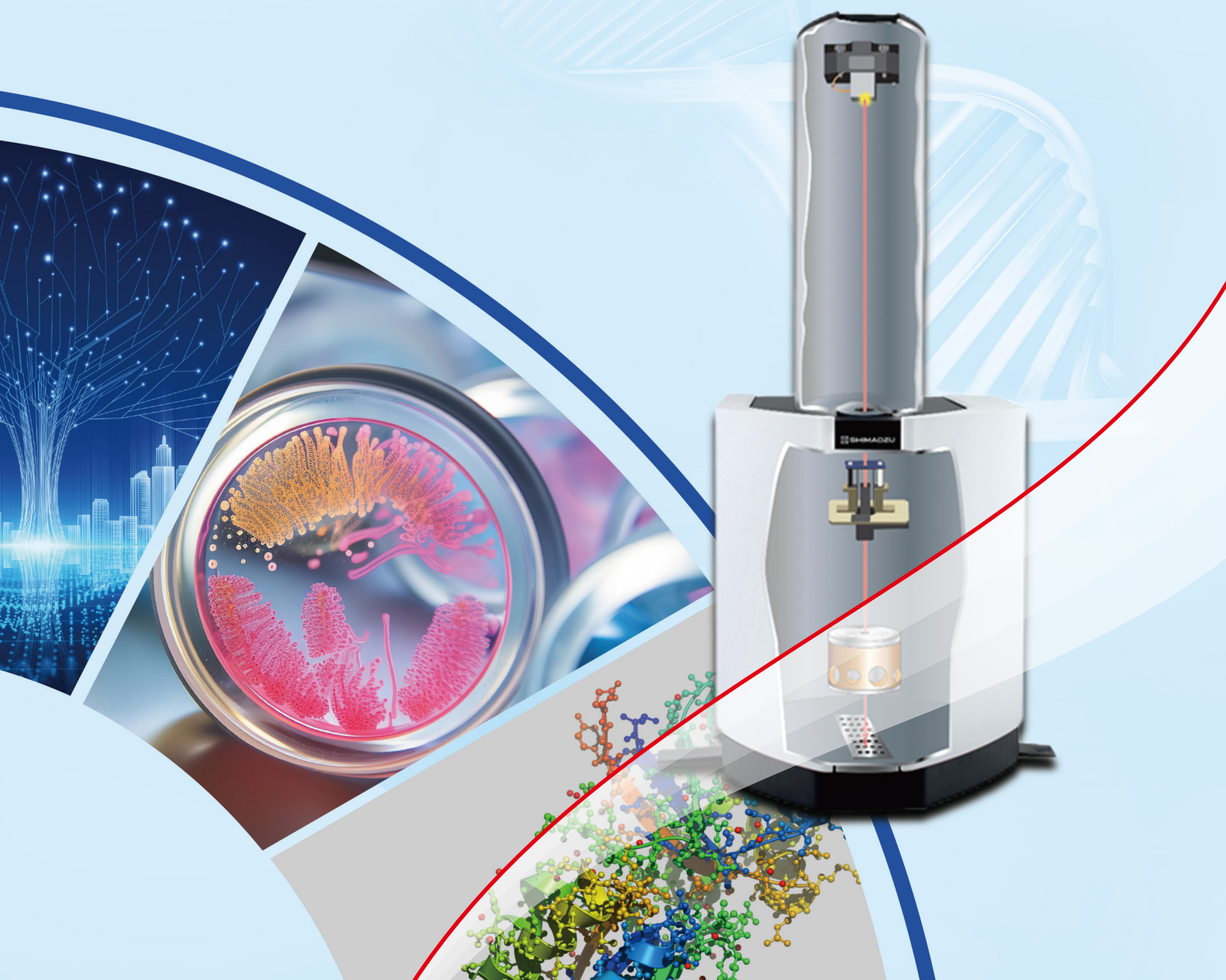


MALDI-8020/8030

应用文集



前言

MALDI-TOF，全称基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，作为一项重要的检测技术，在多个研究领域发挥着关键作用。其原理独具特色，样品分子与基质分子形成共结晶薄膜，当受到激光照射时，基质吸收能量并传递给样品分子，使其瞬间气化并离子化，随后进入飞行时间质量分析器，依据质荷比进行检测。20 世纪 80 年代，岛津的资深工程师田中耕一开发出适合生物大分子检测的基质，使得 MALDI-TOF 质谱法能够成功检测生物大分子的分子量。正因如此，田中耕一与电喷雾电离法的发明人 John Fenn 共同荣获 2002 年诺贝尔化学奖，以表彰他们“开发用于生物大分子质谱分析的软解吸电离方法”。

当今广泛应用的 MALDI-TOF 质谱技术是基质辅助激光解析电离与飞行时间离子分离这两个核心技术的完美结合。尽管基质辅助激光解吸电离源还能与四级杆、离子阱等其他离子分离技术相连接，但脉冲式的激光解吸电离方式与飞行时间质谱中采用的脉冲离子提取技术在耦合方面展现出诸多优势，从而催生了 MALDI-TOF 这一卓越的质谱技术。

在应用方面，MALDI-TOF 涉猎广泛。在分子量测定中，能够提供高精度的结果；在蛋白质鉴定领域，可准确识别蛋白质的结构和特性；聚合物分析中，有助于解析聚合物的组成和分子量分布；微生物鉴定中，基于 MALDI-TOF 的微生物鉴定系统展现出显著优势，与传统生化或免疫学方法相比，其通量更高、时间更快、成本更低，深受广大科研工作者的青睐；核酸分析中，基于核酸分子量测定的单核苷酸多态性 SNP 分析，能够应用于疾病遗传及基因分析等研究，例如耳聋基因的筛查和 RNA 病毒检测。

MALDI-8020/8030 作为体积小巧的台式 MALDI-TOF，采用 355 nm 固体激光器，激光频率达 200 Hz，分子量测量范围为 1-500 kDa。同时，它配备了无油的隔膜真空泵，噪音低至 55 分贝以下。通过优化缩小进样室和样品分析室的体积，退靶仅需 15-20 秒，进靶后抽真空时间 90 秒，相比传统 MALDI-TOF 有了显著提升。基于固体激光器，还能够使用紫外激光自动清洗离子源，避免了泄真空、手动清洗等一系列复杂操作，设定好程序后 8 分钟即可自动完成清洗。

本册应用文集收录了 30 篇代表性的分析应用报告，供相关用户参考。本文集仅供有关人员学习交流使用，不用于任何商业用途。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

第 1 章 MALDI-8020/8030 介绍	1
第 2 章 MALDI-8020/8030 分析应用案例	6
2.1 蛋白质多肽分析.....	6
完整蛋白质分子量检测	7
癌细胞细胞外囊泡分析	9
司美格鲁肽的快速合成质控	11
注射用胸腺法新聚集体分析	15
磷酸化蛋白质鉴定.....	18
In-Source Decay 源内裂解法分析蛋白质序列	20
甲硫氨酸氧化修饰蛋白检测	23
动物毛发鉴别.....	27
2.2 核酸分析	29
共转录加帽后 mRNA 的帽子端定性分析	30
mRNA 和 DNA 生产用核苷酸原料的分子量检测	32
寡核苷酸化学合成原料亚磷酸单体的分子量及杂质分析	35
寡核苷酸引物探针的合成质控	39
寡核苷酸药物的分子量及杂质快速检测	42
反义寡核苷酸药物的序列测定	45
2.3 微生物鉴定.....	48
牛奶中微生物的快速鉴定	49
新生儿肠道微生物的快速鉴定	54
羊奶中乳杆菌的快速鉴定	58
使用统计分析软件进行链球菌分型.....	63
2.4 聚合物分析.....	66
药用辅料 PEG6000 的分子量及分布检测	67
mRNA 药物递送系统脂质纳米粒的原料分子量检测.....	69
聚氧丙烯硬酯醇醚的分子量及分布检测	72
口腔护理产品中消毒剂成分聚维酮碘检测	75
聚乙二醇修饰药品的分析	77
抗血栓药物磺达肝癸钠分析	81
聚合物的热降解分析	83
2.5 金属配合物分析	86
金属配合物的合成确认	87

钼整合物的分子量检测	89
2.6 质谱成像分析	92
质谱成像技术在食品安全中的应用	93
质谱成像技术在动物组织和指纹中的应用	96
质谱成像技术在蛋白和多肽中的应用	98
附录 1：分析应用案例索引	101
附录 2：MALDI-TOF 测试时基质选择	102
附录 3：样品测试浓度及点靶方法	105
附录 4：校准标准品的选择	106



SHIMADZU
Excellence in Science

第1章 MALDI-8020/8030介绍

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱MALDI-TOF自20世纪80年代后期提出，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，不需要接受专业的分析化学培训就可以使用。2002年，岛津制作所的田中耕一与电喷雾电离法的发明人John Fenn博士等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”。

1.1 MALDI-TOF原理

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具有速度快、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。

1.2 MALDI-8020/8030特点

MALDI-8020/8030是岛津类型丰富的MALDI-TOF产品中的一员。这款台式、线性MALDI-TOF质谱仪兼具卓越的性能与小巧的体积 (450×745×1055mm, 86kg)，是当今对仪器要求日益严苛的实验室的理想选择。

表1 MALDI-8020/8030特点

No.	部件或功能	特点
1	固态激光器	355nm, 1-200 Hz 可调, 轰击次数 2×10^9
2	加载锁定室	匹配 48 孔靶板, 退靶 15-20 秒, 进靶后抽真空 90 秒
3	宽口径离子光学系统	最小化离子源被样品污染的风险
4	离子源自动清洗	基于紫外激光器的源清洁功能 (专利技术), 8 分钟即可完成自动清洗
5	正负离子模式	MALDI-8020 正离子模式, 适合大部分样品分析; MALDI-8030 具有正负离子模式, 负离子模式适合部分糖蛋白、寡核苷酸样品
6	无油隔膜泵	避免传统油泵的噪音及更换泵油, 噪音低至 55 分贝以下
7	条形码阅读器	在进样时自动扫描一次性靶板上的条形码
8	软件合规	MALDI Solutions™软件, 具有审计追踪等功能, 符合 21 CFR part 11 法规要求

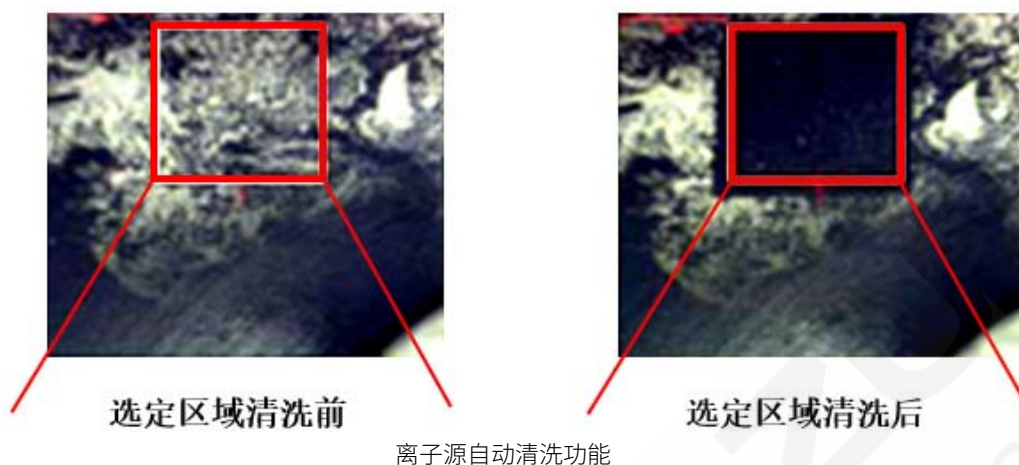
部分特点详细描述如下：

①固态激光器

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

②离子源自动清洗功能TrueClean™

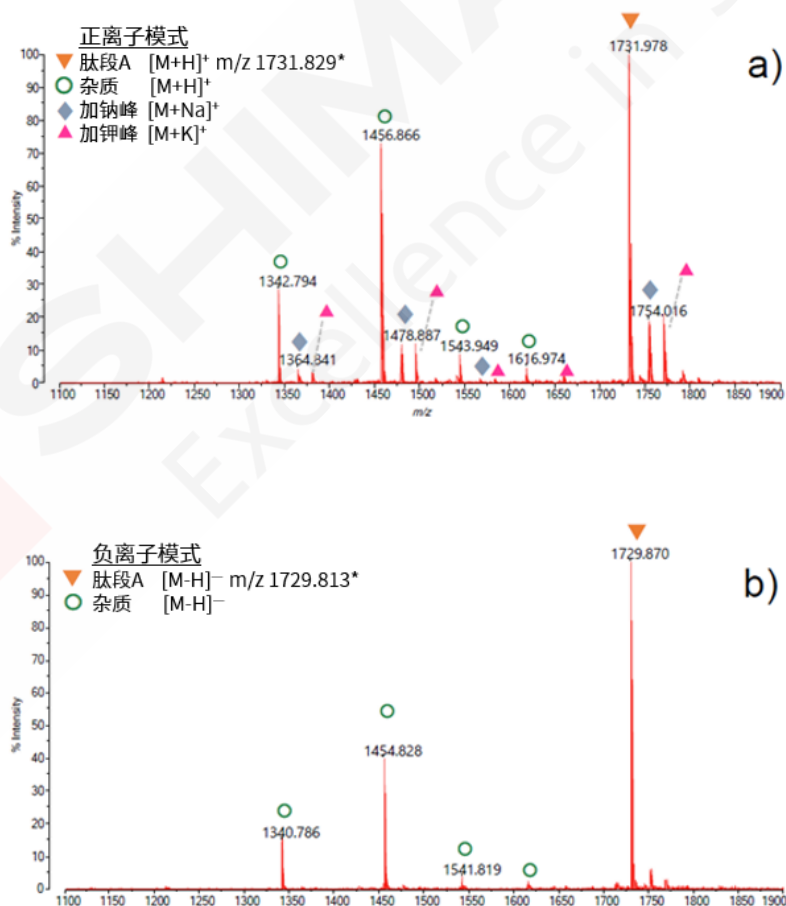
基于紫外激光器的源清洁功能（专利技术），设定好自动程序后，8分钟即可完成自动清洗。避免了泄真空、手动清洗等一系列繁琐操作。



③正负离子模式

MALDI-8020具有正离子模式, 适合大部分样品分析。MALDI-8030除正离子模式外, 还具有负离子模式, 适合正离子模式下电离效果欠佳的部分糖蛋白、多肽、寡核苷酸样品分析。负离子模式下, 盐加合离子更少, 不稳定官能团更易检出, 谱图更易解析, 详见下面的应用案例。

案例1: 合成肽段A的质控

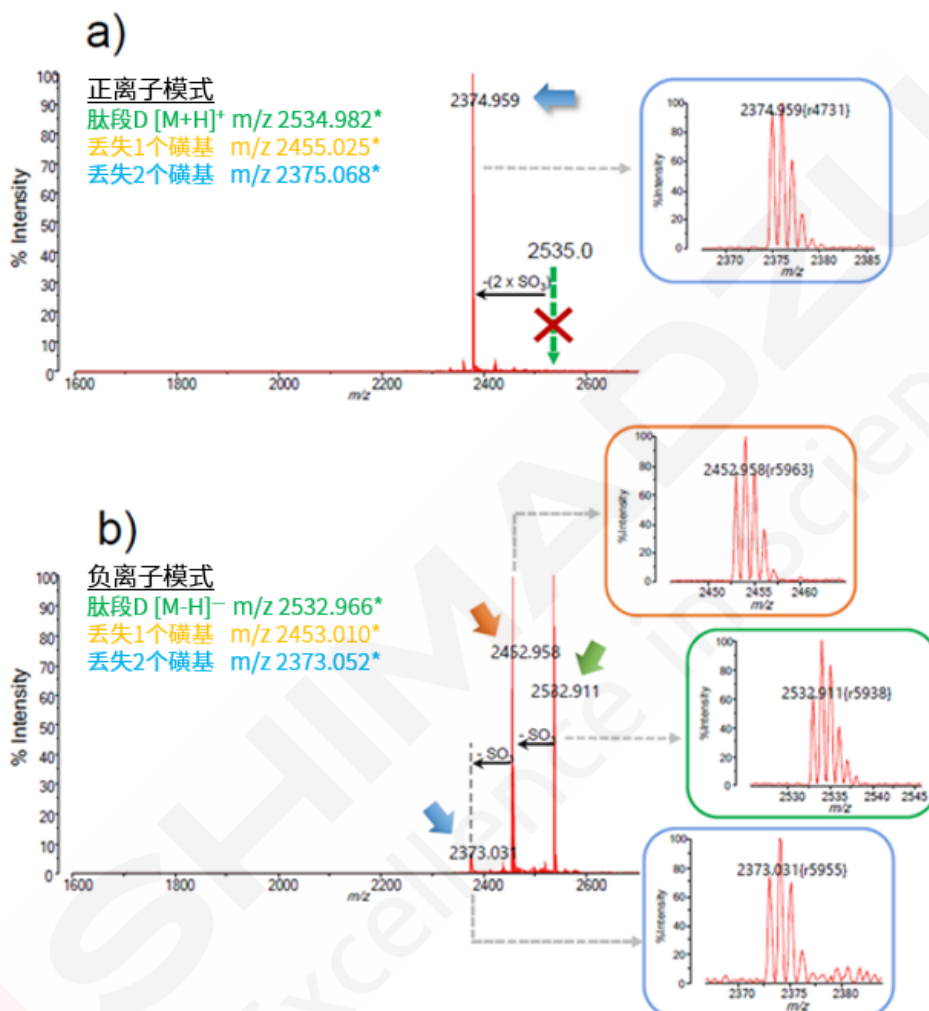


肽段 A 的质谱图: a)正离子模式, b)负离子模式。左侧带*号的为相应离子的理论质荷比
使用双极性台式质谱仪MALDI-8030, 在正、负离子模式下对合成肽段A进行质量控制分析。正离子模式

下，检测到肽段A的完整离子峰 (m/z 1731.978)，反应副产物的杂质峰 (m/z 1456.866, 1342.794, 1543.949等)，以及相应的加钠加钾峰 (m/z 1754.016, 1478.887, 1364.841等)。

负离子模式下，检测到肽段A的完整离子峰 (m/z 1729.870)，以及反应副产物的杂质峰 (m/z 1454.828, 1340.786, 1541.819等)，无加钠峰及加钾峰。负离子模式的背景干扰峰更少，谱图更干净，利于结果解析。

案例2：不稳定官能团磺基的检测



肽段 D 的质谱图：a)正离子模式，b)负离子模式。左侧带*号的为相应离子的理论质荷比

使用双极性台式质谱仪MALDI-8030，在正、负离子模式下对合成肽段D进行质量控制分析，肽段D包含两个与酪氨酸结合的不稳定磺基。正离子模式下，两个不稳定的磺基丢失，只检测到丢失两个磺基后的离子峰 (m/z 2374.959)。

负离子模式下，肽段D的完整离子峰 (m/z 2532.911)，丢失一个磺基的离子峰 (m/z 2452.958)，丢失两个磺基的离子峰 (m/z 2373.031) 均能成功检测。负离子模式下，不稳定官能团磺基更易检出。正负离子模式下，均能得到高分辨的同位素分布谱图。

④条形码自动读取

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



条形码自动读取功能

⑤符合21 CFR part 11法规

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

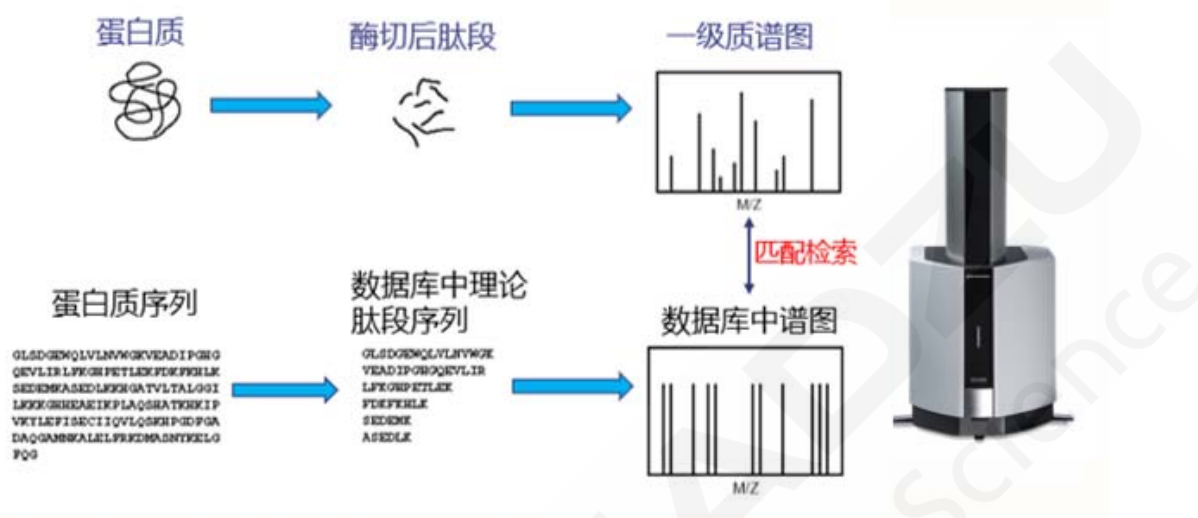
1.3 MALDI-TOF应用

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，寡核苷酸分子量及序列分析等。

表2 MALDI-TOF应用方向

No.	应用领域	详细描述
1	分子量测定	可直接检测蛋白质、多肽、合成化合物等的分子量，高效快捷。
2	蛋白质鉴定	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 (Mascot) 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。另外可以使用二级质谱法，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 Mascot 质谱数据库搜索匹配多肽信息来确定蛋白。
3	聚合物分析	选择合适的聚合物样品溶剂、基质、阳离子化试剂，采集质谱数据，导入聚合物分析软件 (Polymerix)，快速得到聚合物的平均分子量及分布、单体质量、聚合度等信息。
4	核酸分析	对寡核苷酸合成原料、合成产物、杂质等进行分子量检测，分析速度快，图谱简单直观，通过质谱图中信号峰的强弱与分布可快速确认精确分子量与杂质组成情况，为寡核苷酸化学合成质控提供直接依据。另外可以通过 ISD 或 CID 对寡核苷酸序列进行快速测定。
5	微生物鉴定	对微生物中的核糖体蛋白分子量进行快速测定，与数据库中的标准谱图进行匹配检索，给出精确到种的鉴定结果，主要用于致病菌的快速鉴定。

6	质谱成像	<p>质谱成像是一种基于质谱技术的成像手段，其借助质谱直接对生物样品进行扫描成像，能够于同一张组织切片或者组织芯片上，同步剖析数百种化合物分子的空间分布特性。经由对组织内化合物的构成、相对丰度以及分布状况展开高通量、全方位且快速的解析，能够获取潜在生物标志物的空间分布情况，以及目标组织中候选药物的分布信息，来进行生物标志物的发现及化合物的调控。</p>
---	------	---



MALDI-TOF蛋白质鉴定技术

1.4 岛津MALDI-TOF产品线

岛津目前拥有经典的AXIMA系列Assurance、Confidence、Performance，以及MALDI-8020、MALDI-8030、MALDImini等多款MALDI-TOF质谱仪。本应用文集主要展现岛津MALDI-8020/8030仪器的具体应用案例。



岛津 MALDI-TOF 系列产品

第2章 MALDI-8020/8030应用案例

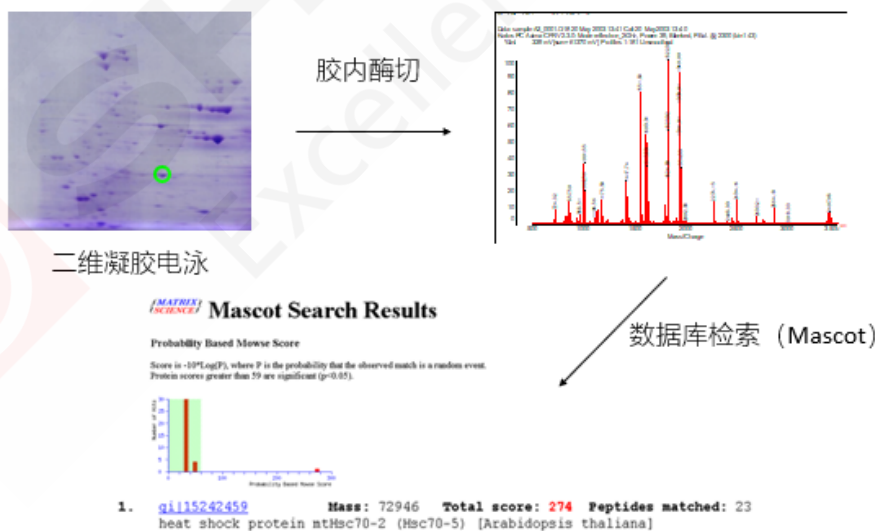
作为软电离模式的质谱仪，MALDI-TOF应用领域广泛，从蛋白质、聚合物、核酸分子量测定，到蛋白质鉴定、微生物鉴定等。本章将逐一展示相应的应用方案。

2.1 蛋白质多肽分析

常见的蛋白质分子量测定方法包含粘度法、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。在质谱方法中，有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。相较其他检测方法，MALDI-TOF作为先进的生物质谱技术，具备质量检测范围宽广、高灵敏度和高准确度等显著特点，同时对样品的需求量较少（上样量低至1 μ L），尤其适用于蛋白质分子量的快速精准测定。

MALDI-TOF蛋白质鉴定的基本原理为：蛋白质先经 SDS-PAGE 凝胶电泳或二维凝胶电泳 2D-PAGE 实现分离纯化，从中选取目标蛋白点，使用蛋白酶（通常为胰蛋白酶Trypsin）进行酶切，从而生成肽段混合物。将其点样至样品靶板，随后借助质谱仪采集数据，并与数据库进行匹配检索，进而给出鉴定结果。

激光的轰击促使肽段电离形成气态离子，经由电磁场的分离作用，把不同质荷比的离子加以区分，通过检测器收集分离后的离子，明确每个离子的质荷比，进而输出一级质谱图。不同的蛋白质经酶解后所形成的一级质谱图均存在差异，通常将其称作肽指纹图谱（PMF, peptide mass fingerprints）。此外，MALDI-8020能够直接通过源内裂解（ISD, In-Source Decay）来检测碎片离子，借此开展完整蛋白质的序列分析以及翻译后修饰分析。在数据库的选择方面，通常会采用美国国立生物技术信息中心NCBI旗下的第三方公开数据库 Mascot。



肽指纹图谱鉴定流程

完整蛋白质分子量检测

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

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

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

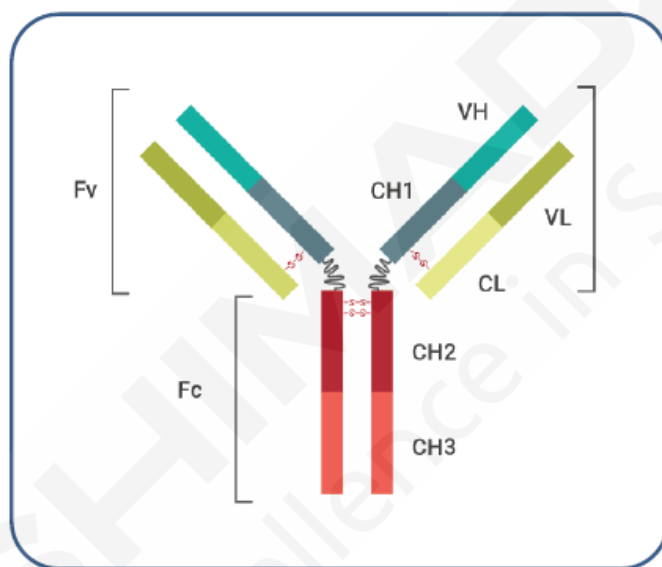


图1 抗体的结构

■ 样品制备和检测条件

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

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

■ 分析结果

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

图3显示IgA完整蛋白的质谱图，从中可观察到预计约160 kDa的一价离子与二价离子（约80 kDa）。另

外，在54 kDa左右检测到的信号与重链分子量是一致的（预计约55 kDa）。

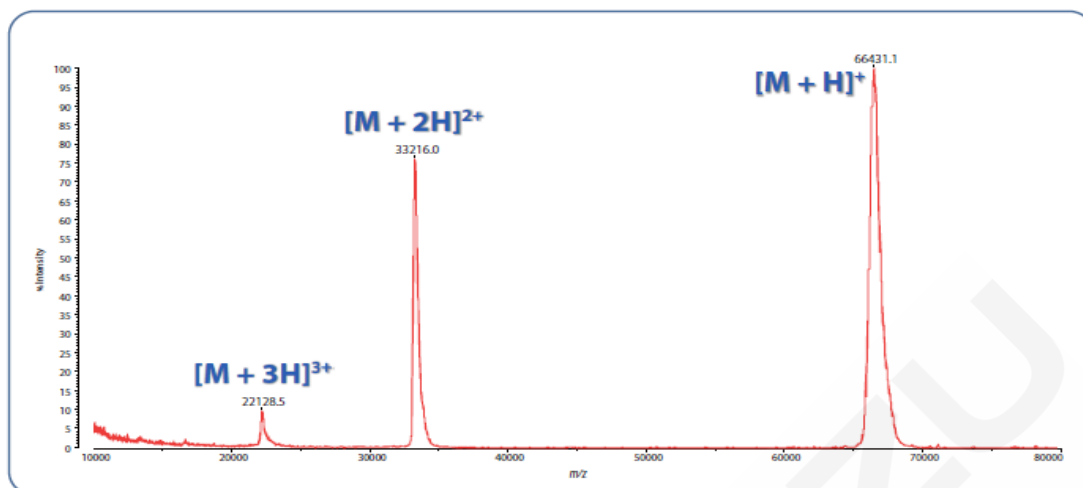


图2 BSA完整蛋白的质谱图 (500 fmol/ μ L, 250 fmol on-target)

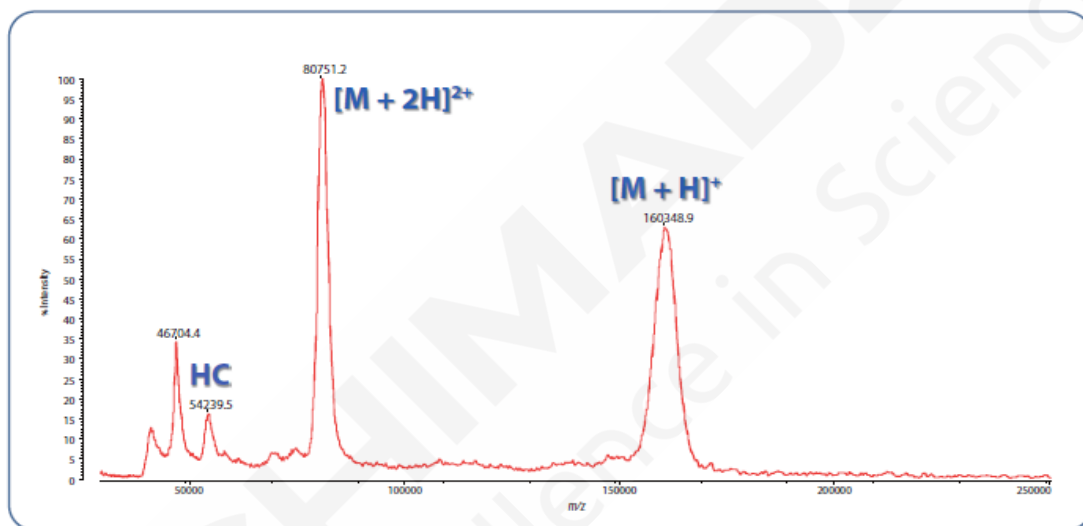


图3 IgA完整蛋白的质谱图 (20 pmol/ μ L, 10 pmol on-target) HC=heavy chain

癌细胞细胞外囊泡分析

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

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

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

■ 样品的预处理

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

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

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



图1 细胞外囊泡的分析流程

■ 结果

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

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

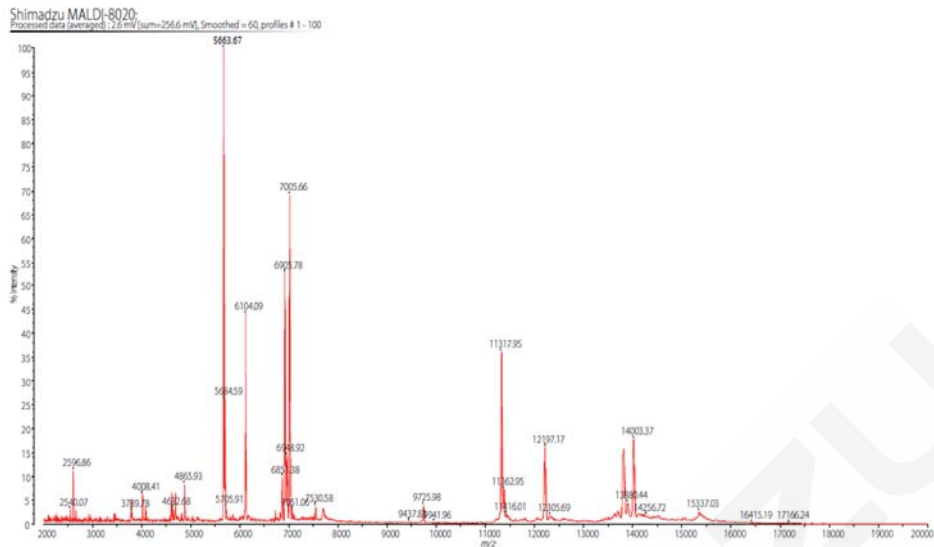


图2 源于原发性大肠癌的细胞外囊泡蛋白质质谱

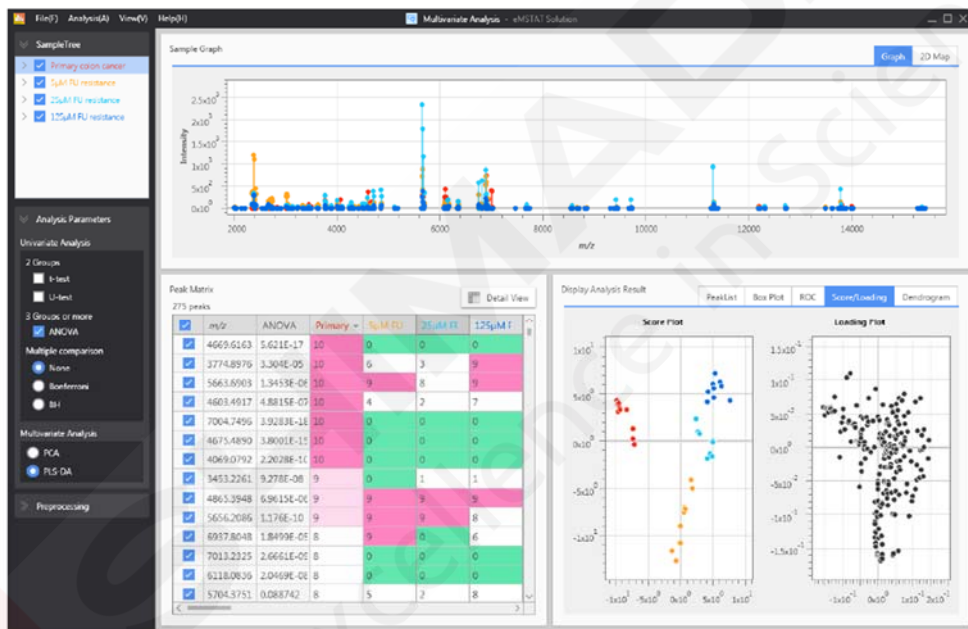


图3 4组细胞外囊泡组的PLS-DA分析结果

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

■ 结论

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

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

司美格鲁肽的快速合成质控

摘要：多肽药物的分子量及杂质的确认和分析，是药物质量控制的必要环节。MALDI-TOF MS 具有分析速度快、无需液相分离、结果简单直观等优点，本文应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8030 分析了司美格鲁肽在研合成中间体及制剂产品，快速获得药物的精确分子量及杂质组成情况，为多肽药物合成的质量控制、生产工艺的优化与调整提供参考与依据。

关键词： MALDI-TOF 多肽药物 司美格鲁肽 分子量 杂质

技术特点：

- ❖ 前处理简单，无需液相分离，分析速度快，可以进行高通量检测。
- ❖ 图谱简单、直观，根据质谱图中信号峰质荷比的大小及组成可快速确认多肽药物的精确分子量与杂质组成情况。

司美格鲁肽（Semaglutide，又叫索马鲁肽）是一款长效胰高糖素样肽-1（GLP-1）类似物，为2022年销售额最高的多肽药物，用于治疗2型糖尿病，同时因“减肥”效果备受推崇，在美国已获批用于治疗肥胖症。

多肽药物的合成方法包括通过动植物中提取、化学合成和基因重组三种，其中化学合成占比在90%以上。对合成的多肽药物进行分子量及杂质的确认，是药物质量控制的必要环节。本文展示了应用台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8030对某种按照半重组制备法生产的在研司美格鲁肽合成中间体及制剂进行分子量及杂质进行快速确认的例子，可作为多肽药物合成快速质控的参考。

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-8030

1.2 分析条件

调谐模式	： 线性正离子模式	激光能量	： 50
激光器	： 355 nm 固态激光器	离子门限值	： 1000
扫描范围	： m/z 1000-10000	脉冲引出质量(Da)	： 4000

1.3 样品前处理

样品：司美格鲁肽合成中间体及制剂。

取0.5 μL样品工作液和0.5 μL CHCA（α-氰基-4-羟基肉桂酸）基质溶液（10 mg/mL）依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。在质谱采集软件上选择待分析的样品靶点，可在几分钟内实现数十个样品的批量采集。

2. 结果与讨论

司美格鲁肽通常按照半重组法合成，主要合成路线包括：1. 酿酒酵母重组表达获得 GLP-1 类似物前体分子；2. 使用酰化剂在前体分子 Lys₂₆ 残基的ε-氨基进行酰化得到前体分子衍生物；3. 前体分子衍生物与包含非蛋白氨基酸的 N 端氨基酸突出端进行偶联，获得偶联后终产物；4. 对司美格鲁肽进行分离纯化，做成制剂。司美格鲁肽合成过程见图 1，应用 MALDI-8030 对某企业提供的在研司美格鲁肽合成中间体分子量及杂质进行检测的统计结果见表 1，质谱图见图 2-图 5。

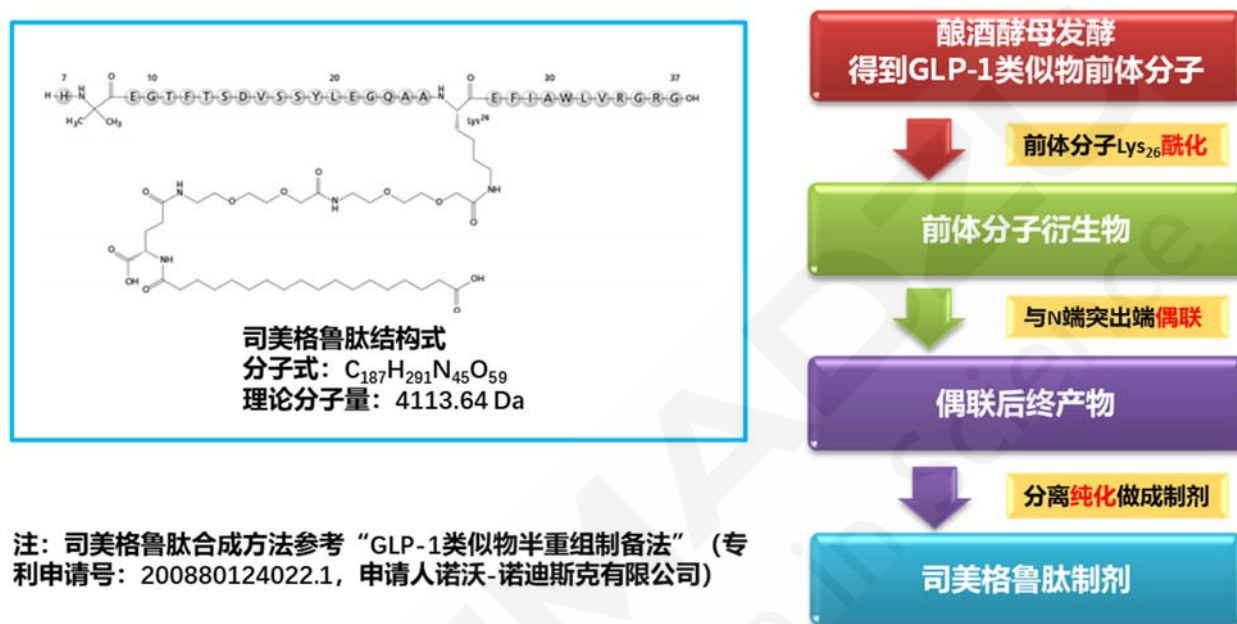


图 1. 司美格鲁肽合成过程

表 1. 司美格鲁肽合成中间体、制剂分子量及杂质检测结果

#	名称	分子式	理论 [M+H]	实测 [M+H] ⁺	杂质
1	前体分子	C ₁₄₂ H ₂₁₆ N ₃₈ O ₄₅	3176.52	3176.23-	无明显杂质信号
2	前体分子 衍生物	C ₁₇₇ H ₂₇₇ N ₄₁ O ₅₇	3892.40	3891.99	m/z 3275.49、m/z 3354.49、m/z 3621.47、m/z 2135.24 等
3	偶联后终 产物	C ₁₈₇ H ₂₉₁ N ₄₅ O ₅₉	4114.65	4114.66	m/z 3821.16、m/z 3598.14、m/z 4215.26、m/z 2107.81 等
4	司美格鲁 肽制剂	C ₁₈₇ H ₂₉₁ N ₄₅ O ₅₉	4114.65	4114.38	-

2.1 GLP-1 类似物前体分子

由酵母重组表达的 GLP-1 类似物前体分子应用 MALDI-8030 检测到 m/z 3176.23 信号峰 (图 2)，与 [M+H]⁺理论值 m/z 3176.52 相符，质谱图信噪比良好，图谱上未观测到明显杂质，表明前体分子纯度较好。



图 2. GLP-1 类似物前体分子的质谱图

2.2 前体分子衍生物

GLP-1 类似物前体分子经酰化后检测到前体分子 (m/z 3176.28) 与前体分子衍生物的离子峰 (m/z 3891.99) (图 3),表明肽段修饰成功,但反应不完全,反应体系中仍有较多前体分子残留。除此之外,还检测到 m/z 3275.49、 m/z 3354.49、 m/z 3621.47、 m/z 2135.24 等信号峰,可能为合成过程中的副产物。

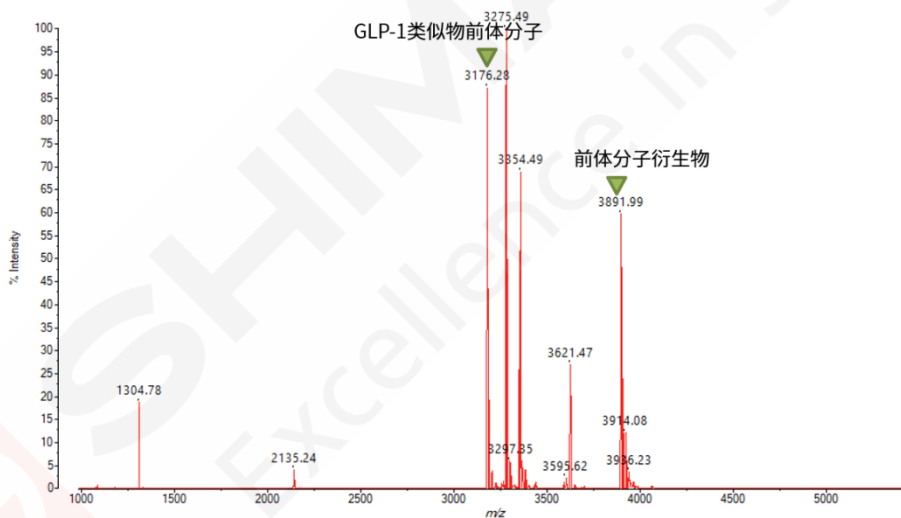


图 3. 前体分子衍生物的质谱图

2.3 偶联终产物

图 5 中,前体分子衍生物与 N 端氨基酸突出端偶联后的产物检测到前体分子衍生物 (m/z 3892.54) 与偶联后目标产物的离子峰 (m/z 4114.66),表明肽段偶联成功,但反应不完全,反应体系中仍有较多未偶联的前体分子衍生物的残留。除此之外,样品还检测到较多杂质,包括 m/z 3821.16、 m/z 3598.14、 m/z 4215.26、 m/z 2107.81 等,可能为偶联过程中产生。对杂质进行分析,有助于生产工艺的调整与优化。

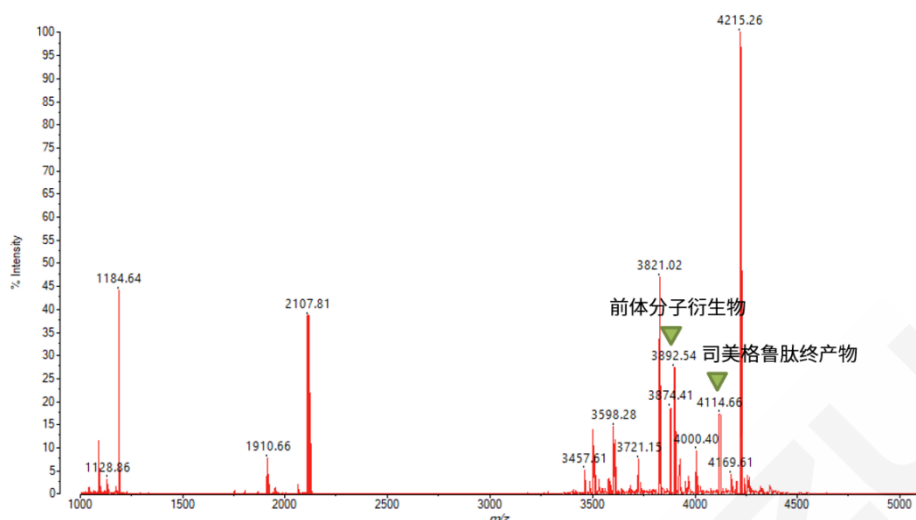


图 4. 偶联后终产物的质谱图

2.4 司美格鲁肽制剂

司美格鲁肽制剂应用 MALDI-8030 检测到 m/z 4114.38、 m/z 2057.88、 m/z 8228.42 的离子峰（图 5），分别对应化合物的 $[M+H]^+$ 、 $[M+2H]^{2+}$ 与 $[2M+H]^+$ 形式。图谱上未观测到明显杂质信号，样品纯度较好。

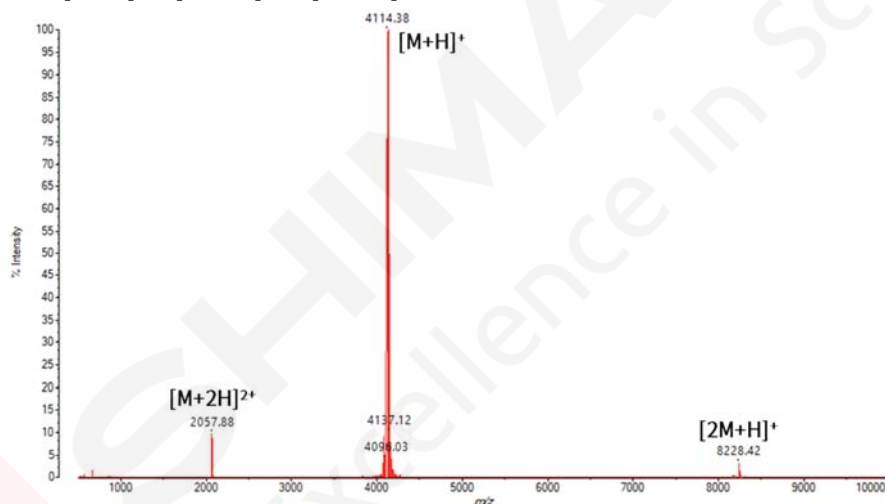


图 5. 司美格鲁肽制剂的质谱图

3. 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-8030 对司美格鲁肽在研合成中间体及制剂产品进行分子量及杂质检测，无需液相分离以及复杂的解卷积等数据分析操作，分析速度快，结果简单、直观，通过质谱图中信号离子的质荷比的大小与分布，快速确认多肽的精确分子量、合成效果及杂质组成情况，为多肽药物合成的质量控制、生产工艺的优化与调整提供参考与依据。

注射用胸腺法新聚集体分析

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 MALDI-8020 对注射用胸腺法新制剂及原料药进行质谱分析，可直接检测制剂中胸腺法新不同的聚集体形式，表明台式 MALDI-8020 可以简便、快捷地对胸腺法新进行聚集体分析，MALDI-8020 有望在多肽药物的聚集体评价方面有更加广泛的应用。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 胸腺法新 聚集体

胸腺法新 (thymalfasin) 是一种化学合成的由28个氨基酸组成的多肽药物制剂，具有提高免疫功能的作用，临床上可用来治疗慢性乙型肝炎，也可作为免疫损害患者的疫苗免疫增强药。2020年新冠疫情期间，注射用胸腺法新被抗疫一线广泛应用，用于提高一线医务人员的抗病毒免疫能力，国家卫健委也将胸腺法新写入《新型冠状病毒肺炎重型、危重型病例诊疗方案（试行第二版）》。

作为一种多肽类药物，胸腺法新在生产、储存和运输过程中易形成聚集体，给药时，聚集体的存在可能导致免疫原性反应（例如常见的过敏反应），影响药物的安全性和有效性。因此对药物中的聚集体进行监测和评价，是对药物进行质量评价的一个重要方面。

本文应用台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8020在线性模式下对不同厂家来源的商品化注射用胸腺法新以及某厂家的胸腺法新原料药进行检测，方法简单、快捷，结果直接可靠，可作为多肽药物聚集体分析的日常监测手段。

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 2000-50000

激光能量：80-100

1.3 样品前处理

取0.5 μL样品溶液及0.5 μL CHCA基质溶液依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

2.1 商品化注射用胸腺法新聚集体检测

将某商品化注射用胸腺法新使用配套的注射水溶解后，取 0.5 μL 溶液点靶并覆盖 CHCA 基质后直接使用 MALDI-8020 进行检测，结果见图 1。由质谱图可见，检测到 m/z 3109.02 与 m/z 6200.4 的显著离子峰，其中 m/z 3109.02 与胸腺法新的单体加氢峰 ($[M+H]^+$)分子量相符（胸腺法新单体理论相对分子质量为

3108.28 Da, 加氢峰理论质荷比为 3109.29), 为胸腺法新单体的离子峰; m/z 6200.4 约是胸腺法新单体相对分子量 (3108.28) 的 2 倍, 推测为胸腺法新的二聚体, 可能在结合形成二聚体时脱掉了相对分子质量为 17 Da 的基团。

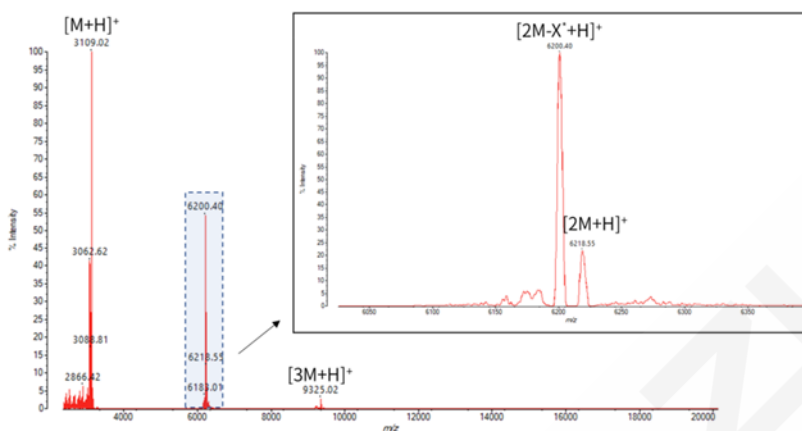


图 1. 商品化注射用胸腺法新质谱图 (m/z 2000-20000) (注: X^* 代表分子量为 17 Da 的基团)

将胸腺法新的二聚体质谱图进行局部放大 (图 2), 可以观测到 m/z 6218.55 的离子峰, 对应为二聚体的加氢峰 ($[2M+H]^+$)。除单体及二聚体外, 样品还检测到三聚体、四聚体等多聚体的离子峰 (图 2 a, b)。

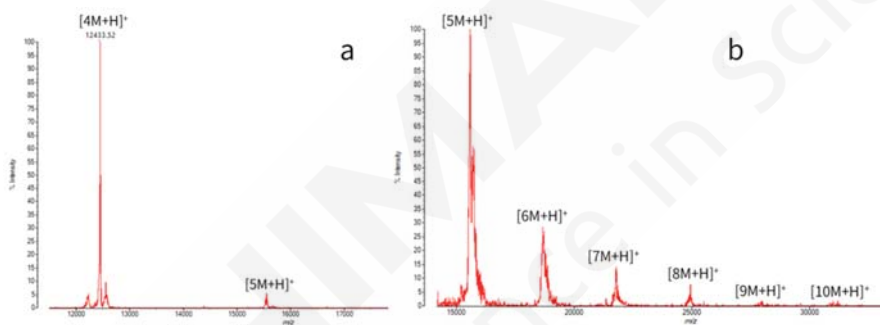


图 2. 商品化注射用胸腺法新质谱图. a. m/z 12000-20000; b. m/z 15000-35000

同法对另一品牌产品进行相关测试, 同样发现较为明显的胸腺法新二聚体、三聚体等多聚体形式的存在(图 3)。

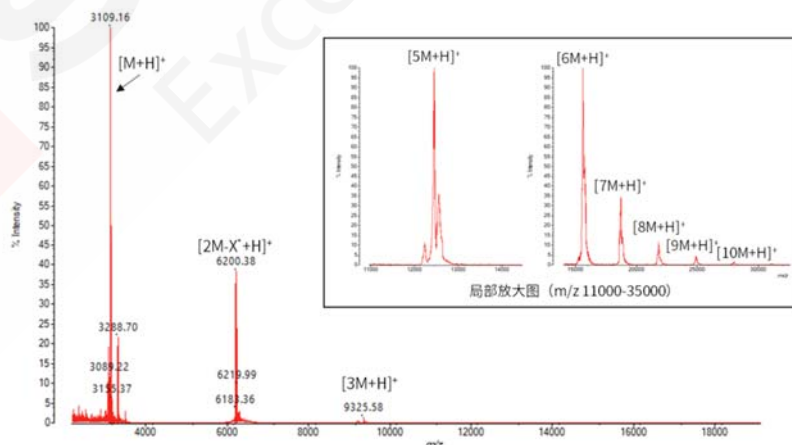


图 3. 另一品牌注射用胸腺法新产品的质谱图 (m/z 12000-20000)

a. m/z 2000-20000 (注: X^* 代表分子量为 17 Da 的基团); b. m/z 12000-20000; c. m/z 15000-35000

2.2 胸腺法新原料药聚集体分析

为判断这些聚集体是否是在生产过程中产生，对胸腺法新原料药进行了检测，结果见图 4。由质谱图可见，胸腺法新二聚体在原料药中就存在，但未检测到明显的三聚体、四聚体等其他多聚体形式。

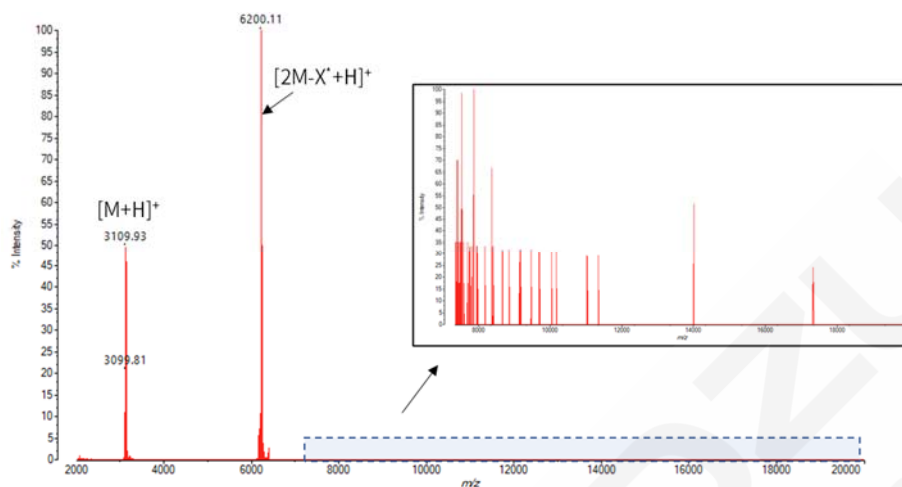


图 4. 胸腺法新原料药质谱图（注：X*代表分子量为 17 Da 的基团）

对胸腺法新原料药中的二聚体进行液相分离纯化，质谱检测结果显示样品中的化合物形式以二聚体为主（图 5）。这表明了检测本身的可靠性，检测结果与样品状态一致，检测环节本身并不会引起聚集体形式的变化，MALDI-8020 可以较为可靠地对制剂中的多肽聚集体的产生进行监测，对生产过程中及商品化的注射用胸腺法新进行质量控制。

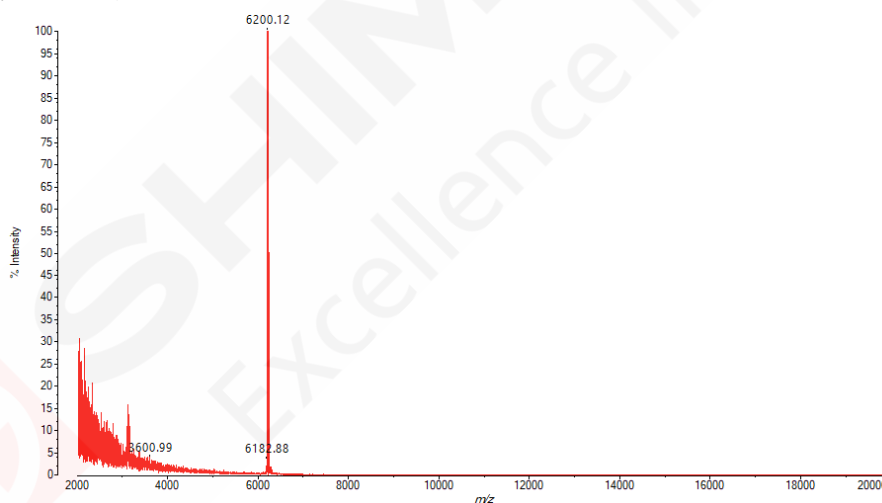


图 5. 经分离纯化的胸腺法新二聚体质谱图 (m/z 15000-35000)

3. 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 对注射用胸腺法新制剂和原料中的多肽聚集体进行了分析，无需样品前处理及液相分离，可直接通过分子量的大小对制剂中聚集体的存在情况进行监测。同时，由于可以获取多肽的精确分子量，可以对样品中多肽的组成、杂质进行分析，有望在多肽药物聚集体评价方面有更加广泛的应用。

磷酸化蛋白质鉴定

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

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

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

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

■ 台式 MALDI-8020

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

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

■ 线性模式的有效性

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

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

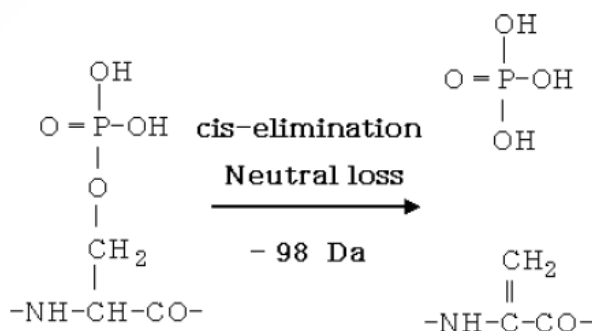


图1 Ser的磷酸化修饰和中性丢失

■ 磷酸化蛋白质序列分析例

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

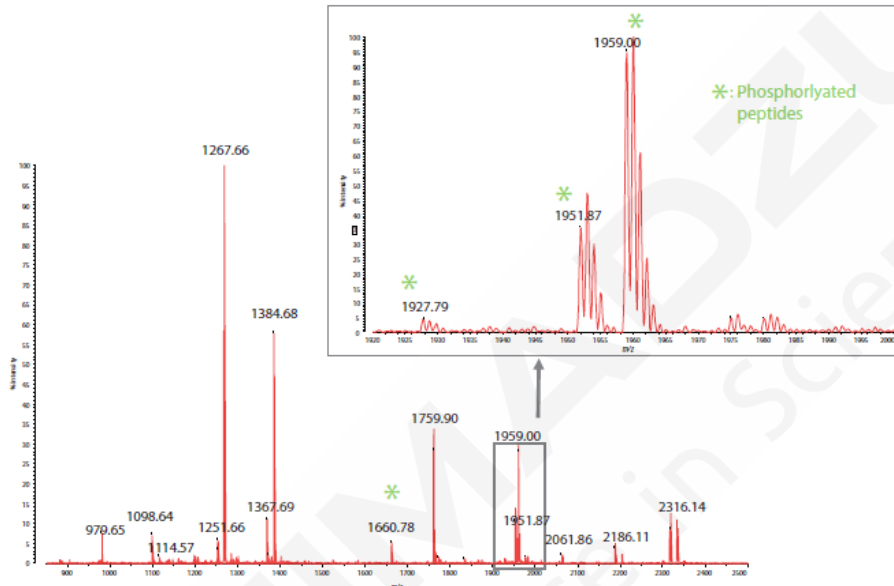


图2 α 酪蛋白的胰蛋白酶酶解物的质谱图

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta M	Peptide
2 - 18	1959.0000	1957.9927	1958.1515	-0.1588	M.KLLILTCCLVAVALAREK.E + Phospho (ST)
23 - 37	1759.9000	1758.8927	1758.9377	-0.0449	K.HQGLFQEVLNENLLR.F
38 - 49	1384.6800	1383.6727	1383.7227	-0.0500	R.FFVAFDFEVPCK.E
58 - 73	1927.7900	1926.7827	1926.6843	0.0985	K.DIGSESTEDQAMEDIK.Q + 2 Phospho (ST)
106 - 115	1267.6600	1266.6527	1266.6972	-0.0445	R.YLQYLEQLLR.L
119 - 134	1951.8700	1950.8627	1950.9452	-0.0824	K.YRVPQLKIVPNSAERK.L + Phospho (ST)
121 - 134	1660.7800	1659.7727	1659.7869	-0.0142	K.VPQLKIVPNSAERK.L + Phospho (ST)
148 - 166	2316.1400	2315.1327	2315.1296	0.0031	K.EPMIGVNGSLAYTFPELFR.Q

图3 MS/MS Ion Search 的结果

■ 总结

通过台式MALDI-TOF MS MALDI-8020进行了序列分析，并获得了大型MALDI-TOF MS质谱仪相媲美的数据，证明了鉴定磷酸化蛋白质以及磷酸化位点的有效性。近年来，MALDI-TOF MS的发展越来越高端化，同时体积变大，结构更复杂。因此大多数需要线性模式分析的常规应用，这些仪器通常是多余的。而且产品尺寸，购买和维护成本也构成了一个很大的障碍。MALDI-8020是世界上最小的线性MALDI-TOF MS，可满足线性模式下蛋白质分析的需求，并有望在生物化学和分子生物学中广泛应用。

In-Source Decay源内裂解法分析蛋白质序列

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

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

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

■ 台式 MALDI-8020

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

■ 蛋白质分子量测定

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

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

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

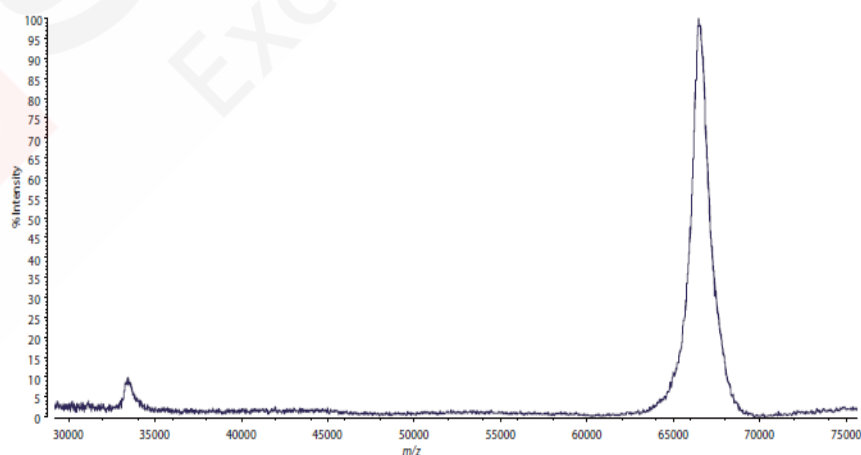


图 1 微量蛋白质（牛血清白蛋白）的质谱图

■ 基于 ISD 的蛋白质序列分析

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

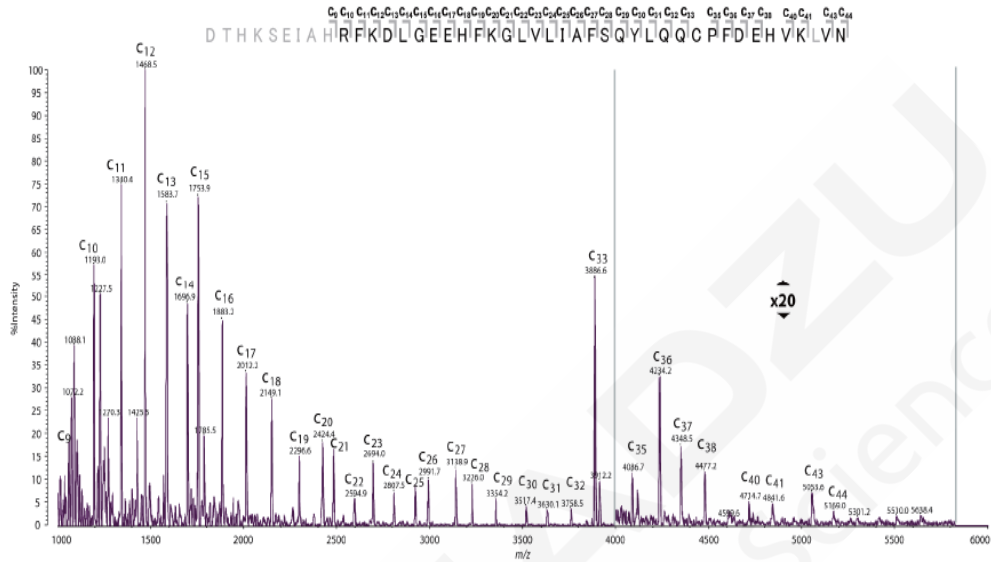


图 2 基于 ISD 的牛血清白蛋白序列分析

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

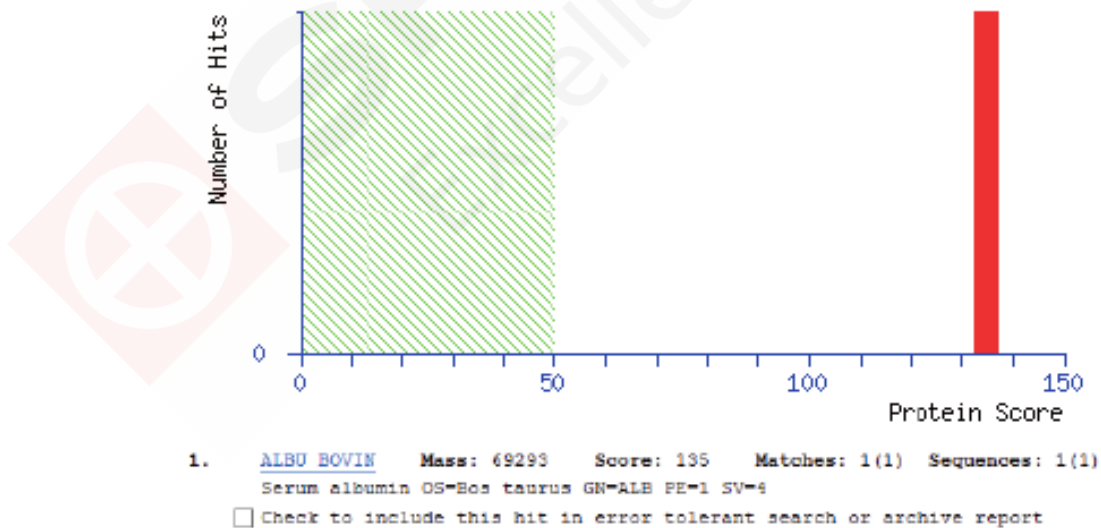


图 3 MS/MS Ion Search 结果

■ 结论

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

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

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



SHIMADZU
Excellence in Science

甲硫氨酸氧化修饰蛋白检测

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

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

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

■ 样品和方法

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

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

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

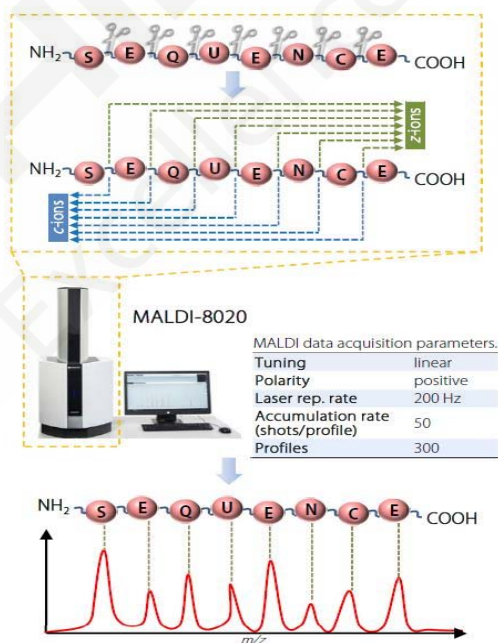


图 1. MALDI-ISD 的工作流程及质谱采集参数

■ 结果

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

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

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

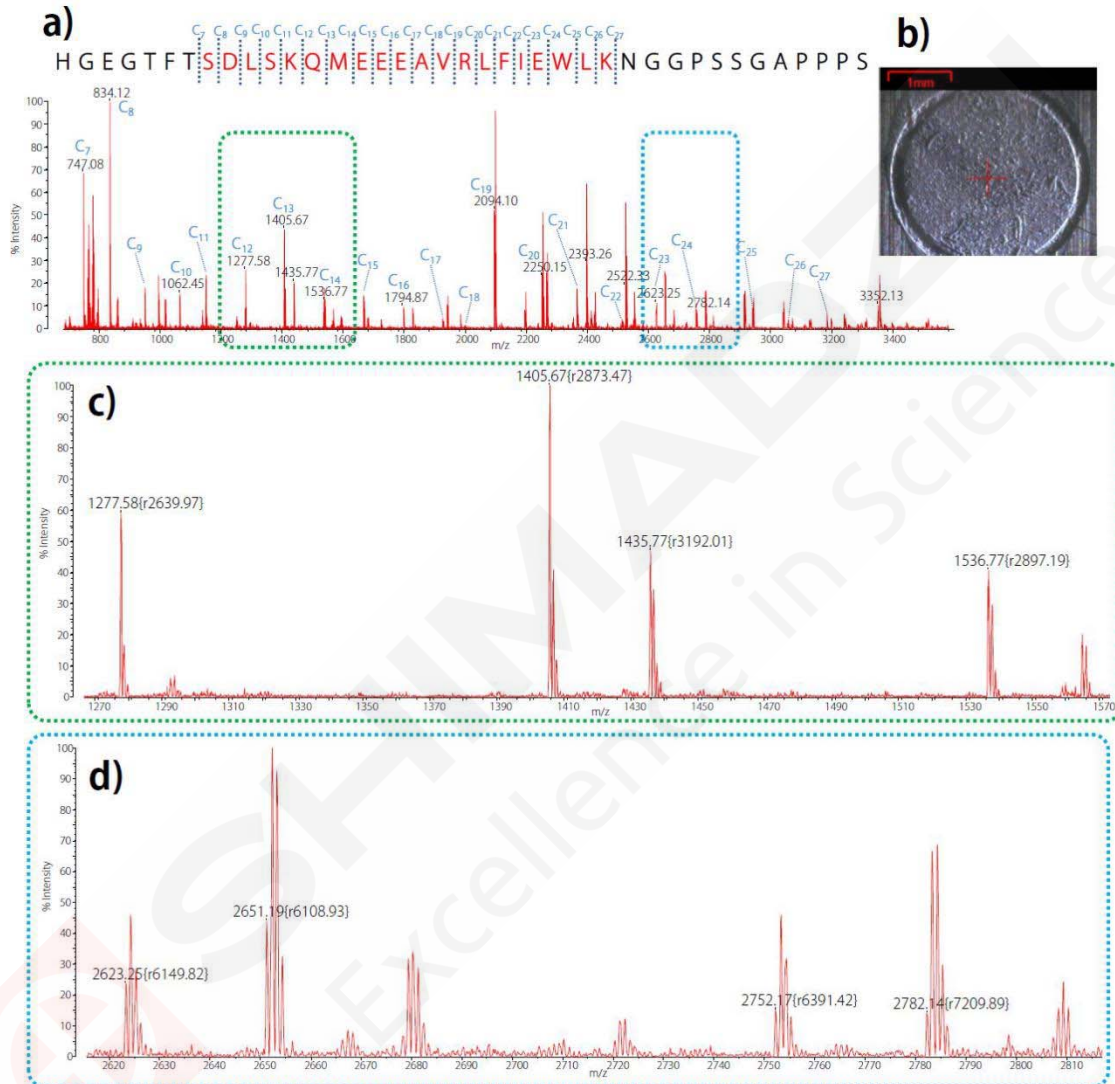


图 2. a) 天然 Exendin-4 的 MALDI-MS/MS 谱图; b) 使用 1,5-DAN 作为基质的良好的摄像机图像; c) & d) MS/MS 谱图的放大图

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

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

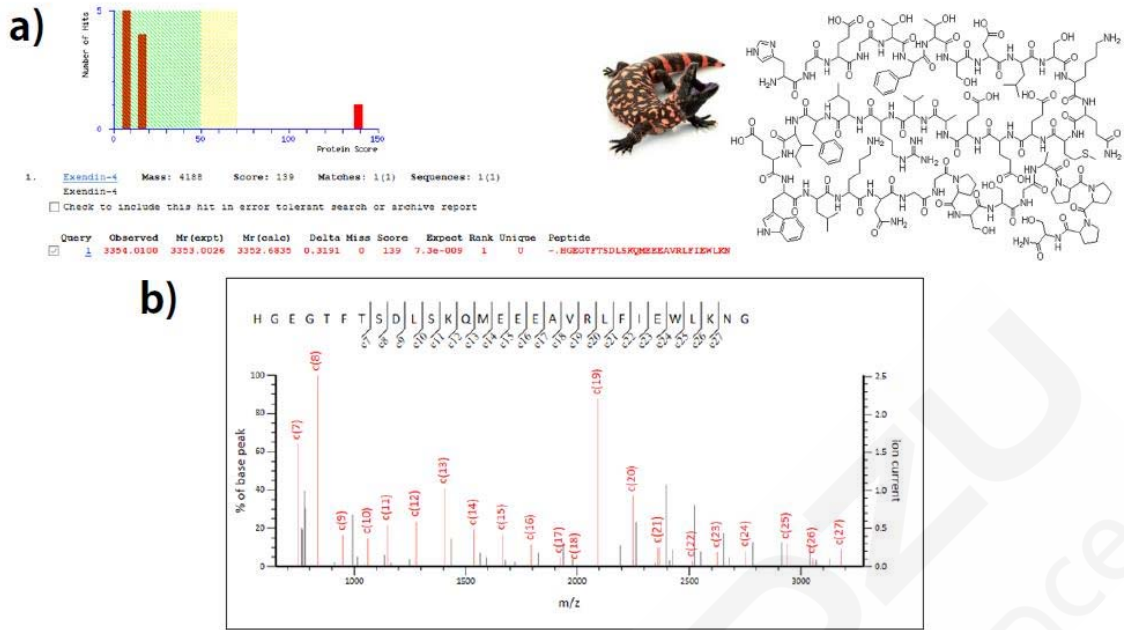


图 3. a) MALDI-MS/MS 的 Mascot 检索结果; b) Mascot 碎片离子匹配图

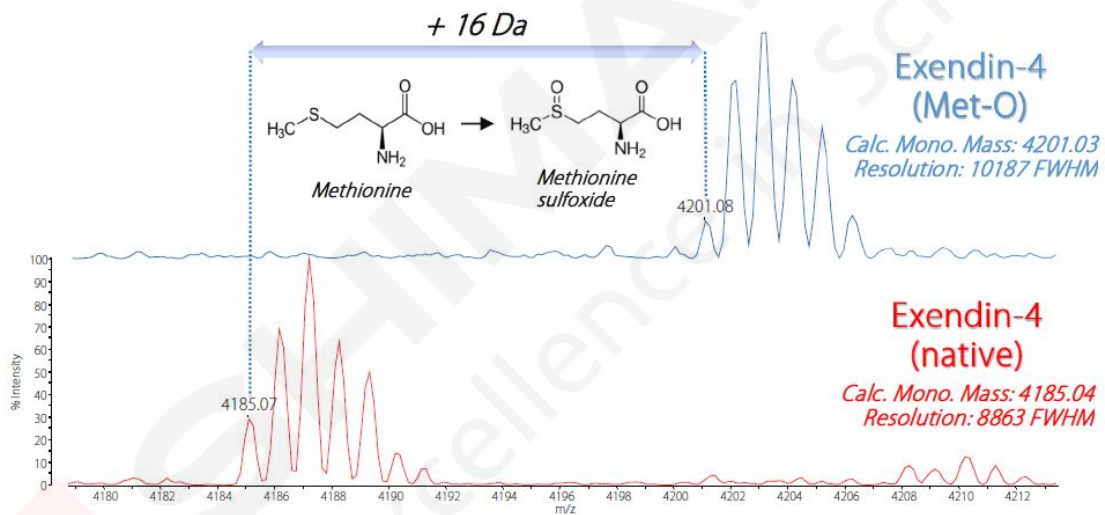


图 4. 天然型 Exendin-4 (红线) 及 Met-O (蓝线) Exendin-4 的一级质谱图 (基质: CHCA)

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

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

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

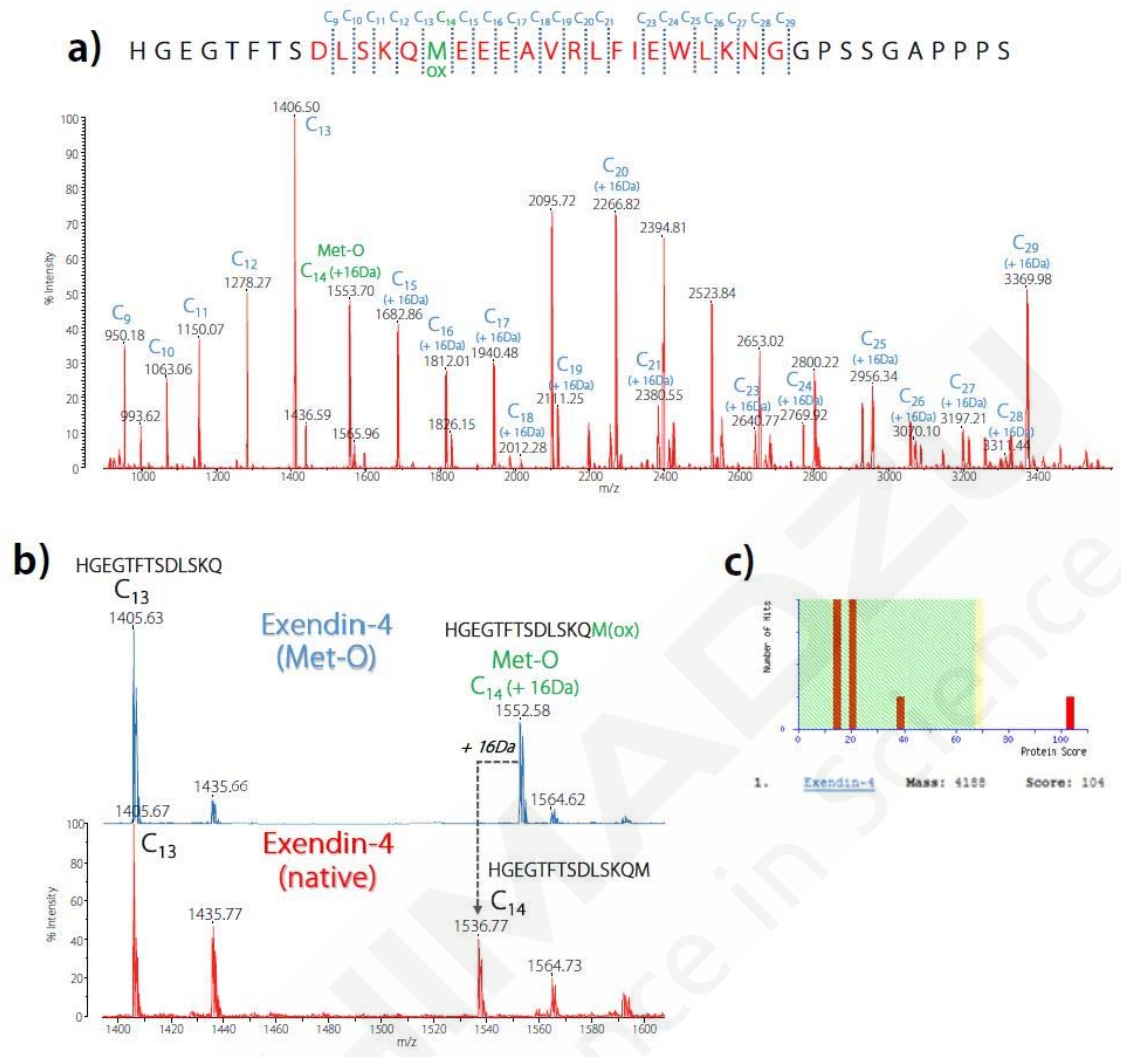


图 5. a) Exendin-4 (Met-O) 的 MALDI-MS/MS 谱图; b) 显示甲硫氨酸氧化导致质谱迁移的碎片离子 (c14) 的局部放大图; c) Exendin-4 (Met-O) 的 Mascot-MS/MS 得分

动物毛发鉴别

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

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

■ 样品的预处理

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

使用ZipTip® μC18 (Merk Millipore) 进行脱盐处理。将完成脱盐处理的样品溶液滴加到MALDI 靶板后, 滴加0.5 μL 的基质溶液, 进行质谱分析。此外, 为保证基质中CHCA (α - cyano-4-hydroxycinnamic acid) 为5 mg/mL, 使用溶解于50 %乙腈/0.05 %三氟醋酸 (trifluoroacetic acid, TFA) 的溶液。

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

■ 结果

动物毛发的胰蛋白酶消化肽的质谱如图1所示。在m/z2450-2750范围内, 检测出具有物种属特异性的肽谱峰。利用该特异性谱峰可辨别动物毛发。构成动物毛发的蛋白质主要为角蛋白, 检测出的肽也来自角蛋白。

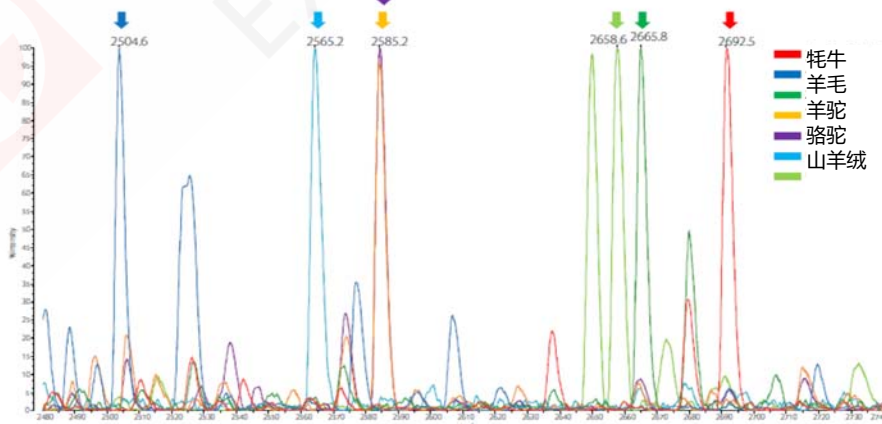


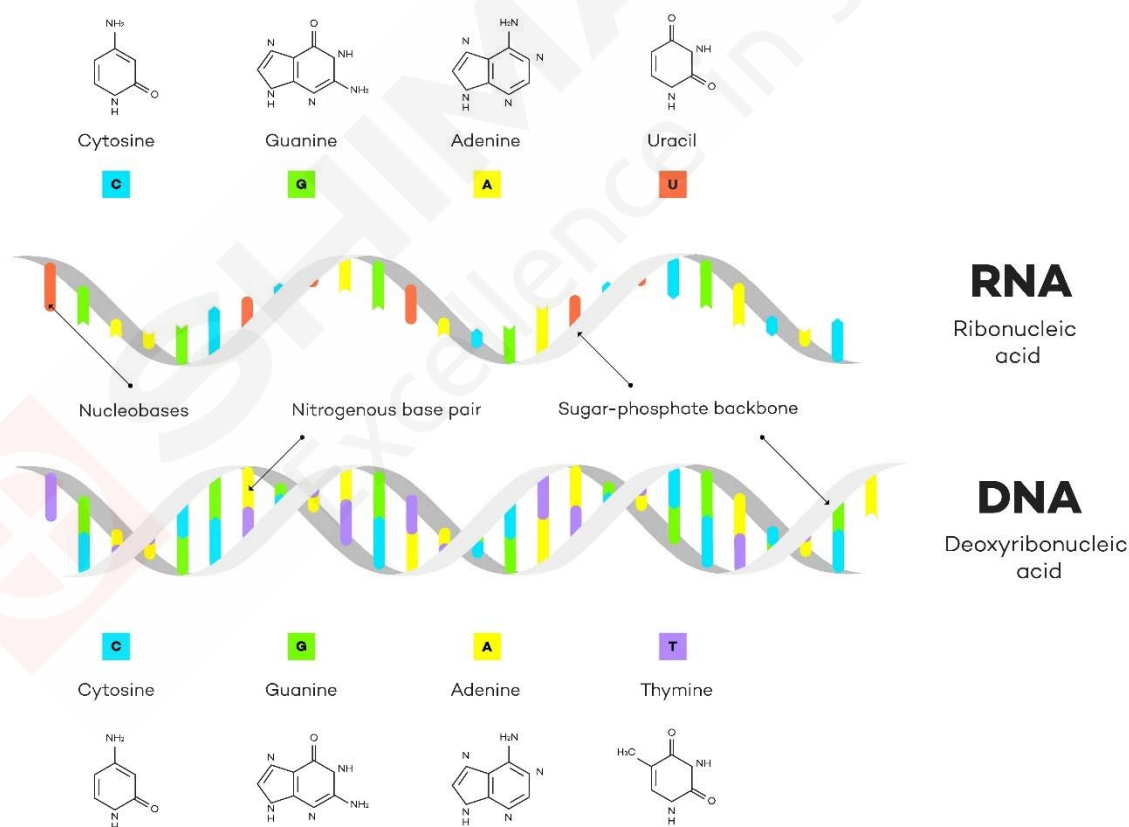
图 1 动物毛发的胰蛋白酶消化肽的质谱

2.2 核酸分析

作为生命的遗传物质，核酸在生命科学研究中占据着至关重要的地位，有关核酸的分子生物学研究已然成为极具活力的研究方向之一。近些年来，核酸类药物在基因治疗和基因诊断领域展现出了优良的应用前景。由此，建立起快速且准确的寡核苷酸分子量测定以及序列分析方法显得极为必要。

基于核酸分子的病毒检测技术于近年来迅猛发展，在多种病原体的检测方面得到了广泛应用，呈现出极高的临床应用价值。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年代起就已被应用于单核苷酸多态性（SNP）的检测。近期，在临床病毒学领域中已报道了基于多重PCR和MALDI-TOF的检测手段，该方法已被证实是用于高通量诊断或基因分型应用的极具前景的方法。此方法涵盖了三个步骤：目标核酸的多重PCR扩增、质量探针的单碱基延伸以及产物的质谱鉴定。当下，该方法已成功运用于各类病毒感染的诊断，诸如口蹄疫、乳头状瘤病毒感染以及冠状病毒感染等。此外，该技术还能够开展遗传性疾病的筛查工作，例如软骨发育不全基因筛查、耳聋基因热点突变检测等。

此外，MALDI-TOF 对还可以对寡核苷酸合成原料、合成产物、杂质等进行分子量检测，分析速度快，图谱简单直观，通过质谱图中信号峰的强弱与分布可快速确认精确分子量与杂质组成情况，为寡核苷酸化学合成质控提供直接依据。



DNA和RNA分子结构

共转录加帽后mRNA的帽子端定性分析

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 MALDI-8020 对 mRNA 加帽样品进行质谱分析, 可直接检测到样品中帽子的形式及相对含量, 表明台式 MALDI-8020 可以简便、快捷地对共转录加帽后的 mRNA 进行帽子端的分析, 为 mRNA 药物和疫苗的质量控制提供方法参考。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF mRNA 加帽

mRNA药物和疫苗的生产流程包括质粒DNA的扩增纯化、mRNA体外转录、体外修饰(加帽、加尾)、脂质体包被等过程。mRNA的帽结构能保护mRNA的5'端不被降解, 并能促使翻译的起始, 因此mRNA的加帽率是mRNA原液质控的重要标准之一。

mRNA的帽子指m⁷GPPPN结构的甲基鸟苷帽子, 包括cap0、cap1、cap2三种形式。cap0主要存在于单细胞生物中, 结构为m⁷GPPPN (G的第7位N氮原子被甲基化); 如果RNA的第一位核苷酸的2'-O发生甲基化, 形成m⁷GPPPNm的结构, 则为cap1, cap1在真核生物中普遍存在; 如果RNA的第1、2位核苷酸的2'-O位均甲基化(第2位必需是A), 成为m⁷G-PPPNmNm, 则为cap2, cap2的发生较少。常见的mRNA的加帽方法包括共转录加帽以及单独使用加帽酶进行转录后加帽两种。共转录加帽为一步法加帽, 在转录时加入帽子类似物, 可直接生成cap1的帽子结构。

本文应用台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8020对共转录加帽获取的mRNA进行了帽子端的分析。

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 5000-10000

激光能量: 135

1.3 样品前处理

将mRNA按照标准前处理流程, 将含有帽子结构的5'端核苷酸序列进行酶解和纯化, 得到待分析的样品溶液。吸取1 μL 样品溶液和1 μL 3-HPA (3-羟基吡啶甲酸) 基质溶液 (50 mg/mL) 依次点靶, 自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

对两份处理好的 mRNA 样品应用 MALDI-8020 进行质谱检测, 质谱图见图 1-图 2。质谱图中均观测到 cap1 离子峰, 质荷比约 7678, 与理论值 (m/z 7678.6) 一致, 未检测到 uncap (m/z 7384.5) 的离子峰, 表明 mRNA 样品的加帽效率非常高, 不含 uncap 或者 uncap 的含量低于 MALDI 的检测限。同时, 未检测到 cap0 (m/z 7664.6), 与样品中帽子的结构形式为 cap1, 不含 cap0 一致。检测结果统计见表 1。

除帽子外,样品中还检测到探针的离子峰 (m/z 8086),为前处理过程中引入。另外,还检测到 m/z 6238、 m/z 7938 等离子峰,可能是样品在前处理环节产生的杂质。两份样品质谱图中离子分布模式相似,平行性较好,表明加帽及酶切等前处理实验环节重复性较好、质谱检测稳定可靠。

表 1. mRNA 加帽样品检测结果

帽子	[M+H] ⁺ 理论值	样品 1 检测值	样品 2 检测值
uncap	7384.5	-	-
cap0	7664.6	-	-
cap1	7678.6	7678.0	7677.8

cap1 序列: m7GpppmAGGAAAUAGAGAGAAAACUCU, 平均分子质量 7677.6 Da。

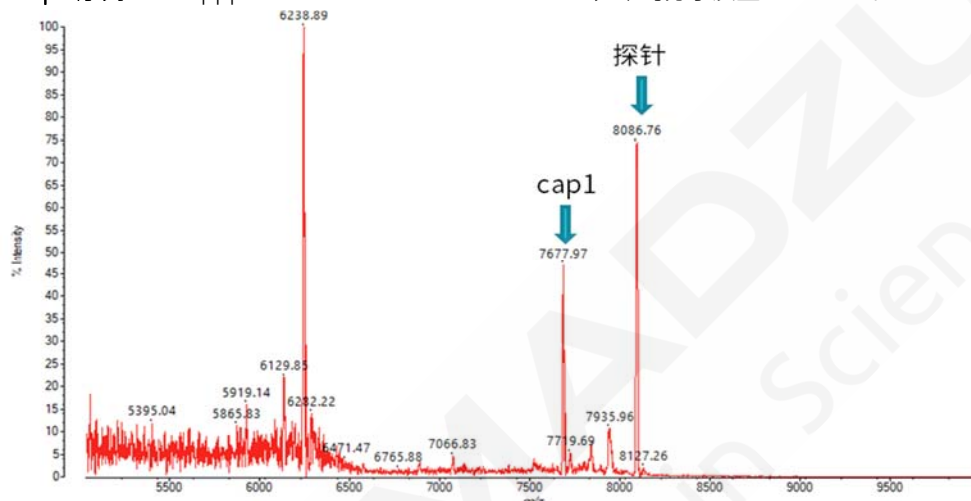


图 1. mRNA 样品 1 质谱图

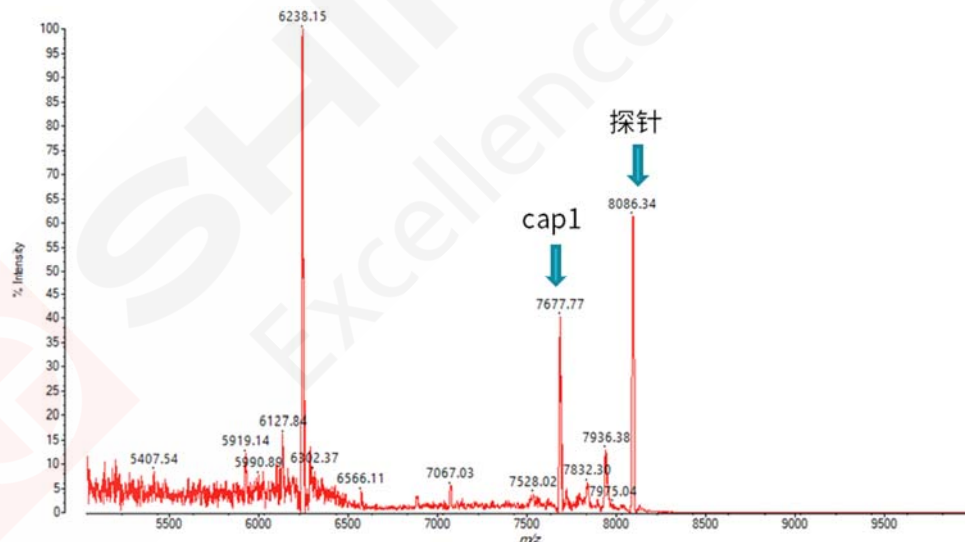


图 2. mRNA 样品 2 质谱图

3. 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 对共转录加帽后的 mRNA 样品进行帽子端的分析,可直接检测到样品中帽子的形式及相对含量。本方法操作简单、检测成本低、分析速度快,结果直接、准确、可靠,有望在 mRNA 药物和疫苗生产质控方面有更加广泛的应用。

mRNA 和 DNA 生产用核苷酸原料的分子量检测

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 MALDI-8020 对 mRNA 和 DNA 生产所用的 NTP 和 dNTP 原料进行质谱分析，可直接检测到核苷酸原料的分子量及组成形式。本方法操作简便、分析速度快，结果直接可靠，为 mRNA 和 DNA 生产相关原料的质量控制提供了参考。

关键词： MALDI-TOF mRNA DNA 原料 NTP dNTP

技术特点：

- ❖ 一次实验可直接检测到核苷酸原料的分子量及组成形式。
- ❖ 本方法无需复杂的样品前处理，操作简便，分析速度快，可以进行高通量检测。

mRNA和DNA生产过程中需要用到多种核苷酸类原料。例如，mRNA生产时，体外转录的直接原料为NTP (ATP、UTP、CTP、GTP)，DNA聚合酶生产DNA时的直接原料为dNTP (dATP、dTTP、dCTP、dGTP)。核苷酸原料的检测与分析是mRNA和DNA生产物料质控的重要一环。

本文应用台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8020对NTP、dNTP原料进行了分析，直接检测到了原料的分子量及分子组成形式。该检测方法无需复杂的样品前处理、操作简单、分析速度快，检测通量高，结果直接可靠，可作为核酸原料质控的日常检测手段。

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	激光能量	： 75-80
激光器	： 355 nm 固态激光器	离子门阈值	： 300
扫描范围	： m/z 300-2000	脉冲引出质量(Da)	： 1500

1.3 样品前处理

取样品加水稀释为100 μ M，作为样品工作液。吸取0.5 μ L NaTFA溶液 (1 mg/mL)、1.1 μ L DHB基质溶液 (30 mg/mL) 依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

2.1 mRNA 体外转录原料 NTP 分子量及组成分析

应用 MALDI-8020 对 mRNA 体外转录原料 ATP、GTP、CTP、UTP 进行检测，结果见图 2，核苷酸的分子式、理论分子量、实测分子量见表 1。以图 2A 为例，ATP 检测到 m/z 530.12、m/z 552.16、m/z 574.13、m/z 596.11 的离子峰，依次对应 ATP 的 $[M+Na]^+$ 、 $[M+2Na-H]^+$ 、 $[M+3Na-2H]^+$ 以及 $[M+4Na-3H]^+$ 的化合物形式^[1,2]，可能为 ATP 中三磷酸基团上 H 离子被 Na 离子部分或全部取代后的产物。同样地，GTP、CTP、UTP

也依次检测到了结合 1-4 个 Na 离子的化合物离子形式，结果见表 1 及图 2。除核苷酸目标峰外，样品还检测到基质背景峰，如 m/z 551。

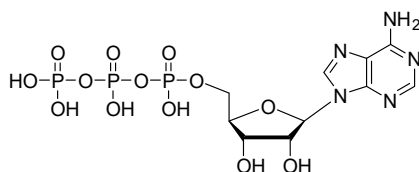


图 1. ATP（三磷酸腺苷）结构式（核苷酸结构式示例）

表1. NTP分子式及分子量检测结果

名称	分子式	[M+Na] ⁺ _{mono}		[M+2Na-H] ⁺ _{mono}		[M+3Na-2H] ⁺ _{mono}		[M+4Na-3H] ⁺ _{mono}	
		理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值
ATP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	529.99	530.12	551.97	552.16	573.95	574.13	595.93	596.11
GTP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₄ P ₃	545.98	546.15	567.96	568.10	589.94	590.08	611.93	612.05
CTP	C ₉ H ₁₆ N ₃ O ₁₄ P ₃	505.97	506.12	527.96	527.94	549.94	549.83	571.92	571.88
UTP	C ₉ H ₁₅ N ₂ O ₁₅ P ₃	506.96	507.02	528.94	528.85	550.92	550.93	572.90	--

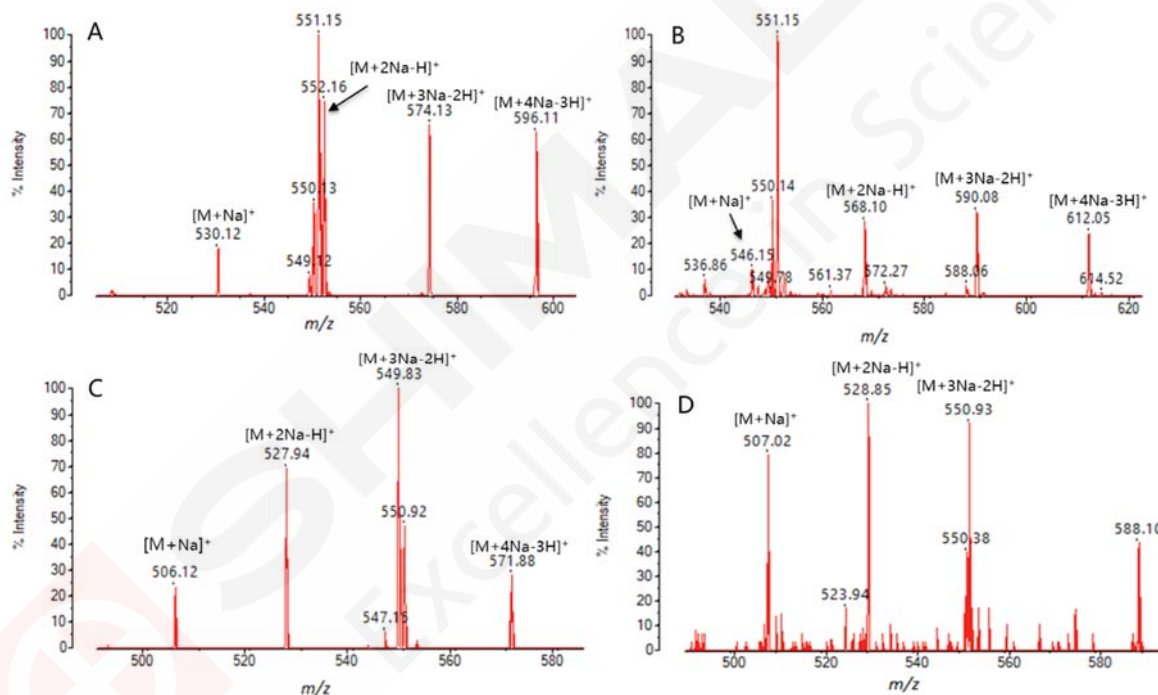


图 2. RNA 药物生产原料 NTP 一级质谱图 (A: ATP, B: GTP, C: CTP, D: UTP)

注：m/z 551 为基质背景峰

2.2 聚合酶链式反应生产 DNA 药物原料 dNTP 分子量及分析

应用 MALDI-8020 对聚合酶链式反应生产 DNA 药物原料 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 进行检测，结果见图 3。如图 3A 所示，dATP 检测到 m/z 514.16、m/z 536.04、m/z 558.03、m/z 579.99 的离子峰，依次对应 dATP 的 [M+Na]⁺、[M+2Na-H]⁺、[M+3Na-2H]⁺ 以及 [M+4Na-3H]⁺ 的化合物形式，可能为 dATP 中三磷酸基团上 H 离子被 Na 离子部分或全部取代后的产物。同样地，dGTP、dCTP、dTTP 也依次检测到了结合 1-4 个 Na 离子的化合物离子形式，结果见表 2 及图 3。

表2. dNTP分子式及分子量检测结果

名称	分子式	$[M+Na]^+_{\text{mono}}$		$[M+2Na-H]^+_{\text{mono}}$		$[M+3Na-2H]^+_{\text{mono}}$		$[M+4Na-3H]^+_{\text{mono}}$	
		理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值
dATP	$C_{10}H_{16}N_5O_{12}P_3$	513.99	514.16	535.97	536.04	557.95	558.03	579.94	579.99
dGTP	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	529.99	530.08	551.97	552.09	573.95	574.04	595.93	596.04
dCTP	$C_9H_{16}N_3O_{13}P_3$	489.98	489.98	511.96	511.98	533.94	533.90	555.93	555.95
dTTP	$C_{10}H_{17}N_2O_{14}P_3$	504.98	505.23	526.96	526.98	548.94	548.91	570.92	570.95

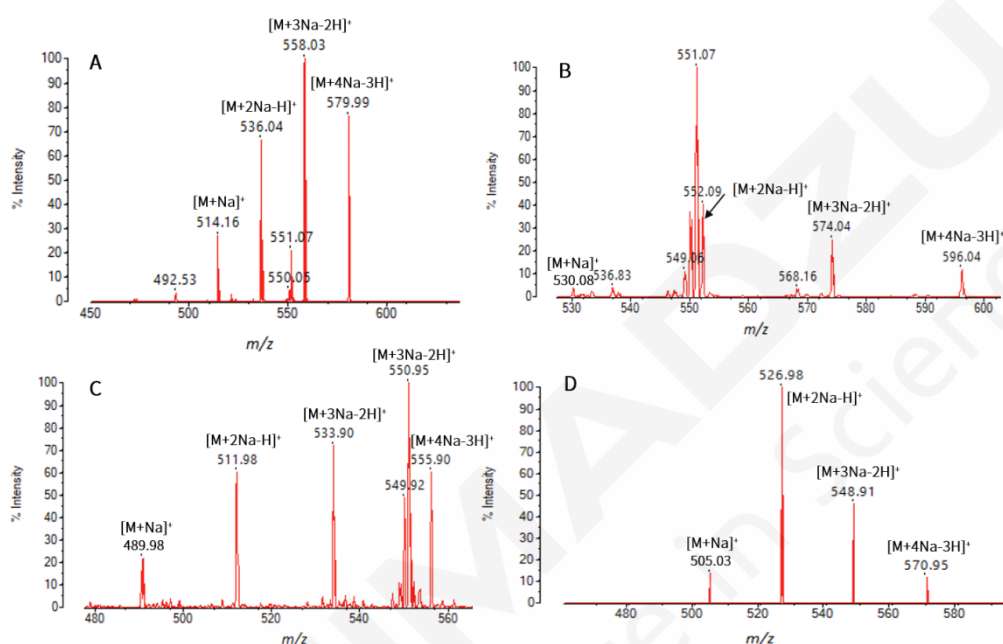


图3. DNA 药物生产原料 dNTP 一级质谱图(A: dATP, B: dGTP, C: dCTP, D: dTTP)

注: m/z 551 为基质背景峰

3. 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 对 mRNA 体外转录原料 NTP 以及 DNA 原料 dNTP 进行了分析, 所有原料均检测到了显著的加钠峰, 可以对结果进行快速确证。本方法操作简单、检测成本低、分析速度快, 结果直接、准确、可靠, 有望在 mRNA 体外转录原料和 DNA 原料质控方面有更加广泛的应用。

[参考文献]

1. Eric Largy, Alexander König, Anirban Ghosh, Debasmita Ghosh, Sanae Benabou, Frédéric Rosu, and Valérie Gabelica. Mass Spectrometry of Nucleic Acid Noncovalent Complexes. Chemical Reviews. 2022, 122, 7720-7839
2. Noah P. Christian, Steven M. Colby, Lori Giver, Chris T. Houston, Randy J. Arnold, Andrew D. Ellington and James P. Reilly. High Resolution Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Analysis of Single-stranded DNA of 27 to 68 Nucleotides in Length. RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, 1995, VOL. 9,1061-1066

寡核苷酸化学合成原料亚磷酰胺单体的分子量及杂质分析

摘要：亚磷酰胺单体是寡核苷酸药物化学合成的关键物料，对亚磷酰胺单体进行分子量及杂质分析是寡核苷酸药物生产质量控制的重要内容。本文应用台式 MALDI-8030 分析了 16 种常见的亚磷酰胺单体，包括 8 种用于合成 DNA 的亚磷酰胺单体及 8 种用于合成 RNA 的亚磷酰胺单体，可以快速获得样品的精确分子量及杂质组成情况，为寡核苷酸药物化学合成物料的质量控制提供直接依据。

关键词： MALDI-TOF 亚磷酰胺单体 分子量 杂质

技术特点：

- ❖ 无需液相分离，分析速度快，最快 5-10 秒可分析一个样品，能够进行高通量检测。
- ❖ 图谱简单、直观，根据质谱图中信号峰质荷比的大小及组成可快速分析亚磷酰胺单体的分子量与杂质组成情况。

寡核苷酸药物的合成主要是在固相上进行的基于亚磷酰胺单体的四步化学合成法：脱保护、偶联、氧化和加帽。亚磷酰胺单体是寡核苷酸原料药的关键物料，符合质量要求的亚磷酰胺单体的供应是寡核苷酸药物商业化的关键因素。在实际应用中，亚磷酰胺单体会引入各种修饰以提高体内稳定性，但经过修饰后的分子结构变得复杂多样，杂质种类繁多，因此在质量控制上具有极大的挑战。对亚磷酰胺单体的分子量及杂质进行分析是寡核苷酸药物物料质控的重要内容。本文应用台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8030对16种常用的亚磷酰胺单体的分子量及杂质进行了分析，该方法操作简单、分析速度快、结果直观，可作为亚磷酰胺单体日常快速质控的参考。

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-8030

1.2 分析条件

调谐模式	： 线性正离子模式	激光能量	： 40
激光器	： 355 nm 固态激光器	离子门阈值	： 500
扫描范围	： m/z 500-5000	脉冲引出质量(Da)	： 1800

1.3 样品前处理

使用甲醇溶解以上样品，配制为 1 mg/mL 的样品工作液。取 0.5 μ L NaTFA 溶液 (1 mg/mL)、0.5 μ L 样品工作液和 1 μ L 葱三酚基质溶液 (10 mg/mL) 依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。在质谱采集软件上选择待分析的样品靶点，可在几分钟内实现数十个样品的批量采集。最快 5-10 秒钟完成一个样品的质谱图采集。

表 1. 亚磷酰胺单体信息

序号	名称	简写	CAS	分子式	分子量 ^{mono} (Da)
1	DMT-dA(Bz)亚磷酰胺	DMT-dA	98796-53-3	C ₄₇ H ₅₂ N ₇ O ₇ P	857.37
2	DMT-dC(bz)亚磷酰胺	DMT-dC	102212-98-6	C ₄₆ H ₅₂ N ₅ O ₈ P	833.36
3	DMT-dG(ib)亚磷酰胺	DMT-dG	93183-15-4	C ₄₄ H ₅₄ N ₇ O ₈ P	839.38
4	DMT-dT 亚磷酰胺	DMT-dT	98796-51-1	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₈ P	744.33
5	DMT-2'-F-dA(Bz)亚磷酰胺	fdA	136834-22-5	C ₄₇ H ₅₁ FN ₇ O ₇ P	875.36
6	DMT-2'-F-dC 亚磷酰胺	fdC	159414-99-0	C ₄₁ H ₄₉ FN ₅ O ₈ P	789.33
7	DMT-2'-F-dG(iBu)亚磷酰胺	fdG	144089-97-4	C ₄₄ H ₅₃ FN ₇ O ₈ P	857.37
8	DMT-2'-F-dU 亚磷酰胺	fdU	146954-75-8	C ₃₉ H ₄₆ FN ₄ O ₈ P	748.30
9	DMT-2'-O-TBDMS-A(Bz)亚磷酰胺	rA	104992-55-4	C ₅₃ H ₆₆ N ₇ O ₈ PSi	987.45
10	DMT-2'-O-TBDMS-C(Ac)亚磷酰胺	rC	121058-88-6	C ₄₇ H ₆₄ N ₅ O ₉ PSi	901.42
11	DMT-2'-O-TBDMS-G(iBu)亚磷酰胺	rG	147201-04-5	C ₅₀ H ₆₈ N ₇ O ₉ PSi	969.46
12	DMT-2'-O-TBDMS-U 亚磷酰胺	rU	118362-03-1	C ₄₅ H ₆₁ N ₄ O ₉ PSi	860.39
13	DMT-2'-OMe-Bz-A 亚磷酰胺	OMe-A	110782-31-5	C ₄₈ H ₅₄ N ₇ O ₈ P	887.38
14	DMT-2'-OMe-C(Ac)亚磷酰胺	OMe-C	199593-09-4	C ₄₂ H ₅₂ N ₅ O ₉ P	801.35
15	DMT-2'-OMe-G(iBu)亚磷酰胺	OMe-G	150780-67-9	C ₄₅ H ₅₆ N ₇ O ₉ P	869.39
16	DMT-2'-OMe-U 亚磷酰胺	OMe-U	110764-79-9	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₉ P	760.32

2. 结果与讨论

16 种亚磷酰胺单体根据修饰类型的不同分为 4 组，质谱图见图 1-图 4。图 1-图 2 为用于合成 DNA 的 8 种常见亚磷酰胺单体，图 3-图 4 为用于合成 RNA 的 8 种常见亚磷酰胺单体。除 fdU、DMT-dT、rU、OMe-U 外，其他 12 种亚磷酰胺单体均检测到样品的加氢峰、加钠峰和加钾峰等三种离子加合形式，实测分子量与理论分子量一致，以加钠峰为例，测试误差在 0.2 Da 以内。fdU、DMT-dT、rU、OMe-U 等 4 种亚磷酰胺单体检测到的离子加合峰为加钠峰、加钾峰两种，未检测到明显的加氢峰，这可能与化合物的性质有关。

各样品质谱图中主要的信号峰为亚磷酰胺单体的加合峰，但除此之外，每份亚磷酰胺单体均检测到少量杂质，杂质含量不等，样品亚磷酰胺单体和部分杂质的测试分子量信息见表 2。

表 2. 16 种亚磷酰胺单体测试结果统计

序号	简写	分子式	[M+Na] ⁺	[M+Na] ⁺	杂质 (m/z)
			理论	实测	
1	DMT-dA	C ₄₇ H ₅₂ N ₇ O ₇ P	880.36	880.29	619.13、797.18、835.19、902.45 等
2	DMT-dC	C ₄₆ H ₅₂ N ₅ O ₈ P	856.35	856.23	878.36、811.10、616.13、641.21 等
3	DMT-dG	C ₄₄ H ₅₄ N ₇ O ₈ P	862.37	862.25	884.33、780.33、801.99、901.64 等
4	DMT-dT	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₈ P	767.32	767.26	684.18、692.29、722.28、805.40 等
5	fdA	C ₄₇ H ₅₁ FN ₇ O ₇ P	898.35	898.25	920.42、892.19、853.23、637.59 等
6	fdC	C ₄₁ H ₄₉ FN ₅ O ₈ P	812.32	812.21	914.43、729.06、967.52、612.12 等
7	fdG	C ₄₄ H ₅₃ FN ₇ O ₈ P	880.36	880.28	902.37、797.10、819.19、918.37 等
8	fdU	C ₃₉ H ₄₆ FN ₄ O ₈ P	771.29	771.17	793.23、929.19、809.23、687.95 等
9	rA	C ₅₃ H ₆₆ N ₇ O ₈ P	1010.44	1010.38	927.28、749.36、965.35、1032.77 等
10	rC	C ₄₇ H ₆₄ N ₅ O ₉ P	924.41	924.37	749.30、841.31、946.72、879.31 等
11	rG	C ₅₀ H ₆₈ N ₇ O ₉ P	992.45	992.42	1014.53、1030.52、906.42、1147.72 等
12	rU	C ₄₅ H ₆₁ N ₄ O ₉ P	883.38	883.32	838.28、905.51、749.30、921.55 等

13	OMe-A	C ₄₈ H ₅₄ N ₇ O ₈ P	910.37	910.22	888.18, 932.39, 649.12, 865.10 等
14	OMe-C	C ₄₂ H ₅₂ N ₅ O ₉ P	824.34	824.34	649.24, 741.26, 779.22, 846.46 等
15	OMe-G	C ₄₅ H ₅₆ N ₇ O ₉ P	892.38	892.42	809.26, 930.41, 994.48, 692.20 等
16	OMe-U	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₉ P	783.31	783.26	700.11, 821.34, 738.23, 692.14 等

备注：以上分子量为单同位素分子量

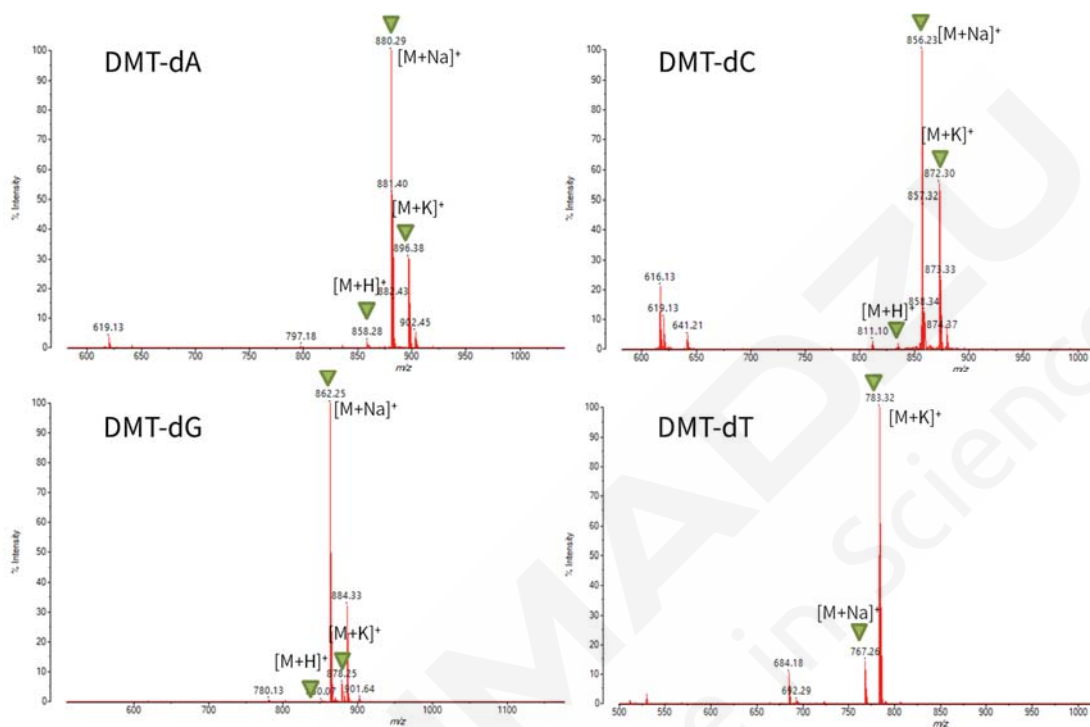


图 1. DMT-dA、DMT-dC、DMT-dG、DMT-dT 的质谱图

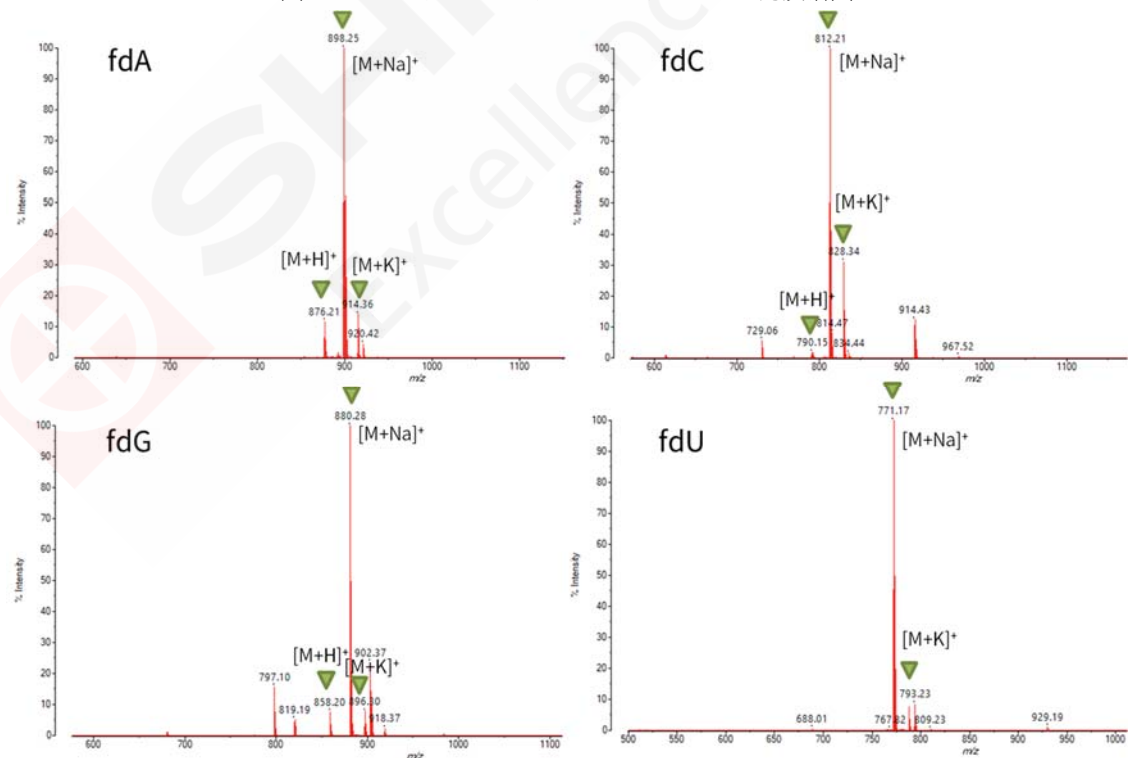


图 2. fdA、fdC、fdG、fdU 的质谱图

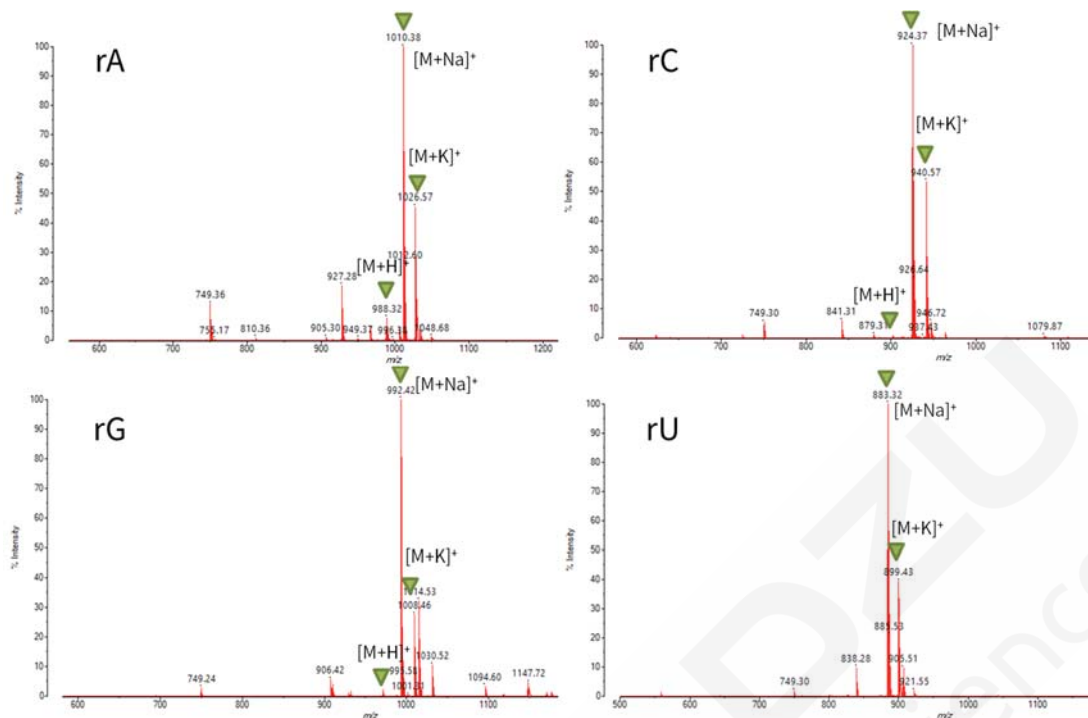


图 3.rA、rC、rG、rU 的质谱图

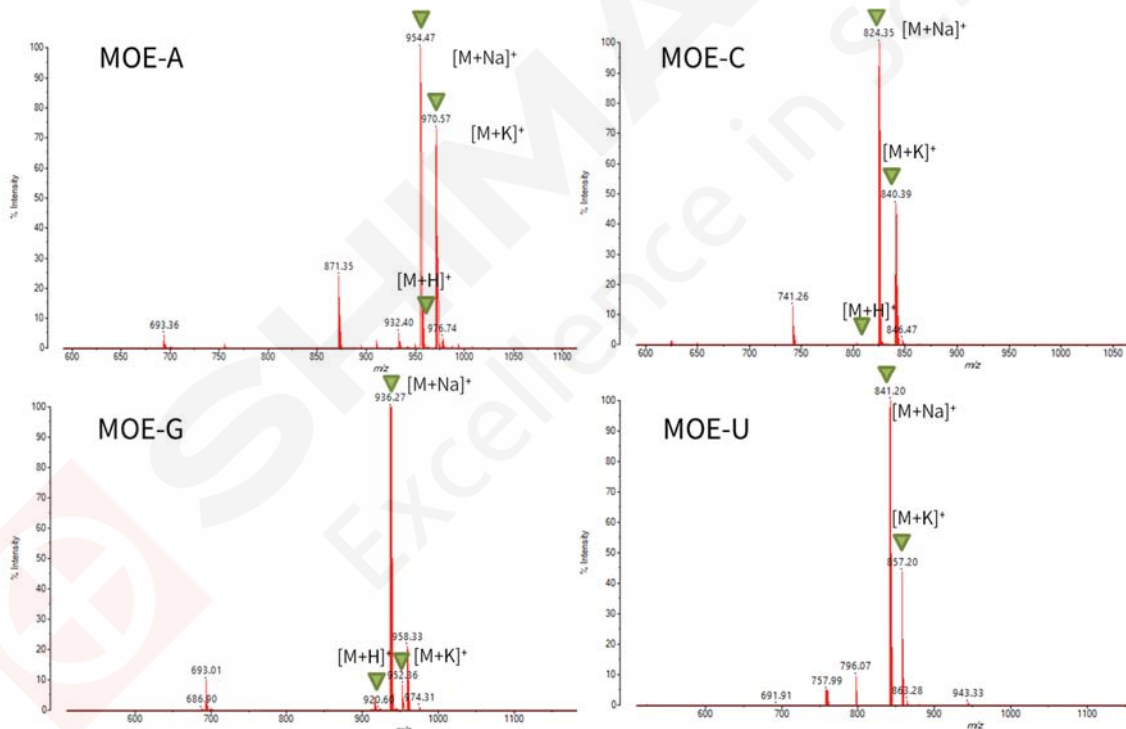


图 4. MOE-A、MOE-C、MOE-G、MOE-U 的质谱图

3. 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-8030 对 16 种市售亚磷酰胺单体进行分子量及杂质检测，分析速度快，图谱简单直观，通过质谱图中信号峰的大小与分布可快速确认亚磷酰胺单体的精确分子量与杂质组成情况，为寡核苷酸化学合成物料质控提供直接依据。

寡核苷酸引物探针的合成质控

摘要: 本文应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪MALDI-8030的负离子模式对合成的寡核苷酸引物探针进行分析。在负离子模式下,三份寡核苷酸样品均成功检测到样品的单电荷离子峰[M-H]⁻及双电荷离子峰[M-2H]²⁻,检测结果与理论值相符。本应用案例表明寡核苷酸类样品在MALDI-8030负离子模式下谱图简单易于解析, MALDI-8030是寡核苷酸类样品分子量检测和合成质量控制的有力工具。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 寡核苷酸引物探针 分子量检测

技术特点:

- ❖ 寡核苷酸类样品分子量的快速检测。
- ❖ 核酸类样品在负离子模式下谱图更简单,易于解析。

寡核苷酸(Oligonucleotide),一般是指核苷酸残基以磷酸二酯键连接而成的短链线性核苷酸片段。寡核苷酸可由人为设计、仪器自动合成为DNA合成用引物、基因探针等,用于PCR扩增实验、基因芯片、电泳、荧光原位杂交等过程,在现代分子生物学研究中具有广泛的用途。然而,分子生物学实验中经常会因为引物或者探针合成问题导致产物扩增不理想或荧光信号低的问题,因此寡核苷酸的质量控制和评价很有必要。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF)作为软电离模式的质谱仪,所产生的质谱图多为单电荷离子,适合进行蛋白多肽、核酸类生物样本的分析。MALDI-8030是岛津MALDI家族最新型号台式机,增加负离子检测模块,在负离子模式下,由于不会检出盐类加合物,因此谱图更简单且易于解读。

本文展示了利用MALDI-8030的负离子模式来检测寡核苷酸引物探针的方法,成功检测到三份寡核苷酸样品的单电荷离子峰及双电荷离子峰。样品无需前处理直接上机,分析过程具有分析速度快、分析成本低的特点。

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仪 MALDI-8030

1.2 试剂与样品

基质: 3-羟基-2-吡啶甲酸(3-HPA基质)。

样品: 合成的寡核苷酸引物探针样品三份,信息如表1。

表 1.样品信息表

No.	样品名称	理论分子量 (Da)
1	寡核苷酸引物探针	6066.9
2	寡核苷酸引物探针	5572
3	寡核苷酸引物探针	14839

1.3 分析条件

调谐模式：线性负离子模式 激光能量：50
激光器：355 nm 固态激光器 离子门阈值：1000
扫描范围：m/z 1000-10000 脉冲引出质量(Da)：4000

2. 样品前处理

将寡核苷酸样品粉末用水配制成 5 μM 的样品溶液，作为样品工作液。用乙腈水溶液 (ACN/water: 70/30) 配制 5 mg/mL 基质辅助铵盐溶液。用上述基质辅助铵盐溶液将 3-HPA 基质 (3-羟基-2-吡啶甲酸) 配制成 40 mg/mL 的基质溶液。将上述 1 μL 样品工作液点到靶板上。待自然干燥后再覆盖 1 μL 基质溶液。待自然干燥后，将靶板送入质谱分析。

3. 结果与讨论

以 3-羟基-2-吡啶甲酸 (3-HPA 基质) 为基质，在负离子模式下进行寡核苷酸引物探针样品的质谱数据采集。三个样品质谱分析结果如下。

1 号样品检测结果如图 1 所示，在 m/z 1000-10000 范围内，检测到 2 个离子峰 m/z 6065 和 m/z 3032，根据分子量推测，分别对应该样品的单电荷离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 及双电荷离子峰 $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ 。质谱检测结果与理论值相符。

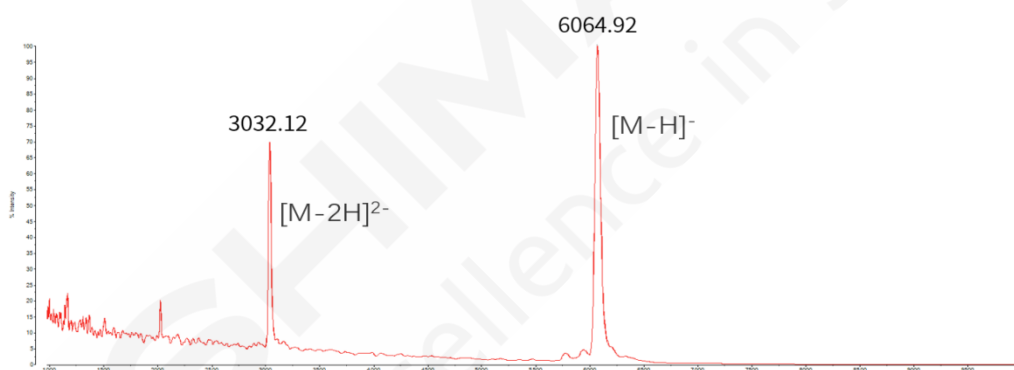


图 1. 1 号样品质谱图 (m/z 1000-10000)

2 号样品检测结果如图 2 所示，在 m/z 2000-10000 范围内，检测到 2 个离子峰 m/z 5572 和 m/z 2784，根据分子量推测，分别对应该样品的单电荷离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 及双电荷离子峰 $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ 。质谱检测结果与理论值相符。

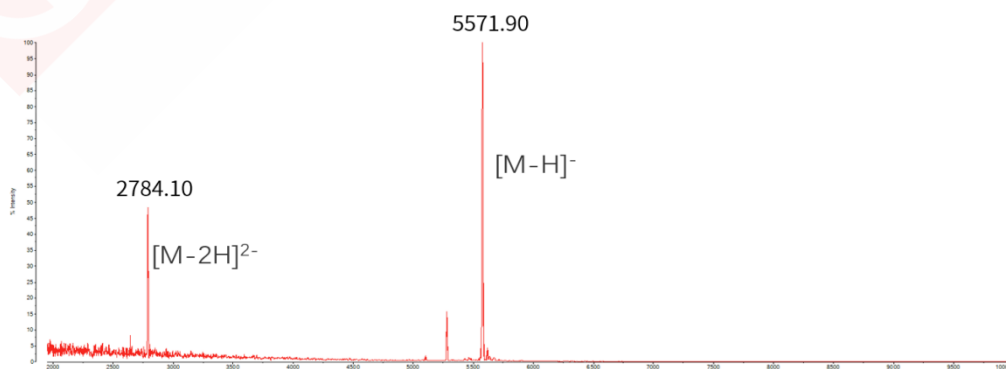


图 2. 2 号样品质谱图 (m/z 2000-10000)

3号样品检测结果如图3所示,在 m/z 5000-20000 范围内,检测到2个离子峰 m/z 14836 和 m/z 7418, 根据分子量推测, 分别对应该样品的单电荷离子峰 $[M-H]^-$ 及双电荷离子峰 $[M-2H]^{2-}$ 。质谱检测结果与理论值相符。

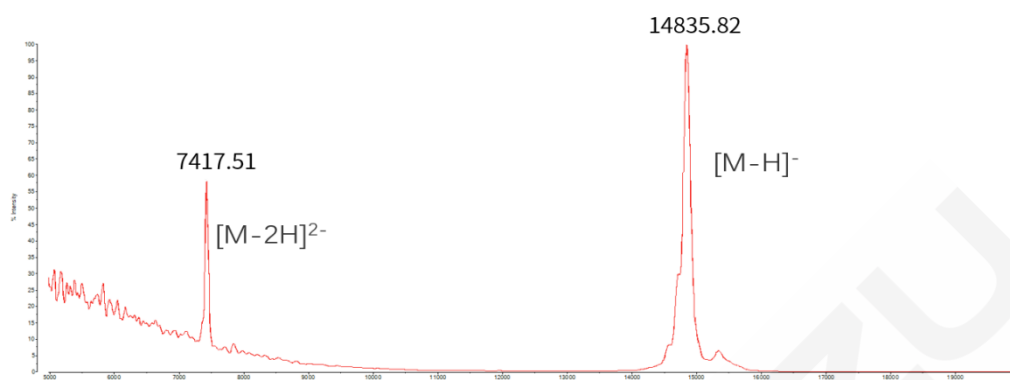


图 3. 3号样品质谱图 (m/z 5000-20000)

4. 结论

本文应用岛津 MALDI-8030 对合成的寡核苷酸引物探针进行检测, 获得了三份寡核苷酸样品在负离子模式下的分子量信息。与正离子模式相比, 负离子模式下不产生盐类加合物, 谱图更简单、更易解析。该方法具有前处理简便、分析速度快、成本低的特点, 为寡核苷酸类样品包括 DNA/RNA 低聚体、引物/探针和寡核苷酸类药物等相关检测提供方法参考。

寡核苷酸药物的分子量及杂质快速检测

摘要： MALDI-TOF 质谱技术具有前处理简单、分析速度快、分析质量范围宽、图谱简单易解析等优点，本文介绍了应用岛津台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 快速检测寡核苷酸药物的分子量及杂质的案例，该方法除直接测定样品精确分子量外，还可对可能含有的杂质情况进行监测。

关键词： MALDI-TOF 寡核苷酸 分子量 杂质

技术特点：

- ❖ 分析速度快，可以进行高通量检测。
- ❖ 前处理简单，可直接测定样品分子量，并对杂质含有情况进行监测。

MALDI-TOF质谱技术因其前处理简单、分析速度快、检测通量高、分析质量范围宽、提供的分子量准确、图谱简单易解析等优点，被广泛用于蛋白质、多肽、核酸、聚合物等样品的分子量检测工作。传统的MALDI-TOF质谱仪体积较大、价格昂贵，限制了该类设备的普及。岛津台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8020体积小，在线性正离子模式下与传统的MALDI-TOF质谱仪具有同等性能。该质谱仪配备了200 Hz的固态激光器和一个快速进样的负载锁定室，实现了样品的快速检测。

本文介绍了应用MALDI-8020快速测定寡核苷酸药物分子量及杂质的案例。取0.5 μL 样品溶液直接点在MALDI靶板上并在其上覆盖基质，使用MALDI-8020进行检测，最快几秒钟即可完成一份样品的检测分析，除精确分子量外，还可获得含有的杂质相关信息，结果直接可靠，可作为寡核苷酸药物合成快速质控的参考。

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	激光能量	： 95
激光器	： 355 nm 固态激光器	离子门限值	： 1000
扫描范围	： m/z 1000-10000	脉冲引出质量(Da)	： 8000

1.3 样品前处理

取样品加水稀释为100 μM ，作为样品工作液。吸取0.5 μL 3-HPA基质溶液 (50 mg/mL)、0.5 μL 样品工作液依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。在质谱采集软件上选择待分析的样品靶点，可在几分钟内实现数十个样品的批量采集。

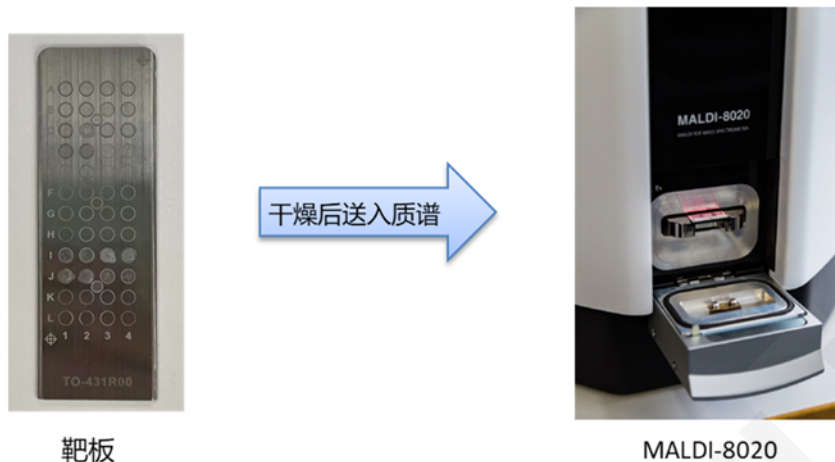


图 1 样品靶板及仪器样品室

2. 结果与讨论

2.1 单链 DNA 药物分子量及杂质检测

应用 MALDI-8020 对 4 份不同长度的单链 DNA 药物进行分子量检测，结果见图 2，样品的理论分子量及实测分子量见表 1。4 份样品均检测到寡核苷酸药物的带一个正电荷 $[M+H]^+$ 及带两个正电荷 $[M+2H]^{2+}$ 的离子形式，其中 $[M+H]^+$ 具有较高信号强度。质谱图信噪比良好，实测分子量与理论值一致。杂质方面，4 份样品均未检测到明显杂质。

表 1. 单链 DNA 药物分子量及杂质情况检测结果

样品链长	$[M+H]^+$ 理论值	$[M+H]^+$ 实测值	杂质检测情况
15nt	4553.05	4553.18	-
16nt	4882.26	4881.84	-
20nt	6118.06	6118.68	-
25nt	7667.06	7666.23	-

备注：“-”代表未检测到明显杂质

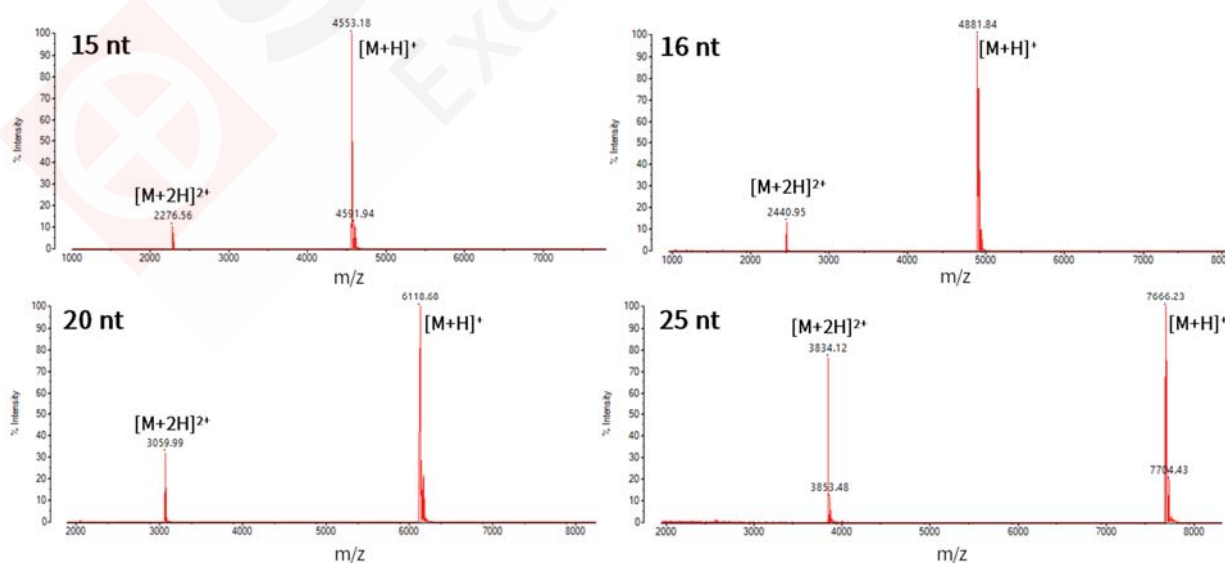


图 2. 单链 DNA 药物的质谱图

2.2 单链 RNA 药物分子量及杂质检测

应用 MALDI-8020 对 4 份单链 RNA 药物进行分子量检测，结果见图 3，样品的理论分子量及实测分子量见表 2。4 份样品均检测到寡核苷酸药物的带一个正电荷 $[M+H]^+$ 及带两个正电荷 $[M+2H]^{2+}$ 的离子形式，其中 $[M+H]^+$ 具有较高信号强度。质谱图信噪比良好，实测分子量与理论值一致。

杂质方面，样品 S1 未检测到明显杂质信号；样品 S2 检测到微弱 m/z 5159.67 与 m/z 5464.81 信号；样品 S3 质谱图上检测到 m/z 3805.81、 m/z 4480.03、 m/z 4786.22、 m/z 5092.05 等多个质谱峰；样品 S4 检测到微弱 m/z 5678.67 信号。

表 2. 单链 RNA 药物分子量及杂质情况检测结果

名称	$[M+H]^+$ 理论值	$[M+H]^+$ 实测值	可能的杂质 (m/z)
S1	6299.00	6299.88	-
S2	5771.39	5770.92	5159.67, 5464.81
S3	6031.70	6031.60	3805.81、4480.03、4786.22、5092.054
S4	6008.66	6007.63	5678.67

备注：“-”代表未检测到明显杂质

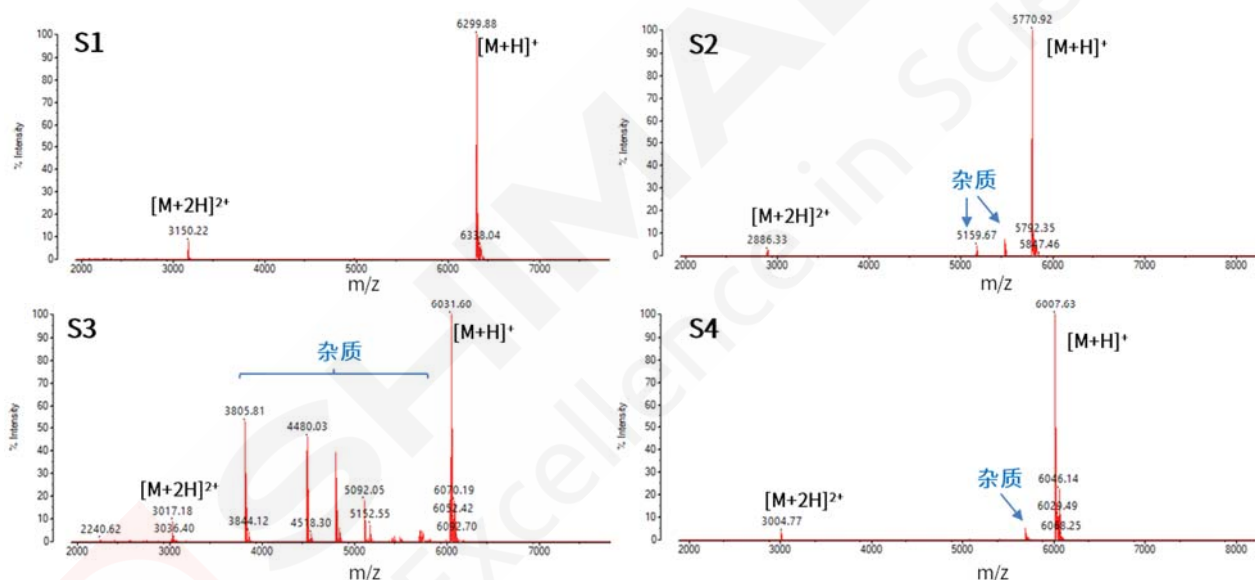


图 3. 单链 RNA 药物的质谱图

3. 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 对 4 份不同长度的单链 DNA 药物及 4 份单链 RNA 药物进行分析，可以直接测定样品的精确分子量，并对杂质含有情况进行监测。本方法前处理简单，分析速度快，可以在几分钟时间内完成数十个样品的批量检测，结果直接、准确、可靠，可作为寡核苷酸药物合成快速质控的参考。

反义寡核苷酸药物的序列测定

摘要：反义寡核苷酸药物（ASO）是目前研究较多的核酸类药物，而核苷酸序列确认是 ASO 质控中的重要环节。本文介绍了应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 快速测定反义寡核苷酸药物的核苷酸序列的案例，通过对 ISD（源内裂解）模式产生的碎片离子进行分析，实现 ASO 核苷酸序列的确认。该方法操作简便，图谱简单易解析。

关键词： MALDI-TOF 反义寡核苷酸 源内裂解 序列解析

技术特点：

- ❖ 正离子模式分析反义寡核苷酸药物序列。
- ❖ 前处理简单，图谱易于解析。

核酸药物疗法作为一种新的治疗模式，近年来引起了人们的广泛关注。与传统生物制药不同，核酸药物可以通过具有高性价比的化学合成来生产。寡核苷酸药物通常指由人工合成的长度50个以内核苷酸组成的一类药物。诺西那生钠注射液是全球首个用于治疗罕见病脊髓性肌萎缩症的精准靶向治疗药物。

基质辅助激光解吸电离（MALDI）可以柔和地电离寡核苷酸样品而不引起不需要的碎裂。通过使用一种特定的MALDI基质，增加激光照射能量，就有可能同时引起样品电离和产生碎片离子。源内裂解（ISD）产生的碎片离子可用于结构分析。核酸的MALDI-ISD碎裂可以提供通过简单的裂解提供连续的碎片离子，因此对寡核苷酸药物的测序非常有用。

本文展示了应用台式双极性基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪MALDI-8020快速测定诺西那生钠仿制药核苷酸序列的案例。本方法基于MALDI-TOF MS源内裂解（ISD）的碎裂方式，通过简单提高激光照射能量，即可实现寡核苷酸的源内裂解，并倾向生成a离子与w离子。与CID（碰撞诱导解离）相比，MALDI-ISD产生的图谱更加简单，更易于解析。

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-8030



图 1. 核酸用芯片靶板及 MALDI-8020

1.2 分析条件

调谐模式：线性正离子模式 激光能量：110-150
激光器：355 nm 固态激光器 离子门阈值：500
扫描范围：m/z 500-10000 脉冲引出质量(Da)：10000

1.3 样品前处理

取反义寡核苷酸药物ASO样品加水稀释为150 μM ，作为样品工作液。取0.5 μL 样品工作液点样到已预先涂敷3-HPA基质的芯片靶板（图1，购自北京毅新博创生物科技有限公司），自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

使用 MALDI-8020 在正离子模式下对 ASO 药物进行分析，以 3-HPA 为基质，激光能量 110 时，ASO 样品检测到带一个正电荷 $[M+H]^+$ 及带两个正电荷 $[M+2H]^{2+}$ 的化合物离子，质谱图信噪比良好，实测分子量与理论值一致（图2）。

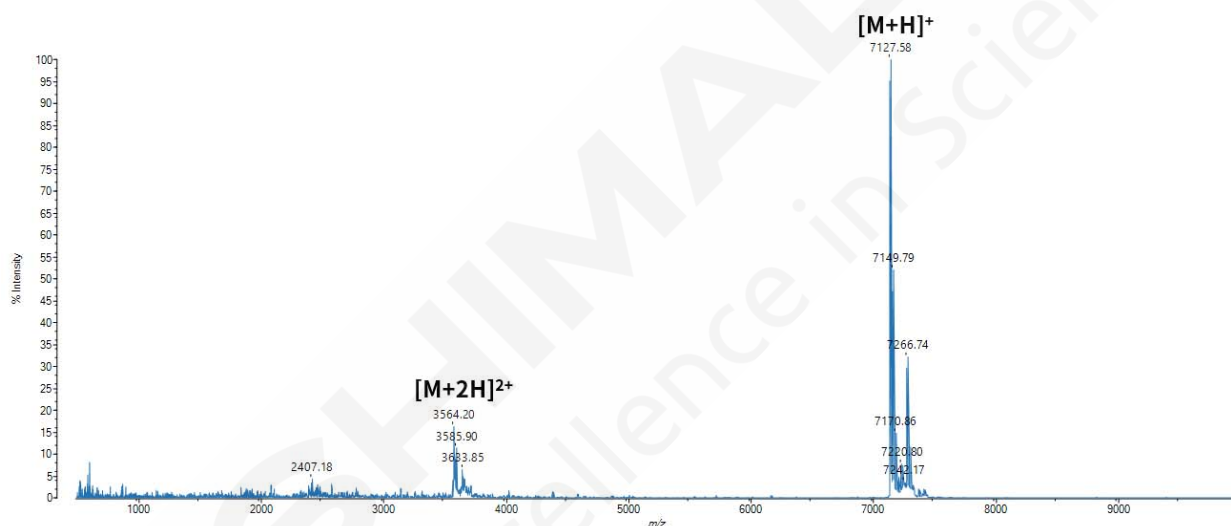


图2. 寡核苷酸 ASO 的一级质谱图（激光能量 110）

寡核苷酸经源内裂解后，倾向产生 a 离子与 w 离子，裂解模式见图 3。通过提高质谱采集的激光能量到 150，实现寡核苷酸药物的源内裂解（ISD），结果见图 4。质谱图上观测到规律性分布的 a 系列离子与 w 系列离子，除 5'-末端的 a1、a17 与 3'-末端的 w1 等与基质干扰信号重叠的离子外，检测到其他全部 a 离子与 w 离子，并与寡核苷酸的理论序列 5'-MeU^{Me}CA^{Me}C^{Me}U^{Me}U^{Me}U^{Me}CA^{Me}UAA^{Me}UG^{Me}C^{Me}UGG-3' 正确匹配。以上结果表明，使用 MALDI-8020 的正离子模式，可轻松实现合成寡核苷酸的分子量确认，并可通过 ISD 碎片 a 离子与 w 离子的匹配快速确认核苷酸序列。

2.3 微生物鉴定

微生物指的是个体难以通过肉眼直接观察的所有微小生物体的统称，涵盖细菌、真菌、病毒、少数藻类等。传统的微生物鉴定方法包含通过显微镜直接观察、在选择培养基和鉴别培养基中培养观察、进行生化反应鉴别、采用免疫学方法鉴别以及运用分子生物学方法鉴别（如 PCR 法或基因测序法）。然而，传统方法存在耗时长、成本高、通量低等问题，这在一定程度上影响了病原微生物鉴定的速度，在一定程度上影响了疾病的预防控制。

20 世纪 80 年代末至 90 年代初，MALDI-TOF 和 ESI 这两种软电离技术的问世，使得质谱能够实现生物大分子的快速分析。2001 年，美国 University of Maryland 的两位学者 Ryzhov 和 Fenselau 借助质谱对微生物细胞内丰富的核糖体蛋白质分子指纹进行分析，提出了利用 MALDI-TOF 鉴定病原微生物的可能性。



MALDI-TOF 微生物鉴定系统工作流程

MALDI-TOF 进行微生物鉴定具有快速、准确、高通量、成本低等特点。在使用 MALDI-TOF 进行微生物鉴定时，典型的质量范围为 m/z 2000-20000 Da，所检测到的目标信号主要为核糖体蛋白和一些看家蛋白，此外，还有酶、脂类等的信号。通常能够鉴定到种的水平，基于特殊的生物信息学分析软件，甚至能够鉴定到亚种或株的水平。MALDI-8020/8030 作为岛津最新的台式飞行时间质谱，性能卓越，十分适合用于微生物菌种的快速鉴定。

Identified Files											
acquisition time	name	sample	%	family	genus	species	typ	delcount	delete	export to LIMS	compare
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F16	311062561_02	99.90	Family I Enterobacteriaceae	Providencia	nitens	196		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F40	311062361_02	99.90	Family I Enterobacteriaceae	Stenotrophomonas	malophilia	161		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F30	311062361_02	99.90	Family I Enterobacteriaceae	Stenotrophomonas	malophilia	166		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ 19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F26	311062251_02	99.90	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli	198		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F16	311062251_02	99.90	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli	195		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F40	311064881_02	99.90	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli	167		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1E30	170564881_02	94.80	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli	117		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1E26	180536591_02	95.20	Family VI Streptococcaceae	Streptococcus	bovis/lactis	93		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1E16	180536591_02	95.20	Family VI Streptococcaceae	Streptococcus	bovis/lactis	72		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F40	180521981_02	99.90	Family VII Staphylococcaceae	Staphylococcus	aureus	134		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

微生物鉴定结果界面

牛奶中微生物的快速鉴定

摘要：在微生物鉴定领域，与传统的平板计数法、生化反应法相比，基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)法具有快速、准确、使用成本低、操作简便等特点。本文使用岛津 MALDI-8020 结合毅新博创微生物数据库，对牛奶中微生物进行了快速鉴定，检测到的微生物主要包括不动杆菌、乳酸菌及大肠菌群等。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 牛奶中微生物 微生物鉴定

刚挤出的牛奶中含有的微生物较少，但储存条件、运输过程及管理不当等可能会引起微生物污染。如运输过程中没有保温措施使温度过高、储存容器不卫生、剧烈震荡等，都可能加速微生物的繁殖，从而导致牛奶变质。

牛奶会进入千家万户的餐桌，对牛奶中的微生物检测非常有必要。传统的牛奶微生物检测法有平板计数法、生化反应法、PCR 法、DNA 探针技术等。传统方法耗时较长，试剂耗材成本较高。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)作为近年兴起的微生物鉴定技术，鉴定过程耗时只需数分钟、日常使用成本低廉，已在临床及科研中得到广泛应用。

本文利用岛津台式飞行时间质谱 MALDI-8020，结合毅新博创微生物数据库，对牛奶中微生物进行快速鉴定。经过与数据库中的标准谱图对比，成功鉴定不动杆菌、乳酸菌及大肠菌群等，主要为有益微生物，结果与预期相符。

1. 实验部分

1.1 仪器及数据库

质谱仪：岛津基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪MALDI-8020

数据库：毅新博创微生物鉴定平台BE3.1.6.1

1.2 试剂与样品

样品：本次实验共测试牛奶样品培养得到的 16 个微生物，均采用固体培养基培养。

基质： α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA)，5 mg/mL。

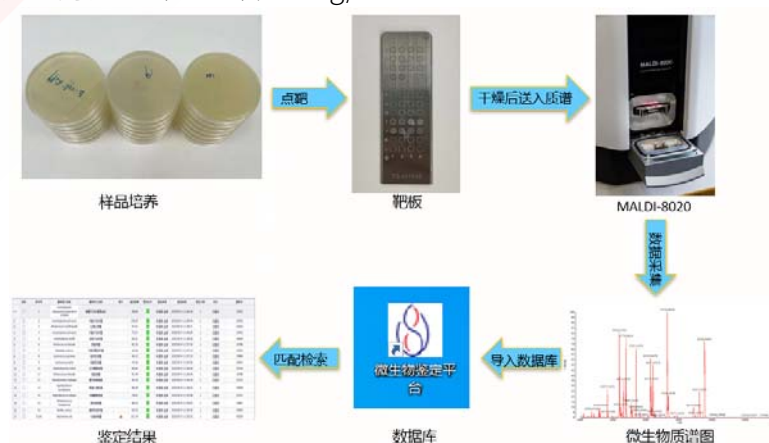


图 1. 牛奶中微生物鉴定流程图

1.3 样品前处理

大肠杆菌标准菌株 ATCC 8099 及 16 个样品，均采用乙醇甲酸提取法前处理。

1.3.1 乙醇甲酸提取法

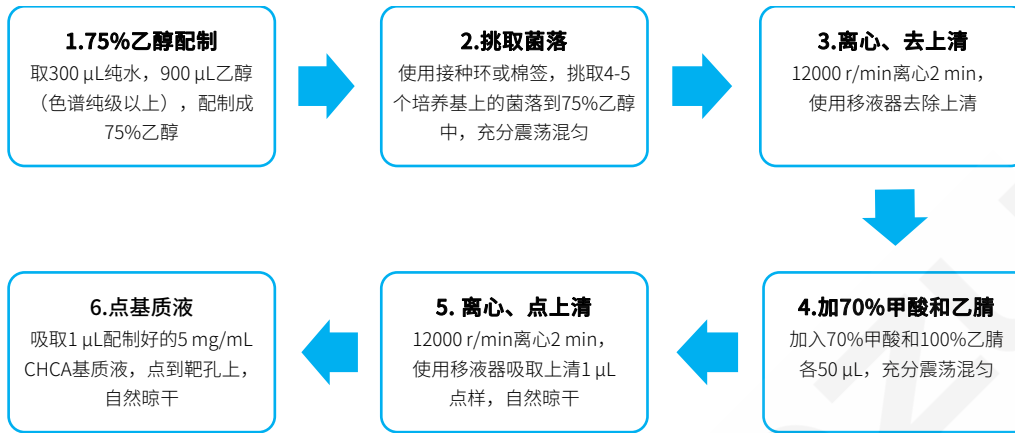


图 2. 乙醇甲酸提取法流程图

1.4 分析条件

调谐模式	: Linear Positive	激光器	: 355nm 固体激光器
扫描范围	: m/z 2000-20000	激光频率	: 50 Hz
脉冲引出质量	: 8330 Da	激光能量	: 70-80

2. 结果与讨论

将样品前处理后进行质谱分析，使用 MALDI-8020 采集质谱图，将数据导入微生物数据库鉴定。

标准菌株ATCC 8099及部分测试样品使用MALDI-8020采集的质谱图如下所示（图3-6）。

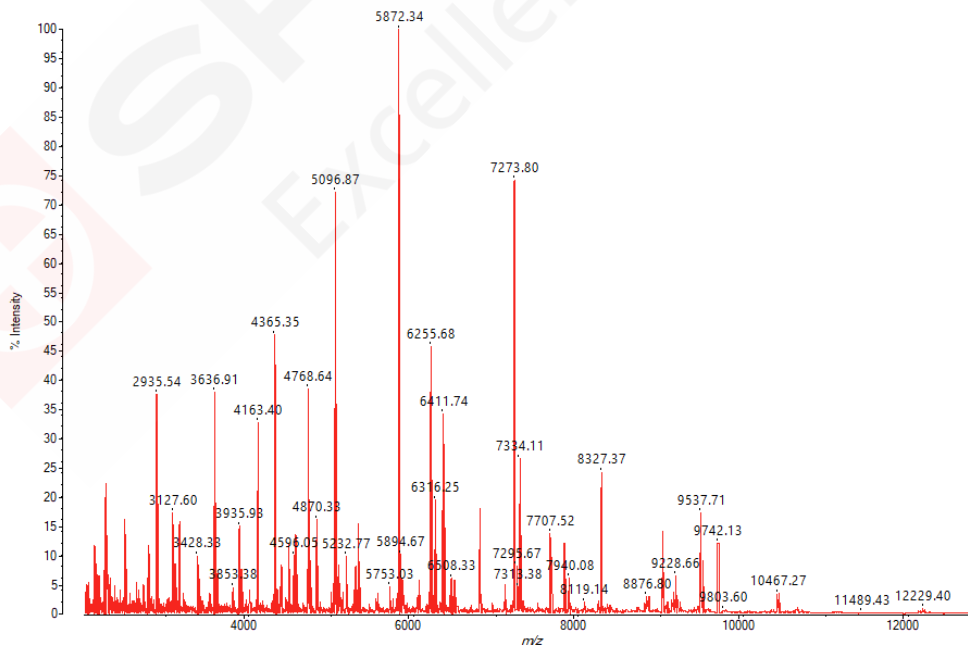


图3. ATCC 8099标准菌株的质谱图

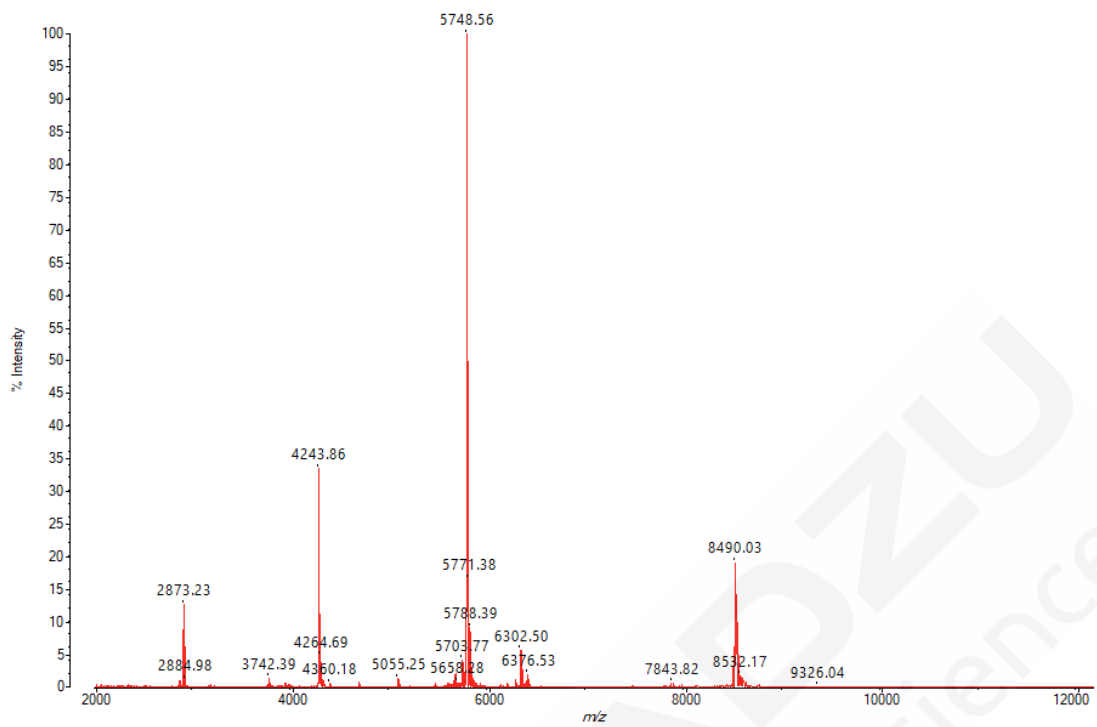


图4. 样品1的质谱图

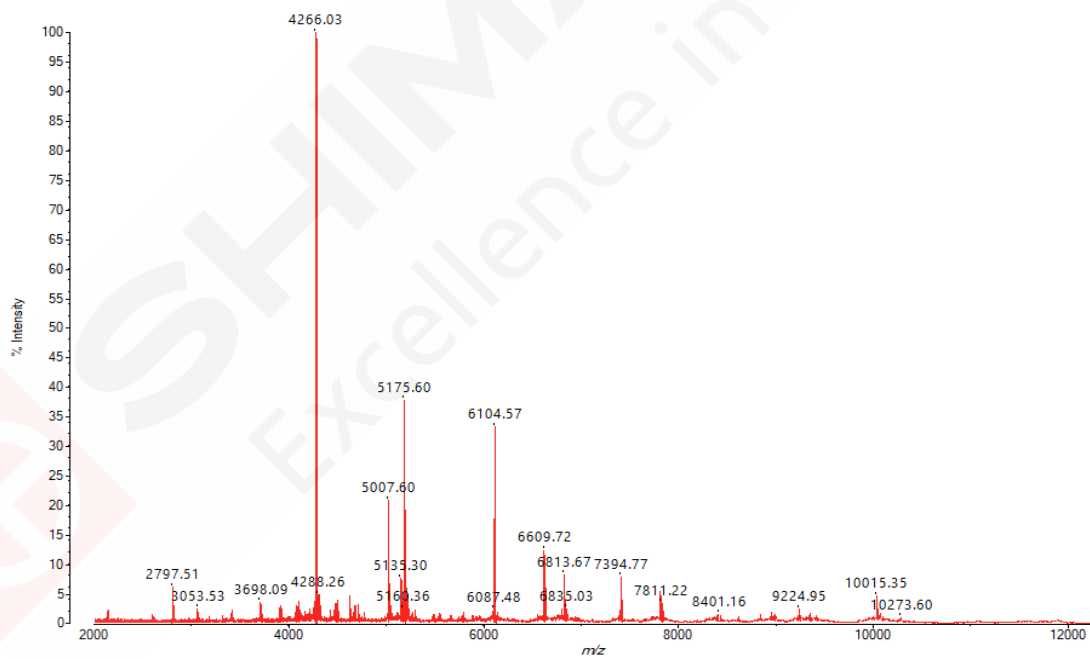


图5. 样品2的质谱图

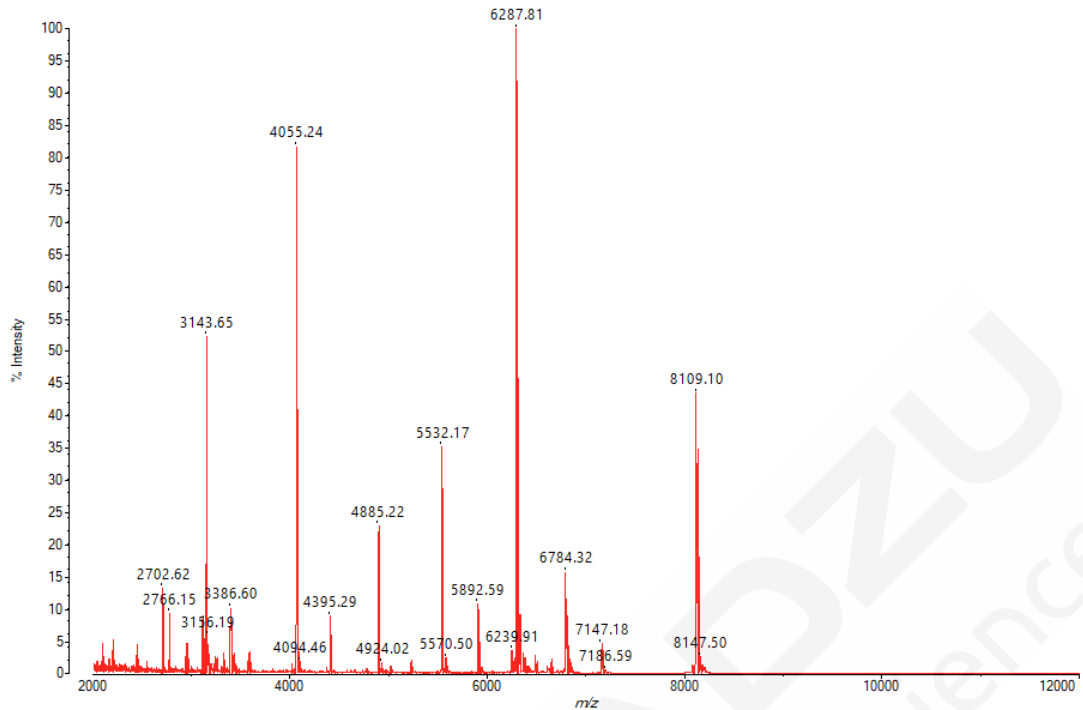


图6. 样品3的质谱图

选择	样本号	菌株英文名称	菌株中文名称	提示	鉴定结果	置信水平	鉴定来源	鉴定时间	鉴定次数	状态	菌株ID
<input type="checkbox"/>	1	Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex	鲍曼不动杆菌复合体		89.68	■	标准库-全部	2022/9/14 11:38:48	1	已鉴定	19303
<input type="checkbox"/>	2	Acinetobacter johnsonii	约翰不动杆菌		109.67	■	标准库-全部	2022/9/14 11:38:46	1	已鉴定	19342
<input type="checkbox"/>	3	Rhodococcus erythropolis	红串红球菌		97.42	■	标准库-全部	2022/9/14 11:38:31	1	已鉴定	22816
<input type="checkbox"/>	4	Acinetobacter johnsonii	约翰不动杆菌		73.24	■	标准库-全部	2022/9/14 11:38:29	1	已鉴定	19346
<input type="checkbox"/>	5	Acinetobacter lwoffii	溶苯不动杆菌		90.51	■	标准库-全部	2022/9/14 11:38:26	1	已鉴定	16909
<input type="checkbox"/>	6	Enterococcus faecalis	粪肠球菌		82.25	■	标准库-全部	2022/9/14 11:37:20	1	已鉴定	16786
<input type="checkbox"/>	7	Klebsiella oxytoca	产酸克雷伯氏菌		62.66	■	标准库-全部	2022/9/14 11:37:18	1	已鉴定	19226
<input type="checkbox"/>	8	Lactococcus garvieae	格氏乳球菌		68.10	■	标准库-全部	2022/9/14 11:37:15	1	已鉴定	15886
<input type="checkbox"/>	9	Lactococcus lactis	乳酸乳球菌		45.46	■	标准库-全部	2022/9/14 11:36:56	1	已鉴定	18064
<input type="checkbox"/>	10	Staphylococcus cohnii	孔氏葡萄球菌		80.64	■	标准库-全部	2022/9/14 11:36:54	1	已鉴定	23220
<input type="checkbox"/>	11	Enterococcus faecalis	粪肠球菌		81.48	■	标准库-全部	2022/9/14 11:36:36	1	已鉴定	16786
<input type="checkbox"/>	12	Pseudomonas rhodesiae	霍氏假单胞菌		60.18	■	标准库-全部	2022/9/14 11:36:16	1	已鉴定	22701
<input type="checkbox"/>	13	Agrobacterium tumefaciens	根癌土壤杆菌		68.39	■	标准库-全部	2022/9/14 11:36:03	1	已鉴定	19549
<input type="checkbox"/>	14	Staphylococcus xylosum	木糖葡萄球菌		78.43	■	标准库-全部	2022/9/14 11:35:58	1	已鉴定	23331
<input type="checkbox"/>	15	Streptococcus dysgalactiae	停乳链球菌		68.16	■	标准库-全部	2022/9/14 11:35:42	1	已鉴定	16941
<input type="checkbox"/>	16	Bacillus cereus	蜡样芽孢杆菌		65.33	■	标准库-全部	2022/9/14 11:35:40	1	已鉴定	19820
<input type="checkbox"/>	E.coli	Escherichia coli	大肠埃希菌	⚠	121.43	■	标准库-全部	2022/9/14 11:35:22	1	已鉴定	18209

图7. 数据库检索结果界面

质谱数据经软件处理后，导入数据库检索（图7）。数据库鉴定结果置信度阈值为25，高于25即为阳性结果。经鉴定16个样品均为阳性结果，详细鉴定结果见表1。

牛奶中的微生物主要分为病原微生物、有害微生物和有益微生物。病原微生物，如沙门氏菌、布氏杆菌、阪崎杆菌等不会影响牛奶品质，但是会引起人体疾病。有害微生物如假单胞菌，不会引起人体疾病，却会引起牛奶变质的腐败菌。有益微生物是指能对肠道代谢起有效调节作用的菌群，如乳酸菌、链球菌、乳杆菌、大肠菌群等。本次实验牛奶中检测到的微生物主要为不动杆菌、乳酸菌及大肠菌群等有益微生物，以及可能引起牛奶变质的假单胞菌，未检测到强致病性的沙门氏菌、布氏杆菌等病原微生物。

表 1 牛奶中微生物鉴定结果

菌株编号	鉴定菌种名称		鉴定得分
	英文名	中文名	
1	<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> <i>complex</i>	鲍曼不动杆菌复合体	89.68
2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	约翰不动杆菌	109.67
3	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	红串红球菌	97.42
4	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	约翰不动杆菌	73.24
5	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	洛菲不动杆菌	90.51
6	<i>Enterococcus faecalis</i>	粪肠球菌	82.25
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	产酸克雷伯氏菌	62.66
8	<i>Lactococcus garvieae</i>	格氏乳球菌	68.10
9	<i>Lactococcus lactis</i>	乳酸乳球菌	45.46
10	<i>Staphylococcus cohnii</i>	孔氏葡萄球菌	80.64
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	粪肠球菌	81.48
12	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	霍氏假单胞菌	60.18
13	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	根癌土壤杆菌	68.39
14	<i>Staphylococcus xylosus</i>	木糖葡萄球菌	78.43
15	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	停乳链球菌	68.16
16	<i>Bacillus cereus</i>	蜡样芽孢杆菌	65.33
ATCC8099	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希菌	121.43

3. 结论

本文采用岛津台式飞行时间质谱 MALDI-8020, 结合毅新博创微生物数据库, 快速准确鉴定牛奶中的微生物菌群, 本次实验检测到的微生物为不动杆菌、乳酸菌及大肠菌群等。MALDI-TOF 指纹图谱法高效、灵敏、快速、操作简便, 是微生物鉴定的有力分析方法。

新生儿肠道微生物的快速鉴定

摘要：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF 法)是近些年来微生物鉴定领域的热点技术，具有快速、准确、使用成本低、高度自动化的特点。本文使用岛津 MALDI-8020 结合毅新博创微生物数据库，对新生儿肠道微生物进行了快速鉴定，检测到的新生儿肠道微生物主要包括大肠埃希菌、粪肠球菌及丁酸梭菌。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 肠道微生物 微生物鉴定

人体的肠道微生态系统是一个庞大而复杂的微生态体系，对于维持人体的健康起着重要的作用。肠道菌群对维生素合成、生长发育、物质代谢、免疫防御等都有重要的作用，因此对肠道菌群的研究有助于新生儿的疾病预防和生长发育。

传统的肠道微生物研究的方法有形态学方法、生理生化法、基因测序法。传统方法耗时较长，试剂耗材成本较高。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF 法)作为一种新的微生物鉴定技术，鉴定过程耗时只需数分钟、日常使用成本低廉，已在临床及科研中得到广泛应用。

本文利用岛津台式飞行时间质谱MALDI-8020，结合毅新博创微生物数据库，进行了新生儿肠道微生物快速鉴定。经过与数据库中的标准谱图对比，成功鉴定大肠埃希菌、粪肠球菌及丁酸梭菌，结果与预期相符。

1. 实验部分

1.1 仪器及数据库

质谱仪：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪MALDI-8020

数据库：毅新博创微生物数据库BE3.1.6

1.2 试剂与样品

样品：本次实验共测试 12 个样品，均采用固体培养基培养。

基质： α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA)



图 1.固体培养基培养后的肠道微生物

1.3 样品前处理

1-8 号样品菌落较小，采用直接涂布法上样。标准菌株 ATCC25922 及 9-12 号样品菌落较大，采用乙醇甲酸提取法。

1.3.1 直接涂布法

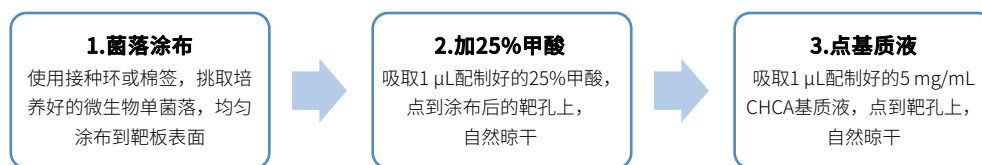


图 2. 直接涂布法流程图

1.3.2 乙醇甲酸提取法



图 3. 乙醇甲酸提取法流程图

1.4 分析条件

调谐模式	: Linear Positive	激光器	: 355nm 固体激光器
扫描范围	: m/z 2000-20000	激光频率	: 50 Hz
脉冲引出质量	: 8330 Da	激光能量	: 70-80

2. 结果与讨论

将样品前处理后进行质谱分析，使用 MALDI-8020 采集一级质谱图，将数据导入微生物数据库鉴定。标准菌株 ATCC25922 及部分测试样品使用 MALDI-8020 采集的一级质谱图如下所示（图 4-7）。

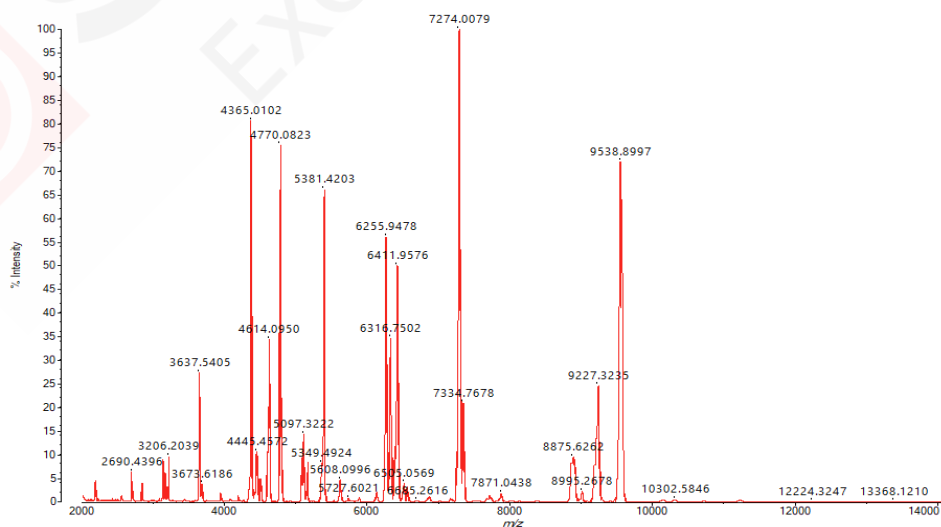


图4. ATCC25922标准菌株质谱图

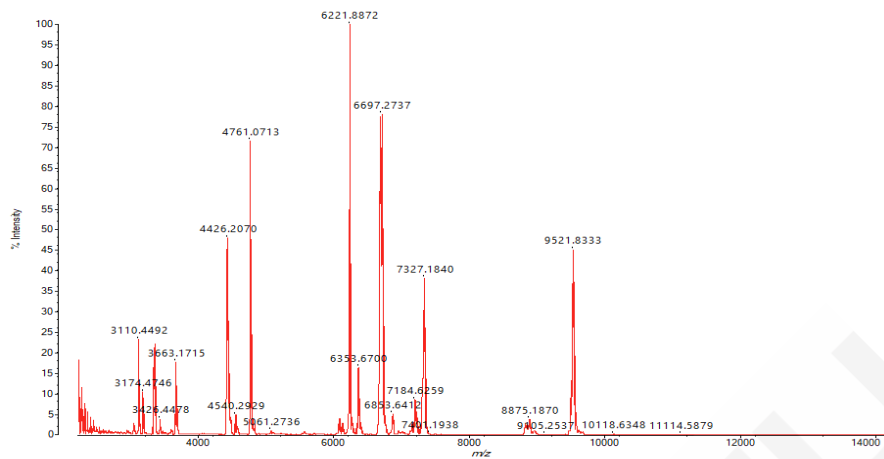


图5. 样品1质谱图

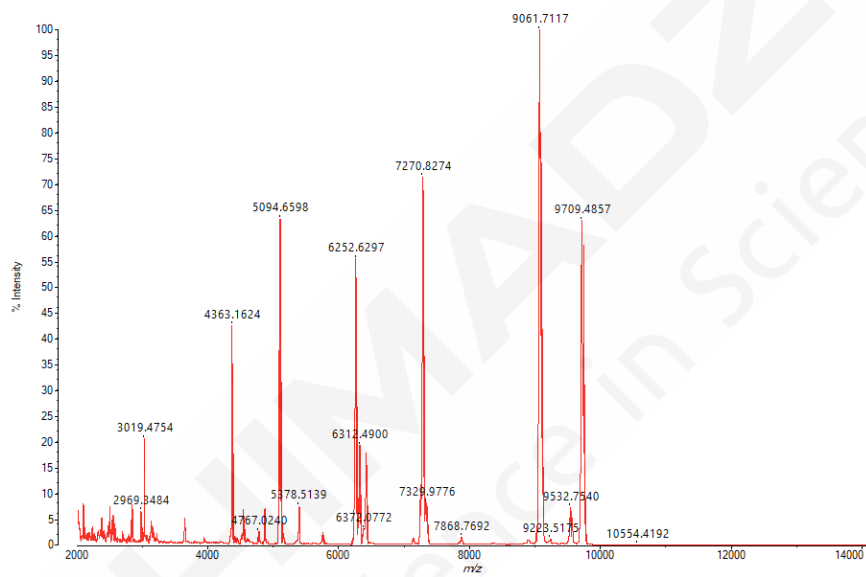


图6. 样品2质谱图

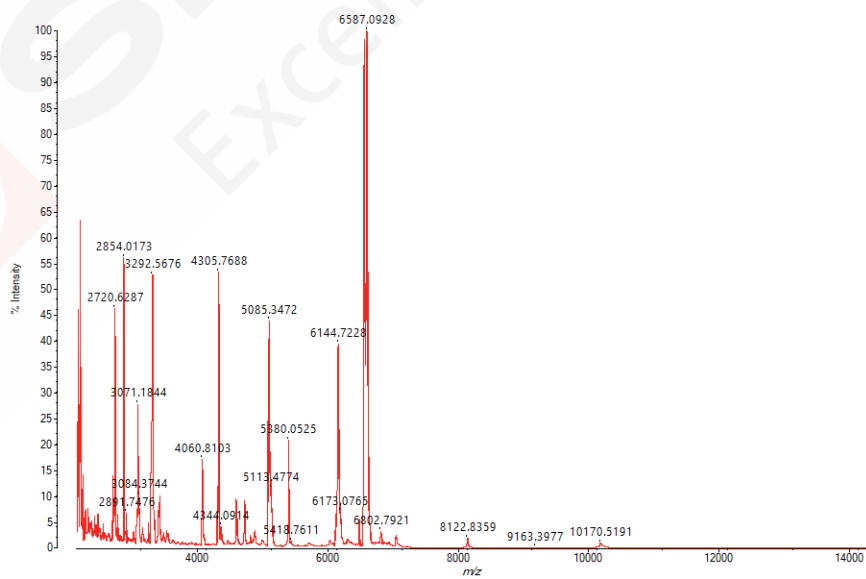


图7. 样品3质谱图

	选择	样本号	菌株英文名称	菌株中文名称	提示	鉴定结果	置信水平	鉴定来源
▶ 1	<input type="checkbox"/>	sample-1	Enterococcus faecalis	粪肠球菌		79.81	■	标准库-全部
2	<input type="checkbox"/>	sample-2	Escherichia coli	大肠埃希菌	⚠	62.59	■	标准库-全部
3	<input type="checkbox"/>	sample-3	Enterococcus faecalis	粪肠球菌		60.57	■	标准库-全部
4	<input type="checkbox"/>	sample-4	Escherichia coli	大肠埃希菌	⚠	55.93	■	标准库-全部
5	<input type="checkbox"/>	sample-5	Enterococcus faecalis	粪肠球菌		49.19	■	标准库-全部
6	<input type="checkbox"/>	sample-6	Enterococcus faecalis	粪肠球菌		99.62	■	标准库-全部
7	<input type="checkbox"/>	sample-7	Escherichia coli	大肠埃希菌	⚠	27.68	■	标准库-全部
8	<input type="checkbox"/>	sample-8	Enterococcus faecalis	粪肠球菌		53.67	■	标准库-全部
9	<input type="checkbox"/>	sample-9	Clostridium butyricum	丁酸梭菌		83.07	■	标准库-全部
10	<input type="checkbox"/>	sample-10	Clostridium butyricum	丁酸梭菌		71.59	■	标准库-全部
11	<input type="checkbox"/>	sample-11	Clostridium butyricum	丁酸梭菌		65.47	■	标准库-全部
12	<input type="checkbox"/>	sample-12	Clostridium butyricum	丁酸梭菌		62.44	■	标准库-全部
13	<input type="checkbox"/>	ATCC25922	Escherichia coli	大肠埃希菌	⚠	102.84	■	标准库-全部

图8. 数据库检索结果界面

质谱数据经软件处理后，导入数据库检索（图8）。数据库鉴定结果置信度阈值为25，高于25即为阳性结果。与数据库自带的标准谱图自动匹配鉴定，12个样品均为阳性结果，详细鉴定结果见表1。测试的肠道微生物主要为大肠杆菌、粪肠球菌、丁酸梭菌，这三种细菌在新生儿肠道中比较常见。

表 1 新生儿肠道微生物鉴定结果

菌株编号	鉴定菌种名称		鉴定得分
	英文名	中文名	
sample-1	<i>Enterococcus faecalis</i>	粪肠球菌	79.81
sample-2	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希菌	62.59
sample-3	<i>Enterococcus faecalis</i>	粪肠球菌	60.57
sample-4	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希菌	55.93
sample-5	<i>Enterococcus faecalis</i>	粪肠球菌	49.19
sample-6	<i>Enterococcus faecalis</i>	粪肠球菌	99.62
sample-7	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希菌	27.68
sample-8	<i>Enterococcus faecalis</i>	粪肠球菌	53.67
sample-9	<i>Clostridium butyricum</i>	丁酸梭菌	83.07
sample-10	<i>Clostridium butyricum</i>	丁酸梭菌	71.59
sample-11	<i>Clostridium butyricum</i>	丁酸梭菌	65.47
sample-12	<i>Clostridium butyricum</i>	丁酸梭菌	62.44
标株 ATCC25922	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希菌	102.84

3. 结论

本文采用岛津台式飞行时间质谱MALDI-8020，结合毅新博创微生物数据库，快速准确鉴定新生儿肠道微生物菌群，本次实验检测到的微生物为大肠埃希菌、粪肠球菌及丁酸梭菌。MALDI-TOF指纹图谱法高效、灵敏、快速、操作简便，是微生物鉴定的有力分析方法。

羊奶中乳杆菌的快速鉴定

摘要：益生菌能促进人体对营养物质的消化吸收，在乳制品中较常见。在微生物鉴定领域，基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)法，具有快速、准确、使用成本低、操作简便等特点。本文使用岛津 MALDI-8020 结合毅新博创微生物数据库，对羊奶中微生物进行了快速鉴定，检测到的微生物主要包括卷曲乳杆菌、发酵乳杆菌、类布氏乳杆菌等益生菌。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 羊奶 微生物鉴定

技术特点：

- ❖ 质谱法操作简便、分析速度快，可以快速给出鉴定结果。
- ❖ 该方法适用于乳制品中微生物快速鉴定。

益生菌是指一类能够在人体内产生益处的微生物。它们能抑制有害细菌的生长，抵抗病原菌的感染，协助合成人体需要的维生素，促进人体对矿物质的吸收。益生菌还能帮助维持肠道菌群的平衡、增强肠道的消化和吸收能力、刺激人体免疫系统。

羊奶作为一种营养丰富的乳制品，不仅含有丰富的蛋白质、脂肪、维生素和矿物质，还含有多种益生菌。传统的乳制品微生物检测法如生化反应法、PCR法、DNA探针技术等，耗时较长，试剂耗材成本较高。MALDI-TOF质谱法作为近年兴起的微生物鉴定技术，鉴定过程耗时只需数分钟、日常使用成本低廉，已在临床及科研中得到广泛应用。

本文利用MALDI-8020结合微生物数据库，对羊奶中微生物进行快速鉴定。经过与数据库中的标准谱图对比，成功鉴定卷曲乳杆菌、发酵乳杆菌、类布氏乳杆菌等益生菌，结果与预期相符。

1. 实验部分

1.1 仪器及数据库

质谱仪：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪MALDI-8020

数据库：毅新博创微生物数据库BE3.1.6.1

1.2 试剂与样品

样品：本次实验共测试羊奶样品培养得到的 8 个微生物，均采用固体培养基培养。

基质： α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA)，5 mg/mL。

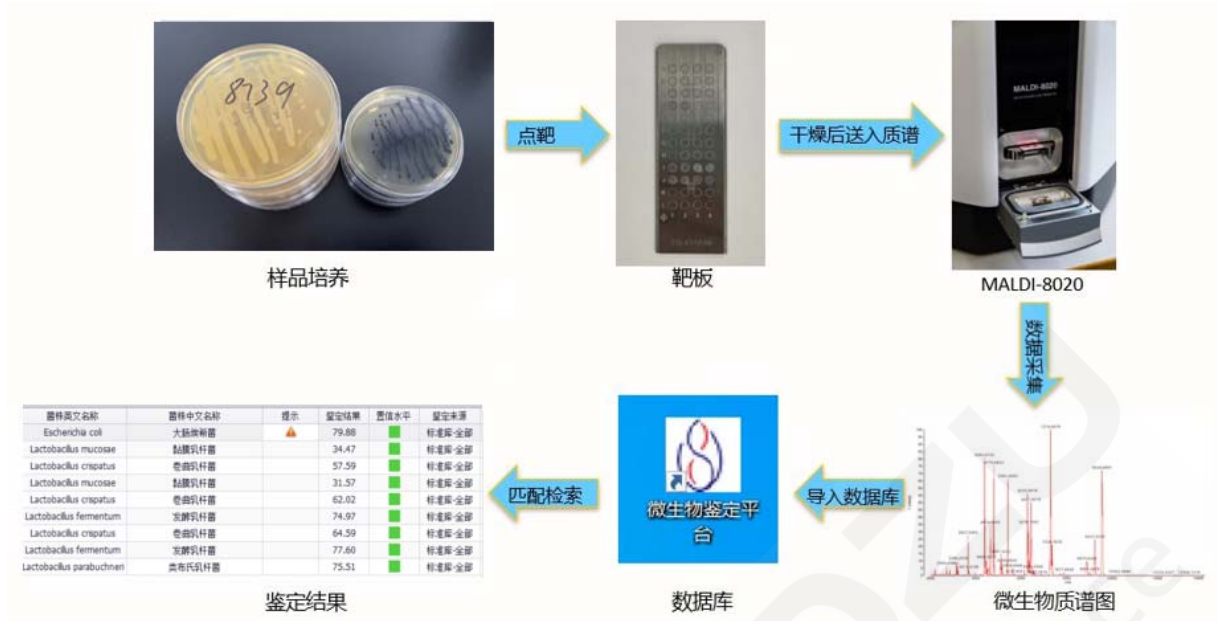


图 1. 羊奶中微生物鉴定流程图

1.3 样品前处理

大肠杆菌标准菌株 ATCC 8739 及 8 个样品，均采用乙醇甲酸提取法前处理。

1.3.1 乙醇甲酸提取法



图 2. 乙醇甲酸提取法流程图

1.4 分析条件

调谐模式	: Linear Positive	激光器	: 355nm 固体激光器
扫描范围	: m/z 2000-20000	激光频率	: 100 Hz
脉冲引出质量	: 8330 Da	激光能量	: 70-75

2. 结果与讨论

将样品前处理后进行质谱分析，使用 MALDI-8020 采集质谱图，将数据导入微生物数据库鉴定。

标准菌株大肠杆菌 ATCC 8739 及部分测试样品使用 MALDI-8020 采集的质谱图如下所示（图 3-6）。

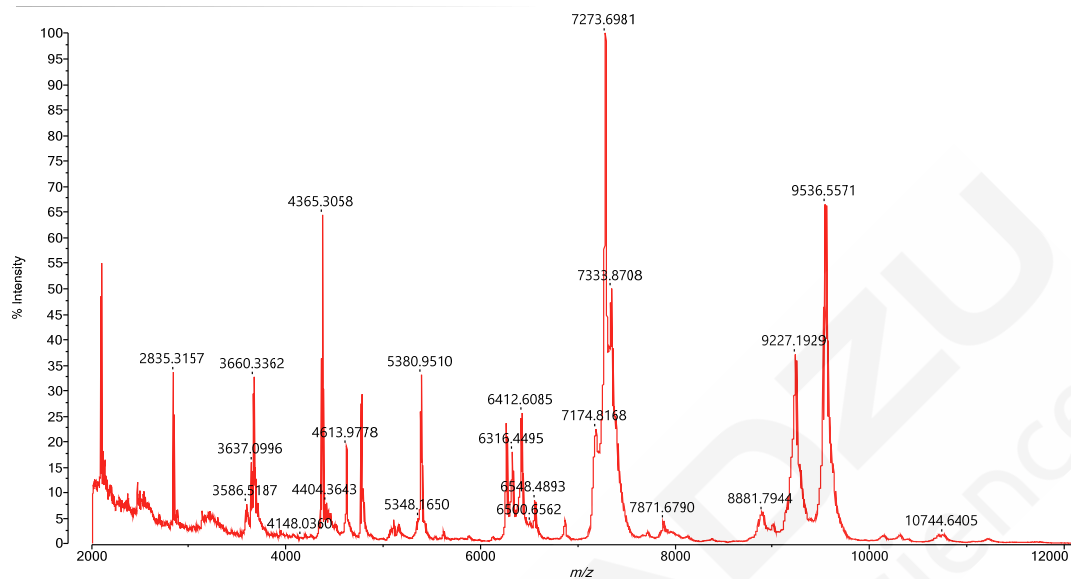


图3. ATCC 8739标准菌株的质谱图

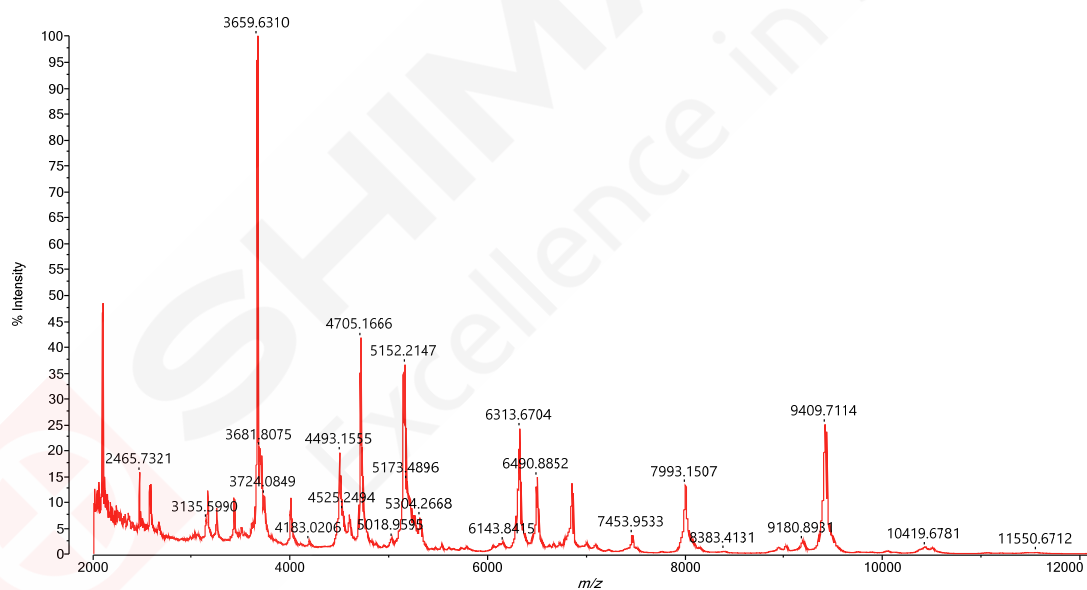


图4. 样品1的质谱图

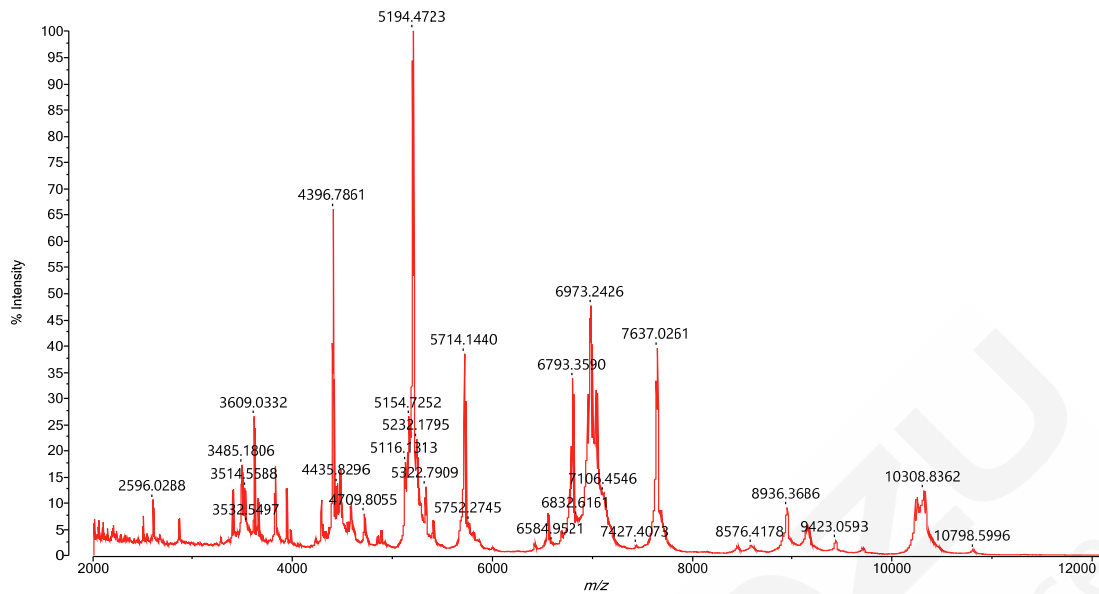


图5. 样品2的质谱图

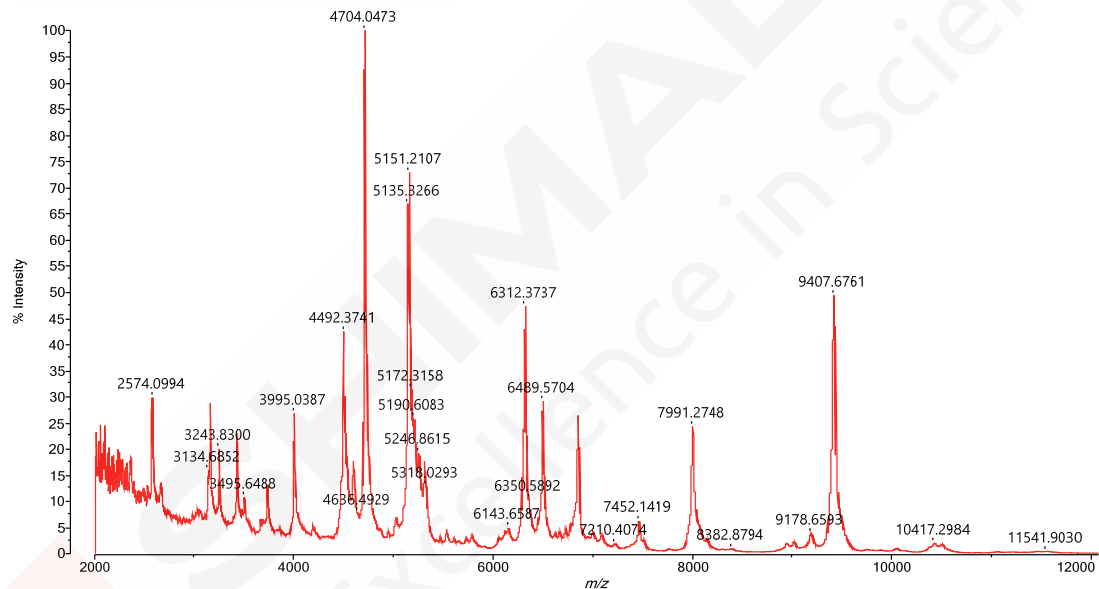


图6. 样品3的质谱图

全选		全不选		导出结果	打印报告					
选择	样本号	菌株英文名称	菌株中文名称	提示	鉴定结果	置信水平	鉴定来源	鉴定时间	鉴定次数	状态
<input checked="" type="checkbox"/>	F2_0001	Escherichia coli	大肠埃希菌	⚠	79.88	■	标准库-全部	2024/3/11 12:21:49	1	已鉴定
<input checked="" type="checkbox"/>	F1_0001	Lactobacillus mucosae	黏膜乳杆菌		34.47	■	标准库-全部	2024/3/11 12:21:44	1	已鉴定
<input checked="" type="checkbox"/>	E4_0001	Lactobacillus crispatus	卷曲乳杆菌		57.59	■	标准库-全部	2024/3/11 12:21:37	1	已鉴定
<input checked="" type="checkbox"/>	E1_0001	Lactobacillus mucosae	黏膜乳杆菌		31.57	■	标准库-全部	2024/3/11 12:21:33	1	已鉴定
<input checked="" type="checkbox"/>	D1_0001	Lactobacillus crispatus	卷曲乳杆菌		62.02	■	标准库-全部	2024/3/11 12:21:31	1	已鉴定
<input checked="" type="checkbox"/>	D3_0001	Lactobacillus fermentum	发酵乳杆菌		74.97	■	标准库-全部	2024/3/11 12:21:28	1	已鉴定
<input checked="" type="checkbox"/>	C1_0001	Lactobacillus crispatus	卷曲乳杆菌		64.59	■	标准库-全部	2024/3/11 12:21:23	1	已鉴定
<input checked="" type="checkbox"/>	C3_0001	Lactobacillus fermentum	发酵乳杆菌		77.60	■	标准库-全部	2024/3/11 12:21:26	1	已鉴定
<input checked="" type="checkbox"/>	A2_0001	Lactobacillus parabuchneri	类布氏乳杆菌		75.51	■	标准库-全部	2024/3/11 12:21:20	1	已鉴定

图7. 数据库检索结果界面

质谱数据经软件处理后，导入数据库检索（图7）。数据库鉴定结果置信度阈值为25，高于25即为阳性结果。经鉴定8个样品均为阳性结果，本次实验羊奶中检测到的微生物主要为卷曲乳杆菌、粘膜乳杆菌、发酵乳杆菌、类布氏乳杆菌等有益微生物，详细鉴定结果见表1。

表 1 羊奶中微生物鉴定结果

菌株编号	鉴定菌种名称		鉴定得分
	英文名	中文名	
1	<i>Lactobacillus mucosae</i>	黏膜乳杆菌	34.47
2	<i>Lactobacillus crispatus</i>	卷曲乳杆菌	57.59
3	<i>Lactobacillus mucosae</i>	黏膜乳杆菌	31.57
4	<i>Lactobacillus crispatus</i>	卷曲乳杆菌	62.02
5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌	74.97
6	<i>Lactobacillus crispatus</i>	卷曲乳杆菌	64.59
7	<i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌	77.6
8	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	类布氏乳杆菌	75.51
ATCC8739	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希菌	79.88

3. 结论

本文采用岛津公司台式飞行时间质谱 MALDI-8020，结合毅新博创微生物数据库，快速准确鉴定羊奶中的微生物菌群，本次实验检测到的微生物为卷曲乳杆菌、发酵乳杆菌、类布氏乳杆菌等有益微生物。MALDI-TOF 指纹图谱法前处理简单、速度快、操作简便，同时数据库中含有 3000 种以上的菌种标准谱图，是微生物鉴定的有力分析方法。

使用统计分析软件对链球菌进行分型

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。

■ 样品制备和检测条件

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MALDI-TOF MS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。

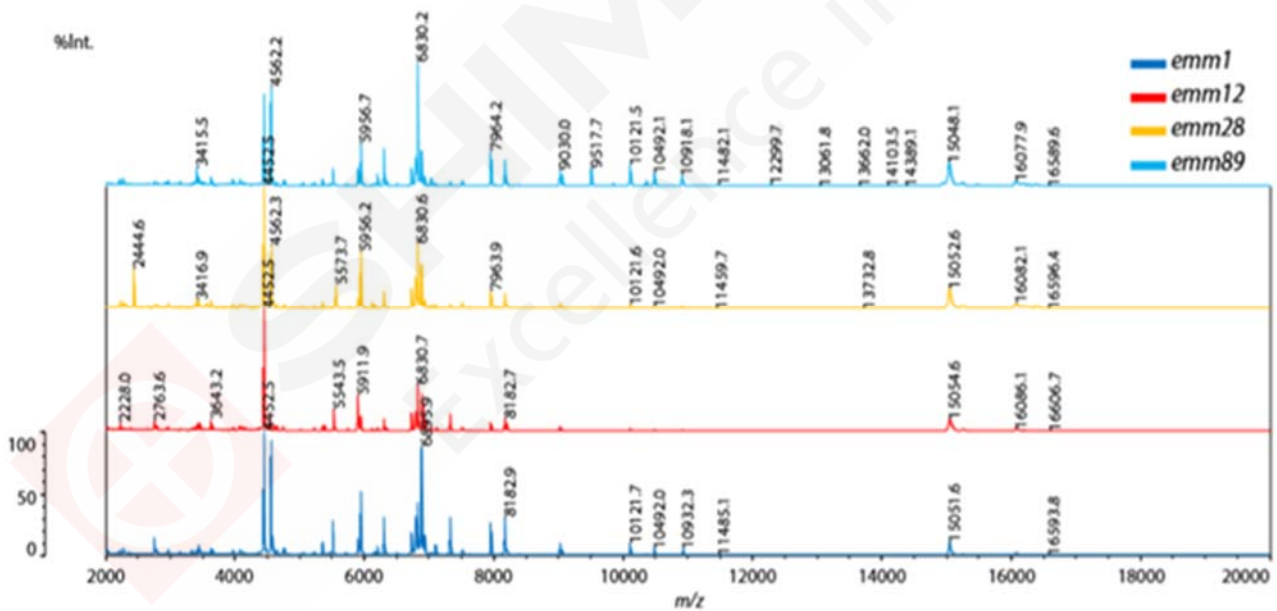


图1 emm1型链球菌与其他类型链球菌的质谱图比较

■ 分析结果

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)。

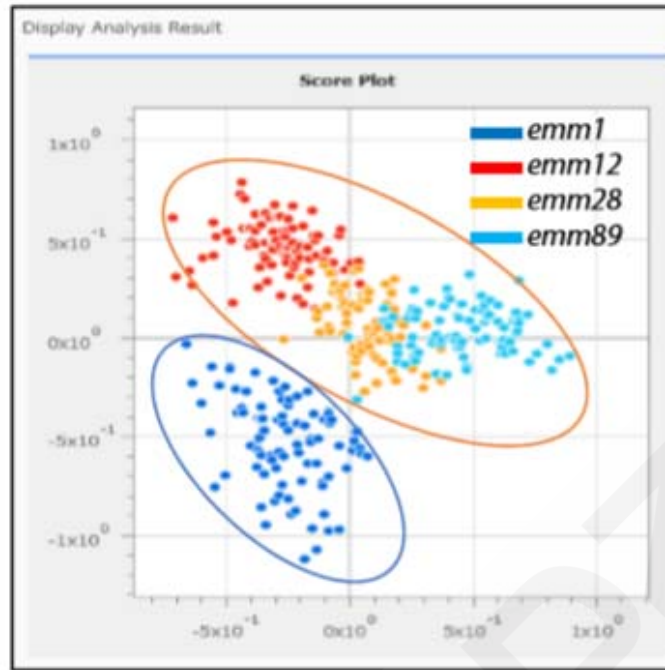


图2 A群链球菌多变量分析结果（记分图）

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/z10932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）。

Peak Matrix 1519 peaks						
<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	0.13935	0	2	0	0

图3 利用峰矩阵函数识别标记峰

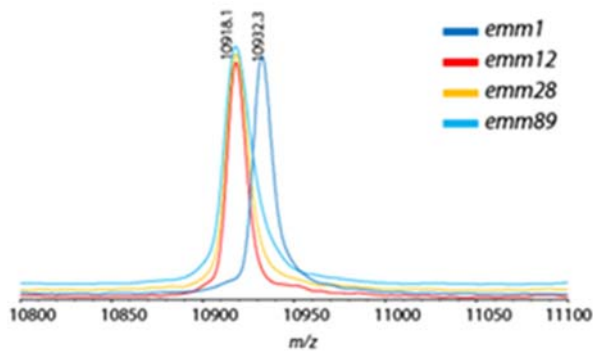


图 4 A 群链球菌 emm1 型及其他类型的放大质谱图

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

■ 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。

药用辅料PEG6000的分子量及分布检测

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

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

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

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

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

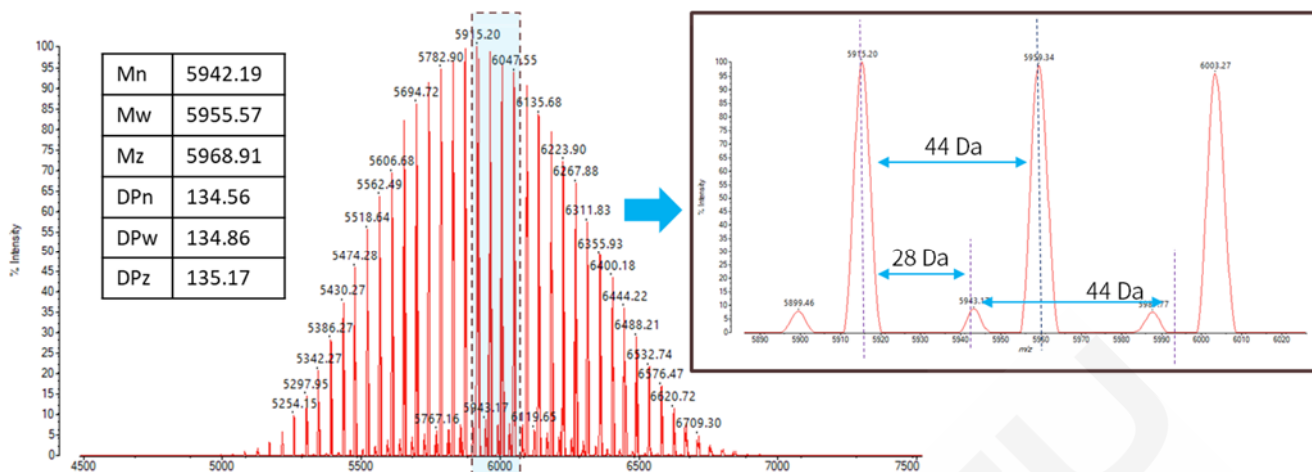


图 1. PEG6000 的一级质谱图

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

mRNA 药物递送系统脂质纳米粒的原料分子量检测

摘要: 本文应用岛津台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 对 mRNA 药物及疫苗生产所用的脂质纳米粒 (LNPs) 的四种原料 (可电离脂质、中性辅助脂质、胆固醇和 PEG 修饰脂质) 进行质谱分析, 可以快速检测原料样品的分子量及组成信息。本方法操作简便、分析速度快, 结果直接可靠, 为 mRNA 药物及疫苗递送介质原料的质量控制提供了参考。

关键词: MALDI-TOF 脂质纳米粒 原料 分子量

脂质纳米粒 (LNPs) 是目前 mRNA 药物和疫苗研究应用最多的递送系统, 也可用于递送寡核苷酸药物, 通常由可电离脂质, 胆固醇, 中性辅助脂质和 PEG 修饰脂质四种成分组成。可电离脂质的头部氨基在酸性条件下会质子化并带正电荷, 这使其对 RNA 有很强的包载能力, 增强体内逃逸。胆固醇常作为 LNP 配方的结构脂质, 可以增强 LNP 的稳定性, 介导 LNP 内吞, 并有利于确保 LNP 的双层结构及脂质的流动性。辅助性中性脂质一般为饱和磷脂, 可以自发地组织形成脂质双层。PEG 修饰脂质位于脂质纳米粒表面, 其亲水端 (PEG 链) 向外形成脂质纳米粒的保护性外壳, 可以阻止血清蛋白吸附和单核吞噬细胞系统的摄取, 同时防止 LNP 颗粒聚集, 提高 LNP 的稳定性。

不同供应商的 LNPs 原料质量不一, 原料质量的细小变化可能会造成 LNP 形态及 mRNA 包裹效果的差异, 最终对 mRNA 药物和疫苗的有效性及其作用发挥的稳定性产生影响。因此, 对作为 LNPs 主要原料的分子量进行监测, 保证原料批次间的一致性与稳定性, 对保障 mRNA 药物临床效果的有效性及其稳定性具有重要意义。本文应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 对可电离脂质 Dlin-MC3-DMA 与 SM-102、中性辅助脂质 DSPC、胆固醇、PEG 修饰脂质 DMG-PEG2000 等 5 种 LNPs 常见的原料样品进行分子量检测, 同时可以对样品的纯度进行确认, 可作为核酸药物和疫苗辅料质控的参考。

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 激光能量 : 70-80
激光器 : 355 nm 固态激光器 离子门阈值 : 300
扫描范围 : m/z 300-4000 脉冲引出质量 (Da) : 1800

1.3 样品前处理

称取样品使用甲醇溶解, 配制为 1 mg/mL 的样品溶液。取 0.5 μ L NaTFA 溶液 (1 mg/mL)、1 μ L 样品溶液和 1 μ L 基质溶液 (30 mg/mL) 依次点靶, 自然干燥后将靶板送入质谱分析。各样品的基质信息见下表。

表1 各样品对应的基质及辅助盐信息

样品	Dlin-MC3-	SM-102	Cholester	DSPC	DMG-
基质	DHB	DHB	9-AA	DHB	葱三酚
盐	NaTFA	NaTFA	-	NaTFA	NaTFA

2. 结果与讨论

2.1 可电离脂质、中性辅助脂质、胆固醇分子量检测

应用 MALDI-8020 检测可电离脂质 Dlin-MC3-DMA 与 SM-102、中性辅助脂质 DSPC、结构脂质胆固醇的分子量，结果如图 1 所示，分子量检测信息见表 2。

图 1A 为可电离脂质 Dlin-MC3-DMA 的质谱图，样品检测到 m/z 642.51、 m/z 690.47 的离子峰，其中 m/z 642.51 为 Dlin-MC3-DMA 的加氢峰 ($[M+H]^+$ ，理论值为 m/z 642.62)， m/z 690.47 推测为杂质。

图 1B 为可电离脂质 SM-102 的质谱图，样品检测到 m/z 710.55 的离子峰，对应 SM-102 的加氢峰 ($[M+H]^+$ ，理论值为 m/z 710.67)。

图 1C 为中性辅助脂质 DSPC 的质谱图，样品检测到 m/z 790.56 与 m/z 1580.22 的离子峰，前者对应 DSPC 的加氢峰 ($[M+H]^+$ ，理论值为 m/z 790.63)，后者对应 DSPC 的二聚体加氢峰 ($[2M+H]^+$ ，理论值为 m/z 1580.26)。

图 1D 为胆固醇的质谱图，样品检测到 m/z 387.28 的离子峰，对应胆固醇的加氢峰 ($[M+H]^+$ ，理论值为 m/z 387.36)。样品整体纯度较好，质谱图上杂质峰较少。

表2. 样品分子式及分子量检测结果

名称	分子式	$[M+H]^+$ mono 理论值	实测值 (m/z)
Dlin-MC3-DMA	$C_{43}H_{79}NO_2$	642.62	642.51
SM-102	$C_{44}H_{87}NO_5$	710.67	710.55
DSPC	$C_{44}H_{88}NO_8P$	790.63	790.56
胆固醇	$C_{27}H_{46}O$	387.35	387.28

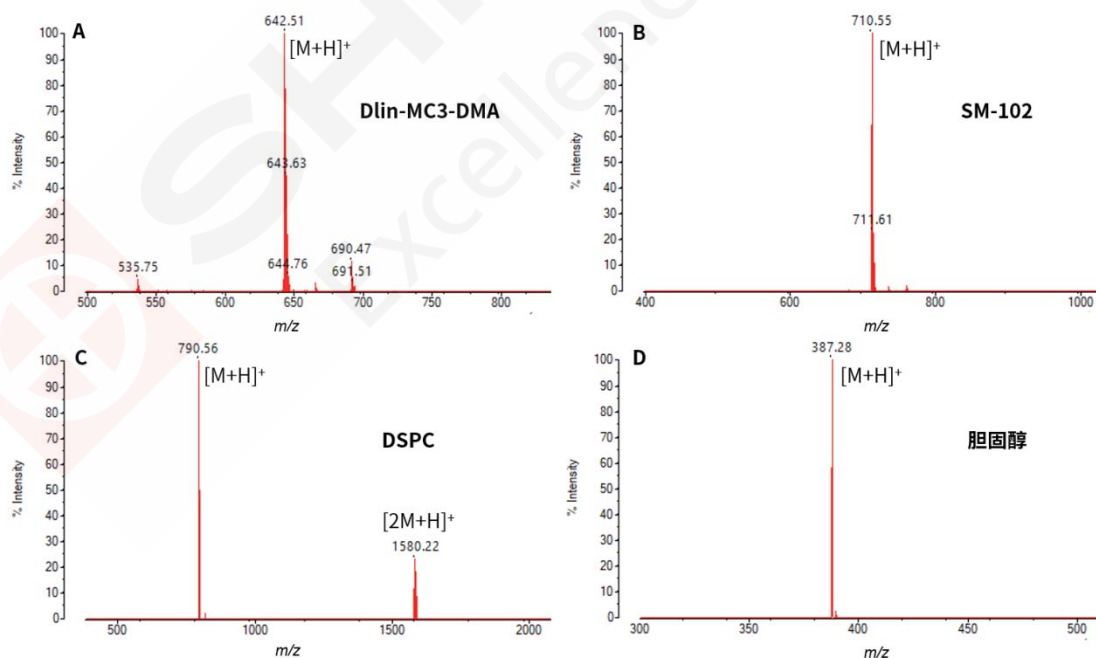


图 1. 样品检测质谱图. A: Dlin-MC3-DMA; B: SM-102; C: DSPC; D: 胆固醇

2.2 PEG修饰脂质DMG-PEG2000分子量检测

应用 MALDI-8020 对 PEG 修饰脂质 DMG-PEG2000 原料进行检测，质谱图见图 2。由图可见，样品在 m/z 1900-3100 范围内检测到一系列分子量依次相差 44 Da 的聚合物离子峰。使用聚合物软件 Polymerix (Sierra Analytics) 分析样品，分析结果示例见图 3，样品化学式为 $C_{32}H_{62}O_5(C_2H_4O)_n \cdot Na$ ，对应 DMG-PEG2000 (分子式 $C_{32}H_{62}O_5(C_2H_4O)_n$) 的钠离子加合峰。Polymerix 软件自动计算得到的数均分子量 M_n 、重均分子量 M_w 、质均分子量 M_z 、多分散度 PD、聚合度 DP 等相关信息见图 3。

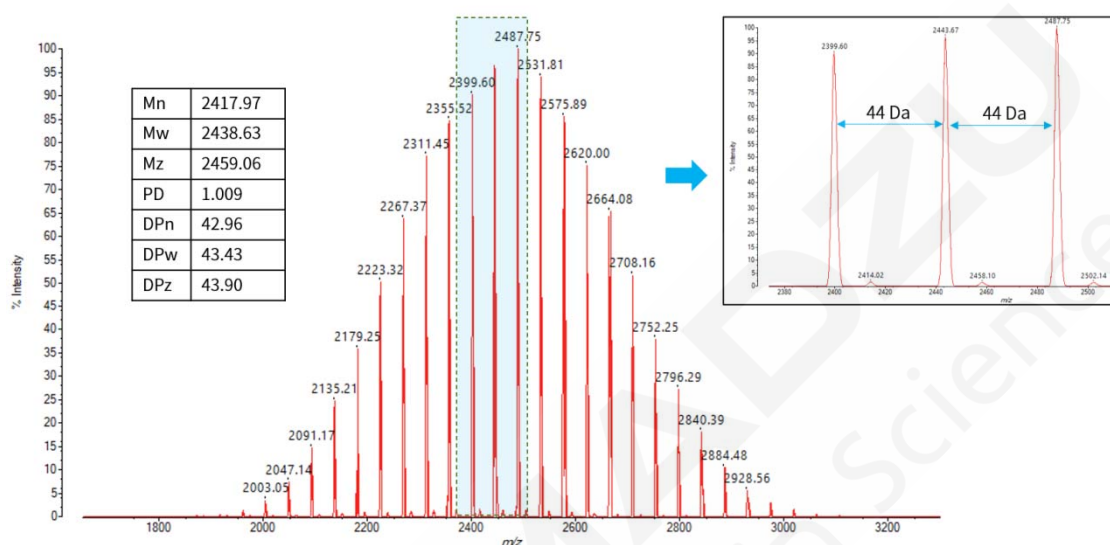


图 2. DMG-PEG2000 样品质谱图

Series Label	M_n	M_w	M_z	PD	DP _n	DP _w	DP _z	Percent Series	Percent Spectrum	Alpha End Group	Repeat	Omega End Group	Charge State	Adduct	Loss	Series Formula
Total/Average	2417.966	2438.629	2459.058	1.009	42.963	43.433	43.897	100.00	100.00	CH3O	C2840	C3185904	1 Na			CH3O [C2840] _n C3185904 + Na
S1	2417.966	2438.629	2459.058	1.009	42.963	43.433	43.897	100.00	100.00	CH3O	C2840	C3185904	1 Na			CH3O [C2840] _n C3185904 + Na

图3. Polymerix软件分析结果

3. 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 检测了 4 类不同类型的 LNPs 原料样品，包括可电离脂质、中性辅助脂质、胆固醇与中性辅助脂质，得到了具体的分子量分布及组成信息，为 LNPs 原料的质量控制提供了依据。本方法操作简单、检测成本低、分析速度快，结果直接、准确、可靠，可作为 mRNA 药物及疫苗递送介质原料质控的参考。

聚氧丙烯硬酯醇醚的分子量及分布检测

摘要：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF）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分子量分布、单体结构等信息。本例使用 MALDI-TOF，以 CHCA 为基质，对一种护肤品及护发品中常见的药用聚合物辅料聚氧丙烯硬酯醇醚进行分析，得到了样品的分子量及分布信息。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF 聚氧丙烯硬酯醇醚 分子量

聚氧丙烯硬酯醇醚是一种药用聚合物辅料，具有润滑、润湿、增塑、分散等特性，常用于药品与化妆品中。在护肤品中，其具有优秀的润肤保湿功效，增加肌肤弹性。在护发品中，赋予头发光泽，并有一定的定型作用，可用于发胶的增塑增稠剂。聚合物的聚合度及分子量分布会影响其性能，因此有必要对聚合物进行检测。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF）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和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。

本文以CHCA为基质，使用岛津MALDI-8020及聚合物分析软件Polymerix（Sierra Analytics.）分析了三个不同批次的药用辅料聚氧丙烯硬酯醇醚的分子量分布及单体信息，可作为药用聚合物辅料样品分析时的参考。

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 500-3000

激光能量：55-60

2. 样品前处理

吸取聚氧丙烯硬酯醇醚样品溶液用乙醇配制成 1 mg/mL 的工作液，取 10 μ L 样品工作液、10 μ L CHCA 基质溶液（10 mg/mL）、5 μ L NaTFA 辅助盐溶液（5 mg/mL）混匀，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

3.1 质谱检测结果及多谱图比对分析

将三个不同批次的聚氧丙烯硬酯醇醚按样品前处理流程点样后，使用 MALDI-8020 进行检测，质谱图见图 1-图 3。三个样品中均含有两簇聚合物样品峰，第一簇集中在 m/z 500-1300，第二簇集中在 m/z 1300-2000，单体分子量 58 Da，与聚氧丙烯硬酯醇醚单体的理论分子式-C₃H₆O-相符。

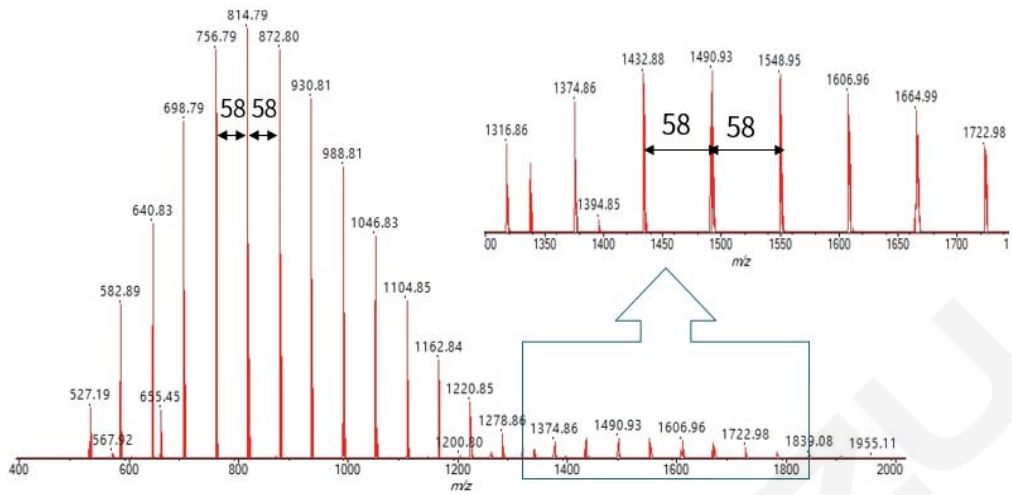


图 1. 样品 1 的质谱图

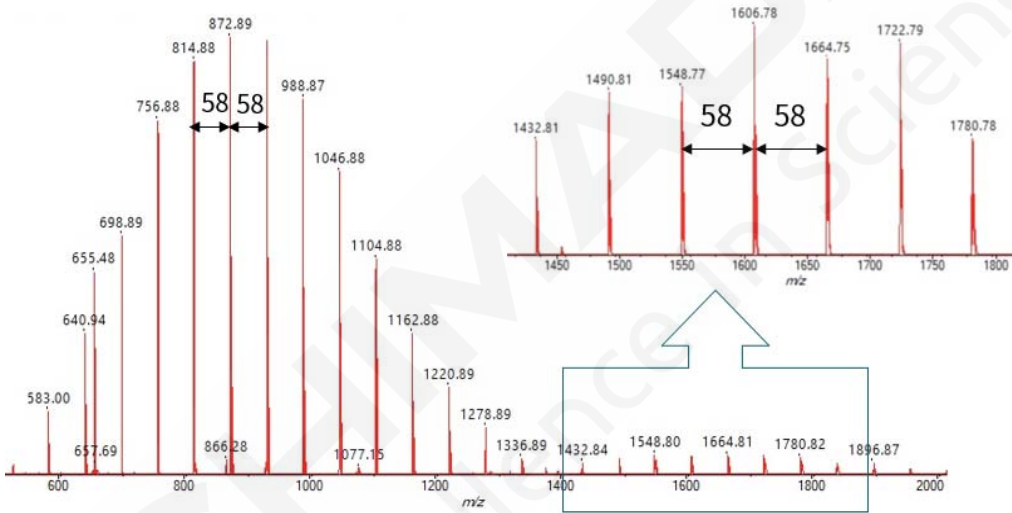


图 2. 样品 2 的质谱图

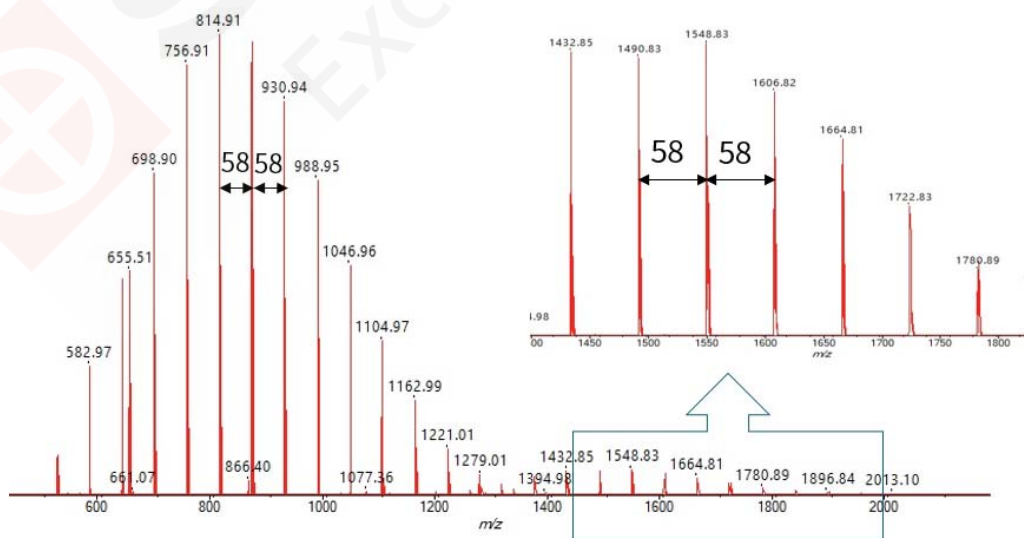


图 3. 样品 3 的质谱图

将三个批次样品的质谱图在分析软件中进行对比分析（图 4），结果显示，三个样品质谱图出峰较为类似，主要离子峰均集中在 m/z 500-2000，主要离子质荷比 (m/z) 一致。总体来看，样品分子量及分布一致，样品之间无明显差异。

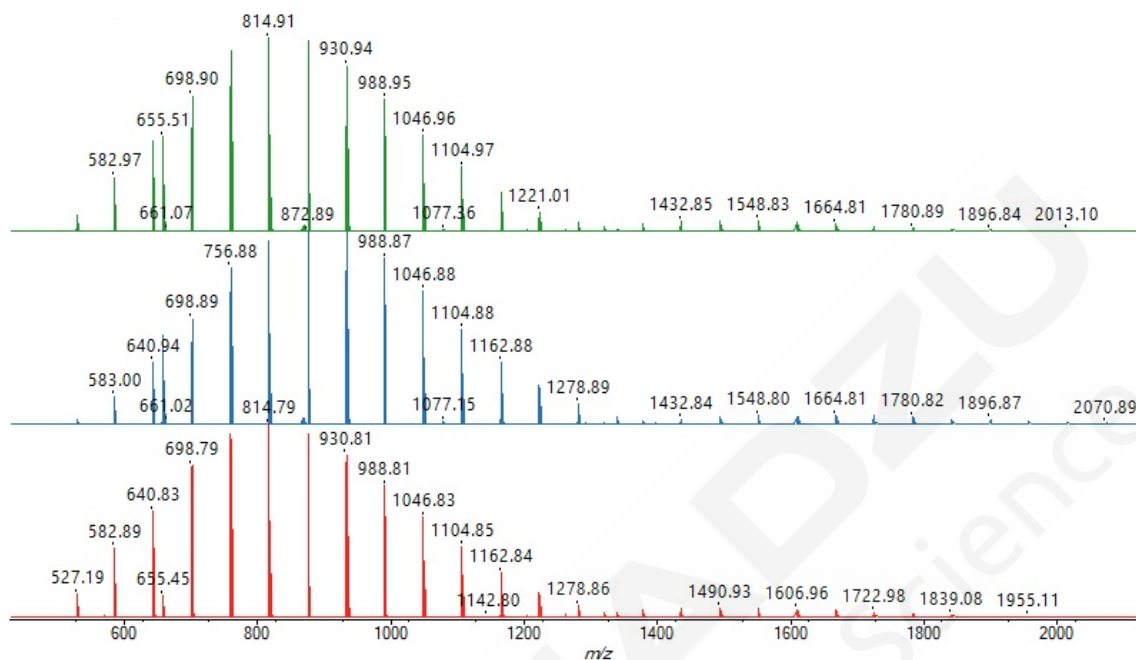


图 4. 三个批次样品质谱图对比分析

3.2 聚合物分析软件计算结果

借助第三方聚合物分析软件 Polymerix (Sierra Analytics)，可以分析并获得样品的数均分子量 M_n 、重均分子量 M_w 、质均分子量 M_z ，多分散度 PD，聚合度 DP，分子式 Series Formula 等相关信息。使用 Polymerix 软件对三个聚氧丙烯硬酯醇醚样品分子量分布信息进行分析，分析详细结果见表 1。软件预测聚氧丙烯硬酯醇醚的分子式为 $C_{18}H_{38}(C_3H_6O)_nNa$ ，表明质谱检测到的样品离子峰主要为加钠峰 ($[M+Na]^+$)。

表 1. Polymerix 软件分析结果

No.	M_n	M_w	M_z	PD	DP_n	DP_w	DP_z	Repeat	Adduct	Series Formula
Sample1	830.718	863.525	895.562	1.039	9.656	10.221	10.773	C_3H_6O	Na	$C_{18}H_{38}(C_3H_6O)_nNa$
Sample2	830.551	863.265	895.175	1.039	9.653	10.216	10.766	C_3H_6O	Na	$C_{18}H_{38}(C_3H_6O)_nNa$
Sample3	838.887	866.218	893.284	1.033	9.796	10.267	10.733	C_3H_6O	Na	$C_{18}H_{38}(C_3H_6O)_nNa$

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 分析聚氧丙烯硬酯醇醚，使用 Polymerix 软件分析，可以快速得到样品的分子量分布、单体质量、聚合度、多分散度等信息。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。

口腔护理产品中消毒剂成分聚维酮碘检测

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

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

■ MALDI-TOF 质谱仪

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

■ 产品中聚维酮碘的直接检测

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

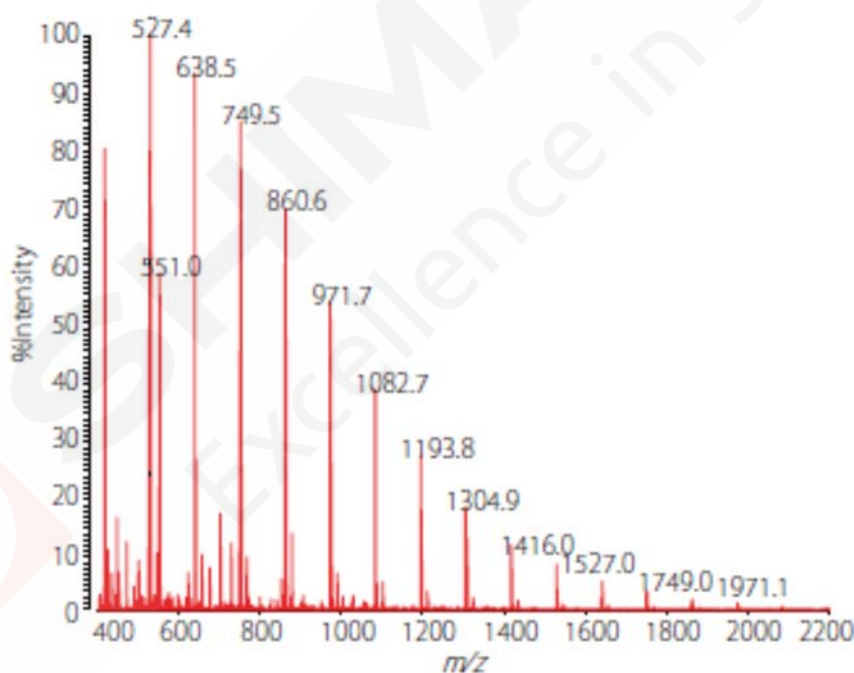


图1. 市售漱口水（A）的质谱图 测定模式：Positive Linear

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

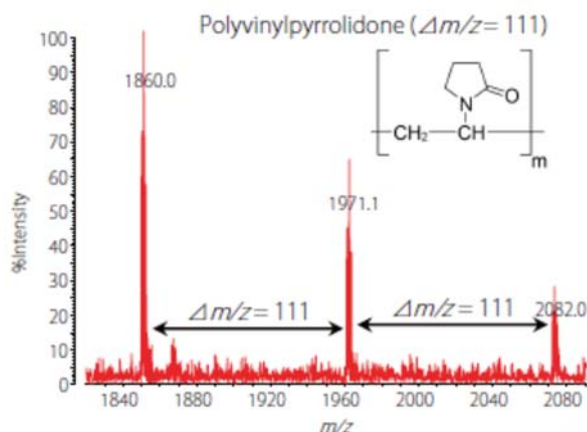


图2. 市售漱口水 (A) 的质谱放大图 测定模式: Positive Linear

■ 产品中氯己定的直接检测

氯己定以葡萄糖酸盐的形式存在于产品中。与聚维酮碘的操作相同，将市售漱口水 (B) 极少量滴到 MADLI 靶板上，再点上 0.5 μL 基质溶液，干燥后进行检测。测定所得质谱图如图 3 所示，在谱图上观察到氯己定的信号。氯己定含有两个氯原子，可以获得特殊的同位素分布。将测得的谱图与理论同位素分布进行比较，可以看出两者一致。

如此，通过使用正离子线性模式专用台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020”，无需预处理即可简单快速地检测出产品中所含的低分子量化合物。

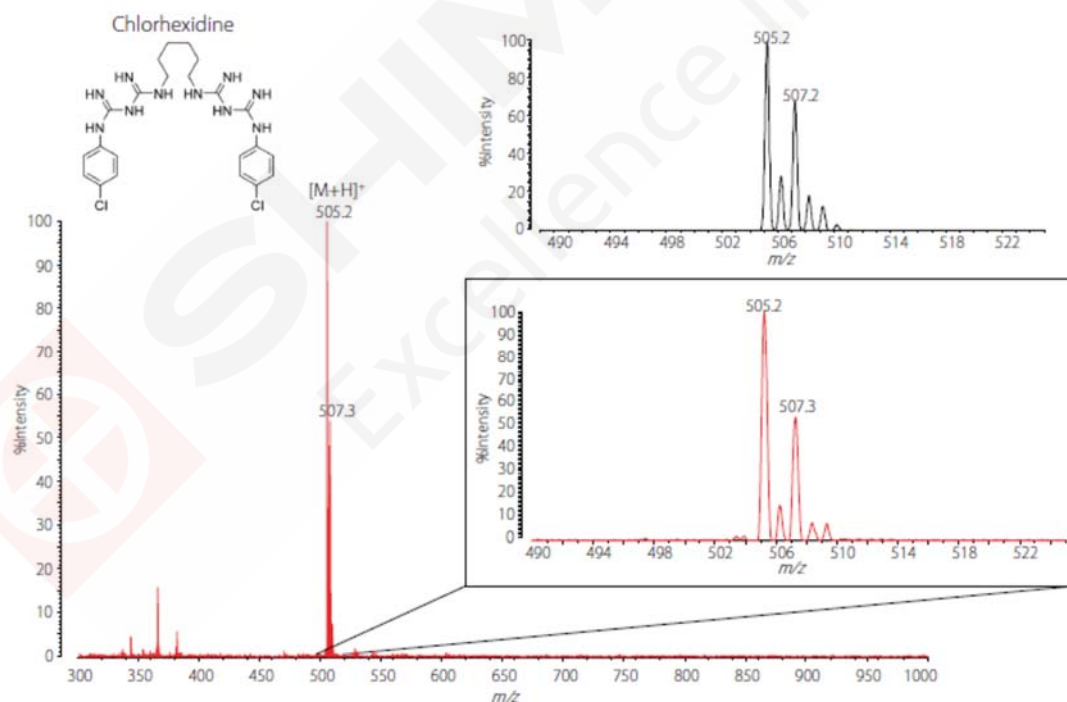


图3. 市售漱口水 (B) 的质谱图和氯己定的理论同位素分布

红: 实测质谱图、黑: 理论同位素分布图

测定模式: Positive Linea

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控制实验室。

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) 一琥珀酸上的维生素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。本文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)。

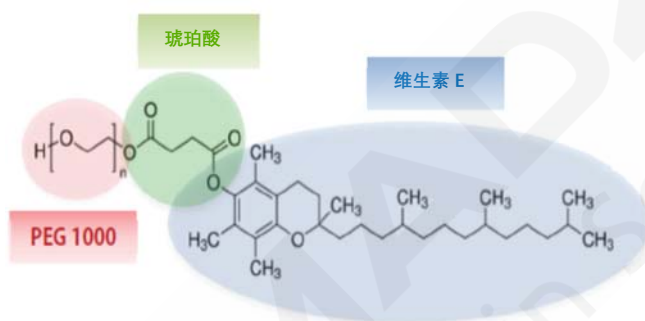


图1 维生素E-TPGS 的结构

■ 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。



图2 维生素E-TPGS聚合物分析的工作流程

表1 MALDI-MS 质谱采集参数

调谐模式	线性
极性	正离子
扫描范围	100-3000 Da
激光频率	200 Hz
轰击次数 (单个谱图)	50
累积谱图数	200

■ 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)。

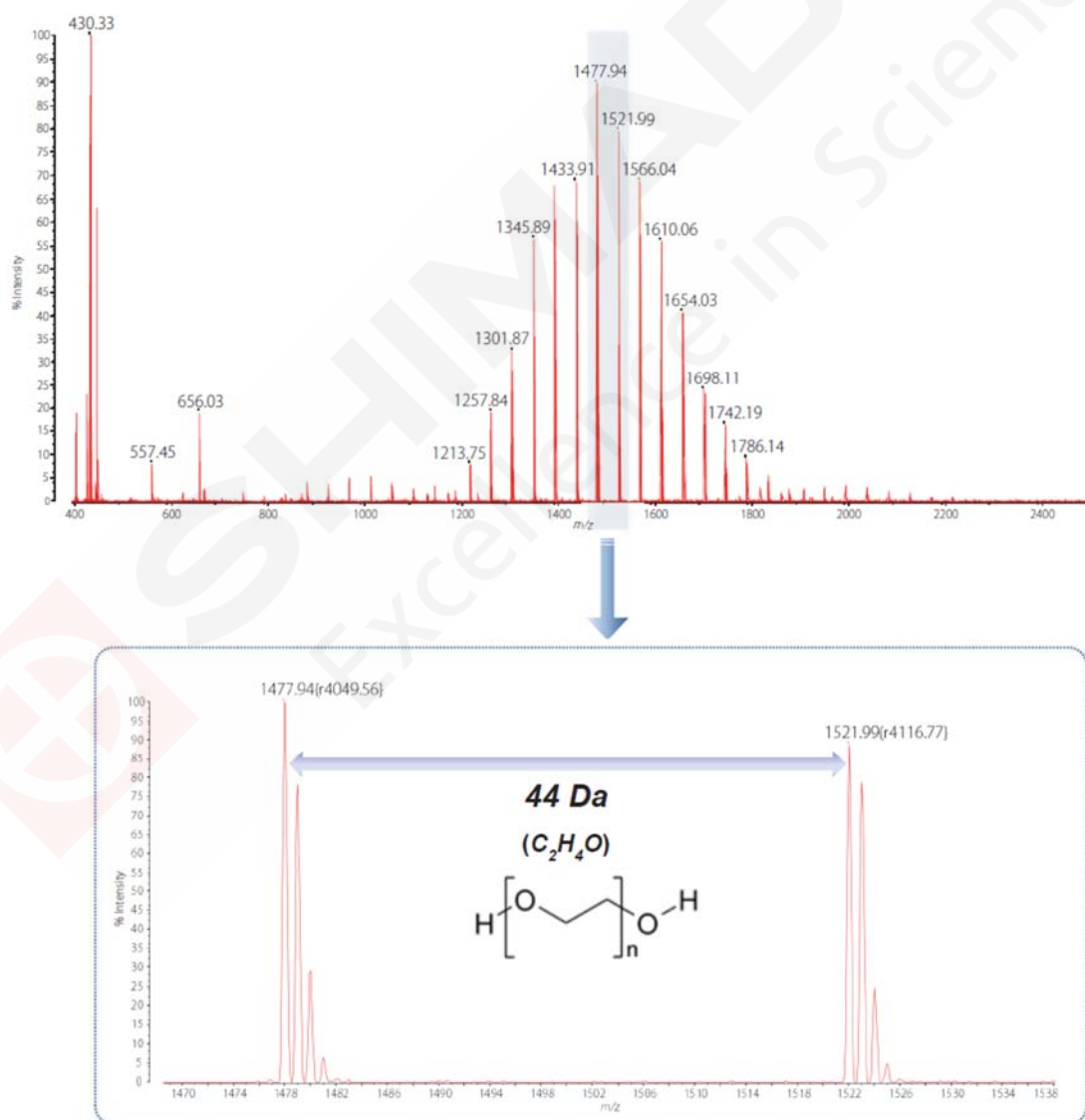


图3 维生素E-TPGS的钠加合离子质谱图 (上) 和将蓝色覆盖部分局部放大的质谱图 (下)

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(CH₂)₂部分的离子所示的结构式一致(如图4 a和b所示)。

另外, 图5显示了使用Polymerix软件分析均聚物系列(图6)的末端基团的结构式和化学式。

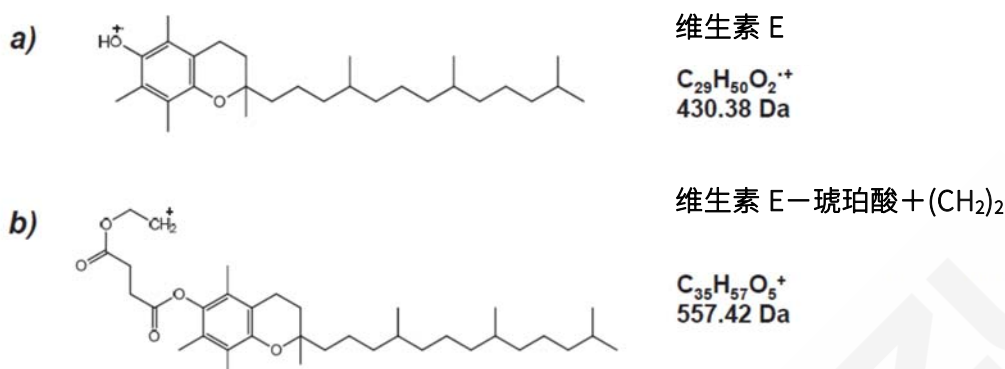


图4 a) 维生素E(自由基离子)的结构式及化学式

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

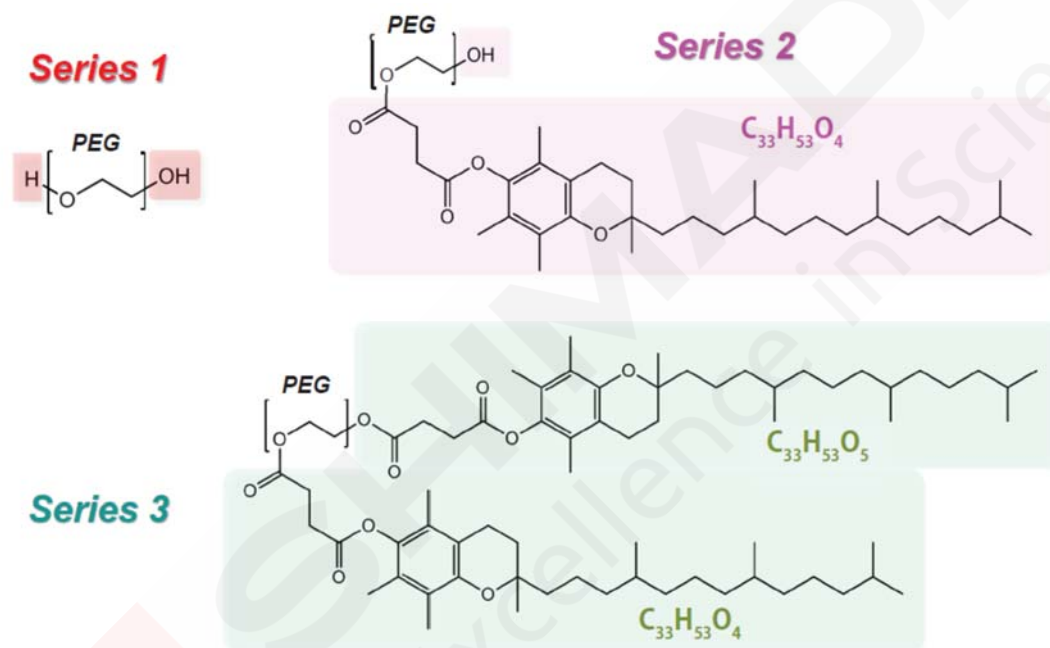


图5 a) 计算得到的均聚物末端基团的结构式及化学式

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)。

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。

	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			1.0	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 a) 使用Polymerix软件进行均聚物解析时的系列定义表



图7 使用Polymerix软件分析生成的均聚物的赋值图



抗血栓药物磺达肝癸钠分析

摘要：磺达肝癸钠由于自身的结构特点使得利用色谱或色谱-质谱串联技术检测分子量及相关杂质相对困难。本文应用台式双极性 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8030 在负离子模式下直接测定磺达肝癸钠的分子量，无需色谱分离，简单快速，可为同类型样品测试提供参考。

关键词： MALDI-TOF 负离子 磺达肝癸钠 分子量

技术特点：

- ❖ 前处理简单，无需色谱分离，简单快速。
- ❖ 应用 MALDI-8030 在负离子模式下直接测定磺达肝癸钠的分子量。

磺达肝癸钠是一种人工合成的新型抗血栓药物，属于高选择性的Xa因子抑制剂，主要通过抗凝血酶(AT III)对Xa的特殊抑制而发挥疗效。它的结构中含五个糖单元，每个糖单元上都结合了磺酸钠基团，具有很强的极性，在常规反相C18柱上保留行为不佳，使用离子色谱分析由于需要的淋洗液浓度很高致使电导检测困难。磺达肝癸钠本身的结构特点使得利用色谱或色谱-质谱串联技术检测磺达肝癸钠的分子量及相关杂质成为一个难题。本文建立了应用台式双极性MALDI-TOF质谱仪MALDI-8030在负离子模式下分析磺达肝癸钠分子量的方法，无需色谱分离，可以直接测得磺达肝癸钠的分子量及分布情况，简单快速，具有较高实用价值。

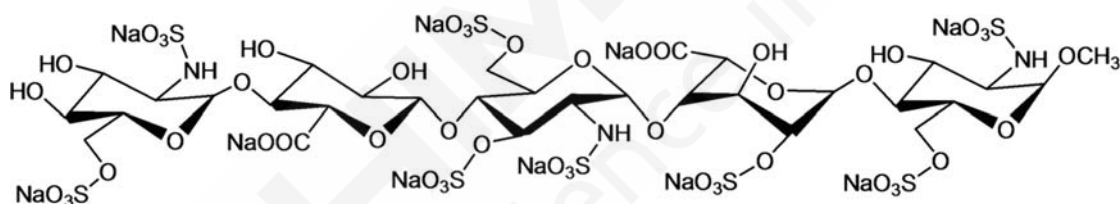


图 1. 磺达肝癸钠结构式

(化学式 $C_{31}H_{43}N_3Na_{10}O_{49}S_8$ ，平均分子量 1728.03 Da)

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-8030

1.2 分析条件

调谐模式：线性负离子模式

激光器：355 nm 固态激光器

扫描范围：m/z 500-5000

激光能量：90

1.3 样品前处理

取0.5 μ L 磺达肝癸钠注射液和0.5 μ L 9-AA基质溶液（10 mg/mL）依次点靶，干燥后送入质谱分析。

2. 结果与讨论

磺达肝癸钠质谱图见图 2，由图可见，样品检测到 9 个分子量依次相差 102 Da 的离子，依次为 m/z 1705.0、 m/z 1603.0、 m/z 1500.9、 m/z 1398.9、..... m/z 888.7，分别对应磺达肝癸钠有 0-8 个 SO_3Na 基团被 H 离子取代后并丢失一个 Na 离子的化合物形式。另外，样品还检测到 m/z 1727.0 的离子峰，对应磺达肝癸钠的 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 形式，质谱信号强度显著低于 $[\text{M}-\text{Na}]^-$ 及其他 SO_3Na 基团被 H 离子取代后并丢失一个 Na 离子的化合物形式，这可能是由于磺达肝癸钠富含钠离子，相比丢失氢离子，磺达肝癸钠在质谱上更容易丢失钠离子而形成减钠峰。除此之外，样品还检测到 SO_3Na 基团及 1 个 Na 离子全部被 H 离子取代后的减钠峰，如 m/z 866.5 对应磺达肝癸钠的 $[\text{M}-8\text{X}-2\text{Na}+\text{H}]^-$ 化合物形式 (X 代表一个 SO_3Na 基团被一个 H 离子取代)。

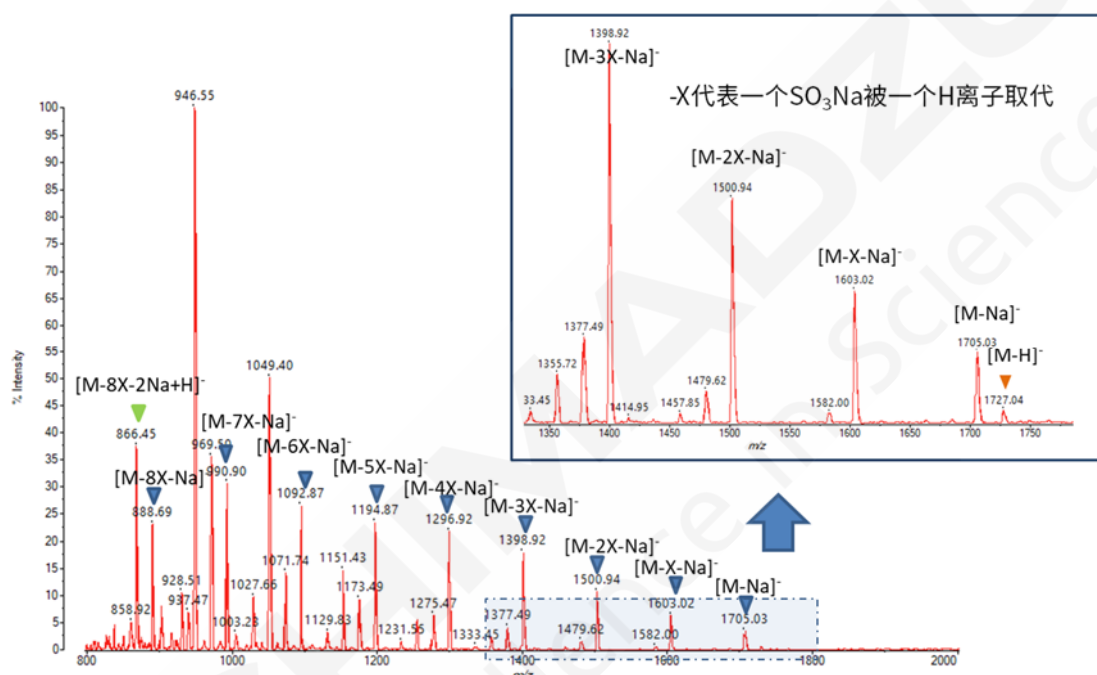


图 2. 磺达肝癸钠质谱图

3. 结论

本文应用台式双极性基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8030 在负离子模式下对磺达肝癸钠的分子量进行检测，直接得到了化合物多种离子形式下的分子量信息。该方法无需液相分离，操作简便，为色谱分析困难或者色谱串联质谱检测困难的化合物提供了参考检测手段。

聚合物的热降解分析

近年来，MALDI-TOF质谱仪被越来越多地用于合成产物和高分子化合物的简单分子量测量和分析。这是因为这种类型的仪器有几个有利的特点：产生单电荷的离子，因此可以很容易地识别分子量；质量范围很广；而且有许多溶剂可供选择，因为样品在干燥之前就已经被烘干了。

另一方面，由于过去几年社会条件的变化，政府部门、大学和私营企业强烈要求降低用于此类应用的仪器的引进和运行成本。台式“MALDI-8020”MALDI-TOF质谱仪是一种能够充分满足这些市场需求的新型仪器。值得注意的是，该仪器的飞行管较短，这是其体积小的主要特点，同时保持了与传统型号相同或更高的性能。

在材料和化学产品的最新开发和质量控制过程中，越来越需要基于分子水平的化学变化，结合耐久性测试，简单、快速地检测合成聚合物产品的降解情况。本文介绍了用MALDI-8020质谱仪分析聚合物热降解的实例。

■ 台式 MALDI-TOF MS: MALDI-8020

MALDI-8020是一种设计紧凑、空间最小的线性模式MALDI-TOF质谱仪。它在线性模式(正离子)下的性能可与传统MALDI-TOF质谱仪的相同模式相媲美。该仪器配备了200 Hz固体激光器和加载锁定室结构，可在几分钟内更换样品靶板，同时保持测量位置的真空度，确保快速进行测量。

该仪器的飞行管长度缩短为0.85 m；然而，质量分辨率与传统仪器一样好。该仪器具有实用的分辨率，即使在 m/z 4000附近也能进行同位素分离。

■ 降解模型的建立和测试条件

实验中通过重复加热和成型0、1、4和10次的过程，制备聚合物降解模型样品。我们不加处理地溶解这些聚合物，并直接使用溶液用于MALDI测量。此外，将这些聚合物在易溶的溶剂中溶解后，引入到不易溶的溶剂中，然后收集含有无沉淀物的低聚物的上清液(溶解/再沉淀法)，并用该溶液进行MALDI测量。使用葱三酚(20 mg/mL，氯仿溶剂)作为基质，Na-TFA (10 mg/mL, THF溶剂)作为阳离子剂。

■ 统计分析

包括多元分析在内的统计分析是通过与正常产品的比较来检测缺陷产品的有效工具；但是，一些商业上可获得的软件需要先进的统计分析知识，这可能给人一种使用这种软件有障碍的印象。新开发的eMSTAT SolutionTM提供直观和及时的统计分析。文中使用这个软件进行分析。

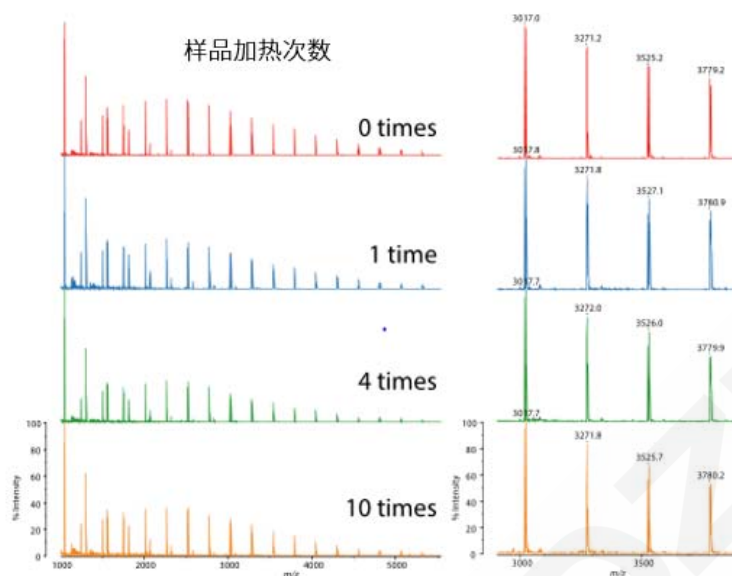


图1. 通用聚酯的质谱图
(直接溶解上样10 mg/mL, 未做任何前处理)

寡聚物结构域的测量与分析结果

首先,我们将聚合物溶解在氯仿中,并在MALDI-8020上进行测量(图1)。样品之间没有显著差异。然后,我们以氯仿为好溶剂,乙腈为差溶剂,采用溶出/再沉淀法分离出相对低分子的低聚物组分,并进行测量。结果如图3所示,从图中可以观察到与主成分信号明显不同的小分子量组分。随着加热次数的增加,这些成分呈增加趋势。所有数据转换为文本形式,在eMSTAT Solution上进行分析(图3)。在eMSTAT Solution读取数据的瞬间,统计分析结果以默认设置显示,通过直观地改变一些最低要求的参数,可以得到最优结果。如图4的得分图所示,这些成分被清晰地分为四个部分。

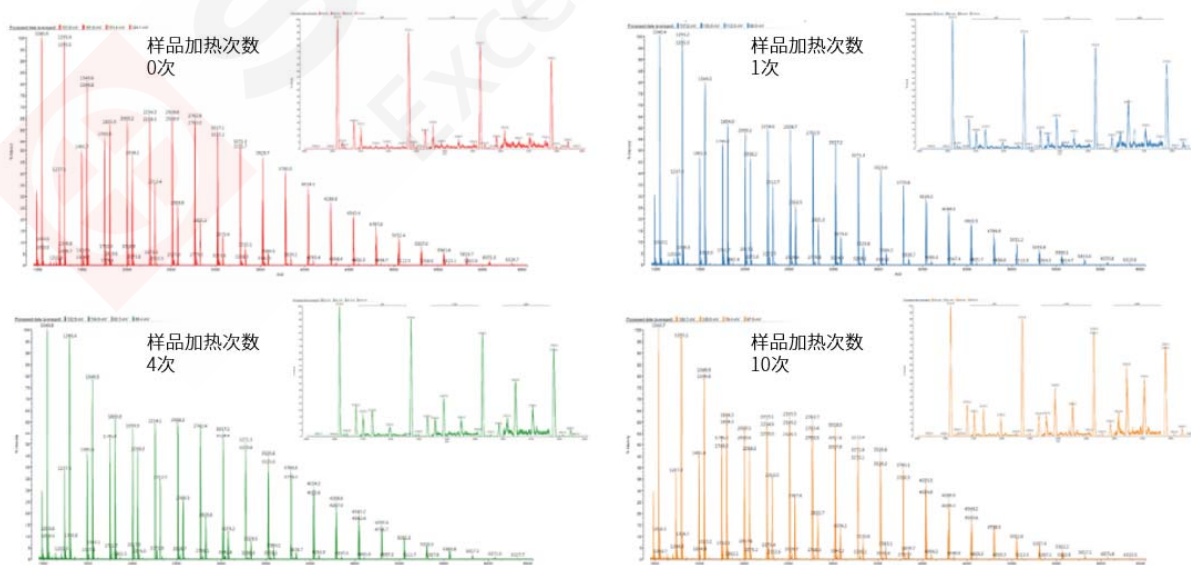


图2. 通用聚酯经过溶解/再沉淀处理后的质谱图

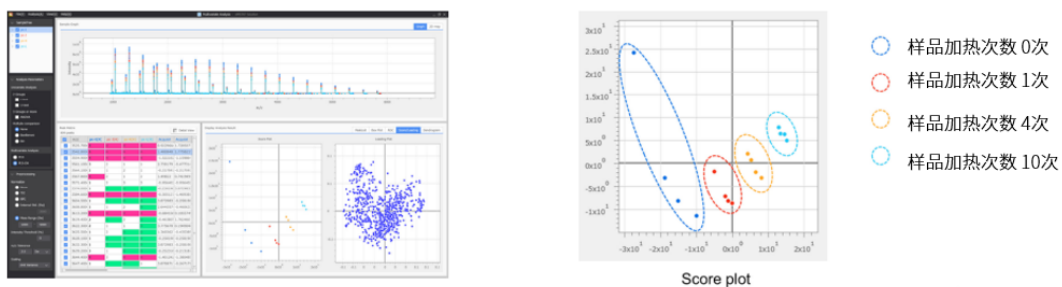


图3. 统计分析软件画面(左)和得分图放大(右)

■ 结论

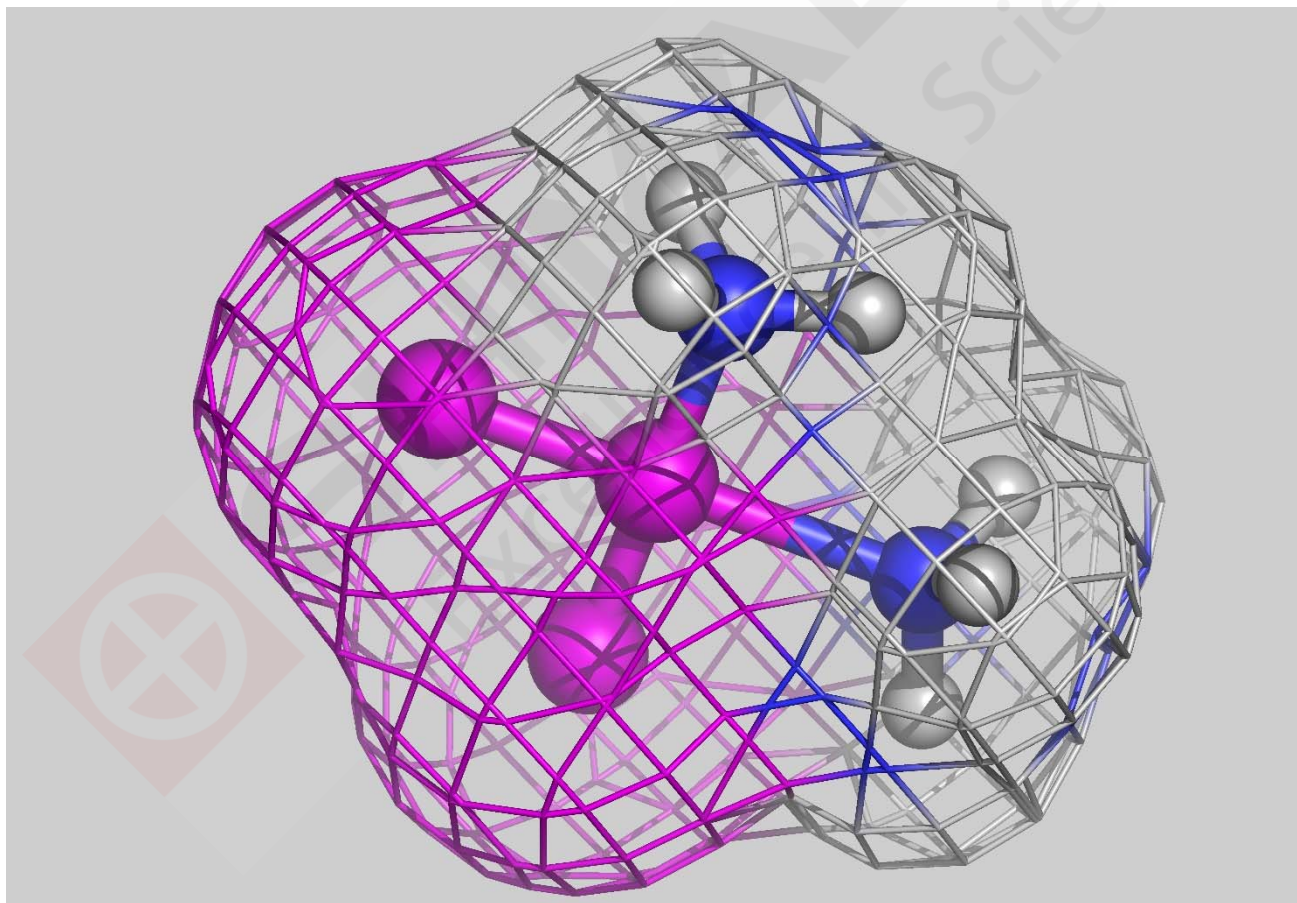
我们利用台式MALDI-8020 MALDI-TOF质谱仪和eMSTAT Solution统计分析软件对聚合物进行降解分析，快速得到了有用的结果。降解或异常成分，即使是微量的，也可能对聚合物的性质产生重大影响。最少的前处理和MALDI-8020的高性能可以作为捕获分子水平上微小变化的有效手段。此外，对于以检测特定异常组分为目的检测流程，eMSTAT Solution可作为操作简单流畅的有用软件。

2.5 金属配合物分析

金属配合物是由配体与金属原子或离子通过配位键形成的配合物。通常包括中心金属原子（或离子）和围绕它的配体。配体可以是中性分子或阴离子，它们通过提供孤对电子与金属形成配位键。金属配合物种类繁多，常见的有金属羰基配合物、冠醚配合物、N-杂环卡宾金属配合物等。

金属配合物的物理性质（颜色、熔点、沸点等）因其组成和结构而异，其通常具有较高的稳定性和催化活性，能够参与多种化学反应。金属配合物介于有机物和无机物之间，既具有有机物的高荧光量子效率的优点，又有无机物的稳定性好的特点。因此，它们在发光材料、催化剂、药物设计等领域具有广泛应用前景。

金属配合物作为发光材料，在固态下具有较强荧光，且无明显的浓度淬灭现象，适用于电致发光器件的制备。许多金属配合物具有优异的催化性能，可用于催化氧化、环氧化、加氢等化学反应。金属配合物在药物设计中也发挥着重要作用，如抗癌药物、抗菌药物等。此外，金属配合物还广泛应用于染料、涂料、塑料等工业领域。总之，金属配合物是一类结构多样、性质独特、应用广泛的化合物。随着科学技术的不断发展，人们对金属配合物的研究将不断深入，其应用领域也将不断拓展。



金属配合物的合成确认

摘要: 本文应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF) 对金属配合物进行分析, 采用反-2-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基]丙二腈 (DCTB) 基质, 在正离子模式下进行数据采集, 结果显示, 在 m/z 1-2000 范围内成功检测到样品的 $[M+H]^+$ 单一同位素峰及其同位素峰, 各同位素峰分布良好。结果表明 MALDI-TOF 适用于金属配合物的分子量表征, 分析过程具有无需样品前处理、分析速度快、分析成本低的特点。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF 金属配合物 分子量检测

技术特点:

- ❖ MALDI-TOF 用于金属配合物等有机功能材料分子量的快速确认。
- ❖ MALDI-TOF 实验可灵活使用多种溶剂, 在优化采集参数方面更便捷。

配体与金属原子或离子通过配位键形成的配合物叫金属配合物, 常见的有金属羰基配合物。金属配合物广泛用于光电领域, 它不仅是一种很好的太阳能电池材料, 还具有良好的荧光性质, 可以用来制备 LED、有机 EL 器件等的荧光材料; 此外, 金属配合物可以识别生物分子和有毒化学物质等, 因此可以作为化学和生物传感器的信号转换材料。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF) 是天然产物研究开发和合成材料质量控制的便捷工具, 无需复杂样品前处理, 上机检测速度快, 检测的主要是化合物的单电荷峰, 谱图相对简单, 易于解析。

本文展示了应用岛津 MALDI 家族最新型号台式机 MALDI-8030 检测金属配合物分子量的方法, 在正离子模式下成功检测到金属配合物样品的化合物信号。结果表明 MALDI-TOF 适用于金属配合物及其合成中间体的分子量检测, 为有机功能材料的检测提供方法参考。

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-8030

1.2 试剂与样品

基质: 反-2-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基]丙二腈 (DCTB)。

样品: 金属配合物样品化学式为 $C_{30}H_{24}Cl_2N_6Ru$, 结构式信息如图 1。

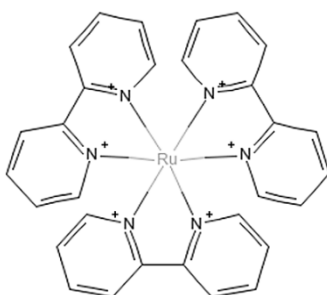


图 1. 金属配合物样品结构式

1.3 分析条件

调谐模式：线性正离子模式 激光能量：50
激光器：355 nm 固态激光器 扫描频率：200 Hz
扫描范围：m/z 1-2000

2. 样品前处理

将样品干粉用乙腈配制成 1mg/mL 的溶液，充分溶解后作为样品工作液。用二氯甲烷将反-2-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基]丙二腈 (DCTB) 基质配制成 10 mg/mL 的基质溶液。将上述 1 μ L 样品工作液点到靶板上。待自然干燥后再覆盖 1 μ L 基质溶液。待自然干燥后，将靶板送入质谱分析。

3. 结果与讨论

以反-2-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基]丙二腈 (DCTB) 为基质，金属配合物样品在正离子模式下进行质谱数据采集，质谱分析结果如下。

金属配合物样品分子式为 $C_{30}H_{24}Cl_2N_6Ru$ ，理论分子量（单一同位素分子量）为 640.05。样品质谱检测结果如图 2 所示，在 m/z 1-2000 范围内，检测到该样品的[M+H]⁺单一同位素峰（m/z 641.18）及其同位素峰，各同位素峰分布良好。检测结果与理论值相符。

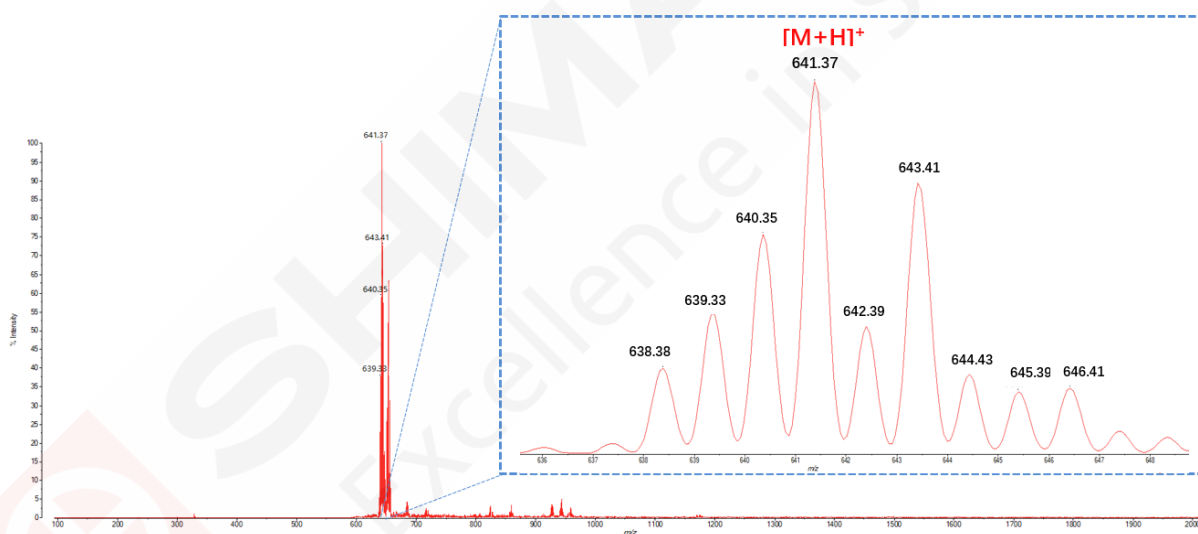


图 2. 金属配合物样品质谱图 (m/z 1-2000)

4. 结论

本文应用岛津台式机MALDI-8030在正离子模式下对金属配合物进行分析，获得了金属配合物样品的分子量信息，实现了MALDI-TOF对金属配合物合成情况的快速确认。该方法具有前处理简便、分析速度快、成本低的特点，为工业、有机精细合成、新型功能材料开发等领域中有机功能材料的合成质控提供方法参考，后续可尝试拓展用于有机染料、有机发光二极管 (OLED)、有机太阳能电池等有机功能材料的检测。

钼螯合物的分子量检测

摘要: 金属螯合物是一类具有环状结构的配合物, 具有不同的结构、性质和功能特性, 在工业、生物医药和环境领域有着广泛的应用。本文应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF) 对钼螯合物进行分析, 无需基质辅助, 钼螯合物在负离子模式下直接电离, 检测结果显示, 在 m/z 200-900 范围内成功检测到一系列不同种类的钼螯合物所对应的离子峰。结果表明 MALDI-TOF 适用于金属螯合物的分子量表征, 分析过程无需液相分离、分析速度快、结果直观, 为金属螯合物等配位化合物的快速检测提供方法参考。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF 钼螯合物 分子量检测

技术特点:

- ❖ MALDI-TOF 适用于金属螯合物等配位化合物分子量的快速确认。
- ❖ 前处理流程简便, 该钼螯合物样品本身带负电荷, 在负离子模式下无需基质辅助可直接电离。

金属螯合物是一类具有环状结构的配合物, 通过两个或多个配位体与同一金属离子形成螯合环的螯合作用而得到。金属螯合物与金属元素紧密联系在一起, 具有不同的结构、性质和功能特性, 在工业、生物医药和环境领域有着广泛的应用: 在工业领域可用于制造染料、胶体、电子元件等许多用途; 在生物医药领域, 可用于制备药物、诊断试剂等; 在环境领域可用于去除有害物质和污染物等。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF) 是化合物分子量表征的便捷工具, 无需液相分离, 前处理简单, 上机检测速度快, 谱图相对简单, 易于解析。

本文展示了应用 MALDI-8030 检测金属螯合物分子量的方法, 在负离子模式下成功检测到不同种类的钼螯合物对应的化合物信号。结果表明 MALDI-TOF 适用于钼螯合物的分子量检测, 为金属螯合物等配位化合物的检测提供方法参考。

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-8030

1.2 试剂与样品

样品: 样品为合成的不同种类钼螯合物的混合物, 可能含有的钼螯合物的化学式信息如表 1。

表 1. 钼螯合物样品信息表

序号	化学式	理论分子量 (average)
1	$[\text{HPMo}_{11}\text{O}_{39}]^{6-}$	285.23
2	$[\text{H}_5\text{PMO}_9\text{O}_{34}]^{4-}$	360.88
3	$[\text{H}_3\text{PMO}_{11}\text{O}_{39}]^{4-}$	428.35
4	$[\text{H}_7\text{PMO}_6\text{O}_{25}]^{2-}$	506.85
5	$[\text{H}_4\text{PMO}_{11}\text{O}_{39}]^{3-}$	571.47
6	$[\text{H}_5\text{PMO}_{11}\text{O}_{39}]^{2-}$	857.71

1.3 分析条件

分析模式: 线性负离子

激光器：355 nm 固态激光器

扫描范围：m/z 200-900

激光能量：75

扫描速率：200 Hz

2. 样品前处理

将样品用水配制成 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液，作为样品工作液。将上述样品工作液点 1 μL 到靶板上。待自然干燥后，将靶板送入质谱分析。

3. 结果与讨论

钼螯合物样品在负离子模式下进行质谱数据采集，质谱检测结果如图 1 所示，在 m/z 200-900 范围内，检测到该螯合钼混合物样品的一系列簇峰，如 m/z 285.06, m/z 360.98, m/z 427.78, m/z 506.56, m/z 571.43, m/z 650.27, m/z 858.05 等。如表 2 所示，根据样品的理论分子量信息，推测不同 m/z 的离子峰对应不同的钼螯合物，推测 m/z 285.06 对应 $[\text{HPMo}_{11}\text{O}_{39}]^{6-}$ ，m/z 360.98 对应 $[\text{H}_5\text{PMo}_9\text{O}_{34}]^{4-}$ ，m/z 427.78 对应 $[\text{H}_3\text{PMo}_{11}\text{O}_{39}]^{4-}$ ，m/z 506.56 对应 $[\text{H}_7\text{PMo}_6\text{O}_{25}]^{2-}$ ，m/z 571.43 对应 $[\text{H}_4\text{PMo}_{11}\text{O}_{39}]^{3-}$ ，m/z 858.05 对应 $[\text{H}_5\text{PMo}_{11}\text{O}_{39}]^{2-}$ 。检测结果与理论值相符。

表 2. 质谱检测结果

化学式	理论分子量 (average)	实测分子量 (average)
$[\text{HPMo}_{11}\text{O}_{39}]^{6-}$	285.23	285.06
$[\text{H}_5\text{PMo}_9\text{O}_{34}]^{4-}$	360.88	360.98
$[\text{H}_3\text{PMo}_{11}\text{O}_{39}]^{4-}$	428.35	427.78
$[\text{H}_7\text{PMo}_6\text{O}_{25}]^{2-}$	506.85	506.56
$[\text{H}_4\text{PMo}_{11}\text{O}_{39}]^{3-}$	571.47	571.43
$[\text{H}_5\text{PMo}_{11}\text{O}_{39}]^{2-}$	857.71	858.05

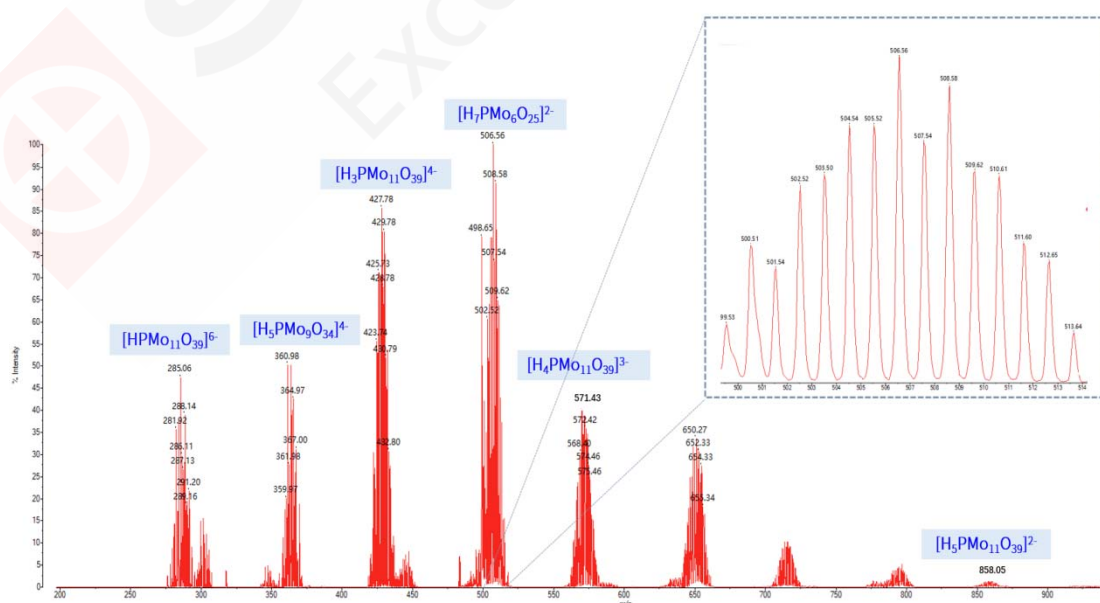


图 1. 钼螯合物样品质谱图 (m/z 200-900)

4. 结论

本文应用MALDI-8030在负离子模式下对钼螯合物混品进行分析，获得了不同种类的钼螯合物的分子量信息，实现了MALDI-TOF对金属螯合物分子量的快速确认。该方法分析速度快、结果直观易于分析，为金属螯合物的分析和检测提供了一种新的手段，为其他类似配位化合物的检测提供方法参考。



2.6 质谱成像分析

质谱成像法 (MSI) 可产生化学快照, 揭示分子空间分布信息。MSI 是无标记的, 并且不需要用于组织分析的组学染色的许多步骤。然而, 组织的样品制备需要冷冻切片。理论上, 任何质量分析仪都能够进行 MSI, 只要前端有助于在一个区域上进行扫描, 并且数据可以以二维方式进行处理和显示。

MALDI-TOF 成像技术自 1997 年引入以来, 已应用于透明细胞肾细胞癌、人类结直肠癌、癌症胃癌和乳腺癌组织以及不同癌症的组织微阵列中的直接脂质分析。MALDI-TOF 质谱仪功能强大, 可以以接近单细胞分辨率的分辨率成像。同时具有常压直接电离的优点, 已被广泛用于无标记、无染色的组织成像。

质谱成像技术的优点包括能够无标记地描绘原位细胞异质性, 区分健康和疾病组织。质谱成像方法的一个主要挑战仍然是将化学或分子信息转化为生物信息。至少在最初, 需要与传统的 H&E 染色和其他免疫组织化学染色进行并行处理, 并与组织学家/病理学家密切合作, 以证实质谱法产生的成像数据。



MALDI 质谱成像流程图

质谱成像技术在食品安全中的应用

质谱成像是近年发展最快的质谱应用之一。此技术直接从表面对目标物质进行测定，无需任何标记或衍生化处理。因此，此技术常用于对物质分布进行可视化分析，例如生物体内的药物代谢物或食品中的功能成分，此类物质通常难以进行标记/衍生化处理。

本报告中，我们会介绍空间分辨率为50 μm 的两个质谱成像示例：植物种子表面的农药和食品接触材料的热诱导变质。

■ 方法

使用MALDI-8020台式线性MALDI-TOF质谱仪，进行质谱成像实验（图1）。像素间距为50 μm 。

植物种子的质谱成像：将农药（未公开）喷洒到大豆种子上。在冷冻状态下制备种子切片（图2），然后用iMLayer™基质升华系统涂上 α -氰基-4-羟基肉桂酸（CHCA）（图1）。iMLayer可生成稳定、可重现基质涂层。使用IonView™，对获取的数据进行分析（图2）。

PET薄膜的质谱成像：将聚对苯二甲酸乙二醇酯（PET）薄膜（用作食品接触材料）在175 $^{\circ}\text{C}$ 下加热4小时、18小时。使用手动基质喷涂器，将含有NaI的地萘酚溶液涂到两个样本和未经处理的PET薄膜样本上。使用IMAGEREVEAL™质谱仪，对获取的数据进行分析。



图 1. MALDI-8020 台式 MALDI-TOF 质谱仪（左）。iMLayer™ 自动基质升华系统（右）。

表 1 质谱成像条件

基质	CHCA
基质厚度	0.7 μm
极性	正离子
激光辐射直径	约 50 μm
激光重复频率	200 Hz

■ 植物种子的质谱成像

大豆种子经常被喷洒农药和消毒剂，以防伤食和疾病。但有人认为，喷洒农药可能对昆虫种群产生不利影响，因为生长中的植物含有农药残留物。因此，确定植物种子中残留化学物质的数量和分布非常重要，以便确定适当使用此类化学物质能否保护环境。

农药的质谱成像结果显示，农药只存在于种子表面，未渗入种子内部（图2A）。另一方面，在种子内部发现异质（可能为代谢物）分布（图2B），而种子切片的光学图像则显示出相对均匀的表面（图2C）。叠加质谱成像结果显示农药和代谢物的分布不同（图2D）。

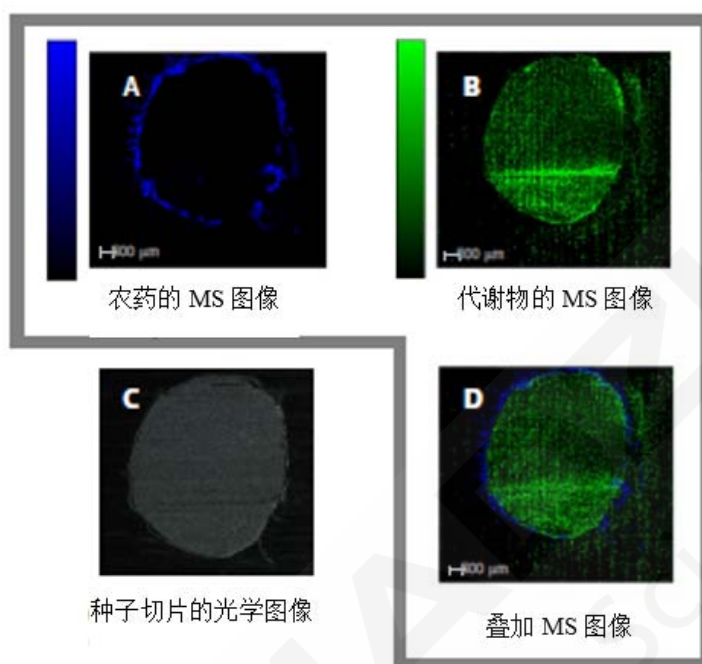


图2. 以50 μm 的空间分辨率，对植物种子中的农药进行质谱成像（基质：经iMLayer升华的CHCA）

■ PET 薄膜的质谱成像

图3为本实验的工作流程。众所周知，PET的环状三聚体在加热后主要以 $[M + Na]^+$ (m/z 599.3) 的形式存在于PET薄膜表面（见图4中插图）。与未处理时相比，加热4小时后，三聚体的强度有所增加（图4B、图4C）。MS图像显示环状三聚体分布于整个分析区域（图4B'、图4C'）。加热18小时后，MS图像显示：在所分析PET薄膜样本的下部，PET三聚体的分布更集中（见图4A'）；与处理4小时的样本相比，三聚体在整个样本中的强度分布更均匀（图4B、图4B'）。

PET低聚物快速“信号强度成像图”结果表明，此工作流程可对食品接触材料和各种工业材料的表面进行评估。



图3. 不同热应力条件下PET薄膜制备

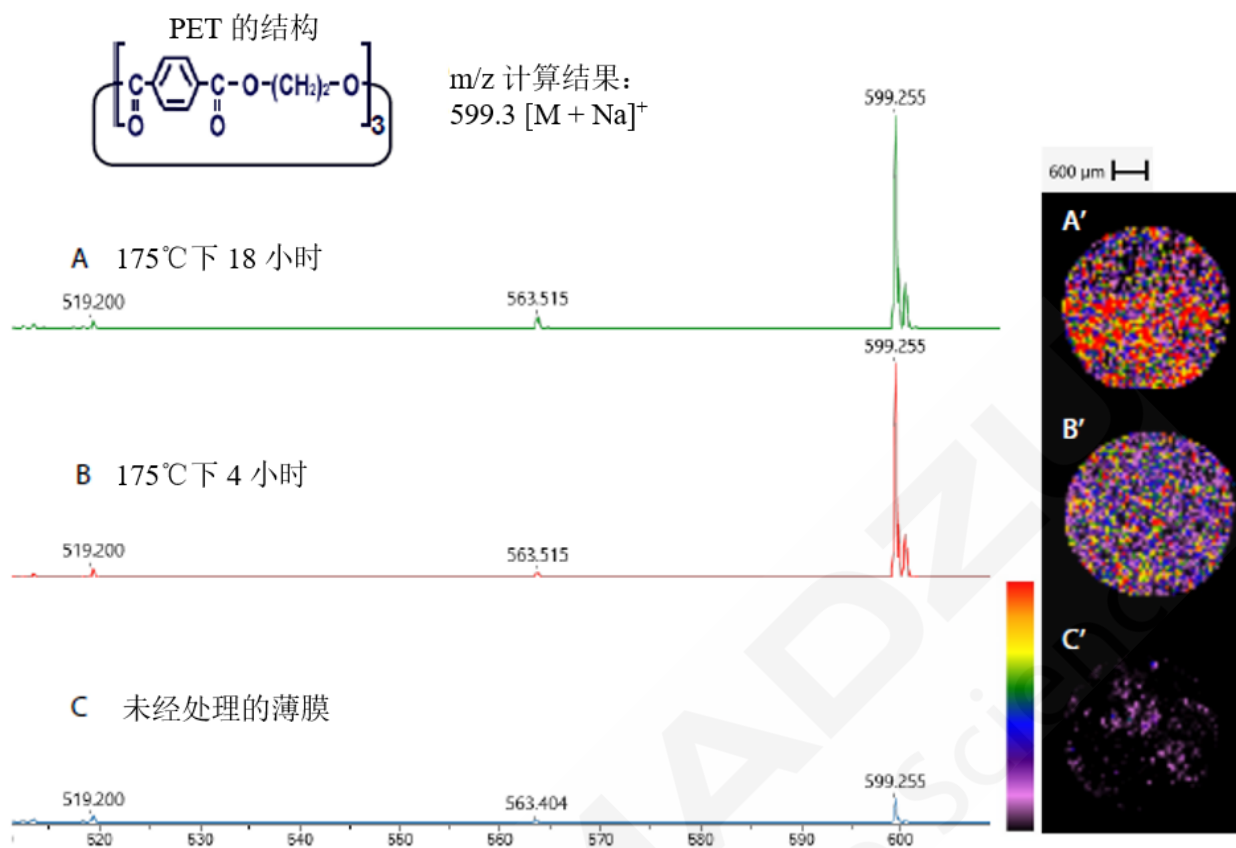


图4. 左：三种不同加热处理下的PET环状三聚体质谱。右：三种不同加热处理下的PET薄膜切片质谱图像。

■ 结论

本报告中，我们使用台式MALDI-8020演示了质谱成像在食品科学与安全领域的应用。在50 μ m空间分辨率下生成农药和低聚物的质谱成像图有助于对检测到的成分的分布情况进行评估。

MALDI-TOF台式线性质谱仪操作简单快捷，适用于各种质谱成像应用，可提供单纯质谱难以获取的位置信息。此外，MALDI-8020和基质升华装置的组合应用有望在各种食品与安全领域发挥作用，包括食品包装和相关材料。

质谱成像技术在动物组织和指纹中的应用

质谱分析的应用领域不断扩大，质谱成像是其中之一。尽管具有高空间分辨率、高质量分辨率的先进仪器已应用于成像领域，但在各种科学/工业领域（此类领域中无需高性能仪器），仪器小型化和易用性需求与日俱增。

本文介绍MALDI-TOF台式质谱仪应用于质谱成像。MALDI-8020和iMLayer是我们推出的成像样本制备装置，可以30 μm 的空间分辨率生成大鼠大脑和指纹的质谱图像，操作简单快捷。

本文介绍的可访问质谱成像工作流程由MALDI-TOF台式质谱仪、基质沉积方法和软件组成，适用于各种应用。

■ 方法

本文中的质谱成像工作流程如图1所示。使用MALDI-8020台式线性MALDI-TOF质谱仪的分析条件见表1。所有质谱成像实验均在正离子模式下以30 μm 的空间分辨率进行。所有数据采集均以200Hz的MALDI激光频率进行。使用iMLayer，将DHB涂覆到大鼠大脑和指纹上。使用IonView™，对数据进行分析。



图 1. 使用 MALDI-8020 的质谱成像工作流程

表 1 MALDI-8020 的分析条件

基质	DHB (升华时间: 7 分钟)
极性	正离子
空间分辨率 (步长)	30 μm
激光重复率	200 Hz
数据点	84,681 像素 (大鼠大脑) 23,104 像素 (指纹)

■ 大鼠大脑的质谱成像

大鼠大脑的质谱成像（由曼彻斯特大学Wolfson分子成像中心（WMIC）Adam McMahan博士提供）如图2所示。

所分析的组织区域（图2A）包括小脑；小脑含有由不同细胞群和区域（例如白质和灰质）组成的分层结构。使用MALDI-8020获取的质谱成像结果（图2B-D）显示出小脑的脂质生物分子分布，并清晰显示出白质和灰质区域。

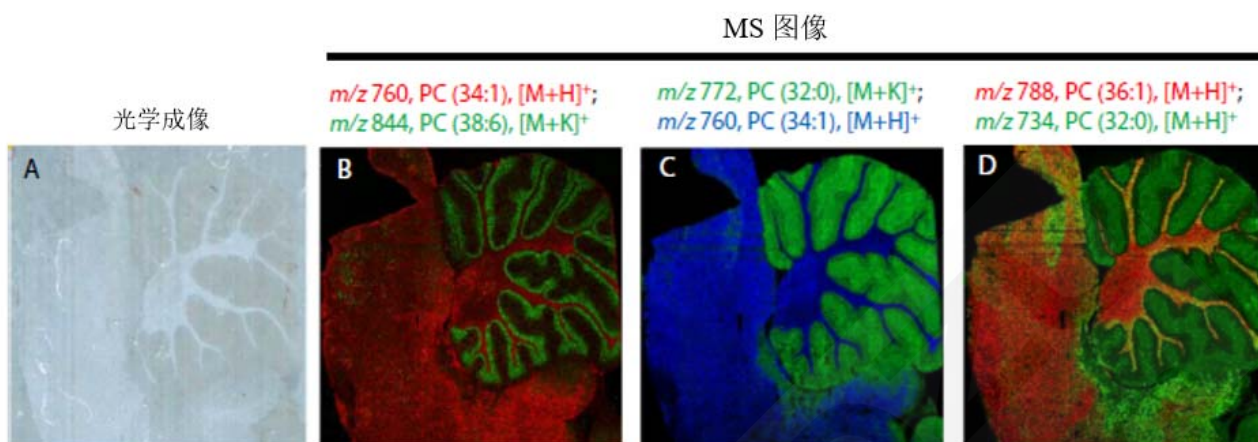


图2. 空间分辨率为30 μ m时，大鼠大脑中脂质生物分子的质谱成像

■ 指纹的质谱成像

指纹的质谱成像也在不锈钢板上进行。按照图1步骤1所示的工作流程，收集指纹样本。

结果再次显示出组织样本的特有模式，质谱成像结果显示出等同于指纹的脂质生物分子分布：指嵴间隙中（ m/z 549）、指嵴特征中（ m/z 829）、汗腺中（ m/z 375、567）（图3）。质谱成像可揭示光学图像中无法看到的区域（例如汗腺）中是否存在特有物质（图3A）。因此，在难以确定物质是否存在的样本中，通过质谱成像查询分子分布具有巨大优势。

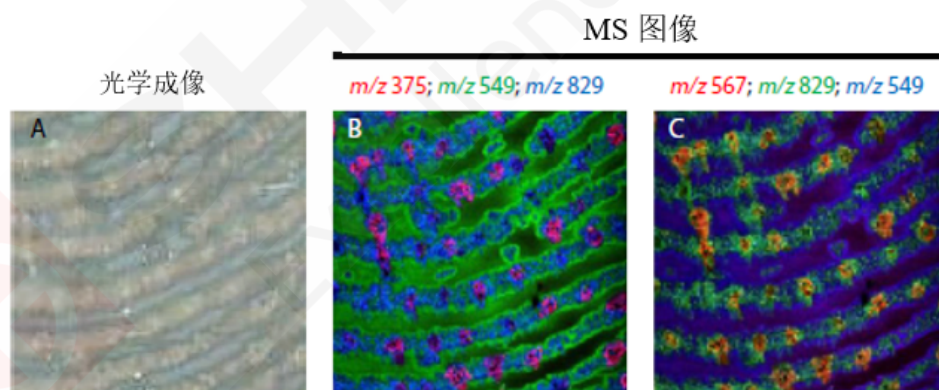


图3. 指纹（包括孔隙区域）的质谱成像

■ 结论

本文介绍了使用MALDI-8020进行质谱成像的两种应用。图2、图3表明：使用MALDI-8020进行质谱成像可实现足够的空间分辨率（即30 μ m）。iMLayer具有良好的样本预处理重现功能，IonView软件有助于质谱图像分析。对于不熟悉质谱成像数据的研究人员来说，上述产品大有裨益。

这些产品和MALDI-8020台式线性MALDI-TOF质谱仪有望快速、轻松提供质谱成像图，使分子分布可视化，从而获取各领域的新知识。

质谱成像技术在蛋白和多肽中的应用

MALDI质谱成像 (MSI) 技术功能强大, 可利用质谱仪功能, 在样本的不同位置采集成千上万张质谱图。随后, 借助专用软件, 可将检测到的离子可视化为模拟彩色图像, 从而直观地显示关键分子在样本/组织中的相对位置。

MALDI-8020线性飞行时间 (TOF) 质谱仪可生成高质量质谱图像, 例如大鼠大脑中的脂质。仪器中快速更换样本靶板的功能 (<3分钟) 和较短的“仪器准备”时间意味着可快速启动采集, 这对优化成像方法大有裨益。我们之前已在MALDI-TOF台式系统上演示过MALDI成像, 用于分析指纹、大豆和PET薄膜的各种目标分析物。在此, 我们会展示我们成像平台的功能: 线性模式分析分析大鼠大脑组织, 针对来自组织切片的完整蛋白和原位酶切后的多肽, 轻松实现高质量质谱数据获取和质谱成像。

■ 测定条件和样本

由AMSBIO (英国, 牛津大学) 在FlexiVision-mini ITO载玻片上制备大鼠大脑样本 (包埋在CMC中)。玻片储存于-80°C; 样本处理前, 将玻片真空干燥至室温。

制备用于多肽和蛋白分析的组织时 (图1), 需去除脂质和盐类, 因其会主导质谱并抑制蛋白信号。脱脂时, 使用6步溶剂清洗方案来清洗玻片^[1]: 1) 70%乙醇中30秒, 2) 100%乙醇中30秒, 3) 卡诺氏固定液 (乙醇: 氯仿: 乙酸的比例为60:30:10) 中2分钟, 4) 100%乙醇中30秒, 5) 水中30秒, 6) 100%乙醇中30秒。清洗后, 在基质沉积前, 对玻片进行真空干燥。

原位酶切时, 使用SunCollect喷涂器 (德国SunChrom) 将浓度为67ng/ μ L的猪胰蛋白酶 (20mM 碳酸氢铵-乙腈 (ACN) (90:10) 溶液) 沉积到组织上。之后将玻片置于含有50:50 ACN:H₂O的再水化室中, 在37°C下放置18小时。温育后, 再次使用SunCollect喷涂器将浓度为10mg/mL的 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA, 50:50 ACN:0.1%三氟乙酸 (TFA)) 涂到玻片上; 之后, 在85°C下进行2分钟无溶剂再水化, 再用5%乙酸进行3分钟再水化。再水化处理会将分析物提取到表面。



图 1. 蛋白和多肽质谱成像的工作流程 (SA 基质和 CHCA 基质)

进行完整蛋白分析时，使用iMLayer™ AERO自动喷涂装置（日本岛津）将浓度为10mg/mL的芥子酸（70:30 ACN:0.1% TFA）喷涂到组织上。以50mm/s的速度将组织喷涂8层，以30mm/s的速度喷涂4层。喷完后，将玻片置于含5%乙酸的再水化室中，在85°C下放置3.5分钟。在MALDI-TOF台式仪器（MALDI-8020，岛津）上，以50μm的空间分辨率（50μm像素间距）、在线性模式下对样本进行分析。

采用的多肽采集方法为：每张图谱激光轰击30次，重复频率为200Hz，质量范围为300-3000m/z，脉冲提取值设为2700Da。共采集67,482张图谱，采集时间为2小时50分钟。

采用的蛋白采集方法为每张图谱激光轰击20次，频率为100Hz，质量范围为3000-30000m/z，脉冲提取值设为22000Da。共采集68,836个图谱，采集时间为3小时47分钟。使用IonView™软件（岛津），对数据进行分析。

■ 多肽和蛋白质谱成像结果

前期工作中（未展示），原位酶切和蛋白成像方案已在MALDI-TOF/TOF（MALDI-7090，岛津）仪器上成功验证。本实验中，我们已将这方法转移到MALDI-TOF台式线性仪器（MALDI-8020）上。

大鼠大脑胰蛋白酶消化的MSI显示：MALDI线性TOF系统上，仍可根据质量（无MS/MS时）将多肽初步归属于常见的大鼠大脑蛋白，例如髓磷脂碱性蛋白（MBP）通常定位于白质中，这与获取的MALDI图像一致（图2）^[2]。

完整蛋白MSI同样显示出与大鼠大脑中常见蛋白（如MBP）相对应的分析物（图3）。图3中的初步蛋白识别基于检测到物质的质量^[3,4]。与常规脂质MSI分析相比，可能获取质量更高的数据，表明此工作流程适用于蛋白成像。超过16kDa时信号很低，但这因使用包埋剂改善大鼠大脑标本切片而导致^[5]。

大鼠全脑多肽和完整蛋白成像的快速采集时间分别为2小时50分钟和3小时47分钟，有利于方法优化。

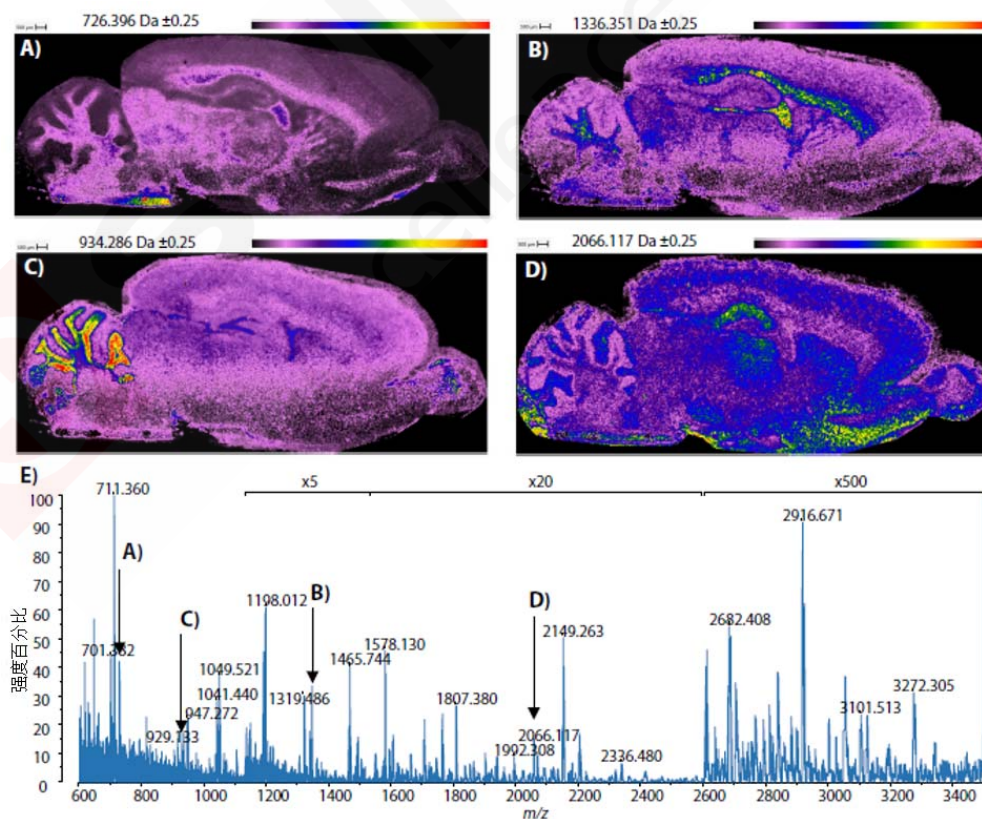


图2. 酶切后多肽的MS图像：： A) MBP肽：HGFLPR, T160-165 (m/z 726.394)； B) MBP肽：YLATASTMDHAR, T148-159 (m/z 1336.633)（定位于白质中）^[4]； C)、D) 未知多肽（分别定位于小脑和灰质中）； E) 大鼠大脑多肽的TIC质谱图

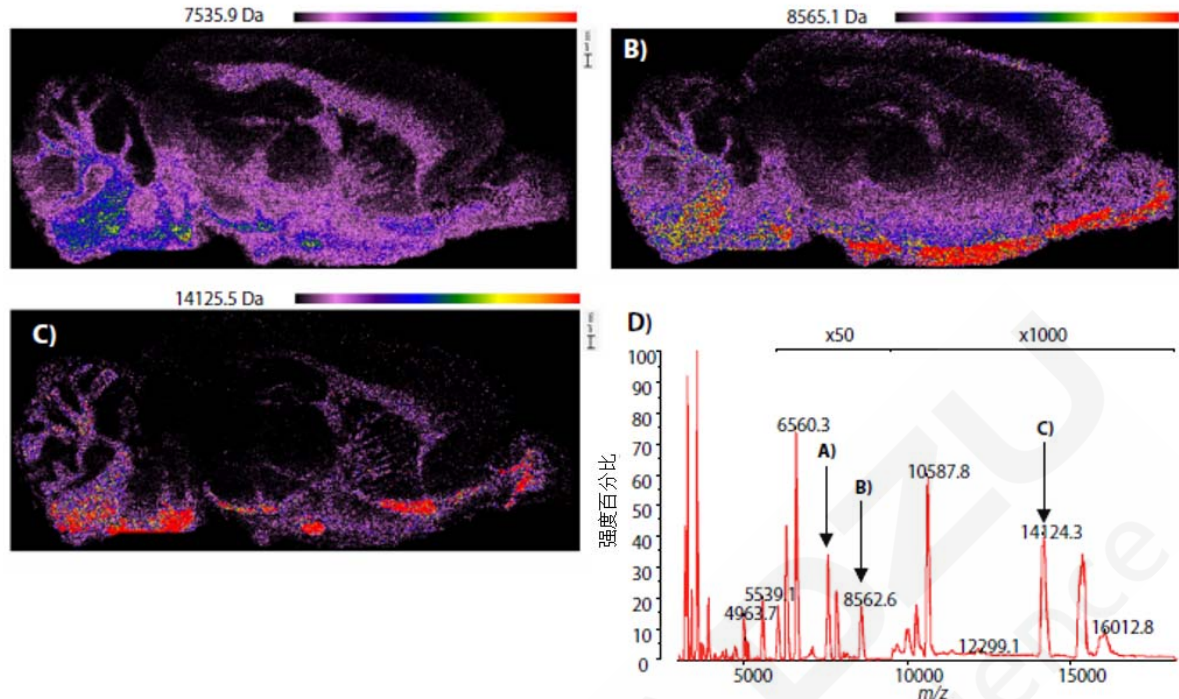


图3. 完整蛋白的MS图像：初步分配：A) 神经颗粒素 (m/z 7537)；B) 泛素 (m/z 8565)；
C) 髓磷脂碱性蛋白 (m/z 14124)；D) 大鼠大脑蛋白的TIC光谱

■ 结论

我们已证明：低成本MALDI-TOF台式仪器可进行MALDI质谱成像，用于多肽和蛋白的原位分析。

MALDI台式仪器中快速更换样本板的功能 (<3分钟) 和快速采集时间 (200Hz激光速度下，2小时50分钟即可采集大鼠全脑的67,482个图谱) 有利于成像方法开发。使用简单的工作流程即可轻松检测出高达16kDa的蛋白，表明此工作流程适用于蛋白成像。

MALDI图像上显示的多肽 (从原位酶切中检测到) MSI与相应蛋白的特有定位一致，表明此工作流程适用于多肽成像以及针对组织中类似高质量物质分布的应用。肽的鉴定将需要MS/MS进行确认，但此应用说明可以证明MALDI-8020上的蛋白和多肽MSI有助于筛选应用。

此款仪器经济实用、设计小巧、功能强大，是MALDI成像新手的理想之选，也是大学和教学实验室中不可或缺的设备。

■ 参考文献

- [1] Yang et al (2011) Matrix sublimation/recrystallization for imaging proteins by mass spectrometry at high resolution. *Anal. Chem.* 83, 5728-5734.
- [2] Heijs et al (2015) Brain region-specific dynamics of on-tissue protein digestion using MALDI Mass Spectrometry Imaging. *J. Prot. Research* 14, 5348-5354.
- [3] Schmitt et al (2019) Genetically Encoded Fluorescent Proteins Enable High-Throughput Assignment of Cell Cohorts Directly from MALDI-MS Images. *Anal. Chem.*, 91,6, 3810-3817.
- [4] Groseclose et al (2007) Identification of proteins directly from tissue: in situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 42, 254-262.
- [5] Franck & Rawlins et al (2010) MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30000 Da. *Med. Sci. Monit.*, 16(9): BR293-299.

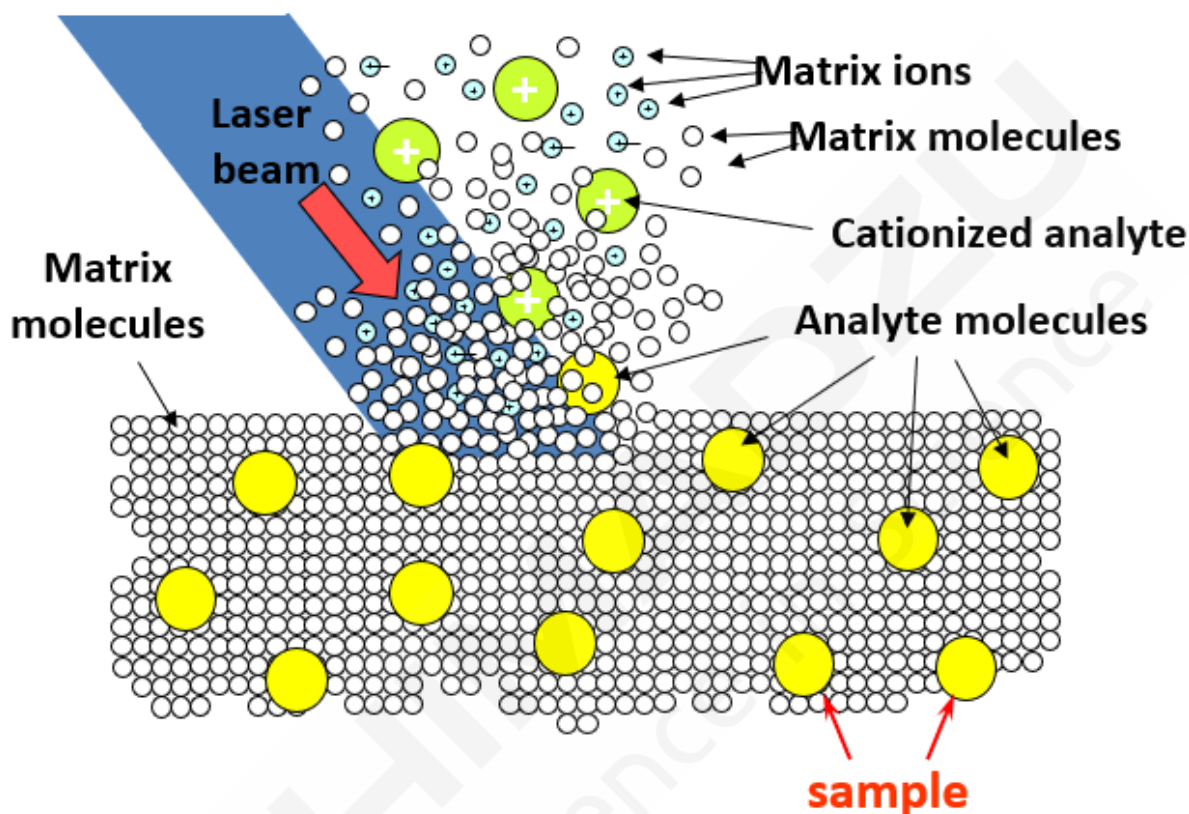
附录 1： 分析应用案例索引

序号	样品名称	基质	辅助盐	分析模式	页码
1	免疫球蛋白 A	SA	-	正离子	7
2	细胞外囊泡	CHCA	-	正离子	9
3	司美格鲁肽	CHCA	-	正离子	11
4	胸腺法新	CHCA	-	正离子	15
5	磷酸化蛋白质（酪蛋白）	CHCA	-	正离子	18
6	牛血清白蛋白（BSA）	SA、DAN	-	正离子	20
7	天然肽及氧化型肽	DAN	-	正离子	23
8	动物毛发	CHCA	-	正离子	27
9	mRNA	3-HPA	-	正离子	30
10	核苷酸原料	DHB	NaTFA	正离子	32
11	亚磷酰胺单体	葱三酚	NaTFA	正离子	35
12	寡核苷酸引物探针	3-HPA	-	负离子	39
13	寡核苷酸药物	3-HPA	-	正离子	42
14	反义寡核苷酸药物	3-HPA	-	正离子	45
15	牛奶中微生物	CHCA	-	正离子	49
16	新生儿肠道微生物	CHCA	-	正离子	54
17	羊奶中微生物	CHCA	-	正离子	58
18	链球菌	CHCA	-	正离子	63
19	PEG6000	葱三酚	-	正离子	67
20	脂质纳米粒（LNPs）	DHB、9-AA、葱三酚	NaTFA	正离子	69
21	聚氧丙烯硬脂醇醚	CHCA	NaTFA	正离子	72
22	聚维酮碘	*	-	正离子	75
23	维生素 E-TPGS	CHCA	NaCl	正离子	77
24	磺达肝癸钠	9-AA	-	负离子	81
25	通用聚酯	葱三酚	NaTFA	正离子	83
26	金属配合物	DCTB	-	正离子	87
27	铝螯合物	*	-	负离子	89
28	大豆种子	CHCA	-	正离子	93
29	大鼠大脑	DHB	-	正离子	96
30	蛋白质多肽	SA	-	正离子	98

注：* 未明确提及使用的基质；- 未使用或未提及辅助盐溶液。

附录 2: MALDI-TOF 测试时基质选择

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。



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

基质简写	基质名称	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
CSA	5-chloro-2-hydroxy benzoic acid, 5-chlorosalicylic acid	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
CHCA	α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid	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
DHB	2,5-dihydroxy benzoic acid, gentisic acid	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
SA	3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, sinapinic acid	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
HABA	2-(4-hydroxy-phenylazo)benzoic acid	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-HPA	3-hydroxypicolinic acid	139.027	139.110	C ₆ H ₅ NO ₃	寡核苷酸	水, 甲醇	15,230-7	
IAA	trans-indole-acrylic acid	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
MSA	5-methoxysalicylic acid	168.042	168.148	C ₈ H ₈ O ₄	蛋白	乙醇	14,618-8	5
NH	norharmane, 9H-pyrido[3,4-b]indole	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	
PA	picolinic acid, 2-pyridineboxylic acid	123.032	123.111	C ₆ H ₅ NO ₂	寡核苷酸	甲醇, 水, 乙腈	P4,280-0	6
THAP	2,4,6-trihydroxy-acetophenone	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	
Dithranol	1,8,9-trihydroxy-anthracene	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： m/z 93.03, 146.06, 190.05, 212.03, 228.01, 379.09。

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

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

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。



附录 3：样品测试浓度及点靶方法

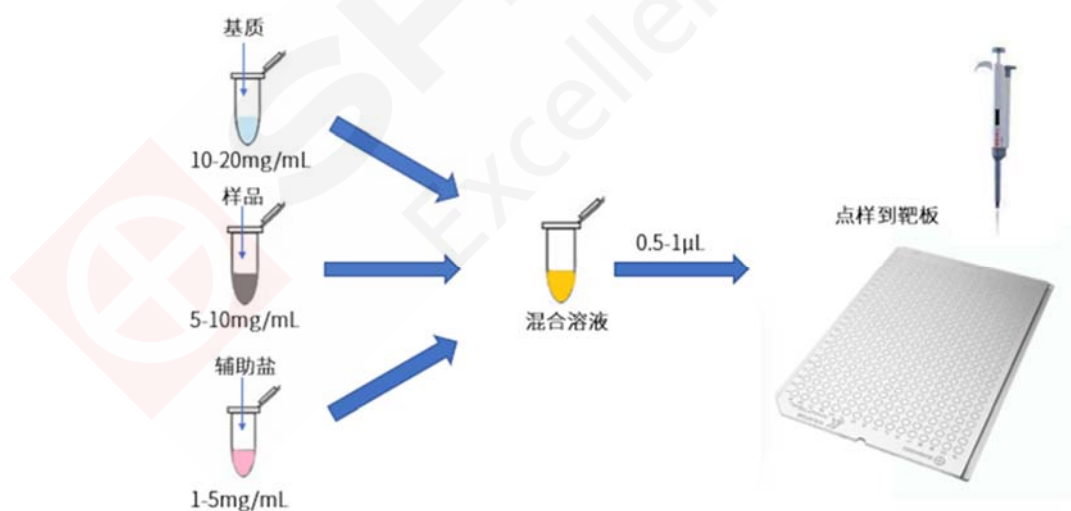
除选择合适基质外，测试样品的浓度也应在合适范围。通常使用移液枪吸取1 μL 溶解好的液体样品点到专用靶板上自然晾干，浓度指的是1 μL 液体中样品的绝对含量。针对常见的样品，推荐的浓度范围如下表2。

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。



聚合物样品点靶方法（混匀法）

附录 4：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_BOVIN	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

备注：表格来源于岛津集团 Kratos 公司提供的《Sample Preparation》样品准备手册。