

HPTLC/IR-MALDI-o-TOF 解析神经节苷脂的结构

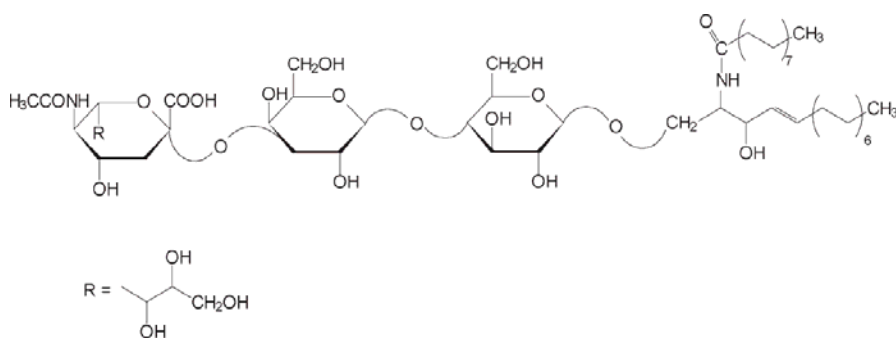


Klaus Dreisewerd 副教授 (左) 和 Johannes Müthing 教授

德国威斯特伐利亚-威廉大学医学物理学和生物物理学研究所的 Johannes Müthing 教授和 Klaus Dreisewerd 副教授的科研团队致力于开发一种 HPTLC 和基质辅助激光解吸/电离质谱 (MALDI-MS) 直接联用的技术。首先 HPTLC 薄层板上待分析的成分斑点以微液滴 MALDI 基质 (甘油) 浸润, 然后 μm 范围内的基质区域被消融转移到质谱仪中, 解吸分子中的一部分被电离并得到检测。实验采用红外 (IR) 激光而不是 MALDI 常用的紫外激光的不同之处在于其可提供更深的侵入能力。由于只有激光聚焦区域内的分子才被清除, 所以可以连续移动采样区域从而获得空间分辨率为 $200\mu\text{m}$ 的扫描样品图谱。采用甘油基质浸润待分析物斑点提高了离子产率, 但这也同时提高了加合物信号的生成, 使得光谱变得更难于判读。Müthing 教授的研究小组采用这一串联技术对神经节苷脂的结构进行了解析。

介绍

神经节苷脂 (GSL) 是一种广泛存在于哺乳动物细胞膜上的具有代表性的脂质体。它们在信号转导和细胞识别等过程中发挥着重要的生物作用。在疾病中它们同样起到各种流感病毒, 细菌和内毒素的受体作用[1]。神经酰胺分子由一个氨基二糖长链 (神经鞘氨醇, $\text{d}18:1$) 构成, 其通过酰胺键连接着各种长度 ($\text{C}16 - \text{C}24$) 的脂肪酸, 后者代表着 GSL 的疏水性侧链。神经鞘氨醇末端的羟基与寡糖形成糖苷键, 这种结构自细胞膜表面向外伸展并可与周围环境发生作用。被称作神经节糖苷的酸性 GSL, 携带有唾液酸 (主要是 N-乙酰神经氨酸, $\text{Neu}5\text{Ac}$), 使得分子在通常的生理 pH 环境下带负电性。神经节糖苷 GM3 ($\text{Neu}5\text{Ac}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-1\text{Cer}$) 就是这样一种典型的哺乳动物的神经节糖苷。



GM3(Neu5Ac, d18:1, C16:0)

薄层色谱是用来进行GSL制备样品初步分析的最常用方法[2]。色谱展开后对GSL进行显色分析可使用地衣酶进行糖类的显色，以及荧光染料对脂类成分进行染色。后者的非破坏性染色使其适合于薄层法制备分离GSL。更深入的检测方法还包括HPTLC酶联免疫吸附（ELISA）技术以及质谱分析免疫染色的GSL成分条带的硅胶洗脱物[3]。采用HPTLC直接串联MALDI-o-TOF-MS是一种灵敏度很高的方法，其避免了其他质谱方法在所需的成分提取过程中的损失问题。HPTLC/MS串联技术适合于各类可在HPTLC上得到分离的成分。该技术在分析奶制品中的内源性寡糖上得到了充分的展示[4]。

样品制备

中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，它是获得人重组糖蛋白的重要来源，主要表达的是神经节糖苷GM3（Neu5Ac）。GM3的分离制备依次在二乙氨基基（DEAE）葡聚糖凝胶（离子交换色谱）和硅胶60（吸附色谱）上完成。

薄层板

HPTLC硅胶60高效薄层色谱预制板，10 x 10 cm（Merck，Art. No. 5633）。

点样

样品5-10 μL，采用CAMAG Linomat 4条带状点样，带宽5mm，轨道间距10mm。

色谱条件

20 x 20 cm平底展开槽，100mL氯仿-甲醇-水（120:85:20）加2 mM CaCl₂作为展开剂，加滤纸饱和3h后，展开80mm（自底边起）。层析缸可供连续10块薄层板展开使用。展开后将薄层板于通风橱内干燥5min。

编者按：通常展开槽的尺寸应该适合于薄层板的大小。所以在这个例子中，采用10 x 10 cm的双槽层析缸，每次10mL流动相和30min的缸饱和时间更恰当。

衍生化

展开后的薄层板的每个轨道用CAMAG smartCUT切割为1cm的窄条。1个对照窄条采用浸渍设备进行地衣酶染色（0.3%（w/v）的3M硫酸溶液），然后在CAMAG薄层板加热器上于100 °C加热3min。1份平行的样品窄条用于IR-MALDI-o-TOF分析。此外也可以用0.02%浓度的樱草黄丙酮-水（4：1）溶液进行衍生化后直接进行质谱分析。这种检测试剂与地衣酶法相比其对样品没有破坏，因为这是一种疏水的可逆吸附行为。

IR-MALDI-o-TOF质谱分析

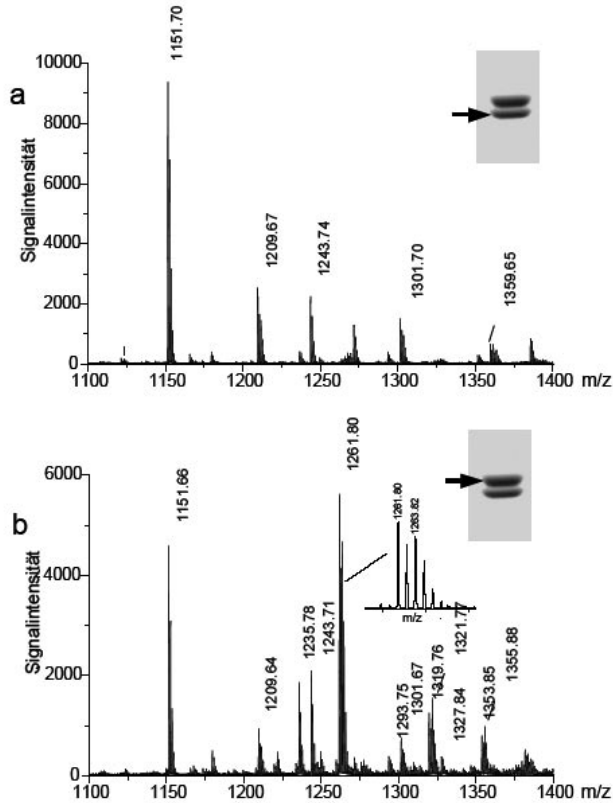
由激光轰击产生的离子源是正交的，也就是说离子运动垂直于激光的移动方向。离子加速后送入飞行时间质谱分析。应用于本次薄层板上原位分析的质谱仪是一台Sciex（Ontario, Canada）提供的改型原型机，安装了ER:YAG激光器（掺钕钇铝石榴石晶体，Bioscope, BIOptics 激光系统公司，柏林）。红外激光的发射脉冲长度约100ns，波长

2940nm。最大4.5 cm x 4.5 cm 的HPTLC薄层板用双面胶固定于样品支架上插入离子源。待分析物被激光解吸附被离子化后完成质谱分析。甘油用作液体基质，以0.3 μ L的微液滴形式点样于GM3区域。质谱分析程序可以从新设定以用于非浸染的薄层板或以樱草黄进行非共价荧光免疫标记的薄层板斑点。

结果与讨论

不同GM3的HPTLC-IR-MALDI-o-TOF-MS直接分析

正如插图中的地衣酶染色参照样品，神经节糖苷GM3 (Neu5Ac) 被HPTLC清晰地分为2个主要条带。MS分析显示下方斑点内的GM3主要由短链脂肪酸 (C16:0) 构成。对应的质谱图记录于负离子模式。上方斑点的GM3主要由长链脂肪酸 (C24:1和C24:0) 构成。



负离子模式下神经节糖苷GM3(Neu5Ac)的HPTLC-IR-MALDI质谱图。
m/z-range 为1100 - 1400。
插图为地衣酶染色参照样品。质谱图是由未染色的样品获得的。

实验的*m/z*值不仅显示了去质子化的GM3[M-H]⁻，而且还包括了甘油基质的加成产物和盐分子。根据对HPTLC分离获得的GM3条带进行的负离子模式IR-MALDI-o-TOF-MS分析中主要的分子离子碎片显示，各类神经节糖苷中的鞘氨基醇的组成均为d18 : 1。

(a) 下方条带

GM3脂肪酸组成	分子离子类型	<i>m/z</i> (单同位素)	
		计算值	测量值
C16:0	[M-H] ⁻	1151.71	1151.70
	[M+NaCl-H] ⁻	1209.66	1209.67
	[M+G-H] ⁻	1243.77	1243.74
	[M+G+NaCl-H] ⁻	1301.72	1301.70
	[M+G+2NaCl-H] ⁻	1359.67	1359.65

(b) 上方条带

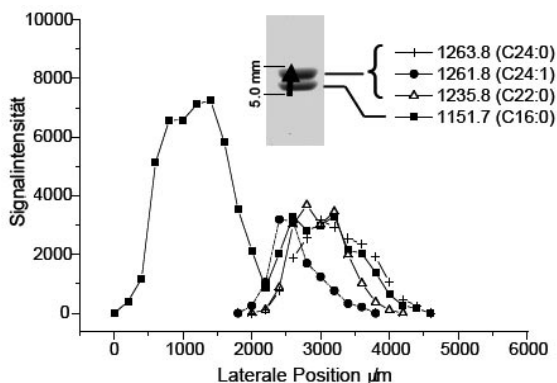
GM3 脂肪酸组成	分子离子类型	<i>m/z</i> (单同位素)	
		计算值	测量值
C16:0	[M-H] ⁻	1151.71	1151.66
	[M+NaCl-H] ⁻	1209.66	1209.64
	[M+G-H] ⁻	1243.77	1243.71
	[M+G+NaCl-H] ⁻	1301.72	1301.67
C22:0	[M-H] ⁻	1235.80	1235.78
	[M+NaCl-H] ⁻	1293.74	1293.75*
	[M+G-H] ⁻	1327.86	1327.84*
C24:1	[M-H] ⁻	1261.82	1261.80
	[M+NaCl-H] ⁻	1319.77	1319.76
	[M+G-H] ⁻	1353.87	1353.85
C24:0	[M-H] ⁻	1263.83	1263.82
	[M+NaCl-H] ⁻	1321.77	1321.77
	[M+G-H] ⁻	1355.89	1355.88

具有最高强度的GM3离子信号以黑体表示。G: 甘油
*较低的信号 (S/N 2-3)

HPTLC-IR-MALDIMS的色谱轮廓解析

借助于激光扫描，HPTLC分离的GM3条带的轮廓扫描总离子流图被获得，其空间分辨率仅受限于激光斑点的尺寸（约200 μ m）。4种主要GM3(Neu5Ac)组分的信号强度以

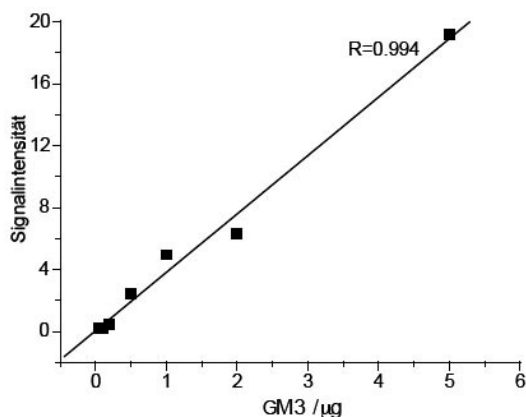
数据点绘出。其中每个点代表着50次激光脉冲的扫描叠加，这期间GM3色谱条带被以200 μm 的步长进行连续扫描。



HPTLC-IR-MALDI-MS 下 4 种含 C16:0, C22:0, C24:1, C24:0 脂肪酸的主要 GM3(Neu5Ac)组分各自的[M-H]⁻总离子流图
插图显示地衣酶染色的参照图谱。质谱图是由未染色的样品获得的。
箭头所示为扫描区域

HPTLC-IR-MALDI-o-TOF-MS的检测限

检测限通过测定一系列自50 ng-5 μg /斑点的不同浓度的GM3(Neu5Ac) C16:0脂肪酸 (m/z 1151.7)来计算获得。图中显示检测下限约为50ng。这个结果和免疫染色法的HPTLC相类似。



GM3(Neu5Ac) C16:0脂肪酸 (m/z 1151.7)的分子离子信号强度和浓度间的回归曲线 (相关系数 $R = 0.994$)。

展望

目前正在开展的是基于HPTLC/IRMALDI-MS技术的，对采用抗体免疫染色检测GSL成分进行的结构解析。

其中的特别之处在于针对高度复杂的Lewisx-GSL的分离只能通过CAMAG全自动梯度多步展开设备 (AMD) 来完成。

致谢

感谢Sequenom公司(德国汉堡)提供o-TOF质谱仪进行测定。同样感谢来自Prof. Dr. Jasna Peter-Katalinic和Prof. Dr.Franz Hillenkamp的慷慨支持。

参考文献

- [1] J. Müthing. In Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology, Vol. 3: Glycolipids; B. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem (Eds.) Springer: Heidelberg, Germany, 2001: pp. 2220-2252, 2001.
- [2] J. Müthing, J. Chromatogr. A 72, 3-25, 1996.
- [3] I. Meisen, J. Peter-Katalinic, J. Müthing, Anal. Chem. 76, 2248-2255, 2004.
- [4] K. Dreisewerd, S. Kölbl, J. Peter-Katalinic, S. Berkenkamp, G. Pohlentz, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 17, 139-150, 2006
- [5] K. Dreisewerd, J. Müthing, A. Rohlfing, I. Meisen, Ž. Vukelic, J. Peter-Katalinic, F. Hillenkamp, S. Berkenkamp, Anal.Chem. 77, 4098-4107, 2005.

作者通讯方式

* Prof. Dr. Johannes Müthing, Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Robert-Koch-Str. 31, D-48149 Münster, Germany; email: jm@uni-muenster.de