

电喷雾离子阱质谱法研究蛋白与小分子配体间非共价结合的方法学探讨

曹 焱, 韩凤梅, 陈 勇*

(湖北大学 中药生物技术省重点实验室, 湖北 武汉 430062)

摘要: 以小檗碱与 α_1 酸性糖蛋白间的非共价结合作为例, 提出了一种新的质谱滴定法。其主要假定条件是: 当蛋白与小分子配体间有一定亲和力, 且作用配体的摩尔量大于作用蛋白的摩尔量时, 蛋白复合物总浓度与作用蛋白总浓度近似相等。通过不同摩尔量比的小檗碱对 α_1 酸性糖蛋白的电喷雾离子阱质谱 (ESI-IT/MS) 滴定实验, 分析小檗碱与 α_1 酸性糖蛋白复合物的结合特点, 并应用荧光法进行验证。结果表明应用质谱滴定法与荧光法得到的小檗碱与 α_1 酸性糖蛋白复合物的结合特性常数 (如稳定常数、结合位点数、作用力类型) 基本相同。与传统质谱滴定法相比, 本文提出的 ESI-IT/MS 滴定法用于蛋白与小分子配体间非共价结合特性研究, 所用仪器相对便宜, 方法简单且适应性强, 在一些研究体系中可得到更准确的实验结果。

关键词: 电喷雾离子阱质谱; 荧光; 小檗碱; α_1 酸性糖蛋白

中图分类号: O657; R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)04 - 0408 - 05

Methodology of electrospray ion trap mass spectrometry for analyzing the non-covalent binding of protein and low-molecular-weight ligand

CAO Yi, HAN Feng-mei, CHEN Yong*

(Hubei Provincial Key Lab of Bio-Technology of Traditional Chinese Medicine, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: A new MS-titration method for the non-covalent binding of protein-ligand based on the research of berberine and α_1 -acid glycoprotein was established. The major presumption of new method is that the total concentration of protein-ligand complex is approximately the same as the total concentration of acting protein if a certain extent of affinity is existed between protein and ligand, in addition, the mole amount of acting ligand is more than that of acting protein. The non-covalent binding behaviours between berberine and α_1 -acid glycoprotein was studied by using electrospray ionization ion trap mass spectrometry (ESI-ITMS), and the results were verified by fluorescence quenching method. The results showed that the binding behaviours between berberine and α_1 -acid glycoprotein, for example, stability constant, number of binding site, type of the main binding force, were almost the same by using the new MS-titration method and fluorescence quenching method. Comparing with the reported MS-titration method, the presented MS-titration method in this paper is more simple and applicable, does not demand much for the devices, and can lead to reliable results in same cases.

Key words: electrospray ion trap mass spectrometry; fluorescence; berberine; α_1 -acid glycoprotein

目前,电喷雾质谱 (ESI-MS) 以其“软电离”质谱特性已广泛用于蛋白非共价结合特性研究,具有样

品用量少、灵敏度高、特异性强、分析快速及复合物化学计量比准确等优点^[1], 质谱法研究蛋白非共价结合体系的难点是如何测定游离蛋白与游离配体浓度^[2]。目前,质谱滴定法已广泛用于蛋白非共价结合特性研究^[3], 该法所依据的主要假定条件是在液相的游离、结合蛋白浓度与其对应的在气态时的质谱离子丰度间具有基本相同的线性比例关系, 这在

收稿日期: 2006-07-07.

基金项目: 湖北省杰出青年基金资助项目 (2002AC004); 中药生物技术省重点实验室开放基金资助项目 (040106)。

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 27 - 88663590,
E-mail: cy101610@npc.gov.cn

很多情况下是不成立的^[4]。同时,质谱滴定法用于蛋白非共价结合体系研究所用的质量检测器均为昂贵的飞行时间质谱(TOF)^[5],发展的技术方法如 SUPREX法^[2,6](MALDI-MS-based stability determination method)和 PLIMSTEX法^[2,6](the method of protein-ligand interaction in solution by MS, titration, and H/D exchange),不仅仪器昂贵,方法复杂,而且在方法学上还涉及到大量的近似处理^[2,4,6]。

本文以 α_1 酸性糖蛋白(α_1 -acid glycoprotein, AAG)与小檗碱(berberine, BER)的非共价结合研究为例,提出了一种应用电喷雾离子阱质谱(ESI-IT/MS)研究蛋白非共价结合特性的新质谱滴定法,该法所依据的主要假定条件是:当蛋白与小分子配体间有一定亲和力,且作用配体的摩尔量大于作用蛋白的摩尔量时,蛋白复合物总浓度与作用蛋白总浓度近似相等。并以荧光法实验结果为对照,探讨了新方法的可行性。

仪器与试剂 LCQ^{DUO}型液质联用仪(美国 Finnigan公司,包括电喷雾电离源, TSP AS3000自动进样器,样品相对分子质量分析使用仪器自带的 Xcalibur软件); RF-540岛津荧光分光光度计; pH S-3C型精密 pH计。盐酸小檗碱(中国药品生物制品检定所), α_1 酸性糖蛋白(Sigma公司),色谱纯甲醇(美国 Fisher公司),其余试剂均为分析纯。

实验方法 电喷雾离子阱质谱法:取 $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ α_1 酸性糖蛋白(AAG)溶液 $50 \mu\text{L}$ 和不同体积 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸小檗碱(BER)溶液于各 Ep管中,用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸缓冲液(pH 7.2)定容至 $500 \mu\text{L}$,配置 1:1, 1:3, 1:6, 1:9, 1:12, 1:15, 1:30, 1:60, 1:90, 1:120和 1:150摩尔比 AAG/BER混合液,混合均匀后于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴作用 1 h,再用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸缓冲液(pH 7.2)稀释 100倍后进行质谱分析。另配摩尔比 60:1的 BER/AAG混合液,于 $27 \text{ }^\circ\text{C}$ 作用 1 h,用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸缓冲液(pH 7.2)稀释 100倍后进行质谱分析。质谱分析条件为:离子源喷射电压 4.5 kV 、毛细管温度 $190 \text{ }^\circ\text{C}$ 、毛细管电压 35 V 、扫描范围 m/z 350 ~ 2 000、鞘气(N_2)流速 $0.60 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$;流动相分别为 100%甲醇(用于 BER), 50%甲醇-50%水(用于 AAG)、100%水(用于 AAG-BER),进样量 $20 \mu\text{L}$,流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;一级正离子全扫描 10 min。

荧光法:于 10 mL 比色管中依次加入 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl溶液 2 mL , $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl缓冲溶液(pH 7.2) 2 mL , $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ AAG溶

液 2 mL ,用水稀释至 10 mL ,摇匀, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中恒温 10 min。取该溶液 2.5 mL 置于 1 cm 比色皿中,分别加入 0, 20, 40, 60, 80 和 $100 \mu\text{L}$ $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ BER,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴作用 1 h。以 AAG空白溶液为参比溶液,固定激发波长为 288 nm 扫描荧光发射光谱,发射波长为 340 nm ($S=1, O=2$)扫描速度为快速,实验温度分别为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $27 \text{ }^\circ\text{C}$,测量混合溶液的发射光谱。

实验结果

1 电喷雾离子阱质谱法

1.1 相对分子质量测定 小檗碱相对分子质量:将 $3.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BER水溶液经 ESI-MS一级正离子全扫描,测得小檗碱相对分子质量为 336.2,与小檗碱的理论值 336.37基本相符。

AAG分子质量:图 1是 $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AAG的一级正离子全扫描质谱图,经 Xcalibur软件(该软件关于相对分子质量计算的基本原理:由图 1A数据中不同的电荷数与相应的质荷比乘积之和取其平均,为软件自带功能)分析计算所进样品 AAG的分子质量,经几次反复测定求得 AAG的平均分子质量为 $44\,094 \text{ Da}$ ($\text{RSD}=0.039\%$, $n=5$),与其理论分子质量 $44\,100 \text{ Da}$ 基本相符,图 1B为其中一次蛋白分子测定的分子质量结果图。

1.2 复合物结合特性分析 复合物分子质量测定及化学计量比:通过分别测定不同浓度的 BER与固定浓度 AAG作用后复合物分子质量的变化,可计算 BER与 AAG的化学结合计量比 $N = (M_{\text{复合物}} - M_{\text{蛋白}}) / M_{\text{药物}}$,式中 M 代表分析物分子质量。图 2是 BER/AAG为 60:1时复合物的质谱分析图,图 3是不同浓度 BER对固定浓度 AAG的滴定曲线,在 BER/AAG大于 60:1,二者的结合开始呈现饱和趋势。从图 4可知, AAG与 BER结合的最大表观化学结合计量比 N 为 1:6.7。

复合物作用力类型:药物与蛋白间的作用力包括氢键、范德华力、静电引力、疏水作用力等。Masaki Otagiri根据大量的实验结果总结出判断生物大分子与有机小分子等结合力性质与结合作用热力学函数之间的关系,即: $\Delta S > 0$ 为疏水和静电作用力; $\Delta S < 0$ 为氢键和范德华力; $\Delta H > 0, \Delta S > 0$ 为典型的疏水作用力; $\Delta H < 0, \Delta S < 0$ 为氢键和范德华力; $\Delta H < 0, \Delta S > 0$ 为静电作用力^[7]。通过改变反应作用温度,经公式(1)和(2)可计算温度变化时药物蛋白结合的 $\Delta H, \Delta S$ 。

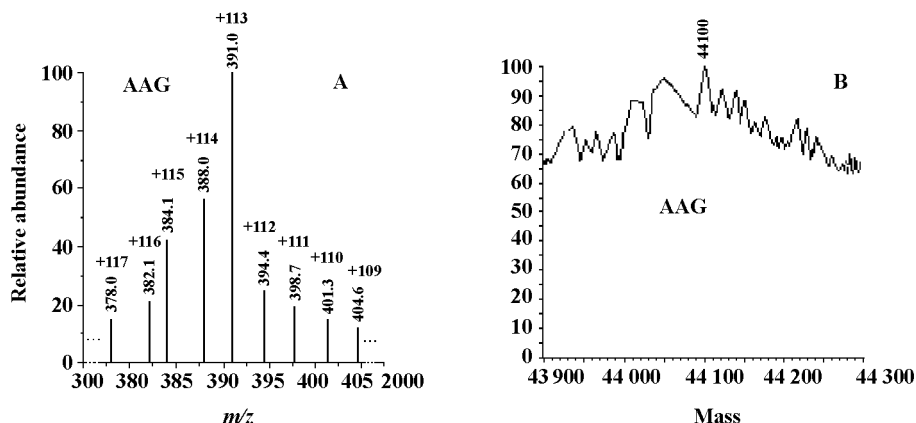


Figure 1 ESI-MS spectra (A) and the average molecular weight calculation (B) of $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AAG using 1:1 methanol-water as mobile phase

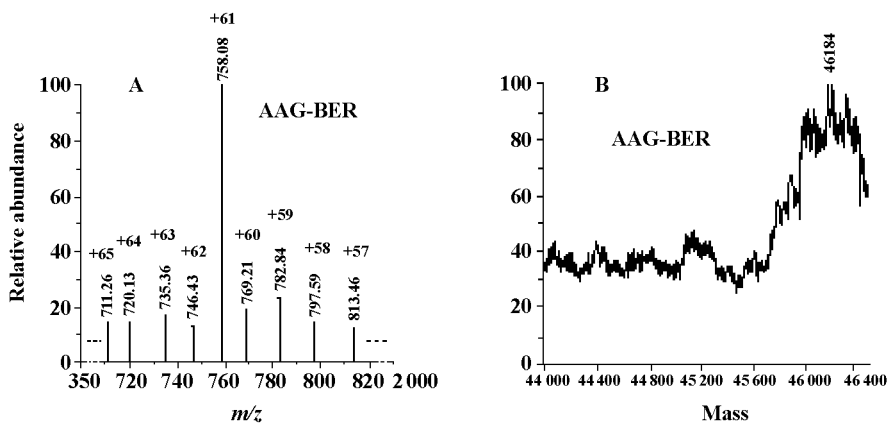


Figure 2 ESI-MS spectra (A) and the average molecular weight calculation (B) of 1:60 AAG/BER molar ratio in ammonium acetate, pH 7.2 using water as mobile phase

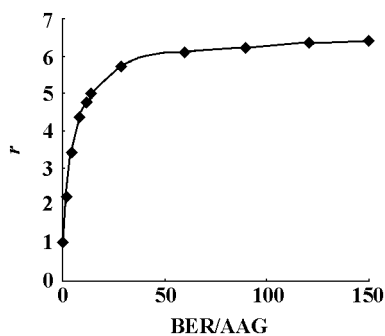


Figure 3 ESI-MS titration plot from ESI-MS titration experiment for binding of BER to AAG. The reaction concentration of AAG was $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

首先,根据式(4)计算了复合物 AAG-BER在作用温度为 27 °C, 37 °C时的稳定常数 K 值(结果见表 1),再根据式(1)和(2)分别计算了 AAG-BER复合

物在上述温度变化时的 ΔH 和 ΔS ,式中 T_1 和 T_2 分别为 27 °C, 37 °C的绝对温度, K_1 和 K_2 为与之对应的结合常数。

Table 1 The binding constants at different reaction temperatures

$T/^\circ\text{C}$	27	37
$K_{(\text{AAG-BER})}$	1.713×10^5	1.933×10^5

$$\ln K_2 / K_1 = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2) / R \quad (1)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \quad (2)$$

根据式(1)和式(2)计算得 $\Delta H = 9.337 \text{ kJ}$, $\Delta S = 131.27 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ 。可见小檗碱与 α_1 酸性糖蛋白之间的作用力主要为疏水作用力。

复合物稳定常数:药物与血清中蛋白质分子存

在非共价键作用,这种作用多采用位点结合模型解释,这是一种纯经验模型。在这种模型下蛋白质分子存在多类结合位点且各类结合作用是等同和独立的,可采用多级结合方程式(3)来说明^[8]:

$$r = \frac{C_b}{[P]} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i K_i C_f}{1 + K_i C_f} \quad (3)^{[9]}$$

式中 C_b , C_f 分别为药物的结合浓度与游离浓度, $[P]$ 为结合蛋白质浓度, r 是药物与蛋白的结合比, m 表示蛋白质共有 m 类结合位点, n_i , K_i 分别表示一个蛋白质分子上第 i 类结合位点的位点数目及结合常数。这个方程从形式上来说类似于 Langmuir 吸附方程,当蛋白质分子仅有一类结合位点时,此方程可转化为著名的 Scatchard 方程^[10]:

$$r/C_f = nK - Kr \quad (4)$$

式中 r 为药物与蛋白的结合比即化学计量比, C_f 为游离药物浓度 ($= C_L - r[P]$), C_L 是药物总浓度, K 为结合常数, n 为结合位点数。

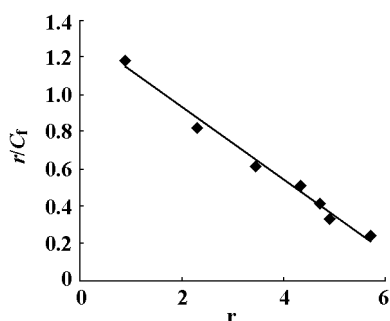


Figure 4 Scatchard-analysis plot from ESI-MS titration experiment between BER and AAG. The molar ratios of BER to AAG were 3, 6, 9, 12, 15, 30 and 60, separately

因此,当固定 AAG 浓度不变时,用不同浓度的 BER 与之作用并测定复合物相对分子质量,依据相对分子质量变化求得不同浓度比时 AAG 与 BER 的结合比 r ,再根据式(4)对 r/C_f 与 r 进行线性拟合可得到图 4。由图 4 曲线的斜率和截距可计算出 BER 与 AAG 形成复合物的表观稳定常数 K 和结合位点数 n 分别为 $1.933 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $n = 6.7$ 。

2 荧光法

2.1 荧光光谱 从图 5 可以看出,在 37 °C 的作用环境下,固定 AAG 浓度,在溶液中不断增加小檗碱的浓度, AAG 的内源荧光强度均有规律的降低,发射峰的峰位和峰形渐渐发生改变, AAG 荧光峰出现

双峰,说明随着小檗碱浓度的进一步增大引起了 AAG 构型的改变,产生特征发射。

2.2 稳定常数,结合位点数 由 Scatchard 方程可知,若荧光仅为 AAG 产生,则 $F_0/F = [P_L]/[P_f]$, 由此得:

$$r = ([C_L] - [C_f]) / [P_L] = n([P_L] - [P_f]) / [P_L] \\ = n(F_0 - F) / F_0$$

其中 $[C_L]$, $[C_f]$ 分别为体系中药物的总浓度和游离浓度, $[P_L]$, $[P_f]$ 为体系中 AAG 的总浓度和游离浓度, F_0 , F 分别为不加入和加入药物后 AAG 的荧光强度,由以上式子可推出:

$$F_0/F = K[C_L]F_0 / (F_0 - F) - nK[P_L]^{[11]}$$

37 °C 作用环境下,固定 AAG 浓度 $[P_L]$, 改变药物分子浓度 $[C_L]$, 以 F_0/F 对 $[C_L]F_0 / (F_0 - F)$ 作图得图 6, 由该直线的斜率和截距求得小檗碱与 AAG 复合物的结合常数 $K = 1.851 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 结合位点数为 6.9。同理求得 27 °C 作用环境下小檗碱与 AAG 复合物的结合常数 $K = 1.641 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

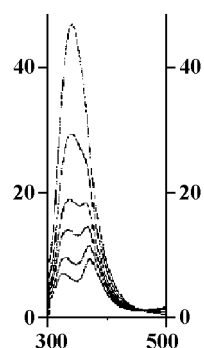


Figure 5 The effect of berberine on the fluorescence emission spectrum of AAG. The added volume of BER are 0, 20, 40, 60, 80 and 100 μL

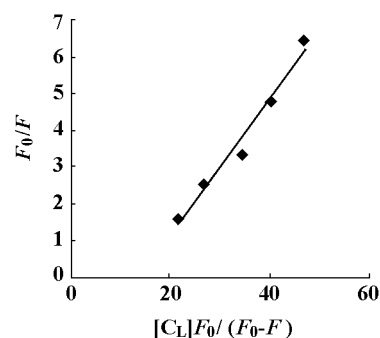


Figure 6 The Scatchard plot of AAG and BER

讨论

应用质谱法直接研究蛋白非共价结合的难点在于如何确定游离与结合蛋白浓度。本文基于质谱滴定法提出的 ESI-ITMS 滴定法研究蛋白非共价结合特性,适用于蛋白与小分子配体间存在一定亲合力的体系,可能不适用于亲合力较弱的体系。因为蛋白与小分子配体间亲合力太弱而配体相对作用蛋白大大过量时,蛋白与配体间的非特异性结合会严重影响方法的测定结果。因此,应用本方法获得较准确的蛋白非共价结合参数的关键是要确定本方法适用的蛋白-小分子配体间的亲合力范围。同时,与文献报道的质谱滴定法一样,要严格优化实验条件以尽可能排除非特异结合等。本课题组应用本方法研究了小檗碱与 α_1 酸性糖蛋白间的非共价结合特性,结果与荧光法实验结果基本一致,说明本方法具有一定适应性。

References

- [1] Wang HX, Yang SC. The development of electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) in studies of non-covalent protein complexes [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2001, 36: 315 - 320.
- [2] Joseph AL, Hu PF, Patrick M, et al. A study of Src SH2 domain protein-phospho-peptide binding interactions by electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 1997, 8: 234 - 243.
- [3] Daniel JM, Mccombie G, Wend S, et al. Mass spectrometric determination of association constants: adenylate kinase and two noncovalent inhibitors [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2003, 14: 442 - 448.
- [4] Michael P, Udo HV, Paul K. Features of the ESI mechanism that affect the observation of multiply charged noncovalent protein complexes and the determination of the association constant by the titration method: biological mass spectrum [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2004, 15: 1424 - 1434.
- [5] Frank S, Carol VR. Characterising electrosprayed biomolecules using tandem-MS — the noncovalent GroEL chaperonin assembly [J]. Int J Mass Spectrom, 2004, 236: 25 - 32.
- [6] Mei MZ, Raghu C, Michael LG. PLIMSTEX: a novel mass spectrometric method for the quantification of protein-ligand interactions in solution [J]. Int J Mass Spectrom, 2005, 240: 213 - 220.
- [7] Ross DP, Sabramanian S. The thermodynamics of protein association reactions—forced contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20: 3096 - 3102.
- [8] Wang HL, Zou HF, Zhang YK. Studies on the competition coordination between drug and protein by microdialysis-LC [J]. Sci Sin B (中国科学 B 辑), 1998, 28: 71 - 77.
- [9] Liang WQ. Biopharmaceutics and Pharmacokinetics (生物药剂学与药物动力学) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 94.
- [10] Scatchard G, Scheinberg IH, Armstrong SH. Physical chemistry of protein solutions [J]. J Am Chem Soc, 1950, 72: 535 - 540.
- [11] Zhao CC, Zheng WF, Li MQ. The interaction of berberine and human serum albumin [J]. Spectrosc Spectral Anal (光谱学与光谱分析), 2004, 24: 111 - 113.