

Abstract The chlorophyll-protein complexes of thylakoids and those of various PS II preparations were analyzed by a low ionic strength native "green gel" system after solubilization by a mixture of detergents, with very little release of free pigment. The subunit composition and absorption spectra of some chloro-

phyll-protein complexes were studied also. This new native green gel system is simple and rapid, with release of very little free pigment.

Key words mild electrophoresis, chlorophyll-protein complexes

基体辅助激光解吸电离质谱法及其应用*

杨伯宇 朱大模 张玉奎

(中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心, 大连 116011)

摘要 基体辅助激光解吸电离质谱是近几年才发展起来的一种新技术, 它在生命科学研究中具有广阔的应用前景. 对基体辅助激光解吸电离质谱技术的基本原理, 运用基体辅助激光解吸电离质谱法研究蛋白质分子量的测定, 蛋白质混合物的分离鉴定以及用基体辅助激光解吸电离质谱技术进行超快速的蛋白质序列分析和 DNA 序列分析的可行性和存在的问题作了介绍和讨论.

关键词 基体辅助激光解吸电离质谱, 分子量测定, 分离鉴定

基体辅助激光解吸电离质谱 (matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry) 技术是 80 年代末期才发展起来的一种新技术, 它由日本科学家 Tanaka 等^[1]和德国科学家 Karas 及 Hillenkamp^[2]几乎在同一时间提出. Tanaka 的方法是把钴粉, 甘油等物质和蛋白质分子混合在一起, 用激光解吸电离质谱法测到了 1×10^5 以上的蛋白质分子量, 但由于对这一方法的机理认识不清, 以及灵敏度的限制, 这一方法没有得到进一步的发展. 德国科学家 Karas 和 Hillenkamp 提出的方法是用烟酸 (nicotinic acid) 作为基体来测定蛋白质分子量的, 并对这一方法的机理进行了合理的分析, 灵敏度、信噪比等方面也明显优于日本人提出的方法. 因此, 这一学科近几年的发展基本上是以德国人的方法为基础的. 我国也在这方面开展了研究工作, 中山大学赵善楷教授等^[3]已研制成激光解吸电离飞行时间质谱仪, 中国科学院大连化学物理研究所进行了大量的

应用研究^[4]. 基体辅助激光解吸电离质谱法具有以下一些特点:

a. 使用脉冲激光作为电离手段, 由于激光和样品之间的作用时间短、区域小、温度低, 所以避免了生物大分子的热分解.

b. 使用了基体辅助电离技术, 即使用样品不共振吸收的激光波长, 首先用激光将基体分子电离, 同时将生物大分子气化, 在气相中基体分子将质子转移到生物大分子上, 使其带电荷, 从而进行质谱分析. 这一技术保证了生物大分子不被激光打碎, 只产生准分子离子.

c. 具有分离和鉴定的双重功能, 可用于混合物的分析.

d. 测量精度高, 使用内标法, 分子量测定精度可达 0.01%.

e. 操作简单, 需要样品量少, 分析时间短, 5—10min 即可完成一项分析.

* 辽宁省科学技术委员会博士科研启动基金资助项目.

收稿日期: 1994-06-15, 修回日期: 1994-09-02

本文将从基体辅助激光解吸电离质谱的基本原理; 基体辅助激光解吸电离质谱法测定生物大分子的分子量; 生物大分子混合物的分离鉴定; 基体辅助激光解吸电离质谱法用于超快速的蛋白质序列分析和 DNA 序列分析的可行性及存在的问题等 4 个方面进行讨论。

1 基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪的原理

图 1 是基体辅助激光解吸电离飞行质谱仪的原理图, 样品和基体的混合物被置于一个探

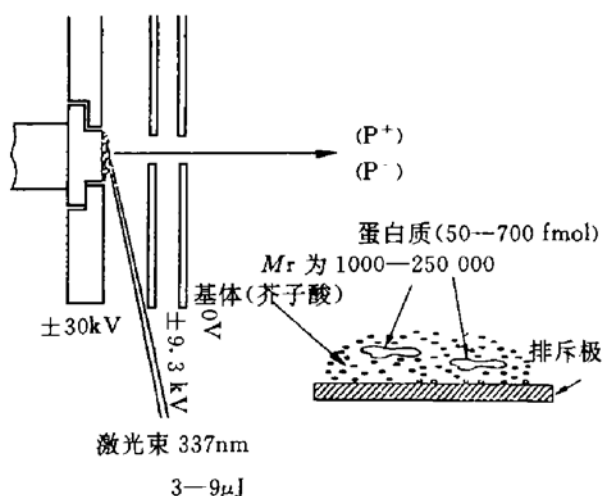


图 1 基体辅助激光解吸电离质谱的原理图

头上, 在激光的照射下, 样品分子和基体分子 (常为有机酸) 吸收激光的能量而被气化, 气化的基体分子同时被激光的能量激发而处于高能态, 高能态的基体分子极易释放出质子。由于样品分子上往往有一些亲质子基团, 所以能结合基体分子释放出的质子, 使样品分子带电荷, 带电荷的样品分子在强电场的作用下被加速, 获得动能 (KE), 然后沿飞行管无场区飞行, 离子的飞行服从如下方程:

$$KE = \frac{1}{2} MV^2 \dots\dots\dots (1)$$

式中, M 为离子的质量, V 为离子飞行的速度, 设飞行管长度为 ΔX , 飞行时间为 ΔT , 则飞行速度为:

$$V = \Delta X / \Delta T \dots\dots\dots (2)$$

将 (2) 式代入 (1) 式, 整理后得:

$$M = 2KE(\Delta T / \Delta X)^2 = K'(\Delta T)^2 \dots\dots (3)$$

即离子的质量与其在管中的飞行时间的平方成正比。通过已知分子量的蛋白质来校正常数 K' , 即可通过测量离子在管中的飞行时间来求得分子量。由于用脉冲激光作为电离手段, 容易实现精确计时, 所以最适于和飞行时间质谱仪相结合。

2 基体辅助激光解吸电离质谱法测定生物大分子的分子量

基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱法是迄今为止测定生物大分子分子量最精确的方法之一 (其它质谱方法虽分辨率较高, 但所测分子量范围有限)。据文献报道, 使用内标法测定生物大分子的分子量, 测量精度已达 0.01%^[5]。而传统的电泳方法的精度只有 5%—10%。我们用基体辅助激光解吸电离质谱法测定了人血清白蛋白、IgG、溶菌酶、激肽释放酶、白细胞生长素、干扰素等一系列蛋白质的分子量, 图 2 是我们测定人血清白蛋白分子量的谱图。使用外标法, 测量精度达到了 0.1%。

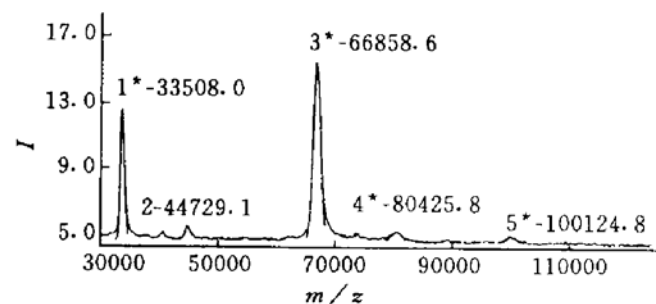


图 2 人血清白蛋白的基体辅助激光解吸电离质谱图

3 基体辅助激光解吸电离质谱法研究生物样品的分离和鉴定

由于基体辅助激光解吸电离质谱法使用激光作为电离手段, 并使用生物大分子不共振吸收的激光波长, 保证了生物大分子在电离过程中不发生裂解, 只出准分子离子峰, 所以只要生物大分子的分子量不同就可以把它们同时鉴定出来。图 3 是用基体辅助激光解吸电离质谱

法测定蛇毒蛋白的谱图,从中可以清楚地看到分子量为 27 726 和 30 769 的两个蛋白质组分.其中质量数为 13 728 和 15 728 的两个峰为这两个组分的双电荷峰,质量数为 58 457 和 61 550 的两个峰是这两个组分的二聚体峰.由此可见基体辅助激光解吸电离质谱法可以用于蛋白质混合物的各个组分的同时测定.基体辅助激光解吸电离质谱法也是分析小肽混合物的有力工具,图 4 是用基体辅助激光解吸电离质谱法分析由 Gly-Leu, Gly-Gly-Gly, Gly-Asp 三个肽组成的混合物的质谱图,虽然这三个肽之间只差一个分子量单位,但它们却得到了很好的分离,这也是基体辅助激光解吸电离质谱法应用于蛋白质序列分析的基础.

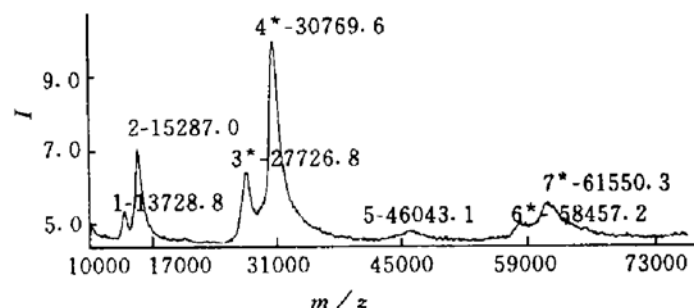


图 3 某蛇毒成分的基体辅助激光解吸电离质谱图

解法,这种方法是将蛋白质从 N 末端逐步降解,用 HPLC 法分析其每个氨基酸残基.这是一个非常慢而费时的方法,而且要求样品有较高的纯度.理论上讲,将蛋白质用酶或化学方法降解为小肽,用基体辅助激光解吸电离质谱法鉴定出这些小肽,即可根据这些小肽推导出蛋白质的氨基酸序列.而且基体辅助激光解吸电离质谱法具有产生最丰富的单电荷分子离子,不使小肽进一步分解,不受缓冲液等小分子干扰的特点,并具有足够的分辨率,具备进行蛋白质序列分析的条件.目前已经开发出天然蛋白质降解的肽片段的大规模数据库,因此,只要测得精确的分子量,即可用计算机软件快速检索出其一级结构.美国科学家 Weinberger 等^[6]已用基体辅助激光解吸电离质谱法成功地测定了鸡心房排钠利尿肽(chicken atrial natriuretic peptide, ANP)的氨基酸序列,耗时还不到 1h,瑞士学者 Schaer 等人^[7]也成功地研究了合成人甲状旁腺激素(synthetic human parathyroid hormone, pTH(1-34))的一级结构.

DNA 的序列分析是基于测定 DNA 的一系列互补链(寡核苷酸片段)来实现的,用一定的方法鉴定出每个寡核苷酸片段,然后根据这些片段组装成完整的 DNA 分子,这也是一个非常复杂费时的过程.用基体辅助激光解吸电离质谱法不经分离而直接鉴定出其所有的寡核苷酸片段,将会使这一过程大大加快.目前阻碍基体辅助激光解吸电离质谱技术应用于这一领域的关键是要攻克较大寡核苷酸的精确分子量测定.可喜的是最近这方面取得了突破,已能精确测定数千分子量的寡核苷酸^[8].从目前国际上已开展的研究来看,解决这些问题的前景是光明的,可望在不久的将来新一代超快速蛋白质和 DNA 序列分析仪会问世.

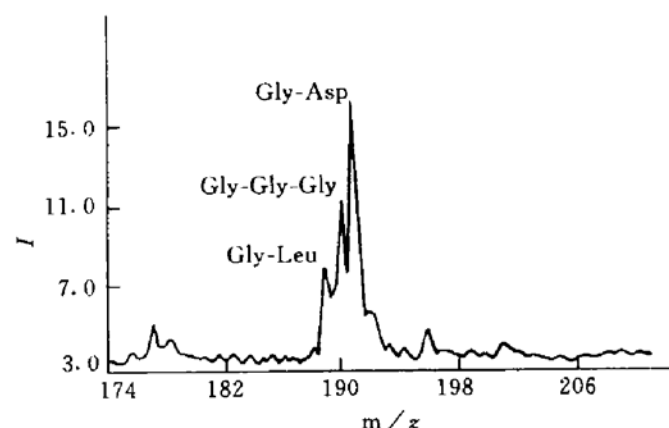


图 4 小肽混合物的基体辅助激光解吸电离质谱图

4 超快速蛋白质序列分析和 DNA 序列分析展望

常用的蛋白质序列分析方法为 Edman 降

参 考 文 献

- 1 Tanaka K, Waki H, Ido Y *et al.* Rapid Commun Mass Spectrom, 1988; 2: 151
- 2 Karas M, Hillenbrand F. Anal Chem, 1988; 60: 2299
- 3 孙德中. 见: 孙德中编. 第五次北京分析测试学术报告会

- 及展览会论文集. 北京: 北京大学出版社, 1993: B5
- 4 杨伯宇, 朱大模, 洪群发等. 科学通报, 1994; 39 (14): 1299
 - 5 Beavis R C, Chait B T. Anal Chem, 1990; 62: 1836
 - 6 Weinberger S R. Oral presentation at the Pittsburgh conference and exposition on analytical chemistry and applied spectroscopy. Atlanta; 1993; March 3—8
 - 7 Schaer M, Boernsen K O, Gassmann E. Rapid Commun Mass Spectrom, 1991; 5: 319
 - 8 Weinberger S R. 见: 孙德中编. 第五次北京分析测试学术报告会及展览会论文集. 北京: 北京大学出版社, 1993: B33

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry and Its Applications in Biochemistry Research. Yang Boyu, Zhu Damo, Zhang Yukui (*Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, National Chromatographic Research and Analysis Centre, Dalian 116011, China*).

Abstract Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI/MS) is a new technique developed in recent years. It can be broadly applied to many aspects of modern life science. Basic principles of this technique are described, some important research results in our group are also described, for example, accurate protein molecular weight determination and the separation and identification of protein mixtures. The feasibility and problems of MALDI/MS applied to fast protein sequencing and DNA sequencing are also discussed.

Key words matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, molecular weight determination, separation and identification

PCR 产物中无错误碱基拷贝最低比率的计算

方悦群 王秉瑞

(卫生部兰州生物制品研究所, 兰州 730046)

摘要 分析了 PCR 过程中带有错误碱基拷贝的量变过程, 得出不同循环 (n) 后不同类型拷贝数的计算通式并以逐次代入方式归纳出 PCR 产物中无错误碱基拷贝最低比率 (R) 和有效循环数 (N), 拷贝酶促合成链长 (H) 及错配率 (f) 的关系式 $R_n = (1 - Hf/2)^{N-1} (1 - Hf)$, 对 PCR 技术制备表达用 DNA 片段有指导意义。

关键词 多聚酶链反应, 碱基错配, 基因表达

耐热 DNA 聚合酶有较高的碱基错配率 (如 2×10^{-4})^[1-3]. 理论上讲, 每次 PCR 循环中不仅前一循环后已带有错误碱基的拷贝 (以下称错误拷贝) 数量会加倍, 而且还会产生新的错误拷贝. 随着循环数的增加, DNA 双链中不含任何错误碱基的拷贝 (以下称无错误拷贝) 比例在产物中越来越小, 这使 PCR 产物不适用于基因表达. 本文试图找到 PCR 产物中无错误

拷贝比率与扩增循环数, 拷贝链长和错配率之间的数学关系.

1 PCR 扩增的拷贝的分类

将所有 PCR 扩增拷贝 (双链) 分为 a. 无错误拷贝; b. 单错误拷贝, 指模板链无错误碱基而复制时互补链按错配率发生了碱基错配的拷