

金属离子与钙调蛋白相互作用的 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱研究

王兆伏^{1,2}, 崔 勔¹, 宋凤瑞¹, 刘志强¹, 刘淑莹¹

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春质谱中心, 吉林 长春 130022; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

Study on the Interactions of Metal Ions with Calmodulin Using MALDI-TOF MS

WANG Zhao-fu^{1,2}, CUI Meng¹, SONG Feng-rui¹, LIU Zhi-qiang¹, LIU Shu-ying¹

(1. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun Center of Mass Spectrometry, Changchun 130022, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Calmodulin is a ubiquitous calcium-binding protein in eukaryote cells and engages in various important biological pathways. In the present study, binding interactions between several metal ions and calmodulin were investigated by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The results revealed that the specific binding of metal ions with the protein could be detected using MALDI-TOF MS.

Key words: calmodulin; metal ions; noncovalent; MALDI-TOF MS

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2008) 增刊-86-02

钙调蛋白(Calmodulin, CaM)是一种普遍存在于动植物体内的钙结合蛋白,可以与多种靶酶相互作用,参与许多重要的生理过程^[1]。钙调蛋白由148个氨基酸组成,相对分子质量为16.7 kDa,含有四个E-F手型的Ca²⁺结合域。Ca²⁺离子与钙调蛋白结合后,引起蛋白构型的变化,从而调节钙调蛋白与靶酶之间的相互作用。人体及环境中存在多种金属离子,某些金属离子也能与钙调蛋白结合,并产生一定的生物学效应^[1-2],因此,研究金属离子与钙调蛋白的相互作用具有重要的生物学意义。本工作利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)研究了6种金属离子与钙调蛋白的相互作用。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Voyager-DE STR MALDI-TOF 质谱仪: 美国 ABI 公司产品; 钙调蛋白(calmodulin)、金属醋酸盐: 购于美国 Sigma-Aldrich 公司; 基质 2,6-二羟基苯乙酮 (DHAP): 购于瑞士 Fluka 公司; 乙腈: 色谱纯, 美国 Fisher Chemical 公司产品; MilliQ 超纯水。

1.2 实验条件与方法

称取 10 mg DHAP 溶解于 1 mL V (乙腈):V (水)=1:2 的混合溶剂中,配制成基质溶液。将 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 钙调蛋白溶液与 1 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 金属醋酸盐溶液等体积混合,室温下放置 5 min。取 1 μL 样品溶液,加入 2 μL 基质溶液,混匀后取 1 μL 混合液点靶,待溶液风干后进行质谱测试。质谱加速电压 25 kV,激光扫描次数 50,质量扫描范围 m/z 5 000~25 000,扫描模式为正离子线性模式。

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30672600, 20873137)和吉林省重点科技发展计划项目(批准号: 20060902)

通信作者: 刘志强 (1962~), 男 (汉族), 吉林人, 研究员, 博士生导师, 从事天然药物化学和有机质谱研究。E-mail: liuzq@ciac.jl.cn

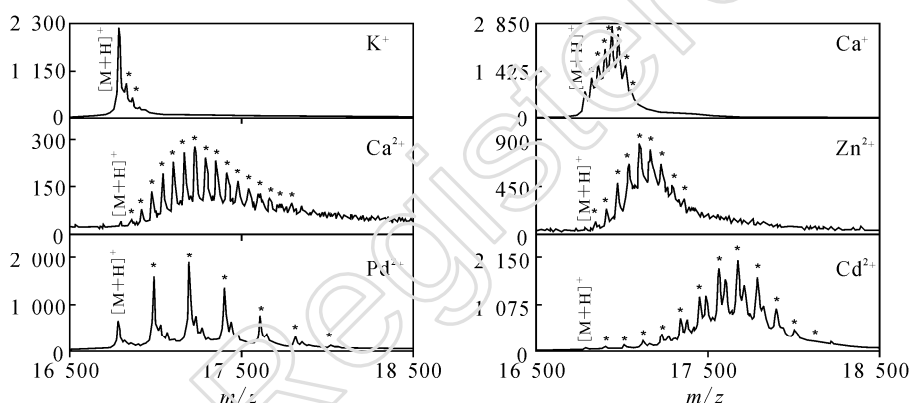
2 结果与讨论

当没有金属离子加入时, 钙调蛋白 (CaM) 的 MALDI 质谱图的基峰为其分子离子峰 $[M+H]^+$, 同时, 还可以观察到 CaM 的双电荷离子峰 $[M+2H]^{2+}$ 。

当向 CaM 溶液中加入 50 倍的醋酸钾时, 除 CaM 的分子离子峰, 还可以观察到 K-CaM 复合物的谱峰 (图 1a)。然而, 复合物谱峰的强度随着金属离子个数的增加而逐渐减小, 与文献报道的由于非特异性结合所呈现的卜氏分配 (Poisson-like distribution) 峰型相符^[3], 说明 K^+ 离子与 CaM 的结合属于非特异性结合, 这与文献报道的结果^[4]相吻合。

当向 CaM 溶液中加入 50 倍的醋酸钙时, 除 CaM 的分子离子峰, 还可以观察到一系列的 Ca-CaM 复合物的谱峰 (图 1b), 复合物的峰型与 K-CaM 复合物的峰型大不相同。谱图的基峰为 CaM·4Ca 的谱峰, 这与 CaM 可以特异性地结合 4 个 Ca^{2+} 离子的事实相吻合, 说明利用 MALDI-MS 能够检测金属离子与钙调蛋白之间的特异性结合。

当向 CaM 溶液中加入 50 倍的醋酸铜、醋酸锌、醋酸铅和醋酸镉时, 均可以观察到一系列的金属离子-CaM 复合物的谱峰 (图 1c~1e)。这些复合物的峰型均与 K-CaM 复合物的峰型不同, 说明这些金属离子可以与钙调蛋白特异性地结合, 这与文献报道相一致^[2]。这些金属离子的离子半径、电荷性质及配位化学性质等方面与 Ca^{2+} 离子的相似之处可能是它们与 CaM 相结合的主要原因, 然而这些因素的差异也导致了 CaM 与这些金属离子的化学计量比和结合力的不同。



注: * 代表钙调蛋白/金属离子复合物

图1 金属离子与钙调蛋白混合溶液的 MALDI-TOF MS 质谱图

Fig.1 MALDI-TOF MS spectra obtained from mixtures of calmodulin with metal ions

3 结论

利用 MALDI-TOF MS 研究了 6 种金属离子与钙调蛋白的相互作用, 发现非特异性结合与特异性结合所形成的复合物的谱峰峰型具有明显的差异。实验结果表明利用 MALDI-TOF MS 可以快速, 灵敏地检测金属离子与钙调蛋白之间的相互作用。

参考文献:

- [1] OUYANG H, VOGEL H J. Metal ion binding to calmodulin: NMR and fluorescence studies[J]. Biometals, 1998, 11: 213-222.
- [2] 肖凤娟, 常虹. 钙离子电极研究金属离子与植物钙调素的竞争结合作用[J]. 河北化工, 2003, 4: 32-34.
- [3] TOUBOULY D, BRUNELLE A, LAPREVITE O. Characterization of alpha-parvalbumin on muscle tissue sections by in situ calcium attachment [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21: 3 756-3 758.
- [4] ZHU M M, REMPEL D L, ZHAO J, et al. Probing Ca^{2+} -Induced conformational changes in porcine calmodulin by H/D exchange and ESI-MS: effect of cations and ionic strength [J]. Biochemistry, 2003, 42: 15 388-15 397.