

MALDImini-1 应用文集



前言

自 20 世纪初英国剑桥大学卡文迪许实验室 J.J.Thomson 研制第一台简陋的质谱装置以来，质谱已有 100 多年的发展历史。质谱仪主要是对带电离子的质量进行检测，从而对待测物质进行定性和定量分析。质谱技术近年广泛应用于生命科学、食品安全、环境化学、临床检验、材料科学等领域。日本岛津公司资深工程师田中耕一和美国科学家 John Fenn，由于开发了用于生物大分子质谱分析的软解吸电离方法，共同获得 2002 年诺贝尔化学奖。

MALDI MS，即基质辅助激光解吸电离技术，将待测物质使用激光器离子化，并通过相应检测器检测带电离子质量的技术。在 MALDI MS 出现之前，质谱对生物大分子分子量和结构的解析比较困难。1987 年，岛津公司的田中耕一和同事将甘油中的 30nm 钴金属粉末与 337nm 氮气激光器相结合的“超细金属加液体基质法”用于电离生物大分子。使用这种方法，田中耕一完成了羧肽酶-A 蛋白（分子量 34 kDa）的电离，证明了选择合适的激光波长和基质可以使蛋白质电离。

传统的 MALDI-TOF 质谱是基质辅助激光解吸电离与飞行时间离子分离技术结合的产物。MALDImini-1 是岛津公司近年新推出的一款基质辅助激光解吸电离数字离子阱质谱仪。使用岛津公司独有的数字离子阱（DIT）技术取代传统的飞行管（TOF）作为质量分析器，缩小了仪器占用的空间，仪器正面只有 A3 纸大小，主机重量 25 kg，实现了仪器的小型化和轻量化。由于采用了新的数字离子阱技术，可以进行二级质谱和三级质谱数据采集，能很好的进行分子量测试、蛋白质鉴定、糖肽结构分析、聚合物分析等应用。

本册应用文集收录了 9 篇代表性的 MALDImini-1 应用报告，内容涉及蛋白质分子量检测、蛋白质鉴定、抗体修饰位点检测、糖及糖肽结构分析、聚合物分析、微生物鉴定等。文集内容非商业广告，仅供专业研究人士参考。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

第一章 MALDImini-1 特点简介

第一节 MALDI 简介	1
第二节 岛津 MALDImini-1 产品特点	2

第二章 MALDImini-1 应用数据集

第一节 蛋白质多肽分析

1. MALDImini-1 高灵敏检测牛血清白蛋白的分子量	6
2. MALDImini-1 鉴定蛋白质种类	8
3. MALDImini-1 快速鉴定细菌芽孢蛋白	12
4. MALDImini-1 分析化学修饰抗体的修饰位点	15

第二节 糖及糖肽分析

1. MALDImini-1 分析糖肽	19
2. MALDImini-1 分析 N-聚糖唾液酸	22
3. MALDImini-1 结合 SialoCapper-ID 试剂盒用于分析聚糖	26

第三节 聚合物分析

1. MALDImini-1 进行聚合物的分子量及分布研究	38
-------------------------------------	----

第四节 微生物鉴定

1. MALDImini-1 进行微生物鉴定	43
------------------------------	----

第一章 MALDImini-1 特点介绍

第一节 MALDI 简介

基质辅助激光解吸电离技术(也就是通常所说的 MALDI)于 1987 年首次由 Hillenkamp 及 Karas 提出,距今已经 30 余年。从那时起,通过将这一“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。相比其他质谱技术,MALDI-TOF 操作简便,经简单培训就可以使用。2002 年,日本岛津制作所的田中耕一先生与电喷雾电离法的发明人 John Fenn 博士一起被授予诺贝尔化学奖,奖励他们“开发了用于生物大分子质谱分析的软解吸电离方法”。

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

MALDI 除几家重要的进口厂商外,市场已经涌现出了安图生物、毅新博创、禾信仪器、融智生物、重庆中元等多家优质国产企业。MALDI 质谱近年来在基因分型分析、生物标志物鉴定、病原体鉴定、质谱成像等应用领域快速发展,越来越被临床检测领域所青睐。2020 年新冠疫情中,各地医院及疾控中心也采购了不少 MALDI 质谱仪,用于病原体的快速鉴定和细菌分型等。



生物梅里埃
VITEK MS



布鲁克
Biotyper



岛津
AXIMA iDplus



安图生物
Autof ms1000

国内市场上主要 MALDI 质谱产品

第二节 岛津 MALDImini-1 特点

岛津目前拥有 AXIMA 系列 Assurance、Confidence、Performance，以及近几年新出的 MALDI-7090、MALDI-8020、MALDImini-1 等多款 MALDI 质谱仪器。



岛津 MALDI 机种

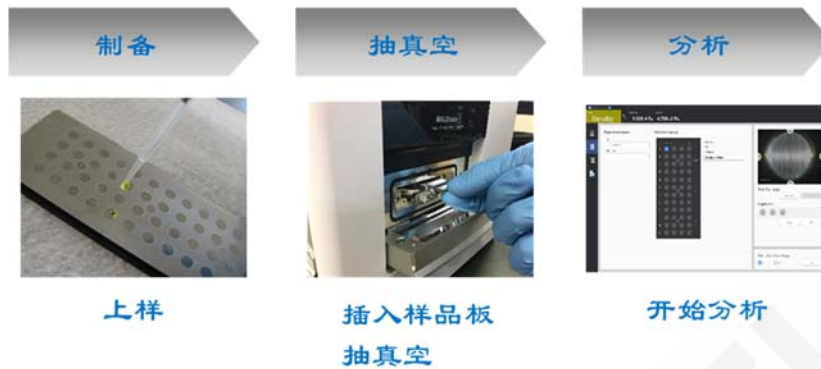
MALDImini-1 是岛津公司新推出的一款基质辅助激光解吸电离数字离子阱质谱仪，使用岛津公司独有的数字离子阱 (DIT) 技术取代传统的飞行管作为质量分析器。MALDImini-1 是一款设计十分紧凑的 MALDI 离子阱质谱仪，相比其他同类设备，尺寸更加小巧。利用岛津独有的“数字离子阱” (DIT) 技术可有效缩减质谱仪尺寸，从而确保仅占用客户工作台上很小的空间。



岛津 MALDImini-1 离子阱质谱仪及内部结构

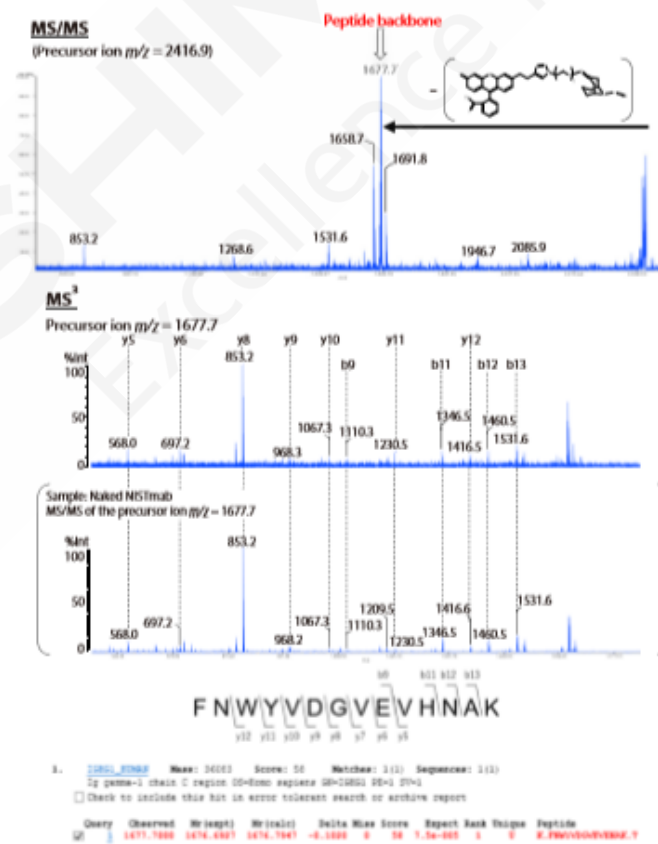
MALDImini-1 体积小，易于安装。A3 纸大小，节省空间和占地面积，重量仅 25kg，内置真空泵，可安装在实验室任何地方。激光光学系统、样品台和真空排气系统均已经过优化，进一步减小设备的尺寸。离子和激光光学器件引导激光束垂直于孔板轰击样品，实现高离子透射率的同时让布局更为紧凑。电离后，离子束偏转 90°，确保离子最大程度地转移到离子阱。

5分钟以内



MALDImini-1 上机分析流程图

数字离子阱 (DIT) 技术, 使用矩形波 RF 捕获离子, 因此可使用比 Triple Q 体积小很多的 MALDImini-1 实现 MS/MS 或 MS³ 级分析。数字离子阱 (DIT) 技术在有效缩减仪器尺寸的同时, 还可以做 2 级和 3 级结构分析, 作为鉴定未知化合物结构的实用工具。使用 MALDI+DIT 在宽质量范围内进行高灵敏度 MS 和 MSⁿ 测量。宽范围的质量范围, 一级质谱 m/z 650- 70000 可与 TOFMS 媲美, 二级质谱 m/z 350-5000。



MALDImini-1 多级质谱与 Mascot MS/MS 离子搜索结果

第二章 MALDImini-1 应用数据集

本数据集收录了生命科学、食品安全、化学材料等相关应用领域的典型报告，包括蛋白质、抗体、聚糖、糖肽、聚合物及微生物等物质的检测。数据来源于岛津全球应用开发中心 (GADC) 及岛津中国分析中心的相关应用报告。

蛋白质分子量检测及蛋白质鉴定在生物学研究具有重要意义，传统是使用 MALDI-TOF (基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱) 进行蛋白质的相关分析。但是 MALDI-TOF 体积较大，价格昂贵。MALDImini-1 质谱仪整合了 MALDI 离子源和数字离子阱 (DIT)，体积小，可以实现 m/z 650-70000 Da 内的蛋白/多肽、多糖等常规样品分子量检测。

蛋白质糖基化是最常见的蛋白质翻译后修饰之一，通常有 N-链接糖蛋白和 O-链接糖蛋白两种主要类型。对糖基化位点以及对应糖链结构的分析，一直是蛋白组学和糖组学研究的热点。由于糖链结构比较复杂，使用一级质谱只能获取分子量信息，需要多级质谱数据进行结构确认。岛津 MALDImini-1 可以进行二级和三级质谱数据采集，针对酶切后的肽段或糖肽样品进行多级质谱分析，可以进行相关肽链或糖链结构的解析。

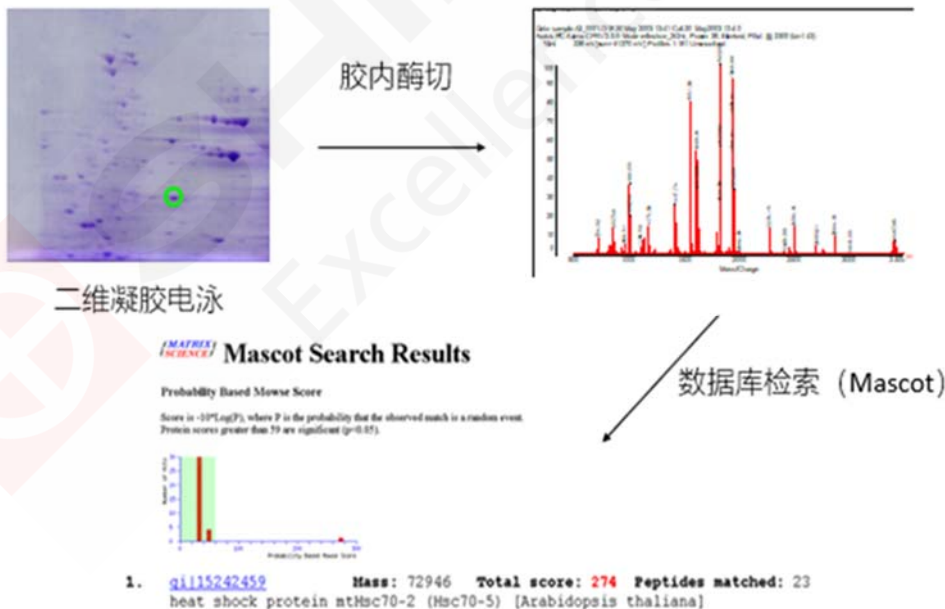
除蛋白/多肽、糖蛋白及聚糖分析外，MALDImini-1 还可以开展聚合物分子量及分布检测，致病性微生物的快速鉴定等相关工作，是相关科学工作者的有力工具。

第一节 蛋白质、多肽分析

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

MALDI MS 蛋白质鉴定的基本原理是：蛋白质经 SDS-PAGE 凝胶电泳或二维凝胶电泳 2D-PAGE 分离纯化，选取目标蛋白点，用蛋白酶（通常是胰蛋白酶）酶切，生成肽段混合物，点样到样品靶板，最后通过质谱仪采集数据并和数据库匹配检索，给出鉴定结果。激光轰击使肽段电离形成气态离子，经电磁场分离将不同质荷比的离子区分开来，经过检测器收集分离的离子，确定每个离子的质荷比，并输出一级质谱图。不同的蛋白质酶解后形成的一级质谱图各不相同，通常称为肽指纹图谱（PMF, peptide mass fingerprints）。样品的肽指纹图谱可以与标准数据库 Mascot 中的谱图进行对比，从而进行鉴定。

抗体作为蛋白质的一种，也可以按照以上思路进行鉴定。此外对于抗体上特殊的修饰位点，可以使用 MALDImini-1 的多级质谱功能，通过形成的碎片离子进行翻译后修饰分析。



肽指纹图谱鉴定流程

MALDImini-1 高灵敏检测牛血清白蛋白的分子量

摘要: 本文展示了应用 MALDImini-1 紧凑型基质辅助激光解吸电离数字离子阱质谱 (MALDI-DIT) 对低浓度牛血清白蛋白 (BSA) (上样量 100 fmol) 进行分子量检测的案例, 表明 MALDImini-1 检测蛋白质分子量的灵敏度较高, 结果准确, 可以满足 m/z 650-70000 以内蛋白质分子量检测的要求。

关键词: 数字离子阱质谱 MALDImini-1 分子量检测 牛血清白蛋白

基质辅助激光解吸电离 (MALDI) 是一种适用于生物大分子质谱分析的软电离方法, 岛津的田中耕一先生由于对该技术的发明贡献于 2002 年被授予诺贝尔化学奖。MALDI 离子源与飞行时间质谱 (TOF) 技术联用, 即 MALDI-TOF 质谱, 被广泛应用于生物大分子的分子量检测。相对于传统体型较大的 MALDI-TOF 质谱, 岛津又开发了整合 MALDI 离子源和数字离子阱 (DIT) (岛津原创技术) 的紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪——MALDImini-1, 该质谱仪小巧轻便, 操作简单, 仅需微量样品和极短的抽真空时间, 即可快速实现 m/z 650-70000 Da 内的多肽/蛋白质样品的高灵敏分子量检测分析。

为了对 MALDImini-1 检测蛋白质的性能进行验证, 考虑到市场上主流的 MALDI-TOF 质谱产品蛋白质检测灵敏度参数为 100-500 fmol BSA (牛血清白蛋白), 本文以 100 fmol BSA 为例, 应用 MALDImini-1 紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪对样品进行了分子量检测考察, 结果显示质谱信号清晰可见、信噪比良好, 检测到的分子量与理论值相符, 表明 MALDImini-1 检测蛋白质分子量的灵敏度较高, 分子量准确, 与传统 MALDI-TOF 相比毫不逊色, 可以满足 m/z 650-70000 以内蛋白质分子量检测的要求。

1. 实验部分

1.1 仪器

MALDImini-1 紧凑型 MALDI 数字离子阱质谱仪

1.2 仪器参数

调谐模式:	线性正离子模式	激光器:	349nm 固体激光器
扫描范围:	m/z 10000-70000	激光能量:	60

1.3 样品前处理

取 5 pmol/ μL 的 BSA 样品原液加入含有 0.1% 三氟乙酸的乙腈水溶液 (乙腈: 水=30: 70) 稀释 50 倍, 配置为 100 fmol/ μL 的样品工作液。取 1 μL 样品工作液和 1 μL 芥子酸基质 (SA, 浓度为 20 mg/mL) 点靶, 自然干燥后将靶板放入质谱进行分析。

2. 结果与讨论

100 fmol (上样量) 牛血清白蛋白的一级质谱检测结果如图 2 所示。从结果来看, 样品质谱信号清晰可见, 检测到单电荷 (约 m/z 66400)、二电荷 (约 m/z 33200) 和三电荷 (约 m/z 22100) 的信号峰, 与理论值 m/z 66430 (单电荷)、 m/z 33215 (二电荷)、 m/z 22144 (三电荷) 一致。

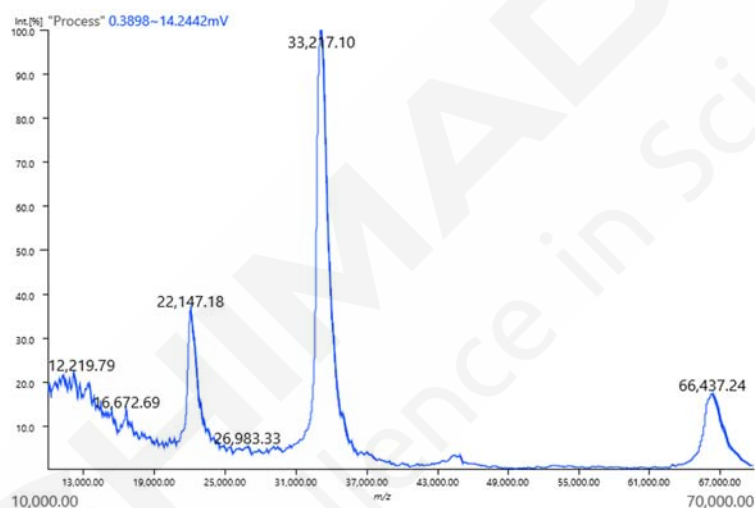


图 2. 100 fmol BSA 的一级质谱图

3. 结论

本文应用紧凑型 MALDI 数字离子阱质谱仪 MALDImini-1 检测 100 fmol 牛血清白蛋白的分子量, 质谱图信噪比良好, 检测结果与理论值相符。MALDImini-1 作为紧凑型基质辅助激光解吸电离数字离子阱质谱仪, 体积小、功能强大、性能卓越, 是进行蛋白质分子量检测的有力工具。

MALDImini-1 鉴定蛋白质种类

摘要: 本文展示了应用 MALDImini-1 紧凑型基质辅助激光解吸电离数字离子阱质谱 (MALDI-DIT) 质谱仪通过肽指纹图谱 (PMF) 和二级质谱搜库成功鉴定牛血清白蛋白 (BSA) 的案例, 表明 MALDImini-1 可以满足蛋白质种类鉴定分析的要求。

关键词: 基质辅助激光解吸电离数字离子阱质谱 MALDImini-1 蛋白质鉴定 牛血清白蛋白

蛋白质鉴定在生物学研究中具有重要意义, MALDI-TOF MS (基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱) 因其分析速度快、通量高, 是进行蛋白质种类鉴定的常用手段之一。传统用于蛋白质鉴定的 MALDI-TOF 体积较大, 价格昂贵。MALDImini-1 质谱仪整合了 MALDI 离子源和数字离子阱 (DIT) (岛津原创技术), 可以实现 m/z 650-70000 Da 内的多肽/蛋白、多糖、聚合物等常规样品分子量检测, 其多级碎裂功能还可以对样品进行复杂的结构分析。

本文展示了应用 MALDImini-1 紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪进行蛋白质鉴定的方法和结果, 通过肽指纹图谱 (PMF) 和二级质谱搜库均成功实现蛋白质鉴定, 表明 MALDImini-1 可以满足蛋白质种类鉴定分析的要求, 该案例可以作为蛋白质鉴定分析时的参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

MALDImini-1 紧凑型 MALDI 数字离子阱质谱仪

1.2 仪器参数

调谐模式:	线性正离子模式	激光器:	349nm 固体激光器
扫描范围:	m/z 650-5000	激光能量:	22.5

1.3 样品前处理

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

2. 结果与讨论

2.1 通过肽指纹图谱 (PMF) 进行蛋白质鉴定

BSA酶解产物的一级质谱检测结果如图1所示。从结果来看，酶解产物的主要信号峰位于 m/z 650-3600之间，将样品质谱数据通过Mascot网站 (<http://www.matrixscience.com>) PMF 搜库功能检索数据库SwissProt (2020_06, 563972条序列)，结果如图2所示，成功匹配到蛋白质ALBU_BOVIN (牛血清白蛋白) 的部分肽段序列，与理论结果一致。

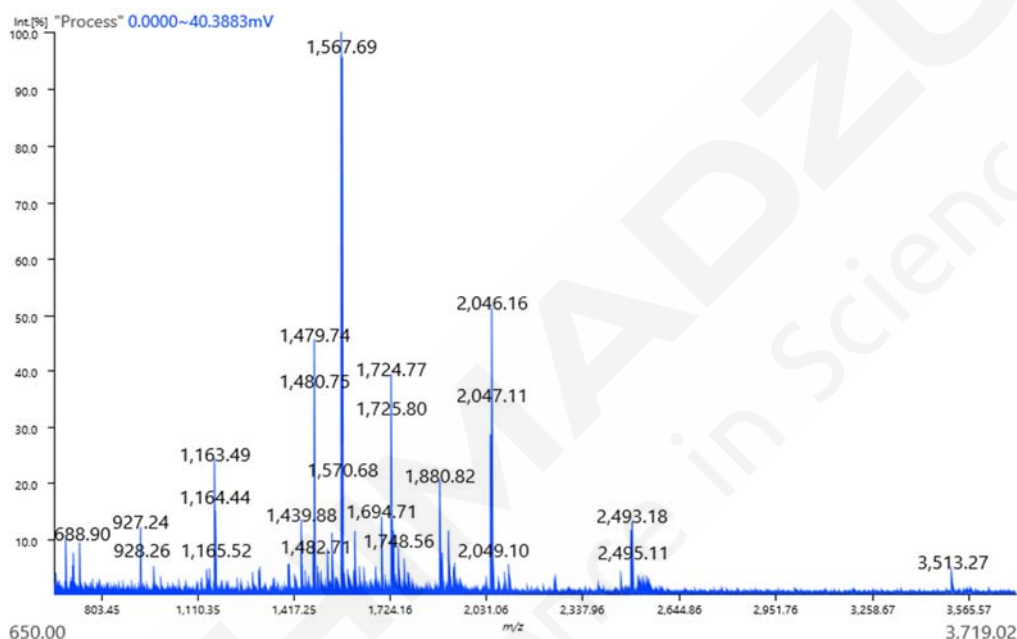
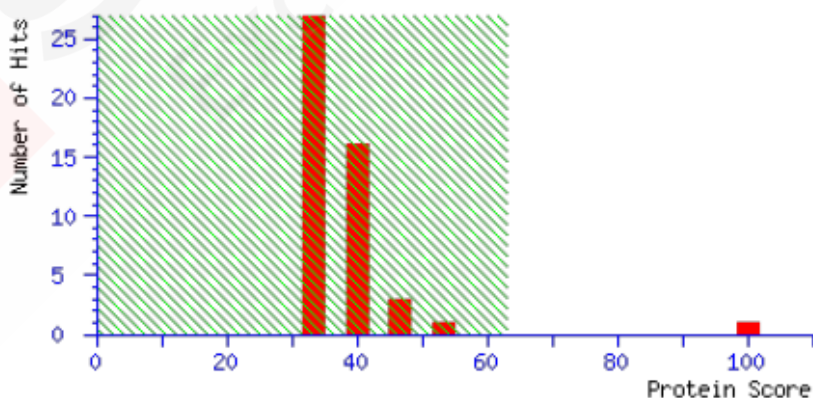


图 1. 牛血清白蛋白的胰蛋白酶酶解产物的一级质谱图



1. [ALBU BOVIN](#) Mass: 71244 Score: 100 Expect: 1.1e-05 Matches: 36
Albumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALB PE=1 SV=4
2. [ALBU SHEEP](#) Mass: 71139 Score: 52 Expect: 0.63 Matches: 27
Albumin OS=Ovis aries OX=9940 GN=ALB PE=1 SV=1

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta M	Peptide
35 - 44	1249.4896	1248.4824	1248.6139	-0.1315 1	R.FKDLGEEHFK.G
45 - 65	2492.1317	2491.1244	2491.2570	-0.1325 0	K.GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK.L
66 - 75	1163.4859	1162.4786	1162.6234	-0.1447 0	K.LVNELTEFAK.T
76 - 88	1463.6347	1462.6274	1462.5817	0.0457 0	K.TCVADESHAGCEK.S
89 - 100	1419.7558	1418.7485	1418.6864	0.0621 0	K.SLHTLFGDELCK.V
89 - 105	1945.8861	1944.8788	1945.0091	-0.1303 1	K.SLHTLFGDELCKVASLR.E
106 - 117	1494.7744	1493.7671	1493.5109	0.2562 0	R.ETYGDMADCCEK.Q + Oxidation (M)
118 - 130	1673.5181	1672.5109	1672.7627	-0.2519 1	K.QEPPERNECFLSHK.D
139 - 151	1576.6021	1575.5948	1575.7603	-0.1654 0	K.LKPDPTLDCDFK.A
161 - 167	927.2390	926.2317	926.4861	-0.2544 0	K.YLYEIAR.R
168 - 183	2045.2061	2044.1988	2044.0206	0.1782 1	R.RHPYFYAPELLEYANK.Y
169 - 183	1888.9002	1887.8929	1887.9195	-0.0266 0	R.HPYFYAPELLEYANK.Y
184 - 197	1747.6065	1746.5992	1746.6978	-0.0986 0	K.YNGVFQECQAEADK.G
236 - 245	1145.4045	1144.3972	1144.6353	-0.2380 1	K.AWSVARLSQK.F
267 - 280	1749.5160	1748.5087	1748.6553	-0.1465 0	K.ECCHGDLLECADDR.A
267 - 285	2247.8467	2246.8394	2246.9354	-0.0960 1	K.ECCHGDLLECADDRADLAK.Y
347 - 359	1567.6883	1566.6811	1566.7354	-0.0544 0	K.DAFLGSFLYEYSR.R
360 - 371	1439.8784	1438.8712	1438.8045	0.0667 1	R.RHPEYAVSVLLR.L
361 - 371	1283.8056	1282.7983	1282.7034	0.0949 0	R.HPEYAVSVLLR.L
375 - 386	1502.4573	1501.4501	1501.6065	-0.1564 0	K.EYEATLECCAK.D
387 - 399	1554.4343	1553.4270	1553.6457	-0.2186 0	K.DDPHACYSTVFDK.L
402 - 412	1305.7985	1304.7912	1304.7088	0.0824 0	K.HLVDEPQNLIK.Q
421 - 433	1479.7378	1478.7305	1478.7881	-0.0577 0	K.LGEYGFQNALIVR.Y
437 - 451	1639.9906	1638.9833	1638.9305	0.0528 1	R.KVPQVSTPTLVEVSR.S
460 - 468	1166.3633	1165.3560	1165.4856	-0.1296 0	R.CCTKPESER.M
469 - 482	1724.7738	1723.7665	1723.8273	-0.0608 0	R.MPCTEDYLSLILNR.L
469 - 482	1740.7849	1739.7776	1739.8222	-0.0446 0	R.MPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation (M)
483 - 489	898.3208	897.3135	897.4742	-0.1607 0	R.LCVLHEK.T
483 - 495	1539.7200	1538.7127	1538.8127	-0.0999 1	R.LCVLHEKTPVSEK.V
499 - 507	1138.3420	1137.3347	1137.4907	-0.1560 0	K.CCTESLVNR.R
508 - 523	1880.8176	1879.8103	1879.9138	-0.1035 0	R.RPCFSAITPDEITYVPK.A
529 - 544	1907.8014	1906.7941	1906.9135	-0.1194 0	K.LFTFHADICTLPDTEK.Q
549 - 561	1504.6366	1503.6294	1503.9137	-0.2843 1	K.QTALVELLKHKPK.A
569 - 580	1399.7747	1398.7674	1398.6853	0.0820 0	K.TVMENFVAFVDK.C
581 - 597	1927.6448	1926.6376	1926.7910	-0.1535 1	K.CCAADDKEACFAVEGPK.L
588 - 607	2091.0519	2090.0446	2090.0718	-0.0272 1	K.EACFAVEGPKLVVSTQTALA.-

图 2. 牛血清白蛋白酶解产物的一级 PMF 搜库结果

2.2 通过二级质谱进行蛋白质鉴定

在样品的一级质谱中, 分别选取前体离子 m/z 1568 与 m/z 1725 进行二级 CID 碎裂 (见图 3), 将获得的质谱数据导出, 通过 Mascot 网站 MS/MS 离子搜库功能在线检索数据库 SwissProt, 结果如图 4 所示, 成功匹配到 DAFLGSFLYEYSR (m/z 1568) 与 MPCTEDYLSLILNR (m/z 1725) 两条肽段序列, 归属的蛋白质为 ALBU_BOVIN (BSA), 与理论值一致, 肽段离子匹配信息见图 4。

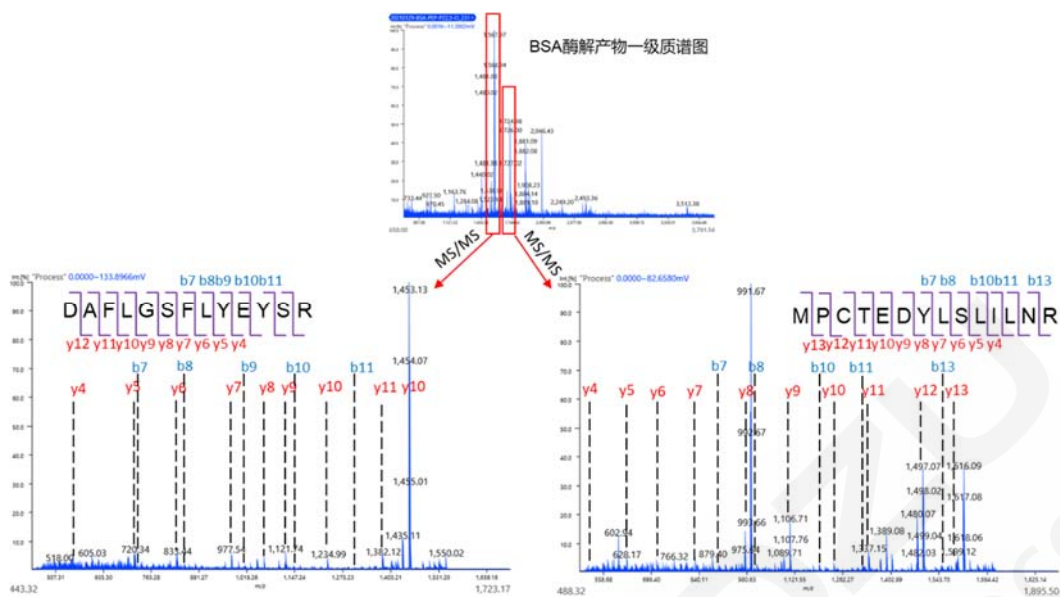


图 3. m/z 1568 及 m/z 1725 的二级质谱图 (左: m/z 1568; 右: m/z 1725)

- [ALBU BOVIN](#) Mass: 71244 Score: 45 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 Albumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALB PE=1 SV=4
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 1	1568.0000	1566.9927	1566.7354	0.2573	0	45	0.0052	1	U	K.DAFLGSFLYEYSR.R
- [ALBU BOVIN](#) Mass: 71244 Score: 44 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 Albumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALB PE=1 SV=4
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 1	1725.1000	1724.0927	1723.8273	0.2654	0	44	0.0044	1	U	R.MPCTEDYLSLILNR.L

图4. m/z 1568与m/z 1725二级质谱搜库结果

3. 结论

本文应用紧凑型 MALDI 数字离子阱质谱仪 MALDImini-1 检测牛血清白蛋白的酶解产物，搜库结果与理论值相符，成功匹配到了牛血清白蛋白的肽段序列。MALDImini-1 作为紧凑型基质辅助激光解吸电离数字离子阱质谱仪，体积小、功能强大、性能卓越，是进行蛋白质种类鉴定的有力工具。

MALDImini-1快速鉴定细菌芽孢蛋白

鉴定微生物种类，可以针对引起感染的病原细菌开出适当的抗菌剂，以及追踪破坏食物的细菌来源。近年来，使用质谱仪 MALDI-TOF MS 进行微生物鉴定的方法已经广泛普及，并广泛用于临床微生物检测和食品和药品等工业领域的质量控制，广泛用于微生物和细菌的鉴定。专为使用而设计。然而，通过 MALDI 鉴定微生物的一般方法具有局限性，即它不容易鉴别混合细菌和孢子形成的细菌。例如，在当前系统中，很难将 MALDI 应用于快速鉴定炭疽芽孢杆菌粉末作为反恐措施。

克服此问题的方法之一是使用 MS/MS 二级质谱测定胰蛋白酶消化后的细菌蛋白，然后数据库搜索获得的肽段来鉴定蛋白。通过 MS/MS 进行蛋白质鉴定的方法可以缩小到蛋白质来源的生物种类，并且可以应用于蛋白质混合物的鉴定，因为可以从多个峰中选择特定的峰。因此，有可能通过与通常的基于 MALDI 的微生物鉴定方法不同的方法来进行微生物鉴定。因此，参考 Fenselau 等人 (1) 的报告，我们使用胰蛋白酶微珠进行蛋白质的胰蛋白酶快速消化，并使用小型 MALDI 数字离子阱质谱仪 MALDImini-1 的 MS/MS 功能来鉴定细菌芽孢蛋白。从而实现细菌的快速鉴定。

■ 小型 MALDI-DIT 质谱仪 "MALDImini-1"

MALDImini-1 (图 1) 是实现了轻量、节约空间的质谱仪，相比一般的 MALDI-TOF MS，它大幅降低了尺寸，占用空间低于 A3 尺寸，主机重量为 25 kg。这种小型化是通过质量分离装置代替飞行时间质谱仪 (TOF MS)，采用我公司自主技术数字离子阱来实现的。同时，MALDImini-1 具有离子阱的特征 MS/MS 和 MS³ 检测功能，因此还可使用该功能进行蛋白质的鉴定和结构分析。

■ 实验

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis subsp. subtilis* NBRC 13719T 是被分类为芽孢杆菌属的细菌之一，被用作形成孢子细菌的模型样品。芽孢杆菌是形成孢子的革兰氏阳性芽孢杆菌。除了纳豆芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis natto*) 等用于食品的菌种以外，还包括食物中毒菌的蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 和具有强感染性的炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) 等菌种。

芽孢是用普通琼脂培养基在 30 °C 下培养枯草芽孢杆菌 1 周以上后形成的。关于芽孢的形

成，可以使用显微镜确认。样品制备的工作流程如图 1 所示。首先，将菌体涂在 MALDI 靶板上，向其中添加 10%三氟乙酸 1 μ L，提取芽孢中所含的蛋白质。自然干燥后，添加胰蛋白酶微珠 (ProteoChem) 2 μ L，在湿润环境和 37 $^{\circ}$ C 的温度下，保温 30 分钟，确保胰蛋白酶溶液不干，对芽孢蛋白质进行胰蛋白酶消化。通过使用胰蛋白酶微珠，可缩短通常需数小时以上的胰蛋白酶消化时间。胰蛋白酶消化后，将基质溶液 (1 μ L) 分层并干燥后，用小型 MALDI 数字离子阱质谱仪 "MALDImini-1" 进行 MS, MS/MS 检测。基质采用 CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)。

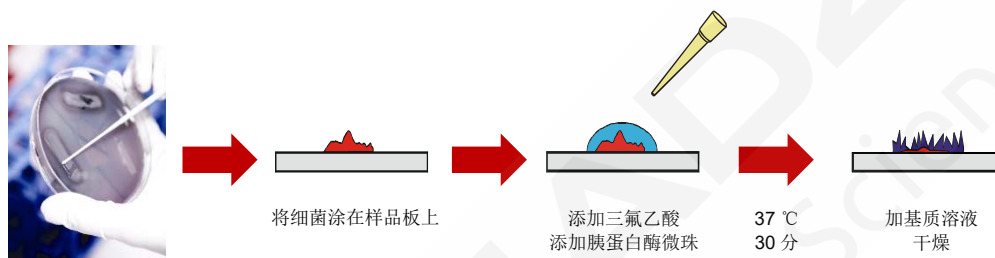


图 2. MALDImini™-1 样品制备的工作流程

■ 结果

使用 MALDImini-1 检测的芽孢的胰蛋白酶消化物的质谱图，具体如图 2 所示。检测到多种源自孢子蛋白的胰蛋白酶肽。从检测出的肽的峰中选择 m/z 1879 的峰，进行 MS/MS 检测，结果如图 3 所示。由该 MS/MS 检测得到的数据，通过 Mascot (Matrix Science) 的 MS/MS Ion Search 进行数据库搜索，鉴定了源自枯草芽孢杆菌的小酸溶性孢子蛋白 A (图 4)。

另外，对蛋白质的氨基酸序列进行同源搜索的 BLAST 搜索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 是在鉴定出的肽序列上进行的。由于它具有不同于细菌和蜡状芽孢杆菌的序列，因此发现该肽的序列具有足够的特异性以缩小细菌种类。在这里，仅显示了枯草芽孢杆菌的研究结果，但在 Fenselau 等人的报告中 1)，对蜡状芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌进行了相同的研究，并用相同的方法鉴定了这些物种的芽孢。显示了缩小范围的可能性。

MALDImini-1分析化学修饰抗体的修饰位点

21 世纪初期，人类发现了抗体药物偶联物（ADC），该物质可作为一类新型抗癌药物，其抗体可与细胞毒性药物绑定结合。结合抗体的高底物特异性与低分子药物的药效，相比常规低分子药物，ADC 有望成为更为有效的抗癌药物。通过人工手段将不同的化合物与蛋白质结合时（如 ADC），化合物的结合程度以及结合位点将成为药物的重要的质量特性之一。

因此，如本文示例所述，通过人工结合低分子化合物与标准研究抗体，创建伪 ADC，之后使用 MALDImini-1 紧凑型 MALDI 数字离子阱（DIT）质谱仪对其实施分析。

■ 胰蛋白酶消化和抗体质谱测定

分别在溶液中对色氨酸残基上（1）用 Me-荧光素-ABNO 修饰过的标准抗体与未经处理的标准抗体（各 1 μ L）实施胰蛋白酶消化（图 1, NISTmab, 人源化 IgGK 单克隆抗体, RM8671），之后使用 Ziptip[®] μ C18 吸头将样品脱盐并在 MALDI 目标板上沉积。将基质溶液（0.5 μ L）覆于样品上并干燥，之后使用 MALDImini-1 紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪实施 MSⁿ 分析。将 DHB（2,5-二羟基苯甲酸）用作基质。

使用 MALDImini-1 测量经修饰和未经修饰的抗体，并进行质谱结果对比。尽管上述两个样品几乎共有所有离子，但在修饰抗体中还是检测到了一些独有离子存在（m/z 2416.、2430.7、2452.7、2560.9）（图 2）。

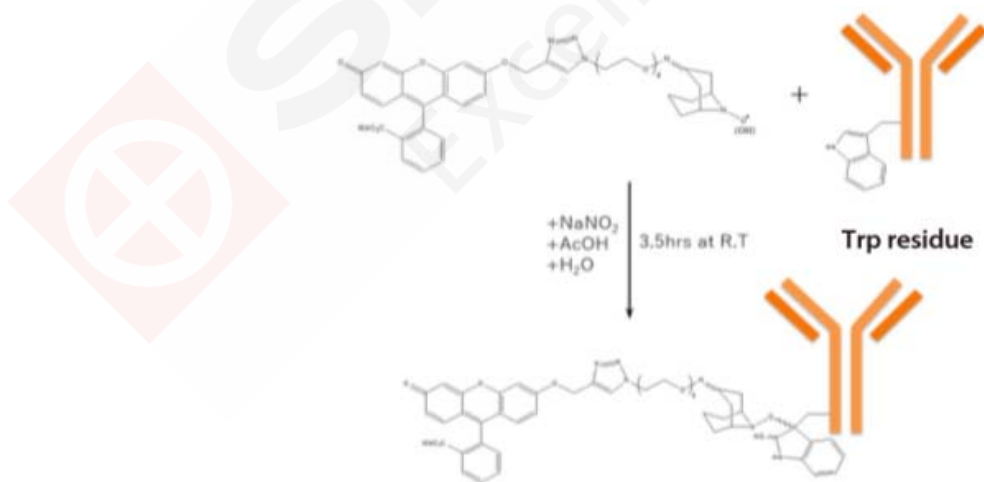


图 1 Me-荧光素-ABNO 抗体修饰

从质量差异来看，认为其中三个离子 m/z 2416.9、2430.7 和 2452.7 与单分子 CH₂ 消除产物或 H/Na 替代产物有关。由于认定 m/z 2416.9 和 m/z 2560.9 可能分别源自不同分子，因此

对其进一步实施分析。

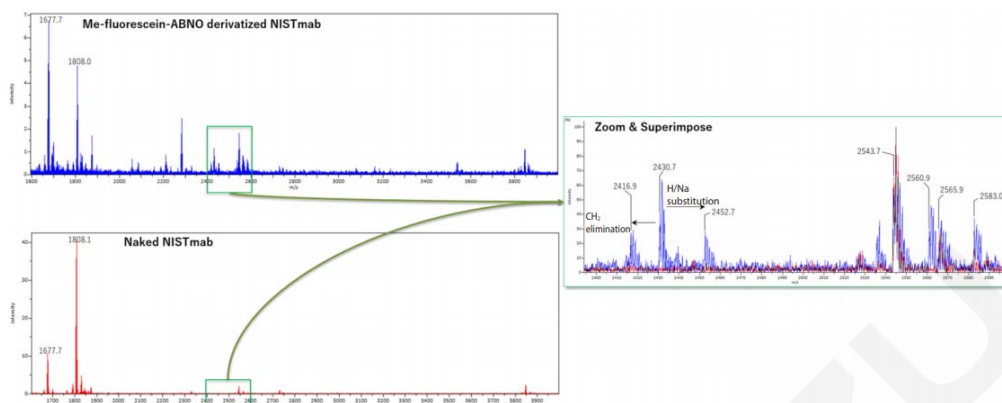


图 2 标准抗体质谱图对比（红色：未经修饰抗体，蓝色：经修饰抗体）

■ 运用 MSⁿ 对修饰位点实施分析

首先，针对 m/z 2416.9 实施 MS/MS 分析，检测到碎片离子 (m/z 1677.7)，认为该碎片离子是修饰基团解离的肽主链（图 3）。由于该离子与未经修饰抗体经 MS 测定后所检测到的离子具有相同的 m/z 值（对经修饰抗体实施 MS/MS 分析获得上述离子的 MS³ 测定结果），且与 MS/MS 离子测定结果具有相同的 m/z 值（对未经修饰抗体实施 MS 质谱分析获得）。对比上述两种离子所得质谱，显示出相同的碎片谱。此外，对这些数据进行 Mascot MS/MS 离子搜索后，结果表明，上述结果源自抗体重链的肽序列（278FNWYVDGVEVHNAK291）。

同理，对 m/z 2560.9 离子实施分析，发现修饰基团同样存在于源自抗体重链的肽序列（305WSVLTVLHQDWLNGK320）中（图 4）。基于上述实际情况，可认为该化学修饰存在于上述两个肽序列的色氨酸残基中。

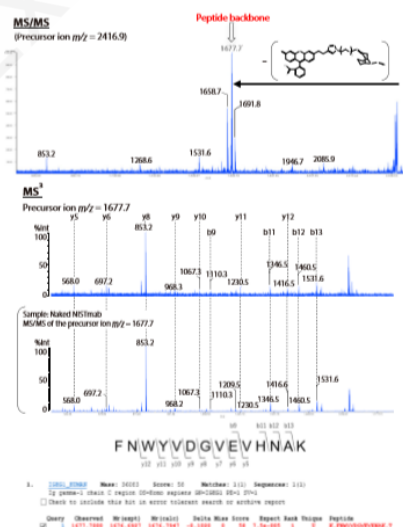


图 3 MSⁿ (n=2,3)质谱与 Mascot MS/MS 离子搜索结果

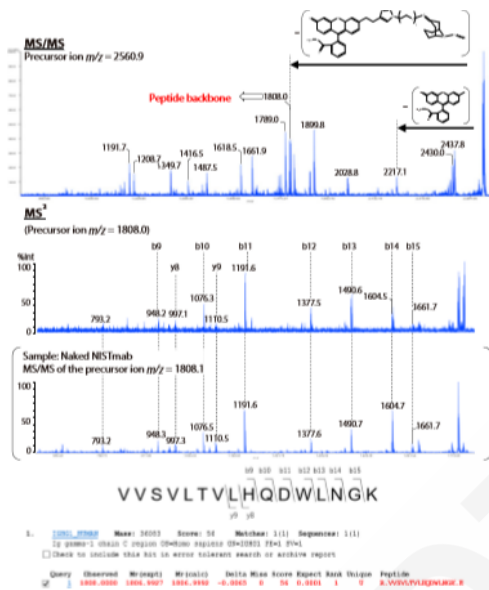


图 4 MSⁿ (n=2,3)质谱与 Mascot MS/MS 离子搜索结果

事实上单体抗体分子是一种复杂分子，包含两个重链分子和两个轻链分子，这表明本次最多发生了 4 个化学修饰。这也与另一实验（应用报告 B086）所得结果（单个抗体分子中存在 3 个化学修饰）保持一致。分析结果表明，尽管体积小，但 MALDImini-1 紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪仍具有较高的 MSⁿ 分析能力，并且能以最高性能方式从修饰肽中获取信息。

```

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSSTAGMSVGVIRQPPGKALEWLADIWDDKKHYN
PSLKDRDLTISKDTSKNQWLKVTNMDPADTATYYCARDMIFNFYFDWVGQTTVYSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD
WLNKGKEYKCRVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK
  
```

图 5 重链和修饰位点的氨基酸序列（粗体：通过 Mascot MS/MS 离子搜索确认的肽氨基酸序列，红色：ME-荧光-ABNO 的修饰位点）

本文译自岛津全球应用开发中心（GADC）No. B099 应用报告。

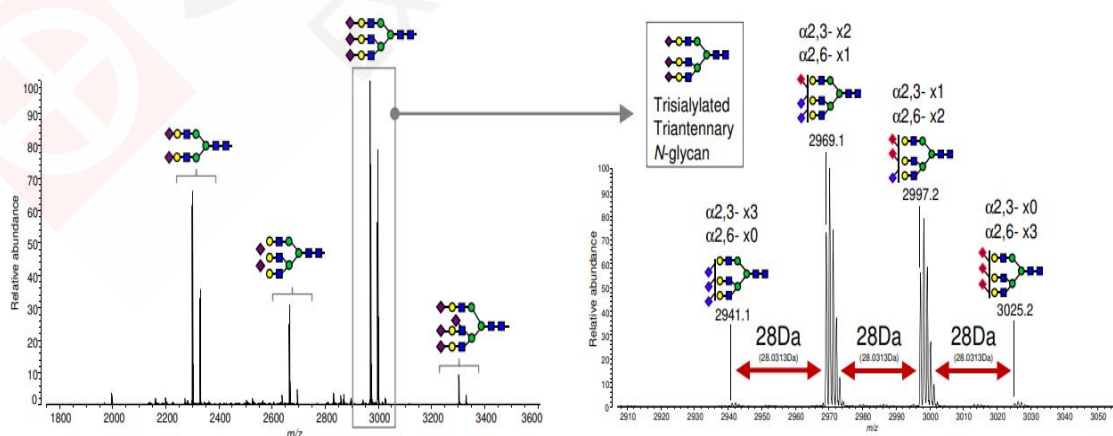
第二节 糖及糖肽分析

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

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

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

到目前为止，质谱仍是糖生物学家应用最为广泛的测定糖链结构的工具。快原子轰击质谱 (FAB-MS)、电喷雾质谱 (ESI-MS)、基质辅助激光解析电离质谱 (MALDI MS) 是目前在糖链结构测定方面应用广泛的 3 种质谱，它们可以直接对样品进行离子化和解析以获得信息，而且可以对完整的糖复合物或者是片段化的样品进行分析。MALDImini-1 的二级及三级质谱功能有助于糖链及肽链的结构解析。



MALDImini-1 糖肽分析

MALDImini-1 分析糖肽

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

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

■ MALDImini-1 紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪

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

■ 从糖蛋白制备糖肽

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

■ MS 测量糖肽片段

使用 MALDImini-1 MALDI-DIT 质谱仪以 4000 Da/s 的扫描速度对回收糖肽实施 MS 测量。结果检测到 m/z 2269.0、2431.1、2593.3、2634.3、2796.3、2958.2、3119.9 和 3282.3 作为

主峰相互具有聚糖衍生质量差异（图 1）。

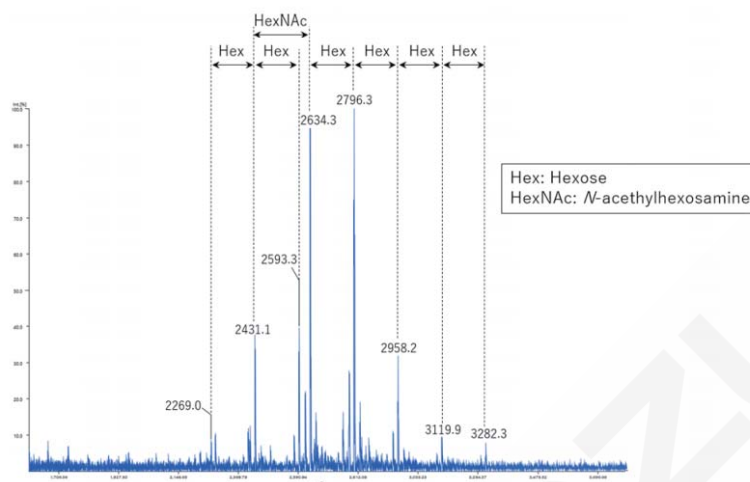


图 1 从商品抗体中提取糖肽组分的质谱图

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

■ MSⁿ 鉴定聚糖结构与结合位点

作为示例，从以此方式鉴定的糖肽衍生信号中选择 m/z 2796.3，并对其进行 MS/MS 分析（图 2）。结果检测到聚糖衍生产物离子，此外，还检测了 N-聚糖根具有特定 GlcNAc 质量差 ($\Delta m/z$ 83、120) 的三重峰。根据上述事实，可理解 MS/MS 质谱中观察到 m/z 值为 1189.7 的离子为肽主链离子。接下来，对肽主链离子 (m/z 1189.7) 实施 MS³ 分析，并确定肽主链的氨基酸序列。

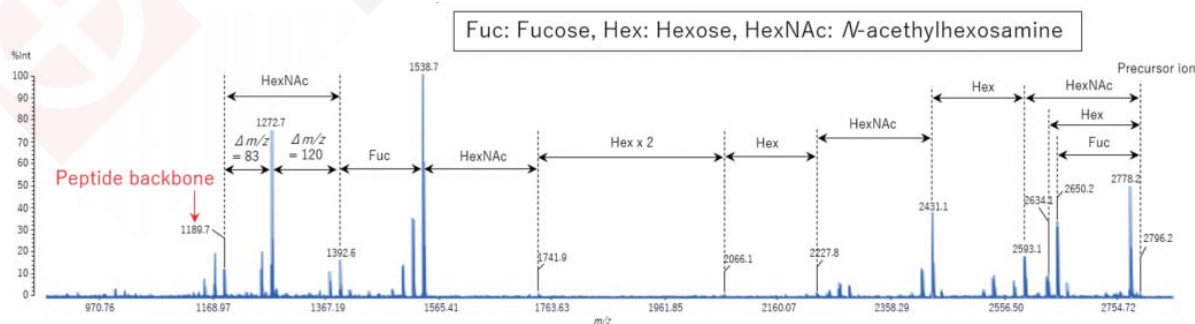


图 2 糖肽的 MS/MS 质谱图（前体离子 m/z 2796.2）

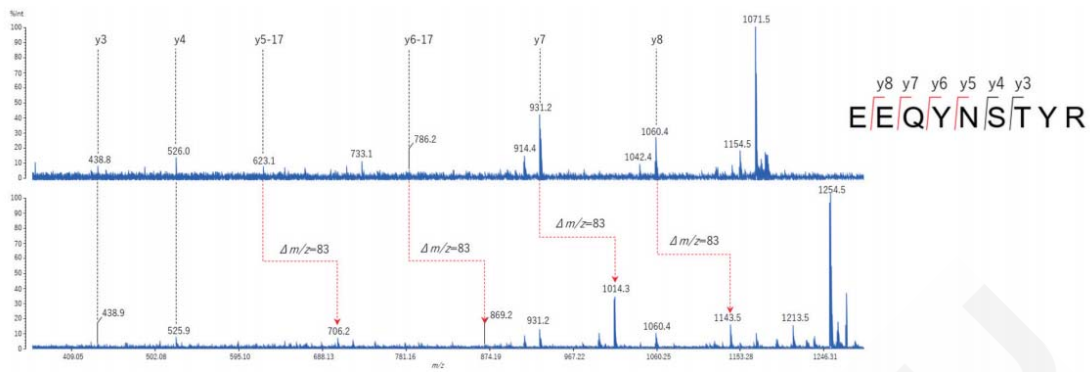


图3 糖肽的 MS³ 质谱结果
 顶部：肽主链（前体离子 m/z 1189.7），
 底部：包含根 GlcNAc 部分结构的肽主链（前体离子 m/z 1272.7）

此外，还对与肽主链结合的根 GlcNAc 环裂解离子（m/z 1272.7）实施了 MS³ 分析，结合肽主链 MS³ 质谱图（图 3）对比分析结果可以确定聚糖的结合位点。上述所有分析结果表明，用于该分析的商品抗体糖肽具有图 5 所示的各类不同结构。

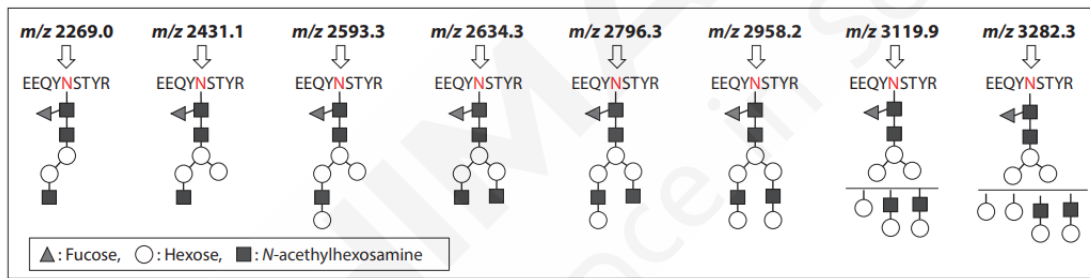


图4 商品抗体衍生糖肽的预估结构（红色：聚糖结合位点的氨基酸）

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

本文译自岛津全球应用开发中心（GADC）No. B100 应用报告。

MALDImini-1 分析 N-聚糖：唾液酸键联异构体的结构分析与鉴定

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

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

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

■ 糖蛋白释放 N-聚糖

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

■ 唾液酸键特异性烷基酰胺化（SALSA）

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

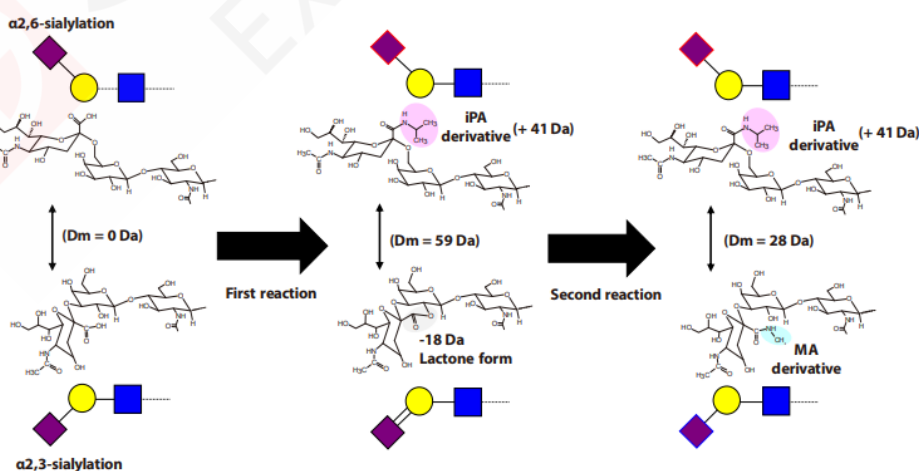


图 1 唾液酸键特异性烷基酰胺化（SALSA）方法所需两步反应的示意图， α 2, 6 唾液酸被异丙胺（iPA）酰胺化，而 α 2, 3 唾液酸被甲胺（MA）酰胺化，产生质量差异后可通过 MS 区分两种形式的唾液酸。

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

■ 聚糖 2AB 标记并点样到 MALDI 孔板上

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

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

此处使用的基质是添加过氯化钠的 CHCA (α -氰基-4-羟基肉桂酸)。

*有关 MALDImini-1 的详细信息，请参见应用新闻编号：B100。

■ 通过 MS^2 分析确认唾液酸链修饰类型

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

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

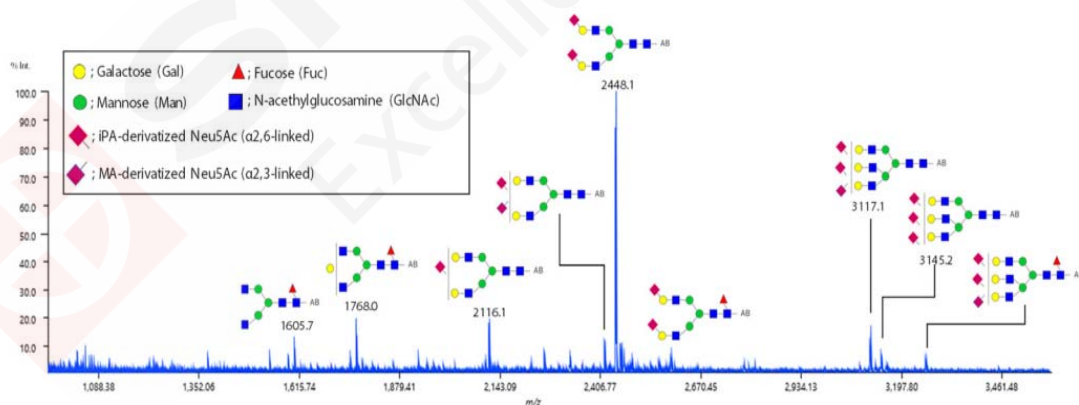


图 2 使用 MALDImini-1 获得的血清糖蛋白衍生 N-聚糖质谱结果

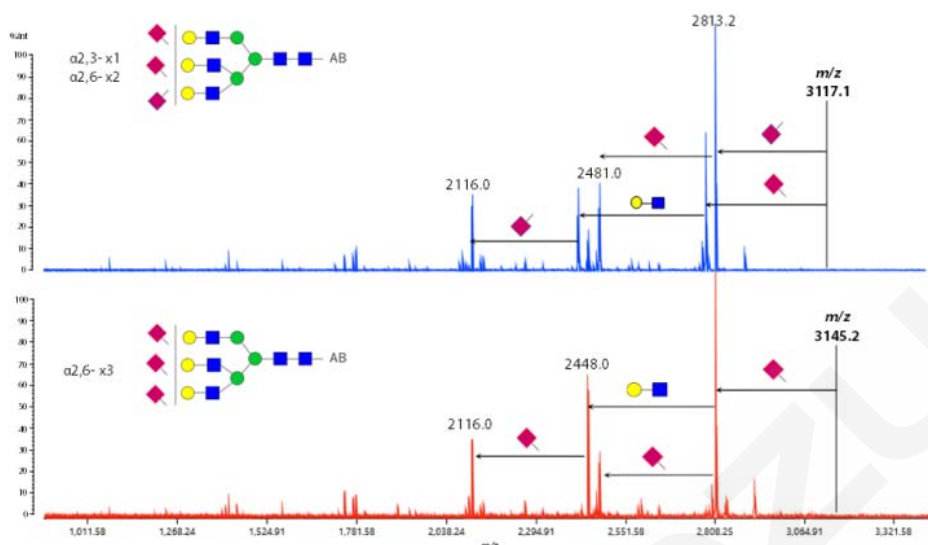


图3 通过 MS² 检测对比三天线聚糖 m/z 3117.1 和 m/z 3145.2 的质谱可根据非还原末端修饰唾液酸残基的中性损失质量来区分链修饰类型

■ 通过 MSⁿ 分析实施聚糖结构分析

在 MS² 聚糖分析中，主要检测到由聚糖键断裂产生的碎片离子。但是，当分析物包含大量相同质量残基时（如聚糖的情况），通常很难确定聚糖中碎片离子源。

碎片离子源可通过实施 MS³ 分析来澄清（图 4）。无法解释 MS² 中双天线聚糖 m/z 2448.1 的碎片离子 m/z 720.0 是通过从非还原性末端序列去除聚糖所得。因此，如对比包含唾液酸的碎片离子（m/z 2107.0）和不含唾液酸的碎片离子（m/z 1783.9）的 MS³ 结果，则不会从后者中检测到碎片离子 m/z 720.0。基于这一事实，可以理解片段离子 m/z 720.0 源自非还原性末端侧的三糖（其中包括唾液酸）。此外，还可通过碎片离子 m/z 1053.4 的 MS³ 结果分析 N-聚糖的核心结构。

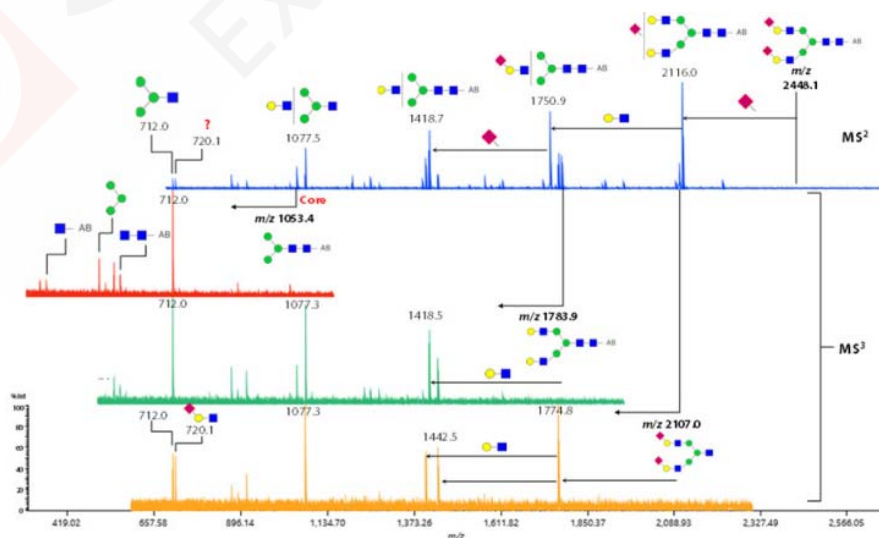


图4 二天线聚糖 m/z 2448.1 的 MSⁿ 质谱图

■ 通过 MSⁿ 分析实施聚糖结构分析

如本实验所示, 可认为通过 SALSA 法稳定唾液酸并结合使用 MALDImini-1 紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪实施 MS³ 分析是一种有效的聚糖结构分析技术 (包括唾液酸的链修饰类型)。

本文译自岛津全球应用开发中心 (GADC) No. B101 应用报告。

MALDImini-1 结合 SialoCapper-ID 试剂盒用于分析聚糖

特点:

- ◆ 唾液酸连接类型可仅使用 MS 分析进行鉴别，而无需与标准聚糖分析结果进行比较，这有助于节省实验室人力。
- ◆ 唾液酸聚糖的灵敏度得到提高，能够在不浪费宝贵样品的情况下分析甚至微量的物质
- ◆ 该试剂盒与传统的聚糖分析方法高度兼容，并可灵活地纳入现有的实验流程。

■ 简介

聚糖被称为“生命的第三链”，在体内以各种形式存在。蛋白质的糖基化与激素和生物制剂的活性，以及病毒感染和癌症发生等密切相关。因此，分析聚糖的结构对于理解生物现象和药物的有益作用至关重要。

唾液酸 (SA) 统称为酸性单糖家族，通常是聚糖的最外层成分。有许多生物现象与唾液酸有关。例如，唾液酸在流感病毒感染过程中起着核心作用。荧光标记高效液相色谱分析以前是聚糖分析的金标准，但近年来，高灵敏度和高通量质谱 (MS) 得到了广泛应用。然而，含有唾液酸残基的酸性聚糖的分析比中性聚糖的分析更困难。

本文描述了一种新的衍生化方法和相应新研发的 SialoCapper-ID 试剂盒，用于改进包含唾液酸的聚糖 (唾液聚糖) 的质谱分析。

■ 唾液聚糖质谱分析中的技术问题唾液酸键特异性衍生化

唾液酸是一种带有羧基的酸性单糖，通常会降低质谱分析的灵敏度。由于唾液酸通常在质谱分析过程中通过分解从聚糖中分离，因此也难以准确确定附着的唾液酸数量。此外，羧基通常导致具有多个质荷比的含盐质谱峰形成。因此，含有多种唾液酸的唾液酸聚糖的质谱峰变得复杂，使得质谱峰的定量解析变得非常困难。

此外，具有 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -键异构体的唾液酸具有相同的质量。由于许多的生物学现象与键合异构体的差异相关，例如流感病毒的感染机制，在聚糖分析中经常需要对键合异构体进行区分。相同质量异构体的鉴别是质谱学中具有挑战性的问题之一。

■ 唾液酸键特异性衍生化

通过化学衍生作用中和唾液酸，解决了唾液酸存在引起的问题。通过中和羧基，抑制了由

于多次碱金属加合引起的唾液酸损失和多个质谱峰，提高了灵敏度和定量效果。

我们开发了一种新的化学衍生方法，不仅可以中和唾液酸，而且还可以区分键的连接类型。我们获得专利的唾液酸键特定烷基酰胺化技术（SALSA 方法）可有效中和唾液酸并根据键类型改变其质量，从而通过质谱法区分唾液酸键合异构体。1,2) SialoCapper-ID 试剂盒是一种用于聚糖预处理的试剂盒，可简化 SALSA 方法的流程。

涉及 SialoCapper-ID 试剂盒的 SALSA 方法包括两个反应步骤，但第二个反应非常快速和稳定，因此在第一个和第二个反应之间不需要额外的反应时间和纯化步骤。最终， $\alpha 2,6$ -连接的唾液酸是异丙基酰胺化的，而 $\alpha 2,3$ -连接的唾液酸是甲基酰胺化的，因此 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -连接的唾液酸可以通过 28 Da 的质量差异来区分（图 1）。

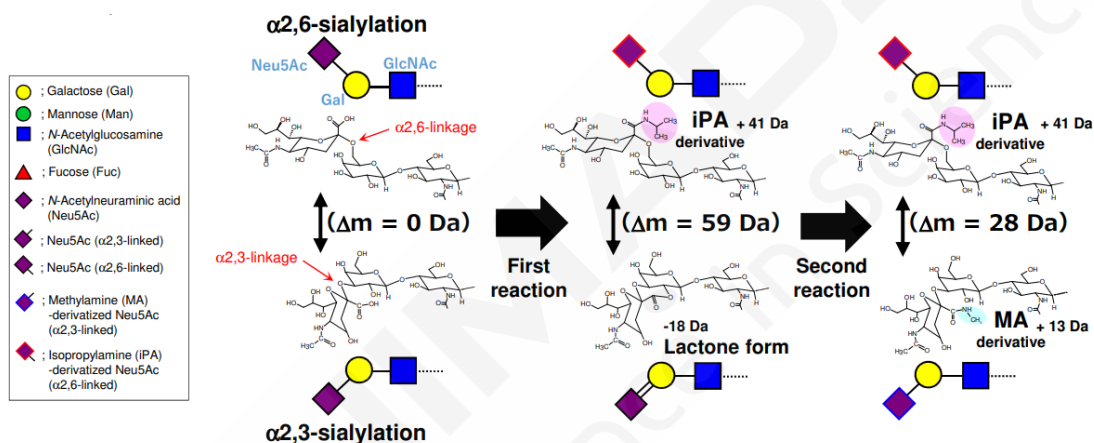


图 1. SALSA 衍生化方法的原理

使用 SialoCapper-ID 试剂盒的 SALSA 法由岛津公司开发，并与北海道大学的 Jun Ichi Furukawa 教授和 Hisatoshi Hanamatsu 博士合作改进。

■ SialoCapper-ID 试剂盒的特点

SialoCapper-ID 试剂盒有三个特点：

- A. 唾液酸键合异构体的简单分析
- B. 提高唾液酸聚糖的灵敏度
- C. 通用性和可扩展性

特点 A 和 B 与试剂盒的有效性有关，特点 C 与试剂盒的使用有关。

■ 唾液酸键合异构体的简单分析

通过使用该试剂盒，质谱检出的 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -连接唾液酸中 28 Da 的质量差被用来区分键合异构体。图 2 显示了由试剂盒衍生的标记的二烯丙基聚糖的质谱。由于这四种聚糖是异构体，它们的原始 m/z 值都是相同的 ($[M+Na]^+$, m/z 2323.8)，但衍生化后，根据连接的类型和数

量，在不同的 m/z 值下检测到每个异构体。同时对反应条件进行了优化，以确保不存在可能降低 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -分辨性能的“未反应”或“错误转化”形式。

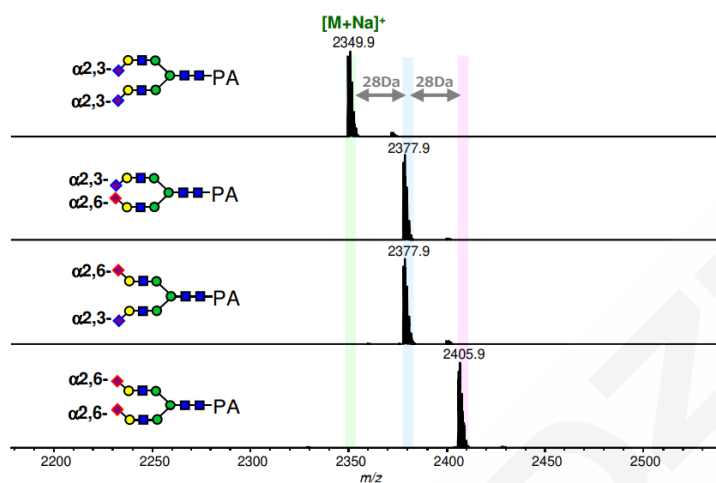


图 2. SialoCapper-ID 试剂盒衍生的标记聚糖标准品质谱图

区分唾液酸键异构体的常规方法包括：1) 制备具有已知唾液酸键类型的聚糖标准物质，进行 LC/MS 分析，匹配标准品和样品之间的 LC 保留时间，以及 2) 比较特定唾液酸酶处理前后的分析结果。

由于 SialoCapper-ID 试剂盒基于化学反应，因此不需要已知唾液酸连接类型的聚糖标准品。当很难获得聚糖标准物质时，这很有帮助，如具有多个唾液酸残基的高度复杂聚糖。

■ 提高唾液酸聚糖的灵敏度

唾液酸的中和作用可防止在质谱分析和羧基吸附多个盐离子的过程中唾液酸残基的损失。因此，唾液酸聚糖的灵敏度提高，质谱采集简化，谱图解析变得更容易。定量也得到了提高，在相同的质谱中检测到的中性和唾液酸化聚糖，具有相似的电离效率。

图 3 比较了由牛胎球蛋白衍生的 N-连接聚糖（N-聚糖）在通过 SialoCapper-ID 试剂盒衍生之前和之后的质谱图。衍生化后，通过抑制盐离子的吸附，提高了灵敏度，简化了质谱。

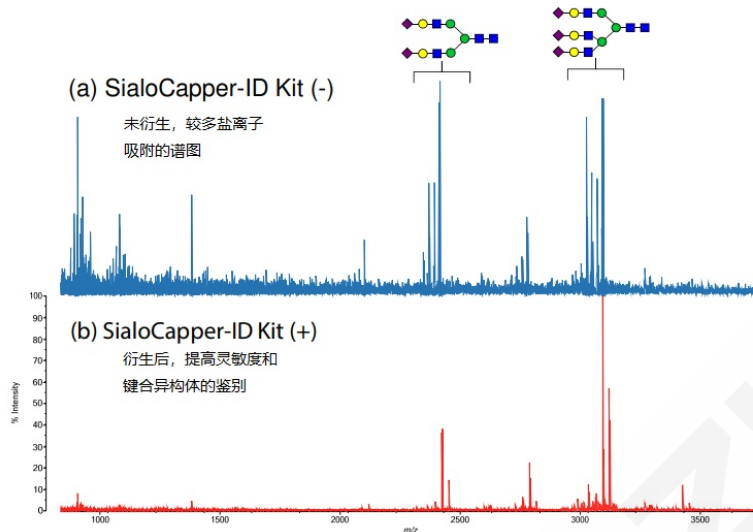


图 3. 牛胎球蛋白 N-连接聚糖衍生前后的质谱图

■ 通用性和可扩展性

连接到蛋白质的聚糖的质谱分析通常会用到以下几个步骤：

- 1) 聚糖释放
- 2) 聚糖标记（如有必要）
- 3) 质谱分析

每个步骤之间可能需要适当的提纯。在分析聚糖的实验室中，可能已有既定的实验操作方案。SialoCapper-ID 试剂盒在一个试剂盒中同时支持液相和固相反应，使具有既定方案的实验室能够轻松地将试剂盒集成到其分析流程中，以区分唾液酸键合异构体。由于该试剂盒有完全稳定的 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -连接的唾液酸，因此该试剂盒也可以与其他酶切和化学反应结合使用。当然该试剂盒可与聚糖分析中常用的聚糖还原末端标记结合使用。图 4 说明了聚糖分析预处理的一般工作流程以及试剂盒衍生化的时间。

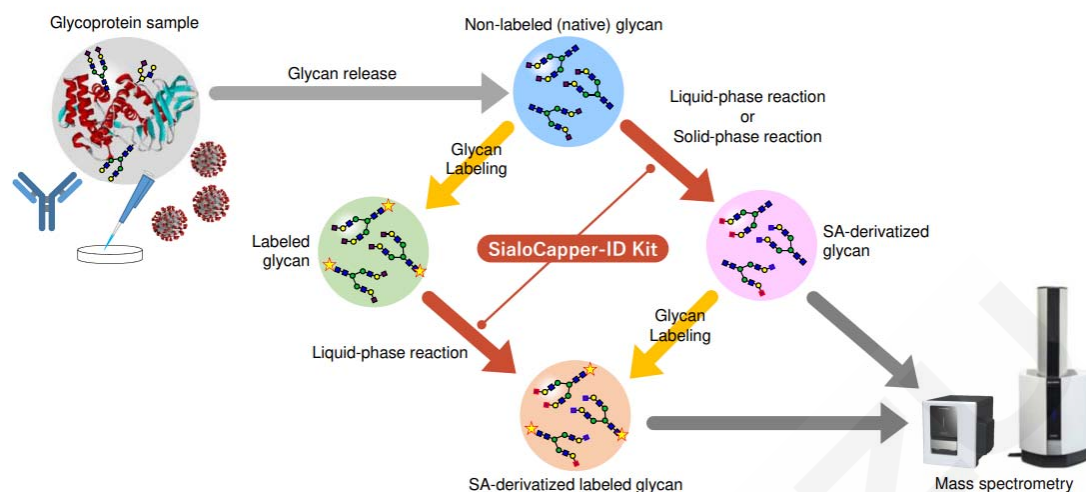


图 4. 使用 SialoCapper-ID 试剂盒对聚糖质谱分析的预处理流程

■ 使用 SialoCapper-ID 试剂盒

使用试剂盒（图 5），可以通过以下两种方法进行唾液酸键特异性衍生化（图 6）。

I. 液相反应

用于在试管中衍生聚糖

II. 固相反应

用于衍生与固体载体结合的聚糖

该试剂盒的处理时间可根据聚糖样品的条件和聚糖分析的工作流程灵活更改。



图 5. SialoCapper-ID 试剂盒的外观和内含试剂

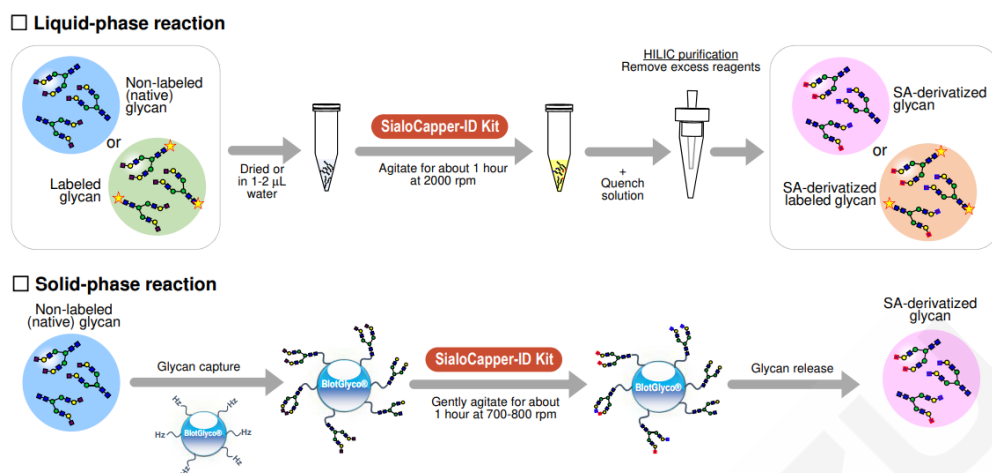


图 6. 使用 SialoCapper-ID 试剂盒进行液相/固相反应的机理

■ 液相反应

该试剂盒通常用于管中干燥的或溶解在少量水中样品的液相反应。它支持还原端标记和未标记聚糖的唾液酸衍生。根据使用说明书，溶解试剂并依次添加到试管中。在第一次和第二次反应之间不需要去除多余的试剂。此外，第二个反应是瞬时完成的，因此所有衍生化步骤所需的总反应时间约为 1 小时。

使用试剂盒进行衍生化后，需要使用 HILIC 载体进行纯化，以去除多余的试剂。该载体不包括在试剂盒中，但可以使用任何熟悉的 HILIC 芯片或柱子。有关推荐的净化方案，请参阅说明手册。

■ 固相反应

通过将该试剂盒与聚糖纯化珠相结合，可以同时完成粗样品中的聚糖纯化和唾液酸衍生化。此外，它还有助于去除多余的试剂，简化实验工作流程，有助于节省实验人力。

BlotGlyco® (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) 珠是一种聚糖纯化珠，可选择性结合到聚糖的还原端。使用该试剂盒的唾液酸键特异性衍生对珠粒上捕获的聚糖有效。从 BlotGlyco® 珠释放聚糖后，可在质谱分析之前进行任何还原端衍生化方法的操作。

由于 BlotGlyco® 珠选择性地结合到聚糖的还原端，因此固相反应不能应用于已标记的聚糖，但它为未标记（天然）聚糖提供了一种高度稳定的解决方案。BlotGlyco® 珠对聚糖具有高度选择性，因此可以在唾液酸衍生化之前有效去除污染物。这就是固相反应“非常稳定”的原因。

■ 需要但不在试剂盒中的耗材

试剂盒仅包含用于唾液酸衍生的化学试剂。它不包括去除多余试剂的 HILIC 载体、聚糖纯化珠 (BlotGlyco®) 或纯化过程所需的溶液。务必单独准备这些必要的用品。有关详细信息，

请参阅使用手册。

■ 质谱仪

对于使用 SialoCapper -ID 试剂盒处理的聚糖的检测，可以使用任何类型的质谱仪。由于 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -键类型可以根据质量进行区分，因此不需要色谱分离。因此，样品可以通过基质辅助激光解吸电离质谱（MALDI-MS）进行分析，该质谱通常不涉及色谱分离。

■ 质谱图实例与解析

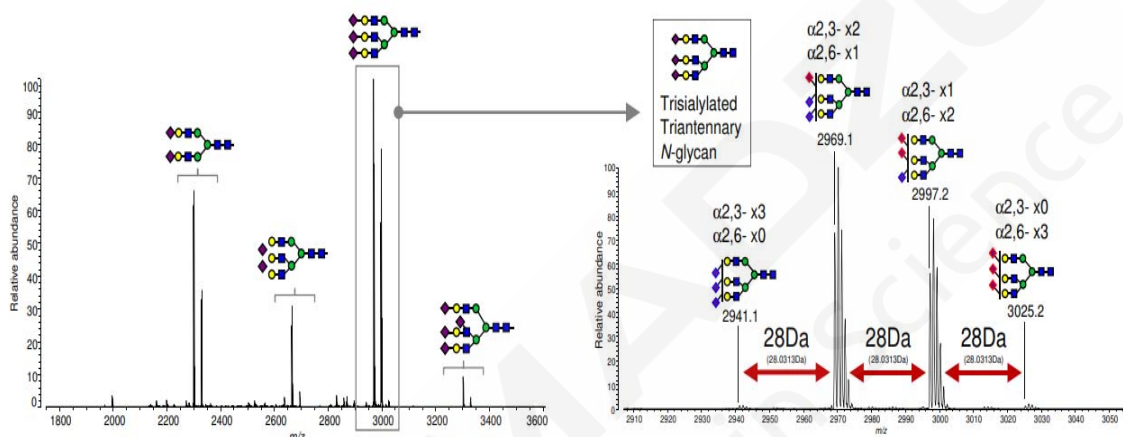


图 7. SialoCapper ID 试剂盒衍生牛胎球蛋白 N-聚糖的质谱图

图 7 显示使用试剂盒获得的质谱图典型示例（源自牛胎球蛋白的 N-聚糖）。胎球蛋白含有许多具有 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -键的唾液酸。

当一个聚糖具有多个具有 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -键的唾液酸时，源自一组唾液酸键合异构体的聚糖峰可显示为差异为 28 Da 的质谱峰簇。对于含有三种唾液酸的三链多糖，可从 2,3-/ $\alpha 2,6$ -键的组合中检测到四个峰（图 7，右侧）。质谱图中这些 28 Da 间隔的峰值强度比反映了其中的 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -唾液酸比例。

■ 质谱数据分析软件

分析聚糖质谱图的第一步是根据获得的 m/z 值估计聚糖的单糖组成。然而，使用 SialoCapper-ID 试剂盒进行衍生化会改变唾液酸残基的质量，并根据连接类型产生质量变化。因此，传统的软件不能支持这种唾液酸键特异性衍生化的结果分析。

针对 SialoCapper-ID 试剂盒开发的支持工具是聚糖成分估计软件，该软件可以分析唾液酸衍生处理后唾液酸残基的质量变化。

基于输入参数（耐受性、每种单糖的质量上限和下限、预处理方法、可检测离子种类等），通过 brute-force 检索，计算并呈现每种 m/z（单同位素峰）对应的聚糖组成候选物（图 8）。

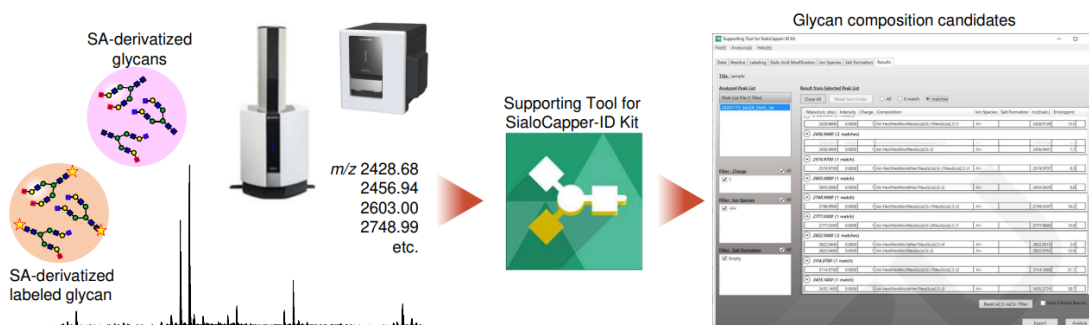


图 8. 使用 SialoCapper-ID 支持软件进行质谱数据分析的流程

■ 示例：使用 MALDImini-1 分析血清中的聚糖

以下是分析来自血清糖蛋白的 N-聚糖的案例。N-聚糖用 SialoCapper-ID 试剂盒衍生，并用岛津 MALDImini-1 紧凑型 MALDI 数字离子阱（MALDI-DIT）质谱仪检测。

本研究使用的血清是用于研究目的的商业化产品。首先，将 5 μ L 血清用 SDS（十二烷基硫酸钠）和 DTT（二硫苏糖醇）变性和还原。添加 NP-40（Nonidet P-40）后，添加 PNGaseF 糖苷酶，使溶液在 37°C 下反应 18 小时，从糖蛋白中释放 N-聚糖。

在糖蛋白释放的 N-聚糖溶液中，取 4 μ L 直接与来自 SialoCapper-ID 试剂盒（液相反应）的反应溶液混合。然后使用 GL-Tip 酰胺（GL Sciences Inc.）去除多余的试剂。

唾液酸键特异性衍生后，用 2-氨基苯甲酰胺（AB）标记聚糖的还原端，然后用 GL-Tip 酰胺去除多余的试剂。

将处理好的样品溶液（0.5 μ L）置于 MALDI 靶板上，通过覆盖基质溶液（0.5 μ L）自然干燥。然后用 MALDImini-1 进行多级质谱 MS^n 分析。本例中使用的基质为添加氯化钠的 CHCA（ α -氰基-4-羟基肉桂酸）。有关 MALDImini-1 的详细信息，请参阅应用报告 B100。

■ 血清中的聚糖一级和二级质谱分析

从血清糖蛋白中检测到各种类型的 N-聚糖，包括二天线和三天线 N-聚糖（图 9）。由于在 m/z 3117.1 和 3145.2 检测到的两个 N-聚糖的质量差值为 28 Da，因此它们可能是仅在 α 2,3-/ α 2,6-键结合方式不同的键合异构体。根据 SialoCapper-ID Kit 支持软件的分析结果（表 1），确定了 m/z 3117.1 聚糖的唯一组成结构，而 m/z 3145.2 聚糖则有两个候选分子 A 和 B。考虑到 N-聚糖的生物合成途径，候选 B 更合理。为了支持这一假设，我们采集了二级质谱图（图

10)。二级实验基于衍生化唾液酸残基对应的中性丢失质量，确认了聚糖中包含的唾液酸连接类型。我们发现 m/z 3117.1 对应于 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -键的混合物， m/z 3145.2 仅对应于 $\alpha 2,6$ -键（候选 B）。

SialoCapper-ID Kit 支持软件具有一个独特的过滤功能，名为 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -键筛选器。该筛选器有一个约束条件，重点是唾液酸残基的数量及其连接类型。使用 $\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -键筛选器，我们能够排除 A 候选分子。

表 1. 使用 SialoCapper-ID 支持软件计算血清 N-聚糖的单糖组成候选物

m/z (obs.)	m/z (calc.)	Glycan Composition	
1605.7	1605.602	AB-Hex3HexNAc4dHex1	
1768.0	1767.655	AB-Hex4HexNAc4dHex1	
2116.1	2115.808	AB-Hex5HexNAc4NeuAc($\alpha 2,6$)-1	
2420.1	2419.935	AB-Hex5HexNAc4NeuAc($\alpha 2,6$)-1NeuAc($\alpha 2,3$)-1	
2448.1	2447.967	AB-Hex5HexNAc4NeuAc($\alpha 2,6$)-2	
2594.1	2593.914	AB-Hex10HexNAc4	
2594.1	2593.999	AB-Hex5HexNAc2NeuAc($\alpha 2,3$)-4	
2594.1	2594.025	AB-Hex5HexNAc4dHex1NeuAc($\alpha 2,6$)-2	
3117.1	3117.226	AB-Hex6HexNAc5NeuAc($\alpha 2,6$)-2NeuAc($\alpha 2,3$)-1	
3145.2	3145.147	AB-Hex10HexNAc3dHex1NeuAc($\alpha 2,3$)-2	A
3145.2	3145.257	AB-Hex6HexNAc5NeuAc($\alpha 2,6$)-3	B
3263.1	3263.284	AB-Hex6HexNAc5dHex1NeuAc($\alpha 2,6$)-2NeuAc($\alpha 2,3$)-1	

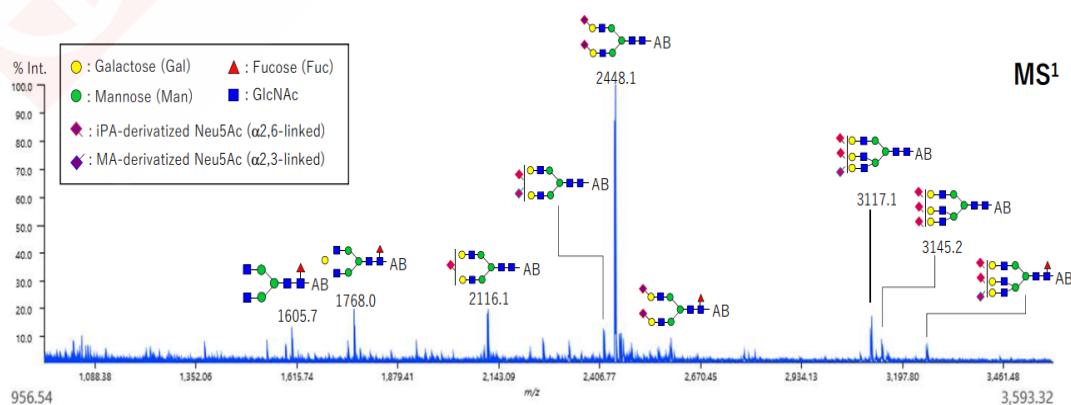


图 9.血清糖蛋白衍生 N-聚糖的 MALDImini-1 一级质谱图

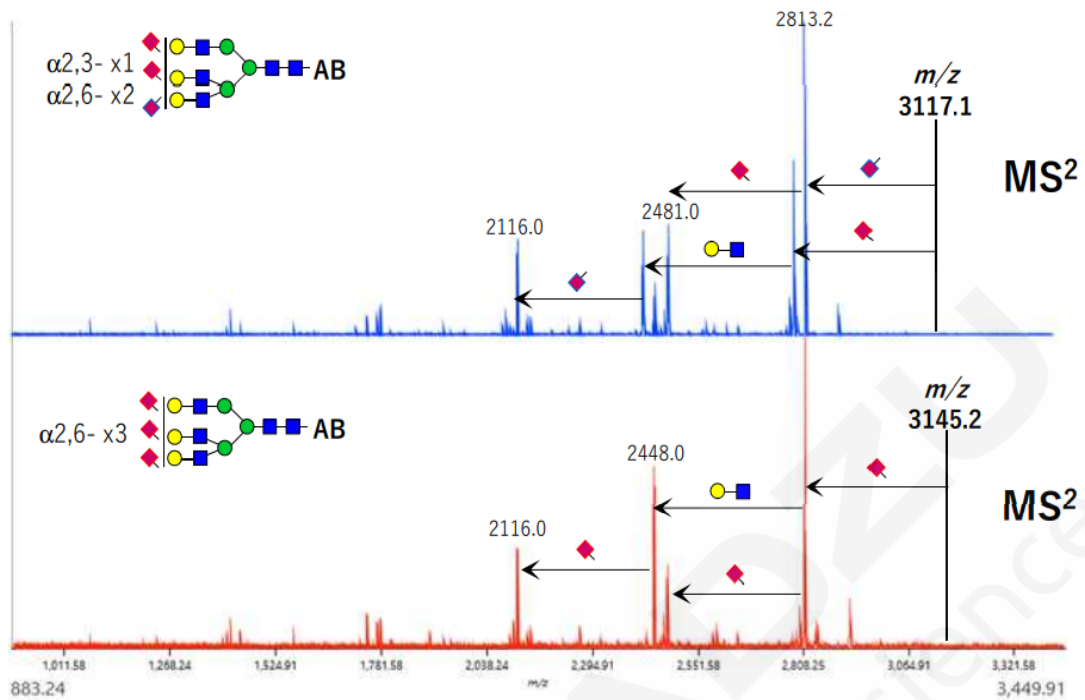


图 10. m/z 3117.1 和 m/z 3145.2 三天线聚糖的二级质谱图对比

■ 总结

SialoCapper-ID 试剂盒是一种唾液酸键特异性衍生试剂盒，用于聚糖的质谱分析，支持液相和固相反应流程。该试剂盒及相应软件能够通过质谱图区分不同的唾液酸键异构体，并通过稳定唾液酸残基帮助提高灵敏度和谱图质量。由于谱图易解析，除识别唾液酸键合异构体外，它在其他方向的应用也是有益的。我们希望该试剂盒能作为一种新的衍生工具用于聚糖质谱分析。

■ 致谢

我们要向北海道大学的 Jun-Ichi Furukawa 教授和 Hisatoshi Hanamatsu 博士表示感谢，他们参与了 SALSA 方法的改进。

SialoCapper 是岛津公司的商标。

BlotGlyco 是 Sumitomo Bakelite 公司的商标。

参考文献：

- 1) Nishikaze T, et al. (2017) Differentiation of Sialyl Linkage Isomers by OnePot Sialic Acid

- Derivatization for Mass Spectrometry-Based Glycan Profiling. Anal Chem 89: 2353-2360.
- 2) Hanamatsu H, et al. (2018) Silaic acid Linkage Specific Derivatization of Glycosphingolipid Glycans by Ring-Opening Aminolysis of Lactones. Anal Chem 90: 13193-13199.

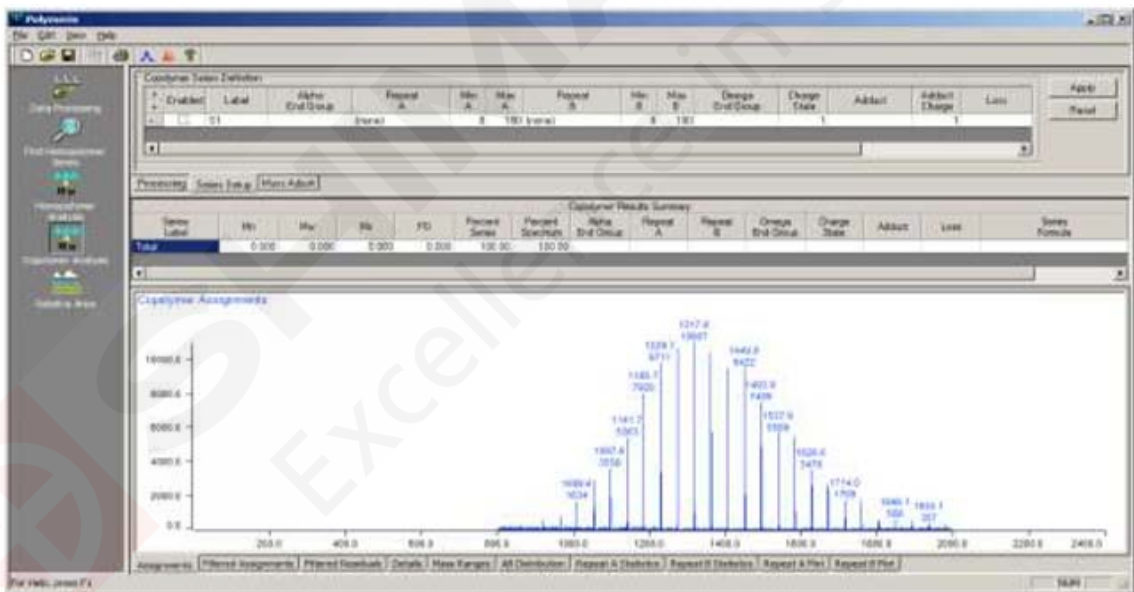


本文译自岛津全球应用开发中心（GADC）No. an_01-00160 应用报告。

第三节 聚合物分析

聚合物是由被称为单体的次级单元重复连接而成的分子，在材料学、医学、药学等各个领域发挥着重要的作用。聚合物分子量测定的常见方法有，端基分析法、气相渗透法、膜渗透法、光散射法、超速离心沉降平衡法、粘度法及凝胶渗透色谱法（GPC）。

MALDI MS 作为一种快捷的分析方法，与传统方法相比，无需复杂的前处理，能容忍少量盐或缓冲液。通过合成高分子的 MALDI MS 分析，可以获得精确分子量、平均分子量、多分散度、聚合度、单体质量、残基质量、构成分子量分布的同族聚合物峰的数量等各种分子量相关信息。岛津 AXIMA 系列仪器分析软件 Launchpad 配置了聚合物分析软件 Polymer Analysis，MALDI-8020、MALDI-7090 及 MALDImini-1 的分析软件可以和第三方聚合物分析软件 Polymerix（Sierra Analytics.）联用，均能快速分析获取聚合物相关信息。



MALDImini-1进行聚合物的分子量及分布研究

摘要：基质辅助激光解吸电离方法（MALDI）是进行聚合物分子量检测及结构分析的常用手段之一，具有分析速度快，质量范围宽，可以快速给出聚合物的分子量及分子量分布、聚合度、单体结构等信息的特点。本文使用岛津最新的紧凑型基质辅助激光解吸电离数字离子阱质谱仪（MALDI-DIT），分析聚乙二醇及聚苯乙烯样品，得到了分子量的分布及单体结构信息。

关键词：基质辅助激光解吸电离数字离子阱质谱 MALDImini-1 聚乙二醇 聚苯乙烯 分子量

聚合物是由被称为单体的次级单元重复连接而成的分子，在材料学、医学、药学等各个领域发挥着重要的作用。常见的聚合物分子量分析方法有：气相渗透法、膜渗透法、光散射法、超速离心法、凝胶渗透色谱法等。

基质辅助激光解吸电离（MALDI）作为一种快捷的分析方法，与传统方法相比，无需复杂的前处理，能容忍少量盐或缓冲液。使用MALDI分析聚合物，可以获得精确分子量、平均分子量、多分散度、聚合度、单体质量、残基质量等各种分子量相关信息。

MALDImini-1质谱仪整合了MALDI离子源和数字离子阱，利用岛津独有的“数字离子阱”（DIT）技术可有效缩减质谱仪尺寸，从而确保只占用很小的空间，同时能实现二级和三级质谱分析。本文应用MALDImini-1及聚合物分析软件Polymerix（Sierra Analytics）分析了常见聚合物聚乙二醇（PEG）及聚苯乙烯（PS）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

MALDImini-1紧凑型MALDI数字离子阱质谱仪

1.2 分析条件

调谐模式：	线性正离子模式	激光器：	349nm 固体激光器
扫描范围：	m/z 650-8500	激光能量：	28-35

1.3 样品前处理

不同样品配制成5 mg/mL的工作液，按照下表选择合适的基质、辅助盐溶液。将样品工作

液、基质液、辅助盐溶液各取5 μL，以1:1:1等体积混匀后，取1 μL混合液点到靶板上，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

表1 基质及辅助盐选择

样品类型	溶剂	基质	辅助盐
聚乙二醇	H ₂ O	CHCA (10 mg/mL)	NaTFA (5 mg/mL)
聚苯乙烯	THF	Dithranol (10 mg/mL)	NaTFA (5 mg/mL)

2. 结果与讨论

2.1 聚乙二醇分析结果

聚乙二醇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分子式H(C₂H₄O)_nOH相符。样品的分子量分布信息由聚合物软件Polymerix (Sierra Analytics) 分析计算。Polymerix软件分析结果见图2。

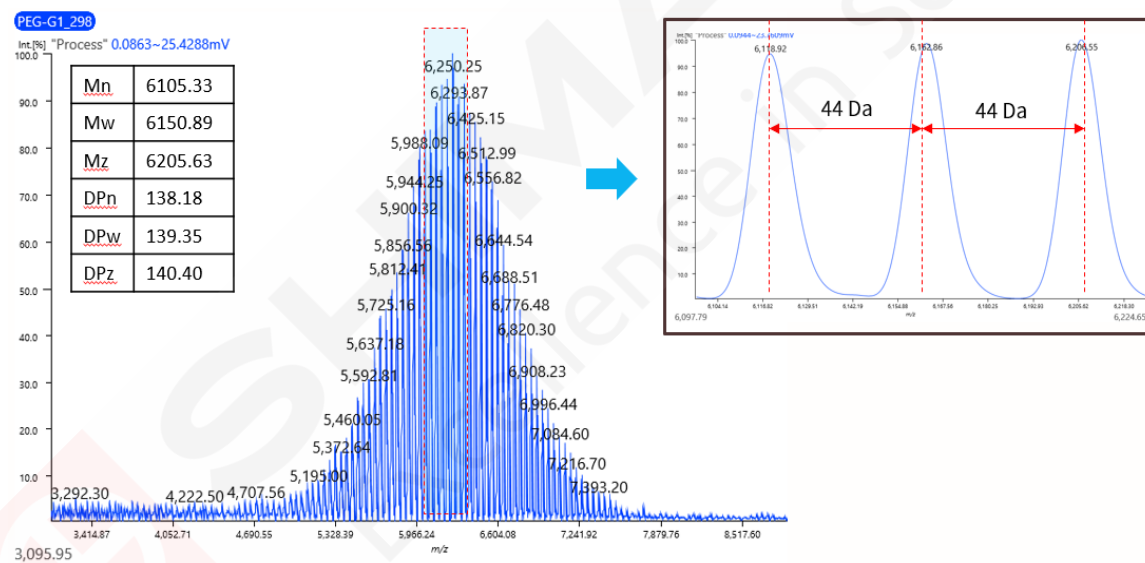


图 1. 聚乙二醇样品一级质谱图 (m/z 3000-8500; 右上: 局部放大)

Homopolymer Results Summary																
Series Label	Mn	Mw	Mz	PD	DPn	DPw	DPz	Percent Series	Percent Spectrum	Alpha End Group	Repeat	Omega End Group	Charge State	Adduct	Loss	Series Formula
Total/Average	6105.336	6156.891	6205.630	1.008	138.183	139.353	140.460	100.00	35.51	H	C ₂ H ₄ O	OH	1 Na			H [C ₂ H ₄ O] _n OH + Na
S1	6105.336	6156.891	6205.630	1.008	138.183	139.353	140.460	100.00	35.51	H	C ₂ H ₄ O	OH	1 Na			H [C ₂ H ₄ O] _n OH + Na

图 2. 聚乙二醇样品 Polymerix 软件分析结果

2.2 聚苯乙烯分析结果

聚苯乙烯的质谱检测结果如图3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104 Da，其中信号强度较高的离子峰系列的分子量分布与分子式H(C₈H₈)_nOH相符。样品的分子量分布信息由聚合物软件Polymerix (Sierra Analytics) 分析计算。Polymerix软件分析结

果见图4。

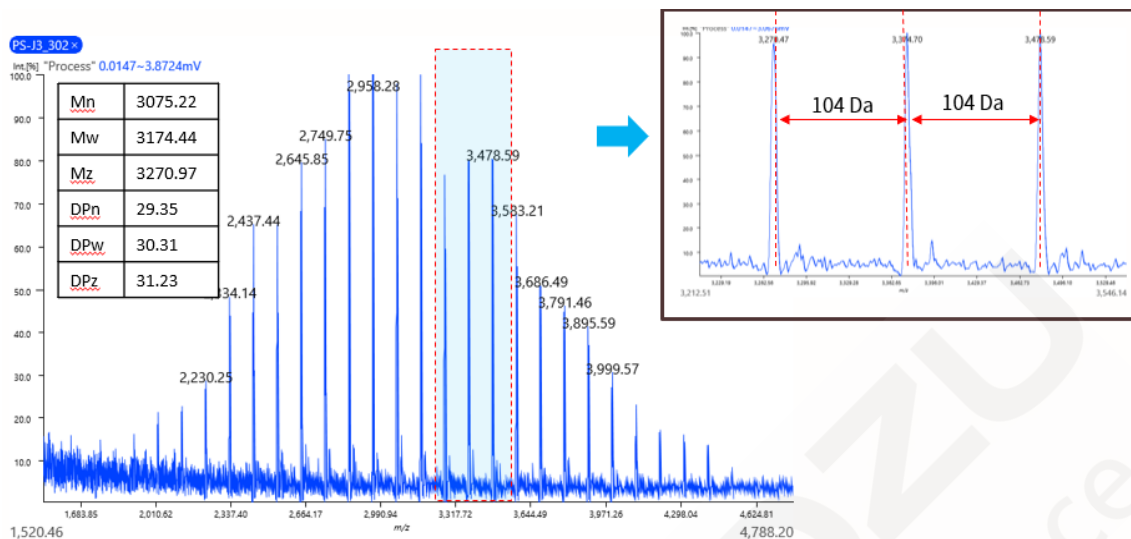


图 3. 聚苯乙烯样品一级质谱图 (m/z 1500-4800; 右上: 局部放大)

Homopolymer Results Summary																
Series Label	Mn	Mw	Mz	PD	DPn	DPw	DPz	Percent Series	Percent Spectrum	Alpha End Group	Repeat	Omega End Group	Charge State	Adduct	Loss	Series Formula
Total/Average	3075.222	3174.436	3270.974	1.032	29.354	30.307	31.234	100.00	9.80	H	C8H8	OH	1 Na			H [C8H8] _n OH + Na
S1	3075.222	3174.436	3270.974	1.032	29.354	30.307	31.234	100.00	9.80	H	C8H8	OH	1 Na			H [C8H8] _n OH + Na

图 4. 聚苯乙烯样品 Polymerix 软件分析结果

2.3 分析结果重复性测试

聚苯乙烯同一个样品重复采集质谱数据三次，均呈标准的聚合物正态分布形态，各主要质谱信号的强度和分布高度相似（图5），表明该聚苯乙烯样品在MALDImini-1仪器上测试结果稳定性及数据重复性良好。

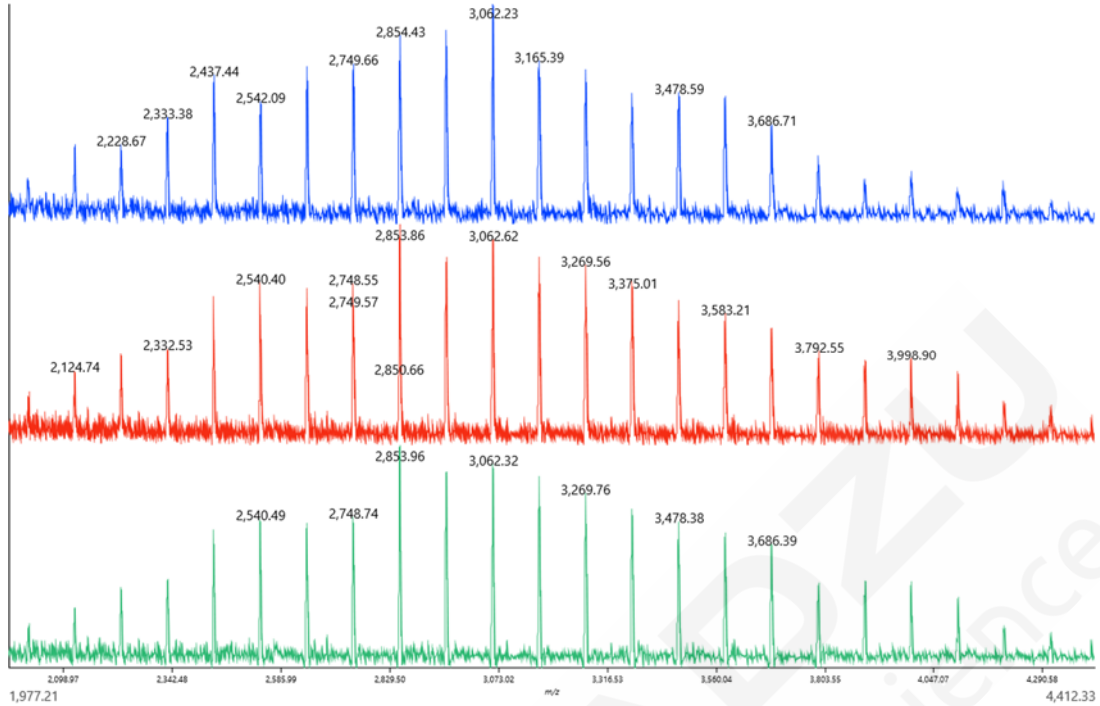


图 5. 聚苯乙烯样品三次重复测试质谱图 (m/z 1900-4400)

3. 结论

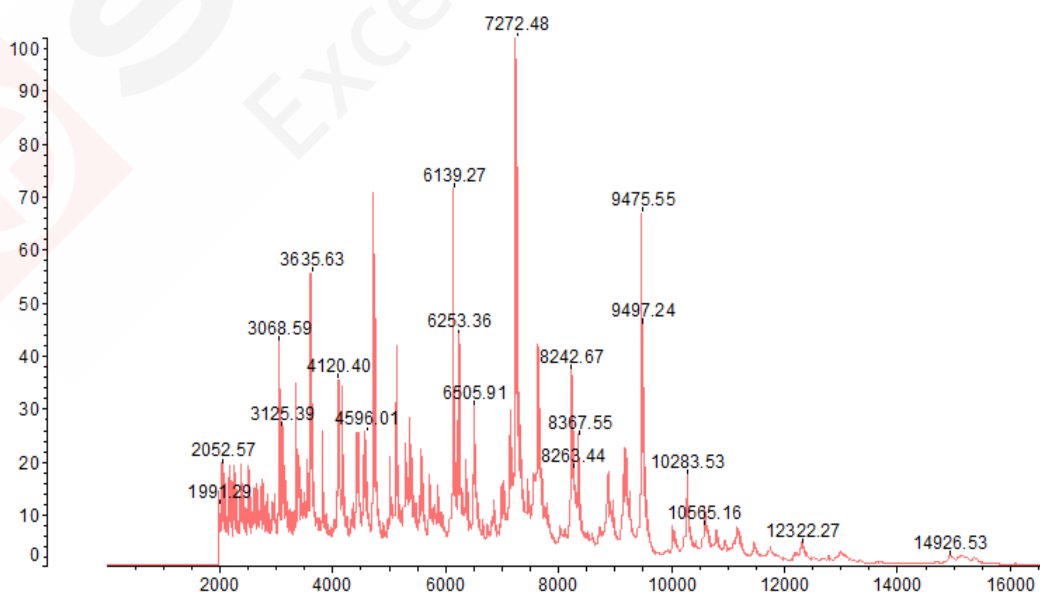
本文应用紧凑型MALDI数字离子阱质谱仪MALDImini-1及Polymerix软件分析聚乙二醇及聚苯乙烯，直接得到了样品的分子量及分布、单体质量等信息。MALDImini-1作为紧凑型基质辅助激光解吸电离数字离子阱质谱仪，使用简单，质量范围宽，重复性良好，选择合适的基质及辅助盐溶液，能高效快速进行聚合物分析。

第四节 微生物鉴定

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

20 世纪 90 年代末期，MALDI MS 开始应用于微生物中核糖体蛋白的研究。MALDI MS 微生物鉴定的基本原理是将样品与过量的小分子基质的混合液点在样品靶板上，待溶剂挥发后形成共结晶，用激光轰击晶体时，基质分子吸收能量同时电离生成质子转移到样品上，使样品带上电荷，带电离子在电场力的作用下带电飞行。通过质量分析器分离不同质荷比的离子，最后被检测器检测，从而获得样品的质量信息。质谱法鉴定微生物具有高通量、速度快、成本低、自动化等特点。

商业化的微生物数据库包含的微生物种类非常多，大部分进口厂商和国产厂商都在 2000 种以上，几乎包含了有代表性的微生物，使得结果具有可比性，假阳性率较低。有些基于 MALDI MS 的鉴定结果中，出现不能鉴定的情况，原因可能是数据库中不包含这些微生物，而不是方法学错误。岛津和生物梅里埃合作的 Saramis 数据库，以及国产厂商毅新博创的微生物数据库，都可以往已有数据库中添加新的物种和参考谱图，方便用户进行数据库的拓展和丰富。



微生物样品质谱图

MALDImini-1 进行微生物鉴定

摘要: 本文展示了应用 MALDImini-1 紧凑型基质辅助激光解吸电离数字离子阱质谱 (MALDI-DIT) 结合微生物质谱数据库成功鉴定标准菌株大肠埃希菌 ATCC 8739 和金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 的应用案例, 表明 MALDImini-1 可以满足常规微生物鉴定的要求。

关键词: 基质辅助激光解吸电离数字离子阱质谱 MALDImini-1 微生物鉴定

微生物鉴定技术是工业、农业、食品安全、临床检验和科学研究中常用的一门重要技术, 近年来基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS)因其分析速度快、结果准确、高通量, 迅速成为一种强有力的微生物鉴定工具。

相对于传统体型较大的 MALDI-TOF MS, 岛津又开发了整合 MALDI 离子源和数字离子阱 (DIT) (岛津原创技术) 的紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪——MALDImini-1, 体型精致小巧, 操作简便快捷, 灵敏度高, 准备时间短, 可实现 m/z 650-70000 内的多肽/蛋白、多糖、聚合物等常规样品分子量检测。本文展示了应用 MALDImini-1 紧凑型 MALDI-DIT 质谱仪结合微生物质谱数据库进行微生物鉴定的方法和结果, 通过数据库检索成功实现大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的准确鉴定, 表明 MALDImini-1 可以满足微生物鉴定的要求。

1. 实验部分

1.1 仪器

MALDImini-1 紧凑型 MALDI 数字离子阱质谱仪

1.2 试剂与样品

基质: α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)

样品: 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) ATCC 8739; 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)

ATCC 6538

1.3 仪器参数

调谐模式:	线性正离子模式	激光器:	349nm 固体激光器
扫描范围:	m/z 2000-18000	激光能量:	45-50

1.4 样品前处理

在 1.5 mL 离心管中加入 300 μ L 去离子水，用接种环挑取 10 mg 新鲜菌体在水中充分混匀；再加入 900 μ L 乙醇，混匀；12000 g 离心 2 min，弃上清，将沉淀室温放置 2 min；加入 80 μ L 70%甲酸溶液，吹打混匀；再加入 80 μ L 乙腈，混匀后 12000 g 离心 2 min，所得上清即为制备好的样品溶液。取 1 μ L 样品点至靶孔中心，晾干，再滴加 1 μ L CHCA 基质溶液，晾干后送入质谱分析。采集谱图后，将谱峰信息导出，用数据库进行检索分析。

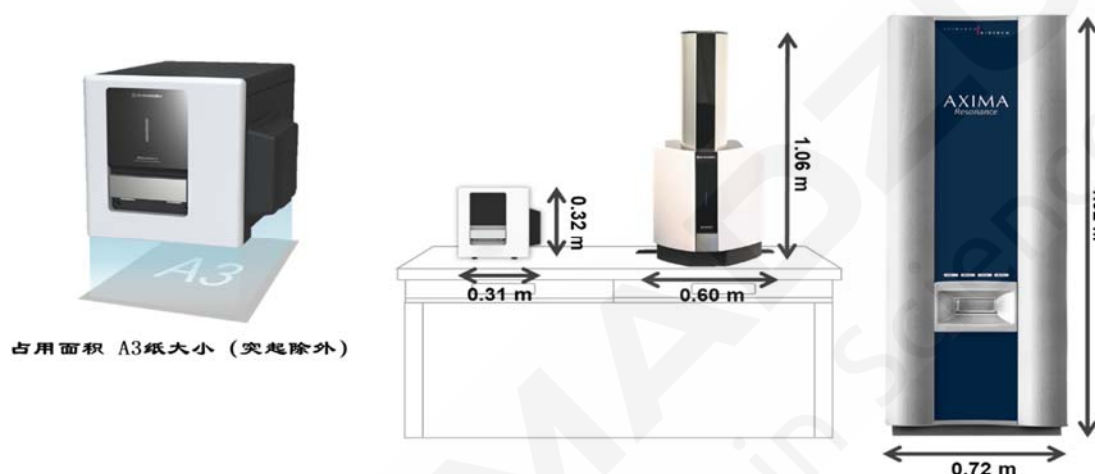


图 1. 精致小巧的岛津 MALDImini-1 质谱仪

2. 结果与讨论

将 2 个标准菌株样本进行传代培养后，经过样品前处理后转移至靶板，添加基质，再送入质谱进行检测分析。



图 2. MALDImini-1 上机分析流程图

质谱检测结果显示，1-2 号菌株样本均在 m/z 2000-18000 检测到一系列离子峰，谱峰信

息丰富。各菌株典型质谱图及菌落形态图结果如下图所示。

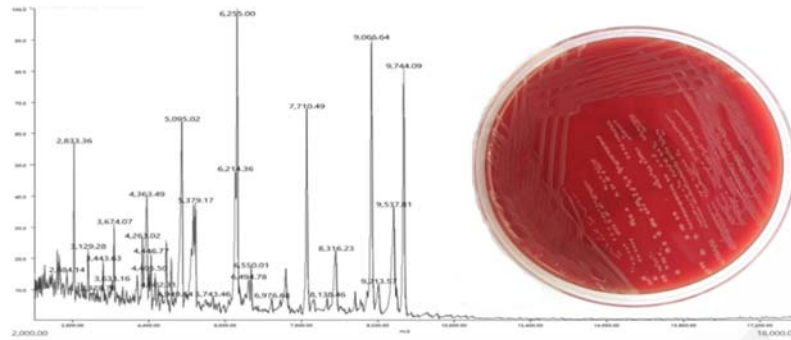


图3. 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) ATCC 8739一级质谱图 (m/z 2000-18000)

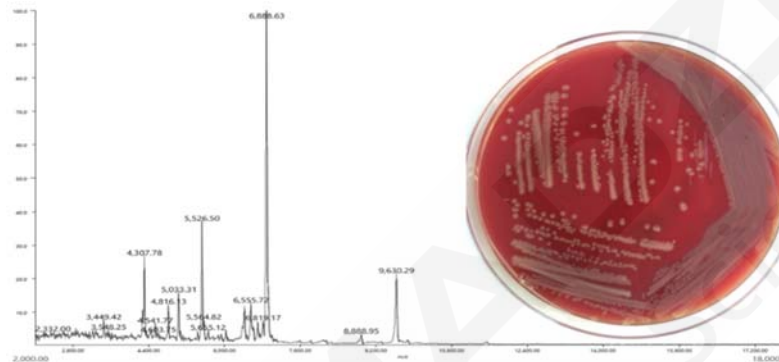


图4. 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538一级质谱图 (m/z 2000-18000)

采集谱图后，将质谱数据导出，用微生物质谱数据库进行检索分析。结果显示，2 个标准菌株样本均鉴定成功，且均能得到准确的鉴定结果。详细检索结果如图 5-6 所示。

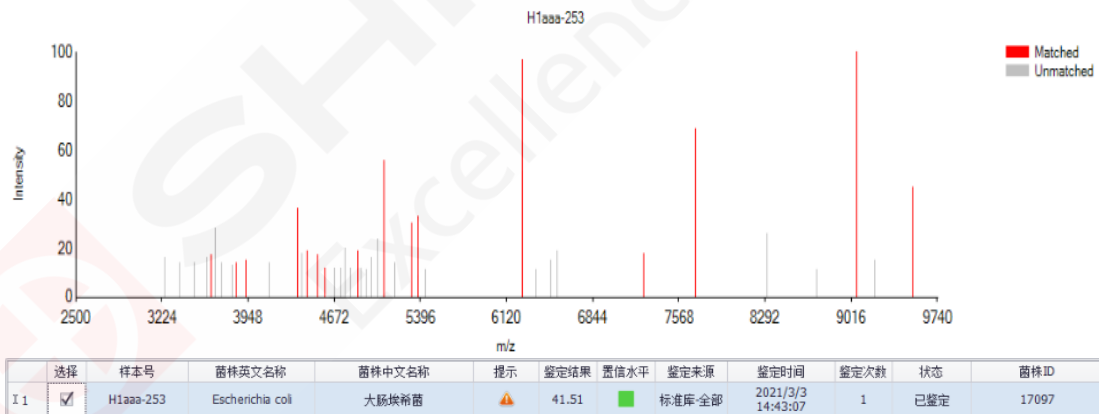
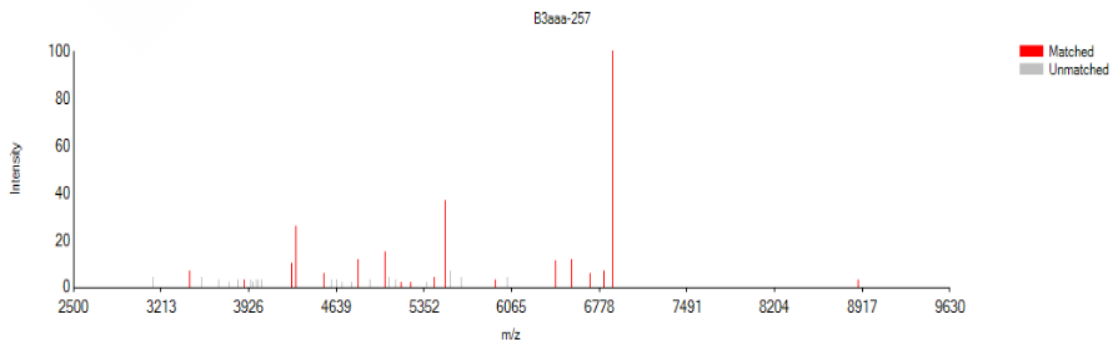


图 5. 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) ATCC 8739 数据库检索结果

(注：鉴定结果置信度阈值为25，大于25即为阳性结果，置信水平显示为绿色。)



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
I 1	<input checked="" type="checkbox"/>	B3aaa-257	Staphylococcus aureus	金黄色葡萄球菌		57.51	■ 标准库-全部	2021/3/3 14:46:29	1	已鉴定	23186

图 6. 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) ATCC 6538 数据库检索结果

3. 结论

本文应用紧凑型 MALDI 数字离子阱质谱仪 MALDImini-1 结合微生物质谱数据库对 2 种常见的微生物（大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌）进行检测。通过简单的样品前处理，成功鉴定 2 个标准菌株，结果与预期相符。分析过程具有分析成本低、速度快、结果准确可靠的特点。MALDImini-1 作为紧凑型基质辅助激光解吸电离数字离子阱质谱仪，体型精巧、功能全面，在微生物快速检测和分析领域的发展未来可期。



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

⊕ 岛津企业管理 (中国) 有限公司/岛津 (香港) 有限公司

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

北京

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

沈阳

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

西安

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

乌鲁木齐

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

郑州

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

上海

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

成都

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

南京

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

重庆

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

武汉

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

广州

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

昆明

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

深圳

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

长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室
邮政编码: 410005

香港

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

用户服务热线电话: 800-8100439
400-6500439

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

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知