

The analytical results obtained by potassium dichromate oxidation method, microwave digestion method and this method have no significant difference. But this method features ease of operate, less sample consumption, more rapid and better accuracy.

激光强度影响酸性多肽解吸电离和稳定性的研究*

黄河清*

(厦门大学生命科学学院分析测试中心, 海洋与环境教育部重点实验室, 厦门, 361005)

摘要 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术研究了激光强度对酸性多肽(acidic peptide, AP)解吸电离和稳定性的影响。实验结果表明了过强的激光强度会影响 AP 的稳定性,并引起部分 AP 分解成 3~8 种新的多肽结构。优化最佳激光强度是准确分析多肽质谱结构信息的关键。

关键词 多肽 激光强度 质谱 解吸电离 稳定性

1 前言

近年来,将生物质谱技术应用于多肽、蛋白质、酶、核酸和多糖等生物大分子结构与功能的研究工作逐年增加^[1]。短短几年内,蛋白质组学已迅速发展成为当前生命科学中最有前瞻性和挑战性的学科,蛋白质组学研究的进展有助于解决基因功能组学无法解决的一系列重大科学难题^[2,3]。开展蛋白质组学研究的基本手段是双向凝胶电泳分离和生物质谱技术。前者用于分离细胞释放的全蛋白,后者用于分析蛋白质的结构信息^[4,5]。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOFMS)是生物质谱技术的主要类型之一,通常用于高通量筛选目的蛋白。在基质辅助条件下, MALDI-TOFMS 通过提供不同的激光强度,将生物大分子解吸电离成为分子离子,检测灵敏度可高达 fmol 量级,准确度达到 0.1%~0.01%,是目前从事蛋白质组学研究最有效的分析工具之一^[6]。

基质、溶剂、盐和样品制备方法的选择和优化是 MALDI-TOFMS 技术准确分析生物大分子的关键,尤其是样品和基质均匀混合后晶体形成的状况。

MALDI 是一种软离子技术,如果不与其他硬件技术(例如源后分解装置(post source decay, PSD)联用,通常被激光解吸电离后的生物大分子将形成单电荷或多电荷分子离子,不会形成碎片分子离子^[7,8]。近期的研究表明,激光强度影响乳铁蛋白的肽脂纹图谱解吸和电离^[9,10],对生物大分子解吸电离和形成新的离子-分子反应起着重要的作用。激光强度是一个重要参数,优化激光强度是准确测定多肽或混合多肽重要的实验步骤^[10-13]。

本文以不同强度的激光为探针,研究激光强度对酸性多肽(acidic peptides, AP)解吸电离程度、一级结构稳定性和形成碎片分子离子等参数的影响,也为用 MALDI-TOFMS 分析多肽一级结构提供了可行的技术。

2 材料与方法

2.1 实验材料

酸性多肽(AP),由美国依利诺大学生物技术研究中心合成,标准分子量为 2960.5Da,一级结构为 SSGVSLLT SNKDEEQRELLKAISNLLD,其中含有三对 LL 键,一对 SS 键,一对 EE 键。在偏微弱酸(pH6.5)条件下,AP 以 $[M+H]^+$ 方式显示了相对丰度较高的质谱峰, m/z 为 2961.50。

* 本论文部分研究受教育部骨干教师计划和海洋与环境教育部重点实验室基金资助。

** 作者简介:黄河清,男,教授,厦门大学生命科学学院分析测试中心主任,主要从事蛋白质工程、蛋白质组学、神经多肽生物学和生物质谱技术的研究工作。

基质 2, 5-羟基苯甲酸 (2, 5-dihydroxybenzoic acid, DHB) 购自美国 ICN 生物医学公司。其他化学药品和 Tris-HCl 缓冲液均为分析纯。

2.2 实验方法

2.2.1 样品制备

将粉状 AP 用 pH 6.5 左右双重蒸馏水配制成浓度标准为 1×10^{-6} mol/L 的样品溶液。

基质 DHB 用二次重蒸馏水搅拌溶解 30min, 配制成 DHB 饱和水溶液。样品和基质溶液事先混合 30~50s, 取混合物 0.8 μ L, 直接点滴在 MALDI-TOF 质谱仪专用样品靶样品孔内, 待样品自然干燥后, 进行分析。

2.2.2 激光强度单位

激光强度单位通常用 mJ/cm^2 或 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 方式表示。但是质谱仪激光器的激光强度与激光器使用时间长短和激光在传输途径中的损耗大小有着密切联系。一般需要特殊专用仪器才能检测到样品靶上的激光强度。在研究论文中, 描述激光强度通常采用内部单位 IU (internal unit)^[10]。为了讨论的方便, 本文也采用质谱仪上所显示的内部单位 IU 表

示激光强度。

2.2.3 仪器与测定条件

实验所用质谱仪为美国通用生物系统公司生产的 Voyager DE-STR 型的 MALDI TOF 质谱仪, 配置脉冲氮激光 (337nm) 作为离子解吸电离源。分析模型使用高分辨率线性模型和延迟引出 (delayed extraction) 技术。在实验过程中, 激光强度变化范围为 1900~2700IU, 加速电压控制在 20kV, 平均测定每个样品的激光脉冲次数约为 100 次。采用内标法标定多肽质谱峰位。

3 结果与讨论

3.1 弱激光强度对 AP 解吸电离和稳定性的影响

近期研究表明, 多肽解吸电离程度与所施加的激光强度有关^[9-10]。参考 Voyager DE-STR MALDI-TOF 质谱仪使用手册可知, 在待测样品质谱峰的绝对强度低于 1000.00、脉冲次数少于 30 次的条件下所获得的质谱图, 可视为噪声质谱图处理。图 1 是在激光强度为 2100IU 条件下, 所获得的 AP 质谱图。

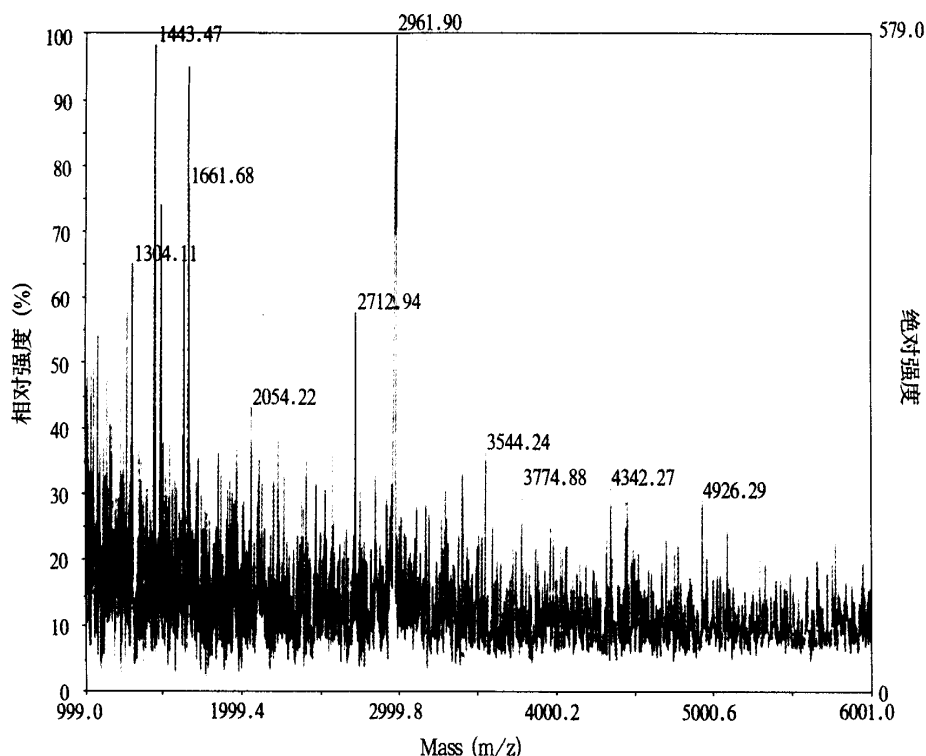


图 1 激光强度为 2100IU 条件下的 AP 质谱图

由图 1 可见, AP 显示的特征质谱峰, 其 m/z 位于 2961.5 处, 同时在 m/z 为 1304.11, 1443.37, 1661.66, 2054.22 和 2712.94 处也显示质谱峰。表面看来, 图 1 是一张普通的 AP 质谱图, 但图中右侧纵坐标表示的绝对强度仅有 579.00, 明显低于 1000.00。

可见, 图 1 是一张含有 AP 质谱峰的噪声图, 其噪声信号强度与 AP 相当。显然, 当激光强度为 2100 IU 时, 无法把 AP 完全解吸电离成为分子离子, 造成 AP 质谱峰的绝对强度小于 1000.00。

把激光强度提高到 2200 IU 时, 可获得图 2 所示的 AP 质谱图。其 AP 质谱峰的绝对强度由原来的 579.00 急剧上升到 2851.7, 高于 1000.00。比较图 1 和图 2 结果可以看出, 图 2 中 AP 质谱峰的绝对强度明显高于其它质谱峰。根据图 2 质谱峰的 m/z , 同时参考 AP 的一级结构(m/z : 2961.5), 经过推算可以发现, 这些非 AP 质谱峰均不是来自 AP 的分解产物。显然, 在激光强度为 2200 IU 的条件下, 仍不足以使 AP 分解成新的短肽分子离子, 只是提高了 AP 解吸电离为分子离子的百分比。

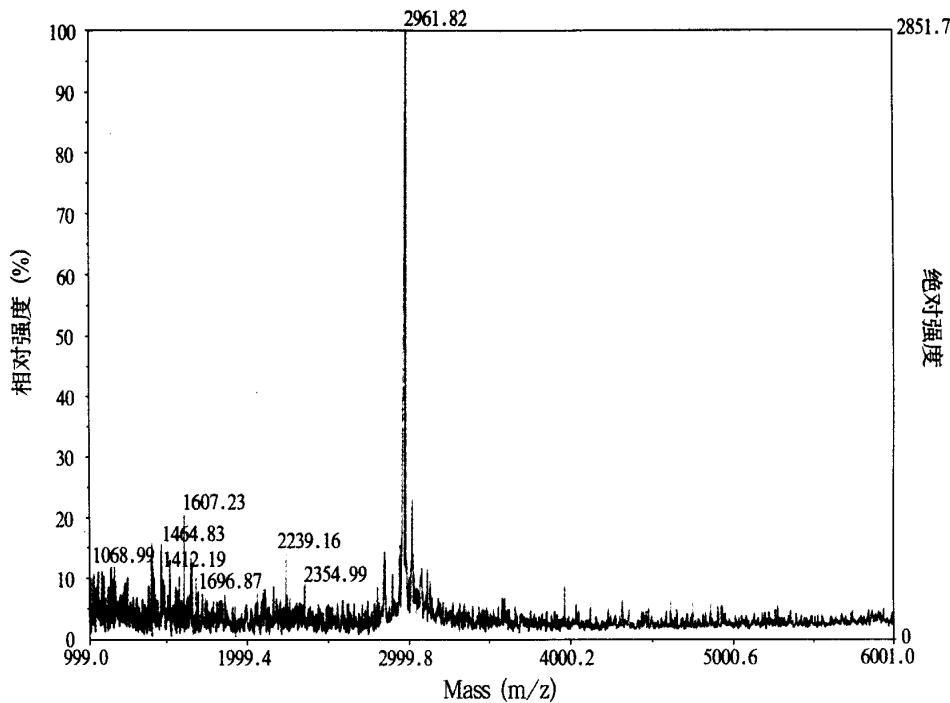


图 2 激光强度为 2200 IU 条件下的 AP 质谱图

3.2 中激光强度对 AP 解吸电离和稳定性的影响

激光强度为 2400 IU 解吸电离 AP, 可获得图 3 所示的质谱图。其中 AP 的质谱峰绝对强度高达 13000, 明显高于图 2 中的绝对强度。图 3 也是一张能反映 AP 质谱的特征图。

由图 3 可见, AP 特征质谱峰位于 m/z 2961.30 处, 而其他一些非 AP 为相对强度低于 20% 的弱质谱峰。根据图 3 中 AP 和图 2 中非 AP 质谱峰的 m/z 和 AP 的一级结构, 可推算得出表 1 的结果。

表 1 在激光强度为 2200 内部单位条件下, AP 的一级结构和它的分解产物

理论计算分子量 (道尔顿)	测量分子量 (m/z)	相对误差(A) ($\times 10^{-6}$)	相对误差(B) (%)	一级结构
2961.50	2961.30	67	0.01	SSGVSLTSTNKDEEQRELLKAISNLLD
1246.58	1247.44	- 689	0.07	SNKDEEQREL
1543.78	1543.92	- 90	0.009	DEEQRELLKAISN
1541.84	1543.92	- 1347	0.134	EEQRELLKAISNL

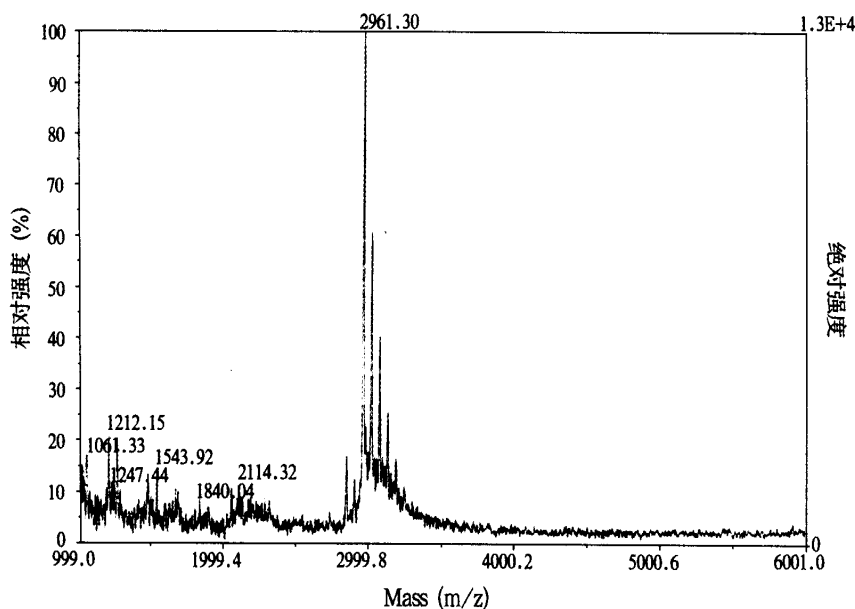


图3 激光强度在2400内部单位条件下, AP和AP分解产物质谱图

表1中 m/z 为 1247.44 和 1543.92 的峰对应于可能有三种不同一级结构的 AP 分解产物, 而图 1、图 2 中却没有出现这种现象。形成这三种产物的原因可能有两个。

其一, 分解产物来源于 AP 合成过程中的残留物。当激光强度低于 2200 IU 时, 这些残留物因激光强度过低而无法被解吸电离; 只有当激光强度高于 2200 IU 时, 才能被解吸电离。其二, 激光强度低于 2200 IU 时, 只能解吸电离 AP, 而无法使 AP 分

解成其他产物; 激光强度高于(或等于) 2200 IU 时, 才能引起部分 AP 分解, 并形成新短肽, 解吸电离成多肽分子离子峰, 表现出非 AP 的质谱峰(见图 3 和表 1)。此外, 在图 3 中 AP 主峰右侧, 还可发现若干个荷比略高于 $[AP + H^+]$ 的质谱峰, 这种现象可能是由于在合成 AP 过程中, 合成反应液中 K^+ 、 Na^+ 或其他金属离子与 AP 形成 $[AP + M^+]$ (M^+ 表示金属离子) 结构所致。因此, 在图 2 和图 4 中同样也可以获得相似的实验结果。

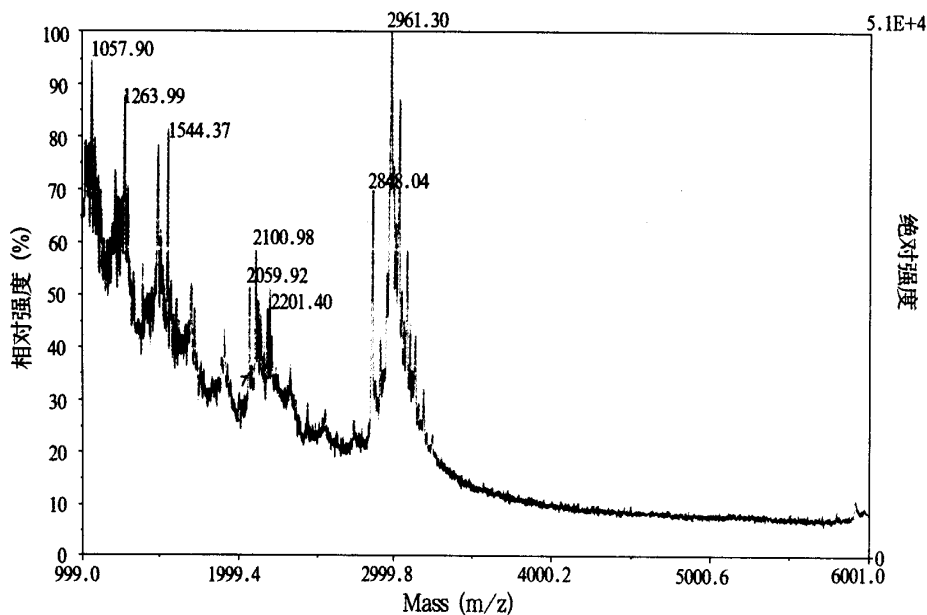


图4 在激光强度为2600内部单位条件下, AP和AP分解产物的质谱图

3.3 强激光强度对 AP 解吸电离和稳定性的影响

图 4 是在激光强度为 2600 IU 的条件下所获得的 AP 质谱图, 其中 AP 的绝对强度迁跃到 51000。实验表明, 当激光强度继续升高到 2700 IU 时, AP 所呈现的绝对强度仍然在 51000 ± 400 , 这说明在激

光强度为 2600 IU 的条件下, 在激光束所覆盖的范围内, AP 百分之百被解吸电离成 AP 分子离子。根据 AP 的一级结构、AP 的 m/z 和图 3 中非 AP 的质谱峰所对应的 m/z , 可总结出表 2 的结果。

表 2 在激光强度为 2600 内部单位条件下, AP 的一级结构和它的分解产物

理论计算分子量 (道尔顿)	测量分子量 (m/z)	相对误差(A) ($\times 10^{-6}$)	相对误差(B) (%)	一级结构
2961.50	2961.30	67	0.01	SSGVSLTTSNKDEEQRELLKAISNLLD
1056.62	1057.30	-643	0.06	QRELLKAIS
1262.60	1263.90	-1029	0.10	SLLTTSNKDEEQ
1543.8	1544.37	-369	0.04	DEEQRELLKAISN
2058.10	2059.92	-884	0.09	GVSLTTSNKDEEQRELLK
2099.10	2100.98	-894	0.09	SNKDEEQRELLKAISNLL
2200.17	2201.40	-559	0.06	LTSNKDEEQRELLKAISN
2200.17	2201.40	-559	0.06	LTSNKDEEQRELLKAISNL
2200.17	2201.40	-559	0.06	TSNKDEEQRELLKAISNLL

由表 2 可知, AP 在被解吸电离的瞬间, 由于激光强度过强而造成部分 AP 被分解成新的多肽分子离子, 即 6 种多肽分子离子峰, 8 种可能是 AP 分解的多肽一级结构。这一现象说明, 过高的激光强度会引起 AP 多肽分解, 形成新的分子离子, 呈现出新的短肽质谱峰。反之, 使用过低的激光强度, 无法完全解吸电离多肽成为分子离子, 会影响测定结果准确性。参考上述质谱图所显示的绝对强度高和样品质谱峰增加数目, 可以较为科学地拟定测定多肽质谱特性的最佳激光强度, 避免引入人为实验误差, 以提高实验准确率。

参考文献

- Rubakhin S S, Garden R W, Sweedler J V et al. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 172-175
- Osthuisen M C, Steyn B, Lindsay D et al. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 94: 47-51
- Wahburn M P, Yates J R. In *Proteomics: A Trends Guide* Blackstock W, Mann V eds, Elsevier, 2000, 28-32
- Cahill D J, Nordhoff E, O'Brien J et al. *Proteomics from Protein Sequence to Function*. Pennington S R, Dunn M J eds, Springer-Verlag, New York Inc. 175 Fifth Avenue, New York, 2001
- Westergren-Thorsson G, Malmstrom J, Marko-Varga G. *J of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 24: 815-824
- Fukai T, Kuroda J, Normura T. *J Am Soc Mass Spectrum*, 2000, 11: 458-463
- Hummon A B, Huang H Q, Kelley W P et al. *J Neuroscience*, 2002, (在印刷中)
- 黄河清, 孔波, 林庆梅等. *生物物理学报*, 2002, 18: 99-103
- Keller B O, Li Liang. *J Am Soc Mass Spectrum*, 2000, 11: 89-93
- Benard S, Arohold J, Lehenert M et al. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1999, 100: 115-125
- Jean-charles B, Francois M, Lsabelle L et al. *Journal of Chromatography B*, 2001, 753: 123-130
- Yan W, Gardella J J A, Wood T D. *J Am Soc Mass Spectrum*, 2002, 13: 914-920

收稿日期: 2002-07-12

Effects of laser intensity on desorption ionization and stability of peptides. Huang Heqing (School of Life Sciences, Ministry of Education laboratory of Marine and Environmental Science, Xiamen University,

Xiamen, 361005)

Effects of laser intensity on the desorption ionization and stability of acidic peptide (AP) were studied with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. The experimental results show that excessively strong laser intensity will affect the desorption ionization and stability of AP and will cause part of AP to decompose into 3~8 new peptide structures. So optimization of laser intensity is the key factor for accurately analysing mass spectrometric information of peptides.

讨论与研究

三种二氧化氯比色计测试性能的对比试验

王立* 金米聪

(宁波市疾病预防控制中心, 宁波, 315010)

摘要 用 DR/850, GDY-101 和 QYJ 型三种比色计及 7230 型分光光度计分别对水中不同浓度的 ClO_2 进行了检测。结果表明: 三种比色计及 7230 型分光光度计的测定结果相互间无显著性差异 ($P > 0.05$)。经过比较, GDY-101 型比色计具有体积小、重量轻、结构简单、操作方便、价格低等优点, 更适用于 ClO_2 的野外检测。

关键词 DPD 法 二氧化氯 比色计

1 前言

随着二氧化氯应用的不断推广, 二氧化氯的检测变得越来越重要。目前二氧化氯的比色测定主要有 DPD 法^[1]、酸性靛蓝法^[2]、甲酚红法^[3]、罗丹明 B 法^[4]、LGB 法^[5] 等。其中, DPD 法是一种比较成熟的分析方法(显色灵敏、直观), 也是目前文献报道的二氧化氯测定方法中唯一的溶液从无色到有色的显色体系, 因此颇受关注。

有些厂家还专门研制了使用该法测定二氧化氯的比色计及其配套试剂, 如 DR/800 系列, GDY-101 型及 QYJ 型等。这些比色计虽然原理大致相同, 但由于仪器功能和性能上的差别, 价格相差悬殊, 为了让广大用户了解这些比色计的性能, 便于选购, 我们对市场上的三种比色计(DR/850 型, GDY-101 型, QYJ 型)的测试性能进行了对比试验。

2 实验部分

2.1 仪器

DR/850 型便携式比色计(美国 HACH)、GDY-101 型比色计(吉林小天鹅), QYJ 型比色器(深圳宝安), 7230 型分光光度计(附带 3cm 比色皿, 上海分析仪器厂)。

2.2 试剂

HACH 二氧化氯试剂包, GDY-101 型二氧化氯试剂包, QYJ 型二氧化氯试剂包, N, N'-二乙基-P-苯二胺草酸盐(DPD), 碘化钾, 甘氨酸, EDTA, 磷酸二氢钠, 磷酸氢二钠, 硫酸(均为 AR)。

0.1% DPD 溶液: 将 1g DPD 草酸盐溶于 8mL 硫酸(1+3)和 200mg EDTA 二钠盐的无氯蒸馏水中, 稀释至 1000mL, 贮存于棕色磨口玻璃瓶中, 在暗处保存。

磷酸盐缓冲液: 称 24g 无水磷酸二氢钠、46g 无

* 作者简介: 王立, 男, 1976 年出生, 大学本科, 技师, 主要从事食品、环境及劳动卫生理化检测与研究。