

大分子蛋白质激光解吸质谱学研究

赵善楷

(测试中心)

摘 要

介绍可分析分子量高达100,000道尔顿大分子蛋白质的激光解吸质谱新方法,给出各类蛋白质的激光解吸质谱图例,并论述其特点。使用新方法可以快速(约10min)、准确(分子量测量准确度为0.1~0.2%)、高灵敏度(可分析少至 5×10^{-15} mol样品)测定蛋白质及其亚基分子量。还讨论了使用液相基体帮助激光解吸的特点和机理。

关键词 激光解吸, 质谱, 蛋白质, 液相基体, 分子量测定

对分子量在10,000道尔顿以上蛋白质作质谱分析,还只是近两三年才见报道^[1~4]。最新的进展是 Hillenkamp 及其研究小组^[3,4]成功地以尼古丁酸帮助激光解吸质谱法只用单个脉冲即可取得分子量高达66,000道尔顿白蛋白的质谱全图,而通过多个激光脉冲累加已获得了分子量高达274,000道尔顿的刀豆脲酶的多亚基全谱图。这一方法还具有很低检测限,达到 5×10^{-14} mol的水平,显示了激光解吸质谱法(LD-MS)对大分子物质的分析的惊人潜力,是质谱学应用于大分子有机物分析的重大突破。

本文介绍作者的帮助激光解吸电离大分子蛋白质的新方法,应用这一方法已成功地分析了分子量高达100,000道尔顿的多种类型的蛋白质,并达到了比使用尼古丁酸基质法低一个数量级的检测限,即达 5×10^{-15} mol的水平。文中还介绍这一新方法的有关机理。

1 实验部分

1.1 仪器

所使用仪器是LAMMA-1000型激光微探针质量分析仪。仪器所用激光源是经Q调及四倍频的掺钕、钇铝石榴石激光器,并带有一套光学衰减片及聚焦显微观察系统。其主要参量为:激光波长:265nm;重复频率:1Hz;脉冲宽度:15nsec;激光能量:80mJ;最小束斑直径:3 μ m。仪器采用反射式飞行时间质谱计。飞行管总长度为1.8m。离子引出电压为3kV。使用17级打拿极电子倍增管作离子检测器,并在其前端加有一20kV的后加速电压转换电极,这是为了在分析大分子物质时进一步提高仪器灵敏度。数据采集系统采用100MHz瞬态记录仪,并配有数据处理和显示的微机系统及相应软件。

1.2 材料

所用材料皆购自美Sigma公司。使用前未作任何处理。

本文1989年12月9日收到

蛋白质样品均配制成 $1 \times 10^{-4} \text{ mol}$ 浓度水溶液以供使用。用作液相基体的3-硝基苄醇(AR)与甲醇(cp)及双蒸馏水以体积比2:3:1配成溶液使用。用作基底物的细纤维棉纸使用前经煮沸双蒸馏水洗涤3次后烘干并保存在干燥瓶内待用。

1.3 实验方法

滴加 $0.5 \mu\text{l}$ 3-硝基苄醇溶液于约 1 mm^2 棉纸片上,再滴加 $0.5 \mu\text{l}$ 待分析蛋白质样品于其上。然后用双面胶纸把棉纸固定于样品架上并放入离子源室内,抽真空至约 $5 \times 10^{-6} \text{ Torr}$ 时即可进行激光解吸分析。通常激光束需稍微散焦至所加到样品上的激光功率密度约为 $2 \times 10^7 \text{ W/cm}^2$ 。

2 结果与讨论

图1是使用上述方法对各类蛋白质进行激光解吸质谱分析的质谱图例,所用蛋白质样品分别为:胰岛素($MW = 5,759$),细胞色素C($MW = 12,384$),胰蛋白酶($MW = 24,000$),白蛋白($MW = 66,000$),磷酸化酶($MW = 97500$)。上述谱图虽只采集单个激光脉冲所得的数据,但高质量数的分子离子和多聚体离子已经清晰可见,例如图1d白蛋白的三聚体离子($3M^+$)其质量数已达198,000。这些大分子蛋白质激光解吸质谱图与其他电离技术所获得质谱主要区别是:基体物质与碎片离子峰只出现在谱图前端1,000质量数以下,但却突出表现其分子离子峰,多聚体离子峰及多电荷离子峰。此外,在这些峰间并没有出现其氨基酸顺序的碎片离子峰。在绝大多数情况下分子离子峰强度都占优势。这一以分子离子峰为主并同时出现多聚体离子峰及多电荷离子峰的特点对正确判断及准确测量蛋白质样品的分子量是十分有利的。由于仪器分辨率不高(约1000),以及估计由于亚稳离子的存在等原因,所展示分子离子峰形较宽,测得分辨率在50左右。但通过峰中心值的计算以及用已知质量数离子(如Na、K及基体分子离子或基峰碎片)进行质量校正,所测得的分子量值与已知值比较,其绝对误差为0.1~0.2%。

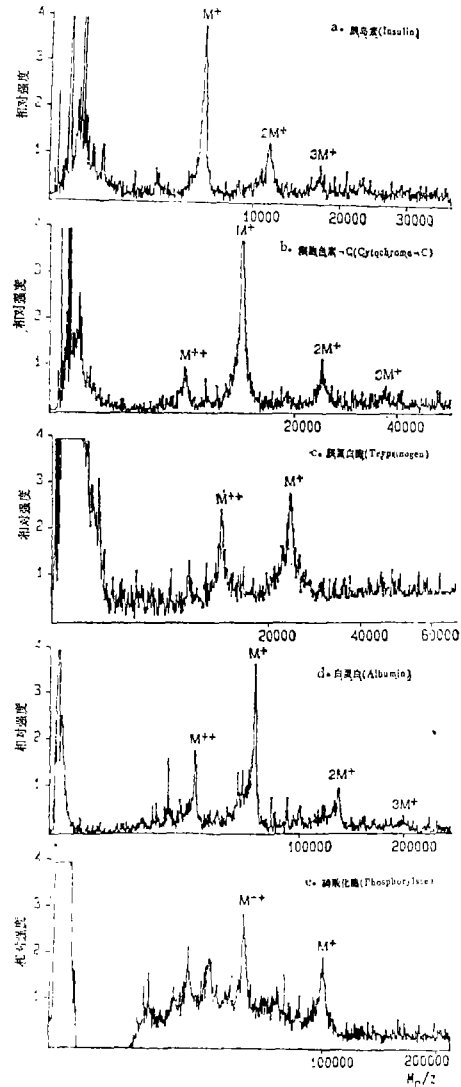


图1 5种蛋白质样品的激光解吸质谱图
Fig.1 LD mass spectra of 5 samples of proteins

此外,在分析大分子蛋白质时,由于仪器设置在高灵敏度档次,因此单脉冲谱图显示很高噪音,但这些随机出现噪音,可以通过多脉冲累加取样方法平均化而使谱线平滑,如图2b所示,有利于提高分子量测量准确度。

从图2不仅可见经累加后噪音已基本被平滑化,更重要是表现出如下事实:即激光束在样品同一位置上取样多达100次,每一脉冲取样所得谱图都基本不变。这是采用液相基体帮助激光解吸特有现象,是蛋白质样品分子在流动液相基体上及时补充的结果。但在采用固体基体时,至多只能在同一位置上取样20~30次,且每一脉冲取样所得谱图往往变化较大。因此,用液相基体帮助激光解吸这一新方法具有极好的重复性和更高的灵敏度。作者使用这一方法对不同蛋白质进行了分析检测限研究,目前已获得样品量少至 $5 \times 10^{-15} \text{mol}$ (即 $0.5 \mu\text{l} 1 \times 10^{-8} \text{mol}$ 浓度样品溶液)的白蛋白($MW = 66,000$)的单脉冲激光解吸谱图。这比已有文献报导检测限低一个数量级。

3 关于激光解吸的机理

由于激光源种类的多样性及其参量可变性大,激光离子源比任何其他种类离子源具有更广阔应用范围和多种工作机理。例如当激光功率密度高达约 $10^9 \text{W}/\text{cm}^2$ 时,其所辐照固体样品产生高温等离子体,从而能实现固体物质的元素组份及痕量杂质分析。当功率密度降至约 $10^7 \text{W}/\text{cm}^2$ 时能对各类型有机物实行解吸电离。但这种解吸分析机理正如Hillenkamp所指出的^[5,6],迄今还没有单一,完整理论模型可予以解释。它因所采用不同激光参量,如波长,束斑,工作状态(连续或脉冲),脉冲宽度,基体物质,以至被分析物的物理化学性质等而有所区别。例如使用波长为 $10.6 \mu\text{m}$ 的连续或脉冲较宽的激光源时,样品解吸电离过程主要受热力学平衡过程所支配。但如使用 266nm 波长紫外激光源时有机物解吸电离则多受样品分子共振或非共振吸收能量过程所支配。又例如所分析样品为有机胺盐一类有机物时,气相离子的形成只是简单地由于激光导致样品的热蒸发。而大分子蛋白质的激光解吸则完全是不同的工作机理在起作用。其解吸过程是能量聚集作用和非热力学平衡的过程。按Hillenkamp^[4]的设想,是由于激光辐照样品表面层众多的基体分子和样品分子而使其解聚喷发出来而形成微小粒子和分子簇,其所携带蛋白

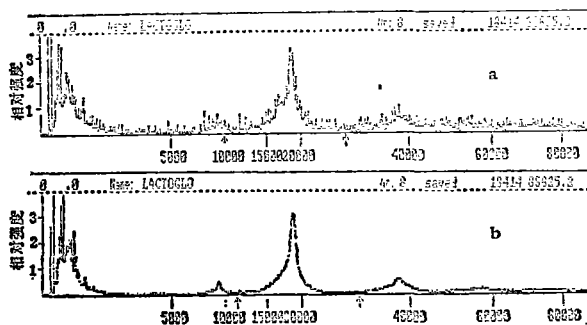


图2 a. β -乳球蛋白在激光辐照同一样品位置第100次所得单脉冲激光解吸质谱图
b. β -乳球蛋白的100次脉冲数据累加所得激光解吸质谱图

Fig. 2 a. LD spectrum of β -lactoglobulin obtained at 100th laser shot at the same spot on the sample
b. LD spectrum of β -lactoglobulin with 100 laser shots accumulation

质分子和电荷随机分布,并最终由于基体分子的脱落并同时带走部份多余内能而最后形成被检测出的离子(分子离子,多聚体离子及多电荷离子)。这一机理与PD-MS和FAB-MS解吸机理相同,只是施加于单位容积样品的能量有所不同而已。但这一认识还有待深化。大分子有机物的激光解吸之不同于质量数只有1000~2000的小分子,是在于必须借助于大量基体分子的解吸(在使用尼克丁酸固体基体时,其基体分子为样品分子的百倍。使用3-硝基苄醇液相基体时则高达万倍)。不仅如此,样品分子越是能均匀分散在基体分子中,则解吸效率越高。反之,甚至会导致失败。单纯采用液相基体物效果不好,而在加入适量溶剂并用细纤维棉纸作为基体后,效果之所以能显著提高,就是因为样品分子能均匀分散在液相基体表面。

作者感谢美国匹兹堡大学Hercules教授对本研究的部分资助以及西德Meunster大学Hillenkamp教授慷慨地为本研究提供仪器和实验室装备

参 考 文 献

- [1] Craig A G et al., *35th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, May 24~29, 1987, Denver, CO, 528
- [2] Tanaka K et al., *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 8(1988), 2, 1519
- [3] Karas M et al., *Anal. Chem.*, 60 (1988), 2299
- [4] Hillenkamp F et al., *Presented at 37th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Miami Beach, May, 1989
- [5] Hillenkamp F, *Presented at 11th Int. Mass Spectrom. Conference*, Bordeaux, 1988

A Study of Laser Desorption Mass Spectrometry of Large Proteins

Zhao Shankai*

Abstract

A new method of laser desorption mass spectrometry(LDMS) for the analysis of large proteins with molecular weight up to 100,000 daltons is introduced. Laser desorption mass spectra of different kinds of proteins are demonstrated, Their features are discussed. By the use of the new method, the molecular weight of proteins and their subunits can be measured fast (within 10 minutes), accurately (with absolute errors of 0.1~0.2%) and with very high sensitivity (amount down to 5 femto-mole proteins is detected). The unique characters and the mechanism of liquid matrix for assisting laser desorption of large proteins are discussed.

Keywords Laser desorption, mass spectrometry, protein, liquid matrix, molecular weight measurement

* Instrumental Analysis and Research Center