

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱表征细胞色素 C

季怡萍, 张红明

(中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022)

Characterization of Cytochrome C by MALDI-TOF-MS

Ji Yi-ping, ZHANG Hong-ming

(Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

Abstract: A matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) technique was used for analysis of molecular weight of cytochrome C. The effects of three kinds of matrix, such as 2, 5-dihydroxybenzoic acid (DHB), α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHC) and sinapinic acid (SA), were used to compared and a suitable α -CHC was found. Experimental data showed that this method was properable to analysis of the congeneric biochemical samples.

Keywords: cytochrome C; MALDI-TOF-MS; matrix

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1004-2997 (2007) 增刊-50-03

细胞色素 C 是一种电子传递链蛋白为线立体呼吸链必须的成份之一, 由 104 个氨基酸残基的一条肽链组成, 起着传递电子的作用, 它是相对分子质量约 1.3 万的碱性蛋白质。在哺乳动物细胞中, 如此高度保守性蛋白常分布在线立体内膜。细胞色素 C 作为一种信号物质, 在细胞凋亡中发挥着重要的作用。正常情况下, 它存在于线粒体内膜和外膜之间的腔中, 凋亡信号刺激使其从线粒体释放至细胞液, 结合 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) 后启动 caspase 级联反应: 细胞色素 C/Apaf-1 复合物激活 caspase-9, 后者再激活 caspase-3 和其它下游 caspase。细胞色素 C 氧化酶亚单位 IV (cytochrome c oxidase subunit IV: COX4) 是定位在线粒体内膜上的膜蛋白, 凋亡发生时, 它保留在线粒体内, 因而它是线粒体富集部分的一个非常有用的标志。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱作为软电离技术, 具有灵敏、快速、准确、测定质量范围大等特点, 在测定生物大分子和合成高聚物应用方面具有特殊的优越性。近年来已成为测定多肽、蛋白质、多糖、核酸、以及多种合成聚合物的强有力工具^[1-3]。不同结构的芳香环状聚醚酮^[4]、芳香环状聚酯^[5]、芳香环状聚醚^[6]以及芳香环状聚酰胺^[7] 等低聚物通过此方法也相继得到了表征。本工作分别选取了三种不同的基质, 通过激光质谱技术对细胞色素 C 进行了表征, 讨论和对比不同基质对其分析结果的影响, 探讨表征此类化合物的适宜条件。

1 实验部分

LDI-1700 激光解吸电离飞行时间质谱仪: 美国 Linear Scientific Inc 公司产品; N_2 激光器: 激光波长 337 nm; 加速电压为 30 kV; 吸引电压 9.3 kV, 检测电压 -4.75 kV。基质 (1) 30 mmol·L⁻¹ α -氰基-4-羟基肉桂酸 (α -CHC)、(2) 100 mmol·L⁻¹ 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB)、(3) 100 mmol·L⁻¹ 芥子酸 (SA): 美国 Linear Scientific 公司提供。

2 结果和讨论

2.1 实验条件的选择

(1) 分别选用了 2,5-二羟基苯酸、 α -氰基-4-羟基肉桂酸、芥子酸这三种基质。将三种基质与细胞色素 C 分别混溶后进行激光质谱检测,考察不同基质对细胞色素 C 的质谱检测结果的影响,经过对比实验认为 α -氰基-4-羟基肉桂酸检测的效果最佳。

(2) 对比了不同浓度的细胞色素 C 在激光质谱上的行为。经过反复实验发现被测样品浓度偏大,基质难于将其解吸电离,达不到预期效果;相反被测样品浓度太小,只出现分子离子峰,其它相关峰被掩盖,只有在 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下才能得到清晰的谱图。

(3) 在实验中发现激光能量大了谱图基线不平稳,信噪比差;激光能量小了谱图重现性差。当激光能量调至 $10 \mu\text{J}$ 时信噪比得到明显改善,谱图重现性好。因此激光能量不宜设置过高,调至最大能量的 30% 左右为宜。

2.2 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测

图 1 为细胞色素 C 以 α -氰基-4-羟基肉桂酸为基质的激光质谱图,图中 m/z 12 824.6 峰代表质子化分子离子峰,即 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰。 m/z 6 412.7 离子峰和 m/z 25 648.8 离子峰分别对应于细胞色素 C 的双电荷离子峰 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 和二聚体单电荷离子峰 $[2\text{M}+\text{H}]^+$,这两个离子峰的出现是对分子离子峰的进一步证明。同时还出现了 m/z 38 472.8 三聚体 $[3\text{M}+\text{H}]^+$ 单电荷离子峰。

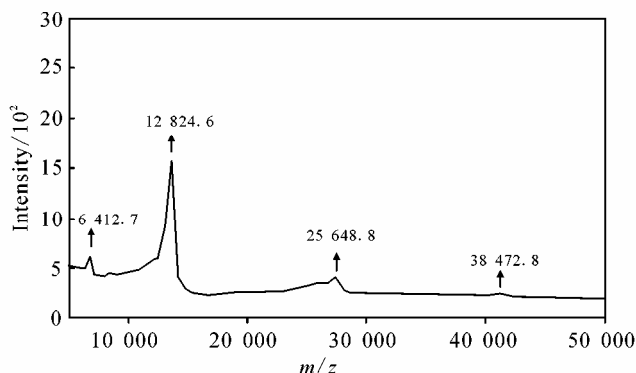


图 1 α -氰基-4-羟基肉桂酸为基质的细胞色素 C 激光质谱图

Fig.1 MALDI-TOF-MS of cytochrome C using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid

图 2 分别是以芥子酸(SA)与 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)为基质检测的激光质谱图,从谱图中同样可以观察到细胞色素 C 的质子化分子离子峰、双电荷离子峰、二聚体单电荷离子峰以及三聚体单电荷离子峰。谱图中谱峰的相对强度与图 1 相比明显地减弱,可见这两种基质用于分析细胞色素 C 不够理想。比较图 2 中的两种基质的检测结果可以观测到,选用 2,5-二羟基苯甲酸基质,得到的谱峰的相对强度要高于芥子酸基质。不同基质得到的不同的检测结果,是与基质与细胞色素 C 的相容性和软硬酸碱理论相关的^[5]。

3 结论

采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术,以 α -氰基-4-羟基肉桂酸为基质能够有效地检测出细胞色素 C 的分子质量及纯度,并且谱图清晰、信噪比好,分辨率与灵敏度得到了显著地提高,表明了 α -氰基-4-羟基肉桂酸是细胞色素 C 的激光质谱检测的适宜基质。本实验方法同样适合于同类生化样品的分析,并且优于其它传统的测定分子量方法。

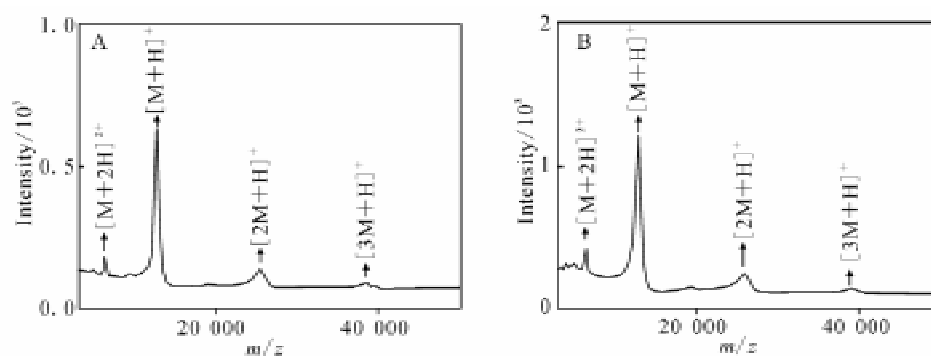


图 2 细胞色素 C 激光质谱图 (A) 芥子酸(SA)为基质；(B) 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB) 为基质

Fig. 2. MALDI-TOF-MS of cytochrome C using sinapinic acid (A) and 2, 5-dihydroxybenzoic acid (B) as matrix

参考文献：

- [1] 赵善楷, 查庆民, 邓慧敏. 分析化学, 2001, 29: 1 251-1 253.
- [2] 赵善楷. 质谱学报, 1998, 19: 1.
- [3] BURLINGAME A L, BOYD R K, GASKELL S J. Anal Chem, 1998, 70: 647R.
- [4] WANG Y F, KWOK P, CHAN. J Polym Sci, Part A: Polym Chem, 1996, 34: 375-385.
- [5] ZHANG H M, JI Y P, CHEN T L. Chinese J Anal Chem, 2001, 29(11): 1 303-1 306.
- [6] DING Y, HAY A S. J Polym Sci, Part A: Polym Chem, 1998, 36: 519-526.
- [7] KIM Y H, CALABRESE J, MCEWEN C. J Am Chem Soc, 1996, 118: 1 545-1 546.

(上接第 45 页)

之前必须备份现有的 progman.ini 和*.grp 文件。升级到 Windows 98 第二版前, 要确保在硬盘上, Windows 的老版本没有被压缩。内存管理程序与 Windows 98 第二版不兼容或可能引起问题。由于英国 MSS 公司方面没有技术支援, 也没有留下安装记录, 只能一步一步地摸索。要从 WINDOWS3.2 升级到 WINDOWS 98, 必须要 WINDOWS 98 的升级版, 由于旧电脑的配置太落后, CPU 80 M, 内存只有 16M, 内存不够, 不支持大硬盘, 升级过程中频繁出错和死机, 无法在旧电脑上直接升级, 只好把硬盘的数据克隆到另一块硬盘上, 在新电脑上进行升级实验。由于新旧电脑的硬件结构不同, WINDOWS3.2 内存管理程序与 Windows 98 第二版不兼容或可能引起问题, 且操作系统落后, 升级时极其不顺利, 不是硬件错误, 就是软件通不过, 或执行了非法操作, 最后导致死机, 无法进入 WINDOWS 98 的桌面。后来从 XP 系统的克隆过程中找到灵感, 先找一块小硬盘把旧电脑所有数据克隆过去, 再用此硬盘来启动旧电脑的操作系统 WIN3.2, 然后卸载所有的驱动程序, 但有部份驱动无法卸载, 只有删除了, 关机, 取下硬盘装到新电脑上, 来运行 WINDOWS 升级程序, 这次升级成功了, 但出现了某些驱动的错误, 运行 MSCONFIG 系统设置程序, 把有问题的驱动屏蔽掉就解决了这个问题。再安装好新电脑的驱动程序, 安装上 MASPEC2 运行, 除了在调试灵敏度时的反应特别慢, 有点像死机的样子, 其它的问题基本上可以解决。为什么会慢呢? 按道理新电脑的 CPU 和内存等都比旧电脑快了许多倍, 虽然 WIN98 采用多任务的方式, 应该不会影响到 MASPEC2 的性能的, 难道还是兼容性或内存分配管理上有差异? 试了多种方法也无法解决, 后来想干脆让 WIN98 在最基本的方式运行, 重新启动电脑, 进入 BIOS, 把 IRQ5 中断单独分配给 ISA 卡, 把新主板除显卡外的所有的驱动程序都卸载了再来验证, 发现所有的问题都迎刃而解了。

整套仪器经过近半年的运行, 稳定可靠, 数据系统的再升级被证明是成功的。

编后语: 为保持作者原有的写作风格, 未对文章做大幅度修改。