

MALDI TOF MS 测定多肽和蛋白质混合物的可行性研究^{*}

张珍英, 邓慧敏, 黎 军, 邓芹英, 赵善楷

(中山大学测试中心, 广东 广州510275)

摘 要:考察了基体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-TOF MS)测定多肽和蛋白质混合物的可行性。实验结果表明: MALDI-TOF MS 能快速地同时提供多肽和蛋白质混合物中各组分的准确相对分子质量。对于相对分子质量较小的多肽混合物, 采用反射模式, 多肽组分分子离子峰 $M+H^+$ 的各同位素峰清楚地区别开来, 达到了基线分离水平。对于5种相对分子质量在1 046.54~66 431.00范围内的多肽和蛋白质混合物, 采用线性检测模式, MALDI-TOF MS 同样能够检测到各组分的分子离子。

关键词: MALDI-TOF MS; 蛋白质; 分析; 可行性

中图分类号: O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 06-0122-03

对多肽和蛋白质混合物各组分的分子量测定中, 多肽和蛋白质的分离不仅费时、费力, 且技术性强。而且测定多肽和蛋白质分子量的传统方法十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对于性质和相对分子质量相近的多肽和蛋白质不能有效的分离, 从而难以准确测定其相对分子质量^[1]。MALDI-TOF MS 是德国科学家 Karas 等^[2]于1988年首创的一种“软”电离技术, 具有高的灵敏度和分辨率, 强的抗污染等优点, 使得该方法可以不需要对多肽和蛋白质混合物进行分离, 就能快速、准确地同时测定每个多肽和蛋白质组分的相对分子质量。MALDI-TOF MS 在多肽和蛋白质混合物的分析方面具有突出优点, 具有重要实际应用价值。

1 实验部分

1.1 仪器及参数 德国 Bruker 公司生产的 REFLEX II型基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪; 氮气激光器, 激光波长 337 nm; 采用反射、线性检测。

1.2 试剂及进样操作

(1) 试剂及配制。

Angiotensin II、Angiotensin I、Substance P 和 Bombesin (购自 Sigma 公司) 分别用 $\varphi=0.1\%$ 的三氟乙酸溶液配制成 10^{-5} mol/L 溶液。Angiotensin II、Insulin、Cytochrome C、Trypsin (购自 Sigma 公司) 和 Bovine Serum Albumin (美国 Molecular Biosystems 公司产品) 分别用 $\varphi=0.1\%$ 的三氟乙酸溶液配制成 10^{-4} mol/L 溶液。 α -胍基-4-羟基肉桂酸(4HCC-

CA) (购自 Adrich Chem Company Ins 公司) 用 $\varphi=0.1\%$ 的三氟乙酸溶液和乙腈体积比为 2:1 的混合液配制成饱和溶液。其它试剂均为国产 AR 级, 水为二次蒸馏水。

(2) 进样操作。

样品 1: 取已配好的 Angiotensin II、Angiotensin I、Substance P 和 Bombesin 溶液各 1 μ L 与 4 μ L 的 4 HCCA 基体溶液混合均匀, 取 1 μ L 混合液滴加到样品台上, 室温干燥后, 将样品台送入离子源进行测定。

样品 2: 取已配好的 Angiotensin II、Insulin、Cytochrome C、Trypsin 和 Bovine Serum Albumin 溶液各 1 μ L 与 5 μ L 的 4 HCCA 基体溶液混合均匀, 取 1 μ L 混合液滴加到样品台上, 室温干燥后, 将样品台送入离子源进行测定。

2 结果与讨论

2.1 样品 1 和样品 2 的 MALDI-TOF MS 谱图分析

图 1 是样品 1 的 MALDI-TOF MS 反射检测图。在图 1 中, 样品 1 的各多肽组分分子离子峰均被观察到, 它们分别是 Angiotensin II ($M+H^+$, $M_w=1\ 046.5$)、Angiotensin I ($M+H^+$, $M_w=1\ 296.7$)、Substance P ($M+H^+$, $M_w=1\ 347.7$) 和 Bombesin ($M+H^+$, $M_w=1\ 619.8$)。并且各多肽分子离子峰都能区别开来。它们的分辨率和信噪比 S/N 分别为: Angiotensin II, 6 980.9 和 69.8 ($m/z\ 1\ 046.5$), Angiotensin I, 9 354.7 和 144.3 ($m/z\ 1\ 296.7$), Substance P, 10 375.6 和 641.7 ($m/z\ 1\ 347.7$) 和

^{*} 收稿日期: 2002-06-14

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (990209)

作者简介: 张珍英 (1977年生) 女, 在读博士生; 通讯联系人: 邓慧敏; E-mail: ceswuq@zsu.edu.cn

Bombesin, 11 425. 0 和 74. 7 (m/z 1 619. 8)。图 2 是图 1 中 Angiotensin II、Angiotensin I、Substance P 和 Bombesin 分子离子峰的放大图。由图 2 可见, 组成各多肽组分分子离子峰的同位素峰都清楚地区别开来, 达到基线分离水平, 高分辨测定多肽和蛋白质混合物中各多肽和蛋白质组分对于分析这些生物大分子具有重要意义。图 1 中的其它离子峰为多肽的 $M+Na^+$ 和 $M+K^+$ 加成峰。综上所述, MALDI-TOF MS 法是测定多肽混合物的理想方法。

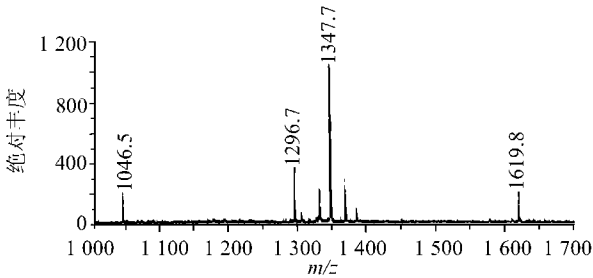


图 1 样品 1 的 MALDI-TOF MS 图 (反射检测)
Fig 1 MALDI-TOF mass spectrum of sample 1
(with reflex mode)

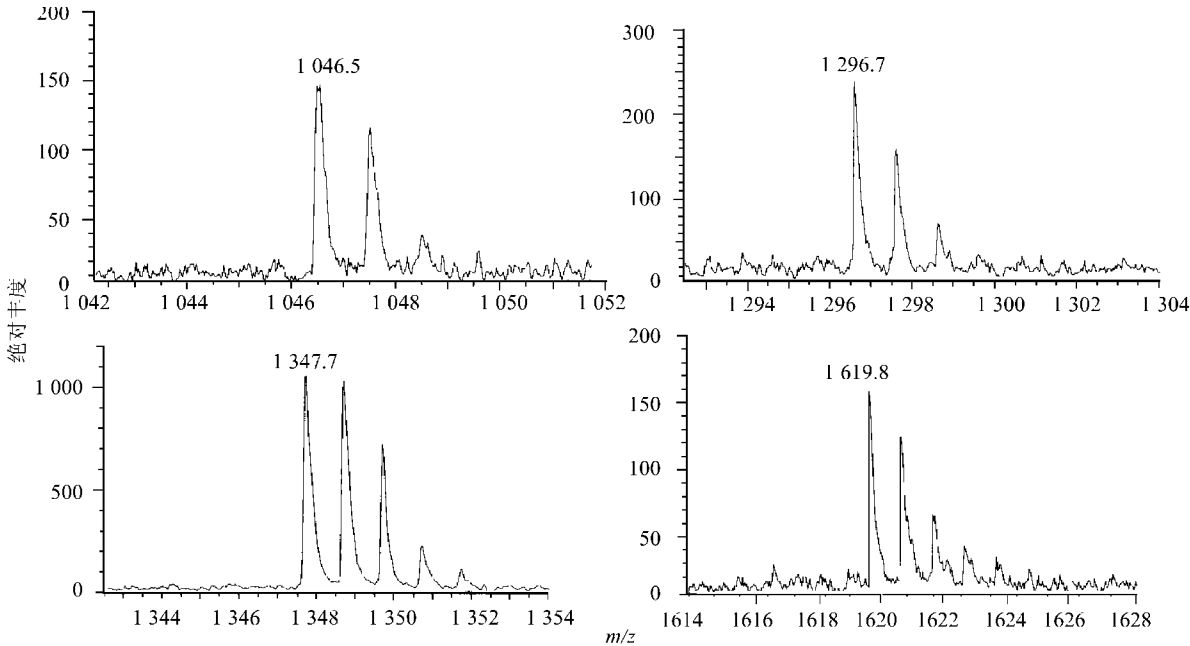


图 2 图 1 中 4 个多肽组分分子离子峰的放大图
Fig 2 The magnified molecular ion peaks of four peptides in Fig 1

图 3 为样品 2 的 MALDI-TOF MS 线性检测图。在图 3 中, 5 种多肽和蛋白质组分的分子离子峰分别是: 峰 1 为 Angiotensin II 分子离子峰 $M+H^+$ ($M_w=1\ 046.5$, 绝对丰度为 7 500), 峰 2 为 Insulin 分子离子峰 $M+H^+$ ($M_w=5\ 730.6$, 绝对丰度为 2 200), 峰 3 为 Cytochrome C 分子离子峰 $M+H^+$ ($M_w=12\ 361.1$, 绝对丰度为 510), 峰 7 为 Trypsin 分子离子峰 $M+H^+$ ($M_w=23\ 312$, 绝对丰度为 65) 和峰 10 为 Bovine Serum Albumin $M+H^+$ ($M_w=66\ 431.00$, 绝对丰度为 70)。由图 3 可见, 随着相对分子质量的增大, 多肽和蛋白质的分子离子峰丰度迅速降低, 这是较高 M_w 的分子离子本身较难被检测器检测到和较低 M_w 的离子对较高 M_w 的离子有抑制作用的结果。虽然 M_w 较大的样品质谱峰的强度大大减小, 但在其放大图中, 每 1 个峰都清楚地分辨开, 能够确定其准确 M_w 和相关信息。在图 3

中还可观察到多肽和蛋白质的单电荷多聚体峰、多电荷单体峰和不同蛋白质加成离子峰: 峰 4 为 Bovine Serum Albumin 的 $M+4H^{++}$, 峰 5 为 Insulin 与 Cytochrome C 的加成离子峰, 峰 6 为 Bovine Serum Albumin 的 $M+3H^{++}$ 峰, 8 为 Cytochrome C 的 $2M+H^{++}$, 峰 9 为 Bovine Serum Albumin 的 $M+2H^{++}$ 。

2.2 反射模式和线性模式的选择及作用 MALDI-TOF MS 法中, 一般可以采用反射检测和线性检测 2 种模式检测各种离子。在反射检测模式下, 谱图分辨率高, 但灵敏度较低, 对于 $M_w<5\ 000$ 和离子丰度较大的样品, 可以选择反射检测模式, 高分辨率的谱图可以给出更准确的相对分子质量和提供更多的结构信息^[3]。所以本文对样品 1 测定时, 采用反射检测模式提高谱图的分辨率; 线性检测模式与反射检测模式相比, 谱图分辨率较低, 但灵敏度大大提高。所以线性检测模式适合于 M_w 较大或离子

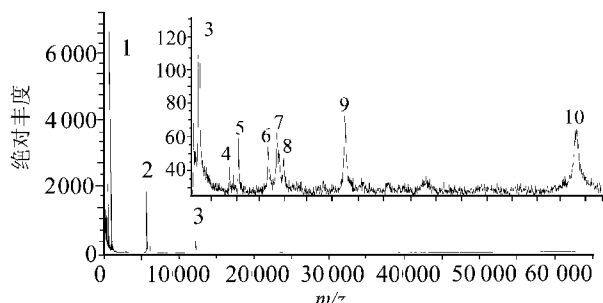


图 3 样品 2 的 MALDI-TOF MS 图 (线性检测)

Fig 3 MALDI-TOF mass spectrum of sample 2
(with liner mode)

丰度较小的样品。本文样品 2 由于多肽和蛋白质组分的 M_w 范围在 1 046 ~ 66 431 范围内, 其中, trypsin、Bovine Serum Albumin 的 M_w 较大, 较难出峰, 只有在线性模式下才能检测到其分子离子。

3 结 论

MALDI-TOF MS 这种“软”电离技术, 快速、灵敏、准确和样品用量少等优点使得它迅速发展为实验室分析多肽和蛋白质的常规方法。MALDI-TOF MS 法是直接测定多肽和蛋白质混合物的一个可行方法, 具有不用分离组分的优点, 大大简便了多肽和蛋白质分析的操作步骤和缩短了分析时间。

参考文献:

- [1] NOKIHARA K. Procedures leading to primary structure determination of proteins in complex mixtures by gel electrophoresis and modern micro-scale analysis[J]. Anal Chem Acta, 1998, 372(1-2): 21-32.
- [2] KARAS M, HILLENKAMP F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 Daltons[J]. Anal Chem, 1988, 60: 2299-2301.
- [3] 袁湘林, 邹汉法, 汪海林, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱用于寡糖的分析[J]. 分析化学, 1999, 27(7): 786-789.

Study on Possibility of Analysis of Mixtures of Peptides and Proteins by Matrix assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry

ZHANG Zhen ying, DENG Hui min, LI Jun, DENG Qin ying, ZHAO Shan kai

(Instrumental Analysis & Research Center,

Sun Yat-sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The possibility of analysis of peptides and proteins mixtures by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was studied. The results showed that this method can detect molecular ions of the peptides and proteins in the mixed samples. Under reflex mode, isotope peaks of molecular ion peaks for all peptides were clearly discriminated on the base line level. Under liner mode, molecular ions of mixed peptides and proteins also were detected and distinguished clearly.

Key words: matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; protein; analysis; possibility