

MALDI-MS 法中基体和样品 结合情况的研究*

赵善楷** 张金红 朱智华 查庆民

(中山大学测试中心 广州 5102275)

[摘要] 本文通过静态小角激光光散方法对 4 种不同基体: 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB), 咖啡酸 (CA), 尼古丁酸 (NA) 和 3-氨基-4-羟基苯甲酸与蛋白质、溶菌酶和细胞色素 C 在水或水与乙腈溶液中的行为进行了观察, 结果发现 3-氨基-4-羟基苯甲酸分别在上述两种蛋白质的水/乙腈溶液中所测得的分子量 M 和第二维利系数 A_2 都较其他基体高好几倍, 有很强的缔合力, 作者联系基体对辅助激光解吸电离作用对上述现象进行了讨论。

关键词: 激光光散射法 基体辅助激光解吸电离质谱法 蛋白质

基体辅助激光解吸电离自 1983 年问世以来^[1], 人们就发现固相基体与样品在形成晶体时相互结合的状态对激光解吸作用的发挥起了十分重要的作用^[2], 如结合不好就得不到好的谱图。因此, 人们在制备样品时注意使样品和基体溶液在形成固体结晶时尽可能地均匀分散, 并往往还需选取最佳位置以获得质量良好的谱图。但是, 可靠直观地确定基体与样品结合的实际情况至今尚无报导。

我们曾试图使用透射电子显微镜, 通过观察基体与样品蛋白质结晶的复型薄膜, 以了解蛋白质在基体晶体上分布情况, 但没有成功。本文叙述了利用小角激光光散方法, 通过观察蛋白质与不基体在水溶液中的结合状态, 以图对基体与蛋白质散射方法, 通过观察蛋白质与不同基体在水溶液中的结合状态, 以图对基体与蛋白质的结合情况作进一步了解, 至于水溶液中结合状态是否与它们干燥结晶后结合状态完全一致则还有待证实, 不过可以推断二者应有密切的关联。我们选用了 4 种基体即 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB)、咖啡酸 (CA)、尼古丁酸 (NA) 以及 3-氨基-4-羟基苯甲酸, 并分别与溶菌酶和细胞色素 C 配成溶液, 用小角激光光散射法通过测定其分子量和第二维利系数, 了解它们在溶液中结合情况, 获得了有意义的结果。

1996-12-04 收

* 国家自然科学基金项目

** 通讯联系人

1 实验部份

测定溶液结合状态的仪器是美国 LDC/Milton Roy 公司生产 KMX-6 型小角激光光散射仪,该仪器简要工作原理如下^[3,4]:

一束光通过介质时,由于光波的电磁场与介质分子相互作用的结果,使组成分子中的电子产生强迫振动成为二次波源向各个方向发射电磁波,即为散射光,在静态光散射讨论的范畴内,它具有与其入射光相同的频率。

1910 年,爱因斯坦继瑞利散射和电磁波理论之后,提出光散射的溶液升落理论,把光散射看作由于分子热运动而造成的介质指数或介电常数的局部升落所引起的,介质常数的局部升落主要与溶液浓度的局部升落有关,有如下关系式:

$$R_0 = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left(\frac{d_n}{d_c} \right)^2 \frac{C}{\frac{1}{M} + 2A_2 C} \left[\frac{1 + \cos^2 \theta}{2} \right] \quad (1)$$

n_0 : 溶剂的折射率

λ_0 : 入射光波在真空中的波长

d_n/d_c : 溶液折射率随浓度变化率

N_A : 阿佛加得罗常数,为 6.023×10^{23} 个/摩尔

C : 溶液浓度

θ : 散射池中心到观测散射方向入射光方向的夹角

R_0 : 剩余瑞利因子

$(1 + \cos^2 \theta)/2$: 汤姆逊因子,反映了散射强度是散射角的函数

$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left(\frac{d_n}{d_c} \right)^2$ 表征溶液性质的光学常数,不同的溶液体系, K 值不同,所以,(1)式可简写为:

$$\frac{(1 + \cos^2 \theta) KC}{R_0} = \frac{1}{M} + 2A_2 C \quad (2)$$

对于小角激光光散射仪(KMX6 型),因为测定用的散射角 $< 7^\circ$,故(2)式可简写为:

$$\frac{KC}{R_0} = \frac{1}{M} + 2A_2 C \quad (3)$$

实验时,我们只需配多个依次递减浓度($10^{-4} \sim 10^{-8}$ M)溶液,分别测得 R_0 ,代入公式,以 $\frac{KC}{R_0}$ 做纵坐标, C 作横坐标,得到一个简单的直线,将其外推至零浓度,其截距即为 $1/M$ (平均分子量的倒数),其斜率为 A_2 (第二维系数)。

A_2 是表征高分子-溶剂相互作用的参数,表征了高分子的远程相互作用,即高分子链段与溶剂分子间的相互作用, $A_2 > 0$ 表示高聚物能溶解在所给定的溶剂中 A_2 越大,溶剂的溶解能力越好。

2 结果与讨论

现以溶菌酶(Isozyme)为例,分子量为 14306Da,测量了 CA_2 、安息得酸、NA 和 DHB 四种基体与其混合溶液的 M 值和 A_2 值,得到结果如表 1。

表1 测定结果

体系	平均分子量	第二维利系数 A_2
溶菌酶/0.15MNaCl	1.39×10^4	-3.64×10^{-2}
溶菌酶/0.15MNaCl+0.015M 咖啡酸	2.49×10^4	9.53×10^{-3}
溶菌酶/0.15MNaCl+0.015M 安息香酸	5.10×10^4	1.89×10^{-2}
溶菌酶/0.15MNaCl+0.015M 尼古丁酸	1.52×10^4	2.59×10^{-3}
溶菌酶/0.15MNaCl+0.015M DHB	1.88×10^4	5.03×10^{-3}

从测得的平均分子量的大小来看,在其与 0.15MNaCl+0.015M 安息香组成的体系中测得的平均分子量最大,为 5.10×10^4 ;其次是 0.15MNaCl+0.015M 咖啡酸组成的体系。在 高分子化合物溶液中使用小角激光散射法测得的平均分子量较实际分子量大,存在两种情况:一是高分子之间互相聚合成二聚体、三聚体等;另一种可能就是溶剂分子与高分子化合物结合非常好,一个高分子化合物分子与很多个溶剂分子相结合使其表观分子量增加。判断何种可能,可参看其 A_2 值, A_2 值越大,表示溶剂与溶质的相互作用越大,溶质与溶剂分子结合得越好,不会因相互排斥而导致溶质分子聚集成多聚体^[5]。从溶菌酶在安息香酸+NaCl 溶液中所测的很大的表观分子量,同时又有最高的第二维利系数看,我们可以判断溶菌酶是与安息香酸分子结合很好,而不会是与之相排斥而单独地聚集成多聚体,这从其具有与蛋白质所含氨基酸相似的一 NH_2 、一 OH 和一 COOH 基团来看,二者相互结合也是可以预期的。如果我们从所测得表观分子量,以单个溶菌酶分子与安息香酸分子结合个数来估算,可以按下式计算: $N = (5.10 \times 10^4 - 1.39 \times 10^4) \div 153 = 242$,即 242 个。公式含义为:混合体系中测得的平均分子量减去在 NaCl 中测得的平均分子量后与该基体的分子量相比较,则得出样品分子在溶液中与基体分子结合的数目,这一数值是很大的。此外,也可以认为有大量安息香酸分子与两个溶菌酶分子结合,此时其个数计算应为: $(5.1 \times 10^4 - 1.39 \times 10^4 \times 2) \div 150 = 154$,即有 154 个安息香酸分子与两个溶菌酶结合。如用同样方法计算其它基体与溶菌酶结合情况(注意这些体系的第二维利系数都为较高正值),溶菌酶在各体系中与基体结合的分子数分别为:咖啡酸 61 个,尼古丁酸 11 个, DHB32 个。

使用细胞色素 C 进行测定也有相似结果,即在 NaCl+安息香酸溶液体系中取得表观分子量和第二维利系数,也比其他体系取得数据大 5 倍以上。

由此我们认为,安息香酸虽然对 355nm 的激光波长有强烈吸收,且结构与咖啡酸、DHB 都很相似,但由于其与蛋白质分子(溶菌酶)的结合作用太强,蛋白质分子被大量基体分子紧紧包围,以至于在激光辐照过程中不能发生能量传递、电荷转移等作用,因此该基体效果不好,甚至不能作基体。而 DHB、咖啡酸、尼古丁酸等都有适量的结合,宜于发挥基体辅助激光解吸电离的作用。这说明基体分子与蛋白质分子的结合对 MALDI-MS 有重要的影响,但并不是结合得越好就一定能起作用,超过了一定限度就可能起相反的作用,以上仅是初步研究结果,更深入的研究正在进行中。

参 考 文 献

- 1 M. Karas, F. Hillendamp. Anal Chem, 1988; 60: 2299
- 2 K Steupat, M Karas, F. Hillendamp. Int J Mass Spectrom and Ion Processes, 1991; 111: 89
- 3 Measurement of Molecular Parameters by Low Angle Light Scattering Methods. Chromatix Appl, Note LS-1, 1976
- 4 M B Huhlin. in "Light Scattering from Polymer Solution", M B Huglin Ed, NY: Academic Press, 1972. 242
- 5 B Chu. Laser Light Scattering, NY: Academic Press, 1974.

A Study on Matrix and Protein Samples Association in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry

Zhao Shankai, Zhang Jinghong, Zhu Zhihua, Zha Qingmin
(Instrumental Analysis & Research Center,
Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Received 1996-12-04

Abstract

By the use of low-angle laser light scattering photometer, the association manner of matrix and protein in water or water acetonitrile solution was investigated. The matrices studied were 2,5-dihydroxybenzoic acid, caffeic acid, nicotinic acid and 3-amino-4-hydroxybenzoic acid and the proteins were lysozyme and cytochrome C. The results demonstrated that the apparent molecular weight and the second virial coefficient A_2 in solution of 3-amino-4-hydroxybenzoic acid with lysozyme or cytochrome C were at least three times higher than that in the other three matrices solution. It means that in the solution, 3-amino-4-hydroxybenzoic acid associated very strongly with these two proteins. Referring to the effects on matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, the above results were discussed.

Key Words: laser light scattering, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, protein