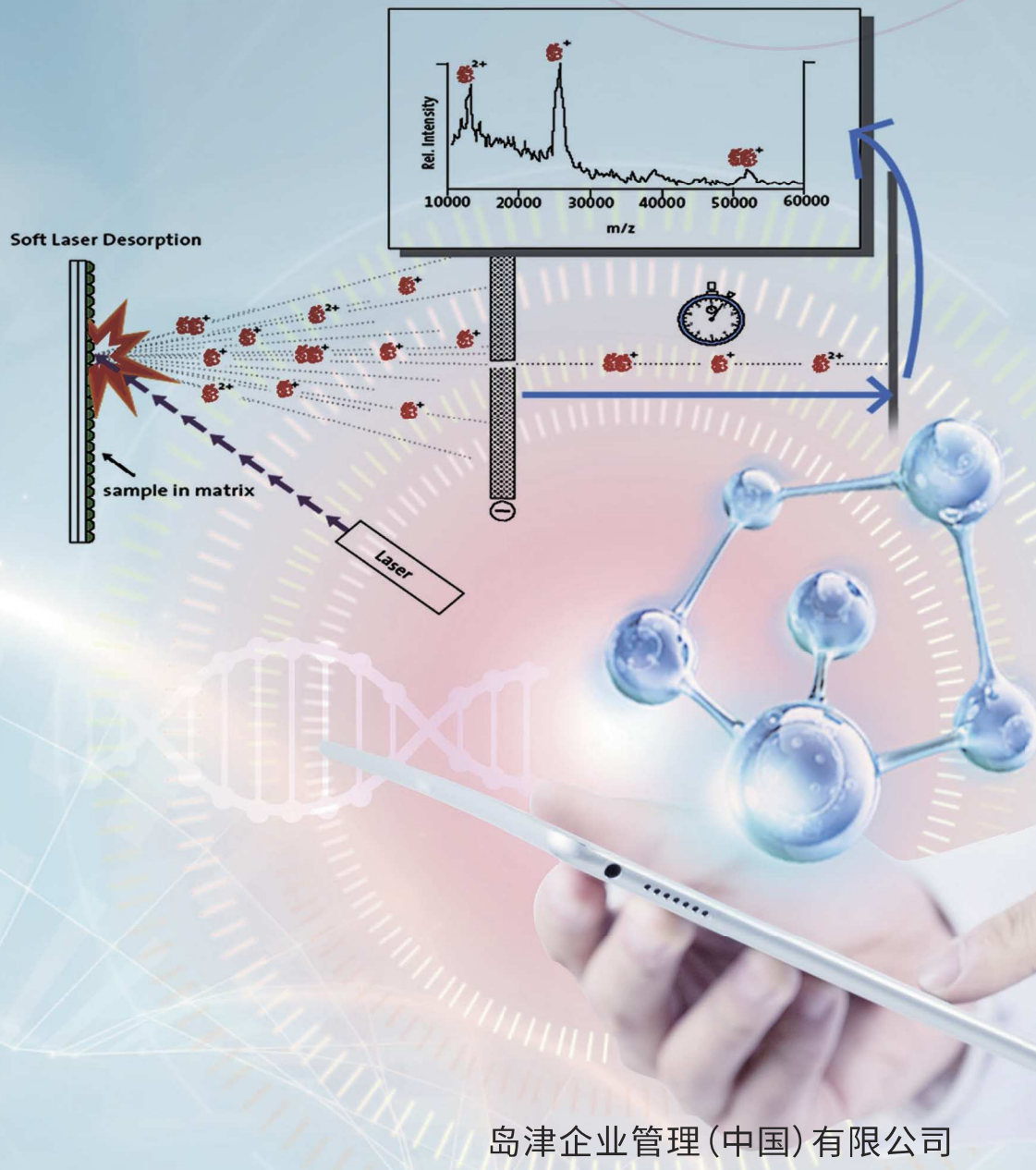


MALDI-TOF应用文集



前言

说到质谱技术，就不得不提及大家耳熟能详的诺贝尔奖。质谱技术从 20 世纪初发展到现在，先后有多位与此相关的科学家获得诺贝尔奖。1906 年，英国科学家 Thomson 因发现电子获得诺贝尔物理学奖。1922 年英国物理学家 Aston 因同位素质谱获得诺贝尔化学奖。1939 年美国科学家 Lawrence 因 FT-TCR 回旋加速器的发明获得诺贝尔物理学奖。1989 年美国科学家 Dehmelt 和德国科学家 Paul 因离子捕集技术共同获得诺贝尔物理学奖。离我们最近的一次，是 2002 年岛津公司资深工程师田中耕一和美国科学家 Fenn，因为“开发了用于生物大分子质谱分析的软解吸电离方法”共同获得诺贝尔化学奖。

MALDI-TOF，即使用基质辅助激光解吸电离技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。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。

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。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。岛津公司目前拥有 AXIMA 系列 Assurance、Confidence、Performance，以及 MALDI-7090，MALDI-8020，MALDImini 等多款 MALDI-TOF 仪器，满足不同用户多元化的需求。

MALDI-TOF 在分子量测定、蛋白质鉴定、聚合物分析、质谱成像、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（如冠状病毒 SARS、MERS）检测等。

本册应用文集收录了 30 篇代表性的 MALDI-TOF 应用报告，供相关用户参考。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心
2021 年 1 月

目 录

第一章 MALDI-TOF 简介

第一节 初识 MALDI-TOF	1
第二节 岛津 MALDI-TOF 产品	2
第三节 MALDI-TOF 的应用领域及应用前景	3

第二章 MALDI-TOF 应用数据集

第一节 蛋白质分析中的应用

MALDI-TOF MS 检测多聚体蛋白	6
MALDI-8020 及 MALDI-TOF Performance 快速鉴定疫苗亚基组成	8
MALDI-8020 鉴定蛋白质种类	11
MALDI-8020 分析蛋白质序列	14
MALDI-8020 分析重组人粒细胞刺激因子	17
MALDI-8020 鉴定二维电泳凝胶中的蛋白质	19
MALDI-8020 和 QC Reporter 软件对合成肽进行质量控制	21

第二节 糖类分析中的应用

MALDI-TOF Resonance 分析中药材中多糖降解得到的寡糖	28
MALDI-7090 应用于-O-聚糖前处理分析	31
MALDImini™-1 紧凑型数字离子阱质谱仪分析糖肽	35
MALDImini™-1 分析 N-聚糖：唾液酸键联异构体	38

第三节 核酸和脂类检测中的应用

MALDI-8020 应用于核酸类药物的快速序列检测	42
MALDI-8020 进行蜡的快速表征评价	44
MALDI-TOF Assurance 应用于酸水解方法的 RNA 序列分析	47
MALDI-TOF Performance 解析复合脂质的结构	49

第四节 微生物鉴定中的应用

MALDI-TOF iD ^{Plus} Performance 鉴定耐药菌品种	54
MALDI-TOF iD ^{Plus} Performance 从人指纹样品中鉴定食源性病原体	58
MALDI-TOF iD ^{Plus} 和统计分析软件对 emm1 A 群链球菌进行分型	61
MALDI-TOF iD ^{Plus} 鉴别细菌血清型	64

第五节 聚合物及材料分析中的应用

MALDI-8020 进行聚乙二醇修饰药品的分析.....	70
MALDI-8020 检测 PEG6000 的分子量及分布.....	74
MALDI-8020 检测聚苯乙烯的分子量及分布.....	76
MALDI-TOF Performance 分析聚合物.....	78
MALDI-TOF Resonance 分析丙烯酸乙酯聚合物.....	82
MALDI-7090 检测 PEG23000 的分子量及分布.....	85

第六节 其他拓展应用

MALDI-8020 进行羊绒羊毛定量检测.....	88
MALDI-8020 用于食用橄榄油掺假鉴别.....	91
MALDI-8020 自动分析急性肾损伤.....	95
MALDI-TOF iD ^{Plus} 系统分析牛奶和乳制品.....	97
MALDI-7090 进行鼠肝脏组织切片的质谱成像.....	101

第三章 MALDI-TOF 日常使用

第一节 基质的选择.....	105
第二节 样品浓度及点靶方法.....	108
第三节 校准标准品的选择.....	108
第四节 缓冲体系对 MALDI 的影响.....	110
第五节 聚合物样品测试.....	111
第六节 微生物样品测试.....	113

第一章 MALDI-TOF 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首次广泛地走进公众视野。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, 如今已经 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

国内市场上主要 MALDI-TOF 产品

第二节 岛津 MALDI-TOF 产品

岛津公司目前拥有 AXIMA 系列 Assurance、Confidence、Performance，以及近几年新出的 MALDI-7090、MALDI-8020、MALDImini 等多款 MALDI-TOF 仪器。

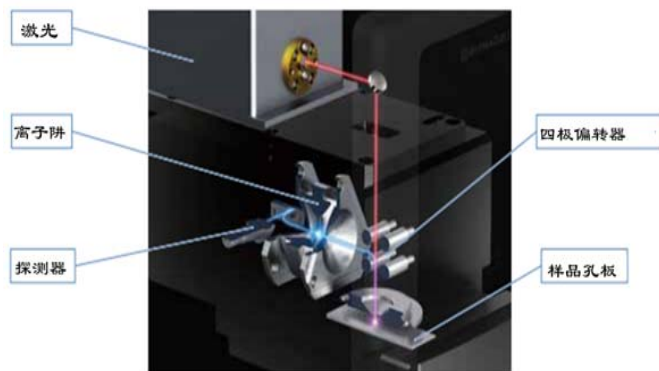


岛津 MALDI-TOF 机种

MALDImini 是岛津公司今年新推出的一款基质辅助激光解吸/电离数字离子阱质谱仪。MALDImini 是一款设计十分紧凑的 MALDI 离子阱质谱仪，相比其他同类设备，尺寸更加小巧。利用岛津独有的“数字离子阱”（DIT）技术（一种新型的光学系统）可有效缩减质谱仪尺寸，从而确保仅占用客户工作台上很小的空间。

世界首屈一指的数字离子阱 (DIT) 技术, 使用矩形波 RF 捕获离子, 因此可使用比 Triple Q 体积小很多的 MALDImini 实现 MS/MS 或 MS³ 级分析。数字离子阱 (DIT) 技术在有效缩减仪器尺寸的同时, 还可以做 2 级和 3 级结构分析, 作为鉴定未知化合物结构的实用工具。使用 MALDI+DIT 在宽质量范围内进行高灵敏度 MS 和 MSⁿ 测量。宽范围的质量范围, 一级质谱 m/z 650- 70000 可与 TOFMS 媲美, 二级质谱 m/z 350-5000。





岛津 MALDI 离子阱质谱仪及内部结构

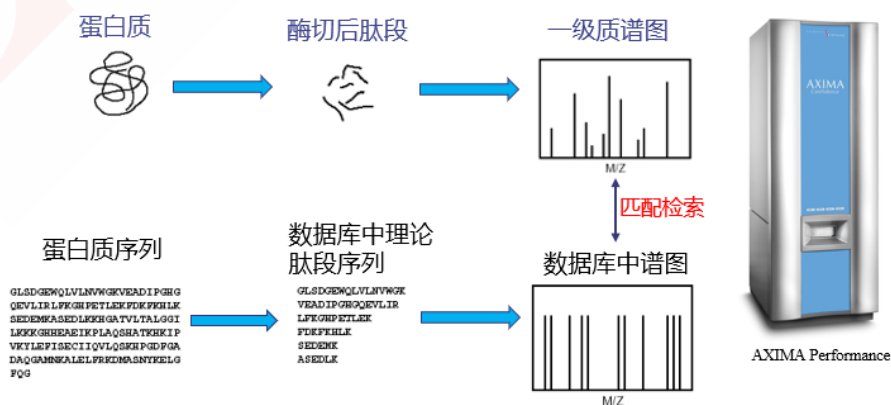
MALDImini 体积小巧，易于安装。A3 纸大小，节省空间和占地面积，重量仅 25kg，内置真空泵，可安装在实验室任何地方。激光光学系统、样品台和真空排气系统均已经过优化，进一步减小设备的尺寸。离子和激光光学器件引导激光束垂直于孔板轰击样品，实现高离子透射率的同时让布局更为紧凑。电离后，离子束偏转 90°，确保离子最大程度地转移到离子阱。

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，质谱成像，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)。蛋白鉴定的另一种方法是二级质谱 MS/MS 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)化学与 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。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，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-TOF 应用数据集

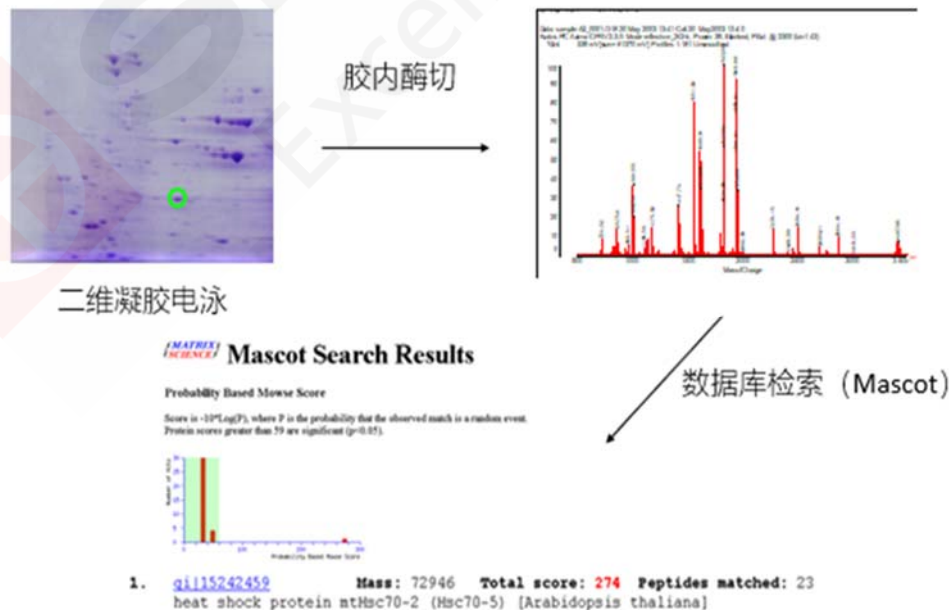
作为软电离模式的质谱仪，MALDI-TOF 应用领域广泛，从蛋白质、聚合物、核酸分子量测定，到蛋白质鉴定、微生物鉴定、质谱成像等。本章将一一展示相应的应用方案。

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 蛋白质、多肽鉴定中的应用

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。

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，经电磁场分离将不同质荷比的离子区分开来，经过检测器收集分离的离子，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。蛋白质鉴定通常使用 NCBI 的第三方公开数据库 Mascot。



肽指纹图谱鉴定流程

MALDI-TOF MS 检测多聚体蛋白

在蛋白质药物开发和应用蛋白质的各种类型研究中, 蛋白质聚集体的意外形成会引起抗原性并损害蛋白质功能。因此, 监测不同环境下蛋白质聚集体的形成, 对于获得一致的生化数据和药物的质量控制都非常重要。

在本文中, 我们描述了一种能检测高质量分子的 MALDI-TOF MS 来检测蛋白质聚集体的方法。

■ 检测由冻融和热处理产生的多聚体蛋白

将小鼠抗体样品(1 μ M、10 μ L)进行两个周期的冻融处理(-80 $^{\circ}$ C/室温)或 50 $^{\circ}$ C 下保持 3 h 的热处理之后, 与蛋白质交联剂 K200 稳定剂(CovalX)混合, 在室温条件下反应 1 h。

反应后, 将样品溶液与 MALDI 基质(芥子酸, 10 mg/mL, 50%乙腈水溶液/0.1%三氟乙酸水溶液)混合, 采用带高质量检测器的 MALDI-TOF MS 进行分析。还分析了在室温下与 K200 稳定剂反应的未经冻融和热处理的抗体样品。

用带有高质量检测器的 MALDI-TOF MS 分析未经处理的抗体样品, 在 148 kDa 附近观察到强抗体信号和弱抗体二聚体信号 (图 1)。

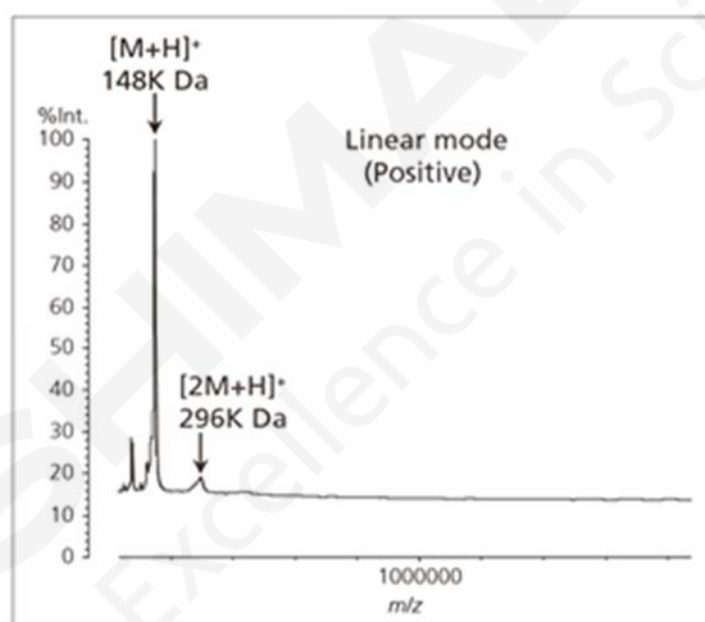


图 1 未处理样品的质谱图

与未处理的抗体样品相比, 经反复冻融处理的样品分析显示, 来自抗体二聚体的信号较强, 也出现了与抗体三聚体、四聚体、五聚体和六聚体相对应的信号 (图 2)。和冻融处理过的样品一样, 热处理的样本也出现了明显的抗体多聚体的信号 (图 3)。

利用连接试剂建立交联反应, 从而通过 MALDI-TOF MS 来分析多聚体蛋白质的形成, 有助于我们了解特定环境如何改变蛋白质聚集。

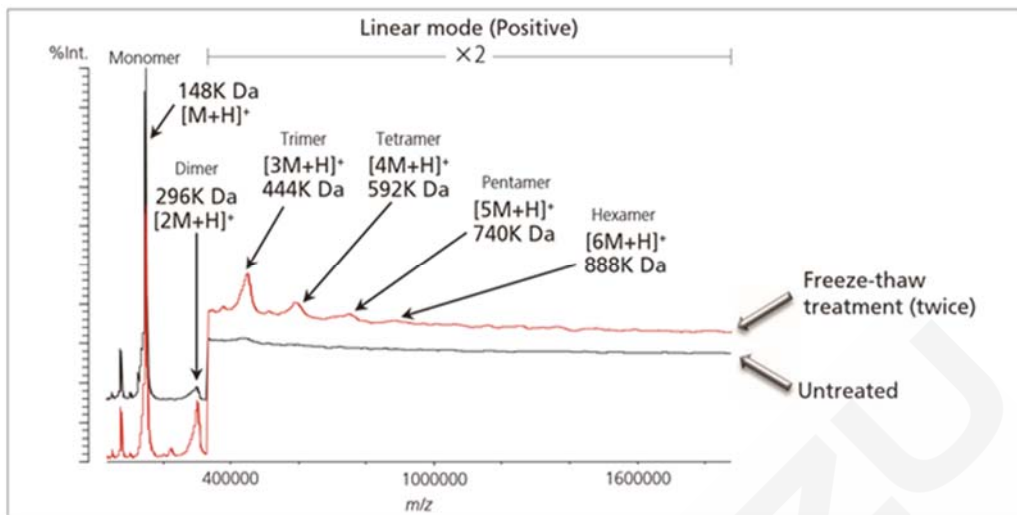


图 2 冻融样本与未处理样本质谱图的比较

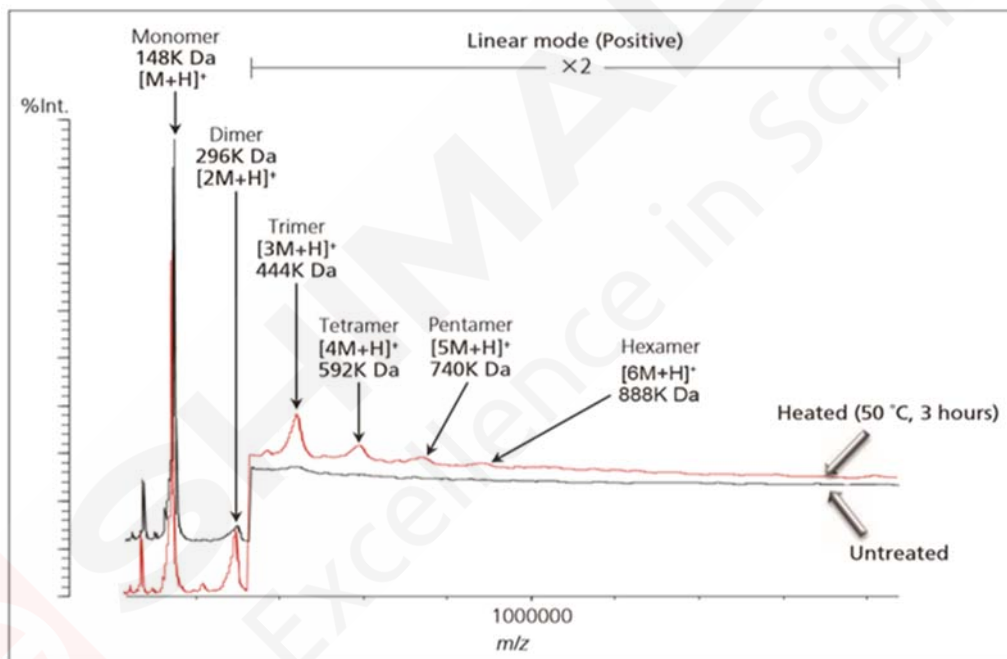


图 3 热处理样品(50°C,3 小时)与未处理样品质谱图的比较

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B060 应用报告。

MALDI-8020及MALDI-TOF Performance快速鉴定疫苗亚基组成

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。

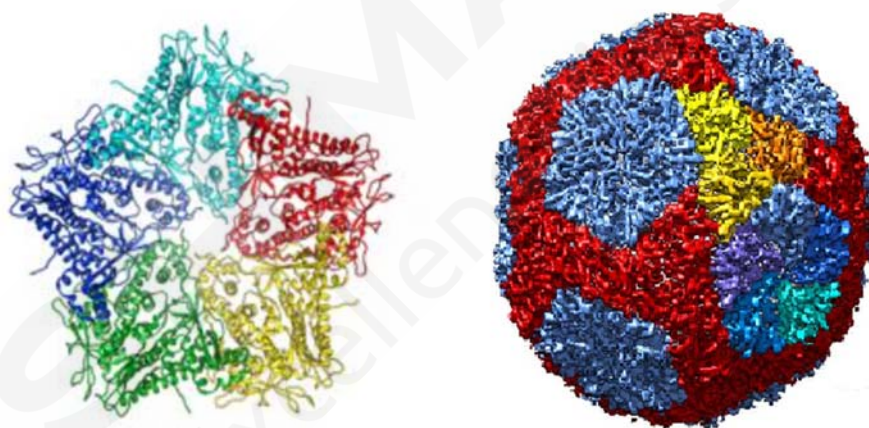


图 1 亚基、蛋白与病毒

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。

1 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。

2 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。

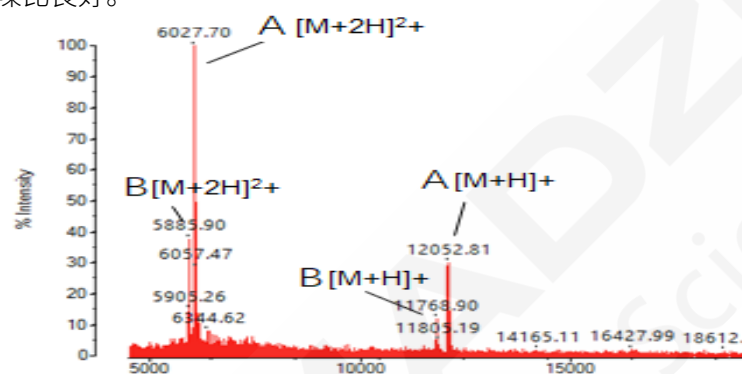


图 2 MALDI-TOF 检测标准品 A, B 亚基的一级质谱图

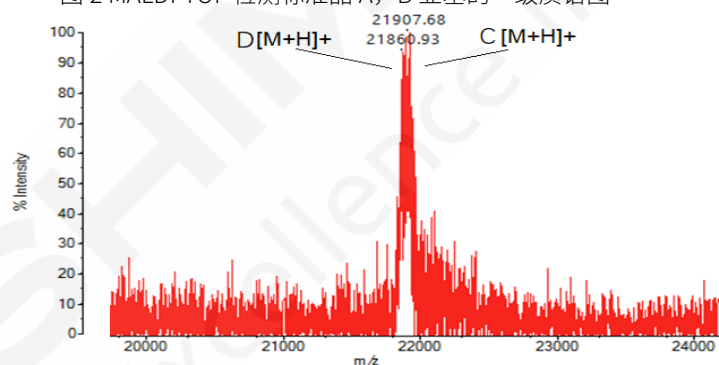


图 3 MALDI-TOF 检测标准品 C, D 亚基的一级质谱图

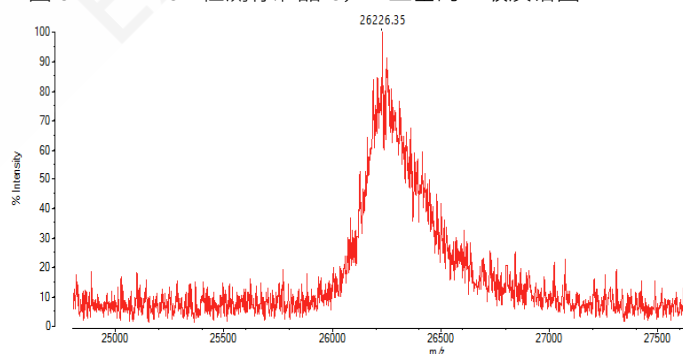


图 4 MALDI-TOF 检测标准品 E 亚基的一级质谱图

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。

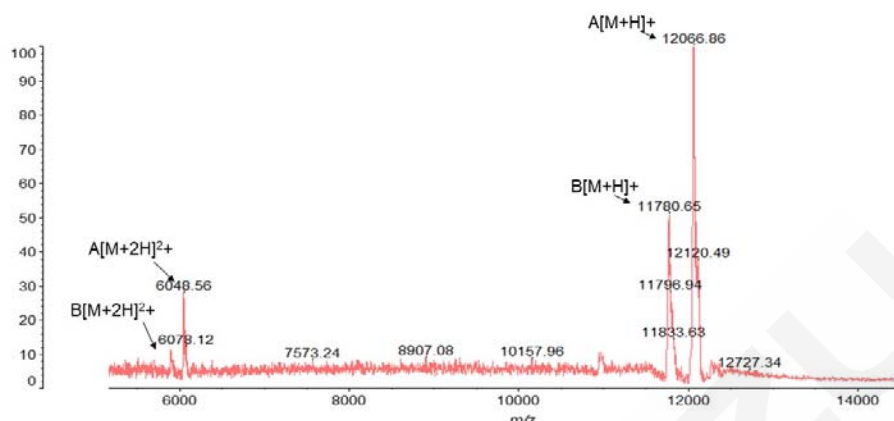


图 5 MALDI-TOF 检测样品 A, B 亚基的一级质谱图

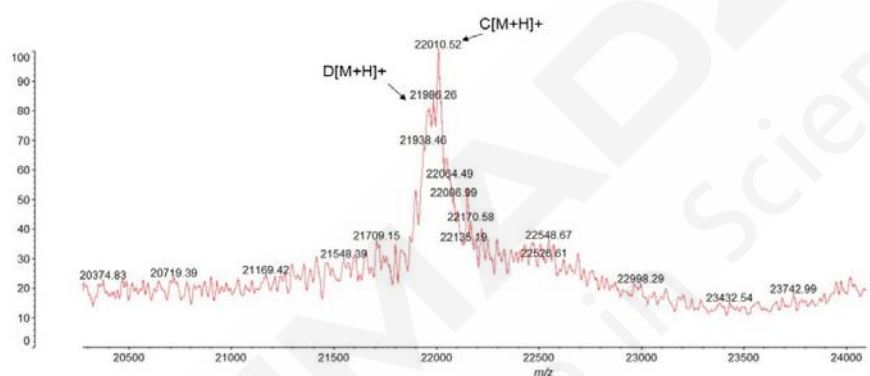


图 6 MALDI-TOF 检测样品 C, D 亚基的一级质谱图

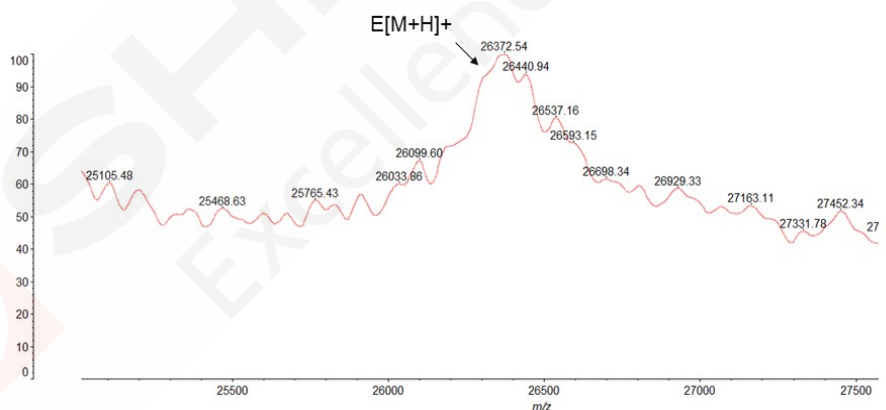


图 7 MALDI-TOF 检测样品 E 亚基的一级质谱图

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。

3 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，是蛋白类疫苗亚基分析的有力工具。

MALDI-8020 鉴定蛋白质种类

摘要：本文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，在线性正离子模式下，以 CHCA (α -氰基-4-羟基肉桂酸) 为基质，分析花生过敏原蛋白质 Ara h 2 的酶解产物，得到了精确的分子量分布信息。将酶解产物的 PMF (肽指纹图谱) 检索 Mascot 数据库，成功匹配到理论蛋白质信息。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 蛋白质鉴定 Ara h 2

蛋白质鉴定是 MALDI-TOF 的常规应用之一，但传统 MALDI-TOF 体积较大，价格昂贵。MALDI-8020 作为全世界体积最小的 MALDI-TOF，占地面积小，价格相对较低，性能优良，同样可以较为方便地进行蛋白质鉴定分析。Ara h 2 (Conglutin-7) 是主要的花生过敏原蛋白质之一，可以引起严重的食物过敏反应，对该蛋白进行定性分析，有助于花生过敏原研究。

本文以 CHCA 为基质，应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020 检测花生过敏原蛋白质 Ara h 2 的酶解产物，并对其进行 Mascot 搜库分析，搜库结果与理论相符，验证了 MALDI-8020 的检测结果，表明 MALDI-8020 可以满足蛋白质分析的要求。

1 实验部分

1.1 分析仪器

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 500-3000
激光能量：60

1.3 试剂和样品

基质：CHCA (α -氰基-4-羟基肉桂酸)
样品：花生过敏原蛋白质 Ara h 2 (Conglutin-7)

1.4 样品前处理

取 50 μ g 样品，应用 DTT (二硫苏糖醇) 和 IAA (碘乙酰胺) 进行还原烷基化处理后，加入 1 μ g 胰蛋白酶 37°C 酶解过夜。吸取 1 μ L 酶解产物和 1 μ L CHCA 基质溶液点靶，自然干燥后送入质谱进行分析。

2 结果讨论

Ara h 2 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 800-2200 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_Viridiplantae (2018_08, 39603 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 Conglutin-7，与理论一致。

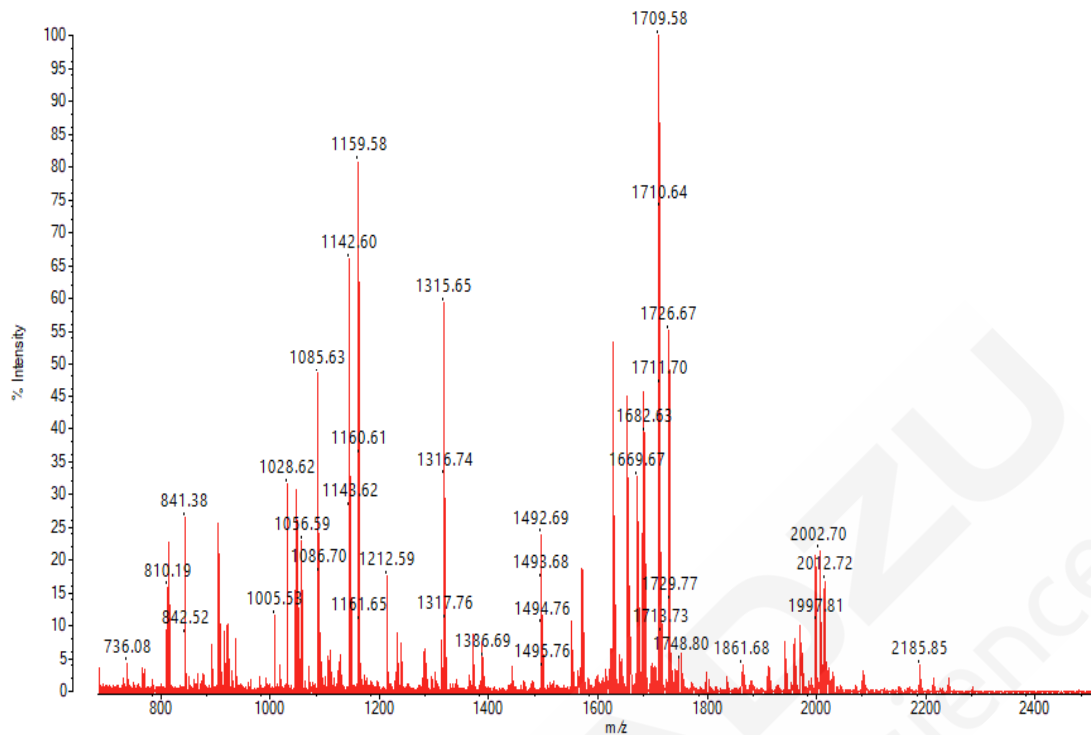


图 1 Ara h 2 的胰蛋白酶酶解产物的一级质谱图

Mascot Search Parameters

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

Search Parameters
Database Enzyme
Taxonomy Hits
 Decoy Missed cleavages

Fixed modifications

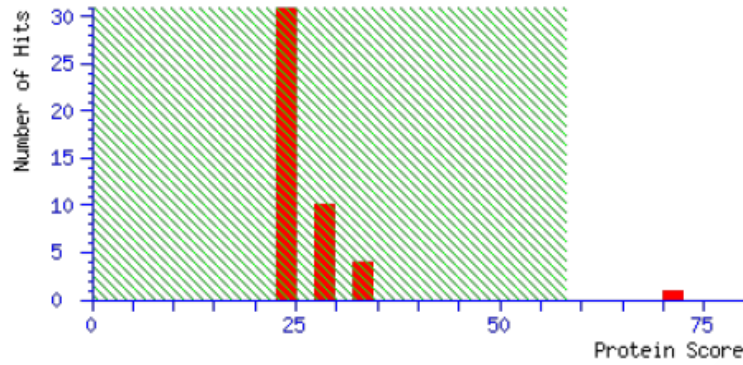
Variable modifications:

Display all modifications

- Acetyl (K)
- Acetyl (N-term)
- Acetyl (Protein N-term)
- Amidated (C-term)
- Amidated (Protein C-term)
- Ammonia-loss (N-term C)
- Carbamidomethyl (N-term)
- Carbamyl (K)
- Carbamyl (N-term)
- Carboxymethyl (C)
- Cation:Na (C-term)

Peptide tolerance Monoisotopic Average
Mass type

图 2 Mascot 检索参数



1. [CONG7_ARAHY](#) Mass: 20558 Score: 71 Expect: 0.0029 Matches: 9
 Conglutin-7 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=2

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta M	Peptide
23 - 31	1159.5800	1158.5727	1158.5418	0.0309 0	R.QQWELQGDR.R
23 - 32	1315.6500	1314.6427	1314.6429	-0.0002 1	R.QQWELQGDRR.C
40 - 52	1624.6800	1623.6727	1623.7973	-0.1246 0	R.ANLRPCEQHLMQK.I
56 - 62	841.3800	840.3727	840.3250	0.0478 0	R.DEDSYGR.D
92 - 102	1212.5900	1211.5827	1211.5755	0.0072 1	R.RGAGSSQHQR.C
93 - 102	1056.5900	1055.5827	1055.4744	0.1083 0	R.GAGSSQHQR.C
103 - 115	1726.6700	1725.6627	1725.6835	-0.0208 0	R.CCNELNEFENNQR.C
116 - 131	2012.7200	2011.7127	2011.8220	-0.1093 0	R.CMCEALQQIMENQSDR.L
147 - 155	1085.6300	1084.6227	1084.5448	0.0780 0	R.NLPQQCGLR.A

图 3 Ara h 2 (Conglutin-7) 酶解产物一级 PMF 搜库结果

3 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 检测花生过敏原蛋白质 Ara h 2 的酶解产物，搜库结果与理论相符。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、分析速度快、仪器维护方便，性能卓越，是蛋白质鉴定的有力工具。

MALDI-8020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-802 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。

1. 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

2. 样品前处理

取 100 μg 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 μL 胰蛋白酶 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 37 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 样品溶液和 0.5 μL CHCA (5 mg/mL) 基质溶液点靶,自然干燥后送入质谱进行分析。

3. 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。

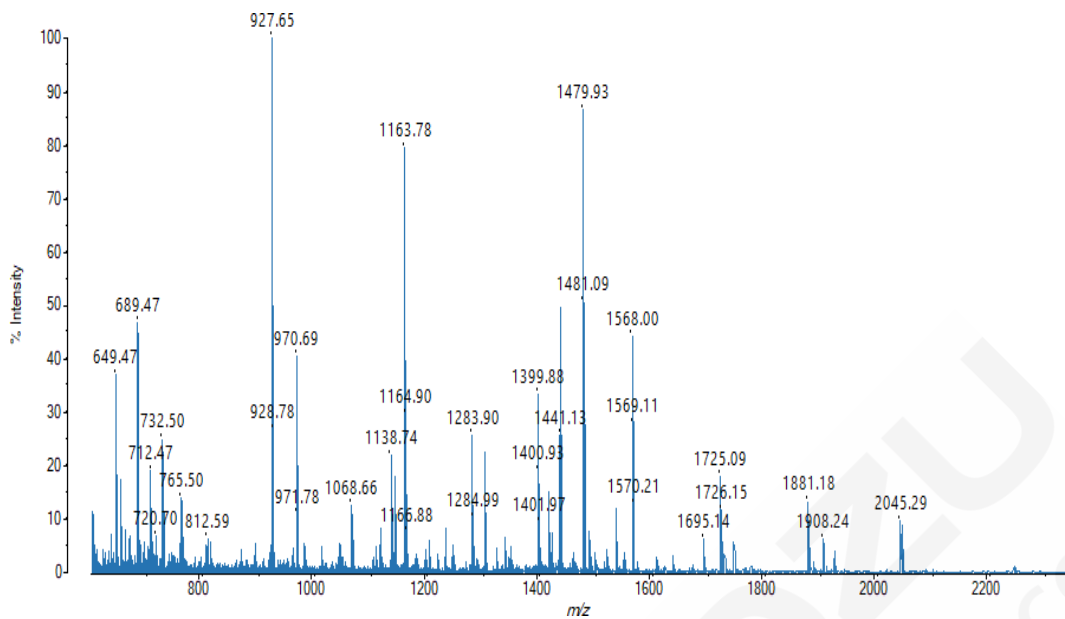


图 1 牛血清白蛋白的胰蛋白酶酶解产物的一级质谱图

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

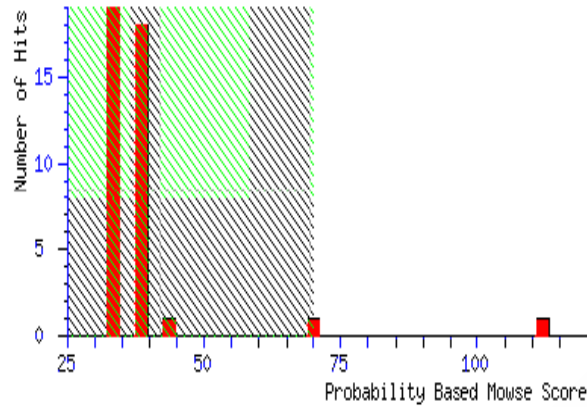
Peptide tolerance: Da

Instrument:

Mass type: Monoisotopic Average

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.LVNELTEFAK.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.QEPPER.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.RHPYFYAPELLEYANK.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.DAFLGSFLYEYSR.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

4. 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。

MALDI-8020 分析重组人粒细胞刺激因子

摘要：本文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，在线性正离子模式下，以芥子酸（SA）为基质，分析蛋白质类药物重组人粒细胞刺激因子的分子量，不仅得到了精确的分子量信息，还观察到了不同电荷离子及蛋白质多聚体的存在和分布。本例可为蛋白质类药物分子量及分布分析提供参考。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 蛋白质类药物 重组人粒细胞刺激因子

重组人粒细胞因子注射液用于预防和治疗癌症化疗等原因导致的中性粒细胞减少症，促进中性粒细胞数量的增加。作为直接注射给药的基因工程药物，药品的分子量及分布为其纯度和物理化学性质的质控依据，对药品质量及安全性的判定尤为重要。MALDI-TOF MS 因其分析通量高、速度快、样品用量少、分析的质量范围宽（原理上无上限）、提供的分子量准确，在蛋白质分子量分析方面应用广泛。

本文以 SA（芥子酸）为基质，应用体积紧凑小巧的台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020 分析重组人粒细胞刺激因子，直接得到了样品带不同电荷离子和蛋白质多聚体的分子量和分布信息，展示了 MALDI-8020 的卓越性能。

1. 实验部分

1.1 仪器

MALDI-8020 台式飞行时间质谱仪。

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 2000-60000

激光能量：120

1.3 试剂和样品

基质：芥子酸（SA）

样品：重组人粒细胞刺激因子注射液原液

1.4 样品前处理

取 0.5 μ L 样品与 0.5 μ L 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。

2. 结果讨论

重组人粒细胞刺激因子注射液原液的质谱检测结果如图 1 所示。从结果来看，样品不仅检测到单电荷（约 18.8 kDa）、二电荷（约 9.4 kDa）、三电荷（约 6.27 kDa）的离子，还可以观察到蛋白质二聚体（约 37.6 kDa）和三聚体（约 56.4 kDa）的信号峰。样品检测到的分子量精确，与理论相符，质谱图信噪比良好。

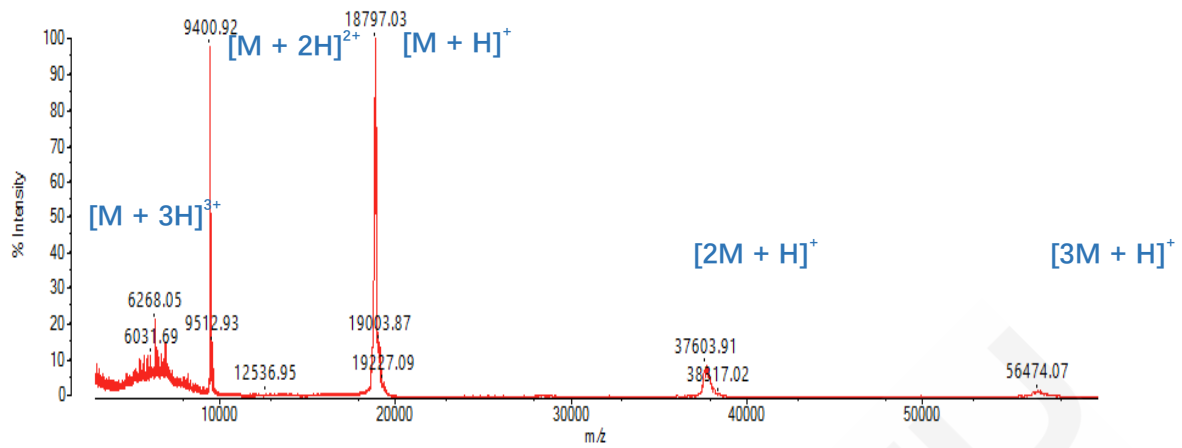


图21重组人粒细胞刺激因子注射液原液的一级质谱图

3. 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 检测蛋白质类药物重组人粒细胞刺激因子注射液原液的蛋白质分子量，直接得到了样品单电荷离子、二电荷离子、三电荷离子、蛋白质二聚体和三聚体的分子量信息，结果与理论一致。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、分析速度快、仪器维护方便、软件满足 21 CFR Part11 合规性，性能卓越，是蛋白质类药物分子量分析的有力工具。

MALDI-8020 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。

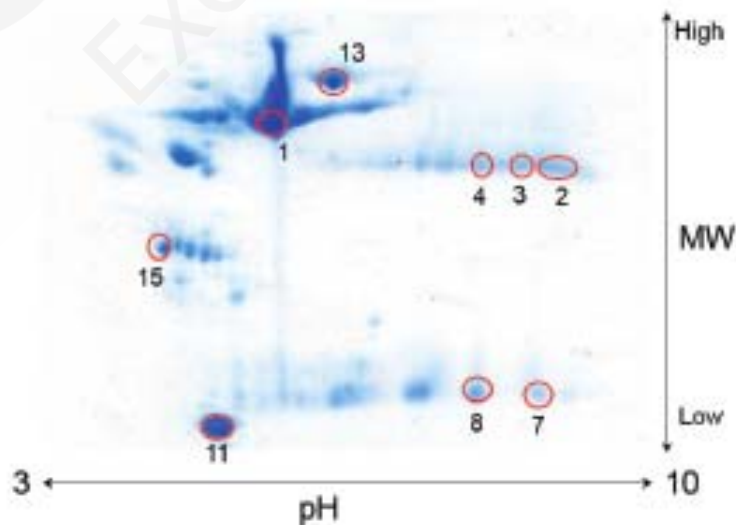


图 1 人血清蛋白质二维电泳凝胶图像 红圈：凝胶切割点

■ 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。

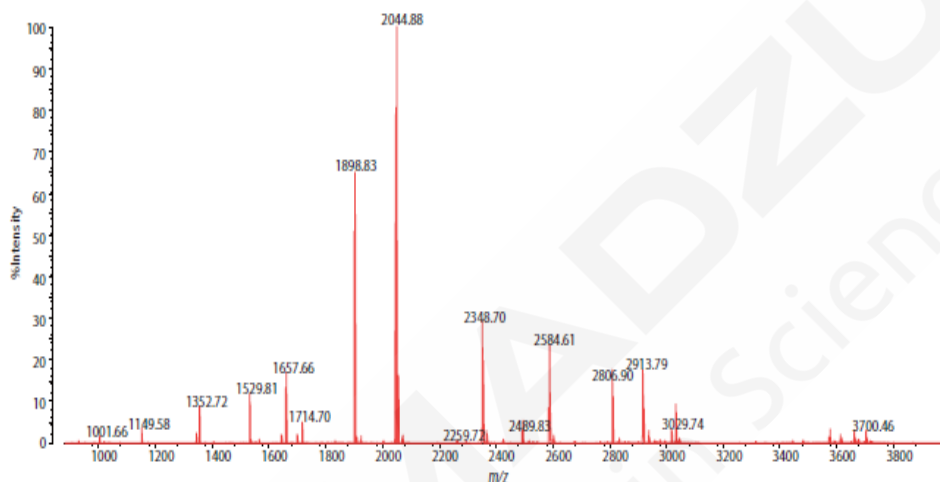


图 2 点 No.1 的质谱图 检测模式：Positive Linear

表 1 随机选取的蛋白点的鉴定结果

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。

MALDI-8020和QC Reporter软件对合成肽进行质量控制分析

生物制药相关制剂生产过程中, 质量控制(QC)在保证高质量产品方面起着至关重要的作用。制剂组分的改变或降解可能会影响治疗作用, 导致活性丧失或毒性的发生。在一些可用于生物制品质控的分析技术中, MALDI-TOF 质谱以其快速简单的操作, 低运行成本, 高灵敏度, 而且能提供某种化合物及其杂质/加合物和修饰产物的分子量信息、序列和结构信息, 因而被广泛使用。

由于制剂降解而导致制剂变化的一个例子是肽或蛋白质的甲硫氨酸残基的氧化, 该氨基酸对氧化非常敏感。

本文使用 Shimadzu MALDI-8020 台式线性 MALDI-TOF 质谱仪和 QC Reporter 软件为合成肽的高通量和自动化质量控制分析提供完整的工作流程解决方案 (图 1)。

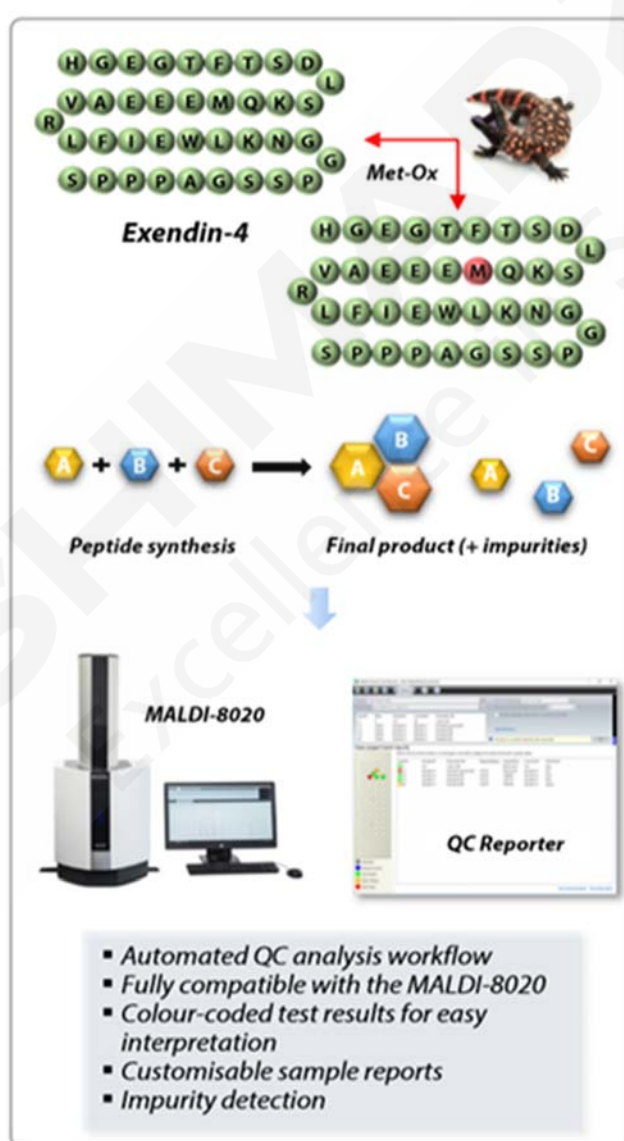


图 1 用于合成肽的 QC 分析的工作流程

■ 样本和方法

Bachem (英国)慷慨地提供了4种杂质含量不同的合成肽样品。Exendin-4购自Sigma-Aldrich。蛋氨酸的氧化使用1%过氧化氢在37°C (15分钟)下进行。氧化之后,采用ZipTip® C18微柱(Millipore)对样品进行纯化。对于MALDI分析,所有样品都和 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA,5 mg/mL,等体积的乙腈/0.1%三氟乙酸)一起点在靶板上。

■ 结果

Exendin-4 是存在于吉拉毒蜥(图 1, *Heloderma suspectum*)唾液中的天然肽。它的合成物-艾塞那肽可用于治疗 2 型糖尿病。

使用 QC Reporter 软件进行 Exendin-4 及其修饰物的分析是一个典型的质控分析流程。为了模拟 Exendin-4 的降解,对它进行化学氧化,之后单甲硫氨酸残基发生磺化形式的改变,并且通常观察到+16 Da 的质量变化。为了模拟部分降解,制备天然 Exendin-4 和 Met-Ox Exendin-4 的混合物。

图 2 显示了 QC Reporter 软件的结果展示窗口,不同颜色代表了 QC 实验的不同结果。目标峰设定为 4186.6 Da,即天然 Exendin-4 的中性平均分子量。软件计算目标物的质子化([M+H]⁺)分子量,然后在所获得的谱图中进行搜索。图 2 右下方的插图显示了用于计算和生成样本结果的用户自定义质量标准设置,包括:相对于目标峰的质量容差、最高容许的加合物及杂质水平(设置为目标峰面积的 50%)。

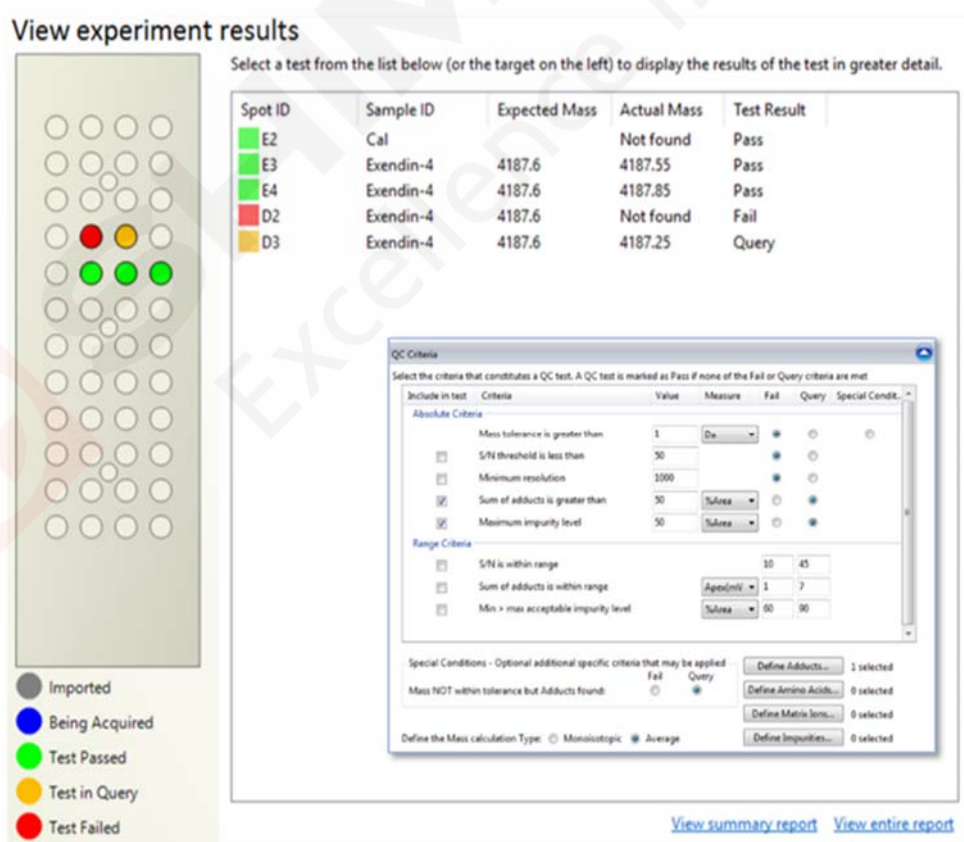


图 2 蛋白质质谱 QC Reporter 软件窗口显示了 exendin-4 QC 实验的不同颜色标记的结果。

右下方的插图显示了用于计算结果的质量标准设置。

在图 3a 中，成功检测到目标峰(m/z 4187.6, $[M+H]^+$)，并且样品(图 2 中的 E3)被报告为“合格”。图 3a 中的插图显示了一部分的报告详细结果。在图 3b 中，未观察到 Exendin-4 的目标峰，然而检测和报告了(图 3c) Exendin-4 的氧化型峰(+16 Da; m/z 4203.6, $[M+H]^+$)。因此，样本(图 2 中的 D2)被报告为“不合格”。图 3b 显示了一种由于氧化而发生完全降解的情况。

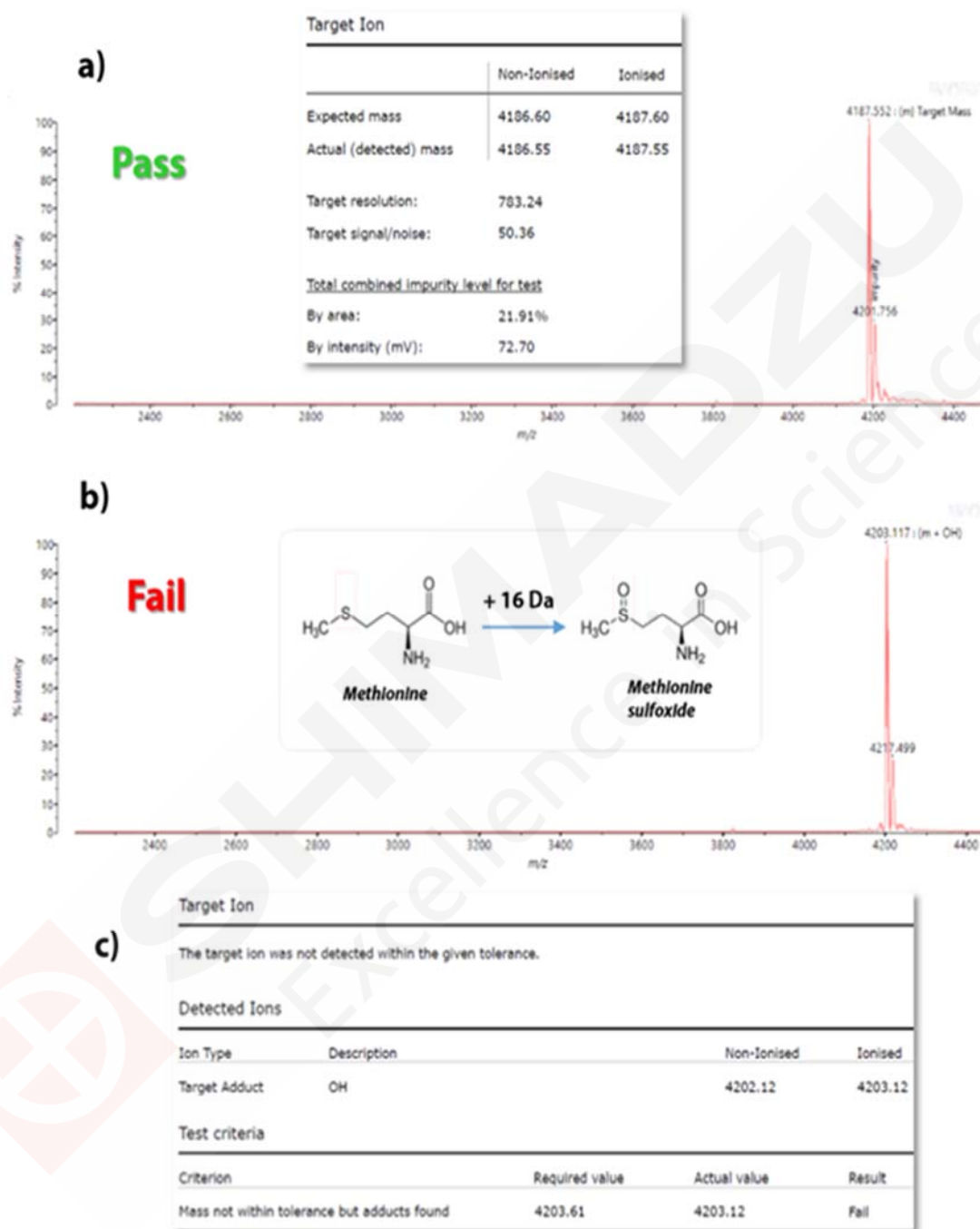


图 3

a) QC 实验谱图显示成功检测出目标峰 m/z (4187.6、 $[M+H]^+$)，并且得到了“合格”结果。插图:部分样本结果生成报告的详细信息。

b) QC 实验谱图显示没有检测到目标峰 m/z ，而得到“失败”结果；插图:甲硫氨酸残基的氧化机制。

c) 生成报告中样本详细结果显示检测到了目标峰的加合物 (m/z 4203.61, $[M+H]^+$)。为了计算质子化($[M+H]^+$)氧化肽类型，OH 被认为是加合物。在这里“O”对应于氧元素，“H”对应于电离质子。

在图 4a 中，天然 Exendin-4 和 Met-Ox Exendin-4 混合物的 QC 实验的结果被报告为“查询”。这表明，虽然检测到了天然型(m/z 4187.6, $[M+H]^+$)的目标峰，但是 Met-Ox 型的标志峰(m/z 4203.61, $[M+H]^+$)超过了天然型峰面积的 50% (图 2,图 4b)，参考 QC 标准设置 (图 2)，结果显示在样本报告中 (图 4b)。

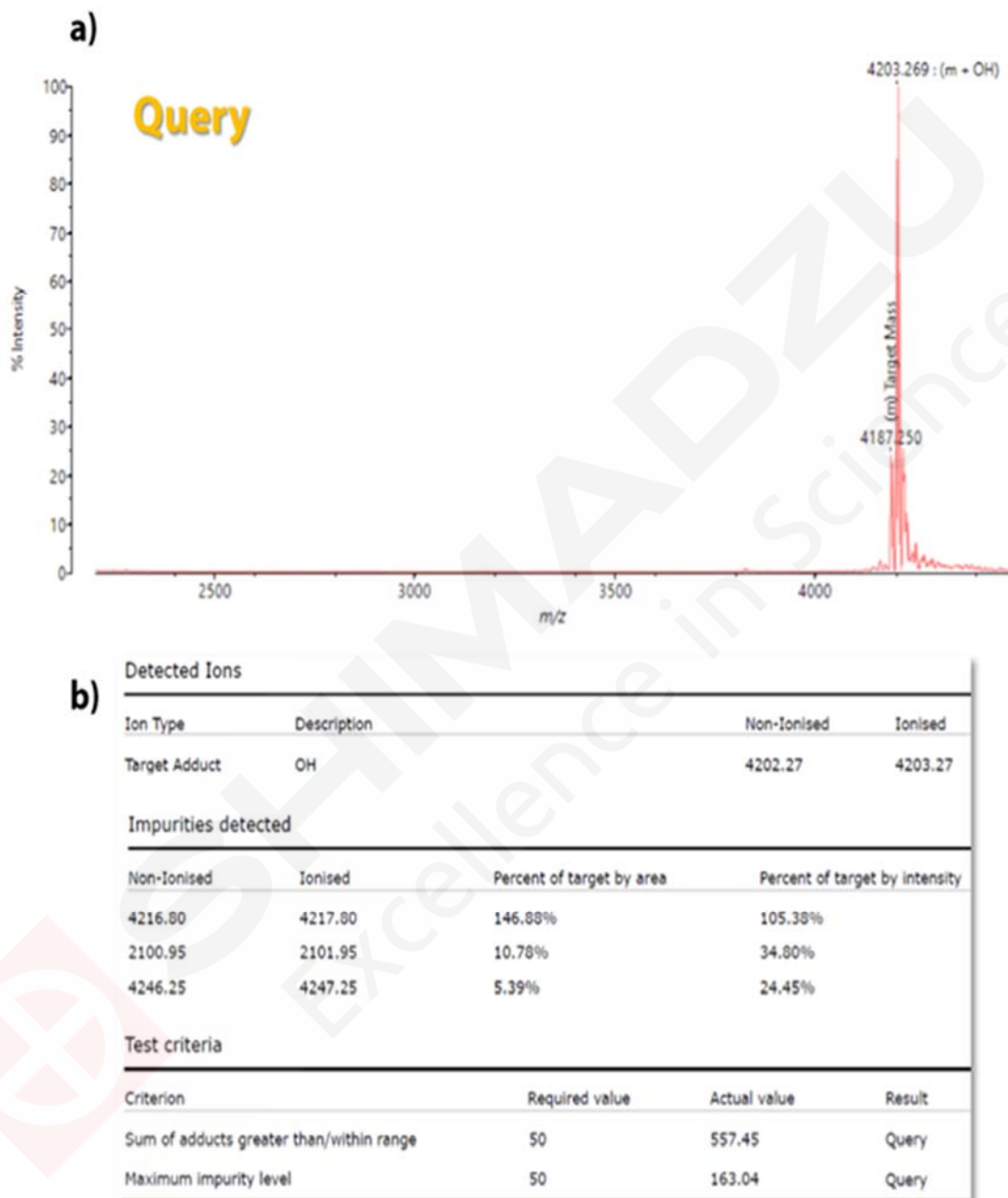


图 4

a) QC 实验谱图显示不仅检测到天然型目标峰，还检测到显著的氧化型峰，因此得到“查询”结果。

b) 生成报告中样本结果的详细信息显示氧化型峰面积超过目标峰面积的设定值 50%。

图 5 a 至 c 显示了三个肽合成产物的 QC 实验结果。如图所示，成功检测到三个目标峰(m/z 1287.73、1503.82 和 1740.94; $[M+H]^+$)。从插图的样本报告中，可以看到三个肽都达到了 QC 质量标准：目标质量峰的最小信噪比(设置为 10)、加合物(钠和钾)和杂质的最大量(都设置为目标

峰面积的 50%)。

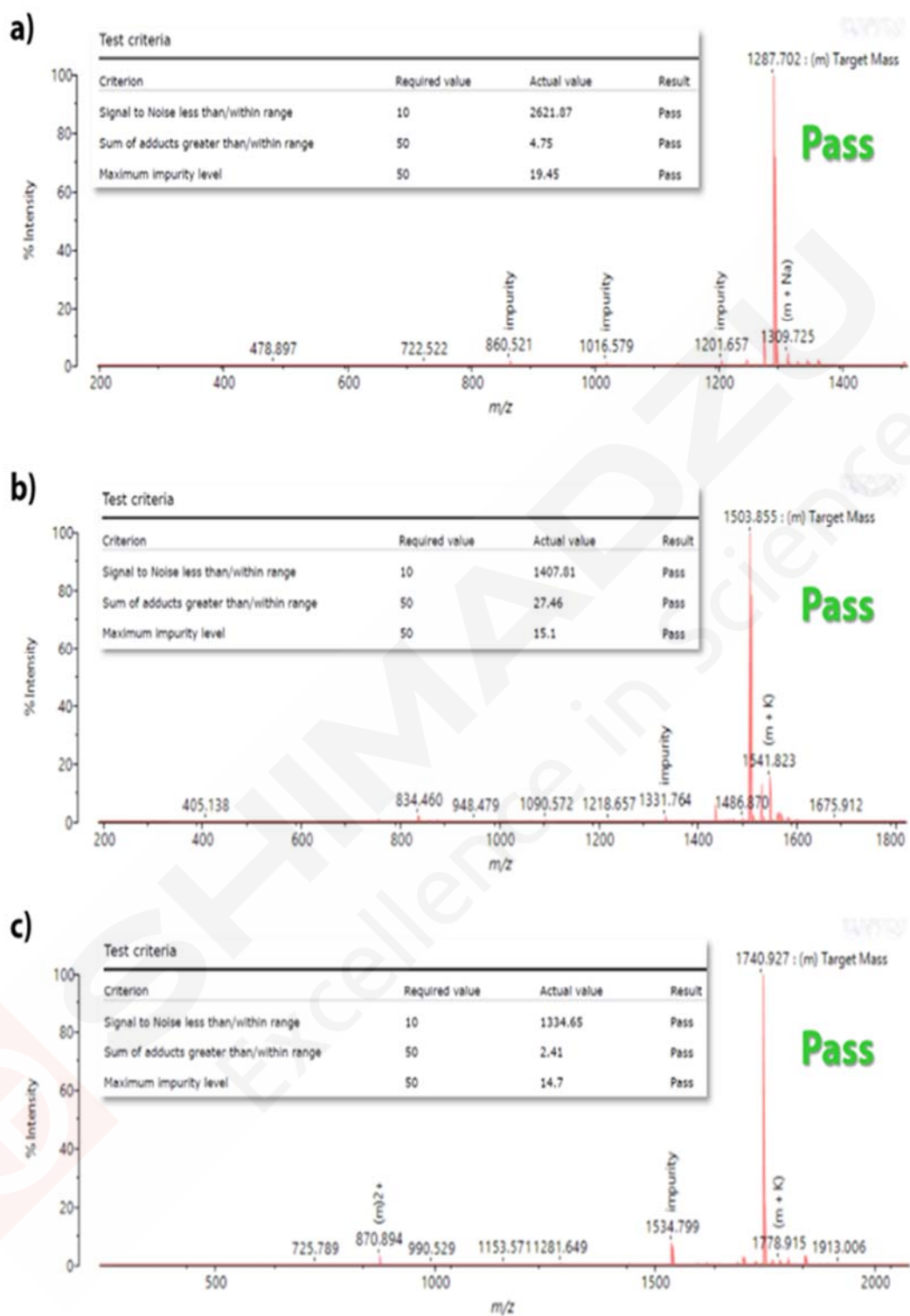


图 5a-c QC 实验的谱图显示成功检测到三个目标质量峰 (m/z 1287.73、1503.82 和 1740.94; $[M+H]^+$), 而且得到了“合格”结果。

插图: 报告的样本结果详细信息显示所有样本达到了设定的 QC 标准。

图 6a-c 展示了其中一个合成肽的 QC 实验结果, 该肽含有显著水平的杂质, 由带有乙酰基的合成的截短中间体组成 (图 6a 显示预估的分子量)。如图 6b 所示, 成功检测到目标质量峰

(m/z 1560.89, $[M+H]^+$) 以及与杂质峰理论值一致的峰。图 6c 生成的样本报告显示, 由于不满足杂质水平标准设置, 故报告为“不合格”。

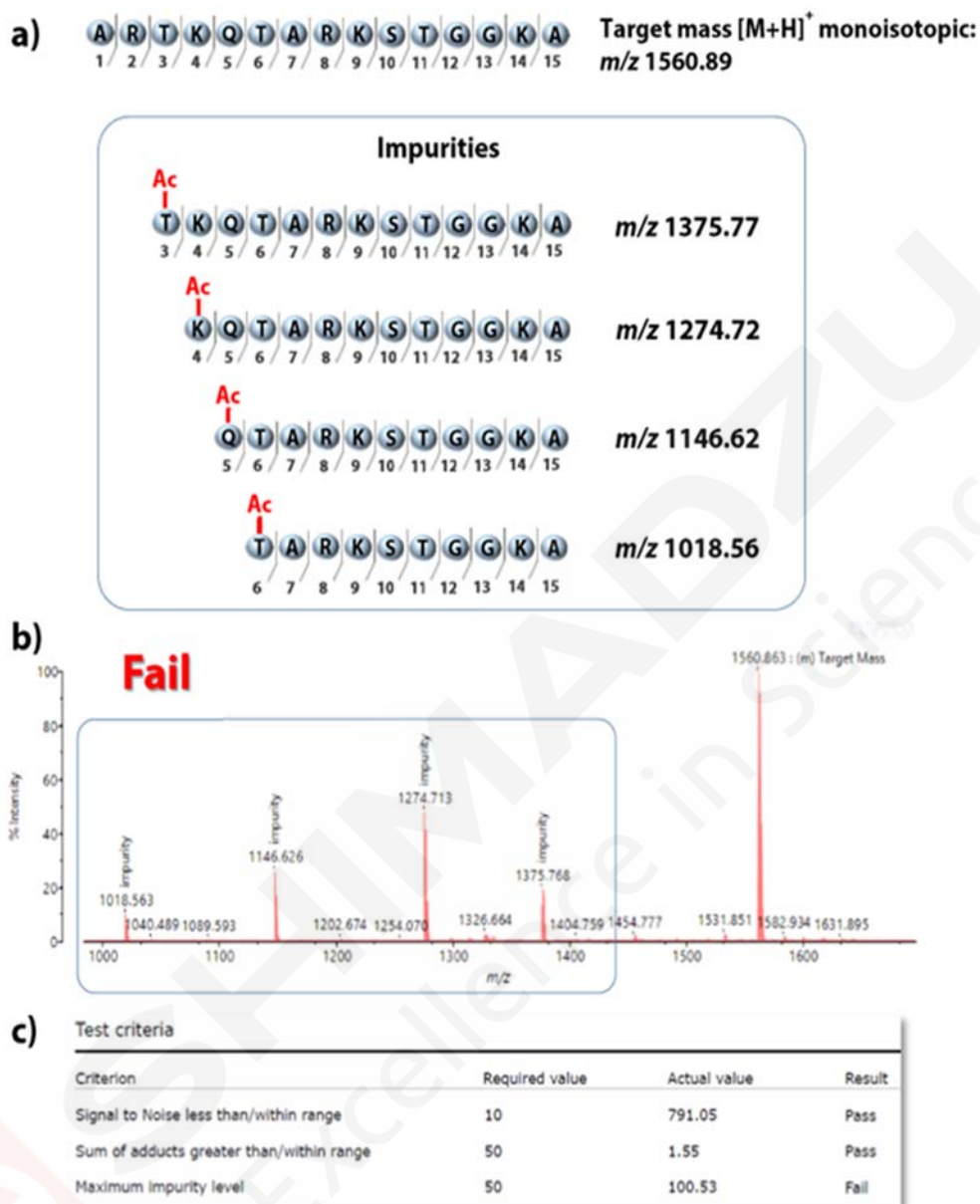


图 6

a)最终肽产物及其杂质(被切断的乙酰化中间体)的序列和分子量计算值。

b)QC 实验谱图显示目标质量峰 m/z 1560.89 ($[M+H]^+$), 由于杂质峰占目标峰面积的 50%以上, 导致“不合格”结果。

c)生成的报告中样本结果的详细信息, 显示杂质峰面积超过目标峰面积的 50%。

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B092 应用报告。

第二节 糖类分析中的应用

常见的生物大分子包括蛋白质、核酸、脂类和糖类。20 世纪末，继基因组学、蛋白组学之后，糖组学也日益受到人们的关注。糖组学是对糖链组成及其功能研究的一门新学科，是基因组学的后续和延伸，具体内容包括研究糖与糖之间、糖与蛋白质之间、糖与核酸之间的联系和相互作用，其主要研究对象为聚糖。

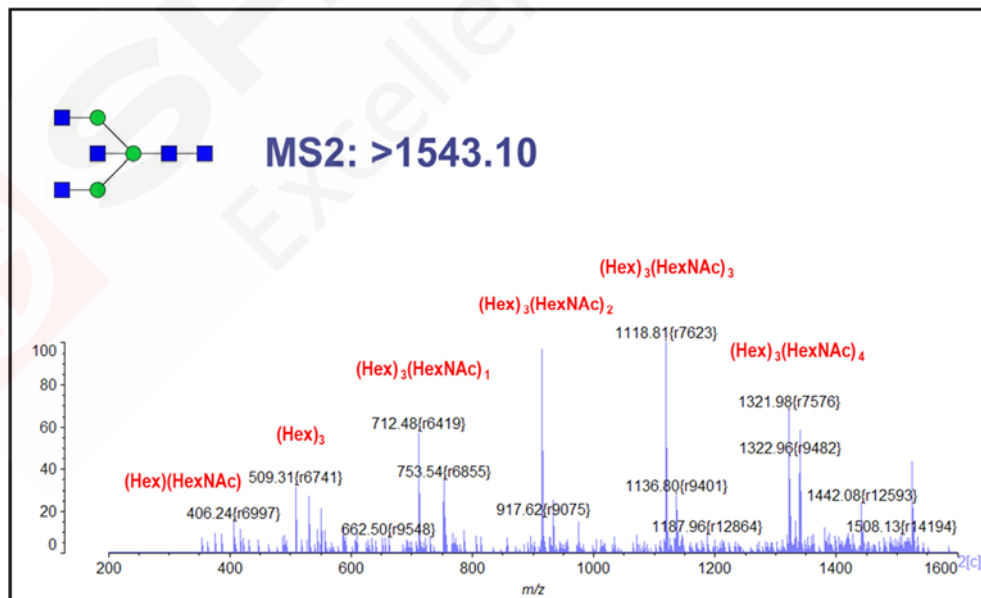
丰富多样的聚糖覆盖了生物有机体的所有细胞，不仅体现在细胞的类型和状态，也参与了许多生物学行为，如细胞发育、分化、肿瘤转移、微生物感染、免疫反应等；聚糖还体现生物和分子的进化作用，如糖酵解、生物合成的保守性以及核糖的起源等。

毫无疑问，要试图深入了解生命的复杂规律，就必须有“基因组-蛋白质组-糖组”的整体观念，这样才有可能揭示自身全部基因功能，从而进一步深入研究疾病的发病机制，有效控制疾病的发生、发展及预后，以及筛选疾病、预测诊断标志物和开发新的药物靶标。

根据与糖链链接方式的不同，糖蛋白主要有两种糖基化形式：N-连接和 O-连接。N-连接和 O-连接糖蛋白主要定位于细胞膜表面，也可以分泌型蛋白的形式存在。此外，糖蛋白还有 GPI 锚定蛋白和近年来在细胞核和细胞质中发现的 O-GlcNAc (N-乙酰氨基葡萄糖) 修饰蛋白两种存在形式。

糖链结构信息包括糖链的单糖组成、异头碳构型、糖苷键的连接位置和糖残基的序列分析等内容。糖蛋白糖链的结构分析包括糖蛋白的提取分离、糖链释放和糖链结构鉴定等多个步骤。连续凝集素亲和色谱法 (SLAC) 通常用来分离细胞中的各种糖蛋白/糖链。

到目前为止，质谱仍是糖生物学家应用最为广泛的测定糖链结构的工具。快原子轰击质谱 (FAB-MS)、电喷雾质谱 (ESI-MS)、基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 是目前在糖链结构测定方面应用广泛的 3 种质谱，它们可以直接对样品进行离子化和解析以获得信息，而且可以对完整的糖复合物或者是片段化的样品进行分析。



糖链解析谱图

MALDI-TOF Resonance 分析中药材中多糖降解得到的寡糖

摘要: 中药材品种繁多,许多中药材在性状上不易区分,较容易混淆。许多易混的中药材由于具有较高的含糖量,将中药材中的多糖提取、降解为寡糖后,通过毛细管电泳检测寡糖,由于不同的中药材多糖降解得到的寡糖种类和含量不同,毛细管电泳检测结果呈现不同的谱图,从而实现不同种类中药材的鉴定。然而,毛细管电泳技术不能直接提供降解得到的寡糖的分子信息,如分子量、聚合度等,因此,这就使进一步分析中药多糖降解为寡糖的研究难以深入。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)灵敏度高、分析快速、对杂质的包容性强、分析的质量范围大,能够对糖类尤其是非衍生化糖进行直接分析。本文应用 MALDI-TOF-MS 以 DHB (2, 5-二羟基苯甲酸) 为基质,对从中药中提取、降解得到的寡糖进行了分析,质谱结果直接给出寡糖的分子量分布、重复单元结构和聚合度信息,为深入研究中药多糖降解机制提供了基础。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF-MS 中药材 寡糖

常用的中药材中,一些药材的名称、外观和颜色都很相似,因此很容易混淆。用错药后,轻则影响临床疗效,重则引起不良反应甚至中毒,从而对人们的用药安全造成很大隐患。因此,需要对这些常用的容易混淆的中药材进行鉴定。对于品种不同、且含糖量高的一些易混中药材,通过提取其中的多糖,将多糖降解为寡糖,得到的寡糖种类和含量不同,使用毛细管电泳分析寡糖,得到不同的图谱,因此可以进行易混中药材的品种鉴定。但是仅仅应用毛细管电泳技术,对于中药多糖降解为寡糖的研究是不足够的,因为毛细管电泳技术不能直接提供寡糖分子的信息,因此还需要其他的可靠手段进行表征。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 作为一种“软”电离技术,在准确、快速和灵敏地测定寡糖分子量和糖类化合物结构的研究及应用中具有很大的优势。本文选取含糖量高的中药材北沙参,利用水提醇沉法从中药中提取出多糖,将多糖降解为寡糖后,以 DHB (2, 5-二羟基苯甲酸) 为基质,利用 MALDI-TOF-MS 测定寡糖,质谱结果直接给出寡糖的分子量分布、聚合度和组成单元的信息,为进一步研究中药多糖降解生成寡糖的机理提供了基础。

1 实验部分

1.1 仪器

AXIMA Resonance

1.2 质谱条件

调谐模式: 反射 正离子模式

扫描范围: m/z 300-2000

激光能量: 110

1.3 试剂和样品

MALDI 使用基质为 DHB (2, 5-二羟基苯甲酸), 样品为中药材北沙参

1.4 实验方法

根据多糖溶于水而不溶于醇、醚、丙酮等有机溶剂,使用水提醇沉方法,从北沙参中药材中提取得到多糖,以 0.3 mol/L 的盐酸溶液使多糖发生降解,降解成寡糖,之后使用旋蒸仪进行蒸发烘干浓缩,以 1:1 的纯水和甲醇配制成浓度为 2 mg/mL 的溶液,与 6 mg/mL 的 DHB

基质等体积混合，将 1 L 混合溶液点在 MALDI 靶板上。在为 MALDI 制备样品时，本文使用了重结晶方法，重结晶法是在干燥已结晶的样品上滴 0.4 L 的乙醇，再在室温下干燥。然后将靶板放入 AXIMA Resonance 中进行检测。

2 结果讨论

北沙参中提取到的寡糖质谱图如图 1 所示。由图可见，北沙参中提取的糖经降解后得到一系列的寡糖，且相邻寡糖都相差一个六碳糖的残基质量数，即 162，如图 2 中的 m/z 1013.33、1175.38 和 1337.44，这说明北沙参多糖降解时，降解下来相同的糖单元。在各主峰旁都有一个与其分子量相差 16 Da 的次峰 (m/z 1013.33 和 1029.30、 m/z 1175.38 和 1191.36)，这正好是 Na 和 K 的质量数差。这是因为糖并不象蛋白质那样容易质子化，所以它极易与样品或基体中的 Na^+ 、 K^+ 形成加合物，在质谱图中形成一对分子量相差 16 Da 的峰。糖的这一性质成为判定其分子量的重要依据。

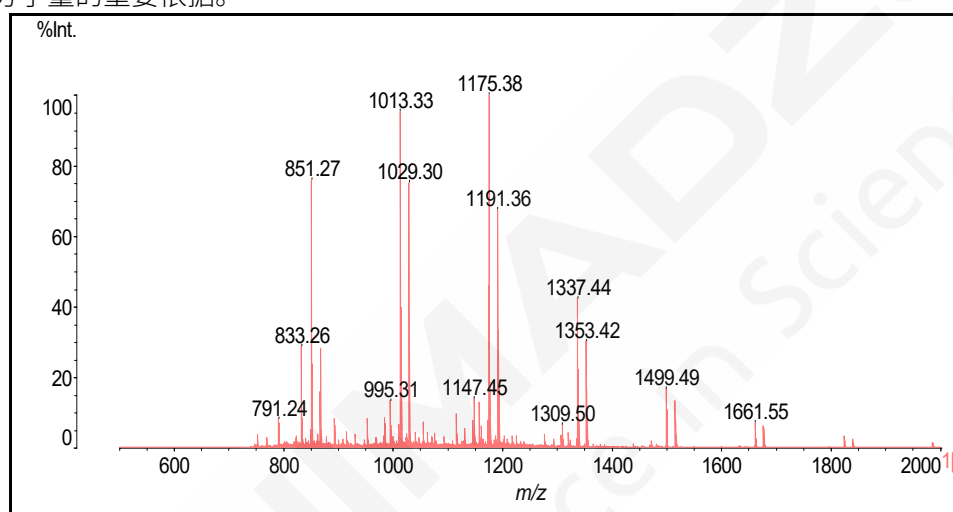


图1 寡糖样品质谱图

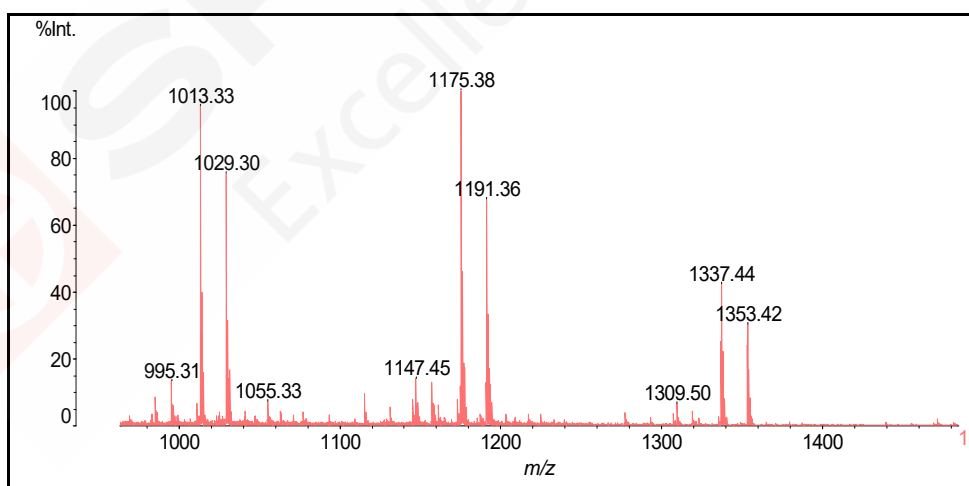


图2 图1的局部放大图

若糖未被衍生时，重复单元为六碳糖的寡糖聚合度为 1 到 12 时，形成加 Na^+ 峰后，理论 m/z 值为 213.06、365.12、527.17、689.22、851.27、1013.33、1175.38、1337.43、1499.49、1661.54、1823.59 和 1985.64。图 3 为图 1 质谱图较大 m/z 值部分的放大图，图 4 为使用较小 m/z 起始的扫描范围得到的质谱图。将图 1、图 3 和图 4 的 m/z 值与理论 m/z 值比较，北沙

参中药材中多糖降解为寡糖时，得到了聚合度为 2-12 的寡糖，即得到了二糖、三糖、四糖、五糖、六糖、七糖、八糖、九糖、十糖、十一糖和十二糖。

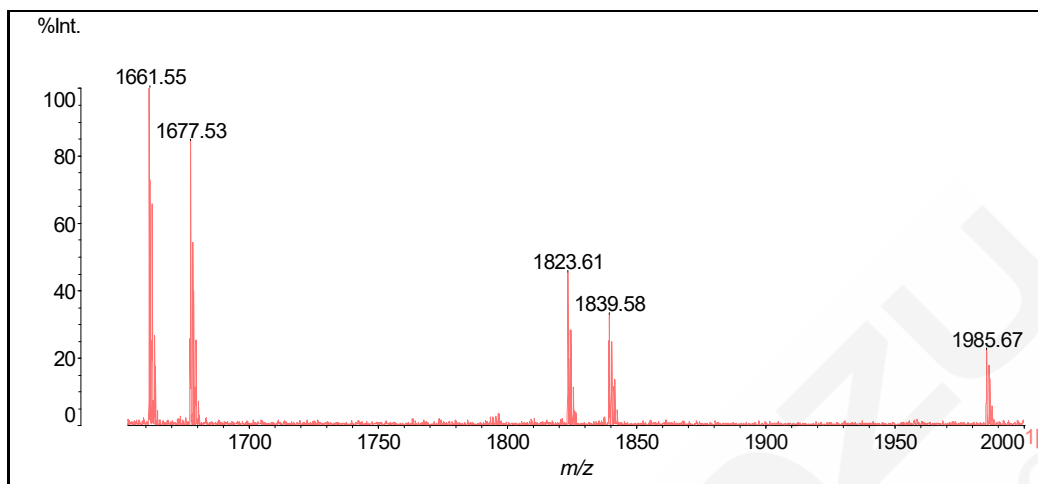


图3 图1的局部放大图

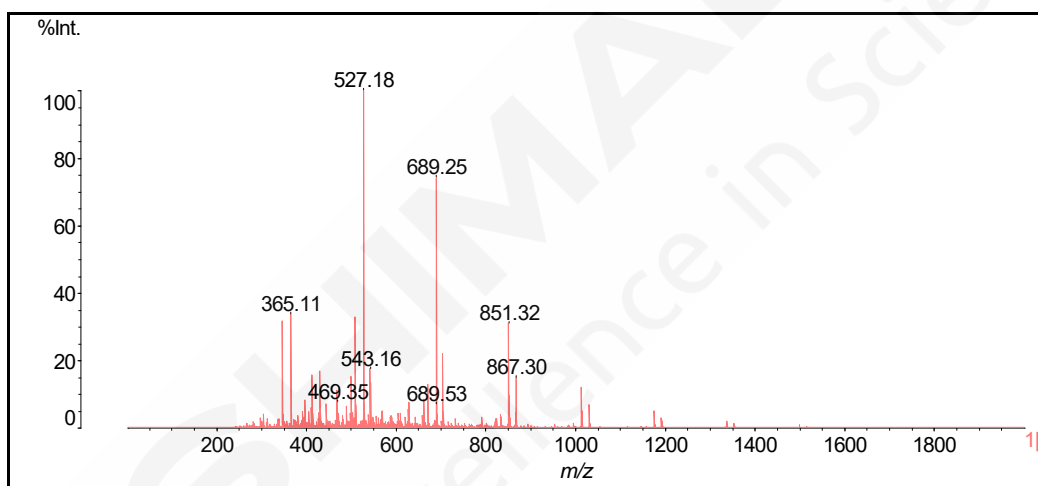


图4 使用较小质量数扫描范围得到的质谱图

3 结论

本文使用 MALDI-TOF 测定了中药材中多糖降解得到的寡糖分子信息，测得了寡糖样品分子量的分布、重复单元结构和聚合度。本方法为中药材多糖降解的研究提供了一种有力的分析手段。

MALDI-7090应用于-O-聚糖前处理分析

以抗体药物为代表的蛋白质类药物，多由来源于真核生物的培养细胞如 CHO (Chinese hamster ovary) 细胞合成。出于这个原因，生物合成的蛋白质中不可避免地会存在众多翻译后修饰。其中，多聚糖的修饰除参与蛋白质的功能调节外，根据其结构的不同，有时还会产生抗原性，因此在生物药品质量相关评价方面备受瞩目。但是，聚糖的评价尚存在许多技术上的挑战。尤其是 O-结合型聚糖 (O-聚糖)，很难用酶将其从蛋白质上完全切除，因此，主要采用胍解反应和 β 消除反应这两种化学切除方法进行聚糖的切除，但上述方法还存在必须改善的问题。胍解反应过程中需要处理一种爆炸性试剂，必须小心注意，所以操作性不强。

而 β 消除技术由于连续的 β 消除反应会引发使多糖逐步降解的剥皮反应 (peeling reaction)。一般来说，在使用 β 消除反应分析 O-聚糖时，加入还原性试剂的还原性 β 消除技术可以在碱性条件下释放聚糖的同时还原糖链根部，而不引发连续的 β 消除反应。但由于该方法会完全还原聚糖的根部，无法在切除糖链后用荧光试剂等进行标记，这限制了该方法的应用。此外，由于聚糖自身的离子化效率不高，使用质谱对该方法获得的样品进行分析时，灵敏度较低。为了解决这个问题，研究者对一种可以结合 2-AB 或 PA 等荧光标记试剂而不还原聚糖根部的非还原性 β 消除/荧光标记技术进行了探索，但未能大幅度抑制连续的 β 消除反应。

即使如此，在以 O-聚糖为分析对象的学术研究中，剥皮反应生成的副产物的存在并未对研究造成重大妨碍。但是，对于生物药品等应用于人体的药物而言，必须对多糖进行评价以进行质量控制，此时如何处理评价过程中的副产物便成为了一大问题。

本文报道了一种基于 PMP 标记法的可以抑制剥皮反应的 O-聚糖的化学切除方法，并报告了研究结果。

■ 使用改进碱性试剂的 One-pod-PMP 标记

在用碱催化剂切除聚糖后，为了对释放的糖链进行 PMP 标记，我们采用了一种以 Wang 等²⁾人报道的使用了 28%氨水的 One-Pod 法为基础的技术。我们选用氨基甲酸铵作为碱催化剂，期望可以看到剥皮反应的抑制效果。样品选用的是胎球蛋白 (来源于胎牛血清的胎球蛋白 Sigma-Aldrich F3004-25MG)，按下述方法对 O-聚糖进行切除和标记。

将 10 mg 的胎球蛋白溶于 1 mL 的水后，以 10 μ L 为单位分别注入 1.5 mL 带螺帽的微量试管中，室温真空干燥。干燥后配制以下两种试剂溶液作为聚糖切除/标记溶液。

首先，向 17.4 mg PMP (1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮、Sigma-Aldrich) 中加入 200 μ L 的 28%氨水 (Sigma-Aldrich) 使其充分溶解，作为“氨水 PMP 标记溶液” (PMP 最终浓度: 0.5 M、氨的最终浓度: 28%)。然后，向 34.8 mg 的 PMP 中加入 200 μ L 的甲醇溶液使其溶解，并将 390 mg 的氨基甲酸铵溶于 1 mL 的水中，等量混合上述两种溶液，作为“氨基甲酸铵 PMP 标记溶液” (PMP 最终浓度: 0.5 M、氨基甲酸铵最终浓度: 2.5 M)。

分别取 50 μ L 上述溶液加入干燥后的胎球蛋白中，50 $^{\circ}$ C 反应 16 小时，同时进行蛋白质中聚糖的切除和 PMP 标记。将反应后的溶液转移至玻璃微量试管中，加入 500 μ L 的水充分搅拌，室温真空干燥。向干燥后的样品中加入 1%乙酸水溶液 (500 μ L) 和氯仿 (500 μ L) 后充分搅拌，离心，样品分离为水层 (上层) 和氯仿层 (下层) 后，将水层转移至新的玻璃微量试管中。向转移的水层中加入氯仿，重复液/液分离的过程两次，包含 PMP 标记聚糖的水相就收集在 1.5 mL 管内。

将收集到的溶液室温真空干燥并溶解于 1 mL 的水中，注入预先用 2 mL 的乙腈和 2 mL 的水清洗的 C18 固相萃取柱 (SupelClean LC-18 SPE Tube 1 mL、Supelco) 上。用 3 mL 的 3% 乙腈水溶液清洗柱子后，加入 1 mL 的 30% 乙腈水溶液洗脱 PMP 标记糖链。室温真空干燥洗脱液，加入 50 μ L 的 50% 乙腈水溶液复溶，用于后续质谱和液相色谱分析。

■ PMP 标记 O-聚糖的 MALDI-TOF MS 分析

向 PMP 标记的 O-聚糖样品 (2 μ L) 中加入 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液 (10 μ L) 并充分搅拌，用经 1 M 氢氧化钠 (10 μ L \times 3)、水 (10 μ L \times 5)、50% 乙腈/0.1% TFA 水溶液 (10 μ L \times 3)、0.1% TFA 水溶液 (10 μ L \times 5) 清洗过的 NuTip Carbon (glygen) 吸附，再用 0.1% TFA 水溶液清洗后，加入 50% 乙腈/0.1% TFA 水溶液洗脱 O-聚糖，将全部洗脱液 (约 3 μ L) 点样于 MALDI 靶板上。样品干燥后，在该样本上覆盖 0.5 μ L 的 MALDI 用基质溶液并干燥，加入 0.2 μ L 的乙醇对样品进行重结晶后进行实验分析。基质溶液的配制方法为将 5 mg DHB (2,5-二羟基苯甲酸, Shimadzu GLC) 溶于 50% 乙腈/0.05% TFA 水溶液 (500 μ L) 中，质谱分析采用的仪器是基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (MALDI-7090、Shimadzu/Kratos)。

分析结果如图 1 所示，与使用 28% 氨水的情况相比，使用最终浓度 2.5 M 的氨基甲酸铵时，剥皮反应产物的信号强度较弱。

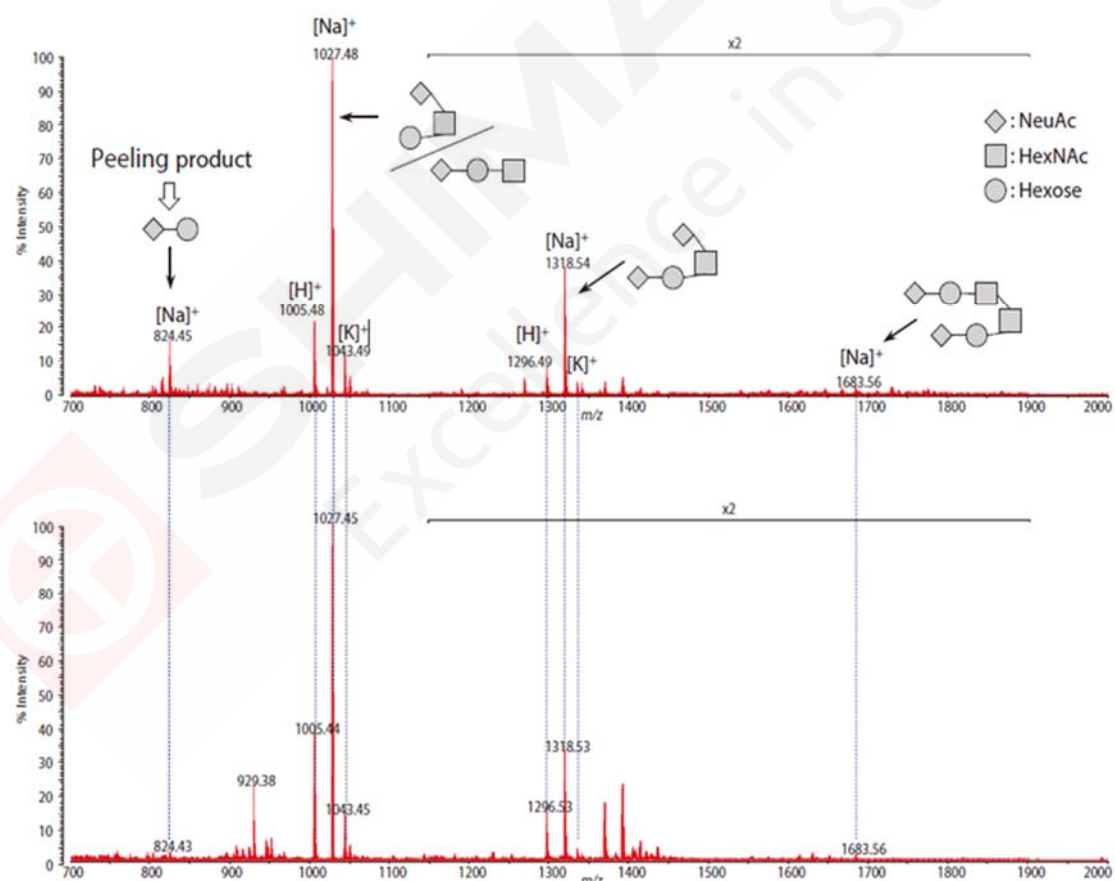


图 1 胎球蛋白的 PMP 标记 O-聚糖的 MALDI-TOF 质谱图

上图：使用最终浓度 28% 氨水进行的反应；下图：使用最终浓度 2.5 M 氨基甲酸铵进行的反应

■ PMP 标记 O-聚糖的 LC 分析

将制备的 PMP 标记 O-聚糖样品按表 1 所示条件进行 LC 分析。用不同碱催化剂进行前处理的样品各制备了两次。使用了 28% 氨水的样品进样 20 μL ，使用了氨基甲酸铵的样品进样 40 μL 。

表 1 PMP 标记 O-聚糖的 LC 分析条件

Instrument	: Nexera
Column	: GlycanPac AXH-1、Analytical 1.9 μm 150 mm L 2.1 mm I.D.(Thermo Scientific)
Mobile phase A	: 100 mM Ammonium formate (pH 4.5)
Mobile phase B	: Acetonitrile
Total flow rate	: 0.25 mL/min
Concentration of mobile phase B	: 0~15 min: 90%、15~40 min: 90→45%、40~45 min: 30%、45~50 min: 90%
Column temp.	: 40 $^{\circ}\text{C}$
Detection	: UV absorption 245 nm (SPD-M30A)

如图 2 所示，在使用 28% 氨水进行预处理的样本中检测出了剥皮反应产物由来的峰，而在使用最终浓度 2.5 M 氨基甲酸铵进行预处理的样本中几乎未检测出该峰。剥皮反应产物和主要 O-聚糖的峰面积见表 2。使用 28% 氨水时，剥皮反应产物占整体的约 12%，而使用最终浓度 2.5 M 氨基甲酸铵时约占 2%，这表明氨基甲酸铵的使用抑制了剥皮反应。但是，我们发现 O-聚糖的切除/标记反应的效率要低于使用氨水的情况。

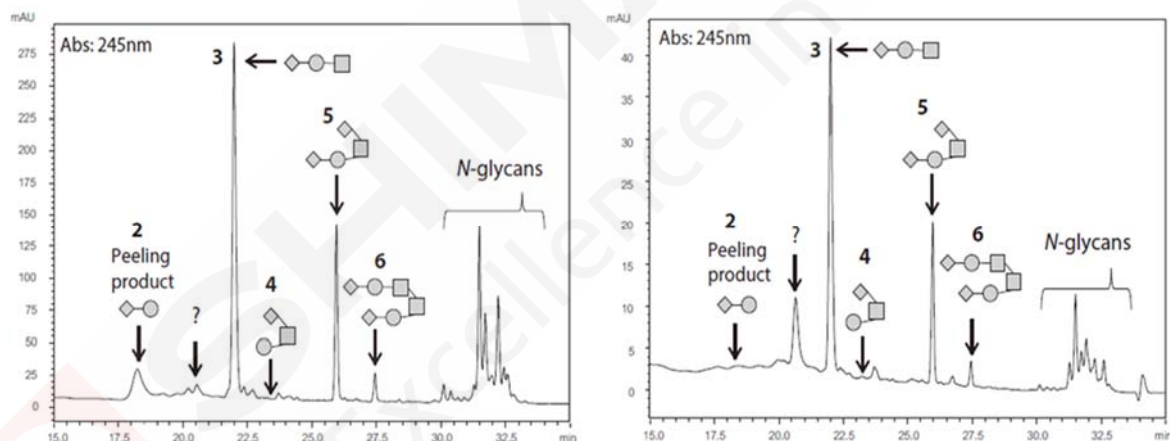


图 2 PMP 标记 O-聚糖的 LC 色谱图示例

左图：使用最终浓度 28% 氨水进行的反应；右图：使用最终浓度 2.5 M 氨基甲酸铵进行的反应

表 2 PMP 标记 O-聚糖的 LC 分析结果 (n=2)

28% 氨水												
Peak No.	保留时间			面积			%面积			高度		
	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD
1	18.2	0.01	0.04	470403.0	174277.78	37.05	12.53	1.35	10.78	17485.5	6695.59	38.29
2	22.0	0.01	0.03	2334391.0	543258.83	23.27	63.39	2.31	3.64	239416.0	52457.42	21.91
3	23.3	0.01	0.02	2882.0	87.68	3.04	0.08	0.02	23.85	424.5	16.26	3.83
4	26.0	0.01	0.02	766212.0	241747.08	31.55	20.57	1.02	4.96	113022.0	34481.36	30.51
5	27.5	0	0.01	126936.0	32437.82	25.55	3.44	0.04	1.29	18832.0	4775.8	25.36
2.5 M 氨基甲酸铵												
	保留时间			面积			%面积			高度		
	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD

Peak No.	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD
1	18.3	0.04	0.24	13180.0	10096.07	76.6	2.21	1.48	67.07	436.5	355.67	81.48
2	22.0	0.01	0.05	401757.0	53148.97	13.23	70.18	0.29	0.41	43209.5	4999.95	11.57
3	23.2	0.00	0.01	2356.5	259.51	11.01	0.41	0.01	1.82	265.0	29.70	11.21
4	26.0	0.00	0.01	134460.0	7737.16	5.75	23.6	1.67	7.1	20017.5	979.34	4.89
5	27.4	0.01	0.03	20582.5	2150.31	10.45	3.6	0.09	2.39	3207.0	294.16	9.17

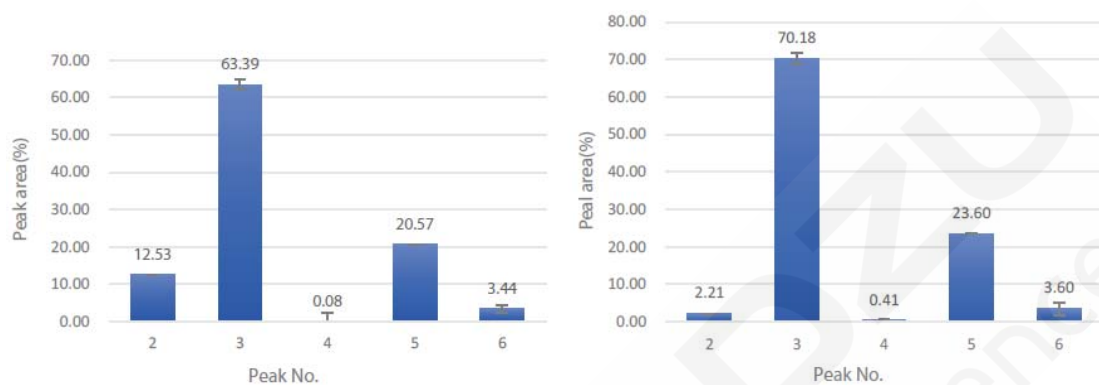


图 3 PMP 标记 O-聚糖的 LC 分析结果 (n=2)

左图：使用最终浓度 28%氨水进行的反应；右图：使用最终浓度 2.5 M 氨基甲酸铵进行的反应

■ 考察

根据本次实验结果，确认了进行精确 O-聚糖分析时的问题产物-剥皮反应产物的生成，可通过使用氨基甲酸铵的 One-pod PMP 标记技术，抑制在全部 O-聚糖的几个百分点以内。虽然该方法存在所需样品量等限制，但仍可用于 O-聚糖糖型分析。

然而，相比于其他技术，本次实验中所用试剂和反应条件对应的聚糖切除效率和标记效率并不高。虽然同时进行糖链切除和标记有效抑制了剥皮反应，但使用 PMP 标记时，与 PA 标记和 2-AB 标记等的荧光检测相比，基于紫外吸收的 LC 检测灵敏度较低，且易受到污染试剂的背景干扰。为排除上述影响，有必要探索能同时进行切除/标记反应并且具有良好反应效率的试剂，也有必要对反应条件进行进一步的研究。

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B064 应用报告。

MALDImini™-1 紧凑型数字离子阱质谱仪分析糖肽

聚糖是蛋白质的一种翻译后修饰产物，是一类拥有高结构异质性的分子，由葡萄糖、甘露糖和其他单糖复合键形成。已知此类复杂结构与蛋白质调节功能相关，且可根据不同疾病和其他因素，产生各种不同现象。其中包括蛋白质主链出现异常聚糖结构，并且可能在认为应该发生此类键合的位点却不存在聚糖键。关于复杂聚糖结构和聚糖与蛋白质结合位点的信息并非直接编码于基因中，而是在蛋白质生物合成过程中起效的大量聚糖转移酶发生反应时产生的。因此，必须对目标糖蛋白实施直接分析，进而了解糖蛋白上聚糖的结构与结合位点。尽管此类分析已广泛采用质谱仪作为分析仪器，但近乎所有类似分析都需要使用大型、高性能仪器实施完成。

本论文报告了使用岛津 MALDImini-1 紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪对糖肽实施分析的分析方法，该质谱仪配有数字离子阱（DIT）（由岛津开发的原创技术）。

■ MALDImini-1 紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪

MALDImini-1 (图 1) 质谱仪整合了 MALDI 离子源和数字离子阱。就传统质谱仪而言，离子阱机构中常规配备有正弦波 RF，但由于该设备需要大型高压电源支持并需要调制电压的正弦波 RF 发生器线圈，因此无可避免，其质谱仪型号均为大型尺寸设备。而相较于常规设备，本次分析中所使用的 MALDImini1 质谱仪，由于安装了“数字离子阱”，尺寸得到大幅缩减。这一成果源自岛津公司利用矩形波 RF 而非非常规正弦波 RF 开发出的一项独有技术得以实现。即便内置了各类真空泵，其设计依然可以保持轻便，节省空间。



图 1 MALDImini™-1 紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪

■ 从糖蛋白制备糖肽

使用市售单克隆抗体作为样品材料，首先，在溶液中进行还原烷基化。之后，将胰蛋白酶添加到该溶液中，并在 37°C 下酶消化 3 小时。酶消化后，使溶液通过装有 SepharoseCL4B 凝胶的移液器吸头，该吸头已预先用丁醇：乙醇：水=4：1：1 调和，糖肽可吸附在凝胶上。然后通过用平衡溶液洗涤去除肽组分，并用乙醇溶液回收糖肽。将回收的糖肽置于 MALDI 靶板上，然后用基质溶液覆盖并干燥。使用 DHB (2,5-二羟基苯甲酸) 作为基质。

■ MS 测量糖肽片段

使用 MALDImini-1 MALDI-DIT 质谱仪以 4000 Da/s 的扫描速度对回收糖肽实施 MS 测量。结果检测到 m/z 2269.0、2431.1、2593.3、2634.3、2796.3、2958.2、3119.9 和 3282.3 作为主峰相互具有聚糖衍生质量差异 (图 2)。

因为聚糖在结构上具有异质性，所以可在一个肽主链上存在多个不同的聚糖结构。在 MALDI-DIT 质谱仪中，信号很容易转换成单价离子，因此，仅需确认 MS 测量检测到信号之间的 m/z 差异并从中搜索与源自聚糖结构成分差异一致的糖信号，即可轻松地多个检测信号中识别出源自糖肽的信号。

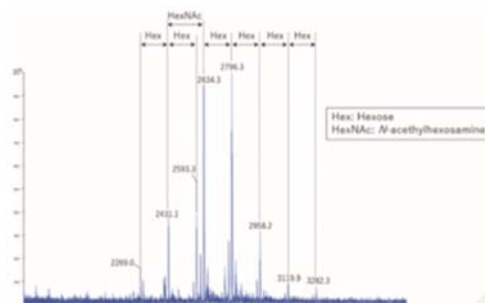


图 2 从商品抗体中提取糖肽组分的质谱图

■ MSⁿ 鉴定聚糖结构与结合位点

作为示例，从以此方式鉴定的糖肽衍生信号中选择 m/z 2796.3，并对其进行 MS/MS 分析（图 3）。结果检测到聚糖衍生产物离子，此外，还检测了 N-聚糖根具有特定 GlcNAc 质量差 ($\Delta m/z$ 83、120) 的三重峰。根据上述事实，可理解 MS/MS 质谱中观察到 m/z 值为 1189.7 的离子为肽主链离子。接下来，对肽主链离子 (m/z 1189.7) 实施 MS³ 分析，并确定肽主链的氨基酸序列。

此外，还对与肽主链结合的根 GlcNAc 环裂解离子 (m/z 1272.7) 实施了 MS³ 分析，结合肽主链 MS³ 质谱图（图 4）对比分析结果可以确定聚糖的结合位点。上述所有分析结果表明，用于该分析的商品抗体糖肽具有图 5 所示的各类不同结构。

分析结果表明，尽管体积小巧，但 MALDImini-1 紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪仍具有较强的 MSⁿ 分析能力，并在获取分子尺寸较大、结构复杂的糖肽等成分的完整信息时，能够达到最高性能。

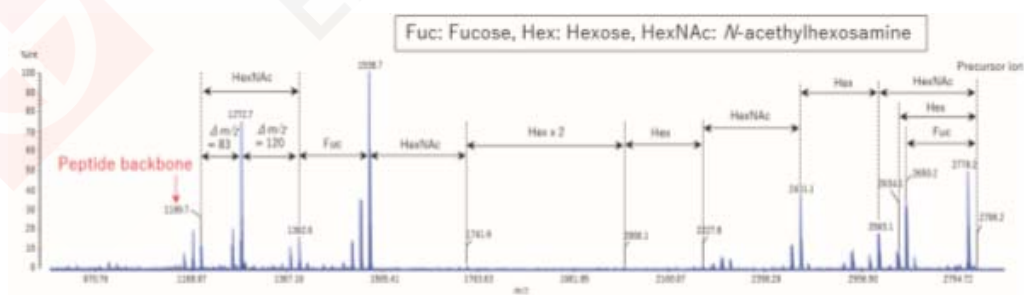


图 3 糖肽的 MS/MS 质谱图（前体离子 m/z 2796.2）

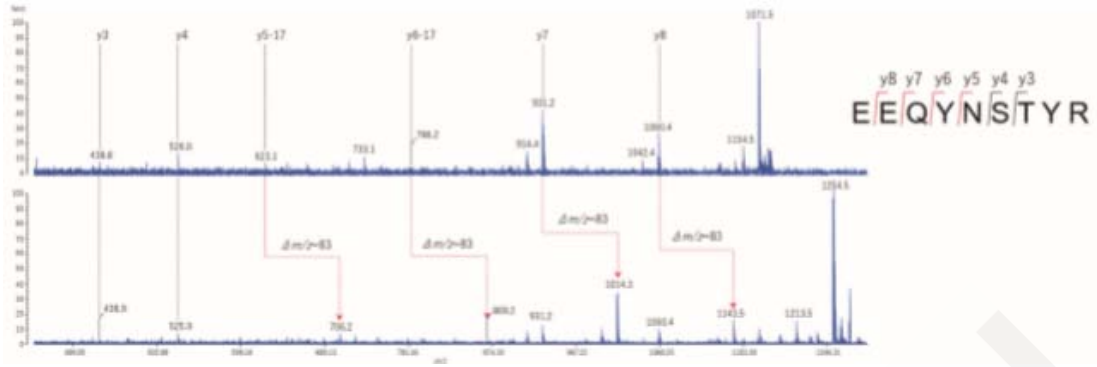


图4 糖肽的MS³质谱结果

顶部：肽主链（前体离子 m/z 1189.7），

底部：包含 GlcNAc 部分结构的肽主链（前体离子 m/z 1272.7）

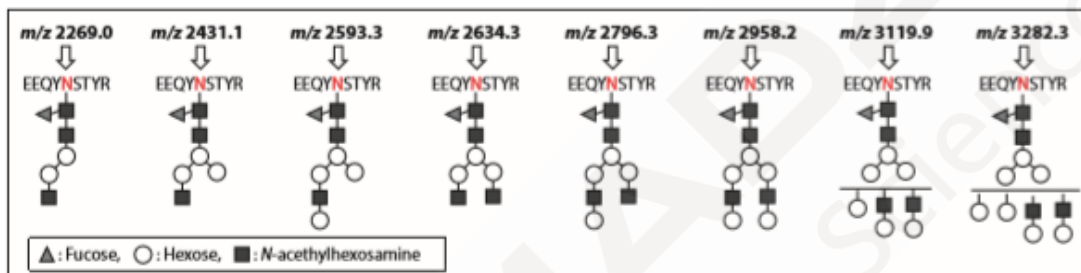


图5 商品抗体衍生糖肽的预估结构（红色：聚糖结合位点的氨基酸）

本文译自岛津全球应用开发中心（GADC）No. B100 应用报告。

MALDImini™-1分析N-聚糖：唾液酸键联异构体

蛋白质的 N-聚糖化在各类生物学现象中起到十分重要的作用。特别是，我们已经了解存在于糖链末端的唾液酸及其链修饰类型是与多种疾病（如：抗原性和病毒感染）相关的重要因素。

近年来，已广泛使用质谱（MS）实施聚糖分析。然而，依然存在与唾液酸残基相关的各类问题，这是因为此类物质不稳定且由于其本身的不稳定性导致容易在分析过程中损失。此外，我们无法通过 MS 区分键合异构体。另一方面，HPLC 分析法主要用于鉴定唾液酸的链修饰类型，但该方法依然存在技术问题，如：在聚糖中存在大量唾液酸的情况下难以实施鉴定。

本文以岛津公司开发的唾液酸键特异性烷基酰胺化（SALSA）法（针对血清源 N-聚糖）稳定唾液酸残基作为示例，使用岛津 MALDImini-1 紧凑型 MALDI 数字离子阱（MALDI-DIT）质谱仪实施检测和分析。

■ 糖蛋白释放 N-聚糖

本研究中使用的血清为用于研究目的的商业产品。首先，将 5 μ L 商品血清变性，并用 SDS（十二烷基硫酸钠）和 DTT（二硫苏糖醇）还原。加入 NP-40（Nonidet P-40）后，加入 PNGaseF（肽-N-糖苷酶 F），之后让溶液在 37°C 下反应 18 小时，从而自糖蛋白中释放 N-聚糖。

■ 唾液酸键特异性烷基酰胺化（SALSA）

岛津开发的唾液酸键特异性烷基酰胺化（SALSA^{*1}）技术不仅可以在化学中和唾液酸的同时防止其优先损失，并且还可通过 MS 来区分唾液酸键异构体（本身与唾液酸具有相同的质量），该异构体可能会导致出现等同于链修饰类型的质量变化（图 1）。

取糖蛋白中提取的 N-聚糖 4 μ L 与 20 μ L SALSA 反应溶液直接混合，然后使该混合物在室温下反应 1 小时。之后，加入用于内酯结构的稳定剂，轻轻混合，并使用 GL-Tip Amide（GL Sciences Inc.）除去过量试剂。

* 1 专利号 WO/2016/159291

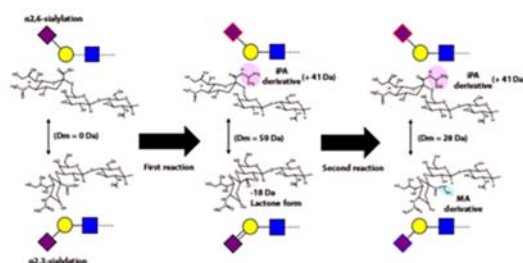


图 1 唾液酸键特异性烷基酰胺化（SALSA）方法所需两步反应的示意图， α 2, 6 唾液酸被异丙胺（iPA）酰胺化，而 α 2, 3 唾液酸被甲胺（MA）酰胺化，产生质量差异后可通过 MS 区分两种形式的唾液酸。

■ 聚糖 2AB 标记并添加入 MALDI 孔板上

唾液酸键特异性修饰后，用 2-氨基苯甲酰胺（2AB）标记聚糖的还原末端，并用 GL-Tip Amide 去除过量试剂。

将样品溶液（0.5 μL ）放在 MALDI 目标孔板上，并通过覆盖基质溶液（0.5 μL ）予以干燥。用 MALDImini-1 紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪实施 MS^n 分析。

此处使用的基质是添加过氯化钠的 CHCA（ α -氰基-4-羟基肉桂酸）。

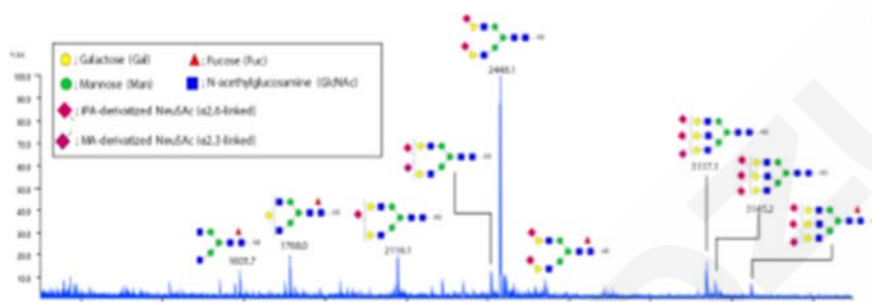


图 2 使用 MALDImini-1 获得的血清糖蛋白衍生 N-聚糖质谱结果（MS）

■ 通过 MS^2 分析确认唾液酸链修饰类型

从血清糖蛋白衍生的 N-聚糖中检测到主要复杂聚糖（包括二天线和三天线聚糖）（图 2）。

图 3 给出使用 MALDImini-1 所获的三天线聚糖 MS^2 光谱对比结果。通过 28Da 差异可检测到这两个聚糖，由此推测这两个聚糖为 $\alpha 2,3$ - / $\alpha 2,6$ -异构体。由于已确认 MS^2 中的修饰唾液酸质量与中性损失质量相等，因此相当于获得了唾液酸链修饰类型的数据支持。发现 m/z 3117.1 是 $\alpha 2,3$ -与 $\alpha 2,6$ -的混合物，而 m/z 3145.2 仅包含 $\alpha 2,6$ -。

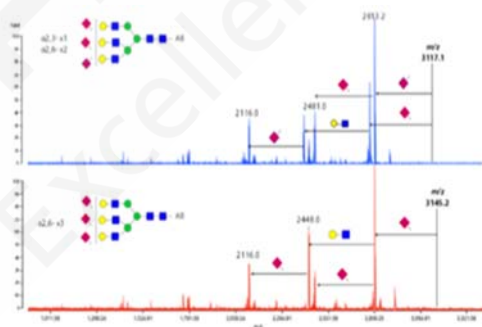


图 3 通过 MS^2 检测对比三天线聚糖 m/z 3117.1 和 m/z 3145.2 的质谱可根据非还原末端修饰唾液酸残基的中性损失质量来区分链修饰类型。

■ 通过 MS^n 分析实施聚糖结构分析

在 MS^2 聚糖分析中，主要检测到由聚糖键断裂产生的碎片离子。但是，当分析物包含大量相同质量残基时（如聚糖的情况），通常很难确定聚糖中碎片离子源。

碎片离子源可通过实施 MS^3 分析来澄清（图 4）。无法解释 MS^2 中二天线聚糖 m/z 2448.1 的碎片离子 m/z 720.0 是通过从非还原性末端序列去除聚糖所得。因此，如对比包含唾液酸的碎片离子（ m/z 2107.0）和不含唾液酸的碎片离子（ m/z 1783.9）的 MS^3 结果，则不会从

后者中检测到碎片离子 m/z 720.0。基于这一事实，可以理解片段离子 m/z 720.0 源自非还原性末端侧的三糖（其中包括唾液酸）。此外，还可通过碎片离子 m/z 1053.4 的 MS^3 结果分析 N-聚糖的核心结构。

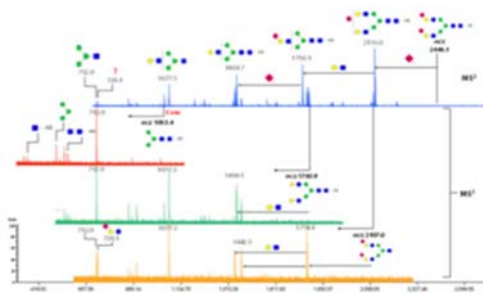


图 4 二天线聚糖 m/z 2448.1 的 MS^n 质谱图

■ 结论

如本实验所示，可认为通过 SALS 法稳定唾液酸并结合使用 MALDImini-1 紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪实施 MS^3 分析是一种有效的聚糖结构分析技术（包括唾液酸的链修饰类型）。

第三节 核酸和脂类分析中的应用

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征 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。

脂类和磷脂分子，是除蛋白、核酸、多糖外的极其重要的生物大分子。他们不仅构成了生物膜，还是细胞的第二信使分子。脂类组学 (Lipidomics) 是近年来新提出的组学概念，可以定义为确定细胞中的全部脂类种类以及所有脂类在代谢、细胞信号传导、转录和翻译过程、基因调控中的生物学作用。脂类的种类众多，同时结构非常复杂，脂类的分析充满了困难和挑战。

MALDI-TOF 具有分析简便迅速、样品要求低、高灵敏度、高可重复性及抗杂质干扰能力强等优点，是分析脂类物质的有力工具，尤其是分析生物组织或细胞提取物的脂类组成。与 MALDI 分析多肽相比，分析脂类时碱金属离子加成现象十分普遍，影响脂类分子的定性和定量分析。因此，选择合适的基质成为 MALDI-TOF 进行脂类分析的关键，合适的基质选择人基于经验的积累。

MALDI-8020 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。

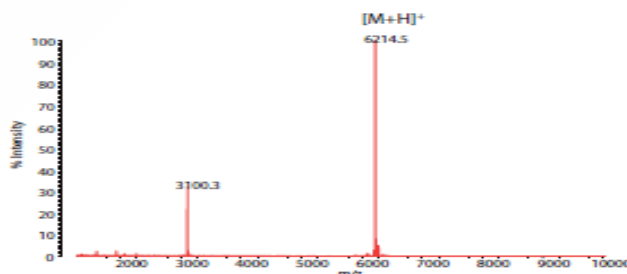


图 1 合成核酸的 MALDI-TOF 质谱图

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。通过比对该 ISD 谱图的碎片离子，可以很容易获得核酸的序列信息。

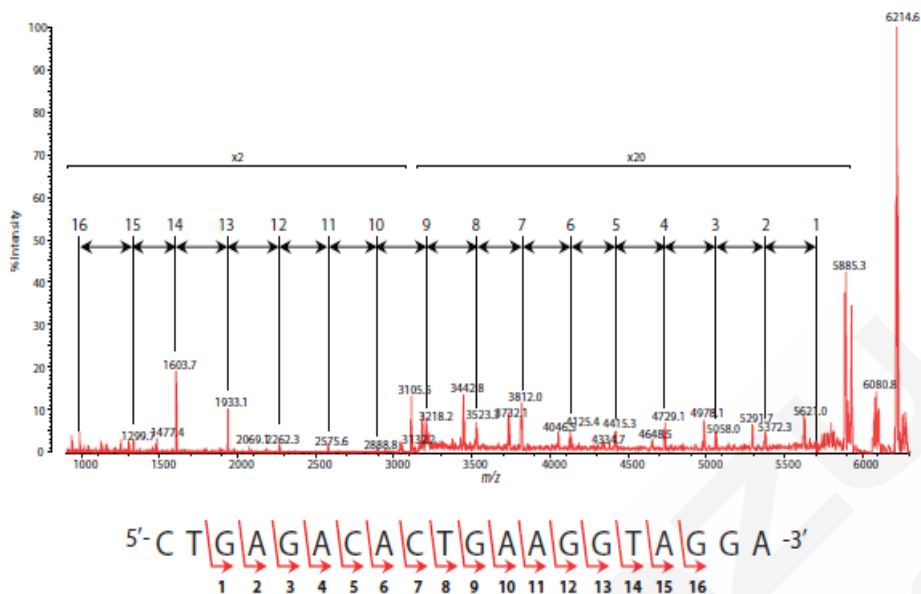


图2 合成核酸的 MALDI-ISD-TOF 质谱图和裂解离子
测定模式: Positive Linear

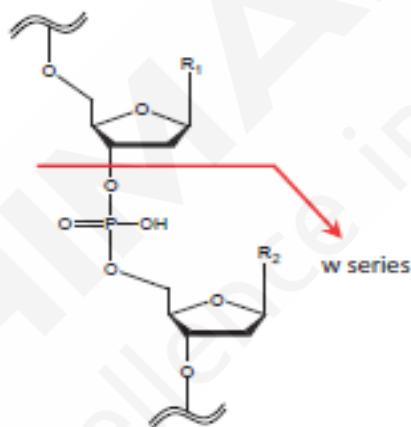


图3 合成核酸的正离子模式 ISD 的切割部位

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。

MALDI-8020进行蜡的快速表征评价

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 可以简单、快速获取从小分子到大分子等各种样品的分子量信息, 因此被广泛应用于合成及生物分子的研发和质控领域。

在 MALDI 中, 样品通过与被称为基质的离子化辅助剂溶液混合进行配制。基质主要是低分子量有机化合物, 为了确保高效的解吸和电离, 需要根据样品类型的不同选择最佳的基质。例如, 测定多肽时选择 α -氰基-4-羟基肉桂酸, 测定蛋白质时选择芥子酸。

在这里为您介绍一种不需要将样品和基质溶液混合的比传统 MALDI 更加快速的方法。

该方法将基质替换为蚀刻的银箔, 在银箔表面进行电离。这种方法被称为表面辅助激光解吸离子化质谱 (SALDI-MS)。该方法不仅可以缩短样品制备时间, 而且与 MALDI 相比, 还具有低分子区域的背景噪声更小的特点。

我们以由复杂的脂质混合物组成的烛蜡为例进行了 SALDI-MS 分析。通过蜂巢得到的蜂蜡比石蜡更贵, 因此蜡烛中的蜂蜡的含量是重要的品质标准。

另一方面, 包含在硬脂蜡中的硬脂不是用石油而是用植物原料制造的, 因此, 被认为是一种可再生、且更加环保的石蜡替代品。通过检测上述由蜜蜂或植物产生的特征性石蜡化合物的主要成分, 可以进行品质标识的检查。

■ 样品制备

对银箔进行切割后, 用戊烷、丙酮、甲醇和水进行清洗, 压平, 在 50°C 的硝酸(23%)中进行蚀刻, 使其表面外观变成灰色。最后, 用水对蚀刻的银箔进行清洗, 用导电性胶带粘贴到 MALDI 靶板上。

直接涂敷烛蜡



使用 MALDI-TOF 测定



通过统计分析软件分析

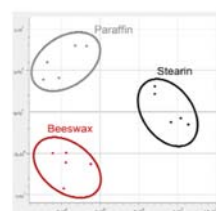


图 1 工作流程

将烛蜡直接涂到银箔上, 使用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 进行测定。为了对该方法进行评估, 同时测定了标准物质和溶解的烛蜡样品。使用统计分析软件 eMSTAT SolutionTM 对得到的质谱数据进行分析, 通过得分图实现了蜡蜡主要成分的可视化。工作流程如图 1 所示。

■ 不同脂质类别的质谱分析

蜡组分被检测为银离子加合物。通过该方法观测到的脂质类别的范围扩展到不具有官能团的饱和烃-烷烃。

上述检测只受到挥发性化合物的蒸气压力限制, 这意味着含有 23 个或更多碳原子的烷烃可以被分析。如果样品在进入质谱仪后直接进行分析, 在质谱图中甚至可以观测到链长更短的烷烃 (图 2)。

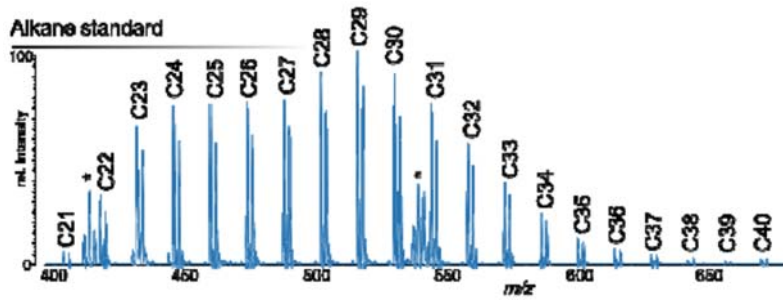


图2 烷烃混合物的质谱图
(GC-标准、数字是指碳原子数。*表示银簇)

图3所示的源于蜜蜂的蜂蜡质谱表现为具有特征性的谱图。该质谱由具有偶数碳原子的蜡酯 1),3)和具有奇数碳原子的饱和或单不饱和烃 1),4)组成。

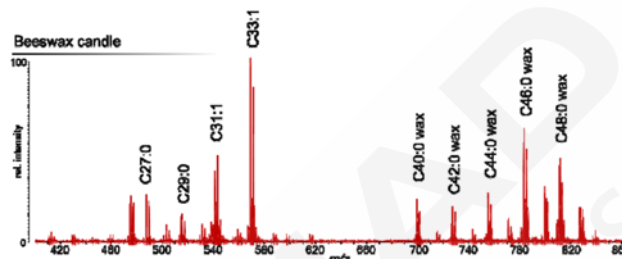


图3 蜂蜡蜡烛的质谱图(1,3,4)

硬脂蜡是皂化的植物和动物脂肪。因此，上述物质是可以替代石油的可再生绿色替代物。硬脂蜡表现为由棕榈酸和硬脂酸等两种游离脂肪酸(FFA)组成的具有特征性的谱图 (图4)。

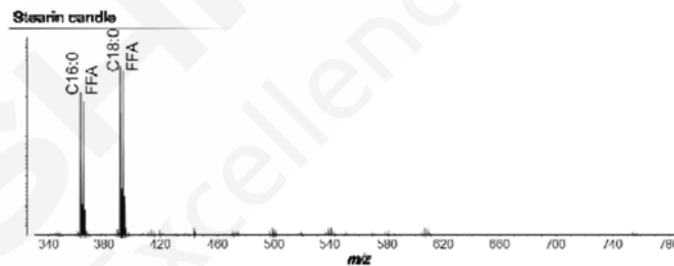


图4 硬脂蜡的质谱图 (棕榈酸(C16)和硬脂酸(C18))

石蜡价格低廉，是用于制造蜡烛的最为普通的原料。由于来源于石油，在质谱中可以观测到所用馏分中具有多种链长的不同烷烃 (图5)。

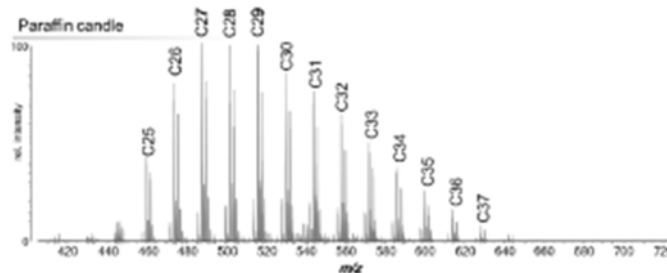


图5 石蜡蜡烛的质谱图 (碳数25~37的烷烃)

上述三个示例表明，使用蚀刻银箔的 SALDI-MS 可以分析大范围的不同脂质类别，即可

以测定：(i)不具有官能团且通常使用 GC 分析的烷烃以及(ii) 极性高、挥发性低，不进行衍生化等难以使用 GC 进行分析的游离脂肪酸和蜡酯等的脂质。SALDI-MS 法不需要通过色谱进行分离，因此，与 GC 相比，可以更快地进行测定。

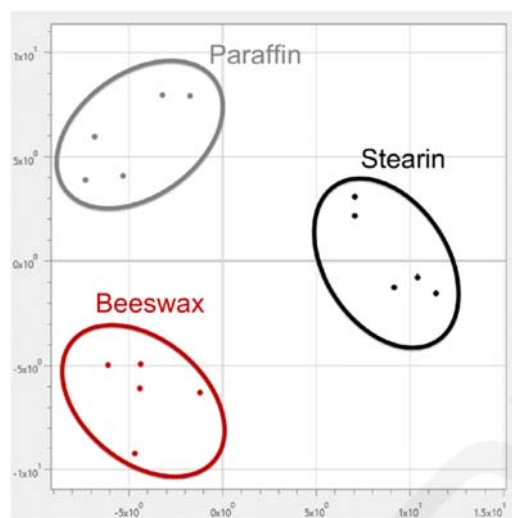


图6 基于eMSTAT Solution软件的多变量分析结果 (Score plot)

■ 利用统计分析软件进行主成分分析

通过使用统计分析软件 eMSTAT Solution 进行多变量分析，对不同原材料的蜡烛进行了分组（图 6）。通过使用判别分析功能，还可以将主要成分的相似度进行评分。

■ 结论

针对使用 GC-MS 难以同时检测的含有烃和低挥发性化合物的复杂脂质混合物，本文介绍了一种分析方法的可能性。该方法可用于工业用蜡、石油、昆虫信息素的分析等用途。由于无需通过色谱进行分离和衍生化，也无需对样品进行溶解，因此，该方法非常快速。统计分析软件 eMSTAT Solution 可以对样品质谱和参考质谱的相关性分析提供帮助。

eMSTAT Solution 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B107 应用报告。

MALDI-TOF Assurance 应用于酸水解方法的 RNA 序列分析

在核酸医药开发过程中，合成了具有反义效应和 RNA 干扰效应的多种序列寡核苷酸。虽然合成寡核苷酸的质量控制是必须的，但是对于具有 20~30 个碱基的较少碱基的寡核苷酸测序却没有确立标准的方法。因此，这个领域需要一种简单可靠的序列分析方法。

本文利用酸水解法进行 RNA 测序分析。

对 21 个碱基合成的 siRNA 和 2'-O-甲基化 siRNA 进行酸水解实验。将低分子量基质(3-羟基-2-吡啶甲酸:3-HPA)和酸(三氟乙酸:TFA)的混合溶液加入到样本溶液中，应用 MALDI-TOF MS 得到的质谱结果表明，除 3'末端 2 个碱基外，整个 19 mer 序列均得以鉴定 (图 1)，对 2'-O-甲基化修饰 RNA 也有效 (图 2)。

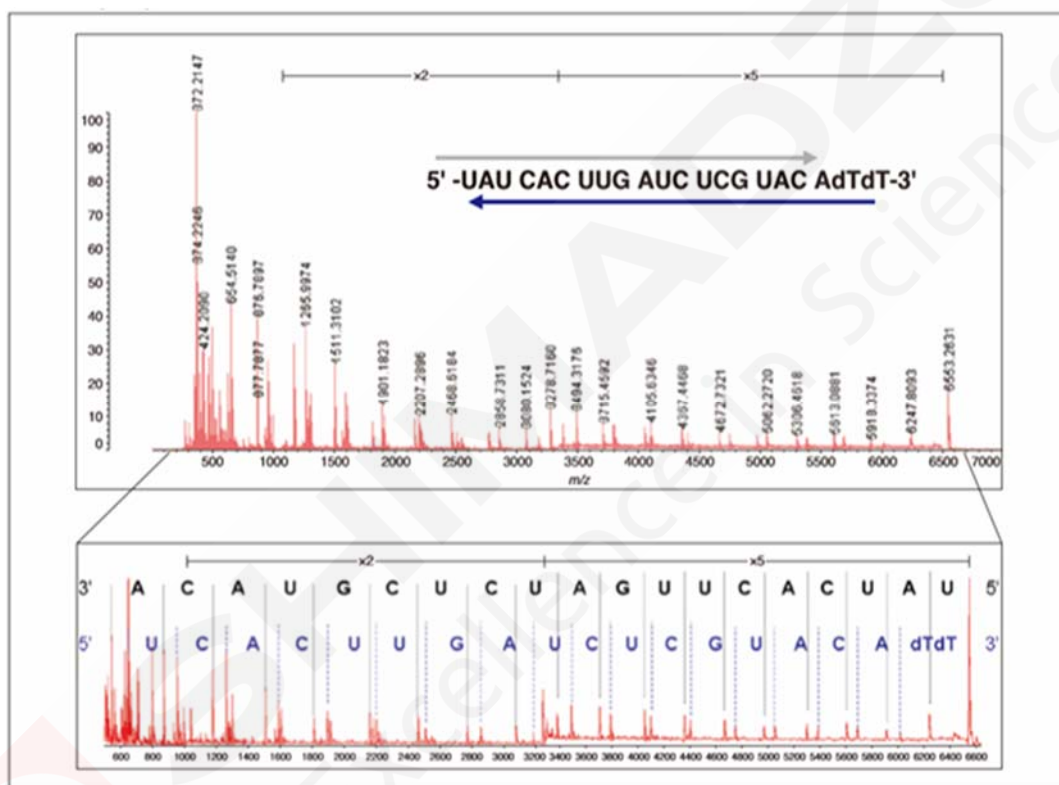


图 1 酸水解后 siRNA (21 个碱基)的质谱图

■ 测试条件

仪器：AXIMA assurance
测量条件：正离子/线性模式
样品：siRNA 21 mer 5'-UAUCAC UUG AUC UCG UAC AdTdT -3'(SIGMA)
基质：50 mg/mL 3-HPA 溶解于 2.5% TFA 水溶液+10 mg/mL 柠檬酸氢二铵

■ 结果

如图 1 和图 2 所示，通过酸水解检测到梯状峰，通过读取峰间的质量差，RNA 碱基测序成为了可能。由于从 3'末端和 5'末端都是一次检测一个碱基，因此获得了非常准确的碱基序列信

息。此外，为了确定最佳分析条件，研究了 TFA 的最佳浓度 (图 3)。结果显示，利用 2.5% 的最终浓度得到了最佳质谱图信息。

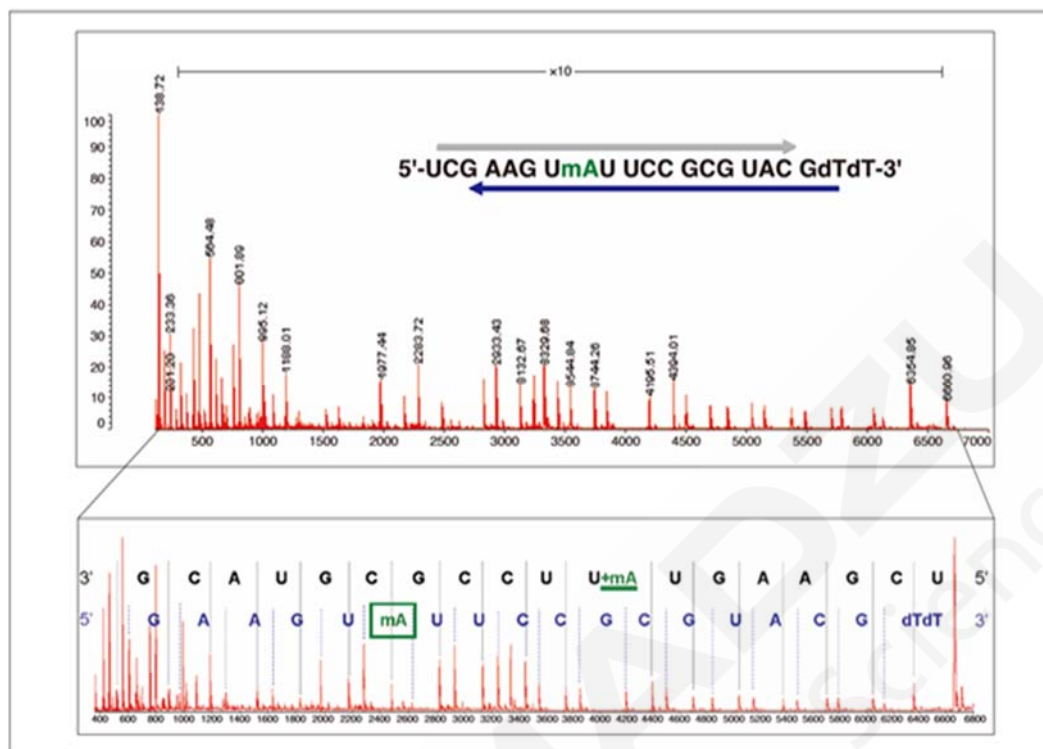


图 2 酸水解后 siRNA (mA:含 2'-O-甲基腺苷)的质谱图

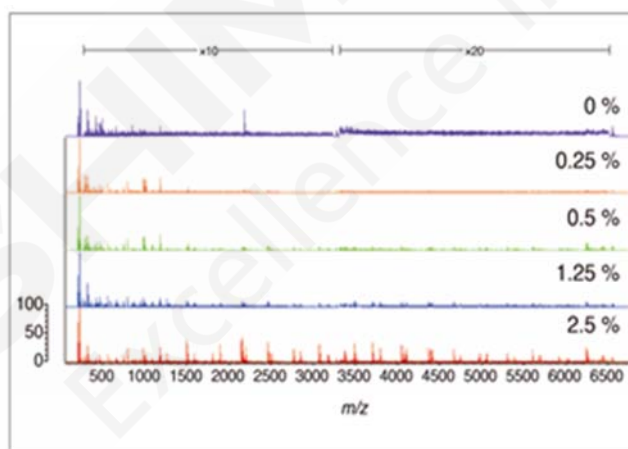


图 3 最佳 TFA 浓度的验证

研究证实 MALDI-TOF MS 技术与酸水解方法的结合是提供约 20 个碱基 RNA 序列的快速且简便的碱基测序的强大技术。

本文应用的是 AXIMA Assurance。AXIMA Confidence 和 AXIMA Performance 也可以用于此类研究。

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B033 应用报告。

MALDI-TOF Performance解析复合脂质的结构

历史上，双聚焦或串联扇形场分析仪通过对三酰甘油的钠化物进行高能 CID (4-5 keV) 来生成三酰甘油最全面的结构特征。

用这种方法，除 sn-2 手性外，可以确定三酰甘油的所有重要结构特征：

- 酰基碳数：对应于脂肪酸取代基中的碳原子总数（不包括甘油部分的三个碳原子）
- 取代基的位置：sn-1/sn-3 和 sn-2 取代基的区别
- 双键数：分子中每增加一个双键，观察到的分子质量减少 2 Da

随着（串联）扇形场分析仪在生物分析中应用的减少，只有将 MALDI 与适当的 TOF/TOF 质量分析器结合起来，才能满足三酰甘油结构分析对高分辨率、良好前体离子选择和高碰撞能量的综合需求。

以前，脂质的 MALDI-TOF MS 分析主要依赖于通过 PSD 的自发碎裂，得到的产物离子谱图仅包含两种类型的碎片离子 (B-和 C-型离子)。只有一篇文章报道了三酰甘油的 CID 碎片谱图，但是谱图的质量相对较差。

本研究中，对合成的和天然存在的三酰甘油混合物（可可脂）的 $[M+Na]^+$ 离子进行了完整的结构分析。AXIMA Performance MALDI-TOF/TOF 是此类分析的理想平台。充分利用真正的高能 CID 条件 (20 keV 碰撞能量+氦气) 和 AXIMA Performance 提供的独特弯曲场反射管，这是首次报道使用高能 CID MALDI-TOF/TOF MS 来表征中性脂类的位置异构体。

■ 实验

所有三酰甘油样品（合成化合物和可可脂）溶解在甲醇/氯仿中。利用 AXIMA Performance MALDI-TOF/TOF 质谱仪进行 MALDI 质谱数据采集。所有实验均以 2,4,6-三羟基苯乙酮为基质加入氯化钠促进钠离子化合物 $[M+Na]^+$ 的形成。在 PSD 和高能 CID 条件下 (20 keV 碰撞能量+氦气) 获得了碎片离子谱图。

■ 结果

三酰甘油可以很容易地被 MALDI 作为钠化加合物而解吸和离子化，没有明显的源内裂解。在 1,2-二棕榈酰 3-油酰甘油的 $[M+Na]^+$ 加合离子的 PSD 谱图中只观察到 B-和 C-型离子。如图 1 所示，这些离子是通过损失一种游离脂肪酸和一种脂肪酸羧酸钠残基而形成的。这些离子不能区分两个外部的脂肪酸取代基 (sn-1, sn-3) 和中间位置的 (sn-2)。因此，使用 PSD 只能获得有关三酰甘油脂肪酸组成的结构信息。

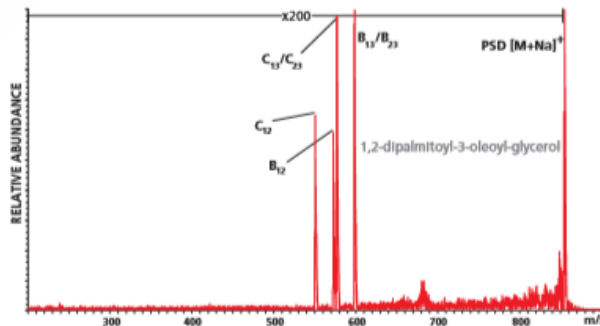


图1 1,2-二棕榈酰3-油酰甘油的PSD谱图

与 PSD 谱图相比，除在 PSD 条件下观察到的离子，相同三酰甘油的 20 keV CID 谱图在低

质量区域产生了丰富的各种结构诊断产物离子，如 E-、F-、G-和 J-型离子（图 2）。

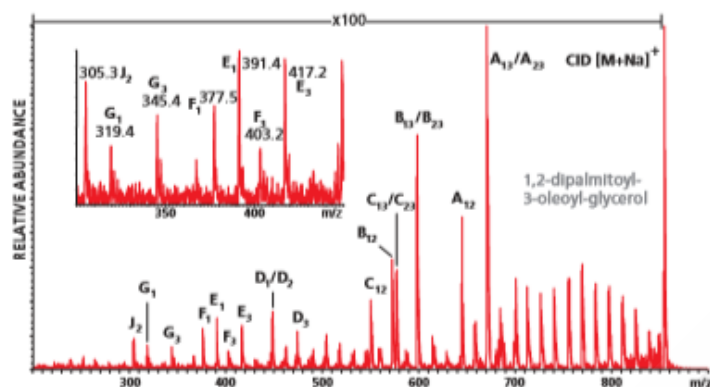


图2 1,2-二棕榈酰-3-油酰甘油的高能CID谱图。

插图：显示E-、F-、G-和J-诊断离子的低质量区

在高能 CID 谱图的高质量区观察到的三个脂肪酸取代基的同时强烈电荷碎裂，被认为是分子氢 (H_2) 的正式 1,4-消除和中性烯烃损失的结果。

此外，仅在高能 CID 谱图中，低质量区显示 D 型产物离子，更显著的是结构上重要的离子 $E_{1/3}$ -、 $F_{1/3}$ -和 $G_{1/3}$ -型离子只存在于 sn-1 和 sn-3 取代基中，并且 J_2 -型离子表征 sn-2 取代基的特征。这些低质量区域产物离子可用于准确区分三酰甘油的结构异构体。

具体地， $E_{1/3}$ (m/z 417.2 和 m/z 391.4)、 $F_{1/3}$ (m/z 403.2 和 m/z 377.5)、 $G_{1/3}$ (m/z 345.4 和 m/z 319.4) 和 J_2 (m/z 305.3 英寸) 在所示的情况下，指示棕榈酸取代基耦合到甘油骨架的中间位置(sn-2)。

图 3 所示为图 2 中所示三酰甘油的结构异构体，即 1,3-二棕榈酰-2-油酰甘油的高能 CID 谱图。

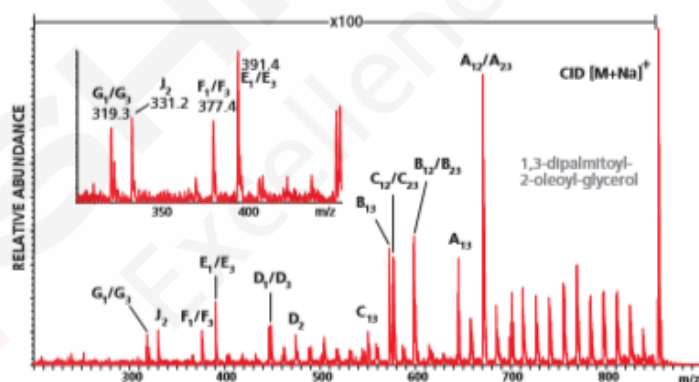


图3 1,3-二棕榈酰-2-油酰甘油的高能CID谱图。

插图：显示E-、F-、G-和J-诊断离子的低质量区

在这种情况下，外侧的两种脂肪酸质量相同，在 m/z 391.4 处生成 $E_{1/3}$ 离子，在 m/z 377.4 处生成 $F_{1/3}$ 离子，在 m/z 319.3 处生成 $G_{1/3}$ 离子。 J_2 离子现在出现在 m/z 331.2 处，表明油酰基取代基与 sn-2 位置相连。为了进一步证明高能 CID 在异构体区分中的价值，测试了三种额外的合成三酰甘油。

图 4 显示了 1,3-二油酰基-2-棕榈酰甘油、1-棕榈酰-2-油酰-3-硬脂酰甘油和 1,2-二硬脂酰-3-油酰甘油的钠化加合物的高能 CID 谱图。

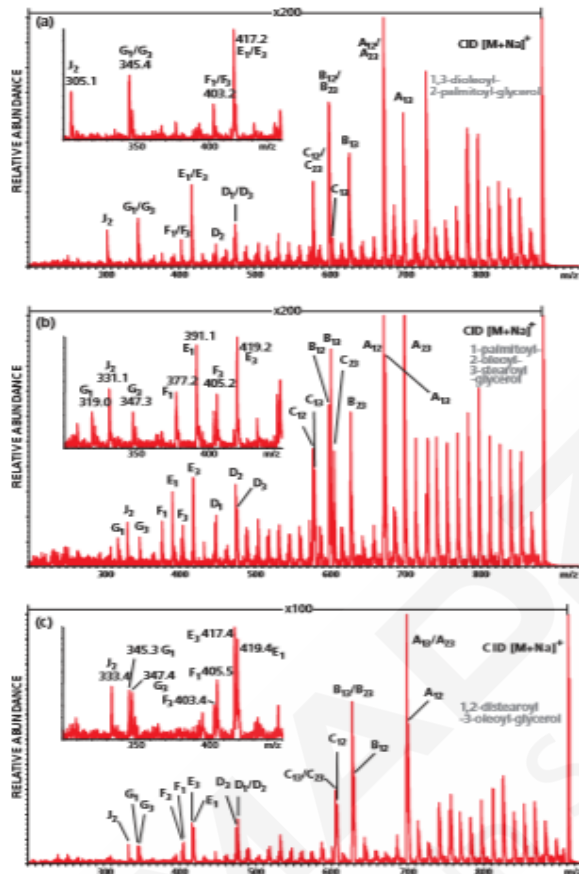


图4 (a) 1,3-二油酰基-2-棕榈酰甘油、(b) 1-棕榈酰-2-油酰-3-硬脂酰甘油和
(c) 1,2-二硬脂酰-3-油酰甘油的钠化加合物的高能CID谱图

同样, 在所有这三种情况下, 不同脂肪酸取代基的位置可以明确地使用不同的 $E_{1/3}$ 、 $F_{1/3}$ 、 $G_{1/3}$ 和 J_2 -型离子来分配。更仔细的检查揭示了更多关于脂质的信息。特别是 1,3-二油酰基-2-棕榈酰甘油, 高质量区 (m/z 727.7 和 m/z 781.6) 中 54 Da 的质量差表明了双键在脂肪酸中的位置。此外, 在 1,2-二硬脂酰-3-油酰甘油的谱图中证明了 MS^2 二级模式下的分辨能力, 其中观察到相差 2 Da (m/z 417.4 和 m/z 419.4) 的 $E_{1/3}$ -型离子被分开。在这种情况下, 来自其他电荷远程碎裂的产物离子与那些确定单不饱和脂肪酸取代基中双键位置的离子一致。

该技术应用于植物油, 特别是可可脂中三酰甘油位置异构体的鉴别。可可脂的三个主要三酰甘油组分 (m/z 855.8、 m/z 883.8 和 m/z 911.9) 如图 5 所示。

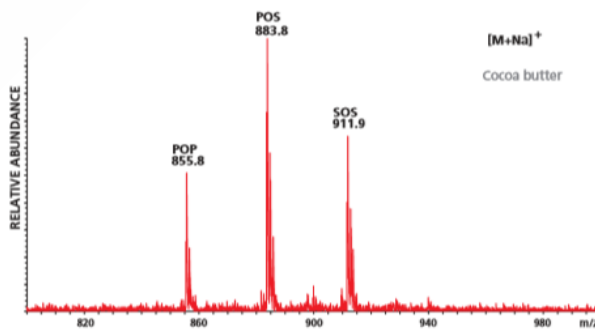


图5 可可脂中三酰甘油的MALDI-TOF质谱图。

使用的缩写: O=油酸, P=棕榈酸, S=硬脂酸

前体离子 m/z 855.8 和 883.8 的高能 CID 谱图在低质量诊断区域产生了与图 3 和 4b 所示

相同的质谱图，表明它们分别是 1,3-二棕榈酰-2-油酰甘油和 1-棕榈酰-2-油酰-3-硬脂酰甘油 (图 6a 和 b)。

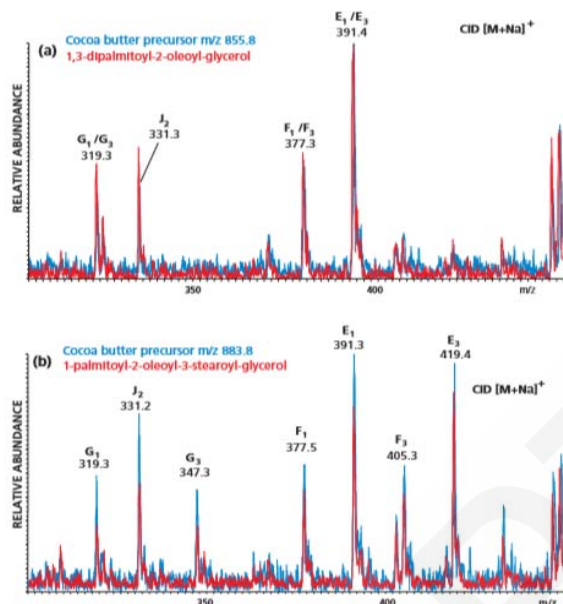


图 6 可可脂组分 m/z 855.8 和 883.8 (蓝色谱图) 与合成三酰甘油 (红色谱图) 高能 CID 谱图中低分子量区的比较: 1,3-二棕榈酰-2-油酰甘油和 1-棕榈酰-2-油酰-3-硬脂酰甘油

更重要的是可可脂中最后一种主要的三酰甘油成分。图 7 显示了 m/z 911.9 高能 CID 谱图的低质量区，并与 1,2-二硬脂酰-3-油酰甘油的低质量区重叠 (如图 4c 所示)。

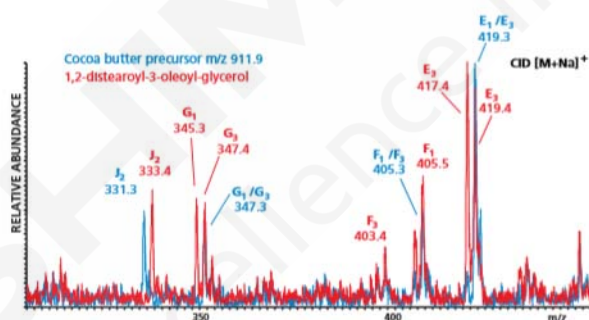


图 7 可可脂组分 m/z 911.9 与合成三酰甘油: 1,2-二硬脂酰-3-油酰甘油的高能 CID 谱图低质量区的比较

从这些谱图可以明显看出，这两种 CID 谱图之间存在显著差异。特别令人感兴趣的是诊断性 J_2 -型离子质量的 2 Da 偏移 (1,2-二硬脂酰-3-油酰甘油为 m/z 333.4，可可脂成分为 m/z 331.3)。这证实了在可可脂三酰甘油中，与甘油主链 sn-2 位羟基相连的脂肪酸取代基是油酸。因此，两种三酰甘油 (1,2-二硬脂酰-3-油酰甘油和 1,3-二硬脂酰-2-油酰甘油) 是位置异构体，天然产物对应于 1,3-二硬脂酰-2-油酰甘油。

■ 结论

研究证明，使用 AXIMA Performance 提供的真正高能 CID TOF/TOF (碰撞能量 20 keV) 对钠化三酰甘油的 MALDI-MS 分析，已被证明是传统扇形场分析仪的有效替代方案。更重要的是，AXIMA Performance 已经被证明可以准确区分这类脂质中的位置异构体。

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. Mo361 应用报告。

第四节 微生物鉴定中的应用

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、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。MALDI-TOF 通常生成的是单电荷离子，数据更容易解析，且在分析前无需高效液相色谱分离，因此具有高通量、速度快、成本低、自动化等特点，广泛应用于蛋白质等生物大分子相关的研究。20 世纪 90 年代末期，MALDI-TOF 开始应用于微生物中核糖体蛋白的研究。

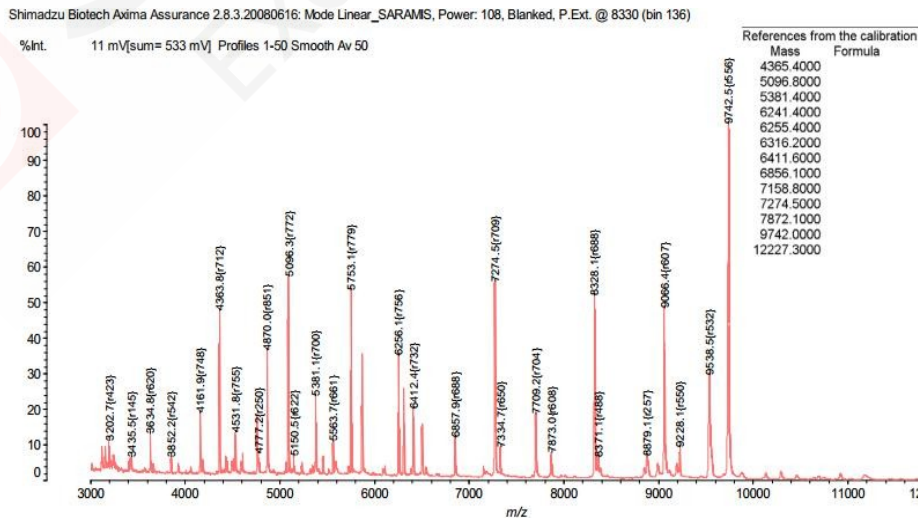
MALDI-TOF 微生物鉴定的基本原理是将样品与过量的小分子基质的混合液点在样品靶板上，待溶剂挥发后形成共结晶，用激光轰击晶体时，基质分子吸收能量同时电离生成质子转移到样品上，使样品带上电荷，带电离子在电场力的作用下带电飞行。通过飞行时间分析器分离不同质荷比的离子，最后被检测器检测，从而获得样品的质量信息。

基于 MALDI-TOF 获得的微生物特征谱图称为细菌指纹图。MALDI-TOF 用于微生物鉴定时，将实际检测的未知微生物的细菌指纹图和数据库中的参考谱图进行匹配检索，通过打分算法最后给出鉴定结果。

应用 MALDI-TOF 进行微生物鉴定是，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。

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，原因可能是数据库不包含这些微生物，而不是方法学错误。岛津和生物梅里埃合作的 Saramis 数据库，可以往已有数据库中添加新的物种和参考谱图，方便用户进行数据库的拓展和丰富。

相信随着越来越多的国产厂商进入 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。



大肠杆菌标准菌株质谱图

MALDI-TOF iD^{Plus} Performance 鉴定耐药菌品种

摘要：基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱仪(MALDI-TOF)指纹图谱法是近些年来微生物鉴定领域的热点技术。本文使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF 结合 SARAMIS 数据库进行常见耐药菌品种鉴定，结果显示所有样品成功进行了鉴定。本实验说明 MALDI-TOF 法具有快速、准确、使用成本低、高度自动化的特点，适合于临床诊断、环境和分类研究或者食品加工质量控制等领域微生物快速鉴定的应用需求。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF SARAMIS 微生物鉴定系统 微生物鉴定 耐药菌鉴定 大肠埃希氏菌 金黄色葡萄球菌 肺炎克雷伯菌 铜绿假单胞菌

随着时代发展，微生物鉴定在科学研究、药品检验和微生物污染控制等领域的应用需求日益凸显。细菌鉴定的传统手段是基于生化方法，检测细菌对各种物质的代谢作用及其代谢产物，该方法耗时长、试剂贵，并且可以检测菌种数量十分有限。基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱仪(MALDI-TOF)指纹图谱法因其快速简便的工作流程和强大可靠的数据处理能力，被认为是一种最有应用前景的微生物分类和鉴定方法。

每种微生物自身独特的蛋白质组成形成独特的蛋白质指纹图谱。通过 MALDI-TOF 质谱仪检测待测微生物的蛋白质组，获得的指纹谱图经过数据处理并与数据库中各种已知微生物的标准指纹图谱进行比对，即可实现对微生物的鉴定（图 1）。与传统方法相比，MALDI-TOF 质谱法鉴定过程耗时只需几分钟、使用的成本低廉，可实现 2,000 多种微生物鉴定，适于进行大规模菌株的准确鉴定。

本文利用岛津基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF 结合 SARAMIS 数据库进行常见耐药菌品种鉴定。通过简单的样品前处理，成功鉴定大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等耐药菌株，结果与预期相符。分析过程具有全自动高通量、分析成本低、速度快、结果准确可靠的特点。

1. 实验部分

1.1 仪器

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 AXIMA-Performance, SARAMIS 数据库

1.2 试剂与样品

基质： α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)

样品：来源于四种常见耐药菌（大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌）的共计 20 株代表性菌株。其中，大肠埃希氏菌 6 株、金黄色葡萄球菌 8 株、肺炎克雷伯菌 3 株、铜绿假单胞菌 3 株。

1.3 分析条件

调谐模式：SARAMIS 模式

扫描范围： m/z 2000-20000

激光能量：60

2. 样品前处理

涂布法：用接种环或枪头取适量(10^5 - 10^6 个细胞)单克隆细菌样品,在 MALDI 样品靶上涂成一薄层。覆盖 1 μ LCHCA 基质 (10 mg/mL) ,干燥后放入 MALDI-TOF 仪器分析。

3. 结果与讨论

以涂布法将多株待检耐药菌株处理后进行质谱分析，操作流程见图1。

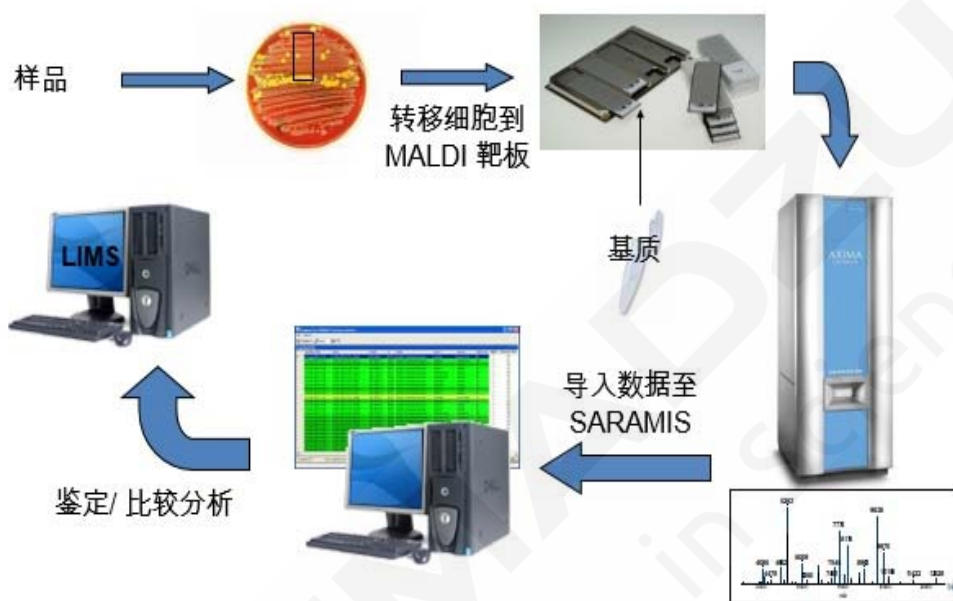


图1 SARAMIS数据库显示鉴定结果图

各菌株典型质谱图结果如图2-5所示。

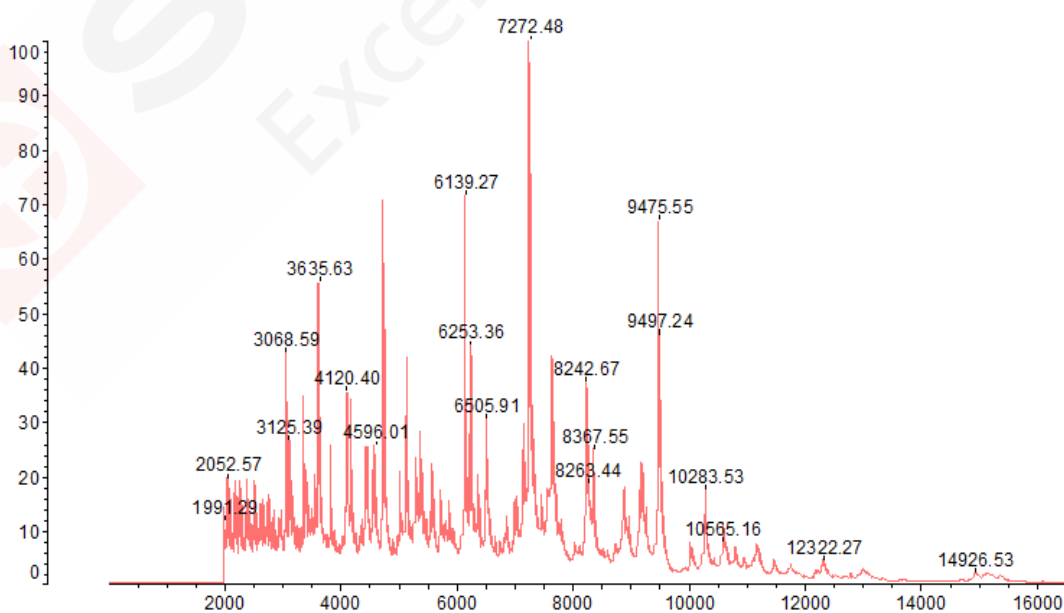


图2 大肠埃希氏菌一级质谱图

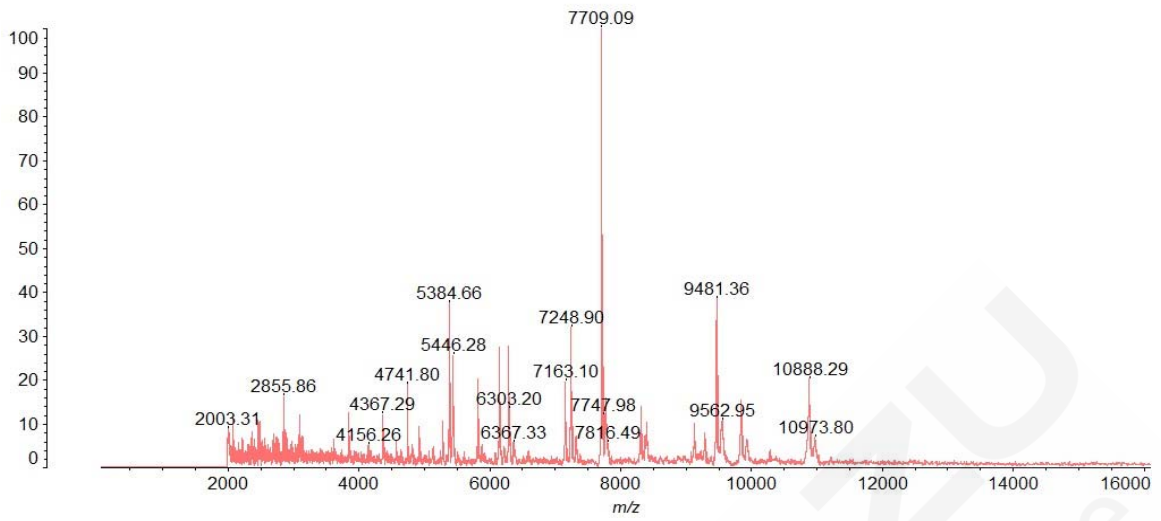


图3 金黄色葡萄球菌一级质谱图

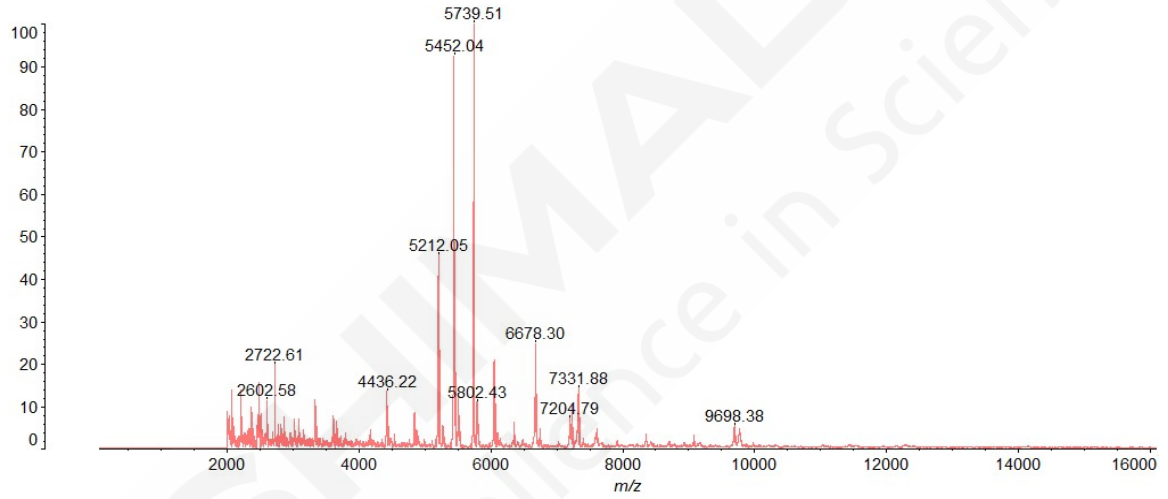


图4 肺炎克雷伯菌一级质谱图

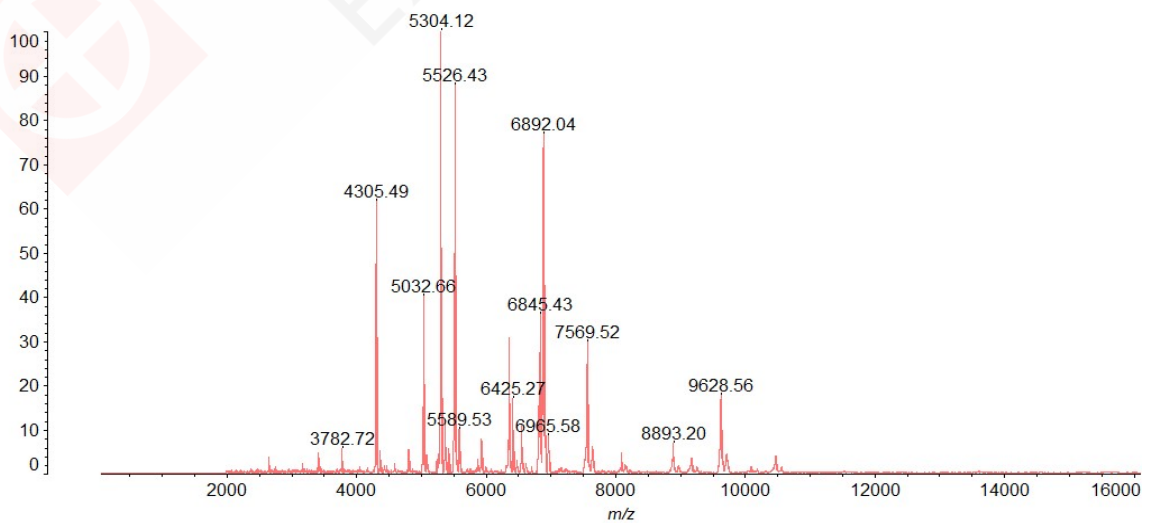


图5 铜绿假单胞菌一级质谱图

谱图数据经软件处理后导入SARAMIS数据库后，经数据库自动读取分析，数十秒内获得鉴定结果，详见图6。所得结果与预期相符。

SARAMIS Premium						
File Options						
Spectra Results						
Identified Files For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.						
acquisition time	name	sample	%	family	genus	species
16 Jan 2019 21:24	cali0073_0001_N23[c]		90.00	Family I Enterobac	Escherichia	coli
16 Jan 2019 21:24	cali0073_0001_M24[c]		99.90	Family I Pseudomon	Pseudomonas	aeruginosa
16 Jan 2019 21:24	cali0073_0001_M23[c]		84.00	Family I Pseudomon	Pseudomonas	aeruginosa
16 Jan 2019 21:24	cali0073_0001_M21[c]		89.80	Family I Pseudomon	Pseudomonas	aeruginosa
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_L20[c]		99.90	Family VIII Staphy	Staphylococcus	aureus
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_L23[c]		99.90	Family VIII Staphy	Staphylococcus	aureus
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_L22[c]		92.00	Family VIII Staphy	Staphylococcus	aureus
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_L21[c]		99.90	Family VIII Staphy	Staphylococcus	aureus
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_L24[c]		99.90	Family VIII Staphy	Staphylococcus	aureus
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_K23[c]		76.50	Family I Enterobacte	Klebsiella	pneumoniae
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_K22[c]		81.70	Family I Enterobac	Klebsiella	pneumoniae
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_K21[c]		95.70	Family I Enterobac	Klebsiella	pneumoniae
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_J20[c]		80.00	Family I Enterobac	Escherichia	coli
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_J24[c]		99.90	Family I Enterobac	Escherichia	coli
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_J22[c]		99.90	Family I Enterobac	Escherichia	coli
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_J21[c]		80.60	Family I Enterobac	Escherichia	coli
16 Jan 2019 20:57	cali0070_0002_J23[c]		86.80	Family I Enterobac	Escherichia	coli
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_H24[c]		99.90	Family VIII Staphy	Staphylococcus	aureus
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_H23[c]		99.90	Family VIII Staphy	Staphylococcus	aureus
16 Jan 2019 20:59	cali0071_0002_H22[c]		99.90	Family VIII Staphy	Staphylococcus	aureus

图6 SARAMIS数据库显示鉴定结果图

3. 结论

本文采用岛津公司基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF 结合 SARAMIS 数据库进行常见耐药菌品种鉴定。此方法高效、灵敏、快速、操作简便，是微生物鉴定实验的有力分析方法。

MALDI-TOF iD^{Plus} Performance 从人指纹样品中鉴定食源性病原体

2010年,世界卫生组织(WHO)报道,全球约发生了58200万例由食品引起的疾病,其中约有351000例死亡。由于食源性细菌通常通过摄入受污染的食物进行传播,因此不适当的食物处理程序可能会威胁到食物消费的安全性。食物中毒是非常致命的,特别是对于免疫缺陷人群。为了减少传染性病原体的传播,在处理食品材料之前需要适当的卫生行为,例如用水和肥皂洗手。

本实验利用基于MALDI-TOF的岛津iD^{Plus}系统,通过对洗手前后包括各种食源性病原体在内的微生物的鉴定,证实了洗手卫生的重要性。该方法基于从MALDI-TOF质谱图中提取肽指纹质量峰值列表以匹配SARAMIS数据库进行识别。

■ 实验

受试者在含有胰蛋白大豆琼脂和5%绵羊血(Thermo Scientific)的血琼脂培养基上轻轻印上5个手指的指纹。将血琼脂平板上的来自于指纹的细菌置于5% CO₂培养箱(MCO5AIC, Sanyo)中37°C培养18至48小时。然后从培养皿中选择合适的单一细菌菌落转移至不同的血琼脂平板上进行纯细菌的培养(图1)。

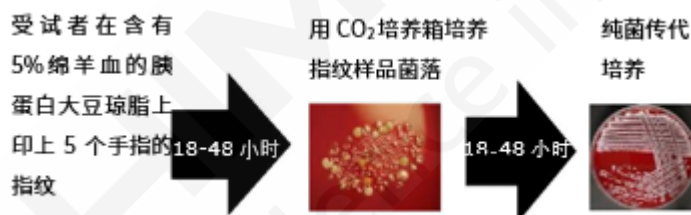


图1 细菌培养流程图

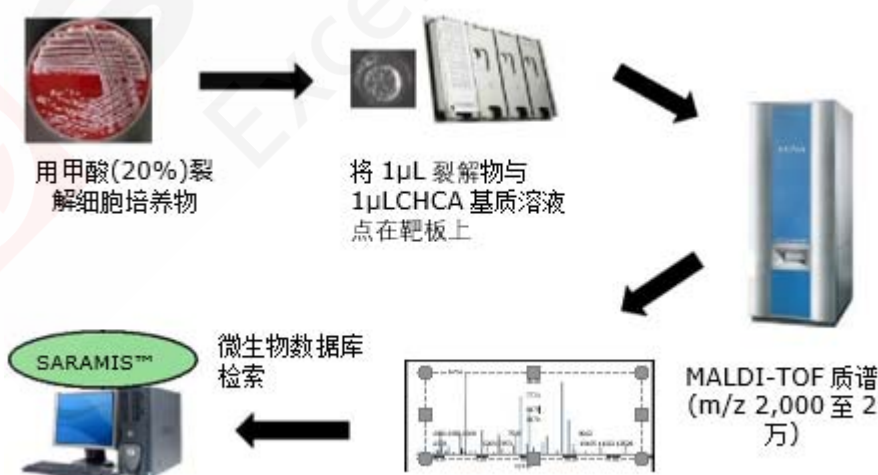


图2 iD^{Plus}平台工作流程图

iD^{Plus}的工作流程(图2)由样品制备、质谱检测和SARAMIS鉴定三个阶段组成。取琼脂平板上的单菌落溶解于20 μL的20%甲酸溶液中。将1 μL的裂解液点在不锈钢靶板上,再点上1 μL

基质溶液(10 mg/mL 的 α -氰基-4-羟基-肉桂酸溶解在含 0.3%三氟乙酸的乙腈/乙醇/水等体积混合液中)。然后, 混合物在室温下干燥, 使基质和分析物分子形成共结晶。使用 MALDI-TOF MS (AXIMA Performance, Shimadzu Corporation)进行质谱检测。利用 20 kV 加速电压, 1,500 Da 低质量离子门, 在正离子线性模式($m/z=2,000$ 到 20000)下获得质谱图。使用大肠杆菌 DH5 α Electro-cell(TaKaRa bio Inc., Japan) 进行分子量校准。通过将样品质谱图与 SARAMIS 数据库中的超级谱图进行比对来进行鉴定。

■ 结果和讨论

未洗手的人指纹样本中发现了 14 种微生物。其中大部分来自人体正常的微生物菌群或自然环境(表 1)。

其中, 从未洗手的指纹样品中发现了蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。这些属于疾病控制和预防中心列出的食源性病原体。当感染者赤手触摸或摄入食物时, 这些细菌很容易被传播。

表 1 iD^{Plus} 平台对受试者未洗手的指纹样品微生物鉴定结果

Name	%	Family	Genus	Species
HA4-3	99.90	Family I Micrococceae	Micrococcus	luteus
HA1	99.90	Family VIII Staphylococcaceae	Staphylococcus	warneri
LB2-1	90.00	Family VIII Staphylococcaceae	Staphylococcus	capitis
LB1-8	99.90	Family VIII Staphylococcaceae	Staphylococcus	aureus
SA4	99.90	Family VIII Staphylococcaceae	Staphylococcus	haemolyticus
SB3-7	99.90	Family VIII Staphylococcaceae	Staphylococcus	epidermidis
HB1-2	99.90	Family I Bacillaceae	Bacillus	cereus group
SB2	99.90	Family VIII Staphylococcaceae	Staphylococcus	hominis
2A1	99.90	Family I Bacillaceae	Bacillus	subtilis
2A2	99.90	Family I Enterobacteriaceae	Proteus	mirabilis
X1	99.90	Family I Neisseriaceae	Neisseria	subflava
YNHM-4	93.20	Family VIII Staphylococcaceae	Staphylococcus	cohnii
TGNH-4	99.90	Family I Rhodobacteraceae	Paracoccus	yeei
E-HG-4	99.90	Family VI Streptococcaceae	Streptococcus	parasanguinis

研究显示, 洗手后, 在洗净手指的指纹样本中已找不到病原体。图 3a 和 3b 显示蜡样芽孢杆菌 (a) 和金黄色葡萄球菌 (b) 的质谱图和细菌培养形态图。

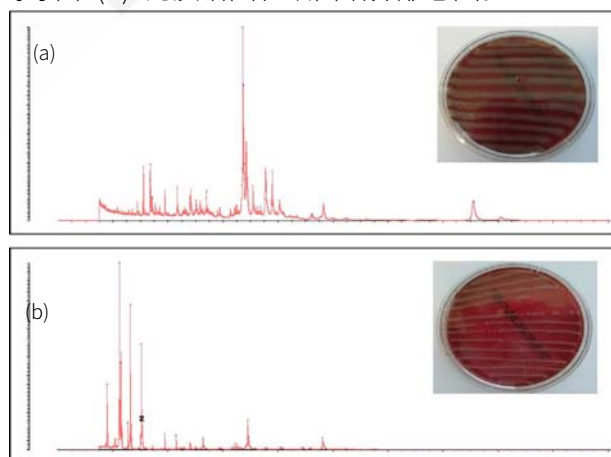


图 3 蜡样芽孢杆菌 (a) 和金黄色葡萄球菌 (b) 的质谱图和细菌培养形态图

表 2 显示了蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 在 iD^{Plus} 微生物快速鉴定系统上的重复性和可靠性鉴定结果。每个样品在靶板上点了 6 个平行靶点, 且所有样本鉴定结果的可靠性大于 90.0% (鉴定阈值)。

表 2 iD^{Plus} 平台对蜡样芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的鉴定结果

Name	%	Family	Genus	Species
HB1-7	99.9	Family I Bacillaceae	Bacillus	cereus group
HB1-6	99.9	Family I Bacillaceae	Bacillus	cereus group
HB1-5	99.9	Family I Bacillaceae	Bacillus	cereus group
HB1-4	99.9	Family I Bacillaceae	Bacillus	cereus group
HB1-3	99.9	Family I Bacillaceae	Bacillus	cereus group
HB1-2	99.9	Family I Bacillaceae	Bacillus	cereus group
LB1-8	99.9	Family VIII Staphylococcaceae	Staphylococcus	aureus
LB1-6	99.9	Family VIII Staphylococcaceae	Staphylococcus	aureus
LB1-5	98.9	Family VIII Staphylococcaceae	Staphylococcus	aureus
LB1-4	99.9	Family VIII Staphylococcaceae	Staphylococcus	aureus
LB1-3	98.9	Family VIII Staphylococcaceae	Staphylococcus	aureus
LB1-2	99.9	Family VIII Staphylococcaceae	Staphylococcus	aureus

超级谱图是根据已知微生物的参考谱图生成的人工指纹质谱图, 它由属、种和株水平的特异性蛋白质指纹谱图组成。通过比较同一菌种, 属和科的分离物的多张质谱图来建立特异性的蛋白质指纹图谱, 并且超级谱库中的每个峰都具有与其特异性水平高低相对应的峰值加权。这意味着在菌种鉴定中, 仅在属或科的水平上的特异峰只能获得较低的峰值加权-无量纲点-而种水平特异峰权重会很高。每个超级谱图由来自不同地区(医院、参考中心、培养收集点)的某一个菌种的至少 15 个不同代表(分离物)的质谱数据来计算, 其中每个菌种要经过一个或多个其他方法进行鉴定, 例如生化方法, 16 sRNA 测序。这保证了无假阳性结果的可靠鉴定。

■ 结论

iD^{Plus} 使用 SARAMIS 快速可靠地用于未清洗的手指上的微生物鉴定 (包括各种食源性病原体) 以及洗手后不存在微生物的验证。正确处理食物和实施卫生管理对于降低人与人之间传播感染性病原体的风险非常重要。

注:仅用于研究, 不用于诊断。

本文译自岛津新加坡分公司 (SAP) No. AD-0105 应用报告。

MALDI-TOF iD^{Plus}和统计分析软件对emm1 A群链球菌进行分型

利用基质辅助激光解吸/电离质谱仪 (MALDI-TOF MS) 进行微生物鉴定的方法越来越普遍, 因为鉴定过程比传统方法更快、更简单。MALDI-TOF 质谱已经成为鉴定技术的一种工具。为了进一步扩展应用领域, 人们正努力利用 MALDI 仪器进行微生物的其他检测, 而不仅限于鉴定。

近年来, 由 A 群链球菌 (GAS) 引起的侵袭性感染呈上升趋势。其中, emm1 A 群链球菌具有很高的致病性, 其侵袭性感染病例表明其发展为暴发型的可能性非常高。据说其病死率和并发症发生率都很高。本文介绍了一个利用 MALDI-TOF MS 和统计分析软件 eMSTAT Solution 区分高致病性 emm1 型与其他类型的一个例子。

■ 材料和方法

首先, 在来自侵袭性感染症的 GAS 菌株中, 我们使用了分离频率高的 emm 1、emm 12、emm 28、emm 89 各 10 株, 并寻找有助于区分 emm 类型的标志物。

以上四种 emm 菌株在血琼脂培养基上培养 24 小时, 经乙醇-甲酸提取, 以芥子酸为基质, 在 iD^{Plus} MALDI 微生物鉴定平台上进行分析。为保证标志物的重现性, 从再培养菌落中制备样品, 每种类型的菌株测量 9 次。利用 eMSTAT Solution 软件对质谱得到的峰列表进行多变量分析, 以区分 emm 类型。此外, 我们对 379 株来自咽炎和扁桃体炎的菌株进行了盲测, 包括 B、C 和 G 群链球菌。

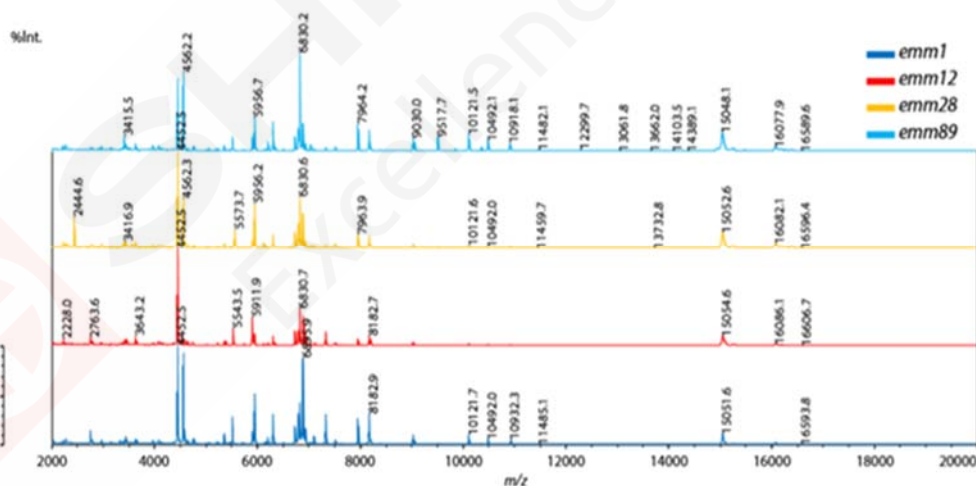


图 1 emm1 型链球菌与其他类型链球菌的质谱图比较

■ 结果

图 1 示出 A 群链球菌 emm1 型和其他类型的质谱图。质谱图很相似, 很难从视觉上区分它们。然而, 通过进行多变量分析 (算法: PLS-DA), 他们被分为两组: emm1 型和其他类型 (图 2)。

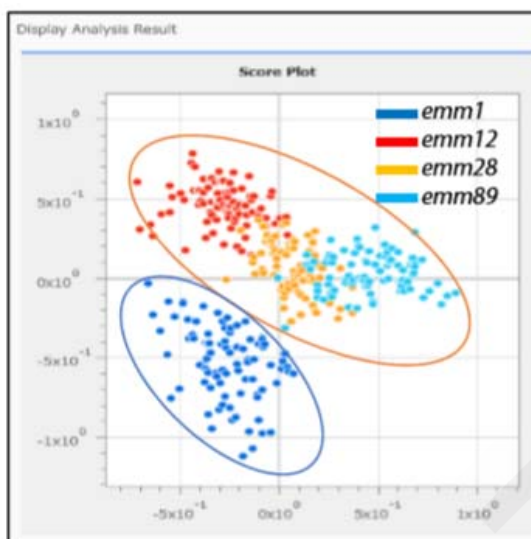


图 2 A 群链球菌多变量分析结果 (记分图)

使用 eMSTAT Solution 软件, 可以区分在 MALDI 质谱中检测到的标记峰, 这有助于区分 emm1 类型和其他类型。作为搜索的结果, 我们从峰值矩阵表中确认, 在 m/z 10932 处的峰值是在 emm1 类型的所有 90 个样本中检测到的, 与此相反, 在其他类型的所有样本中没有检测到 (图 3)。这在质谱图中得到了证实, 我们可以看到 m/z 10932 的峰仅在 emm1 型中检测到 (图 4)。

接下来, 我们用 m/z 10932 的标记峰作为指标, 对 379 株临床分离菌株进行了盲测 (表 1)。在 379 株菌株中, 97 株经常规遗传分析鉴定为 emm1 型, 其中 92 株 (94.8%) 经 MALDI-TOF MS 鉴定为 emm1 型, 阳性符合率较高。另外, 用 MALDI-TOF MS 方法分型为非 emm1 型的 3 株菌株, 常规方法分型为 emm11 ($n=1$) 和 emm28 ($n=2$), 阴性符合率为 98.9% (表 2)。

<input checked="" type="checkbox"/>	m/z	ANOVA	emm1.0	emm12.0	emm28.0	emm89.0
<input checked="" type="checkbox"/>	10529.53	0.45215	0	1	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	10580.12	0.022573	0	0	0	4
<input checked="" type="checkbox"/>	10689.77	0.13804	5	1	9	2
<input checked="" type="checkbox"/>	10697.97	1.1797E-16	64	80	55	84
<input checked="" type="checkbox"/>	10706.51	0.32824	3	2	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	10717.11	0.76438	2	1	2	3
<input checked="" type="checkbox"/>	10725.56	0.27327	0	0	1	2
<input checked="" type="checkbox"/>	10734.97	0.26564	0	2	0	4
<input checked="" type="checkbox"/>	10918.12	4.173E-74	0	88	90	89
<input checked="" type="checkbox"/>	10931.66	8.8298E-56	90	0	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	10951.27	0.45215	0	1	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	10963.42	0.0097304	0	0	0	7
<input checked="" type="checkbox"/>	10970.66	0.45215	1	0	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	11000.27	0.0046591	6	0	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	11007.57	0.45215	1	0	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	11025.18	0.13835	0	2	0	0

图 3 利用峰矩阵函数识别标记峰

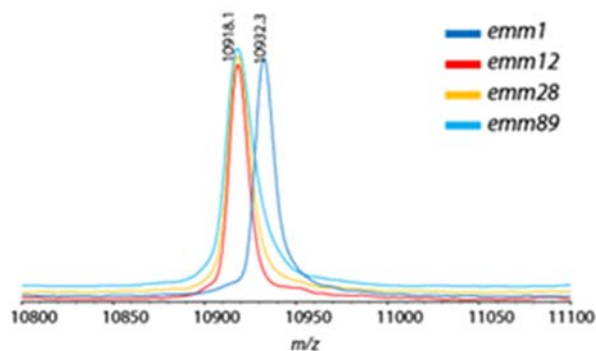


图 4 A 群链球菌 emm1 型及其他类型的放大质谱图

■ 结论

传统的 emm 分型技术需要细菌培养、GAS 分离、PCR 扩增 emm 基因和序列分析，需要三天才能得到结果。然而，利用 MALDI-TOF 质谱技术，在培养后的几十分钟内即可得到结果。这是一种在短时间内对高致病性 emm1 型进行分型的新技术，它在未来的发展值得期待。

表 1 用于盲测的临床分离菌株

emm1	97
emm2	2
emm3	4
emm4	31
emm6	2
emm9	7
emm11	11
emm12	92
emm28	59
emm75	6
emm77	1
emm89	58
emm112	3
Other	6
Total	379

表 2 盲测结果

emm1 Type		Conventional Method (Genetic Analysis)		Total
		(+)	(-)	
Mass Spectrometry	(+)	92 (94.8 %)	3 (1.1 %)	95
	(-)	5 (5.2 %)	279 (98.9 %)	284
Total		97	282	379

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B091 应用报告。

MALDI-TOF iD^{Plus} 鉴别细菌血清型

高精度细菌鉴别软件"Strain Solution Ver. 2"与 iD^{plus} 系统的实际应用

摘要: 我们利用蛋白质分型方法 (S10-细菌法) 成功地实现了肠出血性大肠杆菌血清型水平的识别, 该方法利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 在细菌测量过程中检测到核糖体蛋白的标志物。在未来, 这项技术可以作为一种常规的方法, 在比物种水平更细的水平上进行细菌的鉴别, 这在传统的基于 MALDI-TOF MS 指纹的微生物鉴定方法中是不可能实现的。

关键词: 食物中毒病原体、MALDI-TOF MS、蛋白质分型、S10-GERMS

1. 简介

在食品和药物的生产和临床微生物测试期间, 通常需要快速准确地鉴定微生物。特别是病原微生物和微生物污染物(机会性致病菌)的快速鉴定变得越来越重要。传统的微生物鉴定方法一般包括生理生化检测和针对 16S rRNA 基因序列的 DNA 核苷酸序列分析。然而, 这些技术面临以下挑战: 1) 缺乏快速性; 2) 劳动密集型, 需要专业知识; 3) 对于某些细菌物种, 不可能在属或种级别之外进行详细鉴定; 而且, 重要的是, 4) 鉴别病原微生物需要使用昂贵的试剂 (如抗血清/抗体)。因此, 基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 的方法作为微生物快速鉴定的新技术受到广泛关注。MALDI-TOF 质谱因其简单、方便、可快速处理多个样品而备受关注。

基本上, 来自单个菌落的微生物样品可以通过简单地与极少量的基质溶液(电离佐剂)混合来进行分析。此外, 该方法所需的分析时间小于每样品 1 分钟, 这使得能够在短时间内处理多个样品。使用 MALDI-TOF MS 的微生物鉴定方法自本世纪初开始迅速推广, 主要应用于临床微生物检测领域, 并于 2013 年获得美国食品和药物管理局的批准。使用 MALDI-TOF MS 进行微生物鉴定的流程包括获取微生物样品的质谱图, 并将其与数据库中已记录的各种细菌物种的质谱相匹配 (指纹法)。虽然指纹识别法可以识别到属和种级别, 但它不允许详细区分与食物中毒有关的重要病原体 (如大肠杆菌和沙门氏菌) 的血清型。因此, 我们开发了一种利用蛋白质分型方法^{*1} S10-spc- α 操纵子基因编码核糖体蛋白质谱 (S10-GERMS method) 识别食物中毒致病菌血清型的方法, 该方法比指纹法更能准确地鉴别微生物。此外, 我们开发了一种名为 Strain Solution Ver.2 的高精度细菌识别软件, 与 iD^{plus} 系统兼容(图 1)。在本文中, 使用 MALDI-TOF MS 和 Strain Solution Ver.2 介绍了微生物在血清型水平上的鉴别方法, 并介绍了该方法在肠出血性大肠杆菌^{*2}中的应用实例。

*1 蛋白质分型方法:

该方法以 MALDI-TOF MS 检测的蛋白质组分作为微生物鉴别的生物标志物。用于蛋白质分型的生物标志物是根据目标基因的核苷酸序列数据预先指定的, 与基于遗传技术的分型方法(如传统的 DNA 测序方法)相比, MALDI-TOF MS 的蛋白质分型具有更快、更简单、更易于使用的

优点。如果靶向细菌的基因组序列尚未被解码，蛋白质分型仍然可以通过解码 S10-spc- α 操纵子的碱基序列来进行，该操纵子编码大约一半的核糖体蛋白质。S10-GERMS 法是由日本明治大学农业学院环境生物科学系和国家先进工业科学技术研究所环境测量技术组开发的。

*2 肠出血性大肠杆菌:

迄今为止，已报告了近 200 种不同血清型的大肠杆菌（O 型抗原），但产志贺毒素的血清型 O157、O26 和 O111 是导致食物中毒的主要病原体，因此是问题最多的。然而，传统的指纹识别方法仅限于物种水平，无法确定血清型。

2. S10-GERMS 法及 Strain Solution Ver.2

S10-GERMS 方法通过 MALDI-TOF MS 检测微生物血清型或者株系中特异性的由基因编码的蛋白质（生物标记物）的质谱峰。因此，基于基因的 DNA 序列信息和实际测量值，可以建立一个质谱峰的理论质量数据库，该数据库可能被用作区分血清型或菌株的生物标志物。应用 Strain Solution Ver.2 软件将从样品中获得的质谱峰列表与数据库中的理论值相匹配。

与指纹识别方法不同，该方法中使用的生物标志物成分是明确的，因此即使差异仅由单个碱基突变引起的单个氨基酸突变组成，也可以实现鉴别。因此，这种方法也适用于微生物鉴定之后的分子系统发育分析，以及混合样品的分析（稍后将介绍）。

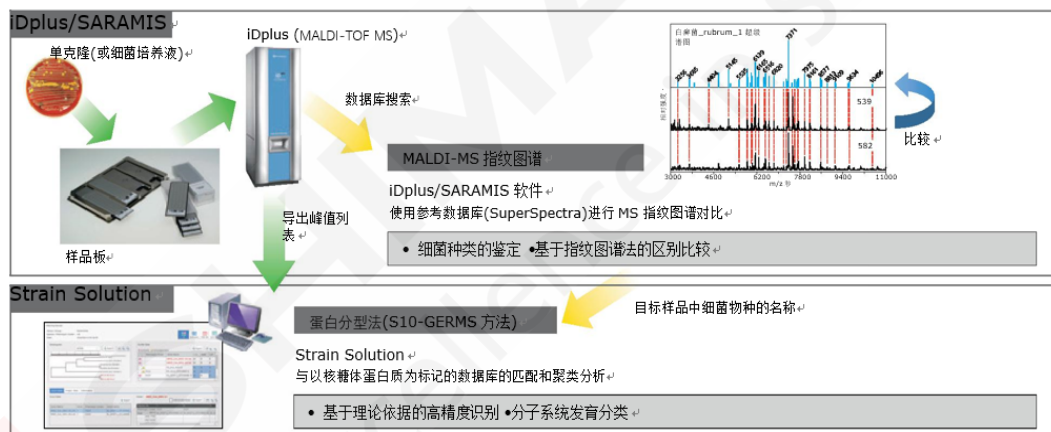


图 1 iDplus 和 Strain Solution

3. 应用方法

本文介绍以识别肠道出血性 *Escherichia coli* 的主要血清型，即 O157、O26 及 O111 为目的的数据库的开发，并提供采用 Strain Solution Ver.2 的分析实例。

3-1. 开发用于 Strain Solution Ver.2 的数据库

首先，从培养标本中获得 50 株具有不同类型 O 抗原的大肠杆菌，用 MALDI-TOF-MS (iDplus) 进行检测，并筛选出可能作为血清型鉴别指标的生物标志蛋白。基因组信息或实验分析的 DNA 序列数据与使用 MALDI-TOF MS 进行实际测量的数据相匹配，并创建了所选生物标记物的理论质量表（图 2）。结果，我们发现了许多生物标记物，这些生物标记物显示了每种大肠杆菌血清型的特征质量数，并且我们能够在 50 株大肠杆菌中区分出 12 组（A-L 组）。

在这些组中，发现酸应激蛋白 HdeB (m/z 9066.2)、核糖体蛋白亚单位 S15 (m/z 10166.6 或 10138.6) 和 L25 (m/z 10676.4 或 10694.4) 以及 DNA 结合蛋白 H-NS (m/z 15409.4 或 15425.4) 的

存在或缺失是肠道出血性大肠杆菌的主要血清型 O157、O26 和 O111 的特征。这些生物标志物还可用于区分上述血清型和其他大肠杆菌菌株和血清型。

3-2. 用野生型株进行验证

使用从食物中毒患者和食物样本中分离出的 45 株不同血清型大肠杆菌野生型菌株，对所开发数据库的实用性进行了验证（表 1）。在胰蛋白酶大豆琼脂培养基和常见大肠杆菌选择性培养基（去氧胆酸琼脂培养基、CT-SMAC 培养基、Chromagar X-gal 培养基、VRBL 培养基）中培养。具体来说，为了验证，执行了以下步骤（图 1）。

(1) 根据图 2 所示的理论质量列表，将大肠杆菌菌株 O157、O26、O111 和 K12 的 HdeB、S15、L25 和 H-NS 的标记峰记录在 Strain Solution Ver.2 数据库中。

(2) 将验证实验中使用的野生型菌株的单个菌落（约 10⁷ 个细胞）培养在琼脂培养基上，涂在金属板上进行分析，然后与 1 微升基质溶液（20 mg/mL 芥子酸、50%乙腈、1%三氟乙酸）混合。

(3) 使用 iD^{Plus} 进行分析，得到质谱图。

(4) 使用 Strain Solution Ver.2，将得到的质谱图的峰值列表与登记在数据库中的标记峰进行匹配。

表 1 用于验证实验的大肠杆菌菌株

ID	Serotype	Gene			Source
		stx1	stx2	eae	
KB0137	O157	+	+	N. D.	Patient (Japan)
KB0139	O157	+	+	N. D.	Patient (Japan)
KB0150	O157	-	-	N. D.	Patient (USA)
KB0152	O157	+	+	N. D.	Patient (Japan)
KB0155	O157	-	+	N. D.	Patient (Kenya)
KB0156	O157	+	+	N. D.	Patient (Japan)
KB0340	O157	-	+	N. D.	Beef liver
KB0341-1	O157	-	+	+	Beef omasum
KB0341-2	O157	-	-	-	Beef omasum
KB0514	O157	-	+	+	Patient (Japan)
KB0521	O111	+	-	+	Patient (Japan)
KB0522	O157	+	+	+	Patient (Japan)
KB0548	O159	+	+	N. D.	Patient (Kenya)
KB0549	UT	-	+	N. D.	Patient (Kenya)
KB0617	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0618	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0619	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0620	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0621	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0622	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0623	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0624	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0625	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0626	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0627	O111	+	-	N. D.	Patient (Japan)
KB0628	O111	+	+	N. D.	Patient (Japan)
KB0732	O121	-	+	+	Patient (Japan)
KB0733	UT	+	+	-	Minced meat
KB0734	O145	+	-	+	Patient (Japan)
KB0735	O91	+	-	-	Patient (Japan)
KB0738	UT	-	+	+	Patient (Japan)
KB0739	O121	-	+	+	Patient (Japan)
KB0740	O91	+	+	-	Patient (Japan)
KB0741	O145	+	-	+	Patient (Japan)
KB0742	O128	+	+	-	Patient (Japan)
KB0743	O91	+	+	-	Patient (Japan)
KB0744	UT	-	+	-	Patient (Japan)
KB0745	O157	+	+	+	Patient (Japan)
KB0746	O115	+	-	-	Patient (Japan)
KB0747	O121	-	+	+	Patient (Japan)
KB0748	O145	-	+	+	Patient (Japan)
KB0749	O103	+	-	+	Patient (Japan)
KB0750	O103	+	-	+	Patient (Japan)
KB0751	O145	+	-	+	Patient (Japan)
KB0752	O145	-	+	+	Patient (Japan)

Serotypes were determined by performing antisera agglutination tests and PCR.
 UT, untyped.
 N. D., not determined.

理论质量数据库

Protein	Coded protein	Group of mass pattern																								
		A		B		C		D				E		F		G		H		I		J		K		L
		1	2	1	2	1	2	1	2	3	4	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
L23	B12	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1
L24	hsc	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0	11198.0
B14	hsc	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3	11490.3
L15	hsc	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4
B11+Me	alpha	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8
B15		10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6
L25		10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4	10284.4
HdeB		-	-	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2
H-NB		15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4

能够识别大肠杆菌 O157, O26 和 O111 的生物标志物的峰值

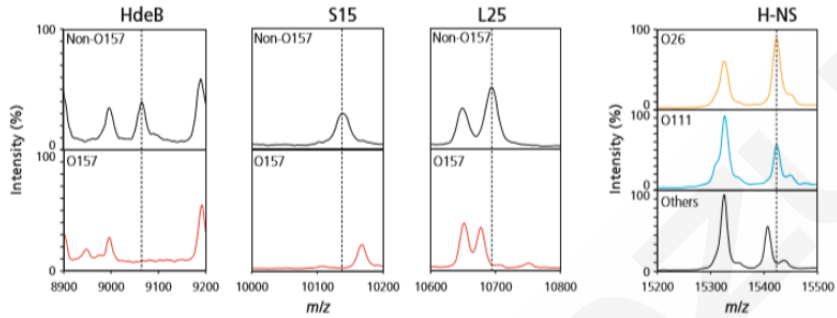


图 2 基于 S10-GERMS 法的肠出血性大肠杆菌血清型鉴别数据库的构建

利用 Strain Solution Ver.2 的聚类分析函数判别结果。如图 3 所示。这些菌株大致分为以下四类：血清型 O157 (簇 A)、其他血清型 (簇 B)、血清型 O26 和 O111 (簇 C) 和血清型 O157 (簇 D)。血清型 O157 (12 株) 和 O26/O111 (13 株) 的正确识别率分别为 92% (11/12) 和 100% (13/13 株)。这些结果与用常规方法测定血清型的结果高度一致。然而，11 株产志贺毒素血清型 O157 菌株在 O157 (D) 聚类中的识别率为 100%，表明大肠杆菌 O157 KB0341-2 (非产志贺毒素菌株) 与普通 O157 菌株不同。此外，O121 KB0747 没有 HdeB 峰；因此，它与 GTC14550 (O157 血清型中的稀有菌株) 归为同一组 (A 组)。

图 3 显示了在胰蛋白胨大豆琼脂培养基上生长的菌落的测量结果，但在不同类型的选择性培养基中生长的菌株也得到了类似的结果。当然，也有必要对其他样本进行验证；然而，这些结果表明，我们的数据库和通过蛋白质分型进行血清型识别似乎对大多数野生型菌株有效。这种方法的另一个优点是，可以在官方方法中使用的选择性培养基上生长的菌落进行分析，也可以对独立试验中使用的菌落进行分析。因此，这种方法可以应用于多种样品，而不必改变传统的微生物检测方法。本研究中描述的数据库可作为 Strain Solution Ver.2 软件的一个选项，还可以根据用途创建更多原始数据库。

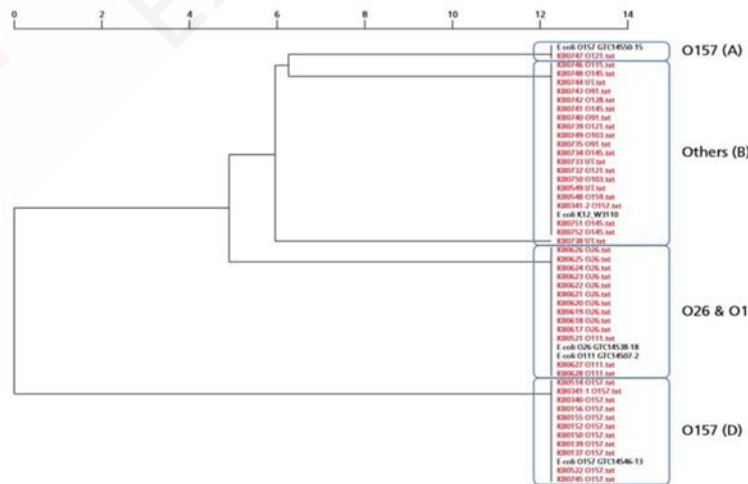
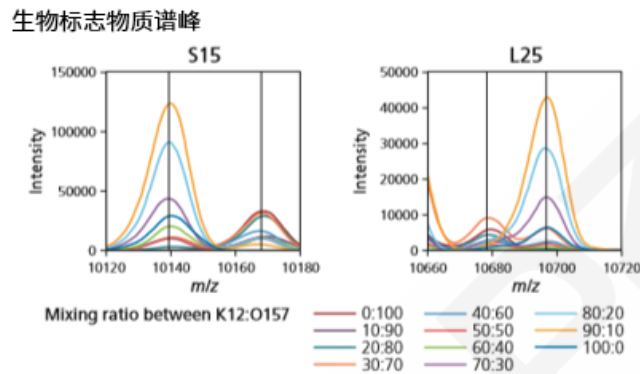


图 3 聚类分析结果：数据库中登记的菌株以黑色显示，验证实验中使用的野生型菌株以红色显示。

3-3.混合样品

将实验中常用的大肠埃希菌 K12 株与肠出血性大肠杆菌 O157 按不同比例混合，并用 MALDI-TOF MS 对菌株进行了分析，以验证 Strain Solution Ver.2 软件是否能以三种生物标志物为指标鉴别混合物。结果表明，当 O157 以 10%~80%的比例混合时，该软件能够正确地确定样品是 O157 与其它大肠杆菌（K12 株）的混合物。当样品以 40%到 70%的比例混合时，所有三种生物标志物都被识别为两个质量峰（图 4）。



菌株分型分析结果

Mixing ratio	Hit biomarker			Results of identifications using the Strain Solution
	S15	L25	H-NS	
K12:O157				
100:0	C	C	C	Other serotypes
90:10	A, C	C	A, C	O157 and other serotypes
80:20	A, C	C	A, C	O157 and other serotypes
70:30	A, C	C	A, C	O157 and other serotypes
60:40	A, C	A, C	A, C	O157 and other serotypes
50:50	A, C	A, C	A, C	O157 and other serotypes
40:60	A, C	A, C	A, C	O157 and other serotypes
30:70	A, C	A, C	A, C	O157 and other serotypes
20:80	A, C	A	A, C	O157 and other serotypes
10:90	A	A	A	O157
0:100	A	A	A	O157

A: Mass corresponding to the biomarker of the O157 type (*Escherichia coli*).
C: Mass corresponding to the biomarker of other *Escherichia coli*

图 4 混合菌的鉴别

与传统的微生物鉴定方法类似，在进行 MALDI-TOF MS 分析之前，通常需要对细菌进行分离；但是，如果将密切相关的菌株混合在一起，则无法通过标准指纹法将它们区分开来。因此，当处理几个密切相关的细菌菌株时，Strain Solution Ver.2 软件的某些功能可用于监测人为错误。这有利于食品工业中使用的发酵剂菌种的质量管理，也有利于微生物菌种的管理。

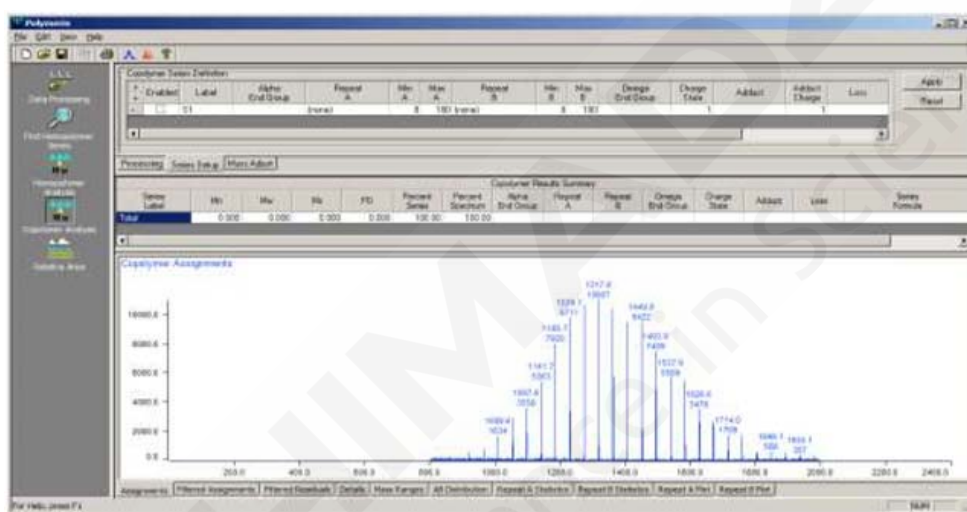
4.结论与展望

由于 MALDI-TOF MS 的快速性和简便性，它在各个领域的应用正在迅速扩展，包括在临床环境、制药工业和食品工业等微生物控制领域。近年来有几项研究报道了 MALDI TOF-MS 用于血液培养基和食品样品中细菌的直接测量，需要更简单、更准确的分析。基于 Strain Solution Ver.2 软件和 S10-GERMS 方法的蛋白质分型技术，可以高灵敏度地区分选定生物标志物质量的微小变化，这一点迄今为止还未被重视。因此，该方法具有广泛的应用前景，不仅可以用于纯种微生物的血清型或菌株的鉴别，而且可以用于无法实验纯种分离的肠道菌群或细菌混合物的详细分析和诊断。

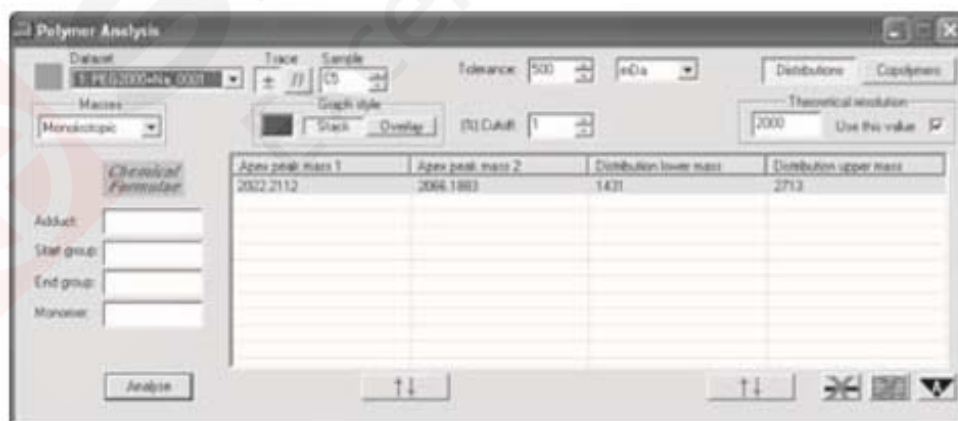
本文译自岛津全球应用开发中心（GADC）No. C146E331 技术报告。

第五节 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



岛津 Polymer Analysis 聚合物分析软件界面

MALDI-8020 进行聚乙二醇修饰药品的分析

聚合物是由称为单体的次级单元重复连接而成的分子，由于其物理和化学性质，在医学、药学、工学、材料科学等各个领域发挥着重要的作用。聚合物的分析可以使用 SEC/GPC 分析、NMR/FT-IR 分光法等的各种分析手法，其中，MALDI-MS 由于可以快速得到聚合物的分子量分布、多分散性以及端基结构信息，因此，广泛应用于制造业和质量实验室。

聚合物将有望作为载体分子应用于治疗领域，控制并运输药物制剂至靶标。键合到聚乙二醇 1000 (PEG 1000) -琥珀酸上的维生素 E (维生素 E-TPGS, 图 1) 被证明可提高药剂溶解性、渗透性以及稳定性。

在这里我们介绍了一种联合台式线性 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 和聚合物数据分析软件 Polymerix (Sierra Analytics) 的维生素 E-TPGS 聚合物的完整解决方案 (图 2)。

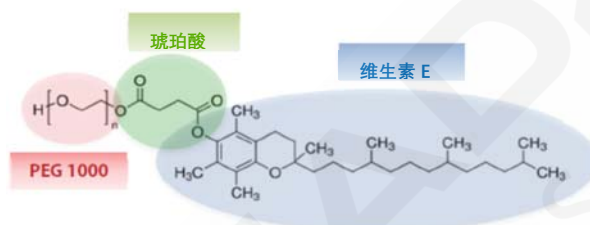


图 1 维生素 E-TPGS 的结构

■ 材料及方法

维生素 E-TPGS 购自西格玛奥德里奇公司。样品溶液 (2 mg/mL, 乙腈/水=1/1) 与 MALDI 基质溶液 (α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA, 10 mg/mL, 乙腈/水=1/1) 混合后使用。作为阳离子化试剂, 使用氯化钠溶液 (1 mM, 乙腈/水=1/1) 对 MALDI 靶板进行预涂。将样品和基质的混合溶液 (1 μ L) 滴到上述氯化钠的预涂靶板上。MALDI-MS 分析按照表 1 所示的参数进行。

表 1 MALDI-MS 质谱采集参数

Tuning	linear
Polarity	positive
Mass range	100-3000 Da
Laser rep. rate	200 Hz
Accumulation rate (shots/profile)	50
Profiles	200

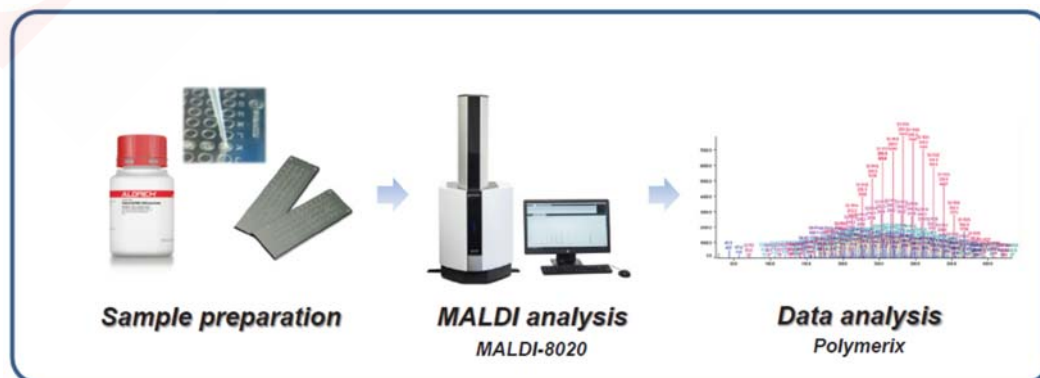


图 2 维生素 E-TPGS 聚合物分析的工作流程

■ 结果

图 3 为维生素 E-TPGS 聚合物的钠加合离子的 MALDI-MS 图谱。主要聚合物离子系列位于 m/z 1,100 – 1,900 范围内，除此之外，还可以看到另外两种微小的离子峰系列 (m/z 800 – 1,200 和 1,700 – 2,200，图 3 上)。

图 3 (下) 显示两个信号峰间隔 44 Da，与重复单元 (C_2H_4O) 的理论分子量一致。由此可知，两个谱峰相当于长度仅差一个 PEG 单元的两个聚合物链。另外，上述两个单同位素谱峰均具有良好的分辨率 ($\{ \}$ 中的 r 值)。

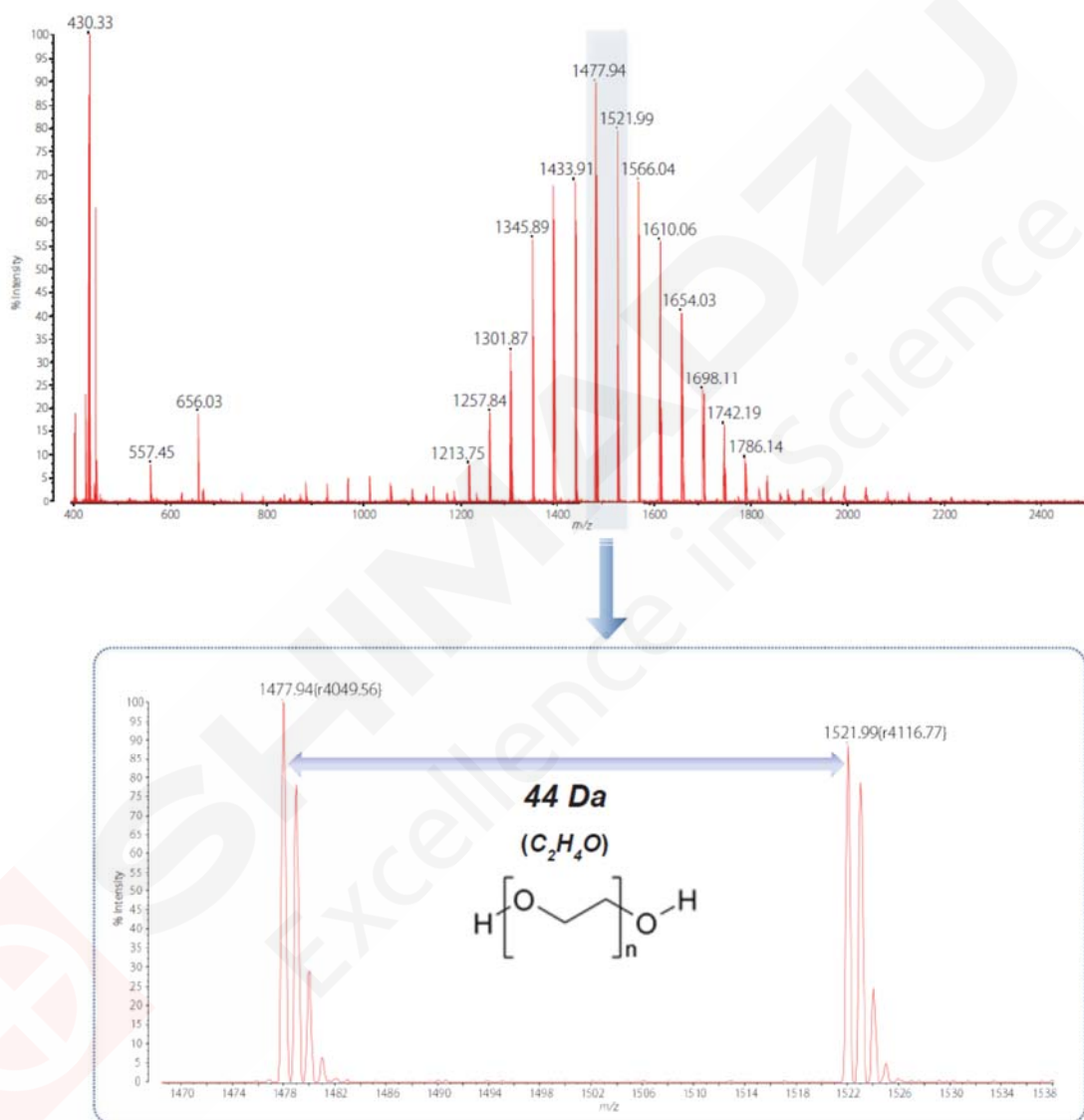


图 3 维生素 E-TPGS 聚合物的钠加合离子质谱图 (上) 和将蓝色覆盖部分局部放大的质谱图 (下)

在维生素 E-TPGS 的钠加合离子质谱图 (图 3) 中检测的两个离子 m/z 430.33 和 557.45 分别与维生素 E (自由基离子) 以及在维生素 E-琥珀酸中加合了 PEG 单元的 $(CH_2)_2$ 部分的离子所示的结构式一致 (如图 4 a 和 b 所示)。

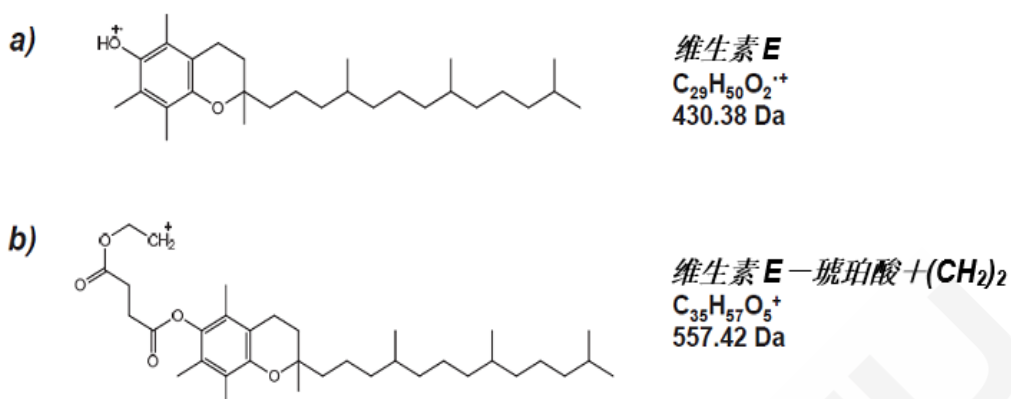


图 4 a) 维生素 E (自由基离子) 的结构式及化学式
 b) 键合了部分 PEG 单元的维生素 E-琥珀酸-的结构式及化学式

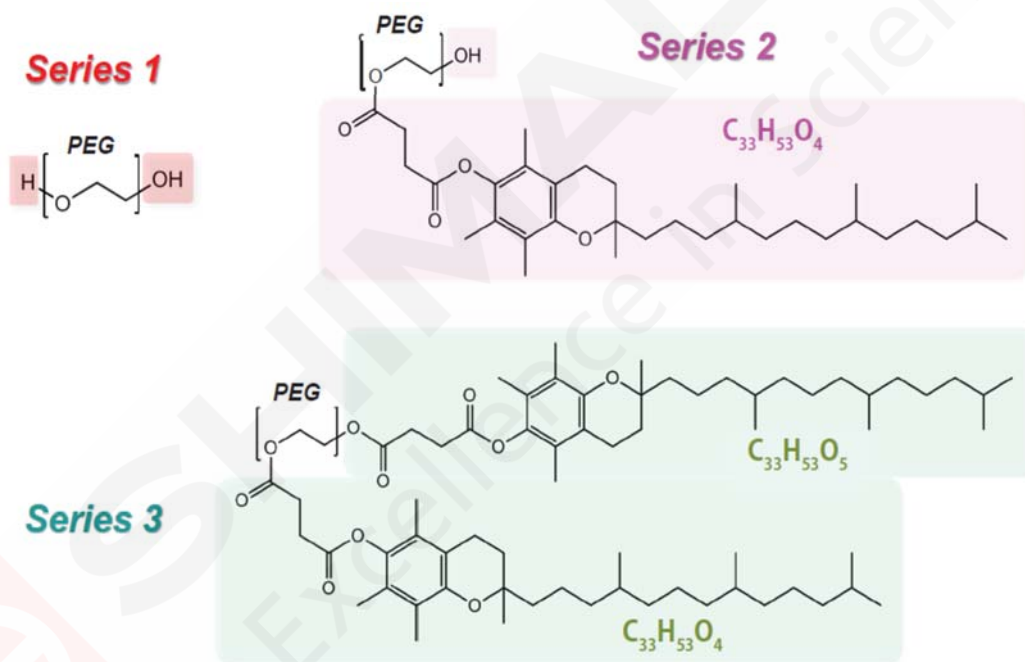


图 5 计算得到的均聚物末端基团的结构式及化学式

使用提供的末端基团进行三个系列 (Series 1~3) 的解析后发现, 计算值与实测值之差 (Excess Mass) 非常小, 所提供的聚合物结构与实际数据充分一致 (图 6)。

	Enabled	Excess Mass	Monoisotopic m/z 1	Monoisotopic m/z 2	Alpha End Group	Repeat	Omega End Group	Charge State	Adduct	Adduct Charge	Loss	Low Mass	High Mass
Series 1	<input checked="" type="checkbox"/>	0.02970	965.5800	1009.6200	OH	C2H4O	H		1 Na	1		1.0	100000.0
Series 2	<input checked="" type="checkbox"/>	0.00314	1477.9400	1521.9900	OH	C2H4O	C33H53O4		1 Na	1		1.0	100000.0
Series 3	<input checked="" type="checkbox"/>	0.04658	1990.3700	2034.3700	C33H53O5	C2H4O	C33H53O4		1 Na	1		1.0	100000.0

图 6 使用 Polymerix 软件进行均聚物解析时的系列定义表

均聚物解析中的赋值图如图 7 所示。匹配的 3 个系列 (Series 1~3) 在质谱图上分别用不同的颜色标注。



图 7 使用 Polymerix 软件分析生成的均聚物的赋值图

MALDI-8020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。

1. 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



图 1. 台式 MALDI-TOF 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

2. 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。

3. 结果与讨论

PEG6000的质谱检测结果如图2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3。

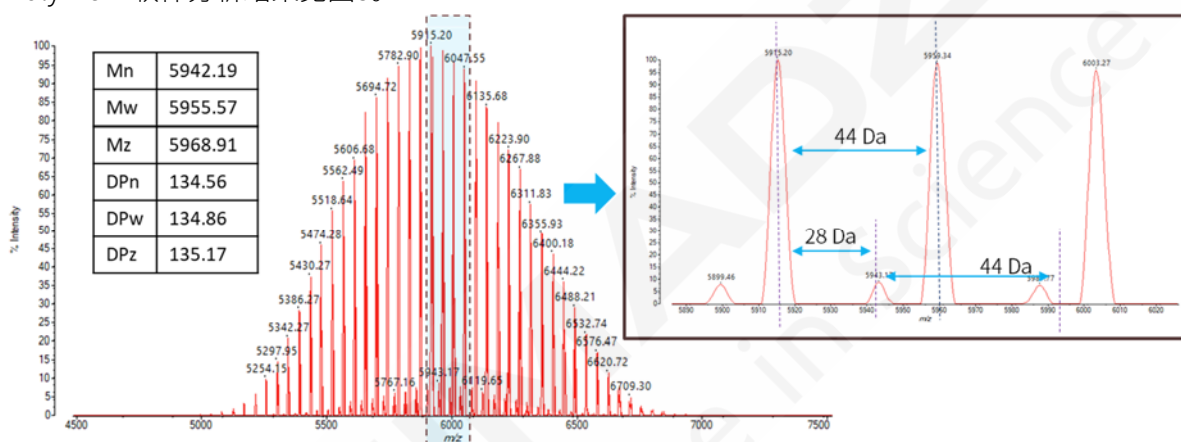


图 2. PEG6000 的一级质谱图

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	1 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	1 H			OH [C2H4O] _n H + H

图 3. Polymerix 软件分析结果

4. 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。

MALDI-8020 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。

1. 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

2. 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。

3. 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-[C₈H₈]-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 CH₃CH₂CH₂CH₂-与 H-。Polymerix 软件分析结果见图 2。

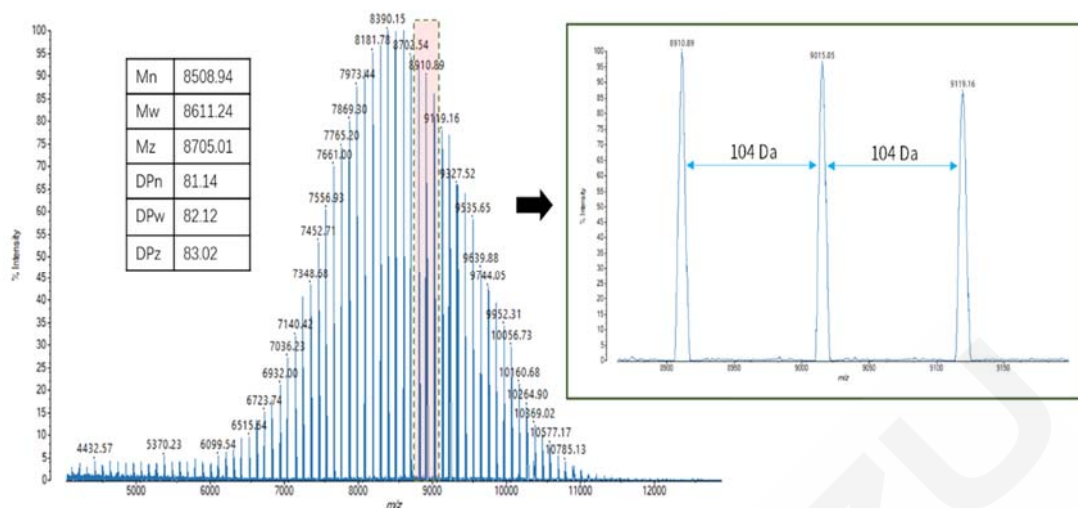


图1. 聚苯乙烯的一级质谱图

Monopolymer 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

4. 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。

MALDI-TOF Performance 分析聚合物

合成高分子材料在日常生活中广泛存在。不论作为家庭用品和食品的容器，或者是用于制造汽车零件和电子设备，塑料制品在我们的日常生活中起着重要作用。

基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-MS)在合成聚合物的分析中变得越来越普遍。美国国家标准与技术研究院(NIST)的 Polymer Division 专注于收集有关聚合物分析方法的信息。Polymer Division 资源之一是收集一系列专门用于 MALDI-TOF 分析的样品制备方法 (<http://polymers.msel.nist.gov/maldir recipes/index.cfm>)、突出了 MALDI 在聚合物分析中的重要性。

“聚合物”一词来自希腊语“很多部分”，用来表示由重复的亚基(“单体”)组成的材料。在合成聚合物中，重复单位相同时(例如： $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$)，该聚合物被称为均聚物。聚合物也可以由不同的单体单元(例如： $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_m (\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_n$)组成，这种情况下被称为共聚物。

聚合物的合成难以精确控制。通常，聚合物样品并不是含正好具有相同数量的单体单位的分子，而是含有在合成期间形成的不同长度的聚合物链。对这种样品进行分析会产生聚合物分析中的典型聚合物分布(图 1)。对于均聚物，聚合物分布中的相邻峰的长度相差一个单体单位。如果峰被充分识别，则可以计算单体单位的质量。当样品含有共聚物时，由于样品中的各种链组成和链长的重叠性，谱图可能变得非常复杂。在这种情况下，能同时处理许多峰并鉴别聚合物种类的聚合物分析工具是必不可少的。

本文介绍了两个聚合物样品的分析结果。图示的示例包括针对均聚物(PEG)和更复杂的共聚物样品而获得的 MALDI 质谱图。实验结果证实聚合物分析软件可用于处理 MALDI 聚合物数据。

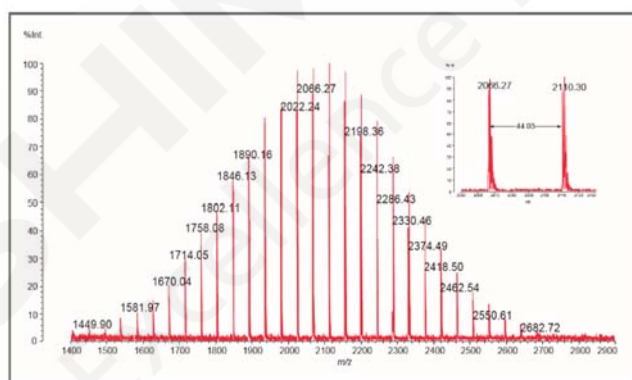


图1:聚乙二醇(PEG)的MALDI-MS质谱图，平均分子量=2000。样品制备中加入了CHCA和NaTFA。

插图：显示了质量范围(2050 -2130 Da)的放大图。相邻峰间的质量差给出了单体单位的质量(PEG, $\Delta M=44.03 (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$)。

■ 方法

PEG 2000 样品:

所有溶液均用等体积的乙腈/0.1% TFA 来配制。聚乙二醇(平均分子量=2000)以 10 mg/mL 的浓度制备。以 10 mg/mL 制备三氟乙酸钠(NaTFA)。将 20 μL PEG 2000 溶液、20 μL NaTFA 溶液与 160 μL 等体积的乙腈/0.1% TFA 混合。

混合等量聚合物样品和基质溶液(α -氰基 4-羟基肉桂酸;5 mg/mL 溶解于 50%乙腈/0.1% TFA 中)，取 1 μL 点在不锈钢靶板上，风干。

EO-PO 样本:

EO-PO 样本由 Day International (伊勒姆, 曼彻斯特 (UK)) 提供并直接使用。将等量样本溶液、基质溶液(地葱酚: 35 mg/mL 溶于 THF)和三氟乙酸钠(10 mg/mL 溶于 THF)混合, 取 1 μ L 点在不锈钢靶板上风干。

样品使用 AXIMA Performance™ MALDI-TOF MS (岛津公司)质谱仪分析。用反射正离子模式。将脉冲提取值 (P.Ext.) 设置为 2000,即针对质量 2000 Da 优化延迟时间。

■ 结果

聚合物分析软件能计算和报告/可视化样品分布信息(多聚物分布分析模式)和识别不同共聚物的组分(共聚物分析模式)。

PEG 2000 的示例 (图 1) 显示了在合成的均聚物样品分析中获得的典型 MALDI 质谱图。相邻的峰相差 1 个单体的质量。通过测量同一系列的相邻峰之间的质量差, 可以获得以单体的质量。在图 1 中, 观察到的质量差为 44.03, 与预期的单体质量一致(calc. = 44.03)。

通过聚合物分析软件(分布分析模式;图 2)对 MALDI 数据分析得到图 3 所示的结果。聚合物分析软件可自动检测单个分布(质量范围 1431-2713 Da), 由软件计算的单体平均分子量为 44.03 与 PEG 单体分子量一致。另外, 软件计算的残基质量(图 3)为 18.0 与端组的 H-和-OH 一致。

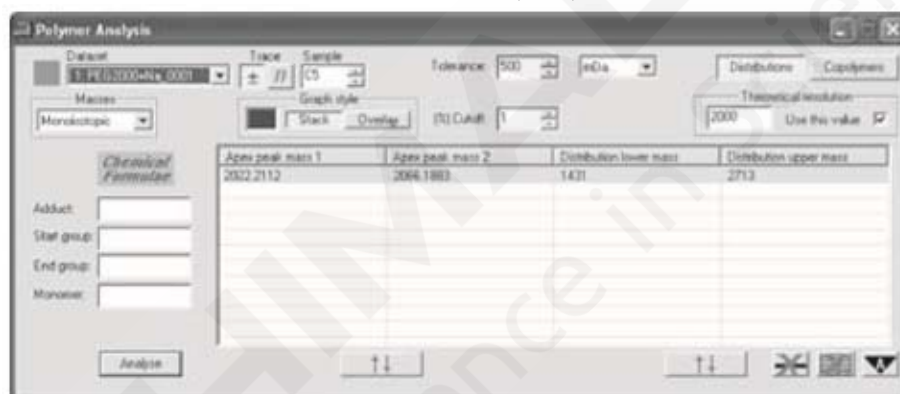


图2:聚合物分析窗口(分布模式)。聚合物分析软件是MALDI-MS AXIMA控制软件的一部分, 需要许可证密钥才能访问此模块。

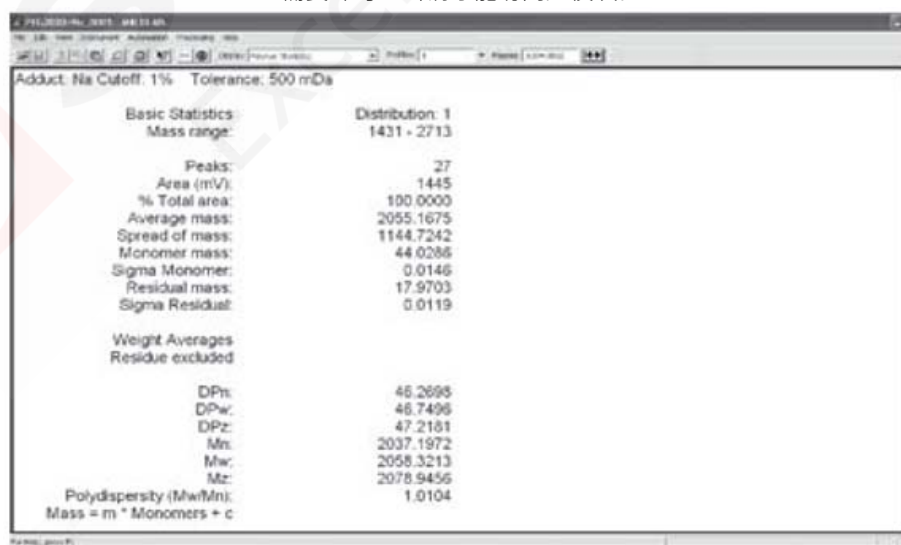


图3:使用聚合物分析软件处理图1所示谱图(分析)后的分布计算结果。

如果已知单体的化学式, 则可以将其与用于制备样品的阳离子/盐一起输入聚合物分析软件,

并用于生成理论聚合物分布。然后将该理论分布与实验获得的 MALDI 谱图(图 4)进行比较

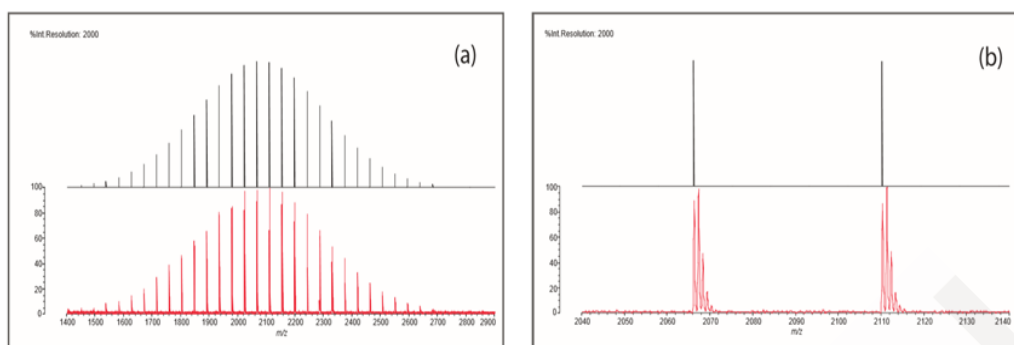


图4:理论数据 (黑色) 和实验谱图 (红色) 的叠加。(a) 质量范围=1400 -2900 Da;
(b) 质量范围=2040-2140 Da。在聚合物中,质量按单同位素峰计算。

图 5 所示的谱图是在更复杂的共聚物样品的分析中获得的。该谱图的放大图 (图 6) 与在均质聚合物样品 (图 1) 中获得的谱图相比,突出显示了谱图的复杂性。谱图复杂性的增加源于样品中存在的不同聚合物链而产生重叠。尝试人工解读此数据是一项艰巨而耗时的任务。然而,使用聚合物分析软件,用共聚物分析模式,可以自动计算不同共聚物组合的分子量,从而简化分析(图 8)。

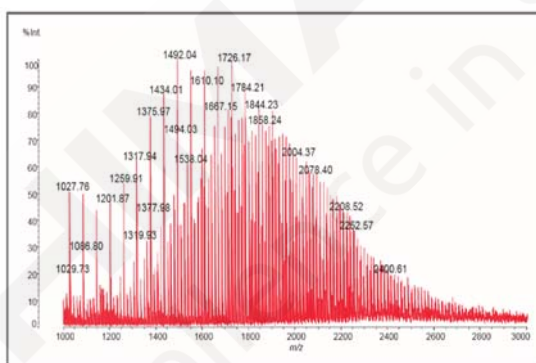


图 5: EO-PO 样本的 MALDI-MS 谱图。样品制备中加入了地菎酚和 NaTFA。

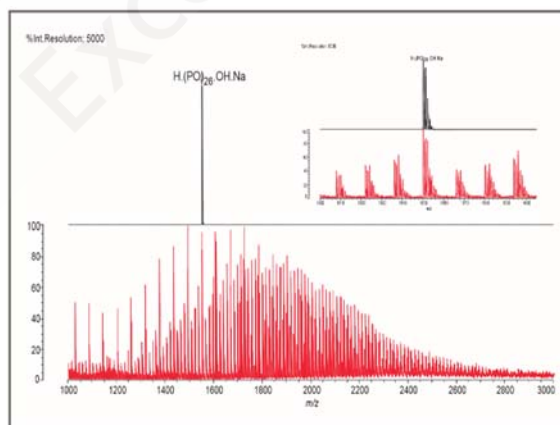


图 6: 共聚物实验样品(红色)的 MALDI 谱图和 H. (PO)₂₆.OH.Na 对应的理论峰图(黑色)。

插图: 显示了图 5 中 MALDI-MS 谱图局部质量范围(1500 -1605 Da)以及 1550 Da 峰处的计算分布。在共聚物计算中,质量按单同位素峰计算。

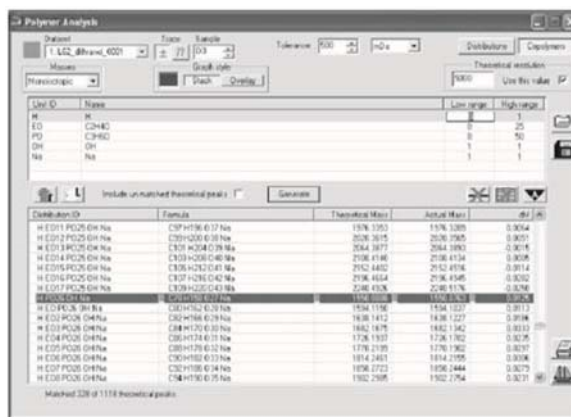


图 7: 聚合物分析软件窗口显示计算分布的 ID, 化学公式, 理论质量, 实际测量质量和在指定值范围内计算的误差(共聚物分析模式)。突出显示的线条对应于图 6 上方的谱图。

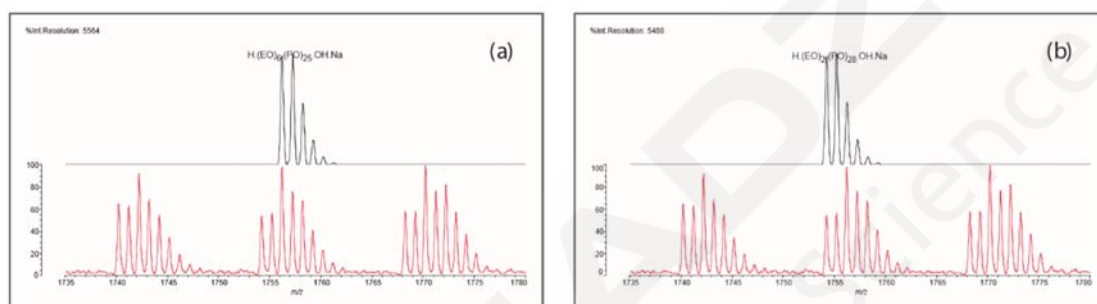


图 8:显示了复杂共聚物样本中重叠峰的分布。红色:共聚物样品的 MALDI 谱图; 黑线: (a)1756.2 Da (H.(EO)₂₅.OH.Na) 的理论分布(b) 1754.2 Da (H.(EO)₂(PO)₂₈.OH.Na)的理论分布

■ 结论

MALDI-TOF 质谱是分析合成聚合物的有用工具。聚合物分析软件, 有助于解读聚合物样品获得的 MALDI 数据。使用该软件, 可以识别共聚物中聚合物的分布, 从而更容易识别属于同一系列的峰和离子。

MALDI-TOF Resonance 分析丙烯酸乙酯聚合物

摘要: 目前, 对于聚合物的解析, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)是一种有力的工具, 它可以给出聚合物的质量分布、单体结构等信息。本文使用岛津 MALDI-TOF-MS, 以 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB) 为基质, 分析一缩二乙二醇与丙烯酸乙酯反应生成的聚合物, 使用岛津专门分析聚合物的 Polymer Analysis 软件, 可以输入预测的聚合物分子式, 得到预测质谱图, 并与实际样品得到的质谱图进行比较, 从而判断聚合物的结构。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF-MS 丙烯酸乙酯聚合物

聚合物在日常生活中普遍存在, 例如, 被用来制造成食物容器或电子器件的组成部分等, 聚合物在人们生活中有着越来越重要的作用。聚合物中重复出现的单元叫做单体, 组成聚合物的单体是同一种的, 则此聚合物叫均聚物; 若聚合物含有 2 种或 2 种以上单体单元, 这类聚合物称做共聚物又称为共聚体。聚合物的合成难于精确地控制, 例如, 很难去控制聚合物中单体的数量, 从而控制链长, 这就需要检测聚合物的质量分布。对于均聚物, 相邻的峰相差一个单体的长度, 若峰能够被充分分开, 则可计算单体的质量。如果包含共聚物, 则复杂程度会大大增加。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)是聚合物分析一种有力的手段, 它可以提供聚合物的质量分布和单体组成等信息。

本文以 DHB (2,5-二羟基苯甲酸) 为基质, 测定了一缩二乙二醇与丙烯酸酯反应生成的聚合物, 并用岛津聚合物分析软件 Polymer Analysis 进行了解析。

1 实验部分

1.1 仪器

AXIMA Resonance

1.2 质谱条件

调谐模式: 反射 正离子模式

扫描范围: m/z 500-5000

激光能量: 130

打点数量: 154

1.3 试剂和样品

2,5-二羟基苯甲酸 (DHB), 聚合物样品为一缩二乙二醇与丙烯酸乙酯反应生成的聚合物。

1.4 实验方法

将样品浓度配制成 5 mg/mL, 取 0.5 L 样品点在 MALDI 靶板上, 然后取 0.5 L 10 mg/mL 的 DHB 基质点在靶板上与样品混合。然后将靶板放入 AXIMA Resonance 中进行检测。

2 结果讨论

检测一缩二乙二醇与丙烯酸乙酯反应生成的聚合物的检测质谱图如图 1 所示。图 1 质谱图的局部放大部分如图 2 所示, 由图 2 可以看出 m/z 值显示两峰之间的质量差为 100 (m/z 983.68 & m/z 1083.75 和 m/z 1183.83), 正符合一个丙烯酸乙酯取代基单体 ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOC}_2\text{H}_5)-$)

的质量。这说明一缩二乙二醇 (HOCH₂CH₂OCH₂CH₂OH) 的 C 上的 H 有被丙烯酸乙酯基所取代生成了丙烯酸酯聚合物。

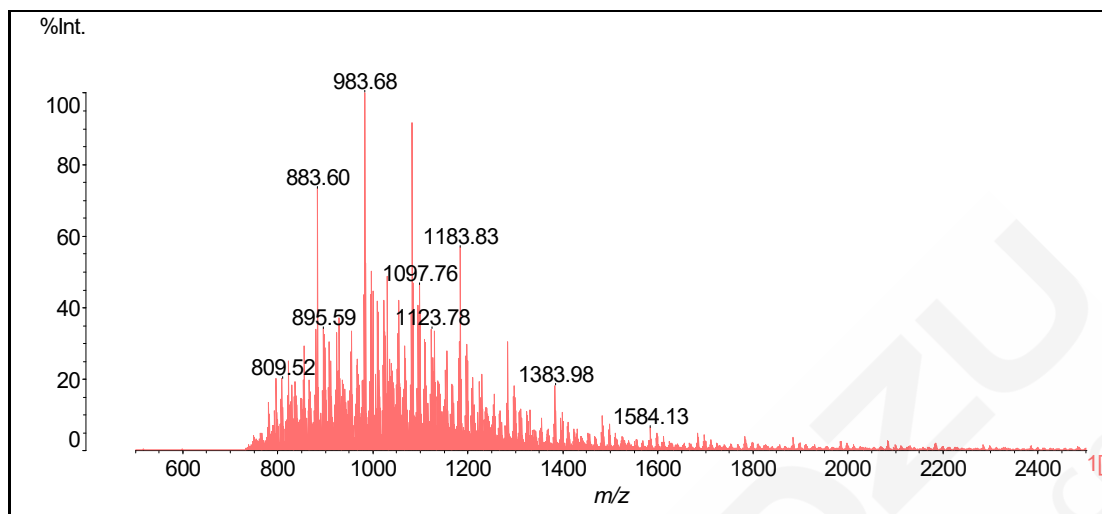


图1 聚合物样品质谱图

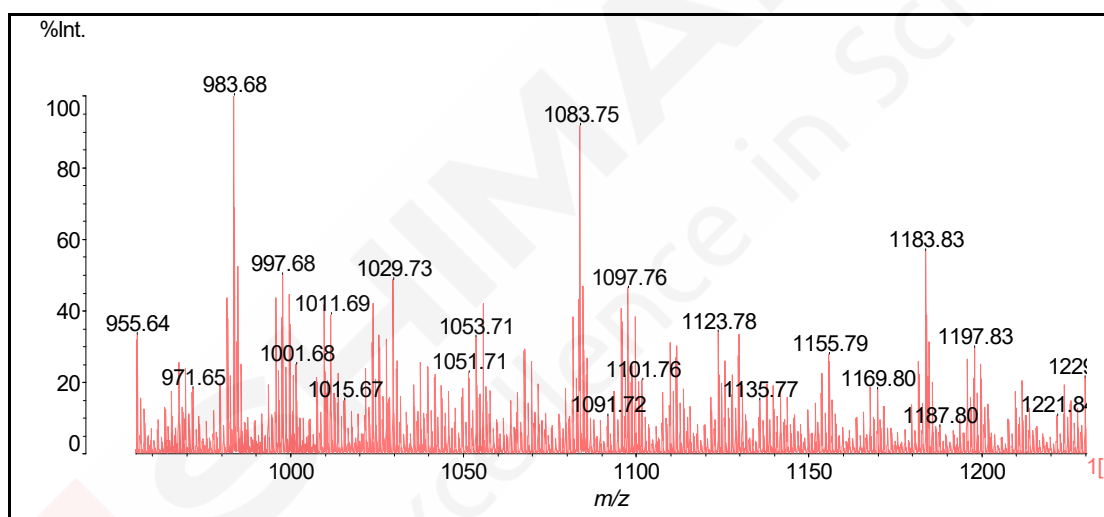


图2 图1的局部放大图

为了进一步分析取代情况及连接的单体数量，应用岛津 Polymer Analysis 软件，可以直接读取 MALDI 所得的数据进行分析。在 Polymer Analysis 软件窗口中可以输入预测的化学式，及含有的单体的数量范围参数。程序执行后，软件会给出预测的一系列化学式的质量数，并自动和得到的质谱图中的质量数进行对比匹配，计算差值及给出分数。在本例中，若一缩二乙二醇 (HOCH₂CH₂OCH₂CH₂OH) 的 C 上的 8 个 H 都被丙烯酸乙酯基 (-CH₂CH (COOC₂H₅)-) 所取代，可能的化学式为 HOC₄OOH_ZnH₈Na，在软件窗口中输入此预测化学式的各个部分，如图 3 中上半部分所示，预测化学式前半部分的 HOC₄OOH 为一缩二乙二醇所有 H 被取代剩下部分，Z 代表丙烯酸乙酯基 (-CH₂CH (COOC₂H₅)-)，n 为含有 n 个单体，n 的范围可先设定 8 到 50 个，H₈ 为最末端的丙烯酸乙酯基连接的 H，Na 为得到的质谱加钠峰。设定完成后，单击“Generate”。得到的匹配上的结果如图 3 中下半部分所示。结果可以清晰地显示取代基的数量及化学式组成。另外，软件也会给出根据预测化学式得到预测质谱图，并可与实际样品质谱图进行叠加比较，如图 4 所示，由图可以看出，预测质谱图与实际质谱图很好的匹配，表明了

预测化学式的正确性。由以上结果可以看出，一缩二乙二醇与丙烯酸乙酯反应得到了一缩二乙二醇 C 上的氢被丙烯酸乙酯基 (-CH₂CH (COOC₂H₅) -) 取代的丙烯酸乙酯聚合物。本例虽然分析的是均聚物，对于共聚物，使用 Polymer Analysis 软件分析遵循同样的分析步骤。在预测化学式时，设定 2 种或 2 种以上单体，然后输入相应单体的数量范围。

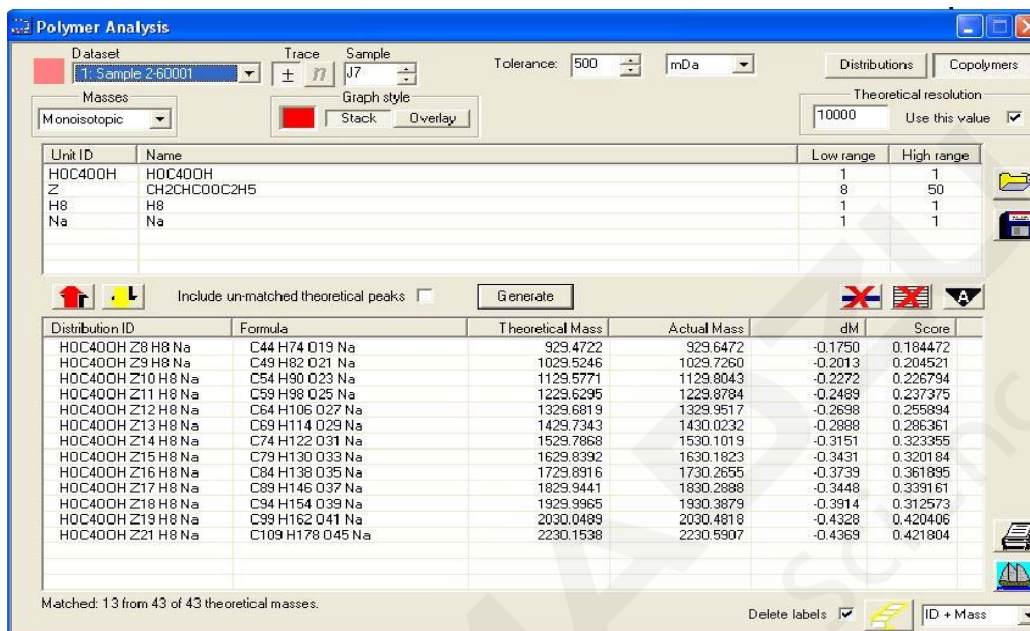


图3 Polymer Analysis软件界面：输入预测化学式及与实际样品质量数的比较结果

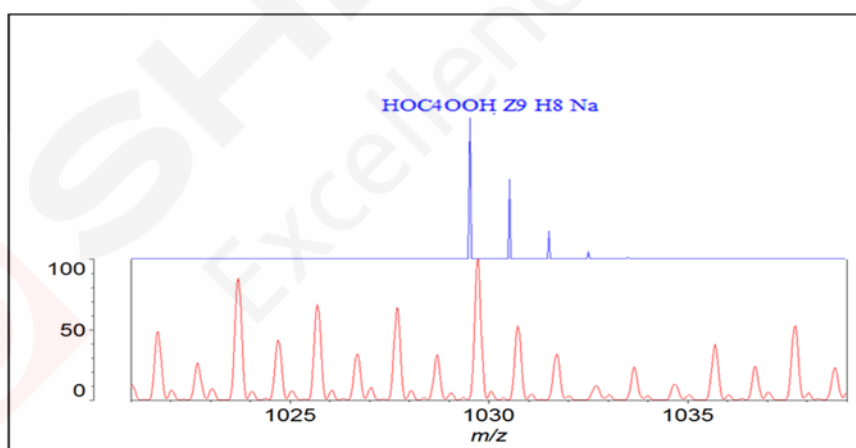


图4 使用 Polymer Analysis 比较预测和实际样品质谱图（上：预测；下：实际样品）

3 结论

本文使用 MALDI-TOF-MS 测定丙烯酸乙酯聚合物，直接得到了样品的分子量的分布、单体质量的信息。利用 Polymer Analysis 软件的质量数和质谱图可以实现预测聚合物的化学式，具有使用简单和分析快速的特点。

MALDI-7090检测PEG23000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 MALDI-7090，以反式-2-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基]丙二腈（DCTB）为基质，分析聚乙二醇 23000（PEG23000），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-7090 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，聚合物的分子量测定及结构分析便是其典型应用之一。岛津的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-7090，具有飞行距离长（线性模式 2.1 米、反射模式 4.1 米）、分析速度快（2000 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。

聚合物是由称为单体的次级单元重复连接而成的分子，由于其物理和化学性质，在医学、药学等各个领域发挥着重要的作用。聚合物的分析可以使用 SEC/GPC 分析、NMR/FT-IR 分光法等的各种分析手法，其中，MALDI-TOF 由于可以快速得到聚合物的分子量分布、多分散性以及端基结构信息，因此，广泛应用于制造业和质量实验室。

PEG 聚乙二醇具有优良的润滑性、保湿性、分散性，是良好的粘接剂、抗静电剂、柔软剂，在化妆品、制药、化纤、橡胶、塑料、农药及食品加工等行业中均有着极为广泛的应用。本文以反式-2-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基]丙二腈（DCTB）为基质，应用 MALDI-7090 及聚合物分析软件 Polymerix (Sierra Analytics) 分析了常用药用辅料聚乙二醇 23000 (PEG23000) 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。

1. 实验部分

1.1 仪器

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-7090



图 1. 岛津 MALDI-7090 质谱仪

1.2 分析条件

调谐模式：反射正离子模式
激光器：355 nm 固态激光器
脉冲引出质量：23000 Da

扫描范围：m/z 10000-40000
激光能量：115-120

2. 样品前处理

取样品加四氢呋喃配制为 10 mg/mL 的样品工作液。取 10 μ L 的样品工作液、10 μ L 的 DCTB 基质溶液 (20 mg/mL)、5 μ L 辅助盐溶液 NaTFA (5 mg/mL) 预混合, 再取 1 μ L 混合液点靶, 自然干燥后将靶板送入质谱分析。

3. 结果与讨论

合理基质的选择等前处理过程是影响 MALDI-TOF 信号表现的主要方面。本实验过程中使用聚合物分析常用基质 CHCA、Dithranol、THAP 等进行测试, 结果表现为样品离子化效果较差而致无明显目标信号。经过多次筛选, 最后选定 DCTB 基质, 质谱图信号良好。

PEG23000 的质谱检测结果如图 2 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 $\text{CH}_3\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}_2$ 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。Polymerix 软件分析结果见表 1。

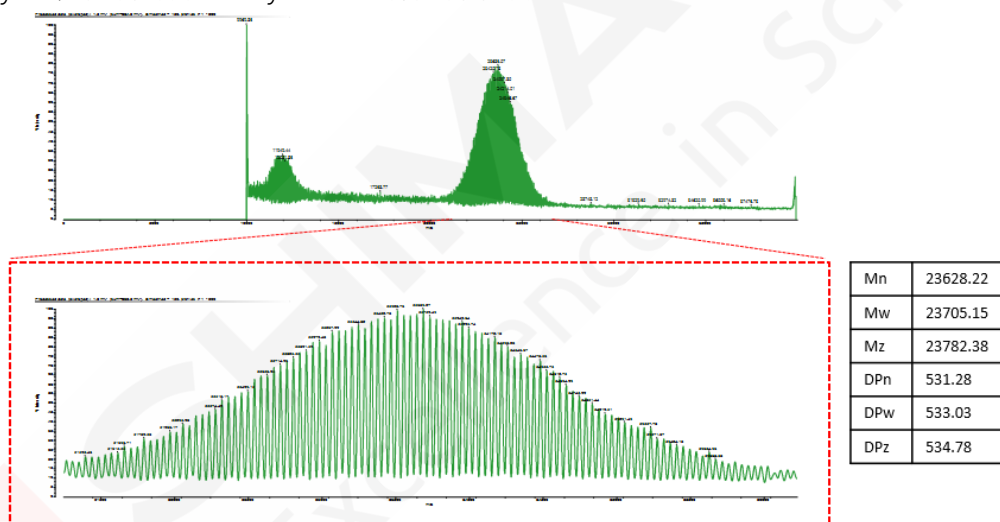


图 2. PEG23000 样品一级质谱图 (上: m/z 10000-40000; 下: 局部放大 m/z 21000-26000)

表 1 Polymerix 软件分析结果

参 数	M _n	M _w	M _z	PD	DP _n	DP _w	DP _z	Repeat	Adduct	Series Formula
结 果	23628.22	23705.15	23782.38	1.003	531.28	533.03	534.78	C ₂ H ₄ O	Na	CH ₃ O(C ₂ H ₄ O) _n C ₁₀ H ₁₁ O ₃ N ₂

4. 结论

本文应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-7090 分析 PEG23000, 直接得到了样品的分子量分布、单体质量的信息。MALDI-7090 作为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱, 具有飞行距离长、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。

第六节 其他拓展应用

MALDI-TOF 作为常见的生物质谱，除前几节介绍的蛋白多肽鉴定、糖和糖蛋白分析、核酸和脂类检测、微生物鉴定、聚合物分析等，在其他领域也有广泛应用。比如动物毛发检测，食用橄榄油掺假，牛奶品种鉴别，小分子药物检测，质谱成像等。

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。

羊绒羊毛衫是常见的动物制品，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 标准国标化的工作，后续岛津公司也会参与该标准的验证工作。

橄榄油营养丰富，富含单不饱和脂肪酸，被认为是迄今所发现的油脂中最适合人体营养的食用油，被称为“液体黄金”。由于橄榄油价格相对较贵，一些不法企业为获取不当利益，在橄榄油中掺入大豆油、玉米油、葵花籽油等低价油进行销售，损害了消费者的利益。传统分析食用油的方法有 PCR、色谱、光谱、核磁共振、MALDI-TOF-MS 等。在这些方法中，MALDI-TOF-MS 因其操作简便、分析通量高、灵敏度高而具有显著优势。

为了讨论疾病的原因及进展情况，在明确病变组织的基础上，搞清病变组织中存在的分子数量变化及分布。根据 LC-MS 或 GC-MS 进行的代谢分析可有效获得代谢产物及脂质定量变化，但由于分析方法的性质，无法知道什么分子在病变组织的什么位置。因此，很难看到病理发展中出现的分子分布变化。近年来，MALDI-TOF 质谱成像分析成为解决这一问题的方法。

分子成像是是指在组织水平、细胞及亚细胞水平对特定分子信息的成像，即用影像学方法反映分子水平的变化，对活体特征及生物进程成像。分子成像通常包括两个方面，即体内分子成像和体外分子成像。常见的体内分子成像技术有：PET、CT、MRI、生物发光成像、荧光成像等。

体外分子成像中，MALDI-TOF 质谱成像不限于特异的一种或几种蛋白质分子，可在组织切片中找到每一种蛋白质分子或药物小分子，并提供这些蛋白质分子或药物小分子在组织中的空间分布的精确信息，同时可对这些蛋白质分子或药物小分子含量进行相对定量。通过所获得的潜在生物标志物的空间分布信息，来进行生物标志物的发现和化合物的监控，用于组织病理特征、疾病诊断、药物疗效控制及寻找生物标志物等。

MALDI-8020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。

1. 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

2. 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，切割蛋白质条带经洗涤液（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。

3. 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。

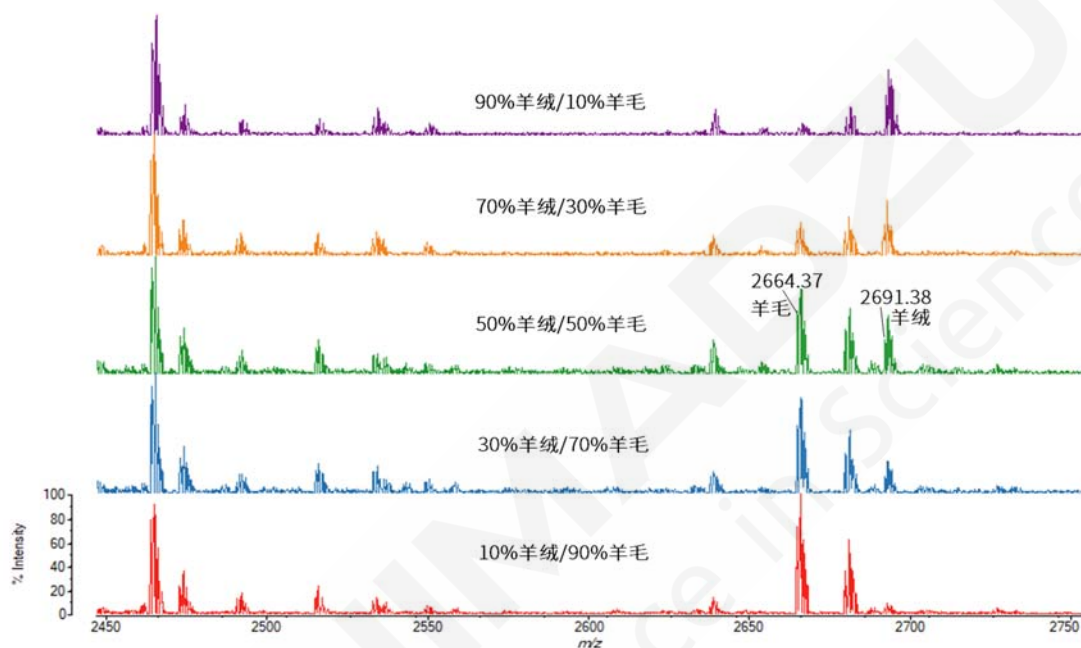


图 1. 羊绒羊毛混合标准品酶解产物一级质谱图

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 ^Q VQSLIVNVESQLAEIR	2691.38
羊毛 (绵羊)	Keratin 33B [Ovis aries]	YSC*QLS ^Q VQSLIVNVESQLAEIR	2664.37

注：*代表C上发生烷基化修饰

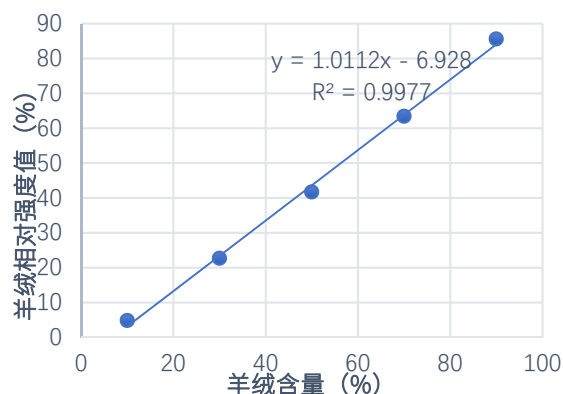


图2. 羊绒、羊毛混合物中羊绒含量的校准曲线

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

4. 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。

MALDI-8020用于食用橄榄油掺假鉴别

摘要: 本文以 DHB (2,5-二羟基苯甲酸) 为基质, 在橄榄油中分别掺入不同比例的大豆油、玉米油、葵花籽油, 配制为掺假橄榄油, 应用岛津台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 进行质谱分析, 通过多元变量统计分析软件 Simca 对检测结果进行主成分分析 (PCA), 成功实现了掺假橄榄油的鉴别。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 食用油 橄榄油 掺假

橄榄油营养丰富, 富含单不饱和脂肪酸, 被认为是迄今所发现的油脂中最适合人体营养的食用油, 被称为“液体黄金”。由于橄榄油价格相对较贵, 一些不法企业为获取不当利益, 在橄榄油中掺入大豆油、玉米油、葵花籽油等低价油进行销售, 损害了消费者的利益。传统分析食用油的方法有 PCR、色谱、光谱、核磁共振、MALDI-TOF-MS 等。在这些方法中, MALDI-TOF-MS 因其操作简便、分析通量高、灵敏度高而具有显著优势。在本研究中, 我们在三种不同品牌的橄榄油中分别掺入三种不同品牌的大豆油, 使成为混合体积分别为 8:2 和 1:1 的掺假橄榄油, 使用台式线性 MALDI-TOF 进行质谱分析, 并利用多元变量统计分析软件 Simca 对采集到的质谱信号进行主成分分析 (PCA), 成功实现了橄榄油掺入大豆油的掺假鉴别。利用相同的分析方法, 亦成功实现了橄榄油掺入玉米油、葵花籽油以及同时掺入三种低价食用油的掺假鉴别。以上结果表明, 应用台式线性 MALDI-8020 可以有效进行橄榄油的掺假鉴别。

1. 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 500-2000
激光能量: 85

2. 样品前处理

于超市分别购买三种不同品牌的橄榄油、大豆油、玉米油、葵花籽油, 用于配制掺假橄榄油。分别配制掺入 20%、50%大豆油、玉米油、葵花籽油的橄榄油样品, 并将四类食用油等比例混合制作为同时掺入三种低价食用油的掺假橄榄油样品, 以上样品作为质谱分析的样本。将 DHB 基质溶于四氢呋喃, 配成 40 mg/ml 的基质溶液。吸取 1 μ L 基质溶液点靶, 干燥后用医用棉签沾取少量食用油样品, 涂抹在基质结晶层上。每个样品涂抹三个靶点, 每种

样品共计涂抹 9 个靶点，涂抹完成后将靶板送入质谱进行分析。

3. 结果与讨论

食用油的主要成分为各类脂肪酸，以 DHB 为基质，应用 MALDI-TOF 进行质谱检测，可知食用油的质谱信号峰主要集中在 m/z 550-650, 850-950 之间（见图 1），对应了食用油中二酰基甘油(DAGs)样碎片和三酰基甘油钠加合物的分布。但由于不同种类的食用油所含脂肪酸的来源、种类、比例有所不同，将质谱图进行局部放大，可以看到橄榄油与大豆油、玉米油、葵花籽油的图谱存在显著差异（见图 2），每类油主要信号峰的分布及信号强度有所不同。例如，橄榄油峰数量相对较少，在 m/z 850-950 区间， m/z 881.7、907.7 具有较高信号强度，并且 m/z 855.7 的信号强度高于 m/z 853.7；大豆油、玉米油、葵花籽油与橄榄油相比，信号峰的数量明显增多， m/z 877.7、879.7、901.7、903.7 等具有较高信号强度， m/z 855.7 的信号强度低于 m/z 853.7。此外，大豆油在 m/z 875.7、899.7 处具有特征峰，葵花籽油中 m/z 853-856、877-885 两个信号峰簇的信号强度相对较低。

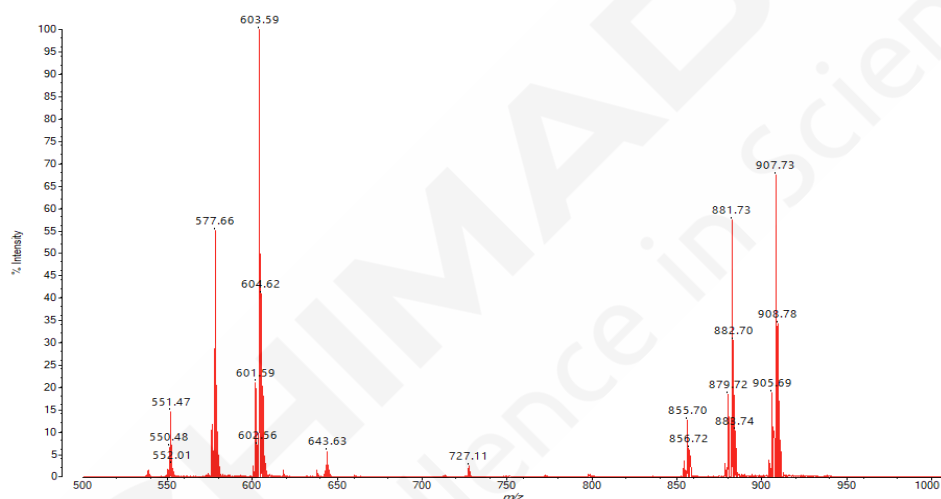


图 1. 食用油一级质谱图示例（橄榄油）

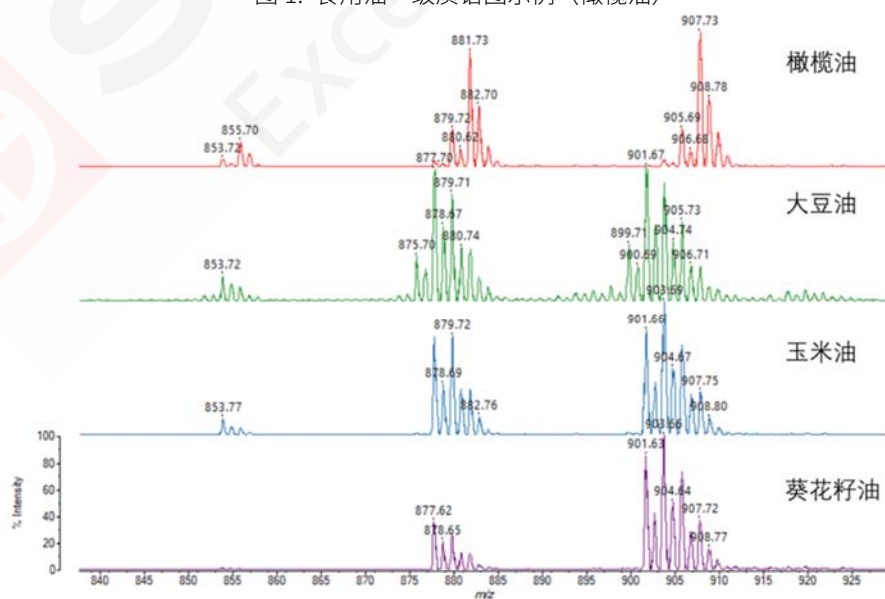
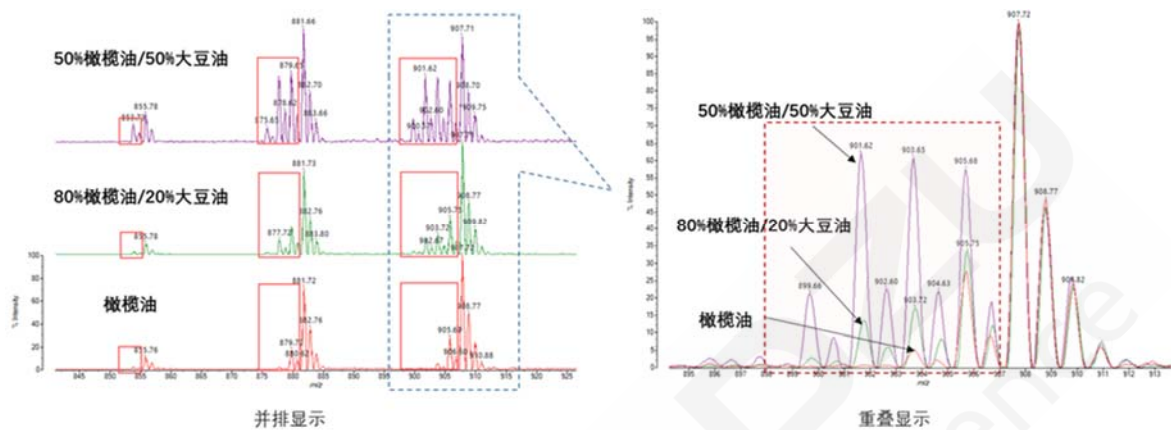


图 2. 橄榄油、大豆油玉米油以及葵花籽油的一级质谱局部放大图示例 (m/z 840-925)

由于橄榄油与其他种类食用油的质谱图中信号峰的分布存在明显差异, 当橄榄油中掺入低价食用油后, 质谱峰的分布及信号强度相应发生变化, 掺入比例越高, 变化越显著(图 3)。以掺入大豆油为例(图 3), 当在橄榄油中掺入 20%大豆油后, 在 m/z 901.7 处出现比较明显的信号峰, m/z 903.7 的信号强度显著增高; 当掺入 50%的大豆油后, 除 m/z 901.7、903.7 的相对信号强度明显增强外, 还可以观察到显著的大豆油的特征峰 m/z 875.7、899.7。



与纯橄榄油的质谱结果主成分分析图谱;D. 同时掺入大豆油、玉米油、葵花籽油的橄榄油与纯橄榄油的质谱结果主成分分析图谱。

当橄榄油中分别掺入 20%、50%的玉米油以及葵花籽油后，应用与掺入大豆油相同的分析方法，同样可以实现掺入不同比例玉米油的橄榄油的鉴别以及掺入不同比例葵花籽油的橄榄油的鉴别（见图 4B、4C）。

考虑到市场上橄榄油掺假可能不止掺入一种低价食用油，而是可能同时掺入 2-3 种低价油，我们在橄榄油中同时掺入了大豆油、玉米油、葵花籽油，配制为四类食用油的等比例混合油，应用相同的方法进行分析，主成分分析结果见图 4D。由图可知，掺入多种食用油的橄榄油与纯橄榄油完全聚为了两类，这说明应用该方法可以有效进行掺入多种低价食用油的橄榄油的鉴别。

4. 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 检测分别掺入不同比例的大豆油、玉米油、葵花籽油的橄榄油样品，通过质谱检测结果的统计分析，成功实现了橄榄油的掺假鉴别。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、分析速度快、仪器维护方便，性能卓越，是食用油分析的有力工具。

MALDI-8020 自动分析急性肾损伤

急性肾损伤 (AKI) 是指肾脏突然受损, 导致其正常功能受损 (表 1)。由于肾脏是人体排泄废物的主要器官, 在缺乏早期发现和干预的情况下, 这可能是一种严重的临床症状。

一些医院患者临床组, 尤其是髌部骨折的患者, 在治疗过程中被确定为 AKI 的高危人群。也与长期死亡率相关, 每年给英国国家卫生服务局带来 4.34 亿至 6.2 亿英镑的财政负担。这些都表明有必要对 AKI 进行监测和早期预测。

为了满足这一需求, 正在进行一项方法转移研究, 利用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 筛选 AKI 生物标记物。这将利用与该技术相关的典型优点, 包括快速分析、样品制备简单、空间要求小、灵敏度高和质量准确度高。因此, 与包括 ELISA 和 CE-MS 的现代 AKI 分析方法相比, MALDI-TOF MS 方法更合适。

在这篇文章中, 我们提供了一个使用 MALDI-8020 质谱仪对重症监护病房有 AKI 风险的患者的尿样进行分析的例子。SampleStation™ 和 AuraSolution™ 软件控制的无缝工作流程实现了具有数据安全性和样本可追溯性的自动化分析, 所有这些对于临床分析都很重要。

表 1 AKI 的病因学分类及实例

肾前性	低血压、肾栓塞致肾低灌注
肾	药物(止痛药、抗生素)、肾小球肾炎、静脉造影剂致肾实质疾病
肾后性	结石、肿瘤、前列腺肿大、手术、放疗等引起输尿管、膀胱或尿道流出道梗阻

■ 样品和方法

格拉斯哥大学 (英国) 心血管与医学科学研究所的 Bill Mullen 教授提供了稀释的尿液样本 (SEC 脱盐后)。样品在 MALDI-8020 仪器上用 SampleStation 和 AuraSolution 软件进行分析, 流程如下: 样品 (0.5 μ L) 与等体积的 MALDI 基质 (α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA), 5 mg/mL, 溶于等体积的乙腈/0.1% (aq.) TFA) 点样, 并在带有条形码的一次性 MALDI 导电靶板 (FlexiMass-DS (岛津)) 上干燥。表 2 总结了 MALDI-MS 分析时的采集参数。

表 2 MALDI-TOF 质谱数据采集参数

模式	线性
极性	正离子
扫描范围	400-2500 Da
最大激光频率	200 Hz
累记轰击次数 (次数/每张谱图)	50
单个样品采集谱图数	100
采样时激光移动路径	Raster

SampleStation 和 AuraSolution 是 Kratos Analytical 公司的商标。

■ 结果

图 1 显示了使用 SampleStation 和 AuraSolution 软件进行自动 MALDI-MS 分析的简单工作流程。

图 2 显示了尿液中 AKI 生物标记物的 MALDI-MS 的示例质谱图结果。肽段的高分辨率同位素峰显示了仪器杰出的线性模式分辨率。

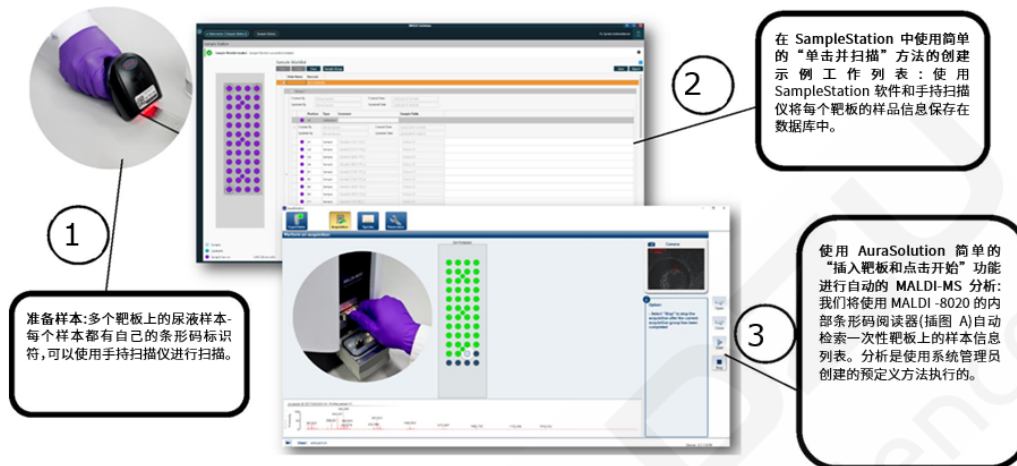


图 1 步骤 (1-3) 的工作流程, 用于使用 SampleStation 和 AuraSolution 软件对尿液样本进行自动 MALDI-TOF MS 分析, 以进行 AKI 筛查。注意: 在采集数据 (3) 的同时, 可以同时从其他靶板上 (2) 中创建更多的工作列表, 而不会中断正在进行的采集。已经获得的工作列表被无缝地更新 (如上面示例屏幕截图中紫色部分所示)。插图 A: 内部条形码阅读器。

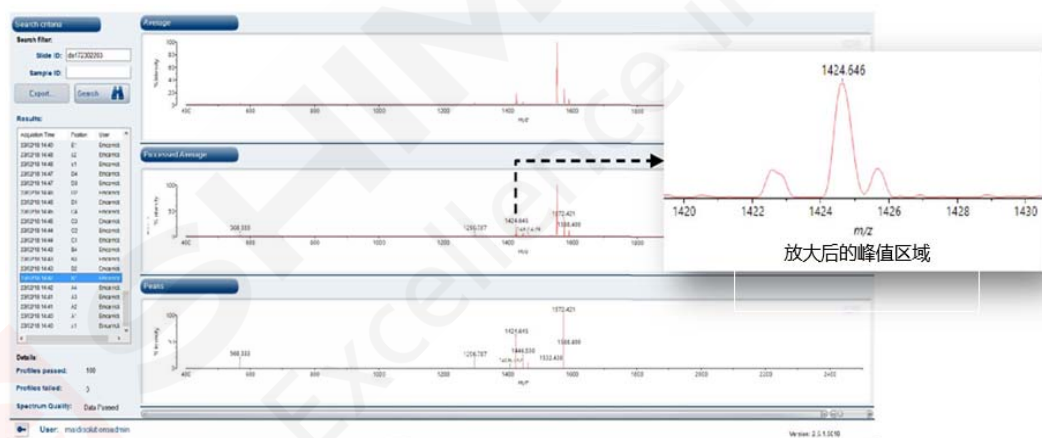


图 2 用于 MALDI-TOF MS 分析 AKI 样品结果的 AuraSolution 软件截图: 在本例中, 可以看到 AKI 生物标记物 (m/z 1424.67)。放大后的质谱区域显示线性模式下的同位素分辨率 (插图)。

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B082 应用报告。

MALDI-TOF iD^{Plus} 系统分析牛奶和乳制品

iD^{Plus}TM 是一个基于 MALDI-TOF MS 建立的微生物鉴定平台，但它远不局限于此应用。与 iD^{Plus} 相关的开放数据库的灵活性允许使用该平台进行分子分析实验，并根据其特征对相关样本进行区分。新的定制样本特定条目（超级谱图）可以添加到现有的微生物数据库中，以创建与特定研究领域相关的子数据库。这在细胞系鉴定、昆虫学、浮游动物研究、鱼类物种形成和食源性细菌研究等领域都有报道。

乳制品掺假是食品工业中的一个重要问题。检测欺诈性地将牛奶添加到其他更昂贵的奶制品中，如山羊奶或绵羊奶的方法，对于根除出于经济动机的牛奶掺假是很重要的。然而，这种非法行为不仅局限于牛奶生产：乳品工业的其他领域，如奶酪制造也成为目标。

例如：受欧洲保护的原产地指定（PDO）立法保护了来自意大利坎帕尼亚地区（mozzarella di Bufala Campana）的备受追捧的水牛干酪。虽然干酪可以用牛奶制作，但它不会获得 PDO 认证，而且是一种非常便宜的产品。这导致了广泛的欺诈行为，试图将奶牛干酪虚假替代水牛干酪。2010 年，意大利农业部对坎帕尼亚地区进行 PDO 保护检查时发现，至少 25% 的水牛干酪含有奶牛干酪。

本研究证明了 iD^{Plus} 系统在快速区分乳制品和识别欺诈行为方面的有效性。使用来自几种不同物种的牛奶的质谱图分析证明了该技术的原理。建立的方法应用于使用 mozzarella 干酪作为模型产品的食品认证。

■ 超级谱图的概念

SuperSpectra 是 iD^{Plus} 数据库中的数据库条目（SARAMISTM），代表一个物种或样本的典型谱图。它们是根据从给定样品中获得的多个质谱图（参考谱图）计算得来的，这些质谱图被合并成一个按谱峰的特异性加权的一致性谱图。加权算法凸显了样本特异的峰值的权重，降低了共同特征峰值的权重，从而进一步提高了数据库匹配时的可信度。图 1 说明了用于创建超级谱图的过程。

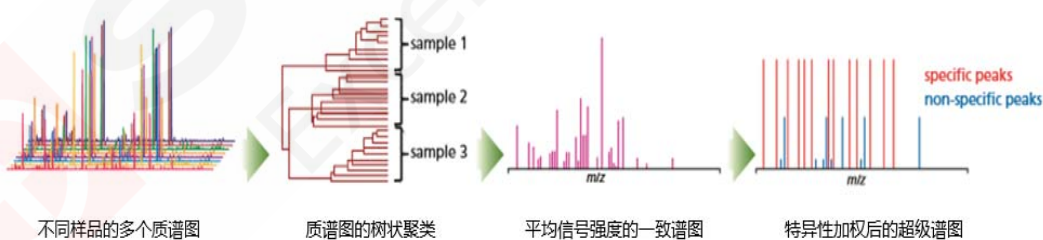


图 1 超级谱图的创建流程

■ 实验

三种牛奶（牛、水牛和山羊）和两种 mozzarella 奶酪（牛和水牛）来自不同来源（表 1）。获取多个参考谱图，并将其组合成每个乳制品的特征超级谱图，以构成定制的乳制品特定数据库。

简单地说，每个牛奶样品被稀释 10 倍于 0.1% 的 TFA 水溶液中。然后将 1 μ L 该溶液点样到靶板上，放置至接近干燥状态后，添加 1 μ L 的 CHCA 基质。对于 mozzarella 样品，少量的奶酪直接使用接种环涂布在 FlexiMass DS 上，再添加 1 μ L CHCA 基质。在 2000-20000 Da 范围内采集质谱图。

表 1 牛奶和马苏里拉干酪样品汇总

Product Name	Product Type	Species
Tesco Semi-skimmed	Milk	Cow
Tesco Pure Filtered Semi-skimmed	Milk	Cow
Tesco Jersey & Guernsey Cow	Milk	Cow
Delamere Sterilized Whole	Milk	Cow
Laverstock Park Semi-skimmed	Milk	Buffalo
Laverstock Park Whole	Milk	Buffalo
St Helen's Farm Semi-skimmed	Milk	Goat
Galbani	Mozzarella	Cow
Waitrose Italian	Mozzarella	Cow
Cantile	Mozzarella	Buffalo
Laverstock Park	Mozzarella	Buffalo
Garofalo	Mozzarella	Buffalo

■ 结果

原理证明

分析不同类型的奶（奶牛、山羊和水牛），产生了高度分类特异性的质谱图，表现出许多物种特有的质谱峰。图 2 突出显示了这些质谱图之间的差异。

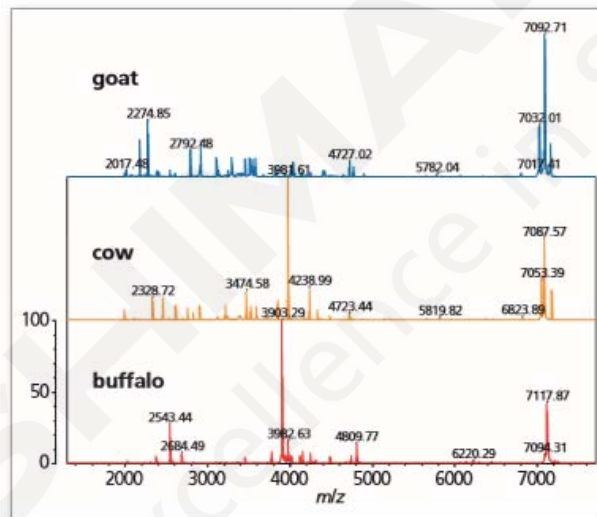


图 2 iDplus 采集的山羊奶、奶牛奶和水牛奶质谱图

对另外的奶牛奶、水牛奶和羊奶样品进行了分析和处理，以进行聚类分析。获得的树状图结果证实了不同奶样品的有效区分（图 3）。

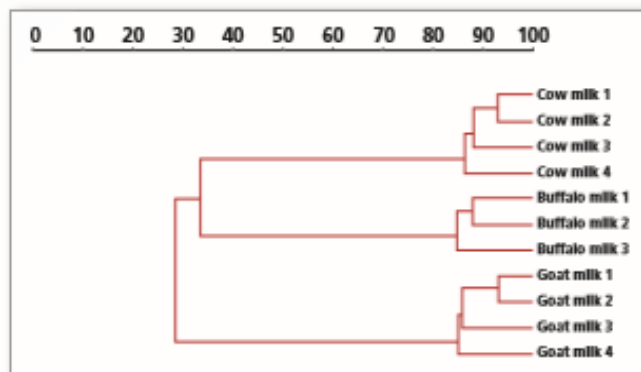


图 3 奶牛奶、水牛奶和山羊奶的聚类分析

食品掺假检测

与奶类似，不同类型的 mozzarella 干酪产生了可区分的质谱分布图，显示出许多特定于产品的质谱峰（图 4）。

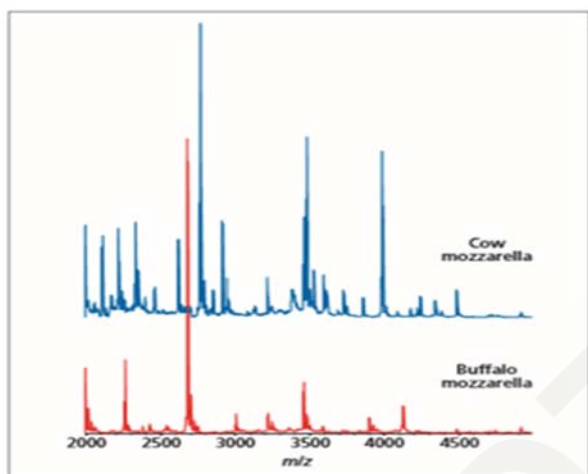


图 4 奶牛、水牛干酪的 iD^{plus} 质谱图

为了模拟 mozzarella 干酪的掺假，将坎帕尼亚地区的奶牛干酪与水牛干酪混合，并用与之前相同的方式制备。图 5 显示了掺假样品的质量分布图，清楚地显示了来源于两种干酪样品的质谱信号。

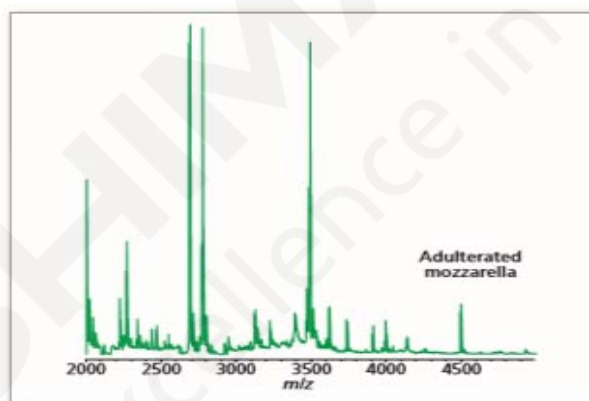


图 5 掺假 mozzarella 干酪的 iD^{plus} 质谱图

当提交掺假的 mozzarella 样本结果以搜索自定义乳制品数据库时，未实现明显的识别（图 6 中标记为红色的结果）。对详细结果的进一步检查表明，该样本与数据库中的奶牛和水牛干酪同时匹配，这清楚地表明样本是掺假的（图 6）。



图 6 掺假 mozzarella 干酪检索确认结果

进一步分析了掺假 mozzarella 干酪样品。结果的聚类分析清楚地显示了三个不同的群体：水牛干酪、奶牛干酪和掺假干酪（水牛和奶牛干酪的混合物），证实了 iD^{plus} 系统可以应用于乳制品掺假检测（图 7）。

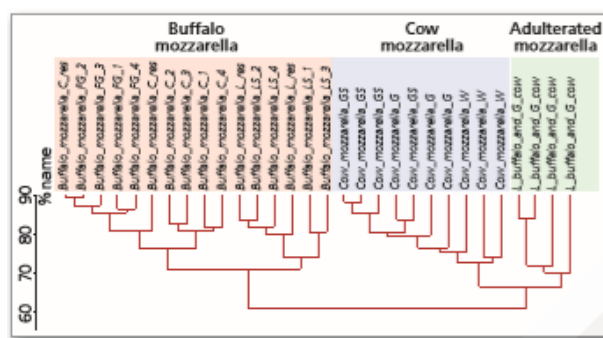


图 7 奶牛、水牛、掺假干酪的聚类分析

■ 结论

食品掺假是业内普遍存在的问题。它既包括对产品的虚假陈述，也包括故意用较少的成分进行掺假。结果表明，该方法能有效地检测乳制品中的掺假。定制数据库的构建非常简单，由于使用了获得专利的超级谱图概念，因此提供了非常高的可信度，而聚类分析工具提供了所获得结果的简单图形表示。iD^{plus} 是一个简单高效的食品掺假检测和真伪筛选的理想平台。

MALDI-7090 进行鼠肝脏组织切片的质谱成像

为了讨论疾病的原因及进展情况，在明确病变组织的基础上，搞清病变组织中存在的分子数量变化及分布。根据 LC-MS 或 GC-MS 进行的代谢分析可有效获得代谢产物及脂质定量变化，但由于分析方法的性质，无法知道什么分子在病变组织的什么位置。因此，很难看到病理发展中出现的分子分布变化。近年来，MS 成像分析成为解决这一问题的方法。此次将要介绍的实验对象为患有非酒精性脂肪肝炎 (NASH) 实验鼠的肝脏，MS 成像分析与 LC-MS 或 GC-MS 的数据组合起来解析疾病状态中的分子动态。

■ 质谱成像样本制备

有些非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 发展后会变化为非酒精性脂肪肝炎 (NASH)，也有些会发展为肝硬化以及肝细胞癌。通过 LC-MS 及 GC-MS 对肝脏内的生化物质进行定量分析，事先检测代谢物的变化。本实验中使用 MALDI-7090 进行质谱成像，分析观察了病理结果与分子分布之间的关系 (图 1)。

让实验鼠摄取高脂肪食物或者正常的食物，第 4 周、第 8 周、以及第 16 周取出实验鼠的肝脏制作干燥切片。对肝脏切片进行病理学染色 (偶氮卡红染色)，作为病理结果观察用的样本。将摄取高脂肪食物的鼠群和摄取正常食物的鼠群各个染色切片放在同一 ITO 涂层玻璃载玻片上，利用质谱成像分析比较切片间的信号强度。

利用基质气相沉积系统 iMLayer™，蒸镀基质后进行再结晶化处理，随后进行测定。

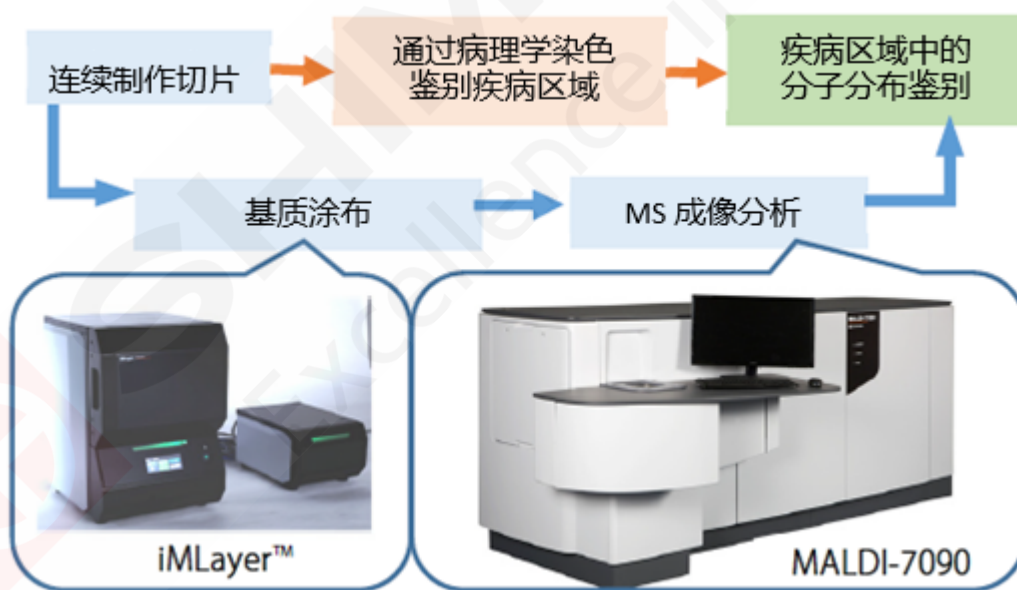


图 1 MALDI-7090 质谱成像的分析流程

■ 纤维化组织中分子分布的可视化

对实验鼠肝脏的切片的纤维化组织进行偶氮卡红染色，将其染成蓝色。与摄取正常食物的实验鼠的肝脏相比，摄取高脂肪食物的实验鼠在投食后 8 周、16 周肝脏的纤维化组织呈现增加状态。(图 2 左; 蓝色部分)

随后，通过 MALDI-7090 进行成像分析，比较偶氮卡红染色切片。分析成像的目标分子作为从 LCMS 或 GC-MS 定量解析的代谢物数据中选出的脂质 m/z 833.58 和 m/z 788.54，

二者叠加后如图 2 右侧所示。观察两个目标分子的分布后，摄取正常食物的实验鼠的肝脏组织中只存在 m/z 833.58。由此可知，摄取高脂肪食物的鼠群由于 NAFLD 发展为 NASH，纤维化区域中存在很多 m/z 788.54。

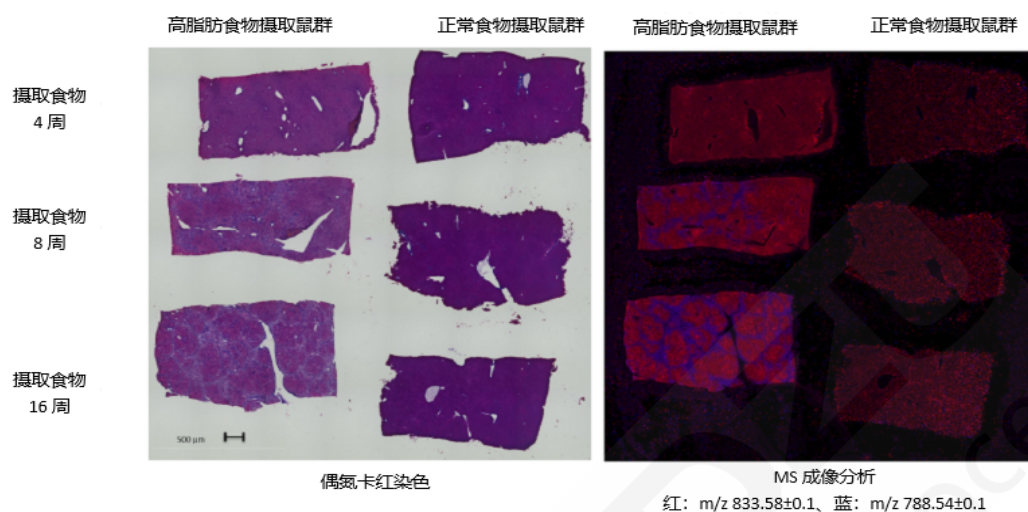


图 2 正常组织及病变组织中的目标分子分布差异

■ 胆汁酸的成像分析

之前在非酒精性脂肪性肝病样本制备中也讲过了，脂肪性肝病发展后有可能变成非酒精性脂肪肝炎，但只是进行了病理学染色区别这两者的状态。但是，仅通过显微镜光学成像识别病态仍有不准确性，在药物开发中作为模型是难以取信的。为了解决这个问题，此次质谱成像是针对胆汁酸进行的，胆汁酸可能根据 LCMS 或 GC-MS 的结果而波动（图 3）。图 3 右侧摄取正常食物的实验鼠肝脏中主要存在初级胆汁酸 m/z 498.24（红）和 m/z 514.23（绿）。相反，摄取高脂肪食物的实验鼠纤维化部分中存在初级胆汁酸 m/z 405.27（蓝）。

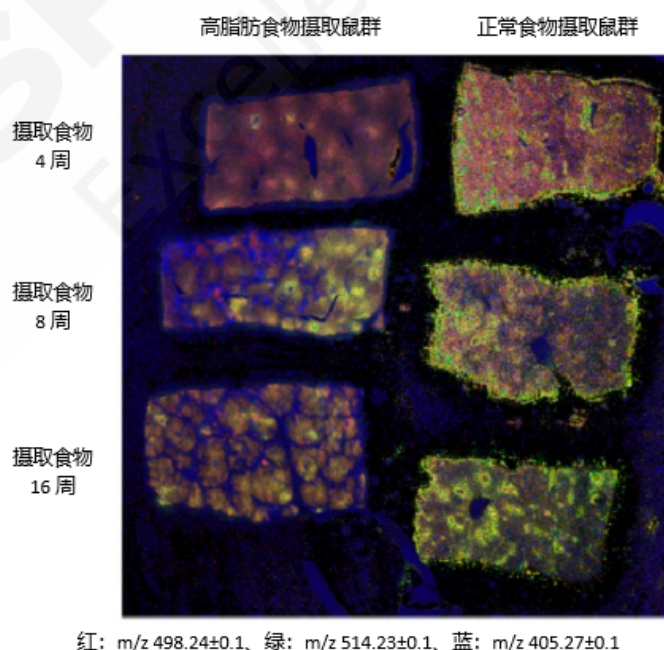


图 3 胆汁酸的质谱成像分析

■ IMAGEREVEAL MS 进行平均化比较

图 3 中对摄取高脂肪食物鼠群的数据进行时间上的比较, 摄取高脂肪食物 8 周的肝脏切片较摄取 16 周的肝脏切片存在更多的 m/z 405.27。但是, 根据切片状态得到的质谱信号具有强弱变化。因此, 原始数据及总离子流 (Total Ion Current; TIC) 校正数据之间的比较有时候也比较困难。这种情况下, 将别的物质作为基准进行标准化, 就可以有效修正信号强度并进行补充。

通过解析软件 IMAGEREVEAL MS, 利用 m/z 405.27 代谢路径包含的 m/z 498.24 和 m/z 514.23, 校正图 3 中所得数据, 结果如图 4 所示。与 TIC 校正的图像 (图 4 右) 相比, 非酒精性脂肪肝炎状态下的摄取高脂肪食物的实验鼠肝脏纤维化区域中, 摄取高脂肪食物 8 周及 16 周后 m/z 405.27 的表达量没有明显差异。而且, 非酒精性脂肪肝炎状态下的实验鼠摄取高脂肪食物 16 周后肝脏组织, 同一切片进行苏木精-伊红 (HE) 染色后与连续切片经天狼星红染色后进行比较可知, m/z 405.27 在纤维化组织中大量存在 (图 5)。由结果可知, m/z 405.27 在肝脏纤维化区域中更多地存在, 但在鼠群高脂肪食物摄取 8 周后非酒精性脂肪肝炎发展过程中伴随的存在量就几乎没有变化了。

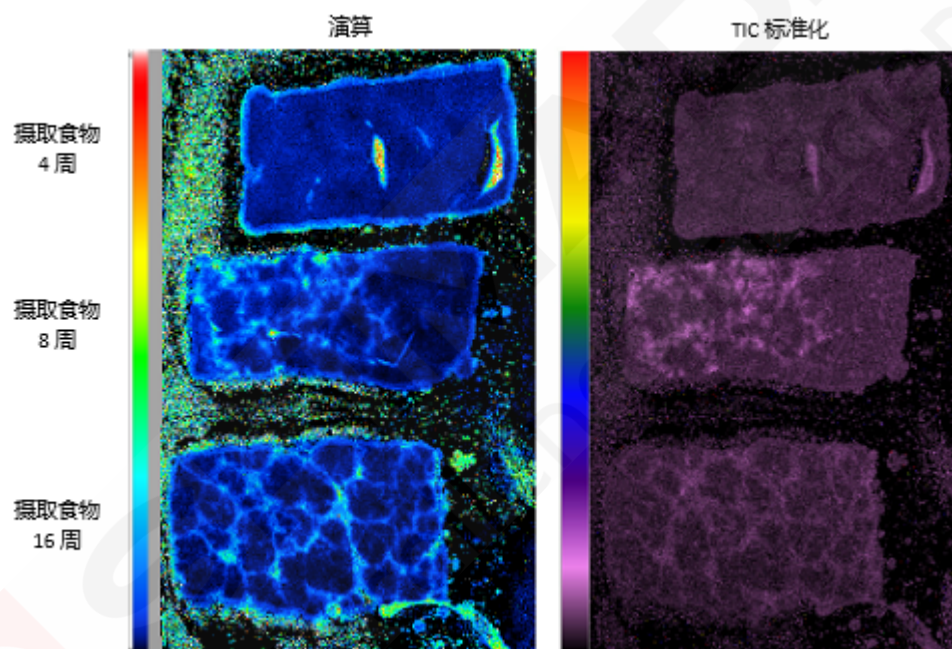


图 4 IMAGEREVEAL MS 处理数据 (演算) 效果
(m/z 405.27、高脂肪食物摄取鼠群)

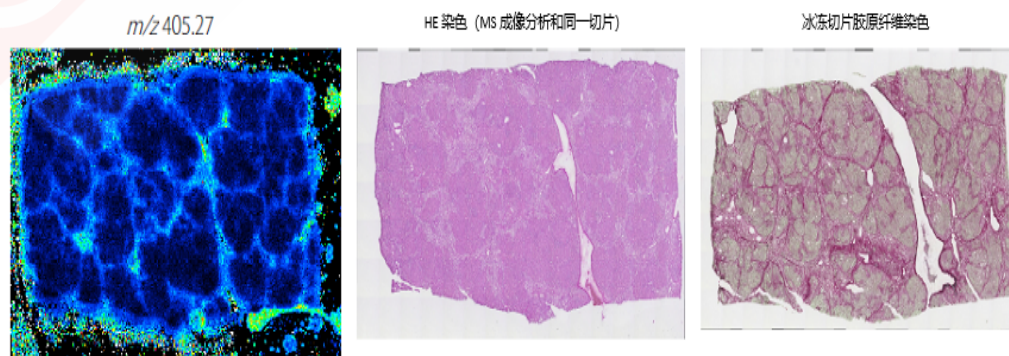


图 5 摄取高脂肪食物 16 周的实验鼠的肝脏组织中 m/z 405.27 的分布以及病理组织学的染色结果间的比较

因此，质谱成像分析可以同时测量/观察同一切片上的多个物质，利用这一优势，可以通过 IMAGEREVEAL MS 解析所得数据，得到反映目标分子实际情况的质谱图像，能够更准确地了解病理过程与目标分子分布位置的关系。此外，将 LC-MS 和 GC-MS 数据与质谱成像相结合，有望通过寻找治疗疾病药物的靶向分子，为新药的研发做出贡献。

iMLayer 及 IMAGEREVEAL MS 为岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B094 应用报告。

第三章 MALDI-TOF 日常使用

第一节 基质的选择

从 MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) 的定义中, 我们可以看到基质在样品电离过程中起到了非常重要的作用。通常认为基质的作用有以下几点: 1. 把样品分子隔离开; 2. 吸收激光能量; 3. 提供卷流, 将样品分子送入气相; 4. 提供反应离子, 将样品离子化。

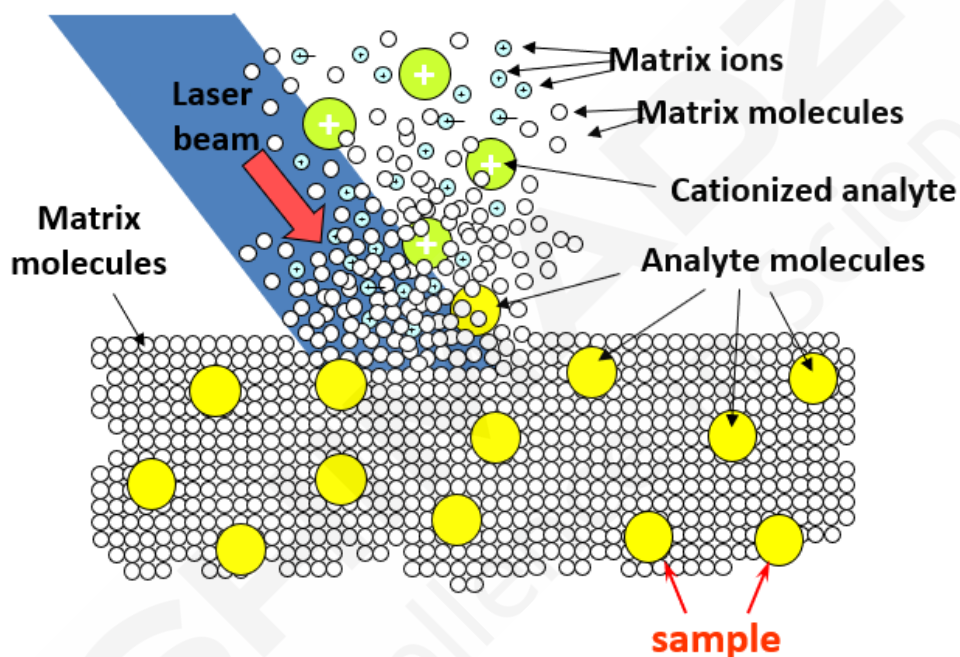


图 1 基质辅助样品电离

针对不同的样品, 选择相应的离子化基质非常重要。常见的基质有 CHCA, DHB, SA, Dithranol 等, CHCA 主要用于酶切后的肽段及小分子蛋白检测, DHB 主要用于糖及糖蛋白检测, SA 主要用于大分子蛋白或抗体的检测, Dithranol 主要用于聚合物检测。另外针对寡核苷酸、脂类、金属配合物等样品分析的多种基质可供选择, 详情见表 1。

常见基质的配制:

1. CHCA 基质: 5-10 mg/ml (50%ACN,50%H₂O,0.1%TFA) 适用多肽及小分子化合物
2. DHB 基质: 10-20 mg/ml (50%ACN,50%H₂O,0.1%TFA) 适用糖类及小分子化合物
3. SA 基质: 10-15 mg/ml (50%ACN,50%H₂O,0.1%TFA) 适用蛋白及大分子样品
4. Dithranol 基质: 10-15 mg/ml (100%THF,0.1%TFA) 适用聚合物样品

表 1: 基质的选择

基质名称及简写	单同位素分子量	平均分子量	化学式	适合样品	溶解性	SigmaAldrich 货号	备注
5-chloro-2-hydroxy benzoic acid, 5-chlorosalicylic acid, CSA	171.993 (Cl ³⁵) 173.990 (Cl ³⁷)	172.567	C ₇ H ₅ O ₃ Cl	水溶性聚合物 (如: 聚苯乙烯)	氯仿, 二氯甲烷, 四氢呋喃	C7,090-8	1
α-cyano-4-hydroxy cinnamic acid, CHCA	189.043	189.170	C ₁₀ H ₇ NO ₃	肽段, 糖肽, 蛋白, 糖蛋白, 有机化合物	水, 乙腈, 甲醇, 乙醇	14,550-5	2
2,5-dihydroxy benzoic acid, gentisic acid, DHB	154.027	154.121	C ₇ H ₆ O ₄	小分子化合物, 糖酯, 糖蛋白, 糖肽, 低聚糖, 聚合物	水, 甲醇, 四氢呋喃, 乙腈, 乙醇, 丙酮	14,935-7	2
3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, sinapinic acid, SA	224.068	224.212	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	蛋白, 聚合物	水, 甲醇, 四氢呋喃, 乙腈, 乙醇, 丙酮	D13,460-0	4
2-(4-hydroxy-phenylazo)benzoic acid, HABA	242.069	242.234	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₃	小分子化合物, 硫酸化合物, 染料, 神经节苷脂, 聚合物	水, 四氢呋喃, 乙腈, 丙酮	14,803-2	1
3-hydroxypicolinic acid, HPA	139.027	139.110	C ₆ H ₅ NO ₃	寡核苷酸	水, 甲醇	15,230-7	
trans-indole-acrylic acid, IAA	187.063	187.198	C ₁₁ H ₉ NO ₂	聚胸腺嘧啶, 聚尿苷, 合成聚合物	水, 甲醇, 乙腈, 乙醇, 丙酮	I-380-7	1
5-methoxysalicylic acid, MSA	168.042	168.148	C ₈ H ₈ O ₄	蛋白	乙醇	14,618-8	5
norharmine, 9H-pyrido[3,4-b]indole, NH	168.199	168.069	C ₁₁ H ₈ N ₂	蛋白, 肽段, 脂类, 糖, 寡核苷酸, 聚合物	TFA, 甲醇, 乙腈, 乙醇, 丙酮, 四氢呋喃, 氯仿, 二氯甲烷	N3,310-1	
picolinic acid, 2-pyridineboxylic acid, PA	123.032	123.111	C ₆ H ₅ NO ₂	寡核苷酸	甲醇, 水, 乙腈	P4,280-0	6

2,4,6-trihydroxy-acetophenone, THAP	168.042	168.148	C ₈ H ₈ O ₄	15 个碱基对以下的寡核苷酸，带多个负电荷样品（如：聚半乳糖醛酸）	甲醇，乙醇	T-6,460-2	
1,8,9-trihydroxy-anthracene, dithranol	226.063	226.231	C ₁₄ H ₁₀ O ₃	非极性化合物及聚合物	四氢呋喃，氯仿	25,920-9	1

备注 1. 在使用 5-氯水杨酸做基质时，可在添加基质之前向样品中添加银离子以增强信号强度。

备注 2. 在低分子量区域，常见的 CHCA 背景峰：93.03, 146.06, 190.05, 212.03, 228.01, 379.09 m/z.

备注 3. 在低分子量区域，常见的 DHB 背景峰：109.03, 137.02, 154.03, 155.04, 177.02, 192.99, 273.04, 288.3, 304.3, 443.4, 478.4 m/z.

备注 4. 在低分子量区域，常见的 SA 背景峰：147.04, 179.07, 181.08, 207.07, 224.07, 225.08, 387.14 m/z.

备注 5. MSA 与 DHB 结合使用，作为超级 DHB 或 DHB。

备注 6. PA 可单独使用，但更常用于与 HPA 结合使用。

第二节 样品浓度及点靶方法

除选择合适基质外，测试样品的浓度也应在合适范围。通常使用移液枪吸取 1 μL 溶解好的液体样品点到专用靶板上自然晾干，浓度指的是 1 μL 液体中样品的绝对含量。针对常见的样品，推荐的浓度范围如下表。

表 2: 样品浓度范围

样品类型	浓度范围	推荐基质
多肽	100 fmol-5 pmol	CHCA, DHB
蛋白质	1-10 pmol	SA
聚合物	50-100 pmol	Dithranol, THAP
寡核苷酸	5-50 pmol	HPA, PA

样品点靶方式:

- 1.混匀法:** 样品及基质在 Ep 管内混合均匀，取 1 μL 点靶，自然晾干。
- 2.覆盖法:** 移液枪取 1 μL 样品，点靶，自然晾干。取 1 μL 基质，覆盖到样品上，自然晾干。
- 3.三明治法:** 移液枪取 1 μL 基质，点靶，等 5-10s 将基质吸走，形成基质的薄膜。取 1 μL 样品，点靶，自然晾干。再取 1 μL 基质点靶覆盖，自然晾干。

第三节 校准标准品的选择

测试样品之前，需要用标准品进行仪器的校准。通常新仪器会有自带的岛津标准试剂盒，里面含有标准多肽混合物 TOFmix、常见基质、细胞色素 C、牛血清白蛋白 BSA、标品稀释溶剂等。如果标准试剂盒使用完，可以联系岛津公司购买新的试剂盒，或者从 Sigma 购买相应的标准品。Sigma 有两个适合 MALDI-TOF 的标准品套装，MSCAL2 多肽校准套装适合小分子样品的校准，MSCAL3 蛋白校准套装适合分子量较大的样品校准。其他样品可以根据样品分子量选择合适的标准品进行校准，常见的标准多肽/蛋白见下面表 3。一般选择多点校准（三个校准点及以上），不建议使用单个标准品强制过原点校准模式。通常建议标准品与样品测试条件一致（离子化模式、扫描范围、PE 值、Blank 值等），只需对激光能量进行微调，使样品出峰信号强度在合适范围即可，这样测试得到的目标峰质荷比 m/z 更精准。

表 3: 常见的标准多肽/蛋白

蛋白/多肽名称	来源	Swiss-Prot 编号	分子量	Sigma 货号
Leu Enkephalin	Human	PENK_HUMAN	556.6	L9133
Met Enkephalin	Human	PENK_HUMAN	573.7	M6638
Bradykinin	Human	KNH_HUMAN	1060.2	B3259
Gramicidin S	Bacillus brevis		1141.5	G0900
Substance P	Human	TKNB_HUMAN	1347.8	S6883
Peptide Seq. Std	Synthetic		1657.8	P2046
Renin substrate	Porcine	ANGT_PIG	1759.0	R8129
Renin substrate	Human	ANGT_HUMAN	1760.0	R5880
Insulin A chain, oxidised	Bovine	INS_BOVIN	2531.7	I1633
Melittin	Bee venom	MEL1_APIME	2846.5	M1407
Glucagon	Bovine	GLUC_BOVIN	3482.8	G7774
Insulin B chain, oxidised	Bovine	INS_BOV	3495.9	I1764
Insulin	Sheep	INS_SHEEP	5703.5	I9254
Insulin	Bovine	INS_BOVIN	5733.6	I15500
Insulin	Horse	INS_HORSE	5747.6	I9129
Insulin	Porcine	INS_PIG	5777.6	I3505
Insulin	Human	INS_HUMAN	5807.7	I0259
Ubiquitin	Bovine	UBIQ_BOVIN	8564.9	U6253
Cytochrome c	Tuna heart	CYC_KATPE	12028.6	C2011
Cytochrome c	Bovine heart	CYC_BOVIN	12230.9	C3131
Cytochrome c	Horse heart	CYC_HORSE	12360.1	C7752
Ribonuclease A	Bovine	RNP_BOVIN	13682.3	R5500
Alpha lactalbumin	Human	LCA_HUMAN	14070.1	L7269
Alpha lactalbumin	Bovine	LCA_BOVIN	14178.1	L6010
Lysozyme c	Chicken Egg	LYC_CHICK	14305.1	L6876
Apomyoglobin	Horse	MYG_HORSE	16951.5	A8673
Apomyoglobin	Sperm whale	MYG_PHYCA	17199.9	A5289
Beta lactalbumin B	Bovine	LACB_BOV	18277.2	L8005
Beta lactalbumin A	Bovine	LACB_BOV	18363.3	L7880
Trypsin inhibitor, B chain	Soybean	ITRB_SOYBN	20036.6	T9003
Trypsin inhibitor, A chain	Soybean	ITRB_SOYBN	20090.7	T9003
Trypsin inhibitor, C chain	Soybean	ITRB_SOYBN	20162.8	T9003
Protein G	Recombinant		21599.0	P5170
Growth hormone	Human	SOMA_HUMAN	22125.1	S4776
Beta trypsin	Bovine	TRYP_BOVIN	23293.3	T8658
Alpha trypsin	Bovine	TRYP_BOVIN	23311.3	T8658
Gamma trypsin	Bovine	TRYP_BOVN	23329.4	T8658
Trypsin	Porcine	TRYP_PIG	23463.5	T0134
Trypsinogen	Bovine	TRYP_BOVIN	23981.0	T1143
Alpha chymotrypsin	Bovine	CTRA_BOVIN	25233.7	C7762

Chymotrypsinogen A	Bovine	CTRA_BOVIN	25656.1	C4879
Carbonic anhydrase II	Bovine	CAH2_BOVIN	29022.7	C7500
Pepsin A	Porcine	PEPA_PIG	34583.8	P6887
Aldolase	Rabbit muscle	ALFA_RABIT	39203.7	A7145
Pepsinogen	Porcine	PEPA_PIG	39606.9	P4656
Alcohol dehydrogenase S	Horse liver	ADHS_HORSE	39711.4	A6128
Alcohol dehydrogenase E	Horse liver	ADHE_HORSE	39832.4	A6128
Ovalbumin	Chicken Egg	OVAL-CHICK	44400.0	A2512
Protein A	Recombinant		44652.0	
Glucose-6-phos. dehydr.	Yeast	G6PD_YEAST	57432.5	G4134
Albumin	Bovine serum	ALBU_BOVIN	66430.0	A0281
Albumin	Human serum	ALBU_HUMAN	66438.2	A3782
Urease	Jack bean	UREA_CANEN	90761.9	U0376
Phosphorylase B	Rabbit	PHS1_RABIT	97218.5	P6635
Albumin dimer	Bovine serum	ALBU_BOVIN	132858.0	A9039

第四节 缓冲体系对 MALDI 的影响

MALDI-TOF 通常是用来测试生物样品，样品通常是在特定的缓冲体系中进行前处理。缓冲体系会带来不少污染物，如缓冲剂和洗涤剂，可能会引起问题，即使它们可能不会影响样品的生物活性。与其他质谱电离技术（如 FAB、电喷雾）在分析之前必须去除常用的生物缓冲剂相比，MALDI 可耐受一定水平的这些盐和洗涤剂。

含有生理量的盐或脂肪的样品没有问题，甚至像牛奶这样的天然生物液体也可以成功地用 MALDI 进行了分析。但是，超过以下限值的缓冲液可能会导致质谱图信号明显减弱：

表 4: MALDI 容忍的缓冲体系浓度

缓冲液类型	容忍浓度上限
磷酸盐	50 mmol
碳酸氢铵	30 mmol
Tris buffer	50 mmol
胍	1 mol
碱金属盐	1 mol
甘油	1 %
叠氮化钠	1 mmol

通常，样品越纯净，质谱信号就越清晰、峰型越尖锐、强度更高。因此，如果可以选择，最好在分析前去除缓冲盐和洗涤剂，并将样品溶解在合适的溶剂中（例如 0.1%TFA 中），该溶剂不会降低质谱响应。如果不能做相应的前处理，但样品是浓缩的，那么可以将其稀释到污染物几乎没有影响的程度。

十二烷基硫酸钠（SDS）是常见的蛋白质洗涤剂。MALDI-TOF 可以容忍溶液中低浓度的十二烷基硫酸钠。然而，大多数含有 SDS 的蛋白质样品，在前处理时会在 0.1%SDS 中煮沸一段时间。一旦蛋白质在含有十二烷基硫酸钠的溶液中煮沸，其溶液性质就会完全改变。据推测，煮沸时蛋白质分子被完全包裹在 SDS 的外壳中。简单地去除溶液中多余的 SDS 并不能改善 MALDI-TOF 的样品制备；还必须去除包裹蛋白质的 SDS 外壳，这种去除可以通过两相萃取来完成。

第五节 聚合物样品测试

通常使用 MALDI-TOF 进行聚合物分子量及分布的测试，特点如下：测出的是聚合物的绝对分子量；可以测出全部的分子量分布；通过测定每一个多聚体的分子量，可以为聚合物的结构分析提供支持。通过 MALDI-TOF MS 分析，可以获得聚合物的精确分子量、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。

MALDI-TOF 聚合物测试时，主要存在的问题：1.要求聚合物的分散度 <1.2 ，最好 <1.1 。当聚合物的分散度较高时，高分子量组分的信号会被抑制，产生质量歧视现象。2.由于聚合物在组成和结构方面的多样性，没有一种基质和方法可以适合于所有聚合物样品的测试。分析时，应结合样品自身的结构，选择合适的基质、辅助盐，设定合适的仪器采集参数。针对不同类型样品的推荐如下表（表 5）。

表 5: 聚合物样品分析基质和辅助盐选择

样品类型	推荐基质	辅助盐溶液	溶剂
聚乙二醇 PEG	DHB, Dithranol	Na-TFA	Water, THF
聚苯乙烯 PS	Dithranol, TPDB	Ag-TFA	THF
聚甲基丙烯酸甲酯 PMMA	DHB, Dithranol, HABA	Na-TFA	THF
聚碳酸酯 PC	Dithranol, IAA, HABA	Li-TFA, NaTFA	THF
金属卟啉配合物	DCTB	-	CHCl ₃

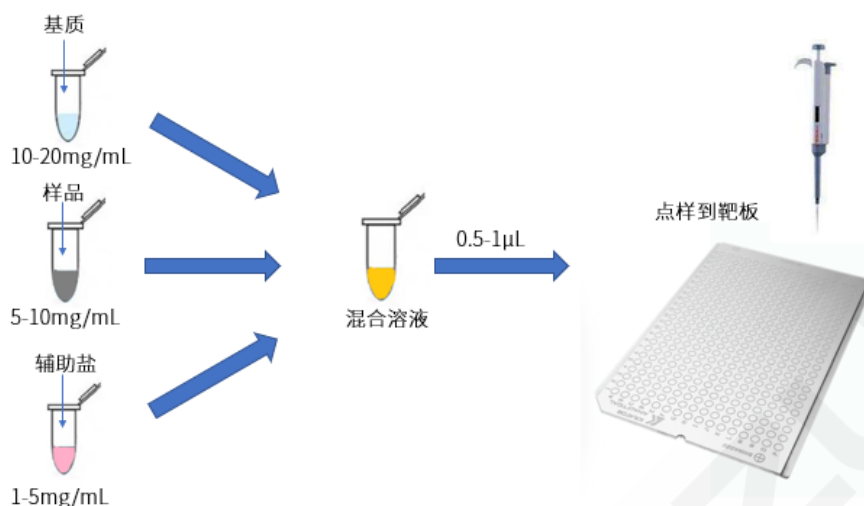


图 2 聚合物样品点样方法

选择合适的基质和辅助盐溶液，配制到合适的浓度。将样品、基质、辅助盐三者的溶液按一定的比例混合（如 5:5:2, 1:1:1 等），尝试不同比例，最终找到合适的配比。如下图（图 3）所示，针对聚苯乙烯（PS）样品，选择合适的基质及辅助盐溶液，可以得到比较好的分析结果。如果是不适宜的基质及辅助盐溶液，则样品无法有效离子化。

目前针对岛津 AXIMA 系列 Assurance、Confidence、Performance 仪器，使用 Launchpad 软件中的 Polymer Analysis 插件可以进行聚合物数据的再解析（图 4）。而 MALDI-8020 和 MALDI-7090，使用 MALDI Solutions 软件生成质谱数据，建议使用第三方 Polymerix 软件分析聚合物数据（图 5）。

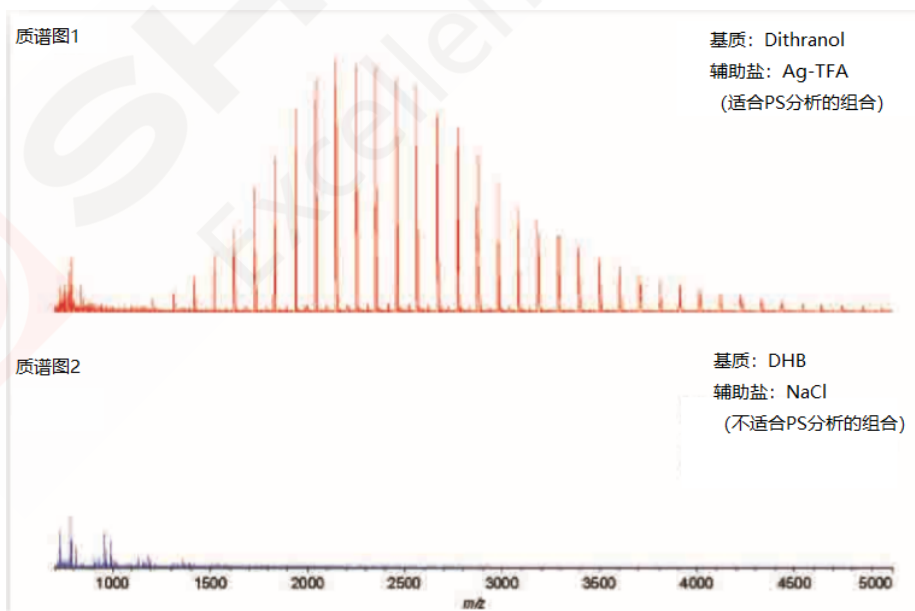


图 3 聚苯乙烯测试方法对比

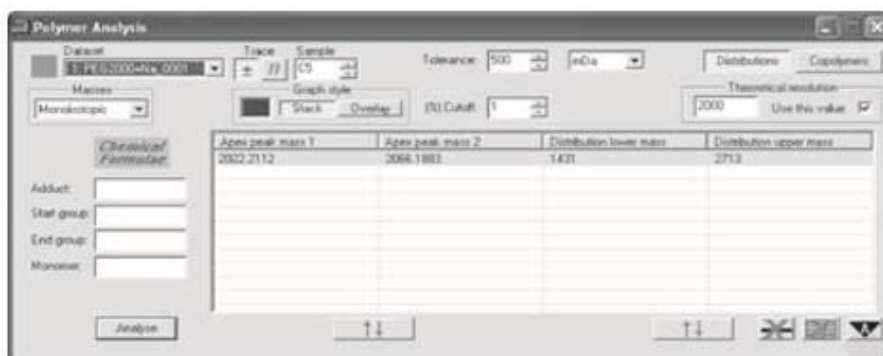


图 4 岛津 Polymer Analysis 软件界面

Enabled	Excess Mass	Monoisotopic m/z 1	Monoisotopic m/z 2	Alpha End Group	Repeat	Omega End Group	Charge State	Adduct	Adduct Charge	Loss	Low Mass	High Mass
<input checked="" type="checkbox"/>	0.02970	965.5800	1009.6200	OH	C2H4O	H		1 Na	1		1.0	100000.0
<input checked="" type="checkbox"/>	0.00314	1477.9400	1521.9900	OH	C2H4O	C3H53O4	1 Na		1		1.0	100000.0
<input checked="" type="checkbox"/>	0.04658	1990.3700	2034.3700	C3H53O5	C2H4O	C3H53O4	1 Na		1		1.0	100000.0

图 5 Polymerix 软件分析结果界面

第六节 微生物样品测试

MALDI-TOF MS 鉴定的前处理步骤主要是通过破坏微生物的细胞结构，达到灭活微生物样本并提取胞内蛋白的目的。微生物细胞壁的构成和成分，是影响前处理效果的最重要的因素，因此，样本细胞壁破坏效果是直接影响是否有足够蛋白用于质谱分析，是决定鉴定能否成功的前提。根据微生物的细胞壁结构和成分差异，可将 MALDI-TOF MS 微生物鉴定前处理方法分为五类，其适用范围见下表（表 6）。请根据样品类型选择合适的前处理方法。

表 6: 不同微生物适用的前处理方法

细菌类型	处理方法	大致流程
G-细菌	直接涂抹法	涂菌后直接覆盖基质溶液
G+细菌	直接涂抹法	涂菌后直接覆盖基质溶液
	原位甲酸提取法	涂菌后用相应浓度的甲酸处理，再覆盖基质溶液
酵母样真菌	原位甲酸提取法	使用相应浓度的甲酸处理后再添加基质溶液，不同型号仪器推荐的甲酸浓度不同，需遵照说明书信息
丝状真菌	乙醇灭活+甲酸、乙腈提取	先用乙醇灭活后再分别使用 70%甲酸和 100%乙腈进行提取、离心，取上清液点靶后，覆盖基质溶液
分枝杆菌/诺卡菌	硅珠破壁+甲酸、乙腈提取	用乙醇辅以 0.5 mm 直径的硅珠震荡破壁，再分别使用 70%甲酸和 100%乙腈进行提取、离心，取上清液点靶后，覆盖基质溶液
分枝杆菌（液体培养）	液体培养直接提取	液体培养报阳后，继续培养 24-72h，经离心去上清后，对沉淀物使用硅珠破壁+甲酸乙腈提取的方法

微生物鉴定时可以选择的基质有 DHB 和 CHCA 两种。DHB 出峰较多，但是由于咖啡环效应，不能形成均匀的结晶，数据采集时间较长，通常建议建立新的标准谱图时使用。CHCA 结晶均匀，适合大批量数据自动采集，节约采样时间，日常使用建议使用 CHCA 基质。

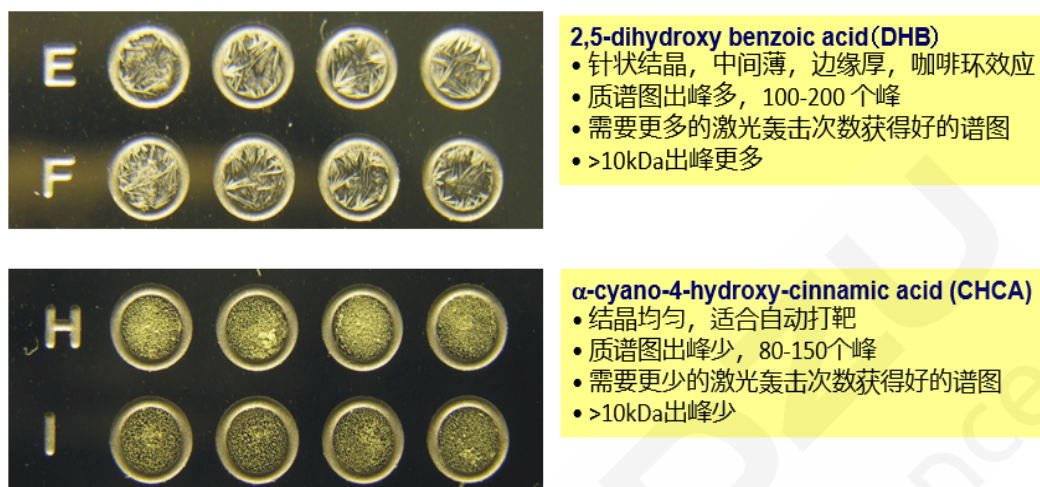


图 6 微生物鉴定使用基质选择

此外日常鉴定过程中我们会遇到鉴定成功率不佳的情况。引起质谱数据无法成功鉴定的可能原因有：1.标准菌株出峰较差，仪器校准未通过；2.样品前处理不佳，数据采集时未采集到足够多的质谱峰；3.数据库中该菌种或菌株的标准谱图不够丰富，匹配效果较差。针对前两点，我们可以从样品培养和前处理着手，进行优化，提高鉴定成功率。而如果是第三种原因引起的鉴定成功率较差，我们就需要新建新的标准谱图。主流厂家的数据库基本上都有新建标准谱图的功能，岛津 Saramis 数据库可以根据用户的需要进行菌株标准谱图的扩充和数据库的完善，满足用户的多元化要求。新建标准谱图后，再次测试相同菌株或菌种的样品，能明显提高鉴定成功率。

acquisition time	name	sample	%	family	genus	species	typ	strain	datacount	matrix
3 Sep 2019 16:01	f210004_F21[c]		99.90	Family I Pasteurei	Avibacterium	paragalinarum			142	
3 Sep 2019 16:00	f210003_F21[c]		99.90	Family I Pasteurei	Avibacterium	paragalinarum			165	
3 Sep 2019 15:59	f210002_F21[c]		99.90	Family I Pasteurei	Avibacterium	paragalinarum			172	
3 Sep 2019 15:57	f210001_F21[c]		99.90	Family I Pasteurei	Avibacterium	paragalinarum			156	
3 Sep 2019 16:04	e210002_E21[c]		99.90	Family I Pasteurei	Avibacterium	paragalinarum			161	
3 Sep 2019 16:03	e210001_E21[c]		99.90	Family I Pasteurei	Avibacterium	paragalinarum			188	
3 Sep 2019 16:07	e210004_E21[c]		99.90	Family I Pasteurei	Avibacterium	paragalinarum			181	
3 Sep 2019 16:07	e210004_E21[c]		0.00						181	
3 Sep 2019 16:06	e210003_E21[c]		0.00						167	
3 Sep 2019 16:04	e210002_E21[c]		0.00						161	
3 Sep 2019 16:01	f210004_F21[c]		0.00						142	
3 Sep 2019 16:00	f210003_F21[c]		0.00						165	
3 Sep 2019 15:59	f210002_F21[c]		0.00						172	
3 Sep 2019 15:57	f210001_F21[c]		0.00						156	
3 Sep 2019 16:03	e210001_E21[c]		0.00						188	

图 7 副鸡禽杆菌 (Avibacterium paragalinorum) 新建标准谱图构建前后鉴定结果对比

(白色：新建标准谱图前；绿色：新建标准谱图后)

参考文献：

1. M. Karas and F. Hillenkamp, (1988) Anal. Chem. 60, 2288.
2. R. C. Beavis and B. T. Chait, (1989) RCMS 3, 233.
3. Vorm, Ole, Brian T. Chait and Peter Roepstorff, Mass Spectrometry of Protein Samples Containing Detergents, 41th ASMS Conference Proceedings, (1994) 621a-621b.
4. Sample Preparation Guidelines for MALDI MS, Kratos Analytical Ltd.
5. 胡继红, 马筱玲等, MALDI-TOF MS 在临床微生物鉴定中的标准化操作专家共识, 中华检验医学杂志 (2019), 第 42 卷第 4 期



SHIMADZU
Excellence in Science