

《实验生物学》

质谱技术



周 虎

中科院上海药物研究所结构表征研究中心

2020年12月8日

自我介绍

教育经历

- 生物学学士
1997年9月—2001年7月
南开大学
- 生物化学与分子生物学博士
2001年9月—2007年6月
中科院上海生化细胞所

工作经历

- 助理研究员
2006年10月—2008年1月
中科院上海生化细胞所
- 博士后
2008年3月—2012年3月
质谱实验室主管 (facility manager)
2009年9月—2012年3月
加拿大渥太华大学
- 研究员、课题组长
2012年3月至今
中科院上海药物研究所

概要

1、质谱的发展历史

- (1) 质谱的发展和分类
- (2) 质谱与诺贝尔奖
- (3) 质谱仪器的类型和用途
- (4) 质谱仪器厂商的前世今生

2、质谱的应用

- (1) ICP-MS及其应用
- (2) MALDI质谱的应用
- (3) 交联质谱及应用
- (4) 氢氘交换质谱及应用
- (5) 基于质谱的代谢组学
- (6) 基于质谱的蛋白质组学
- (7) 质谱在药物研究中的应用

1.1. 质谱法



- 质谱法 (Mass Spectrometry, MS) 即用电场和磁场将运动的离子（带电荷的原子、分子或分子碎片）按它们的质荷比分离后进行检测的方法。测出离子准确质量即可确定离子的化合物组成。

质谱的特点

- ◆质谱不属波谱范围

质谱图与电磁波的波长和分子内某种物理量的改变无关

- ◆质谱是分子离子及碎片离子的质量与其相对强度的谱，谱图与分子结构有关。

- ◆质谱法进样量少，灵敏度高，分析速度快

- ◆质谱是唯一可以给出分子量，确定分子式的谱学方法。

- ◆仪器结构复杂，价格昂贵，使用及维修比较困难(磁质谱仪)。对样品有破坏性。

1.1 质谱的沿革与发展

- 1886年 Goldstein发现正电荷离子
- 1898年 Wien利用电场和磁场使正电荷离子偏转
- 1912年 Thomson研制第世界上一台质谱仪, Ne同位素的发现
- 1917年 电喷雾物理现象被发现 (并非为了质谱)
- 1918年 Arthur Dempster 电子轰击电离(Electron ionization)及磁聚焦
- 1919年 Francis Aston 精密仪器(测定50多种同位素, 第一张同位素表)
- 1934年 Stephens 均匀扇形磁场
球差和质量色散公式Herzog 和 Hintenberger 电磁场组合
离子光学系统
- 1940年 尼尔(Alfred Nier, “father of modern mass spectrometry”)设计出单聚焦质谱仪 (^{235}U , ^{238}U , Manhattan Project)
- 1942年 第一台商品质谱仪;
- 1946年 Stephens飞行时间质谱 (Time-of flight mass analysis)
- 1953年 Paul和Steinwedel四极杆分析器(Quadrupole analyzers)
- 1954年 Inghram和Hayden报道的Tandem系统, 即串联的质谱系统 (MS/MS)
- 1955年 Wiley & McLarens 飞行时间质谱仪;
- 1956年 Gohlke and McLafferty 气相色谱-质谱联用(GC/MS)
Beynon 高分辨质谱仪 (High-resolution MS)

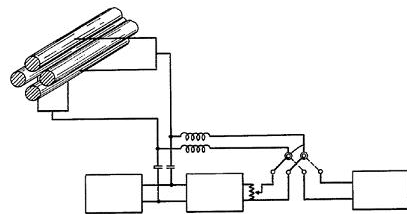
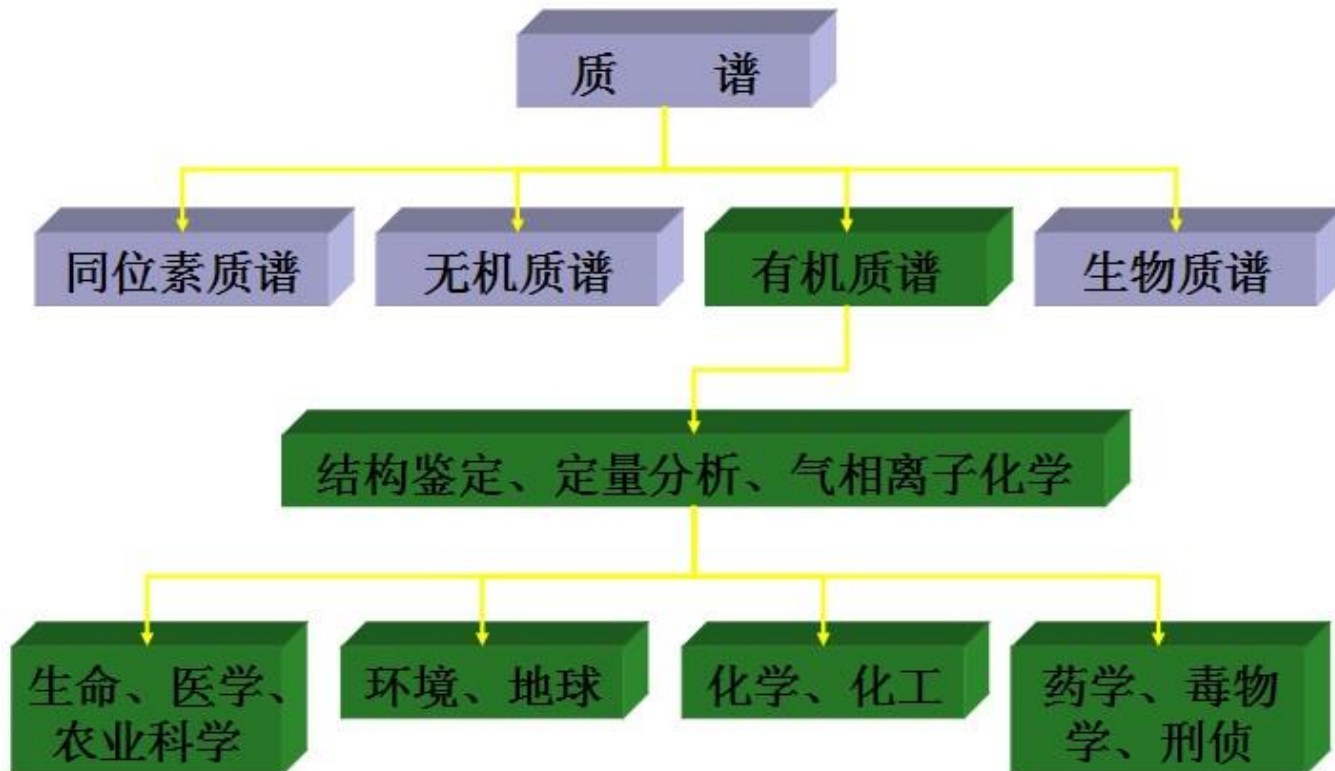


Diagram of Wolfgang Paul's patent for a quadrupole mass filter. Image adapted from US patent 2,939,952 A (1953).

- 1960年 尼尔(Nier)设计并制成了一台小型的双聚焦质谱仪；
- 1965年 Hipple等, 离子回旋共振(Ion Cyclotron Resonance)
- 1966年 Munson & Field化学电离(Chemical ionization)
- 1967年 McLafferty & Jennings, 串联质谱(Tandem mass spectrometry)
- 1973年 McLafferty 液相色谱-质谱联用 (LC/MS), 热喷雾方法
- 1974年 Comisarow和Marshall 傅立叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR-MS)
- 1979年 传送带式LC/MS接口成为商业产品；
- 1981年 Barber等 快原子轰击电离质谱(FAB MS) 小分子 2000以内
- 1982年 离子束LC/MS接口出现；
- 1984年 第一台电喷雾质谱仪宣告诞生；
- 1989年 John. B. Fenn 电喷雾电离
- Koichi Tanaka 基质辅助激光解吸电离
- 1990年 Katta & Chait 电喷雾电离质谱观察蛋白质构象改变
- 1993年 商品电喷雾质谱仪
- 1995年 傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(与ESI和MALDI联用)
- 1998年 高分辨飞行时间质谱仪(Delay Extract Reflectron技术)
- 2000年 静电轨道离子阱质谱 Alexander Makarov

1.1 质谱的分类



Glacial landforms can be dated by mass spectrometry, using radioactive isotopes such as ^{14}C and ^{10}Be .

1.2 质谱与诺贝尔奖

- ① Joseph J. Thomson (英, 1856-1940) 因对气体放电理论和实验研究作出重要贡献并发现电子获1906诺贝尔物理奖
- ② Francis W. Aston (英, 1877-1945)因发现非放射性元素中的同位素并开发了质谱仪获1922年诺贝尔化学奖。
- ③ Hans G. Dohmelt (美, 1922-)和 Wolfgang Paul (德, 1913-1993), 因离子阱的应用获1989年诺贝尔物理奖。
- ④ John. B. Fenn (美, 1917-)和田中耕一 (Koichi Tanaka, 1959-) 因发明了对生物大分子进行识别和结构分析的质谱方法获2002年诺贝尔化学奖。（与NMR方法分享）

The Five Mass Spectrometry Nobel Prize Pioneers



Joseph John Thomson
1906 Nobel Prize for
Physics

"in recognition of the great merits of his theoretical and experimental investigations on the conduction of electricity by gases"



Francis William Aston
1922 Nobel Prize for
Chemistry

"for his discovery, by means of his mass spectrograph, of isotopes, in a large number of non-radioactive elements, and for his enunciation of the whole-number rule"



Wolfgang Paul
1989 Nobel Prize for
Physics

"for the development of the ion trap technique"



John Bennet Fenn
2002 Nobel Prize for
Chemistry

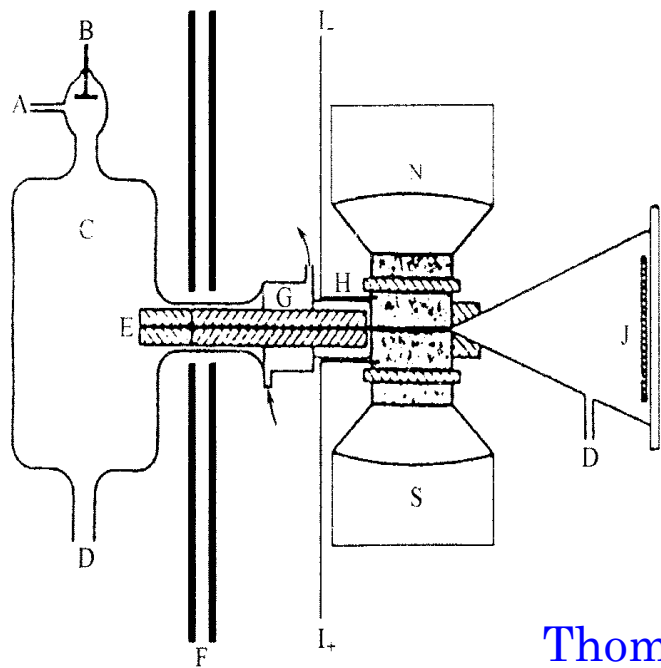
"for the development of soft desorption ionisation methods (ESI) for mass spectrometric analyses of biological macromolecules"



Koichi Tanaka
2002 Nobel Prize for
Chemistry

"for the development of soft desorption ionisation methods (MALDI) for mass spectrometric analyses of biological macromolecules"

上世纪初, 英国学者Joseph. J. Thomson利用低压放电离子源所产生的具有高速度的正电荷离子束, 通过一组电场和磁场, 不同质荷比的正电荷离子按不同质量而发生半径不同的抛物线轨道偏转, 依次达到检测器, 在感光板上被记录下来。

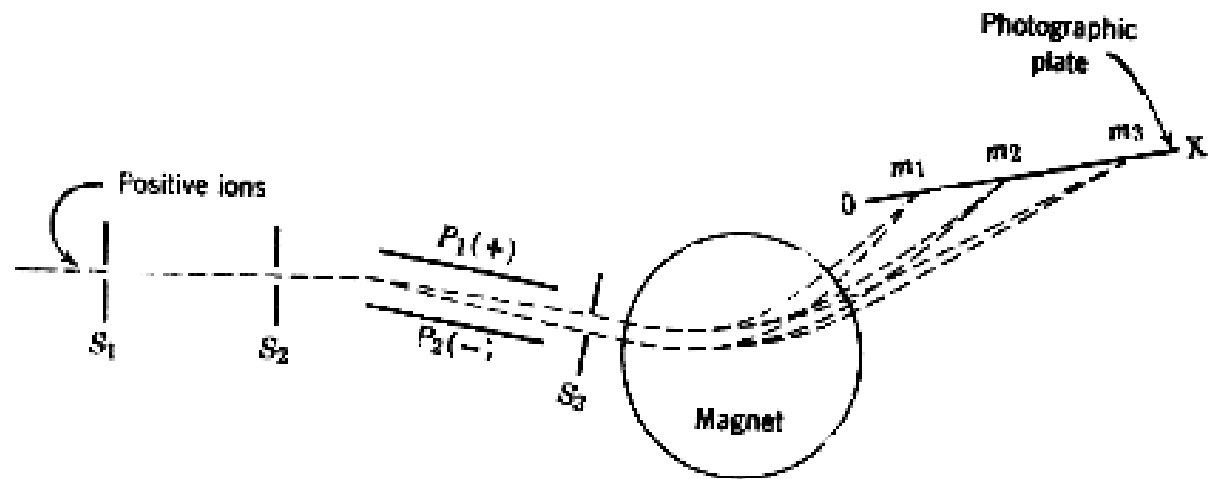


- A. 气体入口
- B. 阳极
- C. 放电管
- D. 去抽空泵
- E. 阴极
- F. 磁屏蔽
- G. 冷却水套
- H. 绝缘体
- I. 电场引线
- J. 照相感光检测器

Thomson 质谱仪示意图



J.J. Thomson captured the parabolas of deflected rays on a photographic plate. Reproduced with permission from *Proc. Roy. Soc. A* **89**, 1-20 (1913), J.J. Thomson, 'Bakerian Lecture: rays of positive electricity'.



Francis W. Aston设计的质谱仪



约翰·芬恩
(John. B. Fenn
1917)



对成团的生物大分子施加强电场



田中耕一
(Koichi Tanaka
1959)



用软激光轰击成团的生物大分子



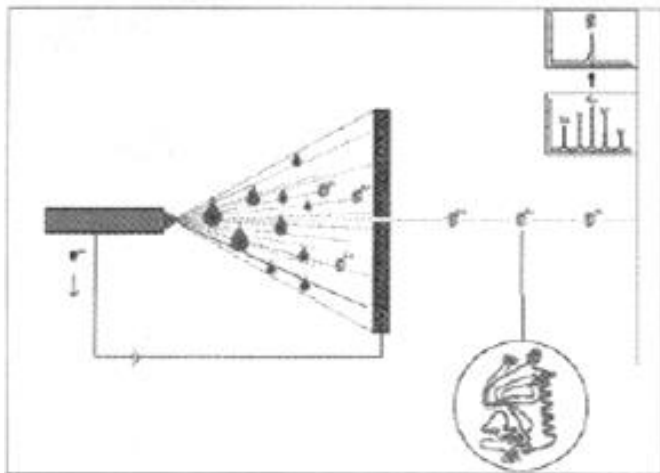
库尔特·维特里希
Kurt Wüthrich
1938



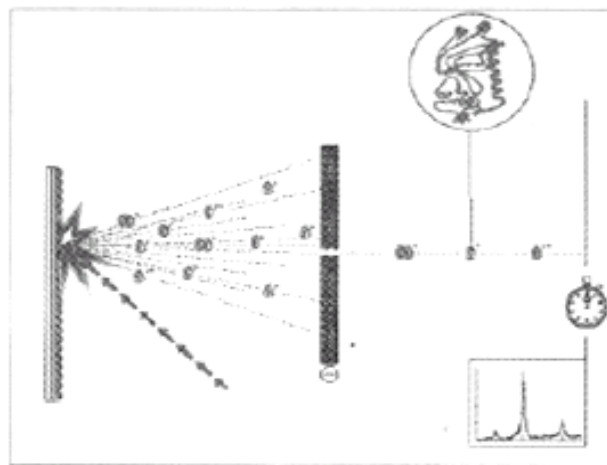
利用NMR技术测定溶液中生物大分子三维结构的方法



使生物大分子相互完整地分离, 同时也被电离。



芬恩的电喷雾质谱技术 (ESI)
原理图

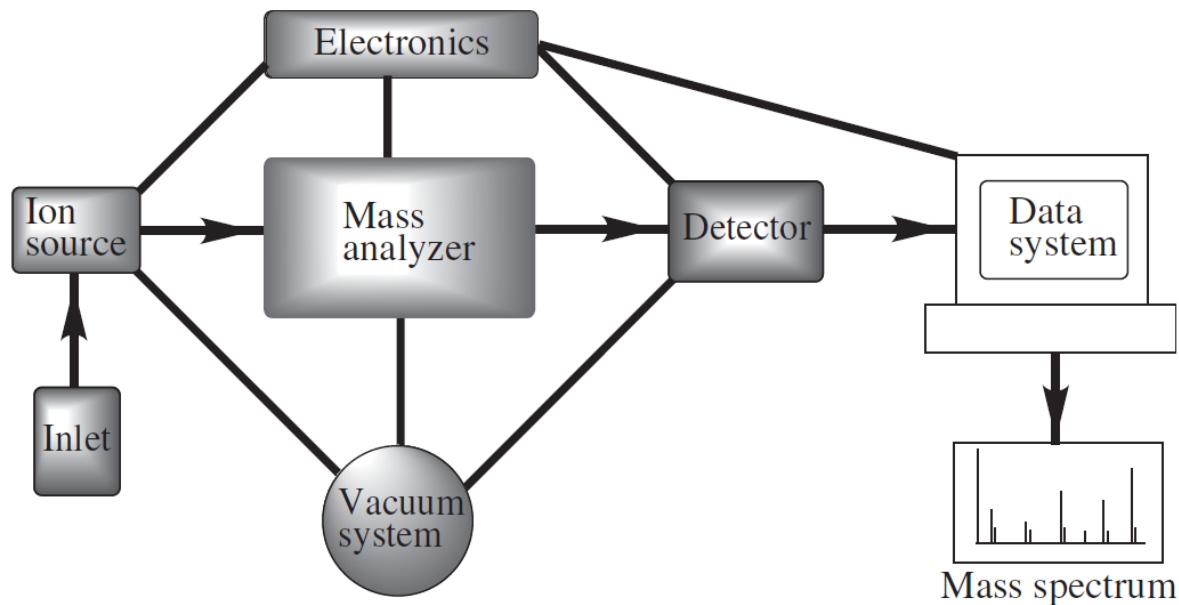


田中耕一的软激光解吸附质谱技术
原理图

解决了测定DNA和蛋白质等生物
大分子的结构问题

1.3 质谱仪器的类型和用途

1.3.1 质谱仪：质谱仪是一种测定气相离子的质量和丰度的仪器



质谱仪的组成：质谱仪由进样系统、离子源、质量分析器、检测系统、真空系统、电子线路和数据采集系统组成

1.3.2 真空系统

质谱仪的离子源和质量分析器需要保持真空状态，压力一般在 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ Pa 和 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ Pa。

- 氧会烧坏离子源的灯丝；
- 用作加速离子的几千伏高压会引起放电；
- 引起额外的离子—分子反应，改变裂解模型，谱图复杂化。

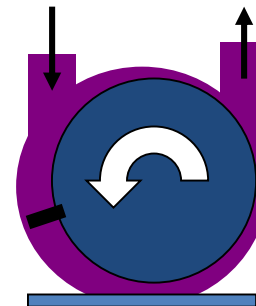


质谱仪与真空系统



Mr. & Ms. LC Emess

- **Vacuum reduces the chance of an ion colliding with other gaseous molecules or other ions.**
- **Higher the vacuum, greater the Mean Free Path.**
- **Lower the collision rate, greater the chance of detection.**
- **Introduce more ions than gas, but gas carries in the ions, therefore more gas means more ions, but more gas also means lower the vacuum.**
- **Vacuum determines**
 - **Sensitivity**
 - **Resolution**
 - **Applied voltages**
- **Two Kinds of vacuum pumps are predominantly used in LC-MS**
 - Mechanical or rough pump**
 - Turbomolecular (Turbo) pump**
- **Vacuum problems, forget mass spectrometry !**

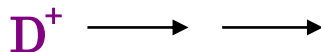
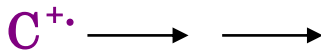
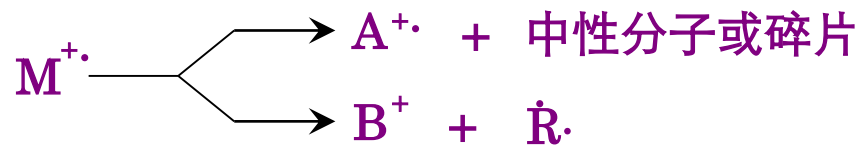


1.3.3 进样系统

- 在不破坏真空度的情况下，使样品进入离子源。
- 气体可通过储气器进入离子源。
- 易挥发的液体，在进样系统内汽化后进入离子源。
- 难挥发的液体或固体样品，通过探针直接插入离子源。

1.3.4 离子源

也称电离和加速室, 在这里, 被分析物质被电离, 生成带电荷的离子。



离子化方法

电子轰击电离 Electron Impact Ionization (EI)

化学离子化 Chemical Ionization (CI)

场电离, 场解吸 Field Ionization (FI), Field Desorption (FD)

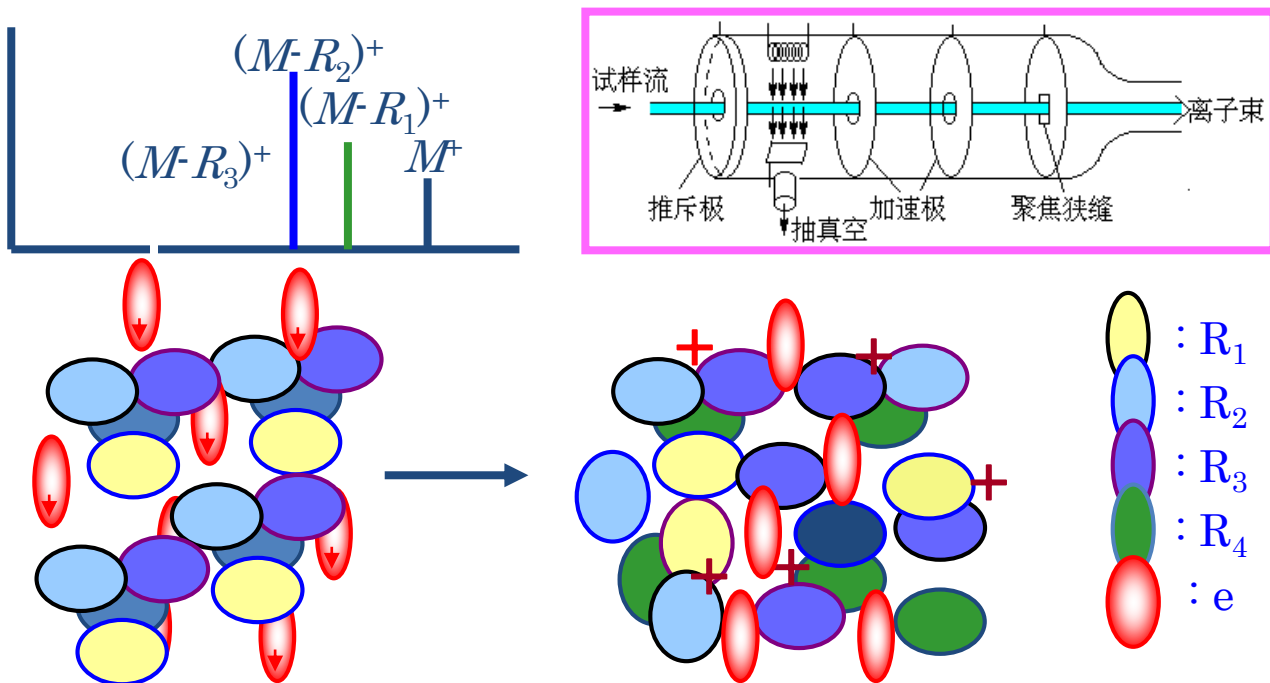
快原子轰击 Fast Atom Bombardment (FAB)

基质辅助激光解析电离 Matrix-Assisted Laser Desorption
Ionization (MALDI)

电喷雾电离 Electrospray Ionization (ESI)

大气压化学电离 Atmospheric Pressure Chemical
Ionization (APCI)

电子轰击电离 (EI)



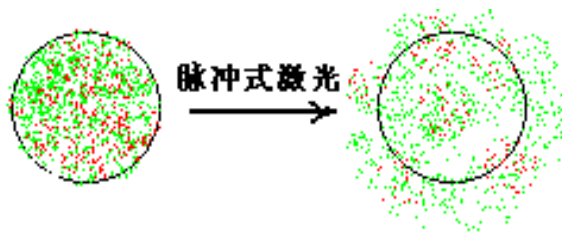
特点：可提供分子结构信息；缺点：有时不能出现 M^+

基质辅助激光解析电离

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)

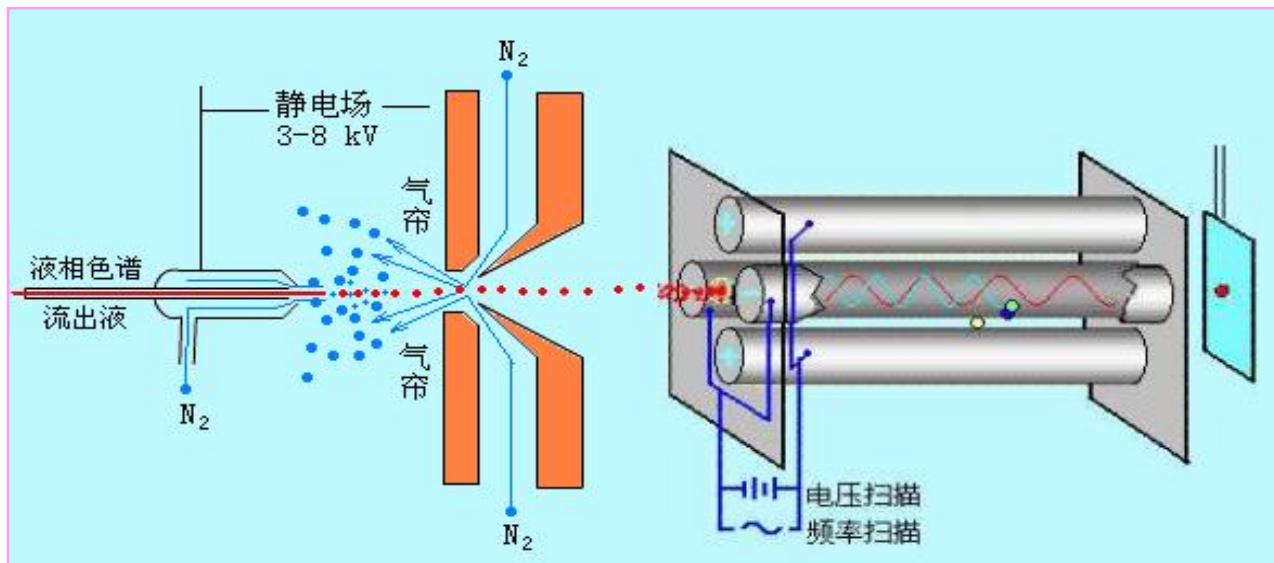
MALDI可使热敏感或不挥发的化合物由固相直接得到离子。

待测物质的溶液与基质的溶液混合后蒸发, 使分析物与基质成为晶体或半晶体, 用一定波长的脉冲式激光进行照射时, 基质分子能有效的吸收激光的能量, 使基质分子和样品分子进入气相并得到电离。



MALDI适用于生物大分子, 如肽类, 核酸类化合物。可得到分子离子峰, 无明显碎片峰。此电离方式特别适合于飞行时间质谱计。

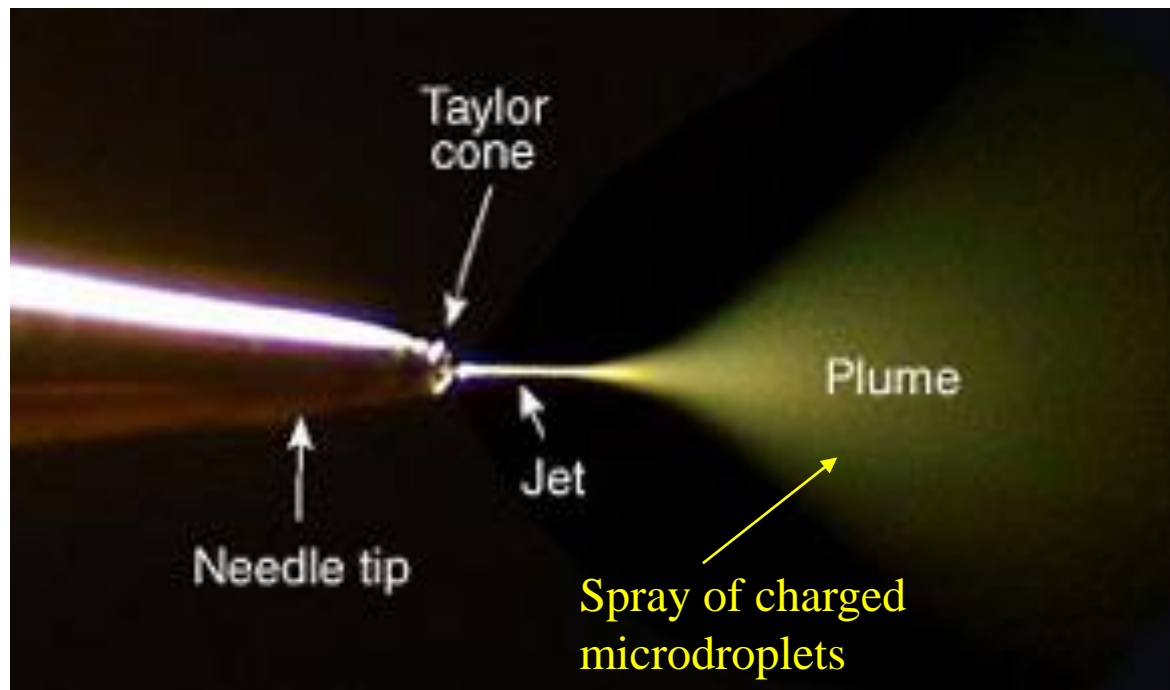
电喷雾电离 (ESI)



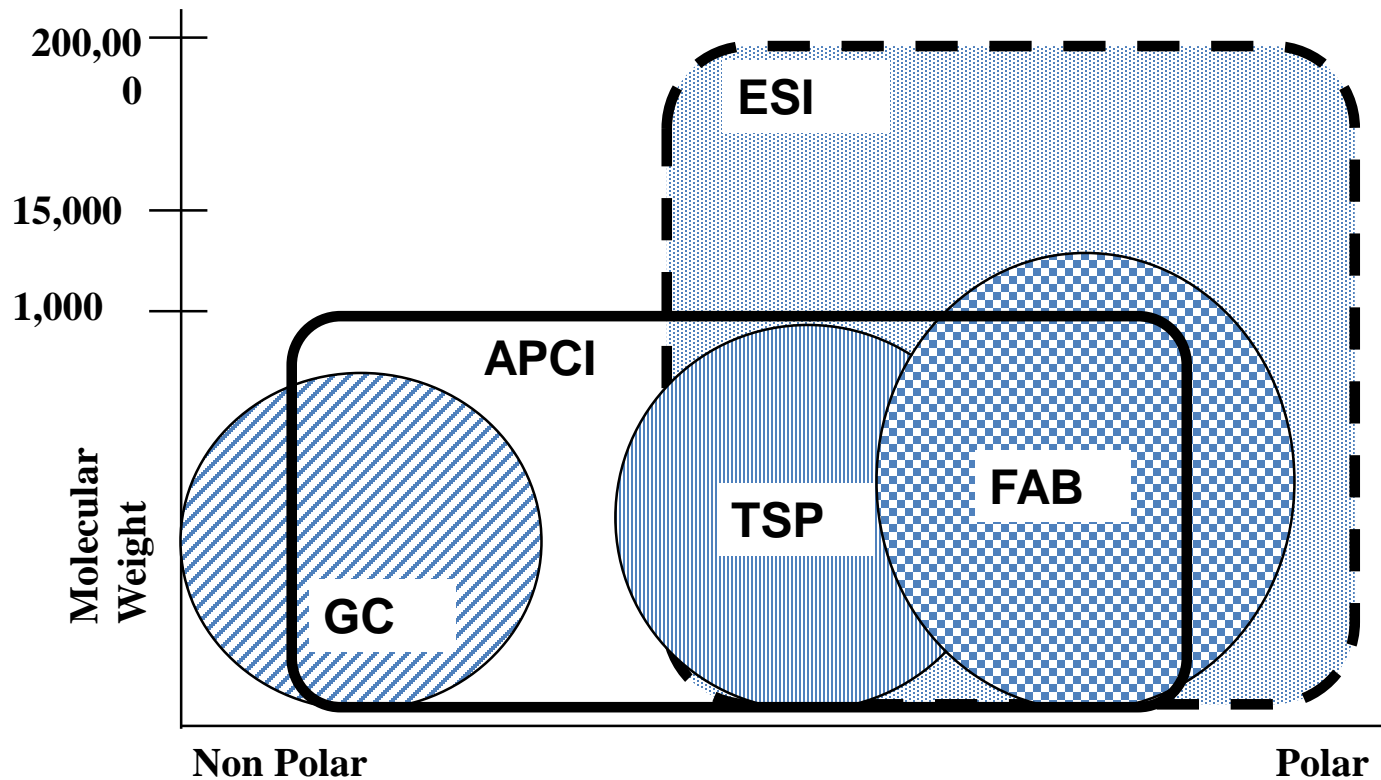
流出液在高电场下形成带电喷雾, 在电场力作用下穿过气帘;

气帘的作用: 雾化; 蒸发溶剂; 阻止中性溶剂分子

电喷雾电离 (ESI)



电离方式的互补性



1.3.5 质量分析器

质量分析仪是质谱中将离子化室产生的不同质荷比 (m/z) 的离子分离的核心组件，不同的质量分析器构成了不同种类的质谱仪。

- 扇形磁场质量分析器
单聚焦(single-focusing)
双聚焦(double-focusing)
- 四极质量分析器 (quadrupole mass analyzer)
- 离子阱 (ion trap)
- 飞行时间质谱 (time of flight, TOF)
- 傅立叶变换质谱 (Fourier transform mass spectrometer) (FT ICR)
- 静电轨道阱质谱 (Orbitrap)

不同类型质量分析器

双聚焦质谱仪体积大；

色谱-质谱联用仪器的发展及仪器小型化（台式）需要；

体积小的质量分析器：

四极杆质量分析器

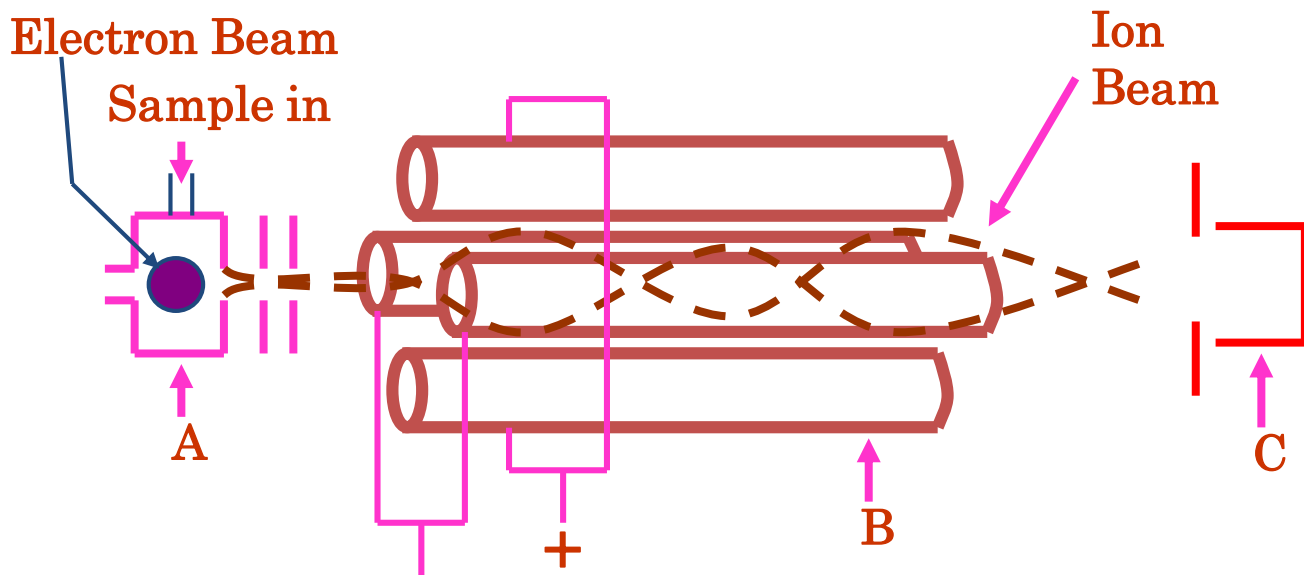
飞行时间质量分析器

离子阱质量分析器

体积小, 操作简单；

分辨率中等；

四极质量分析器 - 四极质谱计



◆ 四极质谱结构简单, 价廉, 体积小, 易操作, 无磁滞现象, 扫描速度快, 适合于GC-MS, LC-MS。分辨率不高。

离子漂移管-飞行时间质谱

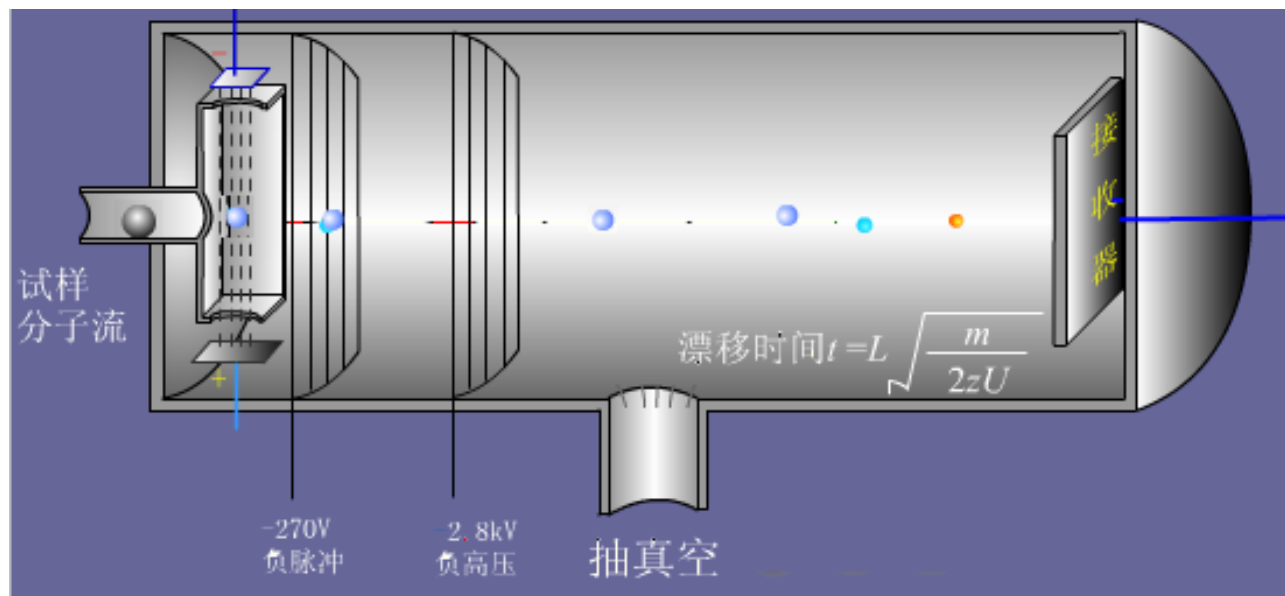
(Time of Flight MS, TOFMS)

TOFMS的核心部分是一个无场的离子漂移管

加速后的离子具有相同的动能 $\frac{1}{2}mv^2 = zV$ $v = (\frac{2zV}{m})^{1/2}$

- ◆ m/z 小的离子, 漂移运动的速度快, 最先通过漂移管, 到达检测器。
- ◆ m/z 大的离子, 漂移运动的速度慢, 最后通过漂移管, 到达检测器。
- ◆ 检测通过漂移管的时间(t)及其相应的信号强度, 可得到质谱图, t 为 μs 或 $10^{-7}s$ 数量级。
- ◆ 适合于生物大分子, 灵敏度高, 扫描速度快, 结构简单, 分辨率随 m/z 的增大而降低。

飞行时间质量分析器



Time of Flight (TOF)

- Developed in 1950's

Popularised in 1980's

- Advantage: no upper mass limit
- Disadvantage: poor resolution

$R = 2 \sim 5,000$

- Time between ion generation & detection

Approximately 10^{-7} seconds

- Very fast electronics required
- Very low maintenance

It is just an empty tube!

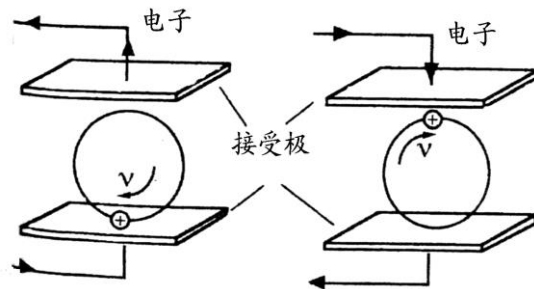
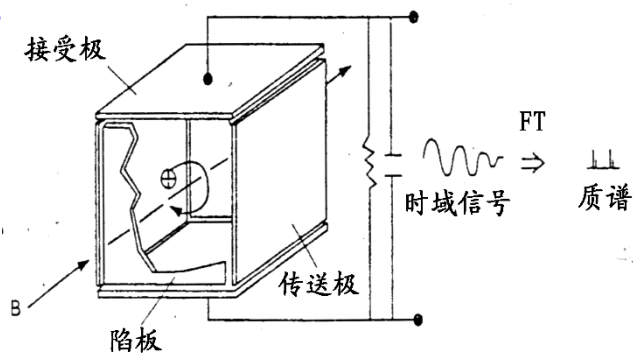
傅立叶变换质谱

Fourier Transform –Mass Spectrometer, FT-MS

傅立叶变换质谱计应该是傅立叶变换离子回旋共振质谱计, 是受FT-NMR的启迪。利用不同 m/z 的离子, 在磁场 B 的作用下, 各自产生不同的回旋频率。若施加一射频场, 使其频率等于某一 m/z 离子的回旋频率, 则离子就会吸收能量而激发。

离子从射频场吸收能量, 称之离子的回旋共振。

激发的离子运动速度(v) 增大, 运动轨道半径(r) 增大, 称之离子的回旋运动的激发。

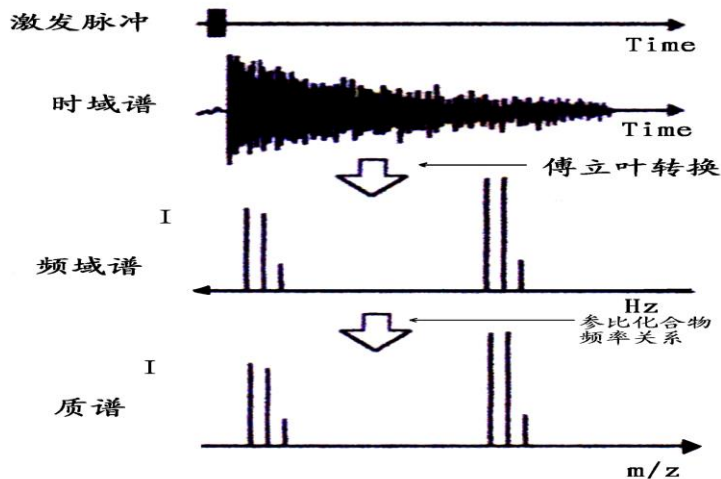


◆如果磁场强度 (B) 一定, 改变射频场的频率 (ν) 即可激发不同 m/z 的离子而得到质谱。

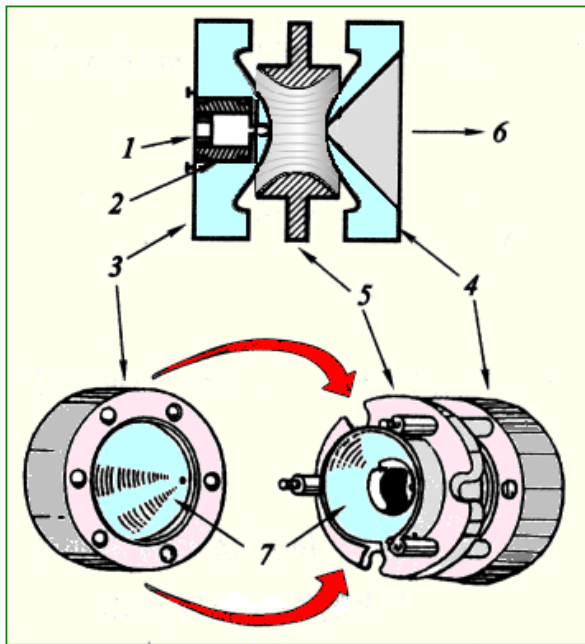
◆ FT-MS的核心为分析室, 分析室由三对平行的极板构成。磁力线沿 z 轴方向, 离子的回旋运动垂直于 z 轴, 在与 x 轴方向垂直的两极板上施加激发射频, 在与 y 轴方向垂直的两极板上检测信号。

◆ FT-MS分辨率极高, 目前可得到精确度最高的精确质量。

◆ FT-MS灵敏度, 质量范围宽, 速度快, 性能可靠。



离子阱质量分析器



离子阱的结构示意图

1. 离子束注入 2. 离子闸门 3, 4. 端电极
5. 环形电极 6. 至电子倍增器 7. 双曲线

离子阱，（Ion trap），由一对环形电极（ring electrode）和两个呈双曲面形的端盖电极（end cap electrode）组成，是一种利用电场或磁场将离子（即带电原子或分子）俘获和囚禁在一定范围内的装置。

原理：将离子储存在阱里，然后改变电场按不同质荷比 (m/z) 将离子推出阱外进行检测。

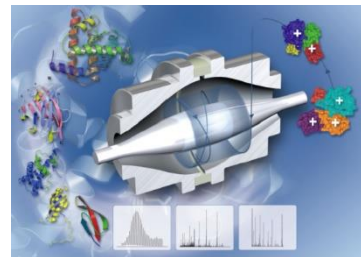
离子阱的特点

- ◆ 离子的囚禁在真空中实现，离子与装置表面不接触.
- ◆ 应用最多的离子阱有“保罗阱”（四极离子阱）和“Penning阱”。
- ◆ 离子阱质谱可以很方便地进行多级质谱分析，对于物质结构的鉴定非常有用。在质谱的使用过程中，离子阱被认为做定性方面有较大优势；而四极杆在定量方面有优势。
- ◆ 离子阱在做多级MS方面有性能（非常容易就能做到3级以上的MS）和成本（只用一个阱就能做）上的优势；而四极杆只能做到二级MS（三重四极杆仪器），且价格较贵。

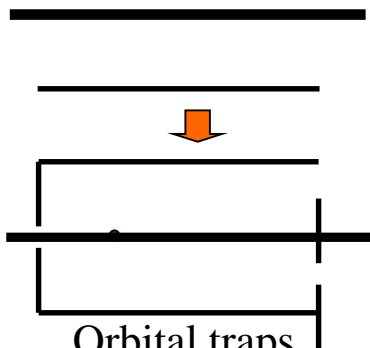
静电轨道阱 Orbitrap



+

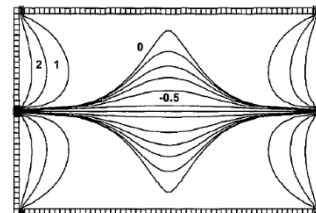
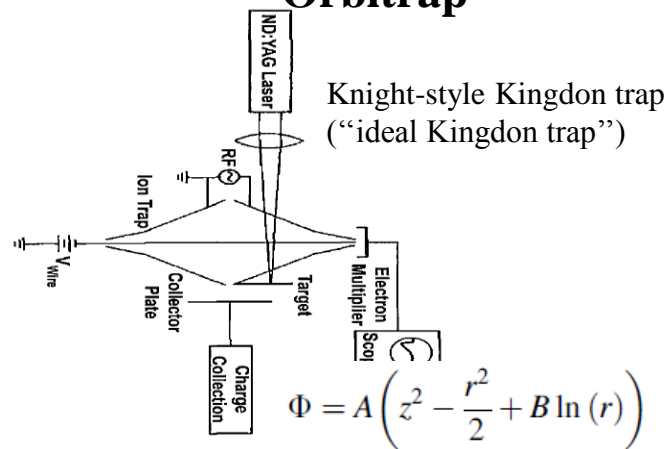


Orb
it Tra
 p



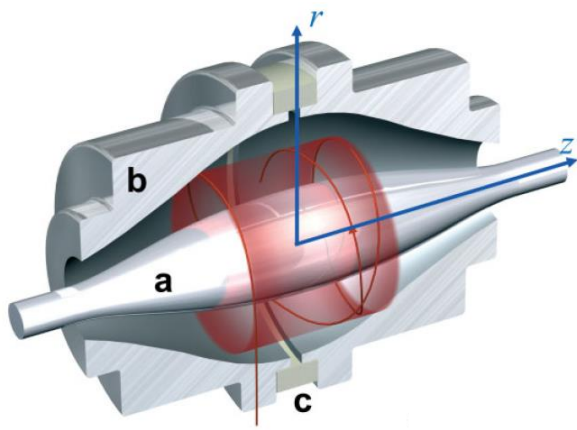
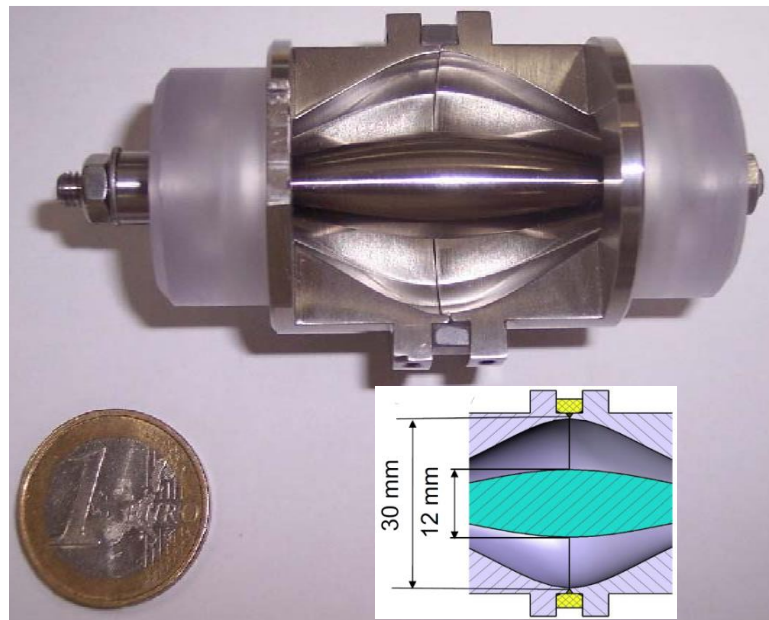
Orbital traps
Kingdon (1923)
 $\Phi = A \ln r + B$

Orbitrap

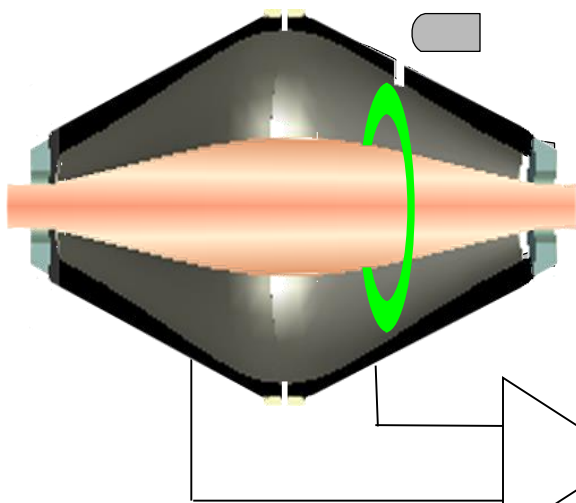




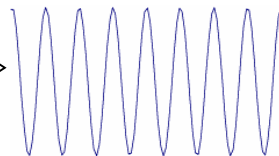
Dr. Alexander Makarov



$$U(r,z) = \frac{k}{2} \left(z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln \left[\frac{r}{R_m} \right] + C$$



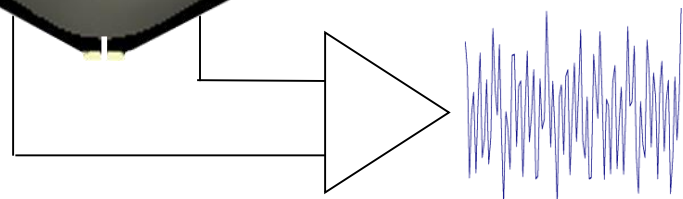
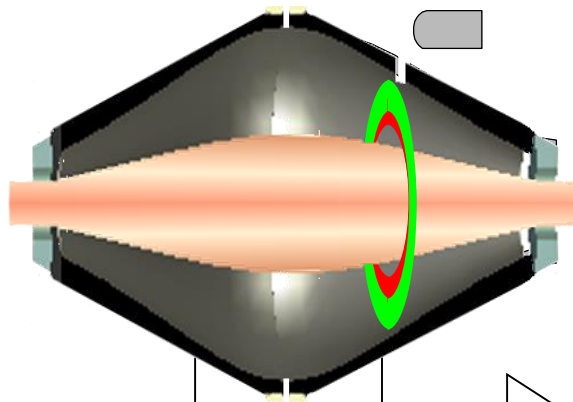
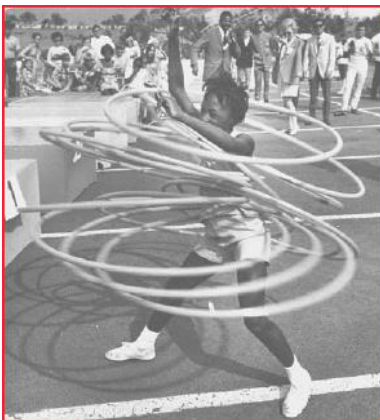
- Only an axial frequency does not depend on initial energy, angle, and position of ions, so it can be used for mass analysis
- The axial oscillation frequency follows the formula



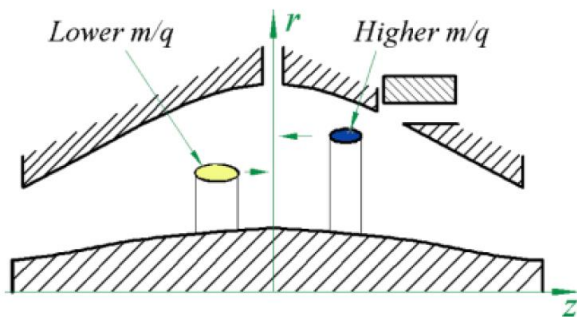
$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$



ω = oscillation frequency
 k = instrumental const.
 m/z = what we want!



Proteomics. 2006 Sep;6 Suppl 2:16-21

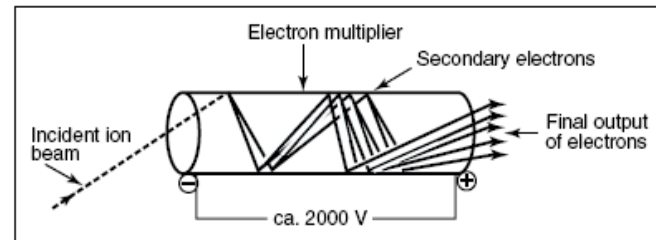
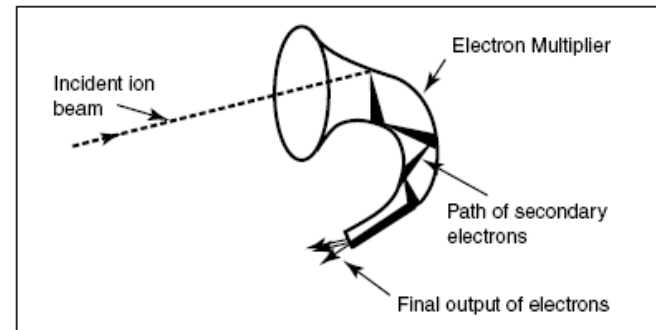
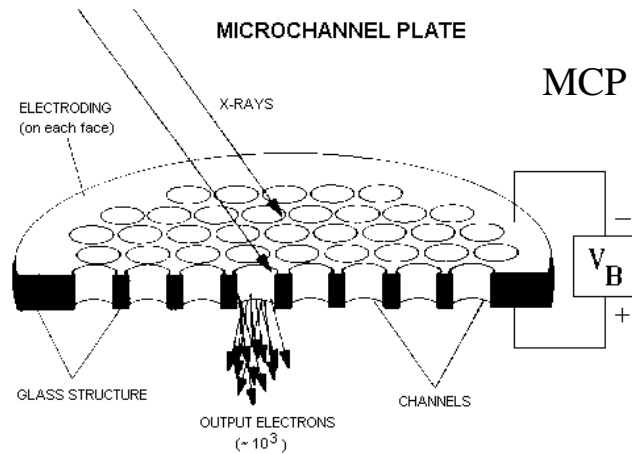


J. Mass Spectrom. 2005; 40: 430-443

1.3.6 检测系统

质量分析器分离并加以聚焦的离子束，按 m/z 的大小依次通过狭缝，到达收集器。经接收放大后被记录。

电子倍增管EM



1.3.7 质谱仪的主要指标

① 质量范围：仪器所检测的质荷比范围。对单电荷离子即为离子的质量范围；对多电荷离子，所检测的离子质量则扩展到离子电荷数相应的倍数。

② 灵敏度(sensitivity)

出峰强度与所用样品量之间的关系；或对选定的样品在一定分辨率下产生一定信噪比的分子离子峰所需的样品量。

③ 分辨率(resolution):

- 质量范围(Mass Range)

不同仪器： 四极杆： 1~600Da, 1~4000Da,

磁质谱： 1~10000Da

飞行时间质谱： 无上限

离子阱质谱： 1~2000Da, 1~4000Da

不同要求： 气体分析： 1~300Da

气相色谱质谱： 1~600Da, 800Da

有机质谱： 1~2000Da

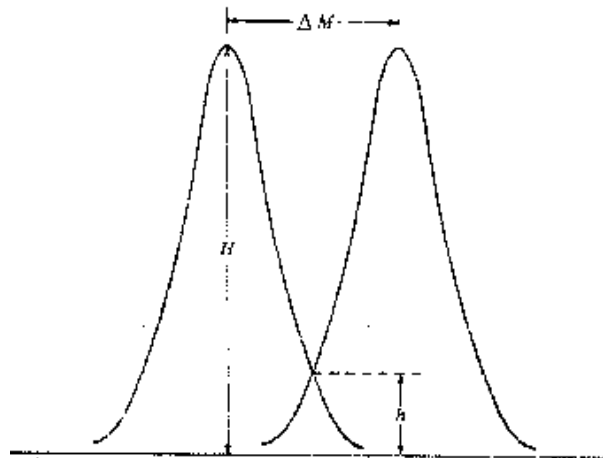
生物分子： 1~10, 000Da, 现可到50万Da

分辨率(resolution):

$R = M/\Delta M$, M 为可分辨的两峰的平均质量。

$R_{10\%} = aM/b\Delta M$ (实际)

ΔM 为可分辨的两峰的质量差； a 为相邻两峰的中心距离； b 为峰高5%处的峰宽。



对于FT-ICR及TOF: $R = M/\Delta M$ M 为所测峰的质量； ΔM 为该峰半高宽所对应的质量数。

➤ 分辨率(Resolution Power, RP)

分开两个邻近质量峰的能力。

若两个相邻峰的峰谷低于峰高的
10%(或5%, 50%), 则认为是分
开的。

- Reported in parts per million (ppm)
- How close is the mass measured by the MS in relation to the theoretically calculated mass?

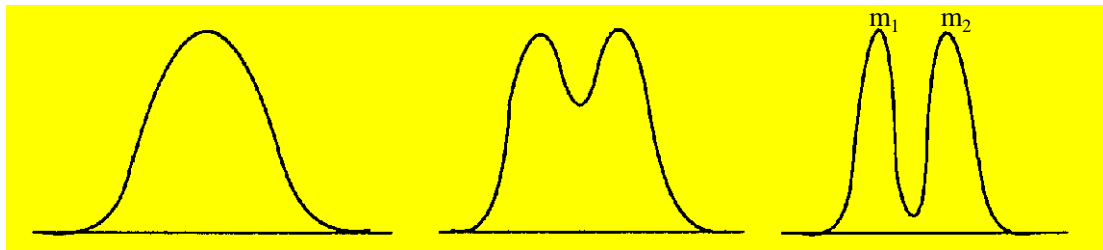
Measured mass: 545.4200

Actual mass: 545.3234

rel. error: $0.4200 - 0.3234 = 0.0966$

$0.0966 \div 545 = 0.000177248$ or 177 ppm

*Therefore the mass accuracy of this
instrument is 177 ppm*

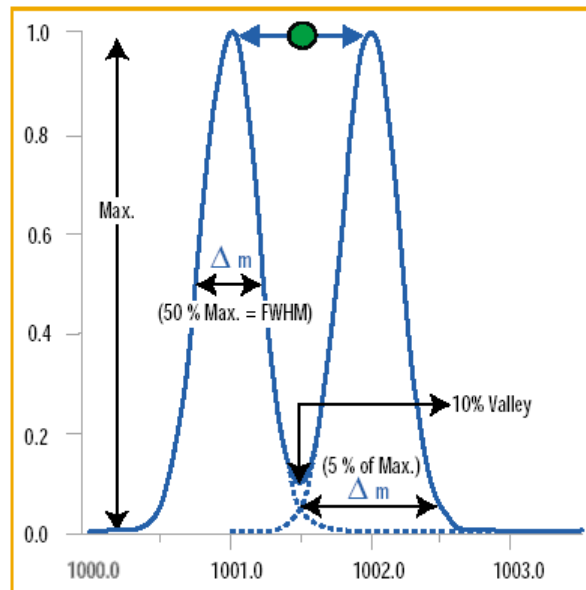


A: 未分开
分辨差

B: 部分分开
分辨较差

C: 全分开
分辨达到要

求



数学定义:

$$RP = \frac{m_1}{\Delta m} = \frac{m_1}{m_2 - m_1}$$

$$RP = \frac{m}{\Delta m}$$

.....(1) m_1 和 m_2 代表两个相邻峰的质量数

.....(2) m 代表某一峰的质量, Δm 代表半峰宽

□例：质量数为28的三种分子组成的精确质量

组成	整数质量	精确质量
CO	28	27.994914
N ₂	28	28.006158
C ₂ H ₄	28	28.031299

若仪器分辨力很低, 如 $RP=200$, 则对以上三个分子不能分开, 混为一峰。

若要分开以下混合物, 则必需有如下分辨力

$$CO/C_2H_4: (RP)_2 = 27.994914 / (28.031299 - 27.994914) = 770$$

$$N_2/C_2H_4: (RP)_3 = 28.006158 / (28.031299 - 28.006158) = 1100$$

$$CO/N_2: (RP)_1 = 27.994914 / (28.006158 - 27.994914) = 2490$$

当仪器分辨力达到770时, 只能够只分开 CO/C_2H_4 。

当仪器分辨力达到1100时, 能够分开 CO/C_2H_4 和 N_2/C_2H_4

当仪器分辨力超过2500时, 三者全部分开。

一般低分辨仪器在2000左右。10000以上时称高分辨。

FT-ICR-MS分辨力可达2百万。

质谱学上的高分辨

- 高的分辨本领

保证两个靠得很近的峰能够分离开, 从而知道是两个峰而不是一个峰。

- 良好的线性行为

用已知精确质量的离子去得到待测定离子的质量数, 不容许二者峰的质量是一样的(重叠在一起), 二者之间必有一定的质量差异, 质谱仪的线性不好, 用已知精确离子的质量来得到待测定离子的质量, 就会因此而产生偏差, 从而造成误差, 两者距离越远, 这种误差越大。

- 良好的稳定性

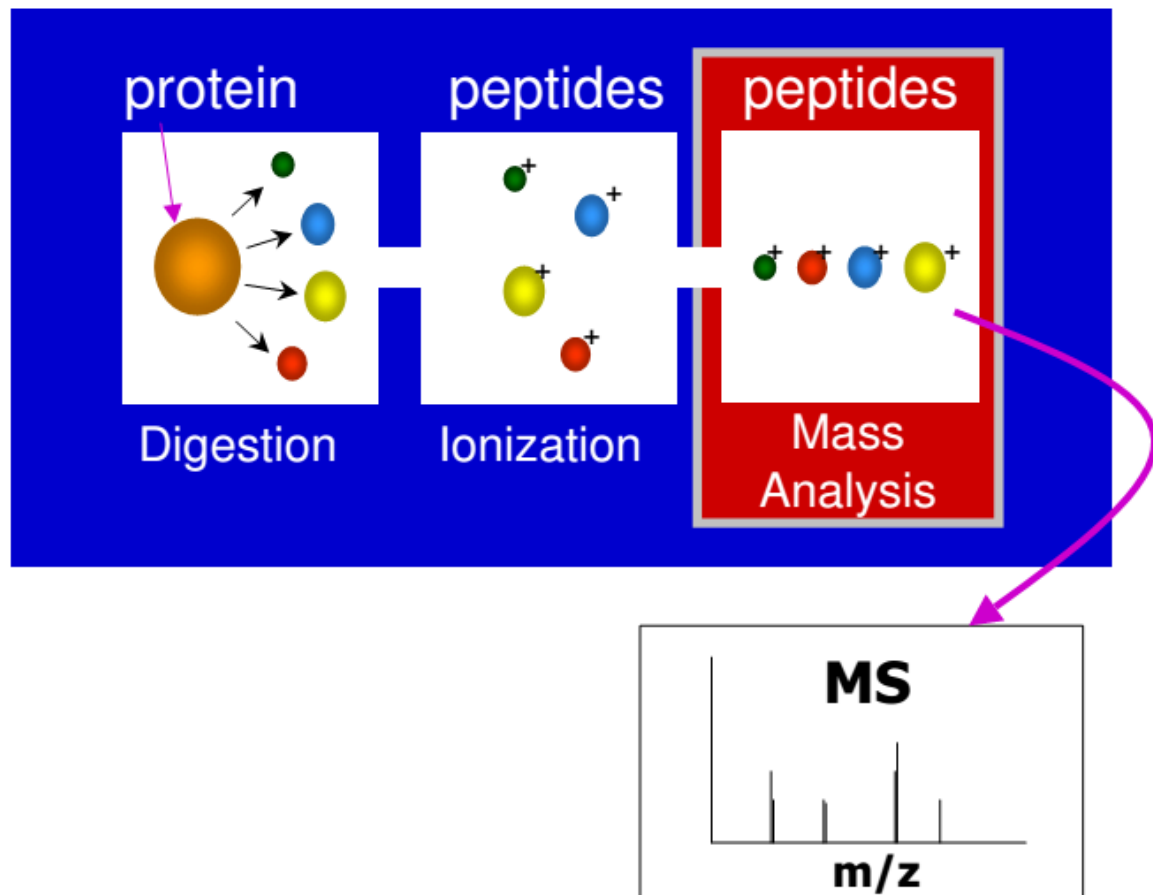
磁质谱, 飞行时间质谱仪, 离子回旋共振质谱仪:

分辨率、线性和稳定性好, 属高分辨质谱仪。

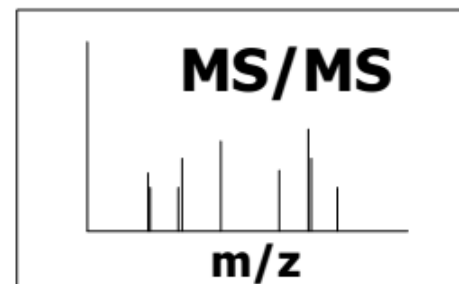
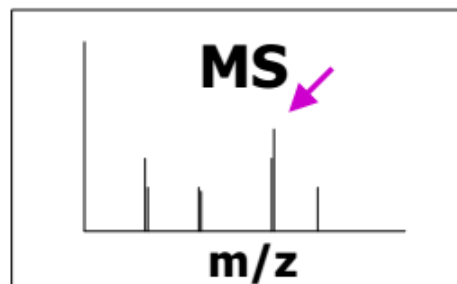
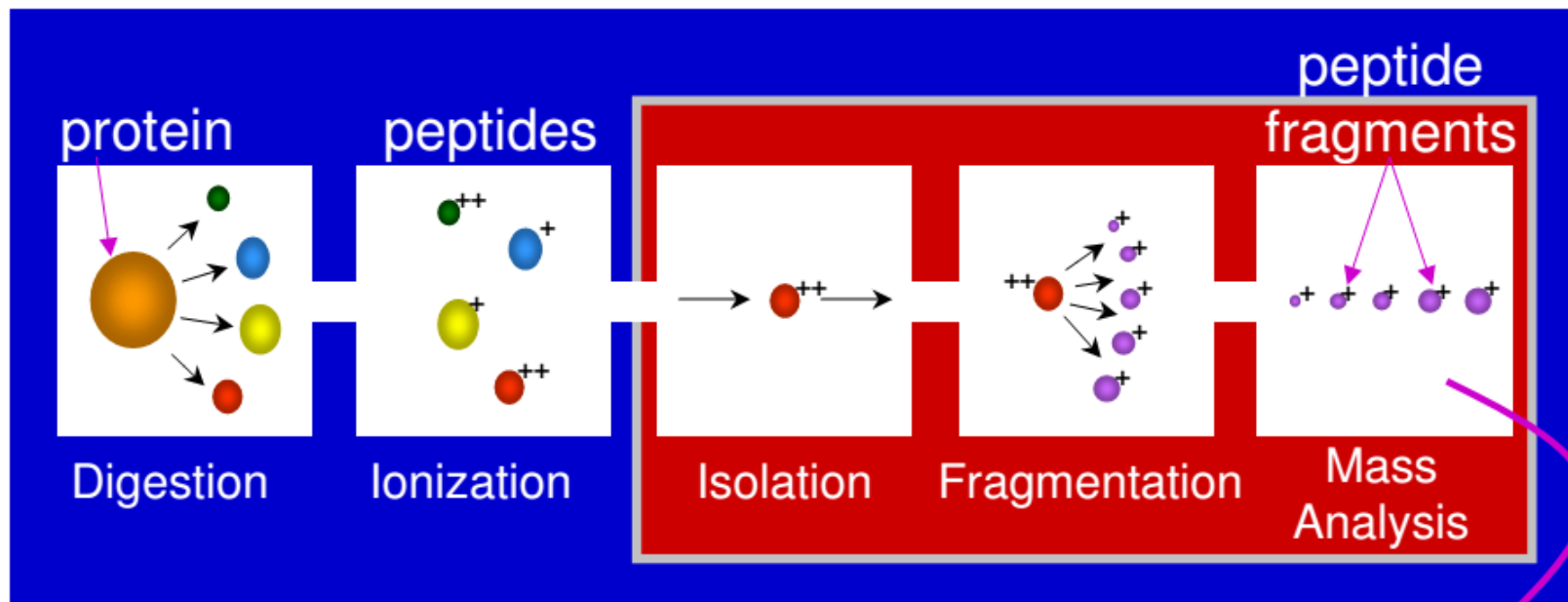
离子阱质谱仪: 分辨率高, 线性低, 准高分辨质谱仪, 用于判断质谱峰带的电荷数。

四极杆质谱仪: 分辨率低, 线性好, 不属于高分辨质谱仪。

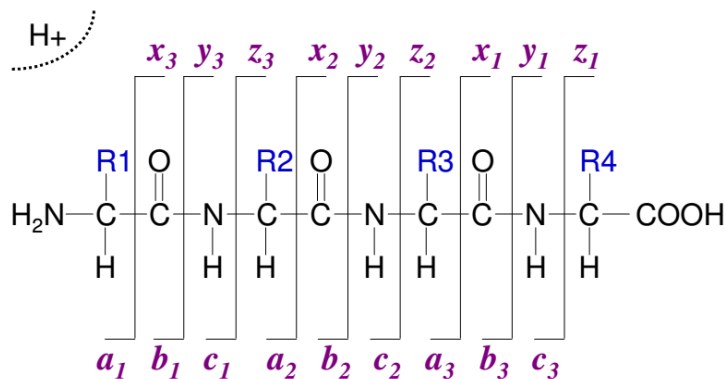
1.3.8 一级质谱



串联质谱



肽段串联质谱



A-P-N-D-F-N-L-K

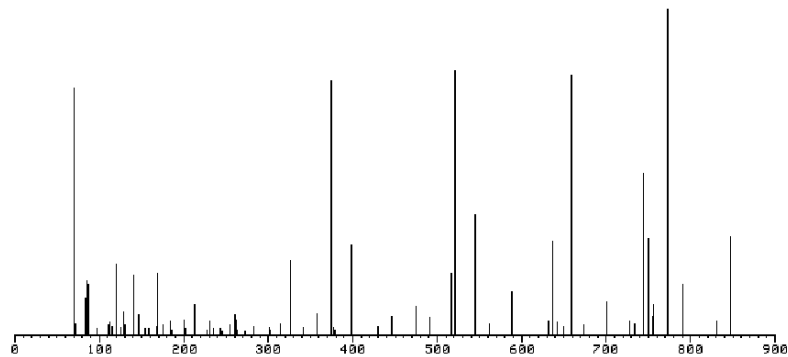
(MH⁺ 918.5)

B-ions

72.0	A	P-N-D-F-N-L-K
169.1	A-P	N-D-F-N-L-K
283.1	A-P-N	D-F-N-L-K
398.2	A-P-N-D	F-N-L-K
545.2	A-P-N-D-F	N-L-K
659.3	A-P-N-D-F-N	L-K
772.4	A-P-N-D-F-N-L	K

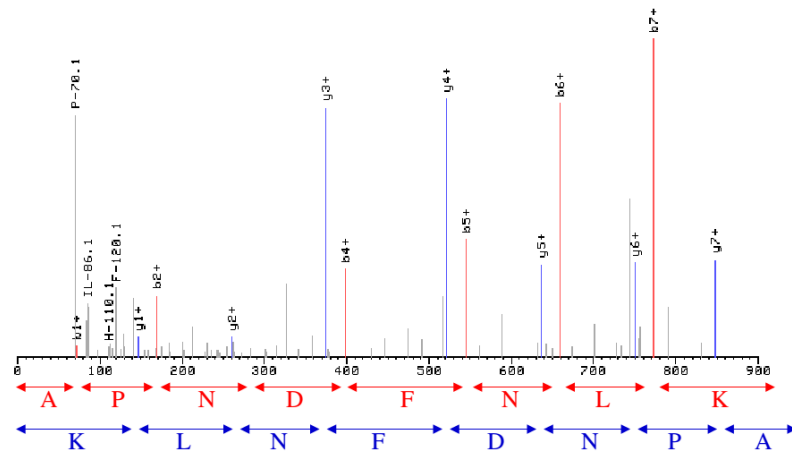
Y-ions

847.4	
750.4	
636.3	
521.3	
374.2	
260.2	
147.1	

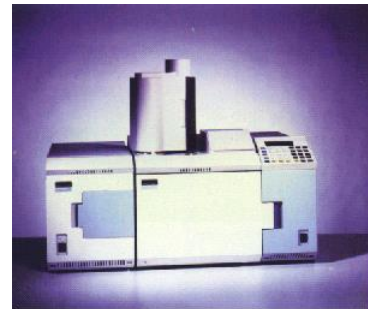


A-P-N-D-F-N-L-K

(MH⁺ 918.5)

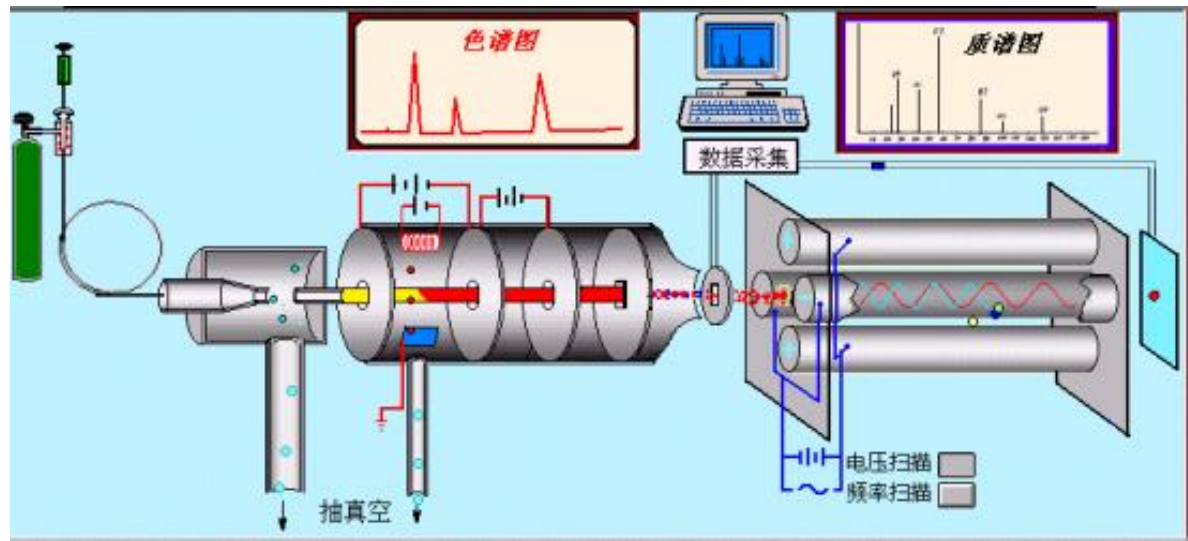


1.3.9 联用仪器

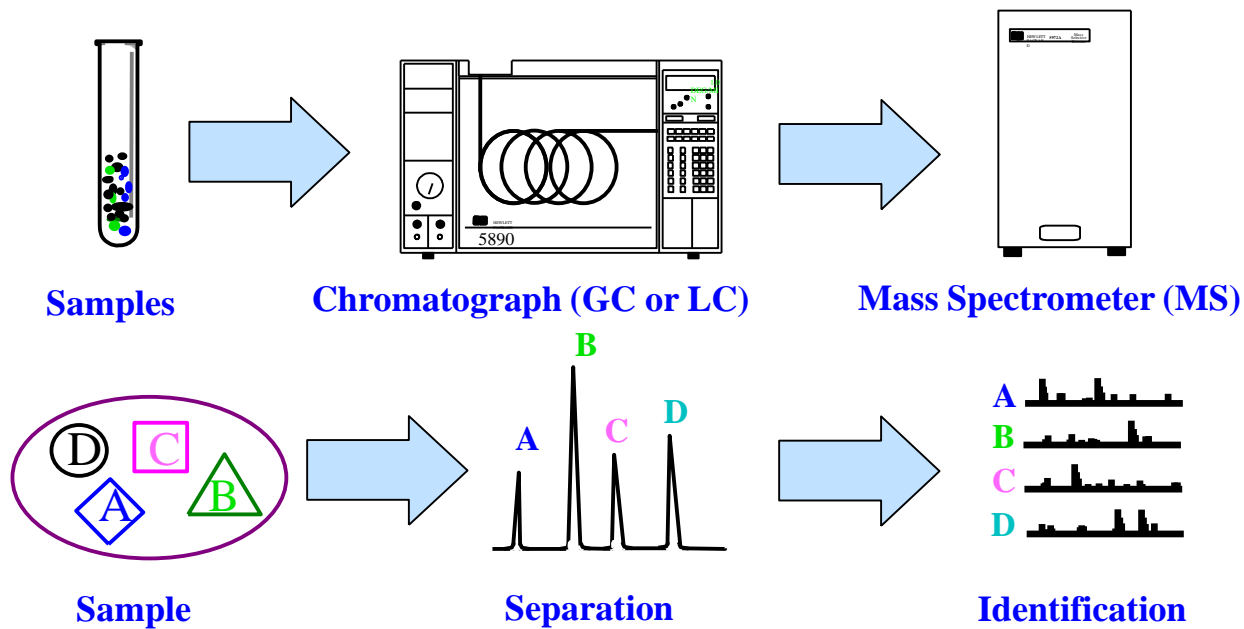


色-质谱联用仪

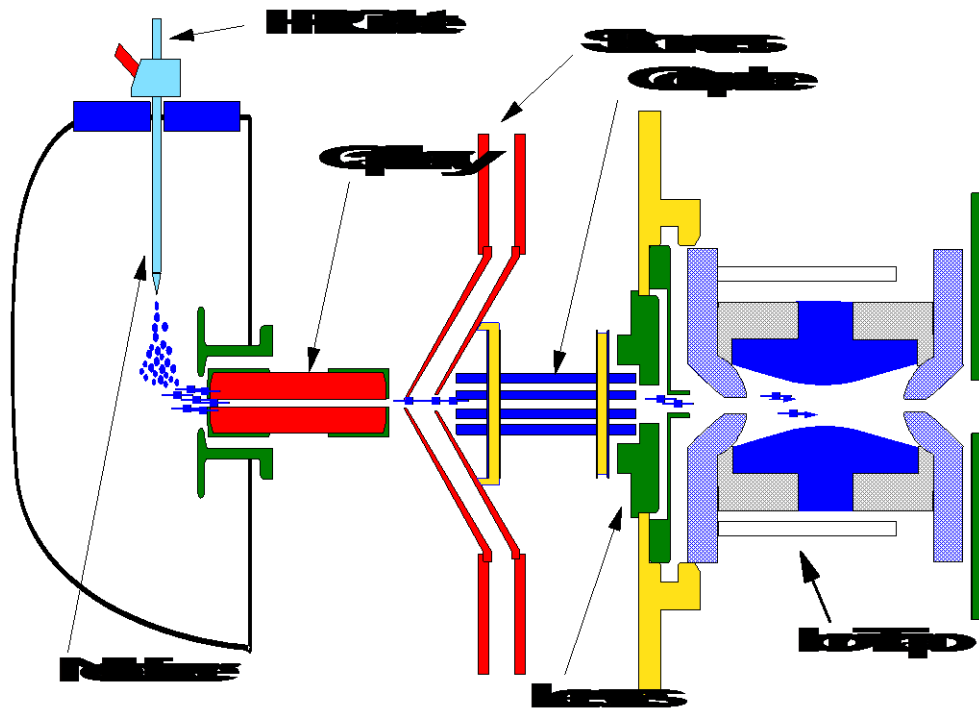
仪器内部结构



联用仪器 (GC/MS)



联用仪器



API - Ion Trap Interface (Esquire-LC)

1.4 质谱仪器厂商的前世今生

Thermo Electron Corp. 1956 George N.
Hatsopoulos
MAT, 1947, Ludolf Jenckel, Bremen

Finnigan, 1967, Robert E. Finnigan, Roger Sant, T.Z.Chu,
San Jose

1981, Finnigan MAT

1990, Thermo Finnigan



Waters Associate Ltd. 1958 Jim Waters

Vacuum Generator (VG), 1962, Bernard Eastwell,
Manchester

VG Micromass, 1969, Eastwell & R D Craig

1991, Acquired by Fisons Instruments

1996, Micromass Limited MBO

1997, Acquired by Waters

2002, Merger of Operation, Waters Micromass



Waters



VG OA-TOF hybrid
instrument (1995)

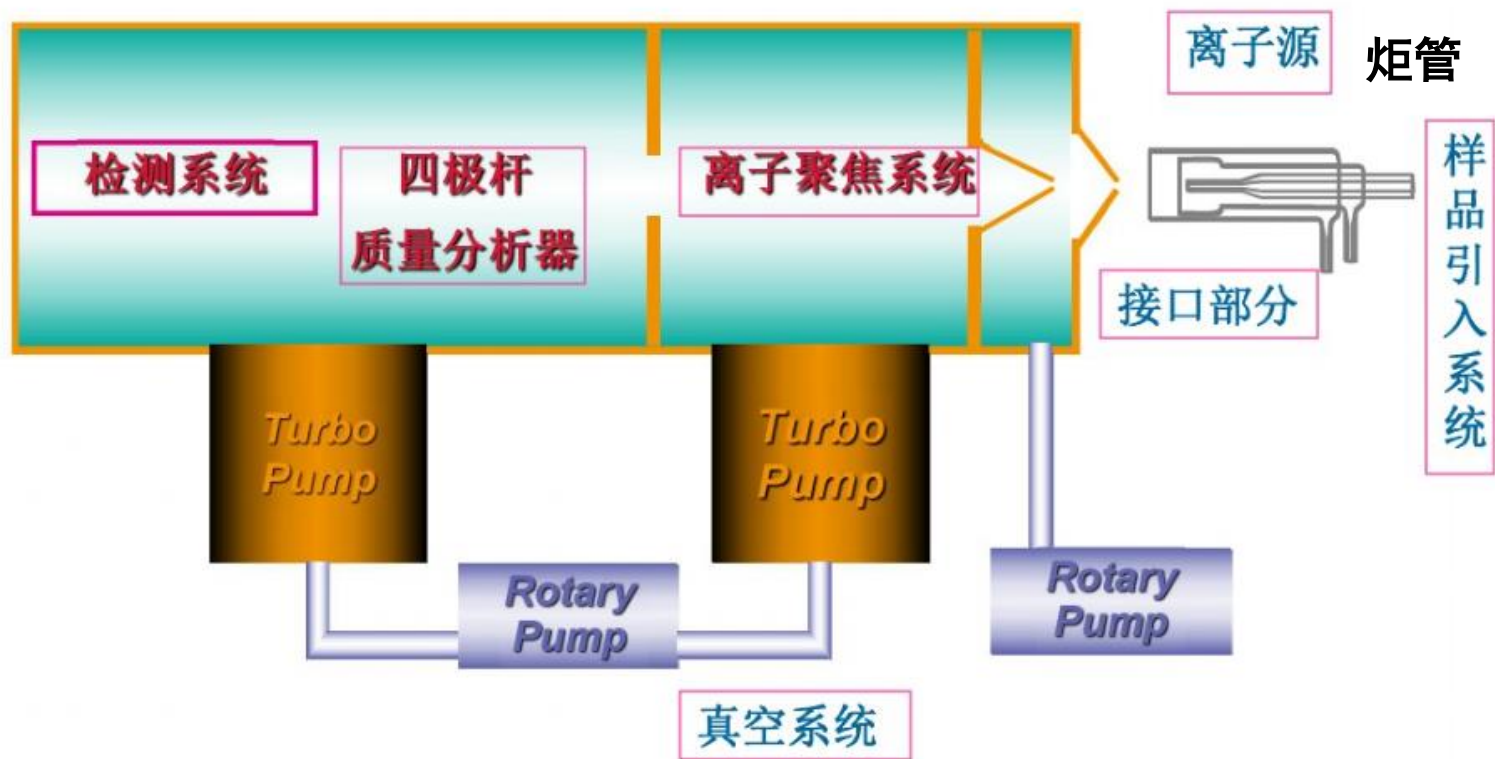
1.4 质谱仪器厂商的前世今生

质谱仪器厂商	组学、生物药优势领域
Thermo Fisher赛默飞	蛋白质组学及科研 (Orbitrap)
Waters沃特世	生物药 (Qtof)
Agilent, AB Sciex	定量 (三重四极杆质谱, Qtof)
Shimadzu岛津/Bruker布鲁克	MALDI-TOF, 质谱成像
Bruker布鲁克	FT-ICR傅里叶变换-离子回旋共振 (MRMS 核磁质谱)

2 质谱的应用

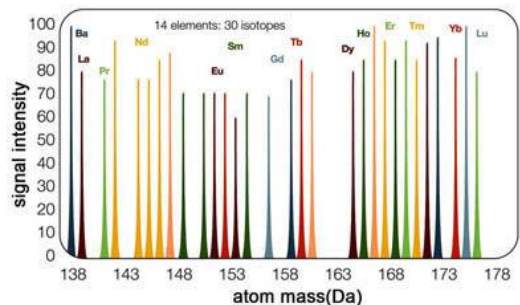
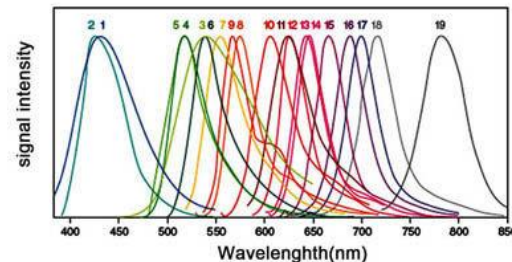
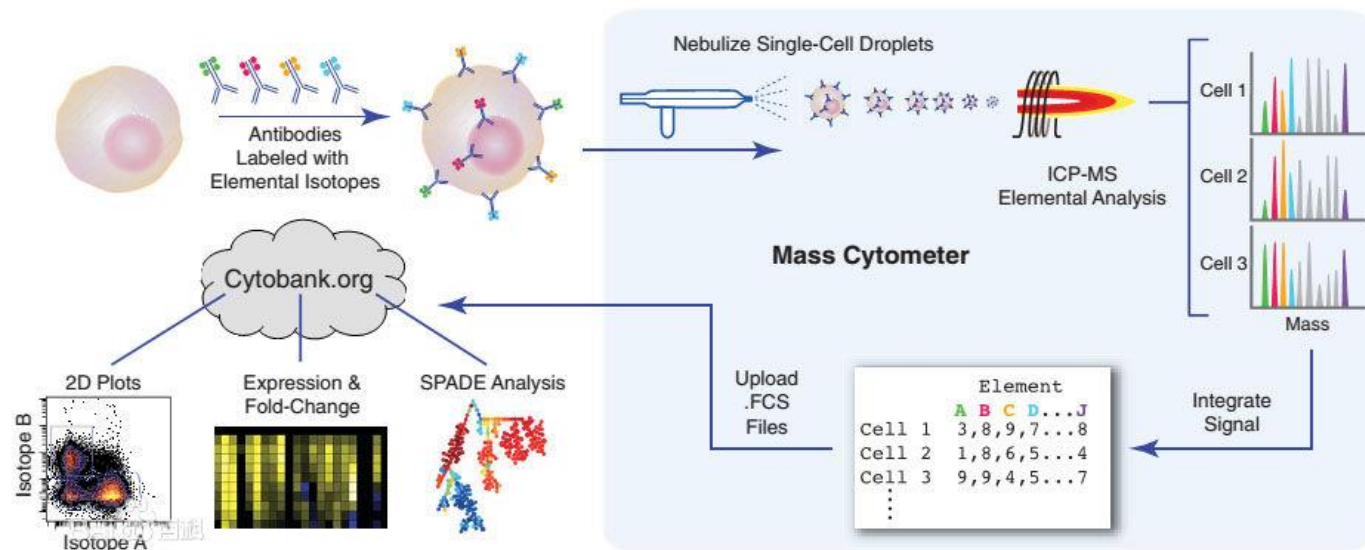
- (1) ICP-MS及其应用
- (2) MALDI 质谱的应用
- (3) 交联质谱及应用
- (4) 氢氘交换质谱及应用
- (5) 基于质谱的代谢组学
- (6) 基于质谱的蛋白质组学
- (7) 质谱在药物研究中的应用

2.1 电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）



电感耦合等离子体（ICP）作为离子源产生离子，氦等离子体（中心温度达7000K）

质谱流式细胞仪 (CyTOF2 Mass Cytometer)

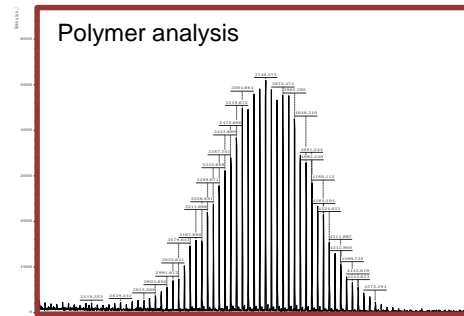
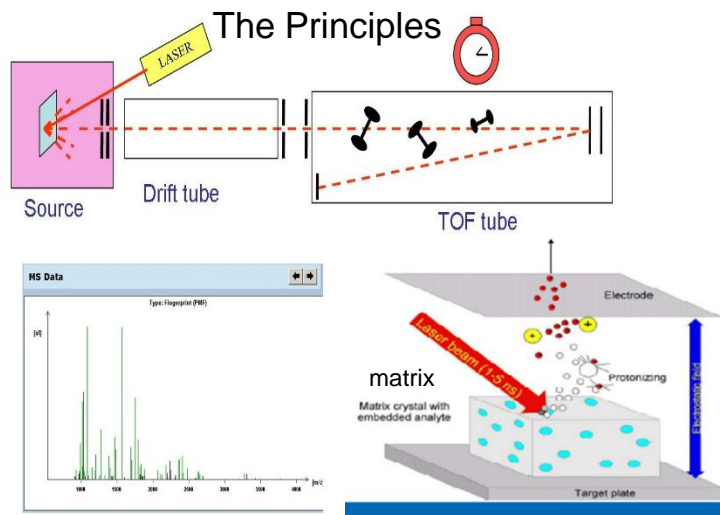


荧光基团发射光谱 (上) 与原子质量谱 (下) 的比较

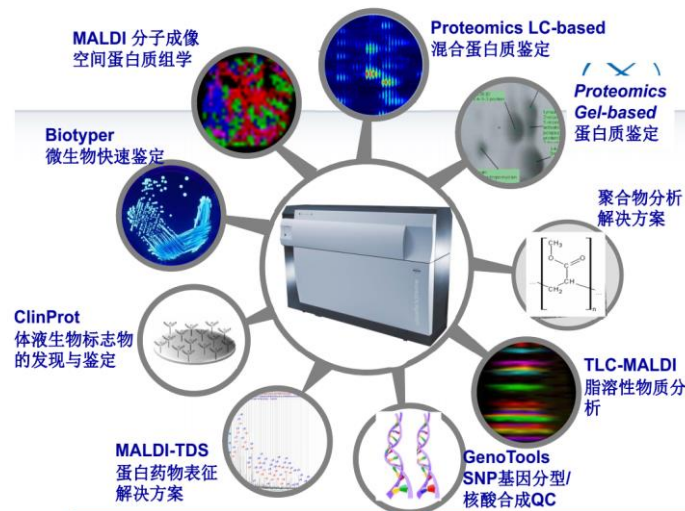
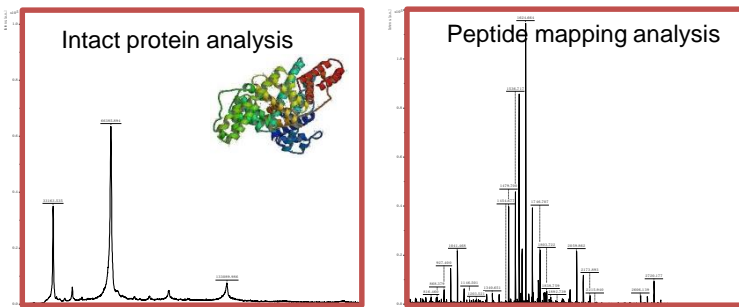
<https://baike.baidu.com/item/质谱流式细胞技术/10184633?fr=aladdin>

质谱流式细胞技术 (Mass Cytometry) 是利用质谱原理对单细胞进行多参数检测的流式技术。它继承了传统流式细胞仪的高速分析的特点, 又具有质谱检测的高分辨能力, 是流式细胞技术一个新的发展方向。

2.2 MALDI-TOF质谱的应用

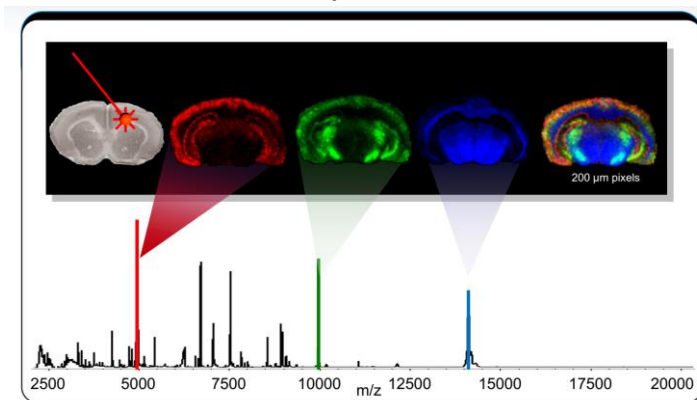


The Application

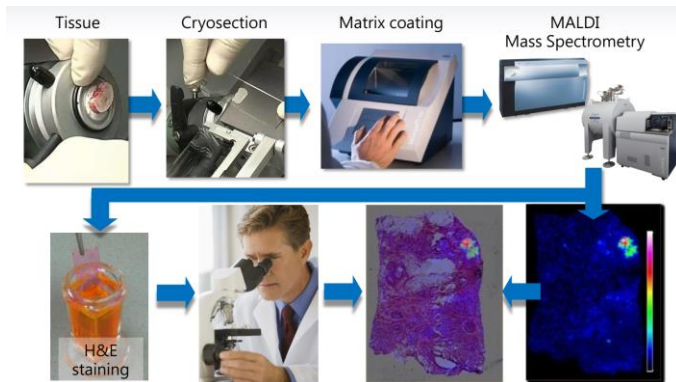


基于MALDI的质谱成像

The Principles



Imaging Workflow



Applicable Instruments

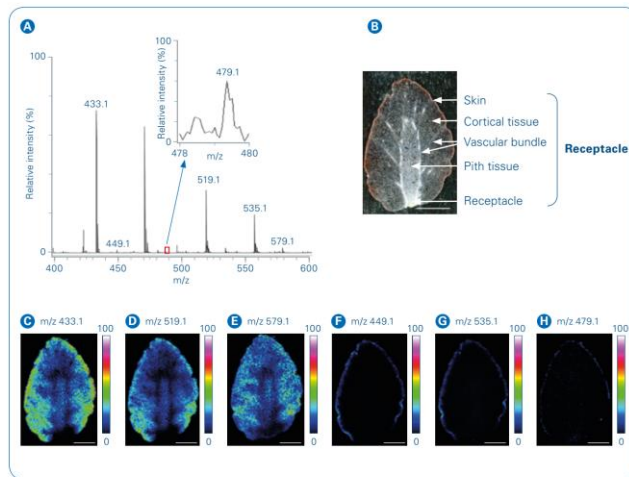


Figure 3: MALDI-MSI analysis of anthocyanins in strawberry sections. **A** Mass spectrum obtained from a section. **B** Optical image of a strawberry section. **C-H** Representative ion images of m/z 433.1, 519.1, 579.1, 449.1, 535.1, and 479.1. Scale bar = 5 mm.

2.3 交联质谱技术

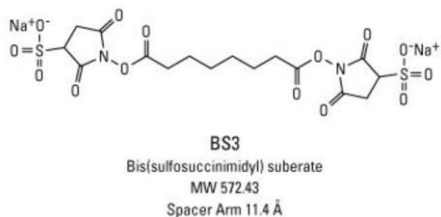
交联技术 (Cross-linking) 指在化合物间用交联试剂形成稳定共价键的技术。

CXMS (Cross-linking with Mass Spectrometry)

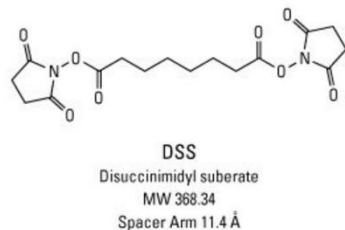
用交联剂交联有空间结构的蛋白，使空间结构上较近的氨基酸形成交联

利用质谱鉴定

得到鉴定的肽段对就意味着这两个肽段在空间距离上相互接近



二（磺基琥珀）辛二酸，
是一种氨基间交联剂，具
有同型双功能，可溶于水，
不可切割，且不能渗透膜



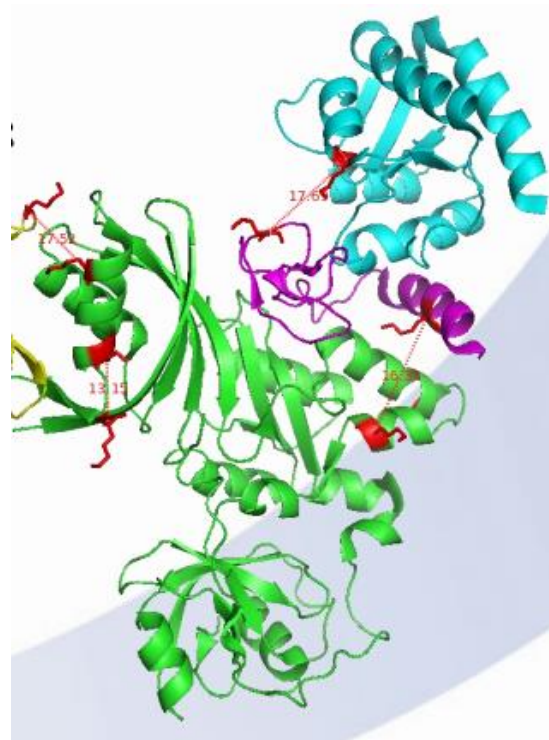
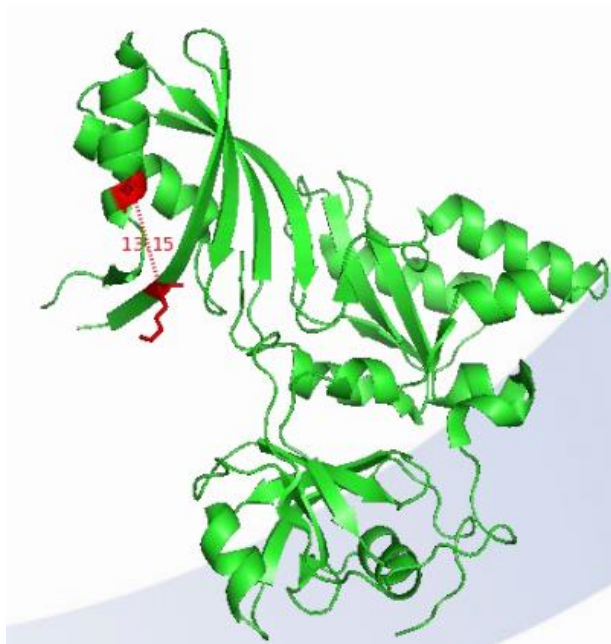
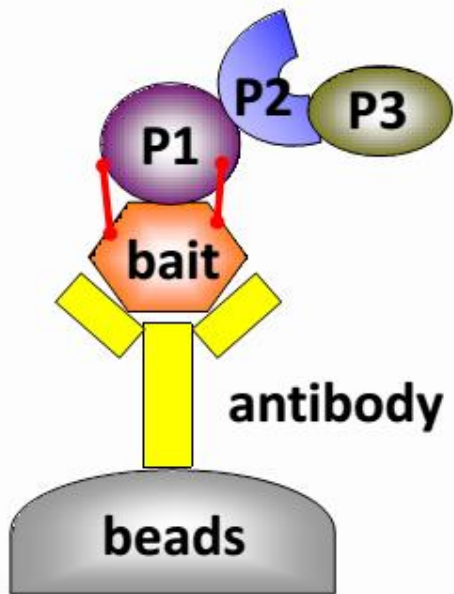
双琥珀酰亚胺辛二酸酯
可渗透细胞膜

交联质谱的应用

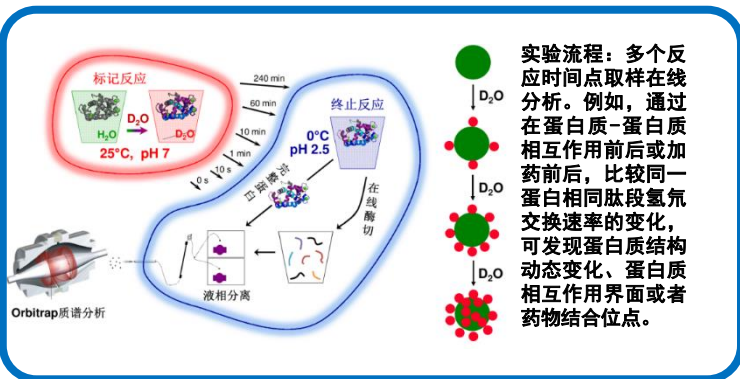
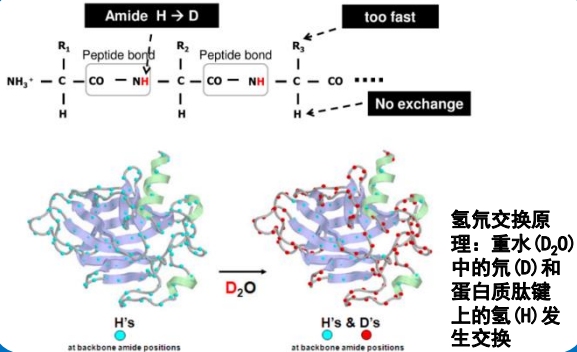
鉴定直接作用蛋白

研究蛋白内折叠

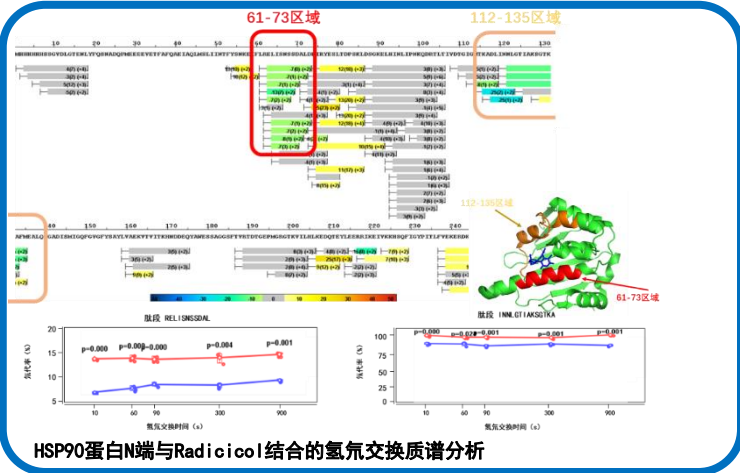
分析蛋白复合物间位置关系



2.4 氘氘交换质谱 (HDX-MS)



Leap公司的自动化氦气交换样品处理设备和数据分析软件 以及美国热电公司的Orbitrap Fusion质谱

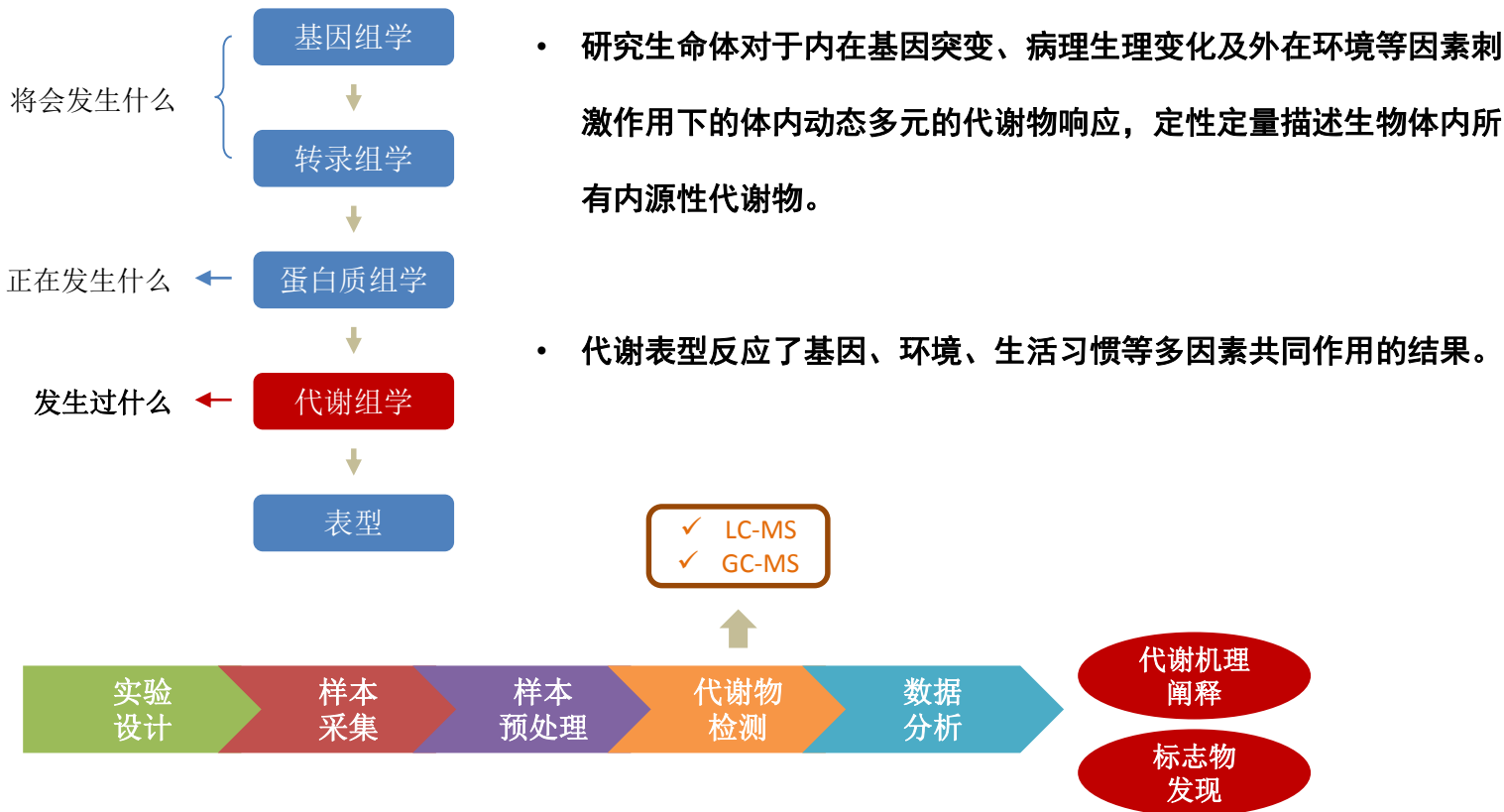


HSP90蛋白N端与Radicicol结合的氢氘交换质谱分析

氢氘交换质谱HDX-MS应用

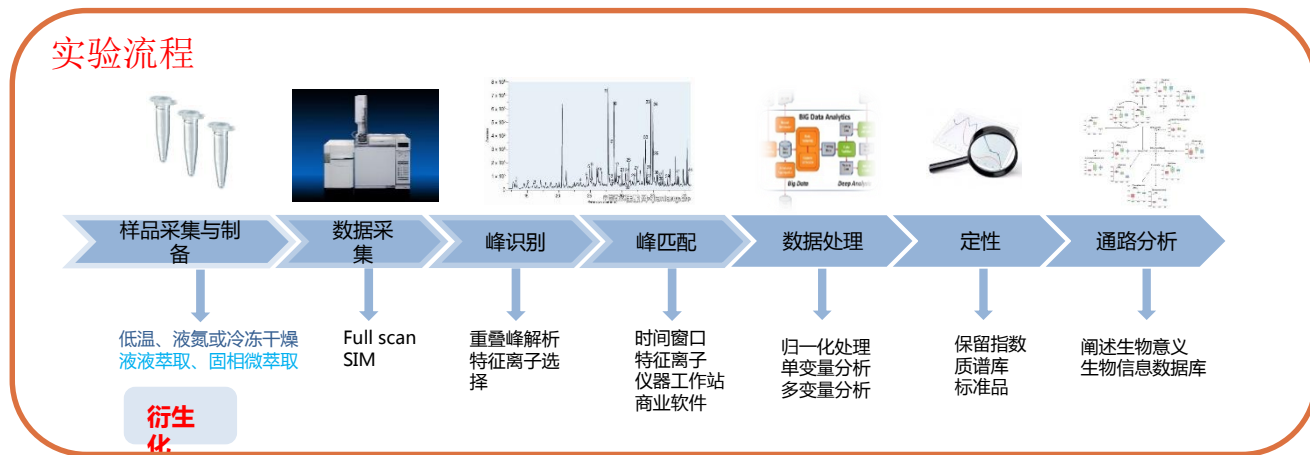
- (1) 小分子-蛋白质相互作用
- (2) 蛋白质-蛋白质相互作用
- (3) 抗原表位分析
- (4) 抗体药质量分析

2.5 基于质谱的代谢组学



GC-MS代谢组学技术

实验流程



优点

- 仪器稳定、重复性好
- 灵敏度、分离效率高
- 保留指数可辅助定性
- 丰富的质谱数据库
- 适合挥发性和半挥发性物质的分离检测
- 衍生化后可对含有活泼H的代谢物进行检测

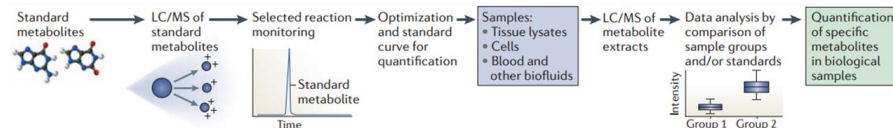
不足

- 质谱数据库信息不完全
- 预处理耗时（衍生化处理）
- 不适合分析高沸点、热不稳定、分子量较大的代谢物的分析

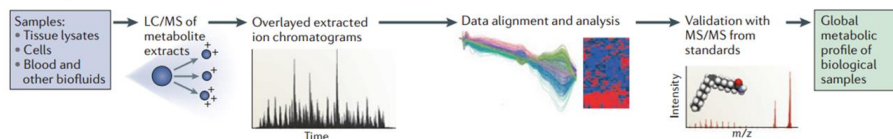
LC-MS代谢组学技术

➤ LC-MS 代谢组学流程

a Targeted metabolomics



b Untargeted metabolomics



➤ LC-MS 代谢组学常用分析方法

液相色谱

- 反相色谱 (RPLC)
 - ✓ 普适性好、用途广、稳定
 - ✗ 亲水性强的代谢物保留差
- 亲水反应色谱 (HILIC)
 - ✓ 增加极性化合物的液相保留

+

高分辨质谱

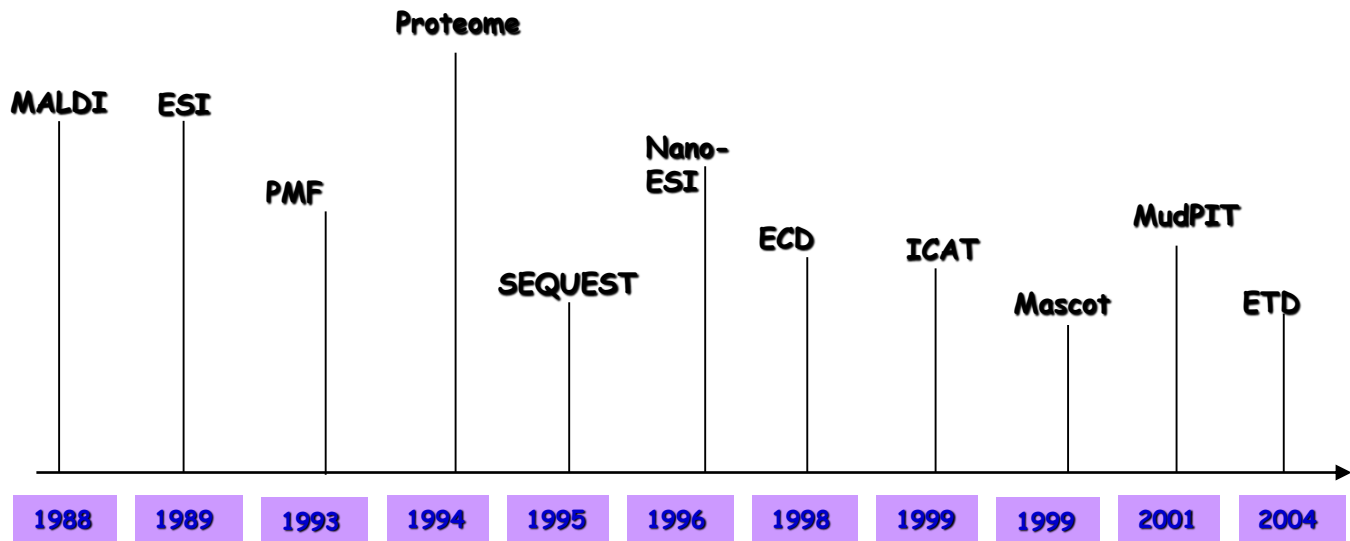


➤ LC-MS 代谢组学平台特点

- ✓ 高分辨、高灵敏、动态范围广
- ✓ 方法选择性大、预处理相对简单
- ✓ 代谢物覆盖面广

- ✗ 不适用于沸点高、热稳定性差代谢物
- ✗ 不适用于非极性化合物

2.6 基于质谱的蛋白质组学



Koichi Tanaka



John Bennet Fenn



Matthias Mann



John Yates



Ruedi Abersold

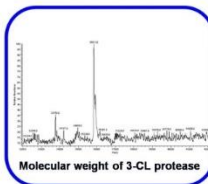
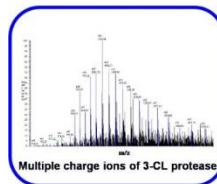
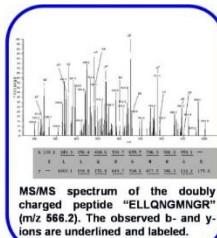
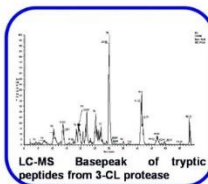
2002 Chemistry

篮球场上的搭档



MAT95

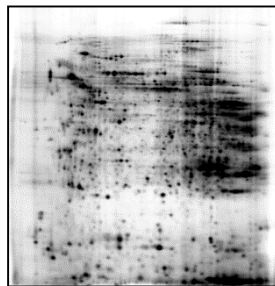
2003年, 质谱组与蒋华良、沈旭课题组合作, 开展了采用质谱进行冠状病毒3C样蛋白水解酶 (Protease of SARS Coronavirus) 的结构鉴定。 *Protein Expr Purif.* 2003 Dec;32(2):302-8.



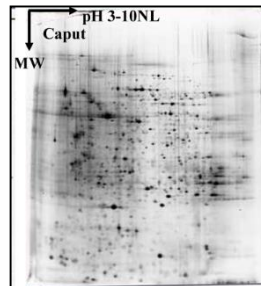
Sequence coverage of 3-CL protease (identified peptides are shown in boldface and underlined)



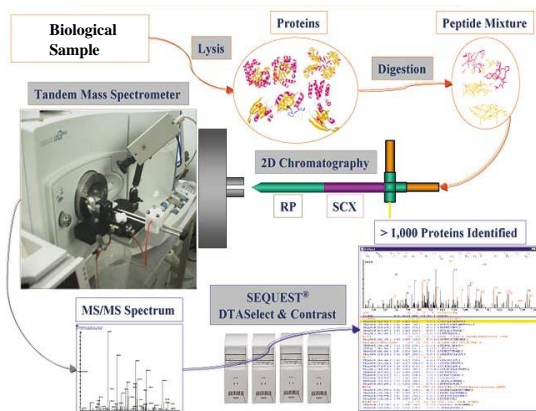
从双向凝胶电泳到MudPIT



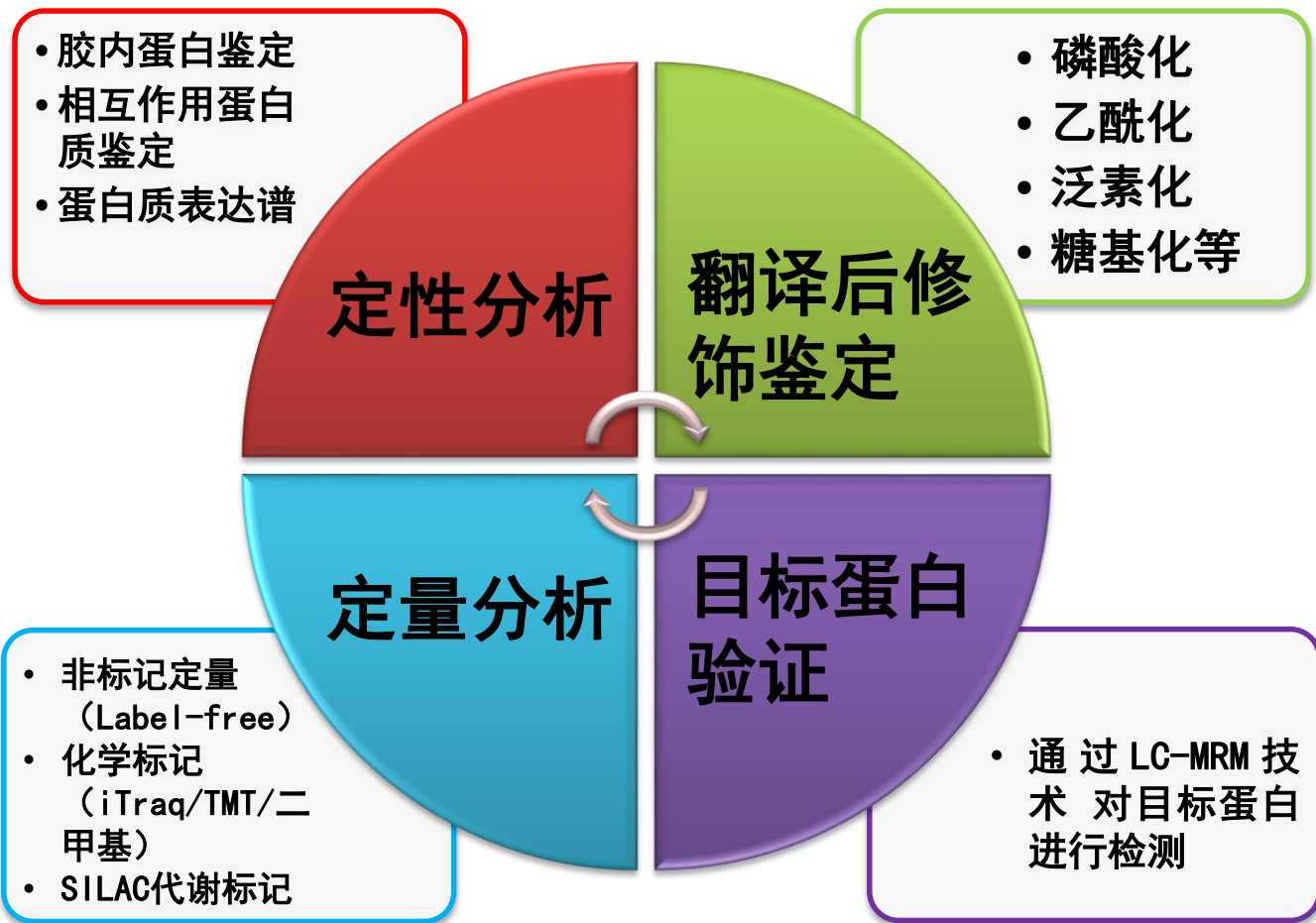
Total Liver 1147
Spots



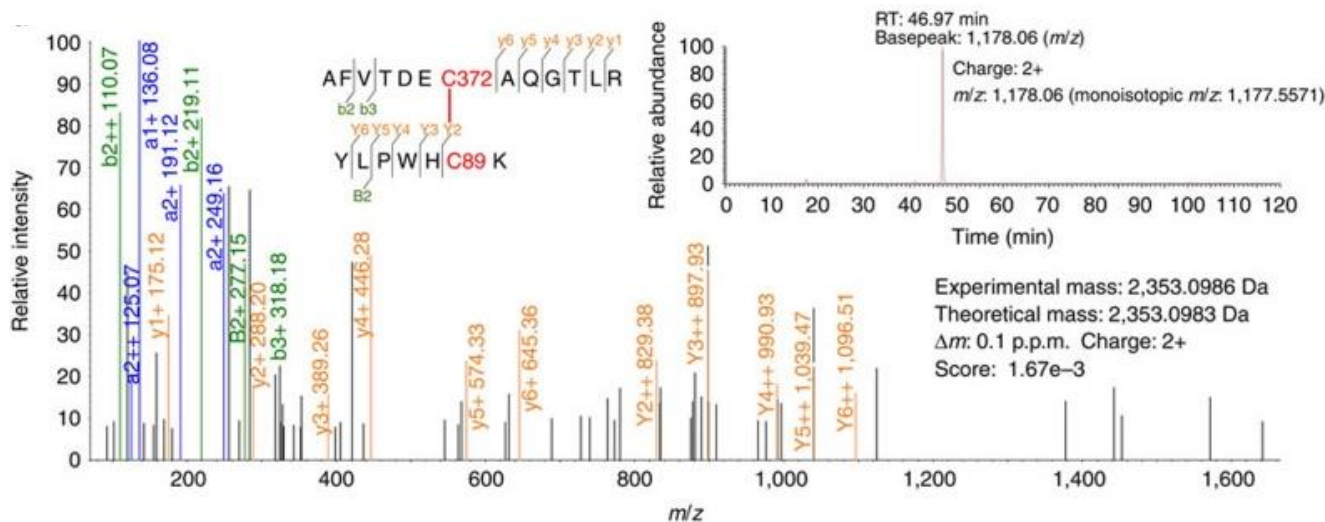
Rat Epididymis >1000 Spots



蛋白质组学的应用范围



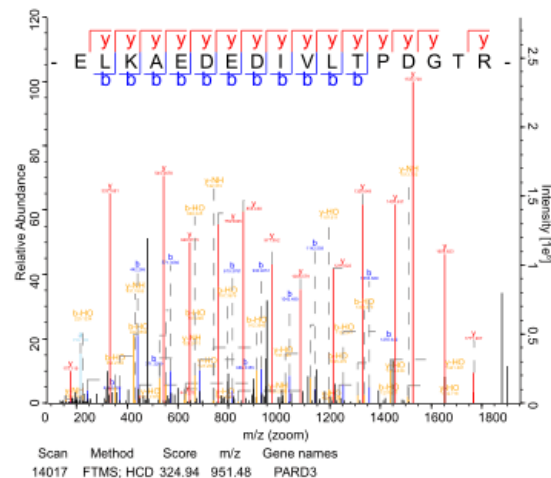
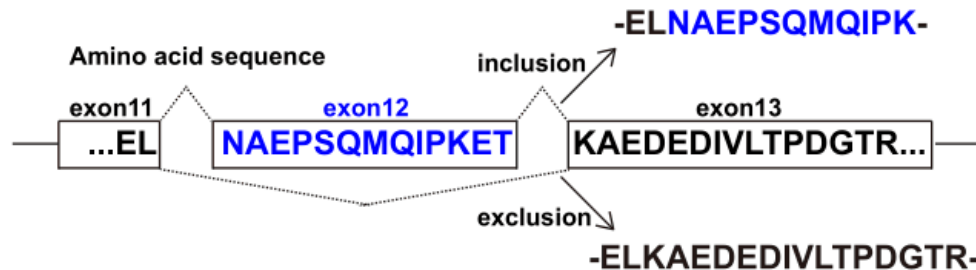
用于蛋白质结构分析的质谱技术开发



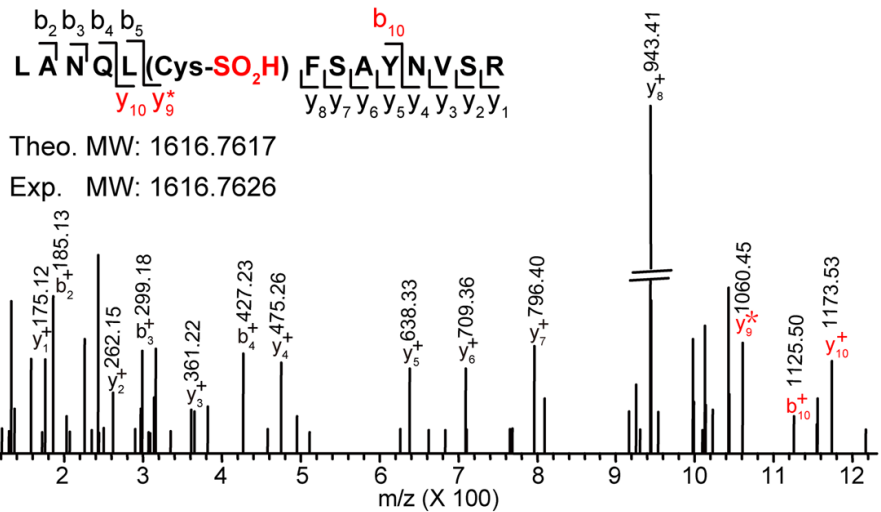
Conformational states of the full-length glucagon receptor.
Jiang H *et al. Nat Commun.* 2015 Jul 31;6:7859.

- **二硫键解析**
- **交联质谱方法学研究**
- **氢氘交换质谱方法学研究**

PAR3



半胱氨酸的氧化和谷胱甘肽化修饰鉴定



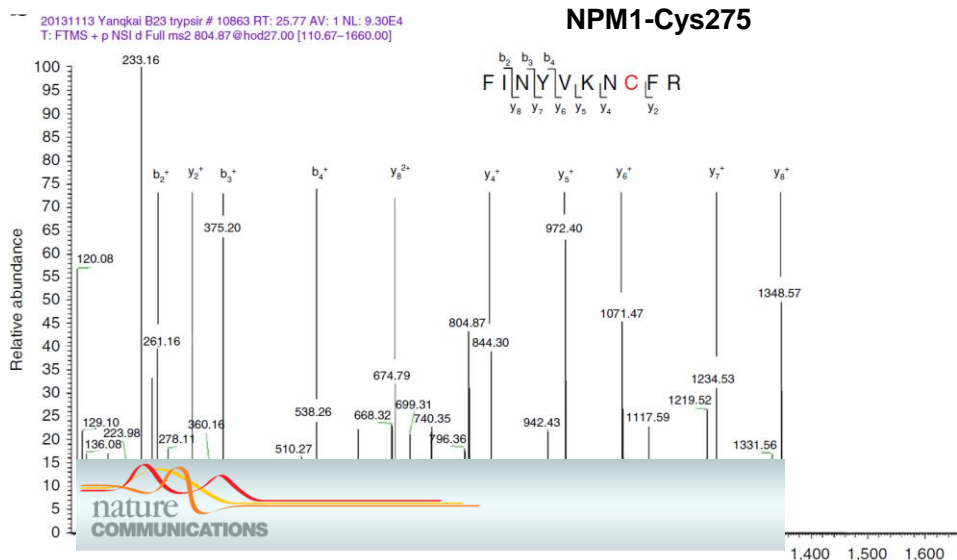
J | A | C | S
JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY

Article
pubs.acs.org/JACS

Structural Insights into the Redox-Sensing Mechanism of MarR-Type Regulator AbfR

Guijie Liu,^{†,‡,§} Xing Liu,^{†,||,§} Hongjiao Xu,^{†,‡} Xichun Liu,[⊥] Hu Zhou,^{||} Zhen Huang,[#] Jianhua Gan,[▽]
Hao Chen,[⊥] Lefu Lan,[†] and Cai-Guang Yang^{*,†}

杨财广组



ARTICLE

Received 12 Jan 2016 | Accepted 18 Oct 2016 | Published 25 Nov 2016

DOI: 10.1038/ncomms13599 OPEN

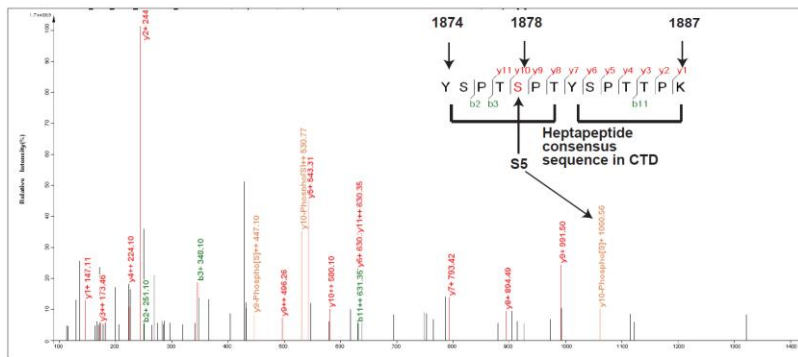
A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin

Kai Yang¹, Ming Wang¹, Yuzheng Zhao², Xuxu Sun¹, Yi Yang², Xie Li², Aiwu Zhou³, Huilin Chu¹, Hu Zhou⁴, Jianrong Xu⁵, Mian Wu⁶, Jie Yang¹ & Jing Yi¹

上交大易静组

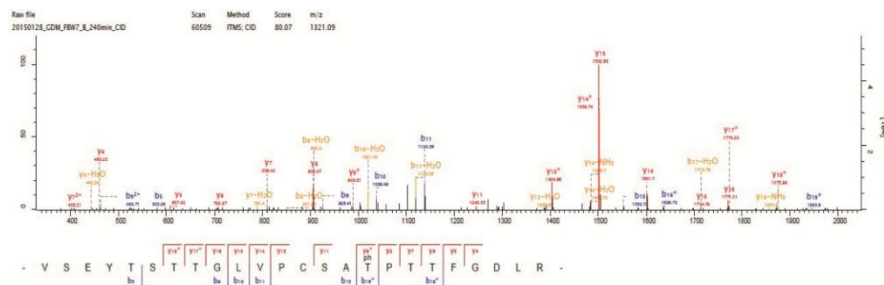
蛋白质磷酸化鉴定：由“地毯式轰炸”转向“精确制导”

Rpb1 pS 1878



Miao Z et al. Molecular Cancer Therapeutics, 2016 accepted

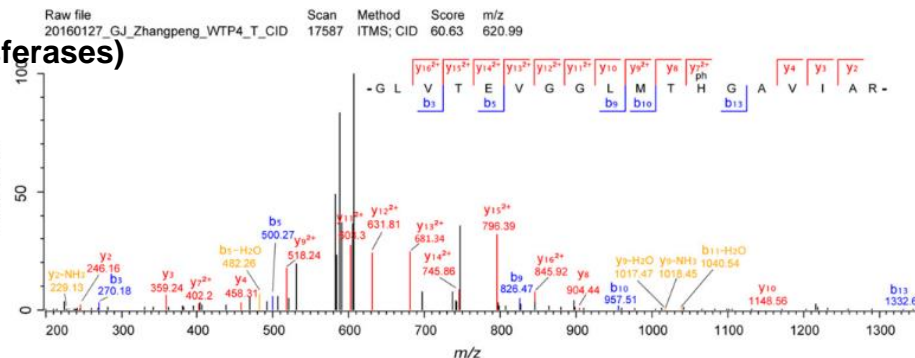
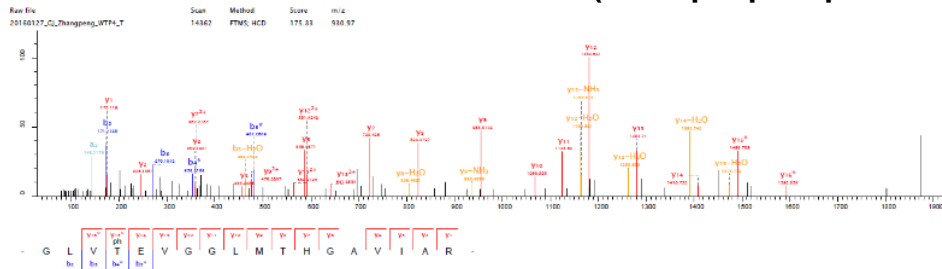
FBW7 pT205



ERK kinase phosphorylates and destabilizes the tumor suppressor FBW7 in pancreatic cancer. Gao D, Yu X et al Cell Res. 2015 May;25(5):561-73.

pT817

LmRPH pHis825 (Rifampin phosphotransferases)



Structural basis of rifampin inactivation by rifampin phosphotransferase. Zhang P et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Mar 21

蛋白质组用于生物标志物发现

Analytes	Discovery	Approved by FDA	Commercialised	Timing (years)
PSA(前列腺特异抗原)	1979	1985	1996	17
Troponin(肌钙蛋白)	1960	1995	1995	35
BNP(脑尿钠肽)	1969	2000	2003	34
D-dimer(D-二聚体)	1975	1989	1995	20
S100b	1967	-	1997	>40
GFAP(神经胶质纤维酸性蛋白)	1977	-		>35

▲ 几种经典标志物从发现到被审批的时间跨度

OVA1 成功通过FDA绿色通道快速审批成为第一个蛋白质组学的IVDMIA，用于配合成像手段判断卵巢癌病灶的恶性程度，开创了蛋白质组从研究向临床的第一步。

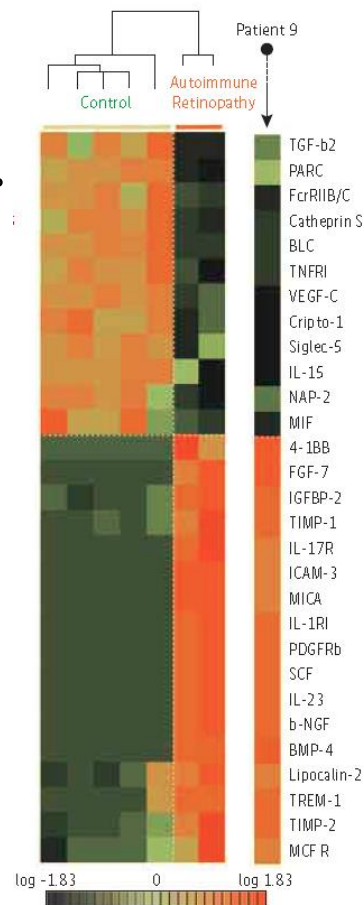
个体蛋白质组学用于精准医疗

美国爱荷华大学的研究人员在精准医学实践方面取得重要进展，他们应用个体化蛋白组学为一位患有眼部疾病的病人成功制定了精准治疗策略。相关研究结果发表在国际学术期刊JAMA Ophthalmology上。

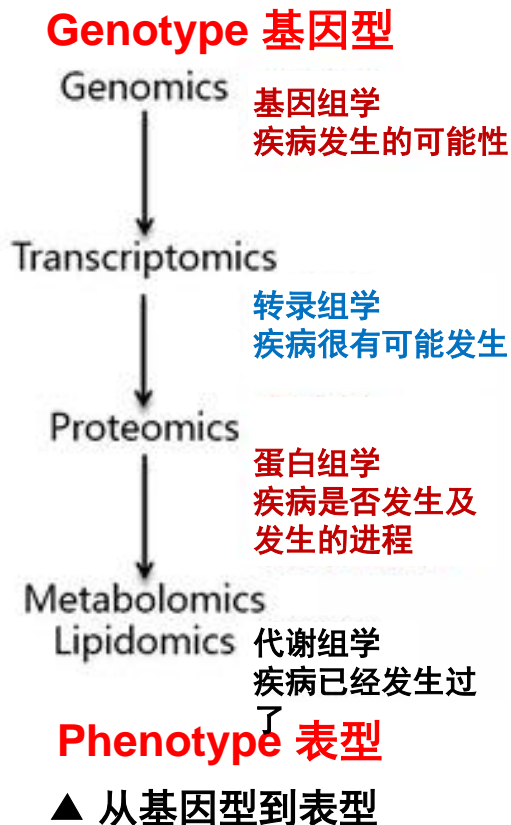
葡萄膜炎的眼部疾病，可能导致病人失明，而引起这种疾病的原因比较多，这也使得疾病的诊断和治疗更加困难。该病人的一只眼睛由于视网膜反复发生炎症以及肿胀形成疤痕组织而丧失视力，但病因仍不明确。研究人员表示，目前仍然没有治疗该疾病的精准药物。

通过对病人眼部液体的蛋白表达谱进行分析，结果发现该病人的蛋白表达谱与另外两名已知患有自身免疫紊乱，产生抗体攻击视网膜的病人非常相似。

随后医生对病人进行了手术，将一种能够持续释放类固醇入眼的装置移植到了病人体内，病人的视力得到改善，同时也没有出现复发。



基于组学技术的精准医学计划



▲ 奥巴马提出“精准医学计划”

目前，单纯的基因组学手段不能够完全满足精准医学的需求，因此需要更加注重生物功能执行者——**蛋白质**——多组学联用的手段势在必行！

临床肿瘤蛋白质组学分析联盟 (CPTAC)



National Cancer Institute
at the National Institutes of Health

◆ 第一阶段2006–2010年，NCI成立CPTAC，建立肿瘤蛋白质组学研究的技术标准。

◆ 第二阶段2011年至2016年，用第一阶段建立的标准蛋白质组学技术，集成蛋白质组学和基因组学对临床肿瘤样本进行大规模分析。

Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium

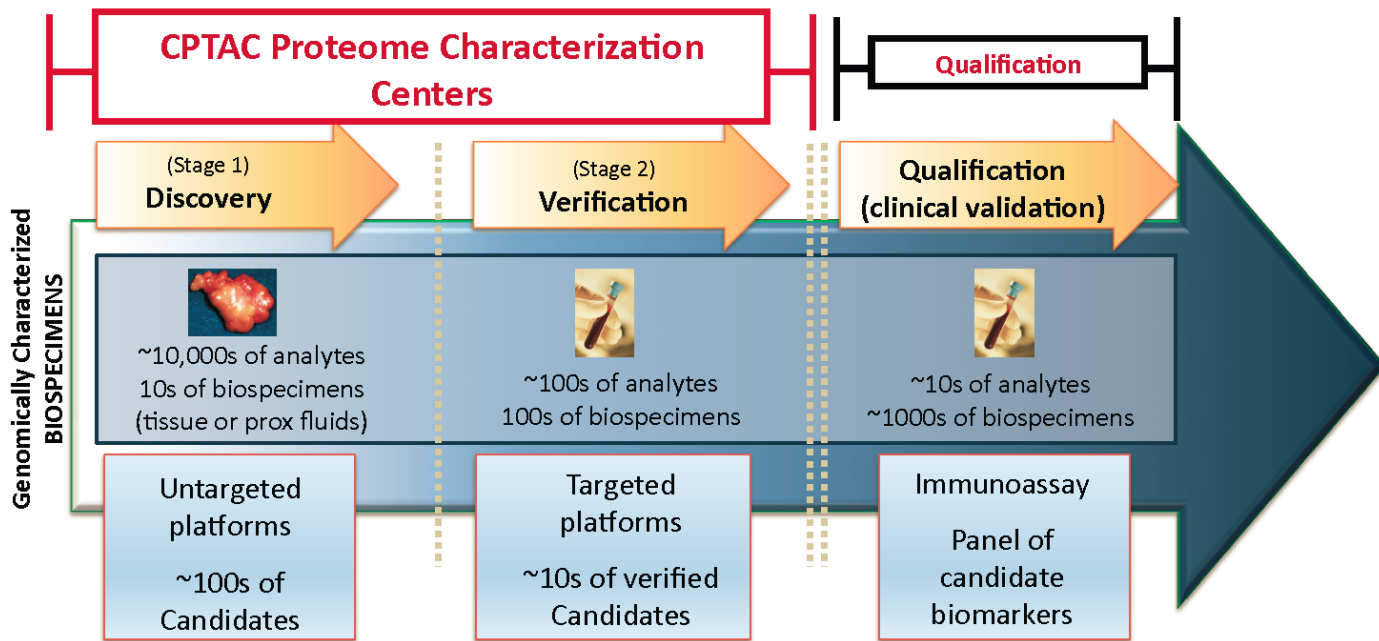


➤ CPTAC已经在美国和全世界建立或合作建立了很多蛋白质组表征中心（PCC），其中也包括韩国科技研究中心。

➤ 2016年，NCI提出用1300万美元在美国建立10个蛋白质组表征中心（PCC）。

➤ CPTAC已经完成结直肠癌，卵巢癌和乳腺癌的肿瘤蛋白基因组学研究。

CPTAC的分析流程



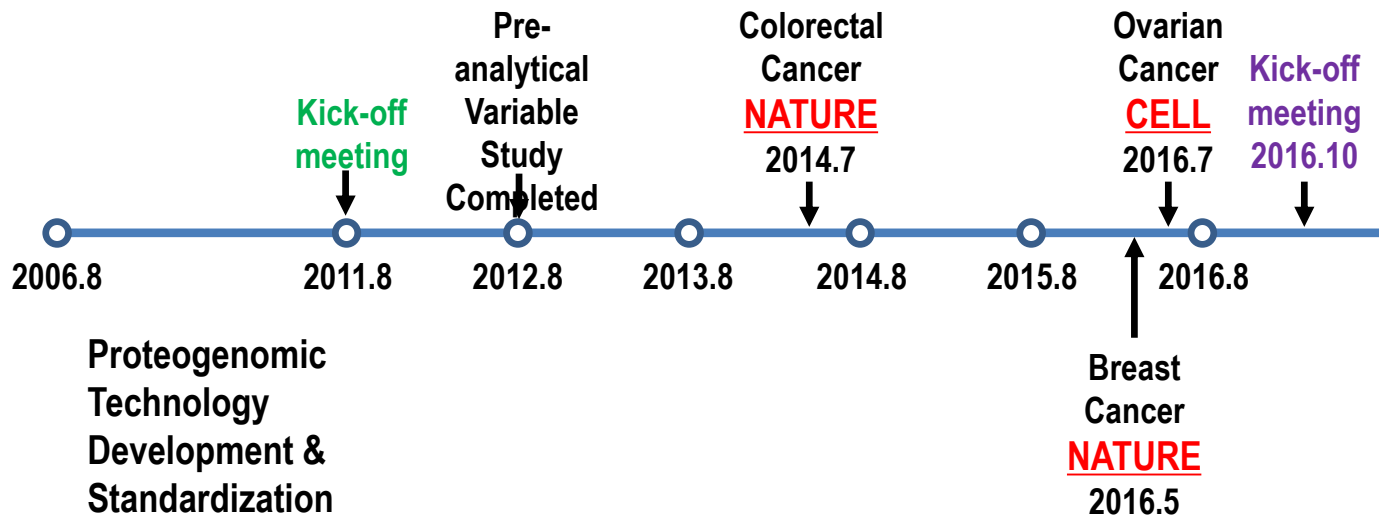
CPTAC的发展历程

CPTAC启动

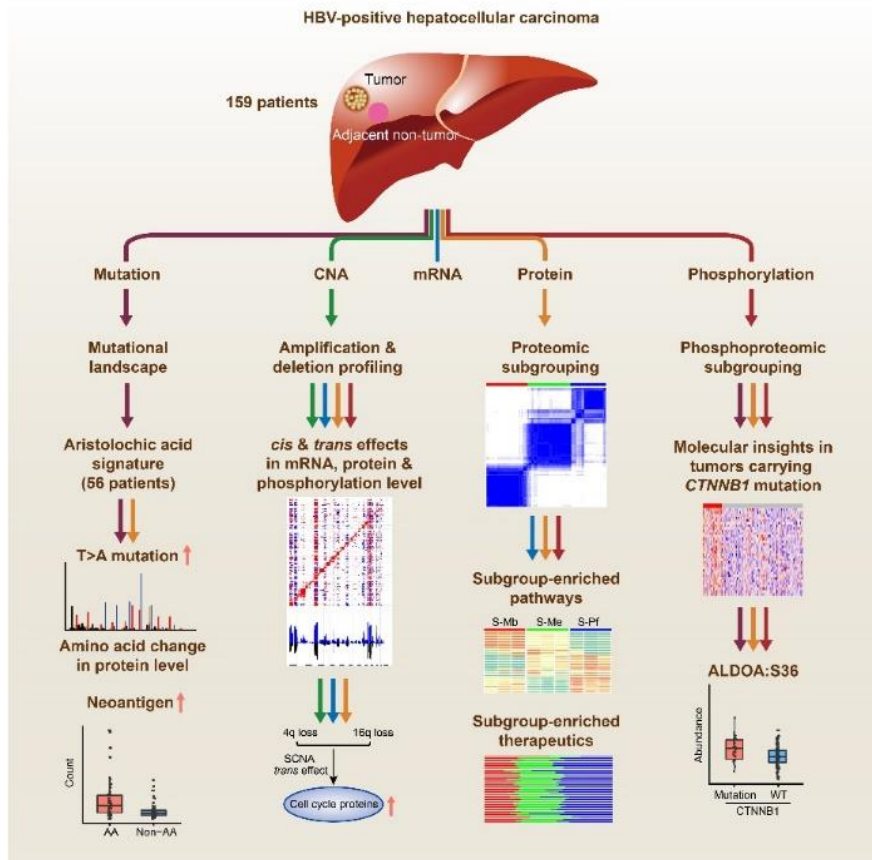
CPTAC 1.0

CPTAC 2.0

CPTAC 3.0



乙肝病毒相关肝细胞癌的蛋白基因组学研究



Cell. 2019 Oct 3;179(2):561-577.e22

- 蛋白质组分子分型与预后相关
- 发现乙肝相关肝细胞癌的代谢重编程现象
- *CTNNB1*突变相关的ALDOA磷酸化可促进肝癌细胞生长

CANCER · 03 OCTOBER 2019

Liver tumours' odd metabolisms might be their weak spot

People with a certain type of liver cancer die sooner if they have higher levels of some metabolic proteins.

—“肝脏肿瘤的异常代谢可能是它们的弱点”

The way to beat liver tumours caused by a common virus might be to target their peculiar metabolisms, according to a detailed analysis of the genes and proteins in such tumours.

Nature专文评论

<https://www.nature.com/articles/d41586-019-02970-1>

蛋白质组学质谱原始数据上传网站

iProX integrated proteome resources GSLLVFAALYVOGERGFYTPKA

English | Sign In | Register

Home My Space Browse Search Submit Analysis Help

Integrated Proteome Resources

iProX is an integrated proteome resources center in China, which is built to accelerate the worldwide data sharing in proteomics. iProX is composed of a data submission system and a proteome database. The submission system is established under the guidance of the data-sharing policy made by ProteomeXchange consortium. Registered users can submit their proteomic datasets to iProX in public or private modes. Once an associated manuscript has been published, a dataset becomes automatically public. It is recommended to use the latest version of [Firefox](#) or [Chrome](#) browser. Please refer to the simple user [manual](#) for the new iProX.

As an official member of ProteomeXchange Consortium, iProX will assign ProteomeXchange identifiers (PXD) to datasets submitted to iProX.

When using iProX, please cite the following reference:
Ma J, Chen T, Wu S, Yang C, Bai M, Shu K, Li K, Zhang G, Jin Z, He F, Hermjakob H, Zhu Y. (2019) iProX: an integrated proteome resource. *Nucleic Acids Res*, 47, D1211-D1217. Please refer to [iProX data license](#) and [CNHPP data license \(in Chinese\)](#).

iProX Basic Statistics

The iProX database currently contains:
676 Projects (336 Public Projects)
1768 Subprojects (751 Public SubProjects)
129008 Datafiles (27651 Public Datafiles)

The iProX datafiles currently contains:
last week: 132 Datafiles (108.89G)
last month: 399 Datafiles (333.23G)
last year: 12930 Datafiles (9122.86G)

Submit Data to iProX

iProX employs a web-based process of filling experimental information and uploading data files. iProX encourages and welcomes users to submit their proteome experiment raw data and processed data, as well as generated and searched identifications which have been published in peer-reviewed publications.

<https://www.iprox.org/>

EMBL-EBI **PRIDE** Archive

Services Research Training About us

Home Submit data Browse data Help Publications About PRIDE Archive

PRIDE > Archive

PRIDE Archive - proteomics data repository

The PRIDE Proteomics IDentifications (PRIDE) database is a centralized, standards compliant, public data repository for proteomics data, including protein and peptide identifications, post-translational modifications and supporting spectral evidence. PRIDE is a core member in the ProteomeXchange (PX) consortium, which provides a single point for submitting mass spectrometry based proteomics data to public-domain repositories. Datasets are submitted to PRIDE via ProteomeXchange and are handled by expert biocurators.

New Pride Web

A new PRIDE web will be released by December 2018, you can check: [Beta Version](#)

Datasets

- 14315 projects
- 97146 assays

News

- Just out @nature "CDK phosphorylation of TRF2 controls t-loop dynamics during the cell cycle" ... [link](#)
- Just out @nature "Marine Proteobacteria metabolize glycolate via the β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase" ... [link](#)

Welcome
ProteomeXchange Submission Tool (version 2.2.3)

Choose submission option below

Complete Submission
Partial Submission

[Resubmission](#) [Sub-submission](#) [Submission guidelines](#) [More about ProteomeXchange](#)

<https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/>

EMBL-EBI **PRIDE** Archive

Services Research Training About us

Home Submit data Browse data Help Publications About PRIDE Archive

PRIDE > Archive > PXD011134

Project PXD011134

Summary

Title
TGF- β 1/p65/MAT2A: a novel pathway involved in the regulation of intracellular SAM and liver fibrogenesis - Part1

Description
Hepatic stellate cell (HSC) activation induced by transforming growth factor β (TGF- β 1) plays a pivotal role in the fibrogenesis. The complex downstream mediators of TGF- β 1 are largely unknown. Here, proteomics analysis and biological validation demonstrated that methionine adenosyltransferase 2A (MAT2A) was significantly upregulated in a CCl₄-induced fibrosis mice model and a small molecule NPLC0393, known to block TGF- β 1/Smad3 signaling, inhibited its upregulation. In HSC cells, TGF- β 1 induced elevation of MAT2A and MAT2B expression as well as reduction of S-adenosylmethionine (SAM) content, which further promoted HSC activation. Functionally, in vivo and in vitro knockdown of MAT2A alleviated CCl₄- and TGF- β 1-induced HSC activation, whereas in vivo overexpression of MAT2A facilitated hepatic fibrosis and abolished therapeutic effect of NPLC0393. TGF- β 1 induced p65 phosphorylation and NF- κ B activation, thereby promoted the transcription of MAT2A and its protein expression. In addition, overexpression of p65 abrogated NPLC0393 mediated inhibition of HSC activation. This study identified a novel pathway TGF- β 1/p65/MAT2A that was involved in the regulation of intracellular SAM contents and liver fibrogenesis, suggesting that this pathway is a potential therapeutic target for hepatic fibrosis.

Sample Processing Protocol
Mouse liver tissues were washed with ice-cold PBS and lysed in SDT lysis buffer (4% SDS (w/v), 100 mM DTT, 100 mM Tris, pH 7.6). The lysates were homogenized with sonication, denatured and reduced at 95°C for 5 min and then

Species
Mus musculus (Mouse)

Tissue
Liver

Instrument
Q Exactive

Software
Not available

Modification
Iodoacetamide derivatized residue

Quantification
Not available

Experiment Type
Shotgun proteomics

[Download Project Files](#)

生物质谱和蛋白质组学技术的发展趋势

质谱技术:

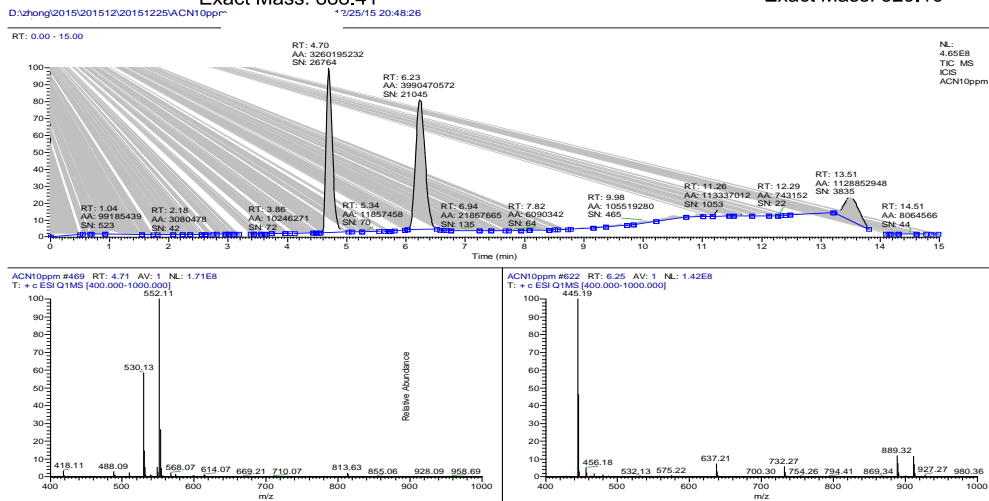
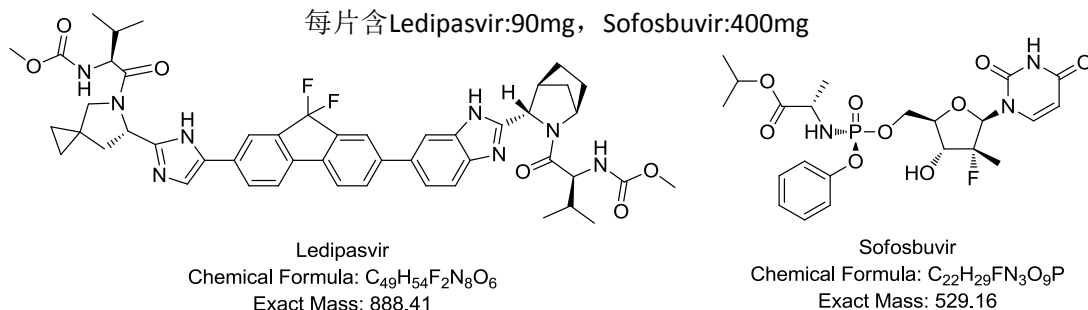
扫描速度 (40~100 Hz), 灵敏度 (离子漏斗 Ion Funnel), 分辨率 (≥ 100 万), 数据采集处理算法等

蛋白质组学:

灵敏度 (单细胞蛋白质组)、蛋白质翻译后修饰、鉴定定量数目、定量准确性重复性、组学数据处理分析 (瓶颈)

2.7 质谱在药物研究中的应用

化学药的成分明确，分析方法相对比较好建立



色谱图中主要有两个峰。下图左边是4.7分钟色谱峰的质谱图，主要离子质荷为530.1，552.1，对应的应该是索非布韦（sofosbuvir）的加氢峰和加钠峰。下图右为6.25分钟色谱峰的质谱图，主要离子质荷比为445.2，445.7，对应的应为来地帕韦（Ledipasvia）的双电荷离子峰 $(M+2H)^{2+}$ ，889和911为Ledipasvia的加氢峰和加钠峰。

利拉鲁肽在PMDA的申报文件

[Brand name] Victoza Subcutaneous Injection 18 mg (changed from Victoza Injection 18 mg)

[Non-proprietary name] Liraglutide (Genetical Recombination)

[Applicant] Novo Nordisk Pharma Ltd.

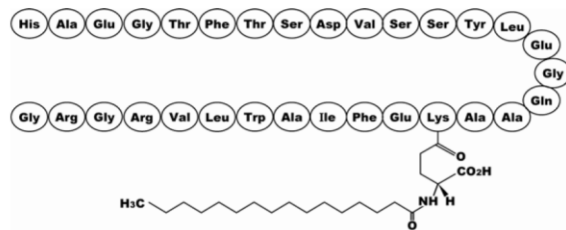
[Date of application] July 14, 2008

[Dosage form/Strength]

A solution for injection in a pre-filled pen. Each pre-filled pen (3 mL) contains 18.0 mg Liraglutide (Genetical Recombination).

[Application classification] Prescription drug (1) Drug with a new active ingredient

[Chemical structure]



Molecular formula: C₁₇₂H₂₆₅N₄₃O₅₁

Molecular weight: 3751.20

Chemical name:

Modified polypeptide of 31 amino acid residues with a covalent linkage at the γ -position of *N*-palmitoylglutamic acid to the ϵ -amino group of Lys. The polypeptide is produced in a recombinant cell by expression of DNA encoding amino acid residues at position 7-37 of human glucagon-like peptide-1 with substitution of Arg for Lys at position 34

利拉鲁肽是一种人胰高糖素样肽-1（GLP-1）类似物，用于治疗糖尿病。

利拉鲁肽在PMDA的申报文件

pH is adjusted, [REDACTED] buffer and [REDACTED] are added, and [REDACTED] are isolated (Step 7, [REDACTED]). After [REDACTED] from Step 7 are dissolved in a buffer containing [REDACTED], impurities are eluted (elution 1) with [REDACTED] exchange chromatograph and then liraglutide precursor is obtained (elution 2) (Step 8, [REDACTED] exchange chromatography) which is further purified with [REDACTED] chromatograph (Step 9, [REDACTED] chromatography ([REDACTED]-HPLC)). pH of the eluate from Step 9 is adjusted to [REDACTED] to [REDACTED] and the process solution is cooled and the precipitate is isolated by centrifugation (Step 10, precipitation). The liraglutide precursor from Step 10 is substituted on the ϵ -amino group of lysine in position 26 with [REDACTED] palmitic acid under [REDACTED] acylation conditions to give the target substance, liraglutide (Step 11, acylation). After further purification with [REDACTED] exchange chromatograph (Step 12, [REDACTED] exchange chromatography) and [REDACTED] chromatograph (Step 13, [REDACTED]-HPLC), pH is adjusted to [REDACTED] to [REDACTED] and the precipitate is isolated by centrifugation (Step 14, precipitation). The precipitate from Step 14 is dissolved in [REDACTED] aqueous solution and the liraglutide solution is [REDACTED] at [REDACTED] °C to [REDACTED] °C under pH about [REDACTED] for about [REDACTED] [REDACTED] and then freeze-dried (Step 15, freeze drying) to obtain the drug substance. If the drug substance does not meet the specifications of total viable count and loss on drying and [REDACTED], [REDACTED] by repeating Step [REDACTED]. If it does not meet [REDACTED], [REDACTED] by repeating Step [REDACTED] and Step [REDACTED], and if the acceptance criteria of the in-process control test at Step 10 (test method, RP-HPLC) are not met, [REDACTED] by repeating steps [REDACTED], [REDACTED], and [REDACTED].

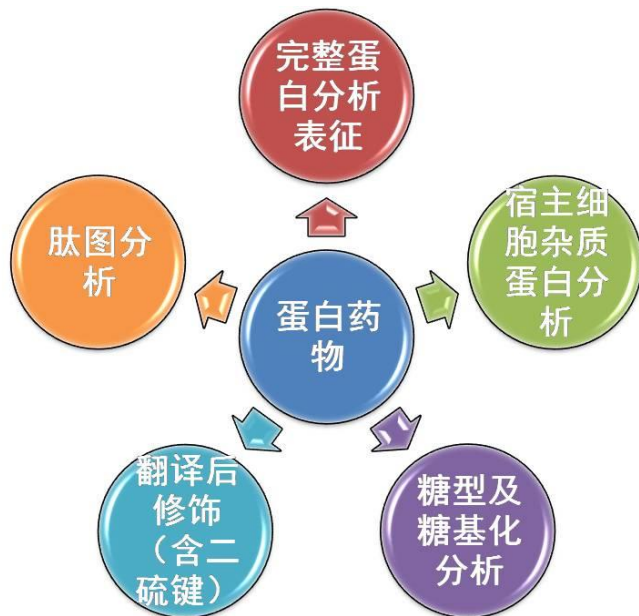
For in-process control tests, infection of the remaining broth is set at Step 1, sterility and infection at Step 2, pH, sterility, infection, phenotype, and structural context of expression plasmid at Step 3, pH at Step 4 and Step 5, liraglutide precursor and impurities (rRt [REDACTED]) at Step 6, load and [REDACTED] and [REDACTED] concentration during elution 1 at Step 8, retention volume of the main peak at Step 9, impurities (rRt [REDACTED]) and host cell proteins (HCP) at Step 10, [REDACTED] concentration and pH at Step 11, load and [REDACTED] ([REDACTED]) at Step 12, [REDACTED] concentration in eluate, [REDACTED] for [REDACTED] and [REDACTED] at Step 13, hydrophilic impurities and Peak 4 ([REDACTED]-liraglutide and [REDACTED]-liraglutide) at Step 14 and pH, temperature, and time at Step 15.

关键的分析参数被标黑，需要重头摸索建立

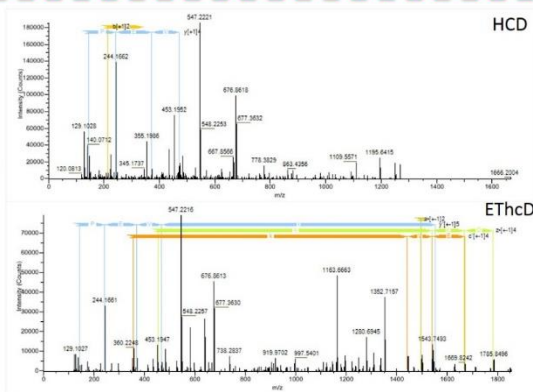
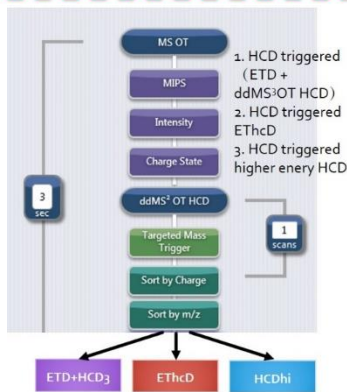
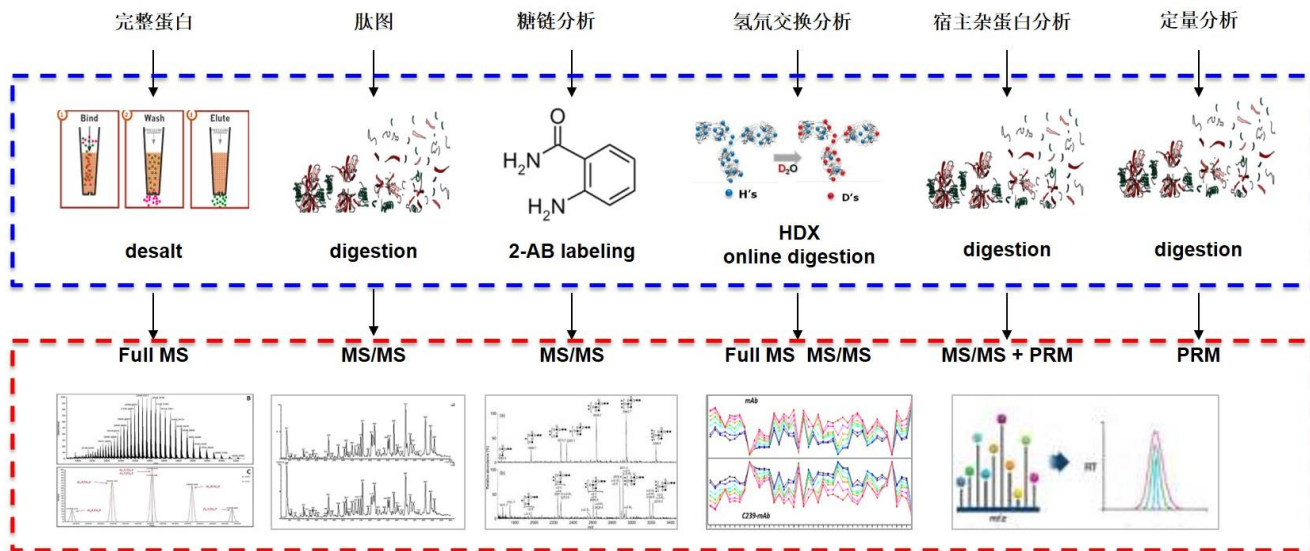
蛋白类药物的分析需求

确认完整蛋白分子量、主要糖型和其他翻译后修饰（PTM），是表征治疗性蛋白和了解其功效与稳定性的关键测量。

质谱仪是进行所有这些分析的主要工具，能在单一平台上实现高质量精度、高特异性和高灵敏度。

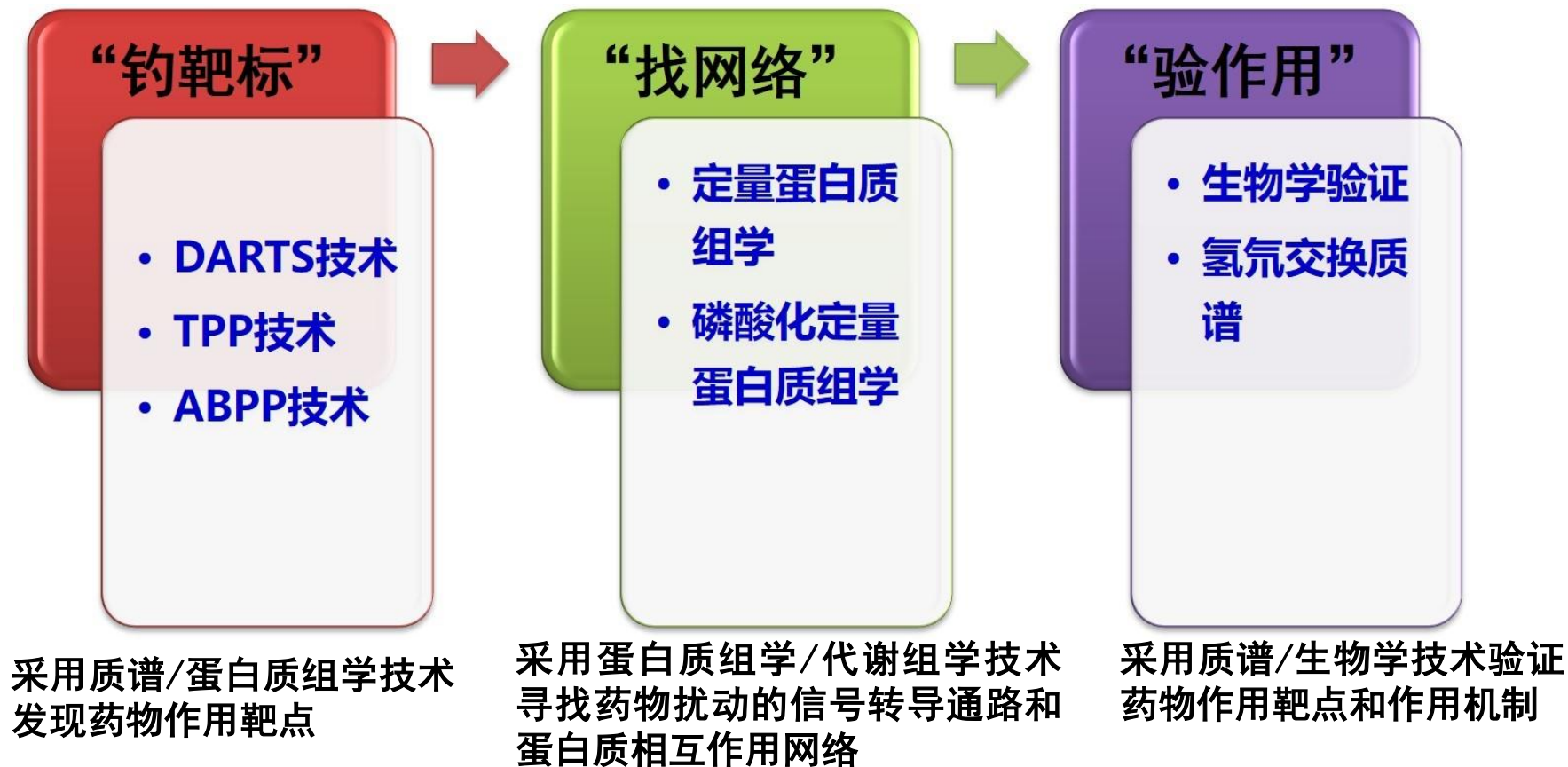


生物药分析的质谱流程



ADC药物偶联位点鉴定的质谱方法

基于质谱的组学技术在药物作用机制研究中的应用展望



寻找药物作用靶标和作用机制，验证药物小分子和靶标蛋白的相互作用

中科院上海药物研究所质谱平台

有机小分子测试

- 单一化合物检测 (ESI , EI)
- 化合物定量分析
- 复杂混合物液质联用分析
- 气质联用分析



线性离子阱质谱仪
(Thermo , LTQ)



气相色谱-四级杆静电
轨道阱质谱仪
(Thermo , GCQE)



三重四级杆质谱仪
(Thermo , TSQ-
Quantiva)



四级杆-飞行时间质谱
仪 (Agilent , 6545)

生物大分子测试

- 蛋白质鉴定
- 蛋白质翻译后修饰分析
- 蛋白质组学技术服务
- 生物药分析



四级杆静电轨道阱
质谱仪 (Thermo ,
GCQE)



四级杆静电轨道阱
质谱仪 (Thermo ,
QEHF)



线性离子阱-静电轨
道阱组合式质谱仪
(Thermo , Elite)



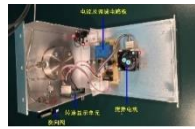
四级杆-线性离子阱-
静电轨道阱组合式
质谱仪 (Thermo ,
Fusion)

科研和仪器功能开发

- 质谱方法开发
- 组学方法开发
- 装备研制和功能开发



纳升级电喷雾离子
源



毛细管色谱柱气压
填充装置



纳升级电喷雾离子
源背景噪音降低装
置



可调温毛细管柱柱
温箱

周虎

中科院上海药物研究所结构表征研究中心

祖冲之路555号3号楼108室

分机：50806600转3103

zhouhu@simm.ac.cn

谢谢大家！

生物药研发的重要性

抗体类药物作为最大一类生物药物已经成为国内外药物研发的重要热点方向。2014年全球药物销售排行前十位的品种中有一半为抗体药物。抗体药物具有特异性强、副作用小等优点，广泛应用于肿瘤、淋巴瘤、白血病、自身免疫疾病、炎症、器官移植排斥反应等疾病的治疗。在过去的30年里，抗体类药物经历了从多克隆抗体到单克隆抗体、从鼠源抗体到人鼠嵌合和人缘化抗体、从杂交瘤技术到基因工程抗体技术的持续发展，为抗体药物的临床应用提供了充分的、持续创新的技术支持。目前，新一代抗体类药物，包括双特异性抗体、融合抗体、糖工程抗体、抗体药物偶联物等，正在汹涌地冲击着传统的抗体药物研发。

我国抗体工业的核心问题在于如何适应抗体药物发展新形势，紧跟新一代抗体药物技术，并实现新的技术创新与突破。生物技术药物最能代表医药高科技发展的方向和水平，从重组人胰岛素到干扰素再到单克隆抗体，它们挽救、延长了众多患者的生命，提高了深受糖尿病、感染性疾病、癌症和血友病等疾病困扰的患者的生活质量。随着生物技术水平的提升，科学家对于疾病有了更深层次、更多角度的认识，生物技术药物将不断走向成熟，伴随着人们收入的提高，更多的患者将会选择生物技术药物。

生物药研发的市场前景

2011年生物技术药物的市场约为1570亿美元，预计到2016年，药品市场会接近1.2万亿美元，生物技术药物市场将达到约2100亿美元，占全球药品费用总支出的17%左右。在新一代抗体药物中，抗体药物偶联物(ADC)与多特异性抗体占有巨大的市场份额。据 *Nature Reviews Drug Discovery*(13, 413 - 414, 2014) 报道，在2013年新一代抗体药物市场规模为501 million，其中ADC市场份额超过90%。到2021年，新一代抗体药物的市场规模将达到5.67 billion，其中ADC药物仍将占最大份额(约40%)，而多特异性抗体将达到约25%的市场份额。

国内外现状及发展趋势

生物技术药物研发要经过药物发现阶段、临床前研究阶段、临床研究阶段，最后才能获得药品监管部门的批准。美国生物技术药的研平均周期为97.7个月，以2005年为例，生物药临床前研究需支出6.15亿美元，临床研究需支出6.26亿美元，共需耗费12.41亿美元，总花销与小分子新药研发支出（13.18亿美元）接近。大多数生物技术药物具有特别复杂的分子结构，其分子量大小甚至会超过500 kDa，对分析技术和方法提出了更高的要求。自1982年第一个重组人胰岛素上市以来，经过30余年的发展，目前有150多个生物技术药物上市，其中一些成为市场上重磅炸弹式的药物。生物技术药物销售收入已连续多年保持了15%以上的增速，世界前20位畅销药中有7个生物技术药物。

一般讲，生物技术药物生产企业是指生物技术药物贡献了一半以上营业收入的医药企业。2011年10 大生物技术药物以单抗为主，雅培的治疗类风湿性关节炎的阿达木单抗以79亿美元成为最畅销生物技术药物。随着化学新药创制难度增大，生物技术药物逐步成为创新药物的重要来源。早期的生物技术药物主要包括重组激素/蛋白质、重组生长因子、细胞因子等产品，自1987年第一个治疗性单克隆抗体药物（Orthoclone OKT3）获准上市，在随后的20多年中，基于抗体技术的药物，其市场得到快速扩张，成为领先的重磅炸弹式的药物。在生物技术药物领域，美国在研究、开发与生产方面一直处于领先地位。2013年美国企业针对100多种疾病利用生物技术正在研发907种生物技术药物（已进入临床研究阶段）。