

国家新闻出版署『十五』规划重点图书

BIOORGANIC
MASS SPECTROMETRY

赵玉芬 著

生物有机质谱

BIOORGANIC
MASS SPECTROMETRY



郑州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物有机质谱/赵玉芬著. —郑州:郑州大学出版社, 2005. 10
(化学生物学丛书)
ISBN 7-81106-070-1

I. 生… II. 赵… III. 生物化学-有机分析-质谱法 IV. Q503

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 043297 号

郑州大学出版社出版发行

郑州市大学路 40 号

出版人: 邓世平

全国新华书店经销

河南第二新华印刷厂印制

开本: 787 mm × 1 092 mm

印张: 15.5

字数: 298 千字

版次: 2005 年 10 月第 1 版

邮政编码: 450052

发行部电话: 0371-66966070

1/16

彩页: 1

印数: 1 ~ 3 100

印次: 2005 年 10 月第 1 次印刷

书号: ISBN 7-81106-070-1/Q · 2 定价: 45.00 元

本书如有印装质量问题, 请向本社调换

序 言

赵玉芬院士的研究工作始于有机磷化学,后来很快延伸到生命有机、生命起源等范围很广的基础研究。显然,这些研究领域的工作在很大程度上要依赖于质谱分析。因此,20 世纪 90 年代初期,在赵院士的领导下,由陈益在清华大学建立了属于研究组的质谱实验室,使用一台国产质谱仪,开始了质谱学研究。用国产的质谱仪进行基础研究,并取得一批重要的研究成果,这在国内是罕见的。

赵玉芬院士后来在厦门大学、郑州大学先后又建立了两个质谱实验室。从事质谱研究的人员从陈益一人发展壮大成为一支队伍。10 多年来,他们很有效地使用质谱分析这一强有力的研究手段,取得了多项有创意的研究成果,如发现磷酸化氨基酸能自活化而组装成肽的反应,并以该方法建立了均肽库;发现磷酸化可以大大提高药物分子与蛋白质的非共价键结合力,从而可能提高药物的疗效;发现磷酸化可提高质谱分析的灵敏度;还发现一些新的质谱裂解规律以及新的有机反应,例如在质谱条件下观察到分子内氨基能十分有效地催化酰胺水解等。这本著作就是他们 10 多年研究工作的结晶。

了解了这些背景,读者不仅可从这本著作中得到一些学术上的启示,而且可以看到一支朝气蓬勃、勇往直前的年青质谱学研究队伍正在茁壮成长。

中国科学院化学研究所研究员

王光辉

2004 年 12 月

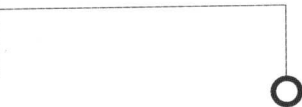
内 容 提 要

本书重点介绍中国科学院院士赵玉芬教授在清华大学、厦门大学及郑州大学三个实验室,从事生物有机质谱研究取得的成果及进展。本书作者的研究领域属于国际前沿,内容主要集中在氨基酸、核苷酸、肽、蛋白及它们的含磷化合物的衍生物的质谱规律。根据所研究的化合物类型,将全书分 11 章进行叙述。

生物有机质谱近年来发展很快,已广泛应用于有机化学、生物化学、药物化学、配位化学以及化学生物学和蛋白质组学等领域,尤其在蛋白质组学方面的应用,使质谱真正步入生物大分子研究领域。

本书内容精练,论述清晰,每章后引用大量文献,可供从事化学生物学及生物有机质谱研究的科技工作者参考。

前言



生物有机质谱是近年来一项发展迅速的技术。例如,20 世纪 80 年代初的快原子轰击质谱(FAB-MS),使极性化合物,如氨基酸、肽、核苷酸等分子的质谱研究向前迈进一大步。最近,电喷雾质谱(ESI-MS)及激光辅助解析飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)的发展,更使蛋白质、核酸、糖类生物大分子的研究成为可能。

我们实验室也随着国内(1983 年)第一台 FAB-MS 在中国科学院科学仪器厂及中国科学院化学所(由王光辉先生等)研制成功后,进入了氨基酸及小肽的研究领域。当时本实验室已发现磷酸化氨基酸在 FAB-MS 中的磷酸化增敏现象,并提出了磷酸化作为肽测序方法的建议。这个建议直到最近用 ESI-MS/MS 才得以实现。这方面的研究情况在第 10 章介绍,并希望能有更多的人将它应用于肽的测序。

ESI-MS 作为一种研究生物大分子的有力工具,可用于研究蛋白质的功能,或蛋白质与小分子、大分子之间的相互作用。我们发现了磷酸化小分子可以增强与蛋白质的弱相互作用,并可以用 ESI-MS 检测到,并发现在弱相互作用中,磷酸基扮演重要的角色。这方面的成果在第 5 章介绍。

液相色谱与质谱联用技术(LC-ESI-MS/MS)是近年来应用越来越广泛的技术,在第 6 章中介绍了几个液质联用的实例,表明这确实是一项快速并精确分析混合物的好方法。当然有机质谱也是跟踪化学反应,研究机理,鉴定结构最直接、最快速的方法之一。这部分的工作

将在其他章节介绍。

本书共分 11 章,以下人员参与了各章节的整理编写工作:第 1 章,陈晶、陈益;第 2 章,曹书霞;第 3 章,陈晶、陈益;第 4 章,周宁;第 5 章,陈晓岚、屈凌波;第 6 章,曹书霞、周宁、刘红霞;第 7 章,朱长进、杨晓丽;第 8 章,付华、陈益;第 9 章,王建锋;第 10 章,陈益、陈晶;第 11 章,曹书霞、陈晓岚、陈勇、刘艳。全书由本人统稿。

总之,我们希望通过本书的介绍,让读者对生物有机质谱有更多的了解。作者诚恳地希望此书能给读者带来一些方便和益处。

赵玉芳

清华大学 厦门大学 郑州大学

2004 年 10 月

目 录

I

1	——质谱在蛋白质组学中的应用	1
○ 1.1	现代质谱简介	2
1.1.1	电喷雾质谱(ESI-MS)	3
1.1.2	基质辅助激光诱导解吸质谱 (MALDI-MS)	4
○ 1.2	质谱在小肽与蛋白质序列测定中的应用	5
1.2.1	离子在电离或飞行中碎裂	5
1.2.2	肽和蛋白质的质谱梯状测序法	13
○ 1.3	质谱在蛋白质组学研究中的其他应用	15
2	——磷酸化氨基酸及磷酸化小肽的质谱研究	23
○ 2.1	磷酸化氨基酸及小肽的 FAB-MS 研究	24
2.1.1	磷酸化氨基酸的 FAB-MS 正、负离子 裂解规律研究	24
2.1.2	磷酸化小肽的 FAB-MS 裂解规律研究	25
○ 2.2	磷酸化氨基酸的 ESI-MS 裂解规律研究	26
2.2.1	磷酸化氨基酸的 ESI-MS 正离子裂解 规律研究	26
2.2.2	磷酸化氨基酸的 ESI-MS 负离子裂解 规律研究	28
2.2.3	磷酸化氨基酸的 ESI-MS 负离子裂解 规律验证	31
2.2.4	磷酸化氨基酸的 ESI-MS 加钠离子裂解 规律及重排反应	35

II

○ 2.3	磷酰化小肽定向合成中序列的质谱分析	38
-------	-------------------	----

3

肽类化合物的重排机制	42
------------	----

○ 3.1	二肽类似物在质谱中的重排反应及其机制研究	42
3.1.1	高分辨质谱研究	42
3.1.2	重排机制的提出	42
3.1.3	重排反应机制证明	44
3.1.4	小肽质谱中脱除 45 u 重排反应	48
○ 3.2	二异丙氧基磷酰化氨基酸的一种重排反应	53
○ 3.3	磷酰化二肽甲酯的一种重排反应	61

4

磷试剂辅助下均肽库的构建及其电喷雾质谱分析	69
-----------------------	----

○ 4.1	磷与肽库	69
4.1.1	均肽库的构建	69
4.1.2	非极性氨基酸与三氯氧磷的反应	70
○ 4.2	ESI-MS 与肽库分析	73
4.2.1	氨基酸均肽库产物分析	73
4.2.2	均肽库的肽链裂解规律	75
○ 4.3	影响均肽库的因素	76
4.3.1	均肽长度与反应时间的关系研究	76
4.3.2	20 种天然氨基酸与三氯氧磷的 成肽反应总结	77
4.3.3	色谱对氨基酸转化率的分析	79



○ 4.4	极性氨基酸的成肽反应	80
4.4.1	苏氨酸的成肽反应	80
4.4.2	组氨酸的成肽反应	80
4.4.3	甲硫氨酸、半胱氨酸及脯氨酸的成肽反应	81
5	电喷雾质谱在研究非共价大分子复合物中的应用	87
○ 5.1	引言	87
○ 5.2	此领域早期重大事情	88
5.2.1	ESI 质谱特点	88
5.2.2	ESI 质谱在研究非共价复合物的早期应用	89
5.2.3	ESI - TOF 质谱的应用	91
○ 5.3	近来的应用	92
5.3.1	ESI - MS 在研究多种相互作用中的应用	92
5.3.2	小分子与蛋白作用机制研究	92
○ 5.4	影响 ESI - MS 分析方法的因素	97
5.4.1	影响 ESI - MS 分析的溶液因素	97
5.4.2	影响 ESI - MS 分析的仪器条件因素	97
○ 5.5	液相和气相 ESI - MS 测量的关系	99
5.5.1	液相和气相 ESI - MS 测量的一致性	99
5.5.2	液相和气相 ESI - MS 测量的差异性	100
○ 5.6	抗HIV 前药与蛋白的非共价键复合物的 ESI - MS 研究	101
5.6.1	AZTPH 和 d4TPH 与牛胰岛素的非 共价键复合物的 ESI - MS 研究	101

IV

5.6.2	CAZTPH 和 Id4TPH 与溶菌酶的非共价键复合物的 ESI - MS 研究	104
-------	---	-----

5.6.3	蛋白与 AZT 磷酰氨基酸类 (CAZTAAOMe) 非共价键复合物的 ESI - MS 研究	107
-------	---	-----

○ 5.7	未来前景	111
-------	------	-----

6 液相色谱 - 质谱联用技术 120

○ 6.1	氨基酸五配位磷化合物的竞争反应研究	121
-------	-------------------	-----

6.1.1	氨基酸成肽反应的 HPLC - MS 定性分析	121
-------	-------------------------	-----

6.1.2	氨基酸成肽反应的 HPLC - MS 定量分析	123
-------	-------------------------	-----

○ 6.2	HPLC - ESI - MS/MS 研究磷酰化苯丙氨酸的水解反应	124
-------	-----------------------------------	-----

6.2.1	反应产物的 HPLC - MS 分析	124
-------	--------------------	-----

6.2.2	水解机制推测	125
-------	--------	-----

○ 6.3	HPLC - MS 分析 β - 兴奋剂克伦特罗	127
-------	--------------------------------	-----

6.3.1	条件的选择	127
-------	-------	-----

6.3.2	结果	127
-------	----	-----

7 多胺酰胺类化合物及其相关衍生物的电喷雾质谱研究 131

○ 7.1	N - 甲基咪唑/多胺酰胺类化合物结构的 ESI - MS/MS 分析	131
-------	-------------------------------------	-----

7.1.1	N - 甲基咪唑/多胺酰胺的质谱特征	133
-------	--------------------	-----

7.1.2	特异性异构产物结构鉴定	137
-------	-------------	-----

7.1.3	结论	138
-------	----	-----

○ 7.2	N - 甲基咪唑聚酰胺/肽缀合物合成反应的电喷雾质谱跟踪	139
-------	------------------------------	-----



7.2.1	合成程序	140
7.2.2	酰胺成键反应的 ESI - MS 跟踪检测	141
7.2.3	酰胺成键反应产物的鉴定	143
7.2.4	结论	148
○ 7.3	<i>N</i> - 甲基咪唑和吡咯类化合物的 分子内氨基催化作用	148
7.3.1	<i>N</i> - 甲基咪唑衍生物的质谱特征	150
7.3.2	<i>N</i> - 甲基吡咯衍生物的质谱特征	152
7.3.3	结论	153
8	质谱在生命有机磷化学中的一些应用	158
○ 8.1	五配位磷化合物的质谱研究	158
8.1.1	氨基酸五配位磷化合物的质谱研究	159
8.1.2	氨基酸 - 核苷五配位磷化合物的 质谱研究	162
○ 8.2	核苷氨基酸缀合物的电喷雾质谱研究	163
8.2.1	腺苷酸苯丙氨酸缀合物的正离子 电喷雾质谱	164
8.2.2	腺苷酸苯丙氨酸缀合物的负离子 电喷雾质谱	166
○ 8.3	有机磷试剂辅助氨基酸成肽反应	167
8.3.1	自组装成肽产物正离子的 FABMS 分析	168
8.3.2	自组装成肽反应的机制研究	169
9	质谱在定量分析中的应用	172

10	——氨基酸增敏效应及肽序列测定的新方法	180
○	10.1 DIPP 磷酰化对氨基酸的增敏效应	180
	10.1.1 磷酰化的增敏效应	180
	10.1.2 增敏效应的机制	183
	10.1.3 加氢与加钠二聚体碎裂一致性研究	192
	10.1.4 磷酰化丙丙二肽气相质子亲和能研究	196
	10.1.5 总结及展望	199
○	10.2 磷酰化对肽序列测定的影响	199
	10.2.1 二异丙基亚磷酸酯 DIPPH 磷酰化多肽	200
	10.2.2 二甲基亚磷酸酯 DMPH 磷酰化多肽	202
	10.2.3 DMPH 磷酰化法测定含赖氨酸肽序列	206
	10.2.4 DMPH 磷酰化肽的负离子碎裂研究	209
	10.2.5 总结及展望	209
○	10.3 含有磷碳键的氮端磷酰化衍生	
	——一种新的肽序列测定的衍生化方法	211
11	——电喷雾质谱及液质联用使用注意事项	218
○	11.1 仪器的安装、准备与维护	218
	11.1.1 仪器安装的环境准备	218
	11.1.2 维护注意事项	219
	11.1.3 仪器维护练习	220
○	11.2 电喷雾离子阱质谱使用注意事项	221
	11.2.1 进样注意事项	221
	11.2.2 维护注意事项	221
○	11.3 液相色谱质谱联用注意事项	222

VII

○ 索引	224
○ 附录	227

蛋白质是构成生物体的一类十分重要的有机含氮化合物,是生命的物质基础。蛋白质是多种多样的,并且行使不同的功能。例如,新陈代谢中的各种化学反应就是在多种特异的蛋白质酶的催化下进行的;作为调节代谢过程的激素、抵御外来物侵袭的抗体以及与遗传控制相关的核蛋白等,都是由蛋白质或它们的衍生物构成的;生命现象的各种活动,如呼吸、运动、营养输送、神经传导、记忆思维等,也是通过蛋白质实现的。蛋白质的不同功能是以其特定结构为基础的。所有蛋白质不论功能和来源如何,均由 20 种基本氨基酸组成。氨基酸按不同的顺序排列,构成蛋白质的一级结构,在此基础上建立起相应的二级、三级以及四级结构。不同的蛋白质行使不同的功能,这是通过其特定的结构来实现的^[1]。研究蛋白质序列、结构与功能之间的关系,是我们了解自然、应用自然的最重要的工作之一。

近年来,随着人类基因组计划的完成,蛋白质组学成为研究热点,并得到了越来越广泛的关注。多数的蛋白质组学研究集中于特定生物体环境下蛋白质的表达及其功能。现在出现了两种相互对立又相互补充的策略。一种是表达与定量调控蛋白质组学(expression or quantitative regulation proteomics),目标是观测细胞或组织中大量的蛋白质在某种特定外界条件(例如用药或患病组织)下表达情况的变化,可用于识别与某种疾病相关的蛋白质、药物靶点等,这也是现在蛋白质组学最重要的应用。另一种策略叫做细胞谱图或结构蛋白质组学,即研究蛋白质的构象及其与其他蛋白质形成复合物的情况。

蛋白质组学的研究是一项相当复杂、相当庞大的工程,需要很多好的方法和新的概念给予支持。图 1-1 为蛋白质组学研究中一个典型的研究过程。待研究生物体系中表达的蛋白质经过二维凝胶电泳(two dimension gel)或二维色谱(包括高效液相色谱及毛细管电泳)分离后,从中提取出感兴趣的蛋白点,然后经过蛋白酶水解成为小肽片断,分离后应用质谱(电喷雾质谱,electrospray ionization mass spectrometry,ESI-MS;基质辅助激光诱导解吸质谱,matrix assisted laser desorption ionization,MALDI-MS)研究某一小肽片断的序列,并重复此步骤得到多个片断序列,输入数据库即可获知此为哪一蛋白质。明确了蛋白质归属后,可以研究此蛋白质随生物体系环境变化的变化情况,从而了解此蛋白质在生物体中的功能。通过这种方法,可以一次研

究细胞或组织表达的多种蛋白质。

在此步骤中,可以看到蛋白质水解及肽的质谱序列研究都起到非常重要的作用,我们的研究工作围绕这两个课题进行,并提出一些新的可能在蛋白质组学研究中有用的方法。

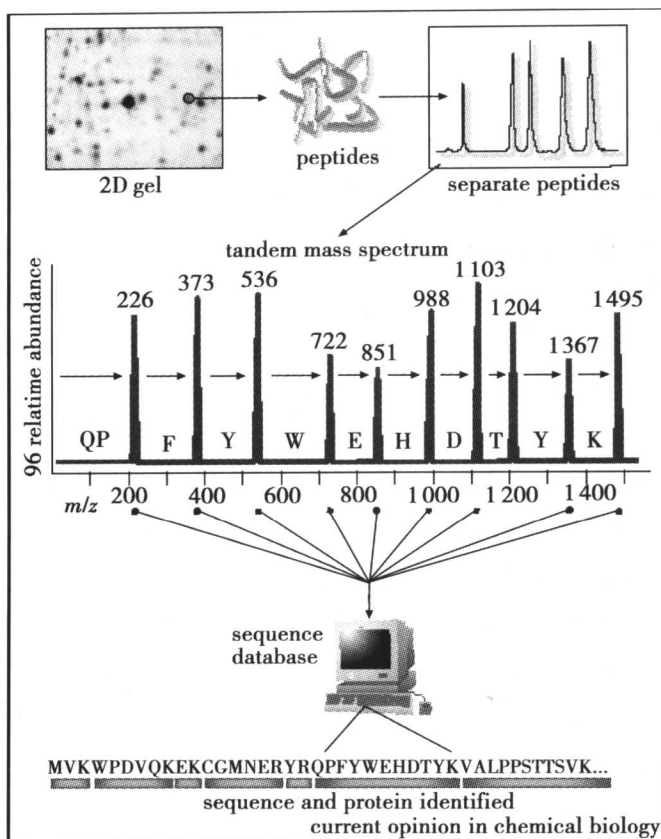


图 1-1 蛋白质组学研究中一个典型研究流程^[36]

1.1 现代质谱简介

近年来的生物化学研究中,随着两种软电离质谱技术电喷雾质谱(ESI-MS)及基质辅助激光诱导解吸质谱(MALDI-MS)的出现,质谱起到了越来越重要的作用,这是因为它们具有以下优点。

(1)可用于分析大分子。现在已有文献报道的所研究化合物的最大分子质量约为 10^6 u。

(2)可用于分析不纯化合物。这在生物化学研究中具有非常重要的意义,因为生物体系相对较复杂,物质提纯不易,因此新型质谱的出现使一些研究成为可能。

(3)样品消耗量很低。现在的最低样品检测限做到了约 10^{-18} mol,在常规下也可做到 10^{-12} mol,这也是其在蛋白质组学研究中成为最重要的检测手段的一个原因,因为生物体中待检测物含量一般都很低,而其他检测方法很难达到要求。

(4)仪器操作简便,检测速度快,适用于大批量的样品研究。这也是与现代生物学的大规模研究相符合的。

下面首先分别介绍一下这两种质谱的基本原理。

1.1.1 电喷雾质谱(ESI-MS)

电喷雾质谱是近年来发展起来的一类新的软电离质谱仪。它的电离过程是“离子雾化”,样品溶液通过一根毛细管进入雾化室,在加热、雾化气(N_2)和强电场($3 \sim 5$ kV)的共同作用下雾化,形成带有多电荷的液滴。对于带电导体,净电荷都聚集在其表面。仪器的电离源处于高真空状态,液滴进入时溶剂挥发,液滴的体积变小,表面的电荷密度增大。由于同性电荷的相互排斥,溶液中样品的分子就以离子的形式逸出。在正离子模式下,分子结合 H^+ 、 Na^+ 或 K^+ 等阳离子而得到 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 或 $[M+K]^+$ 离子;在负离子模式下分子的活泼氢电离得到 $[M-H]^-$ 离子。这就是电喷雾质谱的电离原理(图1-2)。由于生命科学的长足进步,需要利用质谱研究结构的生物分子越来越多,其中最重要的两类就是核酸和蛋白(肽),它们都是高度亲水性的分子,在高温下容易分解,因而电喷雾这种电离方式非常适用于这类分子的研究。

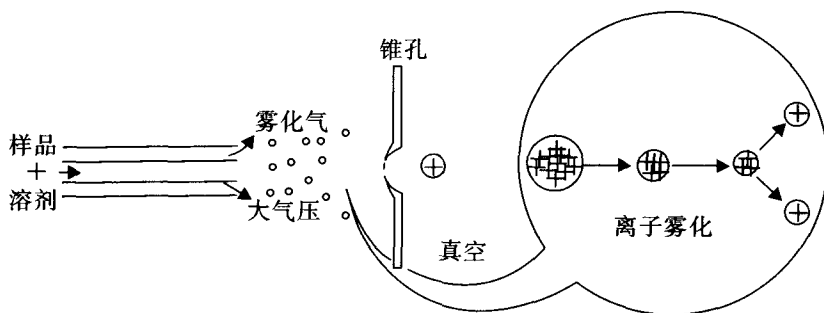


图1-2 电喷雾质谱电离原理

多级质谱分析是鉴定化合物结构的一种十分重要的方法,它可以确认母离子和子离子之间的归属,从而提供比较准确的结构信息。并且这种方法可以直接用于混合物分析,将混合物的质谱中某一质荷比的峰分离出来进行串联质谱分析,就有可能

确认它的结构。这样就能省去大量的分离、纯化工作。目前用于多级质谱分析的质量分析器主要有串联四极杆(tandem quadrupole)和离子阱(ion trap)两种。串联四极杆仪器由几个独立的四极杆检测器串接而成,由于体积、成本的限制,一般只能做到二级、三级。离子阱质量分析器由一个环电极和位于环的两端的两个端盖极组成,电极之间以绝缘体隔开,但两个端盖极是等电位的,其上有小孔以进入样品和排出离子。通过改变施加于阱的环电极和端盖极的电压,使离子在阱中回旋振荡,检测时通过改变电压值使离子逐次从阱中飞出。同时离子阱能选择性地保留某一质荷比的离子,在阱内与惰性气体碰撞进行诱导断裂,随后进行质量扫描,即可得到该离子的二级质谱。类似地,从二级质谱碎片中选择某一质荷比的离子,又可以进行三级质谱分析。只要离子强度足够,这样的步骤可以做到10级,直到获取足够的结构信息为止。

1.1.2 基质辅助激光诱导解吸质谱(MALDI-MS)

基质辅助激光诱导解吸质谱通常使用的是脉冲激光,在一个微小的区域内,在极短的时间间隔(纳秒数量级),激光可以对靶物提供很高的能量。MALDI的方法如下:将被分析物质($\mu\text{mol/L}$ 级浓度)的溶液和某种基质(mmol/L 级浓度)溶液相混合。蒸发溶剂,被分析物质与基质成为晶体或半晶体(semi-crystalline)。用一定波长的脉冲式激光照射。基质分子为可吸收激光光能物质,从而获取能量,使基质分子和样品雾化进入气相并得到电离^[2](图1-3)。

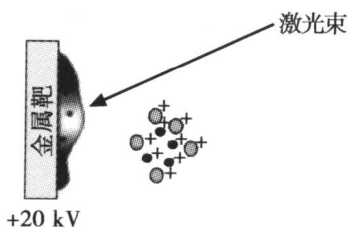


图1-3 基质辅助激光诱导解吸质谱电离原理^[37]

常用的基质有二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid)、芥子酸(sinapinic acid)、烟酸(nicotinic acid)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)等。

采用MALDI-MS法的优点如下:①使一些难于电离的样品电离,且无明显的碎裂,得到完整的被分析物分子的电离产物,特别是在肽类化合物、核酸等生物大分子研究中取得很大成功;②由于应用的是脉冲式激光,特别适合于与飞行时间质谱计