

# A $\beta$ 多肽与铜锌金属离子非共价复合物的电喷雾质谱研究

晋文慧<sup>1</sup>, 王海燕<sup>2</sup>, 韩大雄<sup>1</sup>

(1. 厦门大学医学院药理学系, 福建 厦门 361005; 2. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

## Investigation of Non-Covalent Complexes of Amyloid $\beta$ -Peptide and Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> by Electrospray Ionization Mass Spectrometry

JIN Wen-hui<sup>1</sup>, WANG Hai-yan<sup>2</sup>, HAN Da-xiong<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacy, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Third Institute of Oceanography of State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions were reported to be able to induce A $\beta$  aggregation at nearly physiological concentrations *in vitro* and related to the pathogenesis of Alzheimer's disease. The smaller peptides including A $\beta$ (1-28) was chosen as the target peptide, which helped define the nature of the interaction of the full length peptide. And we studied the influences of the different conditions including the pH, temperature, apparatus conditions, concentration on the impact of complex of Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and A $\beta$ . Our findings by the studies of ESI-MS revealed the stoichiometry of 1:1 for the peptide-metal complexes, and to bind up to four cations upon increasing the metal concentration.

**Key words:** amyloid  $\beta$ -peptide; metal binding; ESI-MS; competitive substitution

中图分类号: O 657.63      文献标识码: A      文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0033-02

阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD), 又称老年痴呆, 其定义性病理标志是在大脑中出现淀粉样脑斑和神经纤维缠结<sup>[1]</sup>。体外实验表明: 铜、锌、都可促使A $\beta$ 聚合, 其中, 锌离子诱导A $\beta$ 聚集的能力最强, 而铜离子与A $\beta$ 作用则受pH或者浓度变化影响<sup>[2]</sup>。本工作以ESI-MS方法探讨了铜、锌离子与A $\beta$ 肽相互作用形成的复合物, 完善了对AD病人体内两种金属离子作用机制的认知。本工作利用电喷雾离子阱质谱对A $\beta$ 多肽分子与金属离子之间的相互作用进行初步的研究。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

Agilent 公司 6310 系列 LC/MS 离子阱质谱仪: 美国 Agilent 公司产品。A $\beta$  (1-28) 多肽: 购自杭州中肽生化有限公司; 甘氨酸锌、甘氨酸铜、醋酸氨均为分析纯, 醋酸、氨水等所有试剂均为色谱纯; 水为纯水机 (美国 Labconco 公司) 生产的超纯水。

### 1.2 样品处理

A $\beta$  (1-28) 多肽储备液 (10 mmol·L<sup>-1</sup>), Zn(Gly)<sub>2</sub> 和 Cu(Gly)<sub>2</sub> 储备液, NH<sub>4</sub>AC-HAC 缓冲溶液 (10 mmol·L<sup>-1</sup>), 缓冲溶液的 pH 分别为 2.5、4.5、6.5、8.5, 用溶剂过滤器过滤后待用。

分别取上述  $A\beta$  (1-28) 储备液和  $Zn(Gly)_2$  或  $Cu(Gly)_2$  储备液适量, 改变起始主客体摩尔比 (1:1、1:20、1:40), 制备了具有不同化学计量比的  $A\beta$  多肽-金属非共价复合物, 超声, 孵育 1~2 h, 稀释后待质谱分析用。

### 1.3 仪器测量

采用电喷雾离子源及其正离子检测模式, 仪器的质量范围为  $m/z$  100~2 200。为了保证质谱数据的稳定性和重现性, 所有数据的扫描时间都累加 1 min, 取信号平均值。壳气  $N_2$ , 干燥气 ( $N_2$ ) 温度 250  $^{\circ}C$ , 喷雾气 ( $N_2$ ) 压力 15.0 kPa, 干燥气 ( $N_2$ ) 流速 8.0  $L \cdot min^{-1}$ , 用注射泵直接注入质谱仪蠕动进样, 进样速度 3  $\mu L \cdot min^{-1}$ 。

## 2 结果与讨论

在正离子模式下检测到的是  $A\beta$  多肽自身多电荷峰及与金属离子结合的复合物峰, 示于图1。图1a为  $A\beta$  肽自身的质谱峰, 653.4和816.4分别为多肽自身带5个和4个电荷的多电荷峰。在图1b中的情形则完全不同, 除了多肽自身的多电荷峰  $[A\beta+5H]^{5+}$  和  $[A\beta+4H]^{4+}$  外, 还能检测到许多新峰  $m/z$  666.0、678.8、691.0、832.5、848.5等, 经计算证明这些峰分别是由3种不同质量数的  $A\beta$  (1-28) 多肽与锌离子形成的非共价复合物  $[A\beta+1Zn+3H]^{5+}$ ,  $[A\beta+2Zn+1H]^{5+}$ ,  $[A\beta+3Zn-1H]^{5+}$ ,  $[A\beta+1Zn+2H]^{4+}$ ,  $[A\beta+2Zn]^{4+}$  所产生的多电荷峰。这说明了  $A\beta$  多肽可与锌离子发生弱相互作用, 形成非共价键复合物。同样,  $m/z$  665.8、678.1、690.5、831.7、847.1的存在也是  $A\beta$  多肽与铜离子发生弱相互作用, 形成的不同质量数的非共价键复合物。我们还看到2种金属与  $A\beta$  (1-28) 的相互作用中的相应化学计量比结合物峰的质量数相差1左右。进一步证明并区分其为带不同电荷的多肽金属复合物峰。另外, 增大金属离子的浓度, 发现二者的化学计量比最大为1:4 (图略), 说明金属离子的结合位点是一定的。复合物在高化学计量比条件下更容易形成加合  $K^+$  的离子峰, 如872.3为  $[A\beta+3Zn-3H+1K]^{4+}$ , 相同条件下  $A\beta$  与单个金属  $Cu$ 、 $Zn$  离子易形成结合  $H^+$  的复合物, 而与多个金属形成结合  $K^+$  的复合物, 前者的相对丰度大于后者, 且均以1:n复合物单体为主。

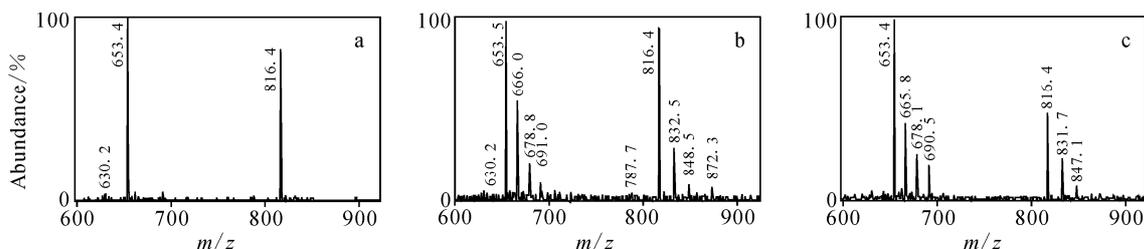


图1  $A\beta$  (1-28) 多肽自身以及分别和相同浓度的锌铜离子孵育复合物在正离子模式下的全扫描一级质谱图

## 3 小结

利用电喷雾软电离技术, 对  $A\beta$  多肽与 2 种金属离子之间的弱相互作用进行了分析研究, 对比了 2 种金属离子质谱峰的不同, 为以后用电喷雾质谱方法研究这两者金属离子的竞争取代打下基础。

### 参考文献:

- [1] 曾雪爱. 阿尔茨海默病发病机理研究进展[J]. 福建医药杂志, 2006, 28(4): 108-110.
- [2] 周科, 陈世荣. 铜离子 (II) 与  $A\beta$  多肽形成可溶性配合物结构的理论研究[J]. 化学学报, 2007, 65 (16): 1 763-1 767.