

碱性溶液中甲醇分子诱导的肌血球素构象变化

姜丹¹, 储艳秋¹, 陈南生^{1,2}, 丁传凡¹

(1. 复旦大学化学系激光化学研究所, 上海市分子催化和功能材料重点实验室, 上海 200433;

2. Department of Molecular Biology and Biochemistry, Simon Fraser University, Canada)

摘要 考察了不同 pH 值的碱性溶液中甲醇分子对诱导肌血球素构象变化的影响. 电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 测量结果表明, 当 pH 分别为 11.0, 11.4, 12.0 时, 不同体积分数的甲醇 (30%, 50%, 70% 及 90%) 和水混合溶液将诱导肌血球素的构象变化. 当 pH = 11.0 时, 肌血球素在溶液中均以 hMb 为主要形态存在 (即血红素稳定存在于肌红蛋白中); 当 pH = 11.4 时, 30% 甲醇中的肌血球素仍以 hMb 为主, 但升高甲醇比例会导致 hMb 上的辅基脱落生成 aMb (蛋白质分子); 当 pH = 12.0 时, 溶液中的肌血球素均以 aMb 为主. 但当应用负离子质谱测量模式时, 检测出的肌血球素负离子均以 aMb 构象为主. 同时采用圆二色谱 (CD) 及紫外-可见 (UV-Vis) 光谱等研究发现, pH 值和甲醇含量分别决定蛋白质分子的二级和三级结构的变化.

关键词 蛋白质; 分子构象; 电喷雾质谱; 肌血球素; 碱性溶液

中图分类号 O657.63

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)11-2139-07

肌血球素, 又名肌红蛋白 (Mb), 在自然状态下呈紧密的球形结构, 其内部存在袋状空穴, 血红素 (Hb) 作为肌血球素的辅基存在于其内部的袋状空穴中. Mb 的分子量约为 17600, 它能可逆地结合氧分子, 是存在于肌肉中的载氧物质. 在自然状态下, 血红素稳定地存在于 Mb 的空穴 (hMb) 中, 当 Hb 因诱导变性被移走后, 蛋白质分子 (aMb) 的稳定性就会下降^[1,2]. 研究表明, 温度、酸碱度、盐度和溶剂性质等都会改变蛋白质分子的结构, 如折叠状态^[3,4] 和生物功能. 由于醇分子诱导的蛋白质分子变性与细胞膜表面低 pH 值及低介电常数诱导的变性相似^[5], 因此备受关注. 1972 年, Brunori 等^[6] 报道了 pH = 9.1 时醇和温度对 Mb 的变性影响. 人们还通过荧光、量热法、核磁共振及小角度 X 射线散射等方法对醇分子诱导下的其它蛋白质分子进行了相关研究, 发现醇类分子作为变性剂可以稳定蛋白内的 α 螺旋, 但会使蛋白质分子的三级结构发生变化, 产生许多不同的部分折叠的蛋白质分子结构状态 (或称之为结构中间态), 这些中间态与蛋白质分子自组装过程中的瞬间过渡态结构相近^[7,8].

传统的检测方法对蛋白质的浓度要求较高, 无法提供瞬间中间态信息. 电喷雾电离 (ESI) 质谱技术是近年来发展起来的研究蛋白质分子结构和性质的主要方法之一^[9-11]. 它具有高灵敏度及高分辨率等优点, 不仅可以准确快速地得到分子组成和结构信息, 还可以得到蛋白质折叠状态变化的中间态信息^[12], 是研究环境因素对蛋白质结构和性质影响的有效手段. 圆二色谱 (CD) 及紫外-可见 (UV-Vis) 光谱等方法也是分析蛋白质构象变化的重要手段. CD 技术利用蛋白质对左右圆偏振光吸收的不同, 推测蛋白质的二级结构和三级结构变化; 利用紫外-可见光谱方法可以观察蛋白质分子的构象变化, 并分析蛋白质内部离子的配位情况和自旋状态^[13].

多电荷蛋白质分子离子的质谱分布可反映出溶液中的蛋白质分子结构. 正离子 ESI-MS 测量结果显示, 自然状态下紧密折叠的蛋白质分子的离子产物具有较少的电荷. Chowdhury 等^[14] 观测到细胞色素 c 的天然态和酸诱导状态在质谱图上的电荷分布明显不同, 这种现象可能是由于蛋白质分子变性后, 其暴露在溶液中的分子表面积增大, 提供了更多的可以获得质子的氨基残基 (负离子模式无此现象). De la Mora^[15], Heck^[16] 和 Nesatyy^[17] 等使用 Dole's 的电荷残基机制 (CRM), 比较了大量球体蛋白

收稿日期: 2009-07-07.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 25027004) 资助.

联系人简介: 丁传凡, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事蛋白质分子的结构与性质、生物质谱及光电子能谱研究.

E-mail: cfding@fudan.ac.cn

质在自然状态下的 ESI-MS 实验结果, 得到蛋白质半径和平均电荷的线性关系. 2005 年, Igor 和 Anirban^[18] 通过晶体数据和质谱数据获得电荷-表面积 (Z vs. S) 的指数关系为 0.69 ± 0.02 , 即蛋白质分子产生的离子所带电荷数与蛋白质分子暴露在溶液中的表面积成正比, 表面积增大表明紧密折叠的程度减弱, 也代表蛋白质分子诱导变性程度的加深. Douglas 等^[19] 研究了 $\text{pH} = 4.0$ 条件下的肌血球素的具体构象, 发现甲醇的诱导产生 3 种不同的平衡态, Baldwin 等^[20] 发现, 三氟乙醇对中间态 aMb 具有稳定作用, Sirangelo 等^[1] 也报道了六氟异丙醇对 Mb 的天然态溶液以及酸化变性溶液的不同诱导效应. 最近, Shirley 等^[21] 研究了苄醇等具有特殊结构的醇类分子对肌血球素构象的诱导作用. 这些报道都应用 ESI-MS 技术的正离子测量模式分析了酸性环境中蛋白质分子受到醇类分子诱导后产生的分子构象变化及其相关的动力学和热力学过程.

早在 1998 年, Douglas 等^[22] 就曾经对 3 种不同的蛋白质分子进行过正、负离子模式的 ESI 研究, 结果发现, 在同样的溶液中, 正、负离子模式显示出的离子电荷都高于天然态离子, 但呈现出不同的蛋白质结构, 认为负离子模式下的离子电荷分布无法直接反应溶液中的蛋白质结构, 负离子模式的机理也与正离子不同. 此后也有应用 ESI-MS 正、负离子模式对多肽及 DNA 分子进行检测的研究, 结果也给出不同的离子电荷分布^[23,24]. 在碱性溶液中, 由于溶液中的游离氢离子较少, 肌血球素电离得到的正离子所带正电荷数目较少, 导致对其进行质谱研究变得相对困难, 目前关于这方面的研究很少, 对于碱性溶液诱导作用与负离子模式质谱的工作机理仍没有明确的解释.

本实验室前期工作^[25] 报道了在酸性溶液中, 改变醇类分子的烷基数目、分子结构及醇类分子的含氟数目等对肌血球素诱导构象变化的影响, 得出了一定的规律. 本文在前期工作的基础上, 分别应用 ESI-MS 的正、负离子工作模式和 CD 和 UV-Vis 等方法较系统地研究了在不同 pH 条件下, 通过改变甲醇分子的体积分数 (0, 10%, 30%, 50%, 70% 和 90%) 诱导肌血球素分子发生的构象变化.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

肌血球素 (Mb, 取自马心), 纯度 90% 以上, 购自 Sigma 公司 ($m = 250 \sim 1882$ mg); 其余化学试剂均为分析纯, 购自上海凌峰化学试剂有限公司; 实验用水为去离子水.

电喷雾电离 PE-Sciex API III 型三级四极杆质谱仪 (加拿大 Concord, ON, m/z 2400); J-715 型圆二色仪 (日本分光株式会社); 8453 型紫外-可见分光光度计 (美国安捷伦公司); PHS-3CW 型精密 pH 计 (上海理达仪器厂).

1.2 实验过程

1.2.1 溶液配置 肌血球素溶液浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$. 溶液的 pH 值用不同体积分数的氨水调节, 分别为 $\text{pH} = 11.0$ (0.5% 氨水), $\text{pH} = 11.4$ (2% 氨水) 及 $\text{pH} = 12.0$ (10% 氨水), 辅以 0.05% 氨水微调. 溶液的甲醇体积分数分别为 0, 10%, 30%, 50%, 70% 及 90%. 溶液温度保持为 $24 \text{ }^\circ\text{C}$. 通过 PHS-3CW 精密 pH 计测量溶液的 pH 值.

1.2.2 ESI-MS 检测 保持电喷雾离子源 (ESI) 相对于质谱仪离子入口处的位置不变. ESI 工作电压为 4800 V, 实验在室温 [$(24 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$] 条件下进行. 质谱检测范围 m/z 550 ~ 2350, 扫描次数固定为 100 次, 单次质谱扫描时间为 18.1 s, 扫描间隔为 1 s, ESI 进样速率为 0.20 mL/h.

1.2.3 CD 检测 固定连续扫描模式, 扫描速度为 100 nm/min, 数据间隔 0.2 nm, 重复扫描 3 次. 扫描范围为 190 ~ 250 及 240 ~ 320 nm, 分别使用 1 mm 光程和 10 mm 光程的石英皿.

1.2.4 UV-Vis 吸收光谱 扫描波长为 480 nm, 扫描速度为 100 ms, 使用 10 mm 光程的石英皿. 检测范围为 190 ~ 1100 nm, 每组数据均经 3 次重复测定.

2 结果与讨论

2.1 电喷雾电离-质谱测定

由于 Mb 在诱导变性后会导致 Hb 脱落, 因此可在 ESI-MS 测量结果中观测到两组质谱峰 (如图 1

所示), 它们分别代表溶液内平衡的两种分子构象(aMb 和 hMb), 这就是质谱法直接观测 Mb 的分子构象大致分布的原理.

2.1.1 正离子工作模式下甲醇含量及溶液 pH 值的影响 固定溶液的 pH 值为 11.0, 即氨水的体积分数约为 0.5%, 改变甲醇的含量, 应用质谱仪的正离子工作模式进行测定. 从图 1(A) 可见, 在 50% 甲醇条件下, Mb 在溶液中以 hMb 的构象为主(hMb8⁺~hMb17⁺), 最高峰位于 hMb11⁺; 由图 1(B) 和 (C) 可见, 70% 和 90% 甲醇条件下 Mb 的离子分布与 50% 甲醇条件下的质谱图基本一致, 但最高峰均由 hMb11⁺ 升至 hMb12⁺. 可见, 随着甲醇含量的升高, Mb 离子所带电荷数升高, 即 Mb 的变性程度升高. 但由于 70% 与 90% 甲醇条件下电荷数相差不大, 可以初步认为甲醇含量升高到一定程度后, 影响蛋白质分子变性的增幅较小.

尽管在 pH = 11.0 时, 所有溶液中的 Mb 都是 hMb, 但并不代表此时的 Mb 仍与天然构象一致. 根据 Douglas 等^[19]对 Mb 的研究, 我们得到的 hMb8⁺~hMb17⁺ 与天然状态下的构象(hMb10⁺~hMb11⁺) 相比, 离子分布范围更广, 最高峰也从天然状态的 hMb10⁺ 升至 hMb11⁺, 说明此时 Mb 处于天然状态到强变性状态的转变过渡态, 这是前人研究中没有提到的一种过渡态.

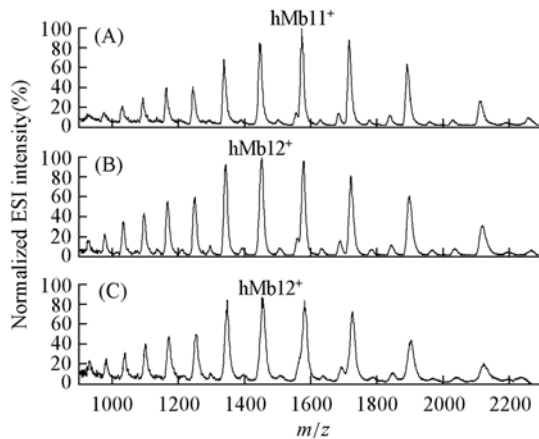


Fig. 1 ESI mass spectra of Mb with different volume fractions of methanol (pH = 11.0)

(A) 50% methanol; (B) 70% methanol;
(C) 90% methanol.

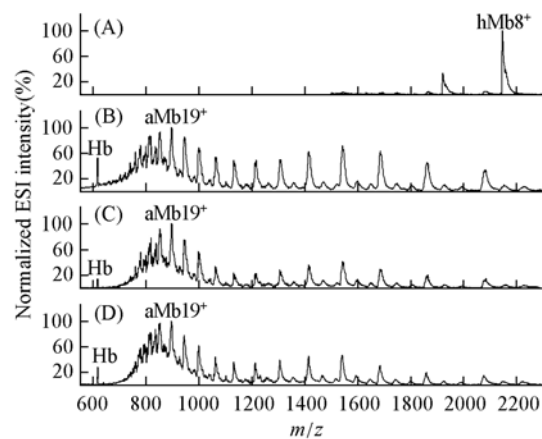


Fig. 2 ESI mass spectra of Mb with different volume fractions of methanol (pH = 11.4)

(A) 30% methanol; (B) 50% methanol;
(C) 70% methanol; (D) 90% methanol.

固定溶液的 pH 值为 11.4, 即氨水的体积分数约为 2%, 改变甲醇的含量, 应用质谱仪的正离子工作模式进行测定. 由图 2(A) 可见, 在 30% 甲醇条件下, Mb 的质谱信号仅表现为 hMb8⁺ 和 hMb9⁺ 两个峰; 由图 2(B)~(D) 可见, 50%, 70% 及 90% 甲醇条件下 Mb 的构象迅速由 hMb 转变为 aMb, 但正离子模式下的 3 种环境中的质谱信号非常接近(aMb8⁺~aMb22⁺), m/z 在 600~1000 范围内有峰产生, 但原因尚不明确, 其中 aMb19⁺ 为最高峰, 此后的最高峰都在 aMb11⁺ 处. 此时, 辅基 Hb 的峰也非常明显. 因此可以认为, 在 pH = 11.4 时, 甲醇的体积分数升高到 50% 以上时, Mb 的构象由 hMb 突然大规模转化为 aMb, 甲醇含量再升高对诱导构象变化的作用很小.

固定溶液的 pH 值为 12.0, 即氨水的体积分数约为 10%, 改变甲醇的含量, 应用质谱仪的正离子工作模式进行测定. 由图 3 可见, 当 pH = 12.0, 甲醇的体积分数为 30% 时, Mb 的构象为 aMb (aMb9⁺~aMb17⁺), 质谱中的最高峰为 aMb14⁺, 表明此时 Mb 已发生大幅度构象变化, 由于表面展开的面积增大, 导致产生更多的正电荷.

通过比较不同 pH 值下各种甲醇含量的质谱信息可以发现, pH 值是影响 Mb 构象变化的最主要因

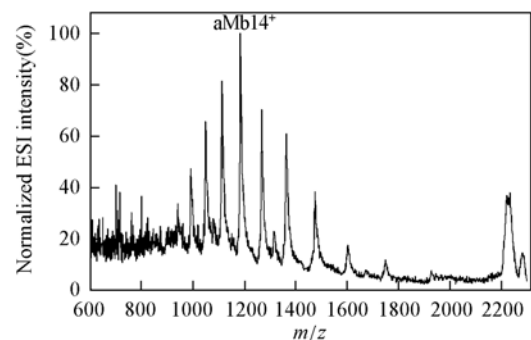


Fig. 3 ESI mass spectra of Mb with 30% methanol (pH = 12.0)

素, 在一定的 pH 值条件下, Mb 的主要构象基本不发生变化: 当 pH = 11.0 时, 过渡态 hMb 构象占主导; pH = 12.0 时, 变性 aMb 构象占主导. 同时, 甲醇也是重要的诱导因素. 在 pH = 11.4 时, 正是由于甲醇含量升高才导致了 hMb 及 aMb 构象向过渡态转变. 因此两者都会直接影响到碱性溶液中 Mb 的构象变化. 由于碱性溶液中 H⁺ 含量较少, 无法为蛋白质分子的氨基提供足够的正电荷, 此时所有构象中所呈现的电荷数比酸性溶液中^[19,25]的少. 蛋白质分子的变性主要受到溶液的游离态质子环境的制约, 在甲醇存在的情况下, 由于氢键作用, 使得蛋白质分子由紧密折叠态展开, 更多的氨基可以与溶液接触, 使构象产生逐步变化. 但 pH 值逐步升高及高比例甲醇带来变性程度的增大, 不能通过溶液中氢离子数目的变化来解释, 原因可能在于甲醇含量提高后, 溶液的疏水、亲水关系发生变化. 其中的机理仍需要进一步研究.

2.1.2 负离子工作模式下甲醇含量与溶液的 pH 值的影响 应用 ESI-MS 的负离子工作模式, 分别对所有溶液进行质谱检测, 结果如图 4 所示. 可见, 在 pH = 11.0, 90% 甲醇和 pH = 11.4, 70% 及 90% 甲醇溶液中可以得到较强的质谱信号, pH = 12.0, 70% 及 90% 甲醇条件下可以得到负离子信号, 但信号较弱.

图 4(A) 显示, 在 pH = 11.0, 90% 甲醇条件下, Mb 的负离子构象以 aMb 为主 (aMb9⁺ ~ aMb20⁺), 并含有少量 hMb, 最高峰为 aMb14⁺; 图 4(B) 显示, 在 pH = 11.4, 70% 甲醇条件下, Mb 的负离子构象以 aMb 为主 (aMb9⁺ ~ aMb15⁺), 并含有少量 hMb, 最高峰为 aMb12⁺, 信号绝对强度比图 4(A) 弱; 图 4(C) 显示, 在 pH = 11.4, 90% 甲醇条件下, Mb 的负离子构象以 aMb 为主 (aMb10⁺ ~ aMb20⁺), 含有少量 hMb, 最高峰为 aMb15⁺.

比较相应条件下的正离子质谱信号可以发现, 无论正离子构象是以 hMb 为主, 还是以 aMb 为主, 其负离子构象均以 aMb 为主. 比较两种 pH = 11.4 条件下的负离子信号可以发现, 提高甲醇含量有助于 Mb 产生更多的负电荷. 比较两种 90% 甲醇条件下的负离子信号也可以发现, 溶液碱性的升高也导致了 Mb 脱去更多的羧基氢. 由于碱性溶液条件更容易使蛋白质分子上的氢转变为离子游离出来, 而甲醇作为变性剂也容易诱导蛋白质分子展开而暴露更多的羧基, 因此实验现象符合了蛋白质分子在溶液中的变性规律. pH = 12.0 时反而无法获得良好的负离子质谱信号. 结合 pH = 11.0 的负离子信号强度优于 pH = 11.4 的结果, 这可能是由于溶液中的正离子和负离子的电离竞争关系导致的. 因为 aMb 会脱离 Hb 的正离子变成相应的负离子形式 hMb 比 aMb 更容易电离为正离子. 前者中 hMb 构象显示为正离子, 则 aMb 的负离子含量较高; 后者溶液中 hMb 变性为 aMb, aMb 此时以正离子形式带电荷, 则电离为负离子的数目减少. 由此也可以推测, pH = 12.0 时, aMb 负离子更难获得, 大部分都显示为正离子, 因此其负离子模式的强度非常低. 正、负离子模式的电离机理不同, 导致溶液中共存的不同蛋白质结构先后电离为正离子或负离子, 从而产生不同的离子分布状态. 因此, 负离子模式暂时还不能直接用于研究溶液中的蛋白质分子结构, 只可以为蛋白质的变性状况辅佐佐证, Douglas 等^[22]曾提出负离子模式更适于蛋白质三级结构的测定.

2.2 圆二色谱

远、近紫外-圆二色光谱可以分别提供多肽链的二级和三级结构信息^[26]. 二级结构是指蛋白质中单条肽链本身的折叠与螺旋构象, 三级结构是指蛋白质中肽链间的折叠盘绕结构. Mb 的近紫外 CD 光谱为精细结构, 274 nm 处的强烈信号可提供 Mb 三级结构的信息. 266, 274, 285 及 296 nm 附近的信号均为芳香基的特殊三级结构信息; 位于 209 及 222 nm 附近的强烈信号可以归属为 Mb 二级结构中 α 螺旋的信息^[15]. 图 5 为 Mb 在不同溶液中的远、近紫外-圆二色光谱图.

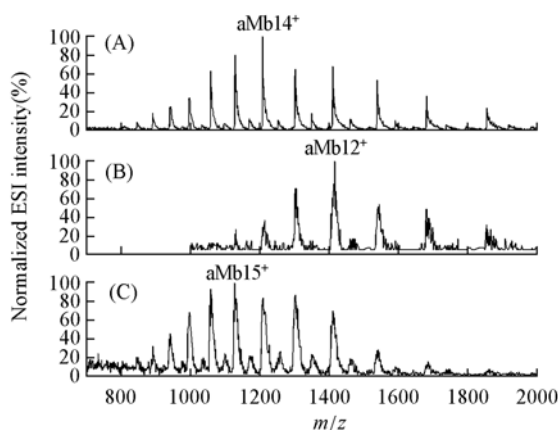


Fig. 4 ESI mass spectra of Mb under different conditions (negative mode)

(A) pH = 11.0, 90% methanol; (B) pH = 11.4, 70% methanol; (C) pH = 11.4, 90% methanol.

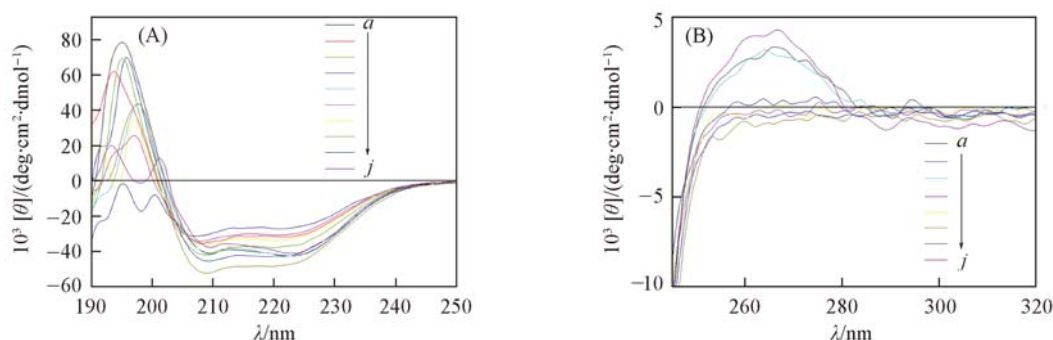


Fig. 5 Far-UV (A) and near-UV (B) CD spectra of Mb in different solutions

a. pH = 11.0, 30% methanol; *b.* pH = 11.0, 50% methanol; *c.* pH = 11.0, 70% methanol; *d.* pH = 11.0, 90% methanol;
e. pH = 11.4, 30% methanol; *f.* pH = 11.4, 50% methanol; *g.* pH = 11.4, 70% methanol; *h.* pH = 11.4, 90% methanol;
i. pH = 12.0, 30% methanol; *j.* pH = 12.0

由远紫外 CD 光谱[图 5(A)]可知,在 *a* (pH = 11.0 的 30% 甲醇), *e* (pH = 11.4, 30% 甲醇) 及 *j* (pH = 12.0, 不含甲醇的参比溶液) 3 种环境中, Mb 保留了自然状态下的三级结构, 肽链间的相互结构未被破坏. 而在其余条件下均被破坏[不含甲醇的 pH = 11.0, 11.4 参比溶液与不含甲醇的 pH = 12 参比溶液接近; 溶液 *b*, *c* 与 *d* (pH = 11.0, 甲醇体积分数分别为 50%, 70% 和 90%) 接近, pH = 12.0, 50% 甲醇溶液、pH = 12.0, 70% 甲醇溶液和 pH = 12.0, 90% 甲醇溶液与 pH = 12.0, 30% 甲醇接近, 未示于图 5 中]. 因此, 在 pH = 11.0, 11.4 的 30% 甲醇溶液中及 pH = 11.0, 11.4, 12.0 的无甲醇的溶液中, Mb 的三级结构均得以保留, 也即 pH 值不超过 11.4 时, 甲醇比例的高低决定了 Mb 三级结构是否被诱导变性. 提高甲醇含量达到 50%, 70% 及 90% 时, Mb 的三级结构改变, 这可能也是只有 70% 及 90% 甲醇溶液中的 Mb 才能得到负离子模式 ESI-MS 信号的原因之一.

由近紫外 CD 光谱[图 5(B)]可知, 溶液 *a*, *b*, *c* 及 *d* 都没有发生二级结构变性, 肽链的折叠构象得以保留. 从溶液 *e* 开始, 曲线发生红移, 二级结构表现出诱导变性的趋势. 当溶液变化为 *i* 时, 二级结构剧烈变性, 曲线由 195 nm 附近单高峰变化为两个分立的双高峰(图略). 同时, 不含甲醇的 pH = 11.0, 11.4 的溶液和不含甲醇的 pH = 12.0 的曲线趋势也分别与 *a*, *e* 及 *i* 相似. 参照计算得到的 α -螺旋和 β -折叠的数值(如表 1)也可以直观地了解其变性程度. 因此, 决定二级结构变性的因素为溶液的 pH 值. 同一 pH 值条件下, 改变甲醇体积分数只改变了曲线的峰高和相应的基线位置.

Table 1 CD calculate results of Mb in different solution

Solution	α -Helix (%)	β (%)	Turn (%)	Random (%)	Solution	α -Helix (%)	β (%)	Turn (%)	Random (%)
<i>a</i>	33.1	23.3	23.2	20.4	<i>f</i>	21.3	29.5	20.3	28.9
<i>b</i>	30.4	34.7	9.7	25.2	<i>g</i>	26.2	17.5	24.1	32.2
<i>c</i>	20.7	43.3	14.5	21.5	<i>h</i>	24.8	21.0	26.2	27.9
<i>d</i>	25.3	32.5	19.2	23.0	<i>i</i>	16.7	23.1	24.7	35.5
<i>e</i>	28.8	9.9	32.8	28.5					

表 1 为圆二色谱的各结构计算值, 根据计算结果可以看到, 溶液中的 α -螺旋比例随着溶液碱性和甲醇含量的升高逐渐下降. 根据文献[8]报道, 天然态 Mb 的 α -螺旋含量大约为 63.7%, 因此在上述 15 种溶液中, 肌血球素均处于变性的中间态, 即使是以 hMb 的构象存在, 也与天然态的构象有较大的差异.

2.3 紫外-可见吸收光谱

紫外-可见吸收光谱可以用于研究 Mb 中的铁离子的配位情况及电子自旋态^[13,27]. 410 nm 附近的 Soret 谱带与六配位高自旋的三价铁相对应, 也即 Hb 与 Mb 成键相连; 该谱带偏移至 397 nm 或更小时, 则代表 Hb 发生了状态变化; 该谱带偏于 386 nm 附近时, 则代表了五配位高自旋态.

分别测定了 pH = 11.0, 11.4, 12.0 及甲醇含量分别为 0, 30%, 50%, 70%, 90% 等共计 15 组溶液, 并选择具有代表性的 10 组紫外-可见吸收光谱示于图 6.

根据本实验室之前的研究结果, Mb 在自然状态下的最高峰为 410 nm, 范围较宽. 谱线 *j*, *k* 及 *l* 基

本都表明 Mb 更接近于自然状态,说明在没有甲醇存在的情况下, Mb 的构象基本没有发生变性;此外,谱线 *a* 表明,在 pH = 11.0, 只含 30% 甲醇时, Mb 的构象仍比较接近自然状态,只是最高峰略向低波长偏移;谱线 *d* 表明,当甲醇含量提高时, Mb 的谱线开始向 397 nm 附近偏移,说明 Hb 状态有所变化. 根据质谱信息可知,虽然 Hb 尚未脱落,但 Mb 的离子电荷数增多,这可能是构象变性过程中的某种中间态;谱线 *e* 则表明 pH = 11.4, 30% 甲醇时, Mb 仍以 hMb 构象存在;当甲醇比例升高后,谱线 *f*, *g* 和 *h* (pH = 11.4, 甲醇体积分数分别为 50%, 70% 和 90%) 逐渐向 397 nm 处移动,并有明显的位移. 峰强增大的规律,代表了 Mb 的构象变性程度的增强;谱线 *i* 的最高峰处于 397 及 410 nm 之间,约为 404 nm,结合质谱信息,该处也应为 Hb 脱落后带有部分高电荷离子的另一种中间态构象.

通过紫外-可见吸收光谱的信息,仍可以把 Mb 的构象分为 3 组:(1) 溶液中不含甲醇及 pH = 11.0, 11.4 和 30% 甲醇的溶液中, Mb 的最高峰位置基本处于 410 nm 附近,即 Mb 以 hMb 及低电荷数为主;(2) 在 pH = 11.4, 50%, 70% 及 90% 甲醇的溶液中, Mb 的最高峰基本处于 397 nm 附近,代表 Mb 以 aMb 及高电荷数为主,曲线峰高的下降表明分子内键强下降,结合能力下降;(3) 当 pH = 12.0 时, Hb 和 Mb 的结合能力再次下降,峰高比其它溶液都更低一些,最高峰的再次移动说明该过渡态中分子内铁离子的配位形态发生了变化.

3 结 论

应用 ESI-MS、CD 以及 UV-Vis 吸收光谱等实验方法较为系统地研究了在 pH = 11.0, 11.4, 12.0 时,通过改变甲醇分子的体积分数(0, 10%, 30%, 50%, 70% 及 90%),诱导肌血球素分子发生构象变化. 结果表明,肌血球素的分子构象与溶液中甲醇分子的体积比及溶液的 pH 值相关:当 pH = 11.0 时,肌血球素在各溶液中均表现为以 hMb 为主要形态,二级结构无变化;当 pH = 11.4 时,30% 甲醇中的肌血球素仍以 hMb 为主,而升高甲醇比例则会导致 hMb 上的辅基立刻脱落;当 pH = 12.0 时,溶液中的肌血球素均表现为以 aMb 为主. 此外,应用负离子模式,只有 70% 及 90% 等高甲醇含量的溶液中能表现出负离子质谱信息,且肌血球素均以 aMb 为主要形态. 在整个诱导过程中, hMb 与 aMb 之间存在不同的平衡,产生过渡态的电荷分布不同,分子内部铁离子的配位情况也发生了变化.

因此,碱性溶液下甲醇分子对于蛋白质分子结构诱导变性的规律基本如下:溶液的 pH 值决定了甲醇分子诱导 Mb 分子二级结构是否发生了变化,当碱性较低的时候,二级结构不发生变化;当 pH 值升高时, Mb 的二级结构开始变性,并随着 pH 值的进一步升高变性愈发显著. 甲醇分子的含量决定了 Mb 分子三级结构是否发生变化,当甲醇的体积分数不超过 30% 时, Mb 分子的三级结构不发生变化;当甲醇比例进一步增大时,其三级结构明显变性. 同时, pH 值和甲醇分子的含量共同决定了溶液中电离产生的蛋白质分子离子的电荷数和分子构象. pH = 11.4, 30% 甲醇含量的溶液条件是一个转折点,只要两个条件有任何一个增大,都会导致 Mb 构象从 hMb 转化为 aMb,同时带来 Mb 分子内六配位高自旋的三价铁转变为低自旋或五配位高自旋态的变化.

陈南生感谢上海市分子催化和功能材料重点实验室及高级访问学者基金的资助.

参 考 文 献

[1] Sirangelo I., Piza F. D., Marmo C., *et al.* Biochemistry[J], 2003, 42: 312—319

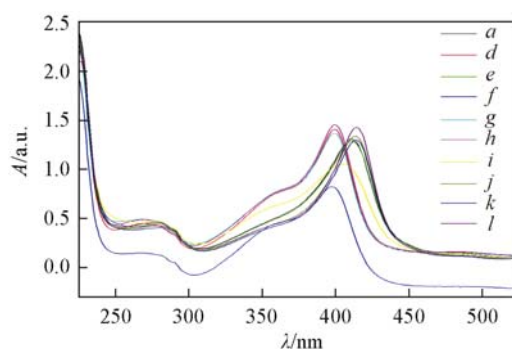


Fig. 6 UV-Vis spectra of Mb in different solutions

a. pH = 11.0, 30% methanol; *d.* pH = 11.0, 90% methanol;
e. pH = 11.4, 30% methanol; *f.* pH = 11.4, 50% methanol;
g. pH = 11.4, 70% methanol; *h.* pH = 11.4, 90% methanol;
i. pH = 12.0, 30% methanol; *j.* pH = 11.0; *k.* pH = 11.4;
l. pH = 12.0.

- [2] Miranker A. D., Robinson C. V., Radford S. E., *et al.*. *FASEB J.* [J], 1996, **10**: 93—101
- [3] Zhang G., Wu C. *J. Am. Chem. Soc.* [J], 2001, **123**(7): 1376—1380
- [4] Benjamin A. H., Samantha L. K., Andy P., *et al.*. *J. Am. Chem. Soc.* [J], 2007, **129**(37): 11394—11401
- [5] Grandori R. *Curr. Org. Chem.* [J], 2003, **7**: 1589—1603
- [6] Brunoni M., Giacometti G. M., Antonini E., *et al.*. *J. Mol. Biol.* [J], 1972, **63**: 139—152
- [7] Anfinsen C. B. *Science* [J], 1973, **181**: 223—230
- [8] Crcighton T. E. *J. Phys. Chem.* [J], 1985, **89**: 2452—2459
- [9] Loo J. A. *Int. J. Mass Spectrom.* [J], 2000, **200**: 175—186
- [10] Heck A. J., Van Den Heuvel R. H. *Mass Spectrom. Rev.* [J], 2004, **23**: 368—389
- [11] Sobott F., McCammon M. G., Hernandez H., *et al.*. *Philos. Trans., Ser. A* [J], 2005, **363**: 379—389
- [12] CHU Yan-Qiu(储艳秋), DAI Zhao-Yun(戴兆云), JIANG Gong-Yu(蒋公羽), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)* [J], 2009, **30**(5): 869—875
- [13] Wiwatchaiwong S., Nakamura N., Ohno H. *Biotechnology Progress* [J], 2006, **22**(5): 1276—1281
- [14] Chowdhury S. K., Katta V., Chait B. T. *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1990, **112**: 9012—9013
- [15] De La Mora J. F. *Anal. Chim. Acta* [J], 2000, **406**: 93—104
- [16] Heck A. J., Van Den Heuvel R. H. *Mass Spectrom. Rev.* [J], 2004, **23**: 368—389
- [17] Nesatyy V. J., Suter M J. F. *J. Mass Spectrom.* [J], 2004, **39**(1): 93—97
- [18] Kaltashov I. A., Mohimen A. *Anal. Chem.* [J], 2005, **77**: 5370—5379
- [19] Kodali R. B., Douglas D. J. *Biochemistry* [J], 2000, **39**: 14702—14710
- [20] Luo Y., Baldwin R. L. *J. Mol. Biol.* [J], 1998, **279**: 49—57
- [21] Shirley H. L., Sheng Y., Rachel R., *et al.* *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* [J], 2009, **20**: 593—596
- [22] Konermann L., Douglas D. J. *J. Am. Mass Spectrom.* [J], 1998, **9**(12): 1248—1254
- [23] Reddy P. N., Srinivas R., Kumar M. R., *et al.* *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* [J], 2007, **18**(4): 651—662
- [24] Rosu F., Pirotte S., De Pauw E., *et al.*. *International J. Mass Spectrom.* [J], 2006, **253**(3): 156—171
- [25] JIANG Dan(姜丹), CHU Yan-Qiu(储艳秋), DING Chuan-Fan(丁传凡). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)* [J], 2009, **30**(8): 1571—1576
- [26] YANG Yu-Hong(杨宇红), SHAO Zheng-Zhong(邵正中), CHEN Xin(陈新). *Acta Chim. Sinica(化学学报)* [J], 2006, **64**(16): 1730—1736
- [27] Qiu C. L., Patricia A. M. *J. Biol. Inorg. Chem.* [J], 2003, **8**: 83—94

Methanol-induced Conformation Change of Myoglobin in Basic Solution

JIANG Dan¹, CHU Yan-Qiu¹, CHEN Nan-Sheng^{1,2}, DING Chuan-Fan^{1*}

(1. *Shanghai Key Laboratory of Molecular Catalysis and Innovative materials, Laser Chemistry Institute,*

Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. *Department of Molecular Biology and Biochemistry, Simon Fraser University, Canada)*

Abstract This paper reports the methanol-induced conformation change of myoglobin in basic solution. According to the results of mass spectrometry, we found that the conformation of myoglobin(Mb) changed in different volume fractions of methanol at pH = 11.0, 11.4, 12.0. And both of the methanol concentration and pH value have some effect. Mb exists as hMb at pH = 11.0, aMb at pH = 12.0, aMb at pH = 11.4 except in 30% volume fraction of methanol solution. Using negative ion mass spectrometry mode, Mb all show mainly as aMb. More information of Fe ion's coordination and electron spin state were found *via* CD spectrometry and UV-Vis Soret absorption.

Keywords Protein; Molecular conformation; Electrospray ionization-mass spectrometry; Myoglobin; Basic solution

(Ed. : A, G)