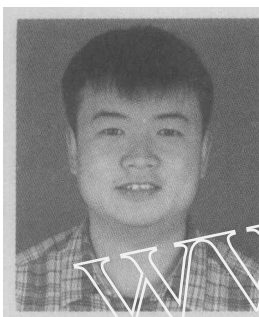


生物质谱在核糖核酸领域的应用

杨何义, 蔡 耘, 钱小红*

(军事医学科学院基因组学与蛋白质组学研究中心, 北京 100850)



【作者简介】:

杨何义, 1997年毕业于山西大学, 获学士学位; 2000年在山西农业大学生物化学与分子生物学专业获硕士学位。2003年在军事医学科学院药物分析专业获博士学位。主要从事生物质谱在核酸领域的研究及应用工作。现在美国 Yeshiva 大学 Albert Einstein 医学院进行博士后研修, 从事利用生物质谱对酪氨酸磷酸化的规模化识别及定位和鉴定细胞中酪氨酸磷酸酶底物的研究。

摘要:综述了近十年来生物质谱用于分析核糖核酸的应用进展。概述了电喷雾电离质谱 (ESI-MS)、基质辅助激光解吸电离质谱 (MALDI-MS) 的原理。论述了生物质谱用于分析生物大分子具有准确、快速、灵敏度高等优点。总结了质谱用于单核苷酸多态性分型分析 (SNP genotyping)、对短的串联重复序列 (STR) 分析; 基因缺陷而导致的疾病诊断; 对寡核苷酸片段的序列分析等 4 个方面的研究成果。讨论了应用 ESI-MS 分析寡核苷酸形成的非共价复合物, 包括研究寡核苷酸的高级结构、寡核苷酸与蛋白质间形成的复合物、寡核苷酸与其它配体小分子间相互作用。提出了存在的问题, 并展望了生物质谱未来的发展方向。

关键词:质谱学; 生物质谱的应用; 综述; 基质辅助激光解吸电离质谱 (MALDI-MS); 电喷雾电离质谱 (ESI-MS); 核酸

中图分类号: O657.63; Q52 **文献标识码:** A

文章编号: 1004-2997(2004)01-52-09

The Application Progress on Biological Mass Spectrometry Analysis of Nucleotide

YANG He-yi, CAI Yun, QIAN Xiao-hong*

(Department of Genomics and Proteomics, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract: The application progress on biological mass spectrometric analysis of nucleotide has been reviewed in the past decade. The principle of electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) and matrix assisted laser desorption ionization-mass spectrometry (MALDI-MS) is described. The advantage of biological mass spectrometry with accuracy, high speed, high sensitivity is introduced. The study results on mass spectrometric analysis of single nucleotide polymorphisms genotyping, short tandem repeats, diagnosis of diseases suffered from gene defect and sequencing of oligonucleotide fragment. The ESI-MS determination of non-covalence complex composed of oligonucleotide is discussed, including study on advanced structure of oligonucleotide, complex of oligonucleotide with protein, interaction between oligonucleotide and other small molecules. Simultaneously, the issue is put forward and the development direction is prospected.

收稿日期: 2003-05-25; 修回日期: 2003-09-09

作者简介: 杨何义 (1974~), 男 (汉族), 山西闻喜人, 在读博士研究生, 药物分析专业, E-mail: yanghy@hotmail.com

* 通讯作者: 钱小红, 教授, E-mail: qianhh@nic.bmi.ac.cn

Key words: mass spectrometry; application of biological mass spectrometry; review; matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS); electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS); nucleic acids

随着 20 世纪 80 年代基质辅助激光解吸电离(Matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)^[1,2]和电喷雾电离(Electrospray ionization, ESI)^[3]两种新的“软电离”方式的出现,使得质谱能够用于分析高极性、难挥发和热不稳定的生物样品^[4],生物质谱应运而生。与分析生物大分子方法相比,其他生物质谱具有准确、快速、灵敏度高等特点,引起了分析化学学家和生物学家的浓厚兴趣。特别是在 20 世纪 90 年代,由于基因组及其衍生的转录组、蛋白质组的兴起,生命科学的研究进入了大科学时代,其特征是所要求的分析技术具有大规模、高通量。生物质谱对蛋白质和核酸的分析恰恰具有这些特征,从而在基因组学与蛋白质组学方面得到广泛的应用。同时,基因组学与蛋白质组学对生物质谱的需求,大大加速了生物质谱自身迅速的发展,如在基质辅助激光解吸电离过程中延迟萃取(Delayed extraction)^[5]技术的应用和电喷雾电离过程中纳喷(Nano-electrospray ionization)技术^[6]的应用,使得生物质谱在分辨率、灵敏度、准确度等方面得到很大提高。

生物质谱在分析核糖核酸方面的应用远远落后于用于蛋白质和多肽的分析。这主要是由以下几方面原因造成的。(1)因核酸分子带有磷酸基,极性和电负性大,容易吸收大量的碱金属离子,如 K^+ 、 Na^+ 等,使核酸形成多种分子量的碱性离子加合物,导致离子速度空间和能量的分

散,引起核酸分子离子峰变宽,不易准确测定其质量数^[4];(2)尤其在基质辅助激光解吸电离过程中,由于核酸分子中所含的碱基具有较强的紫外吸收能力,核酸分子在离子化过程中易于碎裂;(3)已经有经典的生物化学方法用于测定核酸分子的标征和序列,如电泳等。但由于生物质谱本身所拥有的优点及技术的不断完善,生物质谱已经在核酸领域得到了广泛的应用。本文就生物质谱原理、特点及其在核酸领域的应用作一综述。

1 生物质谱原理

1.1 电喷雾电离质谱

电喷雾电离技术由 Zeleny 于 1917 年出现,1984 年美国耶鲁大学 John Fenn 研究组首次发表了 ESI-MS 的研究成果,并于 1988 年报道了他们应用 ESI-MS 首次成功地进行蛋白质分析,从此使 ESI-MS 进入了用于生物大分子研究的时代。

电喷雾电离是在液滴变成蒸气产生离子发射过程中形成的,也称为“离子蒸发”,原理示于图 1。溶剂由泵输送,经不锈钢毛细管流出。由于溶剂本身带有 3~5 kV 的高电压,与对应极之间产生强电场,在毛细管出口发生喷雾,产生带强电荷的液体微粒,所以被称为“电喷雾”。随着液体微粒中溶剂的蒸发,离子向表面移动。离子的密度增加,最终逸出表面,蒸发进入空间^[4]。

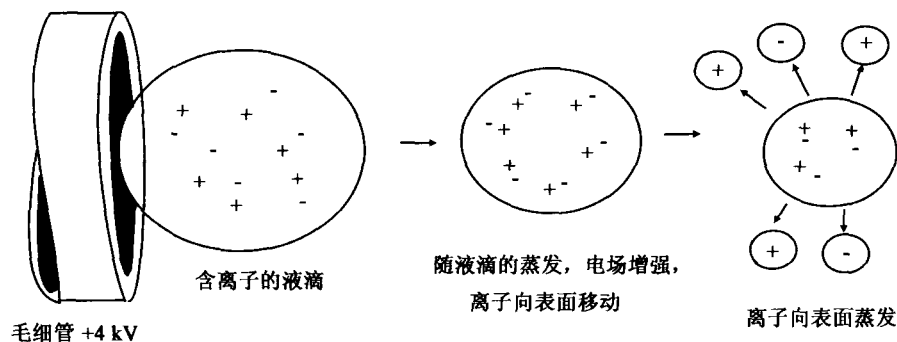


图 1 电喷雾电离工作原理图

Fig. 1 Principle of electrospray ionization

1.2 基质辅助激光解析电离质谱

激光解吸电离质谱(Laser desorption/ionization-mass spectrometry, LDI-MS)是分析难挥发有机物的手段之一,曾用于分析合成聚合物和热不稳定的生物小分子。但激光解析测定的分子量均低于 3 kDa。直至 1988 年 Tanaka 和 Hillenkamp 两个研究小组分别提出使用基质辅助激光解吸电离质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry, MALDI-MS),使 LDI-MS 应用于生物大分子分析得到发展^[1,2]。

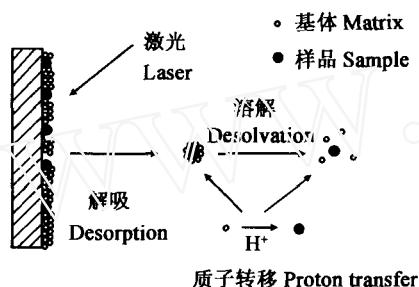


图 2 MALDI 工作原理图

Fig. 2 Principle of MALDI

MALDI-MS 分析生物大分子的关键是首先要使生物分析的生物大分子与合适的基质(一种小分子有机酸)形成共结晶,当激光照射到晶体上时,基质分子吸收能量,并转换成固体的激发能,从而导致固相转移,形成气相分子,此时被分析物与基质分子一起被释放出来,在此过程中生物大分子与基质分子同时发生了质子转移,生物大分子得到离子化。用 MALDI 分析生物大分子的过程中,选择一个合适的基质是很重要的,一般认为基质具备三种功能:(1)吸收能量;(2)使生物大分子彼此分离。生物大分子与极大数量的基质相混合,从而使得原本很强的分子间作用力得到削弱,实验结果表明基质分子与被分析物质间的摩尔比在 100 : 1~50 000 : 1 为最佳离子产生值;(3)使被分析的生物大分子离子化。

2 质谱用于生物大分子分析的优点

与其他分析生物大分子方法相比,生物质谱具有如下优点:(1)准确。检测对象是生物大分子本身所特有一个物理性质——分子量。而其他方法是通过一种间接的方式来表征生物大分子,有时还要受到其他条件的影响,如电泳,其结果是

要受到生物大分子高级结构的影响;(2)快速。如现在基于肽质量指纹图(Peptide mass fingerprint, PMF)鉴定蛋白质的方法要比传统的氨基酸测序法快很多;(3)可用于定性分析,也可用于定量分析;(4)灵敏度高。现在对肽的检出限可达到 10^{-18} mol 水平;(5)串联质谱能提供准确的结构信息。现在人们已经用串联质谱获得肽和寡核苷酸一些序列信息;(6)能有效与一些分离技术联用,从而可直接鉴定一些复杂体系中各组成成分,如二维色谱与串联质谱联用技术已成功用于蛋白质组研究;(7)易于大规模和高通量的操作。能满足基因组学与蛋白质组学等一些新兴学科的技术要求。

3 生物质谱在分析核酸方面的应用

3.1 寡核苷酸片段的分析

已有多篇文献报道应用紫外-基质辅助激光解吸电离质谱(UV-MALDIMS)分析 500~600 个碱基的核酸片断^[7,8],甚至有报道应用红外-基质辅助激光解吸电离质谱(IR-MALDIMS)分析长达约 2 180 个碱基的核酸片断^[9],但由于大的核酸分子在离子化的过程中更加容易裂解,因此所获得谱图的分辨率和准确度却很低,不能反映准确的分子量信息。目前生物质谱对核酸的常规分析主要集中于对小片段(特别是 50 个碱基以下)的寡核苷酸片段进行分析,以便获得高的分辨率和准确度,从而能够区分由于碱基 A 和碱基 T 的分子量的差异(9 Da)。这方面应用主要包括:(1)单核苷酸多态性分型(Single nucleotide polymorphisms genotyping, SNP genotyping)分析^[10~12];(2)对短的串联重复序列(Short tandem repeats, STR)分析^[13];(3)基因缺陷而导致的疾病诊断^[14~16]以及(4)对寡核苷酸片段的序列分析^[17,18]。

3.1.1 单核苷酸多态性分型分析 单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)是指在基因组 DNA 某个位置处存在有单个碱基的差异,其人群发生频率超过 1%,人类基因组 DNA 序列 90%多态性是由它造成的^[19]。截止到现在,人们已经知道包括人类在内的几十种生物体基因组 DNA 序列,接下来的工作重点将转移到对基因组 DNA 序列进行多态性研究,最终探究生物体生物学性状差异的遗传基础。因此 SNP 的研究已成为当前功能基因组研究中的一

个新的热点。

SNP 研究一般包括以下几个方面:首先在基因组序列上找到单核苷酸多态性位点,即 SNP 作图(SNP mapping);其次在大量的样本中测定每一个 SNP 的等位频率,即 SNP 分型(SNP genotyping);最后对所得的数据进行连锁不平衡分析或关联分析,以找出其中所隐含的生物信息。截止到 2003 年 3 月 14 日,全世界各地递交到美国国家生物技术信息中心(NCBI)中 dbSNP 库中人类基因组中所含的 SNP 的数量已达 6 107 661 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>),此数据库对全世界各地的研究者免费开放。随着大量的单核苷酸多态性位点的发现,人们想知道不同人群的 SNP 等位频率(包括疾病人群和正常人群、不同种族人群等等),这往往需要对成千上万个个体进行分析,工作量非常巨大。因此 SNP 分型技术必须准确、高通量和低成本。目前所使用的技术一般包括方法和手段两部分。确定特定 SNP 位点处等位基因的基因型方法有:等位基因特异的延伸法^[20]、等位基因特异的杂交法^[21,22]、等位基因特异的酶切法^[23]、等位基因特异的连接法^[24]等。手段包括:毛细管电泳、检测荧光^[25]、荧光极化^[26,27]、质谱^[20~24]等。这两个部分相互结合可产生多种 SNP 分型的方法。

质谱与其他检测方式相比,有如下优点:(1)准确。因为它检测的是核酸内在的物理性质——分子量(准确地讲是荷质比),而不像其它方式检测的是一种衍生出来的变化;(2)快速。获得一个质谱图只需要几秒钟;(3)易于自动化;(4)耗费少。因为可同时检测多个 SNP 位点。所以该技术越来越受到研究人员的青睐。现在用于单核苷酸多态性的分型研究质谱仪主要是基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOFMS)。国际上已有诸多这方面的报道^[20,24]。国内杨何义等^[28]应用等位基因特异的延伸方法结合 MALDI-TOF 检测技术,建立了 10 重 SNP 分型技术。

3.1.2 对短的串联重复序列的分析 短串联重复序列(Short tandem repeats, STR)是由几个碱基对作为核心单位,串联重复形成的一类 DNA 序列,主要由于核心重复单位数目的变化构成了 STR 基因座的遗传多态性^[29]。人类基因

组中,平均每 15 kb 就有一个 STR 基因座,提供了丰富的遗传标记来源^[29]。如果不同种族 STR 基因座等位基因频率不同,其等位基因分布能够代表某一种族或某一群体特征,STR 遗传标记就可作为人类学研究尤其是种族识别和分析基因从一个群体向另一个群体流动的新手段。

Ross P 等^[30]利用 MALDI-TOF 作为替代传统的应用电泳检测 DNA 片段的手段,对人类基因组 TH01 和 TPOxx 短串联重复序列系统进行分析,得到了可信的结果。Taranenko N 等^[31]应用 MALDI-TOF 作为检测方法,对临床样本的一个四个碱基的短串联重复序列进行检测,他们的结果表明生物质谱可快速、准确分析 DNA 片段,从而可用于法医学和对遗传病的诊断。Oberacher H 等^[31]应用毛细管高效液相色谱结合 ESI-MS 对人类基因组 TH01 短串联重复序列系统进行分析,所得的结果也与传统毛细管电泳结果完全相符。

3.1.3 基因缺陷而导致的疾病诊断 利用生物质谱对寡核苷酸片段的分析在医学诊断方面的应用主要集中于由于基因突变、缺失等因素而导致的各种疾病。近年来随着生物质谱的发展,也有诸多这方面的报道。

囊性纤维化基因一个最常见的突变是编码一个苯丙氨酸的密码子缺失。Chang L 等^[14]首次建立应用 MALDI-TOFMS 在囊性纤维化病人中检测到这种突变。紧接着应用这种方法对 30 个临床样本进行分析,所得结果与常规凝胶电泳分析方法完全一致。Lubman 等^[15]应用 MALDI-TOFMS 对导致婴儿黑蒙性痴呆症(Tay-sachs disease)的 HEXA 基因进行突变分析,并应用于临床诊断。

3.1.4 对寡核苷酸片段的序列分析 质谱用于寡核苷酸的序列分析通常有三种方法:(1)用质谱代替凝胶电泳,分析双脱氧法合成的混合寡核苷酸片段。Poskey 等^[32]用此方法得到长度为 50 个碱基的寡核苷酸序列;(2)分别用磷酸二酯酶(从 5' 到 3' 端和从 3' 到 5' 端)切割寡核苷酸片段,用质谱分析不同时间点的酶切溶液,从而得到寡核苷酸的序列信息。Smirnov I 等^[33]报道此方法在寡核苷酸序列分析中的应用。(3)应用串联质谱直接分析寡核苷酸的序列。Ni J 等^[34]首次报道这种方法。与多肽类似,对寡核苷酸进行串联质谱分析,也形成 a、b、c、d 和 w、x、y、z 四

种系列的离子。但是最容易得到(α -碱基(α -base)、w 系列的离子,并且这些序列的离子在质谱图上的信号最强。一般可根据这两种系列的离子推断出寡核苷酸的序列。由于气相中寡核苷酸离子非常容易裂解(电荷越高,越容易裂解;分子量越大,越容易裂解),在选择母离子时,要尽量选择含有较少电荷的母离子,并且要十分小心控制碰撞的能量。目前,用这种方法成功获得了约有 15 个碱基的寡核苷酸序列。

而用于 DNA 片段的序列分析的凝胶电泳技术还存在下列缺点:(1)手续繁杂,较为费时;(2)容易受单链 DNA 结构的影响,尤其对于一些富含 GC 的片段,往往不能得到明确的结果;(3)对于一些合成的寡核苷酸片段和带有特殊修饰的寡核苷酸片段,应用电泳的方法很难确定其是否合成完全及其修饰情况。

如上所述,应用生物质谱对寡核苷酸片段进行分析已得到了广泛的应用。随着分子生物学技术和反义核酸药物技术的发展,越来越多的寡核苷酸片段被合成,用作引物、探针或作为反义药物等。对这些片段进行准确、快速的检测,以判断合成是否完全及合成的序列是否完全正确,是完全必要的。生物质谱是迄今进行这种检测的最好手段。利用一级质谱可以快速、准确测定其分子量,从而可以判断其合成是否完全,利用二级或多级质谱可以获得其序列的信息。因此,应用生物质谱分析寡核苷酸片段将会受到越来越多的重视。

3.2 对与寡核苷酸形成的非共价复合物的分析

已有众多文献报道利用质谱研究生物大分子间或生物大分子与其它配体分子间形成的非共价复合物。一般所采用的都是 ESI-MS,这是因为 ESI-MS 用的是迄今最软的“电离源”,离子化过程不会对非共价复合物有较大的影响。而对于 MALDI-ESI-MS,分析过程首先需要生物分子与基质形成共结晶,才能使其离子化,而所用的基质大部分都是有机酸,可能导致生物分子变性从而影响非共价复合物的形成。虽然也有报道应用 MALDI-MS 分析由生物分子形成的非共价复合物^[35,36],甚至有报道采用一种中性基质用于这种分析^[37],但是人们目前主要应用 ESI-MS 进行这种研究。

3.2.1 对寡核苷酸高级结构的研究 众所周知,在一定的盐离子(如 Mg^{2+})浓度存在的情况

下,不同寡核苷酸链之间能够以非共价结合的方式形成双链、三链甚至四链。对寡核苷酸链高级结构的研究为利用生物质谱研究生物分子非共价复合物提供了一种很好的模型。Docktycz M 等^[38]于 1994 年应用 ESI 四级杆离子阱检测到两种 DNA 双链结构,分别由 20 个碱基和 10 个碱基组成,并且发现通过调节碰撞能量能使其解离。Bayer E 等^[39]于溶液中加入三乙基胺使双链 DNA 解离,同样在质谱图中也没有发现双链 DNA 峰。此外,他们还发现在 ESI 离子化过程中双链 DNA 带电状况与电喷雾条件有关。Rosu F 等^[40]利用 ESI-MS 研究三链和四链 DNA,同时还用 MS/MS 研究了 Mesoporphyrin IX(一种与四链 DNA 有特异结合药物)与四链 DNA 形成的复合物。他们发现药物在与四链 DNA 结合的过程中,并没有取代与 DNA 结合的 NH_4^+ ,推断出这种药物与四链 DNA 的结合位点位于四链 DNA 外部,而不是在四链 DNA 中间。另有多篇文章报道应用 ESI-MS 对寡核苷酸高级结构的研究。但有一个问题很值得人们思考:就是在生成的气相离子过程中,是什么作用使寡核苷酸链连接在一起?

3.2.2 对寡核苷酸与蛋白质间形成的复合物的研究 人体内 DNA 不断地进行许多重要的生命活动,包括 DNA 修复、复制、转录和翻译等,都是通过特定的 DNA 与蛋白质间相互作用进行调节。因此,有关在分子水平检测 DNA 与蛋白质间相互作用的研究为人们深入了解生命活动提供了一种好的思路。已经有多篇文献报道人们用 ESI-MS 研究 DNA 与蛋白质间形成的复合物中各成分的比例、DNA 与蛋白质间结合的特异性以及蛋白质与特定 DNA(或 RNA)序列间结合力的大小。

Greig M 等^[41]最先报道了这方面的工作。他们用 ESI 四极杆质谱研究牛血清白蛋白(BSA)与 20 个碱基的硫代寡核苷酸序列结合情况。用一系列不同浓度的寡核苷酸溶液与某个固定浓度 BSA 溶液混合,然后通过质谱图中结合和未结合寡核苷酸的 BSA 信号的强度来计算它们各自的浓度,绘制标准曲线,计算出 $K_{D1} = (3.1 + 0.3) \mu\text{mol/L}$ 和 $K_{D2} = (11.9 + 0.6) \mu\text{mol/L}$ 。此外,他们还用毛细管电泳的方法计算出 K_{D1} 和 K_{D2} 值,分别为 $(2.8 + 0.3) \mu\text{mol/L}$ 和 $(10.0 + 0.2) \mu\text{mol/L}$,认为两者间的差异是由这两种方

法所使用的不同的缓冲溶液造成的。紧接着又有多篇文章报道用 ESI-MS 研究 DNA 与蛋白质间的非共价相互作用, 如 Cheng X 等^[42,43]先后报道用 ESI-MS 研究 PU.1 蛋白质(一种转录调控因子)与顺式作用元件 GGAA/T 的结合情况, 同时他们还研究了在噬菌体中 V 蛋白质与单链 DNA 结合情况。Veenstra T 等^[44]用 ESI-MS 研究在 Zn^{2+} 存在情况下, 维生素 D 受体 DNA 结合结构域与维生素 D 应答元件的结合情况, 其结果显示 Zn^{2+} 浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 时, 蛋白质与 DNA 结合得很好, 而在更高的 Zn^{2+} 浓度条件下, 复合物则发生解离。利用质谱对 RNA 于蛋白质间相互作用的研究相对来说较少, 这主要是因为 RNA 酶无处不在, 操作起来相对困难。Sannes-Lowery 等^[45]用 ESI-MS 研究人体免疫缺陷病毒(HIV) Tat 肽与病毒转移复制 RNA 应答元件相互作用, 但相关报道较少。

3.2.3 对寡核苷酸与其它配体小分子间相互作用的研究 DNA 分子(包括单链和双链 DNA 分子)与别的小分子配体(包括一些抗肿瘤、抗病毒治疗试剂)间的相互作用是其产生作用的基础。尽管已经有一些方法应用于这方面的研究, 如圆二色相、荧光波谱学和表面等离子体振^[46]等, 生物质谱以其快速、准确的特点也逐渐受到了人们的重视。

Gale D 等^[47]首先用 ESI-MS 研究司替霉素 A(Distamycin A, 一种已知与双链 DNA 的小沟结合的化合物)与一段自我配对的 12 个碱基的双链 DNA 的结合情况。当在低浓度司替霉素 A 存在的情况下, 发现有 1:1 司替霉素 A 与 DNA 复合物生成; 而在高浓度司替霉素 A 存在的情况下, 发现有 2:1 司替霉素 A 与 DNA 复合物生成。这些实验结果与核磁共振(NMR)的结果相同。紧接着 Gale D 等^[48]用 ESI-MS 比较了几种与 DNA 的小沟结合的化合物(包括司替霉素 A、戊烷脒、烟酸己可碱 33258)与上述双链 DNA 结合情况, 并通过碰撞诱导解离的方法来研究不同的化合物与 DNA 双链分子形成的复合物的稳定性, 发现 2:1 司替霉素 A 与 DNA 复合物比 1:1 司替霉素 A 与 DNA 复合物稳定, 未结合的双链 DNA 比结合的 DNA 更易于发生解离。Gale D 等的工作引起了人们用 ESI-MS 研究 DNA 与小分子化合物相互作用的兴趣。现有一系列的文章报道了应用 ESI-MS 研究

DNA 与小分子化合物间相互作用^[49~53]。最近, Rosu F 等^[54]用 ESI-MS 研究由 12 个碱基的双链 DNA 和一些与双链 DNA 小沟结合的化合物(Hochest 33258、Hochest 33342、DAPI、netropsin、berenil)形成的复合物的情况, 获得了一些有关结合力、结合计量与对序列选择性一些信息, 并与用圆二色相和荧光波谱学方法获得的结果进行了比较, 指出用质谱的方法进行定性和定量的亲和筛选具有一定的应用潜力。David W 等^[55]用 ESI-MS 首次研究四链 DNA [$d(T_2G_5T)$]₄ 与一些小分子药物如 Te101, Distamycin A, Diethylthiocarbocyanine iodide (DTC) 间相互作用, 实验研究表明 Te101 通过末端堆积作用与四链 DNA 末端的碱基 G 相结合, 而 Distamycin A 与四链 DNA 形成的沟状区域结合。这两种不同的结合方式在串联过程中的裂解方式是不一样的。他们用碰撞诱导解离方式对其进行研究, 发现 Te101 与四链 DNA 复合物容易丢失小分子药物, 再裂解出单链 DNA; 而 Distamycin A 与四链 DNA 复合物直接裂解出单链 DNA, 且 Distamycin A 还与单链 DNA 结合在一起。同时他们还研究了 DTC 与四链 DNA 形成的复合物裂解方式, 发现其与 Distamycin A 裂解方式一致, 从而推测 DTC 与 Distamycin A 一样, 是与四链 DNA 形成的沟状区域来结合, 与碱基的序列没有关系。此外, 也有报道应用 ESI-MS 研究单链 DNA 与一些小分子化合物结合的情况, 如 Pocsfalvi G 等^[56]研究了白僵菌素与一个 14 个碱基组成的寡核苷酸结合情况; Wu Q 等^[57]研究了一些金属离子(Na^+ 、 Mg^{2+} 、 UO_2^{2+})与单链寡核苷酸结合情况。

16S 核糖体 RNA 的解码区有一个小的亚区, 命名为 16S, 它正确折叠并保持整个 RNA 结构特点。糖苷在此与该亚区结合, 可被看作是一个完整的 rRNA。NMR 实验显示 16S 可与巴龙霉素(Paromomycin)或庆大霉素(Gentamomycin)结合形成复合物。Sannes-Lowery K 等^[58]用 ESI-MS 研究 16S 与托普霉素或庆大霉素并计算其结合计量与解离常数, 发现 16S 与托普霉素有两个非平衡的结合位点, 并计算了各自的解离常数, 此外还考察了溶液中的缓冲溶液的浓度和有机相的含量对解离常数的影响。

总之, 我们讨论了 ESI-MS 应用于 DNA 组成的多种复合物的研究。正如 Loo 等^[59]所言, 利

用ESI-MS结合串联质谱已成为研究非共价结合的复合物一种有力的工具,并具有很大的应用潜力。ESI-MS具有诸多优点,如快速测定复合物中各成分的结合计量、结合位点的检测、快速筛选与DNA结合的小分子药物等。然而,人们迄今尚未认识一个问题:在气相中的离子是否能够正确反映其在溶液中的实际状态?虽然最初的研究中都是采用一些传统的方法对其进行了验证,但是笔者认为对这个问题的解决,将会进一步促进利用质谱对非共价的复合物的研究。

4 结束语

综上所述,生物质谱已在核酸的研究方面得到了广泛的应用。但是随着生命科学飞速发展,生物学家面前的任务更为巨大和迫切,如诸多生物体的基因组序列的问世,为人们研究物种间与同一物种不同个体间的遗传多态性及进化规律提供了更好的材料,但是认识这种DNA序列多态性的任务非常繁杂。生物质谱已应用于该领域,但许多问题需要解决,如MALDI分析寡核苷酸重复性的问题、对大片段的寡核苷酸分析的问题。我们相信这些问题今后能够得到解决,从而能更好地发挥其准确、快速、灵敏度高的特点,为生物学家提供更加强有力的武器,为解开生命的奥秘和改善人们的生活做出更大的贡献。

参考文献:

- [1] Tanaka K, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 1988, 2:151.
- [2] Hillendamp F, et al. Anal Chem, 1988, 60: 2299.
- [3] Fenn JB, Mann M, Meng CK, et al. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules[J]. Science, 1989, 246:64~71.
- [4] 汪尔康主编. 二十一世纪的分析化学[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 112~149.
- [5] Juhasz P, Roskey MT, Smimov IP, et al. Applications of Delayed Extraction Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry to Oligonucleotide Analysis[J]. Anal Chem, 1996, 68:941~946.
- [6] Wilm M, Mann M. Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source [J]. Anal Chem, 1996, 68(1):1~8.
- [7] Tang K, Taranenko NI, Allman SL, et al. Detection of 500-Nucleotide DNA by Laser Desorption Mass Spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1994, 8:727.
- [8] Liu YH, Bai J, Liang X, et al. Use of a Nitrocellulose Film Substrate in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for DNA Mapping and Screening [J]. Anal Chem, 1995, 67:3482.
- [9] Berkenkamp S, Kirpekar F, Hillenkamp F. Infrared MALDI Mass Spectrometry of Large Nucleic Acids[J]. Science, 1998, 281: 260.
- [10] Kwok PY. High-throughput Genotyping Assay Approaches[J]. Pharmacogenomics, 2000, (1): 1~6.
- [11] Gut IG. Automation in Genotyping of Single Nucleotide Polymorphism [J]. Human mutation, 2001, (17): 475~492.
- [12] Weaver TA. High-throughput SNP Discovery and Typing for Genome-wide Genetic Analysis. In: New Technologies for Life Science: A Trends Guide. 2000, (6):36~42.
- [13] Taranenko NT, Golovlev VV, Allman SL, et al. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization for Short Tandem Repeat Loci[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1998, (1):413.
- [14] Chang LY, Tang K, Schell M, et al. Detection of Delta F508 Mutation of the Cystic Fibrosis Gene by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1995, 9(9): 772~774.
- [15] Srinivasan JR, Liu YH, Venta PJ, et al. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry as A Rapid Screening Method to Detect Mutations Causing Tay Sachs Disease [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1997, 11(10):1144~1150.
- [16] Wada Y, Yamamoto M. Detection of Single-nucleotide Mutations Including Substitutions and Deletions by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1997, 11(15):1657~1660.
- [17] Roskey MT, Juhasz P, Smirnov IP, et al. DNA Sequencing by Delayed Extraction-Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:4724~4729.
- [18] Ni J, Pomerantz SC, Rozenski J, et al. Interpretation of Oligonucleotide Mass Spectra for Determination of Sequence Using Electrospray Ionization and Tandem Mass Spectrometry. 1996, 68:

- 1 989~1 999.
- [19] Brookes AJ. The Essence of SNPs [J]. *Gene*, 1999, 234: 177~186.
- [20] Haff L, Smirnov IP. Single-nucleotide Polymorphism Identification Assays Using A Thermostable Dna Polymerase and Delayed Extraction MALDI-TOF Mass Spectrometry [J]. *Genome Res*, 1997, (7): 378~388.
- [21] Griffin TJ, Tang W, Smith LM. Genetic Analysis by Peptide Nucleic Acid Affinity MALDI-TOF Mass Spectrometry [J]. *Nat biotechnol*, 1997, 15, 1 368~1 372.
- [22] Ross P, Lee K, Belgrader P. Discrimination of Single-nucleotide Polymorphisms in Human DNA Using Peptide Nucleic Acid Probes Detected by MALDI-TOF Mass Spectrometry [J]. *Anal Chem*, 1997, 69, 4 197~4 202.
- [23] Griffin TJ, Hall JC, Prudent JR, et al. Direct Genetic Analysis by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96, 6 301~6 306.
- [24] Jurinke C, van den Boom D, Jacob A, et al. Analysis of Ligase Chain Reaction Products via Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 1996, 237, 174~181.
- [25] Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, et al. Single-nucleotide Polymorphism Analysis by Pyrosequencing [J]. *Anal Biochem*, 2000, 280: 103~110.
- [26] Holland PM, Abramson RD, Watson R, et al. Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5'-3' Exonuclease Activity of *Thermus Aquaticus* DNA Polymerase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 7 276~7 280.
- [27] Livak K, Marmaro J, Todd JA. Towards Fully Automated Genome-wide Polymorphism Screening [J]. *Nat Genet*, 1995, 9: 341~342.
- [28] Heyi Yang, Haijian Wang, Jie Wang, et al. Multiplex Single Nucleotide Polymorphism Genotyping by MALDI-TOF Mass Spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 2003, 314(1): 54~72.
- [29] Edwards A, Hammond HA, Jin L, et al. Genetic Variation at Five Trimeric and Tetrameric Tandem Repeat Loci in Four Human Population Groups [J]. *Genomics*, 1992, 12(2): 241~253.
- [30] Ross PL, Belgrader P. Analysis of Short Tandem Repeat Polymorphisms in Human DNA by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry [J]. *Anal Chem*, 1997, 69 (19): 3 966~3 972.
- [31] Oberacher H, Parson W, Muhlmann R, et al. Analysis of Polymerase Chain Reaction Products by On-line Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Genotyping of Polymorphic Short Tandem Repeat Loci [J]. *Anal Chem*, 2001, 73 (21): 5 109~5 115.
- [32] Roskey MT, Juhasz P, Smirnov IP, et al. DNA Sequencing by Delayed Extraction-Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(10): 4 724~4 729.
- [33] Smirnov IP, Roskey MT, Juhasz P, et al. Sequencing Oligonucleotides by Exonuclease Digestion and Delayed Extraction Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 1996, 238(1): 19~25.
- [34] Ni J, Pomerantz C, Rozenski J, et al. Interpretation of Oligonucleotide Mass Spectra for Determination of Sequence Using Electrospray Ionization and Tandem Mass Spectrometry [J]. *Anal Chem*, 1996, 68(13): 1 989~1 999.
- [35] Woods AS, Buchsbaum JC, Worrall TA, et al. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization of Noncovalently Bound Compounds [J]. *Anal Chem*, 1995, 67(24): 4 462~4 465.
- [36] Tang X, Callahan JH, Zhou P, et al. Noncovalent Protein-oligonucleotide Interactions Monitored by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry [J]. *Anal Chem*, 1995, 67(24): 4 542~4 548.
- [37] Glocker MO, Bauer SH, Kast J, et al. Characterization of Specific Noncovalent Protein Complexes by UV Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 1996, 31(11): 1 221~1 227.
- [38] Doktycz MJ, Habibigoudarzi S, McLuckey SA. Accumulation and Storage of Ionized Duplex DNA Molecules in a Quadrupole Ion Trap [J]. *Anal Chem*, 1994, 66: 3 416.
- [39] Bayer E, Bauer T, Schmeer K, et al. Analysis of Double-stranded Oligonucleotides by Electrospray Mass Spectrometry [J]. *Anal Chem*, 1994, 66(22): 3 858~3 863.
- [40] Rosu F, Gabelica V, Houssier C, et al. Triplex and Quadruplex DNA Structures Studied by Electrospray Mass Spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16(18): 1 729~

- 1 736.
- [41] Greig MJ, Gaus H, Cummins LL, et al. Measurement of Macromolecular Binding Using Electrospray Mass Spectrometry. Determination of Dissociation Constants for Oligonucleotide-serum Albumin Complexes[J]. *J Am Chem Soc*, 1995, 117:10 765~10 766.
- [42] Cheng X, Morin PE, Harms AC, et al. Mass Spectrometric Characterization of Sequence-specific Complexes of DNA and Transcription Factor PU. 1 DNA Binding Domain [J]. *Anal Biochem*, 1996, 239(1):35~40.
- [43] Cheng X, Harms AC, Goudreau PN, et al. Direct Measurement of Oligonucleotide Binding Stoichiometry of Gene V Protein by Mass Spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(14):7 022~7 027.
- [44] Veenstra TD, Benson LM, Craig TA, et al. Metal Mediated Sterol Receptor-DNA Complex Association and Dissociation Determined by Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(3):262~266.
- [45] Sannes - Lowery KA, Hu P, Mack DP, et al. HIV-1 Tat Peptide Binding to TAR RNA by Electrospray Ionization Mass Spectrometry[J]. *Anal Chem*, 1997, 69(24):5 130~5 135.
- [46] Szabo A, Stolz L, Granzow R. Surface Plasmon Resonance and Its Use in Biomolecular Interaction Analysis (BIA) [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1995, 5(5): 699~705.
- [47] Gale DC, Goodlett DR, Light-Wahl KJ, et al. *J Am Chem Soc*, 1994, 116:6 027.
- [48] Gale DC, Smith RD. Characterization of Noncovalent Complexes Formed Between Minor Groove Binding Molecules and Duplex DNA by Electrospray Ionization-Mass Spectrometry [J]. *J Am Soc mass Spectrom*, 1995, 6(12):1 154~1 164.
- [49] Triolo A, Arcamone FM, Raffaelli A, et al. Non-covalent Complexes Between DNA-binding Drugs and Double-stranded Deoxyoligonucleotides: A Study by Ionspray Mass Spectrometry[J]. *J Mass Spectrom*, 1997, 32(11):1 186~1 194.
- [50] Wan KX, Gross ML, Shibue T. Gas-phase Stability of Double-stranded Oligodeoxynucleotides and Their Noncovalent Complexes With DNA-binding Drugs as Revealed by Collisional Activation in an Ion Trap[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, 11(5):450~457.
- [51] Gabelica V, Rosu F, Houssier C, et al. Gas Phase Thermal Denaturation of an Oligonucleotide Duplex and Its Complexes With Minor Groove Binders[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, 14(6):464~467.
- [52] Kapur A, Beck JL, Sheil MM. Observation of Daunomycin and Nogalamycin Complexes With Duplex DNA Using Electrospray Ionisation Mass Spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1999, 13(24):2 489~2 497.
- [53] Griffey RH, Hofstadler SA, Sannes-Lowery KA, et al. Determinants of Aminoglycoside-binding Specificity for rRNA by Using Mass Spectrometry [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96(18):10 129~10 133.
- [54] Rosu F, Gabelica V, Houssier C, et al. Determination of Affinity, Stoichiometry and Sequence Selectivity of Minor Groove Binder Complexes With Double-stranded Oligodeoxynucleotides by Electrospray Ionization Mass Spectrometry[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(16): e82.
- [55] David WM, Brodbelt J, Kerwin SM, et al. Investigation of Quadruplex Oligonucleotide-drug Interactions by Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2002, 74(9): 2 029~2 033.
- [56] Pocsfalvi G, Di Landa G, Ferranti P, et al. Observation of Non-covalent Interactions Between Beauvericin and Oligonucleotides Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1997, 11(3): 265~272.
- [57] Wu Q, Cheng X, Hofstadler SA, et al. Specific Metal-oligonucleotide Binding Studied by High Resolution Tandem Mass Spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 1996, 31(6):669~675.
- [58] Sannes-Lowery KA, Griffey RH, Hofstadler SA. Measuring Dissociation Constants of RNA and Aminoglycoside Antibiotics by Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 2000, 280(2):264~271.
- [59] Loo JA. Studying Noncovalent Protein Complexes by Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J]. *Mass Spectrom Rev*, 1997, 16(1):1~23.