

REFLEX III 基质辅助激光解析电离时间飞行 (MALDI-TOF) 质谱仪的特点及应用

王洪奇 黄舜彦

(布鲁克仪器有限公司 北京 100081)

摘要 REFLEX III 基质辅助激光解析电离时间飞行 (MALDI-TOF) 质谱仪 (图 1) 是布鲁克公司推出的世界上最灵敏的 MALDI-TOF 质谱仪。该仪器配有自动制样机, 无网离子的延迟引出技术, 无网双聚焦反射器, 除可测各种分子的分子量外, 还可通过源后分解谱 (Post Source decomposition, PSD) 得到结构信息, 是当前研究蛋白质组必不可少的质谱仪。本文对该仪器的主要优点, 结构特点, 仪器主要配置及应用等作了简要介绍。

关键词 基质辅助激光解析电离技术 飞行时间质谱仪 蛋白质组 蛋白质 多肽 聚糖 核甘酸

基质辅助激光解析电离技术 (MALDI) 与电喷雾是研究生物聚合物 (如蛋白质、多肽、聚糖和低核甘酸) 的两种有力工具。自从 Hillenkamp 研究组于 1987~1988 年开发了 MALDI 这种电离方法后, 布鲁克就进行了商品化 MALDI-TOF 质谱仪的开发工作。第一代 REFLEX™ 质谱仪系统于 1991 年秋季在阿姆斯特丹国际质谱会议上展出。自此, 布鲁克一直致力于发展这一方法使之成为常规分析手段, 并以不断的更新创造而成为这个领域的领导者。

REFLEX™ 系列仪器是最成功的研究级 MALDI-TOF 质谱仪, 在世界上已有了强大的用户网。

模块化的设计使它在将来易于升级新的附件甚至可以装在第一台 REFLEX (1991/92) 上。布鲁克的专利技术总能保证仪器最先进, 图 1 是 REFLEX III 基质辅助激光解析电离时间飞行 (MALDI-TOF) 质谱仪 (图 1 见封面)。MALDI-TOF 的重要部件包括离子源、激光器、反射器、检测器及软件。

1 结构特点

1.1 离子源

布鲁克公司采用了获专利的脉冲离子引出 (Pulsed Ion Extraction) 技术, 使 MALDI-TOF 的主要性能获得突破。主要是分辨率, 同时质量

准确度和灵敏度也由于离子的延迟引出技术的应用而得到改善。通过控制延迟时间和离子源的场强梯度获得了离子的时间聚焦, 而电离过程和引出过程也被有效的分开。布鲁克公司改进了这一技术, 制造出无网离子源。这种设计能得到最大的离子传输率, 另外通过光学设备的放大可以毫无障碍地观察样品。

SCOUT384™: 这种样品靶是采用工业标准化微滴定盘的形式, 控制 X-Y 方向精确到 4μm 分辨率, 经过外校准可以达到很高的精度, 有 384 个样品位置, 也可只用 48/96 个位置。采用此靶体可以用自动沉积的方法容下几千个样品。

1.2 反射器

布鲁克自加入 TOF 系统研究以来就在使用一种获专利的无轴二阶无网的反射器, 这对离子的传输、聚焦效率较高。相对于较简单的单阶无网反射器而言, 特别是有轴的设计形式, 布鲁克的设计在灵敏度方面优势明显。

1.2.1 两级无网反射器, 极好的分辨率、质量准确度和传输效率, +25/-20kV 操作电压标准。

1.2.2 >3m 有效飞行路径

1.2.3 完全无网设计, 不仅提高传输率而且在检测非常敏感的生物分子时不易产生碎片。

1.3 激光器

- 1.3.1 337nm 氮气激光器
- 1.3.2 226 和 355nm Nd-YAG 激光器 (选件)
- 1.3.3 红外激光器 (选件)
- 1.3.4 紫外和红外之间切换简便 (同时安装)

1.4 检测器

- 1.4.1 高速双微通道板 (MCP)
- 1.4.2 计算机控制线性模式与反射模式之间的切换
- 1.4.3 检测器启动控制
- 1.4.4 独特的HIMAS™检测器有标准和“Turbo”加强灵敏模式最适合检测大的聚合物。

1.5 TOF 软件

- 1.5.1 采集软件可达到 4GHz 数字化频率 (250ps)
- 1.5.2 可显示几个实时采集窗口
- 1.5.3 XTOF™数据处理软件, 基于 UNIX 系统, 印刷质量的图形输出
- 1.5.4 全部参数可由鼠标或键盘控制
- 1.5.5 支持以太网, 可与外部网络连接, 例如向 PC 传送数据。

1.6 自动化

布鲁克公司与欧洲分子生物学实验室的 Matthias Mann 博士合作, 成功地为 MALDI-TOF 谱的自动采集设计了一种基于模糊逻辑的反馈控制系统。算法的改进及其它方面的发展, 最终发行了 AutoXecute™自动化软件。这就使自动采样和 MALDI-TOF 谱的处理, 例如多肽谱或酶解过程的监测成为可能。

除了 AutoXecute™软件, 布鲁克还开发了 MALDI-AutoPrep™ (MAP) 机器人设备 (图 2), 用于自动准备样品。该自动系统能够自动批量地处理样品从溶液瓶到样品靶的全过程。

整个过程以前是手工操作, 而现在则由机器人自动处理。不同样品, 不同的基质, 不同准备过程都可以依据标准模式对操作进行编程。

2 应用

2.1 蛋白质及多肽

脉冲离子引出 (Pulsed Ion Extraction) 技术提高了分辨率和质量准确度。如图所示为 bovine insulin (图 3) 和 angiotension II (图 4) 在反射模式下的谱图, 分辨率可达标 15,000 (FWHM)。

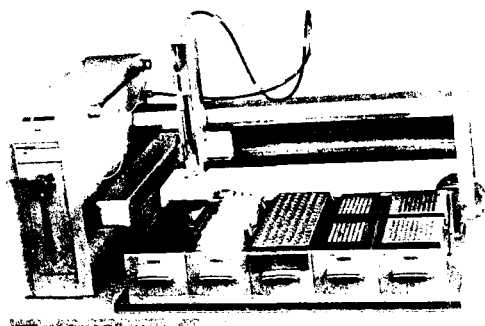


图 2 MALDI-AutoPrep™ (MAP) 自动化样品制备仪

在线性模式下 A 蛋白 (44KDa) 的谱图 (图 5) 充分证明改善了高质量分子的分辨率。

Reflectron Mode

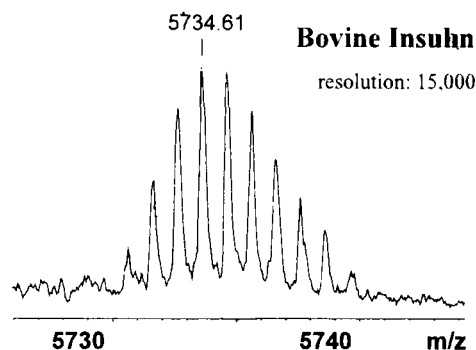


图 3 牛胰岛素 (bovine insulin) 在反射模式下的谱图。分辨率可达到 15,000 (FWHM)。说明了脉冲离子引出 (Pulsed Ion Extraction) 技术提高了多肽分辨率和质量准确度。

2.2 分析聚合物

分析高分子聚合物已成为 MALDI-TOF 的重要应用领域。由于新的基质和预处理方法的发现, 聚合物绝对质量的测量达到了新的水平。聚苯乙烯聚合物 (polystyrene) 样品谱图 (图 6) 显示仪器有较宽的动态范围和检测高分子的能力。

分辨率的提高使确定末端基团的可信度及单聚体重复单元的确证达到新水平。PMMA (methylmethacrylate) 聚合物 (甲基甲基丙烯酸酯) 在 24Kda 的分子量很好地证明了这点 (图 7)。HIMAS™检测器的使用使质量范围可达 300,000 Dalton。

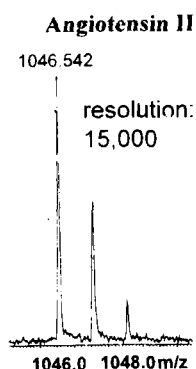


图 4 在反射模式下肽片 angiotensin II 的谱图,分辨率可达到 15,000 (FWHM)。说明了脉冲离子引出 (Pulsed Ion Extraction) 技术提高了肽片分辨率和质量准确度

Linear Mode

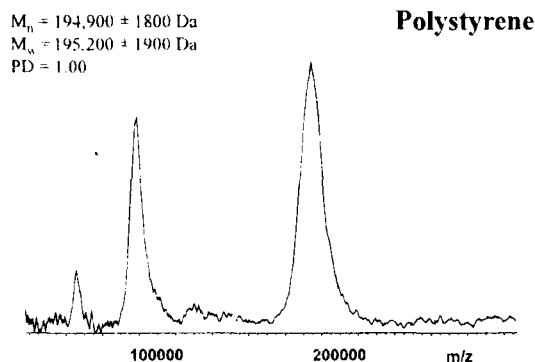


图 6 显示聚合物绝对质量的测量达到了新的水平。聚苯乙烯聚合物 (polystyrene) 样品谱图说明仪器有较宽的动态范围和检测高分子的能力。

Linear Mode

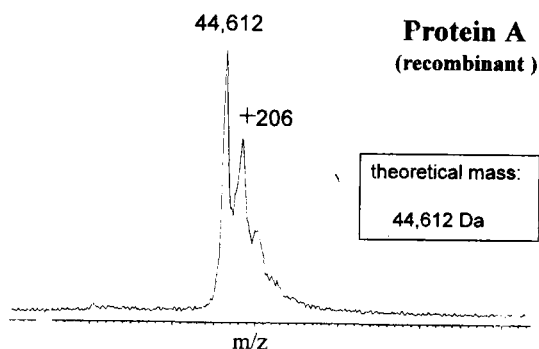


图 5 在线性模式下 A 蛋白 (Protein A 44KDa) 的谱图,充分证明脉冲离子引出 (Pulsed Ion Extraction) 技术改善了高质量分子的分辨率。

Reflectron Mode

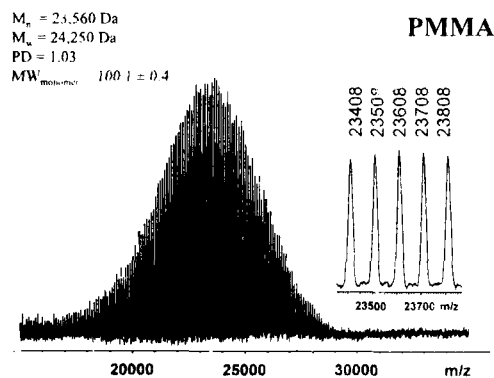


图 7 PMMA (methymethacrylate) 聚合物 (甲基甲基丙烯酸酯) 在 24Kda 的分子量。此图很好地证明分辨率的提高使确定末端基团的可信度及单聚体重复单元的确达到新水平。HIMAS™检测器的使用使质量范围可达 300,000Dalton。

2.3 FAST™/PSD (源后分解) -通过分析碎片得到结构信息除了测定分子量,装有反射器的 TOF 质谱仪可以测得源后分解谱 (Post Source Decomposition),这一谱图显示了分子的特殊结构碎片。FAST™附件含有一个门控设备 (电脉冲) 用于前置离子的选择,还有软件指令控制和处理数据,最终获得真正的质谱联用 (MS/MS) 数据, (图 8A)。这种谱图对解释和确认结构 (例如多肽序列) 非常重要。

2.4 蛋白质组的研究

蛋白质组的研究是当今世界的生物化学的

研究热点,要使该课题顺利进行就必须有能够大量的检测和确认各种蛋白质。这里我们以 Myoglobin 为例。首先将该蛋白酶解 (Trypsin digest) 通过质谱可得到肽谱 (图 8A)。而后再将其中的肽片拿来作 PSD (图 8B),则可得到结构信息 (MS/MS)。这样通过对标准谱库的检测即可确认此蛋白质是否是 Myoglobin (图 8B)。

Tryptic Digest Map - Myoglobin

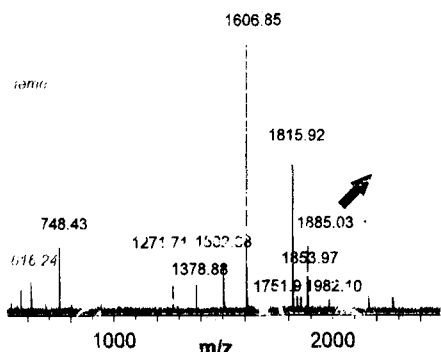


图 8A 蛋白质 Myoglobin 的肽谱。利用某些肽片可进行谱库的检索,便可确认蛋白质

PSD Spectrum of m/z 1885.0

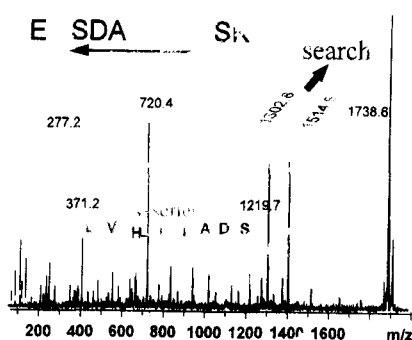


图 8B 蛋白质 Myoglobin 的一个肽片 (m/z 1885.0) FAST™/PSD (源后分解) 得到结构信息谱图。利用此结构信息可进行谱库的检索。对此图进行进一步解析可得氨基酸的一级序列: YLEFISDAIHVLHLSK。

3 总结

REFLEX III 是当前最灵敏的 MALDI-TOF 质谱仪,在检测多肽、蛋白质、DNA 及高分子聚合物等领域有着广泛的应用前景,已成为广大生物工作者必不可少的仪器之一。由于我们采取了全自动的制样、操作及数据处理,该仪器已成为当前研究蛋白质组的理想质谱仪。由于它模块式设计,使仪器便于维修及升级。这样可使广大科技工作者永远处在科学的前沿。

参考文献

- [1] Ole N. Jensen, Peter Mortensen, Ole Vorm and Matthias Mann, *Analytical Chemistry* 69, 1706~1714 (1997); Automation of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Using Fuzzy Logic Feedback Control.
- [2] Tony Houthaeve, Heinrich Gausepohl, Keith Ashman, Tommy Nillson and Matthias Mann, *Journal of Protein Chemistry* 16, 343~348 (1997); Automated Protein Preparation Techniques Using a Digest Robot.

The Characteristics and Applications of REFLEX III MALDI-TOF

Wang Hongqi Huang Shunyan

(Bruker Instruments, Ltd. Beijing 100081, P. R. China)

Abstract REFLEX III MALDI-TOF is the most sensitive MALDI-TOF mass spectrometer (MS) in the world. With our patented gridless pulse ion extraction (PIE), and gridless double focusing reflectron design, it can measure molecular weight of a molecule with high precision and give structural information with post source decomposition (PSD) analysis. It is an ideal MS instrument for researchers especially those who are working on the proteome project. In this article, we will describe some of the characteristics of the instrument, its basic design and some applications.

Key words MALDI-TOF MS proteome protein peptide glycans and oligonucleotides Automation