

α -腈基阿魏酸及其二元混合基体 在基体辅助激光解吸/电离飞行时间 质谱法测定蛋白质中的应用*

邓慧敏 赖志辉 黎 军 赵善楷
(中山大学测试中心 广州 510275)

[摘要]本文应用自行设计、制备的新基体 α -腈基阿魏酸及 α -腈基阿魏酸与 3-硝基苄醇组成的固液相二元混合基体,用基体辅助激光解吸/电离飞行时间质谱法成功地对蛋白质样品胰岛素,细胞色素 C 和白蛋白进行了分子量测定。研究表明, α -腈基阿魏酸可以有效地解吸分子量较小的胰岛素,而 α -腈基阿魏酸与 3-硝基苄醇组成的二元混合基体则能够明显地提高分析灵敏度和重现性,测得分子量较大的细胞色素 C 和白蛋白的激光质谱图。

关键词: α -腈基阿魏酸 3-硝基苄醇 固液相混合基体 基体辅助激光解吸电离蛋白质 分子量测定

在基体辅助激光解吸/电离质谱(MALDI-MS)法中,基体对于样品的解吸电离作用极其重要。用MALDI-MS法测定生物大分子的分子量,成功的关键更取决于合适基体物质的选择^[1]。尽管在MALDI-MS法中,已试用过成百上千种化合物作基体,但目前常用的有效基体却不到十种。因此,不断寻找更多解吸作用好的新基体物质或选择使用混合基体,以扩大MALDI-MS法的应用范围、改善测试效果及提高测试效率,一直都是一个很有积极意义的研究课题。

鉴于最常见的几种基体如阿魏酸 Ferulic Acid (FA)、咖啡酸 Caffeic Acid (CA)、芥子酸 Sinapinic Acid (SA) 及 α -腈基-4-羟基肉桂酸 α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (4HCCA) 都是肉桂酸的衍生物,并根据我们在以往一些研究工作中对 4HCCA 较易产生多电荷离子峰(如图 4。此外,Beavis R. C. 研究小组对此也有报导^[2])的认识,我们设想结构与 4HCCA 极其相似的 α -腈基阿魏酸(α -cyano-3-methoxy-4-hydroxycinnamic Acid)亦应具有类似 4HCCA 基体的作用。为此,我们以自行制备的 α -腈基阿魏酸及其与 3-硝基苄醇组成的二元混合物作基体,用MALDI-MS法对蛋白质样品胰岛素、细胞色素 C 和白

1998—11—02 收

* 国家自然科学基金资助项目

蛋白的分子量进行了测定。结果表明, α -腈基阿魏酸单独作基体, 就可以辅助激光解吸分子量较小的胰岛素(5734D a) 样品, 而应用 α -腈基阿魏酸与 3-硝基苄醇组成的固液相二元混合基体则能够明显地提高分析灵敏度和重现性, 有效地解吸分子量较大的细胞色素 C (13727D a) 和白蛋白(66267D a) 样品, 并得到满意的谱图。

1 实验部分

1.1 仪器及质谱测试条件

仪器为本中心自行研制的研究级激光微探针飞行时间质谱仪^[3], 激光波长为 355nm, 激光束斑直径为 100 μ m, 加速电压为 18kV。

1.2 试剂

1.2.1 α -腈基阿魏酸的制备

方法一: 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛与腈乙酸乙酯在 $\text{AlO}_3\text{-KF}$ 催化下缩合生成 α -腈基阿魏酸乙酯, 将该酯用 NaOH 水解再用 HCl 酸化即得 α -腈基阿魏酸。

方法二: 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛与腈乙酸在 NH_4OAc 催化下反应 10 小时缩合生成 α -腈基阿魏酸。

经红外光谱、核磁共振谱、质谱测试分析, 以上两种方法制备得到的产物, 分子量和结构均得到证实。紫外光谱显示, α -腈基阿魏酸在 355nm 处有强吸收。

1.2.2 基体和样品的配制

α -腈基阿魏酸用 50% 的 0.1% 三氟乙酸水溶液, 45% 的乙腈, 5% 的双蒸水配制成 0.1M 溶液; 3-硝基苄醇用甲醇配制成 0.5M 溶液; 胰岛素、细胞色素 C (均为美国 SIGMA 公司产品) 和白蛋白(美国 Molecular bio system s 公司产品) 用 0.1% 三氟乙酸水溶液配制成 10^{-6} M 溶液。

1.3 进样操作

1.3.1 胰岛素

样品溶液和 α -腈基阿魏酸基体溶液各 5 μ L 混合均匀后, 取 3 μ L 混合液滴于银片上, 空气吹干, 放入仪器样品室中。

1.3.2 细胞色素 C、白蛋白

样品溶液和 α -腈基阿魏酸、3-硝基苄醇两种基体溶液各 5 μ L 混合均匀后, 取 5 μ L 混合液滴于银片上, 空气吹干, 放入仪器样品室中。

2 结果与讨论

图 1、图 2 和图 3 分别为胰岛素、细胞色素 C 和白蛋白的激光质谱图。图 1、图 2 中, 只存在样品的分子离子峰, 图 3 中除了有白蛋白的分子离子峰之外, 还出现了它的双电荷峰。我们曾经试验单独使用 α -腈基阿魏酸作基体测定细胞色素 C 和白蛋白样品, 但是不容易出峰。Tanaka^[4]、William s^[5]、Hillenkamp^[6]、等都曾通过使用二元混合基体来提高和改善基体辅助激光解吸/电离的效果。理想的二元混合基体在 MALDI-MS 法中能够提高灵敏度, 分辨率及谱图的重现性。其原因可能是: 固液相二元混合基体的使用, 可使样品分子在混合基体溶液中处于溶解和分散状态从而降低解吸所需的激光能量; 可形成瞬时

高浓度的气相环境, 利于冷却解吸的样品分子, 从而减小亚稳碎裂作用并增强离子化作用; 可使基体在激光辐照下产生爆炸现象而有利于样品的解吸等等^[4-7]。3-硝基苄醇是一个有效的液相基体^[8], 赵善楷等也曾有 3-硝基苄醇和芥子酸作混合基体测定蛋白质分子量, 并取得了较好的效果^[7]。在此基础上, 我们决定试用 α -腈基阿魏酸与 3-硝基苄醇组成二元混合基体来测定分子量较大的细胞色素 C 和白蛋白样品, 结果表明, 使用这个固液相二元混合基体, 不仅使得细胞色素 C 和白蛋白样品容易出峰, 谱图重现性好, 而且信噪比也由原来的 3 : 1 上升至 6 : 1 以上, 灵敏度得到了显著地提高。此外, 从初步试验的情况来看, α -腈基阿魏酸并不像 4HCCA 那样, 易使样品产生多电荷离子峰。

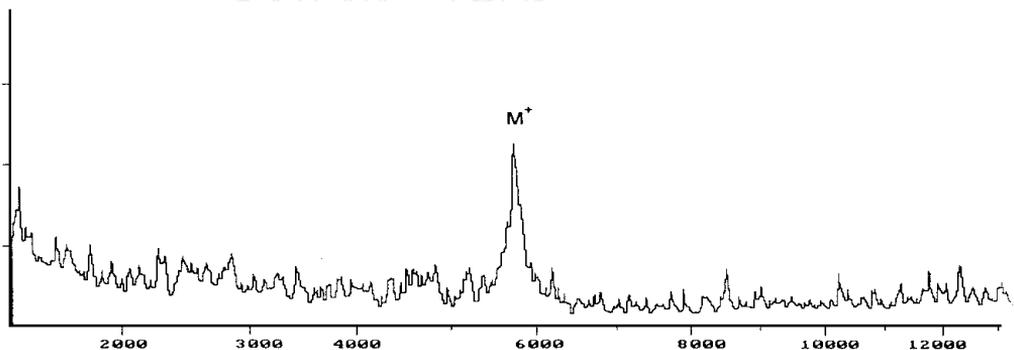


图 1 胰岛素的激光质谱图(基体: α -腈基阿魏酸)

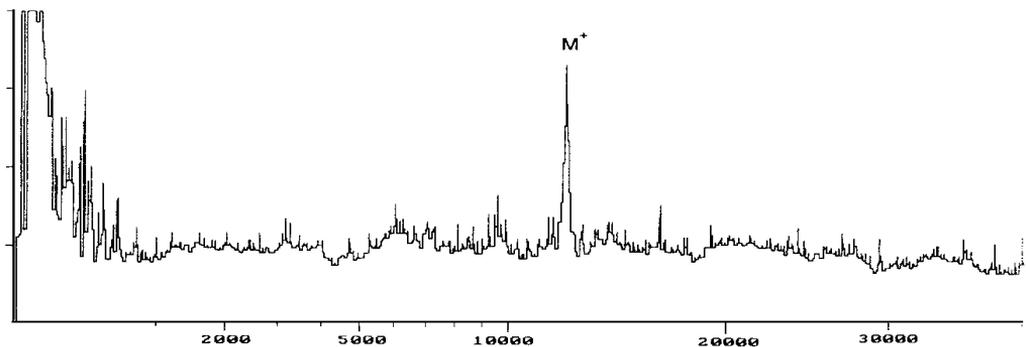


图 2 细胞色素 C 的激光质谱图(基体: α -腈基阿魏酸+ 3-硝基苄醇)

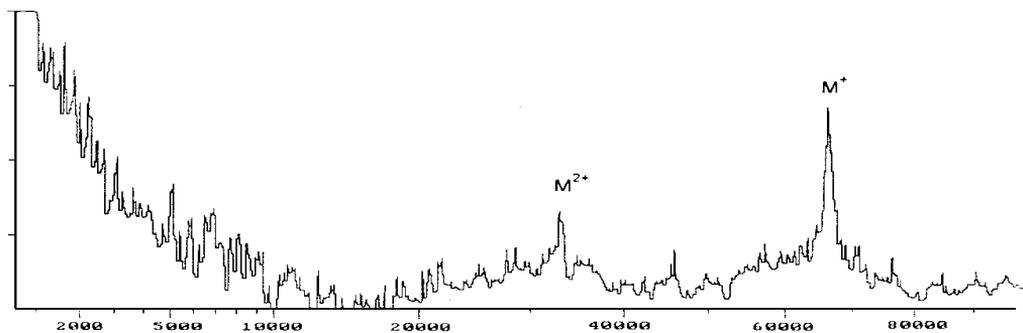


图 3 白蛋白的激光质谱图(基体: α -腈基阿魏酸+ 3-硝基苄醇)

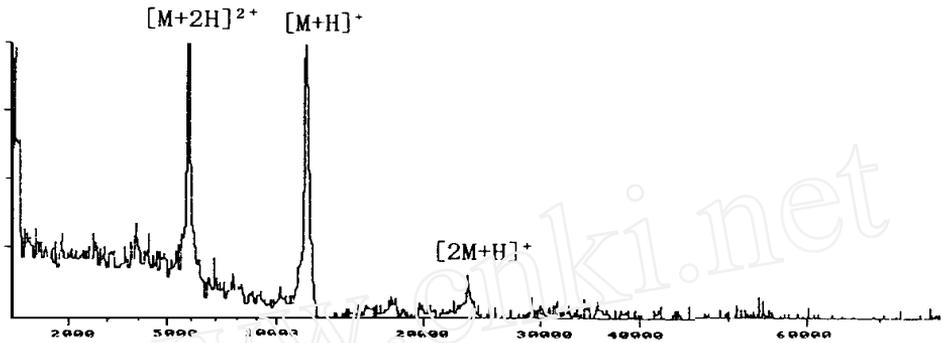


图4 4HCCA 为基体测定的细胞色素C 的激光质谱

我们将在上述研究结果的基础上,进一步全面深入地详细考察 α -腈基阿魏酸的基体行为,并期望这一新基体在测定高分子化合物,多糖类化合物,核酸等其他种类的大分子化合物的分子量中亦能发挥作用。

致谢 本文中,用“方法二”制备的 α -腈基阿魏酸由徐州师范大学化学系有机合成室戴桂元老师提供,在此深表感谢。

参 考 文 献

- 1 A Vertes and R Gijbels in Laser Ionization Mass Analysis, A Vertes, R Gijbels and F Adams (Eds), John Wiley & Sons, New York, 1993, p. 127
- 2 Beavis R C, Chaudhary T and Chait B T. Organic Mass Spectrometry, 1992, 27: 156
- 3 赵善楷, 钟峰 分析化学, 1994, 22: 1079
- 4 Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S Rapid Commun Mass Spectrom, 1988, 2: 151
- 5 Nelson R W, Thomas R M, Williams P. Rapid Commun Mass Spectrom, 1990, 4: 99
- 6 Karas M, Nordhoff E, Hillenkamp F. Proceedings of the 40th ASM S Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics: Washington DC, May 31- June 5, 1992, 368
- 7 赵善楷, 朱志华 质谱学报, 1996, 17: 6
- 8 Krause J, Sroedkli M and schlunegger U P. Rapid Commun Mass Spectro, 1996, 10: 1927

α -Cyano-Ferulic Acid and Its Binary Mixture as Matrices for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Proteins

Deng Huimin, Lai Zhihui, Li Jun, Zhao Shankai

(Instrumentation Analysis & Research Centre, Zhongshan University,
Guangzhou 510275, China)

Received 1998- 11- 02

Abstract

α -cyano-ferulic acid (α -CFA) designed and prepared in our laboratory and the solid-liquid phase co-matrix composed of α -cyano-ferulic acid and 3-nitrobenzyl alcohol (α -CFA + NBA) have been successfully tested for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of proteins. The results demonstrate that α -CFA can effectively desorb insulin which has lower molecular weight, and the binary co-matrix α -CFA + NBA obviously enhances the sensitivity and reproducibility, performing MALDI spectra of cytochrome C and albumin which have higher molecular weight.

Key Words: α -cyano-ferulic acid, 3-nitrobenzyl alcohol, solid-liquid phase co-matrix, matrix-assisted laser desorption/ionization, protein, molecular weight determination