

# 生物质谱技术及其在 RNA 检测中的应用\*

李 军\*\*

(北京大学实验动物中心 北京 100871)

**摘 要** 生命科学的需求促进质谱技术的发展,现代的质谱技术为生命科学研究提供丰富的检测手段,本文重点介绍生物质谱技术的特点、性能以及质谱技术的进展;及质谱技术在 RNA 研究领域的方法学,包括核酸的纯化方法、核酸的离子化技术、核酸的分子量检测技术和核酸质谱数据的解析方法及其软件;以及质谱在核酸领域的具体应用,包括质谱在测序、定量、转录后修饰、核酸的指纹识别、蛋白和核酸相互作用等方面的应用。

**关键词** 质谱技术 RNA/蛋白相互作用 核酸定量 RNA 转录后修饰 RNA 指纹技术

## 引 言

在过去的 30 年里,质谱技术尤其是测定生物大分子的生物质谱技术有飞速的发展,电喷雾离子化 (ESI) 和基质辅助激光解吸电离 (MALDI) 离子化技术的发现为质谱的生物应用奠定基础;质谱的分辨率、灵敏度、准确度也达到很高的水平,生物质谱在蛋白、多肽领域得到广泛地应用,在核酸研究领域,质谱也逐渐发挥越来越重要的作用。下面分别介绍质谱技术、核酸的质谱检测方法以及质谱在核酸领域的应用。

## 1 质谱技术简介

质谱是测定物质分子量的工具,简单地说,质谱的操作部件由软件和硬件两部分组成。硬件主要包括三个核心硬件,分别为样品离子化、质量分析器 (M/Z) 和离子检测器;软件部分包括机器的控制和质谱数据的分析处理。

样品离子化有多种方法,在过去的 20 多年,质谱领域的重大进展之一就是 ESI 和 MALDI 离子化方法的发现,可以在比较温和的条件下产生离子,这大大促进质谱在生物领域的应用。ESI 和 MALDI 离子化的原理在文献 [1] 中已经详细的介绍,这里不再详述。电喷雾离子化的特点是产生多电荷离子,使质量电荷比 ( $m/z$ ) 降低到多数质量分析仪器都可以检测的范围,因而大大扩展分子量的分析范围 [2]。电喷雾离子化根据喷射源液体流量的大小,可分为纳升、微升、电喷和涡轮离子喷射。MALDI 是通过气化的带电基质和样品之间发生碰

撞,把激光的能量传递给样品,从而导致样品的离子化 [1]。它也是一种软电离技术,适用于混合物及生物大分子的测定 [3]。

质量分析器是质谱的核心,目前质谱的质量分析器有四类:离子阱 (Ion Trap)、飞行时间 (Time of Flight, TOF)、四极杆 (Quadrupole) 和傅立叶变换离子回旋共振。它们在设计 and 构造上各有不同,因而各有优缺点。质量分析器决定整个机器的分辨率、质量准确性、敏感性和质量检测范围。离子阱质量分析器使用频率分离离子,具有中等的质量准确度,且测量的质量范围有限。傅立叶变换离子回旋质谱使用频率分离离子,具有很高的质量准确度和分辨率,但傅立叶变换离子回旋质谱价格昂贵、仪器操作复杂。飞行时间分析器使用时间和距离分离离子,具有较高的质量准确度和分辨率,测量的质量范围大。四极杆质量分析器使用频率分离离子,具有较低的质量准确度和分辨率,且测量的质量范围有限。这些质量分析器的发明促进质谱的应用。

近 10 年来,质谱的重要进展体现在两个方面:(1) 质谱技术的第一个重要进展就是开发串联质谱,就是对上述质量分析装置进行不同的组合,以达到特异性的目标;(2) 质谱另一个重要进展不是在于技术层面上,而是在仪器化方面,商业化的仪器推动质谱在应用领域里的快速发展。各厂家为满足客户的需要,尤其是生命科学领域的需要,组合不同的特殊电离技术以及各种质量检测器,生产出超高分辨率、高灵敏度、宽质量范围的质谱仪;把质谱与气相色谱、高效液相色谱系统联用,大大拓宽质谱应用范围。下面主要介绍一些有代表性的质谱仪。

\*基金项目:中国博士后科学基金资助(20070420010)

\*\*通讯地址:北京市颐和园路5号(100871),010-62756977,likejun@tom.com

傅立叶变换 - 离子回旋共振质谱 (Fourier Transform ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer, FT-ICR-MS) 具有超高质谱分辨率、高质量测量准确度、回旋池内现场反应等显著优点<sup>[4]</sup>。生产傅立叶变换 - 离子回旋共振质谱的主要厂家有 Thermo Fisher 和 Bruker。Thermo Fisher 的 LTQ-FT 是串联线性离子阱 FT-ICR, 而 Bruker 的 APEX-Qe 是三级四极杆和 FT-MS 的结合; FT-ICR-MS 质量准确度达 1~2ppm, 分辨率超过  $10^5$ 。

静电场轨道阱 (Orbitrap) 质量分析器, 是第一个在静电场中进行离子捕获的高性能质量分析器, 基于这一分析器, 开发 LTQ orbitrap 质谱仪。该机器使用线性离子阱实现离子分离、裂解以及多级质谱功能。它在质量准确度、分辨率、动态范围、灵敏度以及多级质谱能力等方面具有明显优势, 具有高达 30 万的分辨率。它与 LTQ FT 线性离子阱回旋共振质谱仪有相近的工作原理, 但仪器运行时无需消耗大量制冷剂, 能够在降低运行成本的同时得到高分辨率的数据结果<sup>[5,6]</sup>。

MALDI - TOF 质谱采用一系列的新技术, 如提供二阶无网离子反射器, 延长离子在飞行管中的飞行距离, 飞行路径可达 3m; 创新的使用 LIFT<sup>TM</sup> 技术来提升能量, 可高速完成高质量的 MS/MS 质谱数据; 采用独有的 PANTM 全景宽域聚焦技术, 可以在非常宽的质量范围内获得大于 25000<sup>[7]</sup> 的分辨率。MALDI - TOF 质谱可用来分析较为复杂的混合物, 在样品含量低于  $10^{-12}$ mol 时, 分子量的测定仍有相当高的灵敏度和分辨率。

近年来发展的 MassARRAY<sup>TM</sup> 时间飞行质谱生物芯片系统由美国 Sequenom 公司开发, 是目前唯一采用质谱法直接检测单核苷酸多态性 (SNP) 的设备。该系统的突出特点是能以极高的精确度快速进行基因型识别, 直接测出带有 SNP 或其他突变的目标 DNA。MassARRAY<sup>TM</sup> 系统反应体系为非杂交依赖性, 不存在潜在的杂交错配干扰, 不需要各种标记物, 其采用的高密度 SpectroCHIP<sup>TM</sup> 点阵芯片分析系统能在 4h 之内完成多达 3840 个多重性鉴定, 每个检测点只需 3~5s, 结果实现全自动分析。这套系统所提供的大规模、高通量检测 SNP 的技术平台, 在当前疾病机制研究中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。

## 2 RNA 检测的质谱分析技术

同质谱在蛋白分析方面的巨大成功相比, 在核酸分析领域中, 质谱的应用遇到非常大的挑战。限

制其使用的因素包括: 在解吸附 / 离子化过程中由于内部的能量转移导致气相时的片断化和核酸的脱嘌呤; 核酸与带正电的钾、钠和带负电的磷酸相互作用产生的加合效果 (adduct) 对质谱信号的影响, 以及核酸质谱数据分析软件开发的滞后。

### 2.1 核酸样品的前处理

质谱在蛋白多肽领域的应用非常广泛, 而在核酸领域的应用, 目前所占的比例很小。从技术上说, 样品的前处理, 也就是样品的纯度, 对获得高质量的质谱非常关键, 尤其是离子, 比如金属阳离子钾、钠等, 通过离子诱导的作用, 大大减弱核酸的信号。研究人员已经开发多种纯化核酸的方法, 液滴透析法 (Drop dialysis)<sup>[9]</sup>、阳离子交换法<sup>[10]</sup>、乙醇沉淀<sup>[11]</sup>、ZipTips-C<sub>18</sub> 反相纯化法<sup>[12,13]</sup>、磁珠分离法<sup>[14]</sup>、尺寸排出色谱法 (size exclusion chromatography)<sup>[10]</sup> 被成功地应用于核酸的质谱分析。

### 2.2 核酸的电离

和多肽相比, 核酸的电离比较困难, 而且电离的核酸不稳定, 容易产生碎片, 核酸电离通常产生带多个电荷的离子, 需要高分辨率的检测器才能检测到, 随着高分辨质谱的出现, 以及对核酸离子化过程中的碎片的分析, 开发基于核酸碎片特征的核酸测序方法。Shah 等建立用 ESI-MS 的方法分析修饰和未修饰的小干扰 RNA (siRNA)<sup>[15]</sup>。Huang 等利用纳升电喷雾质谱, 通过串联质谱研究 siRNA 的离子特征, 发现前体离子低电荷状态, 主要产生的离子是 c/y 离子, 而在前体离子高电荷状态时, a-B/w 离子也非常显著。复杂的离子分布导致质谱解析的困难, 通过质子转移反应可以简化质谱数据, 顺利完成测序<sup>[16]</sup>。基质辅助激光解吸电离 (MALDI) 在核酸领域应用非常广泛, 包括核酸测序、核酸代谢产物的识别等, 都有成功使用的案例, 这将在下一部分谈及。MALDI 离子化时, 基质的选择非常关键, 核酸科学中常用的基质在 Sauer 的综述中比较详细的总结<sup>[17]</sup>。

### 2.3 核酸分析中质量分析器的选择

根据实验目的不同, 可选用不同的质谱仪和相应的分析方法。MALDI-TOF 质谱在核酸指纹图谱<sup>[18]</sup>、SNP (Single nucleotide polymorphism, SNP) 以及核酸定量<sup>[19]</sup> 研究中得到广泛应用。Limbach 博士在进行核酸实验时采用的是线性离子阱、杂交四极杆 / 飞行时间质谱两种技术, 识别核酸的化学修饰的类型, 并确定核苷酸链中修饰的位置<sup>[20]</sup>。傅立叶变换离子回旋共振质谱仪在解析核酸的空间

结构以及核酸和蛋白大分子或小分子间的相互作用上发挥重要作用<sup>[21,22]</sup>。

## 2.4 数据处理

核酸质谱的分析非常复杂,人工解谱效率很低。在过去很多年里,核酸分析软件的开发没有得到足够重视,阻碍质谱在核酸领域的大规模应用,零星有一些机构或个人开发一些核酸质谱分析工具,如 McCloskey 小组的 RNA 修饰数据库<sup>[23]</sup> 以及核酸分子量计算工具 Mongo Oligo Mass Calculator<sup>[24]</sup>, 还有用于核酸测序的软件 SOS<sup>[24]</sup> 和 compas<sup>[25]</sup>。最近,核酸分析软件快速发展,开发用于核酸高级结构的分析 MS2LINKS<sup>[26]</sup> 及虚拟实验室软件 MS3D 软件<sup>[26-28]</sup>, 开发基于数据库核酸指纹分析软件<sup>[29,30]</sup>, 这必将大大推动核酸转录组的研究。

## 3 质谱技术在 RNA 检测中的应用

### 3.1 核酸测序

目前核酸的测序还只是针对短片段核酸,通常可以采用 2 种策略测定核酸的序列,即从底测序(bottom up sequencing) 和从顶测序(top down sequencing)。所谓的从底测序,就是用酶或化学试剂,把核酸片段化为寡核苷酸、单核苷酸甚至单碱基,然后进行质谱分析。用磷酸二酯酶(从 5' 到 3' 端和从 3' 到 5' 端)切割寡核苷酸片段,用质谱分析不同时间点的酶切产物,可得到寡核苷酸的序列信息<sup>[14,31]</sup>。该方法中使用的质谱一般为 MALDI-TOF 质谱,质量准确度高,范围大,分析简单。通过把酶切反应放在重水中进行,可以在末端形成<sup>18</sup>O 的末端,可简化质谱数据的分析<sup>[19]</sup>。所谓的从顶测序就是测序过程中不依赖酶的切割,而是直接从核酸电离时产生的离子的性质来测定核酸的序列。对核苷酸进行串联质谱分析时,通过捕获和分析样品在碰撞室碰撞形成的带 a、b、c、d 和 w、x、y、z 等多种电荷离子的离子特性,可以得到序列信息。但由于核苷酸带多个电荷,质谱复杂,需要高准确度的质谱,同时还需要高效率的质谱算法<sup>[20]</sup>。目前的测序软件包括 sos 和 compas,其分别可测序 20mer 和 50mer,还有一些算法正在开发中<sup>[32]</sup>。最近 huang 等用碰撞诱导解离(CID)的质谱方法对单链和双链 siRNA 进行测序,它们通过引入苯并喹啉(benzoquinoline)介导的质子转移反应<sup>[11]</sup>,把带多电荷的核酸片段的电荷降到只含 1~2 个电荷,简化质谱的分析,从而获得完整的序列信息。

### 3.2 核酸指纹技术

通过酶切蛋白产生特征性多肽片段的蛋白鉴定方法已经广泛应用。在核酸研究中, Hossain 等发现用 MALDI-MS 检测核酸酶(如核酸酶 T1)处理的不同 tRNA,会产生该 tRNA 独特产物,这种独特的产物组合就像 tRNA 的签名,可用来检测某种独特的 tRNA;把几种不同的 tRNA 混合在一起,在混合物中很容易检测到各特异性 tRNA 的存在<sup>[18]</sup>,因此该方法可以直接识别出总 tRNA 不同的 tRNA 成分。可以称这种技术为核酸指纹技术。最近,两个不同的机构几乎同时发表他们的研究成果<sup>[29,30]</sup>,他们的成果基于几乎同样的策略,首先根据现有的核酸数据库,预测不同核酸序列的核酸酶 T1 酶切特征片段,形成核酸的指纹数据库;然后用核酸酶 T1 处理核酸样品,得到核酸酶 T1 处理的核酸的质谱数据,通过比对、搜索核酸的指纹数据库,可以识别核酸的种类。目前,已经开发成网络工具向研究者免费开放。就像蛋白的指纹技术大大推动蛋白的研究一样,同样有理由相信核酸指纹技术将大大推动转录组的研究。

### 3.3 核酸定量研究

核酸定量研究通常是把 RNA 水解成核苷,然后用 LC/MS 定量。该方法只能测定样品中总核酸的含量,不能提供某核酸序列的定量信息。Meng 等建立在寡核苷酸水平的核酸的定量方法,将 RNA 样品分别在<sup>18</sup>O 的重水和<sup>16</sup>O 普通水中用 RNA 酶 T1 降解,酶切产物将被<sup>18</sup>O 或<sup>16</sup>O 标记,把上述处理的 RNA 混合在一起进行质谱检测,相差两个 Da 分子量的离子的相对的离子峰度,代表样品核酸浓度的差异,在一定的比例范围内,<sup>18</sup>O 或<sup>16</sup>O 标记的核酸的离子峰度和核酸的浓度成正比。在检测样品时,通过向检测样品中加入核酸浓度已知的<sup>18</sup>O 标记的酶切产物,通过<sup>18</sup>O 或<sup>16</sup>O 离子峰的峰度,获得核酸的浓度。该方法已在 18 个已知和 4 个未知的 RNA 样品中得到验证<sup>[19]</sup>。Turakulov 等把原先用于 SNP 检测的引物延伸法进行改造,通过向 cDNA 加入已知浓度的竞争性的寡核苷酸序列,然后用引物延伸的方法,同时扩增模板和竞争性的寡核苷酸序列,从而达到定量检测的目的,灵敏度可达到 $10^{-19}$  mol,大约相当于 1000 个 mRNA 分子。该方法克服以前各种以保守的看家基因(house-keeping gene)作为标准参照的定量方法的缺点,可用于低表达基因和极小样品的 RNA 检测。通过和 sequenon 设备联用,还可以达到高通量的检测<sup>[8]</sup>。siRNA 作为治疗性药物正引

起广泛的关注,最近 Bahr 等建立用 MALDI-TOF 质谱测定双链 siRNA 的定量方法,可以用于合成 siRNA 的质量监控,他们在 siRNA 样品中加入已知浓度的单链寡核苷酸,测定在变性和非变性下的核酸样品的质谱数据,可以在很短的时间内精确地测定出核酸的浓度,以及核酸片断的含量<sup>[33]</sup>。

### 3.4 核酸的空间结构的解析

核酸和蛋白相互作用是核酸功能研究的重要部分,但核酸的盐加合作用、核酸的异质性以及核酸和蛋白之间的非特异性作用,导致核酸和蛋白的相互作用的研究非常困难。质谱法测定大分子间相互作用,必须保持大分子复合体的四级结构的完整性。Robinson 和她的同事已构建一个用户界面友好的纳米 ESI 系统,以确保蛋白质复合体在电离过程中不受任何破坏。他们还开发离子移动质谱 (ion mobility-MS),该质谱使用离子漂移室 (ion drift cell) 分离离子,测定一个离子在弱电场中通过一个含有中性气体分子的小室时需要的时间长短,经过仔细校准,转化为碰撞截面值 (collision cross section),它直接和分子大小及布局成比例。他们以结构已知的 TRAP (Trp-RNA binding attenuation protein, TRAP) 复合物为模型,测定色氨酸和 mRNA 对 TRAP 的稳定作用,验证该方法在研究大分子结构方面的有效性。然后用这一技术,成功的研究 RLC (RISC-loading complex), Robinson 认为应用这一新近发现的功能强大的质谱实验方法,可进行动态条件下的四级结构的研究,适合其它方法不能胜任的瞬时或可逆关联现象的研究,结构生物学将从中大大获益<sup>[34]</sup>。

化学性的结构探针在研究核酸/蛋白相互作用方面提供重要信息。化学试剂可把结构特异性的化学修饰引入到蛋白核酸复合物的蛋白或核酸成分中,通过质谱数据的分析,可以解析出蛋白/核酸的空间结构。Yu 等系统研究多种溶剂可接近探针 (solvent accessibility probes)<sup>[35]</sup> 对蛋白/核酸复合体的修饰,以及修饰后的复合体的傅立叶转换离子回旋加速共振质谱特点,获得关于碱基配对、核酸或核酸/蛋白复合物的空间信息,他们同时开发 ms2linkes 软件,其对分析复杂质谱大有帮助。目前,ms2linkes 被引入虚拟实验室 MS3D<sup>[27]</sup> 网络工具中,成为研究蛋白核酸结构的免费平台。

### 3.5 转录后修饰

RNA 的转录后修饰对 RNA 的功能具有重要意义,目前已经发现生物体自发产生的 RNA 修饰有

96 种<sup>[23]</sup>,目前 MS 是首选的 RNA 转录后修饰的工具。已经建立多种核酸修饰的质谱检测方法,这些方法都是基于修饰 RNA 的分子量的增加(只有假鸟嘌呤除外),如通过核酸酶图谱 (RNase Mapping) 的方法,酶切的产物通过反向 HPLC/ESI-MS,通过序列中核酸的分子量偏移可以得到核酸转录后修饰的信息。MALDI 质谱用于核酸的转录后修饰更直接,因为通常 RNA 分子在 MALDI 质谱分析时,只带一个电荷。通过进一步的改进,比如在酶切时引入核素标记的分子,可提高该方法的可靠性。对于假尿嘧啶,因为它是尿嘧啶的同分异构体,和尿嘧啶具有相同的质量,不能直接用上面的方法,可以通过检测其衍生物,或给假尿嘧啶作个标签的方法检测。第二种方法是利用假鸟嘌呤的 C-C 糖苷键,而不是 C-N 糖苷键,C-C 糖苷键在 MS/MS 时会产生独特的片断<sup>[36]</sup>。

### 3.6 核酸 SNP 分析

质谱在单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 方面的应用,已经有大量的文献做深入的分析<sup>[3]</sup>,基因 SNP 的检测被广泛地应用于人类疾病的诊断<sup>[37]</sup>。这里需要强调,目前核酸 SNP 分析的趋势是大规模高通量,通过对质谱 SNP 分析的各个阶段进行自动化,已经成功地开发出大规模高通量的研究设备和方法<sup>[8]</sup>。

## 4 总结

在过去的 30 年内,质谱技术取得非常大的突破,使其在生物大分子检测的应用成为可能,而各个公司开发多种高分辨、高灵敏度、高采样速度的质谱,并成功推广到各实验室,大大推动核酸的质谱研究,各研究机构和个人开发丰富的质谱研究方法和质谱研究工具,大大促进质谱在核酸领域的应用,相信在未来几年里,关于核酸,尤其是转录组的研究,将得到突飞猛进的发展。

### 参考文献

- 1 何美玉. 生物大分子分析研究领域的重大突破, 大学化学, 2003, 18(1):18~22, 25
- 2 罗国安, 梁琼麟, 王义明等. 电喷雾质谱新方法及其在生命分析化学中的应用, 现代仪器, 2005, (1):5~8
- 3 杨何义, 蔡耘, 钱小红. 生物质谱在核糖核酸领域的应用, 质谱学报, 2004, 25(1):52~60
- 4 王光辉, 熊少祥, 何美玉等. 傅立叶变换 - 离子回旋共振质谱, 现代仪器, 2001, (1):1~5
- 5 Makarov A, Denisov E, Lange O, et al. Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer.

- Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 2006, 17(7):977~982
- 6 Perry RH, Cooks RG and Noll RJ. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass spectrometry reviews*. 2008, 27(6):661~699
- 7 赵晓光, 杨松成, 马龙华. 新一代串联飞行时间质谱仪及其创新技术, *现代仪器*, 2007, (4):9~14
- 8 Turakulov R, Nontachaiyapoom S, Mitchelson KR, et al. Ultrasensitive determination of absolute mRNA amounts at attomole levels of nearly identical plant genes with high-throughput mass spectrometry (MassARRAY). *Plant & cell physiology*. 2007, 48(9):1379~1384
- 9 Liu C, Wu Q, Harms AC, et al. On-line microdialysis sample cleanup for electrospray ionization mass spectrometry of nucleic acid samples. *Analytical chemistry*. 1996, 68(18):3295~3299
- 10 Cui Z, Theruvathu JA, Farrel A, et al. Characterization of synthetic oligonucleotides containing biologically important modified bases by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical biochemistry*. 2008, 379(2):196~207
- 11 Huang TY, Liu J, Liang X, et al. Collision-induced dissociation of intact duplex and single-stranded siRNA anions. *Analytical chemistry*. 2008, 80(22):8501~8508
- 12 Jiang Y and Hofstadler SA. A highly efficient and automated method of purifying and desalting PCR products for analysis by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical biochemistry*. 2003, 316(1):50~57
- 13 Berhane BT and Limbach PA. Stable isotope labeling for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and post-source decay analysis of ribonucleic acids. *J Mass Spectrom*. 2003, 38(8):872~878
- 14 Spottke B, Gross J, Galla HJ, et al. Reverse Sanger sequencing of RNA by MALDI-TOF mass spectrometry after solid phase purification. *Nucleic acids research*. 2004, 32(12): e97
- 15 Shah S and Friedman SH. An ESI-MS method for characterization of native and modified oligonucleotides used for RNA interference and other biological applications. *Nature protocols*. 2008, 3(3):351~356
- 16 Lenz C, Kuhn-Holsken E, Urlaub H. Detection of protein-RNA crosslinks by NanoLC-ESI-MS/MS using precursor ion scanning and multiple reaction monitoring (MRM) experiments. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2007, 18(5):869~881
- 17 Sauer S. The essence of DNA sample preparation for MALDI mass spectrometry. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 2007, 70(2):311~318
- 18 Hossain M and Limbach PA. Mass spectrometry-based detection of transfer RNAs by their signature endonuclease digestion products. *RNA*. 2007, 13(2):295~303
- 19 Meng Z and Limbach PA. Quantitation of ribonucleic acids using  $^{18}\text{O}$  labeling and mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2005, 77(6):1891~1895
- 20 Meng Z and Limbach PA. Shotgun sequencing small oligonucleotides by nozzle-skimmer dissociation and electrospray ionization mass spectrometry. *European journal of mass spectrometry (Chichester, England)*. 2005, 11(2): 221~229
- 21 Frahm JL and Muddiman DC. Nucleic Acid analysis by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry at the beginning of the twenty-first century. *Current pharmaceutical design*. 2005, 11(20):2593~2613
- 22 Egger AE, Hartinger CG, Ben Hamidane H, et al. High resolution mass spectrometry for studying the interactions of cisplatin with oligonucleotides. *Inorganic chemistry*. 2008, 47(22):10626~10633
- 23 Limbach PA, Crain PF and McCloskey JA. Summary: the modified nucleosides of RNA. *Nucleic acids research*. 1994, 22(12):2183~2196
- 24 Rozenski J and McCloskey JA. SOS: a simple interactive program for ab initio oligonucleotide sequencing by mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2002, 13(3):200~203
- 25 Oberacher H, Wellenzohn B, Huber CG. Comparative sequencing of nucleic acids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2002, 74(1):211~218
- 26 Kellersberger KA, Yu E, Kruppa GH, et al. Top-down characterization of nucleic acids modified by structural probes using high-resolution tandem mass spectrometry and automated data interpretation. *Analytical chemistry*. 2004, 76(9):2438~2445
- 27 Yu ET, Hawkins A, Kuntz ID, et al. The collaboratory for MS3D: a new cyberinfrastructure for the structural elucidation of biological macromolecules and their assemblies using mass spectrometry-based approaches. *Journal of proteome research*. 2008, 7(11):4848~4857
- 28 Zhang Q, Yu ET, Kellersberger KA, et al. Toward building a database of bifunctional probes for the MS3D investigation of nucleic acids structures. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2006, 17(11):1570~1581
- 29 Nakayama H, Akiyama M, Taoka M, et al. Ariadne: a database search engine for identification and chemical analysis of RNA using tandem mass spectrometry data. *Nucleic acids research*. 2009, 37(6):e47
- 30 Matthiesen R and Kirpekar F. Identification of RNA molecules by specific enzyme digestion and mass spectrometry: software for and implementation of RNA mass mapping. *Nucleic acids research*. 2009, 37(6):e48
- 31 Tolson DA and Nicholson NH. Sequencing RNA by a combination of exonuclease digestion and uridine specific chemical cleavage using MALDI-TOF. *Nucleic acids research*. 1998, 26(2):446~451
- 32 Oberacher H, Mayr BM, Huber CG. Automated de novo sequencing of nucleic acids by liquid chromatography-

- tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2004, 15(1):32~42
- 33 Bahr U, Aygun H, Karas M. Detection and relative quantification of siRNA double strands by MALDI mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2008, 80(16):6280~6285
- 34 Gordiyenko Y, Robinson CV. The emerging role of MS in structure elucidation of protein-nucleic acid complexes. *Biochemical Society transactions*. 2008, 36(Pt 4):723~731
- 35 Yu E and Fabris D. Toward multiplexing the application of solvent accessibility probes for the investigation of RNA three-dimensional structures by electrospray ionization-Fourier transform mass spectrometry. *Analytical biochemistry*. 2004, 334(2): 356~366
- 36 Meng Z and Limbach PA. Mass spectrometry of RNA: linking the genome to the proteome. *Briefings in functional genomics & proteomics*. 2006, 5(1):87~95
- 37 Li Y, Hahn S and Holzgreve W. Recent developments in the detection of fetal single gene differences in maternal plasma and the role of size fractionation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006, 1092:285~292

## Mass spectrometry technique and application for RNA analysis

Li Jun

(Laboratory animal center, PKU, Beijing 100871)

**Abstract** New method requirements in biosciences stimulate the development of new mass spectrometry, and modern mass spectrometry provide plenty of choices for biosciences. In this review, modern mass spectrometry technique, mass spectrometry methods for RNA analysis and practical application of mass spectrometry in RNA science were deeply reviewed such as the ESI and MALDI ion technique, RNA purification methods, RNA sequencing, quantitation, post transcriptional modification analysis, RNA fingerprint technique, RNA/protein interaction.

**Key words** Mass spectrometry RNA/protein interaction RNA quantitation RNA fingerprint Post transcriptional modification

(上接第15页)

## Macro-fingerprint infrared spectroscopic identification method and the quality control of traditional Chinese medicines

Sun Suqin Zhou Qun Tao Jiaxun

(Key Laboratory of Bioorganic Phosphorus Chemistry & Chemical Biology (Ministry of Education), Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084)

**Abstract** An integrated analysis method via Infrared spectroscopy for complex materials, namely the macro-fingerprint infrared spectroscopic identification method, is introduced in this article. Major applications of the method are face to the quality control of traditional Chinese medicines (TCM). Fast and non-destructive identification of the crude drugs and their producing area are reviewed for the first time. Analysis and evaluation the quality of preparation of TCM, including the preparing procedure of medicines and the determination of types and quantity of the auxiliary materials added in the TCM products are also reviewed. The method follows the holistic principles emphasized by Chinese Medicine. Without separation and extraction, the method does not lose originality and compatibility of TCM during analysis. Obviously, it is the simplest, quick, convenient and non-separated detective means or method.

**Key words** Macro-fingerprint infrared spectroscopic identification method FT-IR Traditional Chinese medicine Identification Quality control