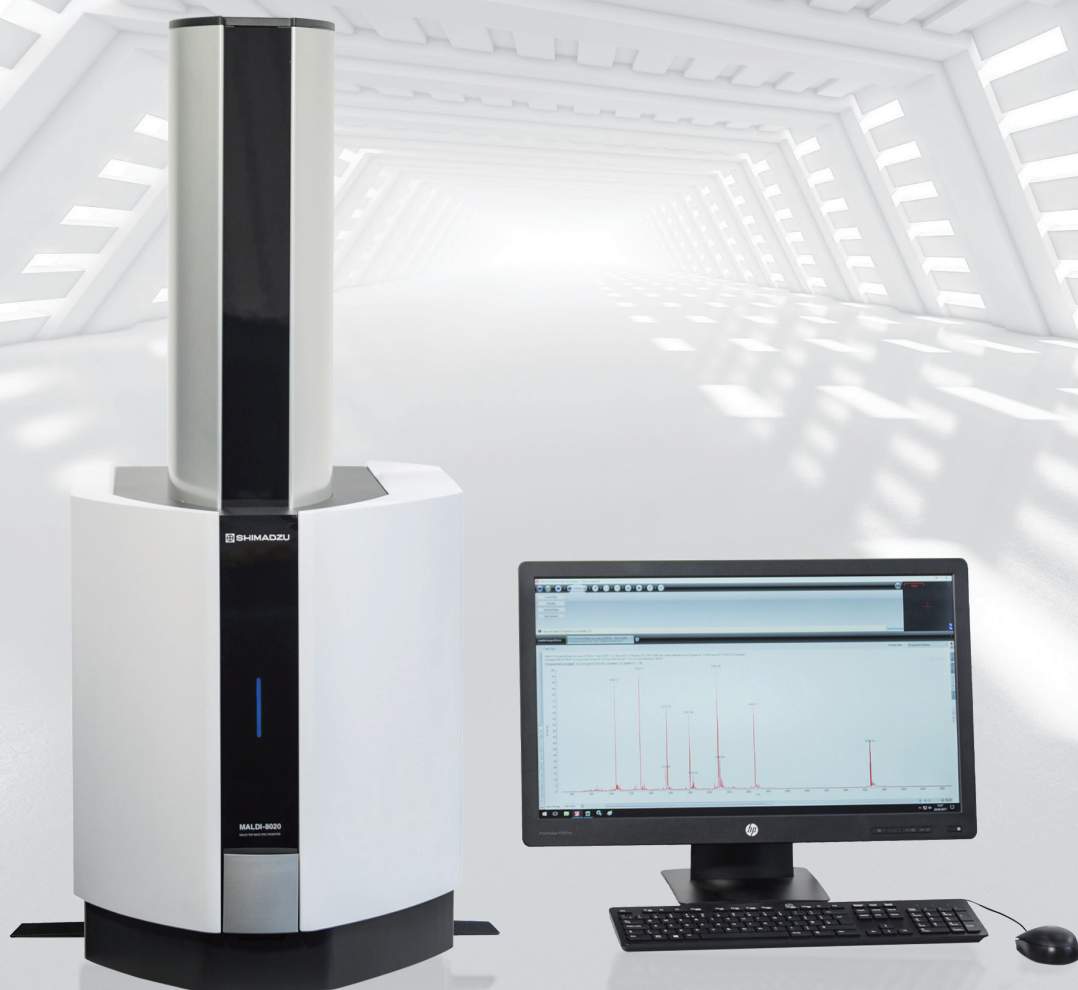


MALDI-8020

应用文集



前言

MALDI-TOF，即使用基质辅助激光解吸电离技术将待测物质离子化并通过飞行时间质谱检测的技术。在 MALDI-TOF 出现之前，质谱对生物大分子分子量和结构的解析比较困难。上世纪 80 年代，日本岛津公司的资深工程师田中耕一，以及德国科学家 Hillenkamp 和 Karas 开发了适合于生物大分子检测的基质，使 MALDI-TOF 质谱法成功检测到生物大分子的分子量。田中耕一因此与电喷雾电离法的发明人 John Fenn 共同获得了 2002 年的诺贝尔化学奖，奖励他们“开发了用于生物大分子质谱分析的软解吸电离方法”。

严格来说，当今被广泛采用的 MALDI-TOF 质谱技术实际上是两个核心技术的结合，即基质辅助激光解吸电离与飞行时间离子分离技术。基质辅助激光解吸电离除与飞行时间质量分析器结合外，同样可以与其他离子分离技术，如四级杆、离子阱等相连接。但脉冲式的激光解吸电离方式无疑与在飞行时间质谱中采用的脉冲离子提取技术在耦合上有很多优势，从而促成了 MALDI-TOF 这一质谱技术的出现。

1987 年，岛津公司的田中耕一和同事使用了将甘油中的 30nm 钴金属粉末与 337nm 氮气激光器相结合的“超细金属加液体基质法”用于电离生物大分子。使用这种方法，田中耕一完成了羧肽酶 -A 蛋白（分子量 34kDa）的电离，证明了选择合适的激光波长和基质可以使蛋白质电离。

MALDI-TOF 在分子量测定、蛋白质鉴定、聚合物分析、核酸分析、微生物快速鉴定等各个研究领域均有良好的应用。特别是近年来比较热门的微生物鉴定和核酸分析。基于 MALDI-TOF 的微生物鉴定系统与传统生化或免疫学方法相比，通量更高，时间上更快捷，成本上更低，越来越受广大科研工作者青睐。基于核酸分子量测定的单核苷酸多态性 SNP 分析，可以进行疾病遗传及基因分析等方面的研究，如耳聋基因的筛查、RNA 病毒检测。

MALDI-8020 作为全世界最小的台式 MALDI-TOF MS，采用 355nm 固体激光器，激光频率最快能达到 200Hz，分子量测量范围 1-500kDa。同时采用了无油的隔膜真空泵，噪音低至 55 分贝以下。优化缩小了进样室和样品分析室的体积，退靶仅需 15-20 秒，进靶后抽真空时间 90 秒，比传统 MALDI-TOF 快了不少。基于固体激光器，可以使用紫外激光自动清洗离子源，避免了泄真空、手动清洗等一系列操作，设定好程序后 8 分钟即可自动清洗完毕。

本册应用文集收录了 19 篇代表性的 MALDI-8020 应用数据，供相关用户参考。

目录

第一章 MALDI-8020 简介

第一节 初识 MALDI-TOF	1
第二节 关于 MALDI-8020.....	2
第三节 MALDI-TOF 的应用领域及应用前景.....	4

第二章 MALDI-8020 应用数据集

第一节 蛋白分子量测定中的应用

1. MALDI-8020 应用于完整蛋白质分析.....	7
2. MALDI-8020 应用于糖蛋白质分子量测定.....	9
3. MALDI-8020 分析癌细胞细胞外囊泡.....	11
4. MALDI-8020 快速鉴定病毒蛋白类疫苗亚基组成.....	13

第二节 蛋白质、多肽鉴定中的应用

5. MALDI-8020 应用于 PMF 法鉴定二维电泳凝胶中的蛋白质.....	17
6. MALDI-8020 应用于磷酸化蛋白质分析.....	19
7. MALDI-8020 应用于 In-Source Decay 法分析蛋白质序列.....	21
8. MALDI-8020 分析蛋白质序列	24
9. MALDI-8020 检测甲硫氨酸氧化修饰.....	27

第三节 动物毛发分析中的应用

10. MALDI-8020 质谱分析仪辨别动物毛发.....	32
11. MALDI-8020 进行羊绒羊毛定量检测	35

第四节 聚合物、材料分析中的应用

12. MALDI-8020 应用于快速检测低分子量化合物	39
13. MALDI-8020 应用于合成高分子分析	42
14. MALDI-8020 确认有机功能材料合成	44
15. MALDI-8020 检测 PEG6000 的分子量及分布.....	46
16. MALDI-8020 检测聚苯乙烯的分子量及分布	48
17. MALDI-8020 应用于 PET 薄膜表面分析.....	50

第五节 核酸分析中的应用

18. MALDI-8020 应用于核酸类药物的快速序列检测.....	53
19. MALDI-8020 应用于肽核酸 (PNA) 分析	55

第六节 微生物鉴定中的应用展望	57
-----------------------	----

第一章 MALDI-8020 简介

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-TOF MS) 因 2002 年日本岛津公司的田中耕一“开发了用于生物大分子质谱分析的软解吸电离方法”获得诺贝尔化学奖而走进公众视野。然而，由于缺乏切入更广阔市场的应用点，这之后 MALDI-TOF MS 又逐渐沉寂下来。2012 年开始，采用 MALDI-TOF MS 进行临床微生物鉴定在商业上大获成功，市场一再扩大。特别是近年来在基因分型分析、生物标志物鉴定、病原体鉴定、质谱成像等应用领域的发展，越来越被临床检测领域所青睐。

第一节 初识 MALDI-TOF

基质辅助激光解吸电离 (也就是通常所说的 MALDI) 于 1987 年首次由 Hillenkamp 及 Karas 提出，距今已经 30 余年。从那时起，通过应用这一“软电离”技术与飞行时间质谱的结合，成功地实现了生物大分子的快速和高度可靠检测，同时也为生命科学领域提供了全新的分析方法。相比其它质谱技术，MALDI-TOF 操作简便，不需要接受分析化学培训就可以使用。2002 年，岛津制作所的田中耕一先生与电喷雾电离法的发明人 John Fenn 博士共同获得了诺贝尔化学奖，奖励他们“开发了用于生物大分子质谱分析的软解吸电离方法”。

MALDI 的原理是用激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜，基质从激光中吸收能量传递给生物分子，而电离过程中将质子转移到生物分子或从生物分子得到质子，而使生物分子电离的过程。因此它是一种软电离技术，适用于混合物及生物大分子的测定。TOF 的原理是根据不同质荷比 (m/z) 的离子在飞行管中的飞行速度不同，从而导致飞行时间的不同而被检测。MALDI-TOF MS 具有灵敏度高、准确度高及分辨率高等特点，为生命科学等领域提供了一种强有力的分析测试手段，并扮演着越来越重要的作用。

近几年，国内 MALDI-TOF MS 仪器的研发与生产快速起步，涌现了一批科研人员和企业，大大推动了 MALDI-TOF MS 国产化的进程。2020 年新冠疫情中，各地医院及疾控中心也采购了不少 MALDI-TOF 仪器，用于病原体的快速鉴定和细菌分型等。



生物梅里埃
VITEK-MS



布鲁克
Microflex



岛津
Performance



安图生物
Autof ms1000

市场上主要 MALDI-TOF 产品

第二节 关于 MALDI-8020

岛津公司目前拥有 AXIMA 系列 Assurance、Confidence、Performance，以及 MALDI-7090、MALDI-8020 等多款 MALDI-TOF 仪器。



岛津 MALDI-TOF 机种

MALDI-8020 是岛津公司类型丰富的 MALDI-TOF 产品中的最新一员。这款台式、线性 MALDI-TOF 质谱仪兼具卓越的性能与小巧的体积 (450×745×1055mm, 86kg), 是当今对仪器要求日益严苛的实验室的理想选择。

MALDI-8020 具有以下特点：

1. 固态激光器

355nm 固态激光器，1-200Hz 可调，使用寿命轰击次数 2×10^9 次以上。

2. 用于快速进样的加载锁定室

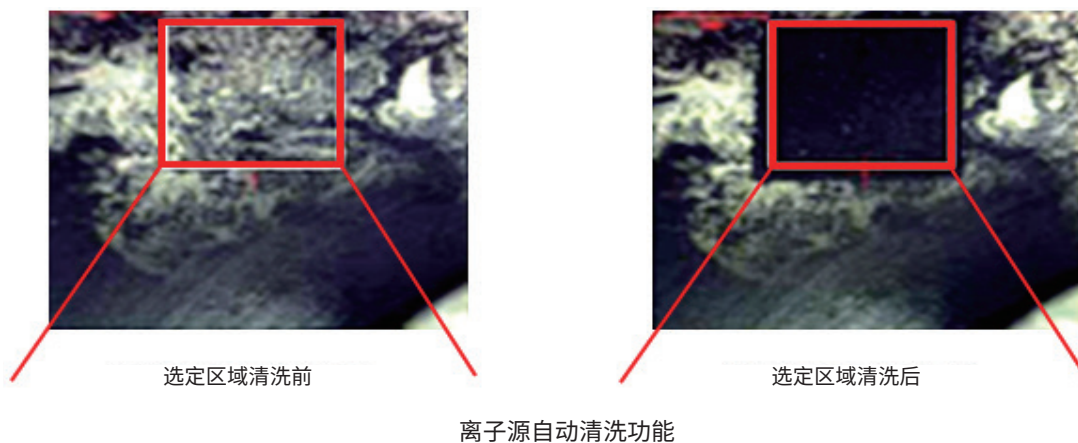
样品靶板加载锁定室体积最小化，适合放入一片 48 孔的靶板。退靶时间 15-20 秒。放入靶板后，90 秒抽真空完成。减少了实验等待时间。

3. 宽口径离子光学系统

以宽口径的离子光学系统来优化聚焦离子束，最小化离子源被实验物污染的风险，降低离子源清洁和维护的需求。

4. 离子源自动清洗功能 TrueClean™

基于紫外激光器的源清洁功能（专利技术），设定好自动程序后，8 分钟即可完成自动清洗。避免了泄真空、手动清洗等一系列操作。



5. 无油隔膜泵

样品加载室使用无油隔膜泵，避免传统油泵的噪音。噪音低至 55 分贝以下，绿色环保。

6. 条形码自动读取

整合于 MALDI-8020 内的条形码阅读器（专利技术）在进样时自动扫描一次性靶板上的条形码。当条形码读取成功时，仪器前面板上的 LED 灯将会提示。



条形码自动读取功能

7. 符合 21 CFR part 11 法规

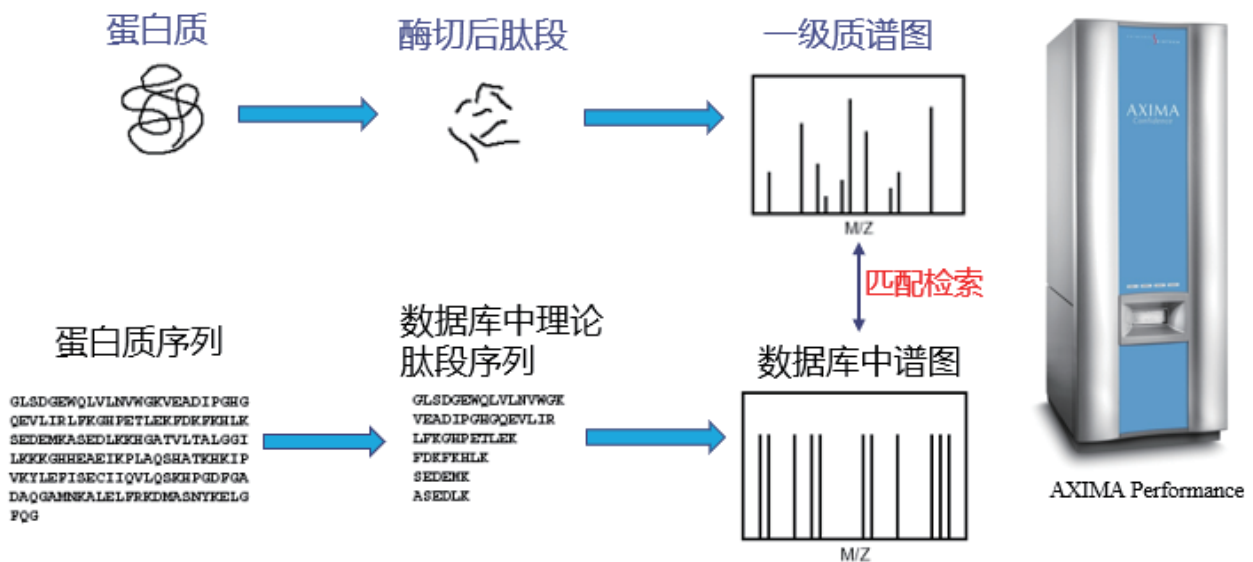
系统在 MALDI Solutions™ 软件控制下进行操作，该软件的特点是其集中式、安全性高的 Microsoft® SQL 数据库，可用于存储从样品序列列表、采集参数设置到采集的 MALDI 数据等一切数据。该软件与完整的审计追踪功能一起使用，可成为实现 21 CFR part 11 法规合规的有力工具。

第三节 MALDI-TOF 的应用领域及应用前景

MALDI-TOF 应用领域广泛，主要集中在蛋白质、多肽、糖及糖蛋白分子量测定，蛋白质鉴定，微生物鉴定，聚合物分析，核酸分子量测定或单核苷酸多态性 SNP 分型等。

在 MALDI-TOF 质谱仪刚出现的时候，它主要用于蛋白质等生物大分子的分子量测定及蛋白质鉴定。蛋白质鉴定的常用方法是通过凝胶电泳分离蛋白，将蛋白酶解成多肽，再用 MALDI-TOF 采集质谱数据，然后比对质谱图中的多肽峰与从蛋白数据库所生成的多肽峰匹配程度，给出蛋白名称和氨基酸序列匹配度，从而实现蛋白鉴定。这种方法通常被称为肽质量指纹谱分析 (Peptide Mass Fingerprinting, PMF)。蛋白质鉴定的另一种方法是二级质谱 MSMS 法，通过 MALDI TOF-TOF 将酶切后产生的多肽在串联质谱内 CID 碰撞生成离子碎片，然后通过蛋白多肽串联质谱数据库搜索匹配多肽信息来确定蛋白。

肽质量指纹图谱PMF技术



MALDI-TOF 肽质量指纹谱图技术

相比蛋白和多肽分析，MALDI-TOF 分析核酸样品开展得稍微滞后，1993 年 Becker 研究小组报道了 3- 羟基吡啶甲酸 (3-HPA) 可作为良好的基质之后才有所突破。目前应用比较多的是基因位点的单核苷酸多态性鉴定 (SNP)。方法如下：多重 PCR 扩增目的基因后，利用单碱基延伸 (Single-base Primer Extension) 技术与 MALDI-TOF 相结合的单核苷酸多态性 (SNP) 鉴定的质谱方法。SNP 检测的主要优势在于可以在一个样品反应体系中同时检测多达几十个 SNP 位点。多重 PCR 结合 MALDI-TOF SNP 分型技术，可以应用于病毒的检测，国内最早开展类似研究是华大基因 2009 年进行的人类乳头瘤病毒的检测。岛津公司正在与合作方毅新博创公司进行 MALDI-TOF 快速检测 12 种 RNA 病毒的合作研究。

MALDI-TOF 自 30 多年前出现至今已经成为分析各种非挥发性分子，包括蛋白质，肽，寡核苷酸，脂质，聚糖和其他生物分子的成熟技术。微生物实验室细菌鉴定的传统方法包括形态学、生化反应、免疫学等，检测周期长，部分疑难菌种不易鉴定，不能满足临床诊断的时效要求，特别是应对菌血症、败血症等重症感染的情况。2001 年美国 University of Maryland 的 Ryzhov 和 Fenselau 通过质谱分析微生物细胞内丰富的核糖体蛋白质分子指纹图谱，提出了利用 MALDI-TOF 鉴定病原微生物的可能性。基于 MALDI-TOF 的微生物鉴定方法，比传统的各种表型和生物化学测试方法更精确，速度更快，成本更低，通量更高。而且在微需氧菌、厌氧菌、真菌、结核分枝杆菌及病毒等难鉴定、难培养病原体的鉴定方面弥补了生化鉴定方法的不足，被临床实验室逐渐所采纳。

预计 MALDI-TOF 微生物鉴定和核酸检测两个方向将成为热点，并将在科研和临床中得到越来越广泛的应用。已有不少进口厂商和国产厂商取得 NMPA (CFDA) 的医疗器械认证，临床质谱的竞争非常激烈。

第二章 MALDI-8020 应用数据集

作为软电离模式的质谱仪，MALDI-TOF 应用领域广泛，从蛋白质、聚合物、核酸分子量测定，到蛋白质鉴定、微生物鉴定等。本章将一一展示相应的应用方案。

MALDI-TOF 的优点：1. 对样品的消耗很少；2. 随着质量分析器的不断改进、新基质的不断发现和应用，使得 MALDI-TOF 的分辨率不断提高；3. MALDI-TOF 质谱峰主要带单电荷，一级质谱碎片峰少，谱图易解析，非常有利于对混合物的分析；4. 能容忍少量盐、缓冲剂和其他难挥发成分，降低了样品前处理的要求；5. 主流 MALDI-TOF 测量范围 1-500kDa，对生物大分子的测量有优势；6. 分析速度快，几秒到几十秒即可完成样品质谱图采集，适合高通量快速检测；7. 日常分析只需基质和简单有机溶剂，使用成本低。

第一节 蛋白分子量测定中的应用

常见蛋白质分子量测定的方法有粘度法、凝胶过滤层析法、凝胶渗透色谱法、SDS-PAGE 凝胶电泳、二维电泳、渗透压法、超速离心法等，质谱方法包括电喷雾离子化质谱技术 ESI 和基质辅助激光解吸电离质谱技术 MALDI-TOF。MALDI-TOF 检测蛋白分子量比其他方法更快捷方便，通常几秒到几十秒即可给出质谱图。

台式 MALDI-TOF MS 应用于完整蛋白质分析

众所周知，在生命科学领域进行蛋白质分析时广泛使用 MALDI-TOF MS。在这个领域有较长历史的分析方法，SDS 电泳和尺寸排阻色谱法都存在费时，分子量检测精度低等缺点。MALDI-TOF MS 可提供更准确的分子量信息，已成为分析蛋白质一级结构的强大工具。另外，近年来人们经常需要在飞摩尔和亚飞摩尔级别上对蛋白质进行分析，因此对 MALDI-TOF MS 的灵敏度检测寄予较高的期望。

MALDI-TOF MS 能检测的质量范围原理上是无限广的，并且实际应用中也是从低分子量到抗体等高分子量都能覆盖。单克隆抗体（参见图 1）应用于诊断和治疗，在其开发和质量控制过程中采用快速可靠的分析方法是十分重要的。

台式 MALDI-TOF MS (MALDI-8020) 拥有卓越的性能，使用这台仪器能够高通量，高灵敏地检测出蛋白质。

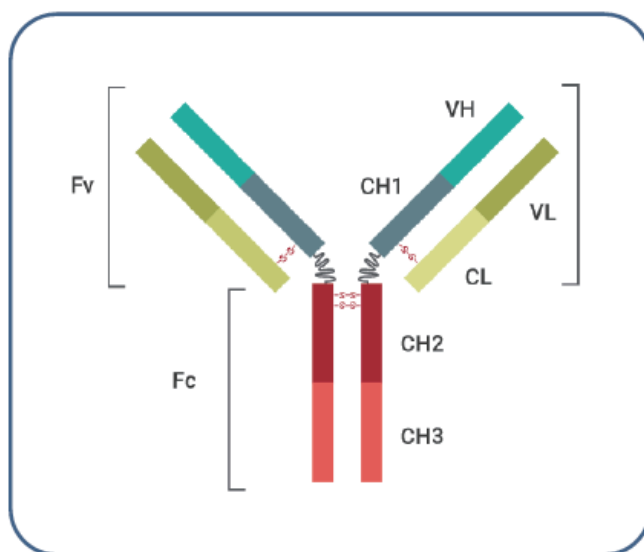


图 1 抗体的结构

■ 样品制备和检测条件

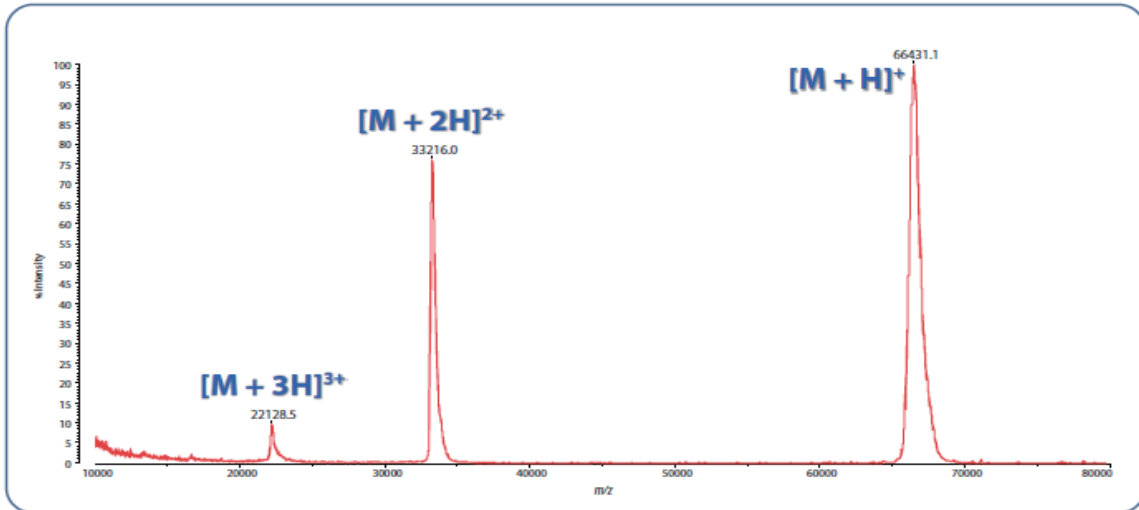
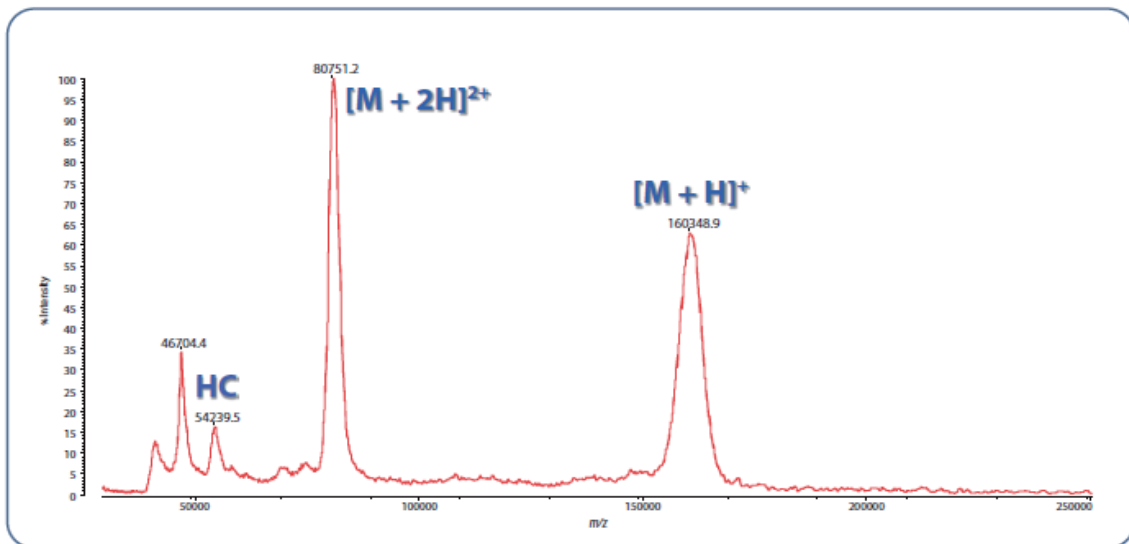
牛血清白蛋白 (BSA) 和免疫球蛋白 A (IgA) 是从 Sigma-Aldrich 购买的，分别以 500 fmol/μL 和 20 pmol/μL 的浓度溶解。得到的样品溶液与 MALDI 基质 (Sinapic acid、20 mg/mL, 1:1 乙腈 /0.1% 三氟乙酸水溶液) 混合后进行了分析。

数据是以本仪器最大激光速度 (200 Hz) 和线性模式 (正离子) 下采集的。设定 50 shots/profile, 累积计算 200 profiles, 取其平均值作为一个质谱图。

■ 分析结果

图 2 为 BSA 完整蛋白的质谱图，充分显示了 MALDI-8020 的灵敏度。图中可观察到一价 (约 66 kDa)，二价 (约 33 kDa)，三价 (约 22 kDa) 的离子，S/N 比良好，其分辨率与普通的 MALDI-TOF 的线性模式相比毫不逊色。

图 3 显示 IgA 完整蛋白的质谱图，从中可观察到预计约 160 kDa 的一价离子与二价离子 (约 80 kDa)。另外，在 54 kDa 左右检测到的信号与重链分子量是一致的 (预计约 55 kDa)。

图 2 BSA 完整蛋白的质谱图 (500 fmol/ μ L, 250 fmol on-target)图 3 IgA 完整蛋白的质谱图 (20 pmol/ μ L, 10 pmol on-target) HC=heavy chain

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B074 应用报告。

台式 MALDI-TOF MS 应用于 糖蛋白质分子量测定

MALDI-TOF 质谱分析法具有高通量和高灵敏度，与 LCMS 法一样在众多领域中得到广泛应用。特别是近年来越来越多地应用于合成化合物和高分子量化合物的分子量检测和结构分析。这是由于此类质谱仪具有容易生成一价离子便于确认分子量、可检测的质量范围广、样品干燥后进行检测故而可选择的溶剂种类多等优点。

此外，由于近几年社会形势的变化，无论是政府、大学还是民营企业，都强烈希望此类设备在引进和运行方面都降低成本。台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 正是一款可充分满足这一市场需求的新产品。值得关注的一点是，本产品有一个较短的飞行管，虽然比传统机型尺寸小，但仍保留同等以上的性能。

用 MALDI-TOF 质量仪测定翻译后修饰蛋白质的分子量，属于生物化学和分子生物学等领域最基本的应用之一。特别是糖蛋白分子量，由于糖链结构不同而产生的不均一性，导致糖蛋白分子量为多分子量群分布。

本文介绍了应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020，检测糖蛋白分子量的实例。

■ 台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020

MALDI-8020 (图 1) 虽然是一款拥有目前世界最小尺寸和安装面积的线性 MALDI-TOF MS，但其线性检测模式 (正离子) 的性能与传统机型该模式的性能是相同的。通过采用 200 Hz 固态激光器以及在保持检测部位真空度的情况下更换样品靶板 (加载锁定室)，可进行快速检测。



图 1 台式 MALDI-8020

■ 糖蛋白质的分子量测定

Ribonuclease B 的氨基酸序列如图 2 所示。已知这种蛋白质通过高甘露糖型的 N 型糖链修饰后，可以在主要成分中检测出比原蛋白质分子量高约 1217 的修饰体。将 5 pmol 的牛来源 Ribonuclease B 与 Ferulic acid (10 mg/mL、50% 乙腈 /0.1% 甲酸水溶液) 混合，通过 MALDI-8020 线性模式测定的结果如图 3 所示。在 m/z 14890 处检测到 Ribonuclease B 的单电荷质子，这与理论值 (14899.3) 一致。此外，糖链不均一性分布也通过 hexose 的质量差异 (理论值 162) 检测到。

综上所述，MALDI-8020 线性模式的分辨率、质量精度等不逊色于传统 MALDI-TOF MS 的相同模式。

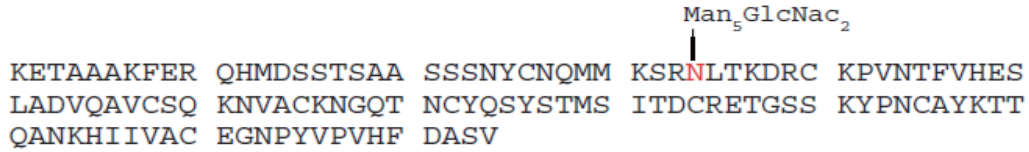


图 2 Ribonuclease B 的氨基酸序列和糖链修饰

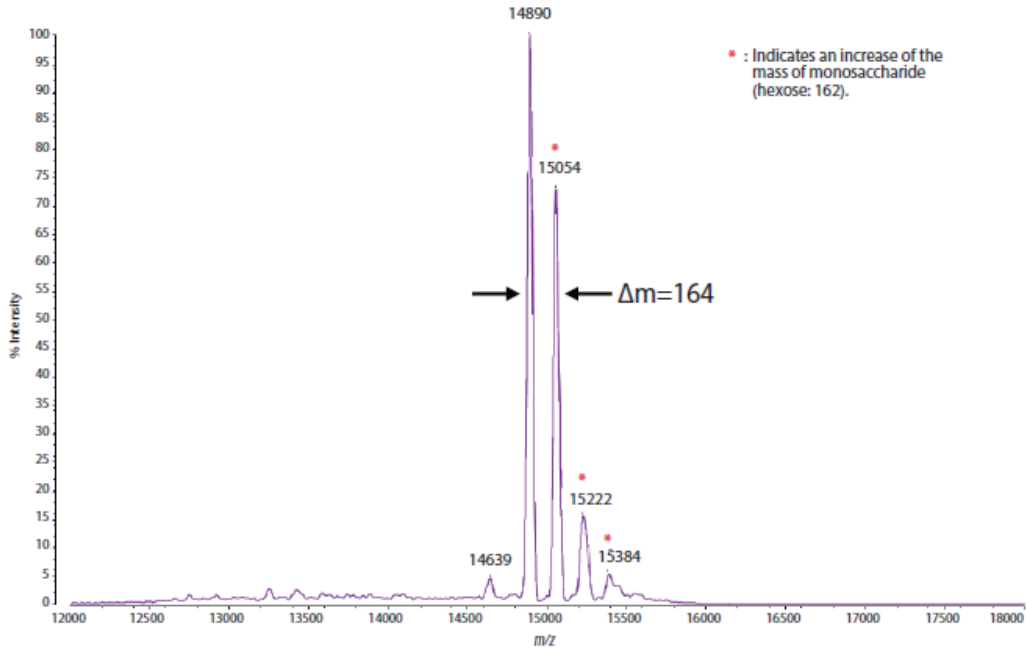


图 3 Ribonuclease B 的质谱图

总结

台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020 与大型 MALDI-TOF MS 一样，能检测糖蛋白质的分子量和不均一的糖链修饰分布。

近年来，MALDI-TOF MS 的发展越来越高端化，同时体积变大，结构更复杂。因此对于大多数需要线性模式分析的常规应用，这些仪器通常被过度指定。而且产品尺寸和初始 / 运行成本也构成了引进这些仪器的一个很大的障碍。

MALDI-8020 是世界上最小的线性 MALDI-TOF MS，可满足线性模式下蛋白质分析的需求，并有望在这个领域中广泛应用。

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B071 应用报告。

应用台式 MALDI-TOF MS 分析癌细胞细胞外囊泡

癌细胞通过细胞外囊泡与全身细胞相互作用。细胞外囊泡在体内循环并传递引起恶性表型的分子信息。

通过同时培养大肠癌转移淋巴结细胞和 5-氟尿嘧啶，我们建立了对化疗耐药性增强的细胞。将通过超离心分离从该细胞的培养上清液中回收的细胞外囊泡用作体液中循环的源于癌细胞的生物标志物的模型。

本文介绍了使用 MALDI-TOF MS 分析癌细胞化学疗法抗性增强所引起的细胞外囊泡蛋白质差异化表达水平的事例。

样品的预处理

对源于原发性大肠癌的细胞外囊泡和细胞提取物、5、25、125 μM 的 5-fluorouracil (FU) 具有抗性的淋巴结转移亚克隆由维也纳医科大学的 Dr. Gerald Stübiger 提供。

使用台式 MALDI-TOF 质谱分析仪 MALDI-8020 获得细胞外囊泡的质谱。基质采用 CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)。

使用获得的质谱，通过统计解析软件 eMSTAT Solution™ 进行多变量解析 (图 1)。通过偏最小二乘判别分析 (PLS-DA)，我们能够获得可以区分不同细胞群的细胞外囊泡的蛋白质模式。



图 1 细胞外囊泡的分析流程

结果

图 2 显示了细胞外囊泡样品的质谱的实例。在 m/z 2,000-25,000 的范围内主要检测出源于蛋白质的成分。本分析中 MALDI-TOF MS 的测定灵敏度为低 $\mu\text{g/mL}$ ($1.2 \sim 5 \times 10^{10}$ particles/mL) 范围。

获得数据后，将获得的谱峰列表导入 eMSTAT Solution 软件，进行多变量解析。分数图 (图 3 右下) 显示可以区分对 5-氟尿嘧啶具有抗性的组和具有敏感性的组。各细胞外囊泡的质谱具有明确区别于另一组的特异性。峰矩阵 (图 3 左下) 显示了每组中特异性检测到的峰。峰矩阵将在组内所有质谱中检测出的谱峰用红色单元格显示，将仅在部分质谱中检测出的谱峰用粉红色单元格显示，将所有质谱中均未检测出的谱峰用绿色单元格显示。在 m/z 2,000 - 7,000 范围内检测出的谱峰在表征化学疗法抗性方面非常有效。

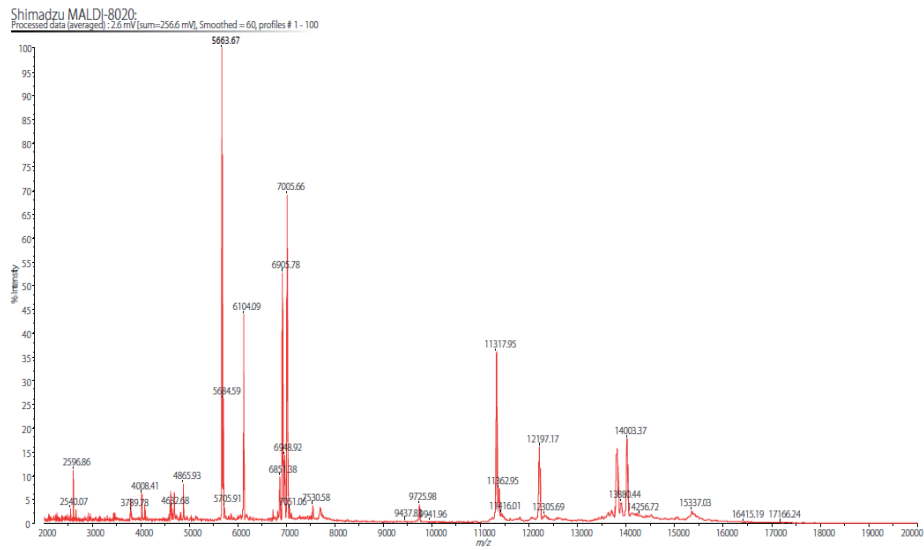


图 2 源于原发性大肠癌的细胞外囊泡蛋白质质谱

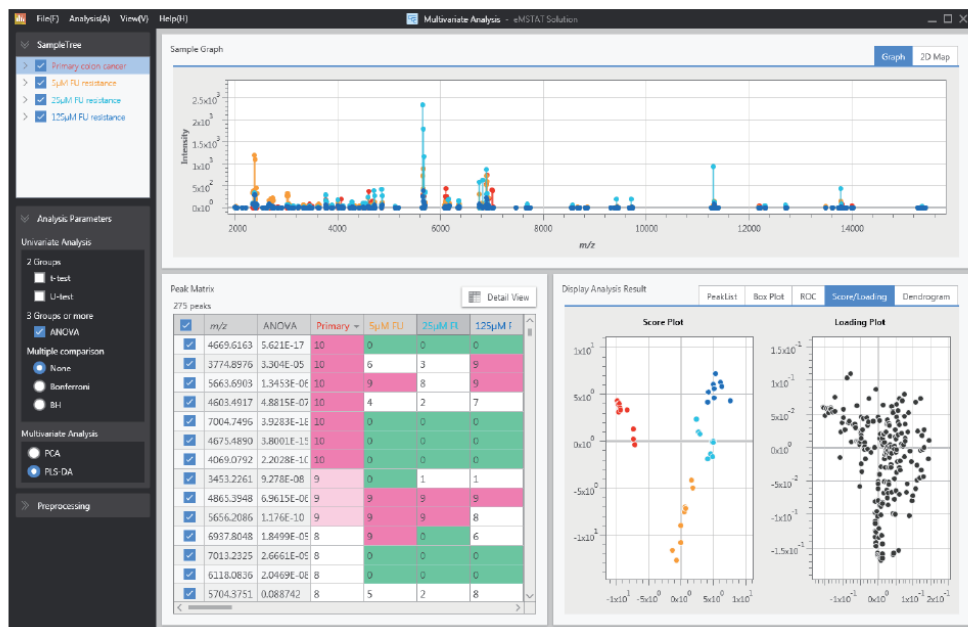


图 3 4 组细胞外囊泡组的 PLS-DA 分析结果

●原发性大肠癌 ●5µM 5- 氟尿嘧啶抗性 ●25µM 5- 氟尿嘧啶抗性 ●125µM 5- 氟尿嘧啶抗性

结论

结果表明，通过分析癌细胞的细胞外囊泡，可使用台式 MALDI-TOF MS 和统计解析软件 eMSTAT Solution 的组合系统进行生物标志探索研究。

使用 MALDI-TOF MS 进行蛋白质分析有望成为未来微创癌症诊断和化疗监测的新工具，例如无活体组织检查治疗抵抗性的早期检测新工具。

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B097 应用报告。

MALDI-TOF 快速鉴定病毒蛋白类疫苗亚基组成

摘要：本文应用岛津基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪（MALDI-TOF）检测疫苗蛋白组分，检测各亚基的分子量信息、分布与比例。结果显示标准品具有完整亚基组成，疫苗样品也具有较好的亚基完整性。该结果与疫苗样品的活性结果匹配。本例表明此方法无需样品前处理、快速简便、可靠性强，可为疫苗亚基组成分析提供有力参考。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF) 疫苗 亚基

接种疫苗可以预防许多流行疾病的发生，是保护婴幼儿、年老体弱者免于病痛的重要手段。蛋白类疫苗是品种最多，接种率最高的疫苗品种，据 2016 年统计数据显示，病毒和蛋白类疫苗占全球疫苗销量 48.9%。亚基是病毒和蛋白类疫苗的微小结构单元，这些亚基按照一定的比例与构象结合形成完整的蛋白，蛋白与核酸结合形成病毒，成为具有免疫活性的疫苗成分（图 1）。因此，疫苗蛋白质各亚基的组分完整性与含量是衡量疫苗免疫能力的重要指标。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF）是一种软电离方式，适合蛋白质等大分子的离子化，且具有分析质量范围宽、数据精确、通量高、速度快的优势，可以填补 LCMS/MS 的空白，对疫苗内生物活性大分子成分进行精确地定性分析。

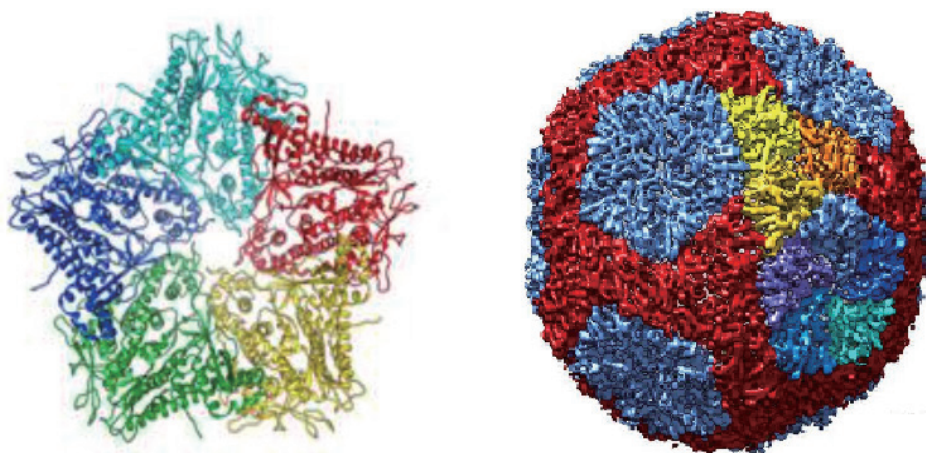


图 1 亚基、蛋白与病毒

以某病毒为例，不同颜色代表的各亚基以一定比例与构象结合形成蛋白质（左）；蛋白质排列并结合核酸最终形成完整病毒（右）。图片来自网络。

实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020, AXIMA-Performance

1.2 分析条件

调谐模式：线性正离子模式

扫描范围：m/z 5000-30000

激光能量：130

1.3 试剂和样品

基质：芥子酸（SA）

样品：疫苗标准品与样品

1.4 样品前处理

取 0.5 μL 样品与 0.5 μL SA 基质（浓度为 20 mg/mL），按照“三明治”法点靶（点靶顺序为：基质 - 样品 - 基质），自然干燥后将靶板放入质谱进行分析。

结果讨论

2.1 疫苗标准品测试

疫苗质谱检测结果如图 2-4 所示，显示检测到了标准品中所有亚基，其中 A 与 B 亚基的信号峰强度接近 2:1，C 与 D 亚基的信号峰强度接近 1:1。检测到的分子量精确，与理论相符，质谱图信噪比良好。

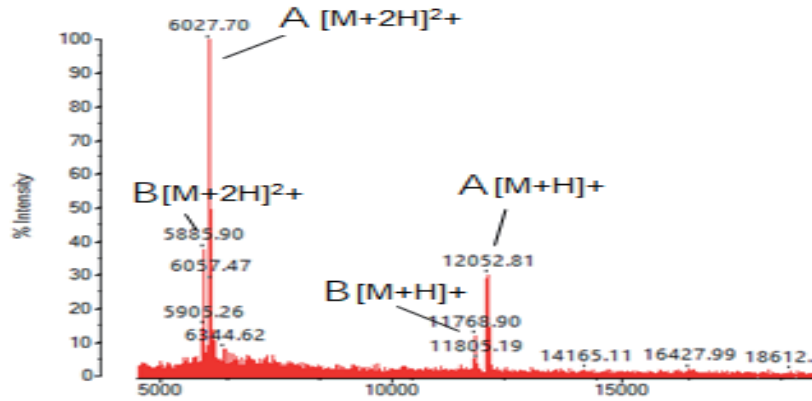


图 2 MALDI-TOF 检测标准品 A, B 亚基的一级质谱图

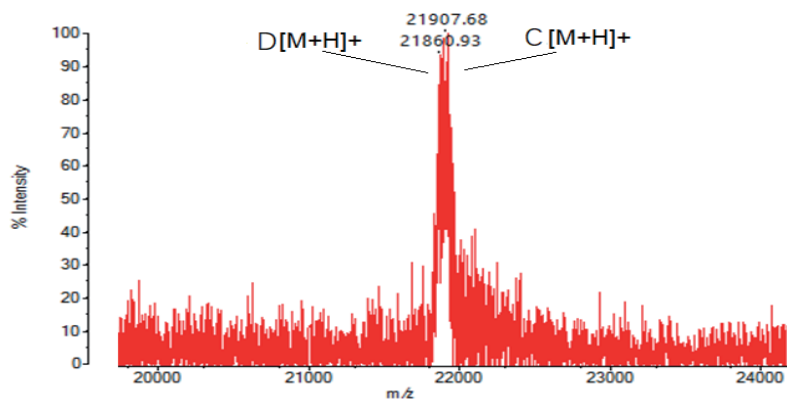


图 3 MALDI-TOF 检测标准品 C, D 亚基的一级质谱图

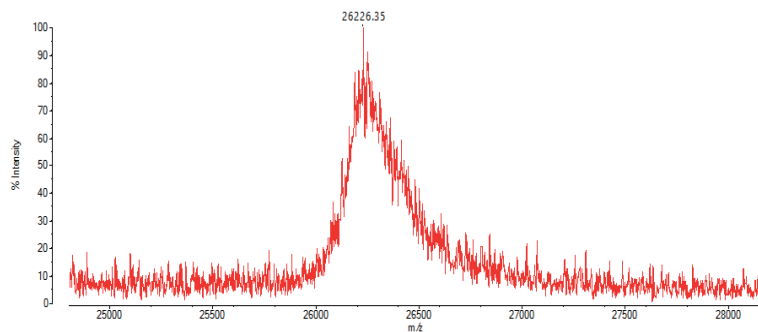


图 4 MALDI-TOF 检测标准品 E 亚基的一级质谱图

2.2 疫苗样品测试

将优化所得的 MALDI-TOF 方法用于疫苗样品亚基的测定（典型谱图如图 5-7），结果显示疫苗样品具有较好的亚基完整性。各亚基全部检测到，其中 A 与 B 亚基的信号峰强度接近 2:1，C 与 D 亚基的信号峰强度接近 1:1。该结果与疫苗样品的活性结果匹配。

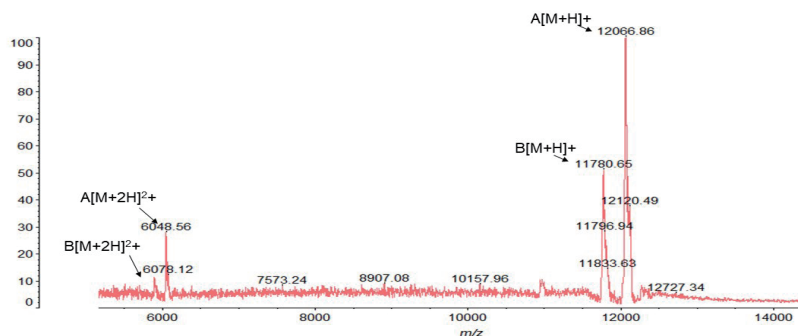


图 5 MALDI-TOF 检测样品 A, B 亚基的一级质谱图

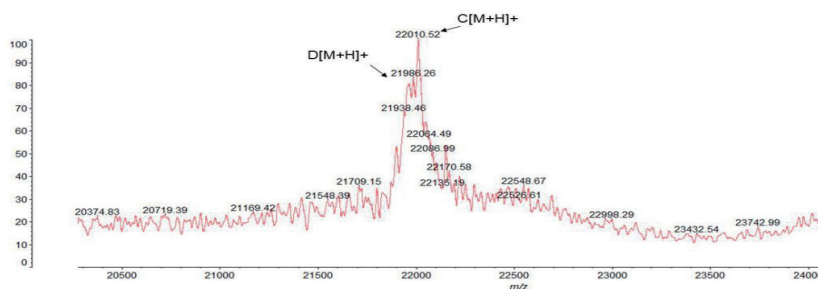


图 6 MALDI-TOF 检测样品 C, D 亚基的一级质谱图

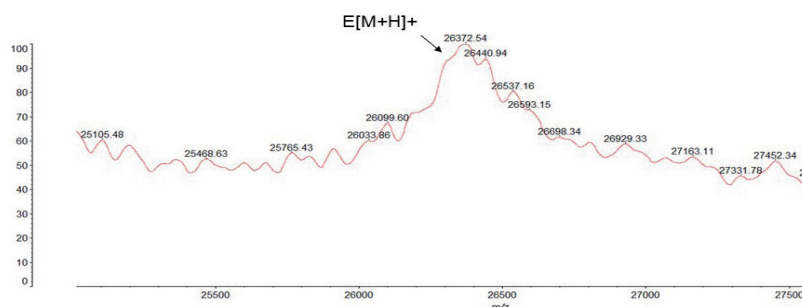


图 7 MALDI-TOF 检测样品 E 亚基的一级质谱图

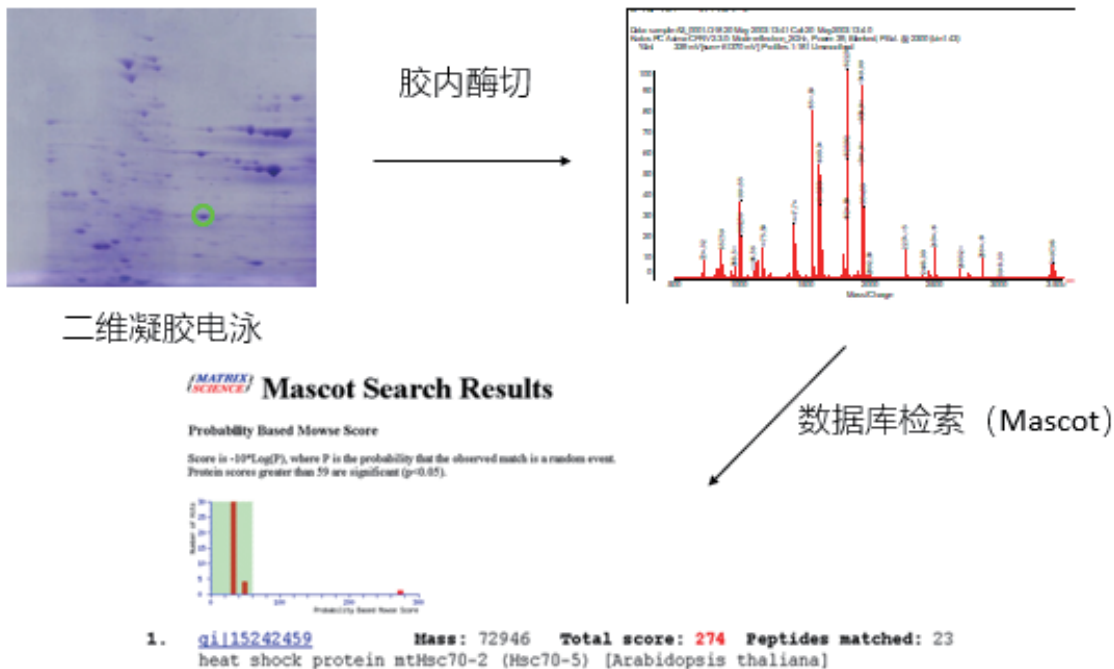
检测结果表明，利用 MALDI-TOF 检测到了该疫苗的所有亚基，得到了样品单电荷离子、二电荷离子的分子量信息，结果与理论一致。

结论

本文应用岛津基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测疫苗各亚基存在分布与比例，直接得到了样品单电荷离子、二电荷离子的分子量信息，结果与理论一致。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，分析速度快、仪器维护方便、性能卓越，是蛋白质疫苗亚基分析的有力工具。

第二节 蛋白质、多肽鉴定中的应用

MALDI-TOF 蛋白质鉴定的基本原理是：蛋白质经 SDS-PAGE 凝胶电泳或二维凝胶电泳 2D-PAGE 分离纯化，选取目标蛋白点，用蛋白酶（通常是胰蛋白酶）酶切，生成肽段混合物，点样到样品靶板，最后通过质谱仪采集数据并和数据库匹配检索，给出鉴定结果。激光轰击使肽段电离形成气态离子，经飞行时间质量分析器分离将不同质荷比的离子区分开来，经过检测器检测离子信号，确定每个离子的质荷比，并输出一级质谱图。不同的蛋白质酶解后形成的一级质谱图各不相同，通常称为肽指纹图谱（PMF, peptide mass fingerprints）。此外 MALDI-8020 可直接通过源内裂解（ISD, In-Source Decay）来检测碎片离子，由此进行完整蛋白质的序列分析和翻译后修饰分析。数据库通常使用 NCBI 的第三方公开数据库 Mascot。



肽指纹图谱鉴定流程

台式 MALDI-TOF MS 应用于 PMF 法 鉴定二维电泳凝胶中的蛋白质

目前，LCMS 蛋白质组学鸟枪法一直作为高通量方法用于鉴定细胞中的多种蛋白质。但对于所有蛋白质研究均使用此方法未必有效。尤其是鉴定通过二维凝胶电泳等方法分离出的蛋白质，凝胶上的蛋白点需要与蛋白质鉴定结果相匹配。凝胶上的蛋白质酶解后，使用 MALDI-TOF MS 进行分析有时比 LCMS 更为有效。

本文应用二维凝胶电泳和台式 MALDI-TOF MS 进行蛋白质鉴定的案例加以说明。

■ 血清蛋白质二维凝胶电泳

用 100 μL 的水稀释 0.5 μL 的人血清，之后加入甲醇：三氯甲烷：水（3：1：4）的混合溶液，离心分离出蛋白质，然后用甲醇净化蛋白质并风干。在二维凝胶电泳用缓冲液（Working 膨胀剂、SHARP）中加入还原剂和两性电解质后，添加到风干的蛋白质并进行二维凝胶电泳。电泳时间一维、二维共计进行了近 2 个小时。

使用 InstantBlue（Expedeon Ltd.）对电泳结束后的凝胶进行 CBB 染色，从而检测出蛋白点（图 1）。

■ 凝胶切割，酶解及脱盐

从上面获得的二维电泳凝胶上随机切取一些蛋白点，用 25 mM 碳酸氢铵 /50% 乙腈溶液脱染色后，使用 10 mM DTT（dithiothreitol）/50 mM 碳酸氢铵水溶液还原，接着使用 55 mM IAA（iodoacetamide）/50 mM 碳酸氢铵水溶液进行烷基化。然后，按照 50 mM 碳酸氢铵水溶液，25 mM 碳酸氢铵 /50% 乙腈水溶液，乙腈的顺序清洗凝胶去除多余的 DTT 及 IAA。将去除多余试剂的凝胶离心干燥后，添加适量的 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Lys-C（Mass spec grade, Promega），使凝胶在冰上膨胀。添加 50 mM 碳酸氢铵水溶液至膨胀后的凝胶浸入的程度，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行一晚酶解处理。

酶解处理后的凝胶片加入 40 μL 的 50% 乙腈 /0.1% TFA（trifluoroacetic acid）水溶液，振动 30 分钟后回收溶液，然后再在凝胶片加入 40 μL 的 75% 乙腈 /0.1% TFA 水溶液，振动 30 分钟后回收溶液。将回收的溶液混合后进行离心干燥后，加入 10 μL 的 0.1% TFA 水溶液，重新溶解回收液中所含蛋白质酶解物，进一步使用 ZipTip $\mu\text{C}18$ （Merk Milipore）进行脱盐处理。

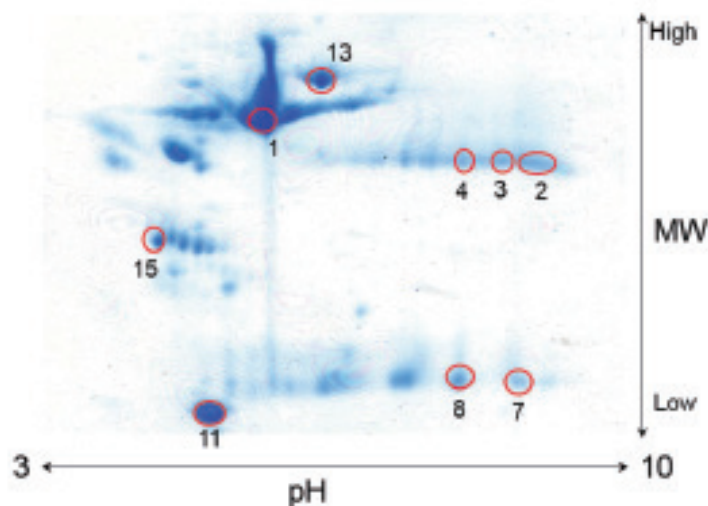


图 1 人血清蛋白质二维电泳凝胶图像
红圈：凝胶切割点

■ 质谱分析

将脱盐处理后的样品溶液点在 MALDI 靶板上，在样品上再点上 0.5 μL 基质溶液，然后进行质谱分析。基质溶液的配制方法为：将 CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) 溶解于 50% 乙腈 / 0.05% TFA 的水溶液中，配制浓度为 5 mg/mL。质谱分析使用台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020”。

将随机选取的蛋白点提取的酶解产物进行质谱分析，如图 2 所示获得了清晰的质谱图。从质谱图中提取 mass list 列表并进行 Mascot PMF (Peptide mass fingerprinting) 检索，鉴定出表 1 所示的蛋白质。

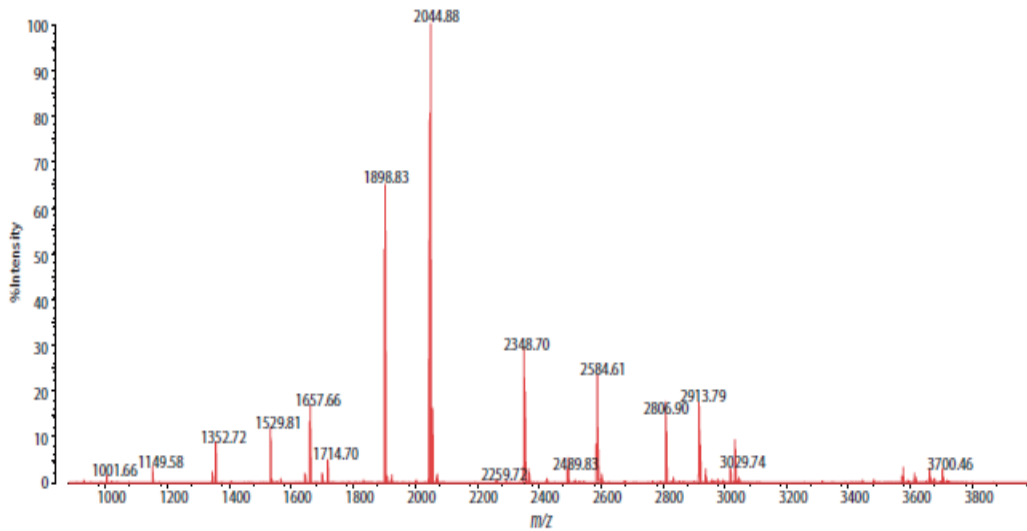


图 2 点 No.1 的质谱图
检测模式：Positive Linear

表 1 随机选取的蛋白点的鉴定结果
(括号内为鉴定分数低的结果)

Spot	Score	Description of protein
1	116	Serum albumin, human
2	90	Ig gamma-1 chain C region
3	68	Ig gamma-1 chain C region
4	68	Ig gamma-1 chain C region
7	60	Ig kappa chain C region
	59	Ig lambda-2 chain C region
8	60	Ig kappa chain C region
11	(50)	(Apolipoprotein A-1)
12	99	Alpha-1-antitrypsin
13	193	Serotransferrin
15	73	Complement C3
22	(47)	(Vitamin-D binding protein)

如上，使用二维凝胶电泳和正离子线性模式专用台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” 系统，可对通过电泳获得的蛋白点的信息进行分析。这样，二维电泳凝胶上各个点的蛋白质就成功鉴定出来了。

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B066 应用报告。

台式 MALDI-TOF MS 应用于 磷酸化蛋白质分析

MALDI-TOF 质谱分析法具有高通量和高灵敏度，与 LCMS 法一样在众多领域中得到广泛应用。特别是近年来越来越多地应用于合成化合物和高分子量化合物的分子量检测和结构分析。由于此类质谱仪具有容易生成一价离子，便于确认分子量，可检测的质量范围广，样品干燥后进行检测，可选择的溶剂种类多等优点。

此外，由于近几年社会形势的变化，无论是政府、大学还是民营企业，都强烈希望此类设备在引进和运行方面都降低成本。台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 正是一款可充分满足这一市场需求的新产品。值得关注的一点是，本产品有一个较短的飞行管，虽然比传统机型尺寸小，但仍保留同等以上的性能。

近年来，仪器研发均趋向于高端技术，MALDI-TOF 质谱仪的反射模式因其高分辨率和结构分析功能而备受关注。相比之下，线性模式在一些领域的应用早被受到重视，但近年来未见到技术上的大幅进展。蛋白质翻译后修饰特别是磷酸化修饰的鉴定，不稳定化合物的分子量鉴定等都是线性模式为更有效的方法。

本文介绍了应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 检测磷酸化蛋白质的酶解产物，并对磷酸化修饰进行了分析。

■ 台式 MALDI-TOF MS: MALDI-8020

MALDI-8020 虽然是一款拥有目前世界最小尺寸和安装面积的线性 MALDI-TOF MS，但其线性检测模式（正离子）的性能与传统机型该模式的性能是相同的。通过采用 200 Hz 固态激光器以及在保持检测部位真空度的情况下更换样品靶板（加载锁定室），可进行快速检测。

本产品的飞行管虽然只有 0.85 m，但质谱分辨率并不亚于传统机型，在 m/z 4000 附近也可进行同位素分离。

■ 线性模式的有效性

线性模式对具有高分子量化合物和不稳定官能基的化合物检测是有效的。MALDI 法离子化的化合物有时会在自由飞行空间内因过剩的内部能量被分解。由于在这个过程中产生的片段离子的速度与原化合物相同，它们在线性模式下被认为是相同的分子量。另一方面，在反射模式下，这些片段离子的分离取决于动能，检测到的分子量是不同的。因此，在反射模式下可以获得质谱的高分辨率和高精度，但是当官能基脱离时导致被脱离官能基的离子信号变得很强，或者可能无法检测到目标化合物。

如图 1 所示，磷酸化肽段的磷酸基在飞行过程中容易脱离，可以说是一种适合在线性模式下检测的化合物。

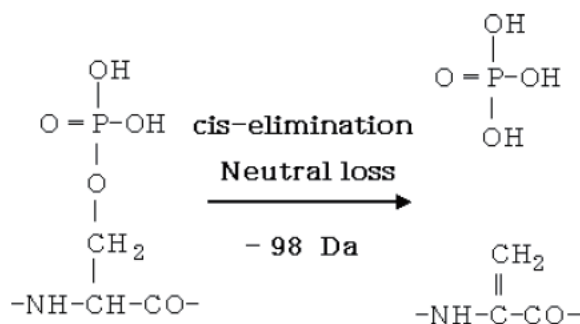


图 1 Ser 的磷酸化修饰和中性丢失

磷酸化蛋白质序列分析例

用胰蛋白酶酶解磷酸化蛋白质（牛 α -酪蛋白），然后大约 1pmol（用蛋白质换算）的量滴到薄层的 CHCA 基质上并干燥。如图 2 所示，用 MALDI-8020 的线性模式对该酶解物进行检测。通过 Mascot 检索，从 m/z 900 至 2500 的范围内检测到的肽段的质荷比，鉴定出了 α 酪蛋白。另外，通过线性模式检测出多个磷酸化肽段，通过数据库检索还鉴定了修饰位点（图 3）。结果表明，该仪器具有足够的分辨率，可用于酶解肽段的分析。尽管 MALDI-8020 是一款出色的线性模式专用仪器，但并不适合大规模蛋白质组学的分析。然而，在以非组学方法分离提纯的蛋白质的鉴定以及翻译后修饰的分析，通过本仪器可以快速获得有效信息。

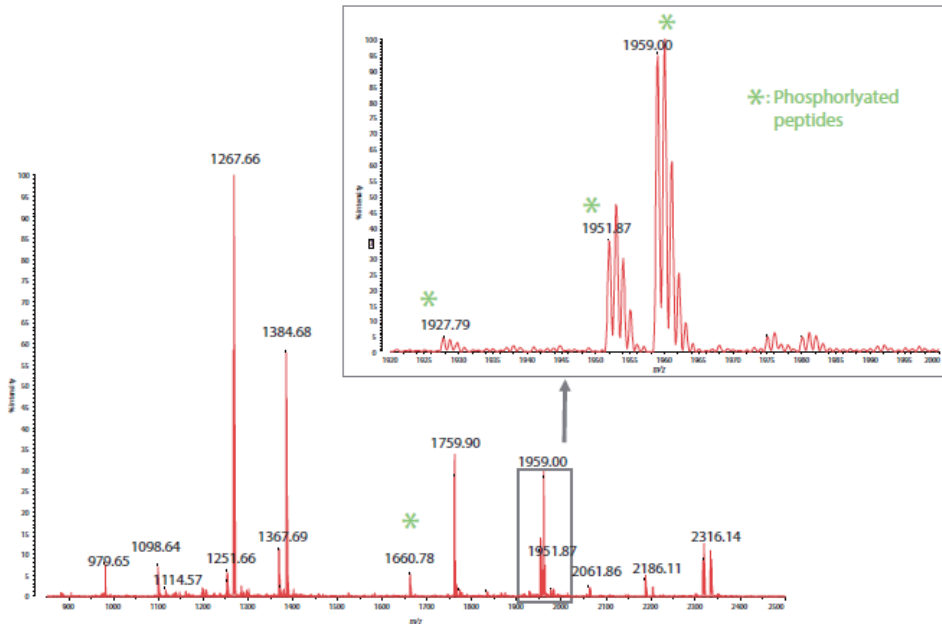


图 2 α 酪蛋白的胰蛋白酶酶解物的质谱图

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	M	Peptide
2 - 18	1959.0000	1957.9927	1958.1515	-0.1508	1	M.KLLILTCLVAVALARPK.H + Phospho (ST)
23 - 37	1759.9000	1758.8927	1758.9377	-0.0449	0	K.HQGLPQEVLENLLR.F
38 - 49	1384.6800	1383.6727	1383.7227	-0.0500	0	R.FFVADPDEVFCK.E
58 - 73	1927.7900	1926.7827	1926.6843	0.0985	0	K.DIGSESTEDQAMEDIK.Q + 2 Phospho (ST)
106 - 115	1267.6600	1266.6527	1266.6972	-0.0445	0	R.YLOYLBQLLR.L
119 - 134	1951.8700	1950.8627	1950.9452	-0.0824	1	K.YEVPQLKIVPNSAEER.L + Phospho (ST)
121 - 134	1660.7800	1659.7727	1659.7869	-0.0142	0	K.VPQLKIVNSAEER.L + Phospho (ST)
140 - 166	2316.1400	2315.1327	2315.1296	0.0031	0	K.ERMIGVNSQLAYTFELER.Q

图 3 MS/MS Ion Search 的结果

总结

通过台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020 进行了序列分析，并获得了大型 MALDI-TOF MS 质谱仪相媲美的数据，证明了鉴定磷酸化蛋白质以及磷酸化位点的有效性。

近年来，MALDI-TOF MS 的发展越来越高端化，同时体积变大，结构更复杂。因此大多数需要线性模式分析的常规应用，这些仪器通常是多余的。而且产品尺寸，购买和维护成本也构成了一个很大的障碍。

MALDI-8020 是世界上最小的线性 MALDI-TOF MS，可满足线性模式下蛋白质分析的需求，并有望在生物化学和分子生物学中广泛应用。

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B073 应用报告。

台式 MALDI-TOF MS 应用于 In-Source Decay 法分析蛋白质序列

MALDI-TOF 质谱仪被广泛用于蛋白质的分子量测定和结构鉴定。通常使用质谱仪鉴定蛋白质，需进行胰蛋白酶酶解作为预处理，但若蛋白质已经分离提纯，则无需进行胰蛋白酶酶解，可直接通过离子的源内裂解 (ISD, In-Source Decay) 来检测，由此进行完整蛋白质的序列分析。

通过 MALDI 来测定蛋白质的分子量时，通常会使用 sinapinic acid 作为基质，但通过 ISD 进行序列分析时，会使用 1,5-diaminonaphthalene (DAN) 作为基质。ISD 产生的碎片离子可通过 Mascot 等数据库检索来进行蛋白质鉴定。此外，还可通过对碎片离子质量所获得的氨基酸序列信息进行同源性搜索，从而推测出在数据库中没有鉴定到的蛋白质。

本文将介绍使用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 进行的蛋白质分子量的测定以及通过 ISD 进行的序列分析。

■ 台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020”

MALDI-8020 是一款体积小，占地少的线性 MALDI-TOF MS，在线性模式（正离子）下与传统的 MALDI-TOF MS 具有同等性能。该质谱仪配备了 200 Hz 的固态激光器和一个 load-lock chamber，在保持真空度的状态下更换靶板，实现了迅速的检测。

■ 蛋白质分子量测定

将 250 fmol (约 17 ng) 的牛血清白蛋白 (BSA) 与 sinapinic acid (10 mg/mL、50 % 乙腈水溶液 / 0.1% 三氟乙酸水溶液) 混合，通过 MALDI-8020 的线性模式进行检测。如图 1 所示，在 m/z 66430 处检测出 S/N 大于 100 的 BSA 的单价离子峰。

正如该检测例子所示，线性模式的灵敏度、质量精度、分辨率等与传统的 MALDI-TOF MS 相同模式比较也并无太大差异。

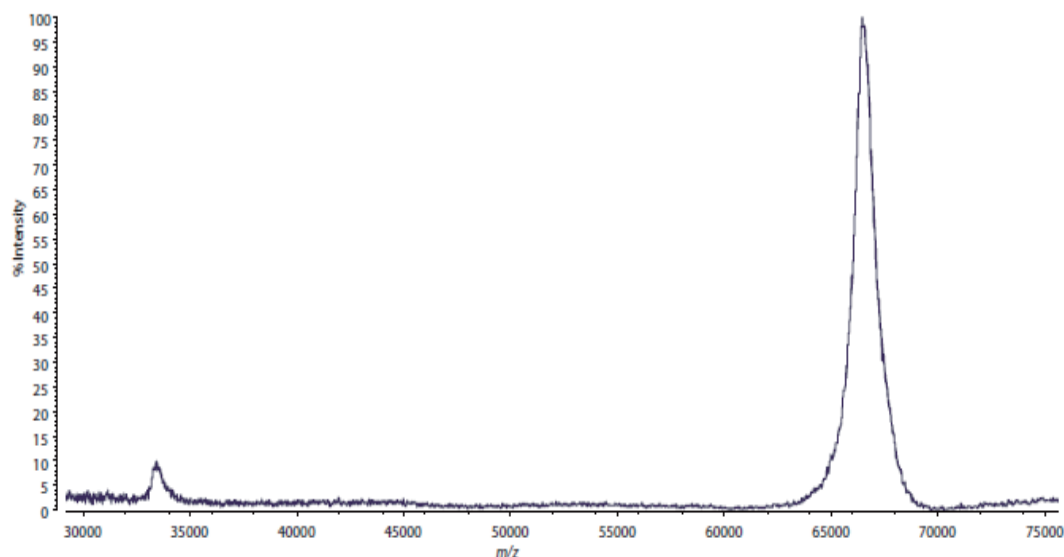


图 1 微量蛋白质（牛血清白蛋白）的质谱图

■ 基于 ISD 的蛋白质序列分析

将 5 pmol 的 BSA 与 DAN (10 mg/mL、50 % 乙腈水溶液 / 0.1% 三氟乙酸水溶液) 混合, 在 MALDI-8020 的线性模式下进行检测。如图 2 所示, 检测出了由 ISD 产生的 BSA 的 N 末端碎片离子—c 系列离子 c9 ~ c44 (c34、c39、c42 除外)。

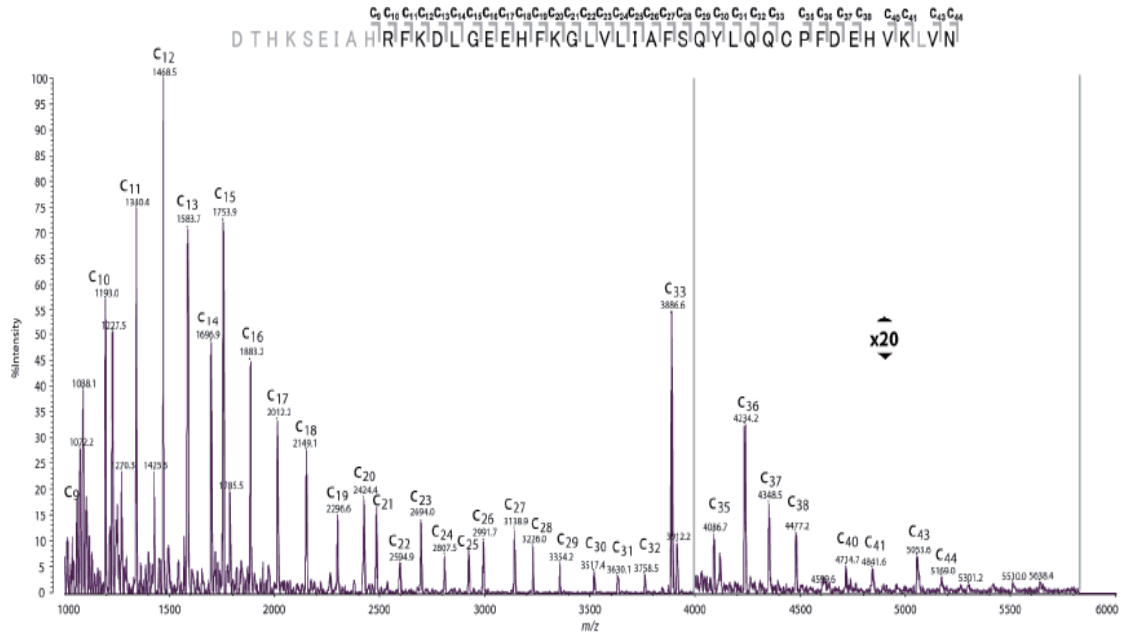


图 2 基于 ISD 的牛血清白蛋白序列分析

此外关于图 2 的质谱图, 假设它是某 c 离子作为前体离子时产生的 MS/MS 谱图, 也可以通过数据库搜索来鉴定该蛋白质。这与使用胰蛋白酶酶解后获得的肽段的 MS/MS 图谱的检索方法相同。关于图 3 的碎片离子信息, 将 C33 离子 (m/z 3886) 作为伪前体离子, 仪器类型选择 MALDI- ISD, 通过 Mascot (Matrix Science) 数据库进行 MS/MS 离子搜索。数据库搜索的结果显示, 牛血清白蛋白被鉴定为第一候选蛋白质 (图 3)。

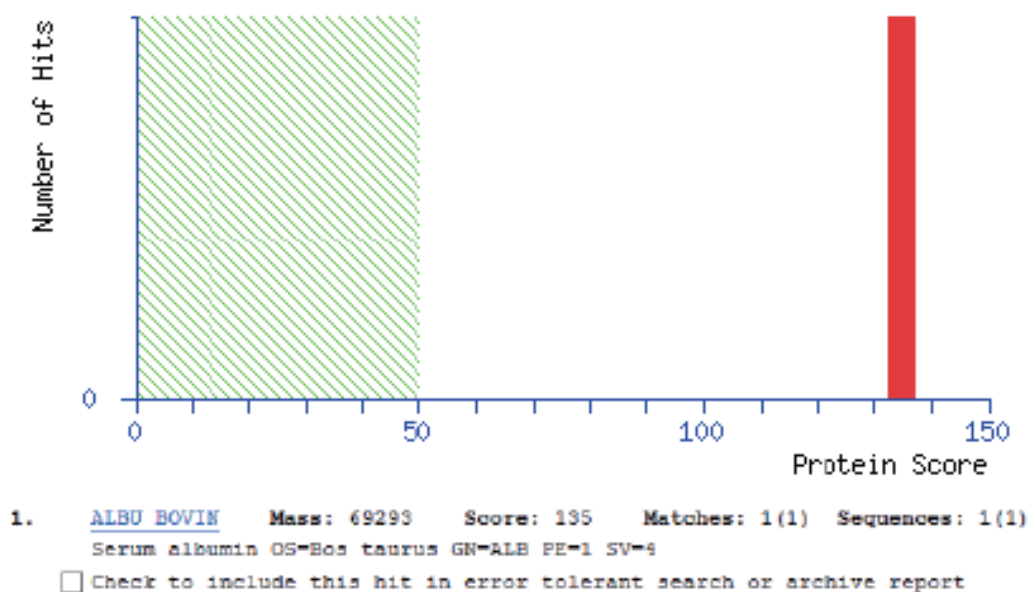


图 3 MS/MS Ion Search 结果

■ 总结

本文阐明了台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” 与体积更大的 MALDI-TOF MS 相同，能进行蛋白质的分子量测定，并能通过 ISD 进行序列分析。

近年来，MALDI-TOF MS 的发展越来越高端化，同时体积变大，结构更复杂。因此对于大多数需要线性模式分析的常规应用，这些仪器通常被过度指定。而且产品尺寸和初始 / 运行成本也构成了引进这些仪器的一个很大的障碍。

MALDI-8020 是世界上最小的线性 MALDI-TOF MS，可满足线性模式下蛋白质分析的需求，并有望在这一领域中广泛应用。

本文译自岛津全球应用开发中心（GADC）No. B069 应用报告。

应用台式 MALDI-TOF-MS 分析蛋白质序列

摘要：本文将牛血清白蛋白酶解并脱盐后，以 CHCA (α - 氰基 -4- 羟基肉桂酸) 为基质，应用岛津台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020 分析，得到了酶解产物的肽指纹 (PMF) 图谱。以 PMF 图谱检索 Mascot 数据库，匹配到了有效的肽段序列信息，这些肽段归属于牛血清白蛋白 (BSA)。这表明此方法可以鉴定数据库中的蛋白质。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 蛋白质序列 牛血清白蛋白

MALDI-TOF-MS 因其分析速度快、通量高，是分析蛋白质序列的常用手段之一。传统分析蛋白质序列的 MALDI-TOF 体积较大，价格昂贵，而 MALDI-8020 作为台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，占地面积小，价格相对较低，性能与同等模式的大型质谱相比毫不逊色，同样可以较为方便地进行分析蛋白质序列。本文以牛血清白蛋白 BSA 为例，使用胰蛋白酶酶解后，采用 MonoSpin[®] C18 除盐，以 CHCA 为基质，应用 MALDI-8020 检测酶解产物，通过 Mascot 软件检索数据库，搜库结果与理论相符，匹配到了 BSA 的肽段序列，验证了 MALDI-8020 的检测结果，表明 MALDI-8020 可以满足蛋白质序列分析的要求。

■ 实验部分

1.1 仪器

MALDI-8020 台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪

1.2 分析条件

调谐模式：线性正离子模式

扫描范围：m/z 600-4000

激光器：355 nm 固态激光器

激光能量：75

■ 样品前处理

取 100 μ g 样品，应用 5 mM DTT (二硫苏糖醇) 和 20 mM IAA (碘乙酰胺) 进行还原烷基化处理后，加入 2 μ L 胰蛋白酶 (0.5 μ g/ μ L) 37 $^{\circ}$ C 酶解过夜。酶解完成后采用 MonoSpin C18 按照说明书进行脱盐。吸取 0.5 μ L 样品溶液和 0.5 μ L CHCA (5 mg/mL) 基质溶液点靶，自然干燥后送入质谱进行分析。

■ 结果与讨论

BSA 酶解产物的一级质谱检测结果如图 1 所示。从结果来看，酶解产物在 m/z 600-2100 之间检测到显著信号峰。将样品一级肽指纹图谱 (PMF) 通过 Mascot 软件检索数据库 SwissProt (2018_12, 558898 条序列) (参数设置见图 2)，结果如图 3 所示，成功匹配到蛋白质 ALBU_BOVIN (牛血清白蛋白) 的部分肽段序列，与理论一致。

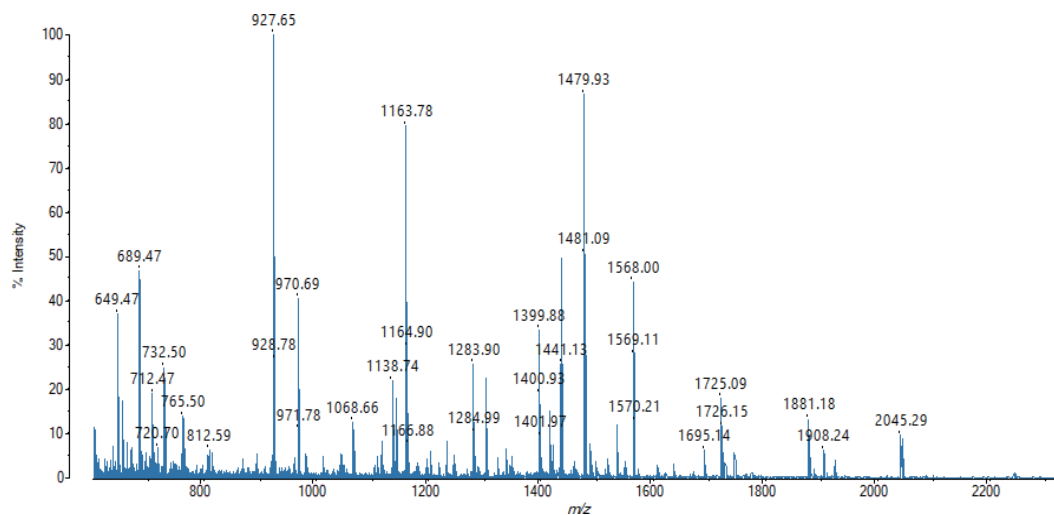


图 1 牛血清白蛋白的胰蛋白酶酶解产物的一级质谱图

Modifying parameters [protein-pep]

New Load Save Edit attributes (rename)

Mascot Search Parameters

Server parameters
Please specify a server URL to be used to submit searches
Server URL: Update

Search Parameters
Database: Enzyme:
Taxonomy: Hits:
 Decoy Missed cleavages:

Fixed modifications: Display all modifications

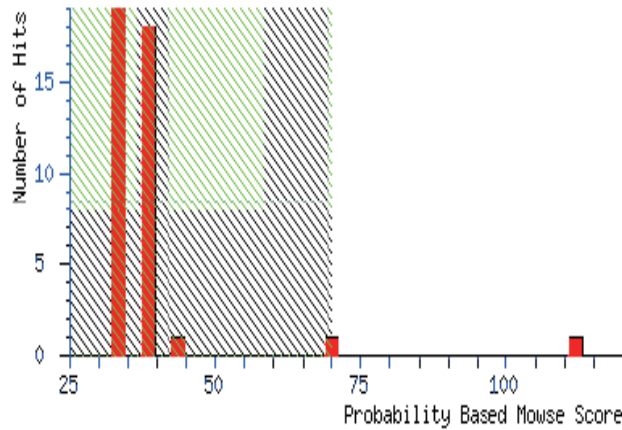
Variable modifications: Display all modifications

Peptide tolerance: Da Monoisotopic Average
Mass type:

Instrument:

OK Cancel

图 2 Mascot 检索参数



1. [sp|P02769|ALBU_BOVIN](#) Mass: 71244 Score: 112 Expect: 3.5e-006 Queries matched: 21
Serum albumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALB PE=1 SV=4

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
29 - 34	712.4700	711.4627	711.3664	0.0964	0	K.SEIAHR.F
66 - 75	1163.7800	1162.7727	1162.6234	0.1494	0	K.LVNELETFAK.T
89 - 100	1419.9900	1418.9827	1418.6864	0.2963	0	K.SLHTLFGDELCK.V
118 - 122	658.4600	657.4527	657.3082	0.1445	0	K.QEPEP.N
156 - 160	665.5300	664.5227	664.3697	0.1530	1	K.KFWGK.Y
161 - 167	927.6500	926.6427	926.4861	0.1566	0	K.YLYEIAR.R
168 - 183	2045.2900	2044.2827	2044.0206	0.2621	1	R.RHPYFYAPELLYANK.Y
205 - 209	649.4700	648.4627	648.3265	0.1362	0	K.IETMR.E
236 - 241	689.4700	688.4627	688.3656	0.0971	0	K.AWSVAR.L
347 - 359	1568.0000	1566.9927	1566.7354	0.2573	0	K.DAFLGSLFYEYSR.R
360 - 371	1439.9800	1438.9727	1438.8045	0.1683	1	R.RHPEYAVSVLLR.L
361 - 371	1283.9000	1282.8927	1282.7034	0.1894	0	R.HPEYAVSVLLR.L
402 - 412	1306.0200	1305.0127	1304.7088	0.3039	0	K.HLVDEPQNLK.Q
413 - 420	1068.6600	1067.6527	1067.4342	0.2185	0	K.QNCDQFEK.L
421 - 433	1479.9300	1478.9227	1478.7881	0.1346	0	K.LGEYGFQNALIVR.Y
460 - 468	1166.8800	1165.8727	1165.4856	0.3871	0	R.CCTKPESER.M
469 - 482	1725.0900	1724.0827	1723.8273	0.2554	0	R.MPCTEDYLSLILNR.L
499 - 507	1138.7400	1137.7327	1137.4907	0.2420	0	K.CCTESLVNR.R
508 - 523	1881.1800	1880.1727	1879.9138	0.2589	0	R.RPCFSALTPDETYVPK.A
524 - 528	609.4600	608.4527	608.2806	0.1721	0	K.AFDEK.L
569 - 580	1399.8800	1398.8727	1398.6853	0.1874	0	K.TVMENFVAFVDK.C

图 3 牛血清白蛋白酶解产物的一级 PMF 搜库结果

结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 检测牛血清白蛋白的酶解产物，搜库结果与理论相符，成功匹配到了牛血清白蛋白的肽段序列。MALDI-8020 作为台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，体积紧凑、分析速度快、仪器维护方便，性能卓越，是蛋白质序列分析的有力工具。

使用台式 MALDI-TOF MS 检测甲硫氨酸氧化修饰

MALDI-TOF MS 是获得肽或蛋白质分子量及一级结构相关信息的一种迅速而又简便的方法。在各种裂解方法中，源内分解 (ISD) 可以用于“自上而下”蛋白质组学，得到蛋白质序列。它可以利用氢自由基迁移生成 c- 及 z- 碎片离子系列。与源后裂解 (PSD) 相比，ISD 的一大优势在于理论上不受样品质量的限制，无需进行酶消化，直接对较大的蛋白质进行测序。MALDI-ISD 工作流程的概要如图 1 所示。

在制药行业的生物相关药品开发过程中，为了对失活、毒性等对治疗带来影响的可能性进行监控，作为质量管理过程的一个组成部分，对制剂配方或降解等导致的变化进行跟踪是非常重要的。其中，肽或蛋白质的甲硫氨酸残基氧化就是一个伴随降解出现修饰的例子。甲硫氨酸同其他氨基酸相比，非常容易氧化。

在这里我们为您介绍通过使用台式 MALDI-TOF 质谱 MALDI-8020 通过进行精确的完整分子量分析和自上而下的序列解析，确定 Exendin-4 肽的甲硫氨酸氧化 (Met-O) 修饰的实例。可以说，在生物相关药品的 QC 中，这种方法对确定不希望在生产工艺中出现的变化来说是一种有效的方法。

样品和方法

Exendin-4 肽取自 Sigma-Aldrich。甲硫氨酸的氧化按照以下方法进行: Exendin-4 与 1%过氧化氢 (H₂O₂, pH 中性) 在 37°C 条件下孵育 15 分钟。对样品溶液进行酸化处理，使用 ZipTip® C18 (Millipore 公司生产) 对肽进行纯化。

将天然肽及 Met-O 肽与 α - 氰基 -4- 羟基肉桂酸 (CHCA, 5 mg/mL, 50% 乙腈 /0.1% 三氟乙酸) 混合，取 1 μ L 滴在靶标上并干燥。为了进行 ISD 分析，将天然肽及氧化型肽与 1,5- 二氨基萘 (溶解在 50% 乙腈 /0.1% 三氟乙酸中的 1,5-DAN 饱和溶液) 混合，取 1 μ L 滴在靶板上并干燥。

装置使用台式 MALDI-TOFMS 中的 MALDI-8020，按照图 1 中所述的测定条件进行分析

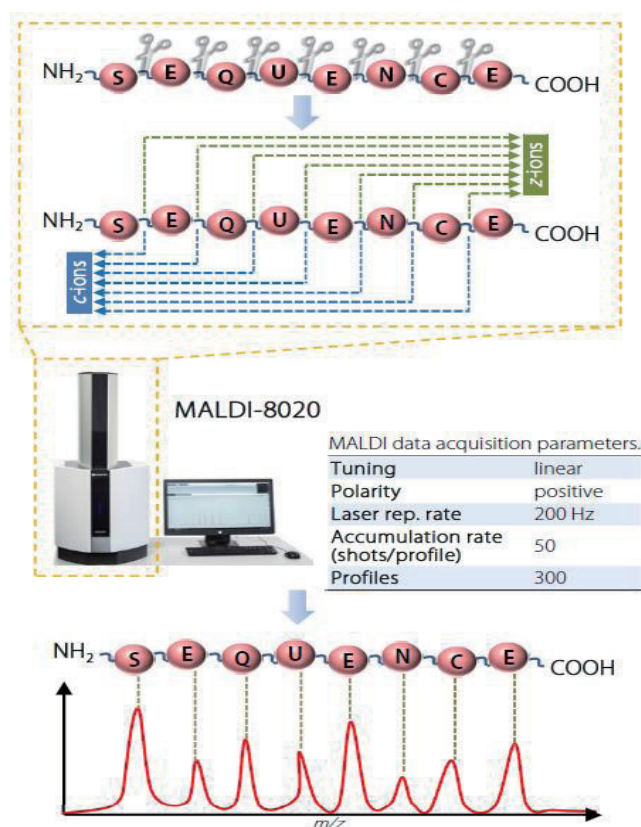


图 1 MALDI-ISD 的工作流程及质谱采集参数

结果

Exendin-4 是存在于吉拉毒蜥 (*Heloderma suspectum*) 唾液中的天然肽。它的合成形式 -Exenatide, 用于治疗 2 型真性糖尿病。

天然 Exendin-4 的 MALDI-MS 谱图如图 2 a) 所示。图中质量标签与检测到的单同位素峰相对应。

从图 2 b) 的摄像机图像中可以看出, 通过优化的样品制备方法而得到的样品具有非常良好的均一性。在质谱的放大区域 (图 2 c) 及 d)) 中, 显示出碎片离子 (m/z 1200-2800 范围) 单同位素峰的良好分辨率。

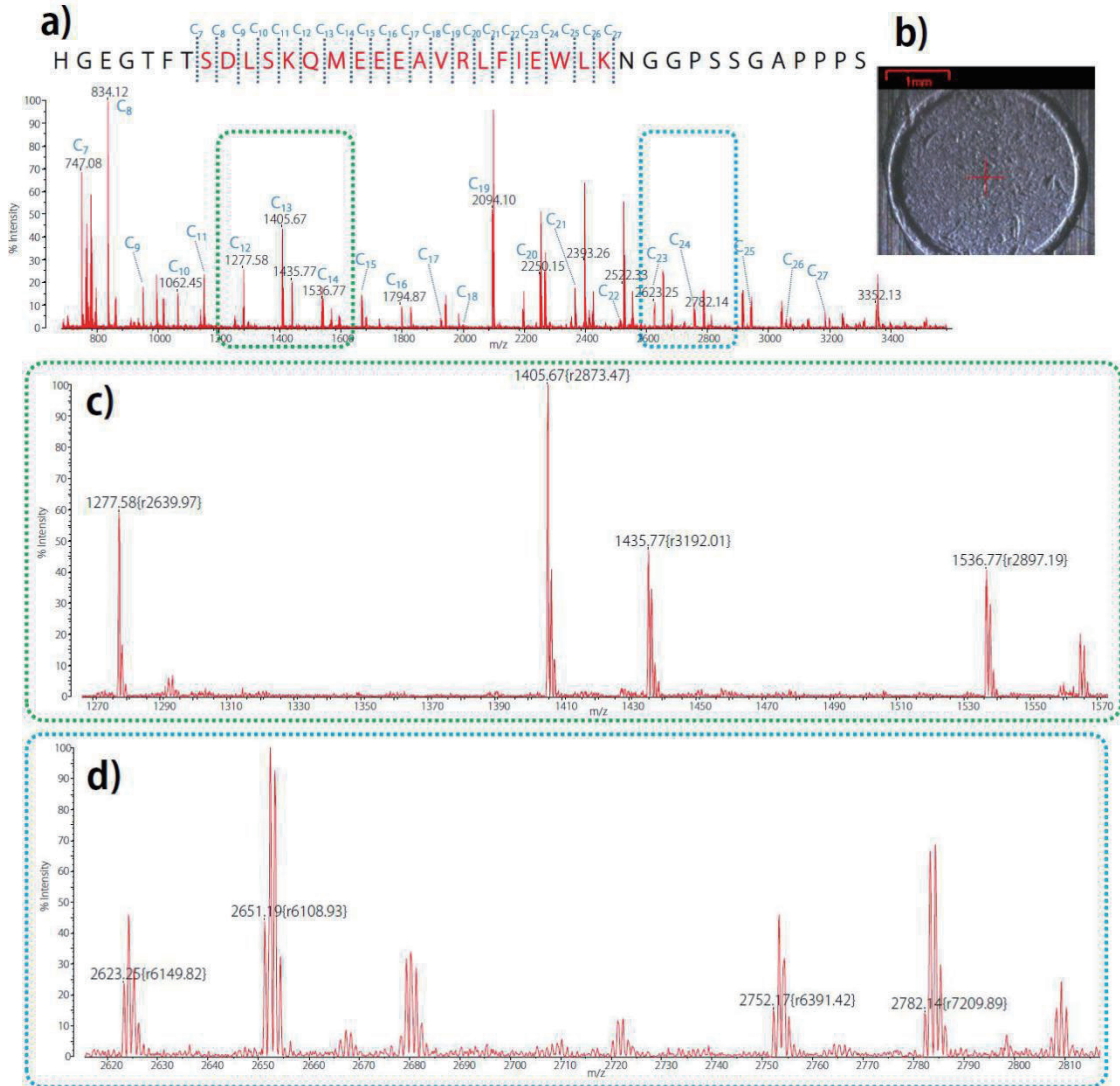


图 2 a) 天然 Exendin-4 的 MALDI-MS 谱图; b) 使用 1,5-DAN 作为基质的良好的摄像机图像; c) & d) MS 谱图的放大图

为了进行 Mascot-MS 数据库检索, 创建了添加 Exendin-4 序列的定制版 Swiss-Prot 数据库, 然后, 使用 MALDI Solutions 软件的检索工具进行了 Mascot-MS 检索。结果如图 3 所示, 得到了有效的得分 (图 3 a)) 和序列覆盖率 (72%; 图 3 b)) 。

完成氧化反应后, 进行了肽分子量的测定, 确认成功发生了氧化反应。在使用 CHCA 基质得到的图 4 的谱图中, 天然型 (红线) 及氧化型 (蓝线) Exendin-4 的质谱表现出非常好的质谱精度和分辨率。正如预测所示, 在 Exendin-4 中有一处甲硫氨酸支链被氧化, 检测到了与生成的亚砷相对应的 +16Da 的质量迁移。

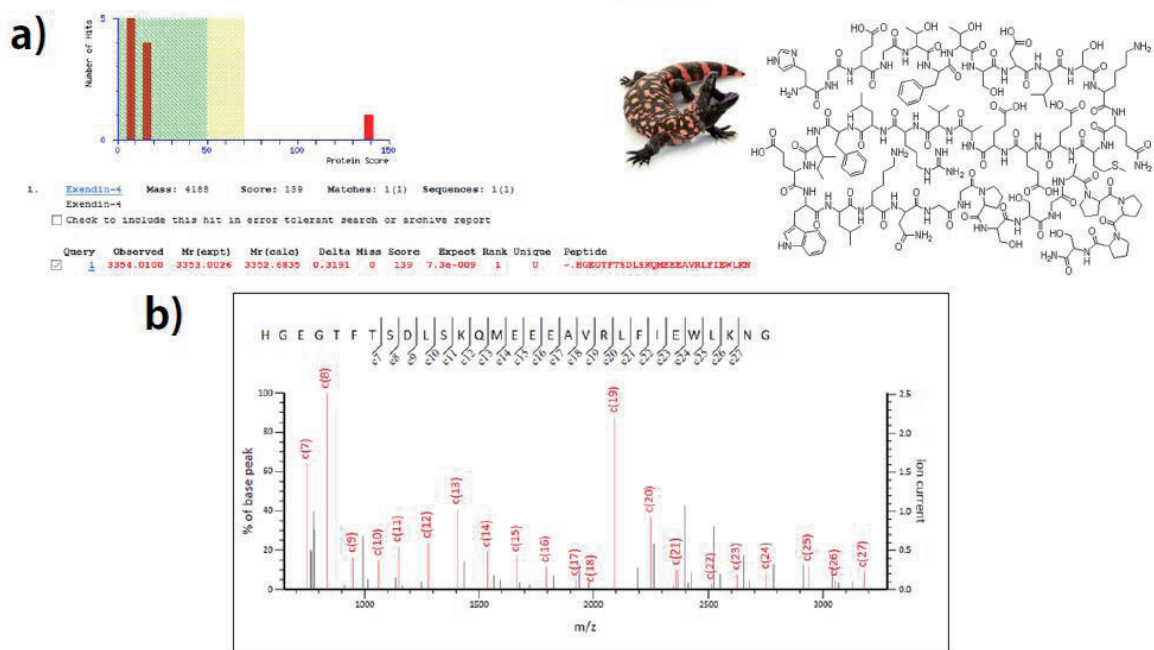


图 3 a) MALDI-MS/MS 的 Mascot 检索结果; b) Mascot 碎片离子匹配图

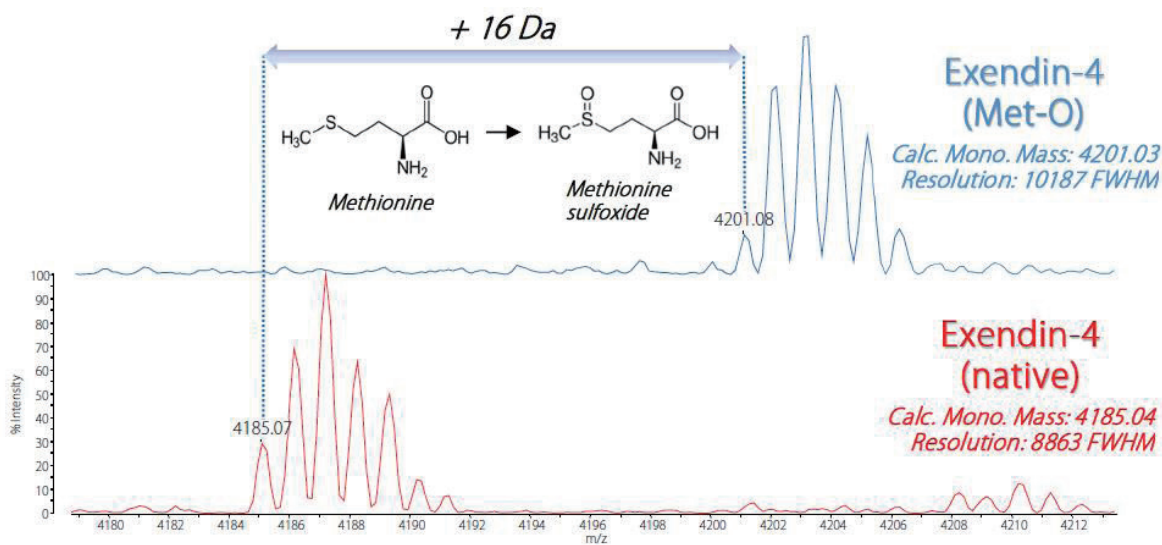


图 4 天然型 Exendin-4 (红线) 及 Met-O (蓝线) Exendin-4 的一级质谱图 (基质: CHCA)

氧化型 Exendin-4 的 MALDI-MS/MS 谱图如图 5 a) 所示。通过 ISD 检测到了在 N 末端生成的 c-ion 系列 (c9-c13) 及 16Da 迁移的 c- 离子 (c14-c29)。c14 离子 (用绿色显示) 是与含甲硫氨酸残基的氧化部位相对应的碎片离子。

在图 5 b) 中对天然 (红线) 和氧化体 (蓝线) Exendin-4 的碎片离子 (m/z 1400-1650) 进行了比较。这里显示的碎片离子信号也表现出良好的同位素分离。

正如所期待的那样, c14 离子 (HGEFTSDLSKQM) 显示了与甲硫氨酸的氧化相对应的 16Da 的质量迁移。Exendin-4 (Met-O) ISD 图谱的 Mascot 检索采用了先前创建的定制数据库, 并指定甲硫氨酸氧化为固定修饰, 其结果如图 5 c) 所示, 获得了有效的 Mascot 得分。

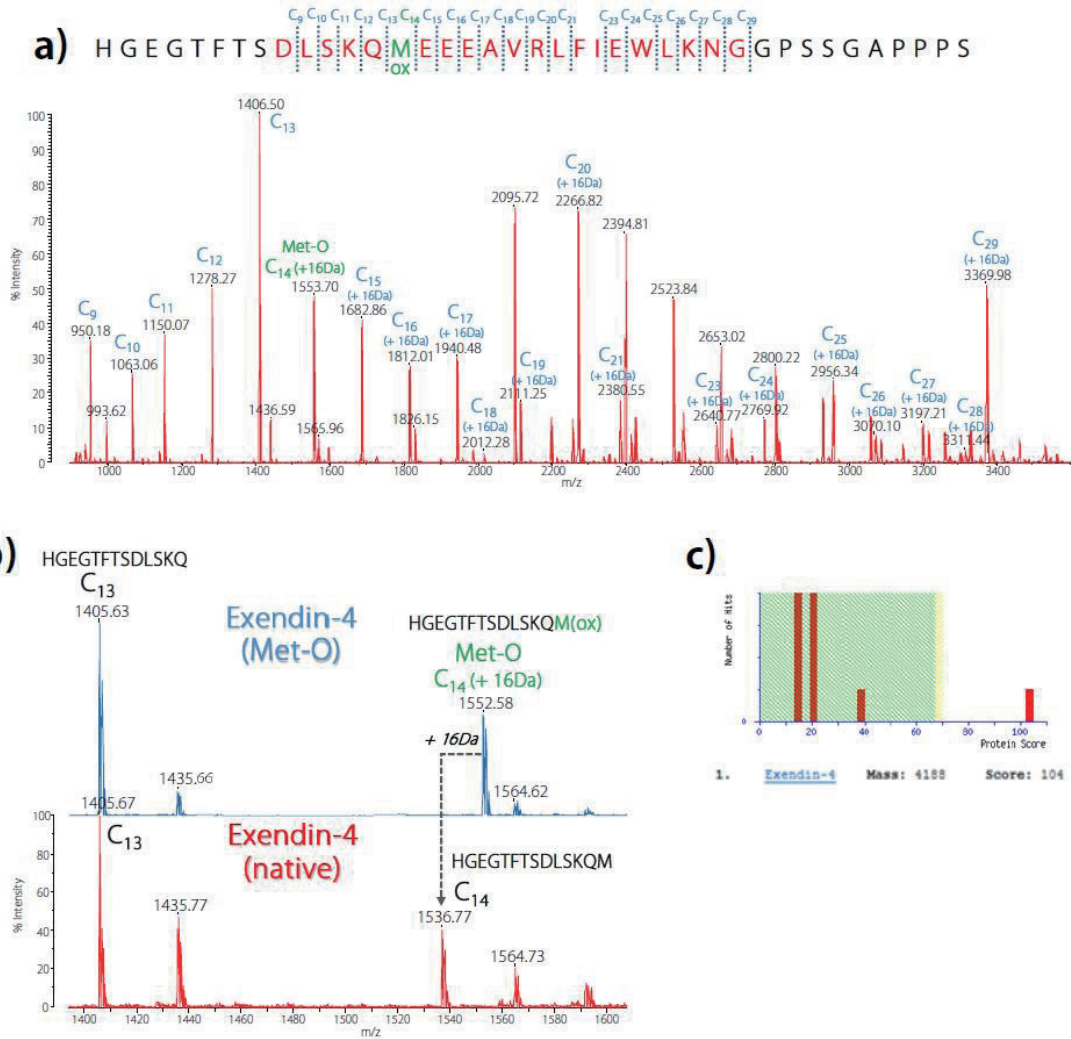


图 5 a) Exendin-4 (Met-O) 的 MALDI-MS 谱图; b) 显示甲硫氨酸氧化导致质谱迁移的碎片离子 (c14) 的局部放大图; c) Exendin-4 (Met-O) 的 Mascot-MS/MS 得分

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B078 应用报告。

第三节 动物毛发分析中的应用

动物毛发的主要成分是由一系列氨基酸经肽键结合成链状结构的蛋白质。动物毛发纤维柔软富有弹性，保暖性好，吸湿能力强，光泽柔和，可以制成四季皆宜的中高档服装，以及装饰物和工业用织物。传统通过肉眼观察毛发的形状结构，或红外光谱特征进行鉴定分析。

羊绒是长在山羊外表皮层，掩在山羊粗毛根部的一层薄薄的细绒，入冬寒冷时长出，抵御风寒，开春转暖后脱落，自然适应气候的变化。羊绒因为它的稀缺性，也被称为“软黄金”。而常见的羊毛来自绵羊，羊毛衫的原料是绵羊毛，不适合贴身穿，会有扎人的感觉。因此对羊绒羊毛的鉴别十分必要。

2018年9月，国际标准化组织（ISO）发布了利用MALDI-TOF MS检测特征性多肽来进行纺织品中动物毛发纤维定性和定量分析的方法（ISO 20418-2: 2018）。国内也有单位进行该ISO标准国际化的工作，后续岛津公司也会参与该标准的验证工作。

TC > ISO/TC 38

ISO 20418-2:2018

TEXTILES — QUALITATIVE AND QUANTITATIVE PROTEOMIC ANALYSIS OF SOME ANIMAL HAIR FIBRES — PART 2: PEPTIDE DETECTION USING MALDI-TOF MS

ABSTRACT PREVIEW

This document specifies a qualitative and quantitative procedure to determine the composition of animal hair fibre blends by MALDI-TOF MS.

The composition of non-animal hair fibres can be measured by methods described in the ISO 1833 series. Both results are then combined to determine the whole composition of fibres.

The method is based on a preliminary identification, by light microscopy, of all fibres in a blend on the basis of their morphology, according to ISO/TR 11827. In case fibres of the same animal species are present (e.g. blends of cashmere and mohair), the method is not applicable and the quantitative analysis can be performed using microscopical analysis (e.g. as described in ISO 17751 series).

GENERAL INFORMATION o

Status : © Published

Publication date : 2018-09

Edition : 1

Number of pages : 23

Technical Committee : ISO/TC 38 Textiles

ICS : 59.060.01 Textile fibres in general

ISO 20418-2: 2018 标准

使用台式 MALDI-TOF 质谱分析仪辨别动物毛发

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析仪 (MALDI-TOF MS) 可以简便、快速获取涵盖肽和蛋白质、合成高分子等各种高分子样品分子量信息。该 MALDI-TOF MS 广泛用于研究和开发以及质量控制领域的合成产品和天然产物的分子量确认。

作为 MALDI 的一项新用途, 提倡采用通过检测具有物种属特异性的动物毛发肽以辨别动物毛发的方法。该辨别方法获得国际标准化组织 (ISO) 的认证, 形成 ISO 规格, 是“利用山羊绒等动物毛发纤维的肽法的试验法”。该辨别方法也适用于 1 根毛发的分析, 因此不仅可以防止伪造山羊绒, 也可应用于食品等当中的异物混入检查。

下面介绍了使用台式 MALDI-TOF MS 的 MALDI-8020 辨别动物毛发的事例。

■ 样品的预处理

使用剪刀和球磨机等将山羊绒、羊毛以及牦牛、羊驼、骆驼、马、兔子的原毛粉碎。向 10 ~ 50 mg 粉碎后的原毛内加入 0.5 mL 包含 50 mM 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 的 4% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 以及 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 7.8), 在 95 °C 下加热 15 分钟 ~1 小时。加热后, 在提取液中加入碘乙酰胺, 浓度达到 100 mM, 在室温下反应 15 分钟, 添加 25 mM 的 DTT 10 μ L 后停止反应。使用三氯乙酸沉淀该提取液, 洗净后, 使用 50 mM 碳酸氢铵稀释再次溶解于 7 M 尿素和 2 M 硫脲溶液的提取液, 加入 2.0 μ g 的胰蛋白酶, 在 37 °C 下消化一晚。

使用 ZipTip® μ C18 (Merk Millipore) 进行脱盐处理。将完成脱盐处理的样品溶液滴加到 MALDI 靶板后, 滴加 0.5 μ L 的基质溶液, 进行质谱分析。此外, 为保证基质中 CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) 为 5 mg/mL, 使用溶解于 50% 乙腈 /0.05% 三氟醋酸 (trifluoroacetic acid, TFA) 的溶液。

质谱分析使用的是台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020”, 在线性正模式下进行测定。尝试通过采用统计解析软件 eMSTAT Solution™ 解析从各质谱获得的谱峰列表, 辨别各动物毛发。

■ 结果

动物毛发的胰蛋白酶消化肽的质谱如图 1 所示。在 m/z 2450-2750 范围内, 检测出具有物种属特异性的肽谱峰。利用该特异性谱峰可辨别动物毛发。构成动物毛发的蛋白质主要为角蛋白, 检测出的肽也来自角蛋白。

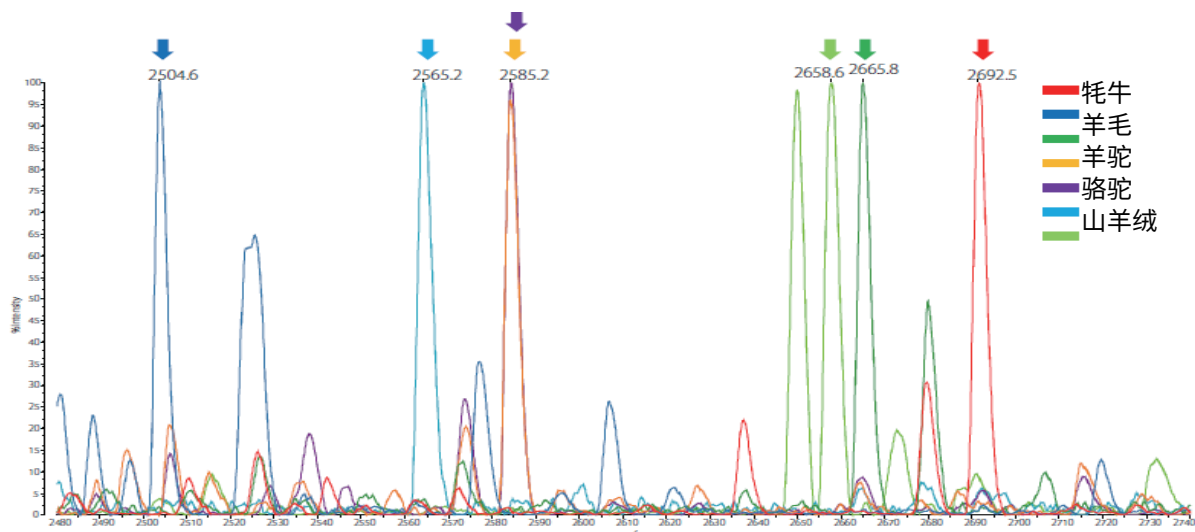


图 1 动物毛发的胰蛋白酶消化肽的质谱

表 1 keratin type I 物种特异性氨基酸排列顺序

物种	Keratin Type I Protein	氨基酸排列	[M+H] ⁺ 平均质量 *1
山羊绒	Keratin 33A [Capra hircu]	YSCQLNQVQSLIVNVESQLAEIR	2692.38
牦牛	Keratin type I microfibrillar, 47.6 kDa-like [Bos mutu]	YSSQLAQVQGLIGNVESQLAEIR	2504.81
羊毛	Keratin 33B [Ovis arie]	YSCQLSQVQSLIVNVESQLAEIR	2666.03
骆驼 / 羊驼	Keratin, type I microfibrillar, 47.6 kDa[Camelus dromedaries]	YGSQLSQVQGLITNVEHQLAEIR	2584.90
马	Keratin 33A [Equus caballu]	YSSQLSQVQGLITNVESQLAEIR	2564.86
兔子	Keratin, type I cuticular Ha3-I [Oryctolagus cuniculu]	YSSQLSQVQCMISNVESQLGEIR	2657.99
犬	Keratin 33A [Canis lupus familiari]	YSSQLNQVQCMITNVESQLAEIR	2713.07
褐鼠	Keratin 31 [Rattus norvegicu]	YSSQLSQVQCLITNVESQLGEIR	2653.98
人	KRT34 protein [Homo sapien]	YSSQLSQVQSLITNVESQLAEIR	2594.89

*1 计算碘乙酰胺对氨甲酰甲基化的半胱氨酸残基的平均质量。

物种特异性谱峰的归属结果如表 1 所示。该氨基酸排列来自 keratin type I。从该排列可以看出，除此次测定的物种之外，人和褐鼠也具有特异性。另外，仅羊驼和骆驼的特异性谱峰质谱一致，因此无法相互辨别。

此外，采用图 2 所示的物种特异性谱峰和 eMSTATSolution，制作了判别动物毛发、物种的判别模型（算法：Support Vector Machine）（图 2 左）。采用制成的判别模型，对另行测定的山羊绒、牦牛毛、羊毛等 3 种样品进行了判别分析，全部判别出正确的物种（图 2 右）。

判别模型制作

Discrimination Model

Name: Animal Hair2450-2750_SVM Algorithm: SVM

Training Data: 2019/03/06 13:06:33 Cross Validation: Type: KFold

Kernel Scale: 1.15024 Auto Box Constraint: 0.01409 Auto Value: 2

Max Evaluations: 10 Estimated Error: 2%

Training Data

m/z	ANOVA	Cashmere(S)	Yak(S)	Wool(S)	Alpaca(S)	Camel(S)	Horse(S)	Rabbit(S)
2464.270	8.0282E-1	8	8	0	0	0	0	0
2480.760	5.3168E-1	0	5	0	0	0	0	0
2488.330	0.000514	0	4	0	0	0	0	0
2503.730	1.41E-21	0	8	0	0	0	0	0
2506.150	5.8129E-1	0	0	8	0	0	0	0
2524.920	8.4333E-1	0	8	0	0	0	0	0
2526.210	0.29637	3	3	2	0	0	0	0
2537.900	1.3764E-1	0	0	0	0	5	0	0
2564.300	1.8893E-1	0	0	0	0	0	8	0
2572.790	0.016946	0	0	2	4	4	0	0
2574.220	0.00239	0	0	0	4	4	0	0
2577.060	1.2193E-1	0	8	0	0	0	0	0
2584.180	2.3494E-1	0	0	0	8	8	0	0
2606.900	2.9707E-1	0	0	7	0	0	0	0
2637.520	1	2	8	0	0	0	0	0
2649.830	1.047E-11	0	0	0	0	0	8	8
2657.640	1.036E-41	0	0	0	0	0	8	8
2665.050	6.8134E-1	0	0	8	0	0	0	0
2673.650	0.036751	0	0	0	0	0	0	3
2679.540	1.0154E-1	8	0	8	0	0	0	0
2691.640	1.5588E-1	8	0	0	0	0	0	0

判别分析

Sample Name & Result

Name	test1_c	test2_c	test3_c	test5_w	test6_wc	test7_wc	test9_ye	test10_ye	test11_ye
Group	Cashme	Cashme	Cashme	Wool	Wool	Wool	Yak	Yak	Yak
Score	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2464.2700	---	7121.64	2699.0	3876.01	6225.32	2892.2	---	8174.82	---
2480.7600	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2488.3300	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2503.7300	---	---	---	---	---	---	29521.7	39587.23	9901.4
2506.1500	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2524.9200	---	---	---	---	---	---	7317.98	13846.9	4605.66
2526.2100	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2537.9000	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2564.3000	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2572.7900	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2574.2200	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2577.0600	---	---	---	---	---	---	10292.5	14461.96	3260.26

图 2 动物毛发的判别分析（左：制成的判别模型；右：动物毛发的判别分析结果）

总结

结果表明，使用台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020 和统计解析软件 eMSTAT Solution，可以快速辨别动物毛发。使用该方法，不仅是山羊绒，还可对羽毛和人类毛发等各种对象进行辨别。MALDI-8020 兼具台式的紧凑性和充分的分子谱分析性能，可以简便、快速地评价多种样品的特性，未来将拥有广阔的发展前景。

本文译自岛津全球应用开发中心（GADC）No. B095 应用报告。

应用台式 MALDI-TOF-MS 进行羊绒羊毛定量检测

摘要：本文对羊绒羊毛混合物样品进行蛋白质提取及酶解后，应用岛津台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 对酶解产物进行质谱分析，结果显示羊绒羊毛混合标准品定量校准曲线线性关系良好，实际样品检测结果与预期相符，表明台式线性 MALDI-8020 可以满足羊绒制品中羊绒及羊毛的定性及定量检测要求。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF 羊绒 羊毛

羊绒制品中羊绒含量的检测及含量标注的真实性一直是消费者及质检等相关部门关心的问题。传统的检测方法为使用显微镜对毛发纤维进行形态观察，但这种方法费时费力，主观性强，检测结果的准确率依赖于操作者的经验。依靠毛发纤维中的特征性 DNA 或蛋白质进行鉴别及定量检测是近些年发展起来的方法，这两种方法相比传统方法更加准确，分析通量更高。DNA 检测的方法不适合 DNA 受损伤的样品，相比之下，蛋白检测的方法适用样品范围更广。2018 年，国际标准化组织（ISO）发布了利用 MALDI-TOF MS 检测特征性多肽来进行纺织品中动物毛发纤维定性和定量分析的方法（ISO 20418-2: 2018）。本文参照该方法应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 在线性模式下对羊绒及羊毛混合物标准品及实际样品进行了定性及定量分析，标准品定量标准曲线线性良好，实际样品检测结果与预期相符，这表明，台式线性 MALDI-8020 可以满足羊绒制品中羊绒及羊毛的定性及定量分析要求。

实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020

1.2 分析条件

调谐模式：线性正离子模式

激光器：355 nm 固态激光器

扫描范围：m/z 2000-4000

激光能量：70

样品前处理

用剪刀和球磨机将羊绒、羊毛原毛粉碎。取粉碎原毛 10mg，加入 0.5 ml 的蛋白质提取液（50mM DTT，4% SDS，0.1 M 磷酸缓冲液，pH 7.8），混匀后 95°C 水浴 20 分钟。加入 10 μ L DTT（二硫苏糖醇）（190 mg/mL）溶液，95°C 水浴 15 分钟，加入 50 μ L IAA（碘乙酰胺）溶液（94 mg/mL）室温静置 30min，再加入 20 μ L DTT 溶液终止反应。12000 rpm 离心 2 min，取上清。取 10 μ L 蛋白质提取液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，考马斯亮蓝染色，切割蛋白条带经洗涤液（50 mM 碳酸氢铵溶液，50% 乙腈）洗涤后，加入胰蛋白酶酶解。取 1 μ L 酶解产物点靶，添加 1 μ L CHCA（ α -氰-4-羟基肉桂酸，5mg/mL）基质溶液，自然干燥后送入仪器分析。每个靶点重复点靶三次。

结果与讨论

羊绒与羊毛混合标准品酶解产物的质谱检测结果如图 1 所示。动物毛发含有的主要蛋白质为角蛋白，所检测到的多肽信号峰主要来源于角蛋白。依靠角蛋白含有的物种特异性信号峰，可以鉴别动物毛发的种类。羊毛及羊绒含有的特征峰的序列及分子量信息见表 1。由质谱检测结果可知，样品在 m/z 2691 与 m/z 2664 附近检测到了与羊绒、羊毛相对应的特征峰，且检测到的特征峰信号峰强度随着样品比例的变化而变化。根据不同比例羊绒与羊毛混合标准品中的羊绒特征峰的相对信号强度 ($=\text{intensity}(\text{羊绒}) / [\text{intensity}(\text{羊绒}) + \text{intensity}(\text{羊毛})]$) 的平均值计算羊绒含量与羊绒相对信号强度的校准曲线，结果见图 2。

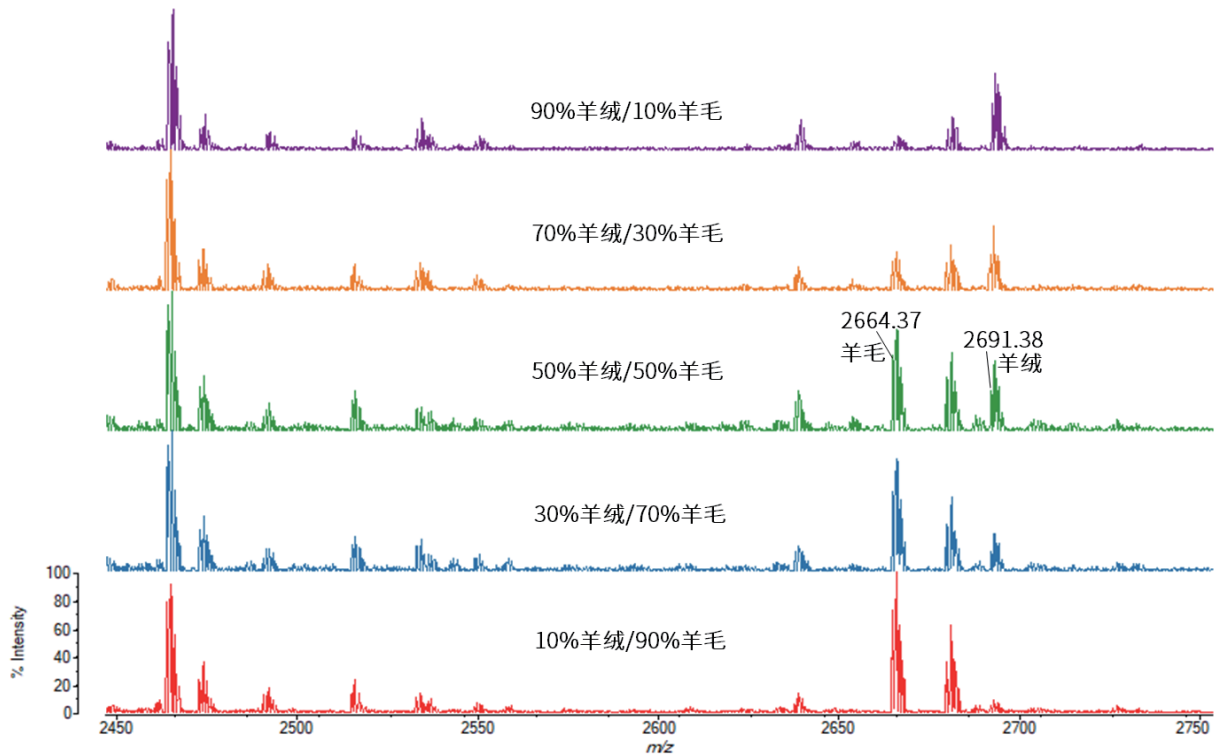


图 1 羊绒羊毛混合标准品酶解产物一级质谱图

表 1 羊绒与羊毛物种特异性 I 型角蛋白多肽位点

样品种类	I 型角蛋白	多肽序列	Mw[M+H] ⁺ _{Mono}
羊绒 (山羊)	Keratin 33A [Capra hircus]	YSC [*] QLN [*] QVQSLIVNVESQLAEIR	2691.38
羊毛 (绵羊)	Keratin 33B [Ovis aries]	YSC [*] QLS [*] QVQSLIVNVESQLAEIR	2664.37

注：* 代表 C 上发生烷基化修饰

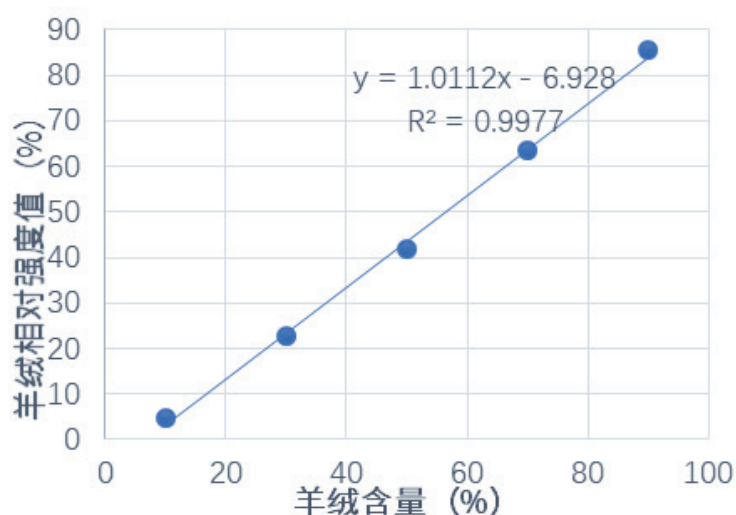


图 2 羊绒、羊毛混合物中羊绒含量的校准曲线

根据建立的校准曲线，测试经权威检测部门验证过的实际样品，样品羊绒含量标注值及实测值统计结果见表 2 所示。由结果可知，实际样品检测结果与标注值一致，表明该方法可以用于羊绒制品中羊绒含量的检测。

表 2 羊绒制品实际样品检测结果

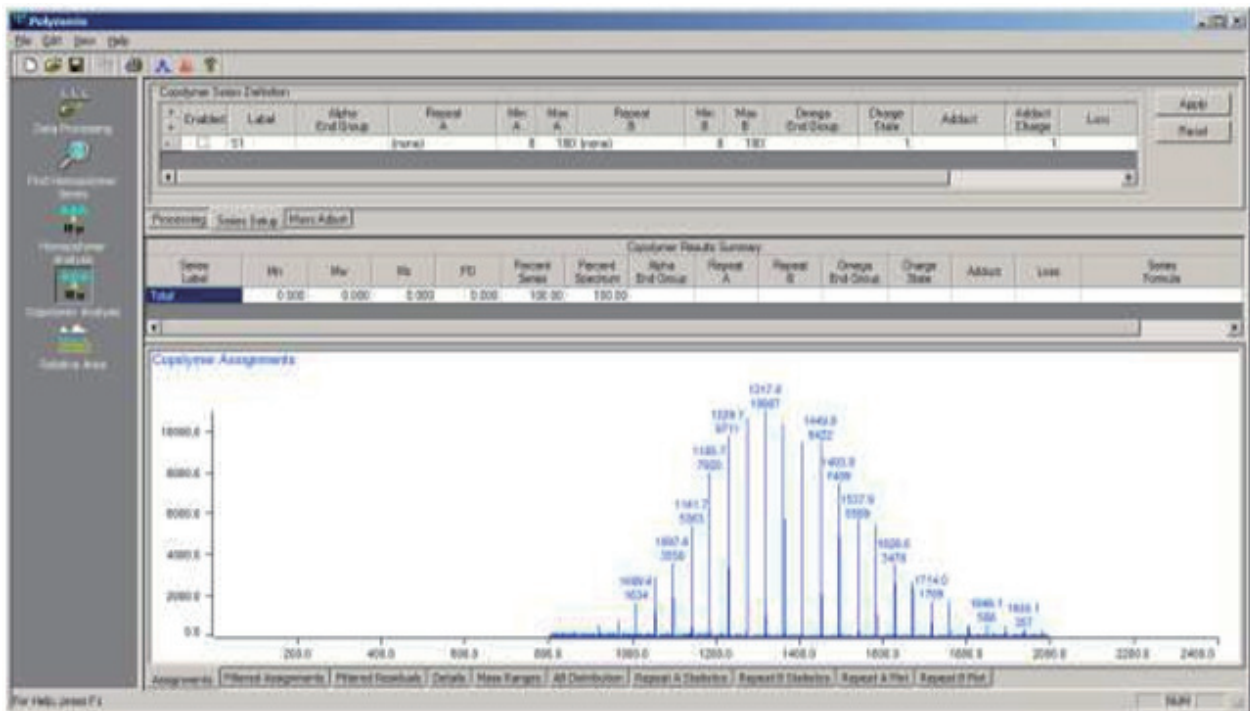
样品	1	2	3	4	5
标注值 (%)	10	16	30	50	100
实测值 (%)	11.3	15.8	26.7	52.1	100
实测值标准偏差	0.22	0.13	0.29	0.41	0

■ 结论

本文应用台式基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 MALDI-8020 在线性模式下对羊绒羊毛混合物进行了定量分析，检测结果与理论一致，表明台式线性 MALDI-8020 可以用于羊绒羊毛定量检测。MALDI-8020 作为台式基质辅助激光解析电离飞行时间质谱，体积紧凑、检测成本低，定量结果准确可靠，分析速度快，适合进行核酸、蛋白质 / 多肽、多糖、脂质等各类样品的高通量检测，有望在质检领域的定量分析检测方面有更加广泛的应用。

第四节 聚合物、材料分析中的应用

聚合物分子量测定的常见方法有：端基分析法、气相渗透法、膜渗透法、光散射法、超速离心沉降平衡法、粘度法及凝胶渗透色谱法 (GPC)。MALDI-TOF 作为一种快捷的分析方法，与传统方法相比，无需复杂的前处理，能容忍少量盐或缓冲液。通过合成高分子的 MALDI-TOF MS 分析，可以获得精确分子量、平均分子量、多分散度、聚合度、单体质量、残基质量、构成分子量分布的同族聚合物峰的数量等各种分子量相关信息。岛津 AXIMA 系列仪器分析软件 Launchpad 配置了聚合物分析软件 Polymer Analysis，MALDI-8020 及 MALDI-7090 的分析软件 MALDISolutions 可以和第三方聚合物分析软件 Polymerix 联用，均能快速分析获取聚合物相关信息。



聚合物分析软件 Polymerix 分析界面

台式 MALDI-TOF MS 应用于 快速检测低分子量化合物

通常认为 MALDI-TOF MS 是一种能有效对蛋白质和多肽等大分子进行分析的方法，但是 MALDI-TOF MS 也可以用于快速简便地分析低分子量化合物。尤其是 MALDI-TOF MS 不易受分析样品中所含盐等的影响，无需通过纯化等预处理即可直接分析产品中的成分。例如，可直接分析市场上口腔护理产品中的杀菌成分（聚维酮碘和葡萄糖酸氯己定等），以及类似的低分子量消毒剂成分。

本文将针对采用台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020”，检测市售口腔护理产品中消毒剂成分的事例展开介绍。

■ MALDI-TOF 质谱仪

使用台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” 进行分析。该装置保持了现有 AXIMA Assurance 的卓越性能，是一款实现小型化的正离子模式专用装置。MALDI-TOF 质谱仪采用 200Hz 固态激光器作为电离激光，除配备全自动离子源清洗装置外，还采用无油隔膜泵的新设计。

■ 产品中聚维酮碘的直接检测

聚维酮碘是一种具有杀菌作用和表面活性的低分子量聚合物，系漱口水等口腔护理产品中含有的一种药物。将市售漱口水（A）极少量滴到 MALDI 靶板上，再点上 0.5 μ L 的基质溶液，干燥后进行分析。测定所得质谱图如图 1 所示。

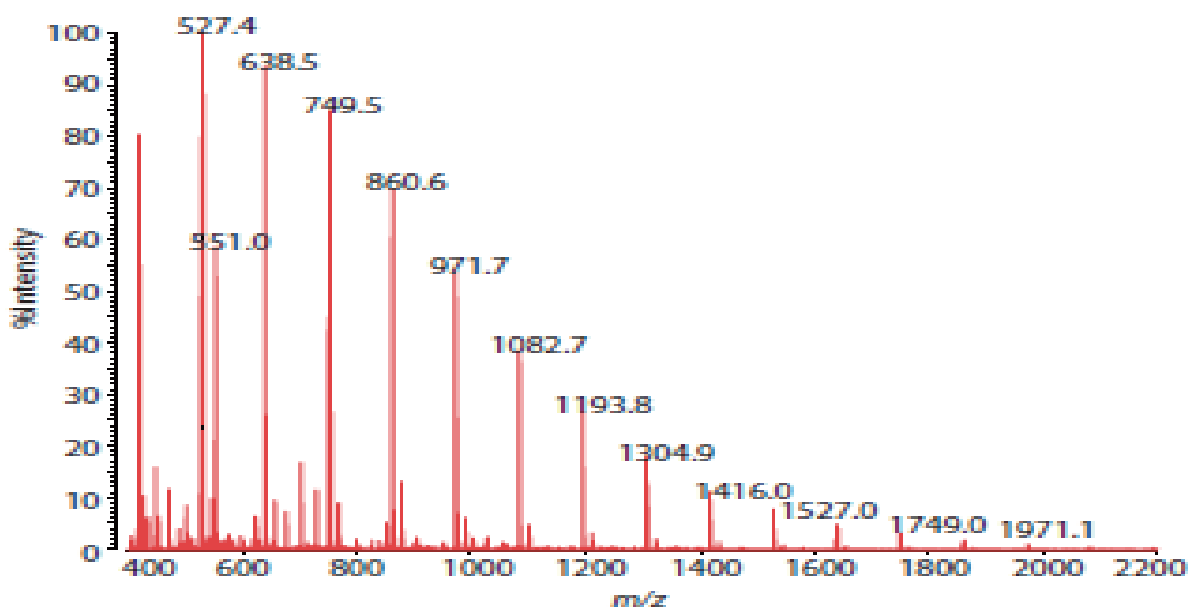


图 1 市售漱口水（A）的质谱图
测定模式：Positive Linear

如图 2 所示，通过放大的质谱图，可确认源自聚维酮碘组分之一的聚乙烯吡咯烷酮的质量差信号。

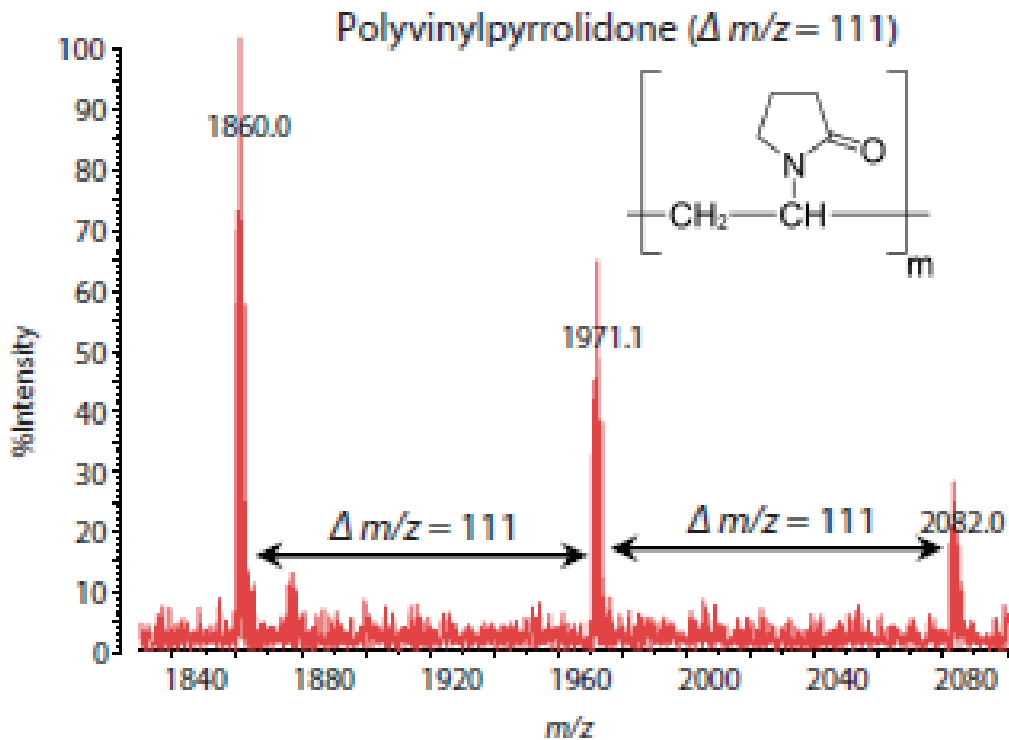


图 2 市售漱口水 (A) 的质谱放大图
测定模式: Positive Linear

■ 产品中氯己定的直接检测

氯己定以葡萄糖酸盐的形式存在于产品中。与聚维酮碘的操作相同，将市售漱口水 (B) 极少量滴到 MALDI 靶板上，再点上 0.5 μ L 基质溶液，干燥后进行检测。测定所得质谱图如图 3 所示，在谱图上观察到氯己定的信号。

氯己定含有两个氯原子，可以获得特殊的同位素分布。将测得的谱图与理论同位素分布进行比较，可以看出两者一致。如此，通过使用正离子线性模式专用台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020”，无需预处理即可简单快速地检测出产品中所含的低分子量化合物。

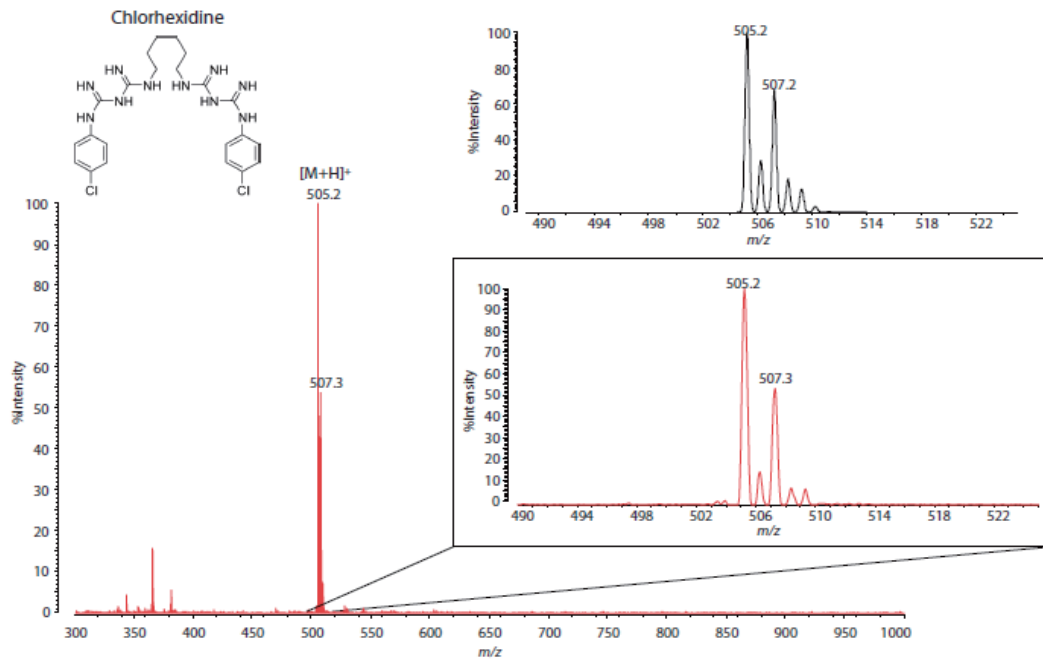


图3 市售漱口水 (B) 的质谱图和氯己定的理论同位素分布
 红：实测质谱图、黑：理论同位素分布图

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B068 应用报告。

台式 MALDI-TOF MS 应用于 合成高分子分析

近年来，受保护地球环境的影响，很多与回收相关的法律都已经执行了。相应地，我们身边的可再生塑料产品也不断增多。于是，快速并且详细地分析再生产品的需求日益增加。在这种情况下，可以通过分析寡聚体而非聚合物整体来获得足够的信息。按照惯例，寡聚体一般通过使用溶解 / 再沉淀等粗分离法、结合各种色谱法以及光谱法进行分析。

另一方面，近年来 MALDI-TOF MS 广泛应用于寡聚体的分析，通过使用该装置，可以快速获取末端基团和单体单元的信息。

本文以聚碳酸酯为例，介绍了通过溶解 / 再沉淀法对寡聚体进行粗分离，并结合台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020 对该寡聚物进行分析的全过程。

■ 台式 MALDI-TOF MS：MALDI-8020

MALDI-8020 虽然是一款拥有目前世界最小尺寸和安装面积的线性 MALDI-TOF MS，但其线性检测模式（正离子）的性能与传统机型该模式的性能是相同的。通过采用 200 Hz 固态激光器以及在保持检测部位真空度的情况下更换样品靶板（加载锁定室），可进行快速检测。

■ 聚合物分子量分布的测定

测定的聚碳酸酯 (PC) 样品包括 PC 标准品和从光盘提取的 PC 寡聚体 (图 1)。两者均检测到单一同位素峰，且 PC 单体的重复单元为 254 Da (图 1 插图)。

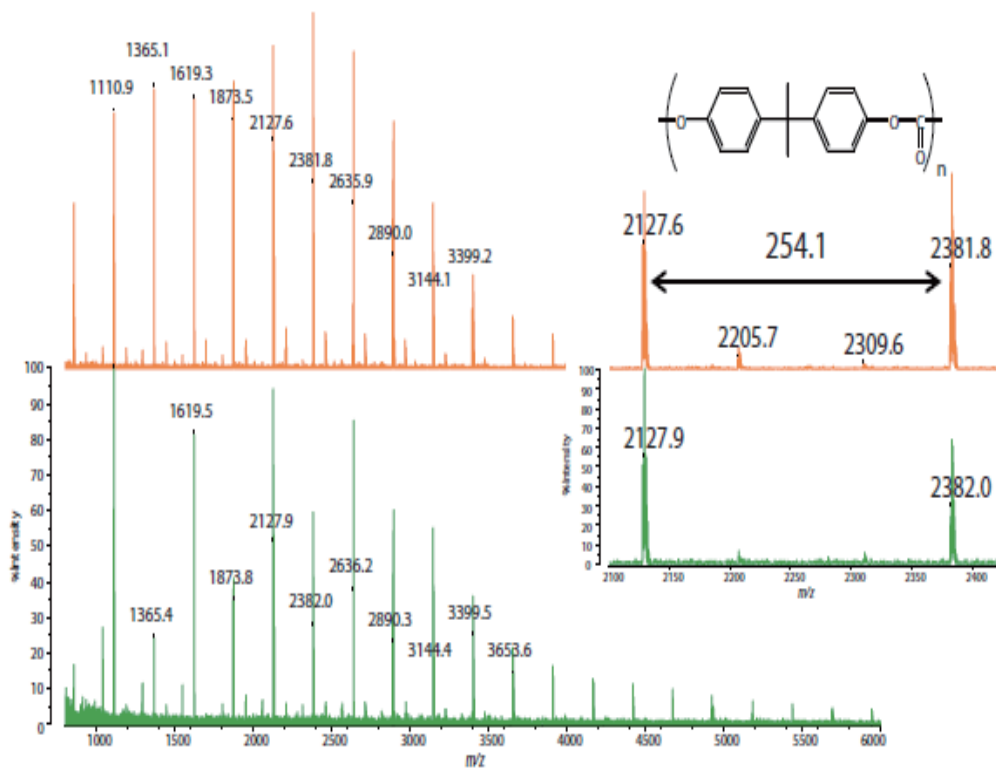


图 1 PC 寡聚体的质谱图 (上: 标准品、下: 光盘)

■ 末端基团的分析

图 2 质谱图显示，PC 中有三个 254 Da 单体单元重复的组分。我们已知 PC 采用封端剂，因此推定以下三种化学结构，使用 Polymerix 软件（Sierra Analytics）分析，3 种寡聚体组分分别归类为两末端封端、单端封端、以及环状类型（图 2）。

我们发现来自光盘的寡聚体以两末端封端类型为主要成分。由于光盘用途的聚合物要求高质量，特意去除低分子量的寡聚体，MALDI-TOF MS 的分析结果也反映了这一点。另一方面，通过同样的 MALDI-TOF MS 分析可知，以再生 PC 为原料生产的文具，其中的寡聚体，环状类型相对较多，末端 OH 也偏多；而市售的芯片，单末端 OH 类型相对较多，而环状类型不多¹⁾。如上所述，通过 MALDI-TOF MS 和简单的预处理方法可以比较评价再生聚合物。

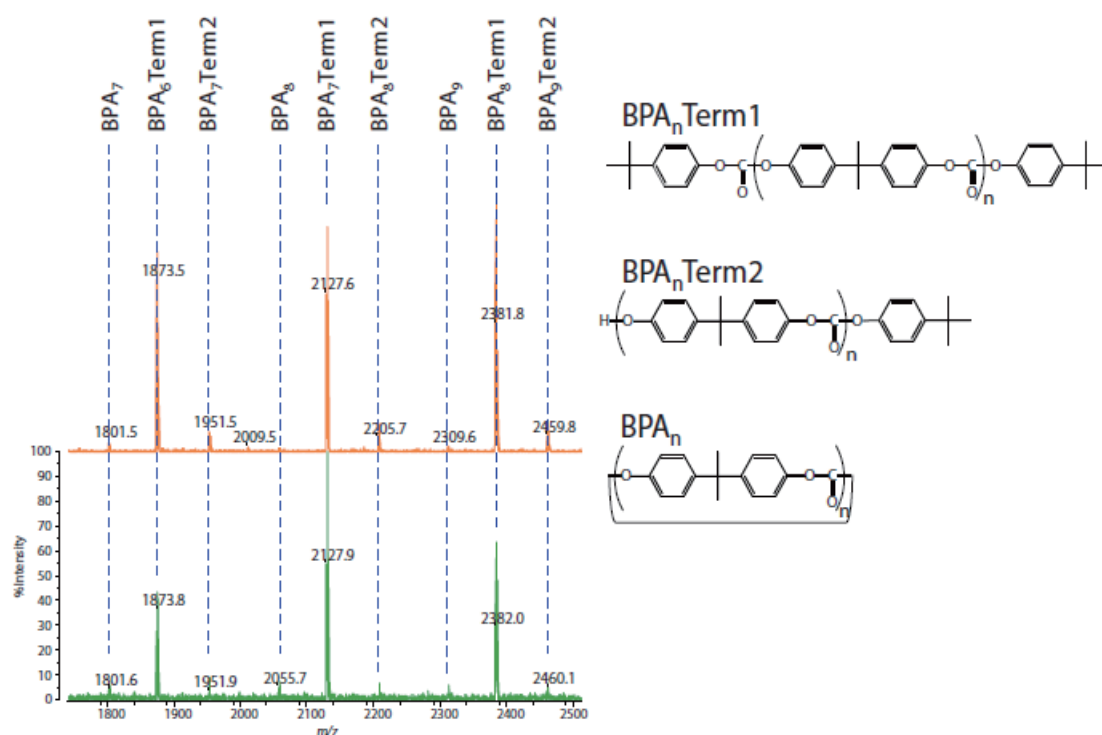


图 2 PC 寡聚体的末端基团分析结果
上：标准品、下：光盘样品

■ 总结

台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020 与大型 MALDI-TOF MS 一样，可以进行聚合物的分子量分布测定和末端基团的分析。

近年来，MALDI-TOF MS 的发展越来越高端化，同时体积变大，结构更复杂。因此对于大多数需要线性模式分析的常规应用，这些仪器通常被过度指定。而且产品尺寸和初始 / 运行成本也构成了引进这些仪器的一个很大的障碍。

MALDI-8020 是世界上最小的线性 MALDI-TOF MS，可满足线性模式下聚合物的分析需求，并有望在这个领域中广泛应用。

本文译自岛津全球应用开发中心（GADC）No. B070 应用报告。

使用台式 MALDI-TOF MS 确认有机功能材料合成

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析仪 (MALDI-TOF MS) 具有可以简便、迅速地获得从低分子到高分子的各种样品的分子量信息的特点。该 MALDI-TOF MS 广泛用于研究和开发以及质量控制领域的合成产品和天然产物的分子量确认。

与 LC-MS 等其他质谱分析仪相比, MALDI-TOF MS 可使用多种溶剂, 研究条件所需的时间更短, 并且高分子量样品也可检测出主要一价离子 (1 成分 = 1 谱峰), 可简便、快速确认有机色素和有机 EL、有机太阳能电池等有机功能材料的合成。

样品的预处理

将从东京化成工业株式会社或 Sigma-Aldrich Co. LLC 购买的市售产品有机功能材料用作样品。将这些样品溶解于 THF (tetrahydrofuran), 使其浓度达到 1 mg/mL 左右。将样品溶液与基质 (DCTB、10 mg/mL THF 溶液) 一同滴在 MALDI 测定用不锈钢靶板上进行干燥。测定使用的是台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020。

有机功能材料的测定事例

作为有机功能材料的测定事例, 高分子半导体砌块和有机 EL 材料质谱如图 1 所示。观测到各自一价自由基正离子均为良好的 S/N 比。并且, 观测到的同位体分布规律与理论上的同位体分布一致。这表明当使用 MALDI-TOF MS 时, 合成产物不仅可以从观察到的离子质量确认, 而且可以从同位素分布模式确认。

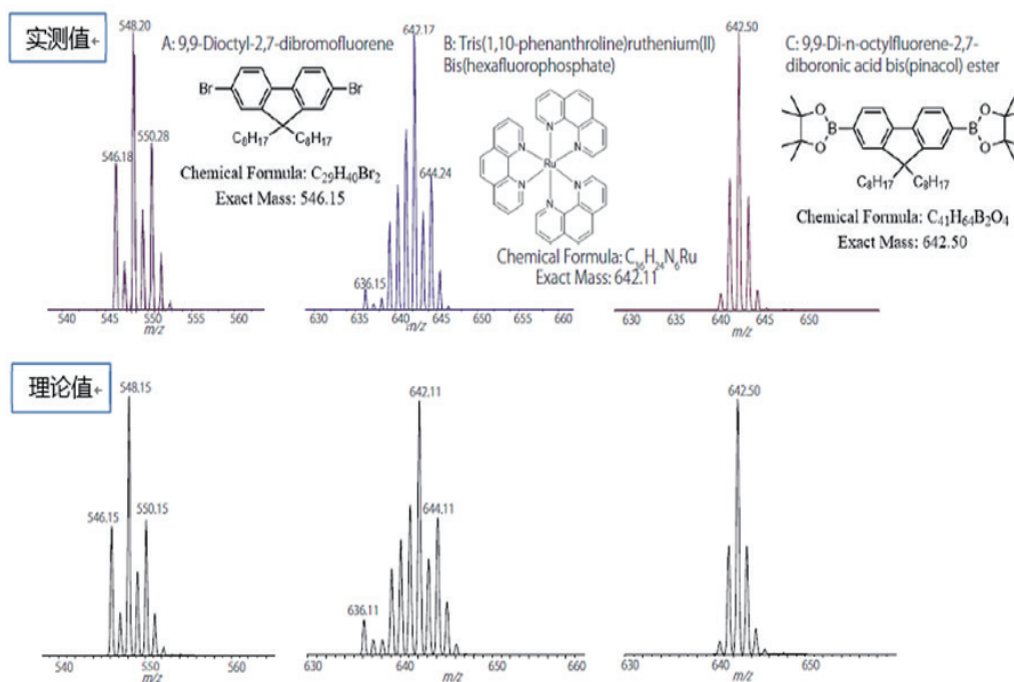


图 1 高分子半导体砌块 (A、C)、有机 EL 材料质谱 (B) 上: 实测值 下: 理论值

* 结构式选自东京化成工业株式会社网站

分子量超过 1,000 的有机功能材料的测定事例

对于分子量小于 1,000 的有机化合物，如图 1 所示，使用直接电离方法 DART（实时直接分析）也可以获得相同的数据。但是，DART-MS 存在的问题是难以电离分子量超过 1000 的分子。一些有机功能材料的分子量超过 1,000，因此 DART 可以覆盖的范围是有限的。

MALDI-TOF MS 的可测量质量范围远大于 DART，因此可以轻松离子化分子量超过 1,000 的分子。因此，从用作有机太阳能电池材料的金属配合物和富勒烯类当中选出分子量超过 1,000 的作为测试样品，使用 MALDI-TOF MS 进行了测定（图 2）。同时，观测到一价自由基正离子均为良好的 S/N 比，根据放大图可看出各同位素谱峰均已分离。

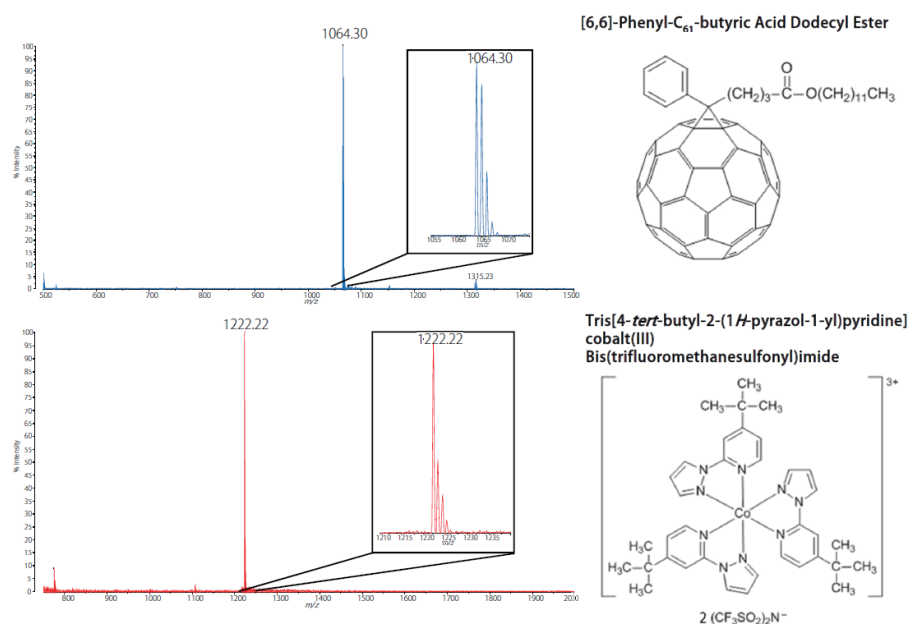


图 2 分子量超过 1,000 的有机功能材料质谱上：有机薄膜太阳能电池（OPV）材料
下：色素增感太阳能电池（DSSC）材料

* 结构式选自东京化成工业株式会社网站

总结

结果表明，台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020 可测定分子量超过 1,000 的有机 EL 和有机太阳能电池等有机功能材料。MALDI-TOFMS 不限于此样品，在其他质谱分析仪难以进行测定时（溶解性较低或相对分子量较大、结构复杂的有机化合物），它也可以进行测定，因此可用于各种有机功能材料及其合成中间体的合成确认。

近年来，MALDI-TOF MS 在实现高规格的同时，尺寸和复杂性也增大，因此相对占据 MALDI 大多数用途、使用线性模式进行测定的需求来说，规格过高，而且在尺寸和导入 / 维护成本等方面，导入门槛较高。

针对此问题，MALDI-8020 紧凑但具有足以确认合成产品的性能，预计未来可作为满足有机功能材料测定需求的产品得到广泛应用。

本文译自岛津全球应用开发中心（GADC）No. B096 应用报告。

应用台式 MALDI-TOF-MS 检测 PEG6000 的分子量及分布

摘要：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）是进行聚合物分子量检测及结构分析的常用手段之一，它可以快速给出聚合物的质量分布，单体结构等信息，并可以有效对聚合物的端基结构进行分析。本文使用岛津台式 MALDI-TOF MS，以葱三酚为基质，分析聚乙二醇 6000（PEG6000），得到了分子量的分布及单体结构信息。

关键词：台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF 聚乙二醇 分子量

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）具有简单、快速获取从低分子到高分子各种样品的分子量信息的优点，广泛应用于研究开发以及质量控制领域中各种合成材料及天然产物的分子量测定，聚合物的分子量测定及结构分析便是其典型应用之一。

MALDI-8020 是岛津的台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，具有体积紧凑（长 0.45 米宽 0.745 米、高 1.055 米）、分析速度快（200 Hz 355 nm 固态激光器采集）、仪器维护方便（True Clean 自动 UV 激光源清洗）和软件满足 21 CFR Part 11 合规性的特点。本文以葱三酚为基质，应用 MALDI-8020 及聚合物分析软件 Polymerix（Sierra Analytics）分析了常用药用辅料聚乙二醇 6000（PEG6000）的分子量分布及单体信息，可作为聚合物样品分析时的参考。

实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020

1.2 分析条件

调谐模式：线性正离子模式

激光器：355 nm 固态激光器

扫描范围：m/z 1000-10000

激光能量：90

样品前处理

取样品加水溶解，配成 5 mg/mL 的样品工作液。取 1 μ L 的样品溶液和 1 μ L 葱三酚基质溶液（10 mg/mL，溶剂为四氢呋喃）点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

结果与讨论

PEG6000 的质谱检测结果如图 1 所示。样品检测到聚合物离子峰系列，相邻聚合单元分子量相差 44 Da，其中信号强度较高的离子峰系列的分子量分布与结构式 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ 相符，另外一个离子峰系列信号强度较低，聚合单元比另一系列的相邻聚合单元大 28 Da，可能两者端基结构有所不同。样品的分子量分布信息由聚合物软件 Polymerix（Sierra Analytics）分析计算。Polymerix 软件分析结果见图 2。

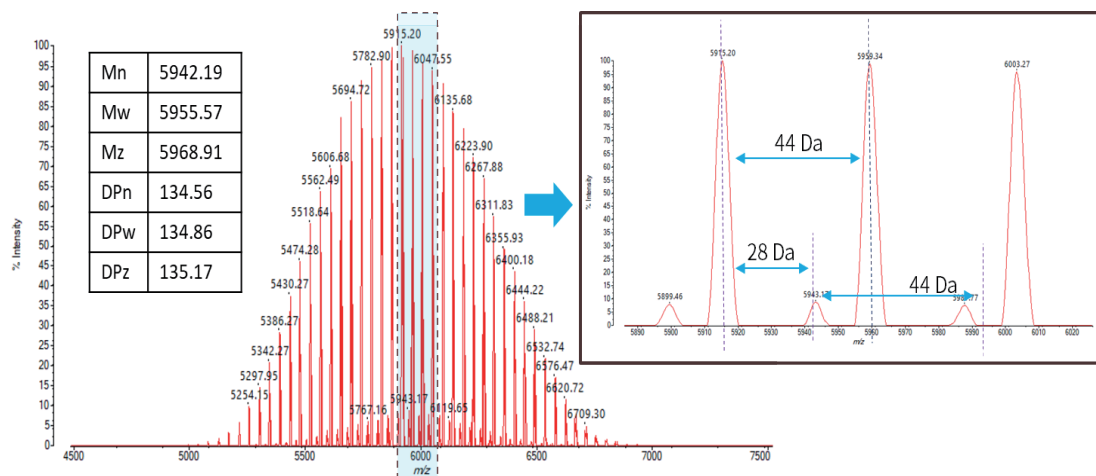


图 1 PEG6000 的一级质谱图

Homopolymer Results Summary																
Series Label	Mn	Mw	Mz	PD	DPn	DPw	DPz	Percent Series	Percent Spectrum	Alpha End Group	Repeat	Omega End Group	Charge State	Adduct	Loss	Series Formula
Total/A	5942.191	5955.566	5968.905	1.002	134.560	134.864	135.167	100.00	99.37	OH	C2H4O	H				OH [C2H4O] _n H + H
S1	5942.191	5955.566	5968.905	1.002	134.560	134.864	135.167	100.00	99.37	OH	C2H4O	H				OH [C2H4O] _n H + H

图 2 Polymerix 软件分析结果

结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 分析 PEG6000，直接得到了样品的分子量分布、单体质量的信息。MALDI-8020 作为台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，具有体积紧凑、分析速度快、仪器维护方便和软件合规的特点，是聚合物分析的有力工具。

应用台式 MALDI-TOF-MS 检测聚苯乙烯的分子量及分布

摘要：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 是进行聚合物分子量检测及结构分析的常用手段之一，它可以快速给出聚合物的质量分布，单体结构等信息，并可以有效对聚合物的端基结构进行分析。本文使用岛津台式 MALDI-TOF-MS，以葱三酚为基质，分析聚苯乙烯，得到了分子量的分布及单体结构信息。

关键词：台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF 聚苯乙烯 分子量

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 具有简单、快速获取从低分子到高分子各种样品的分子量信息的优点，广泛应用于研究开发以及质量控制领域中各种合成材料及天然产物的分子量测定，聚合物的分子量测定及结构分析便是其典型应用之一。

MALDI-8020 是岛津的台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，具有体积紧凑 (长 0.45 米、宽 0.745 米、高 1.055 米)、分析速度快 (200 Hz 355 nm 固态激光器采集)、仪器维护方便 (True Clean 自动 UV 激光源清洗) 和软件满足 21 CFR Part 11 合规性的特点。本文以葱三酚为基质，应用 MALDI-8020 及聚合物分析软件 Polymerix (Sierra Analytics) 分析了弱极性的聚合物 - 聚苯乙烯的分子量分布及单体信息，可作为聚合物样品分析时的参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020

1.2 分析条件

调谐模式：线性正离子模式

激光器：355 nm 固态激光器

扫描范围：m/z 4000-20000

激光能量：75

■ 样品前处理

吸取 1 μL 的硝酸银溶液 (0.01 mol/L, 溶剂为水) 滴在样品靶上, 干燥后吸取 1 μL 的样品溶液 (1 mg/mL, 溶剂为四氢呋喃), 覆盖在硝酸银结晶层上, 干燥后滴加基质溶液葱三酚 (10 mg/mL, 溶剂为四氢呋喃), 自然干燥后送入质谱分析。

■ 结果与讨论

聚苯乙烯的质谱检测结果如图 1 所示。样品检测到聚合物的质谱峰, 在 m/z 4000-12000 之间均有分布。相邻聚合单元分子量相差 104 Da, 与聚苯乙烯的单体结构式 $-\text{[C}_8\text{H}_8\text{]}-$ 相符。样品的分子量分布信息由聚合物软件 Polymerix (Sierra Analytics) 分析计算。根据检测得到的准确分子量信息并结合聚合物软件的分析, 可知聚苯乙烯的末端基团分子量合计为 58 Da, 推测该聚苯乙烯样品的末端基团可能为 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 与 $\text{H}-$ 。Polymerix 软件分析结果见图 2。

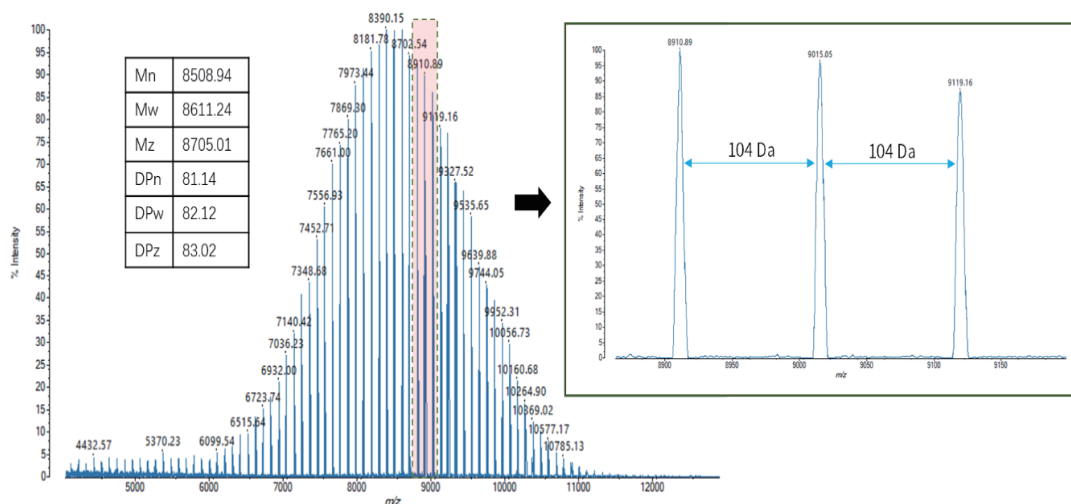


图 1 聚苯乙烯的一级质谱图

Homopolymer Results Summary																
Series Label	Mn	Mw	Mz	PD	DPn	DPw	DPz	Percent Series	Percent Spectrum	Alpha End Group	Repeat	Omega End Group	Charge State	Adduct	Loss	Series Formula
Total/Average	8508.938	8611.235	8705.007	1.012	81.141	82.123	83.024	100.00	100.00	C4H9	C8H8	H	1			C4H9 [C8H8] _n H
S1	8508.938	8611.235	8705.007	1.012	81.141	82.123	83.024	100.00	100.00	C4H9	C8H8	H	1			C4H9 [C8H8] _n H

图 2 Polymerix 软件分析结果

结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 分析聚苯乙烯，直接得到了样品的分子量分布、单体质量的信息，并对端基结构进行了预测分析。MALDI-8020 作为台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，具有体积紧凑、分析速度快、仪器维护方便和软件合规的特点，是聚合物分析的有力工具。

台式 MALDI-TOF MS 应用于 PET 薄膜表面分析

MALDI-TOF 质谱分析法具有高通量和高灵敏度，与 LCMS 法一样在众多领域中得到广泛应用。特别是近年来越来越多地应用于合成化合物和高分子量化合物的分子量检测和结构分析。由于此类质谱仪具有容易生成一价离子，便于确认分子量，可检测的质量范围广，样品干燥后进行检测，可选择的溶剂种类多等优点。

此外，由于近几年社会形势的变化，无论是政府、大学还是民营企业，都强烈希望此类设备在引进和运行方面都降低成本。台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 正是一款可充分满足这一市场需求的新产品。值得关注的一点是，本产品有一个较短的飞行管，虽然比传统机型尺寸小，但仍保留同等以上的性能。

近年来，采用 MALDI-TOF 质谱仪进行质谱成像的有效性得到广泛的认可，各种技术也不断地发展。另一方面，与降解和耐久性检验联合进行的，对表面上的化合物本身而非其微观结构进行检验的需求日益增加。

本文介绍了应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020, 进行 PET 薄膜表面分析的实例。

■ 台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020

MALDI-8020 虽然是一款拥有目前世界最小尺寸和安装面积的线性 MALDI-TOF MS，但其线性检测模式（正离子）的性能与传统机型该模式的性能是相同的。通过采用 200 Hz 固态激光器以及在保持检测部位真空度的情况下更换样品靶板（加载锁定室），可快速检测。

本产品的飞行管虽然只有 0.85 m，但质谱分辨率并不亚于传统机型，在 m/z 4000 附近也可进行同位素分离。

■ 热处理 PET 薄膜的制备

聚对苯二甲酸乙二醇酯（PET）作为通用工程塑料材料，应用非常广泛。众所周知，聚合物中的低聚物是在伴有加热时成型和拉丝等工艺中析出，造成批次缺陷和工艺故障。尤其是 PET 环状三聚体的低聚物经热处理后移动到树脂和薄膜表面，容易析出。

将市售 PET 薄膜分成两种，一种进行 100°C 以上的热处理，另一种在室温下放置数小时。图 2 所示为经处理后两种薄膜的光学显微镜图像。目视观察热处理后的薄膜，也能发现薄膜有些变白。使用导电的双面胶带将薄膜固定到不锈钢制 MALDI 靶板上，喷雾法涂敷基质（20 mg/mL Dithranol、3 mg/mL Na-TFA in THF），制成 MALDI 测定样品。

热处理后

无热处理

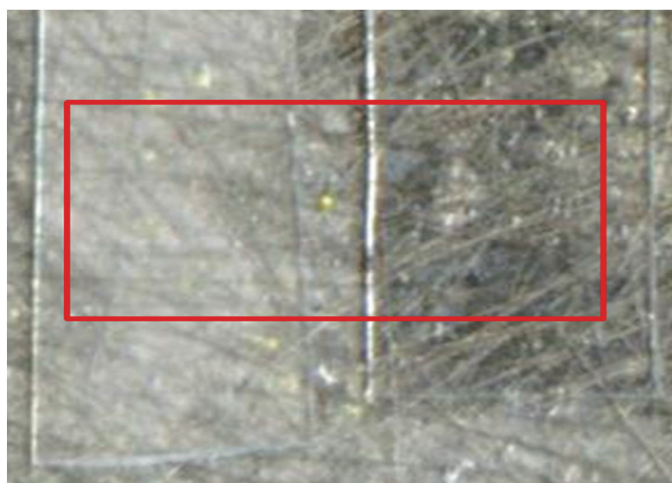


图 1 PET 薄膜的光学显微镜图像

PET 薄膜的简单表面测定

采用 MALDI-8020 对图 1 红线内区域进行常规的质谱检测。结果表明，不论是否经过热处理，均在 m/z 1199 处检测出 Irganox1010 分子相关的加 Na 离子（图 2）。而仅在经热处理后的表面检测出 m/z 599，这与 PET 环状三聚体的分子量（加 Na 离子）相符。

然后利用 Irganox1010 和环状三聚体的信号，制作图 3 所示的叠加图。通过该方法可以把热处理前后的表面差异可视化。

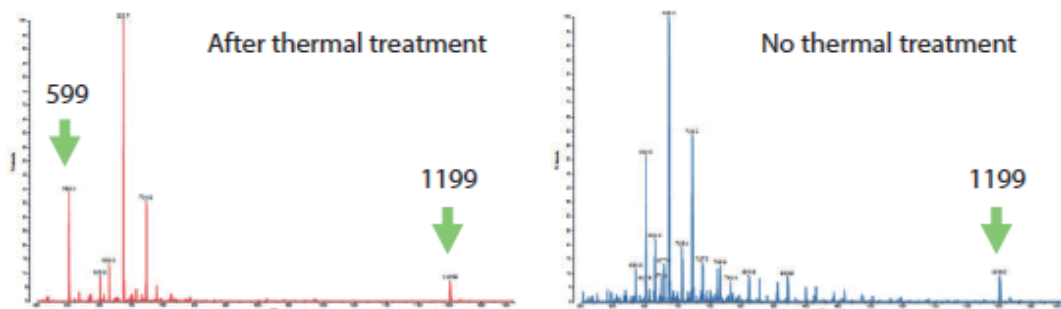


图 2 PET 薄膜表面的质谱图

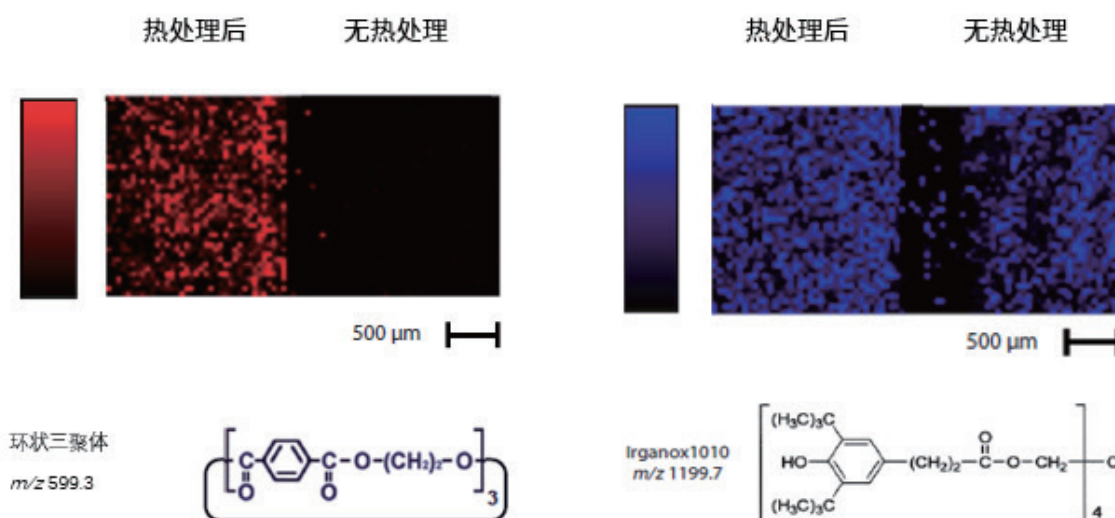


图 3 m/z 599 以及 1199 的叠加图（图 2 红线内区域）

总结

通过台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020 进行简单的表面分析，可以发现热处理前后聚合物薄膜表面的差异。近年来，MALDI-TOF MS 的发展越来越高端化，产品尺寸，购买和维护成本也构成了一个很大的障碍。

MALDI-8020 是世界上最小的线性 MALDI-TOF MS，可满足线性模式下化工产品分析的需求，并有望在这一领域中广泛应用。

本文译自岛津全球应用开发中心（GADC）No. B072 应用报告。

第五节 核酸分析中的应用

作为生命的遗传物质，核酸在生命科学研究中有着重要的地位，有关核酸的分子生物学研究已成为最具活力的研究方向之一。近年来，核酸类药物在基因治疗和基因诊断方面显示出良好的应用前景。建立快速、准确的寡核苷酸分子量测定及序列分析方法十分必要。

冠状病毒 (Coronaviruses, Covs) 属于冠状病毒科，是自然界广泛存在、能够感染人和动物的一大类病毒家族，在电镜下观察其病毒粒子表面有类似日冕状的纤突而被命名。冠状病毒的基因组较大，其单股正链基因序列长达 26-32kb，是自然界已知序列最长的 RNA 病毒。人类冠状病毒感染主要包括上呼吸道、下呼吸道和胃肠道症状，轻微的症状像普通感冒、咳嗽、发热和腹泻等，严重的则会发展成支气管炎和肺炎，并伴随肾脏功能衰竭、急性呼吸窘迫综合征等症状。本世纪冠状病毒已有 3 次大流行，2002-2003 年的传染性非典型肺炎，又称为严重急性呼吸道综合症 SARS；2012 年的中东呼吸综合征 MERS；以及 2019 年底出现的新型冠状病毒 2019-nCoV。因此，快速准确地鉴定病毒感染的病原体非常重要。

基于核酸分子的病毒检测技术近年来快速发展，已广泛应用于多种病原体的检测，展现出了很高的临床应用价值。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 技术自 20 世纪 90 年代以来已用于单核苷酸多态性 (SNP) 的检测。最近，在临床病毒学中已经报道了基于多重 PCR 和 MS 的检测方法，该方法被证明是用于高通量诊断或基因分型应用的有前景的方法。该方法包括三个步骤：目标核酸的多重 PCR 扩增、质量探针的单碱基延伸和产物的质谱鉴定。目前该方法已成功应用于各种病毒感染的诊断，如口蹄疫、乳头状瘤病毒感染和冠状病毒感染。另外该技术还可以进行遗传性疾病的筛查，如软骨发育不全基因筛查、耳聋基因热点突变检测等。

科学抗疫，共克时艰 岛津在行动 武汉加油！中国加油！



基于飞行时间质谱技术协助合作方开发 RNA 病毒检测试剂盒，可在同一个反应体系内对 12 种 RNA 病毒分型检测。适用于新冠病毒 RNA 检测的全套引物设计和试剂开发，目前正在开展引物的验证优化和试剂盒的临床验证评估 (合作方：北京毅新博创生物技术有限公司)。

岛津公司作本着实现“为了人类和地球的健康”之愿，致力于为抗疫企业搭建平台，共同研制应对疫情的方法，以科学技术，抗击疫情！

台式线性质谱仪 MALDI-8020
&
立式 AXIMA Assurance



台式 MALDI-TOF MS 应用于核酸类药物的快速序列检测

由遗传信息的载体 DNA 和 RNA 等核酸类物质组成的药物称为“核酸类药物”。核酸类药物可以将传统低分子药物和抗体药物无法靶向的 mRNA (messenger RNA) 和 microRNA 作为靶标, 有望成为治疗至今仍难以治愈的遗传性疾病等的新一代创新药物。

尽管核酸类药物有许多种, 比如与 mRNA 结合抑制蛋白质合成的 siRNA、增强 microRNA 功能的 miRNA、通过与蛋白质结合抑制蛋白质功能的适体、与核酶相似具有直接切割靶向 RNA 功能的物质等, 但它们均具有链状结构, 即由构成 DNA 和 RNA 的腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶等数十个(脱氧)核苷酸连接而成的链状结构。

核酸类药物无需像抗体药物一样通过细胞培养来合成, 可以通过化学合成, 生成分子量从几千到几万不等。确认合成的核酸类药物是否具有预定的核苷酸序列, 对确保药物的功能至关重要。

本文介绍了采用 MALDI-TOF MS 确认合成核酸的分子量和核苷酸序列的例子。

■ 合成核酸的前处理

Empty microspin column (BioRad) 中加入经 1N 盐酸活化并用水清洗的约 200 μ L 阳离子交换树脂悬浊液 (Dowex 50w 100-200mesh、Dow chemical), 离心并弃去溶液部分。

去除溶液后, 向样品纯化柱中加入 10 μ L 样品水溶液(核苷酸序列: 5' -CTGAGACACTGAAGGTAGGA-3', 100 pmol/ μ L), 离心, 回收流经阳离子交换树脂的样品。

将 1 μ L 的样品溶液点在 MALDI 靶板上, 其上再点上基质溶液 (0.5 μ L), 干燥后测定。

■ MALDI-TOF 质谱仪

分析时使用台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” (图 1)。该装置既具有 AXIMA Assurance 的卓越性能, 又成功实现设备小型化。MALDI-TOF 8020 质谱仪采用 200Hz 固态激光器作为电离激光, 并配备全自动离子源清洗装置和无油隔膜泵。

■ 质谱分析

样品的 MS 测定结果如图 1 所示, m/z 6214.5 检测到一价离子。

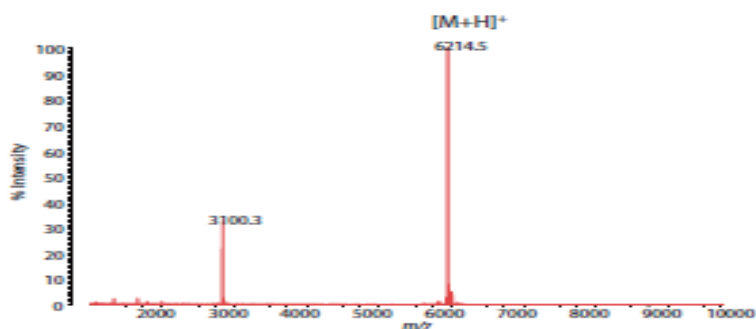


图 1 合成核酸的 MALDI-TOF 质谱图

下一步利用源内裂解技术 (ISD: In source decay) 测定样品, 结果如图 2 所示, 获得合成核酸的 ISD 谱图。在正离子模式下 ISD 测定核酸时, 更倾向于生成 w 系列离子, 如图 3 所示, 因此可以获得非常简单的谱图。通过对比该 ISD 谱图的碎片离子, 可以很容易获得核酸的序列信息。

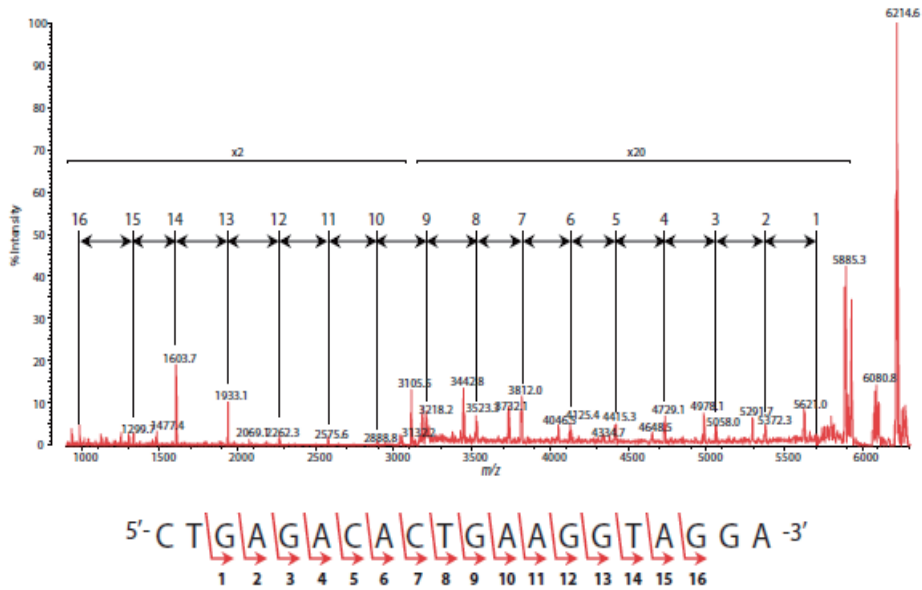


图 2 合成核酸的 MALDI-ISD-TOF 质谱图和裂解离子
测定模式: Positive Linear

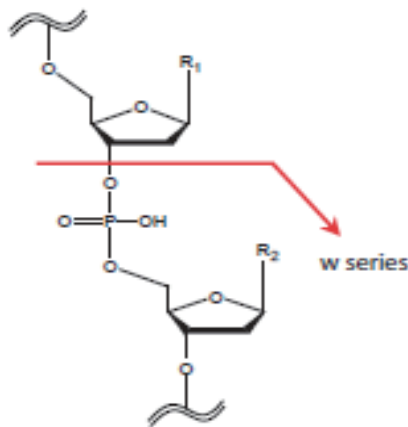


图 3 合成核酸的正离子模式 ISD 的切割部位

如上文所示, 使用 positive linear 模式专用台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020”, 可以非常简单地确认合成核酸的分子量和序列。

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B067 应用报告。

台式 MALDI-TOF MS 应用于 肽核酸 (PNA) 分析

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF MS)，因其简单的前处理方法和准确的分子量信息得到好评。本款 MALDI-TOF MS 在品质管理以及研究开发领域中对肽核酸 (PNA) 寡聚体的合成支援和成品确认是非常有效的。本文介绍了应用台式 MALDI-TOF MS 分析 3 种 PNA 的例子。

肽核酸 (PNA) 是模拟 DNA 的人工合成聚合体，DNA 的核酸碱基 (A/G/C/T) 没有改变，只是用肽结构取代了主链的脱氧核糖和磷酸基团的部分 (图 1)。主链的结构，n-(2-aminoethyl) glycyI 单元是由一个酰胺结合的，带有中性电荷以及光惰性的，不同于带负电荷糖磷酸为主链的 DNA。

由于电荷状态的不同，PNA 强烈地结合到互补的 DNA/RNA 序列。与 DNA 相比，PNA 的重要作用在于具有较强的结合力以及杂交特性。因此，PNA 在分子诊断和研究领域中广泛被应用，比如，单核苷酸多态性 (SNP) 检测，荧光原位杂交 (FISH) 和分子生物传感器等技术。

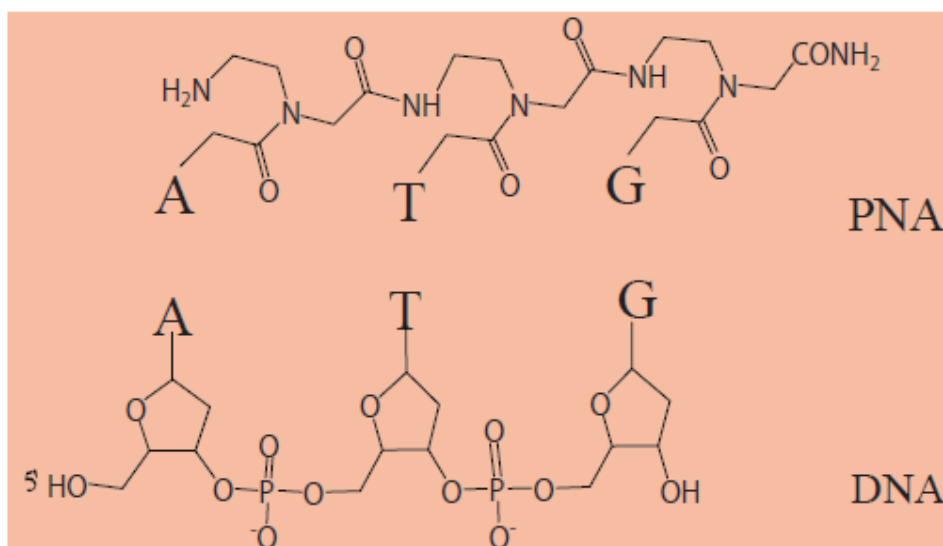


图 1 比较 PNA 和 DNA 的主链结构

这些应用中，具有序列特异性和生物稳定性的 PNA，被用作一种高选择性的分子探针，在一个碱基突变以及相关的遗传疾病中辨别“几乎相同但只是几个不同的序列”。另外，PNA 也有可能作为反义药物 (anti-sense drugs) 应用于治疗人体免疫缺陷病毒 (艾滋病病毒; HIV-1)。

材料与方 法

PNA 样品由 DestiNA Genomica S.L. (Spain) 公司提供。样品溶液 (4-15 $\mu\text{mol/L}$, 0.1 % TFA 水溶液) 和基质溶液等量点在 MALDI 的不锈钢靶板上，干燥后进行检测。基质使用 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA, 5mg/mL) 或者 Sinapic acid (SA, 20 mg/mL)，溶解于乙腈 /0.1% TFA 水溶液 =1/1。质谱分析使用台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020”，根据表 1 的参数进行检测。

表 1 MALDI 质谱仪数据采集参数

Tuning	linear
Polarity	positive
Mass range	100-12000 Da
Laser rep. rate	200 Hz
Accumulation rate (shots/profile)	50
Profiles	200
Sampling method	Dither

结果

PNA 样品 A 的质谱图如（图 2 上）所示。包括 Base Peak 在内的同位素簇中单同位素峰的测定值为 m/z 4510.9，在放大图上可看出同位素峰分离的非常好。虽然是在线性模式下检测，但分辨率充分满足了要求 (>8000 FWHM)。同时还举了分子量更大的 PNA 的检测例子，样品 B 和样品 C 的质谱图如（图 2 下）所示。

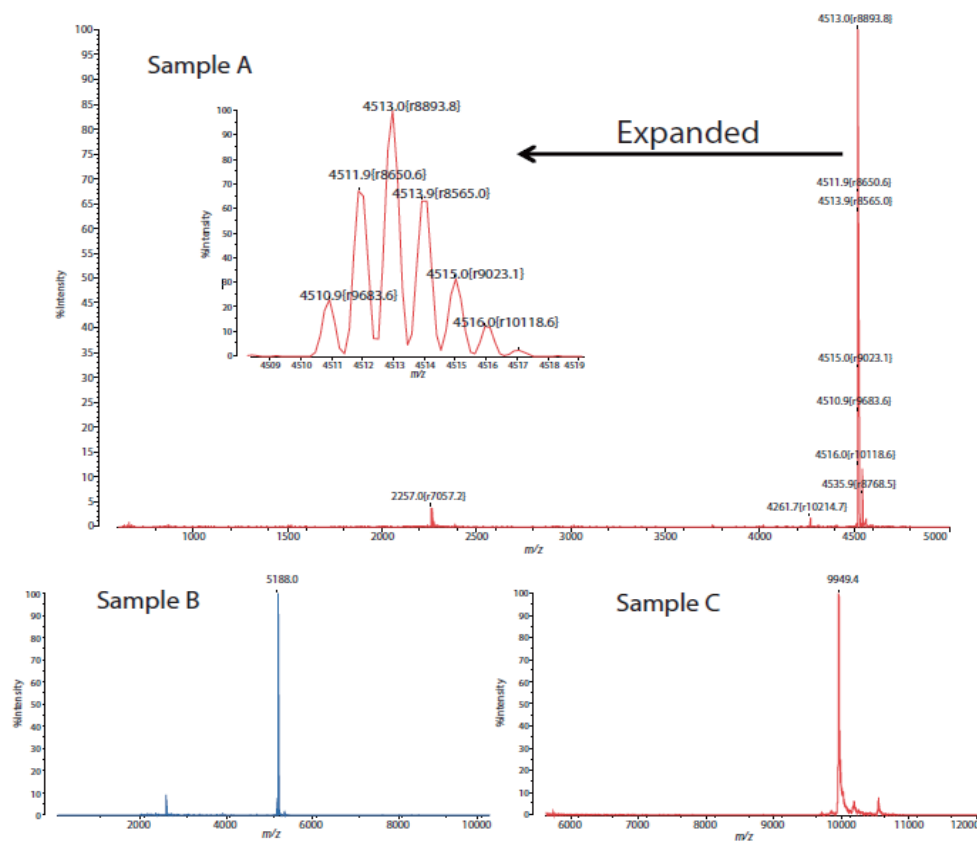


图 2 台式 MALDI-TOF MS 应用于 PNA 分析例

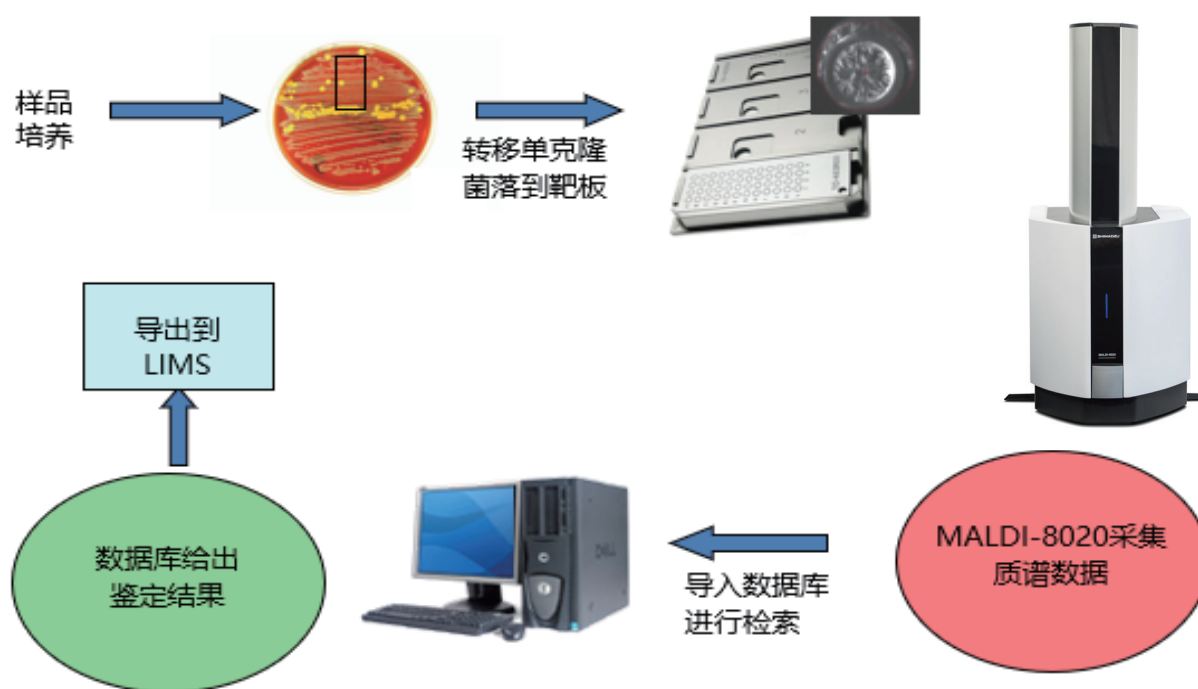
样品 A (2pmol, 基质 CHCA) 的分析结果表明, 在线性模式下也能检测到 >8000 FWHM 的高分辨率。样品 B / 样品 C (5.5pmol/7.5pmol, 基质 SA) 的高分子量区域的分析结果用平均分子量标记。

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B076 应用报告。

第六节 微生物鉴定中的应用展望

微生物是个体难以用肉眼观察的一切微小生物统称，包括细菌、真菌、病毒、少数藻类等。传统的微生物鉴定方法包括显微镜直接观察、选择培养基和鉴别培养基培养观察、生化反应鉴别、免疫学方法鉴别和分子生物学方法鉴别（PCR 法或基因测序法）。传统方法耗时长，成本高，通量低，影响病原微生物鉴定的速度，在一定程度上影响了疾病的控制。

20 世纪 80 年代末 -90 年代初，MALDI 和 ESI 两种软电离技术的出现，使得质谱能够对生物大分子进行快速的分析。2001 年美国 University of Maryland 的 Ryzhov 和 Fenselau 通过质谱分析微生物细胞内丰富的核糖体蛋白质分子指纹图谱，提出了利用 MALDI-TOF 鉴定病原微生物的可能性。



MALDI TOF 微生物鉴定系统工作流程

应用 MALDI-TOF 进行微生物鉴定时，典型的质量范围为 m/z 2-20 kDa，检测到的目标信号主要是核糖体蛋白和一些看家蛋白，其他还有酶、脂类等的信号。通常可以鉴定到种的水平，基于特殊的生物信息学分析软件，甚至可以鉴定到亚种或株的水平。MALDI-8020 作为岛津台式飞行时间质谱，具有线性正离子模式，适合用于微生物菌种的快速鉴定。

商业化的微生物数据库包含的微生物种类非常多，大部分进口厂商和国产厂商都在 2000 种以上，几乎包含了有代表性的微生物，使得结果具有可比性，假阳性率较低。有些基于 MALDI-TOF 的鉴定结果中，出现不能鉴定的情况，原因可能是数据库中不包含这些微生物，而不是方法学错误。相信随着越来越多国产厂商进入 MALDI-TOF 微生物鉴定领域，以及更多的数据库和软件系统的开发完善，MALDI-TOF 质谱将成为微生物鉴定领域重要的技术手段。

Identified Files											
acquisition time	name	sample	%	family	genus	species	typ	datacount	delete	export to LIMS	compare
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1G1[c]	03116259-1	99.90	Family I Enterobacteriaceae	Providencia	reitgeri		196	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F4[c]	31106236-1_02	99.90	Family I Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	malophilia		181	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F3[c]	31106236-1	99.90	Family I Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	malophilia		166	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ 19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F2[c]	31106225-1_02	99.90	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli		198	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F1[c]	31106225-1	99.90	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli		195	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1E4[c]	17056488-1_02	99.90	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli		167	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1E3[c]	17056488-1	94.80	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli		117	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1E2[c]	18053559-1_02	95.20	Family VI Streptococcaceae	Streptococcus	bovis/alactol		93	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1E1[c]	18053559-1	95.20	Family VI Streptococcaceae	Streptococcus	bovis/alactol		72	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1D4[c]	18052218-1_02	99.90	Family VIII Staphylococcaceae	Staphylococcus	aureus		134	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

微生物鉴定结果



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

⊕ 岛津企业管理 (中国) 有限公司 / 岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
邮政编码: 100020
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码: 110016
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710065
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
邮政编码: 830002
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
邮政编码: 450007
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
邮政编码: 200233
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
邮政编码: 610063 B座12层
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中路2号亚太商务楼27层B座
邮政编码: 210005
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区青年路38号重庆国贸中心1702座
邮政编码: 400010
电话: (023)6380-6068/6058 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
邮政编码: 430060
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
邮政编码: 510656
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
邮政编码: 650021
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼 F2.6-1C
邮政编码: 518040
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
SUITE 1028, OCEAN CENTRE, HARBOUR CI TY,
TSIM SHA TSUI, KOW LOON, HONG KONG
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

用户服务热线电话: 800-8100439
400-6500439

本产品样本所宣传的内容, 以本版本为准
样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知