

## 电喷雾质谱研究甲醇诱导的溶菌酶构象变化

储艳秋, 吴波, 丁传凡

(复旦大学化学系物理化学研究所, 上海市分子催化和功能材料重点实验室, 上海 200433)

**摘要:**为了研究甲醇诱导对溶菌酶构象的影响,用电喷雾质谱(ESI-MS)结合圆二色性光谱(CD)在 pH 2.0 的条件下测定不同甲醇浓度的溶菌酶构象。在甲醇浓度上升到 70% 前, 溶菌酶的 ESI 质谱图中电荷状态分布没有太大的变化。然而, 当甲醇浓度超过 75%, 以 16+ 为中心的高电荷态分布开始出现, 并可以观察到两簇离子峰, 表明溶菌酶的三级结构已发生变化。与此同时, 圆二色性光谱显示溶菌酶的螺旋变性态的百分率明显上升, 其二级结构也部分发生变化。由此可见, 当甲醇浓度超过 75%, 溶菌酶构象将会由折叠态转变为非折叠态。差示扫描量热曲线(DSC)结果显示, 固体溶菌酶溶解于 5% 甲醇溶液后, 峰顶温度  $T_m$  将由固体的 79.6 °C 上升到 81.8 °C, 表明固体溶菌酶溶解于水后, 热稳定性略有升高。

**关键词:**电喷雾质谱法; 构象; 溶菌酶; 甲醇诱导

中图分类号:O 657.63; O 641.6 文献标识码:A 文章编号:1004-2997(2008)05-257-04

## Probing Methanol-induced Conformational Transitions of Lysozyme by Electrospray Ionization Mass Spectrometry

CHU Yan-qiu, WU Bo, DING Chuan-fan

(Shanghai Key Laboratory of Molecular Catalysts and Innovative Materials, Physical Chemistry Institute, Chemistry Department, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** To explore methanol-induced conformational change of lysozyme at pH 2.0, electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and circular dichroism (CD) were employed to probe the conformations of lysozyme solutions containing different concentrations of methanol. The charge state distribution (CSD) of lysozyme didn't change significantly before the methanol concentration rose up to 70%. However, when it reached 75%, the high CSD centered at 16+ began to emerge, and bimodal was observed, suggesting that the tertiary structure of lysozyme was destroyed. Meanwhile, CD spectra showed that the percentage of helical state increased obviously, suggesting the secondary structure was partially affected. The results indicated when methanol concentration was over 75%, the conformation of lysozyme could change from folded into unfolded, accompanied by the collapse of tertiary structure. Differential scanning calorimetry (DSC) indicated temperature peak value

收稿日期:2008-01-03;修回日期:2008-03-01

基金项目:国家自然科学基金(20473020)资助

作者简介:储艳秋(1965~),男(汉族),上海人,副教授,从事分析有机分子和生物大分子的研究。E-mail: chuyq@fudan.edu.cn

通信作者:丁传凡(1962~),男(汉族),安徽人,教授,从事生物质谱新技术和新方法及其在蛋白质组学中的应用的研究。

E-mail: cfding@fudan.edu.cn

( $T_m$ ) rose up from 79.6 °C to 81.8 °C after the solid lysozyme dissolved in 5% methanol solution, which suggested thermal stability of lysozyme was intensified.

**Key words:** electrospray ionization mass spectrometry; conformation; lysozyme; methanol-induced

在极端 pH 值、变性剂、有机溶剂和高温条件下, 具有紧密折叠构象的天然球形蛋白质会发生变性, 导致其紧密的结构展开成非折叠的构象<sup>[1]</sup>。有机溶剂诱导蛋白质变性之所以引起人们的兴趣, 是因为有机溶剂诱导变性的蛋白质与细胞膜附近变性蛋白质的性质很相似, 其 pH 值和介电常数都很低。近年来, 甲醇诱导蛋白质<sup>[2-3]</sup>, 诸如肌血球素等构象变化的研究一直为人们所关注, 并且已经取得了较大的进展。

Kamatari 等<sup>[4]</sup>用小角度 X 射线散射法(SAXS)等技术研究表明, 在 pH 为 2.0, 溶剂组成中的甲醇浓度高于 60% 时, 溶菌酶可以由天然态转变为螺旋变性态(helical state)。由 Guinier 曲线可得, 溶菌酶螺旋变性态的回旋半径( $R_g$ )为 24.9 Å, 明显地高于天然态的 15.7 Å。Kratky 曲线可以用来测量蛋白质肽链的球形完整性和随机性, 溶菌酶螺旋变性态的 Kratky 曲线中没有出现清晰的峰形, 表明该结构缺乏完整的球形状态。由此可以看出, 60% 以上的甲醇浓度会使溶菌酶由天然球形的折叠构象转变为较为展开的非折叠构象, 三级结构被彻底破坏。然而, Mao 等<sup>[5]</sup>采用 H/D 交换结合 ESI-MS 比较天然的溶菌酶和甲醇诱导变性的溶菌酶两种溶液在气相中的构象, 发现对相同电荷态的两种溶菌酶来说, 它们 H/D 交换的水平很相近。此外, 用串级质谱测定碰撞截面积(cross section)实验揭示, 甲醇诱导螺旋变性的溶菌酶在气相中的回旋半径( $R_g$ )与紧密结构溶菌酶的半径相接近。综上, 可以推测天然的和甲醇诱导变性的两种溶菌酶溶液在气相中的构象没有明显的差别, 但甲醇诱导溶菌酶变性前后的构象变化还是值得作进一步的研究。

在过去数十年中, 许多分析技术先后被应用于检测蛋白质在溶液中的构象变化, 其中包括分光光度法、粘度法、荧光法、圆二色谱(CD)、小角度 X 射线散射法(SAXS)、核磁共振等。凭借其快速、高灵敏度、以及较低的样品使用量, 电喷雾质谱已被广泛地应用于蛋白质构象的检测。近年来, 差示扫描量热法(DSC)被广泛应用于

生物大分子的研究<sup>[6]</sup>, 其主要原因是因为它可以提供大量与蛋白质热变性有关的信息, 包括蛋白质空间构象的变化与其热稳定性之间的关系等。

最近, 潘婷婷等<sup>[7]</sup>报道了用电喷雾质谱结合圆二色谱和荧光光谱等技术研究乙腈诱导对溶菌酶构象的影响, 发现在酸性条件下, 随着乙腈浓度的上升, 电喷雾质谱的谱图中溶菌酶电荷状态分布会变宽, 即由天然构象转变为部分非折叠构象。本工作拟采用上述技术进一步探索和研究在 pH 2.0, 不同浓度甲醇诱导的溶菌酶的构象变化, 并且用 DSC 研究甲醇的加入对溶菌酶热变性温度的影响。

## 1 试验部分

### 1.1 主要仪器与装置

装有 Sciex 离子喷雾界面的三重四极杆串级质谱仪( $m/z$  2 400), 质谱仪的质量由聚丙二醇(PPG)校正; PHS-3C 精密 pH 计: 上海林达仪器厂产品; J-175 圆二色光谱(CD)仪: 日本 Jasco 公司产品; TA-Q 100 差示扫描量热仪(DSC): 美国 TA 公司产品。

### 1.2 主要材料与试剂

鸡蛋清溶菌酶: 购于 Sigma 公司(L6876, St. Louis, MO); 甲醇(AR)和盐酸: 购于国药集团化学试剂有限公司; DL-二硫苏糖醇(DTT): 购于瑞士 Fluka 公司。

### 1.3 试验条件

电喷雾质谱通过石英毛细管喷射样品溶液产生不同浓度甲醇诱导的多电荷溶菌酶离子, 喷雾器加 4 800 V 电压, 正离子模式检测。DSC 扫描速率 3 °C · min<sup>-1</sup>, 扫描范围为 10~160 °C。0.02 mmol · L<sup>-1</sup> 天然溶菌酶在 21 °C 的 DTT(1 mmol · L<sup>-1</sup>)溶液中孵化过夜。

## 2 结果与讨论

Babu 等<sup>[2]</sup>的实验结果显示, 在蛋白质水溶液中加入一定比例的甲醇会对其构象产生明显的影响。甲醇诱导的溶菌酶电荷状态分布和构象变化的 ESI 质谱图示于图 1。由图 1 可以看

出,溶菌酶水溶液中加入 30% 甲醇后,质谱峰呈现出一定的变化规律,即随着甲醇浓度的增大,离子峰变高,峰宽变窄,这是因为加入甲醇后,溶液的介电常数变小,表面张力变小,有利于从 Taylor 锥体的尖端喷出更细的雾滴,使灵敏度有所提高。当甲醇浓度从 30% 增加到 70%,除了溶菌酶的最高峰从 10+ 改变到 9+,其质谱图没有明显的变化。然而,值得注意的是,当甲醇浓度到达 75% 时,以 16+ 为中心的高电荷离子簇开始出现。当甲醇浓度达到 80% 时,溶菌酶的质谱图出现明显的两簇离子峰,高电荷离子峰簇(13+, 14+, 15+, 16+, 17+, 18+) 的强度也变得更大,表明溶菌酶由紧密折叠构象转变为非折叠构象,其三级结构被彻底破坏。

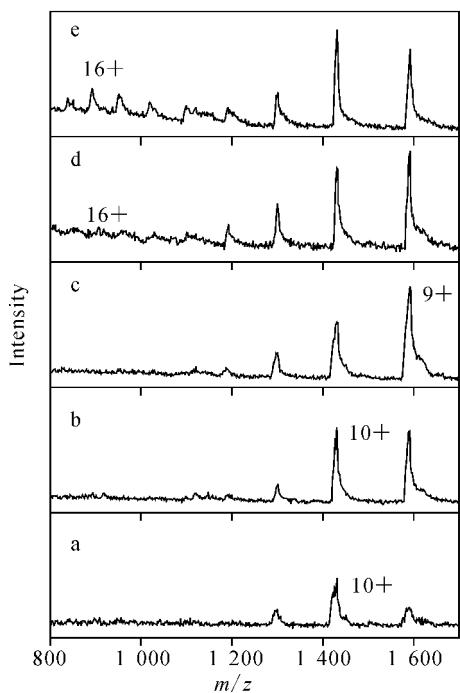


图 1 在 pH 2.0 下,甲醇诱导的溶菌酶溶液电荷状态分布和构象变化的 ESI 质谱图

甲醇浓度(a)0%;(b)30%;(c)70%;  
(d)75%;(e)80%

Fig. 1 ESI mass spectra of methanol-induced charge state distribution and conformation variations for lysozyme at pH 2.0

Methanol concentrations(a)0%;(b)30%;  
(c)70%;(d)75%;(e)80%

由此可见,尽管 Mao 等<sup>[5]</sup>采用串级质谱测定碰撞截面积(cross section)的实验显示,甲醇诱导螺旋变性的溶菌酶在气相中的回旋半径

( $R_g$ )与其天然结构的半径差别很小,但在 ESI 质谱图中仍然可以检测出两者构象之间的细微差别。Babu 等<sup>[3]</sup>用氢氘交换结合 ESI-MS 技术,检测了细胞色素 C 和乳球蛋白等其他蛋白质的电荷状态分布(CSD)变化,并且提出在酸性条件下,随着甲醇从中浓度、高浓度到很高浓度的递增变化,天然蛋白质的构象转变也会经历过渡态(I)、螺旋变性状态(H)和最后的螺旋变性保护态(Hc)。这种紧实的受保护结构仍然会同那些完全变性的蛋白质一样产生高电荷状态。

用 ESI-MS 研究蛋白质构象变化的实验中,在溶液中由酸诱导会产生两簇离子峰(bimodal)的天然蛋白,即使是那些含有二硫键的蛋白,诸如  $\beta$ -乳球蛋白等,在气相中仍然可以检测到较为展开的螺旋变性态(H);而象溶菌酶这样靠 4 个分子内二硫键来维持的结构相当稳定的蛋白,酸诱导实验中没有出现两簇离子峰现象,在气相中也很难检测到螺旋变性态。其主要原因可能是在酸诱导实验中,质子被加到蛋白质的碱性氨基酸的氨基上面,在电喷雾去溶剂以后,仍然能保持其在溶液中的构象;而甲醇诱导蛋白质在溶液中的螺旋变性态,在 ESI 去溶剂后,既可以保持原来较为伸展的螺旋变性态(如细胞色素 C),也可以在气相中由螺旋变性态重新转变为紧密的状态(如溶菌酶)。

由于蛋白质的圆二色光谱(CD)在远紫外(190~250 nm)主要为肽键吸收,近紫外(250~330 nm)为酪氨酸残基和色氨酸残基等吸收。因此 CD 谱既可以有效地在远紫外区探测蛋白质中主链二级结构的含量和变化,又能在近紫外区提供一些三级结构,包括芳香性残基侧链环境及二硫键的信息等<sup>[8]</sup>。溶菌酶水溶液在 pH 2.0 的环境下,由不同浓度甲醇诱导的远紫外 CD 光谱示于图 2。在甲醇浓度从 30% 增加到 50% 的过程中,CD 光谱中没有观察到明显的改变,表明加入少量甲醇后溶菌酶的二级结构基本不变。然而当甲醇浓度达到 75% 以上时,CD 光谱在 208 nm 和 222 nm 附近显示出两个强度很大的负峰,这些光谱最小值是蛋白质  $\alpha$ -螺旋的特征峰,这个现象表明溶菌酶二级结构发生了明显改变。根据圆二色光谱的数据,在不同浓度甲醇的存在下,溶菌酶所含  $\alpha$ -螺旋的百分率从 19.5(30% 甲醇)、19.8(50% 甲醇)上升到 22.5

(75% 甲醇)、24.6(80% 甲醇) 和 27.1(90% 甲醇)。不难发现, 随着甲醇浓度的升高, 溶菌酶中螺旋变性态的百分率上升。

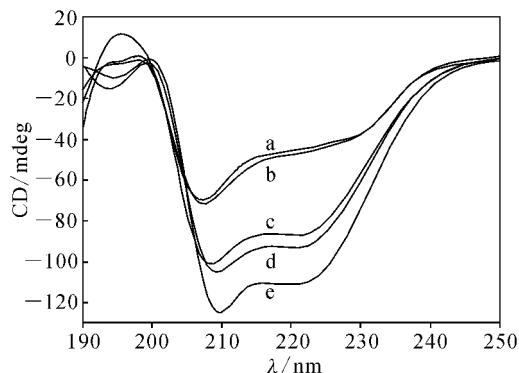


图 2 不同浓度甲醇(pH 2.0)下的溶菌酶水溶液 CD 光谱图

甲醇浓度(a) 30%; (b) 50%; (c) 75%;  
(d) 80%; (e) 90%

Fig. 2 CD spectra of the lysozyme in different concentrations of methanol at pH 2.0

Methanol concentrations (a) 30%; (b) 50%;  
(c) 75%; (d) 80%; (e) 90%

如果分子中不对称原子能级的跃迁产生反常色散, 则溶液发生 cotton 效应。在 195 nm 附近产生的 cotton 效应可以认为是溶菌酶中的肽键吸收发生变化引起的。随着甲醇含量的增加, 可以观察到在 195 nm 区域, 先是正吸收峰增加(50% 甲醇), 然后又变为负吸收峰(80% 甲醇), 这是由于甲醇的诱导作用使得溶菌酶由紧密折叠转变为非折叠构象以后, 它的肽键吸收也发生明显的变化, 即发生由正 cotton 效应向负 cotton 效应转变。由于甲醇溶剂的极性大于纯水, 因此甲醇量增加后, 由于甲醇的诱导作用, 导致溶菌酶正负吸收峰均向长波方向移动, 即发生极性红移现象。

溶菌酶固体, 溶菌酶 5% 甲醇溶液以及 DTT 还原后的溶菌酶 5% 甲醇溶液的差示扫描量热曲线(DSC)示于图 3。图 3(a) 为典型的固体溶菌酶的 DSC 曲线, 由图可见, 当温度达到 32.6 °C 后, 样品开始快速吸热, 形成峰顶温度  $T_m$  为 79.6 °C, 焰变  $\Delta H$  为 236.8 J · g<sup>-1</sup>。由图 3(b) 可见, 溶菌酶 5% 甲醇溶液, 当温度达到 55 °C 后, 温度发生快速变化, 在 81.8 °C 达到峰值; 而 DTT 还原后的溶菌酶甲醇溶液峰顶温度  $T_m$  达到 84.4 °C, 说明溶菌酶溶液的热稳定性更高, 这种热稳定性的提高可能与固体

溶菌酶溶解于甲醇和水的混合溶液以后, 部分形成氢键有关, DTT 还原后的溶菌酶可能有更多氨基酸残基参与形成氢键。

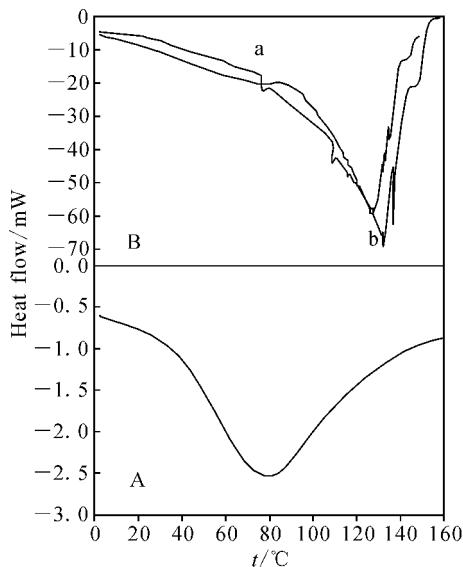


图 3 溶菌酶固体, 溶菌酶溶液和还原后的溶菌酶溶液的 DSC 曲线

(A) 溶菌酶固体; (B) 溶菌酶溶液(a)  
和还原后的溶菌酶溶液(b)

Fig. 3 DSC curves for solid lysozyme, lysozyme solution and reduced lysozyme solution

(A) solid lysozyme; (B) lysozyme solution(a)  
and reduced lysozyme solution(b)

### 3 结 论

电喷雾质谱结合圆二色谱对 pH 2.0, 不同浓度甲醇(0%~90%)诱导溶菌酶构象变化进行研究。结果表明, 在甲醇浓度达到 70% 以前, 溶菌酶的结构没有明显的变化; 然而, 当甲醇浓度超过 75%, ESI 谱图中出现两簇离子峰, 高电荷离子峰(13+、14+、15+、16+、17+、18+)的强度也相应地变得更大, 表明溶菌酶的构象将会由折叠态转变为非折叠态, 其三级结构也被完全破坏。

差示扫描量热曲线结果表明, 固体溶菌酶溶解于 5% 甲醇溶液以后, 峰顶温度将由固体的 79.6 °C 上升到 81.8 °C, 而 DTT 还原后的溶菌酶 5% 甲醇溶液的峰顶温度达到 84.4 °C, 这表明固体溶菌酶溶解于甲醇和水的混合溶液以后, 热稳定性略有升高, 而且在 DTT 还原后, 溶菌酶热稳定性变得更高。

(下转第 273 页)

## 参考文献:

- [1] WULFKUHLE J D, LIOTTA L A, PETRICOIN E F. Proteomic applications for the early detection of cancer [J]. Nature Reviews, 2003, 3 (4): 267-275.
- [2] PETRICOIN E F, LIOTTA L A. SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer [J]. Curr Opin in Biotechnol, 2004, 15(1): 24-30.
- [3] CONRADS T P, HOOD B L, ISSAQ H J, et al. Proteomic patterns as a diagnostic tool for early-stage cancer: a review of its progress to a clinically relevant tool [J]. Mol Diagn, 2004, 8(2): 77-85.
- [4] 郑燕华,邹德威,冯 凯,等.蛋白芯片技术筛选肝癌血清标志蛋白的初步研究[J].中华检验医学杂志,2005,28(6):628-631.
- [5] 郑咏梅,张 军,陈星旦,等.基于逐步回归法的近红外光谱信息提取及模型的研究[J].光谱学与光谱分析,2004,24(6):1 047-1 049.
- [6] 张 琳,张黎明,李 燕,等.偏最小二乘法在傅里叶变换红外光谱中的应用及进展[J].光谱学与光
- 谱分析,2005, 25(10): 1 610-1 613.
- [7] 朱尔一,杨芃原.化学计量学技术及应用[M].北京:科学出版社,2001: 92-107.
- [8] 朱尔一.一种适合用于处理中药指纹图谱数据的偏最小二乘法[J].计算机与应用化学,2005, 22(8): 639-642.
- [9] 朱尔一,林 燕.偏最小二乘变量筛选法在毒品来源分析中的应用[J].分析化学,2007, 35 (7): 973-977.
- [10] 林 燕,朱尔一.不同污染源海水的分类模型[J].光谱学与光谱分析,2007, 27 (10): 2 107-2 110.
- [11] 朱尔一,林 燕.利用偏最小二乘法的一种变量筛选法[J].计算机与应用化学,2007, 24(6): 741-745.
- [12] CUI J F, KANG X N, DAI Z, et al. Prediction of chronic hepatitis B, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma by SELDI-based serum decision tree classification[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2007, 133: 825-834.

(上接第 260 页)

## 参考文献:

- [1] 沈金灿,康海宁,谢丽琪,等.金属结合硫蛋白在TRIS醋酸缓冲体系中的电喷雾质谱表征研究[J].质谱学报,2007, 28 (4): 202-208.
- [2] BABU K R, DOUGLAS D J. Methanol-induced conformations of myoglobin at pH 4.0 [J]. Biochem, 2000, 39 (47): 14 702-14 710.
- [3] BABU K R, MORADIAN A, DOUGLAS D J. The methanol-induced conformational transitions of beta-lactoglobulin, cytochrome c, and ubiquitin at low pH: A study by electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Am Soc Mass Spectrum, 2001, 12(3): 317-328.
- [4] KAMATARI Y O, KONNO T, KATAOKA M, et al. The methanol-induced transition and the expanded helical conformation in hen lysozyme[J]. Protein Sci, 1998, 7 (3): 681-688.
- [5] MAO D M, BABU K R, CHEN Y L, et al. Conformations of gas-phase lysozyme ions produced from two different solution conformations [J]. Anal Chem, 2003, 75 (6): 1 325-1 330.
- [6] 方盈盈,胡新根,于 丽,等.溶菌酶热变性的DSC研究[J].物理化学学报,2007, 23 (1): 84-87.
- [7] 潘婷婷,储艳秋,吴 波,等.电喷雾质谱研究乙腈诱导的溶菌酶的构象变化[J].复旦学报:理科版,2008,47(4):33-38.
- [8] 杨宇红,邵正中,陈 新.光谱法研究pH值对再生桑蚕丝素蛋白在水溶液中结构的影响[J].化学学报,2006, 64 (16): 1 730-1 736.