

生物大分子质谱电离技术的突破及 核磁共振三维结构测定方法的建立 ——2002 年诺贝尔化学奖简介

黄仁槐^{**}

(中国科学院生物物理研究所, 分子生物学研究中心, 北京 100101)

摘要 2002 年诺贝尔化学奖授予了质谱和核磁共振领域的三位科学家以表彰他们对生物大分子鉴定及结构分析方法做出的贡献。其中两位科学家 J. B. Fenn 和 K. Tanaka 分别发展了生物大分子质谱分析的软解吸电离方法; 另一科学家 K. Wüthrich 则将核磁共振技术成功地应用于生物大分子如蛋白质的溶液三维结构测定。他们的研究成果已使质谱和核磁共振技术成为生物大分子强有力的研究手段, 极大地促进了生物大分子的研究进程, 必将对整个生命科学研究产生深远的影响。

关键词 生物质谱, 核磁共振, 电喷雾电离, 软激光解吸电离, 诺贝尔奖

学科分类号 N19

经瑞典皇家科学院反复评议, 2002 年诺贝尔化学奖授予了在生物大分子质谱和核磁共振研究做出杰出贡献的 3 位科学家^[1]。他们分别是美国科学家 Fenn、日本科学家 Tanaka 和瑞士科学家 Wüthrich。Fenn 和 Tanaka 分别发展了两种生物大分子质谱分析的软解吸电离方法; Wüthrich 则将核磁共振技术成功地应用于生物大分子如蛋白质的溶液三维结构测定。他们的研究成果, 使质谱技术和核磁共振技术成功地应用于生物大分子研究, 质谱可以快速鉴定蛋白质等生物大分子的身份, 而核磁共振则可以获得接近于生理状态下生物大分子溶液三维结构及其动力学行为, 今天它们已经成为蛋白质等生物大分子强有力的研究手段, 而且也为新型药物筛选提供了新的有效途径。

1 生物大分子质谱电离技术

质谱技术的基本原理是样品分子电离汽化后, 根据不同离子质荷比的差异来分离并确定其分子质量^[2]。早在 1912 年 Thompson 就阐述了基于分子大小及电荷多少来分离分子的潜力。但经过 70 多年的努力, 生物大分子的质谱分析仍然令人难以捉摸。其主要难点在于生物大分子极性大, 热不稳定, 难以用常规方法电离汽化。快原子轰击 (fast atom bombardment, FAB) 测定小肽分子质量有很多成功的例子, 但随着分子质量增大, 灵敏度下降, 其分子质量限制在 10 ku 以下。直到 20 世纪

80 年代末, 质谱才开始在生物大分子研究中得到广泛应用, 这主要归功于电喷雾电离 (electrospray ionization, ESI) 及软激光解吸电离 (soft laser desorption, SLD) 两种电离技术的发展。

1.1 电喷雾电离

1968 年 Dole 首次描述了电喷雾电离原理, 主要包括电荷残余模型 (charge residue model, CRM)。按这种模型, 带电液滴因挥发而使液滴表面的电荷密度增大, 静电斥力增大到一极限值, 液滴即发生爆炸 (Rayleigh 爆炸), 形成更小的带电液滴, 这些小液滴进一步挥发, 会进一步爆炸, 直到液滴变得极小, 使液滴表面电荷密度极大, 导致液滴中解析出质子化和去质子化的大分子离子并释放到周围气体中。

Dole 早期的实验中使用了惰性气体来帮助去溶剂化过程, 但真正的突破是 Fenn 完成的^[1]。Fenn 改善了 Dole 的方法, 采用逆流的气体实现去溶剂化, 这样消除了已经离子化的大分子重新溶剂化过程, 使电喷雾与质谱第一次完美结合在一起 (图 1a 所示)。此外 ESI 形成的离子呈复杂的多电荷状态, 电荷数从 +2 到 +40 甚至更高, 这极大地增加了质谱结果分析的难度, 当时许多科学家对此

* 通讯联系人。

Tel: 010-64888548, E-mail: huangrh@moon.ibp.ac.cn

收稿日期: 2002-11-20, 接受日期: 2002-11-26

感到十分迷惑, 而 Fenn 认识到这种复杂的多电荷离子信息正好可用来改善分子质量测定精确度, Fenn 提出多电荷理论揭示了这一秘密. 他认为, 每一种电荷状态离子质荷比的测量可用来独立计算目的分子分子质量的一个解, 取所有解的平均作为目的分子分子质量的值, 其质量测量精度就得到了极大的提高. 同时, 分子电离汽化后以多电荷态存在也极大地提高了分子量测量的范围. 应用这种方法, Fenn 于 1988 年第一次成功地测定了分子质量达 40 ku 的蛋白质分子, 精确度达 0.01%.

1.2 软激光解吸

上个世纪 80 年代, 科学家就开始探索用激光作为能源来解决分子的电离汽化问题. 他们把一束光聚焦到固体或液体样品希望以此激发少量样品电离汽化而同时避免分子内部的化学断裂. 原苏联科学

家 Letokhov 首先用这种方法对极性小分子如氨基酸获得成功. 随后由 Karas 和 Hillenkamp 进一步发展了这一方法, 他们的研究证实使用一种吸收基质能辅助小分子的电离, 但对大分子的尝试没有成功.

1987 年日本科学家 Tanaka 获得突破, 利用激光通过一种物化基质的辅助实现了大分子的电离汽化^[1]. 其独到之处在于选用了合适的激光能量与波长, 以配合特定的物化基质与基质中分析物分子结构间的吸收和热迁移性质 (图 1b 所示). Tanaka 发现低能 (氮原子) 激光比较理想, 氮原子激光束波长为 330 nm, 不会被蛋白质的芳香环吸收, 有效地避免了汽化过程中分子的片段化. Tanaka 应用这种方法成功地测定了糜蛋白酶原 (25 717 ku), 羧肽酶-A (34 472 ku) 及细胞色素 c (12 384 ku) 的准确分子质量.

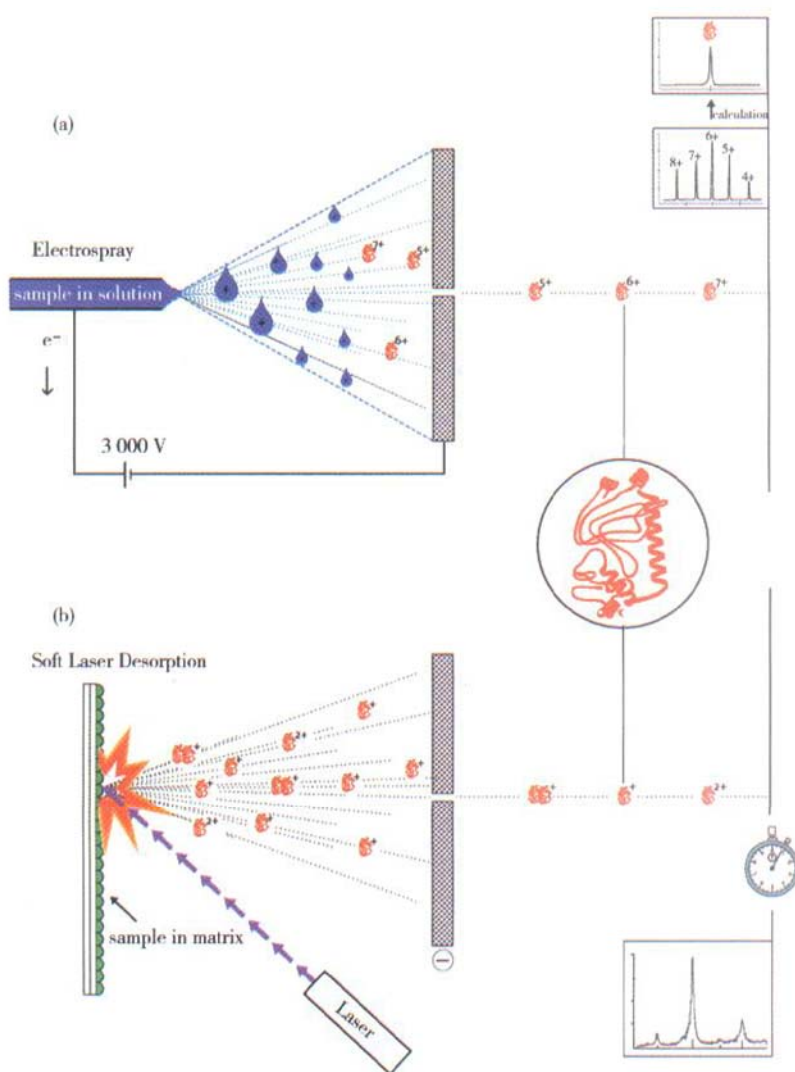


图 1 电喷雾电离(a)及软激光解吸电离(b)质谱分析原理 (引自 <http://www.nobel.se>)

Tanaka 的物化基质(一种含胶状颗粒的甘油)已不再使用,但由于他在技术上的突破,SLD 技术得到快速发展,其中基质辅助激光解吸电离(matrix-assisted, laser-desorption ionization, MALDI)技术最为成功,也是目前使用的主要方法.该方法把待测大分子样品掺入一种低分子质量晶形基质中,基质的最大吸收波长与激光脉冲波长匹配.其主要优点是分子电离汽化后仍保持完整且所带电荷低,一般只带 1~2 个电荷,所以谱图简单,可以分析不纯样品及混合样品. MALDI 与飞行时间(time of flight, TOF)检测器结合已经成为生物大分子分子质量测定的重要工具^[2].

这两种电离技术的发展促使质谱在生物大分子研究中得到广泛应用,而且由于质谱测量精度高、样品耗量极少,它已成为生物大分子尤其是蛋白质研究的重要手段.它不仅可测定生物大分子的准确分子质量,研究生物大分子相互作用,而且可以与串联质谱(MS/MS)联用测定生物大分子化学结构,提供翻译后修饰的信息等.

2 核磁共振测定生物大分子结构

核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)现象首先由 Bloch 和 Purcell 于 1946 年观测到(1952 年诺贝尔物理学奖),随后 Ernst 将 Fourier 变换方法应用于 NMR,代替以往的连续波方法,使 NMR 方法的灵敏度极大地提高,并在此基础上发展了二维核磁技术. Ernst 因此而获 1991 年诺贝尔化学奖.由于核磁灵敏度及分辨率的提高,科学家已开始试图用 NMR 研究生物大分子性质.从那时起,高分辨 NMR 就成为一种研究生物大分子的溶液结构、动力学及分子相互作用的最重要的研究工具.

NMR 测定蛋白质结构的方法包括四大基本要素^[3]: a. 结构测定的主要 NMR 参数 NOE(nuclear overhauser effect)距离测定; b. 核磁谱峰序列专一性归属; c. NMR 结构计算及结构评价; d. 数据收集的多维 NMR 技术. Wüthrich 在这些领域都不愧为先驱.核磁共振测定蛋白质结构基本原理如图 2 所示.

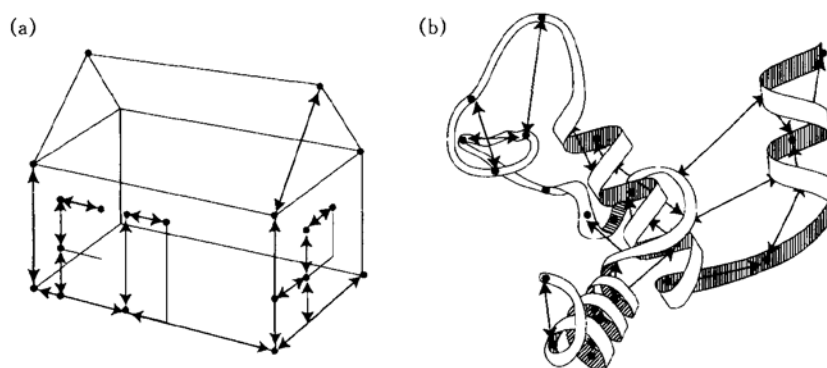


图 2 核磁共振测定蛋白质等生物大分子的三维结构

(a) 正如以各边和面之间的距离即可画出一间房子的三维图形, (b) 从 NOESY 谱中可测定分子中相距 0.5 nm 以内的原子间 NOE 距离,以此作为约束即可计算出该分子的三维结构(引自 <http://www.nobel.se>)

在 1976~1980 年期间, Wüthrich 领导的研究组就发展了测量 NOE 的技术、蛋白质序列共振归属策略及核磁结构计算算法.在此期间,他们还与 Ernst 一起对二维核磁在生物大分子中的应用做出贡献,并记录了第一张二维 NOE 谱. 1981 年 Wüthrich 研究组开始把二维 ^1H NMR 谱应用于蛋白质结构测定.随后完成了几种小肽结构的共振峰归属,并于 1984 年首次完成第一个蛋白质(牛精浆蛋白酶抑制剂, BUSI II A) NMR 原子分辨率结构测定. Wüthrich 报道的这一结果引起了大家

的争议^[3],因为 BUSI 结构与猪胰分泌型胰蛋白酶抑制剂(PSTI)晶体结构极其相似,怀疑 Wüthrich 解析的 BSUI 结构是模拟 PSTI 晶体结构的结果.于是 1984 年晶体学家 Huber(1988 年诺贝尔化学奖获得者)提议他们两家实验室分别用 X 晶体衍射及 NMR 技术同时测定同一蛋白质 α -淀粉酶抑制剂(tendamistat)的晶体结构及核磁结构.解析过程中互不通气.分别解析出结构后,做仔细的分析比较发现二者总体上极其相似,其不同之处主要在于分子表面.此后, NMR 结构测定方法才

逐步得到认同。

由于 NMR 能研究接近生理状态的溶液结构及其动力学行为, 目前 NMR 结构测定已成为不可或缺的生物大分子结构测定技术。至 2002 年 11 月 5 日, 生物大分子结构数据库 PDB 库中已有 2 969 套由 NMR 测定的溶液三维结构坐标, 约占总数的 15%。与 X 射线单晶晶体衍射相比, NMR 一般只集中于研究相对较小的蛋白质分子, 分子质量一般小于 30 ku。然而最近的进展极大地拓宽了 NMR 的研究范围, TROSY (transverse relaxation-optimized spectroscopy) 技术把 NMR 研究范围扩大到 100 ku, 而 CRINEPT (cross-correlated relaxation-enhanced polarization transfer) 则进一步把 NMR 研究范围扩大到 900 ku^[4]。

在今天的“蛋白质组学”时代, 人们已不再满足于对单一生物分子的研究, 人们希望得到更为全局的认识, 希望获得细胞中蛋白质表达全貌(即蛋白质组)以及细胞中生物学功能相关的全体蛋白质

三维结构(即结构基因组)的理解。而质谱和核磁共振技术在生物大分子研究的成功应用, 无疑为这些全局性研究提供了有力的工具。事实上, 质谱技术已成为蛋白质组学研究技术的核心和基石, 而核磁共振技术作为两种主要的结构解析技术之一, 也必将在结构基因组学研究中发挥重要作用。而且核磁共振可以获得接近于生理状态下生物大分子溶液三维结构信息及其动力学行为, 必将使我们对生物学功能相关的生物分子的动态过程有更深刻的认识。

参 考 文 献

- 1 Mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) applied to biological macromolecules. <http://www.nobel.se/chemistry/laureates/2002/ddv.html>. 2002-10-09
- 2 Fitzgerald M C, Siuzdak G. Biochemical mass spectrometry: worth the weight. *Chemistry & Biology*, 1996, **3**: 707~715
- 3 Wuthrich K. The way to NMR structures of proteins. *Nature Structural Biology*, 2001, **8**: 923~925
- 4 Fiaux J, Bertelsen E B, Horwich A L, *et al.* NMR analysis of a 900K GroEL-GroES complex. *Nature*, 2002, **418**: 207~211

Mass Spectrometry (MS) and Nuclear Magnetic Resonance(NMR) Revolutionized The Study of Biological Macromolecules

HUANG Ren-Huai*

(Center for Molecular Biology, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The progress of science is in part attributed to the development of new methodologies. The application of mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) in the study of biological macromolecules is such a representative example, which is the subject of this year's Nobel prize award in chemistry shared by three scientists. The works include the development of soft desorption ionization methods for mass spectrometric analysis of biological macromolecules and the development of NMR for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules in solution. These developments revolutionized the analytical methods for biomolecules such as proteins and facilitate the study of biological macromolecules so much enough to have deep effects on the whole life sciences.

Key words nobel prize, nuclear magnetic resonance, electrospray, soft laser desorption

* Corresponding author. Tel: 86-10-64888548, E-mail: huangrh@moon.ibp.ac.cn

Received: November 20, 2002 Accepted: November 26, 2002