

维 A 酸结合蛋白 I 折叠/伸展过程的氢/氘交换质谱研究

张 琳, 谢建英

(广东海洋大学理学院, 广东 湛江 524088)

摘要: 氢/氘交换质谱通过测定蛋白骨架中的氢(氘)与溶剂中氘(氢)的相互交换作用来研究蛋白的结构信息。采用氢/氘交换技术结合傅里叶变换离子回旋共振质谱研究氘代维 A 酸结合蛋白 I 与溶剂之间的氢/氘交换, 发现在不同的 pH 值下, 该蛋白的氢/氘交换具有不同的交换机理和交换速率, 由其交换速率可估计不同交换时间蛋白骨架中残留的未交换的氢或氘的数目, 确定蛋白骨架在溶剂中的暴露程度, 得到蛋白的结构信息。

关键词: 氢/氘交换; 质谱; 维 A 酸结合蛋白

中图分类号: O 657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2010)05-302-04

Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Study

on the Folding/Unfolding Process of Cellular Retinoic Acid-Binding Protein I

ZHANG Lin, XIE Jian-ying

(College of Science, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: The structural information of proteins was studied with hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry by testing the hydrogen(deuterium) on protein bond exchange with the deuterium(hydrogen) in solvents. Utilizing hydrogen/deuterium exchange technique combined with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, the hydrogen/deuterium exchange in deuterium-cellular retinoic acid-binding protein I and its solvents was investigated. At different pH, the different exchange mechanism and different exchange speed are found for this protein. From the speed of the hydrogen/deuterium exchange, the number of unexchangeing hydrogen or deuterium at different exchange time remained in protein can be estimated, confirming the extent of the protein bond exposure to the solvents to obtain the structural information of protein.

Key words: hydrogen/deuterium exchange; mass spectrometry; cellular retinoic acid-binding protein

蛋白折叠/伸展一直是生物化学中最重要的问题之一, 蛋白的结构变化通常都伴随着蛋白功能的改变, 因此对蛋白质结构及其与生物功能关

系的研究也是当代分子生物学的核心领域之一。氢/氘交换(HDX)对蛋白结构非常敏感, 蛋白的结构不同在不同位置的交换速率也不同, 此即

HDX 可用来研究蛋白的折叠/伸展动力学的缘故^[1-2]。氢/氘交换的速率主要由 2 个因素确定, 即与溶剂的可接触性和氢键作用。形成分子内氢键的氢比那些与溶剂水形成氢键的氢交换速率慢, 而那些包埋在溶剂内未形成氢键的氢交换速率更慢。传统的氢/氘交换技术与核磁共振相结合, 而这种方法最大的缺陷在于需预先确定所讨论的蛋白的核磁共振谱, 这意味着要耗费大量的工作; 并且核磁共振对检测物的浓度要求也较高。质谱(MS)技术的发展使其能够精确地测定蛋白的分子质量, 如果蛋白中的氢部分被氘取代, 蛋白分子质量的增加就会在质谱图上反映出来, 且质谱所需分析物的量很少, 因此现代质谱技术可广泛用于蛋白质中氢/氘交换的检测^[3-8], 由此探寻蛋白的结构信息。

维 A 酸结合蛋白 I (CRABP I) 是细胞内脂结合蛋白家族之一, 它具有 136 个氨基酸残基, 组成 10 个条形 β 折叠和一小段 α 螺旋, 其结构简单, 既没有二硫键, 也没有辅基或转译后的修饰, 非常适合蛋白的折叠/伸展研究。本研究采用氢/氘交换技术与傅里叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR MS)相结合, 检测氘代维 A 酸结合蛋白(D-CRABP I)在水溶液中的伸展过程, 并讨论 pH 值的变化对蛋白伸展的影响。

1 试验部分

1.1 主要仪器与装置

傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(4.7T, APEX III); 德国 Bruker 公司产品; pH S-3C pH 计。

1.2 主要材料与试剂

CRABP I 按文献^[9]方法表达, 氘水及氘代醋酸购自 Aldrich 公司, 其他药品为市售分析纯试剂。

1.3 试验条件

1.3.1 H/D 交换 将冷冻干燥的蛋白溶于 $pD=3$ 的氘水和氘代醋酸溶液中($1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), $45\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温 20 min, 得到 D-CRABP I。HDX 反应的进行是将 D-CRABP I 以 $1:20$ 溶于 $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸水溶液中, 紧接着将蛋白溶液注入质谱仪进行检测。试验中的 pH 值和 pD 值均由 pH 计直接测得, 未考虑同位素效应的影响。

1.3.2 质谱条件 质谱仪为配备 4.7 Tesla 超导磁体的傅里叶变换离子回旋共振质谱仪

APEX III。喷雾电压 $2\ 500\text{ V}$, 毛细管温度 $120\text{ }^\circ\text{C}$, 离子检测激发电压 5.0 V , 离子源内真空度 $6.4 \times 10^{-5}\text{ Pa}$, 注射泵流速 $250\text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

2.1 不同 pH 值下蛋白的氢/氘交换质谱图

氢/氘交换质谱的测量可作为研究蛋白结构变化的重要工具, 其谱图可用来检测蛋白质折叠/伸展过程的各种结构形式。通过检测 pH 2.0~11 范围内的氘/氢交换质谱, 发现 pH 2.8~10 的质谱图与 pH 2.0~2.5 和 pH 10~11 的谱图存在明显的差别。pH 2.5 和 pH 3.5 时, D-CRABP I 与水溶液中氢相互交换的 FT-ICR MS 谱图示于图 1 和图 2。在 pH 2.5 时, CRABP I 的氢/氘交换展示了与 pH 3.5 时完全不同的同位素谱图形式, 这种差别可能归因于它们不同的交换反应机理。

2.2 不同 pH 值下的氢/氘交换机理

虽然氢/氘交换的反应机理尚未完全明了, 但人们普遍接受的是由 Linderström-Lang 提出, 并经 Hvidt 和 Nielsen 改进的二状态模型^[10-11]。该模型假设氢/氘交换由两个过程决定: 一个是通过蛋白的伸展/折叠将其骨架伸展使之暴露于溶剂中的过程; 另一个是蛋白结构中的氢(氘)与溶剂中的氘(氢)相互交换的过程。氢与氘的交换机理取决于这两个过程的相对速率。如果蛋白伸展/折叠互换速率比其结构中的氢与溶剂中的氘互换速率快, 氢/氘交换遵循 EX2 机理, 质谱图仅显示一组随时间逐渐漂移的同位素离子峰。如 pH 2.5 时 CRABP I 的氢/氘交换, 随着时间的推移, CRABP I 的 $[M+8H]^{8+}$ 峰逐渐向分子质量低的方向移动, 表示蛋白中的氘逐渐被溶液中的氢取代。反之, 如果蛋白伸展/折叠互换速率比其结构中的氢与溶剂中的氘互换速率慢, 氢/氘交换则遵循 EX1 机理, 质谱谱图中出现两组同位素离子峰, 其中 m/z 值低的一组峰在氢/氘交换的开始并不存在, 而是在交换过程中逐渐生长出来的, 它代表蛋白中氘被氢取代的一部分; 而 m/z 值高的一组峰在交换过程中逐渐消失, 该离子峰代表原来的氘代蛋白部分, 如 pH 3.5 时 CRABP I 的氢/氘交换。从图 2 可以看出, 在 m/z 值不同的两组峰此消彼长的同时, 还伴有两组峰同时向 m/z 值减小的方向移动的现象, 这说明氢/氘交换不仅遵循 EX1 交换机理, 还伴有 EX2 交换机理。

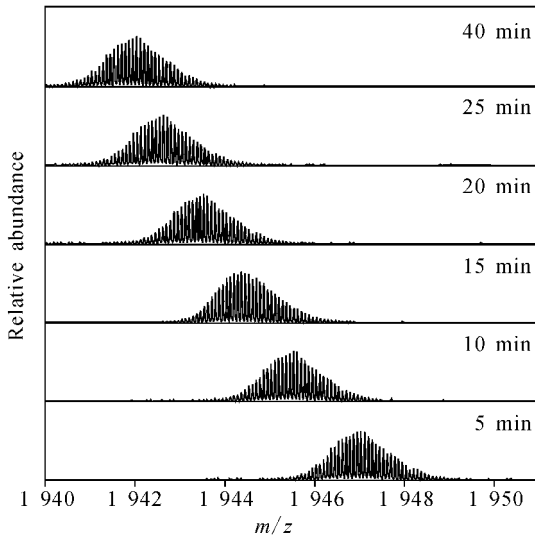


图 1 pH 2.5 时氘代 CRABP I 的 $[M+8H]^{8+}$ 氢/氘交换质谱图

Fig. 1 H/D exchange mass spectra of $[M+8H]^{8+}$ of D-CRABP I at pH 2.5

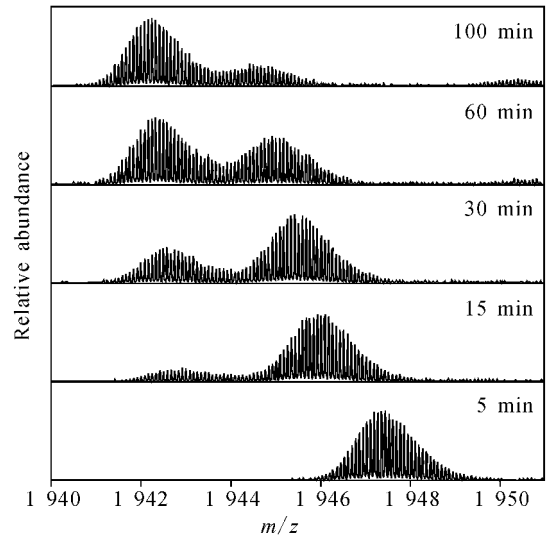


图 2 pH 3.5 时氘代 CRABP I 的 $[M+8H]^{8+}$ 氢/氘交换质谱图

Fig. 2 H/D exchange mass spectra of $[M+8H]^{8+}$ of D-CRABP I at pH 3.5

2.3 未交换氢(氘)数的计算

蛋白结构中存在 3 种类型的氢原子:第 1 种是蛋白骨架中与骨架碳共价结合的氢,这种氢不能进行氢/氘交换;第 2 种为蛋白支链上的氢,这种氢因交换速率极快故很难测定;第 3 种是蛋白骨架上与胺基氮相连的氢,其交换速率最容易被检测。除脯氨酸外,每个氨基酸都有 1 个与胺基氮相连的氢,且它们在蛋白的二级结构中参与了氢键的形成,因此它们的交换速率反映了蛋白的结构及其稳定性的信息。CRABP I 分子中共存在 260 个可交换的氢,其中与胺基氮相连的氢 132 个。由于氘与氢的分子质量相差 1 u,对于完全氘代的 D-CRABP I,当分子内有一个位置的氘被溶剂中的氢产生交换时,蛋白分子的分子质量将减少 1 u。D-CRABP I $[M+8H]^{8+}$ 峰的 m/z 为 1966.05,当支链上的氘全部被氢取代时, $[M+8H]^{8+}$ 峰 m/z 为 1949.55。无论在 pH 2.5 还是 pH 3.5 的条件下,氢/氘交换实验进行 1 min 后, $[M+8H]^{8+}$ 峰的 m/z 均小于 1949.55,表明蛋白支链上的氘在很短时间内就被溶剂中的氢完全取代。蛋白分子中氢/氘交换的数目可以根据其质谱图中同位素峰的 m/z 值来进行估算,如交换 5 min 后,CRABP I 的 $[M+8H]^{8+}$ 峰在 pH 2.5 时 m/z 为 1946.9,对应的蛋白分子质量为 15 567.2 u,而 CRABP I 的平

均分子质量是 15 460.4 u,故此时约有 107 个氘尚未被氢取代;pH 3.5 时,交换 5 min 后 $[M+8H]^{8+}$ 峰的 m/z 为 1947.3(m/z 较高者),对应的分子质量为 15 570.4 u,即尚有 110 个氘未被氢所取代。同样可算出其他交换时间 D-CRABP I 中未被氢所取代的氘的数目,示于图 3。需要说明的是,未交换的氘是以质谱中同位素峰的中心点为依据进行计算的,由于存在较宽的同位素分布,要精确地确定同位素峰的中心点还有一定的困难,因此,计算所得的未交换的氘的数目只能作为半定量的分析结果。从图 3 还可以看出,CRABP I 在 pH 2.5 时氢/氘交换速率比 pH 3.5 时的交换速率快,这是由于 CRABP I 在 pH 2.5 以下会发生蛋白变性而使其结构展开,从而导致氢/氘交换速率变快。

3 结论

氢/氘交换傅里叶变换离子回旋共振质谱可用于检测蛋白结构信息,它对 pH 值非常敏感。CRABP I 的 $[M+8H]^{8+}$ 峰在不同的 pH 值范围呈现不同的交换机理,pH 3.5 时,质谱图中出现两组同位素离子峰,其中 m/z 值低的一组峰在交换过程中逐渐增长,而另一组 m/z 值较高的峰在交换过程中逐渐消失,遵循 EX1 交换机理;当 pH 2.5 时,质谱图中只出现一组同位素离子

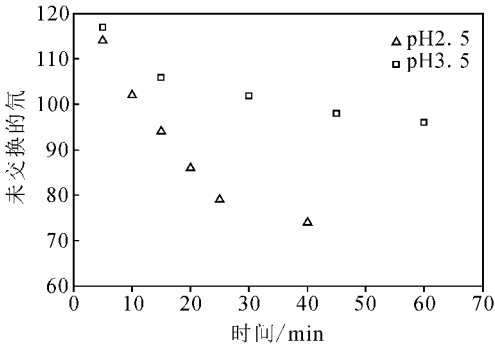


图 3 不同氢/氘交换时间氘代
CRABP I 中余留的氘的数目

Fig. 3 The number of deuterium remained
in D-CRABP I at different H/D exchange time

峰,它随时间逐渐向 m/z 值减小的方向移动,遵循 EX2 交换机理。

参考文献:

- [1] STOYCHEV S H, NATHANIEL C, FANUCCHI S, et al. Structural dynamics of soluble chloride intracellular channel protein CLIC1 examined by amide hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry[J]. *Biochemistry*, 2009, 8(35): 8 413-8 421.
- [2] KONERMANN L, TONG X, PAN Y. Protein structure and dynamics studied by mass spectrometry: H/D exchange, hydroxyl radical labeling, and related approaches [J]. *J Mass Spectrom*, 2008, 43(8): 1 021-1 036.
- [3] SMIRNOVAS V, KIM J I, LU X, et al. Distinct structures of scrapie prion protein (PrP^{Sc})-seeded versus spontaneous recombinant prion protein fibrils revealed by hydrogen/deuterium exchange [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(36): 24 233-24 241.
- [4] MOBLEY J A, POLIAKOV A. Detection of early unfolding events in a dimeric protein by amide proton exchange and native electrospray mass spectrometry[J]. *Protein Sci*, 2009, 18(8): 1 620-1 627.
- [5] 刘国强,董 静,王 弘,等. 4 种儿茶素类化合物电喷雾质谱裂解规律的研究[J]. *高等学校化学学报*, 2009, 30(8): 1 566-1 570.
- [6] SLYSZ G W, PERCY A J, SCHRIEMER D C. Restraining expansion of the peak envelope in H/D exchange-MS and its application in detecting perturbations of protein structure/dynamics[J]. *Anal Chem*, 2008, 80(18): 7 004-7 011.
- [7] LU X, WINTRODE P L, SUREWICZ W K. Beta-sheet core of human prion protein amyloid fibrils as determined by hydrogen/deuterium exchange [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(5): 1 510-1 515.
- [8] POLIAKOV A, JARDINE P, PREVELIGE P E. Hydrogen/deuterium exchange on protein solutions containing nucleic acids: utility of protamine sulfate [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22(16): 2 423-2 428.
- [9] LIU Z P, RIAO J, GIERASCH L M. Equilibrium folding studies of cellular retinoic acid binding protein, a predominantly beta-sheet protein[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(1): 134-142.
- [10] LINDERSTRØM-LANG K. Deuterium exchange between peptides and water [M] London, Chem Soc, 1955: 1-20.
- [11] HVIDT A A, NIELSEN S O. Hydrogen exchange in proteins[J]. *Adv Protein Chem*, 1966, 21: 287-386.