

化学实验

推荐一个化学生物学教学实验 ——电喷雾质谱研究磷酸基对丙氨酸 与溶菌酶分子间相互作用的影响

付川¹ 蔡谊敏¹ 刘艳^{1*} 赵玉芬^{1,2}

(1 化学生物学福建省重点实验室 厦门大学化学化工学院 福建厦门 361005

2 厦门大学医学院药理学系 福建厦门 361005)

摘要 介绍一个利用电喷雾质谱研究生物大分子与化学小分子相互作用的实验方法。讨论了该实验在化学生物学专业本科生教学工作中的实践效果。

化学生物学的一个重要研究方向是利用多种现代分析手段来研究生物大分子与化学小分子之间的相互作用。目前,研究生物大分子与化学小分子之间相互作用的技术手段除了各种光谱学技术(如紫外、荧光、圆二色等)外,主要还有 X 射线晶体衍射、溶液核磁共振及质谱技术。

质谱作为一种分析方法,长期以来一直用于小分子化合物的结构分析。随着质谱软电离技术的不断发展,新型生物质谱特别是电喷雾质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI/MS)已广泛应用于弱相互作用及非共价复合物的检测和研究中。电喷雾离子化的特点是可以产生多电荷离子而不是碎片离子,使质量电荷比降到多数质量分析器都可以检测的范围内,因而大大扩展了分子量的分析范围。另外,该电离技术能够在接近天然溶液状态的情况下,对生物大分子与各种小分子或其他大分子所形成的非共价复合物进行无损分析,能够更加真实地反映生物大分子的生理状态。由于 ESI/MS 具有灵敏度高、快速和质量精确度高的优点,弱相互作用复合物的化学计量比能够很容易地从分子量推出;通过改变实验条件,可以比较不同化合物与蛋白质亲和力的大小。

相对于生物核磁技术以及 X 射线晶体衍射来说,质谱技术研究生物大分子与小分子的相互作用较为简便、易行。因此,在化学生物学专业的本科教学中引入质谱实验方法,对学生深入了解该专业的前沿研究领域、研究意义以及研究技术手段,具有一定的教学指导意义。

我们在已有的科研基础上,将部分研究成果^[1]简化成一个简便、易行的化学生物学本科教学实验——电喷雾质谱研究磷酸基对丙氨酸与溶菌酶分子间相互作用的影响。该实验在厦门大学经过 2003 级化学生物学专业 39 位学生的教学实验验证,约有 96% 的学生顺利完成,收到了良好的教学效果。

2500m/z;正离子模式;用流动注射泵进样,流速为 2 μ L/min。Compound stability: 80%;Average: 7;Rolling average: on,No. 22。

(3) 分别对 3种待测样品溶液进行质谱检测。待总离子流稳定后,保存此时的扫描谱图,最后利用仪器自带的数据分析软件进行数据分析,寻找 3张质谱图的差异。学生实验中获得的 3张电喷雾质谱图如图 2所示。比较图 2中的 a、b、c,可以清楚地观察到 N 磷酸化丙氨酸与白蛋白溶菌酶形成弱相互作用复合物,而丙氨酸则不能。

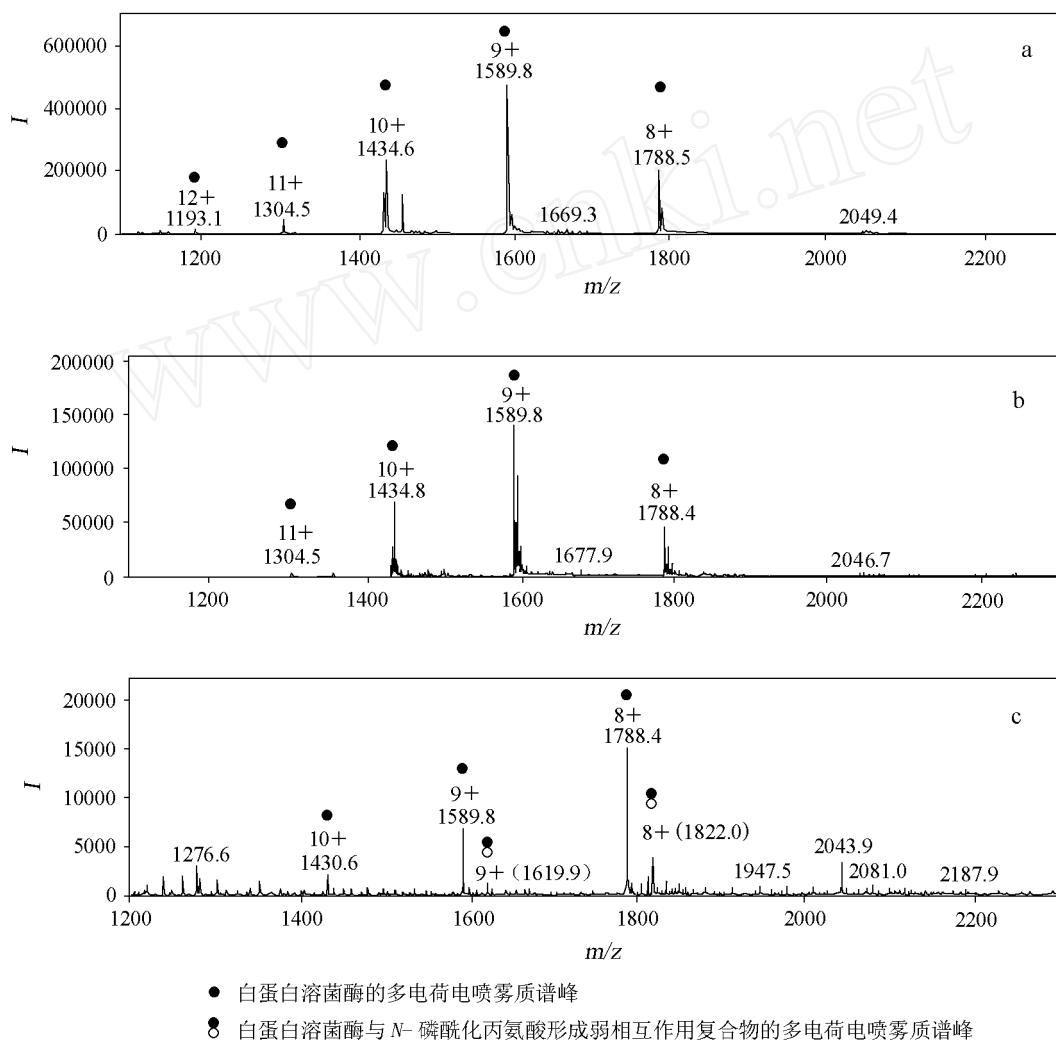


图 2 白蛋白溶菌酶与 N 磷酸化丙氨酸及丙氨酸的弱相互作用电喷雾质谱图

a)白蛋白溶菌酶的多电荷电喷雾质谱图; b)白蛋白溶菌酶与丙氨酸的弱相互作用电喷雾质谱图;

c)白蛋白溶菌酶与 N 磷酸化丙氨酸的弱相互作用电喷雾质谱图

6 教学建议

(1) 在进行本实验前,要求学生充分利用图书馆的网络资源,通过化学专业数据库(如

SciFinder Scholar, ACS美国化学学会数据库等)查阅研究化学小分子与生物大分子的相互作用方法及意义。

(2) 关于化学小分子的选择,可以根据现有实验室条件自行选择那些方便、易得的样品。例如,学生在有机化学基础实验中制备的乙酰苯胺,可以通过质谱技术研究其与蛋白质的弱相互作用^[3]。

(3) 实验成功与否的关键在于质谱仪器参数的调节。比如,若 Compound stability, Average, Rolling average几个参数设置不当,将会导致化学小分子与蛋白质的弱相互作用复合物解离,从而观察不到所需质谱信息。

(4) 实验需 3学时(不包括 *N* 磷酸化丙氨酸的合成),包括实验讲解、样品准备及上机测试。每次上课 4人,2人一组进行样品准备及上机测试。

(5) 实验完成后进行课堂讨论与总结,集体讨论以下 3个问题: 所得 3种样品溶液的质谱图存在哪些差异? 为什么电喷雾是一种软电离源? 它的工作原理是什么? 生物大分子在电喷雾质谱中的表现形式是什么? 电喷雾质谱与 MALD FT-IC/MS有何不同? 指导教师可借此机会介绍另一种软电离质谱技术即 MALD FT-IC/MS,以拓宽学生的知识面。

参 考 文 献

- 1 方美娟,骆淑娜,赵玉芬,等. 物理化学学报, 2005, 21(9): 1042
- 2 Ji G J, Xue C B, Zeng J N, *et al Synthesis*, 1988, 6: 444
- 3 俞天智,陶祖贻. 光谱学与光谱分析, 1999, 13: 453

(上接第 26页)

于传统的研究生课程体系“本科化”色彩较浓^[3],有些学生没有改变本科阶段的学习习惯,对研究性的自主学习不适应。尤其是刚开始进行研究型实验时,不会主动思考,遇到问题感到焦虑,总是习惯性地等老师帮忙解决,对老师有较大的依赖性。

总体来看,现代卫生分析化学课程的创新性建设有助于培养和提高学生以创新能力为核心的综合能力和总体素质,而且随着课程建设的继续进行,经过师生的共同努力,目前存在的一些问题也应该能得到解决。

参 考 文 献

- 1 王孙禺,袁本涛,赵伟. 中国高等教育, 2007(9): 32
- 2 王忠伟,陈鹤梅. 学位与研究生教育, 2006(9): 14
- 3 罗尧成. 学位与研究生教育, 2006(6): 43