

基于离子淌度质谱研究低浓度甘油对蛋白质结构的影响

何源峰, 朱龙平, 苗慧, 陈宝

(中山大学药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 甘油作为水溶液中蛋白质的稳定剂, 研究其存在时蛋白质的结构变化对蛋白质相关研究和应用具有重要意义。本研究以牛血清白蛋白(BSA)为模型蛋白, 采用离子淌度质谱(IM-MS)法和动态光散射法考察在近似生理条件下低浓度甘油对蛋白质结构的影响。在一定浓度范围内, 甘油可引起 BSA 平均电荷和碰撞截面积(CCS)的增加, 单个电荷状态也经历了 CCS 值的增加, 还可导致 BSA 水化半径的增加, 表明低浓度甘油可引起溶液中蛋白质结构松散。此外, 含 0.5% 甘油的 BSA 去折叠的开始电压较高, 且去折叠过渡发生在更宽的电压范围内, 表明低浓度甘油可提高蛋白质的稳定性。本工作可为甘油稳定蛋白质的机制研究提供参考。

关键词: 离子淌度质谱(IM-MS); 甘油; 牛血清白蛋白(BSA); 蛋白质结构; 碰撞截面积(CCS)

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2022)05-0663-07

doi: 10.7538/zpxb.2022.0131

Effects of Low Concentration Glycerol on Protein Structure Based on Ion Mobility-Mass Spectrometry

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

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

Abstract: Glycerol is a simple polyol compound, it has many biological and industrial applications when mixed with water. It can stabilize proteins under extreme conditions, such as heat stress, cold shock, high pressure, etc. Most proteins are usually stored in a buffer system with the presence of glycerol after purification to maintain the stability of their biological activity. At present, there are still some controversies about the protective mechanism of glycerol on proteins. Most studies were focused on the effect of high concentrations of glycerol on protein structure. However, there were few related studies on low concentrations of glycerol. Therefore, an in-depth understanding of the effects of low concentrations of glycerol on protein structure is beneficial to protein-related research and applications. Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) has become a commonly used technique to study protein structure and function, which is reliable and time-efficient. Protein conformational change can be described in more

detailed by ESI combined with ion mobility spectrometry. Ion mobility provides an additional dimension of resolution. When ions with different sizes, charges and shapes pass through the chamber, they are migrated and separated in neutral media according to the collision cross-section (CCS). By measuring the molecular weight, charge state distribution, drift time and CCS, the structural change information of the protein can be obtained. In this study, bovine serum albumin (BSA) was used as a model protein, and ion mobility-mass spectrometry (IM-MS) and dynamic light scattering were used to investigate the effect of low concentration glycerol on protein structure under approximate physiological conditions. The results showed that glycerol within a certain concentration range could cause an increase in the average charge and CCS of BSA. Meanwhile, a single charge state of BSA also experienced an increase of CCS in presence of glycerol. In addition, the hydration radius of BSA were increased with the increase of glycerol concentration. The results indicated that low concentrations of glycerol can loosen proteins. It is interesting to note that the unfolding voltage of BSA containing 0.5% glycerol was higher than BSA without glycerol and the unfolding transition occurred in a wider voltage range, indicating that low concentration of glycerol can improve the stability of the protein. These results provide further insight into the mechanism of glycerol stabilizing proteins and may also provide references for the related research and development of proteins.

Key words: ion mobility-mass spectrometry (IM-MS); glycerin; bovine serum albumin (BSA); conformation of protein; collision cross-section (CCS)

甘油是一种简单的多元醇化合物,与水混合后,具有许多生物和工业应用。甘油能在极端条件下稳定蛋白质,如热应激、冷冲击、高压等^[1-4]。大多数蛋白质在纯化后通常保存在含有甘油的缓冲体系中,以保持其生物活性的稳定性^[5]。目前,关于甘油对蛋白质的保护作用机制仍存在争议,大部分研究主要着眼于高浓度甘油对蛋白质结构的影响^[1,5-6],而对低浓度甘油的研究则较少。因此,深入了解低浓度甘油对蛋白质结构的影响,有利于蛋白质的相关研究和应用。

电喷雾电离质谱(ESI-MS)是研究蛋白质结构和功能的常用技术,具有可靠、省时的特点^[7-8]。当 ESI-MS 与离子淌度(ion mobility spectrometry, IMS)相结合时,可以更详细地描述蛋白质的构象变化^[9-14]。当不同尺寸、电荷和形状的离子穿过离子淌度腔室时,会根据碰撞截面积(CCS)的大小在中性介质中迁移并分离。通过测量蛋白质的分子质量、电荷态分布、漂移时间和 CCS 值,可以得到蛋白质的结构变化信息。

本研究以牛血清白蛋白(bovine serum

albumin, BSA)为模型蛋白,采用离子淌度质谱(IM-MS)技术考察低浓度甘油对蛋白质结构的影响,并探讨其可能的机制。采用动态光散射法验证液体状态下低浓度甘油对蛋白质粒径的影响,同时利用碰撞诱导去折叠指纹图谱研究其对蛋白质稳定性的影响,以期进一步了解甘油稳定蛋白质的机制,为蛋白质的相关研究和开发提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

Synapt G2-Si HDMS 电喷雾-四极杆-行波离子淌度-飞行时间质谱仪:美国 Waters 公司产品;DynaPro Plate Reader II 高通量动态光散射仪:美国 Wyatt 公司产品;P-97 毛细管拉制仪:美国 Sutter 公司产品;5424R 冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品;MPC-P25 微孔板离心机:杭州奥盛仪器有限公司产品;XS105 十万分之一天平、Delta 320 pH 计:德国 Mettler 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

马心肌红蛋白、BSA、氨水:美国 Sigma 公司产品;甘油:上海麦克林生化科技有限公司产品;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 公司产品;96 孔板:美国 Corning 公司产品;其余试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液配制 精密称取适量的 BSA,用 100 mmol/L 醋酸铵溶液 (pH 7.4) 配制成 50 $\mu\text{mol/L}$ 母液。取 20 μL BSA 母液,分别加入不同体积的 10% 甘油,并用 100 mmol/L 醋酸铵溶液稀释至 50 μL ,得到甘油浓度分别为 0%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2% 和 4% 的 BSA 溶液 (20 $\mu\text{mol/L}$)。

精密称取适量的马心肌红蛋白,用甲醇-水-甲酸溶液 (49 : 49 : 2, V/V/V) 配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 的变性马心肌红蛋白溶液。

1.3.2 行波离子淌度数据采集 将质谱仪切换为离子淌度采集模式,打开氮气 (淌度气体)、氩气 (碰撞、冷却、净化离子) 和氦气 (缓冲作用)。吸取 3 μL BSA 蛋白溶液上样,优化离子淌度条件。采用已知 CCS 的变性马心肌红蛋白进行 CCS 校正,计算 BSA 离子的 CCS。行波离子淌度的基本原理及校正程序已有报道^[15-17],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 0.8~1.2 kV,锥孔电压 40 V,源偏移 80 V,源温度 37 $^{\circ}\text{C}$,离子淌度气体为氮气,行波速度 175 m/s,行波高度 8 V。通过 4 V 的增量将碰撞能量逐步增加到 70 V,以获得碰撞诱导去折叠数据。

1.3.3 动态光散射 以 100 mmol/L 醋酸铵溶液 (pH 7.4) 为溶剂,配制甘油浓度分别为 0%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2% 和 4% 的 BSA 溶液 (1 g/L),4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 10 000 r/min 离心 10 min,缓慢吸取 100 μL 上清液,加入 96 孔板中,25 $^{\circ}\text{C}$ 下以 2 000 r/min 离心 3 min;利用高通量动态光散射仪测量各样品的流体力学半径,测量温度 25 $^{\circ}\text{C}$,散射角 150 $^{\circ}$ 。

1.3.4 数据处理 采用 Waters 公司的 Masslynx V4.1 和 Driscopt 软件处理离子淌度数据,WYATT 公司的 DYNAMICS 7.8.1.3 软件处理动态光散射数据。

2 结果与讨论

2.1 ESI-MS 分析

质谱分析具有基于电荷态分布的变化跟踪蛋白质结构变化的能力^[18]。电荷态分布结果显示,在不含甘油的情况下,BSA 的主要电荷态为 +15 和 +16,表明其四级结构保存完好,处于紧凑的折叠状态^[19];当甘油浓度 $\leq 0.1\%$ 时,BSA 的电荷态分布与不含甘油的电荷态分布基本一致,表明结构未发生显著变化;当甘油浓度为 0.5% 时,BSA 的电荷态分布发生显著变化,整体向高电荷态转移;随着甘油浓度的进一步增加 ($\leq 4\%$),BSA 的电荷态不断向高电荷态转移,低电荷态的峰基本消失,表明气相中 BSA 结构发生显著变化,示于图 1。

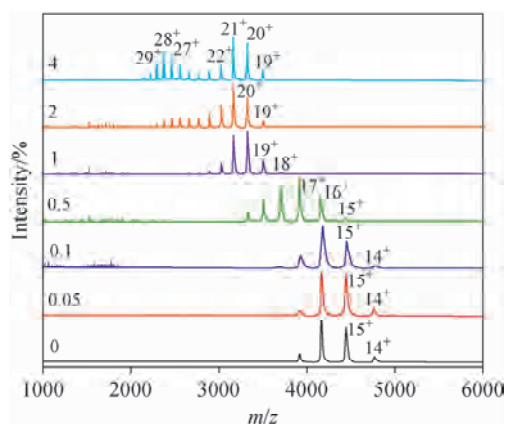


图 1 不同浓度甘油条件下 BSA 的质谱图
Fig. 1 Mass spectra of BSA with different concentrations of glycerol

根据公式 (1) 计算不同浓度甘油情况下 BSA 离子的平均电荷,其中 $\bar{Z}$ 表示加权平均电荷, Z_i 表示离子 i 的电荷数, I_i 表示离子 i 的离子强度,结果示于图 2。当甘油浓度 $\leq 0.1\%$ 时,BSA 的平均电荷数与不添加甘油时基本一致;当 $0.1\% < \text{甘油浓度} \leq 4\%$ 时,BSA 的平均电荷数随着甘油浓度的增加而增加,表明低浓度甘油可能导致气相中 BSA 的去折叠。

$$\bar{Z} = \frac{\sum (Z_i \cdot I_i)}{\sum I_i} \quad (1)$$

2.2 离子淌度分析

参照公式 (2) 计算不同浓度甘油情况下 BSA 离子的平均 CCS 值,其中 $\overline{\text{CCS}}$ 表示加权平

均 CCS 值, CCS_i 表示离子 i 的 CCS 值, I_i 表示离子 i 的离子强度, 结果示于图 3。与观察到的平均电荷数趋势一致, 在一定甘油浓度范围 (0.1%~4%) 内, BSA 的平均 CCS 值随着甘油浓度的增大而增大, 表明气相中 BSA 的去折叠程度随甘油浓度的增大而增大。

$$\overline{CCS} = \frac{\sum (CCS_i \cdot I_i)}{\sum I_i} \quad (2)$$

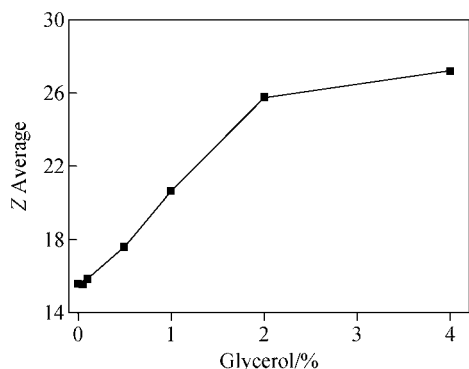


图 2 甘油浓度对 BSA 平均电荷的影响

Fig. 2 Effect of glycerol concentrations on average charge of BSA

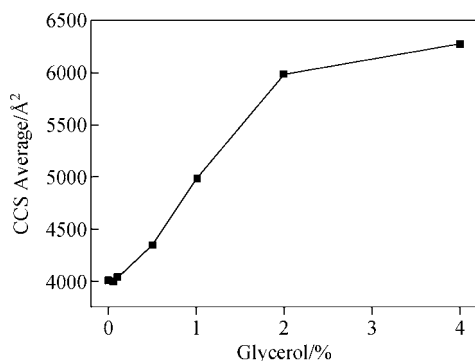


图 3 甘油浓度对 BSA 的 CCS 值的影响

Fig. 3 Effect of glycerol concentrations on CCS of BSA

进一步考察不同电荷态 BSA 离子的折叠情况, 结果示于图 4。携带不同电荷的 BSA 离子具有不同的漂移时间, 其 CCS 值随着电荷数的增加而增大, 表明 BSA 离子所带电荷数越多, 其去折叠程度越大。

同一蛋白质较高电荷态的离子比较低电荷态的离子具有更大的 CCS 值, 其原因可能是高电荷态导致库仑排斥力增加, 进而使离子在气

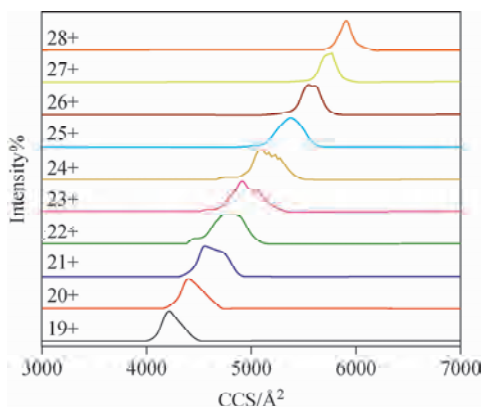


图 4 2%甘油存在下不同电荷

BSA 离子的碰撞截面积

Fig. 4 CCS of BSA ions with different charges in 2% glycerol

相中展开, 也可能是从溶液中转移了不太紧凑的蛋白质进入质谱^[20]。为了研究低浓度甘油导致蛋白质结构松散的机制, 本实验分析了单电荷态蛋白质离子的 CCS 值与甘油浓度之间的关系。结果显示, 在一定的甘油浓度范围 (0.1%~4%) 内, +16、+17 和 +18 电荷态 BSA 离子的 CCS 值均随着甘油浓度的增大而增大, 示于图 5a; 类似地, 单个电荷态 BSA 离子的到达时间也随着甘油浓度增大而增加, 示于图 5b~5d。以上结果表明, 甘油引起的电荷增加导致库仑排斥作用的增强不是导致蛋白质结构松散的唯一因素, 甘油引起的蛋白质结构松散也可能发生在溶液中。

2.3 动态光散射

为了证明甘油引起的蛋白质结构松散是否发生在溶液中, 本实验利用动态光散射法 (dynamic light scattering) 测量不同甘油浓度下 BSA 的水化半径大小, 从而监测蛋白质的结构变化。结果表明, 当甘油浓度 $\leq 1\%$ 时, BSA 粒径未发现显著变化; 当 $1\% < \text{甘油浓度} \leq 4\%$ 时, BSA 粒径随着甘油浓度的增大而增大, 示于图 6。结果表明, 甘油引起的蛋白质结构松散发生在溶液中。

2.4 碰撞诱导去折叠

较高浓度的甘油 (10%~40%) 可提高蛋白质稳定性^[1,6,21], 而低浓度甘油在引起蛋白质结构松散的情况下是否可以提高蛋白质稳定性有待进一步分析。本研究考察了在添加/不添加

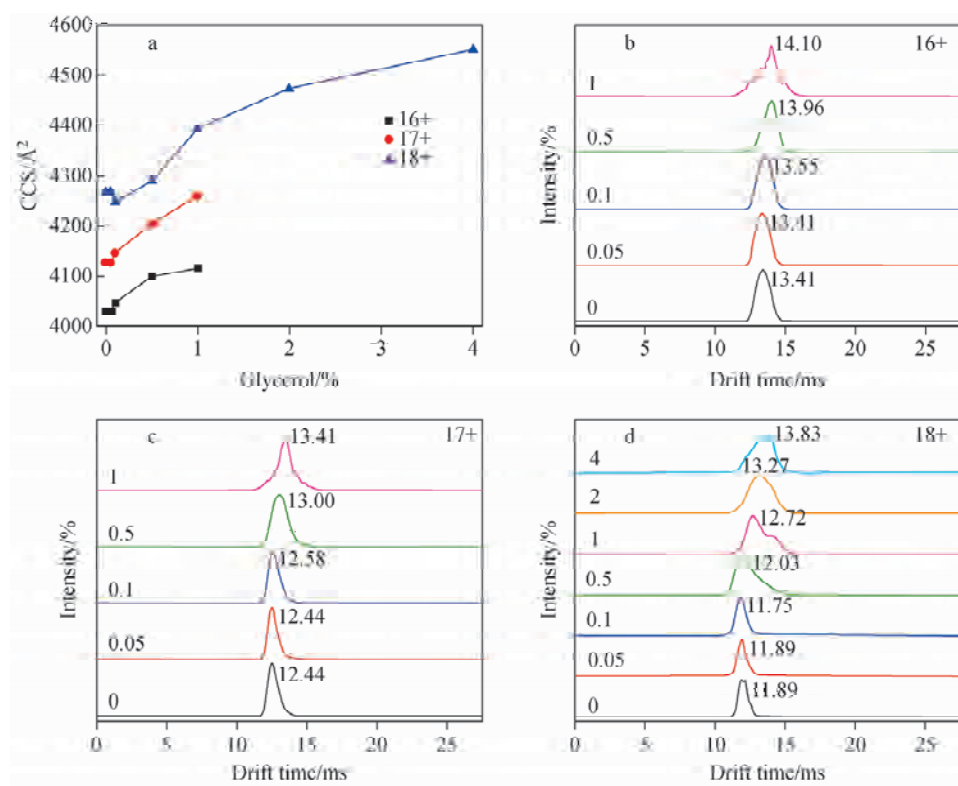


图 5 BSA 的 16+、17+、18+ 电荷状态的 CCS 值(a)和到达时间(b~d)与甘油浓度的关系
Fig. 5 Relationship between CCS value (a) and arrival time (b~d) of the 16+, 17+ and 18+ charge states of BSA with glycerol concentrations

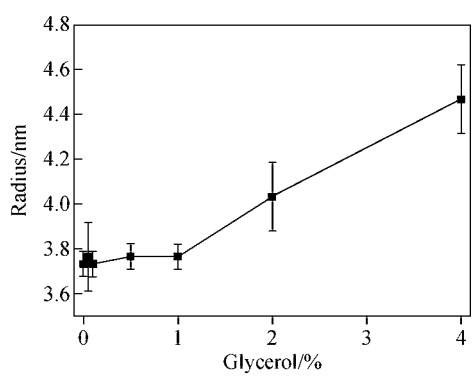


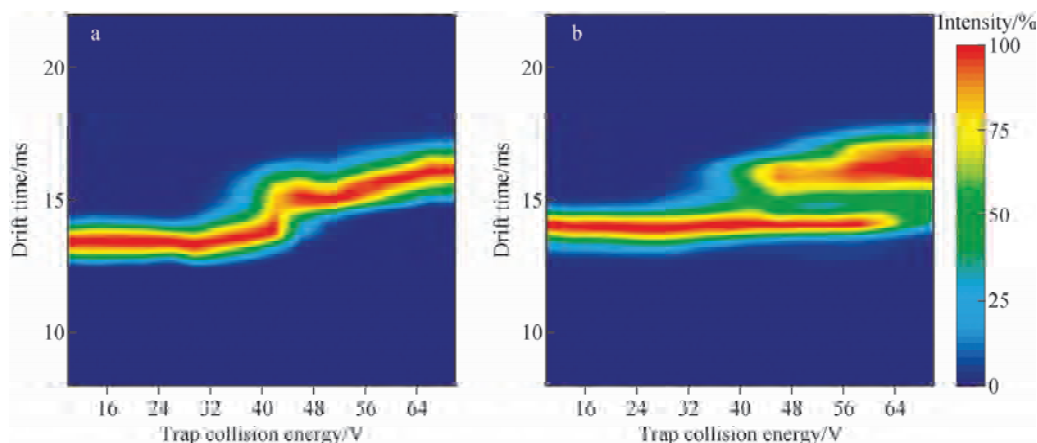
图 6 甘油浓度对 BSA 水化半径的影响
Fig. 6 Effect of glycerol concentration on hydration radius of BSA

甘油情况下进入离子淌度腔室前对 BSA 离子进行碰撞激活,得到相应的碰撞诱导去折叠指纹图谱,示于图 7。在相对较低的碰撞能量下,无论是否添加甘油,BSA 离子的漂移时间基本一致(约 13.6 ms),表明 BSA 处于紧凑构象。随着碰撞能量的增加,未添加甘油的 BSA 在 40~44 V 之间发生了一个去折叠事件,产生漂

移时间约 15.5 ms 的松散构象,48 V 时紧凑构象完全消失,示于图 7a;而在含 0.5%甘油的情况下,BSA 去折叠开始发生在更高的电压,并且去折叠过渡发生在更宽的电压范围内,44~58 V 之间仍以紧凑构象为优势构象,62~70 V 之间则以松散构象为优势构象,在 70 V 时仍可检测到紧凑构象(约 30%),示于图 7b。以上结果表明,低浓度甘油仍可提高蛋白质稳定性,抑制蛋白质去折叠。这可能是由于甘油会与蛋白质发生极强的非共价相互作用^[22],从而抑制蛋白质去折叠。

3 结论

本研究采用离子淌度质谱法和动态光散射法考察了在近似生理条件下低浓度甘油(0.05%~4%)对 BSA 结构和稳定性的影响,并探讨可能的机制。结果表明,低浓度甘油可引起气相中蛋白质结构的松散,这是电荷增加导致库仑排斥力增强和溶液中蛋白质结构松散共同作用的结果。碰撞诱导去折叠指纹图谱表



注:a. 不含甘油;b. 含 0.5%甘油

图 7 电荷状态为 16+ 的 BSA 碰撞诱导去折叠指纹图谱

Fig. 7 Collision-induced unfolding fingerprint spectra of 16+ charge state of BSA

明,低浓度甘油可提高蛋白质的稳定性,这可能是甘油与蛋白质发生极强的非共价相互作用的结果。

参考文献:

- [1] GEKKO K, TIMASHEFF N S. Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures[J]. *Biochemistry*, 1981, 20: 4 667-4 676.
- [2] MENG F G, HONG Y K, HE H W, LYUBAREV A E, KURGANOV B I, YAN Y B. Osmophobic effect of glycerol on irreversible thermal denaturation of rabbit creatine kinase[J]. *Biophysical Journal*, 2004, 87(4): 2 247-2 254.
- [3] RUAN K, XU C, LI T, LI J, LANGE R, BALNY C. The thermodynamic analysis of protein stabilization by sucrose and glycerol against pressure-induced unfolding: the typical example of the 33-kDa protein from spinach photosystem II [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270: 1 654-1 661.
- [4] FRANKS F, HATLEY R. Stability of proteins at subzero temperatures: thermodynamics and some ecological consequences[J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1991, 63(10): 1 367-1 380.
- [5] MITSUHIRO H, SATOSHI A, MASAOKI S, HIROKI I, SHIN-ICHI T, NOBUTAKA S. Direct evidence for the effect of glycerol on protein hydration and thermal structural transition[J]. *Biophysical Journal*, 2018, 115(4): 313-327.
- [6] PRIEV A, ALMAGOR A, YEDGAR S, GAVISH B. Glycerol decreases the volume and compressibility of protein interior[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1996, 35: 2 061-2 066.
- [7] RAJABI K, ASHCROFT A E, RADFORD S E. Mass spectrometric methods to analyze the structural organization of macromolecular complexes [J]. *Methods*, 2015, 89: 13-21.
- [8] SAHIN C, OSTERLUND N, LEPPERT A, JOHANSSON J, MARKLUND E G, BENE-SCH J L P. Ion mobility-mass spectrometry shows stepwise protein unfolding under alkaline conditions[J]. *Chemical Communications*, 2021, 57: 1 450-1 453.
- [9] LANUCARA F, HOLMAN S W, GRAY C J, EYERS C E. The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics[J]. *Nature Chemistry*, 2014, 6: 281-294.
- [10] VAHIDI S, STOCKS B B, KONERMANN L. Partially disordered proteins studied by ion mobility-mass spectrometry: implications for the preservation of solution phase structure in the gas phase[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(21): 10 471-10 478.
- [11] EL-BABA T J, FULLER D R, HALES D A, RUSSELL D H, CLEMMER D E. Solvent mediation of peptide conformations: polyproline structures in water, methanol, ethanol, and 1-propanol as determined by ion mobility spectrometry-mass spectrometry[J]. *Journal of the*

- American Society for Mass Spectrometry, 2019, 30: 77-84.
- [12] FOUQUE K J D, MORENO J, FERNANDEZ-LIMA F. Exploring the conformational space of growth-hormone-releasing hormone analogues using dopant assisted trapped ion mobility spectrometry-mass spectrometry[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2019, 123: 6 169-6 177.
- [13] MEYER N A, ROOT K, ZENOBI R, VIDAL-de-MIGUEL G. Gas-phase dopant-induced conformational changes monitored with transversal modulation ion mobility spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(4): 2 033-2 040.
- [14] BUTCHER D, BERNAD S, DERRIEN V, SEBBAN P, MIKSOVSKA J, FERNANDEZ-LIMA F. Non-symbiotic hemoglobin conformational space dependence on the heme coordination using nESI-TIMS-TOF MS[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2018, 430: 37-43.
- [15] RUOTOLO B T, BENESCH J L P, SANDERCOCK A M, HYUNG S J, ROBINSON C V. Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes[J]. Nature Protocols, 2008, 3: 1 139-1 152.
- [16] STIVING A Q, JONES B J, UJMA J, GILES K, WYSOCKI V H. Collision cross sections of charge-reduced proteins and protein complexes; a database for CCS calibration[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(6): 4 475-4 483.
- [17] GOING C C, WILLIAMS E R. Supercharging with *m*-nitrobenzyl alcohol and propylene carbonate: forming highly charged ions with extended, near-linear conformations[J]. Anal Chem, 2015, 87(7): 3 973-3 980.
- [18] FOUQUE K J D, FERNANDEZ-LIMA F. Following structural changes by thermal denaturation using trapped ion mobility spectrometry-mass spectrometry[J]. J Phys Chem B, 2020, 124(29): 6 257-6 265.
- [19] 何源峰, 苗慧, 朱龙平, 陈宝. 牛血清白蛋白与柚皮素复合物的非变性质谱研究[J]. 质谱学报, 2022, 43(3): 374-380.
- HE Yuanfeng, MIAO Hui, ZHU Longping, CHEN Bao. Investigation of interactions between naringenin and bovine serum albumin by native mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2022, 43(3): 374-380(in Chinese).
- [20] JURNECZKO E, BARRAN P E. How useful is ion mobility mass spectrometry for structural biology? The relationship between protein crystal structures and their collision cross sections in the gas phase[J]. Analyst, 2011, 136(1): 20-28.
- [21] VAGENENDE V, YAP M G S, TROUT B L. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol[J]. Biochemistry, 2009, 48(46): 11 084-11 096.
- [22] MENDES M A, SOUZA B M D, SANTOS L D D, SANTOS K S, PALMA M S. Analyzing glycerol-mediated protein oligomerization by electrospray ionization mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005, 19(18): 2 636-2 642.

(收稿日期:2022-07-18;修回日期:2022-08-18)