

电喷雾多级质谱研究功能小分子与蛋白质的非共价相互作用 ——推荐一个化学生物学教学实验

张于锰, 陈语嫣, 刘艳*

厦门大学化学化工学院, 福建省化学生物学重点实验室(厦门大学), 福建 厦门 361005

摘要: 肌红蛋白不仅便宜易得, 而且自身就是一种由蛋白质和铁卟啉环辅基通过非共价相互作用构成的复合物。因此, 以肌红蛋白为研究模型, 带领学生实践基于电喷雾多级质谱技术的酶抑制剂直接筛选策略, 重点考查不同有机溶剂比例及pH等样品制备条件对复合物测定结果的影响, 以及如何利用二级质谱技术实现功能小分子配体的在线定性分析。该实验已在我校化学生物学专业本科生“化学生物学综合实验”教学工作中进行了多轮教学实践, 通过实践不断优化实验设计, 取得了良好的教学效果。

关键词: 电喷雾多级质谱; 非共价相互作用; 肌红蛋白

中图分类号: G64; O6

A Chemical Biology Teaching Experiment: Characterization of the Non-Covalent Interaction between Functional Small Molecule and Proteins by Electrospray Multistage Mass Spectrometry

Yumeng Zhang, Yuyan Chen, Yan Liu*

Fujian Provincial Key Laboratory of Chemical Biology (Xiamen University), College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China.

Abstract: Myoglobin is not only easily available, but also an inherent complex between protein and porphyrin ligand. Therefore, non-covalent complex of myoglobin was selected as the research model for teaching experiment to lead the senior students to practice the direct screening strategy of enzyme inhibitors by electrospray multistage mass spectrometry. Through comparing the effects of different sample preparation conditions on the MS determination of the complex, including organic solvent content and pH, students will understand the importance of sample preparation for MS analysis and grasp how to use MS/MS technology to achieve online qualitative analysis of functional small molecule ligands. The experiment here has been used for a few years as one of the teaching experiments in “comprehensive chemical biology experiments” course for undergraduates majoring in chemical biology at our college. With continuous teaching practice and optimization of the experiment, some good teaching effects have been achieved.

Key Words: Electrospray multistage mass spectrometry; Non-covalent interaction; Myoglobin

在功能小分子与蛋白质的非共价相互作用研究方面, 酶的抑制剂筛选是重要的应用领域之一, 在药物研发方面具有极其重要的科学意义及社会价值。质谱技术因其高灵敏、快速、高效、样品消耗量小(pmol–fmol)等特点, 在非共价复合物研究方面显示出巨大的应用潜力, 与H/D交换技术相联

收稿: 2021-02-28; 录用: 2021-03-30; 网络发表: 2021-04-23

*通讯作者, Email: stacyliu@xmu.edu.cn

基金资助: 国家人才培养基金项目(J0630429)

合还可以描述蛋白折叠动力学过程^[1]。通过“Intensity-Fading”间接的质谱检测技术也可以有效获得蛋白质与配体相互作用位点及作用本质信息^[2]。

1 质谱技术研究功能小分子与蛋白质相互作用的基本策略

电喷雾电离(Electrospray Ionization, ESI)及基质辅助激光解吸电离(Matrix Assisted Laser Dissociation Ionization, MALDI)是研究功能小分子与蛋白质的非共价相互作用常用的软电离质谱离子源。

质谱研究功能小分子与蛋白质的非共价相互作用成功的关键是保证蛋白质是在“天然”状态下进行质谱测试。通常可以使用温和的电压(例如, 锥孔电压Cone Voltage)、毛细管温度等仪器测试参数和采取温和的样品制备策略, 来实现蛋白质在“天然”状态下的质谱测试。蛋白质、多肽的分子量较大, 在质谱中的离子化效率较低。因此, 为了提高蛋白质、多肽在质谱中的离子化效率及检测灵敏度, 往往在样品制备过程中, 将蛋白、多肽溶于含0.1% HCOOH或0.1% HOAc并含一定比例乙腈或甲醇的水溶液中。然而, 这样的样品溶液配制方法对蛋白质非共价复合物的检测非常不利, 强酸环境、有机溶剂的使用, 会降低非共价复合物的稳定性, 从而导致复合物结构解离。具体来说, pH越低, 有机溶剂含量越高, 蛋白质与功能小分子的非共价复合物越容易解离^[3]。除了蛋白样品缓冲溶液pH、有机溶剂外, 所有能够导致蛋白质变性的因素都不利于蛋白质非共价复合物的稳定存在。因此, 质谱毛细管温度和工作电压在研究蛋白质非共价复合物时也是需要考虑优化的重要因素。

肌红蛋白(Myoglobin), 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素辅基铁卟啉与蛋白质的非共价相互作用而形成的蛋白复合物, 常常用其来衡量非共价蛋白复合物的质谱测试参数的有效性。

2 实验设计

功能小分子与蛋白质的相互作用研究最为典型的应用就是酶的抑制剂筛选。基于质谱技术的酶抑制剂筛选方法可分为直接筛选法(图1A, 1B)和间接筛选法(图1C)^[4]。图1A中, 通过直接检测酶-抑制剂复合物, 实现小分子酶抑制剂的直接筛选; 图1B中, 先利用质谱“钓”到酶-抑制剂复合物后, 通过测试条件的改变, 实现复合物的解离, 再利用质谱直接检测、鉴定小分子抑制剂; 图1C中, 则以酶底物的酶解产物为“报告分子”, 利用质谱检测“报告分子”间接实现抑制剂的筛选。

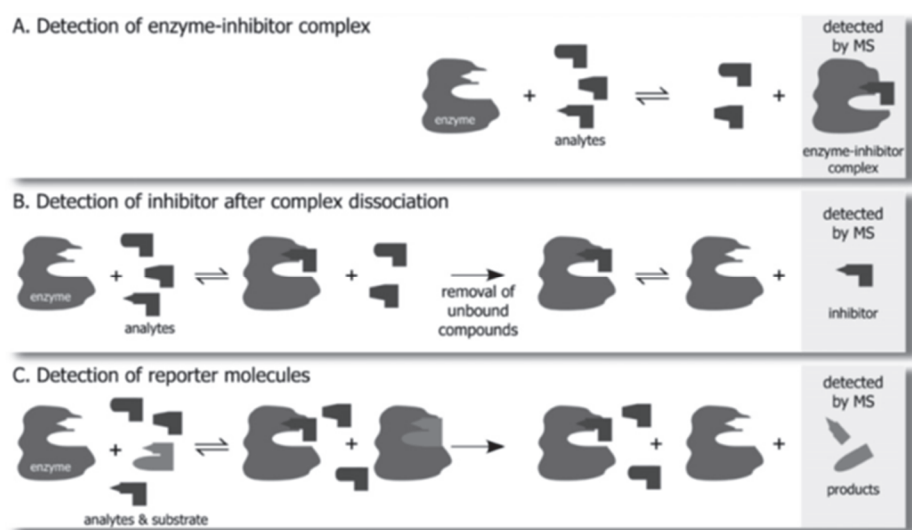


图1 基于质谱技术的酶抑制剂筛选策略^[4]

本实验选择以肌红蛋白为模型蛋白, 来模拟酶抑制剂的直接筛选方法(图1B), 通过测试样品溶液条件的改变, 考查pH环境及有机溶剂对肌红蛋白复合物的电喷雾质谱全扫描谱的差异, 让学生观察肌红蛋白的测试条件对其复合物测定的影响。此外, 通过待测样品中酸或有机溶剂的增加, 实现复合物的完全解离释放出小分子配体——血红素辅基, 即铁卟啉环, 计算蛋白复合物与蛋白质的质量差值, 确定小分子配体铁卟啉环辅基的分子离子峰, 并对其进行二级质谱解析, 以获得相应的结构信息。

该实验是在厦门大学化学生物学系早期的“化学生物学综合实验”^[5]基础上的进一步拓展。早期教学实验仅进行了测试样品溶液条件的改变对复合物质谱测定的影响考查, 没有引入酶抑制直接筛选应用策略的介绍以及二级质谱对小分子配体的定性分析。改进后的实验更有利于学生利用简单的模型蛋白复合物, 全面理解基于电喷雾多级质谱技术的功能小分子与蛋白质的非共价相互作用研究的实际应用。

选择肌红蛋白作为本实验的研究对象有三个根本设计原因。其一, 肌红蛋白是一种常规的商品化的蛋白质, 并且其本身就是蛋白质与血红素辅基的非共价相互作用复合物, 可以有效模拟酶-抑制剂复合物, 样品来源方便, 便宜易得, 有利于在大学本科基础实验教学中推广使用; 其二, 以甲醇、醋酸作为蛋白质复合物的变性剂以及互作破坏剂, 考查这两种常用的生物质谱测试辅助试剂对血红素辅基(抑制剂)与肌红蛋白(酶)复合物结构的影响, 并在线解离血红素辅基, 利用二级质谱分析技术完成血红素辅基定性分析过程, 帮助学生利用简单的模型更好地体会并了解实验核心意义; 其三, 肌红蛋白是被普遍认可的标准物质, 用来评价维系非共价蛋白质复合物“天然”状态的质谱测试条件的有效性, 直接选择肌红蛋白进行质谱测试, 有利于学生更好地了解其在质谱上的谱学特性。

3 实验操作

3.1 仪器与试剂

3.1.1 仪器

德国布鲁克道尔顿公司AmaZon SL电喷雾离子阱质谱; 精密分析天平: 赛多利斯精密天平(型号: BT224S, 精确读数0.1 mg); 漩涡混匀器: 北京大龙MX-S可调式混匀仪。

3.1.2 试剂

马心肌红蛋白(Myoglobin, $M_w \approx 17500$)购自上海生工, 市售的马心肌红蛋白本身含有血红素辅基, 或者称为铁卟啉辅基, 为了便于讨论, 文中用“肌红蛋白复合物”表示肌红蛋白与铁卟啉辅基之间存在弱相互作用的复合物形式; 超纯水Milli-Q纯化(Millipore, Bedford, MA, USA, 18.2 M Ω ·cm); 甲醇(HPLC级), Merck Co.(Darmstadt, 德国); 醋酸(MS纯), Sigma Co.。

3.2 实验步骤

3.2.1 样品配制

Solution A: 称取1 mg马心肌红蛋白于1.5 mL离心管, 加入1 mL超纯水(此时肌红蛋白水溶液的pH $\approx$ 9), 涡旋混匀器中混匀, 国产0.22 μ m聚醚砜树脂(PES)针式过滤头过滤, 得到浓度为 5.715×10^{-5} mol·L⁻¹的马心肌红蛋白储备液。

Solution B1–B5: 分别取100 μ L Solution A于5个1.5 mL离心管中, 再分别加入0、100、200、300、400 μ L甲醇, 以及400、300、200、100、0 μ L超纯水, 混匀, 备用。

Solution B6–B10: 分别取100 μ L Solution A、10 μ L 0.1%醋酸水溶液于5个1.5 mL离心管中, 再分别加入0、100、200、300、400 μ L甲醇, 400、300、200、100、0 μ L超纯水, 混匀, 备用。

Solution B1–B10的马心肌红蛋白的测试终浓度为 1.143×10^{-5} mol·L⁻¹。

3.2.2 仪器操作

质谱条件设置:

1) 全扫描质谱: 正离子模式; 用流动注射泵进样, 流速为40 μ L·min⁻¹; 扫描范围600–2200 m/z ;

Target mass 1200; Dry temperature 220 °C; nebulizer 7 Psi; Dry gas: 4.5 L·min⁻¹; average: 5; Rolling Average: 15.

2) MS/MS质谱: 正离子模式; 用流动注射泵进样, 流速为40 μL·min⁻¹; 扫描范围200–1200 *m/z*; Target mass 616; Dry temperature 220 °C; nebulizer 7 Psi; Dry gas: 4.5 L·min⁻¹; average: 5; Rolling Average: 5.

3.2.3 数据分析

分别对Solution B1–B10待测溶液进行质谱检测, 待总离子流稳定后, 保存此时扫描谱图。利用仪器自带的数据分析软件(Compass DataAnalysis)进行数据分析, 具体质谱检测结果如图2及图3所示。图2中, 甲醇含量为0时(图2a), 在上述质谱检测条件下, 既观察到肌红蛋白复合物的质谱多电荷信号峰, 也检测到了解离的蛋白质的质谱信号峰, 说明该质谱检测仪器参数还可以进一步优化, 以完全消除蛋白复合物的解离。随着甲醇含量的逐步增加(图2b和2c), 肌红蛋白复合物的质谱多电荷信号峰逐渐减弱, 蛋白质的质谱信号逐渐增强, 说明多数的蛋白以单体形式存在, 当甲醇含量达到60%时, 复合物基本都发生了解离, 以蛋白质单体形式存在, 表现出多电荷的近似正态分布峰型(图2d), 复合物自身的多电荷峰极弱(对应图2d中, 带15个电荷的分子离子峰1172.21 *m/z*)。当甲醇浓度达到80%时(图2e), 蛋白质复合物离子化效率大大降低, 蛋白质单体多电荷峰不显著。

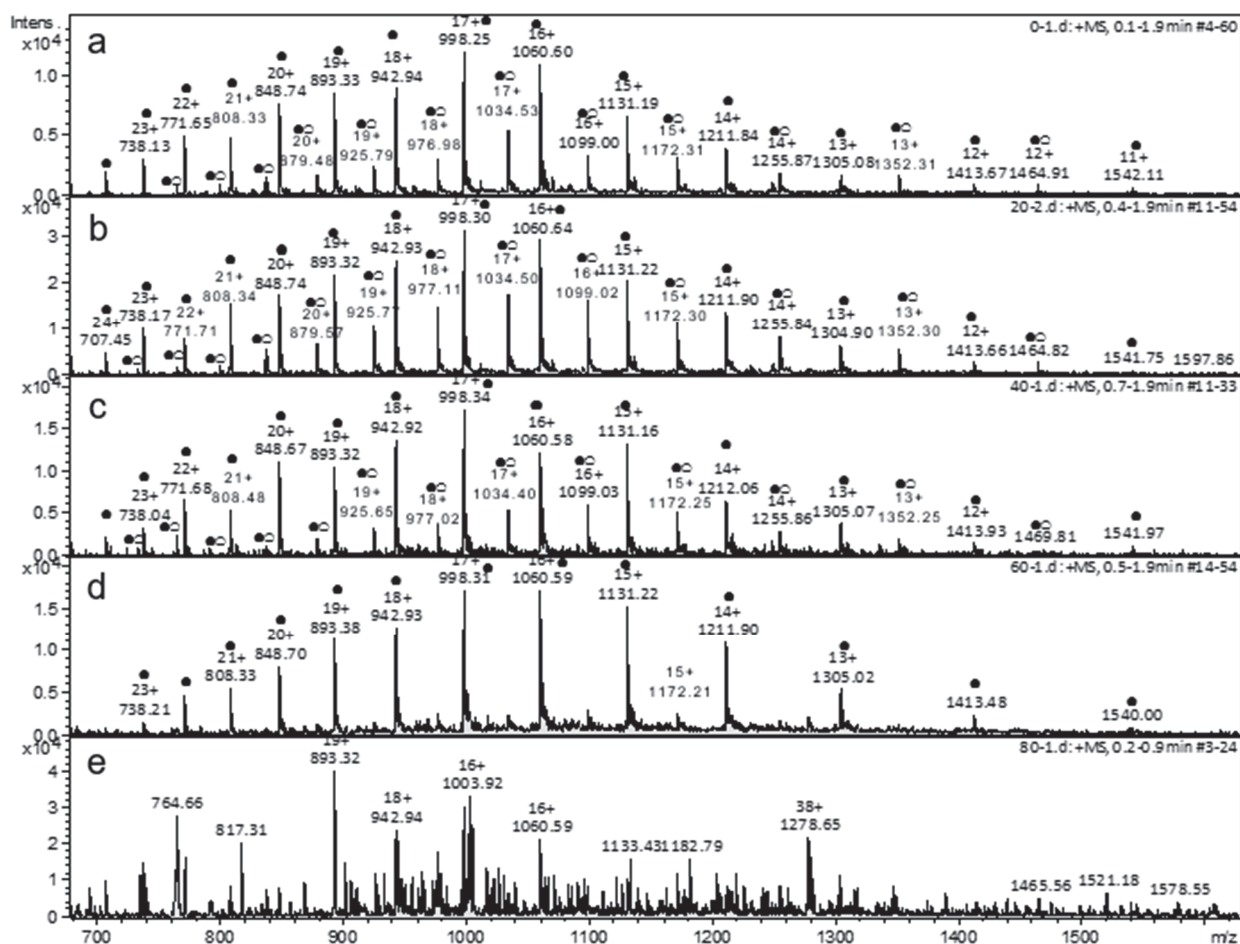


图2 不同甲醇比例下肌红蛋白与其铁卟啉辅基弱相互作用电喷雾质谱图

●○肌红蛋白与铁卟啉辅基复合物的多电荷电喷雾质谱峰; ●解离铁卟啉辅基后的肌红蛋白多电荷电喷雾质谱峰

(a) 未加甲醇; (b) 20%甲醇溶液; (c) 40%甲醇溶液; (d) 60%甲醇溶液; (e) 80%甲醇溶液

另外, 加入醋酸的组别(图3)与不加醋酸的组别(图2)相比, 特别是图3e与图2e相比较, 同样是在80%的甲醇溶液中, 酸的引入可以大大提升蛋白质的离子化效率, 表现出良好的质谱检测信号峰(图3e)。这也说明了在蛋白质、多肽的质谱检测过程中, 加有机酸提高其离子化效率的重要性。另外, 10 μL 0.1%醋酸的使用, 甲醇含量为0时(图3a), 完整的肌红蛋白复合物以及解离蛋白质可以同时检测到, 当甲醇含量提高到40%时, 铁卟啉环辅基与肌红蛋白仍保持较为强烈的相互作用, 除了部分解离的蛋白质外, 复合物的多电荷峰也可以显著地检测到, 在质谱图上呈现较为良好的近似正态分布的多电荷峰型(图3c)。但是, 当甲醇含量提高到60%时, 肌红蛋白复合物完全解离, 释放出铁卟啉环辅基, 在质谱设定的扫描范围中呈现出蛋白质的近似正态分布的多电荷峰型(图3d)。

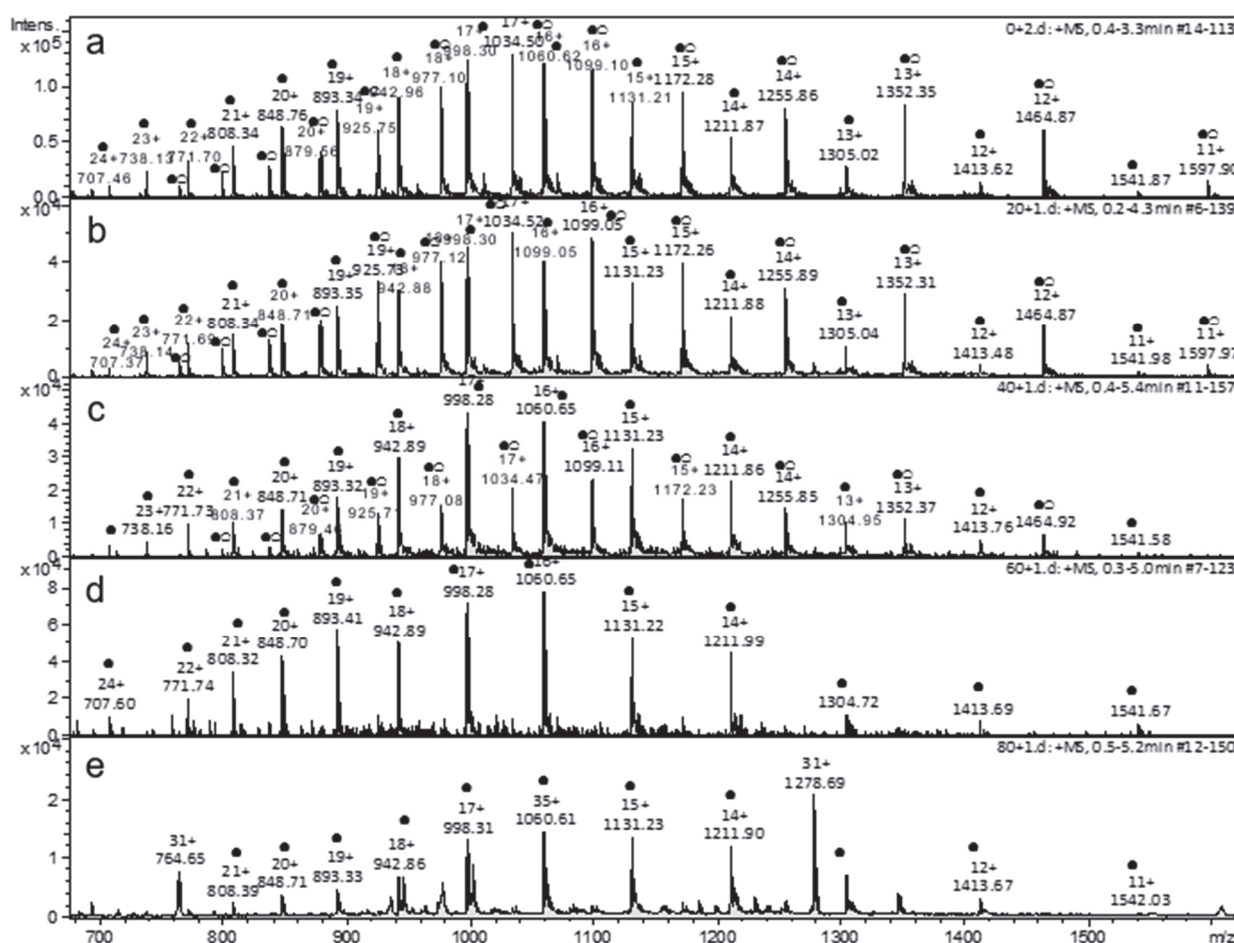


图3 10 μL 0.1%醋酸环境不同甲醇比例肌红蛋白与其铁卟啉环辅基弱相互作用电喷雾质谱图

●肌红蛋白与铁卟啉环辅基复合物的多电荷电喷雾质谱峰; ○解离铁卟啉环辅基后的肌红蛋白多电荷电喷雾质谱峰

(a) 未加甲醇($\text{pH} \approx 6$); (b) 20%甲醇溶液; (c) 40%甲醇溶液; (d) 60%甲醇溶液; (e) 80%甲醇溶液

利用Compass DataAnalysis软件中Deconvolution功能, 对谱图进行去卷积分析, 可以获得质谱图2、图3上蛋白质峰所带电荷数的指认。通过多电荷峰的质荷比, 以及相应的电荷数, 可以推算出原蛋白质的分子量。以图3b为例, 经去卷积计算分析, 图中肌红蛋白复合物平均分子量为17570.00 Da, 铁卟啉辅基解离后的肌红蛋白平均分子量为16954.73 Da, 两者之间分子量相差615.27 Da, 该丢失的分子量可能对应肌红蛋白复合物解离下来的相互作用的功能小分子铁卟啉环辅基。

为探究该中性丢失小分子的结构特征, 对质谱信号强且肌红蛋白复合物完全解离的图3e样品进行二次测试, 调节质谱测试的扫描范围为200–1200 m/z , 在该质谱扫描范围内, 寻找 $[615 + \text{H}]^+$ 峰,

即616 m/z 质谱信号峰。研究表明, 图3e样品在扫描范围200–1200 m/z 中, 确实检测到极强的616 m/z 质谱信号峰, 对该分子离子峰进行二级质谱碎裂分析, 结果如图4所示。

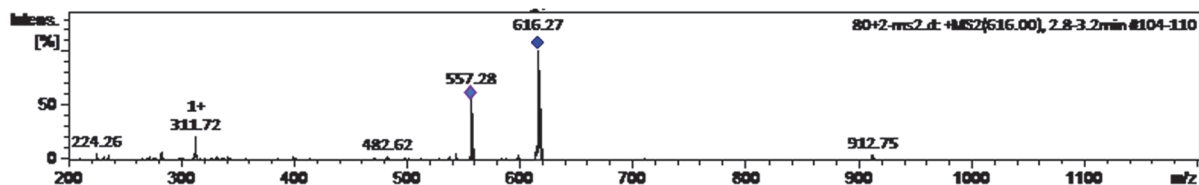


图4 分子量616.27捕获的二级碎裂电喷雾质谱峰

从图4中可以观察到, 所捕获的分子离子峰616.27 m/z , 经二级质谱碰撞诱导解离(Collision-Induced Dissociation, CID)后, 最典型的碎裂特征是: 中性丢失59 Da, 产生碎片峰557.28 m/z 。中性丢失59 Da, 可以通过C–C键的均裂, 以乙酸自由基形式($\cdot\text{CH}_2\text{COOH}$)离去而实现, 因此, 分析辅基结构中可能含有乙酸基团, 与铁卟啉环辅基结构特征一致(图5)。

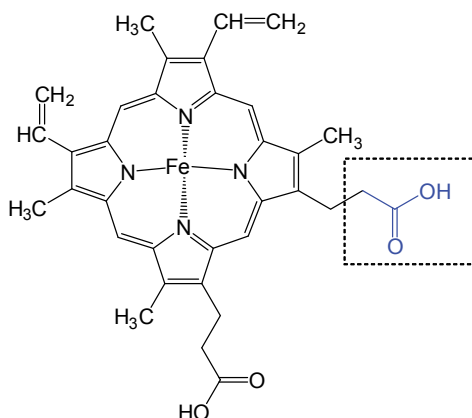


图5 铁卟啉环辅基结构式

方框中为乙酸基团

4 结语

质谱测试之前的样品前处理是质谱测试结果好坏的关键。学生在大学四年级之前的仪器分析等理论课上对质谱分析的基本原理等都有所了解, 但是质谱测试前的样品前期准备的相关知识缺少培训。另外, 厦门大学化学化工学院“化学生物学综合实验”安排在大四秋季学期, 学生正好都处于进入实验室进行本科毕业论文设计实践阶段, 有利用质谱分析样品的潜在需求。因此, 在做实验之前, 结合PPT将背景知识以及常规质谱配样、上机操作的基本注意事项对学生进行详细讲解。引导学生掌握基本的质谱分析、样品制备的基本常识(如质谱正负离子检测模式选择的依据、二级质谱的测试意义、样品脱盐处理的基本方法、质谱图软件分析方法等)。引导学生观察、思考不同样品测试条件下, 肌红蛋白复合物在电喷雾质谱全扫描中的表现形式的差异形式是什么, 差异产生原因是什么。蛋白样品的称量由助教完成。所有蛋白样品溶液的配制由学生现场完成, 现用现配。建议分组进行教学实验, 1组安排5–6名同学。每次实验安排1组同学, 可以统一配制一组Solution B1–10的待测样品, 小班教学实验过程中可以保证每位同学都可以独立进行实际的上机操作。整个实验时长约3–4小时(包括PPT讲解时间)。

最后, 需要说明的是, 本教学实验提供了一种利用简单的蛋白质复合物模型来模拟酶抑制剂直接筛选过程的策略, 适合于没有现成“目标酶及潜在抑制剂”筛选体系的学校开展相关教学工作。

如果原有教学平台已具有“目标酶及潜在抑制剂”的筛选体系，可以将该质谱实验的设计原理直接用于自身的筛选体系。另外，为了让学生在一次样品测试中能同时观察到肌红蛋白复合物和解离的蛋白质的多电荷质谱信号峰，以及两组多电荷质谱峰的变化趋势，不必让学生过于刻意地、耗时地现场优化出只有蛋白复合物而没有解离峰的质谱测试条件。此外，由于卟啉环结构稳定，在CID二级质谱碎裂模式下不容易碎裂，因此在探究其结构的过程中，我们仅仅进行了二级质谱裂解。对于其他实际样品而言，若其小分子配体结构在CID模式下容易解离为分子量不同的各种碎片离子，则可以进一步对其进行三级及以上的多级分析，对每一级碎裂下来的碎片峰进行多级分析可以更好地获知并了解该配体更为详尽的结构信息，这也是多级质谱在研究化合物结构特征的优势和独特作用。

参 考 文 献

- [1] 张瑞萍, 再帕尔·阿不力孜. 分析测试学报, **2005**, No. 1, 117.
- [2] Downard, K. M. *Mass Spectrom. Rev.* **2016**, 35 (5), 559.
- [3] Lin, X.; Zhao, W.; Wang, X. *J. Mass Spectrom.* **2010**, 45 (6), 618.
- [4] de Boer, A. R.; Lingeman, H.; Niessen, W. M. A.; Irth, H. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2007**, 26 (9), 867.
- [5] 刘艳, 甘杰鹏, 于腊佳, 赵玉芬. 大学化学, **2014**, 29 (5), 62.