

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00307

寡糖衍生化及基质辅助激光解吸电离 飞行时间质谱分析方法研究

韩欢欢 马岩 王璐 张万军 卫军营 张养军 钱小红*

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所,北京蛋白质组研究中心,蛋白质组学国家重点实验室,北京 102206)

摘要 为提高中性寡糖在基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)中的检测灵敏度,建立了以1-(4-氰基苯基)-4-哌啶碳酰肼(CPH)为衍生化试剂对寡糖的标记方法。寡糖的还原端与CPH的酰肼基团反应生成腙,使得寡糖被CPH标记,衍生物以MALDI-TOF质谱进行分析。结果表明:在反应温度95℃,醋酸浓度为0.125%(V/V),CPH过量100倍的条件下,衍生率可达最大,并且CPH衍生可使中性寡糖在MALDI-TOF质谱中的检测灵敏度提高10倍。本方法简便快速,灵敏度高,适合微量寡糖链的质谱分析。

关键词 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;1-(4-氰基苯基)-4-哌啶碳酰肼;中性寡糖

1 引言

糖基化作为一种普遍的蛋白质翻译后修饰反应,在生命过程中起着重要作用。糖蛋白上的寡糖链能够影响蛋白的稳定性及蛋白的构象,参与胞外胞内的信号转导,并能引发与其它分子之间特异的相互作用^[1,2]。基质辅助激光解吸电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱以其简单、快速和较高的灵敏度已经成为糖结构分析中的重要手段^[3,4]。但是,由于寡糖的亲水性强,缺乏易于结合质子的碱性基团,离子化效率较低,使得MALDI-TOF质谱对寡糖链结构的分析远远落后于对蛋白/肽段的结构分析。为提高寡聚糖在质谱中的检测灵敏度,研究者进行了各种尝试,主要通过对寡糖的化学修饰来提高寡糖的质谱检测灵敏度。如在寡聚糖的还原端通过衍生化加上各种结构中含有质子的基团(如季铵碱^[5,6]和吡啶^[7]),或加上易得质子的基团(如胍基^[7]);通过增强寡聚糖的疏水性来提高其检测灵敏度,因为疏水性强的分析物更容易与基质形成均匀的混晶从而产生更强的信号^[8],如将苯肼^[9,10]、苊醌^[11]基团标记在寡聚糖的还原端从而提高寡聚糖在质谱中的检测灵敏度。

1-(4-氰基苯基)-4-哌啶碳酰肼(CPH)包含哌啶基团,该基团在含氮杂环化合物中具有较强的碱性($pK_a=11.2$),推测其可能会使寡聚糖易于质子化,并且其结构中的苯环能够增强寡聚糖的疏水性。目前尚未见采用含哌啶基团的试剂对寡糖进行衍生化以提高其质谱检测灵敏度的报道。本研究以麦芽七糖为样品,通过优化反应条件,建立了CPH的寡糖衍生化方法,衍生化后的麦芽七糖的质谱检测灵敏度提高了10倍。此方法应用于葡聚糖和去唾液酸化的胎球蛋白的N-糖链质谱分析,获得了满意的结果。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

4800 ProteomicsAnalyzer 基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱仪(美国ABI公司),仪器控制软件为4700 Series Explorer Software,数据处理软件为Date Explorer Software 4.5;石墨化碳黑萃取柱(美国Alltech公司);离心机(美国Sigma公司);冷冻干燥离心机(美国Thermo公司)。

1-(4-氰基苯基)-4-哌啶碳酰肼(美国Maybridge公司);碘乙酰胺(IAA)与乙腈(比利时Acros公司);麦芽七糖(DP7),去唾液酸化的胎球蛋白(Asialofetuin),肽-N-糖苷酶F(PNGase F),2,5-二羟基苯甲酸(DHB),5-甲氧基水杨酸(美国Sigma公司);葡聚糖(包含聚合度1~20的葡萄糖聚合物,美国

2009-07-15 收稿;2009-11-11 接受

本文系国家重点基础研究规划项目(Nos. 2006CB910801, 2006CB910803, 2007CB914104)、国家高技术研究发展计划项目(No. 2006AA02A308)、国家自然科学基金项目(Nos. 30621063, 20635010, 20735005, 20875101)和国家重点实验室自主课题(No. 2008ZX10207)资助项目。

* E-mail: qianxh1@yahoo.com.cn

Beckman 公司); RapiGest™ (美国 Waters 公司); 三(2-甲酰乙基)膦盐酸盐 (TCEP, 美国 Pierce 公司); 三氟乙酸 (TFA, 美国 Fluka 公司); 水为 Milli-Q 纯水; 其余试剂均为国产分析纯。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液的配制 用乙腈配制 1×10^{-8} mol/L CPH 溶液; 用水配制 1×10^{-9} mol/L 麦芽七糖及葡聚糖溶液; 冰醋酸溶液: 用无水乙醇将乙酸稀释成不同浓度; SDHB 溶液: 10 g/L 2,5-二羟基苯甲酸溶液 (70% 乙腈, 0.1% 三氟乙酸) 与 10 g/L 5-甲氧基水杨酸溶液 (50% 乙腈) 以 9:1 (V/V) 混匀。

2.2.2 衍生化反应 取 10 μ L 麦芽七糖溶液或寡糖水溶液, 置于 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入 40 μ L CPH 溶液, 然后加入 10 μ L 一定浓度的冰醋酸的乙醇溶液, 在一定温度的水浴中敞口反应至溶液完全挥干。冷却后加入 100 μ L 50% 乙腈完全溶解, 点靶进行 MALDI-TOF 质谱分析。

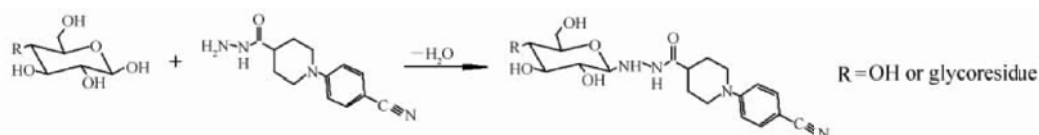
2.2.3 MALDI-TOF 质谱分析 将 1 μ L 样品点在不锈钢靶上自然干燥, 然后点 0.8 μ L SDHB 溶液真空干燥, 待基质完全干燥后, 在每个点加 0.2 μ L 乙腈, 使结晶更加均匀。一级质谱数据采集使用 MS-1 kV 反射模式, 加速电压 20 kV, 激光能量 6500, 每张谱图累加 1500 次。马心肌红蛋白胰酶酶切肽段作为标准物对仪器进行外标校正, 校准至相对误差 $\leq 1.0 \times 10^{-5}$ 。用 Date Explorer Software 4.5 计算每个离子的单同位素峰的面积, 定义相对强度为同一张质谱图中发生衍生化后 $[M + Na]^+$ 与 $[M + K]^+$ 峰面积之和与未发生衍生化的 $[M + Na]^+$ 与 $[M + K]^+$ 峰面积之和的比值。

2.2.4 去唾液酸化胎球蛋白 N-糖的制备 称取去唾液酸化胎球蛋白 1 mg, 溶解于 2 mL 50 mmol/L NH_4HCO_3 中, 取 10 μ L 加入 Rapigest 终浓度为 0.1%, TCEP 终浓度 5 mmol/L, 60 $^{\circ}C$ 水浴加热 30 min。冷却至室温, 加入 IAA 终浓度 25 mmol/L, 避光反应 1 h。加入 PNGase F 1 μ L, 37 $^{\circ}C$ 反应过夜。加入 TFA 终浓度 0.5%, 37 $^{\circ}C$ 反应 30 min, 13000 r/min 离心 10 min, 取上清液。用石墨化炭黑萃取小柱纯化 N-糖链^[12]: 先用 1.5 mL 80% 乙腈和 1.5 mL 水冲洗平衡柱子, 再将离心后的上清液上样于小柱, 用 1.5 mL 水将盐洗脱, 最后用 25% 乙腈将 N-糖链洗脱, 冷冻干燥离心机冻干。

3 结果与讨论

3.1 CPH 衍生化反应机理

采用 CPH 按照上述的衍生化方法首先对麦芽七糖进行衍生化, 反应机理如下:



此反应利用衍生化试剂的酰肼基团与寡糖的还原端生成成脎。寡糖分析中常用的还原胺化反应需要过量的衍生化试剂和硼氢化钠, 因此需要在质谱分析前将过量的试剂除去, 操作步骤多, 将增加对样品的损耗。而成脎的反应效率高, 反应只需加热和过量的带酰肼基团的试剂即可完成^[13], 并且在质谱分析之前不需要纯化过程, 更加适合对微量寡糖进行分析。将 CPH 衍生化后的麦芽七糖直接进行 MALDI-TOF 质谱分析, 图 1a 是 MALDI-TOF 质谱检测反应体系中不含冰醋酸的衍生化产物的结果, 衍生前后的麦芽七糖均以加钠峰和加钾峰的形式出现, 图 1 中 b ~ e 表示了各峰的同位素分布情况, 衍生化前后各峰的同位素分布情况一致。按照实验方法中的叙述, 用各同位素峰的峰面积计算相对强度, 即 $(A_{1401} + A_{1417}) / (A_{1175} + A_{1191})$, 以相对强度评价各反应条件对反应完全程度的影响。

3.2 基质的影响

2,5-DHB 是糖分析中最常用的基质, 但是由于 DHB 形成的结晶呈长针状, 且聚集在边沿处如图 2a, 需要用较长的时间选择最佳的激光采集位置。本研究采用 DHB 与 5-甲氧基水杨酸的混合基质 SDHB (图 2b), 并采用二次结晶法, 即在干燥的结晶点上滴加少量乙腈, 乙腈挥发后可得到均匀、晶粒较小的晶体表面 (图 2c)。两种方法并用极大改善了样品结晶结构和均匀程度, 提高了重现性和灵敏度。

3.3 衍生化反应条件的优化

3.3.1 反应温度的影响 首先选定反应体系中冰醋酸的含量为 1%, CPH 试剂过量 40 倍, 考察各反应

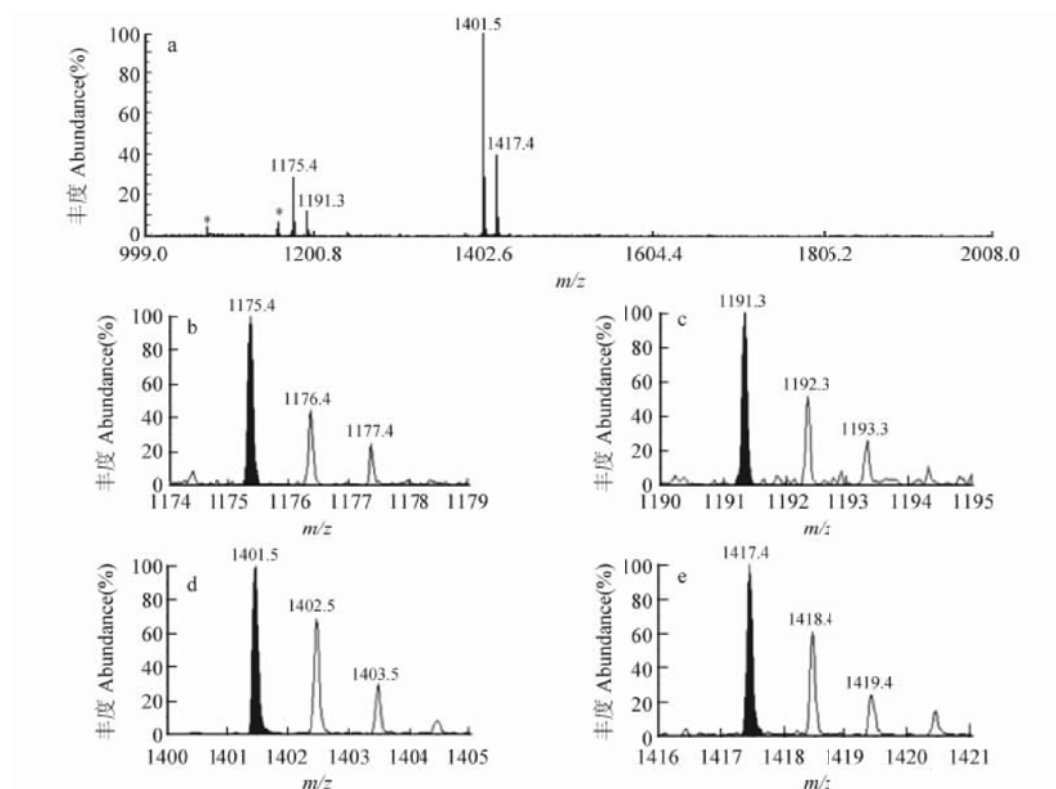


图1 麦芽七糖发生衍生化前后 MALDI-TOF 质谱图及同位素分布

Fig. 1 MALDI-TOF MS spectra of maltoseptase (DP7) derivatized by 1-(4-cyanophenyl)-4-piperidinecarbohydrazide(CPH) and isotopic distributions

a. 点靶量(Amount loaded on the target plate)10 pmol, *: 杂质峰(Impurity); b,c. 衍生化前的 $[\text{DP7} + \text{Na}]^+$ (m/z 1175)和 $[\text{DP7} + \text{K}]^+$ (m/z 1191)的同位素分布(Isotopic distributions of DP7 (m/z 1175 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1191 $[\text{M} + \text{K}]^+$)); d,e. 衍生化后的 $[\text{DP7} + \text{Na}]^+$ (m/z 1401)和 $[\text{DP7} + \text{K}]^+$ (m/z 1417)的同位素分布(Isotopic distributions of CPH derivatized DP7 (m/z 1401 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1417 $[\text{M} + \text{K}]^+$)).

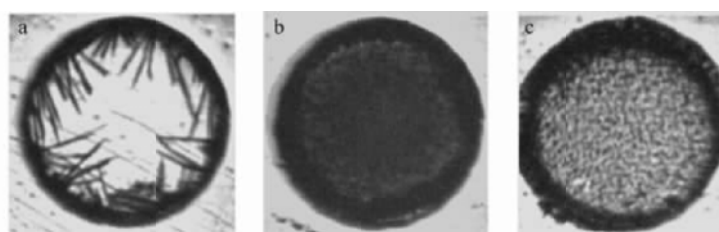


图2 点有不同基质的样品点的显微图

Fig. 2 Microscopic view of sample spots with different matrix

a. 2,5-Dihydroxybenzoic acid(DHB); b. Super DHB(SDHB); c. SDHB, 乙腈重溶(SDHB with acetonitrile recrystallisation)。

温度对反应完全程度的影响。结果如图3所示,在0℃冰浴8 h后用 N_2 吹干,或者置各温度水浴中至溶剂完全挥干,随着反应温度的升高,衍生化的完全程度有小幅升高。由于寡聚糖的还原端与酰肼基团之间是脱水反应。温度对此反应完全程度的影响并不大,该反应的关键是将反应体系中水分的及时除去^[14]。本实验采取水浴挥干方式除去反应体系中的水,在95℃水浴条件下,该反应5 min即可完成。

3.3.2 乙酸含量的影响 CPH与糖类物质还原端间的反应是由酰肼基团通过亲核攻击质子化的糖半缩醛碳原子进行的。通常认为在酸性环境下有利于该反应的进行,但文献[15]报道该反应并不需要酸的催化。在CPH试剂40倍过量,95℃水浴的条件下考察醋酸浓度对衍生化完全程度的影响,结果见图4a。当醋酸的浓度为0.125%时,反应的完全程度达到最大。本研究采用20 mmol/L NH_4HCO_3 的乙醇

溶液代替醋酸溶液,反应结果与未加入醋酸时的结果类似,反应完全程度很低。随着醋酸浓度的升高,相对强度值逐渐降低。文献[16]报道,较高的醋酸浓度会造成反应产物脎不稳定。本实验发现,醋酸含量升高不但造成反应完全程度的降低,还导致衍生化前后的麦芽七糖发生乙酰化,见图4b,在醋酸浓度为25%的条件下对麦芽七糖进行衍生化,反应的完全程度很低,大部分以未衍生化的形式存在, m/z 1217.5和1443.5分别是衍生化前后的麦芽七糖发生了乙酰化后的结果。最终选定醋酸浓度为0.125%(V/V)。

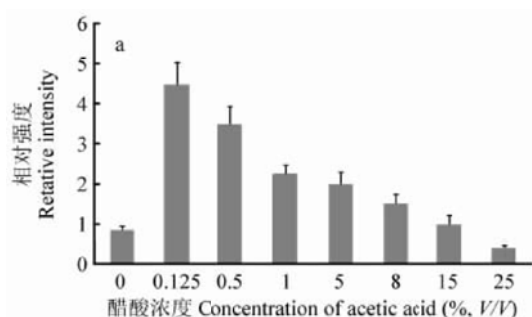


图4 醋酸浓度对麦芽七糖衍生化的影响

Fig. 4 Effect of concentration of acetic acid on derivatization

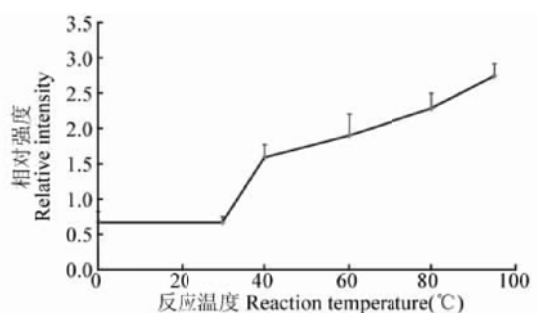
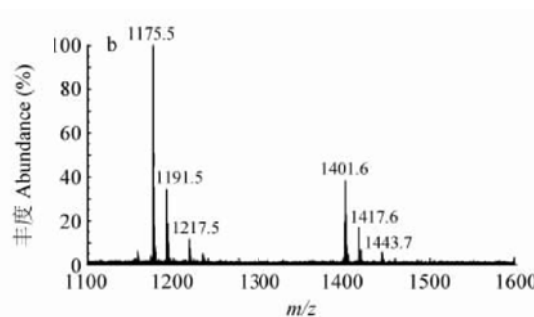


图3 反应温度对衍生化的影响

Fig. 3 Effect of temperature on derivatization



a. 不同醋酸浓度下的相对强度(Relative intensity of derivatization with different concentration of acetic acid); b. 25%醋酸, 95 °C 麦芽七糖发生衍生化后的质谱图(MS spectra of DP7 derivatization by CPH in 25% acetic acid at 95 °C)。

3.3.3 试剂过量倍数的影响 在95 °C,醋酸浓度为0.125%的条件下,考察CPH试剂过量倍数对衍生化反应的影响,结果见图5。当CPH试剂用量是麦芽七糖用量的100倍时,检测到的相对强度最大。当CPH试剂的过量倍数超过100时,由于大量CPH的存在,影响了结晶状态从而抑制了反应产物的质谱信号,使相对强度下降。最终选定CPH过量100倍。

3.3.4 灵敏度的提高 在优化的条件,即95 °C水浴,0.125%醋酸,CPH试剂过量100倍的条件下,麦芽七糖发生衍生化后10 pmol点靶的MALDI检测结果如图6a所示。未发生衍生化的麦芽七糖产生的信号强度与1 pmol麦芽七糖产生的信号强度接近,如图6b所示。在优化的条件下,此衍生化反应的反应效率约为90%。

为了评价CPH衍生化对寡聚糖检测灵敏度的提高程度,在优化的条件下比较了衍生化前后麦芽七糖的质谱检出限。在信噪比相同的情况下,未发生衍生化的麦芽七糖的检出限为0.1 pmol,CPH衍生化后的麦芽七糖的检出限为0.01 pmol,且不存在未发生衍生化的麦芽七糖,灵敏度提高了约10倍,与文献[7]报道的吉拉德试剂T(Girard's reagent T)衍生化的效果类似。CPH衍生化之后的寡聚糖在MALDI-TOF质谱中仍表现为 $[M + Na]^+$,表明CPH中的哌啶基团虽然具有较强的碱性,但是仍不能使寡糖得到质子表现为 $[M + H]^+$,尽管如此,寡聚糖检测的灵敏度仍然提高了10倍,这可能是由于引入了疏水基团,使分析物更容易与基质形成均匀混晶的结果。

3.4 对葡聚糖的分析

采用以上优化的条件对葡聚糖进行衍生化,用MALDI-TOF质谱检测相同量的葡聚糖衍生化前后的质谱图,结果见图7。图7a为衍生化前的检测结果,可以看到聚合度4~15的葡寡糖分子的 $[M + Na]^+$

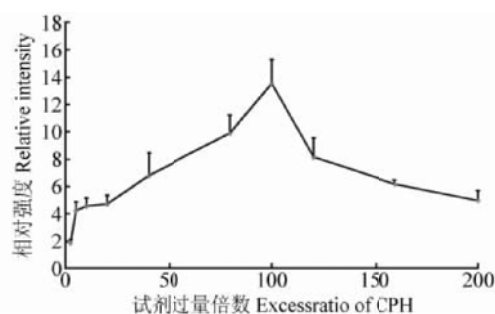


图5 CPH过量倍数对衍生化的影响

Fig. 5 Effect of excess ratio of CPH on derivatization

峰,各峰之间相差 162,与葡萄糖残基的相对分子质量一致。而 CPH 衍生后的检测结果至少可以看到聚合度 2~26 的葡寡糖分子的 $[M + Na]^+$ 峰。表明 CPH 能显著地提高寡糖的质谱检测灵敏度。

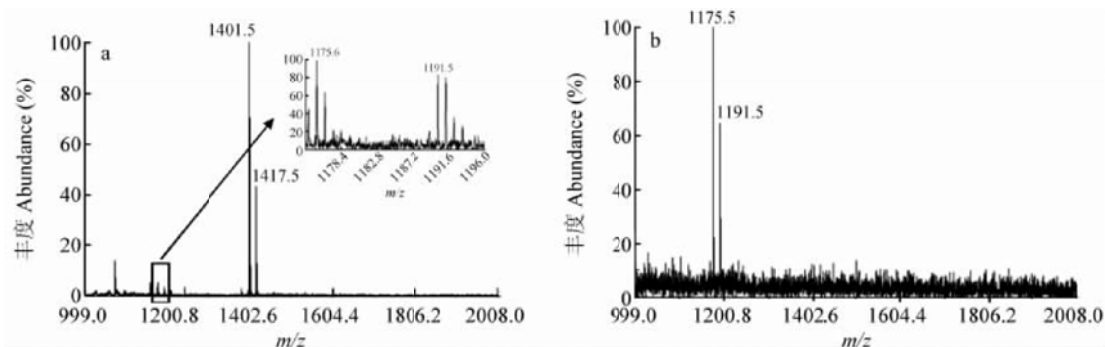


图6 优化条件下麦芽七糖发生衍生化的 MALDI-TOF 质谱图

Fig.6 MALDI-TOF MS spectra of DP7 derivatized with CPH

点靶量(Amount loaded on the target plate): a. 10 pmol; b. 1 pmol。

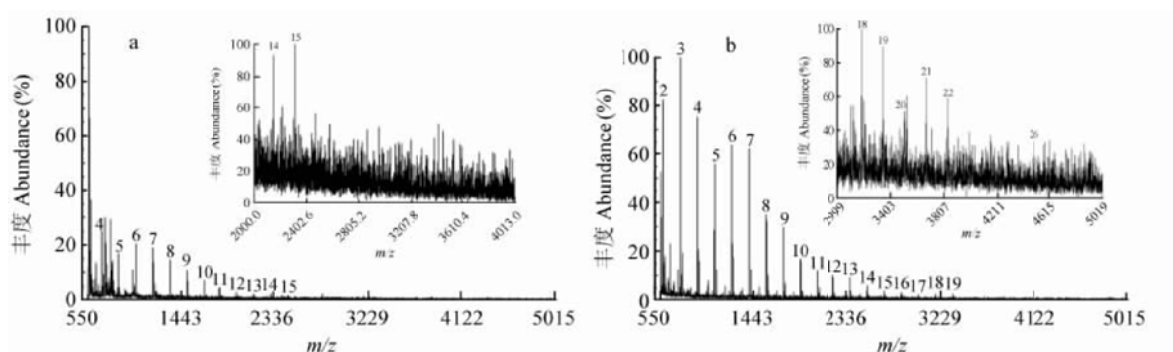


图7 葡聚糖衍生化前(a)和衍生化后(b)的 MALDI-TOF-MS 图

Fig.7 MALDI-TOF MS spectra of glucose ladder standard(a)and CPH derivatized glucose ladder standard(b)

图中峰 2~26 代表聚合度 2~26 的葡寡糖的 $[M + Na]^+$ 峰 (Peaks of 2-26 presents the maltodextrins with 2-26 degrees of polymerization. The peaks are $[M + Na]^+$).

3.5 对去唾液酸化胎球蛋白的 N-糖链分析

为了进一步证明 CPH 衍生化在糖基化分析中应用的可行性,将此方法应用于对标准糖蛋白去唾液酸化胎球蛋白的 N-糖分析中。图 8 为将 100 pmol 去唾液酸化的胎球蛋白的 N-糖链进行 CPH 衍生化之后的 MALDI-TOF 质谱检测图。图 8 得到的主要离子经 GlycoMod 软件计算后得到的糖型如表 1 中所示,文献[17]报道的去唾液酸化胎球蛋白的主要糖型全部被检测到,表明本方法适用于实际的糖基化样品的分析。

表1 去唾液酸化胎球蛋白 N-糖链经 CPH 衍生化后的质谱信息

Table 1 Observed signals of CPH-derivatized oligosaccharides released from asialofetuin

质荷比 m/z		组成 Composition
观测值 Observed	理论值 Theoretical	
1727.7	1727.8	HexHexNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂
1889.8	1889.8	Hex ₂ HexNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂
2092.8	2092.9	Hex ₂ HexNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂
2254.9	2255.0	Hex ₃ HexNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂

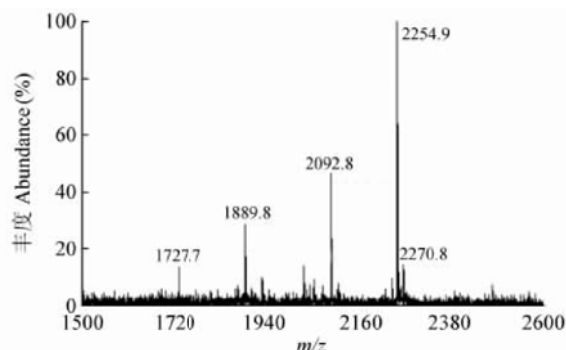


图8 去唾液酸化胎球蛋白 N-糖链经 CPH 衍生化后的 MALDI-TOF 质谱检测图

Fig.8 MALDI-TOF MS spectra of CPH-derivatized N-glycans released from asialofetuin

综上所述,以麦芽七糖为样品,通过优化反应条件,建立了 CPH 的寡糖衍生化方法,衍生化后的麦芽七糖的质谱检测灵敏度提高了 10 倍。将此方法应用于葡聚糖和去唾液酸化胎球蛋白的 *N*-糖链质谱分析,获得了令人满意的结果,表明本方法能够应用于实际的糖基化样品的分析。

References

- 1 Helenius A, Aebi M. *Science*, **2001**, 291(5512): 2364 ~ 2369
- 2 Lowe J B. *Cell*, **2001**, 104(6): 809 ~ 812
- 3 Harvey D J. *Mass Spectrom. Rev.*, **1999**, 18(6): 349 ~ 450
- 4 Dell A, Morris H R. *Science*, **2001**, 291(5512): 2351 ~ 2356
- 5 Okamoto M, Takahashi K, Doi T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1995**, 9(8): 641 ~ 643
- 6 Naven T J P, Harvey D J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10(7): 829 ~ 834
- 7 Shinohara Y, Furukawa J, Niikura K, Miura N, Nishimura S. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(23): 6989 ~ 6997
- 8 Kratzer R, Eckerskorn C, Karas M, Lottspeich F. *Electrophoresis*, **1998**, 19(11): 1910 ~ 1919
- 9 Lattová E, Kapková P, Krokhin O, Perreault H. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(9): 2977 ~ 2984
- 10 Lattová E, Chen VC, Varma S, Bezabeh T, Perreault H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21(10): 1644 ~ 1650
- 11 Zhang Y, Iwamoto T, Radke G, Kariya Y, Suzuki K, Conrad A H, Tomich J M, Conrad G W. *J. Mass Spectrom.*, **2008**, 43(6): 765 ~ 772
- 12 Packer N H, Lawson M A, Jardine D R, Redmond J W. *Glycoconj. J.*, **1998**, 15(8): 737 ~ 747
- 13 Shinohara Y, Sota H, Kim F, Shimizu M, Gotoh M, Tosu M, Hasegawa Y. *J. Biochem.*, **1995**, 117(5): 1076 ~ 1082
- 14 Hull S R, Turco S J. *Anal. Biochem.*, **1985**, 146(1): 143 ~ 149
- 15 Kameyama A, Kaneda Y, Yamanaka H, Yoshimine H, Narimatsu H, Shinohara Y. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(15): 4537 ~ 4542
- 16 ZHANG Ling(张琳), ZHANG Xi(张曦), YOU Jin-Mao(尤进茂), DUAN Ji-Cheng(段继成), ZHANG Wei-Bing(张维冰), YAN Chao(阎超), ZHANG Yu-Kui(张玉奎). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2004**, 32(8): 1002 ~ 1005
- 17 Yet M G, Chin C C, Wold F. *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263(1): 111 ~ 117

Derivatization of Oligosaccharides and Analysis by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry

HAN Huan-Huan, MA Yan, WANG Lu, ZHANG Wan-Jun, WEI Jun-Ying,

ZHANG Yang-Jun, QIAN Xiao-Hong*

(State Key Lab of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing 102206)

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

Abstract A derivatization method for the determination of oligosaccharides with high sensitivity by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) based on a labeling reagent 1-(4-Cyanophenyl)-4-piperidinecarbohydrazide (CPH) was proposed. The hydrazones were generated by the reaction of the reducing ends of oligosaccharides and the hydrazide of CPH. The derivatives were directly analyzed by MALDI-TOF-MS. Reaction conditions such as reaction temperature, concentration of acetic acid and excess ratio of CPH reagent were optimized. When the oligosaccharides reacted with 100 time excess of CPH at 100 °C and in 0.125% acetic acid (V/V), the yield was highest. The results showed the derivatization with CPH increased the sensitivity of MS detection and this method was suitable for the analysis of oligosaccharides' compositions.

Keyword Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry; 1-(4-Cyanophenyl)-4-piperidinecarbohydrazide; Neutral oligosaccharides

(Received 15 July 2009; accepted 11 November 2009)