

电喷雾电离技术

1. 电喷雾电离技术的发展简介

ESI 是近年来新发展起来的一种软电离技术。它利用高电场使质谱进样端由毛细管流出的液滴带电，在逆向 N₂ 气流的作用下，液滴溶剂蒸发，表面积缩小，表面电荷密度不断增加，直至产生的库仑斥力与液滴表面张力达到雷利极限，液滴爆裂为带电的子液滴，这一过程不断重复使最终的液滴非常细小呈雾状，这时液滴表面的电场非常强大，使被测物离子化并以单电荷或多电荷离子的形式进入质量分析器[36]。

在 ESI 被应用之前，人们已经了解到通过强静电场可以从液体表面产生微小液滴电喷雾[37-39]，并且在这方面做了很多研究工作[40-42]，使静电喷雾法可以应用于喷漆和静电喷涂[43,44]、农作物喷雾[45]、静电乳化[46]、燃料雾化[47,48]以及制备有机聚合物涂层的电极[49]等许多领域。

1968 年，Bendix 公司的 Dole 等首先发现了从一带电毛细管尖端喷射溶液而产生大分子气态离子的可能性，发表了最早将电喷雾与质谱成功结合起来的论文[16]，报道了应用电喷雾电离技术测定苯与丙酮溶液中的聚苯乙烯的质谱数据，平均分子量可达 51000。然而，这一早期工作被应用于离子迁移光谱仪，而不是质谱仪的离子分析。随后的 20 年间，应用电喷雾作为质谱离子源的研究一直处于停滞状态，直到 1984 年，美国耶鲁大学的 Fenn 等[50-52]以 Dole 等人的思路为基础，完成了将电喷雾电离技术用作质谱离子源和 LC/MS 接口的关键工作。随后，他们继续改进电喷雾电离技术，使之更适宜用作 LC/MS 的接口。短短十几年来，电喷雾技术取得了迅速的发展，电喷雾离子源与离子阱质谱[53]、磁质谱[54]、飞行时间质谱[55]以及傅立叶变换离子回旋共振质谱[56]的联用相继被报道。

电喷雾质谱(Electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS)能直接分析溶液样品，由于它不像电子轰击、化学电离等常规电离技术存在样品加热气化的过程，因而特别适合分析强极性、难挥发或热不稳定的化合物，尤其是生命科学中感兴趣的肽和蛋白类物质；由于 ESI 能产生多电荷形式的离子，因而利用常规 m/z 范围的质谱仪即可实现生物大分子的分析测定，能快速、灵敏和准确地测定分子量高达几万到十几万的生物大分子。电喷雾技术在发展过程中出现过多种接口，代表着发展的各个阶段及技术各自的特点，因而各种文献中电喷雾技术方面的术语使用似乎也显得有些混乱，故做以下说明。

(1) 电喷雾电离

在喷口与金属毛细管之间施加数千伏特的高电压，此高电压是起关键作用的离子化条件，ESI 接口因此而得名。初期的接口在没有使用辅助气体的情况下，仅靠此高电压也可以对喷雾产生的液体微粒做进一步的分散并有效地完成离子化过程。

(2) 离子喷雾

离子喷雾是一种带有喷雾气体的设计，又称为雾化辅助电喷雾(nebulization-assisted electrospray)，后期的设计兼有喷雾气体和干燥气体，就是目前所说的 ESI 接口。

(3) Nano-ESI

早期的 ESI 接口与此类似，它适合于蛋白质、肽类的多电荷离子测定，进样速度为 10-100nL/min，并因此而得名为 Nano-ESI。Nano-ESI 接口可用于毛细管电泳和微径柱 HPLC 与质谱的联用，原因是它具有很低的工作流速。

(4) Z-喷雾(Z-Spray)

这是一种带有加热干燥气体的接口，干燥气体在逆流方向或垂直方向设置。喷雾为双正交 Z 型喷雾方式，其它方面与 ESI 接口相同。

(5) 涡流离子喷雾(Turboionspray)

这是一种较老的、高效率的设计,即**进样喷口**与质谱分析器离子入口处在不同轴的位置上,同时也有**干燥气体加速雾化**。

(6) 正交喷雾(Orthogonal spray)

较新的电喷雾接口多采用**正交喷雾方向**,即喷口与质谱仪离子入口相互垂直。这类接口设计中,除干燥气体外还增加了一路气体,成**帘状挡在质谱分析器入口前**,流动方向与离子运动方向相反,以**避免大量的中性分子进入质谱仪并防止非挥发性物质污染**。

(7) 冷喷雾(Cold spray)

通过对液体喷雾以及脱溶剂过程进行冷却来增加分子的极化率,从而促进分子的离子化,并将其成功应用于一些遇热不稳定而无法用 ESI-MS 进行分析的超分子体系的研究中。

2. 电喷雾机理

电喷雾离子化过程是应用电场来产生带电液滴,然后通过离子蒸发将被测物离子送入质谱分析。电喷雾喷出的小液滴携带很多正电荷,随着溶液的挥发和小液滴的缩小,表面电荷与表面积比值就会变大,直到电荷之间的排斥力等于表面张力,这时小液滴达到雷利稳定限[57]。随着溶剂的不断挥发,直到小液滴的表面电荷足以克服表面张力的束缚,小液滴就会发生库仑爆炸,生成更小的带电小液滴。这个过程反复循环,直至最后得到待测物离子。电喷雾的过程可分为三个阶段:液滴形成,液滴缩小和气态离子形成。在正离子检测模式下,电喷雾电离针相对真空取样小孔保持很高的正电位,负电荷离子被吸引到针的另一端,在半月形的液体表面聚集着大量的正电荷离子。液体表面的正电荷离子间相互排斥,并从针尖处的液体表面扩展出去,当静电场与液体的表面张力保持平衡时,液体表面锥体的半顶角为 49.3° ,被称为“Taylor 锥体”[58]。随着液滴的变小,电场强度逐渐加强,过剩的正电荷克服表面张力形成小液滴,最终从 Taylor 锥体的尖端溅射出去。在某种程度上可以认为,电喷雾过程实际上是电泳过程[59]。电喷雾的电离机制可以由图 1.2 来表示。常认为电喷雾可以用两种机制来解释。

(1) 离子蒸发机制[60,61]

在喷针针头与施加电压的电极之间形成强电场,该电场使液体带电,带电的溶液在电场的作用下向带相反电荷的电极运动,并形成带电的液珠(液滴),由于小雾滴的分散,比表面增大,在电场中迅速蒸发,结果使带电雾滴表面单位面积的场强高达 $1 \times 10^8 \text{V/cm}^2$,从而产生液滴的“爆裂”,重复此过程,最终产生分子离子。

(2) 带电残基机制[62]

首先也是电场使溶液带电,形成带电雾滴,处于毛细管尖端的极性溶液液滴在强电场中积累电荷,带电的雾滴在电场作用下运动,由于溶剂的迅速蒸发,库仑斥力大于表面张力导致液滴破裂成较小液滴,再蒸发溶剂,液滴再破裂,溶液中分子所带电荷在去溶时被保留在分子上,结果形成离子化的分子,最终形成气相离子。

一般来讲,电喷雾方法适合使溶液中的分子带电而离子化。离子蒸发机制是主要的电喷雾过程,但对分子量较大的化合物,带电残基的机制也会起相当重要的作用。目前,无论离子蒸发机制还是带电残基机制都得到了广泛的认同[63-65],而且有证据证明小分子离子通过离子蒸发途径产生,而多电荷的球蛋白等大分子的电离符合带电残基机制[66]。

电喷雾也可以测定**中性分子**,它是利用溶液中带电的**阳离子**和**阴离子**吸附在中性分子基团上而产生**准分子离子**。这样的电离过程有时(尤其是在分析生物大分子的时候)可以产生**多重质子化**的离子,降低被分析离子的质荷比,使质量范围不大的质谱仪可以分析大于其质量上限几十倍的高质量分子,大大地扩展了质谱的测定范围。多电荷质谱峰给出的分子量信息不是直观的,离子以“表观”质量数出现在谱图上,需要经过处理转化。

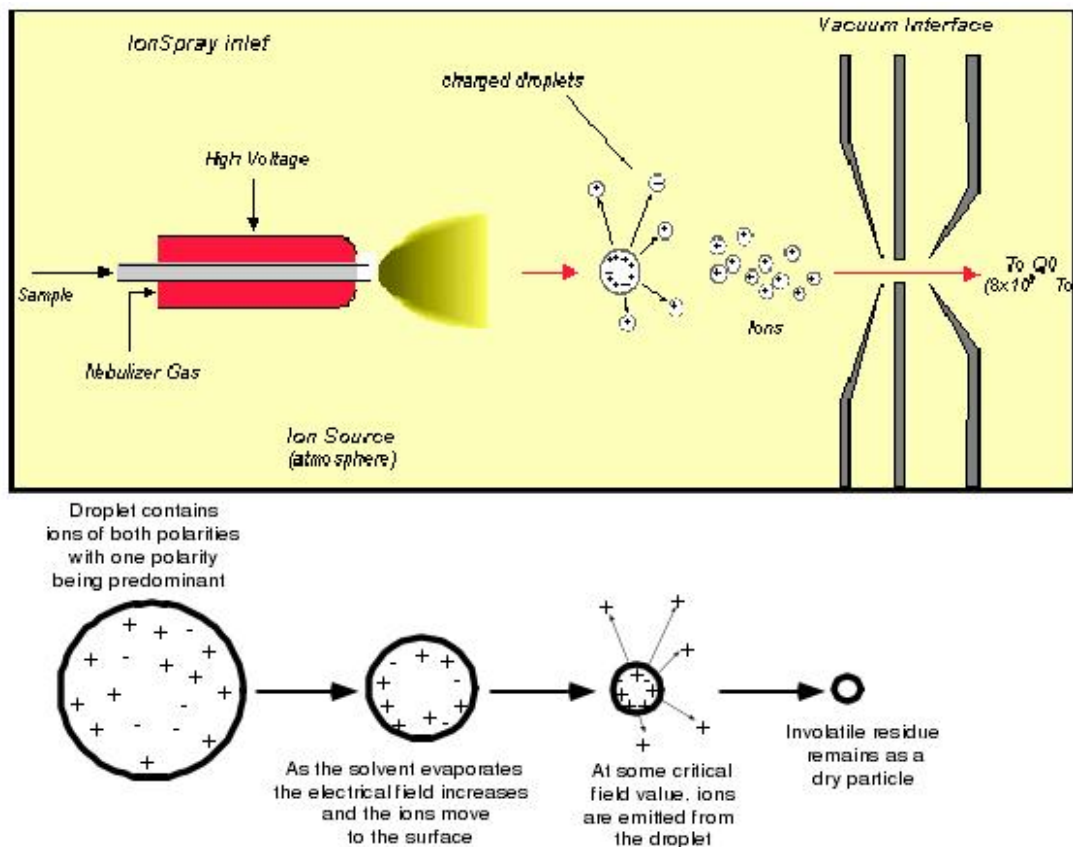


图 1.2 电喷雾原理

影响初始液滴产生的主要因素[67]有:溶液流速、溶液的电阻系数和溶液的表面张力。由于电喷雾过程相当复杂,影响样品分子离子化程度的因素也是十分多的,如被测物的 pK_a 值和溶液的 pH 值;干燥气体的温度和流量;溶剂的蒸发热;离子在气态的溶解热;质子亲和势和电荷交换速率等。喷雾毛细管内径的大小以及静电场强的大小等也能对电喷雾产生影响。 pH 对被测物是否能带电荷从而被电离有相当重要的作用,有的大分子对 pH 范围要求比较宽松,而有的生物大分子能生成多电荷离子的 pH 范围相对窄,这在分析中要加以注意。 pH 与形成的正、负离子的类型也有关。当检测离子为正离子时,希望形成阳离子。在低 pH 时,阳离子可以通过质子化而形成带电离子;增加 pH ,灵敏度会下降,同时分子的平均带电电荷将减少。当用负离子方式检测时,增加 pH 有助于去质子化,从而使分子的碱性基团暴露出来,并可以增加灵敏度。

一般样品浓度应小于 10^{-5} mol/L ,如果浓度过高,则形成多分子离子的可能性很大。对大部分有机物都适用的最常用的溶剂是 20%水+80%乙腈+0.1%甲酸。表面张力越高,放电所要求的电压就越高,如以纯水为溶剂时喷雾电压几乎是以甲醇时所需电压的 2 倍。喷雾电压过高,针尖本身在空气中会引起尖端放电,在进行分析时,尖端放电可以辅助产生较大电流,但会抑止大分子离子的产生,一般可以在气流中加氧或用 SF_6 等增强喷雾的导电性来抑制。

3. 质谱技术的应用

世界著名的质谱学家 McLafferty 称现代质谱的特异性(Specificity)、灵敏性(Sensitivity)、快速(Speed)和能提供准确的化学计量信息(Stoichiometry)四大特点为“4S”优点。现代质谱和它的联用技术已经广泛地应用于化学、医学、材料、环境和生物等几乎所有与化合物相关

的学科和领域中，是当今科学领域内最活跃的学科之一。

电喷雾应用范围广，可分析的物质包括:合成有机化合物、药物及其代谢产物、天然产物、违禁药物、蛋白质、糖类、核苷酸与 DNA、类脂、聚合物、无机物及金属有机化合物、富勒烯、表面活性剂、甚至是自组装膜与胶束等。以电喷雾为电离源的质谱还可以兼容多种样品引入方式，如液相色谱、毛细管电泳、超临界色谱、凝胶色谱及更多的其它进样方式。随着技术进步和理论研究的深入，电喷雾技术将在化学、材料科学、新药研发以及生命科学领域等发挥更加重要的作用。

质谱的应用领域:

- 1.化合物分子量和结构测定
- 2.化学反应的鉴别和反应机理的研究
- 3.石油组分和添加剂的分析
- 4.化工原料和化工产品的分析鉴定
- 5.毒品分析和中毒病人中毒品的鉴定
- 6.空气、水和泥土中有机污染物的分析
- 7.香料中组分的分析
- 8.食品中维生素等组分、食油中组分分析
- 9.染料、涂料的分析
- 10.有机聚合物的分析
- 11.酒中组分的分析
- 12.植物中有机组分的分析
- 13.粮食、蔬菜、水果中农药残留物分析
- 14.烟草中组分的分析
- 15.食肉中一些激素的分析
- 16.天然药物结构鉴定，合成新药结构确证
- 17.新药中杂质、药物降解物分析，新药稳定性研究
- 18.药代动力学研究和药物代谢物结构分析
- 19.新药研究中组合化学库中组分的鉴定
- 20.多肽、蛋白质分子量的测定
- 21.多肽和重组蛋白一级结构的确定
- 22.多肽序列的测定
- 23.蛋白质变异体的检测
- 24.蛋白质中巯基测定和蛋白质中二硫键的指定
- 25.蛋白质翻译后修饰的测定
- 26.蛋白质高级结构的研究
- 27.生物分子非共价键相互作用的研究
- 28.未知蛋白质的鉴定和蛋白质组学研究
- 29.蛋白质复合物中组分的分析
- 30.寡核苷酸、DNA 片断分子量测定
- 31.寡核苷酸序列分析
- 32.SNP 测定
- 33.用模型识别软件快速鉴别微生物
- 34.结构免疫学研究中的应用
- 35.细胞生物学中的应用

简单介绍一下:

(1)分子量的测定

ESI-MS 的软电离特点,能使化合物在电离过程中不被破坏,因而能得到更为准确的分子量信息,能广泛用于各领域的各类物质分析。电喷雾质谱使生物大分子的分子量测定也变得比较容易[68,69],与其他测定分子量的方法相比,ESI-MS 方法具有快速、灵敏和准确的特点,更适合大分子量样品的分析[70]。

(2)结构分析和裂解机理研究[71]

ESI-MS 测定的分子量能提供分子结构的初步信息,为进一步了解分子的结构,还需分析分子产生的碎片离子和指纹图谱,如用高分辨质谱仪测定样品的精确分子量,确定样品的分子式;从低分辨质谱的同位素比确定分子式;从有机化合物的裂解方式获取结构信息;用质谱图比较鉴别化合物;计算机检索质谱图库,鉴别化合物。CID 或其它方式产生的多级质谱一般可以较好的确认化合物的结构[72]。而对于复杂的混合物以及生物大分子、非共价结合的蛋白质复合物的测定等则比较复杂,生物结构的分析主要包括二硫键的测定、蛋白质的折叠、糖蛋白或磷酸化蛋白结构和作用位点的研究。通常先用酶解或化学解离等方法让大分子变成小分子片断后再进行质谱分析[73]。现在也出现了一些较好的技术,如红外多光子解离(IRMPD)、电子捕获解离(ECD)等可直接利用多级质谱来分析大分子物质[74]。现代质谱技术已经能够快速、准确地提供蛋白、核酸等生物大分子的分子量、序列、一级结构信息以及修饰等方面的信息;能够研究生物大分子与小分子化合物的弱相互作用等。质谱还可以应用内标或外标法以选择离子检测方式进行定量分析。

(3)有机化学反应的研究

应用 ESI-MS 还可以研究溶液中有机化学反应过程及其产物组成。检测反应过程中间产物以揭示化学反应的机理。

(4)分子间非共价相互作用的研究与新药筛选

非共价结合的自组装体系是靠弱相互作用聚集在一起的,用通常的质谱方法,很难得到分子离子峰。在生物体内,起生理作用的受体/配体往往是可逆结合的,相对来说,它们的结合也不是很强的。因电喷雾离子化条件比较温和,可以防止复合物在离子化过程中解离,从而观察到完整非共价的酶/抑制剂、肽/金属离子配合物和受体/配合物等等。近几年来,研究特异性生物分子/有机分子复合物成为热门课题,利用 ESI-MS 法已初步研究了溶液中蛋白质/配体、酶和活化剂/抑制剂、DNA/药物、离子通道/抑制剂等非共价相互作用,在研究生物分子结构及药物作用机理、药物的构效关系等方面取得了较大进展,为从分子水平筛选药物先导物开辟了新途径[75-81]。组合药物筛选是目前新药研究中一种比较先进的技术。在体外模拟的生理条件下,药物与靶分子反应,如果存在共价或非共价的结合,则会生产强键或弱键的复合物。反应产物用 ESI-MS 进行检测,从测量的分子量的变化可以推测药物分子是否与靶分子作用形成复合物,作用的强弱可以通过质谱中的其它方法如 CID 等方法来检测。这样,通过对比药物成分和靶分子的分子量和解离能量,便可以推断何种药物与靶分子的不同强度的结合[82]。

4. 质谱在非共价相互作用研究方面的应用

非共价相互作用很弱,一般小于 10kJ/mol,比通常的共价键键能小 1-2 个数量级,作用范围为 0.3-0.5nm,但这些分子间弱相互作用力可在一定条件下起加合与协同作用,形成具有一定方向性和选择性的强作用力,而这种强作用力是分子识别与组装的基础,不仅与人体内细胞功能的实现休戚相关(生物分子间相互作用),而且在材料、电子科学等方面都有很广的应用。对其本质的研究,有助于理解在生命科学、医学、药学领域中涉及到的分子之间的相互作用以及相互识别过程。

非共价相互作用一直是科学界的一个研究热点[83-89]。科学家们已经用许许多多的方法来研究非共价复合物,主要分为以下几类,光谱方法如核磁共振(NMR)、表面等离子体共振

(SPR)、荧光光谱、X-射线衍射、红外光谱(IR)、电子顺磁共振(EPR)等；色谱方法如凝胶渗透色谱、胶束色谱、体积排阻色谱(SEC)、超滤(UF)电泳(包括聚丙烯酰胺凝胶电泳、琼脂糖电泳和毛细管电泳)等；其它方法主要包括量热方法(ITC 和 DSC)、分子模拟计算方法和一些生物学上常用的杂交方法(Southern, Northern, Western Blot)。但是这些方法用于检测非共价复合物获得其结构信息时各有优缺点,如样品消耗量大、耗时、精确度低、灵敏度差及样品纯度要求高等。凝胶色谱、超速离心、红外光谱、差示紫外光谱、荧光光谱、圆二色谱等只能表明形成复合物后蛋白质的结构发生了变化,但提供很少或不能提供关于分子量及复合物化学计量信息。X-晶体衍射和核磁共振方法被用于测定蛋白质的三维结构,可以提供详细的结构信息,但都很费时和复杂。X-晶体衍射只有在得到合适晶体的情况下才能应用,但单晶的培养是很不容易的。核磁共振法适合分析高浓度(1-2mmol/L)的水溶性生物样品,分析所用样品量很大且不能分析分子量很大(大于 40000)的复合物。

自从软电离方法——ESI 和 MALDI 在 1989 年分别由 Fenn 和 Tanaka 发明以来[90,91],质谱技术凭借其四个“S”(Specificity, Sensitivity, Speed 和 Stoichiometry)的突出优点以及多级质谱的功能,在非共价复合物研究领域发挥越来越大的作用[92,93]。研究人员不仅利用 ESI-MS 研究了众多模型化合物间的相互作用,而且在实际应用领域对蛋白质与配体、酶和活化剂与抑制剂、DNA 与药物、离子通道与抑制剂等非共价相互作用做了详细的研究[92,94];不仅研究离子在气相中的相互作用,而且研究了它们在溶液中的作用及其气相条件和液相条件的相关性[95]。另外,在药物的作用机理、构效关系和生物大分子的高级结构方面的研究也取得了重大的进展,这就为在分子水平大规模的筛选药物先导化合物开辟了新途径。

4.1 复合物的电喷雾研究历史

早期的离子化方法,如场致解吸离子化、快原子轰击、二次离子质谱、热喷雾和等离子体解吸等技术,直到今天仍是非常可行的分析技术。但相对于 ESI 等软电离技术,它们存在着灵敏度低、分子量范围窄和不够“软”的缺点。ESI 在不破坏共价键的前提下使分子离子化,而且能够维持弱的非共价键相互作用,使之在研究非共价复合物方面显出独特的优越性。此外,ESI 与这些离子化方法还有一个明显的不同之处是能够一定程度反映生物分子结构与溶剂性质、液相状态间的关系。

非共价复合物的研究历史要追溯到 20 世纪 90 年代初期,在 1991 年到 1993 年间,一系列杂志报道了 ESI-MS 在研究非共价复合物时的应用。其中一大部分作为快报的形式发表在美国化学会志上。首先是 Cornell 大学的 Ganem 等合作报道了在细胞浆中用 ESI-MS 检测到受体蛋白 FKBP12 及其配体 FK506 和 Rapamycin 的完整复合物[96];稍后,他们又报道了溶菌酶和 N-乙酰葡萄糖胺的结合以及酶解的产物[97]。这些早期报道不仅验证了 ESI-MS 研究非共价复合物的可行性,而且将 ESI-MS 带入了生物化学、生物和医药领域的应用中。为使研究结果更具有实际意义,他们还提出控制实验条件来观察 ESI 过程,验证复合物是离子化过程中气相离子加合反应的结果,还是液相中复合物的本质反映,以考察其产生气相加合物来代替液相中具有专一性的复合物的可能性。因此,建立能真实反应液相中所形成的复合物的 ESI 方法是十分重要的。以往的这些文章也推动了生物学、生物化学和药物化学向运用 ESI-MS 技术的方向发展。Katta 等在亚铁血红素(原卟啉 IX)与肌红蛋白的复合上研究了溶液 pH 对复合物的影响[98]。他们在溶液 pH 从 3.35 到 3.90 情况下观察了肌红蛋白的 ESI-MS 谱图变化。在 pH=3.55 时,谱图仅仅显示亚铁血红素和脱辅基的蛋白质的峰。逐步提高 pH 到 3.90 时,就允许蛋白质适度折叠到较“自然”或非变性状态,它同时以两种状态(脱辅基与未脱辅基)存在;pH 在 4.4 或更大时它完全以自然状态存在,此时全部蛋白以非共价键的形式和血红素结合。这说明 ESI-MS 上观察到的肌红蛋白不是在离子化过程中产生的,而是体系溶液中复合物的质谱体现。这个研究是 ESI-MS 研究复合物历史上的一个里程碑。直到

现在,肌红蛋白还经常在复合物研究中作为一个优化质谱条件的标准物质,被用作“调谐”化合物,优化实验条件,提高灵敏度,同时也用来观察非共价键蛋白质复合物。随后的几年里,还出现了一系列的非共价结合体系的 ESI-MS 报道。例如, Ganguly 等研究的 ras 蛋白和 GDP 之间的蛋白-核苷酸体系[99], Baca 等报道的 HIV 蛋白酶二聚体和抑制剂之间的蛋白-蛋白体系[100]等。更多更详细的蛋白非共价复合物 ESI-MS 的研究文献可在 Loo 的综述中找到,他根据相互作用的类别对它们作了简单的分类[78]。

近年来,随着研究手段的发展和人们对许多结合本质研究的兴趣,ESI-MS 对非共价复合物的研究从原来的大分子领域扩展到其它各个领域。除大分子外,当前受关注的其它非共价复合物主要有金属离子或含金属小分子与中性分子的相互作用和中性小分子间的相互作用[101,102]。总的来说,用 ESI-MS 进行复合物的研究是先的生物大分子领域中兴起,然后扩展到各个领域。但是,随着人们对生物体(包括人类自己)的研究兴趣的不断增长,ESI-MS 在生物大分子非共价复合物领域的研究起着越来越重要的作用,同时还将向更快、更准确以及更大分子量的领域发展[103]。

4.2 液相和气相 ESI-MS 测量的关系

ESI-MS 在非共价复合物研究中大受欢迎。生物体大部分由水组成。对于 ESI-MS 分析来说,一个生物化学样品最初是溶解在溶剂中,然后注射入质谱仪,而后才转化为气态。气相分子的测量跟初始的液相能否联系起来,测量的气相结构能否代表液相结构的真实状态就引起了研究者的思考。致力于此领域的研究者们发现了非共价复合物的 ESI-MS 测量出的化学计量和测量中观察到复合物及其相对丰度都跟液相联系最紧密。有关的早期报道,像 Loo 等人所做的关于核糖核酸酶 S 的实验[104,105],反应了实验和所料想结果的一致性。观察到的复合物形成通常不只是一种简单的气相分子聚集,去除溶剂后,特异性结合的复合物气化后仍能在某种程度上得以保存。ESI-MS 反映的结果与液相行为的正向联系表明 ESI-MS 可以用来测量溶液平衡结合常数。但 McLafferty 等人[106], Jarrold[107], Clemmer 等人[108], Williams 等人[109],及其他一些研究者都认为,气相和液相的状态也许不完全一致,因为气相分子或复合物的精确三维结构,跟那些溶剂中的分子也许相同,也许不同,然而,生物分子进入气态时也许会保留一些结构因素,例如:已经发现一个小型环状的多肽的碰撞活化解离行为跟它的液态结构相关[110],自然状态下分离出来的肽由一个“尾”区组成,肽“尾”区插入一个有 7 个残基组成的“圈”,并且,它的“尾”区是被非共价键作用力维持在“圈”里,而合成的同样序列的肽的“尾”区却在“圈”的外面,这两个肽的 MS/MS 谱显示出很大的差别,这种不同反映出它不同的溶液结构。在这个例子中,肽的液相结构跟气相结构一致,此结果表明,可以通过探测生物分子的气相结构来阐明它们的液相空间结构。还有人发现了非共价复合物的相对分解行为与它们的液相稳定性间的联系。Podjarny 等人作了一个有趣的研究:对醛糖还原酶与抑制剂的结合情况,分别用 X-射线和 ESI-MS 检测,并对它们得到的数据加以比较[111]。在醛糖还原酶与各种各样的抑制剂的相互作用中都包含了静电和氢键作用,而断裂醛糖还原酶与各种各样的抑制剂形成的 1:1 的气相复合物所需的能量则与所组成复合物的不同的抑制剂相关。

液相中非共价作用类型的不同会影响观察到的 MS 结果;根据 ESI-MS 气相测量结果的差异也可区分液相中非共价相互作用的不同类型。在非溶剂环境中靠静电作用结合在一起的复合物在气相中非常稳定。在溶液中这种静电作用会由于其溶解在有一定介电常数的溶剂中而大大降低[112]。例如蛋白质-RNA 复合物的离子,这类复合物是由一个带高正电的分子与一个带负电的大分子通过静电作用形成的,像 TA 肽-TAR RNA 复合物[113],这种复合物是非常稳定的,即使施加很高的碰撞能亦不分解;氨基配糖物如新霉素是通过静电作用与 RNAs 发生相互作用的,新霉素-TAR RNA 复合物在气相测定中也未解离。但是,在溶液中通过疏水键结合,具有相似的结合亲和力的复合物,在气相中就非常不稳定[114],在溶

液中靠疏水作用结合,在真空中这种作用就常显得很弱。Robinson 研究组注意到 ESI-MS 所测量的疏水小分子跟酰基 CoA 键合蛋白质结合的气相相对亲和力跟它们的液相亲和力没有对应关系[115]。气相相互作用所显示的不同相对稳定性使在运用 ESI-MS 来测量液相中绝对和相对亲和力时应特别留意,对于那些在气相和液相中靠相同的作用机制结合在一起的复合物,它们在气相中可能有着相似稳定性,这时用 ESI 测定其相对亲和力应该不成问题,但是如果在液相中相互作用的分子疏水键作用结合在一起的复合物,在用 ESI-MS 测定的质谱数据可能就不那么可靠。

虽然 ESI-MS 实验中采用多种方法除去大分子复合物中的水分,但在许多生化作用中,水仍是在一起起调节作用的重要成分,质谱能识别出这种有着重要作用的水分子吗?因为水包围着大分子复合物并与其发生相互作用,所以在整个溶剂范围内从大量水中区分出这些很少但很重要的水分子是很难的。但也有已经观察到结合水的复合物的报道,例如:水结合到小肽,短杆菌肽 S[116]和其他几个大蛋白[117,118]的质谱。Fabris 等观察了结合水的 Zn 胰岛素六聚物的复合物[119],其中水分子跟 Zn^{2+} 配位。一个在 HIV 领域较重要的关于蛋白质复合物的研究包括了 HIV 蛋白酶二聚物与抑制剂间的相互作用[120]。先前 HIV 蛋白酶的 X-射线晶体结构显示了一个高亲和水分子“水-301”,但是,尽管多次尝试用 ESI-MS 测试水合蛋白质复合物,其中包括降低金属毛细管表面温度,降低去溶剂化作用的碰撞能,还是没能观察到水合物的存在,也许在溶液中水分子和 HIV 蛋白酶结合寿命短,交换迅速导致质谱仪观察不到它的存在。然而,Robinson 研究组报告的几个例子表明,有时也可能观察到这样的水分子[121]。

大多数文章都肯定气相 ESI-MS 测量跟液相系统之间的联系,这样似乎使这项技术更有价值,否定此结果的文章很少见到,在一些学术领域好像也不太被鼓励这么做。在某种程度上,这是一种不幸,因为我们可以从这样的例子中学到和成功实验一样多的东西。但是,当我们从这样的实验得出结论时,一定要慎重。最好,ESI-MS 结论可以说成对所提出的假设的一种支持。

4.3 非共价相互作用

非共价相互作用是指除共价结合外基团和分子间的所有其它相互作用。非共价相互作用主要包括离子键、范德华力、氢键相互作用和疏水相互作用[122]。它们在形成非共价复合物中起的作用不仅与分子的属性有关,而且还与其处的环境密切相关。

(1) 离子键

离子键是由两个带相反电荷的分子在一定的距离(r)的情况下表现出来的作用力。不论在溶液状态下还是在气态状态下,静电力在复合物中的作用都是十分重要的。水相中谷氨酸和赖氨酸形成的离子键稳定了蛋白的 α 螺旋结构[123];在细胞色素 C 及其过氧化酶的复合物的形成过程中,带电氨基酸残间的静电力起了重要的作用[124];实验证明在 *Pseudomonas aeruginosa* 外膜蛋白 D2 中存在一个碱性氨基酸的结合位点,通过静电力结合碱性氨基酸或者含碱性氨基酸的多肽。

(2) 范德华力

范德华力是构成蛋白质高级结构的主要作用力,同时也是复合物形成的一种作用力。按来源不同,可以分为静电力、诱导力和色散力。虽然范德华力在复合物形成中普遍存在,但是对于这些复杂分子间作用的单个力的测定是十分困难的,因此很少有专门的文献来测定这类力在 ESI-MS 研究复合物中扮演的角色。

(3) 偶极相互作用

偶极相互作用按照偶极的数目和作用对象,可以分为以下几种:偶极-偶极、离子-永久偶极、离子-诱导偶极、离子-无极、无极-无极和偶极-无极相互作用等。除离子偶极相互作用外,偶极相互作用由于其影响较小,在很多蛋白质或者多肽的研究中经常将它忽略。

(4)氢键相互作用

我们知道,双链 DNA 中的碱基配对的力是由氢键提供的。氢键在分子间相互作用中是十分普遍的。当一个氢原子被电负性较大的原子(如 N, O 等)化合后,由于氢原子上的电子被化合原子吸引,氢原子显示出较大的电正性,这时氢原子和其它分子中的电负性大的原子有强烈的静电作用,所以在某种程度上,氢键相互作用也是静电相互作用的一种。氢键的键能在 30kJ/mol 以下,比共价键能小很多,比范德华力稍大一些。由于氨基酸残基中羟基和氨基普遍存在,所以在多肽和蛋白质的研究中,氢键显得尤为重要[125]。

(5)疏水相互作用

疏水相互作用最早是由 Kauzman 在研究天然蛋白结构的形成和稳定性的时候提出来的[126]。它是指极性基团之间通过静电力和氢键作用聚焦在一起,从而排斥疏水基团。对蛋白质分子来说,疏水氨基酸(含疏水侧链基团的氨基酸)如苯丙氨酸、亮氨酸和异亮氨酸等通常聚集在一起,在分子内部形成区。由于很多小分子化合物极性较小,蛋白质分子与小分子的相互作用经常是小分子与疏水区的作用。当然,非共价相互作用是多种作用力共同作用的结果[127]。

非共价复合物形成的主要作用力与上面提到的这些力有关。但是,作用的强度还和很多因素相关,如溶液的离子强度和 pH、温度等。对不同的复合物作用方式和作用强度的研究还将是一个长期的研究问题。在 ESI-MS 中,由于溶剂分子的去除,除疏水作用外,大部分相互作用都表现出一定程度的增长。相反,当体系失去水后,疏水作用变得更弱了。在此,疏水作用、亲水作用和氢键相互作用是比较特殊的相互作用,它们不能简单的用公式来表示。然而,这三种力在蛋白质高级构象的保持和复合物的形成中都起着重要的作用。但是,仅仅在质谱图上看到一个所谓的复合物的峰并不能够证明两个分子间有特异性亲和力,它们有可能是非特异性结合(如离子化过程中的分子团簇或其它不可逆结合等)的假阳性结果[128]。

因此,采取一系列的方法来鉴定非共价结合的特异性是十分有必要的。当前常用的两类方法是化学修饰法和实验过程控制法。

化学修饰主要是指采用化学或生物化学的方法改变复合物中某个分子的活性部位结构特性来削弱结合力或者消除结合力的方法。比如:蛋白质的定点突变、氨基酸的共价修饰、核苷酸的碱基错配、蛋白高级结构的二硫键的去除等等。Rostom 等采用多种方法研究了外周血多肽受体的多肽结合特性。采用不同侧链的氨基酸、不同氨基酸、不同立体化学性质和不同多肽 N 端的乙酰化修饰的结果表明:修饰后多肽的结合位点不能很好的形成,多肽与受体的结合与这些化学修饰密切相关。结合质谱图的电荷分布特征和峰宽度特征,作者得出结合的多肽是在一个充满溶剂的腔中被受体包含的[129]。

实验过程控制法是指不同的样品准备条件(温度、缓冲液等),或者不同的实验手段。在不同的温度和缓冲液条件下,非特异性结合的复合物会在各种条件下都存在。Smith 等考察了不同的温度和不同 pH 缓冲溶液下的锌指多 DNA 的特异结合性质[130]。近来,还有的科学家通过比较同一样品的 MALDI 和 ESI 实验结果来推断结合是否是特异性的。他们认为,如果结合是特异性的,与采用的离子化方法无关,可在不同的离子化方法中都观察到复合物的质谱信号[131]。

总之,由于质谱研究的对象气相环境中的复合物,其相互作用的方式与液相中的不尽相同。因此,只有采取多种方法,谨慎的研究复合物,推断其结合的本质,才能获得有意义的结果,并将其应用到指导实际工作中去。

4.4 电喷雾质谱研究非共价相互作用

自 1991 年 Ganem 等首次将 ESI-MS 用于研究亲免蛋白 FKBP12 和几种不同的免疫抑制药物形成的非共价复合物以来,ESI-MS 技术被越来越多地被应用于各种非共价复合物的研究中,并已逐渐成为研究非共价相互作用的主要手段之一[132]。电喷雾质谱研究非共价相

互作用主要是用于考察非共价结合的选择性、亲和力及稳定性,测定结合或解离常数,确定结合位点等。

(1)考察结合的选择性、亲和力及稳定性

用 ESI-MS 研究超分子复合物的结合选择性主要是采用竞争的方法,样品溶液中通常含有一种主体化合物和多种客体化合物,或多种主体化合物和一种客体化合物,通过比较质谱图中不同复合物离子的丰度来评估主体分子和不同客体分子的结合选择性。这类实验所需的样品量极少(通常在 nmol 级),是衡量体系中结合选择性和亲和力的快速、准确和有效的方法。此外,通过气相条件下复合物离子的解离过程可以考察结合的稳定性。Kempen 等[133]采用 ESI-MS 考察了溶液中一系列侧基分别为甲氧基、羧酸、酯或酰胺的二苯并-15-冠-5 套索醚对三种碱金属 Na^+ 、 Li^+ 、 K^+ 的结合选择性。结果发现,在甲醇溶液中所有被考察的套索醚对 Na^+ 的选择性均好于对 Li^+ 和 K^+ 的选择性。套索醚空腔的大小、侧基的碱性以及溶剂种类均会影响套索醚从溶液中提取金属离子的能力。Blair 等[134]用 ESI-MS 对五种笼型冠醚与重金属离子的结合选择性的研究表明,除了笼型穴状配位体衍生物倾向与 Pb^{2+} 结合外,大部分的笼型化合物倾向与 Hg^{2+} 结合。同时该实验还表明,溶抗衡离子的种类对于复合物的形成影响相当大,如在含有金属高氯酸盐或硝酸盐的溶液中二氮-15-冠-5 会优先选择结合 Hg^{2+} ,而在金属氯化物溶液中则会优先结合 Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 。这种竞争性的策略还被用于研究和评估生化体系中的非共价复合物的结合选择性和亲和力,如蛋白-药物[135]、DNA-药物[136]、蛋白-多肽[137]、多肽-DNA[113]等。

采用 ESI-MS 方法研究亲免蛋白 FKBP12 与不同的免疫抑制药物如纳巴霉素等形成的非共价复合物的结果表明,一个蛋白质分子可与两个药物分子形成非共价复合物,其中蛋白与大环内酯纳巴霉素的结合明显强于与其它类似物的结合。Wan 等[138]考察了四种药物(偏端霉素、烟酸己可碱 33258、烟酸己可碱 33342 和 Berenil)与一个双链 DNA 的竞争性结合,并根据 ESI-MS 中未结合的双链 DNA 与结合的双链 DNA 的丰度比值来计算同一双链 DNA 的相对结合亲和力。研究表明,药物与 DNA 结合的程度依次为烟酸己可碱 33342>烟酸己可碱 33258>偏端霉素>Berenil。Cheng 等[139]采用 ESI-MS 方法推算出 Gene V 蛋白对寡核苷酸序列 poly(dT)的亲和力是对 poly(dA)亲和力的 400 倍,结果与其它生物物理实验得出的结论一致。Guo 等[140]采用 ESI-MS/MS 方法,通过改变碰撞诱导解离的能量考察了药物齐墩果酸(OA)与具有增溶、缓释作用的多种环糊精之间的结合稳定性,结果表明 OA 与不同环糊精之间的结合稳定性为 $\alpha\text{-CD-OA} < \beta\text{-CD-OA} < \gamma\text{-CD-OA}$ 。

(2)测定结合或解离常数

用 ESI-MS 测定结合常数的方法有很多种,其中最常用的是滴定法和竞争法。文献报道了很多成功运用质谱法获得结合或解离常数的例子。这部分将在后文详细叙述。

(3)确定结合位点

ESI-MS 和 ESI-MS/MS 技术是研究生物超分子复合物结合位点非常有效的工具,目前这方面的研究多集中于金属离子-蛋白、药物-蛋白等非共价复合物。由于气相条件下复合物的解离过程往往可揭示其结合作用的本质,因此研究的方法主要是将蛋白水解与电喷雾串联质谱检测相结合。Nemirovskiy 等[141]用 ESI-MS/MS 研究了以兔肌钙蛋白的钙离子结合位点 III 为模型的一系肽与钙离子复合物的碰撞活化裂解行为,由于 ESI-MS 中所产生的钙离子/肽碎片由钙离子结合点控制,因而提供了钙离子结合位点的信息,表明钙离子的结合位点涉及到一个谷氨酰胺、一个谷氨酸和一个天冬氨酸。为研究过渡金属配合物对多肽和蛋白进行选择切割的机理,孙晓娟等[142]用 ESI-MS/MS 考察了金属离子 $\text{Pd}(\text{II})$ 和 $\text{Pt}(\text{II})$ 对多肽 Microperoxidase-II(Mp-II)的配位位点。结果表明, $\text{Pd}(\text{II})$ 和 $\text{Pt}(\text{II})$ 均优先选择与 Mp-II 的 Cys7 配位,它们所促进的细胞色素 C 中 His18-Thr19 肽键的水解切割与它们和 Cys7(而不是和 His18)的配位相关。

考察药物与蛋白的作用位点有助于深入了解药物的作用机理。Ganguly 等[143]采用 ESI-MS/MS 分析酶解后的蛋白片段,确定了有机抑制剂 SCH54292 在致癌的 ras 蛋白上的结合位点。

4.5 电喷雾质谱研究蛋白质非共价复合物的实验条件

从电喷雾技术创立伊始,这项技术就表现出对弱键结合的化合物具有很好的检测能力,对非共价复合物的研究首先在大分子领域展开。非共价复合物脱溶剂的过程将复合物从液相转移到气相。为在气相中保持完整的复合物,整个离子化过程应十分温和。因此,我们必须选择合适的仪器界面条件(如毛细管温度、喷雾电压、鞘气和干燥气温度以及流速等)以减少非共价复合物的解离,提高脱溶剂的效率,产生可靠的复合物离子信号。电喷雾质谱研究非共价复合物成功的关键条件是调节合适的仪器参数和样品制备。ESI 产生的液滴的脱溶剂效果直接影响到非共价复合物的观测。改变溶液条件的方法(例如采用水中加入少量的有机溶剂,同时还含有低浓度的酸)能提高实验的总灵敏度,但是改善仪器装置和适当选择仪器参数来有效脱溶剂对研究非共价复合物有着一样甚至更多的影响。在近乎 100%水、中性溶液经常会观察到多电荷复合物的溶剂加合峰,这样会降低总的灵敏度,因为这时所分析的复合物多电荷离子峰分布在溶剂加合峰中,整个峰型变宽,使得对分子量的分析变得复杂。用来去除溶剂化效应的物理方法有:对带多电荷的电喷雾液滴喷射逆向气流,加热喷射的逆向气流,加热玻璃或毛细管金属入口和调节碰撞区的能量。

实验表明,乙酰辅酶 A(acyl COA)及其衍生物与蛋白质的复合物对 ESI 很敏感,当温度由 20°C 升至 80°C,复合物完全分解,看不见复合物的分子离子峰。控制一定的温度和电压是得到完整复合物离子的必要条件。Goodlett 等人在研究气相中一条 s 多肽链和 s 蛋白质组成的非共价复合物(核糖核酸酶 S)的稳定性时发现,毛细管加热至 100°C,仍能观察到核糖核酸酶 S 的分子离子峰;若升至 171°C,核糖核酸酶 S 的离子峰完全消失,只能观测到核糖核酸酶 S 解离出的 S 蛋白离子峰;若保持毛细管温度为 110°C,提高分散电压至 200V 时,核糖核酸酶 S 也将完全解离[105]。因此,在气相中降低毛细管温度和分散电压是得到完整的复合物离子的重要条件。界面条件对复合物离子稳定性的影响程度依复合物的种类不同而各异。然而,尽管绝大多数方法是为了从气相复合物中去除溶剂,但关键是要维持去溶剂分子和大分子复合物断裂之间的平衡。总的来说,非共价分子复合物在气相状态显得非常脆弱,在能够使样品离子化的条件下,温度越低越好,如果过热,或者在大气压力/真空界面的碰撞能量或 Cone 电压太大,它很容易解离。然而,仪器界面条件降低会减小 ESI 过程中去溶剂效率,溶剂分子去除不完全势必导致离子峰变宽、分析灵敏度下降。在较温和的界面条件下,生长激素释放抑制因子(SRIH)脱溶剂不完全,可与 1-10 个水分子形成 SRHI-nH₂O 加合物[144]。可见,在 ESI 过程中界面条件越低复合物离子越稳定,我们应在保证充分去除溶剂的情况下,尽可能使用温和的仪器界面条件。

除此以外,溶解样品的溶剂、pH 值以及一定离子强度的缓冲液也是影响非共价复合物形成的重要因素。对大多数体系来说,不同的条件会引起复合物相对丰度的变化。通常,用电喷雾质谱研究蛋白质时,低的 pH 或有机溶剂的存在会导致蛋白质变性,阻碍复合物的形成,即使溶液中只含有 10%的甲醇,也会导致复合物的消失。一般情况下样品溶于含少量 HCOOH 或 CH₃COOH 的乙腈或甲醇的水溶液中。用电喷雾质谱研究复合物最灵敏和最稳定条件并不一定适用于非共价键复合物的研究。此条件下蛋白质已去折叠变性,这样的条件不利于形成非共价复合物。在接近生理 pH 值时,蛋白质保持有天然的活性构象,才能形成非共价复合物。从实验观点来看,成功使用 ESI-MS 分析非共价复合物的关键包括:保持适度的溶液条件以便保证复合持天然的状态,并且快速有效地对 ESI 产生的液滴进行脱溶剂。可以使用合适的溶剂,调节溶液的 pH 值,以及较强的缓冲体系来维持复合物原有的状态。偏离这些最适宜的条件就会使所能观察到的复合物相对比例减少。研究蛋白质非共价复合物

时, 比较合适的溶液为 pH 在 5-8 之间的 5-50mmol/L 的乙酸铵和碳酸氢铵挥发性缓冲盐溶液。因为它们不常跟大分子形成很多的气相加合物, 而且在使用这些缓冲体系时背景离子强度降低但蛋白质离子强度却能保持。

分析成功的关键还在于样品的纯度和质量, 因为与 ESI-MS 相配的缓冲系统是有限的, 因此相对于质谱分析, 实验前的缓冲系统的选择和脱除额外的杂质盐、添加剂就显得很专业, 在去除杂质盐和样品浓缩时, 经常选用渗析和离心膜过滤, 在线微量渗析, 还有最近 Naylor 和合作者们提出的在线尺寸排阻色谱法[145]为样品在进入 ESI 源前的快速纯化提供了方法, 保证样品达到所需纯度。

总之, 所有能够导致复合物解离的因素都不利于非共价键复合物的形成。pH 值、有机溶剂、温度和电压是在研究非共价键复合物时要考虑的几个重要因素。用电喷雾质谱研究蛋白质非共价键复合物的稳定性也常常是通过改变这几个条件来实现的。为了优化给定 ESI 界面和整个系统的操作条件, 可选择在一个观察非共价大分子复合物的最佳条件, 可以用肌红蛋白作为一个测试系统或“校准参数”来选择最佳的仪器必需条件, 以保证观察到肽链与血红素分子之间 100% 复合物形成(也就是说, 最小量观察脱辅基蛋白和游离的血红素)。每一台仪器和相对应的系统参数都有它自己的独一无二性。虽然这个方法不能确保立即容易地观察到非共价分子复合物, 但它却给实验提供了一个有益的参考。低流量 micro-和 nano-电喷雾源不仅在研究生物分子 ESI-MS 起了重要作用, 而且对于研究非共价复合物也很有意义。而且每分钟纳升的流量很低, 减少了样品的消耗量, 同时又不会减弱信号强度, 而且产生的液滴体积也变小了。这些也许会对非共价复合物研究中的脱溶剂化有所帮助, 但它仍停留在争议的阶段, 还要作一定的研究来验证这个假设。但是, 毫无疑问, nanoelectrospray 的到来会给非共价大分子复合物的研究提供重要的帮助。电喷雾质谱应用于非共价相互作用的研究实例 ESI-MS 所研究的主客体非共价体系非常广泛。常用环糊精、杯芳烃、轮烷、卟啉作为主体研究其与客体分子间的相互作用。在蛋白质领域, 质谱已探测了它们与金属离子、辅酶、抑制剂、其他蛋白质、多糖、寡聚核苷酸的相互作用。有关非共价复合物的质谱研究的文献报道很多, 而且在不同的时期也分别有许多科学家对之进行了很好的总结。

(1)金属离子与小分子

金属离子和小分子间的相互作用在 ESI 技术发明前就已经受到关注。而且, 它与很多大分子体系不同, 不需要 ESI-MS 等现代离子化手段也可以进行研究。最近几年这方面的研究十分活跃。氨基酸等小分子是进一步研究生物大分子的基础, 因此成为研究的热点之一。吴胜明等[146]用正离子电喷雾质谱研究了常见 20 种氨基酸与钠离子在弱酸性水溶液中的非共价结合情况, 实验研究中观察到绝大多数氨基酸在此条件下与钠离子的非共价键结合力很弱甚至没有, 但其中脯氨酸和苯丙氨酸与钠离子有较强的非共价键结合能力。随后, 他们用三级四极串联质谱分析了常见的 20 种氨基酸的加钠效果[147]。结果表明, 绝大多数氨基酸与钠离子的非共价键结合力很弱甚至没有, 但脯氨酸和苯丙氨酸很容易形成加钠离子峰。采用“序列对接法”, 测出重组人酸性纤维细胞生长因子(rh-a FGF)C-端肽段的全序列, 并确定钠离子的加成位点为该肽段的第 6 位脯氨酸(6Pro)。通过酸化样品溶液得知无加钠、无序列间隙的该肽全序列, 与加钠肽段的序列一致。所有这些理论计算研究为进一步研究金属离子与蛋白质的研究提供了参考数据。Vitale 研究了 Cu^+ 与不同溶剂分子的反应, Schroder 研究了 Cu^+ 与尿素的配位[148]。此外, 还有卟啉类化合物(含各种金属离子)的仿生学的质谱研究, 比如铁卟啉的载氧功能, 还原性等方面的质谱研究。

(2)小分子与小分子

人工合成的自组装超分子配合物近来发展成为一个激动人心的研究领域。ESI-MS 是直接分析自组装体系混合物的有效工具。由轮烷、索烃和螺旋构造的超分子配合物皆可以用 ESI-MS 进行检测[149]。目前, 对环糊精与其它小分子的相互作用的研究比较活跃。环糊精

的空腔结构使之能与很多小分子尤其是药物分子尺寸相宜,形成复合物,在一定程度上起到增溶缓释、增加生物利用度和药物稳定性、减少药物的气味和毒副作用等。环糊精作为一个多功能分子在手性分离、药物缓释等方面都起着相当大的作用,研究他们的相互作用对于其作用机理的研究是十分有利的。吴巍等[150]利用电喷雾串联质谱研究了 α -、 β -和 γ -环糊精与黄芩苷的相互作用,证明三种环糊精都能与黄芩苷形成 1:1 和 2:1 包合物,并通过紫外吸收光谱计算包合物的稳定常数实验证明了质谱的结论。郭丽敏等[151]在液相条件下制备了 β -环糊精和联苯胺的非共价复合物,利用荧光光谱和高分辨核磁共振谱($^1\text{H NMR}$)对它们的液相化学性质进行了详细研究,并利用电喷雾多级串联质谱(ESI-MS)对所形成的非共价复合物的气-液相性质进行了比较研究。结果表明,在气相中,该非共价复合物可以稳定存在,其化学计量比分别为 1:1 和 2:1。申睿[152]等利用电喷雾飞行时间质谱测定了合成的氨基化环糊精与 5 种氨基酸所形成的 1:1 包合物的结合常数(K),考察了质谱条件及溶液条件对结合常数的影响,通过比较结合常数的大小,探讨了氨基化环糊精与氨基酸在准气相状态下的作用方式。

冠醚也是常用的主体分子,经常用于研究其与金属离子的非共价相互作用中,Kempen 等采用 ESI-MS 考察了溶液中一系列侧基分别为甲氧基、羧酸、酯或酰胺的二苯并-15-冠-5 套索醚对三种碱金属 Na^+ 、 Li^+ 、 K^+ 的结合选择性。结果发现,在甲醇溶液中所有被考察的套索醚对 Na^+ 的选择性均好于对 Li^+ 和 K^+ 的选择性。套索醚空腔的大小、侧基的碱性以及溶剂种类均会影响套索醚从溶液中提取金属离子的能力。Blair 等用 ESI-MS 对五种笼型冠醚与重金属离子的结合选择性的研究表明,除了笼型穴状配位体衍生物倾向与 Pb^{2+} 结合外,大部分的笼型化合物倾向与 Hg^{2+} 结合。Young 等还采用质谱方法计算了一系列套索冠醚-碱金属离子复合物的结合常数。杯芳烃(Calixarenes)一般是指由亚甲基桥连苯酚单元所构成的大环化合物,由于该类化合物具有富 π -电子的疏水空腔及特殊的立体化学结构,在对有机小分子的识别上显示出极大的优势,被誉为继冠醚和环糊精之后的第三体分子。20 世纪 80 年代中期以来,Gutsche 等几个研究组分别报道了杯芳烃及其衍生物能识别多种有机小分子,如氯仿、二氯甲烷、甲醇、苯、甲苯、苯甲醚、吡啶、氧化吡啶、二氧六环等,与它们形成稳定的包合物。此外,杯芳烃类衍生物也能够识别较大的有机分子,可与多种萘、醌、二茂铁、甾体、笼碳、染料分子等形成稳定的包合物。目前,围绕杯芳烃的手性识别和仿生物酶等的研究正向更深和更广的方向发展。Mckerverey 领导的研究组合成了杯[4]、杯[6]及杯[8]芳烃的多种酯类衍生物并报道了杯[4]芳烃酯类衍生物(1b)与乙腈形成化学计量 1:1 包合物的晶体结构。Hamann 等人在 1996 年提出了带有脲基官能团的杯[4]芳烃可以通过头-尾氢键作用形成二聚体,这种二聚体能够与氟代苯形成化学计量 1:1 的包合物。

(3) 蛋白、小肽与金属离子

金属离子对于金属酶的催化活性和结构稳定性至关重要,同时参与许多重要的生物过程,它们通过触发机理、稳定结构及控制氧化还原反应来起作用,在很多金属蛋白(如 MMP 等)中起着决定性的作用。Feng 等利用 ESI-MS 检测了基质金属蛋白酶(Matrix Metallo Proteinase),其中一个 MMP-matrilysin,在生理 pH 条件下,可测到同时结合两个 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} ,而在 $\text{pH}<4.5$ 时,仅检测到不能与抑制剂结合的脱金属酶,提示酶的活性必须有 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 的参与。Craig 等研究了在 VD 受体蛋白(VDR)和类维生素 AX 受体蛋白 α ($\text{RXR } \alpha$)-DNA 转录复合物形成过程中锌的调节作用。VDR 可与锌结合,细胞中 VD 依赖基因的活性受到细胞间锌离子浓度的影响。利用 μ ESI-MS 技术考察了不同 Zn^{2+} 浓度下,受体蛋白-DNA 的相互作用。不加入 DNA 时,VDR 和 $\text{RXR } \alpha$ 蛋白的质谱图中分别显示很强的单体峰,其同源二聚体峰很弱。二者混合物的谱图是单个受体蛋白谱图的叠加,锌不影响受体蛋白的相互作用。随着 Zn^{2+} 浓度的增加,检测到这两种蛋白的 Zn^{2+} 加合离子峰。当骨质疏松 VD DNA 反应元件(OP-VDRE)存在时,可观察到 $\text{RXR } \alpha$ 二聚体/OP-VDRE 复合物,但没有相应的 VDR

二聚体/OP-VDRE 复合物。VDR/RXR α 异源二聚体随着 Zn^{2+} 加入发生解离。用 Mg^{2+} 代替 Zn^{2+} 不改变蛋白/OP-VDRE 复合物。这些结果说明锌对类固醇激素受体蛋白-DNA 相互作用的调节作用。Amster 等人在红毒扁豆硷型蛋白质属结合性质, 以及蛋白质-蛋白质相互作用的影响和金属的氧化状态方面作了出色的研究。在所有的二价金属离子中, 钙离子的作用最为重要, 借助于细胞膜内外的浓度差, 钙离子在调节细胞过程中常充当第二信使的作用。其调节细胞的过程常涉及钙结合蛋白质。EF-hand 蛋白质结合钙的性质, 如钙调素和它们的靶肽已成为 ESI-MS 研究的对象。Loo 用电喷雾质谱研究了白蛋白和钙调素与钙离子的化学结合计量数及其协同关系。研究发现白蛋白的两个钙离子结合位点与钙离子的结合有很强的协同性。在钙离子浓度高时, 钙调素可以和四个钙离子结合。第三个钙离子和第四个钙离子与钙调素的结合有很强的协同性。钙调素分子中与钙离子结合的两部分也有很强的相互作用。Veenstra 等用电喷雾质谱研究了钙调素与两个肽的非共价键复合物。一个肽是钙调素依赖的蛋白酶 II 的钙调素结合区, 另外一个为毒蜂肽。只有在钙离子存在时, 钙调素和两个肽及钙离子形成 1:1:4(钙调素:肽:钙离子)的三元复合物。Nemirovskiy 等用 FAB 源和 ESI 源的串联质谱研究了以兔肌钙蛋白的钙离子结合位点 III 为模型的一系列小肽和钙离子复合物的高能和低能碰撞活化裂解行为。电喷雾质谱中产生的钙离子/肽段碎片由钙离子结合控制, 提供了钙离子结合位点的信息。表明钙离子结合位点涉及到一个天冬氨酸、一个谷氨酸和一个谷氨酰胺。

(4) 蛋白与配体

蛋白质生理功能通常体现在蛋白质与配体发生特异性结合。研究蛋白质与配体的相互作用有助于理解蛋白质的功能及相关的生理过程, 并为新药研发提供依据。1991 年, Katta 等报道的 Heme 和 Apomyoglobin 的复合物和 Ganem 发现的 FK506 和 FK 结合蛋白的复合物是最早报道的蛋白-配体复合物。这两篇文章证明了 ESI-MS 研究蛋白-配体复合物的可行性。此后, 利用 ESI-MS 进行了很多蛋白-配体复合物的研究。Bruce 研究了分子伴侣蛋白 SecB 与配体 OppA 的复合物, 得到了化学计量比和精确相对分子质量信息。Schmidt 用正、负离子模式的 nanoESI-MS 研究了血红蛋白和肌红蛋白中球蛋白与血红素的非共价复合物, 发现复合物碰撞活化的裂解程度和气相稳定性取决于 ESI-MS 实验条件以成基团(铁血红素、亚铁血红素)所带的电荷。这一结果证明了静电力对复合物气相稳定性及质谱信号强度的重要作用。Pramanik 等人研究了 GDP/GTP 与 ras 蛋白的结合。Schwartz 等[153]用 ESI-MS 研究了小分子配体生物素(分子量 244)和亚氨基生物素(分子量 243)与由 4 个亚基组成的大蛋白链亲和素(分子量 53084)的非共价键结合行为。链亲和素与亲和素一样, 与生物素有很强的特异亲和力(KD=10-15mol), 使得这一类非共价键复合物在生物化学和分子生物学, 尤其是免疫化学和亲和分离中有非常广泛的应用。近些年来, 随着质谱的发展, 对蛋白-配体复合物体系的研究也更加深入。人们一方面寻求新的结合体系——如 α -amylase 和其微生物抑制剂 tendamistat 复合物, 另一方面将重点投向复合物结合强度和结合本质的研究。Nesatyy 用 ESI-MS 研究了气相中 BPT1(Bovine pancreatic trypsin inhibitor)与其靶酶的结合特性[154]。

(5) 蛋白与蛋白/多肽

ESI-MS 在研究蛋白质四级结构方面有巨大的能力。蛋白质之间非共价复合物分同源和异源两种。利用质谱图上质量的差别可以区分这两种复合物。同时质谱也非常适合于鉴定蛋白质四级结构中的亚基数目。Brookhavenprotein databank 蛋白质数据库的所有蛋白质中, 33% 形成了多聚体复合物, 在这些复合物中, 80% 的形成了二聚体或四聚体。乙醛脱氢酶(ALDH)以同源四聚体的形式显示酶活性。Shen 等研究了被 4 种不同抑制剂抑制的 ALDH 四级结构, 通过比较质量数差异, 推测了抑制剂与酶的结合类型和结合位点。MRP8 和 MRP14 是钙诱导吞噬细胞活化过程中重要的钙结合蛋白, 形成非共价复合物是它们发挥生理功能的先决条件, Strupat 等用 ESI-MS 证明了在没有 Ca^{2+} 的情况下, 两种蛋白质形成 MRP8/14 和 MRP8/14*

异源二聚体, Ca^{2+} 存在时, 形成(MRP8/14*)、(MRP8/14*)(MRP8/14)以及(MRP8/14)₂ 等异源四聚体, 这一结果验证了 MALDI-MS 的实验结果。他们认为, 如果质谱反映的是溶液中情况, 那么结合程度应不取决于所采用的离子化方式, 对这一观点还有待于深入研究。Loo 等对 ADH(Alcohol Dehydrogenase)在乙醛、乙醇互变中的作用进行了研究, 表明酵母及哺乳动物的 ADHs 都是均质的[155]。在这个过程中, 仅有 25%基参与互变。马肝的 ADH 是二聚体, 活性酵母的 ADH 则以四聚体的形式存在。在 ESI-MS 分析蛋白质亚基结构过程中, 溶液的 pH 及离子源的条件都很重要, 在不同 pH 值下, 蛋白质以不同数目的亚基聚集体存在, 这对我们研究蛋白质性质具有重要意义。Standing 等采用 ESI-TOF-MS 对 40T 酶的低聚结构进行分析, 结果表明在溶液中以六聚体存在, 这和以往的 X-射线衍射结果一致[156]。对 SAL(Silurus Asotus Roe Lectin)的 ESI-MS 测定表明, SAL 的单体分子量为 31750, 而沉淀平衡法测定的分子量为 95200。由此可以说明该蛋白质在溶液中以三聚体的形式存在。这一推断得到了基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)实验结果的支持[157]。Lafitte 对钙调蛋白在溶液中及变性条件下的蛋白质聚合体的研究与超离心测定结果一致[158]。

(6)蛋白与核酸

蛋白质和 DNA 的相互作用涉及到细胞过程的许多方面, 其中影响最大的就是基因转录调控。蛋白转录因子与特定的 DNA 序列结合并导致这个基因的表达, 从而实现某些特定的细胞功能。传统的研究方法是凝胶滞留实验。利用 ESI-MS 代替此方法有很多优点, 如不需要放射性标记, 快速, 化学计量准确等。化学结合计量是蛋白质和 DNA 相互作用的一个重要特性。当一个样品中含有不同的化学结合计量数或结合后分子量差别很小时, 化学结合计量的测定就更为困难。电喷雾质谱由于具有高灵敏度和高质量准确度的优点, 因此可以很准确的测定其化学结合计量。最早的蛋白质和 DNA 复合物研究是 Smith 实验小组用 ESI-MS 检测的从细菌噬菌体 ϕ 1 分离的单股 DNA 结合蛋白 Gene V 和几个寡核苷酸的化学结合计量数。在噬菌体的复制过程中 Gene V 起稳定单链 DNA(ssDNA)的作用, 并将合成的噬菌体 DNA 从双链转变为单链。已知 Gene V 在生理条件下主要以二聚体存在, KD 为 10-12mol。在 pH 7.0 10mmol/L 乙酸铵溶液中, 无论是正离子还是负离子电喷雾质谱, Gene V 都主要以二聚体存在。在负离子条件下, 形成了带电荷数最高为-8 的 4 个多电荷峰。在 pH 3.30 的 50mmol/L 乙酸溶液中形成了最高带+14 电荷的 11 个多电荷峰。这与蛋白质在酸性条件下变性的结果一致。将不同比例的 Gene V 蛋白和 16mer 的寡核苷酸在 pH 7.0 的 10-50mmol/L 乙酸铵溶液中反应 10min 后进行电喷雾质谱, 结果表明 Gene V 蛋白和 16mer 寡核苷酸可以形成不同化学计量结合的非共价键复合物。主要是 4:1(Gene V:16mer), 当寡核苷酸过量时, 有少量 2:1 的复合物存在。他们同时用电喷雾质谱研究了 Gene V 蛋白和 d(pT)13, d(pT)15, d(pT)18 3 个同源寡核苷酸的化学计量结合数。当 Gene V 蛋白的摩尔浓度与 d(pT)13, d(pT)15, d(pT)18 混合物的总摩尔浓度比为 1:1 时, Gene V 蛋白和 d(pT)18 主要形成 4:1 的复合物, 而与 d(pT)13, d(pT)15 主要形成 2:1 的复合物; 当 Gene V 蛋白的摩尔浓度与 d(pT)13, d(pT)15, d(pT)18 混合物的总摩尔浓度比为 2:1 时, Gene V 蛋白与 d(pT)18, d(pT)15 形成 4:1 的复合物, 而与 d(pT)13 仍形成 2:1 的复合物。说明 Gene V 蛋白与 d(pT)13 的主要化学结合计量数为 2:1, 与 d(pT)18 的为 4:1, 而与 d(pT)15 的化学结合计量数则根据寡核苷酸和 Gene V 蛋白的相对浓度不同为 4:1 或 2:1。文献报道 Gene V 蛋白与 poly(dA)和 poly(dT)的亲合力相差两个数量级, 用电喷雾质谱也得到了相同的结论。将 Gene V 蛋白和 d(pT)13, d(pA)14 的混合物在 pH 7.0 10mmol/L 乙酸铵溶液中进行电喷雾质谱分析。当 d(pT)13 和 d(pA)14 摩尔浓度相同时, 主要是 Gene V 蛋白和 d(pT)13 形成的 2:1 的非共价键复合物。几乎没有 Gene V 蛋白和 d(pA)14 形成的复合物。当只有 d(pA)14 时, Gene V 蛋白与 d(pA)14 可以很容易形成 2:1 的复合物。即使当 d(pT)13 和 d(pA)14 摩尔浓度为 2:100 时, Gene V 蛋白与 d(pT)13 形成的 2:1 复合物的丰度仍是 Gene V 蛋白与 d(pA)14 形成的 2:1 复合物的 8 倍。

以上实验结果表明 Gene V 蛋白与 d(pT)13 的亲合力是与 d(pA)14 亲和力的 400 倍。ESI-MS 也是研究蛋白质和核酸相互作用是一种很好的技术。Sannes-Lowery 等通过竞争结合实验考察了 HIV-1Tat 肽和 TAR RNA 及其突变体的相对结合强度。在高浓度 Tat 肽溶液中结合比测定的结果最大可达 3:1, 这样的复合物存在许多非特异性的结合, 一般认为 1:1 的复合物是特异性结合产生的。同时由 ESI-MS 得到的变异 TAR RNA 突起区域与 HIV-1Tat 肽的亲合力降低的结论也与溶液态的实验结果一致。Kapur 等利用 ESI-MS 研究了 Tus 蛋白与大肠杆菌染色体特异性终止复制 Ter DNA 序列之间的结合。检测到 1:1 的 Tus 蛋白-Ter DNA 复合物。在 Tus 蛋白和非特异性 DNA 混合物的 ESI-MS 谱中, 主要出现未复合的 Tus 蛋白离子, 说明在气相中观察到的 Tus 蛋白-Ter DNA 复合物是由特异性结合产生并比较了正常及变异 Tus 蛋白与 Ter DNA 的相对结合强度, 变异 Tus 蛋白 A173T 与 Ter DNA 复合物的解离常数是正常 Tus 蛋白-Ter DNA 复合物的 350 倍。Trp 抑制蛋白质的 ESI 质谱和它特定的 DNA 操作基因被检测到, 更说明了此方法对特定相互作用的意义。只有在结合位点间有合适空间的 DNA 序列才能跟蛋白质组合成复合物。Naylar 研究小组曾发现了影响 DNA 与配体结合的因素, 这些因素直接影响到这些配体是增强还是抑制基因转录[159]。

(7)酶和抑制剂

HIV-1 蛋白酶是天冬氨酸蛋白酶家族的一个成员。该家族成员包括木瓜酶、肾素、凝乳酶及组织蛋白酶 D 等[160]。HIV 蛋白酶专一性地催化病毒 gag 和 gag-pol 转录产物, 产生装配病毒颗粒所需要的酶和结构蛋白质。HIV-1 蛋白酶活性在 pH 6 时最高, 将二聚体解离会导致酶活性的完全散失。胃蛋白酶抑制剂 A(isovaleryl-Val-Val-Sta-Ala-Sta, Mr686)是天冬氨酸蛋白酶的特异性抑制剂[161]。HIV-1 蛋白酶的活性位点由两个亚基的相同部分组成。抑制剂和酶的反应由氢键和疏水作用共同起作用。Loo 等[120]用电喷雾质谱研究了胃蛋白酶抑制剂 A 和 HIV-1 蛋白酶的结合与 pH 值的关系。在 pH 2.5 的 2.5% 乙酸溶液(乙腈:水=2:1)中, 只有 HIV-1 蛋白酶单体的多电荷峰。最高所带电荷数为 13, 共 6 个多电荷峰。将胃蛋白酶抑制剂 A 和 HIV-1 蛋白酶的乙酸铵储备液混合后, 用乙酸或氨水调节溶液的 pH 值并测定其电喷雾质谱图。在 pH 4.7-6.9 的溶液中观察到了胃蛋白酶抑制剂 A 和 HIV-1 蛋白酶二聚体的三元复合物, 同时有 HIV-1 蛋白酶二聚体和单体的存在。酶与抑制剂的三元复合物在 pH 5.5-6.0 时最稳定。该结果与以前 Baca 和 Kent 报道的结果一致。酶与抑制剂的三元复合物对电喷雾质谱的大气压真空接口条件很敏感, 在低的 Vts(10V)和低毛细管温度时(175℃)三元复合物的丰度最高, 提高毛细管温度会使三元复合物降解。

(8)抗原-抗体反应

用电喷雾质谱研究抗原抗体相互作用不仅灵敏、准确、快速, 与酶解相还可以确定抗原表位及抗体互补位。Miller[162]等用电喷雾质谱直接检测到了一个能够抑制 HIV-1 活性的由 17 个氨基酸组成的微抗体(MicroAb)和代表从巴西(clade B)和非洲(clade A)分离出的第一代 HIV-1 菌株 V3 区的肽(V3 肽)的相互作用。该微抗体(MicroAb)是一个能特异性地与 HIV-1 包膜糖蛋白 gp120V3 环状区作用的鼠单抗 IGGI(F58)的重链第三补体区(CDR-H3)的一部分。它的活性比 F58 高 5 倍。将 MicroAb 和 V3 肽溶解于 pH 7.0 的 50mmol/L 的乙酸铵溶液中, 使浓度分别为 500ug/mL, 37℃ 反应 1 小时后进行电喷雾质谱测定。观察到了 MicroAb 和 V3 肽的复合物。但同时存在未结合 MicroAb 和 V3 肽, 且复合物的丰度相对较低。可能是所用的载液(乙腈:水=1:1, 含 0.1% 甲酸)不大合适, 不利于复合物的形成。结果表明 MicroAb 是通过与病毒颗粒直接结合而介导病毒失活的。将 V3 肽用胰蛋白酶进行完全酶解(37℃ 1 小时)和部分酶解(4℃ 2 分钟)。然后将酶解肽段和 MicroAb 混合后在 37℃ 反应 1 小时后进行电喷雾质谱测定。结果表明只有部分肽段与 MicroAb 结合。通过比较与 MicroAb 结合肽段的序列及进一步研究, 证明 MicroAb 的抗原表位是 RKSIXIGPGR。该实验结果表明在研究溶液中抗原-抗体反应时, 电喷雾质谱是一种灵敏、快速、准确的方法。

(9)核酸-药物复合物

核酸-药物复合物的研究为解释药物的构效关系,设计结构合理的新药提供了依据。氨基糖苷类抑制剂可以与 TAR RNA 发生特异性结合,阻止 Tat 蛋白-TAR RNA 复合物的形成从而中止 HIV 病毒的复制。Sannes-Lowery 等[163]用 ESI-MS 检测了两种氨基糖苷类药物新霉素和链霉素与 TAR RNA 及 Tat 肽-TAR RNA 的非共价复合物。新霉素与 TAR RNA 的结合数为 3,与 Tat 肽-TARRNA 的结合数为 2。从质谱数据推测新霉素的强亲和力结合位点位于 TARRNA 的三核苷酸突起区。ESI-MS 竞争结合实验表明新霉素比链霉素结合力更强,这与药物实际活性大小相一致。与氨基糖苷具有相似溶液亲和力的小分子抑制剂——2,4,5,6-四氨基嘧啶与 TAR RNA 形成的复合物在气相中由于碰撞裂解,稳定性远弱于 RNA-氨基糖苷复合物。由此推断小分子抑制剂主要通过疏水作用与 TAR RNA 结合,而氨基糖苷以静电力与 RNA 结合,气相性的差异为区分非共价作用的类型提供了有力依据。对抗肿瘤药物道诺霉素及诺加霉素与双链 DNA 结合的复合物进行了 ESI-MS 测定[164],在 pH 8-9 条件下,发现复合物离子丰度最高。药物与不同序列 DNA 的结合能力不同,证明药物嵌入 DNA 双螺旋结构具有序列选择性。质谱与 HPLC、HPCE 等分离技术在线联用,可以测定不同化合物与 DNA 或 RNA 之间的相对结合强度或绝对结合强度,成为从分子水平上筛选药物先导物的新的理想工具。Wan 等[165]用 ESI-MS-MS 研究了六核苷酸和八核苷酸二聚体的气相裂解情况。定义 E50 为引起复合物离解 50%的碰撞能,用来表示复合物的稳定性。考察了电荷数、碱基对数目、强质子亲和力碱基的位点、氢键数目对二聚体结构稳定性的影响。当电荷相同时,二聚体稳定性与氢键数目成正比关系。同时还研究了双链 DNA-药物复合物的稳定性,根据复合物解离为两条单链时与药物的结合情况,可以分辨药物结合部位和结合形式。另外,最近 CSI-MS 在生物分子结构的检测方面以及在研究相对分子质量较大的有机分子(天然产物)间弱相互作用方面展示了良好的作用。Yamaguchi 等[166]应用 CSI-MS 观察到氨基酸(甘氨酸、缬氨酸、丝氨酸、蛋氨酸和苯丙氨酸)在溶液中明显的链状结构,X-射线晶体衍射实验也证明了它们在晶体中是由氢键结合的链状结构。但是 L-脯氨酸在溶液中的结构不同,当加入碱金属离子时可引起 L-脯氨酸在溶液中周期性地聚合为环状簇合物。加入 Na⁺时,可检测到[6Pro+Na]⁺,并认为它是以 Na⁺为中心的两个三聚体的叠合(3Pro+Na+3Pro)。加入 K⁺,Rb⁺,Cs⁺时,CSI-MS 谱中以八聚体峰为最强,同样,用 MS-MS 实验证明了八聚体是以金属离子为中心并由两个四聚体叠合组成的。溶液中存在特定离子诱导的环状簇合物以及大规模聚集的链状结构,这在氨基酸的生化研究中具有非常重大的意义。再帕尔等[167]研究了核苷类分子的相互作用,得到了与氢键结合数目相对应的定量结果,同时亦与 DNA 双螺旋中碱基对的结合模式相符合。推测在溶液中腺苷(A)、脱氧腺苷(dA)、胞苷(C)、脱氧胞苷(dC)及胸苷(dT)分子以链状结构形式存在,而鸟苷(G)或脱氧鸟苷(dG)容易形成以四核环状结构为单元的簇合物。另外,G-G 错配识别分子萘啶二聚体(naphthyridine dimer, ND)的加入,很容易破坏 G-四聚体,使得原来最强的[4dG+Na]⁺逐渐消失,而 2dG+H⁺生成。这一结果提示由于在人类端粒序列中富含 G,ND 与 G-G 结构之间强的结合作用可导致端粒 DNA 的破坏,从而抑制端粒酶作用下序列的延伸。这是在核苷分子水平上第一次直接观察到 DNA 的动态溶液行为。二聚、三聚、四聚 DNA 形成的 DNA 多链非共价复合物由于解链温度(T_m)低,非常不稳定,用 ESI-MS 很难表征。Yamaguchi 等[168]用 CSI-MS 研究了三个链、四链寡脱氧核苷酸,总结出 6 个 G 碱基对于稳定 DNA 端粒的 G-四聚体是必须的。他们设计了具有很强分子识别能力的 DNA 分子,例如,在 5'-d(AGGGGGGAAAAA)AA-3'(D7)与 5'-d(TTTTTTTTTTTTTTTT)-3'(D6)的 1:1 混合溶液的(-)CSI-MS 谱中,不仅出现[D7+D6]二聚体离子,而且观察到明显的[D7·D6]₄二聚-四聚复合体离子,这是由于 6 个 G 碱基的存在而引起的聚合。这些结果表明 CSI-MS 不仅可用于表征 DNA 二聚体、三聚体和四聚体,而且对于用其他光谱方法难以检测的不稳

定的、复杂的多链 DNA 复合物也可得到满意结果。

ESI-MS 技术是一种新发展起来的“软电离”质谱技术，能快速、准确地测定生物分子或不稳定有机分子的分子量。大量的实验事实证明，在“温和”的界面条件下，ESI-MS 还适合分析生理条件下特异性非共价生物-有机分子复合物，测定溶液中非共价复合物的化学计量数和结合常数。随着药物工业的发展，寻找高亲和力的靶蛋白抑制剂作为新药开发中关键的一环，越来越受到人们的关注，因此，非共价复合物的高通量检测成为人们关注的焦点。

虽然 ESI-MS 不能满足新药筛选行业每天上万个化合物的超高通量筛选要求，但是它可以在靶点研究方面起重要的作用，可以为解释药物的构效关系、设计结构合理的药物提供重要的依据。如非共价蛋白质-内源性物质(如 GDP、亲和素等)或外源性物质(如亲和素衍生物、FK506、RM 等)复合物性质的研究，对理解生物体内物质传递和药物机理有着十分重要的意义。此外，ESI-MS 质量范围的扩展更加适合在生理条件下对蛋白质寡聚体的形态及键合能力的研究。因此，在保持生物分子高级结构的近中性溶液中，ESI-MS 为特异性非共价复合物开辟了直接分析分子识别过程的新途径。

6. 参考文献:

- [36]钱小红, 谢剑炜.现代仪器分析在生物医学研究中的应用.北京, 化学工业出版社, 2003, 第一版:229
- [37]J.Zeleny.The electric discharge from liquid points,and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces.Phys.Rev.,1914,3: 69-91
- [38]J.Zeleny.Instability of electrified liquid surface.Phys.Rev.,1917,10:1-6
- [39]J.Zeleny.Electrical discharges from pointed conductors.Phys.Rev.,1920, 16:102-105
- [40]B.Vonnegut,R.L.Neubauer.Production of monodisperse liquid particles by electrical atomization.J.Colloid Sci.,1952,7:616-622
- [41]V.I.Kozhenkov,N.A.Fuks.Electrohydrodynamic atomization of liquids. Russ.Chem.Rev., 1976,45:1179-1184
- [42]T.K.Burayev,I.P.Vereshchagin.Physical processes during electrostatic atomization.Fluid Mech-Sov.Res., 1972,1(2):56-66
- [43]W.Kleber,Tech.Dig.,1967,9:550
- [44]A.A.Elmoursi.Laplacian fields of bell-type electrostatic painting systems. IEEE Trans.Ind.Appl.,1989,25(2):234-240
- [45]A.G.Bailey.The theory and practice of electrostatic spraying. Atomisation Spray Technol.,1986,2:95
- [46]J.F.Hughes,J.M.C.Roberts.Electrostatic emulsification of domestic and personal care products.Int.J.Cosmet.Sci.,1984,6:103-113
- [47]A.G.Bailey.Electrostatic spraying of liquids,Wiley,New York,1988
- [48]A.J.Yule,S.M.Aval.Cyclic variations of diesel sprays.Fuel,1989,68(12): 1558-1564
- [49]B.Hoyer,G.S?renson,N.Jensen,D.B.Nielsen,B.Larsen.Electrostatic spraying:A novel technique for preparation of polymer coatings on electrodes.Anal.Chem.,1996,68:3840-3844
- [50]M.Yamashita,J.B.Fenn.Electrospray ion source.Another variation on the free-jet theme.J.Phys.Chem.,1984,88:4451-4456
- [51]M.Yamashita,J.B.Fenn.Negative ion production with the electrospray ion source. J.Phys.Chem.,1984,88:4671
- [52]C.M.Whitehouse,R.N.Dreyer,M.Yamashita,J.B.Fenn.Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers.Anal.Chem., 1985,57:675
- [53]G.J.Van Berkel,G.L.Glish,J.A.McLuckey.Electrospray ionization combined with ion trap mass

- spectrometry. *Anal. Chem.*, 1990, 62: 1284-1295
- [54] L. Jiang, M. Moini. Design and performance of a high resolution electrospray ion source for a magnetic sector mass spectrometer with a heated capillary inlet. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1995, 6: 1256-1261
- [55] J. G. Boyle, C. M. Whitehouse. An ion-storage time-of-flight mass spectrometer for analysis of electrospray ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1991, 5: 400-405
- [56] K. D. Henry, E. R. Williams, B. H. Wang, F. W. McLafferty, J. Shabanowitz, D. F. Hunt. Fourier-transform mass spectrometry of large molecules by electrospray ionization. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1989, 86(23): 9075-9078
- [57] L. Rayleigh. On the equilibrium of liquid conducting. Masses charged with electricity. *Phil. Mag.*, 1882, 14: 184-186
- [58] G. I. Taylor. Disintegration of water drops in an electric field. *Proc. Roy. Soc. Lond. A*, 1964, 280: 383-397
- [59] A. T. Blades, M. G. Ikononou, P. Kebarle. Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell. *Anal. Chem.*, 1991, 63: 2109-2114
- [60] J. V. Iribarne, B. A. Thomson. On the evaporation of small ions from charge droplets. *Chem. Phys.*, 1976, 64: 2287-2294
- [61] B. A. Thomson, J. V. Iribarne. Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J. Chem. Phys.*, 1979, 71: 4451-4463
- [62] G. Schmelzeisen-Redecker, L. Buttering, F. W. R. Ilgen. Desolvation of ions and molecules in thermospray mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, 1989, 90: 139-150
- [63] J. B. Fenn, J. Roswell, C. K. Meng. In electrospray ionization, how much pull does an ion need to escape its droplet prison? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1997, 8: 1147-1157
- [64] M. Gamero-Castaño, J. Fernandez de la Mora. Modulations in the abundance of salt clusters in electrosprays. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 1426-1429
- [65] M. Sakairi, A. L. Yergey, K. W. M. Siu, J. C. Y. Le Blanc, R. Guevremont, S. S. Berman. Electrospray mass spectrometry: Application of ion evaporation theory to amino acids. *Anal. Chem.*, 1991, 63: 1488-1490
- [66] P. Kebarle. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 2000, 35: 804-817
- [67] 杨芑原, 钱小红, 盛龙生. 生物质谱技术与方法. 北京, 科学出版社, 2003, 第一版: 42
- [68] J. A. Loo, H. R. Udseth, R. D. Smith. Peptide and protein analysis by electrospray ionization-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 1989, 179: 404-412
- [69] R. R. Ogorzalek Loo, B. E. Winger, R. D. Smith. Proton transfer reaction studies of multiply charged proteins in a high mass-to-charge ratio quadrupole mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1994, 5: 1064-1071
- [70] R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, H. R. Udseth. New developments in biochemical mass spectrometry: Electrospray ionization. *Anal. Chem.*, 1990, 62: 882-899
- [71] P. J. L. Daniels, A. K. Mallams, J. Weinstein, J. J. Wright, G. W. A. Milne. Mass spectral studies on aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1976, 1: 1078-1088
- [72] S. Rabbolini, E. Verardo, M. D. Col, A. M. Gioacchini, P. Traldi. Negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry in the structural characterization of penicillins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1998, 12: 1820-1826
- [73] K. Biemann. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu. Rev.*

Biochem.,1992,61:977-1010

[74]C.Masselon,G.A.Anderson,R.Harkewicz,J.E.Bruce,L.Pa?a-Toli?,R.D. Smith.Accurate mass multiplexed tandem mass spectrometry for high throughput polypeptide identification from mixtures.*Anal.Chem.*,2000,72: 1918-1924

[75]Y.Wang,M.Schubert,A.Ingendoh,J.Franzen.Analysis of non-covalent protein complexes up to 290 kDa using electrospray ionization and ion trap mass spectrometry.*Rapid Commun.Mass Spectrom.*,2000,14:12-17

[76]R.L.Winston,M.C.Fitzgerald.Mass spectrometry as a readout of protein structure and function.*Mass Spectrom.Rev.*,1997,16:165-179

[77]M.T.Rodgers,P.B.Armentrout.Noncovalent metal-ligand bond energies as studied by threshold collision-induced dissociation.*Mass Spectrom.Rev.*, 2000,19:215-247

[78]J.A.Loo.Studing of non-covalent complexes by electrospray ionization mass spectrometry.*Mass Spectrom.Rev.*,1997,16:1-23

[79]N.Xu,L.Pa?a-Toli?,R.D.Smith,S.Ni,B.D.Thrall.Electrospray ionization-mass spectrometry study of the interaction of cisplatin-adducted oligonucleotides with human XPA minimal binding domain protein.*Anal. Biochem.*,1999,272:26-33

[80]K.P.Madhusudanan,S.B.Katti,W.Haq,P.K.Misra.Antisense peptide interactions studied by electrospray ionization mass spectrometry.*J.Mass Spectrom.*,2000,35:237-241

[81]M.Bartok,P.T.Szabo,T.Bartok,G.Szollosi.Identification of ethyl pyruvate and dihydrocinchonidine adducts by electrospray ionization mass spectrometry.*Rapid Commun.Mass Spectrom.*,2000,14:509-514

[82]宋凤瑞, 闫存玉, 刘宁, 刘志强, 刘淑莹.核酸靶分子与某些中药成分的非共价作用研究.*分析化学*, 2005, 12:1743-1746

[83]E.Nordhoff.Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry as a new method for the characterization of nucleic acids.*TrAC Trends in Anal.Chem.*,1996,15:240-250

[84]B.Ganem,Y.T.Li,J.D.Henion.Detection of oligonucleotide duplex forms by ion-spray mass spectrometry.*Tetrahedron Letters*,1993,34:1445-1448

[85]K.X.Wan,T.Shibue,M.L.Gross.Non-covalent complexes between DNA-binding drugs and double-stranded oligodeoxynucleotides:A study by ESI ion-trap mass spectrometry.*J.Am.Chem.Soc.*,2000,122:300-307

[86]A.M.Last,C.V.Robinson.Protein folding and interactions revealed by mass spectrometry.*Curr.Opin.Chem.Biol.*,1999,3:564-570

[87]N.Potier,P.Barth,D.Tritsch,J.F.Biellmann,A.A. Van Dorsselaer.Study of non-covalent enzyme-inhibitor complexes of aldose reductase by electrospray mass spectrometry.*Eur.J.Biochem.*,1997,243:274-282

[88]Y.T.Li,Y.L.Hsieh,J.D.Henion,M.W.Senko,F.W.McLafferty,B.Ganem. Mass spectrometric studies on noncovalent dimers of leucine zipper peptides. *J.Am.Chem.Soc.*,1993,115:8409-8413

[89]T.D.Veenstra,A.J.Tomlinson,L.Benson,R.Kumar,S.Naylor.Low temperature aqueous electrospray ionization mass spectrometry of noncovalent complexes.*J.Am.Soc.Mass Spectrom.*,1998,9:580-584

[90]J.B.Fenn,M.Mann,C.K.Meng,C.F.Wong,C.M.Whitehouse.Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.*Science*,1989,246: 64-71

[91]K.Tanaka,H.Waki,Y.Ido,S.Akita,Y.Yoshida,T.Yoshida,T.Matsuo. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry.*Rapid Commun.Mass Spectrom.*

Spectrom.,1988,2: 151-153

[92]F.W.McLafferty.Tandem mass spectrometry.Science,1981,214(4518): 280-287

[93]F.W.McLafferty.Billionfold data increase from mass spectrometry instrumentation.J.Am.Soc.Mass Spectrom.,1997,8:1-7

[94]岳贵花,许崇峰,卞利萍,张素艳,赵建伟,杨芑原.电喷雾质谱在非共价蛋白复合物研究中的应用.分析科学学报,2000,16(6):495-502

[95]V.J.Nesatyy.Mass spectrometry evaluation of the solution and gas-phase binding properties of noncovalent protein complexes.Int.J.Mass Spectrom.,2002,221:147-161

[96]B.Ganem,Y.T.Li,J.D.Henion.Detection of non-covalent receptor-ligand complexes by mass spectrometry.J.Am.Chem.Soc.,1991,113:6294-6296

[97]B.Ganem,Y.T.Li,J.D.Henion.Observation of noncovalent enzyme-substrate and enzyme-product complexes by ion-spray mass spectrometry. J.Am.Chem.Soc.,1991,113:7818-7819

[98]V.Katta,B.T.Chait.Observation of the heme-globin complex in native myoglobin by electrospray-ionization mass spectrometry.J.Am.Chem.Soc.,1991,113:8534-8535

[99]A.K.Ganguly,B.N.Pramanik,A.Tsarbopoulos,T.R.Covey,E.Huang,S.A. Fuhrman.Mass spectrometric detection of the noncovalent GDP-bound conformational state of the human H-ras protein.J.Am.Chem.Soc.,1992,114:6559-6560

[100]M.Baca,S.B.H.Kent.Direct observation of a ternary complex between the dimeric enzyme HIV-1 protease and a substrate-based inhibitor.J.Am.Chem.Soc.,1992,114:3992-3993

[101]O.V.Nemirovskiy,R.Ramanathan,M.L.Gross.Investigation of calcium-induced,noncovalent association of calmodulin with melittin by electrospray ionization mass spectrometry.J.Am.Soc.Mass Spectrom.,1997,8:809-812

[102]T.D.Veenstra,L.M.Benson,T.A.Craig et al.Metal mediated sterol receptor-DNA complex association and dissociation determined by electrospray ionization mass spectrometry.Nat.Biotechnol.,1998,16(3): 262-266

[103]J.A.Loo.Electrospray ionization mass spectrometry:a technology for studying noncovalent macromolecular complexes.Int.J.Mass Spectrom.,2000,200:175-186

[104]R.R.Ogorzalek Loo,D.R.Goodlett,R.D.Smith,J.A.Loo.Observation of a noncovalent ribonuclease S-protein/S-peptide complex by electrospray ionization mass spectrometry.J.Am.Chem.Soc.,1993,115:4391-4392

[105]D.R.Goodlett,R.R.Ogorzalek Loo,J.A.Loo,J.H.Wahl,H.R.Udseth,R.D. Smith.A study of the thermal denaturation of ribonuclease S by electrospray ionization mass spectrometry.J.Am.Soc.Mass Spectrom.,1994,5:614-622

[106]D.Suckau,Y.Shi,S.C.Beu,M.W.Senko,J.P.Quinn,F.M.WamplerIII, F.W.McLafferty. Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1993,90:790

[107]M.F.Jarrold.Unfolding,refolding,and hydration of proteins in the gas phase. Acc.Chem.Res.1999,32:360-367

[108]C.S.Hoaglund-Hyzer,A.E.Counterman,D.E.Clemmer.Anhydrous protein ions. Chem.Rev.,1999,99:3037-3080

[109]D.S.Gross,P.D.Schnier,S.E.Rodriguea-Cruz,Fagerquist,E.R.Williams. Proc.Natl.Acad.Sci. USA,1996,93:3143

[110]J.A.Loo,J.X.He,W.L.Cody.Higher order structure in the gas phase reflects solution structure.J.Am.Chem.Soc.,1998,120:4542-4543

- [111]H.Rogniaux,A. Van Dorsselaer.P.Barth,J.F.Biellmann,J.Barbantou,M. van Zandt,B.Chevrier,E.Howard, A.Mitschler,N.Potier,L.Urzhumtseva,D.Moras,A.Podjarny.Binding of aldose reductase inhibitors:correlation of crystallographic and mass spectrometric studies.*J. Am. Soc. Mass Spectrom.*,1999,10:635-647
- [112]F.W.McLafferty,N.L.Kelleher,T.P.Begley,E.K.Fridriksson,R.A. Zubarev,D.M.Horn. Two-dimensional mass spectrometry of biomolecules at the subfemtomole level.*Curr. Opin. Chem. Biol.* 1998,2:571-578
- [113]K.A.Sannes-Lowery,P.Hu,D.P.Mack,H.Y.Mei,J.A.Loo.HIV-1 Tat peptide binding to TAR RNA by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*,1997,69:5130-5135
- [114]Q. Wu,J.Gao,D.Joseph-McCarthy,G.B.Sigal,J.E.Bruce,G.M. Whitesides,R.D.Smith.Carbonic anhydrase-inhibitor binding:From solution to the gas phase.*J. Am. Chem. Soc.*,1997,119:1157-1158
- [115]C.V.Robinson,E.W.Chung,B.B.Kragelund,J.Knudsen,R.T.Aplin,F.M. Poulsen,C.M.Dobson. Probing the nature of noncovalent interactions by mass spectrometry.A study of protein-CoA ligand binding and assembly.*J. Am. Chem. Soc.*,1996,118:8646-8653
- [116]S.E.Rodriguez-Cruz,J.S.Klassen,E.R.Williams.Hydration of gas-phase ions formed by electrospray ionization.*J. Am. Soc. Mass Spectrom.*,1999, 10:958-968
- [117]J.A.Loo,K.A.Sannes-Lowery,P.Hu,D.P.Mack,H.Y.Mei.in *New Methods for the Study of Biomolecular Complexes*,W.Ens,K.G.Standing, I.V.Chemushevich(Eds.),Kluwer,Dordrecht,The Netherlands,1998:83
- [118]J.A.Loo,V.Thanabal,H.Y.Mei.in *Mass Spectrometry in Biology and Medicine*,A.L.Burlingame,S.A.Carr,M.A.Baldwin(Eds.),Humana, Totowa,NJ,2000:73
- [119]D.Fabris,C.Fenselau.Characterization of allosteric insulin hexamers by electrospray ionization mass spectrometry.*Anal. Chem.*,1999,71:384-387
- [120]J.A.Loo,T.P.Holler,S.K.Foltin,P.McConnell,C.A.Banotai,N.M.Horne, W.T.Mueller, T.I.Stevenson, D.P.Mack. Application of electrospray ionization mass spectrometry for studying human immunodeficiency virus protein complexes.*Proteins:Structure,Function,and Genetics*,1998, 33(S2):28-37
- [121]E.Chung,D.Henriques,D.Renzoni,M.Zvelebil,J.M.Bradshaw,G. Waksman, C.V.Robinson, J.E.Ladbury.*Structure(London)*,1998,6:1141
- [122]T.Cserháti,M.Sz?gyi.Role of hydrophobic and hydrophilic forces in peptide-protein interaction:New advances.*Peptides*,1995,16(1):165-173
- [123]P.C.Lyu,P.J.Gans,N.R.Kallenbach.Energetic contribution of solvent-exposed ion pairs to alpha-helix structure.*J. Mol. Bio.*,1992,223:343-350
- [124]P.Lindahl,M.Abramson,L.Bj?rk.Interaction of recombinant human cystatin C with the cysteine proteinases papain and actinidin.*Biochem. J.*, 1992,281:49-55
- [125]D.H.Williams,J.P.L.Cox,A.J.Doig,M.Gardner,U.Gerhard,P.T.Kaye, .R.Lal,I.A.Nicholls,C.J.S alter,R.C.Mitchell.Toward the semi-quantitative estimation of binding constants.Guides for peptide-peptide binding in aqueous solution.*J. Am. Chem. Soc.*,1991,113:7020-7030
- [126]W.Kauzmann.Factors in the interpretation of protein denaturation.*Adv. Protein Chem.*,1959,14:1-64
- [127]R.A.King,D.L.Anders,G.E.Christie.Site-directed mutagenesis of an amino acid residue in the bacteriophage P2 Ogr protein implicated in interaction with Escherichia coli RNA polymerase.*Mol. Microbil.*,1992,6: 3313-3320
- [128]J.B.Cunniff,P.Vouros.False positives and the detection of cyclodextrin inclusion complexes

- by electrospray mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1995, 6:437-447
- [129] A. A. Rostom, J. R. H. Tame, J. E. Ladbury, C. V. Robinson. Specificity and interactions of the protein OppA: Partitioning solvent binding effects using mass spectrometry. *J. Mol. Biol.*, 2000, 296:269-279
- [130] R. D. Smith, K. J. Light-wahl. The observation of the non-covalent onteraction in solution by electrospray ionization mass spectrometry: Promise, pitfalls and prognosis. *Biol. Mass Spectrom.*, 1993, 22:493-501
- [131] E. Lehmann, B. Salih, M. Gómez-López, F. Diederich, R. Zenobi. Do matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectra reflect solution-phase formation of cyclodextrin inclusion complexes? *Analyst*, 2000, 125: 849-854
- [132] 刘勤, 张淑珍, 吴弼东, 申睿, 恽榴红, 谢剑炜. 电喷雾质谱在超分子 体系中非共价相互作用研究中的应用. *质谱学报*, 2005, 26(5):51-58
- [133] E. C. Kempen, J. S. Brodbelt, R. A. Bartsch, Y. Jang, J. S. Kim. Investigation of alkai metal cation selectivities of lariat ethers by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 1999, 71(24):5493-5500
- [134] S. M. Blair, J. S. Brodbelt, A. P. Marchand, K. A. Kumar, H. S. Chong. Evaluation of binding selectivities of caged crown ligands toward heavy metals by electrospray ionization/quadrupole ion trap mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2000, 72(11):2433-2445
- [135] X. Cheng, R. Chen, J. E. Bruce, B. L. Schwartz, G. A. Anderson, S. A. Hofstadler, D. C. Gale, R. D. Smith, J. Gao, G. B. Sigal, M. Mammen, G. M. Whitesides. Using electrospray ionization FTICR mass spectrometry to study competitive binding of inhibitors to carbonic anhydrase. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117(34):8859-8860
- [136] A. Triolo, F. M. Arcamone, A. Raffaelli, P. Salvadori. Non-covalent complexes between DNA-binding drugs and double-stranded deoxyoligonucleotides: A study by ionspray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 1997, 32(11):1186-1194
- [137] K. A. Sannes-Lowery, H. Y. Mei, J. A. Loo. Studying aminoglycoside antibiotic binging to HIV-1 TAR RNA by electrospray ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, 1999, 193(223):115-122
- [138] K. X. Wan, T. Shibue, M. L. Gross. Non-covalent complexes between DNA-binding drugs and double-stranded oligodeoxynucleotides: A study by ESI ion-trap mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122(2): 300-307
- [139] X. Cheng, A. C. Harms, R. N. Goudreau et al. Direct Measurement of Oligonucleotide Binding Stoichiometry of Gene V Protein by Mass Spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93(14):7022-7027
- [140] M. Q. Guo, S. P. Zhang, F. R. Song, D. W. Wang, Z. Q. Liu. Studies on the non-covalent complexes between oleanolic acid and cyclodextrins using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 2003, 38(7):723-731
- [141] O. V. Nemirovskiy, M. L. Gross. Determination of calcium binding sites ingas-phase small peptides by tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1998, 9(10):1020-1028
- [142] 孙晓娟, 梅毓华, 金晨等. ESI-MS 和 MS-MS 研究 Pd(II)和 Pt(II)与多肽 Microperoxidase-II 的相互作用. *分析测试学报*, 2003, 22(增刊):4-7
- [143] A. K. Ganguly, B. N. Pramanik, E. C. Huang et al. Detection and structural characterizat ion of ras oncoprotein-inhibitors complexes by electrospray mass

- spectrometry. *Bioorg. Med. Chem.*, 1997, 5(5): 817-820
- [144] P.F. Crain, J.A. McCloskey. Applications of mass spectrometry to the characterization of oligonucleotides and nucleic acids. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1998, 9: 25-34
- [145] L.M. Benson, S. Naylor. Presented at the 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Allied Topics, Long Beach, CA, 2000
- [146] 吴胜明, 杨松成, 王杰, 王鸿丽, 刘炳玉, 李爱玲, 何昆, 魏开华, 张学敏. 氨基酸与钠离子非共价键相互作用的电喷雾质谱研究. *分析测试学报*, 2004, 25: 66-67
- [147] 吴胜明, 王杰, 刘炳玉, 王鸿丽, 魏开华, 张学敏, 杨松成. 纳升电喷雾串联质谱“序列对接法”确定多肽的加钠位点. *分析化学*, 2006, 34(1): 1-4
- [148] D. Schröder, H. Schwarz. Dissociation behavior of $\text{Cu}(\text{urea})^+$ complexes generated by electrospray ionization. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2002, 219: 729-738
- [149] F.M. Romero, R. Ziessel, A.D. Gervais, A. V. Dorsselaer. Monitoring the iron(II)-induced self-assembly of preorganized tritopic ligands by electrospray mass spectrometry: unique formation of metallomacrocycles. *Chem. Commun.*, 1996: 551-553
- [150] 吴巍, 郭明全, 刘淑莹. 黄芩苷与环糊精非共价复合物的电喷雾串联质谱研究. *质谱学报*, 2004, 25: 77-78
- [151] 郭丽敏, 刘志强, 刘淑莹. β -环糊精与联苯胺非共价复合物的化学研究. *分析化学*, 2005, 33(4): 495-497
- [152] 申睿, 吴弼东, 刘勤, 顾明松, 谢剑炜. 氨基化环糊精与氨基酸包络物的电喷雾质谱研究. *分析化学*, 2006, 34(8): 1153-1156
- [153] B.L. Schwartz, D.C. Gale, R.D. Smith, A. Chilkoti, P.S. Stayton. Investigation of non-covalent ligand binding to the intact streptavidin tetramer by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 1995, 30(8): 1095-1102
- [154] D.J. Douglas, B.A. Collings, S. Numao, V.J. Nesatyy. Detection of noncovalent complex between α -amylase and its microbial inhibitor tendamistat by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. in Mass Spectrom.*, 2001, 15: 89-96
- [155] J.A. Loo. Observation of large subunit protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 1995, 30: 180-183
- [156] M.C. Fitzgerald, I. Chermushevish, K.G. Standing et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93: 6581
- [157] K. Murayama, H. Taka, N. Kaga, T. Fujimura, R. Mineki, N. Shindo, M. Morita, M. Hosono, K. Nitta. The structure of *Silurus asotus* (Catfish) Roe lectin (SAL): identification of a noncovalent trimer by mass spectrometry and analytical ultracentrifugation. *Anal. Biochem.*, 1997, 247: 319-326
- [158] D. Lafitte, A.J.R. Heck, T.J. Hill, K. Jumel, S.E. Harding, P.J. Derrick. Evidence of noncovalent dimerization of calmodulin. *Eur. J. Biochem.*, 1999, 261: 337-344
- [159] T.A. Craig, L.M. Benson, A.J. Tomlinson, T.D. Veenstra, S. Naylor, R. Kumar. *Nat. Biotechnol.*, 17: 1214
- [160] A. Wlodawer, M. Miller, M. Jaskolski et al. Conserved folding in retroviral protease: Crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science*, 1989, 245: 616-621
- [161] A. Wlodawer, J.W. Erickson. Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu. Rev. Biochem.*, 1993, 62: 543-585
- [162] A.L. Miller, N.A.C. Jackson, H. Dalton, K.R. Jennings, M. Levi, B. Wahren, N.J. Dimmock. Rapid analysis of epitope-paratope interactions between HIV-1 and a 17-amino-acid neutralizing microantibody by electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.*, (FEBS) 1998, 258: 164-169

- [163]K.A.Sames-Lowery,R.H.Griffey,S.A.Hofstadler.Measuring dissociation constants of RNA and aminoglycoside antibiotics by electrospray ionization mass spectrometry.*Anal.Biochem.*,2000,280:264-271
- [164]A.Kapur,J.L.Beck,M.M.Sheil.Observation of daunomycin and nogalamycin complexes with duplex DNA using electrospray ionization mass spectrometry.*Rapid Commun.Mass Spectrom.*,1999,13(24): 2489-2497
- [165]K.X.Wan,M.L.Gross,T.Shibue.Gas-phase stability of double-stranded oligodeoxynucleotides and their noncovalent complexes with DNA-binding drugs as revealed by collisional activation in an ion trap.*J.Am.Soc.Mass Spectrom.*,2000,11:450-457
- [166]M.Kunimura,S.Sakamoto,K.Yamaguchi.Alkali metal-mediated proline aggregation in solution observed by coldspray ionization mass spectrometry. *Org.Lett.*,2002,4:347-350
- [167]再帕尔·阿不力孜,坂本茂,山口健太郎.*分析测试学报*,2002,21(增刊): 5-6
- [168]S.Sakamoto,K.Yamaguchi.Hyperstranded DNA architectures observed by cold-spray ionization mass spectrometry.*Angew.Chem.Int.Ed.Engl*,2003,42:905-908