新型离子液体基质用于 MALDI-MS 高效离子化寡糖/糖肽

匡敏 张莹 杨芃原 陆豪杰*

(复旦大学 化学系和生物医学研究院 上海 200433)

摘要 本研究发展了四种基于三羟基苯乙酮(THAP)的新型离子液体基质, 即 2',3',4'-THAP/二甲基苯胺(DMA)、2',4',6'-THAP/DMA、2',3',4'-THAP/吡啶(Py)及 2',4',6'-THAP/Py, 用于提高寡糖/糖肽在 MALDI-TOF MS 中的离子化效率. 与传统的固体基质 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)和 2',4',6'-三羟基苯乙酮(2',4',6'-THAP)相比, 新型离子液体体系分析不同类型的寡糖链, 均可获得更高的检测灵敏度. 可使葡聚糖(dextran 1000)和环状寡聚糖 β -环糊精在 MALDI 质谱中的信噪比提高 10 倍以上, RNase B 的复杂寡糖链也实现了高灵敏度的检测. 在糖肽分析中, 2',3',4'-THAP/DMA 离子液体高灵敏度地检测到辣根过氧化酶的 7 条糖肽, 而 2',3',4'-THAP 作为基质时却无法检测到任何信号.

关键词 离子液体基质; 寡糖; 糖肽; 三羟基苯乙酮; 质谱

Novel Ionic Matrices for Enhanced Ionization of Oligosaccharides/Glycopeptides during MALDI-MS Analysis

Kuang, Min Zhang, Ying Yang, Pengyuan Lu, Haojie*

(Department of Chemistry and Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract Matrix plays a fundamental role in the desorption/ionization process during MALDI MS analysis, thus is closely related to the spectral quality. Nevertheless, it is usually difficult for analytes to disperse homogeneously due to the formation of hot spots, which had become a problem encountered with many of the current matrices. This may result in increased measurement time and hamper the application of MALDI MS. Although many efforts have been devoted to optimize matrix choice for oligosaccharide and glycopeptides analyses, there are few matrices that could work well with them in MALDI MS so far. In this study, a novel class of ionic liquid matrices (IMs) based on trihydroxyacetophenone (THAP) was introduced as potential alternatives to the traditional crystalline matrices and showed superior performance for oligosaccharides and glycopeptides analysis. The combination of pyridine or *N,N*-dimethylaniline (DMA) with 2',3',4'-trihydroxyacetophenone (2',3',4'-THAP) or 2',4',6'-trihydroxyacetophenone (2',4',6'-THAP) at the molar ratio of 1 : 1 turned out to be well suited for the analysis of oligosaccharides. Besides, the optimized condition could be achieved by 5-fold dilution of the IMs and adding ammonium citrate dibasic [(NH₄)₂HCit] as matrix additive. Afterwards, in comparison to signals obtained with traditional solid matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), substantial improvements in sensitivity were observed by the new IMs. Specifically, signal-to-noise ratios of dextran1000 as well as β -cyclodextrin were enhanced more than 10-fold. Moreover, the complex glycan mixture from the intact glycoprotein of RNase B released by PNGase F could be detected with high sensitivity when 2',3',4'-THAP/DMA functioned as the matrix. The unbiased nature of such IM also made it applicable to analyze glycopeptides derived from 10 ng tryptic digests of horseradish peroxidase (HRP), while it was almost impossible to detect any signals when measured with solid matrix 2',3',4'-THAP. In comparison to methods involving derivatization of oligosaccharides, which are susceptible to contamination and often require tedious purification steps, such technique could be readily used and largely reduce sample losses during analysis. As a consequence, these new IMs are promising to be advantageous in glycosylation analysis by MALDI-TOF MS.

Keywords ionic liquid matrix; oligosaccharides; glycopeptides; trihydroxyacetophenone; mass spectrometry

1 引言

作为生命体内最为重要的翻译后修饰之一, 糖基化在生命体内的诸多过程中都扮演着至关重要的角色. 细

胞表面的糖基化对细胞分子机制起着极大的调控作用, 包括细胞粘附, 受体激活, 信号传导, 分子运输和清除, 胞吞作用等^[1]. 同时, 蛋白质糖基化的异常也和许多炎症、肿瘤及先天疾病发生息息相关^[2]. 近年来, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)以其极

* E-mail: luhaojie@fudan.edu.cn; Fax: 0086-021-54237961

Received March 18, 2013; published April 23, 2013.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Science and Technology Key Project (Nos. 2012CB910602, 2012AA020203), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21025519, 21005020, 31070732), Shanghai Projects (11XD1400800, Eastern Scholar, B109 and 20114Y167).

项目受国家重点基础研究发展计划(Nos. 2012CB910602, 2012AA020203)、国家自然科学基金(Nos. 21025519, 21005020, 31070732)和上海市项目(11XD1400800, 东方学者, B109 和 20114Y167)资助.

高的检测灵敏度和广泛的适用性,为一系列生物大分子的检测、鉴定与表征提供了有效的手段,包括蛋白、肽段、核糖核苷酸等^[3,4]。但是,由于寡糖具有较强的亲水性,加之其结构中缺乏与质子结合的碱性基团,导致其在 MALDI-TOF-MS 中的离子化效率极低,因此,寡糖和糖肽的质谱分析依然面临着巨大的挑战^[5]。

为了应对这一挑战,许多研究者们为此做出了不懈努力。一方面,通过对寡糖的化学衍生来提高其检测灵敏度是一种较为普遍的方法^[6],即通过在寡糖链上修饰含有质子或易于和质子结合的基团以及疏水性基团,从而提高它们在 MALDI 质谱中的离子化效率^[7]。目前最为常见的衍生方法是全甲基化法^[8]和还原胺化法^[9]。然而,衍生法通常所需样品量较大,且易于造成样品污染和损失,因而其应用受到了一定程度的限制^[10]。合适基质的选择是 MALDI-MS 分析成功的关键,而在实验中,选择何种基质严重依赖于所分析的样品^[11]。近年来,寻找适用于寡糖分析的基质也日渐成为科学家们关注的焦点,这类方法不仅能大大提高样品的离子化效率,且与衍生法相比,前处理过程更简单,能有效减少样品损失并降低样品污染。目前已有许多这类基质被报道,并广泛应用于碳水化合物化合物的分析^[12~13]。此外,向基质中添加合适的辅助剂也能有效改善谱图质量^[14]。但是,合适基质与基质添加剂的选择通常无规律可循,其选择与优化过程大多需要经验的积累,尽管 MALDI 技术的发展日新月异,寻找适用于多种寡糖分析的基质依然是一大难题。

Armstrong 等^[15]首次将离子液体作为 MALDI 基质的研究为生物样品的分析提供了新思路,许多研究将 MALDI 质谱中常用的基质 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)或 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)与有机碱反应形成离子液体,如正丁胺(BA)、*N,N*-二甲基苯胺(DMA)等,并广泛应用于肽段、蛋白、磷脂、糖类等一系列生物样品的分析中^[16,17]。这类方法在诸多领域都表现出了极好的应用前景^[18~20]。已有报道指出,三羟基苯乙酮(THAP)作为基质使用时,能显著提高寡糖^[21]、磷脂^[22]及核酸分子^[23]在 MALDI-MS 分析中的灵敏度,而当 2',4',6'-三羟基苯乙酮与 1,1,3,3-四甲基胍形成离子液体用于糖肽及寡糖链的质谱分析时^[24],与使用单一的 THAP 基质相比,能使肽链骨架较短的糖肽也实现高效离子化,从而鉴定到更多糖肽,但与此同时,该离子液体也引入了更多的杂峰导致谱图更为复杂。此外,目前尚无采用 2',3',4'-三羟基苯乙酮(2',3',4'-THAP)或 2',4',6'-三羟基苯乙酮(2',4',6'-THAP)与二甲基苯胺(DMA)或吡啶(Py)组成离子液体的报道。鉴于此,本实验发展了 2',3',4'-THAP/DMA, 2',4',6'-THAP/DMA, 2',3',4'-THAP/Py 及 2',4',6'-THAP/Py 四种新型离子液体基质,并考察了以之作为 MALDI 基质分析寡糖及糖肽的效果。结果表明,与传统的固体基质 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)及 2,4,6-三

羟基苯乙酮(2,4,6-THAP)相比,新型离子液体体系分析不同类型的寡糖链时,均能获得更高的检测灵敏度。葡聚糖(dextran 1000)及环状寡聚糖 β -环糊精(β -CD)在 MALDI 质谱中的信噪比都能提高十倍以上。除了可用于提高寡糖链的离子化效率,这类离子液体基质在复杂体系中也具有适用性,以 2',3',4'-THAP/DMA 进行考察时,可以实现对 RNase B 的寡糖链体系的高灵敏度检测。此外,当分别以离子液体基质 2',3',4'-THAP/DMA 和固体基质 2',3',4'-THAP 分析 10 ng 辣根过氧化物酶(HRP)的酶解肽段时,单一的 2',3',4'-THAP 几乎检测不到任何信号,而 2',3',4'-THAP/DMA 却能高灵敏度的检测到 7 条糖肽。

2 结果与讨论

2.1 离子液体基质用于寡糖的 MALDI-MS 分析

2.1.1 离子液体基质体系条件的优化

MALDI 质谱分析结果的好坏很大程度上依赖于样品的前处理过程。在此,以平均分子量为 1000 的葡聚糖(dextran 1000)作为标准分析物进行探索,并通过考察离子液体的配比、浓度以及基质辅助添加剂对分析效果的影响以获得最优化条件。

首先考察了不同配比的离子液体基质对糖肽离子化效率的影响,将 2',4',6'-THAP 与 DMA 按 1:1, 1:2 和 1:3 的物质的量比混合形成离子液体,即 2',4',6'-THAP/DMA, 2',4',6'-THAP/(DMA)₂ 和 2',4',6'-THAP/(DMA)₃。图 1(a)~(c)分别是以这三种基质分析 10 ng dextran 1000 得到的 MALDI 质谱图,通过对比可知,三种条件下获得的质谱分析结果并无明显区别,因此直接选用 2',4',6'-THAP/DMA 开展后续的研究。

在 MALDI 质谱分析过程中,合适的基质-分析物比例也至关重要。太高的基质/分析物比例容易导致基质离子峰的出现,并容易产生强烈的信号干扰。而当基质/分析物的比例太低时,又容易导致待分析物不能被充分离子化^[25]。同时,已有文献指出,基质中存在柠檬酸氢铵((NH₄)₂HCit)时,能有效抑制基质簇合峰的形成^[26],而 NH₄⁺ 能竞争性地与待分析物结合,并有助于其能量解吸和电离^[20]。因此,实验中也考察了 2',4',6'-THAP/DMA 离子液体用含(NH₄)₂HCit 的 CH₃CN/H₂O/TFA (50:50:0.1, *V/V/V*)混合液稀释不同倍数后分析 10 ng dextran 的效果。与图 1(a)~(c)相比,图 1(d)中检测到的寡糖链不仅有更高的信噪比,且谱图背景更干净。而采用未经稀释或过度稀释的离子液体作为基质时(数据未在文章中显示),分析效果均不如图(d)中所示。此外,我们也利用 2',4',6'-THAP 对 10 ng dextran 1000 进行了分析,如图 S1,不难发现,谱图中观察不到任何有效的质谱信号。这也证明,与单独使用 THAP 相比,以离子液体作为基质时,能更好的提高 dextran 1000 的离子化效率。

图1 4种离子液体基质分析 10 ng dextran 1000 的 MALDI 质谱图. (a) 未稀释的 2',4',6'-THAP/DMA, (b) 2',4',6'-THAP/(DMA)₂, (c) 2',4',6'-THAP/(DMA)₃ 和 (d) 5 倍稀释并加入 (NH₄)₂HCit 的 2',4',6'-THAP/DMA. 图中, *、●与○分别表示 [dextran+Na]⁺, [dextran+K]⁺, 及加 [dextran+Na-H₂O]⁺

Figure 1 MALDI-TOF mass spectra of dextran 1000 with (a) undiluted 2',4',6'-THAP/DMA, (b) 2',4',6'-THAP/(DMA)₂, (c) 2',4',6'-THAP/(DMA)₃ and (d) 5 times diluted 2',4',6'-THAP/DMA with CH₃CN/H₂O (50 : 50, *V/V*) containing 0.6 mg/mL (NH₄)₂HCit as matrices. Sodium adducts, potassium adducts and sodium adducts with H₂O losses of dextran 1000 are denoted by asterisks, filled cycles and empty cycles, respectively

鉴于此, 最优化离子液体基质体系为: 将 2',4',6'-THAP 或 2',3',4'-THAP 与 Py 或 DMA 按 1 : 1 的物质的量比混合, 再用 50% CH₃CN/50% H₂O/0.1% TFA 的溶液体系稀释 5 倍, 并添加 (NH₄)₂HCit 使其终浓度为 0.6 mg/mL.

2.1.2 离子液体基质用于寡糖分析

在以上优化条件下, 系统的考察了四种离子液体用于 MALDI 质谱分析寡糖的效果. 图 2 是分别以 4 种离子液体基质体系 (a) 2',3',4'-THAP/DMA, (b) 2',3',4'-THAP/Py, (c) 2',4',6'-THAP/DMA, (d) 2',4',6'-THAP/Py 及 (e) DHB 基质分析 50 ng dextran 1000 的质谱图. 图中观察到的质谱峰主要是 [dextran+Na]⁺, [dextran+K]⁺. 不难发现, 与 DHB 作为基质时的分析效果相比, 四种离子液体均能显著提高寡糖链的离子化效率. 以图中标示的 6 糖寡聚糖 (Glc 6, *m/z* 1013.6) 为例, 其信噪比提高了十倍以上. 此外, 本研究也对两种离子液体基质和两种固体基质分别单独用于分析 1 ng dextran 1000 的效果进行了对比. 如图 S2(a), (b) 所示, 以 2',3',4'-THAP/DMA 或 2',4',6'-THAP/DMA 分别作为基质时, 不仅能有效的检测到一系列寡糖链峰, 且谱图检测背景十分干净. 而以 2',3',4'-THAP 或 2',4',6'-THAP 单独作为基质时, 几乎检测不到任何有效信号, 如图 S2(c), (d) 所示. 此外, 根据文献报道^[27], 采用 DHB/DMA 离子液体基质分析 dextran 1000 时, 与单独使用 DHB 的分析效果相比, DHB/DMA 能使 Glc8 的质谱峰信噪比提高约 12 倍, 这与 2',3',4'-THAP/DMA 及 2',4',6'-THAP/DMA 离子液体基质分析 dextran 1000 的效果相当, 也进一步证明了 2',3',4'-THAP/DMA 及 2',4',6'-THAP/DMA 的应用价值. 已有报道阐明, 苯胺^[18]或 DMA^[19]与 DHB 形成离子液体并作为 MALDI 基质使用时, 不仅会使基质更有效的

吸收激光能量, 且能改善寡糖的解吸与离子化过程^[20]. 以此类推, 在本实验中, 有机碱 DMA 和 Py 的引入, 也能使基质更好的吸收并重新分配激光能量, 进而产生更好的质谱检测效果.

图2 5种基质分析 50 ng dextran 1000 的 MALDI-TOF 质谱图. (a) 2',3',4'-THAP/DMA, (b) 2',3',4'-THAP/Py, (c) 2',4',6'-THAP/DMA, (d) 2',4',6'-THAP/Py 及 (e) DHB

Figure 2 MALDI-TOF mass spectra of 50 ng dextran 1000 with (a) 2',3',4'-THAP/DMA, (b) 2',3',4'-THAP/Py, (c) 2',4',6'-THAP/DMA, (d) 2',4',6'-THAP/Py and (e) DHB as matrices. Signal to noise ratios corresponding to Glc 6 were denoted in the spectra

为了考察这类新型基质在环状寡糖的质谱分析中的适用性, 4 种离子液体也被分别应用于 β -CD 的 MALDI-MS 分析中. 图 S3-A 是分别用 4 种离子液体基质和 DHB 分析 1 ng β -CD 时的质谱图. 显然, 与 DHB 相比, 4 种新型离子液体检测到的质谱峰信噪比更高. 当仅使用 0.1 ng β -CD 进行分析时, DHB 基质已无法检测到任何有效信号, 而离子液体基质却依然能检测到信噪比很高的寡糖链峰, 如图 S3-B 所示. 由此可知, 这类新型离子液体基质可以使分析 β -CD 的检测限降低至少一个数量级.

为了验证这类离子液体基质在复杂体系中的适用性, 我们选用了 2',3',4'-THAP/DMA 离子液体基质进行探索, 首先考察了它对 15 ng RNase B 糖蛋白上的寡糖链分析的效果. 如图 3 所示, 谱图中所有质谱峰均对应 RNase B 上寡糖链的加 Na⁺ 或加 K⁺ 峰. 根据其寡糖结构中乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc, *m/z* 203) 和甘露糖 (Man, *m/z* 162) 的分子量差异, 即可推断出相应寡糖链的单糖组成和结构信息 (详细信息见表 S1). 这也说明离子液体在提高寡糖链离子化效率的同时, 为糖蛋白中糖链结构的解析奠定了基础.

2.2 离子液体基质在糖肽分析中的应用

除了可以使寡糖的离子化效率显著提高, 该离子液体基质也能有效促进糖肽在 MALDI-MS 中的离子化. 实验中以标准糖蛋白 HRP 的酶解肽段进行了考察, 图 S4 是分别以 2',3',4'-THAP/DMA 和 2',3',4'-THAP 分析 10 ng HRP 的酶解肽段获得的质谱图. 不难发现, 当以 2',3',4'-THAP/DMA 作为基质时, HRP 的 7 条糖肽都能得到高灵敏度的检测 (相应的糖肽信息见表 S2), 而以 2',3',4'-THAP 单独为基质时, 几乎检测不到任何信号.

图3 2',3',4'-THAP/DMA 作为 MALDI 基质分析 15 ng RNase B 的寡糖链得到的质谱图

Figure 3 MALDI-TOF mass spectrum of glycan chains from 15 ng intact glycoprotein RNase B digested by PNGase F with 2',3',4'-THAP/DMA as matrix

即使将 HRP 的样品量增至 1 μg , 依然无法实现对多条糖肽的鉴定, 且谱图中噪音干扰强烈(如图 S5). 因此, 与 2',3',4'-THAP 相比, 2',3',4'-THAP/DMA 作为基质分析 HRP 的酶解肽段时, 能使其检测灵敏度提高至少 100 倍.

3 结论

综上所述, 本研究制备了 4 种新型离子液体, 并作为 MALDI 基质成功应用于寡糖及糖肽的分析. 当用优化后的离子液体体系分析时, 能使不同类型的寡糖、复杂的寡糖链体系及糖肽均得到高灵敏度的检测, 且操作快速、简单, 质谱检测背景干扰低. 同时也从不同角度证明, 这类新型离子液体基质对寡糖类物质的分析效果明显优于固体基质. 总之, 基于三羟基苯乙酮的新型离子液体作为 MALDI 基质时, 在寡糖及糖肽的分析中具有可行性和良好的应用前景, 这为此类物质的快速、高灵敏度分析提供了新的思路.

References

[1] Ohtsubo, K.; Marth, J. D. *Cell* **2006**, *126*, 855.

- [2] Lazar, I. M.; Lazar, A. C.; Cortes, D. F.; Kabulski, J. L. *Electrophoresis* **2011**, *32*, 3.
- [3] Han, H. H.; Ma, Y.; Wang, L.; Zhang, W. J.; Wei, J. Y.; Zhang, Y. J.; Qian, X. H. *Chin. J. Anal. Chem.* **2010**, *38*, 307. (韩欢欢, 马岩, 王璐, 张万军, 卫军营, 张养军, 钱小红, 分析化学, **2010**, *38*, 307.)
- [4] Hirabayashi, J.; Arata, Y.; Kasai, K. I. *Proteomics* **2001**, *1*, 295.
- [5] Mechref, Y.; Kang, P.; Novotny, M. V. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *534*, 53.
- [6] Nishikaze, T.; Kaneshiro, K.; Kawabata, S. I.; Tanaka, K. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 9453.
- [7] Kaneshiro, K.; Watanabe, M.; Terasawa, K.; Uchimura, H.; Fukuyama, Y.; Iwamoto, S.; Sato, T. A.; Shimizu, K.; Tsujimoto, G.; Tanaka, K. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7146.
- [8] Harvey, D. J. *Mass Spectrom. Rev.* **1999**, *18*, 349.
- [9] Lemaire, R.; Tabet, J. C.; Ducoroy, P.; Hendra, J. B.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 809.
- [10] Chen, P.; Baker, A. G.; Novotny, M. V. *Anal. Biochem.* **1997**, *244*, 144.
- [11] Zabet-Moghaddam, M.; Heinzle, E.; Tholey, A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 141.
- [12] Laremore, T. N.; Murugesan, S.; Park, T. J.; Avci, F. Y.; Zagorevski, D. V.; Linhardt, R. J. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1774.
- [13] Jia, W. T.; Wu, H. X.; Lu, H. J.; Cai, R. F.; Yang, P. Y. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*, 1681. (贾韦韬, 吴慧霞, 陆豪杰, 蔡瑞芳, 杨凡原, 化学学报, **2008**, *66*, 1681.)
- [14] Tholey, A.; Zabet-Moghaddam, M.; Heinzle, E. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 291.
- [15] Armstrong, D. W.; Zhang, L. K.; He, L.; Gross, M. L. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3679.
- [16] Snovida, S. I.; Chen, V. C. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8561.
- [17] Fukuyama, Y.; Nakaya, S.; Yamazaki, Y.; Tanaka, K. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2171.
- [18] Knochenmuss, R.; Dubois, F.; Dale, M. J.; Zenobi, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 871.
- [19] Currie, G. J.; Yates, J. R. *Int. J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 955.
- [20] Pan, C. S.; Xu, S. Y.; Zhou, H. J.; Fu, Y.; Ye, M. L.; Zou, H. F. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 193.
- [21] Yang, X.; Wu, H.; Kobayashi, T.; Solaro, R. J.; Van Breemen, R. B. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1532.
- [22] Papac, D. I.; Wong, A.; Jones, A. J. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3215.
- [23] Li, J.; Deng, H. M.; Lai, Z. H.; Zhao, S. K. *Acta Chim. Sinica* **1999**, *57*, 1142. (黎军, 邓慧敏, 赖志辉, 赵善楷, 化学学报, **1999**, *57*, 1142.)
- [24] Ullmer, R.; Rizzi, A. M. *J. Mass Spectrom.* **2009**, *44*, 1596.
- [25] Knochenmuss, R.; Dubois, F.; Dale, M. J.; Zenobi, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 871.
- [26] Smirnov, I. P.; Zhu, X.; Taylor, T.; Huang, Y.; Ross, P.; Papayanopoulos, I. A.; Martin, S. A.; Pappin, D. J. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2958.
- [27] Snovida, S. I.; Perreault, H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 3711.

(Cheng, B.; Lu, Z.)