)应用于肽段的羧基衍生化. 结合基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和电喷雾质谱(ESI MS)分析, 肽段的质谱离子化效率和带电荷数均得到显著提高.

1 实验部分

1.1 实验材料

1-丁基咪唑、3-溴丙胺氢溴酸盐和 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)购自 Sigma-Aldrich(St. Louis, USA). 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基-7-偶氮苯并三氮唑(HOAt)和肽段 RVYVHPI(RI-7)购自上海吉尔生化有限公司. 三氟乙酸(TFA)购自 Acros organics(Geel, Belgium). α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)购自 Bruker Daltonics(Bremen, Germany). 色谱纯乙腈购自 Merck(Darmstadt, Germany). 所有无机试剂均为分析纯, 而其他试剂均为色谱纯. 实验用水采用 Milli-Q 系统(Millipore, France)纯化制得.

1.2 BAPI 合成

BAPI 合成过程参考文献[25]方法. 首先将 1-丁基咪唑(2.0 g, 16 mmol)和 3-溴丙胺氢溴酸盐(3.5 g, 16 mmol)溶解于 20 mL 的无水乙醇中, 随后于氮气保护下 90℃回流反应 24 h. 反应完毕, 溶剂乙醇采用减压蒸馏的方式去除. 残余物用 3 mL 水溶解, 并加入固体氢氧化钾调节溶液 pH 约为 8, 真空干燥除水, 并将粗产物重溶于 30 mL 甲醇/四氢呋喃(体积比 1:1)溶液, 过滤、真空干燥, 并以乙腈/水为流动相采用反相色谱进行纯化.

1.3 多肽衍生

在典型的衍生化过程中, 首先将 7 μ L 0.8% 的 BAPI 的 DMF 溶液与 20 μ L 10 ng/ μ L 的 RI-7 水溶液均匀混合. 随后向上述溶液中顺序加入 4 μ L 2 mg/mL 的 EDC 和 3 μ L 2 mg/mL HOAt(均溶解于无水 DMF 中), 室温混合均匀. 最后, 向上述溶液中加入 24 μ L 0.03% TFA 水溶液, 室温混合均匀, 保持约 10 s, 反应完毕. 衍生反应采用真空浓缩的方式终止, 重溶于水或 50%乙腈/水溶液(均包含 0.1% TFA), 待分析. 空白衍生实验参考肽段的衍生过程, 只是在衍生过程中用水代替肽段溶液.

1.4 质谱分析

MALDI-TOF MS 实验在 Bruker UltraflexIII TOF/TOF 质谱仪(Bruker, Bremen, Germany)中采用阳离子反射模式进行分析. 质谱仪在使用前需用标准肽段进

行分子量校正. 首先将 0.5 μL 未衍生或 BAPI 衍生的肽段溶液点样于不锈钢靶板上, 待溶剂挥干后, 将 1 μL 的基质溶液(7 mg/mL CHCA 溶解于含有 0.1% TFA 的 60% 乙腈/水溶液中)点样, 溶剂挥干后即可进行质谱分析. ESI MS 实验在 LCQ^{DUO} 四级离子阱质谱仪(LCQ-IT MS, Thermo Fisher, San Jose, CA, USA)中进行.

2 结果与讨论

气相碱性和疏水性对物质的质谱离子化具有重要的影响^[26,27]. 如图 1A 所示, BAPI 分子中的丁基和丙基使得试剂具有良好的疏水性, 而咪唑环中的氮原子使得试剂具有更高的气相碱性. 此外, 通过 1-丁基咪唑的季铵化反应在 BAPI 分子中引入了一个永久性正价, 可显著提高肽段在质谱中的离子带电荷数, 增强肽段的离子化效率. 基于此, BAPI 可作为一种潜在有效的衍生试剂以提高肽段的质谱鉴定能力.

如图 1B 所示, 以 EDC 和 HOAt 作为缩合试剂, 衍生试剂 BAPI 中的氨基可以和肽段中的羧基反应形成共价的肽段衍生物. 模式肽段 RI-7 用于评价 BAPI 的衍生化效率. 如图 2A 所示, 在优化的衍生条件下, 肽段本身的 MALDI-TOF 质谱峰(质核比 883.5)完全消失, 全部转化为相应的衍生产物(质核比 1046.7), 显示了 100% 的衍生化效率. 此外, BAPI 衍生化使得肽段的分子量增加了 164.2 Da, 这与 BAPI 的分子结构(质核比 182.17)相一致. 进一步考察了肽段衍生物的稳定性. 衍生肽段首先采用真空浓缩终止反应, 进

而重溶于 0.1% TFA 水溶液或 0.1% TFA 乙腈/水(体积比 1:1)溶液. 如图 2B 和 C 所示, 从 MALDI-TOF MS 的谱型来看, 即使衍生化肽段于室温放置 1 周, 其质谱图没有发生显著改变, 显示了肽段 BAPI 衍生产物的高稳定性.

为了评价 BAPI 衍生化对肽段离子化效率的影响, 首先考察了真空浓缩法对衍生反应的终止效果. 如图 3A 所示, 通过采用 MALDI-TOF MS 分析肽段和终止反应后的空白衍生液的混合物, 在其质谱图中不能观测到肽段的 BAPI 衍生产物的质谱峰(质核比 1046.7). 上述结果表明, 采用真空浓缩法终止反应后, 过量的衍生化试剂不能和肽段继续发生反应. 因此, 将当量混合的衍生和未衍生化肽段 RI-7 进一步采用了 MALDI-TOF MS 进行分析. 代表性的质谱图如图 3B 所示, 与未衍生化肽段相比, 肽段经 BAPI 衍生后其质谱检测灵敏度平均可提高 42.2 倍($n=5$), 上述结果优于最近的报道^[24]中采用商品化哌嗪作为衍生化试剂的分析结果.

进一步采用 ESI MS 评价了 BAPI 衍生化对肽段质谱带电荷数的影响. 图 4A 是代表性的未衍生化肽段 RI-7 的 ESI 质谱图, 由图可见, 肽段主要带+1 价和+2 价电荷. 然而, 肽段经 BAPI 衍生后, 如图 4B 所示, 带+1 价电荷的肽段峰几乎完全消失, 此时肽段主要带+3 价电荷. 上述结果表明, 肽段经衍生后, 其质谱带电荷数得到显著增加. 因此, BAPI 衍生化有望用于增强 ETD 质谱中肽段的分析鉴定能力.

图 1 BAPI 合成(A)^[25]及肽段衍生(B)示意图

图2 BAPI 衍生 RI-7 的 MALDI-TOF MS 谱图(A)及其在含 0.1%TFA 水溶液(B)和 0.1%TFA 乙腈/水(体积比 1 : 1) 溶液(C)中的稳定性

3 结论

本论文发展了阳离子衍生试剂 BAPI, 并将其应用于肽段的羧基化衍生. BAPI 的高衍生化效率以及

衍生化产物的高稳定性可保证良好的衍生重现性. 此外, 不仅衍生化肽段的质谱检测灵敏度得到显著提高, 其质谱带电荷数可同时显著增加. 上述结果表明, BAPI 有望用于肽段的高灵敏度质谱鉴定研究.

图 3 未衍生 RI-7 和空白溶液(A)及 BAPI 衍生 RI-7(B)当量混合后的 MALDI-TOF MS 谱图

图 4 ESI MS 分析未衍生(A)和 BAPI 衍生(B)的肽段 RI-7

参考文献

- 1 Qin S, Ferdinand A S, Richie J P, et al. Chromatofocusing fractionation and two-dimensional difference gel electrophoresis for low abundance serum proteins. *Proteomics*, 2005, 5: 3183–3192
- 2 Cima I, Schiess R, Wild P, et al. Cancer genetics-guided discovery of serum biomarker signatures for diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 3342–3347
- 3 蒋涛, 杨蕾, 蒋慧, 等. 一种结合单张芯片序列捕获和高通量测序技术测序外显子组的方法. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41:

714–721

- 4 李树龙, 刘新, 魏来, 等. 乙肝纤维化分级相关血浆蛋白标志物的定量蛋白质组筛选. 中国科学: 生命科学, 2011, 41: 178–186
- 5 Foote R S, Khandurina J, Jacobson S C, et al. Preconcentration of proteins on microfluidic devices using porous silica membranes. *Anal Chem*, 2005, 77: 57–63
- 6 Qiao X, Wang L, Ma J, et al. High sensitivity analysis of water-soluble, cyanine dye labeled proteins by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Chim Acta*, 2009, 640: 114–120
- 7 Qiao X, Sun L, Wang L, et al. High sensitive protein detection by hollow fiber membrane interface based protein enrichment and *in situ* fluorescence derivatization. *J Chromatogr B*, 2011, 879: 1439–1443
- 8 Chiappetta G, Ndiaye S, Demey E, et al. Dansyl-peptides matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric (MALDI-MS) and tandem mass spectrometric (MS/MS) features improve the liquid chromatography/MALDI-MS/MS analysis of the proteome. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24: 3021–3032
- 9 Wang J, Zhang J, Arbogast B, et al. Tandem mass spectrometric characterization of thiol peptides modified by the chemoselective cationic sulfhydryl reagent (4-iodobutyl)triphenylphosphonium—effects of a cationic thiol derivatization on peptide fragmentation. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2011, 22: 1771–1783
- 10 Mirzaei H, Regnier F. Enhancing electrospray ionization efficiency of peptides by derivatization. *Anal Chem*, 2006, 78: 4175–4183
- 11 Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003, 422: 198–207
- 12 Qiao X Q, Wang R, Zhang L H, et al. Recent advancement of chemical derivatization and its applications to high sensitive analysis of peptide in mass spectrometry. *Chin J Anal Chem*, 2012, 40: 1123–1129
- 13 Kim J S, Cui E, Kim H J. Picolinamidation of phosphopeptides for MALDI-TOF-TOF mass spectrometric sequencing with enhanced sensitivity. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20: 1751–1758
- 14 Kulevich S E, Frey B L, Kreitinger G, et al. Alkylating tryptic peptides to enhance electrospray ionization mass spectrometry analysis. *Anal Chem*, 2010, 82: 10135–10142
- 15 Laremore T N, Weber D M, Choma C T. An evaluation of the utility of *in vacuo* methylation for mass-spectrometry-based analyses of peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19: 2045–2054
- 16 Shuford C M, Comins D L, Whitten J L, et al. Improving limits of detection for B-type natriuretic peptide using PC-IDMS: an application of the ALiPHAT strategy. *Analyst*, 2010, 135: 36–41
- 17 Li J, Ma H, Wang X, et al. Enhanced detection of thiol peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry after selective derivatization with a tailor-made quaternary ammonium tag containing maleimidyl group. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21: 2608–2612
- 18 Vasicek L, Brodbelt J S. Enhanced electron transfer dissociation through fixed charge derivatization of cysteines. *Anal Chem*, 2009, 81: 7876–7884
- 19 Arrigoni G, Resjö S, Levander F, et al. Chemical derivatization of phosphoserine and phosphothreonine containing peptides to increase sensitivity for MALDI-based analysis and for selectivity of MS/MS analysis. *Proteomics*, 2006, 6: 757–766
- 20 Tsumoto H, Ra M, Samejima K, et al. Chemical derivatization of peptides containing phosphorylated serine/threonine for efficient ionization and quantification in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22: 965–972
- 21 Xu Y, Zhang L, Lu H, et al. Mass spectrometry analysis of phosphopeptides after peptide carboxy group derivatization. *Anal Chem*, 2008, 80: 8324–8328
- 22 Zhang L, Xu Y, Lu H, et al. Carboxy group derivatization for enhanced electron-transfer dissociation mass spectrometric analysis of phosphopeptides. *Proteomics*, 2009, 9: 4093–4097
- 23 Zhang J, Al-Eryani R, Ball H L. Mass spectrometry analysis of 2-nitrophenylhydrazine carboxy derivatized peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2011, 22: 1958–1967
- 24 Qiao X, Sun L, Chen L, et al. Piperazines for peptide carboxyl group derivatization: effect of derivatization reagents and properties of peptides on signal enhancement in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25: 639–646
- 25 Bates E D, Mayton R D, Ntai I, et al. CO₂ capture by a task-specific ionic liquid. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 926–927
- 26 Pashkova A, Moskovets E, Karger B L. Coumarin tags for improved analysis of peptides by MALDI-TOF MS and MS/MS. 1. Enhancement in MALDI MS signal intensities. *Anal Chem*, 2004, 76: 4550–4557
- 27 Dreisewerd K. The desorption process in MALDI. *Chem Rev*, 2003, 103: 395–425

乔晓强, 2005 年毕业于河北大学化学与环境科学学院, 同年进入中国科学院大连化学物理研究所攻读博士学位, 师从张玉奎院士和张丽华研究员; 2011 获得理学博士学位, 同年进入河北大学药学院工作。目前已发表 SCI 论文 13 篇, 申请 5 项发明专利, 参与一本中文著作编写。主要研究方向侧重生物分子高效富集与高灵敏检测研究。

张丽华, 1995 年毕业于吉林大学化学系。同年进入中国科学院大连化学物理研究所攻读博士学位, 师从张玉奎院士; 2000 年获得理学博士学位。1999 年赴德国国家环境与健康研究中心合作研究。自 2001 年起在日本德岛大学国际微流控领域著名科学家马场嘉信教授研究室做博士后研究。2003 年进入中国科学院大连化学物理研究所工作; 2004 年入选中国科学院“百人计划”, 并获得择优支持。2005 年晋升为中国科学院大连化学物理研究所研究员, 任课题组长。曾获得辽宁省自然科学一等奖、中国分析测试协会 CAIA 一等奖和中国化学会青年化学奖等奖项。目前, 已在国内外核心刊物上发表文章 100 多篇, 申请 30 余项国内外专利, 参与了 8 本中英文著作的编写。担任

Analytical and Bioanalytical Chemistry 中国地区主编、*Analytical Chemistry* 杂志 A-page

编委、*Proteomics* 杂志和《色谱》杂志编委。现任国家重大科学研究计划“蛋白质定量分析新方法及相关技术研究”首席科学家。目前主要致力于蛋白质组定性和定量分析的新技术和新方法研究, 包括样品预处理新材料、多维集成化分离鉴定平台、高精度高准确度定量新技术以及高灵敏度鉴定新方法等。