

二元新基体—8-羟基喹啉/2,5-二羟基苯甲酸在激光解吸/电离飞行时间质谱分析糖蛋白中的应用*

周丽华^{1,2}, 邓慧敏¹

(1. 中山大学测试中心, 广东 广州 510275;
2. 广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510006)

摘要: 采用8-羟基喹啉(8-HQ)、新二元基体8-HQ/2,5-二羟基苯甲酸(DHB)、实验室常用基体3,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸(SA)和DHB对糖蛋白A和糖蛋白B进行基体辅助激光解吸/电离质谱(MALDI-MS)分析。结果发现,虽然单一的8-HQ不能有效电离此两种糖蛋白,但由8-HQ和DHB组成的二元基体在优化的基体配比和合适的点样方式下,能极大地改善单一DHB基体和样品的共结晶状况,成功地解吸/电离糖蛋白样品。应用8-HQ/DHB能够解决常用基体SA及DHB不能分析某些实际糖蛋白样品的问题,为MALDI-MS分析糖蛋白提供新的基体选择。

关键词: 糖蛋白; 二元基体; 8-羟基喹啉; 2,5-二羟基苯甲酸; 激光解吸/电离质谱

中图分类号: O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2008)05-0063-04

糖蛋白是由糖类和蛋白质以共价键连接而构成的糖复合物,广泛存在于动植物、微生物及病毒中,其糖链在各种生命现象中起着细胞转化、信号传导、免疫与应答等重要作用。糖蛋白结构的研究是蛋白质糖组学中的热点之一。而研究糖蛋白结构的首要基础是获知糖蛋白相对分子质量信息。然而,糖蛋白与其它非糖蛋白物质相比较,在测定分析上具有一定的困难。主要原因是^[1-3]: ①糖蛋白结构复杂。与普通蛋白不同,糖蛋白分子结构的不均一性(糖链的微不均一性及糖基化位点的不均一性),往往使糖蛋白样品不是单一相对分子质量样品,而是由蛋白质与不同组成和链长的糖基结合而构成的混合物。②糖蛋白难以分离提取。糖蛋白在生物体内的相对含量较少且糖基化具有不均一性,因此,传统的分离方法一般难以将糖蛋白与大量的非糖蛋白完全分离开来,非糖蛋白物质的存在往往会干扰糖蛋白的分析。

以化学法结合电泳和色谱法,先降解释放多糖然后分离分析多糖和蛋白质、粗略计算糖蛋白相对分子质量的传统方法,虽然在蛋白质糖组学分析中具有普遍性,但由于耗时(几小时到几天)、较难控制反应及分析条件和样品需求量大,并不完全适用于结构复杂尤其是含量极少的天然糖蛋白的分析。20世纪80年代后,MALDI软电离方法的出

现,使得对糖蛋白相对分子质量及其结构的分析可以摆脱传统的降解-分离-分析方式,实现直接、快速的质谱测定分析。MALDI-MS具有灵敏快捷、直观准确、极高的质量上限、良好的“软电离”性质(产生的分子离子十分稳定,不易裂解)、对杂质的包容性及可直接分析混合物而无需预分离的特点,已成为蛋白质糖组学研究中不可缺少的分析方法之一,并已显示出强大的潜力和应用前景^[4-5]。然而,糖蛋白复杂的结构以及难分离提取的因素,使MALDI-MS分析糖蛋白与非糖基化的蛋白相比,具有一定的困难。如与普通蛋白质的质谱峰相比,糖蛋白分子的质谱峰变宽,灵敏度有很大程度的下降,有时甚至检测不到样品信号;直接测定相对分子质量大于40 000的复杂糖蛋白还存在困难。目前,能提高MALDI-MS测定糖蛋白的解吸/电离效率、质谱分辨率、灵敏度、测定的重复性以及能扩大质量检测范围的可行方法之一,就是针对不同的样品,选取不同的基体进行辅助解吸/电离。目前,文献报道已用于有效分析糖蛋白的一元基体有 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CCA)^[6]、2,5-二羟基苯甲酸(DHB)^[6]、3,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸(SA)、2,6-二羟基苯乙酮(DHAP)^[7]、2-(4-羟基苯偶氮基)-苯甲酸(HABA)^[8]、2,4,6-三羟基苯乙酮(THAP)^[9-10]、3-羟基吡啶甲酸(3-

* 收稿日期: 2008-04-16

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(990209); 广东工业大学博士启动基金资助项目(073009)

作者简介: 周丽华(1978年生),女,讲师; 通讯联系人: 邓慧敏; E-mail: denghm@mail.sysu.edu.cn

HPA)^[11]等。通常,分析相对分子质量低于 5 000 的糖蛋白时,选择 CCA 或 DHB^[6];分析相对分子质量高于 5 000 的糖肽和糖蛋白时,选用 HABA、SA、DHAP 和 3-HPA^[7,11];而测定更高相对分子质量糖蛋白时,则选用 THAP^[9]。由于多元基体不仅能够充分发挥其中各基体成分的优点,而且通过优化各组分的配比,还可以克服单一固相或液相基体的缺点,多元基体的采用已成为改善 MALDI 一元基体分析效果的重要手段。目前,测定糖类相关物质的多元基体大多由 DHB 与其它化合物组成。通过在 DHB 中加入少量其它物质组成的混合基体可以提高样品结晶的均匀,增强质谱信号、提高分辨率和灵敏度。文献报道用于测定糖蛋白的多元基体有以摩尔比为 9:1 的 DHB/5-甲氧基水杨酸(MSA)组成的超 DHB (sDHB)^[11]等。

虽然上述基体的出现在一定程度上、一定范围内解决了某些糖蛋白样品的 MALDI-MS 分析问题。但由于 MALDI-MS 基体的选择和优化现在尚没有完全成熟的理论指导,合适基体的选择在很大程度上仍需依赖于实验探索。并且从多个文献报道实例来看,对不同的样品或以不同方式制样的同一样品都有可能需要使用不同的基体。因此,研究发现新基体以适用于各种不同糖蛋白的 MALDI-MS 测定分析十分必要。

本研究采用实验室常用基体 SA 和 DHB 以及未用于糖蛋白测定的基体 8-羟基喹啉(8-HQ)和新的二元基体 8-HQ/DHB,分别对天然提取动物糖蛋白 A 和基因工程药物糖蛋白 B 进行了分析测定。通过比较分析发现,虽然单一 8-HQ 不能用于此两种糖蛋白的分析,但由 8-HQ 和 DHB 组成的二元基体在优化的基体配比和合适的点样方式下,能够成功地解吸/电离糖蛋白样品,解决常用基体 SA 及 DHB 不能分析某些实际糖蛋白样品的问题。二元基体 8-HQ/DHB 可为 MALDI-MS 分析糖蛋白提供新的基体选择。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

REFLEX™ III 型 MALDI-TOF 质谱仪(Bruker 公司,德国)。氮激光器,激光波长 337 nm,脉冲 2 ns。加速电压、反射器和检测器电压分别 20、23 和 1.55 kV,采用正离子反射和线性检测模式;谱图累加激光点 40~100 个;

基体:8-羟基喹啉(8-HQ)、3,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸(SA)、2,5-二羟基苯甲酸(DHB)、购自 Aldrich 公司(美国)。

糖蛋白样品:糖蛋白 A 为天然提取的动物糖蛋白,糖蛋白 B 为基因工程药物糖蛋白,2 种糖蛋白均来自白云山医药集团基因药物公司。

1.2 样品和基体的配制及进样操作

样品的配制:糖蛋白样品用 $\varphi = 0.1\%$ 三氟乙酸配成约 10^{-5} mol/L 水溶液。

基体的配制:8-HQ、SA、DHB 用水溶液与乙腈混合溶剂配成 0.1 mol/L 溶液,8-HQ/DHB 二元基体按体积比 3:1,2:1,1:1,1:2 和 1:3 配制。

滴液干燥法:取等体积的基体和分析物溶液混合均匀,将 0.5 μ L 的混合液滴于样品靶上,室温晾干后,送入离子源进行测定。

2 结果与讨论

2.1 不同基体测定糖蛋白的结果比较

分别采用 8-HQ、二元基体 8-HQ/DHB、SA 和 DHB 分析了天然提取的动物糖蛋白 A 和基因工程药物糖蛋白 B,并从检测样品离子峰的难易程度、所获离子峰的信噪比和解吸电离样品所需的激光强度三个方面考察了上述基体分析糖蛋白 A 和 B 的效果,结果列于表 1,表中“*”数目越多,表明对应的基体能以较低的激光能量得到相对高的分子离子峰,使用效果越好。

从表 1 结果可知,文献报道常用来测定相对分子质量较小糖蛋白的 DHB,在本研究中则是对相对分子质量较大的糖蛋白 B 取得了好的分析结果,但对相对分子质量较小的糖蛋白 A 却无效;同样,常用来分析相对分子质量较大糖蛋白的 SA,并不是都能很好的解吸/电离相对分子质量较大糖蛋白样品。单一的 8-HQ 并不能有效测定糖蛋白 A 和糖蛋白 B,但使用 8-HQ 与 DHB 组成的二元基体 8-HQ/DHB 测定糖蛋白 A 和 B 取得了良好的效果。糖蛋白 A 和 B 的结构不同可能是导致不同基体测定结果不同的主要原因。8-HQ/DHB 二元新基体能够解决常用基体 SA 和 DHB 不能测定糖蛋白 A 的问题,并且对糖蛋白 B 的测定效果也优于常用基体 SA,表明可为 MALDI-TOF MS 测定复杂的糖蛋白提供新的基体选择。

表 1 不同基体测定糖蛋白的结果¹⁾

Tab. 1 The MALDI MS results of glycoproteins determined by different matrices

糖蛋白	相对分子质量/ 10^5	SA	DHB	8-HQ	8-HQ/DHB (1:1)	8-HQ/DHB (1:3)
A	2~5	-	-	-	**	*
B	~9	*	***	-	*	**

1) “***” “**”、“*”、“-”、分别表示好、较好、一般和无效。

2.2 8-HQ/DHB 配比对测定结果的影响

对配比分别为 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 和 1:3 的 5 种二元基体 8-HQ/DHB 分析糖蛋白的作用效果的研究发现:①基体的配比对基体效果有较大的影响。实验结果表明,无论从样品结晶的均匀度、解吸样品所需激光强度、获得谱图峰的强度及测定样品的重复性等方面考察,配比为 1:1 及 1:3 的 8-HQ/DHB 在测定糖蛋白 A 及糖蛋白 B 时,效果均好于其他配比。②对于 DHB 无法解吸电离的糖蛋白 A,采用 DHB 比例高的 8-HQ/DHB (1:3) 的分析效果也不理想。而采用 DHB 比例低的 8-HQ/DHB (1:1) 则效果有所改善。这说明 8-HQ/DHB 中 8-HQ 比例的增高,可能改变了基体分子与糖蛋白 A 在结晶过程中的结合状况,降低了解吸/电离糖蛋白 A 时破坏晶格所需的激光能量^[12];③对于 DHB 能够有效解吸电离的糖蛋白 B,使用 DHB 比例高的 8-HQ/DHB (1:3),则效果明显比 8-HQ/DHB (1:1) 好,使用单一 DHB 与 8-HQ/DHB (1:3) 获得的糖蛋白 B 谱图差别较小,前者解吸电离样品所需的激光能量稍低一点,在 DHB 中加入 8-HQ 的主要作用是改善单一 DHB 与分析物的结晶形态,提高测定结果的重现性。单一 8-HQ 或 DHB 与样品混合干燥后均形成长针状结晶,但是在测定糖蛋白 B 时,8-HQ/DHB (1:3) 二元新基体与样品则形成极细小的均匀结晶,测定时样品出峰变得容易,且不同采样点之间的出峰差异也大大降低,增加了测定结果的可信度。此外,实验中还观察到,8-HQ/DHB (1:1) 的基体与相对分子质量较小的糖蛋白样品形成的结晶比与相对分子质量较大糖蛋白样品的结晶均匀,而 8-HQ/DHB (1:3) 的基体情况正好相反。从实验结果可知,DHB 比例高和比例低的两种 8-HQ/DHB 基体分别适合于较大和较小糖蛋白的 MALDI-TOF MS 测定。由表 1 结果可知,8-HQ/DHB (1:1) 不仅更适用于质量较低的糖蛋白 A,而且使用效果明显优于常用基体 SA 和 DHB,后两者都无法使糖蛋白 A 产生质谱信号。

2.3 制样方法对 8-HQ/DHB 基体效果的影响

在 MALDI-MS 分析中,制样方法往往对测定效果能产生很大的影响。一般采用 DHB 为基体测定糖蛋白时,以滴液干燥法制样效果最好^[6]。本研究在考察制样方法对 8-HQ/DHB 二元基体使用效果的影响时,采用了两种方法:基体-样品-基体即三明治法和滴液干燥法。与单一 DHB 相似,8-HQ/DHB 采用滴液干燥法制样时,靶上样品结晶的均匀度、质谱信号的强度以及测定的重复性都明

显优于三明治法。DHB 及 8-HQ/DHB 更适宜滴液干燥法的可能原因是,这些基体分子与样品分子混合后,有更长的时间通过分子的运动相互渗透,在溶剂蒸发干燥的过程中,同步结晶,从而改善样品点结晶状况,提高样品的解吸/电离效率。

2.4 糖蛋白谱图分析

图 1a 是以 8-HQ/DHB (1:1) 为基体测定得到的糖蛋白 A 的质谱图,图中出现 5 个质谱峰 m/z 分别为 22 710、24 927、28 927、29 505 和 32 665。从样品提供者所给样品信息(相对分子质量大概范围)及谱图中峰的相对强度来判断,以 m/z 28 927、29 505 和 32 665 为此糖蛋白的主要成分。其他两个峰是否是糖蛋白 A 的成分,还需结合其他分析方法来进一步确认。图 1b 是以 8-HQ/DHB (1:3) 测定糖蛋白 B 得到的质谱图。图中出现的 3 个质谱峰分别是 m/z 44 271、51 756 和 89 564,其中 m/z 89 564 为样品的主要成分, m/z 44 271 则可能是 m/z 89 564 的双电荷离子峰。在 MALDI-MS 测定中,多电荷峰的出现可以辅助确证分子离子峰和样品的相对分子质量。从图 1 糖蛋白谱图可以看出,由不均一糖链引起质量不均一的糖蛋白样品的质谱峰宽且峰强度低。

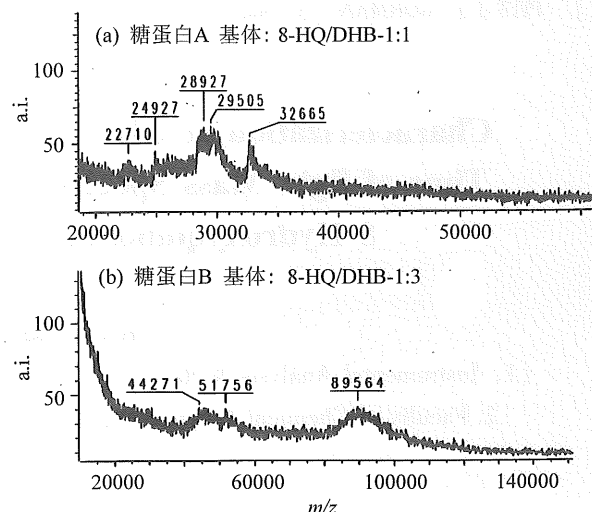


图 1 糖蛋白的正离子线性 MALDI-TOF MS 图

Fig. 1 Positive-ion MALDI TOF mass spectra of (a) glycoprotein A with 8-HQ/DHB (1:1) as matrix and (b) glycoprotein B with 8-HQ/DHB (1:3) as matrix in the linear mode

参考文献:

- [1] DELL A, MORRIS H. Glycoprotein structure determination by mass spectrometry [J]. Science, 2001, 291 (5512):2351-2356.

- [2] HIRABAYASHI J, HASHIDATE T, KASAI K. Glyco-catch method: A lectin affinity technique for glycoproteomics[J]. *J. Biomol Tech*, 2002, 13: 205 - 218.
- [3] 代景泉, 蔡耘, 钱小红. 蛋白质糖基化分析方法及其在蛋白质组学中的应用[J]. *生物技术通讯*, 2005, 16(3): 287 - 292.
- DAI Jingquan, CAI Yun, QIAN Xiaohong. Progress in methods of glycosylation analysis and its related application in proteomics [J]. *Letters in Biotechnology*, 2005, 16(3): 287 - 292.
- [4] 任凤霞, 赵毅民. 基体辅助激光解吸 - 电离质谱在糖复合物分析中的应用进展[J]. *解放军药学报*, 2003, 19(5): 363 - 366.
- REN Fengxia, ZHAO Yimin. Development of saccharide complexes analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. *Pharm J Chin PLA*, 2003, 19(5): 363 - 366.
- [5] HARVEY D J. matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 1999, 18: 349 - 451.
- [6] KUSSMANN M, NORDHOFF E, REHBK-NIELSEN H, et al. Matrixassisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes[J]. *J Mass Spectrom*, 1997, 32: 593 - 601.
- [7] PITT J J, GORMAN J J. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of sialylated glycopeptides and proteins using 2, 6-dihydroxyacetophenone as a matrix [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1996, 10(4): 1786 - 1791.
- [8] JUHASZ P, COSTELLO C E, BIEMANN K. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry with 2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid matrix [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1993, 4: 399 - 409.
- [9] SOTTANI C, FIORENTINO M, MINOIA C. Matrix performance in matrix-assisted laser desorption/ionization for molecular weight determination in sialyl and non-sialyl oligosaccharide proteins [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1997, 11(8): 907 - 913.
- [10] HARVEY D J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates and glycoconjugates[J]. *Int J Mass Spectrom*, 2003, 226(1): 1 - 35.
- [11] TSARBOPOULOS A, PRAMANIK B N, KARAS M, et al. Factors affecting the choice of matrix in matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of glycoproteins [J]. *J Mass Spectrom/Rapid Commun Mass Spectrom*, 1995: S207 - S209.
- [12] GUSEV A I, WILKOMSON W R. Improvement of signal reproducibility and matrix/comatrix effects in MALDI analysis [J]. *Anal Chem*, 1995, 67(6): 1034 - 1041.

Characterization of Glycoprotein by Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry with a Novel Binary Matrix of 8-Hydroxyquinoline/2, 5-Dihydroxybenzoic Acid

ZHOU Li-hua^{1, 2}, DENG Hui-min¹

(1. Instrumental Analysis & Research Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: 8-hydroxyquinoline (8-HQ), a novel binary matrix of 8-HQ/ 2, 5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and two common matrices of sinapinic acid (SA) and 2, 5-dihydroxybenzoic acid (DHB) were used for characterization of glycoprotein A and B by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). The results showed the novel binary matrix of 8-HQ/ DHB was superior to the other matrixes for glycoprotein A and B with the optimal matrix volume ratio and the optimal sample preparation method. Though 8-HQ was a poor matrix for glycoprotein A and B, its presence in the DHB caused much finer crystals to form and higher the sample-to-sample reproducibility and signal-to-noise ratio than DHB used alone. More effective matrix can be chosen for glycoprotein analysis by MALDI-MS using the novel binary matrix of 8-HQ/ DHB.

Key words: glycoprotein; binary matrix; 8-hydroxyquinoline; 2, 5-dihydroxybenzoic acid; laser desorption/ionization mass spectrometry