

# 基于基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)的疾病标志物筛查与鉴定

## ——仪器分析综合实验教学改革

林子俺\*, 靳迎雪

福州大学化学学院, 福州 350108

**摘要:** 本研究旨在开发一种新型开放探索型实验, 并将其融入到本科生的综合实验教学中。该实验采用基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)技术, 用于疾病标志物的筛查与鉴定, 在实验中, 我们选择 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)作为有机基质, 首先研究了点样方式对实验结果的影响。接着, 我们使用5种代谢小分子来验证基质的适用性。然后, 我们从健康人和心血管疾病患者中提取了特异性的血清代谢指纹图谱(SMPs), 通过对大数据进行多元统计分析, 建立了一个用于心血管疾病诊断的MALDI-MS平台, 并成功地将其应用于健康人和患者的区分。这种模式的目标是创建一个将实验教学和科研工作相结合的开放探索型平台, 使学生在实验过程中不仅能学习和掌握MALDI-MS的原理、操作和数据分析, 还能培养他们的科研创新能力和综合思维能力。

**关键词:** 基质辅助激光解吸电离质谱; 疾病筛查; 心血管疾病; 教学实验

中图分类号: G64; O6

## Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) for Disease Marker Screening and Identification: A Comprehensive Experiment Teaching Reform in Instrumental Analysis

Zian Lin\*, Yingxue Jin

College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China.

**Abstract:** This study aims to develop an innovative open-ended exploratory experiment that integrates research into undergraduate laboratory teaching by utilizing Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) technology for disease biomarker screening and identification. In this experiment,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) was chosen as the organic matrix, and an initial investigation examined the effect of different sampling methods on experimental results. The suitability of the matrix was further validated using five different small metabolic molecules. Specific serum metabolic fingerprints (SMPs) were then extracted from healthy individuals and patients with cardiovascular diseases. By applying multivariate statistical analysis to large-scale data, a MALDI-MS platform was developed for the diagnosis of cardiovascular diseases, successfully distinguishing between healthy individuals and patients. The goal of this approach is to create an open and exploratory platform that combines experimental teaching with scientific research, enabling students to learn and master the principles, operations, and data analysis techniques of MALDI-MS while enhancing their research innovation capabilities and comprehensive thinking skills.

收稿: 2024-03-23; 录用: 2024-05-16; 网络发表: 2024-09-04

\*通讯作者, Email: zianlin@fzu.edu.cn

基金资助: 国家自然科学基金(22274021); 福建省自然科学基金(2022J01535); 福建省本科高校教育教学研究项目(FBJG20220268); 福州大学本科教育教学研究项目; 福州大学本科生开放探索性实验项目

**Key Words:** Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry; Disease screening; Cardiovascular disease; Teaching experiment

心血管疾病(CVD)是全球人口最主要的死亡原因,占全球死亡人数的近一半。科技领域应该高度重视人民的健康需求,特别是在CVD的早期筛查和精准医学诊断方面<sup>[1-3]</sup>。早期诊断是预防和治疗CVD的关键环节,而疾病标志物是早期诊断的重要依据,它们反映了生物体在生理、病理或治疗过程中的特征性变化。因此,寻找并研究具有诊断价值的生物标志物是当前的研究重点和难点<sup>[4-6]</sup>,代谢物是生物体内信号通路的最终产物,它们能够实时反映出机体的状态和功能,对于精确诊断疾病有着重要的作用。作为系统生物学的一个关键分支,代谢组学能够对生物体内所有的小分子代谢物进行定性定量分析,从而揭示其与生理病理变化的相对关系,这为早期筛查和精准医学诊断提供了强有力的支持。然而,代谢物的检测面临着诸多困难,主要是由于代谢物的浓度低、种类多、分布广,以及存在大量的干扰分子。因此,亟需开发能全面分析复杂生物样品中的代谢物的分析方法<sup>[7]</sup>。

分子质谱(Molecular Mass Spectrometry)是试样分子在高速粒子束(电子、离子、分子等)作用下电离生成各种类型带电粒子或者离子,采用电场、磁场将离子按质荷比( $m/z$ )大小分离,依次排列成图谱,称为质谱。质谱不是光谱,是物质的质量谱。基于这种分离和检测原理,质谱仪器根据其分辨率、样品离子化方式以及离子源的能量强度被进一步分类,以适应不同的分析需求和样品特性。

(1) 质谱仪器按照分辨率可以分为高( $R > 50000$ )、中( $R = 10000-50000$ )、低( $R < 10000$ )三类,例如,双聚焦质谱仪器和傅里叶变换回旋共振质谱仪属于高分辨质谱仪器;而四级质谱仪、飞行时间质谱仪均属低分辨质谱仪器。(2) 根据样品的离子化过程,离子源主要可分为气相离子源和解析离子源。气相离子源适用于沸点低、分子质量小的化合物,此类离子源主要包括电子轰击源、化学电离源、场电离源等;解析离子源适用于大分子或热不稳定物质,包括场解吸源、快原子轰击源、激光解吸源、电喷雾电离源和大气压化学电离源等。(3) 按照离子源能量的强弱,又可分为硬离子源和软离子源。硬离子源产生高能量激发态分子,导致键断裂并生成碎片,提供分子官能团等结构信息;软离子源则产生分子离子,几乎不会产生碎片,谱图简单,主要包含分子离子峰或准分子离子峰。

激光解吸电离(Laser Desorption Ionization, LDI)是一种结构简单且灵敏度高的电离技术,利用特定波长的脉冲激光照射覆有能吸收激光能量基质的样品靶面,实现样品的电离。此过程中,激光首先激发基质分子,然后在气相中将质子转移至样品分子,完成样品分子的电离。为了提高离子产量并确保有效的电离,常常选用适当的基质材料,由此衍生出基质辅助激光解吸电离(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI)方法。MALDI作为一种软电离技术,其工作原理是将待测样品与强紫外光吸收能力的基质混合形成共晶体,用脉冲激光照射此共晶体,基质快速吸收能量并局部迅速升温,诱导样品发生解吸附反应,并通过场增强效应帮助样品离子化。具体来说,激光能量首先被基质高效吸收,接着以非热力学方式传递给相邻样品分子,赋予样品分子足够的动能实现电离及进入气态,产生单一正离子、负离子或分子离子,同时避免了剧烈的分子裂解现象。因此,MALDI产生的离子谱特征为碎片化程度低,以单电荷离子峰为主,提供分子量和部分结构信息的高质谱数据。

MALDI特别适合与飞行时间质量分析器(Time of Flight Mass Spectrometry, TOF-MS)配合使用。在MALDI-TOF-MS系统中,电离后的样品分子离子,在静电场的加速下进入无电场的飞行管(TOF管),通过测量离子的飞行时间来确定分子量,这种结合了MALDI软电离技术和TOF质量分析的方法,即为MALDI-TOF-MS(简称为MALDI-MS)。MALDI-MS相比其他质谱技术有许多优势,如样品预处理简单、耗样量少、对盐类和蛋白质有较高的容忍度等<sup>[8,9]</sup>。而且,MALDI-MS产生的大部分离子都是单电荷离子,其离子峰直接对应代谢物小分子的分子量。此外,MALDI-MS还具有高通量和高灵敏度的特点,使其在代谢成分分析方面显示出巨大的潜力<sup>[10,11]</sup>。根据MALDI-MS的原理,理论上可以实现全谱分子量的高准确、高分辨、高灵敏检测,为代谢组学研究提供了强有力的工具。因此,本文

设计了一个基于MALDI-MS的心血管疾病标志物筛查与鉴定的开放探索性综合实验。

开放探索型实验项目作为一种新型的教学模式，它鼓励学生在教师的指导下，充分利用实验室的设备和资源，进行自主的、探索性的实验学习，为学生提供实践科研的机会<sup>[12,13]</sup>。针对本科生毕业班的“综合实验(二)”课程，我们学院开设了基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)相关的开放探索型实验，以帮助本科生通过实践活动深入理解科研工作。本实验将临床的心血管疾病研究与新型的质谱分析技术相结合，采用启发式的教学模式，让学生通过实验了解科学研究的前沿内容，拓宽学生的科学视野，激发学生的学习兴趣，提高创新能力和科学研究能力，以培养更多的科技创新人才。

## 1 实验目的

(1) 深入了解基质辅助激光解吸电离质谱MALDI-MS的仪器结构、工作原理，并掌握仪器操作方法及质谱图的解析；

(2) 利用MALDI-MS技术，结合 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)作为有机基质，探究点样方式对实验结果的影响，并验证基质对5种代谢小分子检测的适用性；

(3) 通过提取健康人和心血管病患者的血清代谢指纹图谱(SMPs)，学习并运用多元统计分析方法，建立用于心血管疾病诊断的MALDI-MS平台，进而实现健康人和患者的区分。

## 2 实验部分

### 2.1 实验原理

基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)的工作原理如图1所示：将待测样品与有机小分子混合，形成共晶体，进而将这些样品-基质共晶体暴露于激光之下，基质能够吸收激光能量并传递给样品分子，这一过程中，基质吸收激光能量后迅速升温，促使样品分子从靶板表面温和解吸，解吸过程几乎不造成样品分子的碎片化，从而生成稳定的气态离子。随后，所有带电的气态离子在静电场中获得相同动能，并进入无电场的高真空飞行管(TOF管)，由于带电离子的质荷比不同，导致获得的速度不同，因此根据抵达检测器的飞行时间不同可以实现样品分子量的检测<sup>[14]</sup>。基于这种原理，MALDI-MS理论上可实现全谱分子量的高准确、高分辨、高灵敏检测，具有广泛的应用前景。

一个离子在电场中获得的电离势能 $K$ 与其电荷 $q$ 、加速电压 $V$ 有关，即

$$K = qV \quad (1)$$

分子电离后形成的离子经电场加速从离子源引出，加速电场中获得的电离势能 $K$ 化成动能，两者相等，即：

$$qV = \frac{1}{2}mv^2 \quad (2)$$

$$t = \frac{L}{v} = \frac{L}{\sqrt{\frac{2qV}{m}}} \quad (3)$$

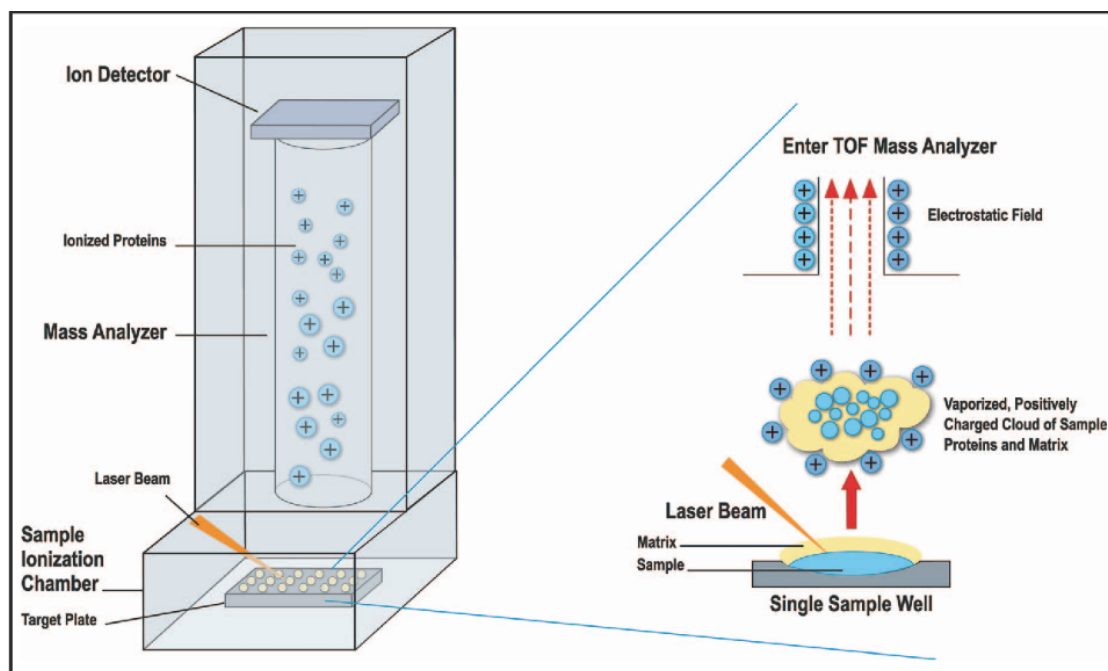
引入质荷比的 $m/z$ 定义：

$$m/z = m/q \quad (4)$$

因此，飞行时间和 $m/z$ 的关系：

$$t = \frac{L}{\sqrt{\frac{2V}{m/z}}}$$

式中， $t$ 是离子从离子源飞行到检测器所需的时间， $L$ 是离子源和检测器之间的距离， $v$ 为飞行速度， $m$ 是离子的质量。

图1 MALDI-MS的工作原理<sup>[15]</sup>

## 2.2 实验材料与试剂

三氟乙酸(TFA)、组氨酸(His,  $C_6H_9N_3O_2$ ,  $M_w = 155.15$ )、苯丙氨酸(Phe,  $C_9H_{11}NO_2$ ,  $M_w = 165.19$ )、赖氨酸(Lys,  $C_6H_{14}N_2O_2$ ,  $M_w = 146.19$ )、羟脯氨酸(Hyp,  $C_5H_9NO_3$ ,  $M_w = 131.13$ )、葡萄糖(Glu,  $C_6H_{12}O_6$ ,  $M_w = 180.16$ )购自Sigma-Aldrich;  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA,  $C_{10}H_7NO_3$ ,  $M_w = 189.17$ )购自德国Bruker Daltonics公司; 二次水( $18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ )由Milli-Q水净化系统(米利波尔, 美国)生产。所有化学试剂均为分析纯及以上纯度, 没有进一步纯化处理。血清标本由福建省直机关医院患者捐献, 所有志愿者均同意为研究提供血清样本。所有患者均按照临床严格诊断方案确诊为CVD。生化样品的研究需遵循赫尔辛基宣言, 并经福建省政府医院伦理委员会批准。

## 2.3 实验仪器与条件

主要仪器: MALDI-TOF-MS(德国Bruker Daltonics); 激光源: Nd:YAG激光(1 kHz, 波长355 nm)及Smart beam系统; 模式: 正模式; 电压: 20 kV; 频率: 1 kHz; 光斑大小: 5; 激光强度: 65%。

## 3 实验步骤

### 3.1 基质与样品的制备

小分子代谢物(His、Phe、Lys、Hyp、Glu)用去离子水配制成浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。使用含有0.1% TFA (3 : 7,  $V/V$ )的乙腈/水的TA30溶液配制 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  CHCA基质。所有样品溶液在 $-4\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存待用。

### 3.2 最佳点样方法的选择

本研究使用CHCA作为基质, 以Lys和His为参考物质, 来比较四种常见的点样方法(干点法、薄层法、双铺法和三明治法), 以确定最佳的点样方式。如图2所示, 在正模式下, 四种方法均可以检测到两种小分子代谢物的分子离子峰, 但是与其他三种方法相比, 干点法可以得到最高的加和峰值强度, 基质背景干扰也比较少。因此, 本研究选择干点法作为后续实验的点样方式。

### 3.3 小分子代谢物标准品的检测

在选定干点法后, 如图3所示, 我们检测了五种小分子代谢物(His、Glc、Lys、Hyp和Phe)。结果

显示，CHCA在正模式下能有效检出这些代谢物，证实了我们的实验设计和方法的有效性，并为后续的疾病筛查和诊断工作打下了基础。

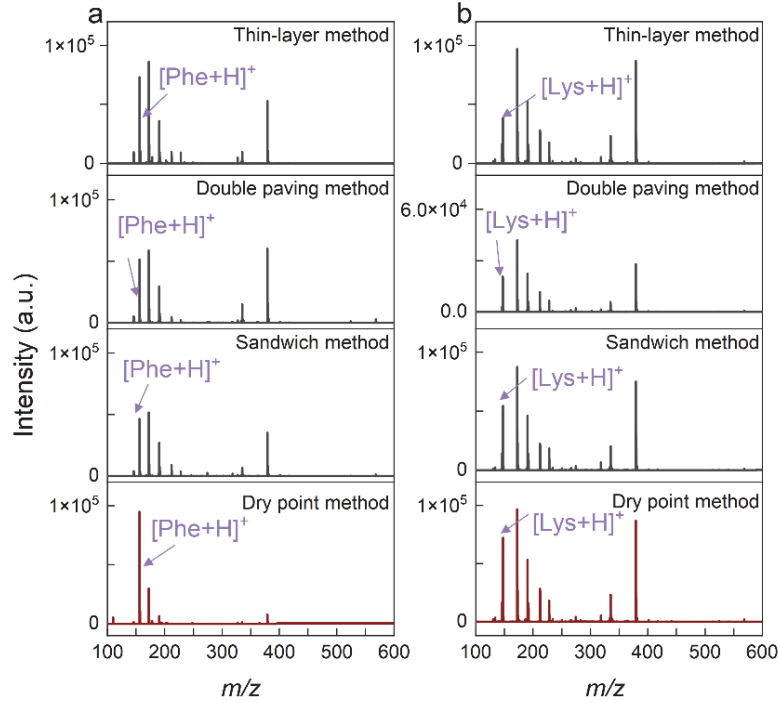


图2 四种点样方式在正模式下的质谱图

(a) Phe为例的四种点样方法在正模式下的质谱图；(b) Lys为例的四种点样方法在正模式下的质谱图

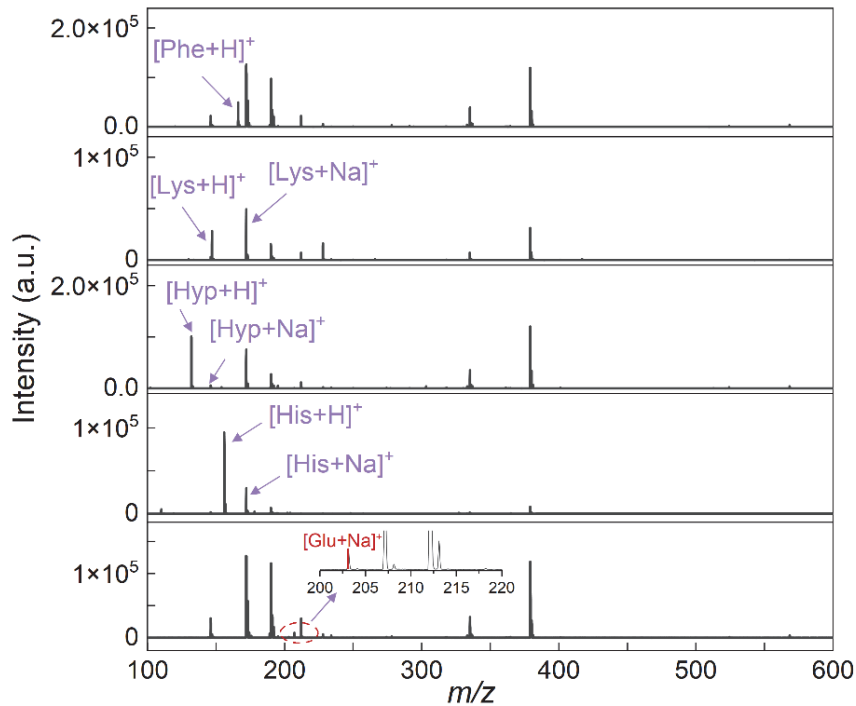


图3 以CHCA为基质5种代谢小分子在正模式下的质谱图

### 3.4 血清样本及代谢组数据的获取与处理

利用CHCA的优异性能, 我们构建了一个用于心血管疾病诊断的MALDI-MS平台。通过该平台, 我们提取了6名健康个体和6名CVD患者的血清代谢谱(SMPs), 并探讨其在临床诊断中的应用。为了进行MALDI-MS分析, 我们首先对血清样本进行了简单快速的处理, 即用去离子水将血清样本稀释10倍, 然后取1  $\mu\text{L}$ 作为分析样品, 采用干点法进行点样, 等样品与基质在靶板上完全干燥并形成均匀的固态共结晶, 此外无需其他预处理步骤。完成点样后, 将靶板引入质谱仪进行深入分析, 以获得血清样本的分子质量信息。每个样品重复测量3次以确保结果的可靠性。获得的质谱数据使用FlexAnalysis 3.4软件导出, 手动对图谱进行峰值提取, 对齐和归一化的预处理。接着利用Simca (version 14.0, Umetrics, Umeå, Sweden)软件进行多元统计分析作图。我们重点是介绍并实践主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)等先进数据处理技术。PCA是通过线性转换实现数据降维, 将复杂高维数据简化为相互正交的主成分, 利于数据可视化和去除噪声, 提高对数据主要结构和趋势的理解。而OPLS-DA在PCA的基础上专为分类任务优化, 强调最大化组间差异和最小化组内差异, 通过正交校正去除无关信息, 从而精确捕捉与分类相关的变量变化, 提升模型预测性能和识别潜在生物标志物的能力。两者结合使用, 既可用于全面探索数据的内在结构, 又能实现对特定疾病状态等分类问题的高度敏感和准确判别, 是生物医学研究中不可或缺的数据分析工具。

## 4 结果与讨论

在构建的MALDI-MS代谢平台中, 我们首先提取了健康对照组和CVD患者的代谢指纹图谱。如图4a所示, 两者的典型SMPs均具有丰富的峰值, 并存在显著差异。图4b的热图进一步展示了两组血清代谢特征的显著差异, 这表明CVD组和健康组的代谢物发生了显著变化。然后, 我们使用无监督主成分分析(PCA)对处理后的数据进行了观察, 如图4c所示, 健康对照组与疾病组在PCA图中有一定的区分性, 尽管不十分明显。但是这些结果表明, 我们的MALDI-MS代谢平台能够有效地区分健康和CVD患者的代谢特征, 为进一步的疾病诊断提供了有力的工具。

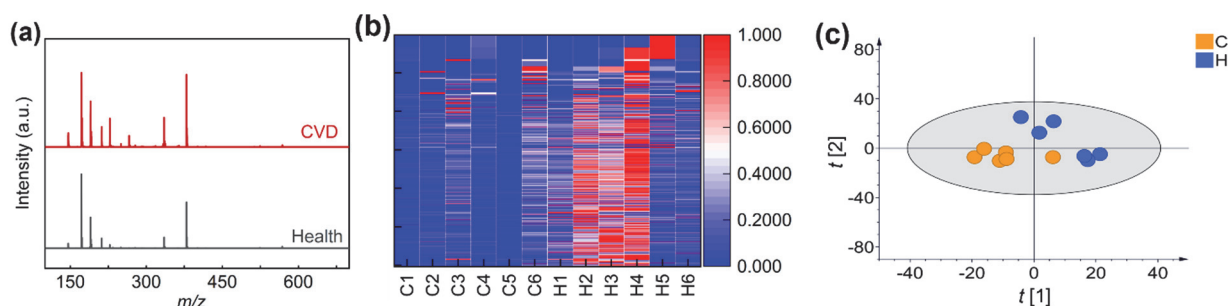


图4 (a) 健康组和CVD患者组典型的质谱图; (b) 12个临床血清样本的热图, 包括6名健康对照者和6名心血管疾病患者(H1-H6为健康人血清样本, C1-C6为患者血清样本); (c) 主成分分析(PCA-X)评分图

电子版为彩图, 下同

为了进一步提高分类效果, 我们采用有监督的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)将两组进行区分, 如图5a所示。两组被很好地区分开来, 模型的拟合度和预测能力分别为 $R^2Y(\text{cum}) = 0.999$ 和 $Q^2(\text{cum}) = 0.921$ 。同时, 我们绘制了受试者工作曲线(ROC)来评估模型的性能, 如图5b所示。模型表现出色, 曲线下面积(AUC) = 1, 95%置信区间(CI)为1-1, 验证了MALDI-MS可以成功区分CVD患者和健康对照。此外, 我们进行了200次随机排列的置换检验, 如图5c所示。置换后对应的值始终低于右边的起始点, 且两斜线的斜率均为正,  $Q^2$ 与Y轴的交点处于负半轴, 表明模型没有过拟合, 确

认了该模型的可靠性。这些结果表明，特异性的血清代谢指纹图谱可以作为心血管疾病的诊断要点，揭示了用MALDI-MS方法测定血清中代谢小分子含量来诊断CVD患者的可能性。

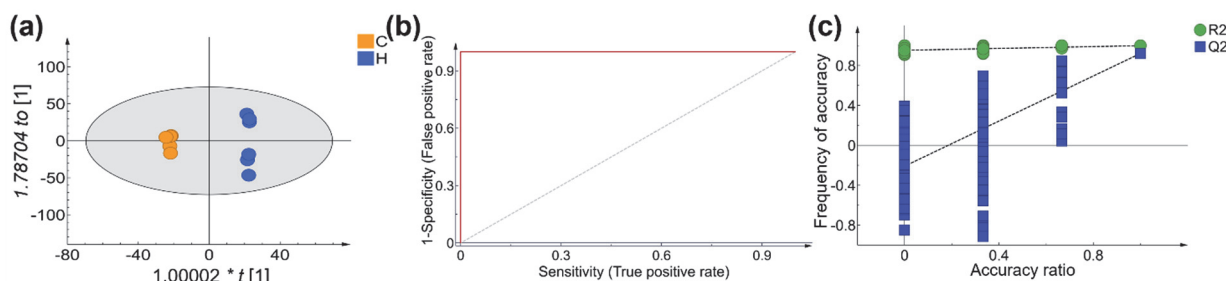


图5 (a) 心血管疾病患者和健康对照组总体代谢差异的OPLS-DA评分图; (b) 区分心血管疾病患者与健康对照的ROC曲线; (c) 心血管疾病患者与对照组的200次随机排列的置换检验图

## 5 实验教学安排及学生反馈

本课程是一门开放探索型实验，主要面向化学学院拔尖班及其他有兴趣的同学，计划在大四学年第一学期开设。这个实验设计为学生在完成各门基础化学实验后，向毕业论文阶段过渡的重要桥梁，其主要目标是培养学生的创新意识和实践能力。实验内容主要涉及MADLI-MS在疾病筛查方面的应用，学生将根据实验步骤进行操作。本课程充分体现了高阶性、创新性和挑战度，融合了化学各分支学科中的一些通用现代实验方法和技术。由于本实验的综合探究性强且实验时间较长，我们建议学生以4-5人一组的形式进行小组合作。在规定的学时内，学生应能完成相应的实验内容，并取得测定结果。实验总时长约为16.0个学时，这些可以在三次实验课内完成。学生实验的学时分布为：学习和掌握MALDI-MS的结构、原理及操作方法并了解实验方案，4.0学时；学生独立进行实验操作，4.0学时；学生实验数据分析与处理，8.0学时。

对参与实验的学生进行调查，学生反馈如下：通过“基于基质辅助激光解吸电离质谱(MADLI-MS)的疾病标志物筛查与鉴定”实验的学习，他们进一步加深了对MADLI-MS仪器结构及分析原理的理解，了解了疾病标志物筛选方法；掌握了多元统计分析大数据的方法，增强了实践能力和创新能力，拓宽了科学视野。

## 6 结语

该实验介绍了一种基于MADLI-MS方法的代谢诊断平台，评价其在疾病诊断中的可行性。通过多元统计分析，我们进一步验证了该平台的心血管疾病诊断性能，成功区分了心血管疾病患者和健康人体。本文表明，该平台在生物体液中疾病标志物的快速高灵敏检测中具有良好的应用潜力，有望在临床中大规模应用。

当涉及到本科生毕业班的开放探索型综合实验课程时，这个实验具有极高的教育和培养意义。通过进行文献调研、分组讨论、实验操作和实验报告的撰写，学生能够全面提升科研思维和创新能力的同时，也关注了科技前沿，解决了科技问题，运用了专业理论知识，激发了潜能，培养了学以致用、综合科研创新和高级思维能力。本实验为学生提供了充分的思考和发挥空间，展示了化学学科的创造性和实用性。这种教学模式不仅提高了教学质量，也为学生提供了实践科研的机会，对于提升学生的综合素质和科研能力具有重要的意义。

## 参 考 文 献

[1] Clark, H. *Lancet* 2013, 381 (9866), 510.

- [2] Paneni, F.; Diaz Cañestro, C.; Libby, P.; Lüscher, T. F.; Camici, G. G. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, 69 (15), 1952.
- [3] Ussher, J. R.; Elmariah, S.; Gerszten, R. E.; Dyck, J. R.; *J. Am. Coll. Cardiol.* **2016**, 68 (25), 2850.
- [4] Ouyang, D.; Fu, Z.; Li, G.; Zhong, C.; Yuan, J.; Huang, H.; Lin, Z. *Chin. Chem. Lett.* **2023**, 34 (6), 107992.
- [5] Lu, W.; Su, X.; Klein, M. S.; Lewis, I. A.; Fiehn, O.; Rabinowitz, J. D. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, 86, 277.
- [6] Johnson, C. H.; Ivanisevic, J.; Siuzdak, G. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, 17 (7), 451.
- [7] Huang, Y.; Du, S.; Liu, J.; Huang, W.; Liu, W.; Zhang, M.; Wang, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2022**, 119 (12), e2122245119.
- [8] Nielen, M. W. F. *Mass Spectrom. Rev.* **1999**, 18 (5), 309.
- [9] 武汉大学, 厦门大学, 中山大学, 南开大学, 浙江大学. 分析化学(下册). 第6版. 北京: 高等教育出版社, 2017: 529-533.
- [10] Gut, I. G.; Jeffery, W. A.; Pappin, D. J.; Beck, S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, 11 (1), 43.
- [11] Lu, J. J.; Tsai, F. J.; Ho, C. M.; Liu, Y. C.; Chen, C. J. *Anal. Chem.* **2012**, 84 (13), 5685.
- [12] 栾雅静, 苏征, 徐哲龙. 实验室科学, **2020**, 23 (5), 114.
- [13] Liu, X.; Yang, J.; Zhao, X.; Xiao, S.; Yu, P. *Mechanics in Engineering* **2022**, 44 (3), 693.
- [14] Dreisewerd, K. *Chem. Rev.* **2003**, 103 (2), 395.
- [15] Patel, R. *Clin. Chem.* **2015**, 61 (1), 100.