

MALDI-MS 法中多电荷单体和单电荷 多聚体分子离子形成机理的 研究之二——负离子质谱的研究*

赵善楷** 朱智华 钟 峰 查庆民
(中山大学测试中心 广州 510275)

[摘要] 本文通过观察不同样品浓度、不同基体、不同基底所形成 MALDI-MS 负离子谱图中多电荷单体及单电荷多聚体的情况,了解其形成的规律。实验结果发现随着样品浓度增加,谱图中单电荷多聚体增加;不导电的硝化纤维膜基底比导电良好的银片基底谱图中多电荷离子增加。以上两种现象与正离子谱基本相似。对比 α -氰基-4-羟基肉桂酸和阿魏酸两种基体的负离子谱图,发现与正离子谱图相同,在 α -氰基-4-羟基肉桂酸谱图中多电荷离子明显多于阿魏酸。对上述实验结果分别就其形成机理作了讨论。

关键词: 基体辅助激光解吸电离质谱法 负离子 多聚体离子

在研究了 MALDI-MS 法正离子谱中多电荷单体和单电荷多聚体分子离子形成机理的基础上^[1],我们进一步研究了负离子谱的情况,其研究方法是相同的,即通过不同蛋白质样品浓度、不同的基体以及不同基底观察所获得的 MALDI 谱图情况,并对结果进行了讨论,实验表明,正负离子谱图有近似规律,但在使用不同基体所获得的负离子谱图中,我们认为负离子形成与正离子形成的规律是不同的。

1 实验方法

所用仪器是自制研究级激光微探针飞行时间质谱仪^[2],采用激光波长为 355 nm,束斑直径为 100 μm ,加速电压为 -20 kV。

使用基体为 α -氰基-4-羟基肉桂酸(4HCCA)和芥子酸(SA)(美国 Sigma 公司生产),并分别溶于 1:1 的乙腈和水混合溶液中,浓度为 0.1 M。所用蛋白质为细胞色素 C (12360Da)和白蛋白(66000Da)(美国 Sigma 公司生产),并分别溶于 0.1%三氟醋酸水溶液中,以配制成所需浓度溶液,使用时取 5 μL 基体溶液与 5 μL 蛋白溶液混合后,取 5 μL 滴于基底上,空气室温吹干后放入离子源中进行测定。

2 结果与讨论

1997-05-22 收

* 国家自然科学基金资助项目

** 通讯联系人

2.1 样品浓度的影响

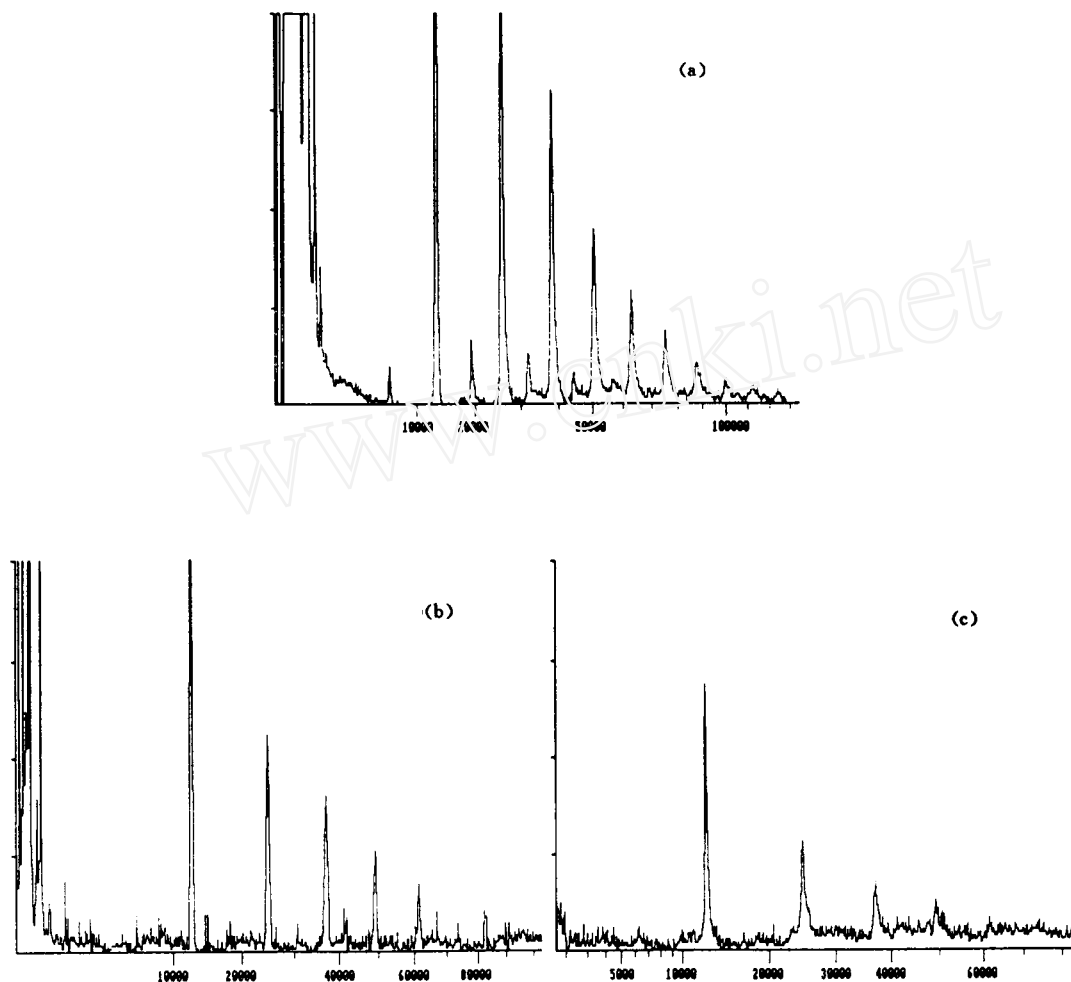


图 1 不同浓度细胞色素 C 的负离子激光质谱图(基体为 SA)

(a) $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ (b) $6 \times 10^{-6} \text{ M}$ (c) $1 \times 10^{-6} \text{ M}$

图 1 - (a)、(b)、(c) 是细胞色素 C 的负离子激光质谱图, 基体是 SA, 三张谱图所对应的样品浓度分别为 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, $6 \times 10^{-6} \text{ M}$ 和 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$, 在与正离子谱图比较时, 我们发现与正离子谱图的规律基本相同, 即样品浓度增大, 出现更多单电荷的多聚体离子, 所不同的是在作正离子谱时浓度变化为 $3 \times 10^{-7} \text{ M}$, $4 \times 10^{-7} \text{ M}$ 和 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 。但在作负离子谱时则需采用更高浓度变化作比较, 这可能是负离子产率较低, 也可能是我们的检测器由于施加了 -2 kV 电压可能降低负离子检测灵敏度。在正负离子激光质谱中, 样品浓度增大, 多聚体离子增加, 可能是由于样品浓度增大, 导致样品分子聚集在一起的几率增加, 使蛋白

质分子在基体分子的固相溶液中就已经聚合形成 2P、3P、4P(P 代表蛋白质分子)等,蛋白质分子之间的聚合体以氢键作用为主,这些多聚体分子同单分子蛋白质一样均匀分布在基体中,这样当样品被激光辐照时,这些多聚体分子仍聚集在一起,就如同一个单个蛋白质分子一样被解吸成气相并与基体分子相互作用。这种随着浓度增加产生多聚体的情况,我们在用小角激光光散射仪观察蛋白质与基体分子溶液结合情况,也发现有此现象(详细情况另文发表)。此外,这种聚合作用不太可能是在气相中进行的,即:



因为这涉及到一个多级反应过程,这在热力学过程中是不利的。

2.2 基体的影响

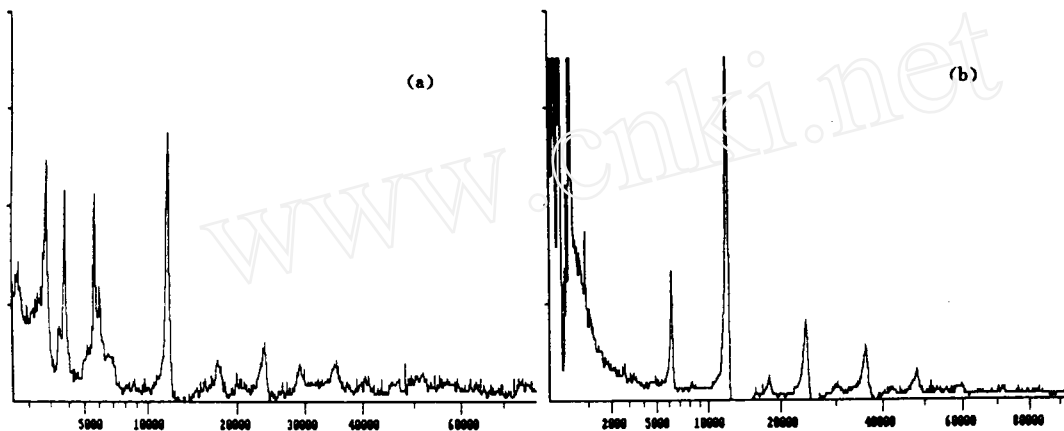
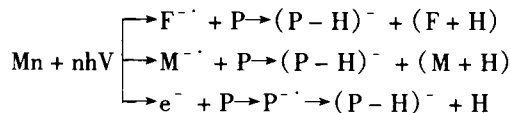


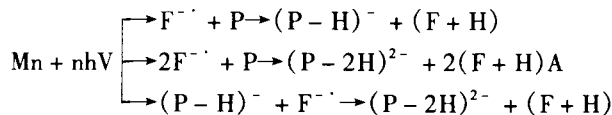
图 2 基体为 α -CHCA 的两种浓度细胞色素 C 的负离子激光质谱图

(a) $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ (b) $1 \times 10^{-5} \text{ M}$

我们以 4HCCA 取代 SA 重复上述实验,结果见图 2-(a)和(b),其浓度分别为 10^{-6} M 和 10^{-5} M 的负离子质谱,从图中可以看出,以 4HCCA 取代 SA 作基体时多电荷离子增加了。这显示在正、负离子激光质谱中,除了浓度影响的因素外,4HCCA 更利于多电荷的产生,这一现象在正离子谱形成的原因分析中⁽¹⁾,我们认为 SA 的质子亲和力 PA(212kcal/mol)大于 4HCCA(201kcal/mol),因此 4HCCA 更易于给出质子使样品形成多电荷离子。但在负离子谱的情况下,如果仍采用上述解释则很明显是无法成立的。我们认为负离子形成过程与正离子是不一样的,即不再是简单的质子(或电子、H)转移反应,反应可能变得更复杂。因为在负离子谱图中,常出现很复杂的碎片峰,正如 Hillenkamp⁽³⁾曾指出的,反应将有可能按下列中的一种或多种同时进行:



4HCCA 作基体,仍有利于多电荷离子的形成,可能是由于 4HCCA 的 α -氨基在激光辐照下极易丢失,从而形成了类似于咖啡酸的自由基碎片离子(从单独的 4HCCA 的激光解吸电离质谱图中可以看到这一碎片离子是基峰),因而十分有利于形成下述反应:



这是一种可能的推断,我们正在深入研究和验证。

2.3 基底的影响

我们根据导电性的不同选用两种基底,一种为导电性极好的银片,另一种为不导电的硝化纤维膜,图 3-(a)和(b)是细胞色素 C 在两种不同基底上的负离子激光质谱。

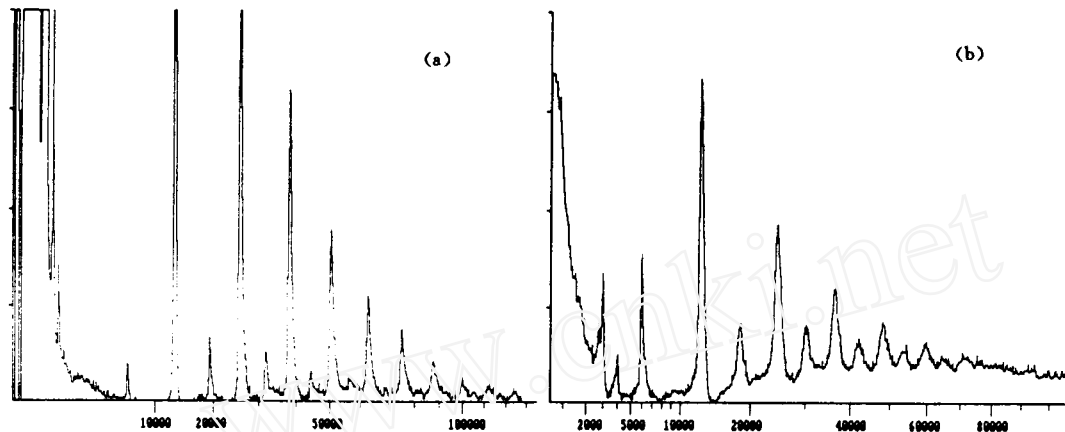


图 3 不同基底细胞色素 C 的负离子激光质谱图(基体为 SA)

(a) 基底为银片 (b) 基底为 NC 膜

两图中的单电荷单体分子离子峰为基峰,以银片做基底时,有多聚体分子离子峰 $[2M + H]^+$ 、 $[3M + H]^+$ 和双电荷单体分子离子峰 $[M + 2H]^{2+}$,但用硝化纤维膜做基底时只有二聚体 $[2M + H]^+$,少了三聚体 $[3M + H]^+$,同时多了一个三电荷二聚体峰 $[2M + 3H]^{3+}$,这说明不导电的硝化纤维膜有利于多电荷单体的产生。同样的现象在分析大分子量的白蛋白($MW = 66000Da$)时更为明显,用银片基底时,其负离子质谱中 $[M + H]^+$ 峰为基峰,没有 $[M + 2H]^{2+}$,而只有 $[2M + H]^+$,但用硝化纤维膜做基底时,出现了多电荷单体的分子离子峰 $[M + 2H]^{2+}$ 、 $[M + 3H]^{3+}$,这一现象与正离子谱是基本相同的。不同基底所造成的谱图的明显差异与基底的导电性有很大关系,银片是电的良好导体,由于激光辐照样品解吸电离,产生大量电荷,这些电荷可通过银片导出,但硝化纤维膜则无此作用,故电荷只能聚集于样品上,从而导致谱图中多电荷强度增加,具体的作用机理尚待研究。

参 考 文 献

- 1 Feng Zhong, Shankai Zhao. Rapid Commun Mass Spectrom, 1855, 3: 230
- 2 赵善楷, 钟峰, 查庆民, 陈东. 分析化学, 1994, 20: 1079
- 3 H Ehring, M Karas, F Hillenkamp. Org Mass Spectrom, 1992, 27: 472

A Study of the Factors Influencing the Formation of Singly Charged Oligomers and Multiply Charged Monomers by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry(II)——Negative Charged Ions

Zhao Shankai* , Zhu Zhihua , Zhong Feng , Cha Qingmin

(Instrumental Analysis & Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Received 1997-05-22

Abstract

By the observation of negative MALDI mass spectra obtained with different concentration of sample solution; different matrices and different substrates, the factors influencing the formation of singly charged oligomers and multiply charged monomers are investigated. The results demonstrate that singly charged oligomers increased with the increase of sample concentration; more multiply charged monomers appeared with the use of nitrocellulose membrane as substrate than that with silver plate. The above results are similar to that observed in positive ion MALDI mass spectra. By the comparison of MALDI mass spectra obtained with the use of α -cyano, 4-hydroxycinnamic acid(4HCCA) and sinapinic acid(SA) as matrix, more multiply charged monomers are found with 4HCCA as matrix. That is also the same as in positive ion spectra. The mechanism of the formation of negative ion spectra mentioned above are discussed.

Key Words: MALDI-MS, negative ions, singly charged oligomers, multiply charged monomers

* The author for correspondence