

电喷雾质谱法研究酸和盐诱导下蛋白质的 折叠状态的改变

杨俐锋¹, 喻琳¹, 刘艳¹, 周宁¹, 陈勇¹, 赵玉芬^{1,2}

(1. 厦门大学 化学生物学福建省重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 清华大学 化学系 生命有机磷及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084)

摘要: 电喷雾质谱正离子模式研究了在酸和盐的诱导下蛋白质的折叠状态. 研究表明, 用酸去折叠后的溶菌酶在相同电喷雾质谱条件中有表现出比紧密折叠的蛋白质相对低的电荷状态, 而细胞色素 C 的电荷状态却相反. 在相当宽的挥发性盐浓度范围内, 电喷雾质谱对蛋白质的检测都表现出良好的信号, 而在高盐浓度下, 传统的检测方法如圆二色谱则无法检测, 这一结果为高盐浓度的下蛋白质的研究提供一个手段. 同时考察了主要仪器条件的设定对测定的影响.

关键词: 蛋白质; 电喷雾质谱

中图分类号: O 629

文献标识码: A

蛋白质是构成生物体的一类十分重要的有机含氮化合物, 是生命的物质基础. 蛋白质是多种多样的, 并且行使不同的功能. 蛋白质的不同功能是以其特定结构为基础的. 所有蛋白质不论功能和来源如何, 均由二十种基本氨基酸组成. 氨基酸按不同的顺序排列, 构成蛋白质的一级结构, 在此基础上建立起相应的二级、三级以及四级结构. 不同的蛋白质行使不同的功能, 这是通过其特定的结构来实现的. 研究蛋白质序列、结构与功能之间的关系, 是我们了解自然、应用自然的最重要的工作之一.

1988 年的 ASMS 会议上, John Fenn 首次提出电喷雾离子化方式并应用于蛋白质分析^[1]. 几年后, 出现了应用该离子化方式的商业产品, 继而发展了一系列的联用技术^[2,3]. 近年来, 随着软电离源 ESI、MALDI 的发展, 生物质谱在蛋白质、肽的分析中得到了越来越广泛的应用^[4~7]. 如何选择最佳的质谱测定条件是工作的关键步骤, 因此考察不同蛋

白质在不同条件下的质谱表现为显得尤为重要.

我们研究了酸和盐诱导下蛋白质的聚集状态, 发现不同的蛋白质对条件改变的响应程度不同. 以溶菌酶为例考察了不同浓度的醋酸铵缓冲液条件, 可以看到在高盐浓度下电喷雾质谱也有着良好的检测信号, 为今后高盐浓度下蛋白质的研究提供了一个快速简便的手段.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Bruker Dalton Esquire3000Plus 液相色谱-离子阱质谱联用仪(美国 Bruker 公司), 配置电喷雾离子源, 74900Series 自动进样器, 最大扫描 6 000;

溶菌酶(Sigma), 细胞色素 C(Merck), 水为去离子水, 冰醋酸(分析纯, 上海化学试剂公司), 经重蒸, 醋酸铵(生化纯, 上海生物化学试剂公司).

1.2 实验条件

质谱检测条件: 正离子模式(Positive mode); 扫描范围(Range) 800 ~ 2 000 m/z ; ICC 20000; 目标分子量(Target mass) 1 430; 积聚时间(Max accu time) 200 ms; 喷雾气(Nebulizer) (N₂) 10 psi; 干燥气(Dry N₂ gas) (N₂) 10 L/min; 干燥温度(Dry temp) 300 °C; 扫描电压: + 4 000 V. 蛋白质终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$.

收稿日期: 2003-09-02

基金项目: 国家自然科学基金(20132020, 20272055), 福建省科技基金(2001F008)和福建省重点科技基金(2002H011)资助

作者简介: 杨俐锋(1979-), 女, 硕士研究生.

* Corresponding author,

E-mail: yfzhao@xmu.edu.cn

2 结果与讨论

正离子模式下的电喷雾质谱研究通常都给出一系列的和蛋白质电荷状态相关的峰. 电喷雾质谱的电荷状态经常用于研究溶液中肽链的三维结构. 溶液中去折叠后的蛋白质比中性条件下紧密折叠的蛋白质表现出不同的电荷状态. 尽管电荷状态改变的机理仍不清楚, 它还是直观的表现出蛋白质溶液状态下状态的变化.

2.1 酸诱导下蛋白质电喷雾质谱的分析

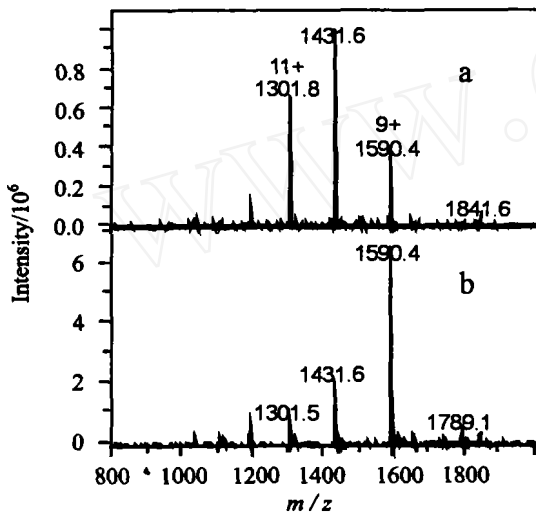


图 1 溶菌酶电喷雾质谱图

Fig. 1 Mass spectrometry of Lysozyme: a. pH = 7, b. pH = 2 (CS = 200 V)

溶菌酶在天然状态下含有 29% 的螺旋和 11% 的折叠, 溶液中靠 4 个二硫键的作用稳定存在, 是 1 个碱性蛋白. 溶菌酶在正离子模式下的电喷雾质谱如图 1a 所示. 它表现出一系列的电荷状态, 其中最高的为 10^+ (1431.6). 在酸诱导的情况下 (pH = 2), 溶菌酶的最高电荷状态为 9^+ (1590.4) (见图 1b). 电荷聚集状态朝低略有改变, 这是由于蛋白质整体结构在酸性条件下部分解离了.

细胞色素 C 二级结构中含有相当高的螺旋 (45%), 其电喷雾质谱正离子模式表现出较窄的电荷状态, 7^+ 和 8^+ 为最强的峰. 细胞色素 C 在正离子模式下的电喷雾质谱如图 2a 所示. 其所带电荷最高为 10^+ (1237.1). 在酸诱导的情况下 (pH = 2), 最高电荷状态为 17^+ (728.3) (见图 2b), 朝高电荷状态移动. 与溶菌酶相反, 表现出比中性条件下更高的电荷聚集状态.

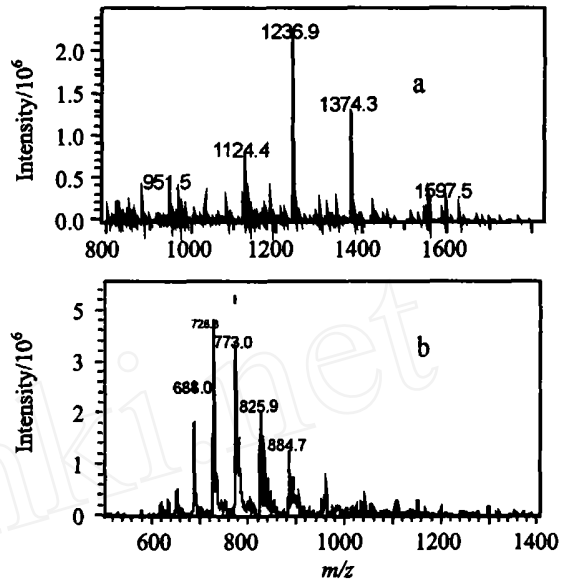


图 2 细胞色素 C 电喷雾质谱图

Fig. 2 Mass spectrometry of Cytochrome C: a. pH = 7, b. pH = 2 (CS = 200 V)

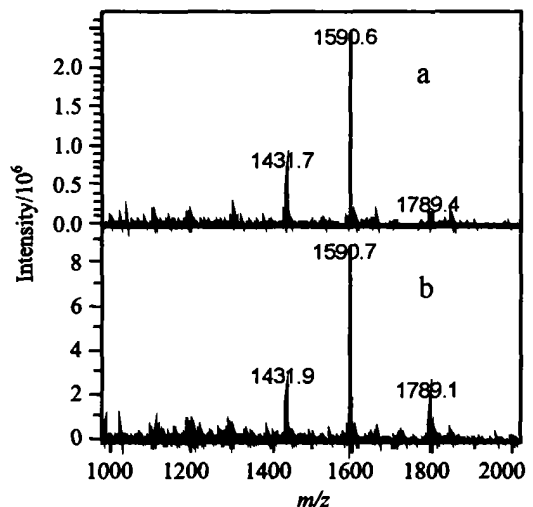


图 3 醋酸铵缓冲液浓度对溶菌酶电喷雾质谱图的影响

Fig. 3 Influence of concentration of NH_4Ac on Lysozyme mass spectrometry. a. 1 mmol/L, b. 1 mol/L (CS = 200 V) pH = 7.0

2.2 醋酸铵缓冲液浓度对蛋白质的影响

质谱测定中的缓冲液有几个作用: (1) 调节溶液的 pH 以支持离子在溶液里的形成 (正负离子模式); (2) 确认选择形成所需要的复合物而避免无用的复合物的形成; (3) 协助色谱的优化.

在蛋白质的质谱检测过程中我们一般用挥发性

酸的盐溶液(醋酸铵)作为缓冲液.用溶菌酶为例考察了不同醋酸铵浓度(1 mmol/L,100 mmol/L,1 mol/L)对蛋白质的影响(见图3).在相同的质谱条件下,溶菌酶的聚集状态并没有发生改变.而在1 mol/L的醋酸铵缓冲液中,我们用圆二色谱检测得不到任何信号.从而可以认为电喷雾质谱在高盐浓度下可以作为一种对于特定蛋白质有效的检测手段.

2.3 质谱条件对蛋白质电荷状态的影响

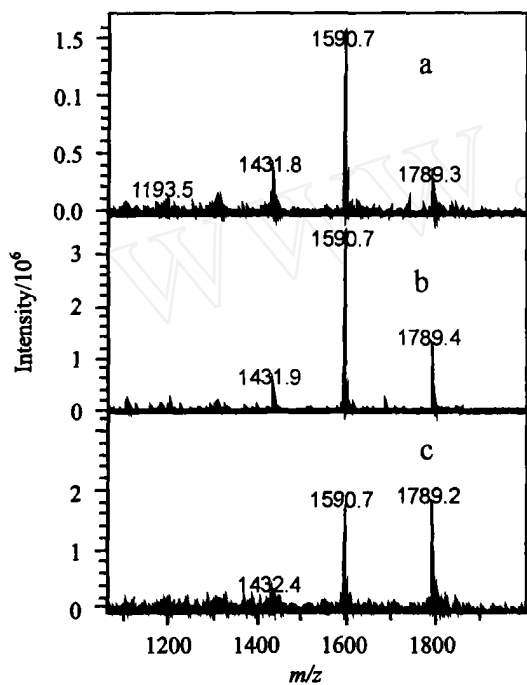


图4 毛细管-刮口电压(CS)大小对溶菌酶电喷雾质谱图的影响

Fig. 4 Influence of capillary-skimmer voltage(CS) on Lysozyme mass spectrometry. a. 100 V, b. 200 V c. 300 V

质谱仪器参数的选择对蛋白质电荷状态的改变也有一定的影响,我们在实验过程中考察了100 mmol/L醋酸铵缓冲液中,不同毛细管-刮口电压(CS:capillary-skimmer voltage)的影响.随着CS的增加,蛋白质的电荷状态略有下降. CS为300 V的时候,最高电荷状态已由9⁺变为8⁺(见图4).说明电喷雾质谱中仪器参数条件的设定也同样影响蛋白质电荷聚集状态,在实验过程中,应根据实验目的,选定最佳参数.

3 结论

通过对溶菌酶和细胞色素C不同酸碱条件下

的分析,表明不同蛋白质对酸碱的响应程度不同,而缓冲盐溶液的浓度对蛋白质的电荷聚集状态影响不大.在实验过程中,应根据不同蛋白质的特性,仔细设定实验的条件,以获得最佳的测定结果.在生命科学发展中,从分子水平上认识生命现象需要快速、灵敏的检测方法来提供分子间相互作用的信息及生物大分子的结构信息.电喷雾质谱以用量少,分析快速、简便的优点在蛋白质组学研究中的得到了广泛的应用.以生物质谱如ESI/MS、MALDI/MS等参与的分析,测试手段方法将在这片新的科研领域中越来越显示其重要性.

质谱并不能为我们提供物质结构的直观图像,因此需要根据所测大分子各片段质量数进一步推测.完全依靠质谱数据来分析样品分子结构及分子间相互作用还是有一定的难度,每一具体的样品仍需采用不同的条件及方法.但是它提供了其它方法所不能测得的信息.对我们的前沿研究仍具有重大意义.以上分析条件的控制使ESI/MS可以从分子水平上成功的对高级结构(二硫键、疏水位点、氢键作用点等)、蛋白-配体的相互作用进行深入研究,这对生物大分子的功能、作用机理、过程等原理的认识具有重大意义.

参考文献:

- [1] Fenn J B, Mann M, Meng C K, et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules [J]. Science, 1989, 246: 64.
- [2] Fenn J B, Mann M, Meng C K, et al. Electrospray ionization-principles and practice [J]. Mass Spectrom. Rev., 1990, 9: 37 - 70.
- [3] John R Chapman. Protein and Peptide Analysis by Mass Spectrometry [M]. Manchester, UK: Humana Press Inc., 1996.
- [4] Joseph A Loo. Electrospray ionization for mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes [J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2000, 200: 175 - 186.
- [5] Joseph A Loo. Probing protein-metal ion interactions by electrospray ionization mass spectrometry: enolase and nucleocapsid protein [J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2001, 204: 113 - 123.
- [6] Brenda L Schwartz, David C, Gale, et al. Investigation of non-covalent ligand binding to the streptavidin tetramer by electrospray ionization mass spectrometry [J]. J. Mass Spectrom., 1995, 30: 1095 - 1102.
- [7] Alomirah H F, Alli I, Konishi Y. Applications of mass

spectrometry to food proteins and peptides[J]. J. Chro-

ma. A. ,2000 ,893 :1 - 21.

Unfolding of Proteins Monitored by Electrospray Ionization Mass Spectrometry :a Comparison of Different Condition

YANG Li-feng¹ , YU Lin¹ , LIU Yan¹ , ZHOU Ning¹ , CHEN Yong¹ , ZHAO Yu-fen^{1,2 *}

(1. The Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province ,Xiamen University ,Xiamen 361005 ,China ; 2. The Key Laboratory for Bioorganic Phosphorus Chemistry ,Ministry of Education ,Department of Chemistry ,Tsinghua University ,Beijing 100084 ,China)

Abstract : The application of positive ion mode mass spectrometry (MS) to large biomolecules has been revolutionized in the past decade with the development of electrospray ionization (ESI) and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) techniques. ESI permits solvent evaporation and sublimation of large biomolecules into the gaseous phase, respectively. ESI has allowed the determination of accurate molecular mass and the detection of chemical modification at high sensitivity. The interface of mass spectrometry hardware and new extended mass spectrometric methods has resulted in the use of MS for protein conformations (native, denatured, folding intermediates), protein folding/unfolding and protein-protein or protein-ligand interactions. In this paper, ESFMS was used to study protein charge state with acid and salt. HEWL (hen egg white lysozyme) and Cytochrome C were taken for example to investigate their foldings under different condition. It was found that the concentration of salt had not much influence on protein folding status and pH of the solution should be paid more attention to different protein during the experiment. This technique is appropriate for the protein observation in high salt solution. At the same time, instrument parameter was considered. In this paper, the influence of CS (capillary-skimmer voltage) was studied. When CS increased, the charge state of protein decreased. To extend this methodology, more native substance could be used to recognize anions by ESFMS. This technique is hoped to do more work in continuing work.

Key words : protein ; electrospray ionization mass spectrometry (ESFMS)