



质谱技术丛书

有机质谱在生物医药中的应用

杨松成 等编著



化学工业出版社

质谱技术丛书

有机质谱在生物 医药中的应用

杨松成 等编著



化学工业出版社

· 北京 ·

有机质谱对生命科学的发展具有重大的影响,是蛋白质组学和代谢组学中的关键核心技术,已成为探索生命奥秘的重要工具之一。在新药的研究中,从新药先导化合物的发现到新药的生产、销售和储存等整个新药研发过程,有机质谱均发挥着重要的不可替代的作用。

本书深入浅出地论述了有机质谱在生物医学中的应用,全书共6章,介绍了有机质谱在蛋白质组学中的应用;生物质谱在生物分子间非共价键相互作用研究中的应用;糖基化蛋白质的生物质谱分析;质谱技术在天然药物研究中的应用;质谱在组合化学研究中的应用;串联质谱技术与药代动力学和药物代谢研究。

本书适于从事质谱分析,生物医学和药学的科研人员参考,也可作高等学校分析化学、生物化学及药学专业等师生的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

有机质谱在生物医药中的应用/杨松成等编著. —北京:
化学工业出版社, 2008. 9
(质谱技术丛书)
ISBN 978-7-122-03575-2

I. 有… II. 杨… III. 有机分析-质谱法-应用-生物
医学工程-研究 IV. R318

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第127708号

责任编辑:任惠敏

文字编辑:焦欣渝

责任校对:蒋宇

装帧设计:尹琳琳

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印刷:北京永鑫印刷有限责任公司

装订:三河市万龙有限责任公司

720mm×1000mm 1/16 印张10¼ 字数177千字 2009年1月北京第1版第1次
印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价: 28.00 元

版权所有 违者必究

质谱技术丛书

王光辉 主编

苏焕华 赵墨田 副主编

- | | | | | |
|----------------------|------|-----|-----|-----|
| 《无机质谱概论》 | 赵墨田 | 曹永明 | 陈刚 | 姜山 |
| 《同位素质谱技术与应用》 | 黄达峰 | 罗修泉 | 李喜斌 | 邓中国 |
| 《电感耦合等离子体质谱技术与应用》 | 刘虎生 | 邵宏翔 | | |
| 《有机质谱仪器》 | 王光辉 | 汪正范 | 苏焕华 | |
| 《有机质谱解析》 | 王光辉 | 熊少祥 | | |
| 《色谱质谱联用技术》 | 盛龙生 | 苏焕华 | 郭丹滨 | |
| 《有机质谱在生物医药中的应用》 | 杨松成等 | | | |
| 《有机质谱在环境农业和法庭科学中的应用》 | 王维国 | 李重九 | 李玉兰 | 徐建中 |
| 《有机质谱在石油化学中的应用》 | 苏焕华 | 姜乃皇 | 任冬苓 | 孙孚庆 |

丛书序

自1912年第一台质谱仪雏形诞生以来，质谱技术已经历了近百年的发展历程。在这期间，先后六次有10位从事质谱研究的学者荣获诺贝尔奖，这反映了质谱技术对科学发展的重要贡献且备受关注。

在质谱技术发展初期，它主要被用于同位素丰度的测定。到20世纪40年代，质谱研究转向有机物的定性和定量分析，并得到十分迅猛的发展。到20世纪80年代，由于出现了生物大分子的离子化方法，使质谱分析研究跨入生物大分子研究领域，成为蛋白质组学及代谢组学的主要研究手段。在20世纪后期，无机质谱也得到了长足的发展和更广泛的应用。目前质谱技术已在原子能、生物学、医药、化学、环境科学、食品科学、法医学、刑侦科学、化工、石油化学、地质学等十分宽广的领域中成为不可缺少的分析手段。随着质谱技术应用领域的不断扩大，对人才的需求也急剧上升，为此，仅美国化学会每年都要举办4~5期各类质谱技术学习班，各种质谱书刊大量涌现。

在20世纪后期，我国经济开始腾飞，这为我国科学技术的快速发展提供了良好的基础。伴随而来的就是对分析技术的迫切要求。在此大背景下，迎来了我国质谱分析的大发展。近些年来我国每年购置质谱仪的数量急剧上升，仅2004年一年已突破600台。与此同时，一支规模颇大的质谱技术队伍也逐步形成。提高质谱工作者的素质，以保证质谱仪器的使用水平和效率，成了当务之急。

目前国内虽已出版了数种质谱专著或翻译本，但还显得很稀缺，尤其是缺少较系统全面、深入浅出地介绍关于质谱技术的基础性知识和前沿发展动态的通俗易懂读物。出版这套丛书就是为满足这些需要的一种尝试。

质谱技术丛书共分九分册：赵墨田等的《无机质谱概论》，黄达峰等的《同位素质谱技术与应用》，刘虎生等的《电感耦合等离子体质谱技术与应用》，王光辉、汪正范等的《有机质谱仪器》，王光辉、熊少祥等的《有机质谱解析》，盛龙生、苏焕华等的《色谱质谱联用技术》，杨松成等的《有机质谱在生物医药中的应用》，王维国等的《有机质谱在环境农业和法庭科学中的应用》，苏焕华等的《有机质谱在石油化学中的应用》。这套丛书的编著者都是多年在质谱第一线辛勤耕耘的质谱专家，有深厚的基础知识和丰富的实际经验，出版这套丛书将为这一领域中的初学者提供完整的参考资料。知悉这套丛书即将出版，我很高兴，特书此序。



2005年7月

本书编著者名单

(按姓氏汉语拼音排序)

- 郭寅龙 中国科学院上海有机化学研究所
胡 蓓 北京协和医院临床药理中心
江 骥 北京协和医院临床药理中心
刘晗青 中国科学院上海有机化学研究所
潘远江 浙江大学化学系
桑志红 军事医学科学院生物医学分析中心
王洪允 北京协和医院临床药理中心
杨松成 军事医学科学院生物医学分析中心
俞翀天 中国科学院上海有机化学研究所
再怕尔·阿不力孜 中国医学科学院药物研究所

前 言

质谱诞生于 20 世纪初期，开始主要用于同位素及其丰度的分析测定。质谱在化学分析领域用于有机物的定性和定量分析始于 20 世纪 40 年代早期，随之得到了迅猛发展。将有机质谱与核磁共振波谱、红外吸收光谱、紫外吸收光谱联合起来应用（即所谓的四大光谱），完全革新了有机化学工作者测定和研究有机化合物结构的工作方式。有机质谱在生物医药学中最早涉及的领域是药物代谢的研究。目前在新药的研究中，从新药先导化合物的发现到新药的生产、销售和储存等整个新药研发过程中，有机质谱均发挥着重要的、不可取代的作用。

在质谱的发展过程中，20 世纪 80 年代后期出现了历史性的巧合，同期出现了电喷雾电离技术质谱和基质辅助激光解析电离技术质谱，开创了有机质谱分析研究蛋白质等生物大分子的新纪元，对生命科学的发展产生了重大的影响。当前有机质谱是蛋白质组学和代谢组学中的关键核心技术，成为探索生命奥秘的重要工具之一。

本书深入浅出地论述了有机质谱在生物医药学中的应用，全书共有 6 章。第一章由杨松成编著；第二章由郭寅龙、刘晗青和俞翀天编著；第三章由桑志红编著；第四章由再怕尔·阿不力孜编著；第五章由潘远江编著；第六章由王洪允、胡蓓和江骥编著。

由于编著者的水平有限，书中难免存在疏漏和不妥之处，恳请读者批评指正。

编著者

目 录

第一章 有机质谱在蛋白质组学中的应用	1
第一节 蛋白质组学的类型	2
一、表达蛋白质组学	2
二、功能蛋白质组学	3
三、结构蛋白质组学	3
第二节 蛋白质组学中的研究技术	3
一、样品的制备	3
二、蛋白质的分离	4
三、蛋白质的质谱鉴定	7
四、定量蛋白质组学	12
五、蛋白质组学的研究策略	17
第三节 蛋白质组学的主要应用	23
一、蛋白质表达谱的研究	23
二、蛋白质翻译后修饰的研究	23
三、蛋白质-蛋白质相互作用的研究	25
四、生物标志物的检测和分析	27
第四节 小结	32
参考文献	32
第二章 生物质谱在生物分子间非共价相互作用研究中的应用	37
第一节 概述	37
一、生物质谱的概况	37
二、生物分子间非共价相互作用研究手段的比较	39
三、生物质谱研究生物分子间非共价复合物的概况和进展	41
四、电喷雾质谱研究生物分子间非共价复合物的实验参数	43
第二节 蛋白质和其他生物分子的非共价相互作用的研究	44
一、蛋白质-蛋白质(多肽)的非共价相互作用的研究	44

二、蛋白质/多肽-小分子非共价相互作用的研究	45
三、多肽-金属离子复合物的研究	47
四、蛋白质的其他复合物	48
第三节 核酸和其他生物分子的非共价相互作用的研究	48
一、DNA 和蛋白质的非共价相互作用研究	49
二、RNA 和蛋白质非共价复合物的研究	50
三、DNA 和小分子的非共价复合物研究	51
四、DNA-金属离子复合物的研究	52
参考文献	54
第三章 糖基化蛋白质的生物质谱分析	60
第一节 糖蛋白的特点	61
第二节 糖蛋白的生物质谱分析	63
一、质谱技术	63
二、糖蛋白的质谱分析	65
第三节 小结	71
参考文献	71
第四章 质谱技术在天然药物研究中的应用	73
第一节 分子量的确定	74
一、EI-MS 及 CI-MS 的应用	74
二、FAB-MS 和 ESI-MS 的应用	75
第二节 串联质谱方法在天然产物结构分析中的应用	79
第三节 天然产物混合物的成分分析	90
一、天然产物混合物中已知成分的结构分析	91
二、在天然产物未知成分结构分析中的应用	91
三、在天然产物成分定量分析中的应用	96
第四节 小结	97
参考文献	97
第五章 质谱在组合化学研究中的应用	100
第一节 前言	100
一、组合化学基础	100
二、组合化学中的质谱分析法	100
第二节 质谱在组合化学库识别及反应跟踪中的应用	101
一、质谱在组合化合物库中的应用	102

二、MALDI-MS 在组合化学反应跟踪中的应用	105
三、ESI-MS 在组合化学反应跟踪中的应用	105
第三节 质谱在纯化组合化学库中的应用	107
第四节 质谱在化学库生物活性成分筛选中的应用	109
一、生物亲和筛选	110
二、筛选修饰过的蛋白质	112
三、催化剂的筛选	113
第五节 小结	114
参考文献	115
第六章 串联质谱技术与药代动力学和药物代谢研究	117
第一节 串联质谱技术的基本原理	117
第二节 串联质谱与色谱联用技术	121
一、LC-MS/MS 联用系统的整合: API 接口技术实现了液-质真正意义 上的联用	122
二、LC-MS/MS 接口技术的新进展	123
三、LC-MS/MS 与药物研究	124
第三节 串联质谱技术与药代动力学研究	124
一、新药研究与药代动力学	124
二、串联质谱技术在现代药代动力学研究中的作用	126
三、LC-MS/MS 在药代动力学研究中的定量策略	129
第四节 串联质谱技术在药物代谢研究中的应用	144
一、串联质谱技术确证代谢物结构的基本步骤	144
二、串联质谱技术在药物代谢产物结构确证中的应用	145
参考文献	149
附录	152
I. 缩写符号表	152
II. 有机质谱中常用同位素的精确质量和丰度	154

第一章 有机质谱在蛋白质组学中的应用

人类基因组计划于 1990 年启动,经多个跨国研究团队十多年的努力,于 2001 发表了人类基因组框架图^[1,2],并于 2003 年完成了人类基因组的全部测序^[3]。这是生物学发展史上的一个里程碑。随着人类基因组计划的实施和推进,生命科学已进入了后基因组时代。后基因组时代生命科学研究的重点是基因的功能,即功能基因组学。当前世界范围内的科技工作者正在从转录组学、蛋白质组学和代谢组学等重要途径探索基因的功能。

蛋白质是细胞按基因蓝图制造的最终产物,是关键的结构和功能分子,是生命活动的执行者和体现者。1994 年 Wilkins 和 Williams 首先提出了蛋白质组 (proteome) 的概念,蛋白质组是一种细胞,或一种组织内的基因在一特定条件下表达的所有蛋白质。蛋白质组学 (proteomics) 是 20 世纪 90 年代中期出现的一门新兴学科,它研究一种生物体、一种器官或一种细胞器中所有蛋白质的特性、含量、结构和其生化与细胞功能,以及它们随空间、时间和生理状态的改变而发生的变化^[4]。蛋白质组学是以细胞或生物体内存在的全部蛋白及其活动规律为研究对象,它是继基因组学之后,在分子水平了解生命过程的逻辑性的第二步,是后基因组时代生命科学研究的核心内容之一。

早在蛋白质组概念提出之前的 1975 年, O'Farrell^[5]、Klose^[6] 和 Scheele^[7] 引入了二维凝胶电泳,并用其分别对大肠杆菌、小鼠和豚鼠的蛋白质图谱进行了类似的研究。这些研究可将很多的蛋白质分离和显示,但不能鉴定。其后有人提出了人类蛋白质大规模分析计划,该计划的目标是应用二维凝胶电泳和其他方法,把所有人类蛋白质编成目录,称之为人类蛋白质索引 (human protein index)^[8]。但由于资金和技术上的限制,该计划未能继续实行。

随着科学技术的发展,现已出现了一套进行蛋白质组学研究的新技术,其中质谱是关键核心技术。质谱起始于 20 世纪初期,质谱中的有机质谱是分析研究气态有机分子离子的理化特性的一门科学。至 20 世纪 60 和 70 年代,有机质谱

已发展成为近代结构化学和分析化学中强有力的分析研究工具。但当时它只能分析研究分子质量小于 1000Da 的有机小分子。在 20 世纪 80 年代末期,在质谱的发展史上出现了重大突破,同期出现了电喷雾电离串联质谱 (electrospray ionization tandem mass spectrometry, ESI-MS/MS) 和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS), 开创了有机质谱分析研究蛋白质等生物大分子的新纪元,对生命科学的发展产生了重大影响。电喷雾电离和基质辅助激光解析电离的两位发明人,美国的 John Fenn 教授和日本科学家田中耕一因此荣获了 2002 年诺贝尔化学奖。美国质谱学会于 2002 年给 Henzel、Stults 和 Watanabe 三位科学工作者颁发了杰出贡献奖,表彰他们将质谱技术应用于蛋白质组学所取得的成就。在颁奖书中曾写道:质谱能从复杂的样品中快速地鉴定蛋白质,导致了蛋白质组学的兴起^[9]。

自 20 世纪 90 年代初期以来,蛋白质组学在国际上的发展十分迅速,其基础理论、实验技术和应用研究正在不断进步。许多国家和一些跨国的制药和生物技术公司相继建立了蛋白质组学研究中心和蛋白质组学技术平台,在国际上建立了相应的互联网站和多种蛋白质数据库。2001 年 4 月在美国成立了国际人类蛋白质组组织 (human proteome organization, HUPO),之后各地区和各国的蛋白质组组织也相继成立。HUPO 相继启动了人类血浆蛋白质组计划、人类肝脏蛋白质组计划、人类脑蛋白质组计划,大规模抗体计划和蛋白质组标准计划等蛋白质组学国际合作研究计划, HUPO 还每年召开一次国际蛋白质组学大会,进行国际学术交流,促进国际蛋白质组学研究^[10]。

本章主要综述和讨论质谱在蛋白质组学中的应用。美国冷泉港实验室 2003 年出版的教科书《蛋白质和蛋白质组学:实验指南》(Protein and Proteomics: A Laboratory Manual)^[11],是一本很有实用价值的参考书。

第一节 蛋白质组学的类型

一、表达蛋白质组学

表达蛋白质组学 (expression proteomics) 是定性和定量研究一种基因、一种细胞或一种生物在特定生理条件下的蛋白质表达分布型 (protein expression profile),即表达的所有蛋白质及其含量。它是蛋白质组学中最基础的研究之一。差异蛋白质表达,可对正常组织和疾病组织的完整蛋白质组或亚蛋白质组的表达进行比较。它能在整体蛋白质组水平上研究信号传导的细胞通路,以及疾病、药

物和其他刺激所引起的蛋白质组的变化。通过表达蛋白质组学研究，能够鉴定信号传导中的新蛋白质，鉴定疾病的生物标志物和药物的靶标等。

二、功能蛋白质组学

顾名思义，功能蛋白质组学（functional proteomics）研究蛋白质的生物功能。它研究蛋白质翻译后的修饰，蛋白质-蛋白质相互作用和蛋白质的亚细胞定位等。它的范围很宽，包含了许多专一、定向的蛋白质组学研究途径。在一些情况下，可用亲和色谱分离特殊的亚蛋白质组，然后作进一步的分析研究。它可对蛋白质复合物进行分离，或用蛋白质的配体分离特殊类型的蛋白质。这样可以对特殊选择的一组蛋白质进行研究和鉴定，从而获得蛋白质信号、疾病机理和蛋白质与药物相互作用等重要信息。

三、结构蛋白质组学

蛋白质的三维结构常常能提供蛋白质的生化和细胞功能信息。结构蛋白质组学（structural proteomics）研究蛋白质和蛋白质复合物的三维结构，以及蛋白质存在于特殊细胞器中的结构。它意在鉴定蛋白质复合物中或细胞器中的所有蛋白质，测定这些蛋白质的定位位置，并探索所有蛋白质与蛋白质之间的相互作用。核孔复合体（nuclear pore complex）的分析是结构蛋白质组学研究的一个例子^[12]。特殊亚细胞器的分离，或蛋白质复合物的纯化，能够大大简化蛋白质组学的分析。汇集所有的研究信息，将能组成细胞的全部结构，并说明某些蛋白质的表达如何使细胞具有独特的特性。本章不涉及这一内容。

第二节 蛋白质组学中的研究技术

一、样品的制备

样品的制备即从细胞和组织中提取蛋白质，是任何蛋白质组分析中关键的步骤之一。从细胞和组织中提取蛋白质，涉及蛋白质的提取量、蛋白质的活性以及靶蛋白结构的完整性。所应用的提取方法，应当是用最小的破裂力，获得细胞的最高破裂度，保持蛋白的完整性，而且重复性好。

哺乳动物组织的细胞膜比较脆弱，样品制备相对简单，组织洗涤后即可进行样品制备。培养的哺乳动物细胞由于没有细胞壁，可用含温和的去污剂方法处理溶化。若制备的样品不保持靶蛋白的三维结构或生物活性，可在较严格变性的条件下使细胞溶化。样品制备方法包括细胞裂解和蛋白质溶解，通常用含有离液剂、去污剂、还原剂、载体两性电解质和蛋白酶抑制剂的溶液制备。详细的样品制备方法，可参见文献 [11] 中“细胞和亚细胞提取物的制备”一节。

二、蛋白质的分离

(一) 一维和二维聚丙烯酰胺凝胶电泳

一种细胞或一种组织中所含的蛋白质成千上万，要对它们进行识别，首先要对其进行分离，使蛋白质混合物分离成单一的组分，以便进行显色和鉴定。一维聚丙烯酰胺凝胶电泳 (one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 1D PAGE) 是一种分离蛋白质混合物的方法。在 1D PAGE 中，应用阴离子去污剂十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 使蛋白质变性并与之结合，然后按照蛋白质的分子量对其进行分离。1D PAGE 简单，易行，而且重复性好，可以分离分子质量 10~300kDa 的蛋白质。其应用比较广泛，但在分离复杂的蛋白质混合物时，其分辨力不足。

二维聚丙烯酰胺凝胶电泳 (2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2D PAGE)，是当前最强有力分离复杂蛋白质混合物的技术，能同时分离数千甚至上万个蛋白质。2D PAGE 的分离原理可用图 1-1 说明，它的高分辨能力是来源于它的一维和二维的分离原理，依据蛋白质的两个互不相同的特性。在一维中是根据不同蛋白质所带电荷量的不同，用等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF) 分离蛋白质。在二维中将蛋白质与 SDS 形成复合物，在 SDS-PAGE 上与一维成垂直方向根据蛋白质分子量大小的不同进行分离。因此它可提供蛋白质的 pI 值和分子量的有价值的信息。

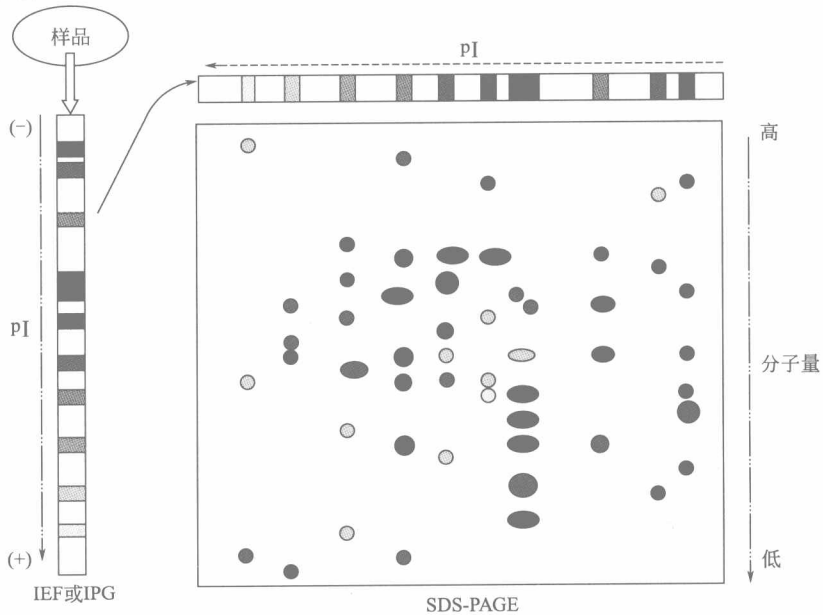


图 1-1 二维凝胶电泳原理

2D PAGE 是 20 世纪 70 年代中期引入的^[5~7]。用固相 pH 梯度凝胶条 (immobilized pH gradient gels, IPG)^[13]作一维分析而发展起来的 2D PAGE, 已克服了原 2D PAGE 重复性差的缺点。应用已商品化的 IPG, 操作规程的标准化和实验方案的不断发展, 已推动建立了 2D PAGE 数据库, 如 SWISS-2D PAGE 和 yeast 2D gel databases^[14,15], 能够通过网络进行世界范围内的信息交流。

复杂的蛋白质混合物用 2D PAGE 分离后, 染色显示 2D PAGE 上的蛋白质斑点。通常用考马斯蓝 (Coomassie blue) 或改进的银染色法染色, 这些染色法与以后的质谱分析是兼容的^[16]。染色后的 2D PAGE 可用特殊软件进行计算机辅助图像分析, 如此可对蛋白质斑点进行定量, 对多个 2D PAGE 胶上蛋白质斑点的图形进行匹配和比较, 还可进行统计分析, 对变异、差异和相似性进行评价。

2D PAGE 作为一种分离技术, 具有高分辨力, 能区分蛋白质的异构体和分辨蛋白质不同的翻译后修饰状态等特点。但 2D PAGE 是一种变性技术, 它不适合分析蛋白质的复合物和蛋白质-蛋白质相互作用。

2D PAGE 的一个重要进展是推出了所谓的差示凝胶电泳 (difference gel electrophoresis, DIGE)^[17]。它是用 2 个不同的染料标记 2 个蛋白质样品, 然后 2 个标记的蛋白质样品同时进行同一的二维凝胶电泳分离, 最后凝胶进行荧光成像生成 2 个图像。它是以图像叠加的方式来鉴别蛋白质分布型的差异, 这一技术现已商品化。

当前绝大多数实验室对 2D PAGE 上的蛋白质斑点进行鉴定时, 是先将 2D PAGE 上单个蛋白质斑点刮下, 进行胶内酶切, 然后用质谱鉴定。二维凝胶电泳和胶内酶切的具体实验参见文献 [11]。大量的实验研究表明, 2D PAGE 在分离蛋白质方面有很多的局限性, 它不仅操作费时费力, 在一维分离时疏水性的蛋白质不能进入胶内而不适合分离脂溶性蛋白质, 也不能分离低丰度的蛋白质, 以及酸性或碱性极强和太大、太小的蛋白质。

(二) 液相色谱分析方法

2D PAGE 的局限性促进了非凝胶电泳分离方法的应用和发展。液相分离方法是其中应用比较广泛的, 它包括高效液相色谱 (HPLC)、毛细管等点聚焦 (CIEF) 和毛细管电泳 (CE)。

在液相分离方法中可通过分离完整蛋白质混合物和多肽混合物两种方式进行。完整蛋白质混合物液相分离方式中, 一种很有希望的技术是应用毛细管等点聚焦和傅里叶变换离子回旋共振质谱 (CIEF-FTICR-MS) 鉴定提取的完整蛋白质的混合物。在此方法中, CIEF 以 pI 分离完整蛋白质, 再用 FTICR-MS 进行

分析, 可得到一个二维显示的结果, 类似于 2D PAGE^[18,19]。

在多肽混合物的液相分离方式中, 复杂的蛋白质混合物通常先用胰蛋白酶对其进行酶切, 然后将酶切后得到的复杂的多肽混合物通过高效纳升柱液相色谱进行分离, 并与质谱直接联机分析。在一维分析中, 长 10cm 内径 50~100 μ m 的纳升柱内填充反相 C₁₈ 填料, 应用 HPLC 乙腈的梯度, 典型流速是 100~200nL/min。分离后从纳升色谱柱流出的多肽进入质谱仪后质谱扫描检测完整的多肽离子。在串联质谱的数据依赖性分析中 (data-dependent analysis, DDA), 仪器自动扫描检测离子, 并根据事先设定的离子强度、 m/z 或电荷状态选择肽离子, 经 CID 而获得 MS/MS 质谱数据^[20]。LC-MS/MS 可常规应用分析一些比较复杂的多肽混合物, 但 1D LC 技术的分离能力常常不能满足更复杂的多肽混合物分离的需要。1999 年 Yates 等^[21]建立了用双相串联纳升色谱柱的具有更高分辨率和更高容量的二维分离系统 (two-dimensional separation), 即所谓的多维蛋白质鉴定技术 (multidimensional protein identification technology, MudPIT)。在此技术中, 一个 3~5cm 强阳离子交换树脂 (SCX) 的色谱柱串联于 C₁₈ 反相纳升色谱柱之前。SCX 填料较 C₁₈ 填料对样品具有更大装载容量, 它可作为多肽的存储器。在 2D 分离时, 在盐浓度增加的 LC 梯度分离中, 从 SCX 柱洗脱下的多肽混合物进入反相 C₁₈ 柱, 并用乙腈梯度进行分离, 色谱柱再平衡之后, 用增加盐浓度从 SCX 柱置换下的另一份多肽混合物再进入 C₁₈ 柱进行分离。如此反复运行直到 SCX 柱上储存的多肽被洗脱完为止。此 2D 分离方法能分离更多的蛋白质混合物, 而且可在混合物中检出低丰度的蛋白质。在 2D LC 分析中, SCX 色谱柱上储存的多肽混合物的洗脱最初是用不同浓度的盐溶液, 一步一步逐步洗脱, 现可用二元泵进行盐浓度的梯度洗脱, 获得更高的分辨率。

2004 年 Waters 公司采用 1.7 μ m 的液相色谱柱填料等新技术, 推出超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC)^[22], 大大地提高了色谱的分辨率, 缩短了色谱时间和提高了灵敏度。1D UPLC-MS/MS, 特别是 nano2D UPLC-MS/MS, 在蛋白质组学研究中, 将会发挥更大的作用。

(三) 亲和分离纯化方法

亲和分离纯化方法, 是将抗体或一特殊的分子固化在色谱柱或芯片上, 利用蛋白质与抗体或特殊分子之间的相互作用, 分离纯化特殊的蛋白质或蛋白质组中的一个小组。例如用磷酸化氨基酸的特殊抗体制备的固相亲和柱, 从一蛋白质组中分离出其中的磷酸化蛋白质。

在大规模分析蛋白质-蛋白质相互作用和蛋白质复合物时, 应用抗原决定簇标记 (epitope tagging) 策略来分离纯化蛋白质复合物。如图 1-2 所示, 将抗

原决定簇基因与饵蛋白的基因做成融合基因，然后在细胞内表达，饵蛋白与有关蛋白质形成蛋白质复合物。用抗体固相化的色谱柱对细胞溶解液进行免疫亲和色谱，洗涤去掉不与抗体结合的蛋白质，再将与抗体结合的蛋白质用竞争洗脱从色谱柱上洗脱下来，这样得到的蛋白质最后用 LC-MS 或 1D PAGE/MS 鉴定。

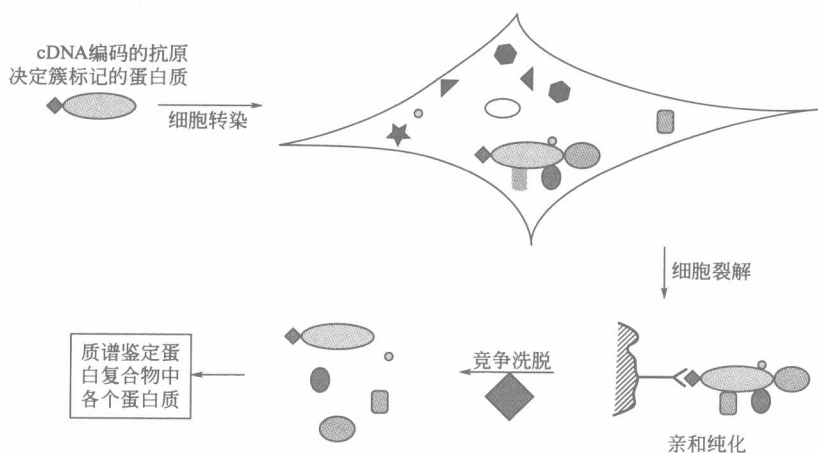


图 1-2 抗原决定簇标记的亲和纯化原理

三、蛋白质的质谱鉴定

(一) 肽质量指纹图鉴定蛋白质

20 世纪 90 年代中期之前，在生命科学领域内鉴定蛋白质是应用 Edman 降解反应的氨基酸测序来进行的。此方法对单个蛋白质的鉴定很有效，但此方法费时费力，而且不适合定性分析复杂的蛋白质混合物。鉴定复杂蛋白质混合物的第一个方法是肽质量指纹图 (peptide mass fingerprinting, PMF) 法^[23,24]。该法首先将复杂的蛋白质混合物用 2D PAGE 进行分离，再将 2D PAGE 上的未知的完整蛋白质斑点用胰蛋白酶在胶内酶切生成多肽 (也可将其他方法获得的纯的未知蛋白质，用胰蛋白酶在溶液中酶切生成多肽)，然后用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)，测定这些多肽的质量，即 PMF。

PMF 法鉴定蛋白质的主要原理是一个蛋白质被胰蛋白酶酶切时，由于胰蛋白酶只酶切蛋白质氨基酸序列中精氨酸和赖氨酸残基的 C 端，所得到的肽片的质量分布即 PMF 具有一定的特异性，不同的蛋白质会产生不同的 PMF。将实验测得的一个蛋白质的 PMF，与蛋白质数据库中每个蛋白质被胰蛋白酶酶切时理论上计算获得数据进行统计比较，从而鉴定蛋白质。图 1-3 是 PMF 法鉴定蛋白