

基质辅助激光解析电离质谱靶上样品前处理方法研究进展

卫军营, 蔡耘, 钱小红, 张养军

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 北京 102206)

摘要: 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术已成为目前蛋白质组学研究中的经典技术。在该技术的成功应用过程中,合适的样品前处理方法起着首要和关键的作用。只有将合适的样品前处理方法与合适的有机基质结合起来,才能成功实现对多肽和蛋白质等生物大分子的准确鉴定。随着质谱分析向高灵敏度、高准确度、高通量的方向发展,出现了许多新的,可直接在 MALDI 靶上前处理的方法,极大地简化了对生物样本的处理步骤,同时减少了样品的损失。特别是将一些纳米材料用于 MALDI 靶上进行样品的前处理,为样品前处理方法的研究开辟了广阔的应用前景。

关键词: 基质辅助激光解析电离质谱;靶上前处理方法

中图分类号:O657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-2997(2007)02-122-07

Pre-treatment Methods On-probe for MALDI Mass Spectrometry

WEI Jun-ying, CAI Yun, QIAN Xiao-hong, ZHANG Yang-jun

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing Proteome Research Center, Beijing 102206, China)

Abstract: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) became a classical tool for the proteome analysis. In the analytical process, proper pre-treatment method of samples, the same as the selection of matrix played a major role for the successful identifications of proteins and peptides. As sensitivity, mass accuracy and throughput of MS analysis become important parameters, lots of pre-treatment methods on-probe, including those promising protocols based on nano-particles materials, which have been used to improve the analysis of biological samples.

Key words: matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry; pre-treatment methods on-probe

自从 1988 年基质辅助激光解析电离质谱技术(Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI-MS)出现以来,由

于其独特的软电离技术,扩展了极性生物大分子的研究领域,使质谱法迅速成为生物大分子测定最有发展前景的工具之一。在该技术的成功应

收稿日期:2006-09-26;修回日期:2007-01-31

基金项目:国家重点基础研究规划项目(2004CB520802)、国家自然科学基金重点项目(20635010)、国家自然科学基金(30321003, 20405017, 20505018, 20505019)和北京市科委重大项目(H030230280190)

作者简介:卫军营(1977~),男(汉),河南郑州人,硕士研究生,药物分析专业。E-mail:weijunying2002@yahoo.com.cn

通讯作者:张养军(1963~),男(汉),陕西人,研究员,从事蛋白质组学分析方法研究。E-mail:zhangyj@nic.bmi.ac.cn

用过程中,合适的样品前处理方法起着首要和关键的作用,因此也就成为人们持久关注的研究热点之一^[1-4]。随着质谱分析向高灵敏度、高准确度、高通量的方向发展^[5],新的 MALDI 靶上前处理方法不断涌现,功能趋向多样化,一些纳米材料也被用于基于 MALDI 的质谱分析^[6-8],极大的促进了 MALDI MS 分析技术的发展。下面就近年来报道的 MALDI 靶上前处理方法进行综述,并对其发展前景进行展望。

1 用于除盐的靶上前处理方法

在 MALDI-TOF MS 对多肽和蛋白质等生物大分子进行分析时,通过选择合适的有机基质通常能成功实现对这些生物大分子的鉴定^[9]。然而,在采用该技术对一个复杂的生物样品进行分析时,仍有一些问题直接影响其成功的应用,例如在蛋白质的预分离或酶解过程中引入的一些盐类(如在蛋白质变性中使用的高浓度尿素或胶上酶切过程中引入的碳酸氢铵等)会影响蛋白质或肽段与基质形成的结晶状态,进而影响质谱信号的强度。虽然 MALDI-TOF MS 对这些盐在低浓度的范围内有一定的耐受性^[10],但高浓度的盐会严重抑制分析物的质谱信号^[11],降低质谱分析的检测灵敏度,增加质谱图解析的难度,使一些分析物无法得到准确的鉴定。为了解决上述问题,除了在 MALDI 分析时应用一些新型的耐盐基质^[12]以外,人们还采取了一些诸如高效液相色谱法^[13]、 C_{18} Zip-Tip^[14]等方法应用于样品的前处理脱盐。虽然这些方法可以有效地去除质谱分析之前的干扰物,但因其步骤繁多,造成样品的损失大,不适合微量样品分析,且费时费力,直接影响了鉴定效率,甚至使一些规模化的鉴定无法进行。因此人们发展了一些利用在 MALDI 靶上进行修饰的方法用于前处理脱盐,这些方法的基本原理为:首先对 MALDI 靶进行修饰,然后利用修饰材料与分析物的特异吸附作用保留被分析物,通过其后浸洗步骤去除污染物,再添加基质进行 MALDI MS 分析。这些方法减少了一些冗长的分离和处理过程,可以显著提高分析速度,降低样品损耗,易于实现通量化,相比其他方法而言更显简便高效。这些修饰方法按其所使用的材料不同可分为如下几种类型。

1) 基于商品化的多聚物薄膜的修饰方法

Hefta 等^[15]通过应用 PVDF 薄膜修饰后的 MALDI 靶,成功鉴定出了细胞色素 P450D,但同时也发现 PVDF 的绝缘性会降低分析的准确度。为了克服上述问题,Mock 等^[16]在 MALDI 靶表面用电喷的方法修饰了一层薄的硝化纤维素膜,并用优化的实验条件成功地去除了污染物的干扰。Zaluzec 等^[17]应用尼龙-66 作为靶上修饰材料分析鉴定了含有 6 M 盐酸胍的蛋白样品,同时也发现吸附于多聚物薄膜上的蛋白在质谱分析时的信号强度与蛋白质及多聚物的类型有关,相同的蛋白质在吸附于不同的多聚物薄膜上会产生不同的信号强度,同样在同一多聚物薄膜上被吸附的不同蛋白质,其信号强度也各异。全氟磺酸树脂(Nafion)作为一种全氟化的聚合物,因其所具有的磺酸基团,使之可以作为一种有效的离子交换材料用于靶上修饰^[18],而且使用 Nafion 处理后的 MALDI 靶分析样品时,甚至不需要进行浸洗操作即能实现对样品的成功鉴定^[19]。当然其缺点也是明显的,由于它的离子交换容量有限,因而不能耐受高浓度的盐,而且对于样品和基质已事先混合的分析物,基本上没有除盐能力。

在常用的基于多聚物的靶上修饰方法中,使用聚乙烯(PE)^[20]和聚丙烯(PP)^[21]作为修饰材料时质谱分析的重现性最好,这是由于 PE 和 PP 形成的孔径最小,而且十分均匀,非常有利于分析物及基质形成均一细小的结晶,因而可以获得良好的重现性。表面活性剂如 SDS 也是常见的严重干扰 MALDI 分析的污染物,0.1% SDS 即可严重干扰样品的质谱信号,为了去除 SDS 的干扰,Blackledge 和 Alexander^[22]使用经 PE 修饰后的 MALDI 靶,并经 50% 甲醇浸洗后,成功鉴定了含 0.73% SDS 的 BSA 样品,并且通过对其作用机理的研究,认为蛋白样品可能是通过疏水作用与多聚物薄膜产生相互作用的,根据这一思路,后来人们又实验了一些具有较强疏水性的聚合材料用于 MALDI 靶的修饰。例如, Hung 等^[20]实验了固体石蜡(Paraffin wax)作为修饰材料用于靶上除盐,在使用经固体石蜡修饰后的 MALDI 靶分析含盐的 DNA 样本时,甚至不需要进行浸洗操作即能实现对样品的鉴定^[23],其原因是由于疏水性的固体石蜡薄膜能显著提高基质与 DNA 形成共结晶的速度,而高极性的盐在疏水膜表面则不易形成结晶,因而对

质谱信号的干扰要小一些。同样疏水性的聚四氟乙烯材料, Teflon^[24] 和 Zitex^[25] 等也被用作 MALDI 靶的修饰材料, 用于除盐前处理, 获得了比较好的效果。

2) 基于基质自身形成的晶体膜的脱盐方法

在 MALDI MS 分析中, 要想获得良好的质谱信号, 一个重要的前提条件是基质与分析物能形成良好的共结晶, 而对形成的共结晶的研究也有助于寻求简便的前处理方法。Beavis 和 Bridson^[26] 利用 X-射线晶体衍射技术结合考马斯亮蓝染色的方法研究了芥子酸(SA)与蛋白分子所形成的共结晶的空间结构, 研究发现, 在晶格中 SA 分子通过氢键作用形成延展的平面结构, 蛋白分子仅与晶体表面相连, 而且在晶体表面未发现可与蛋白分子形成氢键的作用位点, 因此推测蛋白分子是通过疏水作用与基质分子形成共结晶的。基于上述研究, 人们便利用基质在 MALDI 靶上形成的晶体膜作为载体用于选择性吸附含盐样品中的蛋白分子, 继而通过浸洗去除盐的干扰。Beavis 和 Chait^[27] 首先使用冷的蒸馏水浸洗基质与分析物形成的共结晶, 从而成功去除了水溶性盐的干扰, 而信号强度在浸洗之后未见明显降低, 这说明在浸洗过程中损失的蛋白量是微乎其微的。Xiang 和 Beavis^[28] 利用碎小的基质晶体在 MALDI 靶上作为“种子”, 然后再加上基质与含盐样品的混合物, 在短时间内即可形成一层不透明的多晶薄膜, 继而经过浸洗除盐, 成功分析鉴定了含 6 M 尿素的肌红蛋白样品。Cadene 和 Chait^[29] 用几乎同样的方法成功分析鉴定了含有非离子型去垢剂的多个不同的膜蛋白样品, 由于去垢剂是膜蛋白分析中常用的增溶剂, 因此这种方法非常有利于膜蛋白样品的分析鉴定。Vorm 等^[30] 通过改变基质溶液的溶剂和改用水溶性较差的基质方法, 不仅提高了基质的结晶质量, 进而可以提高质谱分析的准确度和灵敏度, 并且也有利于接下来的浸洗脱盐。Zhang 等^[4] 在此方法的基础上加以改进, 成功分析鉴定了含 1% SDS 的 250 fmol BSA 样品。

虽然上述利用基质晶体膜的作用进行除盐的方法能在一定程度上除去盐的干扰, 但在实际应用中也存在一些问题, 如有的方法需要按照严格的流程进行多步骤操作, 对实验技能的要求较高; 有的方法不能有效去除表面活性剂的干扰。Gobom 等^[31] 对上述方法做了进一步的改进, 他

们先用疏水性的聚合物在 MALDI 靶表面修饰一层薄膜, 薄膜中间排列着许多直径约为 400 μm 的小孔, 由于小孔周围聚合物薄膜的疏水作用, 基质仅在小孔中形成结晶, 并且在加入样品后, 分析物与基质形成的共结晶也被限制在小孔的有限区域内, 这样就相当于对样品进行了浓缩, 因而能显著提高分析的灵敏度, 再经过浸洗除盐后, 能对含盐 10~20 fmol 的蛋白样品进行成功地分析鉴定。

3) 利用在靶表面合成的修饰材料进行脱盐的方法

在已报道的对 MALDI 靶进行修饰后除盐的方法中, 还有一些利用巯基试剂如十八烷基硫醇在靶表面形成的功能材料进行脱盐的方法。Brockman 等^[32] 通过将表面覆盖着金点的靶浸于十八烷基硫醇的乙醇溶液中, 从而形成单层的功能薄膜, 可以有效地避免使用某些多聚物薄膜时存在的表面电荷问题, 并且可以利用疏水作用通过接下来的浸洗过程有效去除盐的干扰。但是该方法同样也存在一些实际问题, 主要是在质谱分析时不易采集到良好的质谱信号, 虽然将修饰后的 MALDI 靶经过长时间浸于分析样品中之后, 可以对上述问题加以解决, 但这样同时也降低了样品的分析速度, 不利于通量化的分析。因而 Orlando 等^[33] 实验了一些离子化的单分子层功能材料用于前处理脱盐, 他们用巯基乙胺或巯基丙烷磺酸(MPS)在 MALDI 靶表面修饰形成单分子层, 利用静电作用和熵的改变, 成功地将分别溶于 20% Triton X-100、8 M 尿素和饱和醋酸钠中的蛋白样品进行了分析鉴定, 并且为了利于吸附更多的样品以获得更高的信号强度, 他们还对上述方法做了改进, 即通过含琥珀酰亚胺的单分子层的作用, 在 MALDI 靶的金点上固化了许多聚赖氨酸链^[34], 而且随着聚赖氨酸分子量的增加, 可以在靶表面提供更多的可与蛋白分子相连的氨基基团, 这样分析物的信号强度就会随着聚赖氨酸分子量的增加而得以显著提高。除了采用上述的有机材料之外, 还有一些无机材料也被用于靶上修饰。Li 等^[35] 应用硅氧烷和极细的石墨粉在靶上形成了一层厚度约 0.2 mm 的疏水性载体, 这样更利于分析物与基质形成均一细小的共结晶, 可以有效地提高分析物的信号强度, 而且所形成的载体材料易于清除, 利于通量化的分析。

2 用于富集的靶上前处理方法

在上述用于除盐的靶上前处理方法中, 修饰材料与目标分析物之间的相互作用大多是非特异性的, 这有利于分析不同的生物大分子物质。另外还有一些靶上前处理方法是用来特异性的分析某一类目标蛋白, 如人们在分析磷酸化蛋白质的过程中, 发现经过酶解的磷酸化蛋白质在 MALDI MS 分析中, 磷酸化肽段的信号常常会被非磷酸化肽段所抑制, 使其不易被成功鉴定, 因此人们发展了一些可选择性亲和富集磷酸肽的靶上处理技术, 以提高其信号强度。对于一个理想的亲和富集方法而言, 最重要的要求是方法的特异性, 即仅富集目标蛋白或肽段, 对于其他的干扰物可通过适当的清洗方法予以去除, 因而人们试验的富集材料大多为可与磷酸肽发生较强的吸附作用的功能材料, 如固化的 Fe(III) 离子、Ga(III) 离子等^[36]。

一些金属氧化物也可以特异性的吸附磷酸肽, Chen 等^[6]利用 TiO₂ 作为吸附材料, 将其固化在磁性的 Fe₃O₄ 之上, 借助于外加磁场的作用, 可以从分析样本中特异吸附磷酸肽, 并且这种复合材料也可以用于靶上的亲和富集。根据这一思路, 他们发展了许多基于磁性铁氧化物的亲和富集方法, 如通过共价键的作用, 将人免疫球蛋白(IgG)连接到 Fe₃O₄ 颗粒上^[37], 可以在样品溶液中特异地与目标细菌的细胞壁结合, 从而可将微量的目标细菌从混合物中提取并富集起来, 直接点于 MALDI 靶上进行进一步的质谱分析; 也可以将万古霉素同样通过共价键的作用连接到 Fe₃O₄ 颗粒上^[38], 利用万古霉素与革兰氏阳性菌细胞壁的特异性作用, 将微量的革兰氏阳性菌从感染后的混合物标本中富集纯化出来, 直接点靶进行质谱分析, 并通过 PMF 比对直接对细菌的种类进行区分鉴定, 该方法更适用于含有大量干扰物的生物样本的分析。虽然这些方法在实际应用中还需要对实验条件进行进一步的优化, 有的处理过程也不是直接在 MALDI 靶上进行的, 但相信随着研究的深入, 借助于铁氧化物的磁性特征, 完全可以在磁性的 MALDI 靶上进行更简便的、高通量的处理分析。

除了上述的富集前处理方法之外, 还有一些利用整合的装置进行富集处理的方法, 为通量化分析提供了新的手段。Ekström 等^[39]利用在靶上事先构建的 96 孔纳米小管, 将 40 nL 吸附着

肽段的 Poros R2 磁珠(直径为 50 μm)转入其中, 并经过洗脱之后在整合的富集靶上形成结晶, 继而可进行下一步的质谱分析。Chen 等^[40]利用聚二甲基硅氧烷(PDMS)的高弹性特征, 可以在不同的靶上构建多孔的样品浓缩装置, 并且这些浓缩装置可以方便地进行拆卸。按照不同的实验流程, 可以在该装置中对大量的样本进行除盐、浓缩; 也可以对蛋白质进行靶上的酶解分析, 使用这种技术可以提高对低丰度样品的检出效率, 相应地也可以提高检出蛋白的序列覆盖率。

3 多功能的靶上处理技术

除了上述用于除盐的和用于富集的靶上处理方法之外, 还有一些多用途的前处理方法, 可以根据不同的实验目的发挥相应的作用。如 Chen^[6,37-38,42-44]等在靶上前处理技术应用研究方面做的大量工作中, 除了上述的基于 Fe₃O₄ 磁性特征进行富集的方法之外, 还试验了一系列基于溶胶-凝胶技术的靶上处理方法, 并将其作为一种多功能的手段, 以适用不同的分析需求。溶胶-凝胶工艺是一种常用的独特的材料合成方法^[41], 他们首先在溶胶的聚合过程掺入常用的 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)基质^[42], 在靶上形成混合的 DHB 溶胶-凝胶膜, 这层薄膜在 MALDI 分析时可以充当能量吸收的中心, 而且所产生的基质峰对分析物的干扰很小, 十分适合于小分子蛋白质、多肽和氨基酸等分析。也可以在溶胶的聚合过程掺入 3,4-二氨基苯甲酸(DABA)或 3,5-DABA^[43], 形成均一的混合 DABA 溶胶-凝胶膜。利用此薄膜在分析寡核苷酸时, 可以获得重现性良好的质谱信号, 并可有效抑制阳离子加合物的干扰。甚至还可以将一些无机材料如 TiO₂ 掺入到溶胶的聚合过程中^[44], 利用 TiO₂-溶胶-凝胶混合材料所具有的紫外吸收特性, 将其作为 MALDI MS 分析时的样品载体和辅助电离的基质, 用于基于质谱的分子识别分析。他们还将分子印迹技术用到靶上处理的技术中, 例如他先将 α-环糊精掺入到 TiO₂-溶胶的聚合过程中, 然后经过浸洗去除 α-环糊精, 从而在靶上形成可特异识别 α-环糊精的分子空穴, 这样就可以从含有不同类别环糊精的混合样品中, 特异地将 α-环糊精识别分离出来, 便于下一步的质谱分析鉴定。虽然上述的这些方法被应用于不同的

分析领域,但这一策略为研究新的用于蛋白质组学的靶上前处理技术提供了一些有益的借鉴,相信随着研究的深入,会有更多的、可在靶上进行样品前处理的多功能技术出现。

4 纳米材料在靶上前处理方法中的应用展望

纳米材料的特性为发展多功能的靶上处理技术提供了新的选择。纳米材料是指颗粒尺寸为纳米量级的超细微粒,其尺度大于原子簇,但小于微米级,一般介于 1~100 nm 之间。纳米粒子因其尺寸小、比表面积大、表面原子数多、表面能和表面张力随粒径的下降急剧增大而具有量子尺寸效应、小尺寸效应、表面效应和宏观量子隧道效应等不同于常规固体的光、热、电、磁等新特性^[45],使之呈现出无限广阔的应用前景。前述 Chen 等^[6]所利用的 Fe_3O_4 颗粒即为纳米级的材料,由于 Fe_3O_4 性能相当稳定,且可对其表面进行进一步的修饰,使其包覆一层或多层分子材料而形成核壳式结构,使得 Fe_3O_4 颗粒可以作为一个理想的载体材料,并利用其超顺磁性,完全可以在磁性的靶上用于多种前处理研究。除了纳米 Fe_3O_4 颗粒之外,越来越多的纳米级材料也正逐渐被应用于蛋白质组学研究,相信随着研究的深入,基于纳米材料的靶上前处理方法也必将会成为一个新的研究热点。

参考文献:

- [1] VORM O, ROEPSTORFF P, MANN M. Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation[J]. *Anal Chem*, 1994, 66(19): 3 281-3 287.
- [2] LI L, GOLDING R E, WHITTAL R M. Analysis of single mammalian cell lysates by mass spectrometry[J]. *J Am Chem Soc*, 1996, 118(46): 11 662-11 663.
- [3] KUSSMANN M, NORDHOFF E, RAHBEK N H, et al. Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes[J]. *J Mass Spectrom*, 1997, 32(6): 593-601.
- [4] ZHANG N, DOUCETTE A, LI L. Two-layer sample preparation method for MALDI mass spectrometric analysis of protein and peptide samples containing sodium dodecyl sulfate[J]. *Anal Chem*, 2001, 73(13): 2 968-2 975.
- [5] AEBERSOLD R, MANN M. Mass spectrometry-based proteomics[J]. *Nature*, 2003, 422(13): 198-203.
- [6] CHEN C T, CHEN Y C. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ Core/shell nanoparticles as affinity probes for the analysis of phosphopeptides using TiO_2 surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2005, 77(18): 5 912-5 919.
- [7] JIA W T, CHEN X H, LU H J, et al. CaCO_3 -poly(methyl methacrylate) nanoparticles for fast enrichment of low-abundance peptides followed by CaCO_3 -core removal for MALDI-TOF MS analysis[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45(20): 3 345-3 349.
- [8] ROSI N L, MIRKIN C A. Nanostructures in biodiagnosics[J]. *Chem Rev*, 2005, 105(4): 1 547-1 562.
- [9] 陈海霞, 高文远. 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱在糖类化合物研究中的应用[J]. *质谱学报*, 2005, 26(2): 108-114.
- [10] XBORNSEN K O. Influence of salts, buffers, detergents, solvents, and matrices on MALDI-MS protein analysis in complex mixtures[J]. *Methods Mol Biol*, 2000, 146: 387-404.
- [11] IKEGUCHI M. Protein denaturation and roles of denaturants[J]. *Seibutsu Butsuri*, 2002, 42(2): 72-74.
- [12] XU S Y, YE M L, XU D K, et al. Matrix with high salt tolerance for the analysis of peptide and protein samples by desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(8): 2 593-2 599.
- [13] QI J, WU J, SOMKUTI G A, et al. Determination of the disulfide structure of sillucin, a highly knotted, cysteine-rich peptide, by cyanation/cleavage mass mapping[J]. *Biochem*, 2001, 40(15): 4 531-4 538.
- [14] BAGSHAW R D, CALLAHAN J W, MAHURAN D J. Desalting of in-gel-digested protein sample with mini- C_{18} columns for matrix-assisted laser desorption ionization time of flight peptide mass fingerprinting[J]. *Anal Biochem*, 2000, 284(2): 432-435.
- [15] HEFTA S A, STAHL D C, MAHRENHOLZ A M, et al. Analysis of highly glycosylated or hy-

- dophobic membrane proteins by laser desorption time-of-flight mass spectrometry; proceedings of the 39 th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics, TN, May 19-24, 1991 [C]. Mashville, 1991; 1 416.
- [16] MOCK K K, SUTTON C W, COTTRELL J S. Sample immobilization protocols for matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1992, 6(4): 233-238.
- [17] ZALUZEC E J, GAGE D A, ALLISON J, et al. Direct matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometric analysis of proteins immobilized on nylon-based membranes[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 1994, 5(4): 230-237.
- [18] BAI J, LIU Y H, LUBMAN D M. On-probe purification for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI/MS); proceedings of the 42 nd ASMS conference on mass spectrometry and allied topics, Illinois, May 29-Jun 3, 1994[C]. Chirgo, 1994; 976.
- [19] BAI J, LIU Y H, CAIN T C, et al. Matrix-assisted laser desorption/Ionization using an active perfluorosulfonated ionomer film substrate[J]. Anal Chem, 1994, 66(20): 3 423-3 430.
- [20] BLACKLEDGE J A, ALEXANDER A J. Polyethylene membrane as a sample support for direct matrix-assisted laser desorption/Ionization mass spectrometric analysis of high mass proteins[J]. Anal Chem, 1995, 67(5): 843-848.
- [21] WORRALL T A, COTTER R J, WOODS A S. Purification of contaminated peptides and proteins on synthetic membrane surfaces for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. Anal Chem, 1998, 70(4): 750-756.
- [22] HUNG K C, RASHIDZADEH H, WANG Y, et al. Use of paraffin wax film in MALDI-TOF analysis of DNA[J]. Anal Chem, 1998, 70(14): 3 088-3 093.
- [23] SHALER T A, WICKHAM J N, SANNES K A, et al. Effect of impurities on the matrix-assisted laser desorption mass spectra of single-stranded oligodeoxynucleotides [J]. Anal Chem, 1996, 68(3): 576-579.
- [24] HUNG K C, DING H, GUO B. Use of poly (tetrafluoroethylene) s as a sample support for the MALDI-TOF analysis of DNA and proteins [J]. Anal Chem, 1999, 71(2): 518-521.
- [25] BODNAR W M, ANDEREGG R J, MOYER M B. Analysis of blotted peptides and proteins by MALDI TOF mass spectrometry proceedings of the 42 nd ASMS conference on mass spectrometry and allied topics, Illinois, May 29-Jun 3, 1994[C]. Chirgo, 1994; 683.
- [26] BEAVIS R C, BRIDSON J N. Epitaxial protein inclusion in sinapic acid crystals[J]. J Phys D Appl Phys, 1993, 26(3): 442-447.
- [27] BEAVIS R C, CHAIT B T. High-accuracy molecular mass determination of proteins using matrix-assisted laser desorption mass spectrometry [J]. Anal Chem, 1990, 62(17): 1 836-1 840.
- [28] XIANG F, BEAVIS R C. A Method to increase contaminant tolerance in protein matrix-assisted laser desorption/ionization by the fabrication of thin protein-doped polycrystalline films[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1994, 8: 199-204.
- [29] CADENE M, CHAIT B T. A robust, detergent-friendly method for mass spectrometric analysis of integral membrane proteins[J]. Anal Chem, 2000, 72(22): 5 655-5 658.
- [30] VORM O, MANN M. Improved mass accuracy in matrix assisted laser desorption/Ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 1994, 5(11): 955-958.
- [31] GOBOM J, SCHUERENBERG M, MUELLER M, et al. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics [J]. Anal Chem, 2001, 73(3): 434-438.
- [32] BROCKMAN A H, DODD B S, ORLANDO R. A desalting approach for MALDI-MS using on-probe hydrophobic self-assembled monolayers [J]. Anal Chem, 1997, 69(22): 4 716-4 720.
- [33] WARREN M E, BROCKMAN A H, ORLANDO R. On-probe solid-phase extraction/MALDI-MS using ion-pairing interactions for the cleanup of peptides and proteins[J]. Anal Chem, 1998, 70(18): 3 757-3 761.
- [34] ZHANG L, ORLANDO R. Solid-phase extraction/MALDI-MS: extended ion-pairing surfaces for the on-target cleanup of protein samples[J]. Anal Chem, 1999, 71(20): 4 753-4 757.
- [35] LI X P, WILM M, FRANZ T. Silicone/graphite coating for on-target desalting and improved peptide mapping performance of matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry targets

- in proteomic experiments[J]. *Proteomics*, 2005, 5(6): 1 460-1 471.
- [36] DUNN J D, WATSON J T, BRUENING M L. Detection of phosphopeptides using Fe(III)-nitrotriacetate complexes immobilized on a MALDI plate[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(5): 1 574-1 580.
- [37] HO K C, TSAI P J, LIN Y S, et al. Using bio-functionalized nanoparticles to probe pathogenic bacteria[J]. *Anal Chem*, 2004, 76(24): 7 162-7 168.
- [38] LIN Y S, TSAI P J, WENG M F, et al. Affinity capture using vancomycin-bound magnetic nanoparticles for the MALDI-MS analysis of bacteria[J]. *Anal Chem*, 2005, 77(6): 1 753-1 760.
- [39] EKSTRÖM S, WALLMAN L, MALM J, et al. Integrated selective enrichment target-a micro-technology platform for matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry applied on protein biomarkers in prostate diseases[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(21/22): 3 769-3 777.
- [40] CHEN X X, MURAWSKI A, KUANG G, et al. Sample preparation for MALDI mass spectrometry using an elastomeric device reversibly sealed on the MALDI target[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(17): 6 160-6 168.
- [41] 于惠梅, 陆昌伟, 宁金威. 溶胶-凝胶法制备碳纳米管/SiO₂ 复合材料过程的 TG-DSC-MS 研究[J]. *质谱学报*, 2004, 25(2): 65-68.
- [42] LIN Y S, CHEN Y C. Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on sol-gel-derived 2,5-dihydroxybenzoic acid film[J]. *Anal Chem*, 2002, 74(22): 5 793-5 798.
- [43] CHEN W Y, CHEN Y C. Reducing the alkali cation adductions of oligonucleotides using sol-gel-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2003, 75(16): 4 223-4 228.
- [44] CHEN C T, CHEN Y C. Molecularly imprinted TiO₂-matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for selectively detecting α -cyclodextrin[J]. *Anal Chem*, 2004, 76(5): 1 453-1 457.
- [45] 吴迪, 王鼎聪, 赵得智. 纳米二氧化钛的制备工艺与应用进展[J]. *河北化工*, 2005, 22(2): 8-12.