

不同 pH 值下金属硫蛋白的电喷雾质谱研究

沈金灿¹, 黄志勇¹, 庄峙厦^{1,2}, 王小如^{1,2*}

(1. 厦门大学化学系现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘要: 考察不同 pH 值下金属硫蛋白与锌 (Zn) 的结合情况表明, pH 值下降, 总离子流强度增大, 但低于 3 以后, 又急剧下降; 同时 pH 也决定了金属与硫蛋白的结合形态, 在比较理想的电离的条件下发现, 在 pH 3.0 时主要以脱金属硫蛋白的形式存在; 在 pH 4.0 时金属硫蛋白结合了 4 个 Zn。

关键词: 质谱学; 金属硫蛋白研究; 电喷雾质谱 (ESI/MS); 分子量

中图分类号: O 657.63; Q 513 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2003)03-413-04

金属硫蛋白 (Metallothioneins, 简称 MTs) 是一大类富含巯基的小分子蛋白质 (相对分子量 < 9 000 D), 具有很强的金属结合能力, 哺乳动物 MT 每分子可结合 7 个二价金属离子或 12 个一价金属离子。1957 年 Margosh 和 Vallee^[1] 在研究镉的生物学作用时, 从蓄积镉的器官马肾中第一次分离出含镉的该种蛋白。迄今的大量研究表明, MT 在重金属解毒、微量元素的代谢及自由基清除等方面发挥着重要的作用。关于 MT 的结构与功能的研究一直是科学家关注的热点, 其中哺乳动物 Cd₇-MT 和 Cd₅-Zn₂-MT 的三维结构已分别用 NMR^[2] 和 X 射线衍射法^[3] 测定。研究结果表明, 二价金属离子在 MT 中全部与硫原子四面体配位, 并通过桥联的硫原子形成 M²⁺S₁₁ 和 M²⁺S₉ 两个金属-硫簇, 相应组成 α -和 β -两个结构域。

本工作拟通过考察了金属硫蛋白在不同 pH 值条件下的电喷雾质谱 (ESI/MS) 行为, 以了解 pH 值对金属硫蛋白的在电喷雾质谱中检测的影响, 以及不同 pH 值决定硫蛋白与金属的不同结合形态。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国 Agilent 公司 HP1100 LC/MSD 系统, Millipore 超纯水制备装置。

Zn 诱导 MT (湖南麓谷生物技术公司), 三氟乙酸 (ICN 公司), 其它试剂均为分析纯试剂, 实验中所用的水为 Millipore 超纯水。

1.2 实验步骤

称取 1.0 mg MT, 加入 1.0 mL 超纯水, 配成 1.0 g/L 的储备液, 4 °C 冷藏备用。配置 1% 三氟乙酸水溶液备用。

分别移取 100 μ L MT 储备液于 6 个小管中, 加入 400 μ L 超纯水, 加 1% 三氟乙酸水溶液将 pH 值分别调至 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.0。

流动注射进样, 流动相为水, 流速为 0.3 mL/min, 进样 5 μ L。

通过考察仪器不同在参数值条件下的工作状态, 对仪器的主要参数进行最优化的参数设置值列于表 1。

收稿日期: 2002-11-15

基金项目: 国家自然科学基金 (20175022)

作者简介: 沈金灿 (1978-), 男 (汉), 福建安溪人, 博士生, 原子光谱质谱专业

E-mail: jincansh@263.net

* 通信作者: 王小如, 教授, 电话: 0592-2186401, E-mail: xrwang@xmu.edu.cn

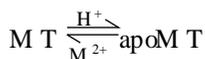


表 1 电喷雾质谱参数设置
Table 1 Parameters of ESIMS

参数(Parameter)	设置值(Setting value)
电离电压(Ionization voltage)	4 500 V
干燥气体流速和温度(Drying gas flow rate and temperature)	10 L/m in, 250
碰撞电压(Fragmentor voltage)	90 V
鞘气压力(Nebulizer pressure)	69 kPa
质量扫描范围(Mass scan range)	500~ 2 500 D

2 结果与讨论

在电喷雾质谱中, pH 值对被分析物质是否能带电荷从而被电离有相当重要的作用, 测定时溶液应控制在一定的酸度, 如加入甲酸或乙酸等挥发性有机酸并控制在一定的浓度, 从而增大离子化效率, 提高灵敏度, 获得理想的结果。但是, 由于金属硫蛋白对溶液 pH 值的敏感性, 不同的 pH 会改变它在溶液中的存在状态。MT 在酸性水溶液中存在如下平衡^[4]:



pH 值接近中性时, MT 主要以结合金属的形式存在, 降低溶液的 pH 值, MT 的金属可脱去。MT 的这种特性给电喷雾质谱测定带来了一定的困难, 为了尽量不破坏金属跟蛋白的结合, pH 值应尽量控制在中性条件下, 由于溶液中的酸度不足, 使得蛋白不容易电离, 从而无法获得理想的信号强度; 对于脱金属硫蛋白的检测则比较理想, 由于其溶液中存在一定的酸度足以使其获得良好的电离。

不同 pH 值对电喷雾质谱的总离子流强度的影响示于图 1。随着 pH 值的降低, 总离子强度不断地增大, pH 值低于 3 以后, 总离子强度又急剧下降, 显然在 pH 值从 7 到 3 的下降过程中, 电离得到改善, 离子的强度得到不断的增强; pH 值的进一步降低(三氟乙酸浓度的进一步增加), 反而抑制了金属硫蛋白的电离, 所检测到的总离子强度迅速下降。

进一步考查不同 pH 值下 MT 的存在形态, 对各个 pH 值下所得的信号进行了质谱解析。结果表明 pH 极大地影响了 MT 的电离。pH > 4.0, 所得的质谱信号微弱, 信噪比低, 由于存在着大量的干扰信号, 给谱图的解析带来了很大的困难。

为了得到准确可靠的结果, 我们主要研究

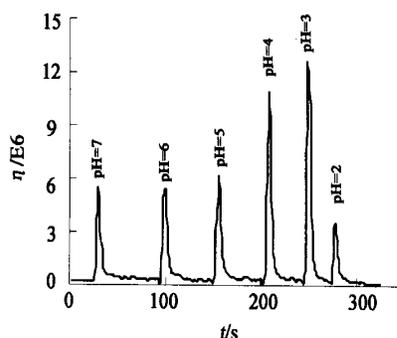


图 1 不同 pH 值下 MT 样品的总离子流强度图

Fig 1 Total ion current chromatogram of MT sample at different pH

了 pH 3.0, pH 2.0 及 pH 4.0 时 MT 的存在形态。实验结果表明, pH 为 2.0 所得的主要谱线与 pH 为 3.0 时所得的主要谱线位置一致, 进一步的解谱结果表明在 pH 2.0 下 MT 的存在形态与 pH 3.0 下一致。

pH 为 3.0 和 4.0 时所得到的质谱图分别示于图 2 和 3。由图 2 和 3 可以看出, pH 降低时使得 MT 的质子化更完全, 所带的电荷数也越多

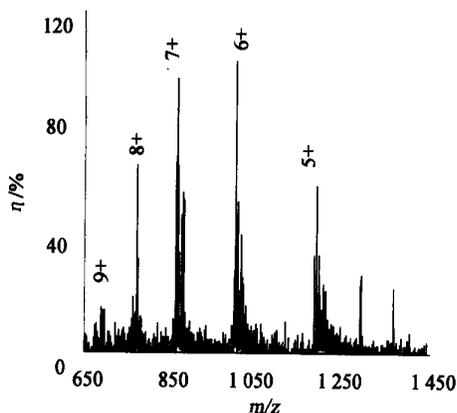


图 2 pH 3.0 下 MT 样品的质谱图

Fig 2 Mass spectrum of MT sample at pH 3.0

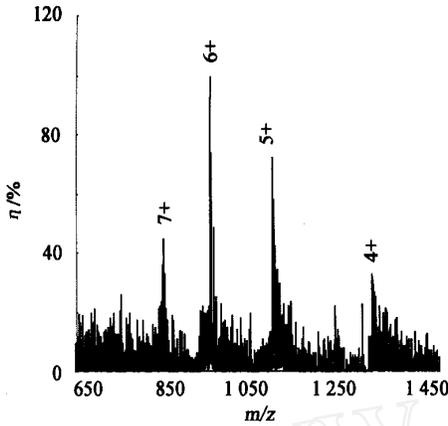


图 3 pH 4.0 下 MT 样品的质谱图

Fig 3 Mass spectrum of MT sample at pH 4.0

(pH 3.0 比 pH 4.0 出现了带更多电荷的谱峰), 如 pH 3.0 时可以找到带 8 个电荷的质谱峰, 而在 pH 4.0 时并未出现。但 pH 值的改变也使得 MT 跟金属的结合形态发生变化, 从图上很明显可以看出其主要谱峰所在的位置并不一致。

在 pH 3.0 及 pH 4.0 下质谱解析所得结果列于表 2, 在 pH 3.0 下所检测到的为脱金属硫蛋白, 而在 pH 4.0 下检测得到的为结合 4 个 Zn 的金属硫蛋白。大部分蛋白在 pH 4.0 条件下都可以找到结合 4 个 Zn 的形态, 唯有 apo-MT-1a 未找到对应的 Zn₄-MT-1a, 分子量为 6 216 的组分。从文献上也未找到相关的资料, 可能是 MT 蛋白类的一个亚型, 还需进一步确证。

表 2 pH 3.0 及 4.0 下 MT 样品的质谱解析结果

Table 2 Mass result of MT sample at pH 3.0 and pH 4.0

编号 (No.)	pH = 3.0		pH = 4.0	
	分子量/D (Mr)	推断分子式 (Formula)	分子量/D (Mr)	推断分子式 (Formula)
1	6 126	Apo-MT-2a	6 379	Zn ₄ -MT-2a
2	6 145	Apo-MT-1a		
3	6 156	Apo-MT-2c	6 409	Zn ₄ -MT-2c
4	6 175	Apo-MT-1β	6 428	Zn ₄ -MT-1β
5	6 216		6 466	Zn ₄ ⁻
6	6 243	Apo-MT-1ε	6 495	Zn ₄ -MT-1ε

注(Notes): 金属硫蛋白分子量的算法^[5]为: 金属蛋白分子量= 脱金属硫蛋白分子量+ n(金属分子量) - 2n(H 分子量)

(The calculation of molecular weight is molecular weight of metallothioneins to equal with molecular weight of apo-metallothioneins+ n(metal Mr) - 2n(H Mr))

二价金属离子在 MT 中与硫原子四面体配位, 并通过桥联的硫原子形成 M₄²⁺S₁₁和 M₃²⁺S₉ 两个金属-硫簇, 相应组成 α、β-两个结构域。由于两个不同结构域所处的不同化学环境, 使得它们与金属的结合也不尽相同。从表 2 所得的结果推测, Zn 在 α-结构域的结合强于其在 β-结构域的结合。pH 的降低, 首先使结合在 β-结构域的 Zn 发生解离, 故在 pH 4.0 时测到的是 α-结构域 Zn 结合硫蛋白(Zn₄-MT); 随着 pH 值的进一步降低, 结合在 α-结构域的 Zn 亦发生解离, 故在 pH 3.0 及 pH 3.0 以下检测得到的是完全脱金属的硫蛋白(apo-MT)。本研究工作存在的不足就是未能在接近中性的条件下完成对 Zn₄-金属硫蛋白的检测, 这有待进一步完善, 实现中性条件下对 Zn 诱导金属硫蛋白的检测。

3 结论

通过采用电喷雾质谱技术研究不同 pH 值下的金属硫蛋白与金属 Zn 的不同结合形态, 进一步表明由于组成金属硫蛋白的 α、β-结构域的差异, 使得其与金属的结合能力存在着差异, α-结构域结合的 Zn 更稳定。同时由于无法获得比较好的电离, 使得在 pH 靠近中性条件下 MT 的金属结合形态的电喷雾质谱研究存在着一定困难, 需要进一步的探索。

参考文献:

[1] Margoshes M, Vallee BL. A Cadmium Protein From Equine Kidney Cortex [J] J Am Chem Soc, 1957, 79: 4 813~ 4 814
 [2] Arseniev A, Schultze P, Worgotter E, et al Th-

- ree-dimensional Structure of Rabbit Liver [Cd7] Metallothionein-2a in Aqueous Solution Determined by Nuclear Magnetic Resonance[J]. *J Mol Biol*, 1988, 201(3): 637~ 657.
- [3] Robbins AH, McRee DE, Williamson M, et al Refined Crystal Structure of Cd, Zn Metallothionein at 2.0 Å Resolution[J]. *J Mol Biol*, 1991, 221: 1269~ 1293
- [4] 王夔 生物无机化学[M]. 北京: 清华大学出版社, 1988, 217~ 223
- [5] Hubert C, Ryszard L. Detection of Artifacts and Peak Identification in Reversed-phase HPLC of Metallothionein by Electrospray Mass Spectrometry[J]. *Talanta*, 1999, 48: 109~ 118
- [6] Hubert C, Ryszard L. Characterization of Metallothionein Isoforms by Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography With On-line Post-column Acidification and Electrospray Mass Spectrometric Detection[J]. *J Chromatogr*, 1998, 829: 127~ 136

Study on the Metallothioneins at Different pH by Electrospray Ionization Mass Spectrometry

SHEN Jin-can¹, HUANG Zhi-yong¹, ZHUANG Zhi-xia^{1,2}, WANG Xiao-ru^{1,2}

(1. The Key Laboratory of Analytical Science of the Ministry of Education, Department of Chemistry, Xianen University, Xianen 361005, China;

2. First Institute Oceanography, National Bureau of Oceanography, Qindao 266061, China)

Abstract: The total ion intensities of the metallothioneins (MTs) increase from pH 7 to 3. The use of electrospray mass spectrometry render it possible to acquire molecular and chemical binding information of the metallothioneins at different pH condition. The result shows that pH is the primary factor to determine the zinc combined to metallothioneins. Metallothioneins are combined with four zinc at pH 4.0 while none zinc is found to be combined to the protein at pH 3.0.

Key words: mass spectrometry; study on metallothioneins, electrospray mass spectrometry (ESI-MS), molecular weight (Mr)

专利简讯

新型雾化——氢化物发生装置

【公开日】 1986.07.02 【公开号】 85204134 【主分类号】 G01N1/28

【申请日】 1985.09.28 【申请号】 85204134 【分类号】 G01N1/28

【申请人】 中国科学院长春应用化学研究所 【地址】 吉林省长春市斯大林大街 109 号

【发明人】 黄立本; 张卓勇

【摘要】 一种用于光谱或质谱多元素同时测定的使样品溶液雾化并产生某些元素的挥发性氢化物的雾化—氢化物发生装置。本发明的特征在于其雾室设有冲洗管, 雾室内除设有气动雾化器外还有由凹面挡板、进液管、反应器组成的氢化物发生器。两者装在设有冲洗管的雾室内。发生器的挡板将雾化器喷出的大液滴收集到反应器内以生成气态氢化物, 与雾化器喷出的气溶胶一同进入光源, 废液由冲洗管冲走, 从而可用一份样品同时测定氢化物元素及不能形成氢化物的元素, 同时可避免硼氢化物和挥发性反应物进入光源。