

超级
实用

发现

测定

成像

质谱分析实验指南

[日] 杉浦悠毅 末松 诚 编

蒲小平 王辰 译

蒲小平 张宇 主审

赵欣 孙懿 专业校审



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

质谱分析

实验指南

[日] 杉浦悠毅 末松 诚 编

蒲小平 王 辰 译

蒲小平 张 宇 主审

赵 欣 孙 懿 专业校审



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

著作权合同登记号 图字：01-2015-6723

图书在版编目（CIP）数据

质谱分析实验指南/（日）杉浦悠毅，（日）末松 诚编；蒲小平等译. —北京：北京大学出版社，2017.11

ISBN 978-7-301-28459-9

I. ①质… II. ①杉…②末…③蒲… III. ①质谱法—分析方法—指南 IV. ①0657.63-62

中国版本图书馆CIP数据核字（2017）第147501号

「見つける、量る、可視化する！質量分析実験ガイド」杉浦悠毅，末松 誠/編

Copyright © 2013 by YODOSHA Co., Ltd.

All rights reserved.

Original Japanese edition published in 2013 by YODOSHA, CO., LTD.

- 书 名 质谱分析实验指南
ZHIPU FENXI SHIYAN ZHINAN
- 著作责任者 [日] 杉浦悠毅 末松 诚 编 蒲小平 王辰 译 蒲小平 张宇 主审
赵欣 孙懿 专业校审
- 责任编辑 黄 炜
- 标准书号 ISBN 978-7-301-28459-9
- 出版发行 北京大学出版社
- 地 址 北京市海淀区成府路 205 号 100871
- 网 址 <http://www.pup.cn> 新浪微博：@北京大学出版社
- 电子信箱 zpup@pup.cn
- 电 话 邮购部 62752015 发行部 62750672 编辑部 62754271
- 印 刷 者 北京大学印刷厂
- 经 销 者 新华书店
- 787 毫米×1092 毫米 16 开本 14印张 320千字
- 2017 年 11 月第 1 版 2017 年 11 月第 1 次印刷
- 定 价 150.00 元

未经许可，不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。

版权所有，侵权必究

举报电话：010-62752024 电子信箱：fd@pup.pku.edu.cn

图书如有印装质量问题，请与出版部联系，电话：010-62756370

致 谢

本图书出版获国家自然科学基金（81571354、81202937、81401259），国家重大科学仪器设备开发专项（2013YQ03065106）资助，还荣获河南省协同创新中心的支持，在此表示衷心感谢。代振风同学在文字编辑及英文专业词汇注解方面给予大力协助，在此一并致谢。

注 意 事 项

■关于本书的内容

本书中记载的内容都是根据出版时的最新信息写作完成，笔者、编辑、监制及出版社都为力求本书的准确付出了极大努力。然而，科学、医学、医疗的进步日新月异，质谱相关的定义、概念、技术操作方法及诊断手段等都会有所变化，读者使用本书时，会有一些内容不一定完全正确。另外，本书中记载的一些企业名、商品名、URL等信息也可能会发生一些无法预测的变更，请各位读者理解。

■关于本书中使用的仪器、实验方法（编者注）

本书中使用的仪器、实验方法均用于基础研究。使用了临床样品的实验，自实验开始，事前都制订了具体详细的研究计划，经过实验者所属研究机构的充分审议，受到许可后方可实行。请各位同行尤其注意，不要未经许可，在临床诊断中随意使用本书的仪器和实验方法。

前言

以将质谱分析灵活应用于生命科学研究为目的

本书的目的是，明确在生命科学研究中质谱分析（mass spectrometry, MS）技术能干什么？由此出发，从引进技术的层面入手，进行全面的考察、梳理和介绍。

对于日常不接触前沿 MS 技术的生命科学研究者来说，对其都有“门槛高”之感^①。例如专业性强，不知怎样下手，使用昂贵的仪器，损坏了怎么办？估计有这样主观心理障碍的大有人在。进而也有不知道应该如何选择恰当的质谱仪等所谓的客观障碍^②。

要克服这样的壁垒需要使用 MS 技术的研究人员自身的愿望，其原动力是这个技术对自己的研究有什么用？为了有助于回答这个问题，在书中我们尽量少用专业术语或原理说明，而是始终以生命科学的语境，回答关于 MS 技术能做什么。作为这样的一本工具书，我们进行了周密的策划。针对能拿到书的读者所研究的生物学难题，MS 是如何给出答案的？我们的目标是使读者通过成功的实例获得启发和激励，从而产生应用质谱技术的驱动力。

发现、测定、成像

一览目录就能看到，日本有很多自主开发优越 MS 技术并专心致力于解决各自的生命科学问题的顶尖研究者。本书将以这些实验室为例，对其将 MS 引入生命科学研究的思路进行全方位的说明。

下面以三个 MS “能做到”的事例为切入点。也就是说，MS 能够：

- (1) “发现” 新因子

→【用于鉴定分析的 MS】
- (2) “测定” 生物分子

→【用于定量分析的 MS】
- (3) 对组织局部分子信息“可视化”

→【用于分子成像的 MS】

这样的各种应用都灵活采用了 MS 的特性，并具有其他方法无法取代的优势，能解决很多生命科学研究中的问题。

本书的使用方法

本书分为基本篇和实践篇两部分。然而，读者在阅读中可以根据自己的需要自由地结合两个部分来阅读。

例如，读者可以结合自身生命科学研究中的事例，从后往前，找到解决问题的关键技术和思路，也就是说可以进行逆向查询。

基本篇中介绍的是上述的“三大 MS 应用”的概念以及各个应用中的简单实例。

① “门槛高”语义原指因为做了什么不合理或者丢脸的事而感到愧疚，本文表达的是“感到困难”的意思。然而因为心理障碍而对 MS 技术敬而远之的心理倒是跟原义更为接近，所以才用了这个比喻。

② 此处说的“连接”并不只是指无法连接硬件这一原义，也含有得不到专家的指导的意思。希望本书能成为一本便于使用的质谱分析指南。

实践篇中，我们邀请到了在“三大 MS 应用”中掌握高端技术的作者，结合 MS 在生命科学研究中的适用性和实验实例对其进行解释说明。

首先，请抱有以下疑问或动机的读者（特别是没有 MS 经验的读者），以自己感兴趣的应用部分（实践篇）作为切入点：

“我的研究中是否用到 MS？”

“MS 能做到这些吗？”

“想知道最先进的 MS 应用实例”



由此根据需要，在整部书中寻找需要的专业知识。为此，必要的基础知识（最低限度的）都收集在基本篇里，并进行了解读，所以各位读者也可以先读基本篇，再读实践篇的各篇章。

本书选取的主题都是目前最先进的 MS 应用实例。有一定经验的读者也可以边读边发现一些之前不知道的、“还能做这样的实验”的主题。

总之，如果这本书能让读者走近 MS，对各位同行的研究有所帮助的话，将深感荣幸。

杉浦悠毅
2013 年 3 月

本书的构成

为了使读者掌握下图所示的MS的“发现、测定、成像”三大功能，本书编辑成了可以从基本篇、实践篇、附录的任意部分开始阅读的形式。

基本篇

会对

(PP.9~46)

- “质谱分析能分析哪些生物样品”
 - “为什么需要连接色谱仪”
 - “ESI、MALDI都是什么的简称？离子化是什么意思？”
- 等问题进行解答，并对质谱分析的原理、基本知识时行解说

实践篇

会对

(PP.47~204)

- “想分析电泳分离得到的蛋白质”
- “想测定血清样品中目的因子的浓度”
- “想知道质谱成像和CE/MS组合测定的实验实例”

等目的、兴趣点作出相应的分析方法和应用实例介绍中，会挑选重要的实验



主导方案

步骤进行相关介绍

附录

会对

(PP.205~211)

- “想尽快学会专用术语”
- “那么，到底应该使用哪种质谱分析仪呢？”

等，帮助理解正文并就开始实验的信息进行相关介绍

对氨基酸进行网络式……
对生理活性脂质进行……
对microRNA进行……
对气体分子进行……
对代谢能量进行……
对氧化应激指标进行……
对蛋白质结构变化进行……

定量

“测定” 生物因子

(用于定量分析的MS)

“发现” 新因子

(用于鉴定分析的MS)

对凝胶中的蛋白质进行……
对翻译后修饰进行……
对小分子疾病分子进行 (代谢组学) ……
对蛋白质分子进行 (蛋白质组学) ……
对感染细菌种类迅速进行……

鉴定

“成像” 分子分布信息

(质谱成像)

对能量代谢进行……
对炎症介质分子进行……
对金属元素分布进行……
对药物全身分布进行……

成像

⇒接下来，就让我们和这本实验指南一起，踏上质谱分析的旅程！

目 录

■ 前言	杉浦悠毅
■ 本书的构成	5

基本篇

—原理和基础知识—

1 生命科学研究中质谱分析应用方法	杉浦悠毅	2
2 掌握MS实验的具体框架	杉浦悠毅	10
3 “发现”质谱分析 定性MS的基础和原理	杉浦悠毅, 新闻秀一	18
4 “测定”质谱分析 定量MS的基础和原理	杉浦悠毅, 新闻秀一	29
5 “成像”质谱分析 质谱成像的基础和原理	杉浦悠毅, 新闻秀一	37

实践篇

—以实验方法为中心—

第 I 章 用质谱分析“发现”未知因子

1 发现配体结合蛋白质	加部泰明, 末松 诚, 半田 宏	48
2 翻译后修饰的检测与鉴定 以微管蛋白翻译后修饰新发现为例	池上浩司, 新闻秀一, 濑藤光利	59
3 探知表达变化的蛋白质 以新蛋白质组学的绝对定量为例	松本雅记, 中山敬一	71
4 发现疾病生物标志物 以CE/MS发现重症抑郁障碍血液生物标志物为例	藤森玉辉, 大桥由明, 川村则行	81
5 迅速鉴定微生物种类	松山由美子, 工藤寿治, 川口寿太郎, 韭泽 崇	89

第 II 章 用质谱分析“测定”已知因子

6 测定氨基酸 依据PFAA表达谱的癌症早期发现方法	今泉 明, 吉田宽郎	98
7 测定酸性溶血磷脂	中西广树	106

8 测定miRNA..... 坂口裕理子, 铃木 勉 112

9 测定气体分子 使用硫醇探针对H₂S进行定量 菱木贵子 120

10 测定细胞能量代谢 缺氧环境下代谢通量的定量 南嶋洋司 132

11 测定细胞氧化应激 以亲电子化合物8-nitro-cGMP的定量为例
.....泽 智裕, 居原 秀, 赤池孝章 139

12 测定蛋白质的“结构变化” 山本龙也 147

第Ⅲ章 用质谱分析“成像”

13 细胞“能量代谢”成像 杉浦悠毅, 梶村真弓 157

14 慢性炎症组织中溶血磷脂成像..... 杉浦悠毅, 花田 充, 本多久乐乐 170

15 “药物代谢动力学”成像 新闻秀一, 滨田哲畅 180

 主导方案	选择最重要的实验步骤进行说明
• 用 Nano LC/ESI-MS 系统进行 MS 测定、数据库检索的详细步骤	解说：山本龙也 53
• 用双向电泳进行蛋白质分离、凝胶内消化的详细步骤	解说：新闻秀一 62
• 采用三重四级杆 LC/MS/MS 系统 MRM 法分子定量的详细步骤	解说：中西 豪 125
• 质谱成像中组织切片样品制备、MS 测定的详细步骤	解说：杉浦悠毅 160

第Ⅳ章 质谱分析研究策略

16 向着代谢系统生物学的新理解迈进
.....末松 诚, 大村光代, 森川隆之, 笠原正贵, 久保亚纪子, 南嶋洋司, 梶村真弓 191

结束寄语——写给即将踏上质谱分析之旅的各位朋友
..... 末松 诚 203

附 录

1. 为初学者准备的质谱分析专业用语集 206

2. 适合各实验目的的质谱仪种类简介..... 208

索 引 212

专栏	—前沿应用介绍—	杉浦悠毅
· 领域改变，质量也会发生变化		46
· 不同领域装置的融合	用质谱流式细胞仪进行多重抗体标记和细胞分析	97
· 金属元素分布的质谱成像		189



基本篇

—原理和基本知识—

1	生命科学研究中质谱分析应用方法	2
2	掌握 MS 实验的具体框架	10
3	“发现” 质谱分析 定性 MS 的基础和原理	18
4	“测定” 质谱分析 定量 MS 的基础和原理	29
5	“成像” 质谱分析 质谱成像的基础和原理	37

1

生命科学研究中质谱分析
应用方法

杉浦悠毅

为了引导未曾使用过质谱仪进行实验的读者入门，本章将首先以生命科学研究中质谱分析（mass spectrometer, MS）是什么，能知道什么？（发挥什么作用？）为主题进行解说。



前言

首先请问，各位读者身边有质谱仪吗？使用动物或细胞的生命科学实验室的大多数人可能在所属研究室内见不到质谱仪的踪影，但是应该在公共仪器设施或合作者的实验室中见过。考虑到购买、维护管理的费用，以及维修的专业性和劳动力，大多数人可能认为相对于一个实验室维护使用一台仪器来说，整个研究所共用一台较为妥当。

然而，日常科研中接触不到的实验仪器的实验意义及其操作方法大家会觉得陌生。这一点造成了生命科学研究者亲自动手做MS实验的心理障碍。因此，即便有预算可以购买，买回来的高价格、高性能质谱仪也会作为“镇座之宝”，“在神龛被供奉起来”，这样的情况笔者屡见不鲜（图1）。

在这种情况下，要学习将MS应用于实际当中，其知识和技术有着相当高的难度。虽说任何实验都有共通点，每个实验都会重复着尝试和失败。积累各种实践经验，才是实验成功的基础。

所以这个过程中我们缺乏的是，对于实践中“灵活应用MS能解决哪些生命科学研究问题”的理解。



应用一台质谱仪能做到的事情非常多

能将MS作为自己的生命科学研究工具，灵活应用其强大功能的实验室不在少数。耳闻目染这些研究实例后，我感到如果能将质谱仪作为生命科学研究中的“常规仪器”多加运用，那么能得到验证的生命现象及其规律将大幅度增加。

例如，进行某种生命现象研究时，可能会遇到需要对动物、脏器、细胞、分子等各种水平的样品中的生物分子进行分析的情况。对核酸、蛋白质的研究还能用一般方法完成。然而，对其他生物分子的分析则束手无策。

例如，细胞实验中，您是否也考虑过这些问题呢？针对外加刺激进行应答的细胞内cAMP是如何变化的？同时，如果能定量分析疾病组

正确使用质谱分析仪



图1 如同“神龛”一样的镇座之宝——质谱仪不就表现出生命科学研究者对MS的敬畏心理吗？

织中蓄积的脂质就好了……或者有些读者也可能迟早会遇到这样的情况；想要（提前）迅速知道某蛋白质的结合对象，想看到给动物用药是否高效地到达病变部位的图像。如果这时身边有质谱仪的话，应用恰当的知识自己动手就能灵活（且快速）地开展验证自己的假说的实验。

笔者在此要强调的是，MS的优点是其广泛适用性（基本上什么都能做），而不是只能用于某种特定专业用途的仪器。灵活应用其特性，研究者就可能按照实验目的自行组合出一套前所未有的测定方法。

实际上（如同本书介绍的那样），MS可应用于不同水平的生物样品（图2）。而且，质谱仪

的价格正在逐年降低。几年前，虽说像F1机那样的高价、高性能的仪器每年都有升级版的新款推出。然而，近年来有些制造商倾向于生产性能足够好，价格比较低的仪器。这种状态今后可能还会持续下去。

然而，即使我们有使用MS的打算，（即便价格正在降低）也还是存在着高价格的问题。目前存在的客观障碍和主观心理障碍，很遗憾本书无力解决前者。诚然，不管现实存在着什么样的障碍，如果没有“试着使用MS”这一原动力，这些障碍都无法清除。因此，下面我们就“MS能做些什么”这个问题进行一些探讨。

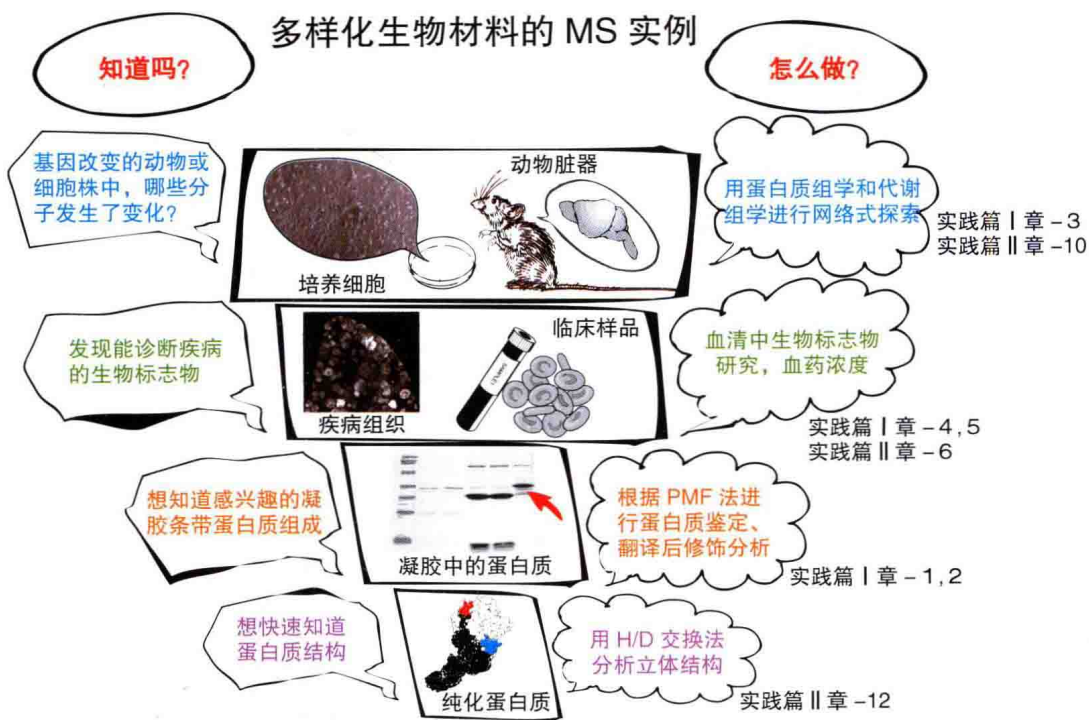


图2 MS的优点是其广泛适用性，实际应用于丰富多彩的实验

充分利用 MS 的广泛适用性，对从动物组织或临床样品到纯化的某种分子等各种水平的样品进行 MS 实验（请参考本书各章节）

MS 与光学仪器比较有哪些特性？

虽然仪器昂贵、专业性高等都被列为“MS 入门的难点”，但仔细回想一下，其实各研究室都有很多人使用最新型的光学仪器，特别是显微镜（事先预约要用共聚焦显微镜的人尤其多）。其中可能也有使用双光子显微镜、超分辨率显微镜等先进光学仪器的读者。

这些仪器与 MS 相比称得上是价格昂贵，专业性强，是培养生命科学研究人才不可或缺的大型仪器。这类光学仪器对生物学家来说有着“眼见为实”这一直观的呈现结果的方式。从虎克显微镜观察开始，通过这些光学仪器，就可以感受到

连绵不断的生物学发展过程。

另一方面，MS 归根结底是基于物理学和工程学的学问。因此对生命科学研究者来说，很难理解质谱仪内部到底是如何运行的。MS 得出的数据也是多维的，实在不能称之为直观。然而它具有光学仪器所不具备的特性，以及唯有 MS 能够提供提供的信息。

那么，质谱仪内部到底是如何运行的呢？由此能知晓什么吗？

相比调控使用“光”的光学仪器来说，MS 调控的是“目的分子本身”^{*1}（图3）。MS 是将分子变成离子（即带电粒子），精确调控其在质谱仪内的运动，由此直接提取出目的分子的大量信息（质量、含量、分子结构信息）的独特方法。



图3 质谱仪内部到底是如何运行的呢？由此能知晓什么吗？

能将所有分子离子化，调控其运动，进而提取丰富的相关信息

稍说点儿题外话，发现了希格斯玻色子的粒子加速器也能使粒子带电并调控极小的基本粒子。甚至能在全长约27 km的巨大加速器内，进行直径为 1.755×10^{-15} m的质子间碰撞这样的高精度实验。

样能通过电磁场调控无法直接碰撞的带电粒子，进而直接提取分子信息。

MS能帮我们做什么

MS的特点是能够对复杂多样的机体分子进行分析，具有以下三个特性（图4）。

【特性1】能够广泛分析多种机体分子

凡能成为带电粒子（离子）的机体分子都能成为广泛的分析对象。因此，从微量金属元素、气体分子等难以制作探针的低分子化合物，到蛋白质、RNA等大分子，这些构成机体的各种分子都能成为分析对象。

而且，有些分子目前只能用MS进行分析。

※1 MS的对象分子

元素（原子）的分析中也会用到，所以准确地说是带电的“粒子，即离子”。

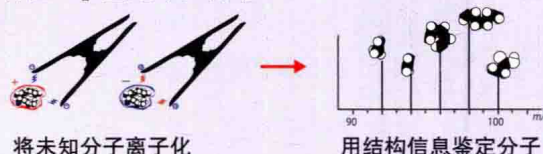
※2 离子光学

调整离子轨道相关的学问被称为离子光学（ion optics），其本质上与光路的调控相同，能使直线运动的离子轨迹“弯曲”或“集聚”。这种技术在电子显微镜中也有应用。

【特性1】能够广泛分析多种机体分子



【特性2】鉴定未知分子



【特性3】一次性测定多种分子

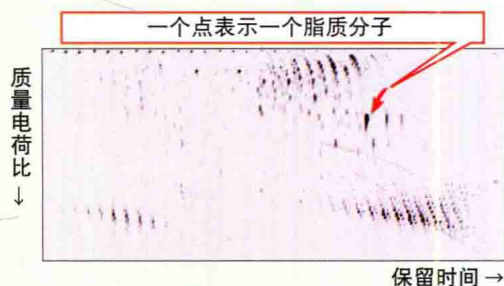


图4 生命科学研究中非常有用的质谱分析的三大特性

【特性2】能够鉴定未知分子

借助MS能够得到分子本身的结构信息。所以可以鉴定出实验前未曾预料到的分子或者未知分子。另一方面，使用探针（抗体等）的方法需要预先制作或选择探针，不适用于未知分子的鉴定。

【特性3】能够一次性测定多种成分（网络式分析，即组学）

能够一次性测定多种分子。根据这个特点，MS常被灵活应用于对机体分子群进行网络式分析的差异蛋白质组学、差异代谢组学中。

附录：快速

与抗原抗体反应、PCR等耗时（>1h）的方法相比，MS得到一张质谱图谱耗时1s以下。当然，虽说前处理以及与色谱仪组合进行的测定要花费很多的时间，但是能够立刻得到待测物分子信息的快速反馈是MS的一大特征。

那么，MS究竟能做些什么？ ——发现、测定、成像？

事实上，在生命科学研究中MS早已不是次要的实验方法了。在PubMed检索关键词“mass spectrometry”，能检索出193070篇热门论文。当然不能简单地用相关论文条数进行比较，但是这个数量与RNA分析方法“*in situ hybridization*”（107989条）和“PCR”（294466条）相比能处于中等水平，随着年数增长，论文条数也有逐年增加的趋势。

然而MS的广泛适用性带来的多种多样的用途，使得生命科学研究中MS的应用难以以一概全。所以本书将对MS分以下三个主要应用方面进行论述。

① “发现”新因子

→用于分子种类/因子鉴定分析的MS

② “测定”生物分子

→用于定量分析的MS

③对组织局部分子信息“可视化”

→用于分子成像的MS

①“发现”新因子

对凝胶中的蛋白质……
对翻译后修饰……
对小分子疾病分子（代谢组学）……
对蛋白质分子（蛋白质组学）……
对感染细菌菌种迅速……

↓
进行鉴定

1. 能够鉴定未知因素 X

MS对分子进行“发现，即鉴定”的能力出类拔萃。

生物学实验阐明某生理现象，通常以①提出假设、②验证假说这样的模式进行。然而提出假设的时候会出现“可能与该现象有关系的因子”，于是其他因子不会成为验证对象（该假设不成立时下一个因子才能被验证）。然而当这种因子列表特别长的时候，当然不能实现对所有因子的验证。更何况预期不到的未知因素X根本不在列表上。

例如，“探究某蛋白质的结合对象”实验。现在广泛使用的是对免疫沉淀后纯化的结合对象进行MS鉴定的方法。请注意该方法可以鉴定预先未知的结合对象（当然对每个可能的对象进行Western blot鉴定并不可行）。这样MS便能发挥其从无数因子中鉴定出目的因子（而且快速）的威力。在此，上述的具有能鉴定未知分子特性（特性2）的MS分析，对完成此类实验功能强大。

如**实践篇 I 章-1**将要讲到的，电泳分离的“蛋白质X”的鉴定是最为流行的MS实验。作为应用篇的**实践篇 I 章-2**中会进一步

讲到用MS进行蛋白质的翻译后修饰分析，鉴定蛋白质“哪个部位”进行了“怎样的修饰”的实例。

2. 依据组学进行网络式探究：造成该现象的原因是什么？

蛋白质组学、代谢组学能在无已知信息的情况下，将对值得关注的现象“进行解释”的因子从成千上万的因子中挑选出来。因此，不根据已有见解也能够建立假说。这就要通过灵活应用MS的一次性测定多种成分（特性3）+鉴定未知分子（特性2）这两点来发挥作用。

例如研究者制作目的基因敲除小鼠，意外发现了与预期不同的表型。在这种情况下，就需要阐明自己所发现的这个基因的改变在机体分子网络中引起了什么样的变化，验证这些变化是否为表型。当然，需要验证的这些机体分子数量庞大。因此对完成这种课题来说，能一次性分析多因子（组学※3）的MS就是一个强有力的工具。

使用MS进行的组学测定是以蛋白质组学、代谢组学为代表。从这些组学测定中，分别能得到模型动物（细胞）和对照样品中蛋白质群或代谢产物群网络式测定的总蛋白质和总代谢产物的表达图谱。之后，根据这些差异，提取出引起生理变化的主要因子，就能得到建立假说的核心信息。

※3 组学

组学是希腊语中意为“所有、全部”的词缀（-ome）和意为“学科”的词缀（-ics）组合形成的词语。随着基因组 Genomics、转录组 Transcriptomics 概念的渗透，这些用语及其概念也在生命科学的各个领域广为人知。