

可调节电子活化解离 (EAD) 技术的MS / MS能提供极度不稳定的蛋白质翻译后修饰信息

使用SCIEX ZenoTOF™ 7600系统进行丙二酰化肽段的修饰位点定位

Tunable electron activated dissociation (EAD) MS/MS to preserve particularly labile post-translational modifications

Joanna Bons¹, Jason Cason², Birgit Schilling¹, Christie Hunter³

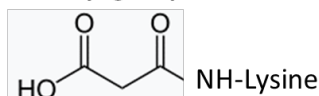
¹ Buck Institute, USA, ² SCIEX, Canada, ³ SCIEX, USA

翻译后修饰 (PTMs) 在多种生物学过程中扮演重要角色, 包括蛋白质构象和信号转导等等。赖氨酸酰化, 例如丙二酰化, 就是其中一种PTM, 并且部分受Sirtuin (SIRT) 蛋白质家族的成员赖氨酸脱酰酶调节。在之前一项关于SIRT5调节的赖氨酸丙二酰组的研究中发现, 在1137个丙二酰赖氨酸鉴定位点 (来自430个蛋白质) 中, 183个位点 (来自120个蛋白质) 在SIRT5 - / - KO小鼠中比野生型小鼠中显著增加¹。具体来说, 是丙二酰化调节了GAPDH的活性。然而, 丙二酰化肽段通常很难通过质谱和CID来表征, 因为这种修饰极其不稳定。

在这项工作中, 我们采用可调节能量的EAD技术, 研究了能量变化对高度不稳定的PTMs (例如丙二酰化) 的影响, 重点关注来自GAPDH (K-192) 中先前鉴定的丙酰基位点。对比了两种碎



Malonyl group



Protein G3P_MOUSE, K192

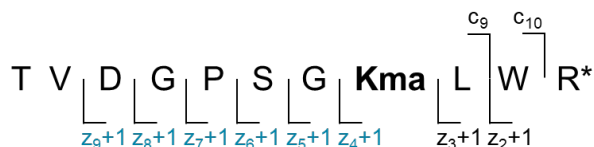


图1. 本文关注的丙二酰化肽段序列。对小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (P16858) 中185-195位, 其中192位赖氨酸 (K-192) 带丙二酰基的肽段进行研究。PTM位点特异性离子用蓝色突出显示。

裂模式 (EAD与CID) 在PTM位点定位中的作用。此外, 我们采用MRM^{HR}模式对样品进行定量, 研究EAD对不稳定修饰的定量PTM表征的作用²。激活ZENO trap采集MS/MS数据, 可提供显著的灵敏度, 提高EAD MS / MS二级图谱的质量。

SCIEX ZenoTOF™ 7600系统用于PTM表征的主要特点

- ZENOTOF™ 7600系统可以在高采集速度 (最高133 Hz) 下获得高分辨率MS和MS/MS图谱
- 灵活的多重碎裂能力: 碰撞诱导解离 (CID) 和电子活化解离 (EAD)³

- 使用ZENO™trap (Zeno阱)使MS / MS碎片离子信号强度得到5-10倍的提升
- 使用EAD MS / MS防止不稳定PTM的中性丢失 (丙二酰修饰中没有CO₂丢失)
- 采用可调节能量EAD MS/MS功能, 可以针对特定的PTMs进行能量优化
- 高效的EAD碎裂模式可产生丰度很好的离子用于PTM位点定位
- 对EAD碎片离子定量的初步评估展示了使用高分辨率MRM (MRM^{HR})工作流的定量性能

方法

样品制备: 丙二酰化合成肽段从Thermo Fisher Scientific公司购买, 在简单基质中稀释后进行后续分析。

液相方法: 采用纳升液相NanoLC™ 425系统的微升模式 (5 μL/min), 直接进样。色谱柱为0.3 mm × 150 mm (2.6 μm粒径) Phenomenex Omega Polar柱。柱温控制在30°C。采用8分钟的短梯度。

质谱方法: 所有数据均使用SCIEX ZenoTOF™ 7600系统和搭配微升系统探头和25 μm喷针的OptiFlow™ Turbo V离子源⁴采集。该系统配备了电子活化解离(EAD)技术, 可采用基于电子的碎裂模式以针对性的方式对丙二酰化肽段进行解离。在CID和EAD模式下, MRM^{HR}数据均采用累计时间为250 ms的TOF MS扫描和150 ms的MS/MS扫描进行采集。每个化合物均进行了能量优化。在整个研究过程中, EAD的电子流也经过优化, 最终值为5000 nA。

数据处理: MRM^{HR}数据通过SCIEX OS软件2.1中的Explorer及Analytics模块进行处理。

EAD可保留不稳定的PTM, 防止中性丢失

对来自小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (P16858) 的丙二酰化肽段TVDGSPGKmaLWR进行合成, 其中192位赖氨酸携带丙二酰化修饰 (图1)。使用CID碎裂模式的MRM^{HR}分析导致了y离子系列碎片的不稳定的丙二酰基团中CO₂显著的中性丢失(-44 m/z) (图2A)。然而EAD碎裂模式可生成完整的z+1离子和c离子系列碎片, 在MS/MS图谱中很容易检测到 (图2B)⁵。具体来说, 从z₄+1到z₁₁+1, 或者包含不稳定PTM的c₉和c₁₀等碎片离子, 都没有发生显著的中性丢失, 这使得PTM位点得以明确定位。

使用Bio Tool Kit软件中的Peptide fragment功能, 可以很容易地将两种解离技术之间的碎片离子覆盖情况进行可视化 (图2C)。

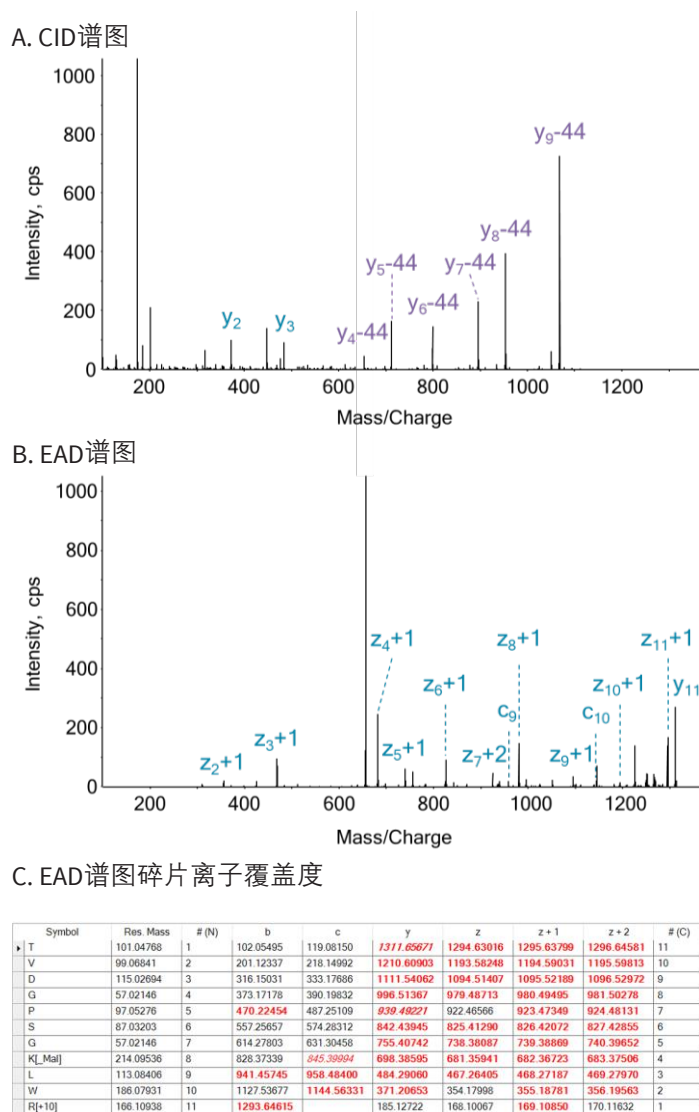


图2. TVDGPSPGKmaLWR肽段在CID和EAD模式下的MS/MS谱图。丙二酰化肽段 (m/z 656.3320) 分别采用 (A) CID模式和 (B) EAD模式 (KE = 5 eV) 进行分析。CID碎裂会导致-CO₂(-44)的中性丢失, 无法检测到“完整的”PTM特异性区分性离子。全面的EAD解离产生了高强度的碎片离子, 为直接的PTM位点定位提供了证据。(C) 通过EAD解离实现了接近完全的序列表征。

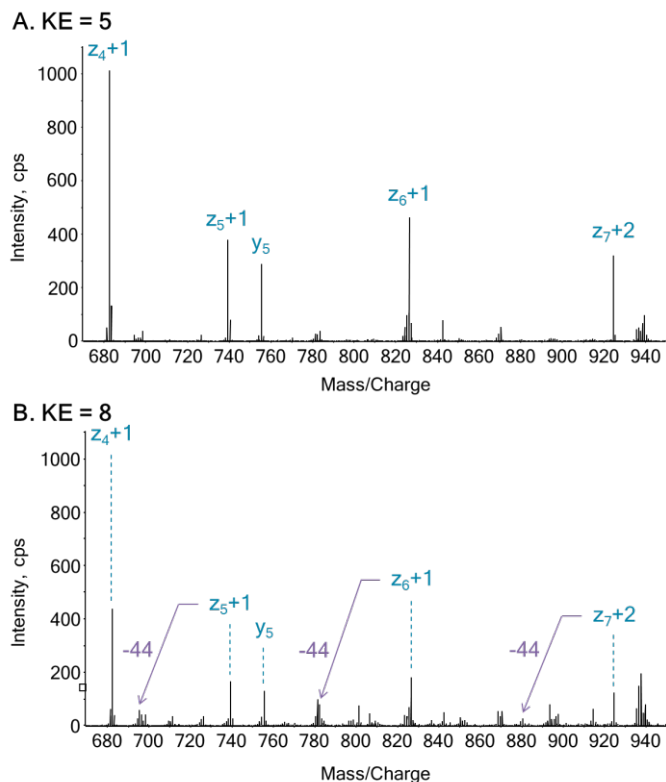


图3. EAD能量 (KE) 值对碎裂模式的影响。在EAD模式下分析丙二酰化肽段TVDGPSPGKMaLWR (m/z 656.330) 的MS/MS图谱, 其能量值分别为 (A) 5eV和 (B) 8eV。

EAD MS / MS的能更优化

利用了ZenoTOF™ 7600系统上EAD能量的可调节特性, EAD解离是在可调能量范围内进行的。这使得保留PTM修饰肽段上不稳定修饰的最佳解离参数得以确定, 同时实现最佳的灵敏度。能量可从0 eV增加到11 eV。在本研究中, 我们观察到KE值为5 eV时产生了高丰度、完整的PTM位点特异性碎片离子, 同时背景噪声很小。当KE增加到8 eV或更高时, MS/MS谱图变得更加复杂, 含有PTM修饰的碎片离子的中性丢失出现 (图3)。

有趣的是, 在EAD解离过程中, 不同能量下的碎片离子的解离模式不同 (图4)。大多数含有修饰残基和不稳定丙二酰修饰的碎片离子的峰面积在KE值为5 eV时最高。在较高的KE值下, 可观察到一些中性的PTM丢失, 但5 eV的KE值保持了翻译后修饰的完整性, 并使位点特异性片段离子的峰面积强度最大。

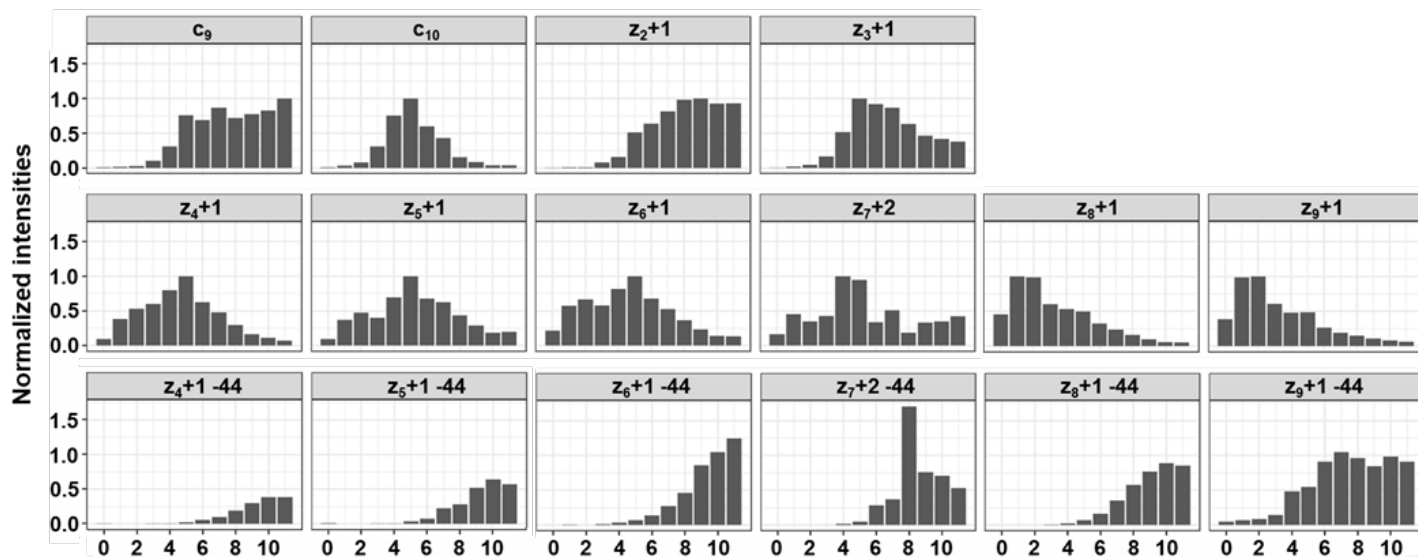


图4. EAD MS/MS的动能优化。在EAD模式下分析丙二酰化肽段TVDGPSPGKMaLWR, 其能量 (KE) 值从0 eV增加到11 eV。提取16个离子的色谱峰。对于完整的离子 (前两行), 峰面积值根据面积最高值进行归一化。对于有中性丢失的离子 (第三行), 面积值通过与其各自对应的完整离子进行归一化。

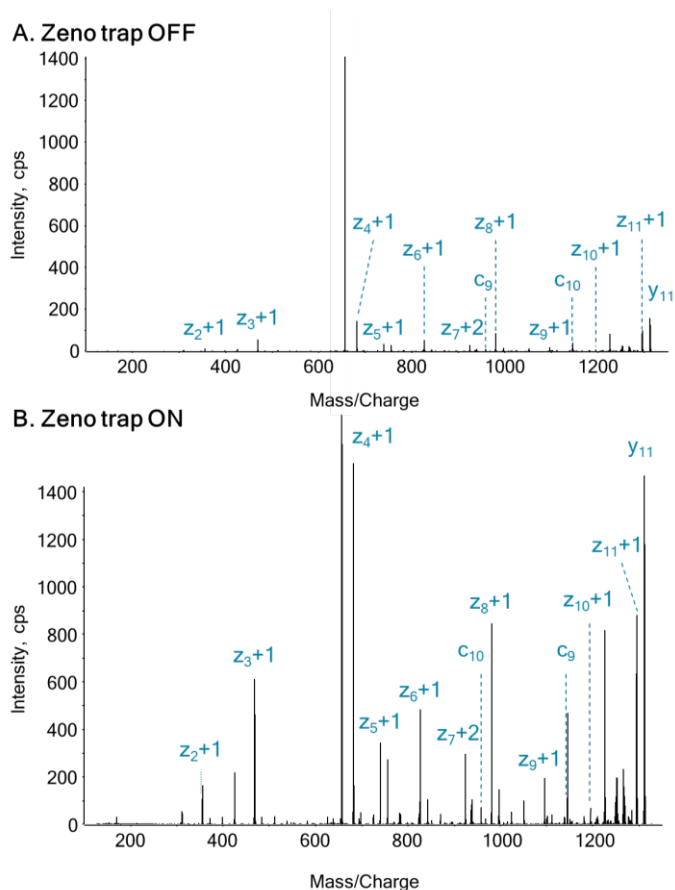


图5. Zeno trap激活时灵敏度提升。TVDGPSTGKmaLWR肽段 (m/z 656.3320) 采用EAD模式 (KE = 5 eV) 在 (A) 未激活和 (B) 激活Zeno阱时的MS/MS谱图。当与EAD结合使用Zeno trap时, 可观察到信号强度和图谱质量的显著改善, 使PTM定位更明确。

Zeno™ trap (Zeno 阱) 提高了MS/MS碎片离子的灵敏度

我们还研究了Zeno trap对MS/MS图谱质量和灵敏度的影响。Zeno trap位于碰撞单元的后半部分, 用于减少碰撞单元和加速器之间的离子损失。离子在Zeno trap中被捕获, 然后按质荷比从高到低的顺序送出, 这样所有离子都能同时到达TOF加速器的中心。这使占空比提升到90%以上, 并极大提高了MS/MS采集的灵敏度。

在激活Zeno trap和未激活Zeno trap的情况下分别采集的EAD MS/MS图谱显示, Zeno trap可提供更高的灵敏度 (图5) 。

表1. 利用Zeno trap获得MS/MS灵敏度的提升。TVDGPSTGKmaLWR肽段在在EAD模式 (动能= 5 eV) 下, 分别在激活和关闭Zeno trap时采集数据, 进样量不同 (柱上进样量16 fmol和80 fmol) 的定量分析。在激活和关闭Zeno trap情况下分别提取色谱峰面积, 并确定灵敏度变化。

Ions	m/z	Zeno trap on/off 16 fmol	Zeno trap on/off 80 fmol
z_4+1	682.3672	7.5	7.8
z_5+1	739.3887	9.6*	5.6
z_6+1	826.4207	8.0	8.0
z_7+2	924.4813	5.2	4.0
z_8+1	980.4950	7.0	6.8
z_9+1	1095.5219	4.0	6.2
c_9	958.4840	9.2*	4.1
c_{10}	1144.5633	3.5	6.8

*没有使用Zeno trap时的微弱信号

在激活Zeno trap和不激活Zeno trap的情况下, 分别提取两个不同进样量的PTM位点特异性碎片离子峰, 并计算峰面积比值 (表1)。对于不同碎片离子, 灵敏度增加在3.5到9.6倍之间, 平均值为6.4倍。这突出了Zeno trap在研究极低丰度离子方面的重要价值。

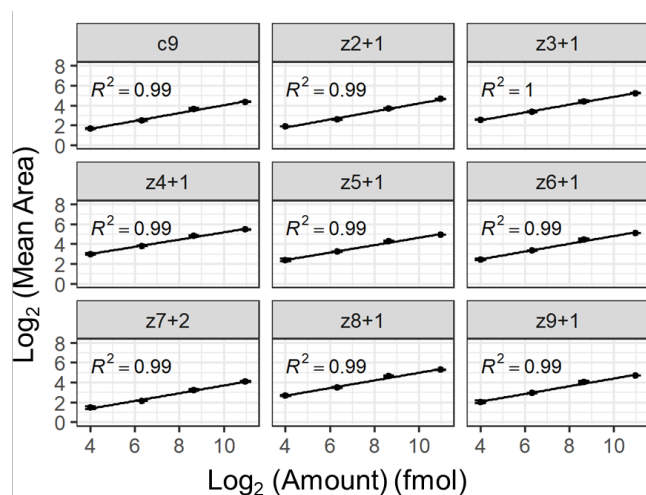


图6. EAD MRM^{HR}中碎片离子的线性响应。TVDGPSTGKmaLWR肽段在EAD模式下进行分析 (KE = 5 eV) , 进行三次重复, 上样量不同 (16、80、400和2000 fmol)。图示为9个碎片离子。每个离子的线性回归的R²系数均进行了展示。

使用靶向MRM^{HR}对定量结果进行初步评估

为了了解EAD MS/MS的定量性能，我们将4种不同浓度的肽段（柱上进样量为16、80、400和2000 fmol）重复进样三次，生成初始稀释曲线（图6）。

在这些初步评估中，被研究的9个碎片离子（ $R^2 \geq 0.99$ ）获得了良好的线性。

结论

在本研究中，我们利用SCIEX ZenoTOF™ 7600系统研究了电子活化解离在不稳定翻译后蛋白修饰的表征和定量中的作用。

- EAD的能量可以调节，并可以针对不同的分析物进行精确优化
- 对于丙二酰化这种极度不稳定的PTM，5 eV的KE值应该是一个很好的可以保持PTM同时获得更佳灵敏度的能量
- 对于包含不稳定PTM的肽段，可针对特定PTM进行能量优化的能力可以实现精确位点定位，并更大限度地提高定量准确性
- 此外，Zeno trap的使用显著提升了灵敏度，进一步提高了这种方法在PTM表征中的实用性
- 采用EAD碎裂模式的MRM^{HR}的初步结果表明，这种方法可以为不稳定的PTMs提供稳健的定量，不过我们计划进一步探索这个问题。

参考文献

1. Nishida Y, Rardin MJ et al. (2015) SIRT5 regulates both cytosolic and mitochondrial protein malonylation with glycolysis as a major target. *Mol Cell*, 59:321-32.
2. Schilling B, Hunter CL et al. (2015) Multiplexed, scheduled, high-resolution parallel reaction monitoring on a full scan QqTOF instrument with integrated data-dependent and targeted mass spectrometric workflows. *Anal Chem*, 87: 10222-9.
3. Qualitative flexibility combined with quantitative power -Using the SCIEX ZenoTOF 7600 LC-MS/MS system, powered by SCIEX OS software. SCIEX technical note RUO-MKT-02-13053-A.
4. Single source solution for low flow chromatography -OptiFlow Turbo V Source - always working in the sweet spot of sensitivity and robustness. SCIEX technical note. RUO-MKT-02-9701-A.
5. PTM site localization and isomer differentiation of phosphorylated peptides - Tunable electron activated dissociation (EAD) MS/MS using the ZenoTOF 7600 system. SCIEX technical note RUO-MKT-02-13174-A.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13006-ZH-B



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：SCIEX-China