



## 肌红蛋白的电喷雾质谱研究 ——推荐一个化学生物学教学实验

刘艳\* 甘杰鹏 于腊佳 赵玉芬

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

**摘要** 在原有实验的基础上,设计、实践了一个利用电喷雾质谱研究生物大分子与小分子相互作用的更为合理、简单、易行的实验方法。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及经验。

**关键词** 电喷雾质谱 弱相互作用 肌红蛋白

化学生物学是一门化学与生命科学高度交叉的前沿学科,它充分利用化学的方法、手段和策略从分子水平认识生命现象的本质,从而为生物医药、农业和环境科学的发展提供解决方案。化学生物学的一个重要研究方向是利用各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。

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相关分析。直到20世纪80年代末电喷雾电离质谱(electrospray ionization mass spectrometry,ESI-MS)和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry,MALDI-TOF-MS)两种软电离(soft ionization)质谱出现,才将质谱的分析范围扩大到生物大分子。

电喷雾是一项软电离技术,样品分子在电喷雾电离时通常不发生裂解,它能够在非常接近天然溶液状态的情况下将非常弱的蛋白质非共价键复合物从液相转变为气相而进行测定,能够更加真实地反映生物大分子的生理状态。因此,基于质谱技术快速、灵敏、样品消耗量少、能够直接给出生物大分子与小分子之间的化学计量比等特点,质谱技术目前也广泛应用于生物大分子与小分子的相互作用研究。

为了让我院化学生物学专业的学生更好地了解质谱技术在生物样品分析及分子间相互作用研究领域中的应用,我们曾自行设计了一个简单易行的教学实验——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,并将其应用到厦门大学化学化工学院2003级至2009级的化学生物学专业的本科教学实验中<sup>[1]</sup>。

该实验在多年的教学实践中,取得了良好的教学效果,但同时也发现了一些不足之处。首先,磷酸化丙氨酸的样品来源具有一定的局限性,不利于该实验在不同学校化学生物学专业间进行推广;其次,为了提高生物大分子在质谱中的检测灵敏度,该实验使用50%CH<sub>3</sub>OH溶液溶解蛋白样品,而高浓度有机溶剂的使用不利于保持生物大分子生理条件下的三维结构,严重影响了用质谱研究生物分子间相互作用的实验结果的可靠性及科学性。因此,我们重新设计并实践了一个更为简便易行的化学生物学本科教学实验——肌红蛋白的电喷雾质谱研究。该实验在厦门大学经过2010级化学生物学系40名本科生教学实验验证,在质谱仪器运行状态良好的情况下,所有学生都可以顺利完成实验,并且对利用质谱研究生物大分子与小分子的相互作用的关键技术有了更为深刻的理解。

\* 通讯联系人,E-mail:stacyliu@xmu.edu.cn

## 1 实验目的

- (1) 了解电喷雾质谱的工作原理。
- (2) 掌握电喷雾质谱研究蛋白质非共价键复合物的基本方法。

## 2 实验原理

细胞功能通常由生物分子间的弱相互作用即非共价键相互作用而体现,如酶与底物、蛋白质与配体、蛋白质与蛋白质及抗原抗体反应等。研究分子间的相互作用,可以为阐释分子间的作用机制,了解各种生物功能提供重要的理论及实验依据。

肌红蛋白(myoglobin)是由一条肽链和一个血红素辅基组成的蛋白复合物,是肌肉内储存氧的蛋白质。肌红蛋白是组成骨骼肌和心肌的主要蛋白质。当肌肉损伤时,肌红蛋白就从肌肉组织中漏到循环血液中,使血清中肌红蛋白浓度增加。临床上常用该指标来判断是否发生肌肉损伤。由于肌红蛋白自身就是通过血红辅基与蛋白质链的弱相互作用而形成的蛋白复合物,常常用来衡量及研究蛋白质有关的非共价键复合物的ESI-MS测试参数的有效性。

电喷雾质谱研究蛋白质非共价键复合物成功的关键是样品的制备方法以及很好地理解和调节仪器参数。在一般情况下,用电喷雾质谱研究蛋白质或多肽的最灵敏和最稳定条件并不适用于蛋白质非共价键复合物的研究。通常,用电喷雾质谱研究蛋白质时,样品溶于含1% HCOOH或1% HOAc的一定比例的乙腈或甲醇水溶液中。这样的条件对蛋白质形成非共价键复合物并不一定有利,很多情况下会破坏非共价键的形成<sup>[2-3]</sup>。此外,电喷雾质谱产生的带电液滴的脱溶剂效果直接影响非共价键复合物的检测。一般提高电喷雾质谱的脱溶剂效果可以通过调节以下仪器参数来实现:提高Dry temperature,增加干燥气流量,以及增加大气压力/真空界面的碰撞能量或Cone电压等。然而,以上参数设置过大,容易导致非共价键复合物的解离。

总而言之,所有能够导致蛋白质变性的因素都不利于蛋白质非共价键复合物的形成。缓冲溶液pH、有机溶剂、Dry temperature和Cone电压是在研究蛋白质非共价键复合物时要考虑的几个重要因素。

因此,本实验选择肌红蛋白为模型蛋白,利用电喷雾质谱技术来测定其整个复合蛋白的相对分子质量,并考察肌红蛋白的测试溶液对其复合物测定的影响。根据文献调研<sup>[3]</sup>,在pH 3.2~3.6的醋酸水溶液中,或在40%~50%甲醇水溶液中,肌红蛋白中的血红辅基会完全解离出来;而在此pH及甲醇含量范围之外,肌红蛋白复合蛋白结构则能够稳定存在。据此,本实验设计考察的两种肌红蛋白的测试溶液分别为50% CH<sub>3</sub>OH(含1%(体积分数,下同)HOAc)溶液以及pH=6的HOAc水溶液。

## 3 仪器与试剂

实验仪器:德国布鲁克道尔顿公司ESI-ESQUIRE-3000plus电喷雾离子阱质谱仪;Orion Model-828 pH计。

实验药品:肌红蛋白( $M_r \approx 17600$ )、超纯水,所用甲醇为色谱纯,醋酸为分析纯。

## 4 实验操作

### 4.1 样品准备

① 1mg/mL(约60 $\mu$ mol/L)肌红蛋白的50% CH<sub>3</sub>OH(含1% HOAc)溶液:称取1mg肌红蛋白,将其溶于1mL含1% HOAc的50% CH<sub>3</sub>OH的溶液中,混合均匀备用。

② 1mg/mL肌红蛋白的醋酸水溶液(pH=6):将醋酸逐滴滴加到超纯水中,以调节超纯水溶液的

pH。充分搅拌后,用 pH 计检测该溶液的 pH = 6 时,停止滴加醋酸即得到 pH = 6 的醋酸水溶液;称取 1mg 肌红蛋白,将其溶于 1mL 上述溶液中混匀,即得到待测样品。

#### 4.2 质谱条件设置

固定参数:正离子模式;用流动注射泵进样,流速为  $4\mu\text{L}/\text{min}$ ;扫描范围  $600 \sim 2500 m/z$ ;Target mass 1500;Dry temperature  $250^\circ\text{C}$ ;Nebulizer 0.048MPa;Dry gas: $4.5\text{L}/\text{min}$ ;Compound stability:100%;Average:5;Rolling Average:20。

### 5 实验结果与讨论

(1)  $1\text{mg}/\text{mL}$  (约  $60\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 肌红蛋白的 50%  $\text{CH}_3\text{OH}$  (含 1% HOAc) 溶液,在上述质谱检测条件下直接进样,得到的质谱检测结果见图 1。

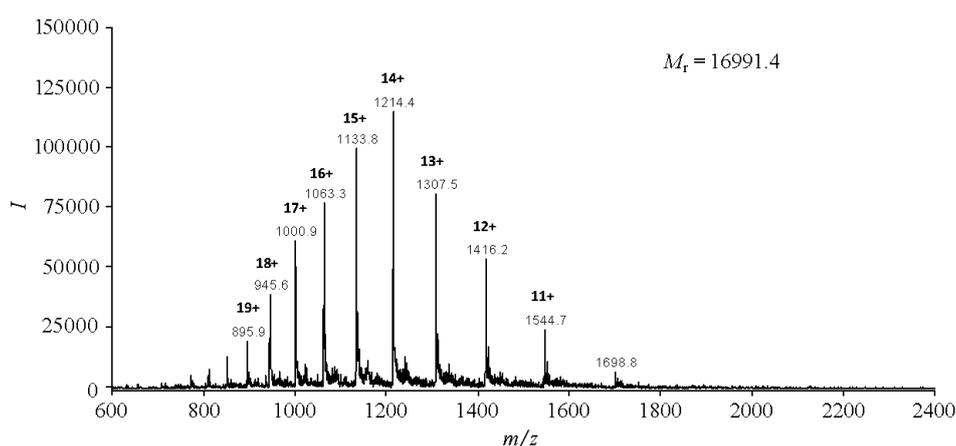


图 1 肌红蛋白( $1\text{mg}/\text{mL}$  约  $60\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 的 50%  $\text{CH}_3\text{OH}$  (含 1% HOAc) 溶液的电喷雾质谱图

通过计算每种带电状态的肌红蛋白相对分子质量的平均值,得到该肌红蛋白的平均相对分子质量是 16991.4,说明在该溶剂条件下血红素辅基已经与肌红蛋白链解离,所测相对分子质量是肌红蛋白链的相对分子质量。该实验结果表明,该质谱实验条件不适合做蛋白质复合物的检测。

(2)  $1\text{mg}/\text{mL}$  肌红蛋白的 pH = 6 醋酸水溶液,在相同的质谱检测条件下,得到的质谱结果见图 2。

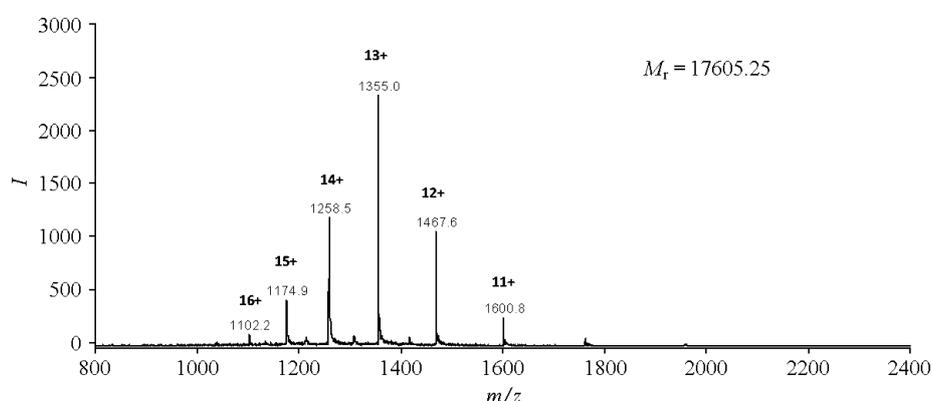


图 2 肌红蛋白( $1\text{mg}/\text{mL}$  约  $60\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 的醋酸水溶液 (pH = 6) 的电喷雾质谱图

通过计算每种带电状态的肌红蛋白相对分子质量的平均值,得到该肌红蛋白的平均相对分子质量是 17605。该实验结果表明,在该质谱测试条件下肌红蛋白能够较好保持其生理条件下的三维结构,血

红素辅基没有解离,所测相对分子质量是完整的肌红蛋白复合物的相对分子质量。

(3) 通过以上两张谱图的比对,还可以看出,对于相同浓度的肌红蛋白样品,由于甲醇的参与,图1中,肌红蛋白的质谱检测信号强度要远远好于纯水体系中的质谱信号(图2)。

(4) 根据以上实验结果,可以得到如下结论:如果生物大分子的质谱检测是为了测定其相对分子质量,可以使用甲醇等有机溶剂以提高其样品的质谱检测灵敏度;如果是为了进一步研究生物分子间的相互作用(如复合物的检测),质谱测试条件要避免一切不利于蛋白质非共价键复合物形成的因素,例如有机溶剂的使用。

## 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、Web of Science 数据库等)查阅研究化学小分子与生物大分子相互作用的基本方法及意义。

(2) 待测样品应现用现配。在教学实验过程中发现,在4℃冰箱中放置3天后的肌红蛋白的pH=6醋酸水溶液,会在ESI质谱中表现出不同的质谱信号峰。

(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(Cone电压的简单调谐参数,若非共价键复合物非常不稳定,可以适当调低该参数)、Dry temperature、Nebulizer、Dry gas等几个参数设置过大,将会导致化学小分子与蛋白质的非共价键复合物解离,从而观察不到所需的质谱信息。上述参数若设置过小,则会大大降低待测样品在质谱仪器上的雾化效率及脱溶剂效果,严重影响质谱检测信号的产生。学生在实验中所采用的上述质谱参数,是教师通过预实验确定的,故需告知学生在以后的实际工作中应首先优化上述质谱参数。

(4) 蛋白质在质谱中的检测灵敏度、雾化效率等相对于有机小分子化合物来说比较低。为了获得更好的蛋白质质谱信号,使用Rolling Average功能,将数值设为No. 20。对有机小分子化合物的质谱检测则不需要使用此功能。

(5) 实验需3学时(不包括样品的配制),包括实验讲解及上机测试。每次上课6人2人一组进行样品准备及上机测试。

(6) 实验完成后进行课堂讨论与总结,集体讨论以下3个问题:①所用不同溶剂条件下的肌红蛋白质谱图存在哪些差异?差异产生的主要原因是什么?②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?③电喷雾质谱与MALDI-TOF-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MALDI-TOF-MS),以拓宽学生的知识面。

## 参 考 文 献

- [1] 付川,蔡宜敏,刘艳,等.大学化学,2008,23(6):43
- [2] Katta V,Chait B T. *J Am Chem Soc*,1991,113:8534
- [3] Lin X,Zhao W,Wang X. *J Mass Spectrom*,2010,45:618