

电喷雾萃取电离技术在蛋白质分析中的应用及展望*

李明^{1)**} 姜杰²⁾ 李红梅¹⁾ 徐锐锋¹⁾

(¹⁾ 中国计量科学研究院, 北京 100013; (²⁾ 哈尔滨工业大学(威海), 威海 264209)

摘要 电喷雾萃取电离技术(extractive electrospray ionization, EESI)是一种能灵敏地电离固体、液体、气体、黏性样品等复杂基体中痕量大分子和小分子的新兴软电离技术。在简要介绍 EESI 原理的基础上, 着重综述其在蛋白质分析中的应用。与商品化质谱仪器配置的电喷雾电离源(electrospray ionization, ESI)不同, EESI 能够在常压条件下最大程度地保留蛋白质在样品中的原始构象, 并获得大量具有生物活性的蛋白质离子。由此可见, EESI 及类似的技术在蛋白质芯片制备、高分辨率氢/氘交换质谱(蛋白质结构分析)、蛋白质计量等方面具有良好的应用前景。本文也对其发展趋势进行了展望。

关键词 电喷雾萃取电离, 质谱, 蛋白质, 原始构象

学科分类号 Q51

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00337

质谱技术已被广泛应用于物理、化学、材料学、生物学、医学等领域^[1-4], 同时在某些制备领域^[5-7]也显示出了强劲的竞争力。离子化源一直被视为质谱仪器的心脏。2004 年, Purdue 大学的 Cooks 教授等^[8]首次提出常压离子化(ambient pressure ionization)的概念, 并报道了关于电喷雾解析电离(desorption electrospray ionization, DESI)的文章, 样品在离子化前无需进行诸如萃取、溶解、脱盐等预处理。随后, 国际上掀起了基于常压离子化技术的快速质谱分析的研究热潮^[9]。我国学者也在此方向上作出突出贡献^[10-13]。其中, Chen 等^[14]在进行 DESI-MS 研究的基础上, 提出了电喷雾萃取电离(extractive electrospray ionization, EESI)技术, 并将其应用于气体^[15-18]、液体^[14, 19-20]、气溶胶^[21-23]和黏性样品^[24-26]的分析。近期, EESI 被用于蛋白质的分析^[27-28], 与商品化质谱仪器配置的电喷雾电离源(electrospray ionization, ESI)相比, EESI 能够在常压条件下最大程度地保持蛋白质的原始构象, 并能够获得大量具有生物活性的蛋白质离子。本文拟对电喷雾萃取电离技术(extractive electrospray ionization, EESI)的基本原理进行简要介绍, 着重综述其在蛋白质分析中的应用, 最后对 EESI 在蛋白质芯片制备、高分辨率氢/氘交换质谱(蛋白质结构分析)、蛋白质计量等方面的应用进行展望。

1 EESI 的基本原理

EESI 的装置由用于产生初级离子的电喷雾通道和用于样品引入的样品通道组成^[9, 29], 如图 1 所示。

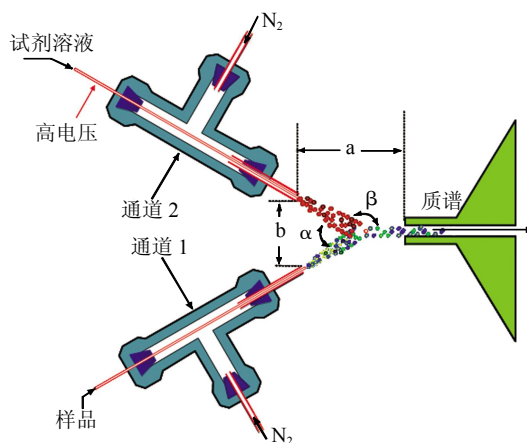


Fig. 1 Schematic of EESI

图 1 电喷雾萃取电离的示意图

* 国家自然科学基金资助项目(21005024), 计量院基金资助项目(21-ATGQDB0909).

** 通讯联系人。

Tel: 010-64526353, E-mail: mingutah@hotmail.com

收稿日期: 2011-07-20, 接受日期: 2011-09-29

在常压条件下, 电喷雾通道产生的初级离子与样品通道出来的中性样品进行碰撞, 发生萃取和电荷转移, 随即产生的待测物离子在电场和真空的共同作用下被引入质谱, 进行质量分析和检测. 根据所测样品不同, 通过调节两个喷雾通道间距离(b)、喷雾通道与质谱入口处的距离(a)、喷雾通道间夹角(α)、喷雾通道与质谱入口形成的夹角(β)等实验参数来获得最佳灵敏度. 实验结果表明, 当样品通道与质谱入口的夹角接近 90° 时, 离子源产生的信号具有长期稳定性^[14]. 由于在时间和空间上将雾化过程和离子化过程分开, 使 EESI 对复杂基体样品进行分析时, 无需任何样品预处理. 与 ESI 相比, EESI 对复杂基体样品分析时, 具有长期稳定性, 并可灵活地通过离子/离子反应显著提高分析的选择性和灵敏度^[14]. 另外, 与 DESI 不同, EESI 的离子化过程在三维空间内完成, 能够更有效地对样品中的复杂基体进行分散, 这使 EESI 具有更高的长期稳定性和灵敏度^[9]. 2002 年诺贝尔化学奖得主、ESI 技术发明人 John B. Fenn 教授对 EESI 给予高度评价, “I have no doubt that this will become a widely used technique for which the community of analytical chemists will be grateful”^[30]. 为拓宽其应用领域, 将电晕放电代替 ESI 产生初级试剂离子, EESI 可用于非极性和弱极性化合物的直接分析.

2 EESI 在蛋白质结构分析中的应用

蛋白质结构复杂并具有特殊生物活性, 对蛋白质研究的一个重要方面就是解析其折叠过程, 通过研究从展开态到折叠态发生的一系列复杂微观过程, 深入了解这一折叠机理, 对研究蛋白质活性和维持蛋白质稳定性都具有非常重要的意义. 质谱是蛋白质分析的重要工具之一, 然而目前商品化质谱仪器配置的 ESI 电离源在几千伏的高电场下进行离子化, 蛋白质的结构和活性容易被破坏, 因此质谱检测到的蛋白质离子往往不能准确反映溶液中蛋白质的真实状态. 为解决这一问题, 将 EESI 用于蛋白质分析避免了蛋白质样品与高电场的直接接触, 并且避免了 ESI 中所必需的一些有机溶剂的使用^[27]. 实验结果表明, EESI 可以将电荷温和地放置在蛋白质分子的液滴上, 从而使蛋白质分子在带电的过程中能够最大程度地维持其原始构象, 并保持其生物活性. 实验发现, 在 EESI 过程中蛋白质分子获得了比 ESI 更低的电荷分布. 例如, 溶菌酶在 pH=5.3 条件下的 EESI 质谱图只出现了 +7 价到 +9

价的离子, 电荷分布较窄, 如图 2a 所示. 折叠结构的溶菌酶外表面有 8 个碱性集团, EESI 对 +8 价溶菌酶离子的形成有较强的偏好(+7、+8、+9 的信号强度比为 16:100:2), 说明溶菌酶在 EESI 离子化过程中可能保持着原始构象, 而 ESI 质谱则呈现出从 +7 价到 +13 价的较宽电荷分布(图 2b), 这是由于部分折叠构象在 ESI 电离过程中被破坏.

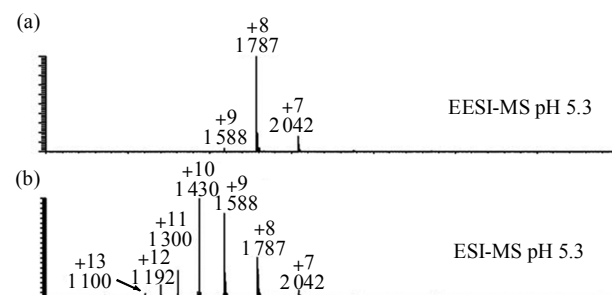


Fig. 2 Mass spectra of lysozyme

图 2 蛋清溶菌酶的质谱图

(a) EESI-MS. (b) ESI-MS.

理论上, 折叠的蛋白质离子能够较好地维持其生物活性. 为此, 作者考察了过氧化氢酶(catalase, CAT)在 EESI 和 ESI 两种离子化过程中酶活性的变化, 酶活性的实验结果如图 3. 令人吃惊的是, 采用 EESI 获得的过氧化氢酶离子在软着陆(soft landing)后能够保持高达 94% 的活性, 而 ESI 获得蛋白质离子的活性约为 1%.

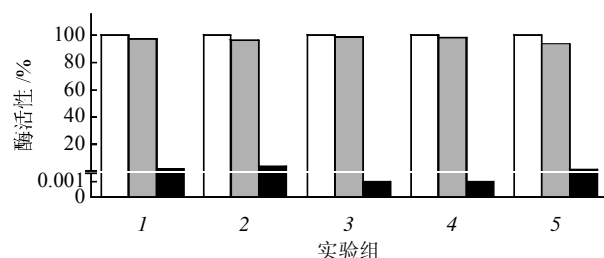


Fig. 3 Enzyme activities of CAT protein ions

图 3 过氧化氢酶离子的酶活性

□: CAT; ■: EESI; ■: ESI.

电荷分布状态和酶活性的实验结果表明, EESI 过程中, 将样品雾化过程和离子化过程分离,

避免了蛋白质分子与高电压的直接接触, 并且避免了 ESI 过程中所需的有机溶剂, 从而使蛋白质能够保持其原始构象, 并具有较高的生物活性.

3 展 望

3.1 蛋白质芯片的制备

生物芯片可用于生物活性的自动分析, DNA 芯片已被广泛应用, 科学家正努力开展蛋白质芯片制备的研究工作. 其中, Cooks 等^[9]试图将离子软着陆(soft landing)技术用于蛋白质芯片的制备, 由电喷雾产生的多电荷蛋白质离子在质量分析器中被分离后, 温和地在接收表面的不同位置着陆. 实验表明, 一些蛋白质(如溶菌酶和胰蛋白酶)在软着陆后仍然保持其生物活性. 然而, ESI 离子化过程中对蛋白质分子原始构象的破坏是制约离子软着陆技术在蛋白质芯片制备方面进一步发展的瓶颈. EESI 技术避免了蛋白质与高电压的直接接触, 从而可以更大程度地维持蛋白质的生物活性. 该技术与离子软着陆技术相结合, 将是蛋白质芯片制备的一种有效方法. 除有机溶剂和电离电压外, 碰撞效应、温度等因素也会影响蛋白质构象. 溶菌酶和过氧化氢酶本身是很稳定的酶, 对外界环境的耐受性较强, 对于其他稳定性较弱的蛋白质, 在保证去溶效率的前提下, 应尽量降低毛细管温度, 并仔细调节离子光学系统的电压以减小离子在传输过程中产生的碰撞.

3.2 EESI 在高分辨率氢/氘交换质谱中的应用展望

氢/氘交换质谱技术逐渐成为分析蛋白质结构和监测其动态变化的主要技术之一. 基于酶切产生的肽谱, 氢/氘交换反应对蛋白质结构分析的分辨率为单个肽段^[31]. 而氢/氘交换反应后采用气相碎裂策略(如电子捕获裂解、电子转运裂解等)^[32], 理论分辨率可达单个氨基酸^[33-34]. 然而, ESI 产生的离子带有较高的能量, 蛋白质分子的氘代情况在离子化过程和离子传输过程中容易发生重排, 这必将影响蛋白质结构分析的结果. EESI 是一种比 ESI 更温和、更软的电离技术, 可以获得能量较低的蛋白质离子, 因此可能解决氢/氘交换质谱-气相碎裂策略中的瓶颈问题.

3.3 EESI 在蛋白质计量中的应用展望

蛋白质计量研究是各国计量机构研究的重要热点和难点之一. 目前, 对蛋白质计量的工作主要集中在成分量测量方面, 其测量结果可溯源到国际单位制(SI)的质量单位^[35]. 另一方面, 与有机小分子不

同, 蛋白质是具有一定活性的生物物质, 国际上往往用生物活性单位 U 来对蛋白质的量进行表征. 蛋白质溯源的关键问题, 不是像小分子那样简单地利用同位素稀释质谱法测量成分量来溯源到 SI 质量单位, 蛋白质计量的主要挑战并不是简单地开发可溯源到 SI 单位的标准物质和参考方法, PTB(德国)、NPL(英国)、IRMM(比利时)、LGC(英国)等单位的蛋白质计量工作者正试图将活性单位与 SI 质量单位统一起来. 解决这一问题的关键一步是将蛋白质的结构、功能、成分量(可溯源至 SI 单位)关联起来. 离子淌度谱(ion mobility spectrometry, IMS)^[36]可对相同质荷比、不同尺寸(即不同截面)的蛋白质离子进行分离, 也就是能够对同一种蛋白质的不同四级结构状态进行定量测量, 而蛋白质的四级结构与其功能密切相关, 因此 IMS 被视为解决蛋白质计量关键问题的有效方法之一^[37]. 但是, 商品化的离子淌度谱配置 ESI 电离源, 蛋白质的结构、折叠状态、活性等容易被 ESI 的高电压和 ESI 所需的有机溶剂破坏, 而 EESI 在离子化过程避免了样品中的蛋白质与高电压的直接接触, 并且避免了使用 ESI 所需的有机试剂, 因此能够在离子化过程中很大程度地保持蛋白质的原始构象. 毫无疑问, EESI 与 IMS 的联用将会成为蛋白质计量研究的一项强有力的工具.

4 结 语

电喷雾萃取电离最初被应用于液体、气体、气溶胶、黏性样品的直接分析, 最近的实验表明, 蛋白质在 EESI 过程中能够很大程度地保持其原始构象和生物活性. 可以预见, 该项新技术将会在蛋白质芯片制备、高分辨率蛋白质结构分析、蛋白质计量学等诸多领域发挥重要作用.

参 考 文 献

- [1] 杨松成. 有机质谱在生物医药中的应用. 北京: 化学工业出版社, 2009
Yang S C. The Application On the Biology and Medicine by Using Organic Mass Spectrometry. Beijing: Chemical Industry Press, 2009
- [2] 赵墨田. 无机质谱概论. 北京: 化学工业出版社, 2006
Zhao M T. The Introduction of Inorganic Mass Spectrometry. Beijing: Chemical Industry Press, 2006
- [3] Nie Z X, Tzeng Y K, Chang H C, *et al.* Microscopy-based mass measurement of a single whole virus in a cylindrical ion trap. *Angew Chem Int Ed*, 2006, **45**(48): 8131-8134
- [4] Li M, Liu S R, Armentrout P B. Collision-induced dissociation

- studies of Fe_mO_n^+ : Bond energies in small iron oxide cluster cations, Fe_mO_n^+ , ($m=1-3$, $n=1-6$). *J Chem Phys*, 2009, **131**(14): 144310
- [5] Ouyang Z, Takats Z, Cooks R G, *et al.* Preparing protein microarrays by soft-landing of mass-selected ions. *Science*, 2003, **301**(5638): 1351-1354
- [6] Badu-Tawiah A K, Wu C P, Cooks R G. Ambient ion soft landing. *Anal Chem*, 2011, **83**(7): 2648-2654
- [7] Nie Z X, Li G T, Cooks R G, *et al.* *In situ* SIMS analysis and reactions of surfaces prepared by soft landing of mass-selected cations and anions using an ion trap mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, **20**(6): 949-956
- [8] Takats Z, Wiseman J M, Cooks R G, *et al.* Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, 2004, **306**(5695): 471-473
- [9] 陈焕文, 胡 斌, 张 燮. 复杂样品质谱分析技术的原理与应用. *分析化学*, 2010, **38**(8): 1069-1088
Chen H W, Hu B, Zhang X. *Chin J Anal Chem*, 2010, **38**(8): 1069-1088
- [10] Na N, Xia Y, Cooks R G, *et al.* Birch reduction of benzene in a low-temperature plasma. *Angew Chem Int Ed*, 2009, **48**(11): 2017-2019
- [11] Na N, Zhao M, Zhang X R, *et al.* Development of a dielectric barrier discharge ion source for ambient mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2007, **18**(10): 1859-1862
- [12] Qiu B, Luo H. Desorption electrospray ionization mass spectrometry of DNA nucleobases: implications for a liquid film model. *J Mass Spectrom*, 2009, **44**(5): 772-779
- [13] Zhou Z G, Zhang J, Liu H W, *et al.* Rapid screening for synthetic antidiabetic drug adulteration in herbal dietary supplements using direct analysis in real time mass spectrometry. *Analyst*, 2011, **136**(12): 2613-2618
- [14] Chen H W, Venter A, Cooks R G. Extractive electrospray ionization for direct analysis of undiluted urine, milk and other complex mixtures without sample preparation. *Chem Commun*, 2006, (19): 2042-2044
- [15] Chen H W, Hu B, Hu Y, *et al.* Neutral desorption using a sealed enclosure to sample explosives on human skin for rapid detection by EESI-MS. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, **20**(4): 719-722
- [16] Chen H W, Yang S P, Zenobi R, *et al.* Neutral desorption sampling of living objects for rapid analysis by extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed*, 2007, **119**(40): 735-738
- [17] Chen H W, Zenobi R. Neutral desorption sampling of biological surfaces for rapid chemical characterization by extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2008, **3**(9): 1467-1476
- [18] Chen H W, Sun Y P, Zenobi R, *et al.* Differentiation of maturity and quality of fruit using noninvasive extractive electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*, 2007, **79**(4): 1447-1455
- [19] Luo M B, Hu B, Chen H W, *et al.* Extractive electrospray ionization mass spectrometry for sensitive detection of uranyl species in natural water samples. *Anal Chem*, 2009, **82**(1): 282-289
- [20] Zhou Z Q, Jin M, Chen H W, *et al.* Rapid detection of atrazine and its metabolite in raw urine by extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Metabolomics*, 2007, **3**(2): 101-104
- [21] Chen H W, Wortmann A, Zenobi R, *et al.* Rapid *in vivo* fingerprinting of nonvolatile compounds in breath by extractive electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed*, 2007, **46**(4): 580-583
- [22] Gu H W, Hu B, Chen H W, *et al.* Rapid analysis of aerosol drugs using nano extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analyst*, 2010, **135**(6): 1259-1267
- [23] Li M, Hu B, Chen H W, *et al.* Extractive electrospray ionization mass spectrometry towards *in situ* analysis without sample pretreatment. *Anal Chem*, 2009, **81**(18): 7724-7731
- [24] Ding J H, Gu H W, Chen H W, *et al.* Selective detection of diethylene glycol in toothpaste products using neutral desorption reactive extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 2009, **81**(20): 8632-8638
- [25] Law W S, Chen H W, Zenobi R, *et al.* Rapid characterization of complex viscous liquids at the molecular level. *Angew Chem Int Ed*, 2009, **48**(44): 8427-8430
- [26] Li X, Hu B, Chen H W, *et al.* Rapid characterization of complex viscous samples at molecular levels by neutral desorption extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2011, **6**(8): 1010-1025
- [27] Chen H W, Yang S P, Li M, *et al.* Sensitive detection of native proteins using extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed*, 2010, **49**(17): 3053-3056
- [28] Hu B, Yang S P, Chen H W, *et al.* Direct detection of native proteins in biological matrices using extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*, 2011, **136**(18): 3599-3601
- [29] Law W S, Chen H W, Zenobi R, *et al.* On the mechanism of extractive electrospray ionization. *Anal Chem*, 2010, **82**(11): 4494-4500
- [30] Zraggen M R. Analysis of complex samples made easier. *Chem Technol*, 2006, June: T21
- [31] Kaltashov I A, Bobst C E, Abzalimov R R. H/D exchange and mass spectrometry in the studies of protein conformation and dynamics: Is there a need for a top-down approach?. *Anal Chem*, 2009, **81**(19): 7892-7899
- [32] 孙瑞祥, 董梦秋, 迟 浩, 等. 基于电子捕获裂解 / 电子转运裂解串联质谱技术的蛋白质组学研究. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(1): 94-102
Sun R X, Dong M Q, Chi H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(1): 94-102
- [33] Pan J, Han J, Borchers C H, *et al.* Electron capture dissociation of electrosprayed protein ions for spatially resolved hydrogen exchange measurements. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(35): 11574-11575
- [34] Pan J, Han J, Borchers C H, *et al.* Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry with top-down electron capture dissociation for characterizing structural transitions of a 17 kDa protein. *J Am*

- Chem Soc, 2009, **131**(35): 12801–12808
- [35] Burkitt W I, Pritchard C, O'Connor G, *et al.* Toward système international d'Unité-traceable protein quantification: From amino acids to proteins. *Anal Biochem*, 2008, **376**(2): 242–251
- [36] 姜 杰, 宋庆浩, 金钦汉, 等. 离子淌度谱技术. 中国仪器仪表, 2008, (2): 63–67
- Jiang J, Song Q H, Jin Q H, *et al.* *China Instrumentation*, 2008, (2): 63–67
- [37] http://www.irmm.jrc.be/events/Documents/future-rm/presentations/Parkes_presentation.pdf

The Application and Perspective of Extractive Electrospray Ionization on The Protein Analysis*

LI Ming¹⁾**, JIANG Jie²⁾, LI Hong-Mei¹⁾, XU Rui-Feng¹⁾

(¹⁾ National Institute of Metrology, Beijing 100013, China; (²⁾ Harbin Institute of Technology at Weihai, Weihai 264209, China)

Abstract The extractive electrospray ionization (EESI) technique is an emerging soft ionization technique and it can be used for the sensitive detection of large molecules and small molecules in solid, liquid, gas and viscous samples without sample pretreatment. Based on the brief introduction of the mechanism of EESI, its applications on the protein analysis were reviewed in detail. Compared to the commercial electrospray ionization (ESI) source, EESI maintains the native structure of protein and thus the biological activity of the protein to the most extent, which shows it can be potentially applied in the fields of preparation of protein microarray, high resolution hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (structure analysis of protein), and metrology for protein.

Key words extractive electrospray ionization, mass spectrometry, protein, native structure

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00337

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21005024) and National Institute of Metrology (21-ATGQDB0909).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64526353, E-mail: mingutah@hotmail.com

Received: July 20, 2011 Accepted: September 29, 2011