

# 固-液相混和基体辅助激光解吸电离质谱法\*

赵善楷\*\* 朱智华

(中山大学测试中心 广州 510275)

〔摘要〕本文尝试用固-液相二元混合基体辅助激光解吸电离,取得较理想的结果。在355nm的激光波长下,使用3-硝基苄醇和芥子酸作混合基体,可提高灵敏度、质量分辨率和改善谱图重现性。

关键词:基体辅助激光解吸电离 固-液相二元混合基体 蛋白质 分子量测定

## 1 前言

自从1988年Hillenkamp教授<sup>[1]</sup>首次报导用基体辅助激光解吸电离质谱法(MALDI-MS)测定了分子量为66000道尔顿的白蛋白后,MALDI-MS在分析化学和生物化学领域中的应用迅速发展,不同种类的大分子如蛋白质、核酸、糖类化合物及高分子化合物都成功地由MALDI-MS法测定,灵敏度在 $10^{-12} \sim 10^{-18}$ 摩尔之间,测量的准确度为 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ ,测定时间可短至1~2分钟一个样品。这些指标都远远高于常规的大分子的分子量测定法。如用于蛋白质、核酸测定的凝胶电泳法,高分子化合物和多糖测定的凝胶色谱法和激光光散射法等。MALDI-MS法之所以能够得到迅速的发展和广泛的应用,很大程度上归功于大量有效的基体的发现。在MALDI-MS法中,基体在样品的解吸电离过程中起着关键的作用,虽然其物理和化学过程还不很清楚。基体化合物的效应取决于它在生物分子电离过程中的有效性和对存在于生物溶液中的大量污染物的不敏感性(包容性)。象芥子酸(SA)、2,5-二羟基苯甲酸(DHB)等,就已被证明是对大多数生物分子很有效的基体。即使在相对较高的无机盐和缓冲液的存在下也是。然而,并非所有的已知的基体都具有这些特点。

我们已经知道,合适的基体的选择对实验结果起着决定性的作用。遗憾的是,目前对于基体的选择及新基体的寻找还在不断地探索中,并没有明确的理论指导。尽管如此,前人大量的研究表明,作为基体,还是有下面一些基本要求:(1)在所使用的激光波长下,基体物质应有较强的吸收;(2)基体与样品能溶于同一种使用的溶剂中;(3)具有真空稳定性;(4)对普遍存在于生物溶液中的无机盐及缓冲液等污染物具有包容性;(5)促使样品易于离子化;(6)不与样品发生化学反应。以上条件只是物质作为基体的必要条件,而不是充

1995年12月20日收

\* 国家自然科学基金资助课题,第6届北京国际分析测试学术报告会推荐论文

\*\* 通讯联系人

分条件。一种物质作为好的基体,很难从理论上判断,只能靠实践证明。

在基体的寻找中,人们已花费了大量的劳动,试用成百上千种物质,但是,目前国际上常用的却只有以下8种:芥子酸(Sinapinic Acid)、2,5-二羟基苯甲酸(Gentistic Acid)、阿魏酸(Ferulic Acid)、 $\alpha$ -CN-4-羟基肉桂酸( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinamic Acid)、咖啡酸(Caffeic Acid)、吡嗪酸(Pyrazionic Acid)、安息香酸(3-Amino-4-hydroxybenzoic Acid)和尼古丁酸(Nicotinic Acid)。最常用的只有前4种。原因就是大部分物质的基体效果都不理想,尽管它们都符合以上所列条件。在进行了大量单一基体的寻找工作后,许多研究者把注意力转向复合基体。Tanaka及其合作者最早使用二元混合的基体辅助激光解吸<sup>[2]</sup>。他们把极细的钴粉分散在甘油中一起作基体,这个均匀的混合体系可以使激光能量更好地耦合到甘油中去。Williams及其合作者<sup>[3]</sup>还发现将这个混匀的二元基体冷冻后用以解吸DNA,其碎片离子强度可以增加10倍。Hillenkamp小组的最近研究表明:用2,5-DHB作基体测量高质量区(>50KDa)的样品时,将一些结构与其相似的化合物混合使用,可改善测量结果,原因可能是降低了破坏晶格所需的激光能量<sup>[4]</sup>。D Shanon Cornerr用罗丹明6G或1,4-二苯基-1,3-丁二烯溶解于NBA或甘油中作二元液相混合基体<sup>[5]</sup>,可以提高分辨率及基体样品中的污染物的抵抗力。还有人认为在某些基体中加入一些糖类,如蔗糖、d-葡萄糖、d-核糖、d-果糖等组成的复合基体的效果很好。因为它们相对易于挥发,在解吸过程中易于分解产生CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O等气体小分子,可能会形成瞬时高浓度的气相环境,有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。赵善楷等报导了使用液相基体尼龙膜或细纤维物质基底能增强激光解吸效应<sup>[6,7]</sup>,并认为与固相基体相比较液相基体具有如下特点:(1)液相更有利于离子的形成;(2)离子在溶液中溶解和分散状态降低了解吸所需能量;(3)在气相过程中去溶剂化过程带走了分子离子的过剩能量;(4)液体在激光辐照下,产生爆炸现象有利于解吸。

为此我们在上述论文基础上,尝试用固-液相二元混合基体来辅助激光解吸电离,并取得了较好的结果。在355nm下,MALDI-MS测蛋白质分子量,用芥子酸(SA)与3-硝基苄醇(NBA)组成的混合物作基体,可改善测量结果,如提高分辨率、灵敏度及谱图重现性。

## 2 实验部分

仪器:本实验室自行研制的激光微探针飞行时间质谱仪,其原理和结构详见文献<sup>[8]</sup>。

条件:激光波长为355nm,激光束斑直径为100 $\mu$ m,加速电压为20kV。

试剂:细胞色素C、胰蛋白酶、胰岛素和白蛋白是从美国SIGMA公司购得。实验使用的固相基体有芥子酸(SA)、2,5-二羟基苯甲酸(DHB)及 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸( $\alpha$ -CYANO)均是从美国ALDRICH公司购得,浓度均配制为0.1M(所用溶剂体积比为50%,浓度为0.1%的三氟醋酸,45%的分析纯乙晴及5%的双重蒸馏水)。3-硝基苄醇(用甲醇配制浓度为0.5M)和间-硝基苯辛醚(NPOE)从日本东京化工厂购得。邻苯二甲酸丙烯酸酯(BPA)从上海试剂一厂购得。后两者皆为分析纯投入使用。所有试剂都是直接使用未经纯化。样品浓度配制为10<sup>-6</sup>M。5 $\mu$ L样品溶液与各5 $\mu$ L的固、液相基体溶液混合均匀后,取5 $\mu$ L的混合物滴于银片或薄膜上,放入样品室中。

### 3 结果与讨论

我们所选用的作为液相基体的 3 种化合物在 355nm 的激光波长下都不能作基体,其中 NBA 和 NPOE 有 266nm 下是较好液相基体。BPA 作为基体未有文献报道。所选用的固相基体都是目前国际上最常用的基体。在 355nm 波长下,它们单独地都能起到好的辅助解吸电离作用。固-液相混合基体实验目的就是想结合固-液两相的优点来改善实验结果,从而改进 MALDI-MS 法。

在固-液相基体的种类搭配实验中,我们采用交叉实验的方法,从对得到的谱图质量进行分析及实验过程中采样出谱的难易来看,我们初步得到结论:在本实验所考察的固-液相基体中,SA 与 NBA 组合是最佳的,如图 1。在实验的最初过程中,我们发现 NPOE 和 BPA 与固相基体混合不但不能改善实验结果,相反却影响了固相基体的辅助解吸作用,得到的结果很不理想。原因可能是 NPOE 能溶解作底物的膜,BPA 与固相基体不能混溶于同种溶剂。确定好固-液相基体的种类搭配,接着须考察它们的浓度匹配。在实验中,我们设定固-液相基体摩尔比例是 4:1,2:1,1:1,1:2,1:5。最终的实验结果如图 2。图 2 表明固-液相基体的摩尔比例是以 2:1 较为理想。由于在固-液相基体混合物中,在 355nm 的激光波长下,SA 有强吸收,NBA 无吸收。通过调节吸收物的量,就可以控制混合基体对激光能量的吸收。实验证明,通过调节固-液相基体的摩尔比例可以提高分辨率。

大量的实验证明,底物在 MALDI-MS 法中起着重要的作用,相同的基体、样品使用不同的底物,所得到的结果是大不一样的。目前常使用的底物是导电性很好的银片。但也有文献报道,在对测量高质量的生物大分子(>50kD)时,使用导电性差的膜作底物比用银片好。本实验中,选用了 4 种物质作底物:银片、尼龙膜、硝化纤维膜及处理过的纸。实验结果表明(见图 3):在固-液相混合基体辅助激光解吸电离质谱法中,使用膜作底物是最佳的,处理过的纸次之,银片较差。由于液相基体具有流动性,在重力的作用下,液相基体会在银片上聚集起来,这是银片作底物得到结果较差的原因。膜片的微孔能够吸附住混合液,使它们不能聚集起来,从而达到了分散均匀的效果。经处理过的纸由于孔径粗大,表面粗糙,虽也能起到吸附分散的作用,但有碍吸收激光能量及解吸作用。

采用以上的最佳基体组合及与理想底物匹配,我们做了大量的实验,测量了实验常用蛋白质的分子量,如图 4。从谱图中发现:在 MALDI-MS 中,使用固-液混合基体有助于提高分辨率、灵敏度及信噪比,且实验中出峰容易,谱图重现性好。尤其是对分子量较大的蛋白质,如白蛋白,效果更为突出。对比图 4 中的 b 和 e,分辨率由原来的 12 提高到 45 (FWMH)。其可能的原因是在固-液二元混合基体辅助激光解吸电离质谱中,样品和固相基体分子溶解和均匀分散在液相基体分子间,有利于样品分子被解析出来。另外,样品易于在液体表面不断地补充,利于在累加取样时谱图有很好的重复性。单一的固相基体则不具有以上特点,很难把样品均匀分散且固相基体与样品之间都是孤立地被吸附在底物上的。

### 4 结论

在固-液相混合基体辅助激光解吸电离质谱法中,结合固-液两相基体的优点能较大

程度的改善实验结果,如提高分辨率、灵敏度及改善谱图重现性等,虽不能从根本上解决 MALD-MS 法分辨率较低的问题,但提供了一种尝试方法,有助于该法的进一步发展和应用。

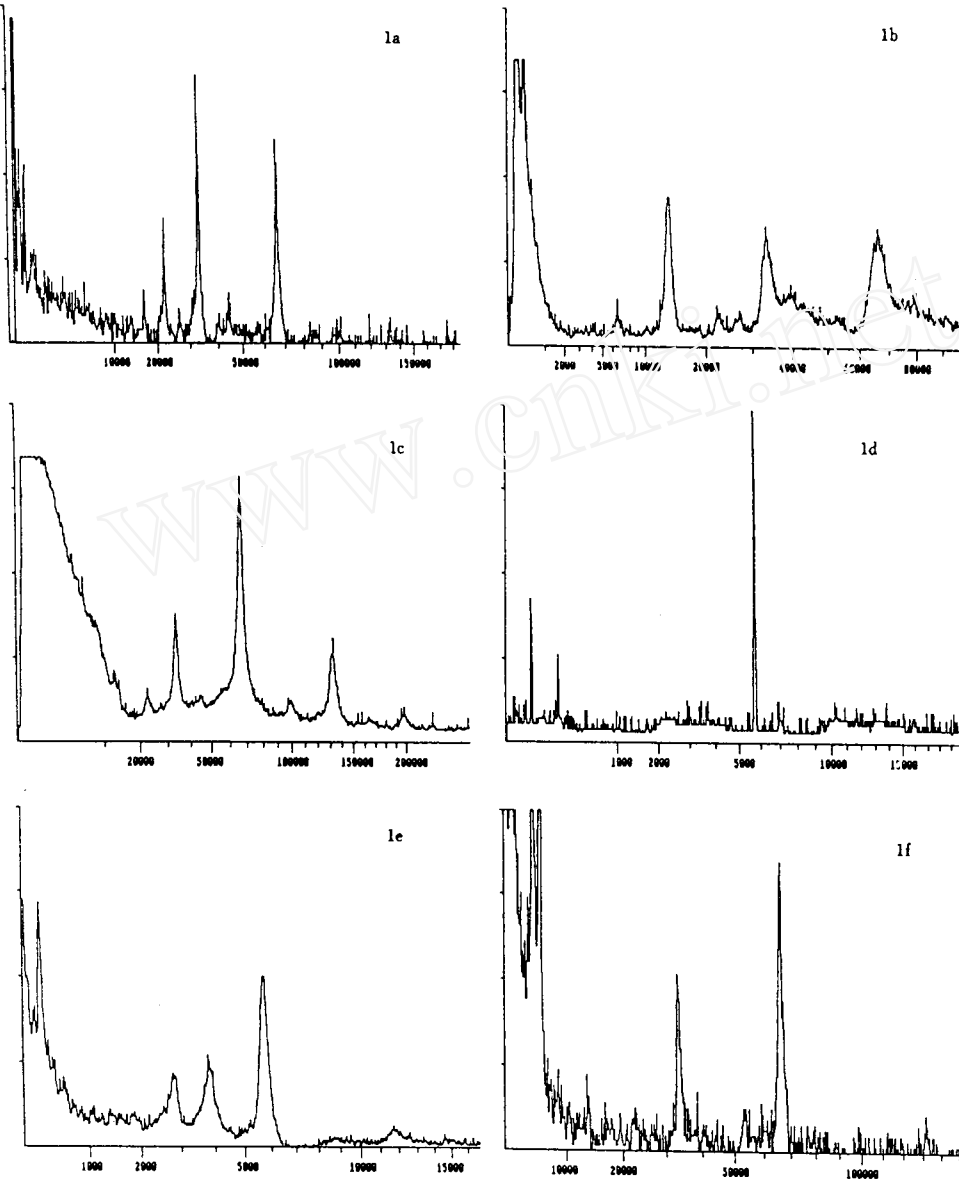


图 1 固-液相基体种类搭配实验所得谱图

(a、b、c 均为白蛋白激光质谱图,样品浓度均为  $5 \times 10^{-6}$  M,底物是尼龙膜,基体分别是:  
a.  $\alpha$ -CYANO+NAB, b. DHB+NBA, c. SA+NBA, 其摩尔比例均为 2 : 1; d、e 为胰岛素激光  
质谱图,样品浓度均为  $1 \times 10^{-6}$  M,底物是尼龙膜。基体分别是: d. SA+NBA, e.  $\alpha$ -CYANO+  
NBA, 其摩尔比例均为 2 : 1; f 为溶菌酶激光质谱图,样品浓度均为  $5 \times 10^{-6}$  M,底物是尼  
龙膜,基体为  $\alpha$ -CYANO+NBA, 其摩尔比例均为 2 : 1。)

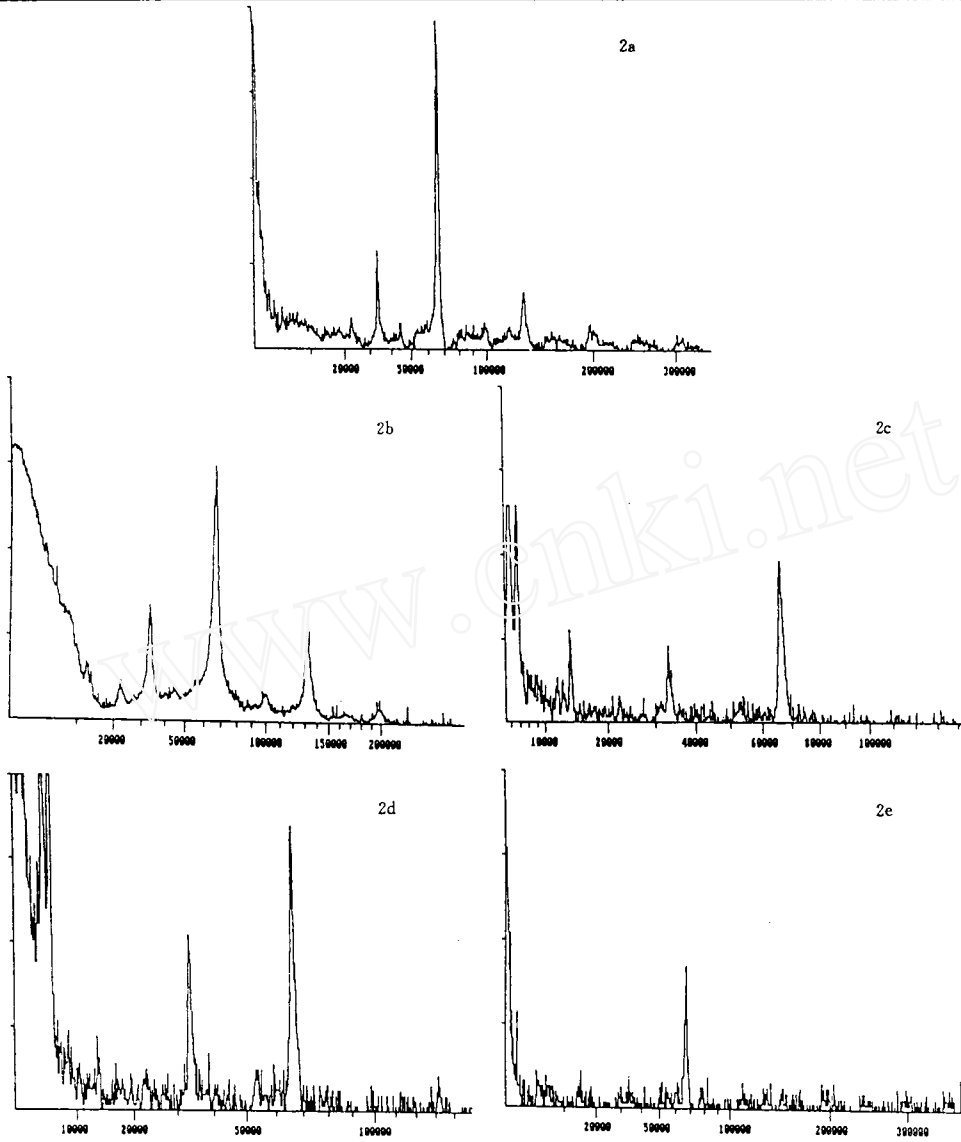
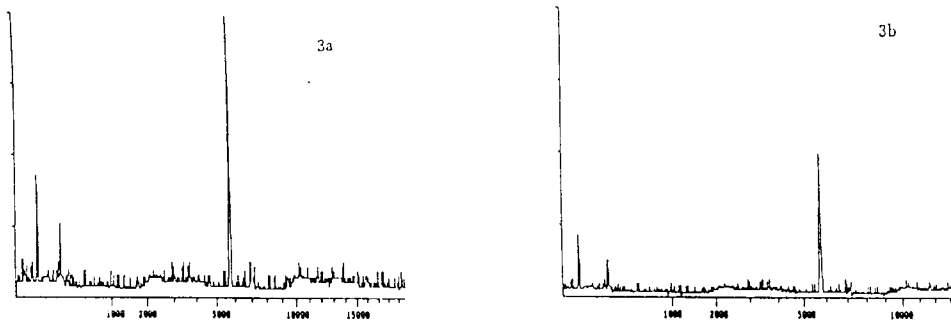


图 2 不同固-液相基体摩尔比的白蛋白激光质谱图

(样品浓度均为  $5 \times 10^{-6} \text{M}$ , 激光波长 355nm, 基体均为 SA+NBA, 底物是硝化纤维膜, 固-液相基体摩尔比例分别是: a. 4 : 1, b. 2 : 1, c. 1 : 1, d. 1 : 2, e. 1 : 5)



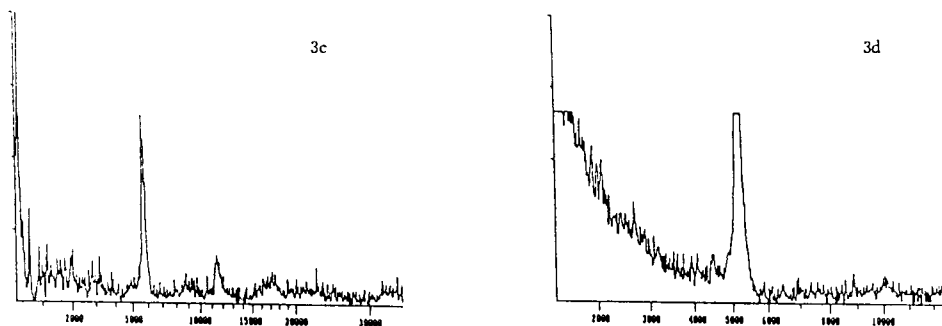


图 3 不同底物的胰岛素激光质谱图

(样品浓度均为  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ , 基体均为 SA+NBA, 其摩尔比例为 2:1, 激光波长为 355nm, 底物分别为: a. 尼龙膜, b. 硝化纤维膜, c. 处理过的纸, d. 银片)

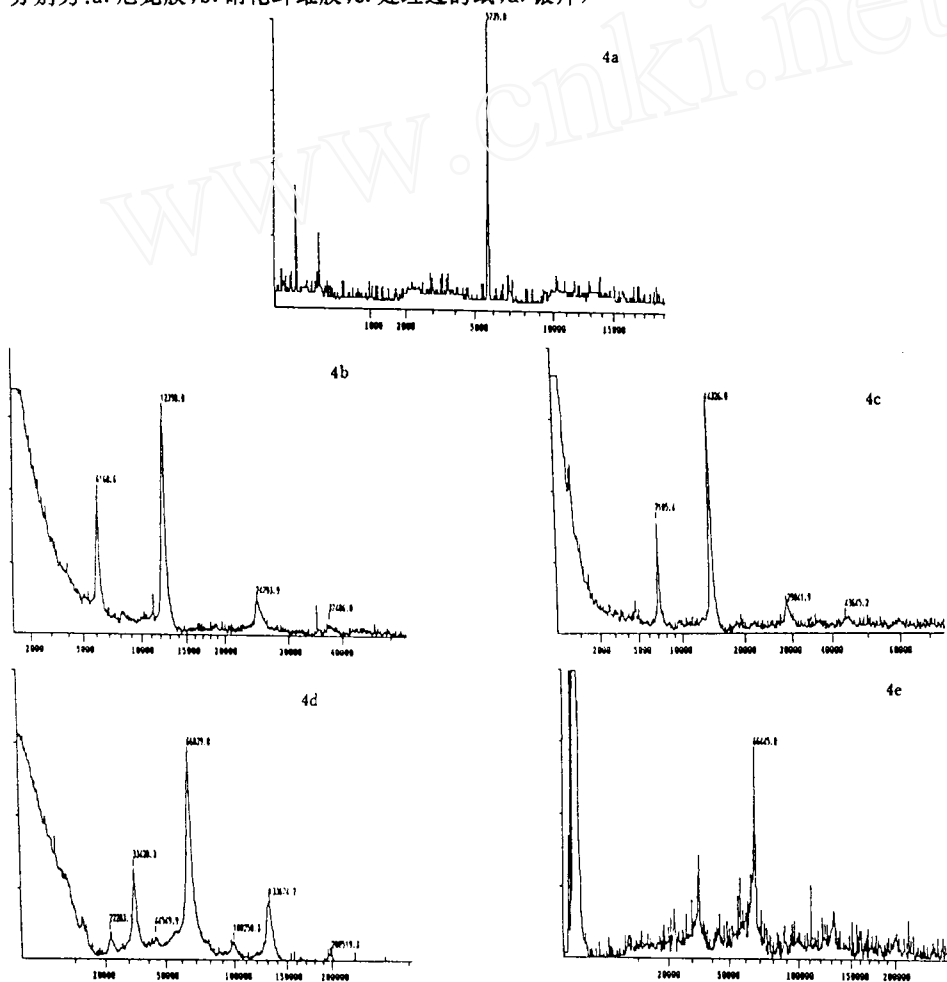


图 4 不同蛋白质的激光质谱图

(a. 胰岛素激光质谱图, b. 细胞色素 C 的激光质谱图, c. 溶菌酶激光质谱图, d. 白蛋白激光质谱图。样品浓度均为  $5 \times 10^{-6} \text{M}$ , 基体均为 SA+NBA, 其摩尔比例为 2:1, 激光波长为 355nm, 底物是硝化纤维膜, e. 白蛋白激光质谱图, 基体为 SA, 其他条件与 d 相同。)

## 参 考 文 献

- 1 Karas M, Hillenkamp F. *Anal Chem*, 1988, 60: 2299
- 2 Tanaka K, Waki H, Ido Y *et al.* *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1988, 2: 151
- 3 Nelson R W, Thomas R M, Williams P. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1988, 2: 151
- 4 Karas M, Nordhoff E, Hillenkamp F. *Proceedings of the 40th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*; Washington, DC, May 31-June 5, 1992, 368-588
- 5 D Shannon C, Michael A D. *Anal Chem*, 1993, 65: 2608
- 6 Shankai Zhao, Kasi V Somayajula, Andrew G Sharkey, *et al.* *Frsnius J Anal Chem*, 1990, 338, 588
- 7 Shankai Zhao, Kasi V Somayajula, Andrew G Sharkey *et al.* *Anal Chem*, 1992, 63: 450
- 8 赵善凯, 钟峰. *分析化学*, 1994, 22(10): 1079

## Solid-Liquid Phase Mixed Matrices Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS)

Zhao Shankai, Zhu Zhihua

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

Received 1995-12-20

### Abstract

Solid-liquid binary mixture used for matrix-assisted laser desorption/ionization of peptides and proteins at 355 nm are described. By the use of mixed matrices composed of a solid-phase matrix (sinapinic acid) and a liquid-phase matrix (3-nitrobenzyl alcohol), the resolution, sensitivity and reproducibility of the obtained mass spectra can be improved.

**Key Words:** matrix-assisted laser desorption/ionization, solid-liquid binary mixed matrices, protein, molecular weight determination