

牛血清白蛋白与柚皮素复合物的 非变性质谱研究

何源峰, 苗 慧, 朱龙平, 陈 宝

(中山大学药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 血清白蛋白是血液中最丰富的蛋白, 研究其与药物的结合情况对了解药物在体内的运输和分布具有重要意义。本研究以柚皮素为模型药物, 采用非变性质谱法研究牛血清白蛋白(BSA)与柚皮素的相互作用情况。结果表明, BSA与柚皮素形成了化学计量比为1:1和1:2的非共价复合物, 二者亲和力较强(平衡解离常数 $K_{d1} = (7.82 \pm 0.03) \mu\text{mol/L}$, $K_{d2} = (9.63 \pm 0.02) \mu\text{mol/L}$), 结合速度快, 5 min左右即可达到饱和。该方法具有操作简便、检测快速、样品消耗量小、无需标记等优点, 可为其他药物与血清白蛋白的相互作用研究提供参考。

关键词: 非变性质谱; 纳升电喷雾质谱; 牛血清白蛋白; 柚皮素; 相互作用

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2022)03-0374-07

doi: 10.7538/zpxb.2021.0175

Investigation of Interactions between Naringenin and Bovine Serum Albumin by Native Mass Spectrometry

HE Yuan-feng, MIAO Hui, ZHU Long-ping, CHEN Bao

(School of Pharmacy, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Serum albumin is a globular protein, which is the most abundant protein in human blood and plays a vital role in drug transportation, distribution and metabolism. Bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin (HSA) have a high degree of homology with structural similarity of 76%. In addition, BSA is cheap and easy to obtain, which is often used as a model protein. Therefore, studying the interaction between the drug and BSA is helpful to understand the transportation and distribution of drug in the body, and is of great significance for elucidating the mechanism action of the drug. Naringenin is an important flavonoid compound that exists in various citrus fruits, tomatoes and grapes, which has been shown to have a variety of pharmacological effects, such as anti-cancer, antioxidant, anti-atherosclerosis, anti-thrombosis and vasodilation activities, etc. Although naringenin has a variety of pharmacological activities, its effect on plasma protein is still unclear. There are many methods for protein-ligand interaction analysis, but those methods have certain shortcomings, such as high sample consumption, long analysis time, the need to label and fix the protein or ligand before analysis, which may easily lead to deviations. Electrospray ionization (ESI) is used in

native mass spectrometry to transfer the complete protein-ligand complex from the liquid phase to the gas phase. This process maintains weak interactions and retains the structure of biological macromolecules and biological function. Native mass spectrometry has the advantages of low sample consumption, no labeling, simplicity, rapidity, and sensitivity. It has been successfully applied to the study of the interaction between proteins and ligands in recent years. In this study, the interaction between BSA and naringenin was studied by native mass spectrometry, which could quickly obtain information about the interaction mode, stoichiometric ratio, equilibrium dissociation constant, and binding kinetics. The results showed that BSA and naringenin formed a reversible non-covalent complex with a stoichiometric ratio of 1 : 1 and 1 : 2. BSA and naringenin had a strong affinity (equilibrium dissociation constant $K_{d1} = (7.82 \pm 0.03) \mu\text{mol/L}$, $K_{d2} = (9.63 \pm 0.02) \mu\text{mol/L}$). The binding speed of BSA and naringenin was fast, which reached saturation after incubating for about 5 min. This method has the advantages of simplicity, rapidity, low sample consumption, no labeling, etc., and can provide reference for the study of the interaction between other drugs and serum albumin.

Key words: native mass spectrometry; nano electrospray mass spectrometry; bovine serum albumin (BSA); naringenin; interaction

血清白蛋白是一种球状蛋白^[1],是人血液中含量最丰富的蛋白质^[2],在药物的运输、分布和代谢中起着至关重要的作用^[3]。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)与人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)具有高度的同源性和 76% 的结构相似性^[4],且价格便宜、易获取,常被用作模型蛋白。因此,研究药物与 BSA 的相互作用,有助于了解其在体内的运输和分布情况,对于阐明药物的作用机制具有重要的意义。

柚皮素的结构示于图 1,它是一种重要的黄酮类化合物,存在于各种柑橘类水果、西红柿和葡萄中^[5],具有多种药理作用,包括抗癌、抗氧化、抗动脉粥样硬化、抗血栓形成和血管扩张等^[6]。尽管柚皮素具有多种药理活性,但其对血浆蛋白的影响尚不清楚。

目前已有多种研究蛋白-配体相互作用的分析方法,如荧光光谱法、圆二色光谱法、等温滴定量热法、表面等离子体共振光谱法和核磁共振波谱法^[7-9]等。但这些方法存在一定的缺陷,如样品消耗量大;分析时间长;在分析之前需要对蛋白质或配体进行标记、固定,容易导致偏差反应等。非变性质谱(native mass spectrometry)利用电喷雾电离(ESI)软电离技术将完整的蛋白质-配体复合物从液相转移到气相,该过程保持了较弱的相互作用,保留了生物大分子的结构和生物功能^[10]。非变性质谱具有样品消耗量少、无需标记、简便、快速、灵敏等优点^[11],近年来已成功应用于蛋白质与配体之间的相互作用研究^[12-15]。

本研究拟利用非变性质谱法研究 BSA 与柚皮素的相互作用,快速得到二者的相互作用方式、化学计量比、平衡解离常数、结合动力学等信息,希望为柚皮素的进一步开发和应用提供数据基础,为其他药物与血清白蛋白的相互作用研究提供借鉴。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

Synapt G2-Si HDMS 纳升电喷雾-四极杆-离子淌度-飞行时间质谱仪:美国 Waters 公司

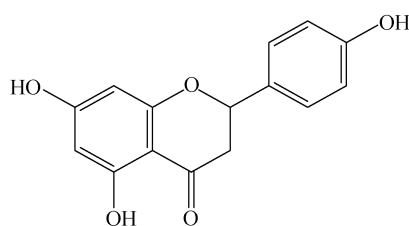


图 1 柚皮素化学结构

Fig. 1 Chemical structure of naringenin

产品;P-97 毛细管拉制仪:美国 Sutter Instruments 公司产品;Milli-Q Advantage A10 超纯水机:德国 Merck Millipore 公司产品。

1.2 材料与试剂

BSA:美国 Sigma 公司产品;柚皮素:上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品;醋酸铵、甲酸:美国 Thermo Fisher 公司产品;甲醇:美国 Honeywell 公司产品;硼硅酸毛细管:美国 Sutter Instrument 公司产品。

2 实验方法

2.1 溶液配制

精密称取适量的 BSA,用超纯水配制成 50 $\mu\text{mol/L}$ 母液,备用。取适量的 BSA 母液,用 200 mmol/L 醋酸铵溶液稀释到 5 $\mu\text{mol/L}$ 。

精密称取适量的柚皮素,用甲醇配制成 3 mmol/L母液,备用。用 200 mmol/L 醋酸铵溶液将柚皮素稀释到 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

将 BSA 与柚皮素按照物质的量比 1 : 3 混合,用 200 mmol/L 醋酸铵溶液稀释,蛋白最终浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 质谱进样针的制备

通过 P-97 毛细管拉制仪对外径为 1.0 mm、内径为 0.58 mm 的硼硅酸毛细管进行拉制得到纳喷针,具体参数为:Heat = 500, Pull = 0, VEL = 35, TIME = 250。

2.3 非变性质谱分析

用移液枪吸取 3 μL 蛋白复合物溶液,推入自制纳喷针中,插入导电铂丝,上样,经质谱仪分析。根据蛋白复合物信号的强弱及分辨率,选择合适的仪器参数。主要参数如下:纳升电喷雾离子源 (nESI),正离子模式,毛细管电压 (capillary voltage)1.0 kV,锥孔电压 100 V,源偏移 (source offset)80 V,源温度 37 $^{\circ}\text{C}$,捕获气体流速 3 mL/min,详细参数列于表 1。

2.4 数据处理

采用 Waters 公司的 Masslynx V4.1 和 MaxEnt 软件进行数据处理。

3 结果与讨论

3.1 质谱条件优化

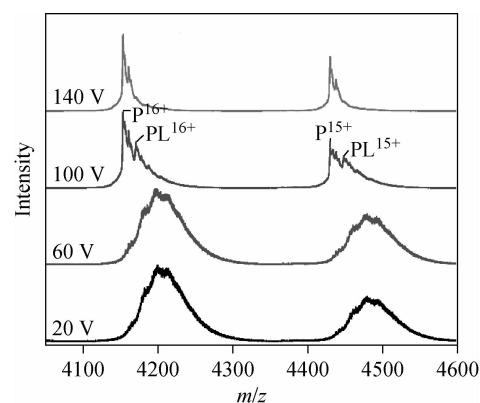
本研究系统地考察了关键仪器参数对 BSA-柚皮素复合物测定的影响,发现锥孔电

压、源温度以及捕获气体流速对复合物的测定具有显著影响。

表 1 详细仪器参数

Table 1 Detailed instrument parameters		
模块	参数名称	数值
Module	Parameter	Value
离子源	毛细管电压/kV	1.0
	锥孔电压/V	100
	源偏移/V	80
	源温度/ $^{\circ}\text{C}$	37
	锥孔气体/(L/h)	0
捕获直流电压	纳米流气体/(L/h)	0
	喷雾气体/(L/h)	0
	吹扫气体/(L/h)	0
	入口电压/V	1
	偏压/V	3
气体控制	捕获直流电压/V	-2
	出口电压/V	0
	氩气/(mL/min)	3
	氦气/(mL/min)	100
	氮气/(mL/min)	80
质量文件类型	质量 1	1000
	停留时间 1/%	25
	斜坡时间 1/%	25
	质量 2	2000
	停留时间 2/%	25
	斜坡时间 2/%	25
	质量 3	3000

通过考察不同锥孔电压的测定结果,发现在一定范围内,随着锥孔电压的升高,蛋白及其复合物峰的分辨率越来越高,示于图 2。当锥孔电压为 20、60 V 时,由于溶剂化效应的影响,蛋白复合物与溶液中的醋酸铵等形成非特异性加合物,质谱峰右移,图谱分辨率低;当锥孔电压为 100 V 时,蛋白复合物峰的丰度及分辨率最高;当锥孔电压为 140 V 时,蛋白复合物发生源内裂解,其质谱峰完全消失。因此,选择 100 V 作为最佳锥孔电压。



注:P表示BSA;PL表示BSA-柚皮素复合物

图2 不同锥孔电压下的BSA-柚皮素复合物质谱图
Fig.2 Mass spectra of BSA-naringenin complex under different sample cone voltages

本实验分别考察了37、80、120℃时蛋白复合物的丰度,结果示于图3。37℃时,蛋白复合物的丰度最高,随着温度升高,蛋白复合物的丰度逐渐降低,说明源温度对BSA-柚皮素复合物的影响较大,可能是高温容易使蛋白发生去折叠^[16],从而导致小分子从结合口袋脱落。因此,选择37℃作为最佳源温度。

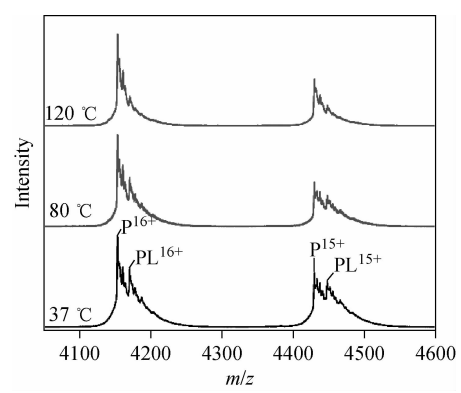


图3 不同源温度下的BSA-柚皮素复合物质谱图
Fig.3 Mass spectra of BSA-naringenin complex under different source temperatures

实验进一步考察了捕获气体流速对蛋白及其复合物分辨率的影响,结果示于图4。可见,当捕获气体流速为0 mL/min时,蛋白及其复合物峰的分辨率较低,谱图不平滑;当捕获气体流速为3 mL/min时,分辨率显著提高;当捕获气体流速超过3 mL/min时,分辨率未见显著变化。因此,选择3 mL/min作为

最佳的捕获气体流速。

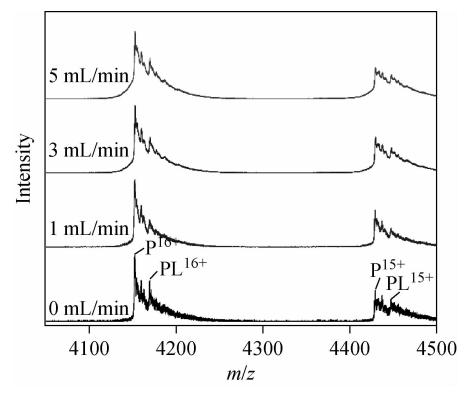


图4 不同捕获气体流速下的BSA-柚皮素复合物质谱图
Fig.4 Mass spectra of BSA-naringenin complex under different flow rates of trap gas

3.2 BSA复合物的ESI-MS分析

空白BSA和物质的量比1:3的BSA-柚皮素复合物的质谱图示于图5a,其中 m/z 3 908、4 153、4 430和4 746处的峰分别代表BSA的+17、+16、+15和+14电荷态,表明BSA处于天然折叠状态^[10]。此外, m/z 3 924、4 170、4 448和4 766处的峰分别代表BSA-柚皮素1:1复合物的+17、+16、+15和+14电荷态; m/z 4 187与4 466处的峰分别代表BSA-柚皮素1:2复合物的+16与+15电荷态。进一步对BSA及BSA-柚皮素复合物进行去卷积处理,得到的分子质量信息示于图5b,其中66 432 u为BSA的平均分子质量,66 705 u和66 977 u分别代表化学计量比1:1和1:2的BSA-柚皮素复合物的平均分子质量。

为了确定柚皮素与BSA的相互作用方式,向BSA-柚皮素复合物溶液中加入等体积的甲醇以及1%甲酸,诱导BSA复合物发生去折叠(变性)。结果表明,分子质量为66 705 u和66 977 u的BSA-柚皮素复合物峰完全消失,仅剩分子质量为66 430 u的BSA峰,说明柚皮素是以非共价方式与BSA发生相互作用,示于图6。

3.3 平衡解离常数

通过直接ESI-MS法测定BSA-柚皮素复合物的平衡解离常数(K_d),该方法是基于电喷雾电离过程中将蛋白质溶液转化为气相离子,当配体与蛋白质相比足够小时,配体结合蛋白

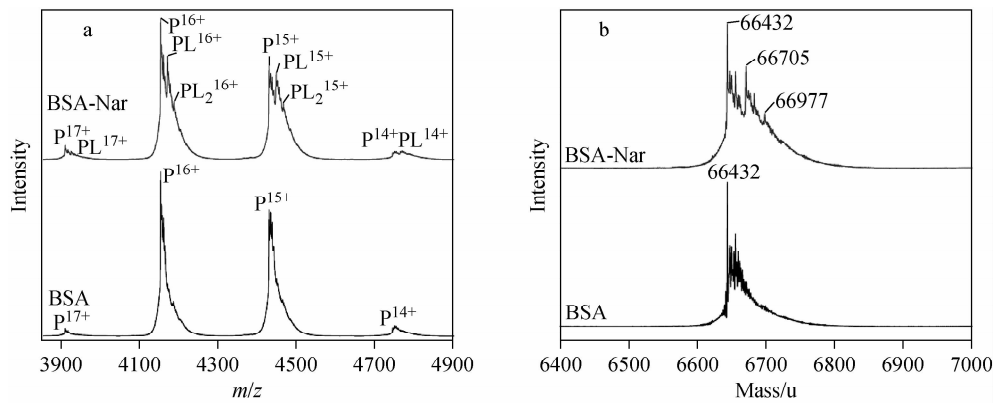


图 5 BSA 与 BSA-柚皮素复合物的多电荷(a)和去卷积(b)质谱图

Fig. 5 ESI-MS spectra of multiply charged (a) and deconvoluted (b) of BSA and BSA-naringenin complex

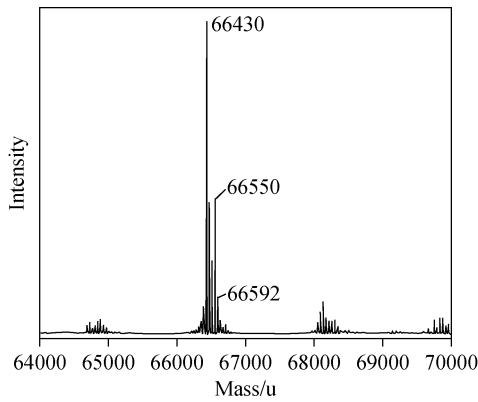
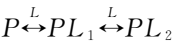


图 6 BSA-柚皮素复合物去折叠后的质谱图

Fig. 6 Mass spectrum of BSA-naringenin complex after unfolding

的大小和表面特性与游离蛋白相似,因此,气相中测定的离子丰度比可以代表平衡浓度比^[17-18]。参照公式(1)~(4)可计算 K_{d1} 和 K_{d2} , 其中, $[P_0]$ 表示蛋白总浓度, $[P]$ 表示游离蛋白浓度, $[PL_1]$ 、 $[PL_2]$ 分别表示 1 : 1 和 1 : 2 蛋白-配体复合物浓度, R 为蛋白-配体复合物与游离蛋白浓度比, $[L_0]$ 表示小分子总浓度, $\sum I_P$ 表示游离蛋白总丰度, $\sum I_{PL_1}$ 、 $\sum I_{PL_2}$ 表示配体结合蛋白总丰度。



$$R_1 = \frac{[PL_1]}{[P]} = \frac{\sum I_{PL_1}}{\sum I_P} \tag{1}$$

$$K_{d1} = \frac{[L_0] - \frac{R_1}{R_1 + 1}[P_0]}{R_1} \tag{2}$$

$$R_2 = \frac{[PL_2]}{[P]} = \frac{\sum I_{PL_2}}{\sum I_P} \tag{3}$$

$$K_{d2} = \frac{R_1 \left([L_0] - \frac{R_1 + 2R_2}{R_1 + R_2 + 1} [P_0] \right)}{R_2} \tag{4}$$

使用上述方法计算化学计量比 1 : 1 和 1 : 2 的 BSA-柚皮素复合物的 K_{d1} 和 K_{d2} 。结果显示, K_{d1} 为 $(7.82 \pm 0.03) \mu\text{mol/L}$, K_{d2} 为 $(9.63 \pm 0.02) \mu\text{mol/L}$, 与基于荧光光谱法测得的 K_d 值 $(7.46^{[19]}, 19.17^{[5]} \mu\text{mol/L})$ 一致,说明该方法准确、可靠。

3.4 结合动力学

将 BSA 与柚皮素分别混合 5、10、20、40 min, 经质谱分析, 结果显示: 孵育不同时间, 蛋白复合物与游离蛋白的丰度比未见显著变化, 说明柚皮素与 BSA 形成非共价复合物的速度非常快, 5 min 内基本达到饱和, 示于图 7。

4 结论

本研究基于非变性质谱法考察了 BSA 与柚皮素的相互作用, 结果表明, BSA 与柚皮素形成了非共价复合物且亲和力较强, 其化学计量比为 1 : 1 和 1 : 2。结合动力学结果显示, 柚皮素与 BSA 形成非共价复合物的速度非常快。该方法具有无需标记、样品消耗量小、简便快速、灵敏等优点, 可为其他药物和血清白蛋白的相互作用研究提供参考。

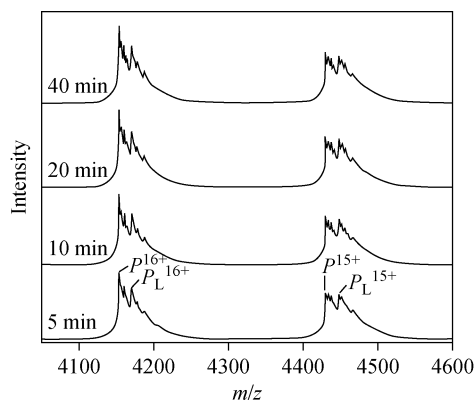


图7 BSA与柚皮素孵育不同时间的质谱图

Fig. 7 Mass spectra of BSA and naringenin incubated under different time

参考文献:

- [1] RABBANI G S, NATE AHN S. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: a natural cargo[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 123: 979-990.
- [2] ZHOU X Q, WANG B L, KOU S B, LIN Z Y, LOU Y Y, ZHOU K L, SHI J H. Multi-spectroscopic approaches combined with theoretical calculation to explore the intermolecular interaction of telmisartan with bovine serum albumin [J]. *Chemical Physics*, 2019, 522: 285-293.
- [3] SHI J H, PAN D Q, WANG X X, LIU T TING, JIANG M, WANG Q. Characterizing the binding interaction between antimalarial artemether (AMT) and bovine serum albumin (BSA): spectroscopic and molecular docking methods[J]. *Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology*, 2016, 162: 14-23.
- [4] YANG Y, ZHANG N, SUN Y, LI J, ZHAO R, ZHENG Z, DING Y, ZHANG X, GENG D, SUN Y. Multispectroscopic and molecular modeling studies on the interaction of bile acids with bovine serum albumin (BSA)[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2018, 1 180: 89-99.
- [5] HU Y J, WANG Y, YU O Y, ZHOU J, LIU Y. Characterize the interaction between naringenin and bovine serum albumin using spectroscopic approach[J]. *Journal of Luminescence*, 2010, 130(8): 1 394-1 399.
- [6] ZHANG Y H, RU Y, JIANG C, YANG Q M, XIAO A F. Naringinase-catalyzed hydrolysis of naringin adsorbed on macroporous resin[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 93: 48-54.
- [7] BECKER W, BHATTIPROLU K C, GUBENSÄ K N, ZANGGER K. Investigating protein-ligand interactions by solution nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Chem Phys Chem*, 2018, 19(8): 895-906.
- [8] LÓPEZ D M D, TRAN D T, VIAULT G, DAI R I S, PEIXOTO P A, CAPELLO Y, MINDER L, POUYSÉGU L, GÉNOT E, di PRIMO C, DEFFIEUX D, QUIDEAU S. Real-time analysis of polyphenol-protein interactions by surface plasmon resonance using surface-bound polyphenols[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2021, 27(17): 5 498-5 508.
- [9] SIDDIQUI S, AMEEN F, REHMAN S U, SARWAR T, TABISH M. Studying the interaction of drug/ligand with serum albumin[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, 336(6): 116 200.
- [10] LENEY A C, HECK A. Native mass spectrometry: what is in the name?[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2017, 28(1): 5-13.
- [11] PUGLISI R, ERBA E B, PASTORE A. A guide to native mass spectrometry to determine complex interactomes of molecular machines[J]. *The FEBS Journal*, 2020, 287(12): 2 428-2 439.
- [12] DU Y, ZHAO F, XING J, CUI M, LIU Z. Investigation of interactions between cytochrome c and ginsenosides by native mass spectrometry and molecular docking simulations[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2020, 34 (18): e8853.
- [13] CHAN S H, MENDES V, THOMAS S E, MCCONNELL B N, MATAK-VINKOVIĆ D, COYNE A G, BLUNDELL T L, ABELL C. Fragment screening against the EthR-DNA interaction by native mass spectrometry[J]. *Angewandte Chemie*, 2017, 56(26): 7 488-7 491.
- [14] WANG B, QIN Q, CHANG M, LI S, SHI X, XU G. Molecular interaction study of flavonoids with human serum albumin using native mass spectrometry and molecular modeling[J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2017, 410: 827-837.
- [15] ZHUANG X, LI X, ZHAO B, LIU Z, SONG

- F, LU J. Native mass spectrometry based method for studying the interactions between superoxide dismutase 1 and stilbenoids[J]. ACS Chemical Neuroscience, 2020, 11(2):184-190.
- [16] HYEON P J, JACKMAN J A, RAHIM F A, JUNREN M G, KYEONG Y B, NAM-JOON C. Temperature-induced denaturation of BSA protein molecules for improved surface passivation coatings[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, doi: 10.1021/acsami.8b13749.
- [17] LIU Y, SU B, WANG X. Study on the noncovalent interactions of saikosaponins and cytochrome c by electrospray ionization mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2012, 26(7): 719-727.
- [18] NGUYEN G T H, TRAN T N, PODGORSKI M N, BELL S G, SUPURAN C T, DONALD W A. Nanoscale ion emitters in native mass spectrometry for measuring ligand-protein binding affinities[J]. Acs Central Science, 2019, 5(2): 308-318.
- [19] 王琳琳,朱靖博,寇自农,丁燕,杨荣荣. 5,7,4'-三羟基取代黄酮化合物与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 大连工业大学学报,2015,34(5):320-325.
- WANG Linlin, ZHU Jingbo, KOU Zinong, DING Yan, YANG Rongrong. Interaction of bovine serum albumin with 5,7,4'-trihydroxy substituent flavonoids[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2015, 34(5): 320-325 (in Chinese).
- (收稿日期:2021-10-13;修回日期:2021-12-06)