

# AXIMA-CFR

## 基质辅助激光离子化飞行时间型质谱仪

### 应用文集 No. 3



### Curved Field Reflectron

### 用于蛋白质酶消解物的分析实例

1. 要点
2. 蛋白质的胰蛋白酶消解产物的 Precursor Ion 分析
3. 蛋白质的胰蛋白酶消解产物的 PSD 分析

## 1. 要点

MALDI-TOF MS 被广泛地应用在蛋白质分析领域。除单纯地测定蛋白质的分子量及多肽的质量指纹图谱外，采用 PSD (Post Source Decay) 的 MS/MS 分析方法是分析多肽结构的有用方法。近年来，PSD 不仅应用在确认多肽的氨基酸序列或翻译后修饰的分析，而且也应用在通过数据库检索分析蛋白质的特性上。采用 Curved Field Reflectron 方式(CFR，曲线场反射方式)的 PSD 分析并不是根据碎片离子的质量改变 Reflectron 电场的设定参数，由于一次可检测全范围的碎片离子使快速分析成为可能。在本数据集，是经双向电泳分离纯化的 *Salmonella typhimurim* 其中的一个样品斑点在胰蛋白酶消解后进行分析举例说明。

## 2. 蛋白质胰蛋白酶消解产物的前体离子(Precursor Ion)的分析

图 1 所示为 *Salmonella typhimurim* 经双向电泳分离，针对其中的一个约 40kDa 的斑点使用胰蛋白酶进行在胶消解，分析后获得的谱图。分析前采用 ZipTipC18(纯化柱，Millipore 公司)进行脱盐，基质采用  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy cinnamic acid 的 0.1% TFA 的 50% 乙腈水饱和溶液。

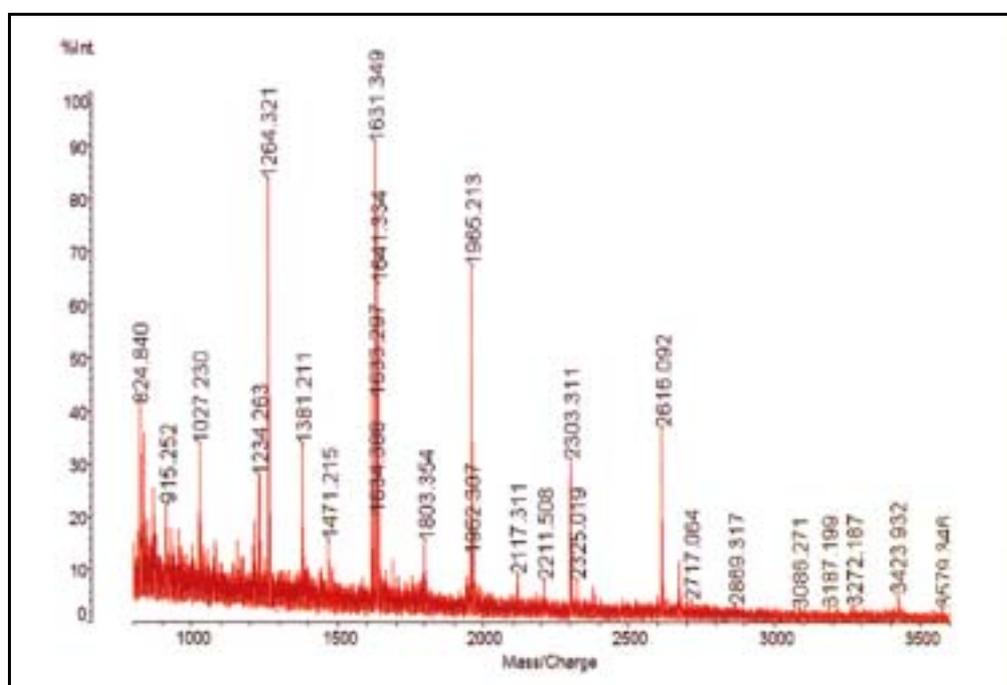


图 1：40kDa 斑点的产物母离子

针对图 1 中的产物母体的单一同位素采用检索引擎[Mascot]进行数据库检索。在图 2 显示了检索结果，结果是 OUTER MEMBRANE PROTEIN A (OMPA，外层膜蛋白 A)作为第一候補被确定。

	Accession	Mass	Score	Description
1.	<a href="#">qi 129140</a>	37566	66	OUTER MEMBRANE PROTEIN A PRECURSOR (OUTER MEMBRANE PROTEIN
2.	<a href="#">qi 129143</a>	37718	57	OUTER MEMBRANE PROTEIN A PRECURSOR (OUTER MEMBRANE PROTEIN
3.	<a href="#">qi 7444571</a>	44130	52	probable integrase - Rhodobacter capsulatus prophage cp4-57
4.	<a href="#">qi 129137</a>	26128	48	OUTER MEMBRANE PROTEIN A (OUTER MEMBRANE PROTEIN II)
5.	<a href="#">qi 2147835</a>	26114	48	outer membrane protein A - Escherichia fergusonii (ATCC 354)
6.	<a href="#">qi 129135</a>	37178	47	OUTER MEMBRANE PROTEIN A PRECURSOR (OUTER MEMBRANE PROTEIN
7.	<a href="#">qi 7188818</a>	37165	44	(AF234269) outer membrane protein A [Escherichia coli]
8.	<a href="#">qi 9106461</a>	83737	43	(AE003974) ATP-dependent Clp protease subunit [Xylella fast
9.	<a href="#">qi 2120868</a>	16207	43	prepilin - Moraxella bovis
10.	<a href="#">qi 1942721</a>	42150	42	Chain A, Elongation Factor Complex Ef-TuEF-Ts From Escheric;
11.	<a href="#">qi 132241</a>	37073	41	RECA PROTEIN
12.	<a href="#">qi 4699821</a>	43155	41	Chain A, Intact Elongation Factor From E. Coli
13.	<a href="#">qi 119212</a>	43256	41	ELONGATION FACTOR TU (EF-TU)
14.	<a href="#">qi 119201</a>	43286	41	ELONGATION FACTOR TU (EF-TU) (p-43)
15.	<a href="#">qi 96718</a>	43224	41	translation elongation factor EF-Tu.A - Salmonella typhimur
16.	<a href="#">qi 538596</a>	43256	41	translation elongation factor EF-Tu.A - Escherichia coli
17.	<a href="#">qi 1169895</a>	107087	41	MINOR TEICHOIC ACIDS BIOSYNTHESIS PROTEIN GGAB
18.	<a href="#">qi 6968727</a>	37348	41	(AL139078) possible sugar nucleotide epimerase/dehydratase
19.	<a href="#">qi 6225108</a>	21848	41	GTP-BINDING PROTEIN CGPA
20.	<a href="#">qi 6958314</a>	107371	40	(AF135191) BslIM [Bacillus sp. NEB-606]

1. [qi|129140](#) Mass: 37566 Score: 67

OUTER MEMBRANE PROTEIN A PRECURSOR (OUTER MEMBRANE PROTEIN 33K) (OU

Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
872.08	871.07	871.51	-0.44	333 -	339	1	RVEIEVK
915.20	914.19	914.52	-0.33	95 -	103	0	AQGVQLTAK
1083.18	1082.18	1082.54	-0.36	223 -	231	0	SDVLFNFNK
1157.27	1156.26	1156.59	-0.33	322 -	332	0	AALIDCLAPDR
1233.26	1232.26	1232.63	-0.38	118 -	128	1	LGGMVWRADTK
1264.36	1263.35	1263.65	-0.30	256 -	267	0	DGSVVVLGFTDR
1381.15	1380.15	1380.65	-0.50	268 -	280	0	IGSDAYNQGLSEK
1470.93	1469.92	1469.70	0.22	82 -	94	1	MPYKGDNINGAYK
1688.38	1687.38	1687.81	-0.43	104 -	117	0	LGYPITDDLDFYTR
2302.30	2301.29	2302.20	-0.91	195 -	217	0	FGQQEAPVVAPAPAPEVOTK

2. [qi|129143](#) Mass: 37718 Score: 57

OUTER MEMBRANE PROTEIN A PRECURSOR (OUTER MEMBRANE PROTEIN II)

Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
872.08	871.07	871.51	-0.44	334 -	340	1	RVEIEVK
915.20	914.19	914.52	-0.33	95 -	103	0	AQGVQLTAK
1027.27	1026.26	1026.58	-0.32	294 -	303	1	GIPADKISAR
1083.18	1082.18	1082.54	-0.36	224 -	232	0	SDVLFNFNK
1157.27	1156.26	1156.59	-0.33	323 -	333	0	AALIDCLAPDR
1233.26	1232.26	1232.63	-0.38	118 -	128	1	LGGMVWRADTK
1641.39	1640.38	1639.81	0.57	104 -	117	0	LGYPITDDLVDVYTR
1803.41	1802.40	1802.98	-0.58	283 -	299	1	AQSVVDYLISKGIPADK
2672.02	2671.02	2670.29	0.73	257 -	281	1	DGSVVVLGYTDRIGSDAYNQGLSER

13. [qi|119212](#) Mass: 43256 Score: 42

ELONGATION FACTOR TU (EF-TU)

Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
837.25	836.24	836.49	-0.25	118 -	124	0	EHILLGR
1027.27	1026.26	1026.58	-0.32	271 -	280	0	AGENVGVLLR
1214.29	1213.29	1213.62	-0.34	305 -	314	0	FESEVYILSK
1218.34	1217.33	1217.56	-0.23	178 -	188	0	ALEGDAEWEAK
1233.26	1232.26	1232.61	-0.35	326 -	334	0	GYRPFYFR
1617.19	1616.18	1615.73	0.45	250 -	263	1	ETQKSTCTGVEMFR
1803.41	1802.40	1802.88	-0.48	60 -	75	0	GITINTSHVEYDTPTR
1964.18	1963.17	1963.95	-0.78	156 -	172	0	ELLSOYDFPGDDTPIVR

### 3. 胰蛋白酶消解产物的 PSD 分析

采用 PSD 分析可以从图 1 中 12 个产物母体获得信息(表 1, 图 3 ~ 7), 然后使用[Mascot]的 MS/MS 离子检索功能(Ion Search)进行检索。其结果显示在约 40kDa 的斑点混有 Elongation Factor-Tu (EF-Tu)。根据产物母离子检索结果, 进行再分析发现 EF-Tu 的存在得分较低(第 13~16 位)。对表 1 中各产物母离子用 PSD 分析显示出检索结果。所获得的全部产物母离子分别占 OMPA 及 EF-Tu 序列的比例为 OMPA 为 60%, EF-Tu 为 30%。

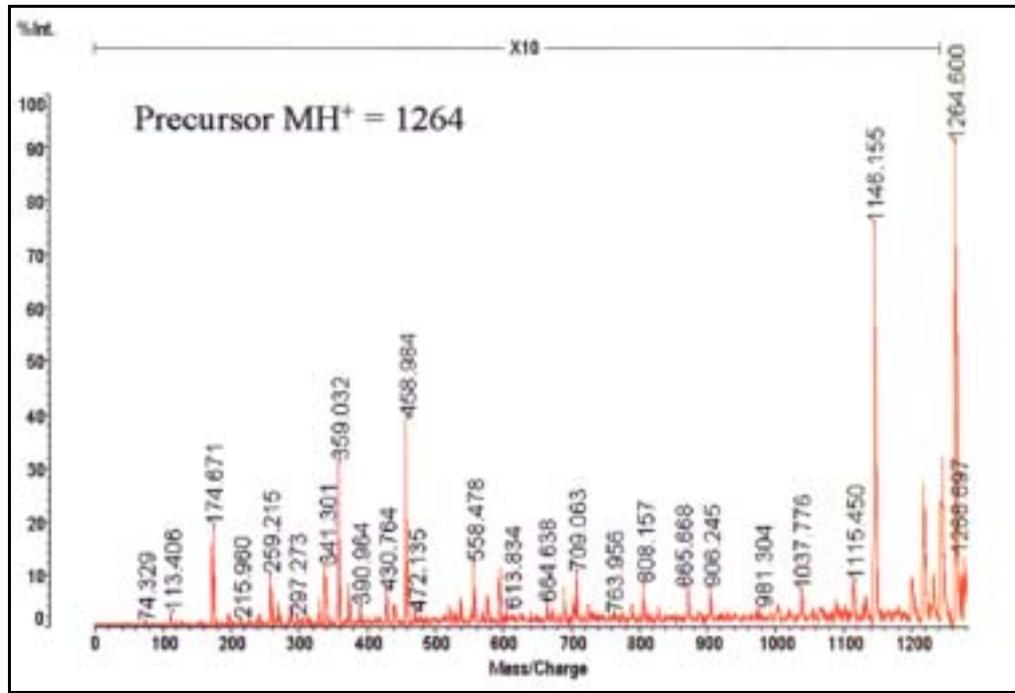


图 3：产物母离子(1264.4Da)的 PSD 质谱图  
(该 PSD 谱图支持鉴定 OMPA)

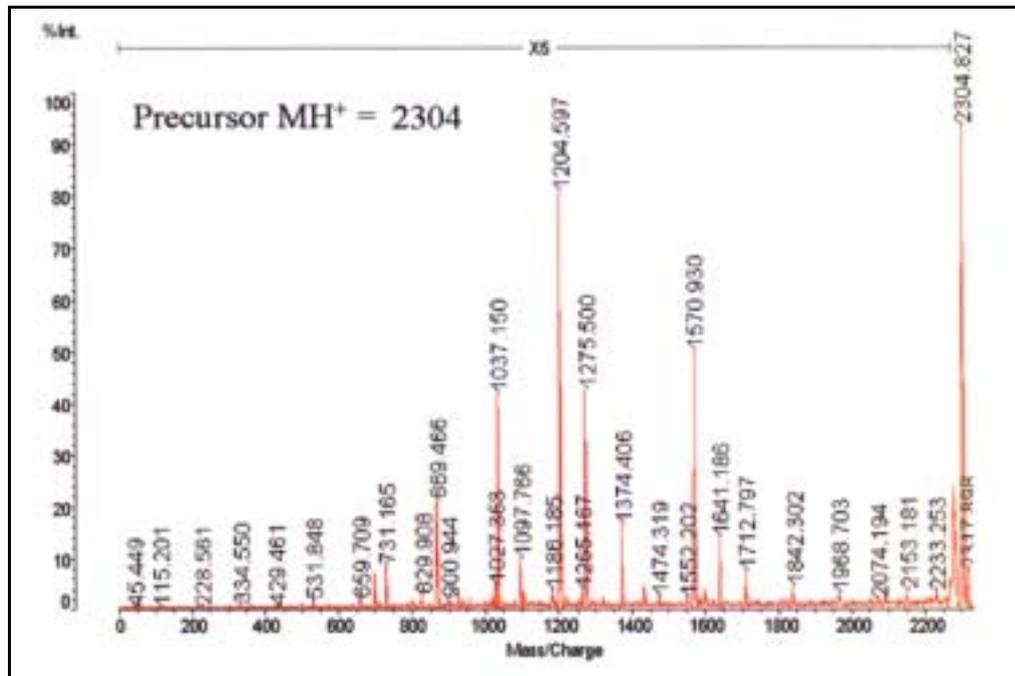


图 4：产物母离子(2304.8Da)的 PSD 质谱图  
(该 PSD 谱图支持确定 OMPA)

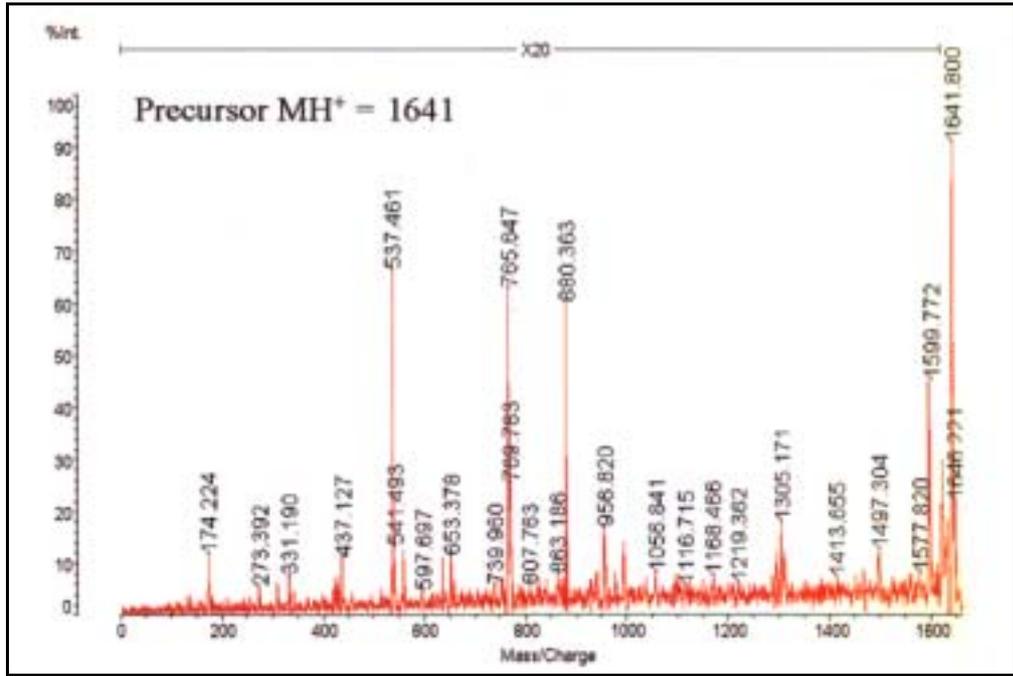


图 5：产物母离子(1641.8Da)的 PSD 质谱图  
(该 PSD 谱图支持确定 OMPA)

根据图 5 的 PSD 分析和从数据库检索的结果判断，1641.8Da 的产物母离子与图 2 中从多肽谱检索得分第二位的 OMPA 中所含有的碎片(104 ~ 117 位：LGYPITDDLVDVYTR)相当。这个氨基酸序列与得分第一位的 OMPA 中所含有的碎片(104 ~ 117 位：LGYPITDDLDFYTR)在第 114 位上的氨基酸发生了置换(Val→Phe)。由得分第一位 OMPA 的 Phe 被置换的产物母离子，说明在这个双向电泳的斑点存在 2 个 OMPA 的变体。

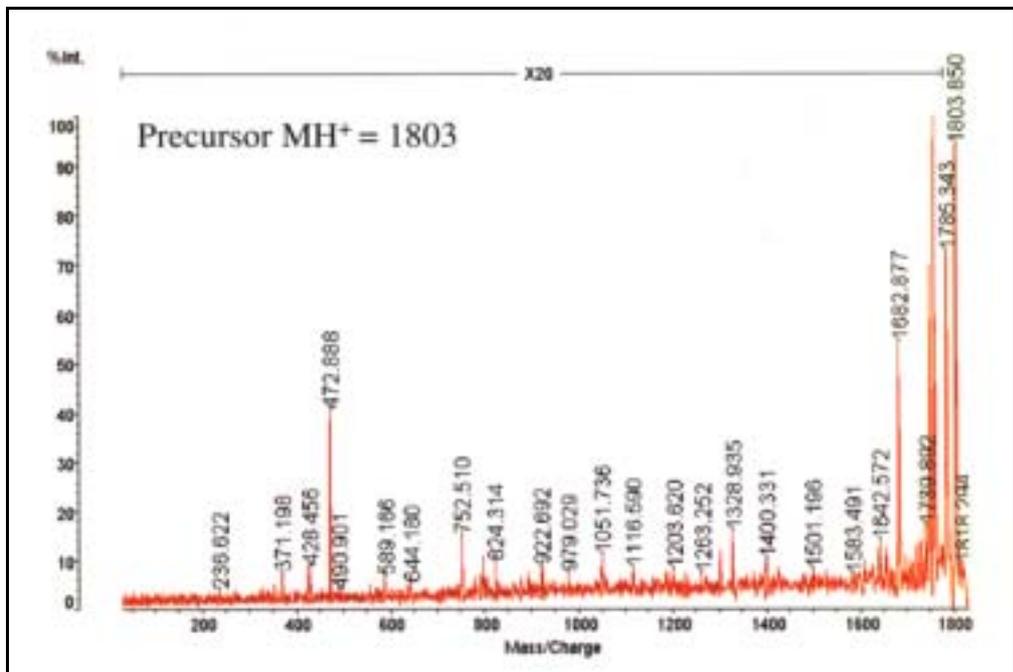


图 6：产物母离子(1803.8Da)的 PSD 质谱图  
(该 PSD 谱图支持确定 EF-Tu)

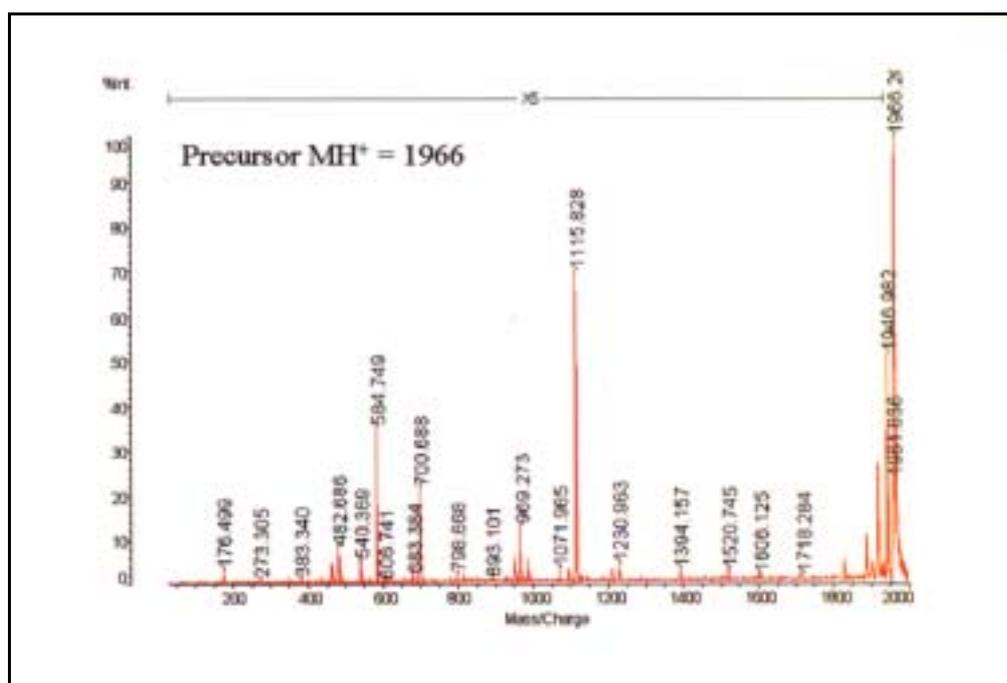


图 7：产物母离子(1966.2Da)的 PSD 质谱图  
(该 PSD 谱图支持确定 EF-Tu)

表 1：由 PSD 质谱图确定蛋白质的要点

	OMP A Variant 1	OMP A Variant 2	EF-Tu
no. of peptides	10	9	8
Database position <sup>1</sup>	1	2	14
<b>Precursor Ion<sup>2</sup></b>			
1027			B
1233			B
1264	A		
1381		B	
1438	?	?	?
1471	A		
1617			B
1641		A	
1803			A
1965			A
2303		B	
2616		B	
<sup>1</sup> 由[Mascot]的多肽质量指纹确定的蛋白质			
<sup>2</sup> A 为由[Mascot]的 MS/MS 离子检索确定的蛋白质 B 为由碎片的理论值确认的蛋白质			

针对表 1 中 1617Da 的 PSD 分析，对于确认接近质量值的 EF-Tu 碎片 EF-Tu250-263(理论值  $MH^+=1616.74$ )和 EF-Tu46-59(理论值  $MH^+=1616.79$ )是非常有用的。PSD 分析的结果被确认为 EF-Tu250-263。

进而对 1233Da 的 PSD 分析，对于确认接近质量值的 OMPA 碎片 OMPA 326-334(理论值  $MH^+=1233.62$ )和 EF-Tu118-128(理论值  $MH^+=1233.64$ )是非常有用的。PSD 分析的结果被确认为 OMPA 326-334。