

应用ESI-MS研究pH 5.6甲醇诱导肌血球素构象变化

姜 丹, 储艳秋, 丁传凡

(复旦大学化学系, 激光化学研究所, 上海 200433)

Methanol-induced Conformation of Myoglobin at pH 5.6 by ESI-MS

JIANG Dan, CHU Yan-qiu, DING Chuan-fan

(Laser Chemistry Institute, Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Using ESI-MS, adding different V:V methanol, study the conformation of Myoglobin at pH 5.6. The results showed that the concentration of methanol was higher to induce conformation similar and low charges at the central peak, different from conformation induced at pH 4.0.

Key words: ESI-MS; bimodal; tertiary interaction

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2008) 增刊-210-01

在pH为5.6时, 以ESI-MS对甲醇诱导的肌血球素构象变化进行研究, 获得与pH 4.0条件下不同的质谱信号, 产生相似中间态的甲醇诱导比例升高, 强信号峰离子显示出较低的带电荷数。

1 实验部分

PE Sciex API III Plus 电喷雾电离三重四级质谱仪; PHS-3CW 精密 pH 计: 上海理达仪器厂产品; 肌血球素: 购自 sigma 公司 (horse myoglobin); 化学试剂甲醇为分析纯; 去离子水。水和甲醇溶液中肌血球素浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。实验中, 甲醇的浓度含量从 0%~90% (V:V), pH 5.6, 电喷雾电离时样品进样速率为 $0.2 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

醇类作为变性剂可以稳定蛋白内的 α 螺旋, 但会使蛋白三级结构不稳定, 带来许多不同的蛋白部分折叠中间态, 这些中间态与蛋白自组装过程中的瞬间过渡态结构相近, 受到了人们的关注^[1-3]。早在 1972 年, Brunori 等人就报道了 pH 9.1 醇和热量对于蛋白质的变性影响。随后, 人们通过远近紫外吸收法、圆二色谱法、色氨酸荧光法等对醇诱导下的其他蛋白进行了相关研究。在 pH 4.0 的弱酸性条件下, 人们发现三氟乙醇对于中间态 aMb 具有稳定作用, Douglas 等对于此 pH 条件下的肌血球素的具体构象进行了详细研究, 发现甲醇的诱导带来了三种不同的平衡态。对于存在于生物体环境中的肌血球素来说, 常态的酸碱度应该接近于中性, 因此研究了 pH 5.6 时肌血球素的构象变化情况。

在甲醇/水的混合溶液中, 肌血球素在 pH 5.6 时的诱导构象变化。0%~25% 甲醇比例时, hMb 没有很强的信号峰; 25%~40% 时, 逐渐出现 hMb 峰, 最高峰位置为 hMb7⁺, 与 pH 4.0 相比, 具有的电荷数目更低, 这可能是由于溶液偏中性环境中, 能被质子化的氢数目较少; 40%~50% 时, hMb 最

(下转第 212 页)

作者简介: 姜 丹 (1984~), 女, 博士研究生。

通信作者: 丁传凡 (1962~), 男 (汉族), 安徽人, 教授, 从事生物质谱研究。E-mail: cfding@fudan.edu.cn

系数 r 分别为 0.995 7、0.996 5、0.991 4、0.998 3、0.999 4。高 ($0.234 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、中 ($0.779 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、低 ($4.985 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 浓度绝对回收率分别为 94.02%、90.82%、89.70%，各浓度连续 3 d 日内精密度 (RSD) 分别为第一批: 8.82%、2.90%、6.89%; 第二批: 7.48%、3.06%、3.35%; 第三批: 9.93%、1.19%、9.56%，日间精密度 (RSD) 分别为: 8.50%、2.46%、9.90%; 基质效应分别为 95.96%、97.88%、104.45%

3 结论

该方法简便快速、灵敏度高、专属性好, 较现有方法更适用于大量血浆样品的头孢克肟含量测定, 并已成功应用于头孢克肟生物等效性评价。

参考文献:

- [1] 朱 红. 头孢克肟的作用机制[M]. 国外医药抗生素分册, 2001, 22(4): 158-160.
- [2] MENG F, CHEN X Y, ZENG Y L, et al. Sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of cefixime in human plasma: application to a pharmacokinetic study[J]. Journal of Chromatography B, 2005, 819: 277-282.

(上接第 210 页)

高峰位置不变, 开始出现 aMb 的信号并逐渐增强, 出现双高峰的情况, 其他电荷数的蛋白峰新信号相对很弱, 离子集中在 19^+ 到 23^+ ; 50%~70% 时, 带电荷数目低于 20 的低信号峰均升高, aMb 10^+ 到 aMb 17^+ 各种电荷的离子强度平均化, 双高峰位置稳定变化为 13^+ 和 11^+ (示于图 1), 与 pH 4.0 相比, aMb 结构的 2 种状态电荷数目都较低; 甲醇浓度大于 70% 时, aMb 双峰消失, 最高峰移动为 aMb 18^+ , hMb 7^+ 信号明显下降, 接近与酸性条件下诱导的中间态 (示于图 2)。

pH 4.0 时显示的类似实验结果为 3 个不同电荷分布状态, 高峰电荷数分别为 hMb 10^+ , aMb 18^+ 和 aMb 23^+ (50% 甲醇)。本实验条件下质谱图呈现 4 种不同的电荷分布, 高峰电荷数分别为 hMb 7^+ , aMb 13^+ 和 aMb 11^+ (70% 甲醇), 这些不同的质谱信号和平衡态情况可能是由于在不同的初始条件下, 醇诱导带来的溶液间氢键增强和三级结构的削弱这两种变化之间的竞争强弱不同造成的差异。

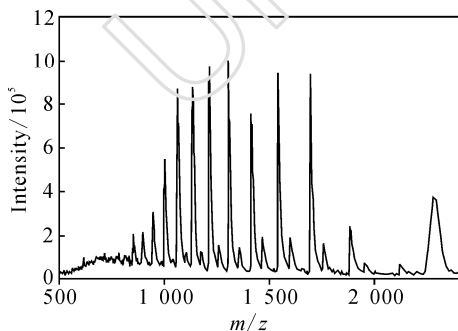


图 1 pH 5.59, 70% 甲醇诱导 Mb 质谱图

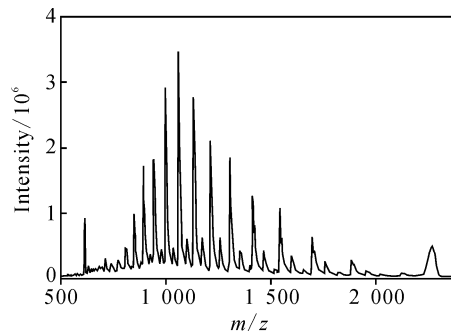


图 2 pH 5.57, 80% 甲醇诱导 Mb 质谱图

参考文献:

- [1] BRUNONI M, GIACOMETTI G M, ANTONINI E, et al. J Mol Biol, 1972, 63: 139-152.
- [2] LUO Y, BALDWIN R L. J Mol Biol, 1998, 279: 49-57.
- [3] KODALI R B, DOUGLAS D J. Biochemistry, 2000, 39: 14 702-14 710.