2026 年 5 月 色 谱 Vol.44 No.5
May 2026 Chinese Journal of Chromatography 525~532

研究论文

DOI: 10.3724/SP.J.1123.2025.04020

非变性质谱和紫外激光解离揭示锌离子对 α-突触核蛋白的构象选择性

覃辉文[1,2]，玄 玥[2]，赵 恒[2]，刘哲益[2*]，丁 茯[1*]，王方军[2]
（1. 沈阳化工大学化学工程学院，辽宁 沈阳 110142；2. 化学反应动力学全国重点实验室，
中国科学院大连化学物理研究所，辽宁 大连 116023）

摘要：锌离子（Zn^{2+}）与 α-突触核蛋白（α-Syn）的构象特异性结合机制对揭示帕金森病发病机理具有重要意义。本研究通过非变性质谱（nMS）联用紫外激光解离（UVPD）技术，揭示了 α-Syn 的 3 种构象异质性，并鉴定出具有显著 Zn^{2+}结合差异的低价态、中间价态及高价态构象。实验数据显示，低价态构象表现出最强的 Zn^{2+}结合能力，其结合位点数超过 2 个且结合强度显著高于仅结合 1 个 Zn^{2+}的中间价态构象和结合 2 个 Zn^{2+}的高价态构象。进一步通过解离效率差异（ΔFYs）的定量比较发现，Zn^{2+}结合诱导不同构象的 α-Syn 发生不同的结构变化，其中低价态构象的 ΔFYs 变化最为显著。对 UVPD 产生的 Zn^{2+}结合蛋白碎片（holo 碎片）进行分布模式分析表明，3 种构象中的 holo 碎片分布存在显著差异。结合一级谱分布特征、ΔFYs 的变化特征和 holo 碎片分布特征，可以推测出低价态构象主要依赖 C 端（Cterm）的静电相互作用形成 Zn^{2+}-蛋白复合物，中间价态构象以配位结合为主导，而高价态构象则表现出两种作用模式的协同效应。该研究从多构象动态平衡视角阐明了 α-Syn-Zn^{2+}相互作用的分子机制，为针对蛋白质构象特异性设计帕金森病调控疗法提供了理论依据。

关键词：α-突触核蛋白；锌离子；紫外激光解离
中图分类号：O658 **文献标识码**：A

Native mass spectrometry and ultraviolet photodissociation reveal conformation-selectivity of zinc ion to α-synuclein

QIN Huiwen[1,2], XUAN Yue[2], ZHAO Heng[2], LIU Zheyi[2*], DING Fu[1*], WANG Fangjun[2]
(*1. College of Chemical Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China;*
2. State Key Laboratory of Molecular Reaction Dynamics, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: The conformation-specific binding mechanism between zinc ions (Zn^{2+}) and α-synuclein (α-Syn) plays a pivotal role in elucidating the molecular underpinnings of Parkinson's disease. α-Syn is an intrinsically disordered protein (IDP), known for its structural plasticity and dynamic conformational landscape, which are intimately linked to its aggregation propensity and pathogenic potential. In this study, we employed native mass spectrometry (nMS) coupled with 193 nm ultraviolet photodissociation (UVPD) to investigate the α-Syn-Zn^{2+} interaction across different conformational states. This integrated approach enables both preservation of non-covalent interactions and detailed structural interrogation, offering unparalleled insights into IDP behavior upon metal binding. We identified three distinct charge-state-dependent conformational populations of α-Syn (low-charge, intermediate-charge, and high-charge conformations), each exhibiting markedly different Zn^{2+} binding capacities and mechanisms. Experimental data revealed that the low-charge conformations exhibited the highest Zn^{2+} binding affinity and capacity, accommodating up to three

收稿日期：2025-04-16
* **通信联系人**. Tel：024-89383328，E-mail：dingfu@syuct.edu.cn（丁茯）；Tel：0411-82464150，E-mail：zy_liu@dicp.ac.cn（刘哲益）.
基金项目：国家自然科学基金项目（32088101，22288201）.
Foundation item: National Natural Science Foundation of China (Nos. 32088101, 22288201).

Zn^{2+} ions. In contrast, the intermediate-charge conformations bound predominantly to one Zn^{2+} ion. The high-charge conformations, despite their extended structures, retained the ability to bind up to two Zn^{2+} ions, but with lower affinity. Quantitative analysis of UVPD-derived fragmentation yield changes (ΔFYs) provided residue-level insights into structural perturbations upon Zn^{2+} coordination. The most pronounced ΔFYs were observed in the low-charge conformers, indicating substantial Zn^{2+}-induced structural stabilization or reorganization, particularly in the C-terminal (Cterm). Distribution patterns of Zn^{2+}-bound protein fragments (holo fragments) generated by UVPD further supported distinct fragmentation patterns for each conformational state, reflecting differential Zn^{2+} distribution and protection across the α-Syn sequence. Integrating ΔFYs analysis with holo fragment mapping, we propose three distinct binding mechanisms: (i) low-charge states stabilize Zn^{2+} binding primarily through electrostatic interactions involving acidic residues in the Cterm; (ii) intermediate-charge states form coordination bonds likely involving histidine or side-chain donors; and (iii) high-charge states exhibit a hybrid mechanism combining electrostatic and coordination elements, though with reduced spatial proximity and structural integrity. Overall, this work highlights the conformation-dependent nature of metal ion interactions in IDPs and underscores the potential of nMS-UVPD as a powerful tool for probing dynamic structural ensembles. These findings provide critical mechanistic insights that could inform the design of conformation-selective therapeutic agents aimed at modulating metal-induced α-Syn aggregation in Parkinson's disease.

Keywords: α-synuclein (α-Syn); zinc ion (Zn^{2+}); ultraviolet photodissociation (UVPD)

α-突触核蛋白(α-Syn)作为一类典型的固有无序蛋白(IDPs),在神经元生理功能维持及帕金森病(PD)等神经退行性疾病的发病机制中具有重要作用[1]。其生理功能主要包括调控突触囊泡的循环过程、介导神经递质的释放以及参与细胞信号转导[2]。然而 α-Syn 异常构象转换并形成不可溶性纤维沉积时,可导致神经元损伤并促进疾病进展[3]。α-Syn 由 140 个氨基酸(AA)组成[4],其各结构域具有明显的功能分化:N 端(Nterm)(AA1~60)呈现两亲性特征,可与脂类结合形成 α 螺旋结构[5];疏水性非淀粉样核心区段(NAC)(AA61~95)是蛋白低聚化及纤维化形成的关键区域[6,7];酸性 C 端(Cterm)(AA96~140)则具有金属离子结合特性[8,9]。大量研究证实,α-Syn 与金属离子的相互作用通过调控蛋白构象稳定性影响其聚集路径,这一分子机制已成为神经化学及结构生物学领域的重要研究方向[8,10]。

锌离子(Zn^{2+})是人体必需的微量元素,在细胞代谢、增殖及凋亡等基础生命活动中发挥关键的调控作用[10]。在神经系统中,Zn^{2+}不仅参与突触信号传递和神经可塑性调节,更显示出独特的神经保护功能[10]。研究表明,Zn^{2+}能够通过与 α-Syn 的特异性相互作用,精确调控该蛋白的结构稳定性与生理功能[10]。然而,当 Zn^{2+}与 α-Syn 异常结合时,会诱导蛋白错误折叠,促进病理性寡聚体及淀粉样纤维的形成,从而增强其神经毒性效应[10]。现有研究通过多种表征技术(包括核磁共振波谱、圆二色光谱、荧光光谱及质谱分析等),已系统阐明 Zn^{2+}的结合位点主要位于 α-Syn 的中间结构域(AA40~80)和 Cterm 区域(AA96~140)[11-16]。值得注意的是,生理浓度范围内的 Zn^{2+}可有效维持 α-Syn 的构象稳定性,但当 Zn^{2+}浓度超过生理阈值时,会显著促进其病理性聚集,形成具有神经毒性的纤维结构[11-16]。

尽管现有研究已采用多种实验手段探究 Zn^{2+}-α-Syn 的相互作用机制,但传统结构解析技术仍存在局限性。固体核磁共振(ssNMR)和 X 射线衍射

引用本文:覃辉文,玄玥,赵恒,刘哲益,丁茯,王方军. 非变性质谱和紫外激光解离揭示锌离子对α-突触核蛋白的构象选择性. 色谱,2026,44(5):525-532.

QIN Huiwen, XUAN Yue, ZHAO Heng, LIU Zheyi, DING Fu, WANG Fangjun. Native mass spectrometry and ultraviolet photodissociation reveal conformation-selectivity of zinc ion to α-synuclein. Chinese Journal of Chromatography, 2026, 44(5): 525-532.

(XRD)由于依赖样品结晶特性,难以捕捉无固定结构的 α-Syn 单体及低聚体动态构象变化[6,17];透射电镜(TEM)虽可观测纤维形貌,却无法解析早期聚集中间态的结构特征[6,17]。此外,由于 α-Syn 单体和低聚体具有多种构象,传统光谱技术受限于异质体系的信号叠加效应,难以实现构象的分离检测,而单分子技术虽具备单粒子分辨率,但其对蛋白精细结构的解析能力仍存在瓶颈[18,19]。

在此背景下,非变性质谱(nMS)因其高效的分离能力,可基于构象带电差异精准区分不同构象,进一步结合离子淌度(IM)、电子转移解离(ETD)等手段,可深入解析 α-Syn 的构象特征[20,21]。例如,nMS-IM 联用分析表明,α-Syn 单体存在三类典型构象亚群,nMS-ETD 联用实验结果进一步表明,α-Syn 的二聚体的相互作用界面可能位于 Cterm[12,21]。此外,nMS 结合电子捕获解离(ECD)/碰撞诱导解离(CID)分析显示,锰和钴离子在 α-Syn 上的结合位点相同,均位于 Cterm 区域[22];nMS-ECD 技术还进一步发现,小分子配体(如 CLR01)可调控铜、锰等金属离子与 α-Syn 的结合能力[23]。分子动态学研究方面,氢氘交换质谱(HDX-MS)实验证实 α-Syn 的 Nterm 结构域暴露程度与其聚集动力学呈正相关性,同时该区域的构象可塑性还直接影响钙离子结合的调控能力[4]。紫外光解离(UVPD)技术通过高能量的紫外光子激活和解离前体离子,相较于其他解离方法,不仅能获得更高的序列覆盖度,还可完整保留配体结合后的蛋白碎片(holo 碎片),为研究金属离子-蛋白复合物的结合构象提供了独特技术优势[24,25]。

本研究采用 nMS 技术揭示了 α-Syn 与 Zn^{2+}结合的构象选择性,并基于 UVPD 技术探究了 Zn^{2+}结合对不同 α-Syn 构象的调控作用。实验数据显示,不同 α-Syn 构象结合 Zn^{2+}的个数及强度不同。进一步分析表明,Zn^{2+}结合虽显著改变各构象的结构特性,但未引起低、中、高价态构象亚群的相对丰度发生显著变化。本研究不仅有助于深入理解金属-α-Syn 的相互作用机制,还为神经退行性疾病的药物开发提供了新视角。

1　实验部分

1.1　仪器、试剂与材料

AKTA 高效液相色谱纯化系统和 Superdex 200 Increase 10/300 GL 尺寸排阻色谱柱(SEC)购自 Cytiva 公司(英国);Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 三合一超高分辨质谱分析系统购自 Thermo-Fisher 公司(美国);193 nm ArF 准分子激光器购自 Coherent Laser Systems Gmbh & Co.KG(德国)。

pET-22b 质粒、大肠杆菌 BL21(DE3)和氯化钠(NaCl)均购自 Sangon 公司(中国)。氨苄青霉素、琼脂、酵母提取物、胰蛋白胨和异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)均购自 BBI 生命公司(中国)。三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自上海吉至公司(中国)。盐酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、硫酸链霉素和硫酸铵购自上海阿拉丁公司(中国)。醋酸铵购自 Sigma-Aldrich 公司(美国)。醋酸锌购自迈瑞尔公司(中国)。P6 脱盐柱购自伯乐公司(美国)。熔融石英毛细管购自 Polymicro Technologies 公司(美国)。透析袋(分子质量截断值为 3 kDa)和 0.5 mL/15 mL 超滤管(分子质量截断值为 3 kDa)购自 Merck 公司(美国)。

1.2　α-Syn 的重组表达与分离纯化

使用 pET-22b 质粒和大肠杆菌 BL21(DE3)重组表达 α-Syn。将重组细菌接种于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 Luria-Bertani(LB)培养基(胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L、琼脂 15 g/L)中,37 ℃过夜培养。挑取培养基上的单菌落转入 15 mL 的 LB 培养液管中进行小规模培养(37 ℃,8~12 h),然后转入 2 L LB 培养液瓶进行大规模培养。37 ℃培养 8~12 h 后,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导蛋白表达,30 ℃诱导 6~8 h。细菌经 3 500 g 离心 20 min 收集,沉淀重悬于裂解缓冲液(20 mmol/L Tris pH 8.0、1 mmol/L EDTA)中并进行超声破碎。裂解液在 4 ℃下以 12 000 g 离心 25 min,上清液在 85 ℃下孵育 10 min,再以 11 000 g 离心 20 min。收集上清液后,加入过饱和硫酸链霉素搅拌 20 min,再离心(11 000 g,20 min)。取上清继续加入硫酸铵至饱和,搅拌 20 min 后,再次离心(11 000 g,20 min),收集沉淀。沉淀重悬于 20 mL 裂解缓冲液中,并在 50 mmol/L 醋酸铵溶液中透析 4 轮,每轮至少 2 h。透析后的溶液用 15 mL 超滤管离心浓缩。浓缩液使用 SEC 分离,流动相为 20 mmol/L Tris(pH 7.4)、1 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl,流速为 1 mL/min,在 280 nm 监测紫外吸收。纯化后的蛋白样品储存在流动相中,并于-20 ℃保存备用。

1.3 样品制备

在进行 nMS-UVPD 分析之前，需对 α-Syn 样品进行缓冲液置换。具体操作：使用 P6 脱盐柱或 0.5 mL 超滤离心管，将样品中的原始缓冲液更换为 500 mmol/L 的醋酸铵缓冲液。缓冲液置换完成后，进一步通过稀释或浓缩步骤将蛋白质浓度调整至 20 μmol/L，以满足后续质谱分析的需求。α-Syn 与 Zn^{2+}按物质的量之比为 1∶50 孵育 2 h 以上，使用 500 mmol/L 的醋酸铵作为孵育缓冲液，并将样品保存在 4 ℃。

1.4 nMS-UVPD 分析

对每种蛋白质溶液，电喷雾电压的最佳电压为 1 400 V 左右。所有实验均在配备 193 nm 紫外激光解离技术的 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪上进行。所有一级质谱图均采用 Orbitrap 质量分析器以 24 万分辨率采集。不同状态的蛋白质离子采用四极杆进行隔离选择，隔离窗口设置为 *m/z* 2，随后采用单脉冲 193 nm 紫外激光激发（脉冲能量：1.2 mJ 左右），产生的碎片离子采用 Orbitrap 质量分析器以 50 万分辨率采集。

1.5 质谱数据分析

针对电荷态分布（CDSs）的分析，从原始质谱数据（*.raw 文件）中提取 α-Syn 结合 Zn^{2+}前后不同价态的强度及电荷信息。随后将这些数据导入 OriginPro 2025 软件，采用该软件提供的 Peak Analyzer 中的 Gauss 函数拟合方法进行拟合分析，通过 Fit converged 获得收敛的最佳拟合解。

针对解离碎片的分析，质谱采集的 Raw 文件采用 MSConvert（版本 3.0）转换为 mzML 格式[26]。随后，使用 TopFDGUI（版本 1.6.2）进行去卷积处理[27]，信噪比阈值设定为 3。去卷积后的数据包含碎片离子的单同位素质量，使用计算机生成的数据库进一步校准并搜索，范围涵盖所有可能的碎片离子（a、a+1、a+2、b、c、x、x+1、y、y−1、y−2、z、z+1），相对质量误差不超过 2×10^{-6}。使用皮尔逊相关系数评估理论同位素分布与实验数据的相关性，相关系数 >0.7 的离子视为可靠离子。每个重复中含 20 次扫描，过滤检测到的扫描次数小于 16 的碎片离子。通过匹配检测到的同位素峰与计算出的同位素峰的轮廓，开发了一个扫描匹配函数。此过程仅针对具有相同电荷态的 α-Syn/α-Syn-Zn^{2+}数据。在去卷积过程中，手动检查重叠的单同位素峰的对应碎片离子。最后，通过中位数归一化对鉴定到的碎片离子强度进行归一化。将所有碎片离子的强度归一化计算碎片产率（FYs）。将 a、a+1、a+2、x、x+1 离子的相对强度相加，确定每个残基位点的 UVPD 解离 FYs，随后绘制蛋白质序列各位点的对应 FYs 变化图。不同条件间 FYs 差异（ΔFYs）的统计显著性通过 *t* 检验确定，并绘制以每个位点的 ΔFYs。$P\leqslant0.001$ 的位点被认为具有显著性差异。holo 碎片离子的识别及比例计算与其他碎片离子类似，但使用的离子类型包括 a、a+1、a+2、b、c、x、x+1、y、y−1、y−2、z 和 z+1 离子，同一位点的同端 holo 碎片视为相同 holo 碎片。所有数据分析均通过自定义 R 脚本完成（版本 4.4.0）。本研究中使用的原始数据已公开储存在 Zenodo 数据存储库（https://doi.org/10.5281/zenodo.15362532），读者可通过链接直接获取。

2 结果与讨论

2.1 α-Syn 单体的构象异质性及其对 Zn^{2+}的选择性

对 α-Syn 一级质谱数据的拟合结果显示，CDSs 可分解为 3 个正态分布的峰，峰值分别位于 7 价（7+）、10 价（10+）和 13 价（13+）（图 1a）。根据 nMS 结果，α-Syn 的构象可被分为三类：低价态、中间价态和高价态构象亚群，这一分类与离子迁移谱（IM）分析结果一致[12]。在 Zn^{2+}结合实验中，我们采用物质的量之比为 1∶50 的 α-Syn/Zn^{2+}，经 2 h 孵育后进行 nMS 检测。质谱分析表明，所有价态均能与 Zn^{2+}结合，且 α-Syn 与 Zn^{2+}结合后，其 CDSs 同样可拟合为 3 个正态分布的峰（图 1b），对应的低、中、高价态构象亚群的相对丰度变化较小。此外，nMS 结果还表明 α-Syn 与 Zn^{2+}的结合特性随其价态变化而呈现出差异：在低价态构象中，α-Syn 结合的 Zn^{2+}数量最多，结合强度最高；在中价态构象中，结合的 Zn^{2+}数量最少，结合最弱；而在高价态构象中，其结合的 Zn^{2+}数量及结合强度均介于低、中两种价态之间（图 2）。

2.2 Zn^{2+}对 α-Syn 的选择性调控

对 α-Syn 的 3 个代表电荷态（7+、10+和 13+）进行 UVPD 解离分析，结果表明：在 7+、10+和 13+电荷态下，分别鉴定得到 496、569 和 494 个碎片离子，对应的序列覆盖度依次为 85.00%、95.71% 和 92.86%（图 3）。

为进一步探究 Zn^{2+}对 α-Syn 的构象选择性，对

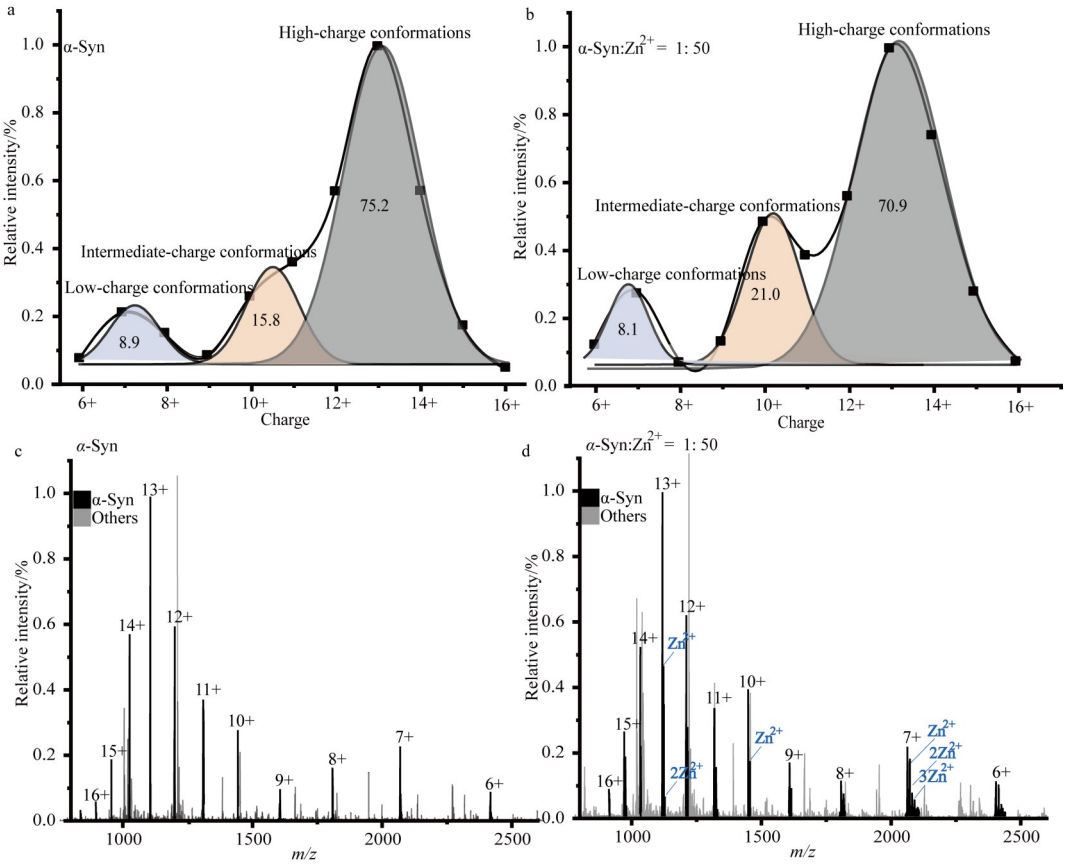


图 1　α-Syn 结合 Zn^{2+}(a)前、(b)后的构象分布拟合以及结合 Zn^{2+}(c)前、(d)后的一级质谱图

Fig. 1　Conformational distribution fitting of α-Syn (a) before and (b) after Zn^{2+} binding, and MS^1 spectra of α-Syn (c) before and (d) after Zn^{2+} binding

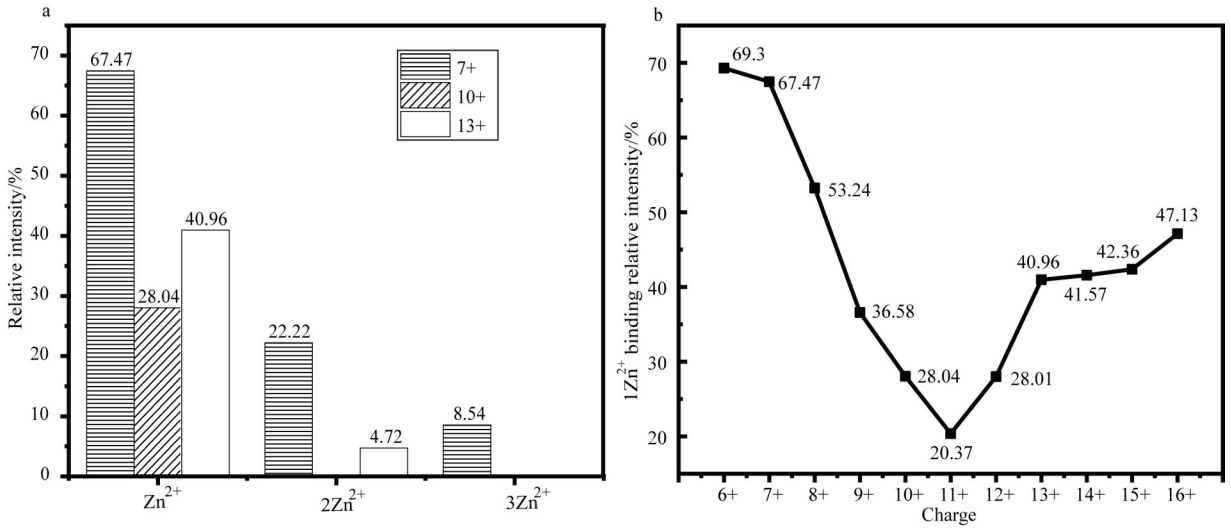


图 2　α-Syn 结合 Zn^{2+}:(a)3 个典型价态的结合强度分布图;(b)所有价态结合 1 个 Zn^{2+} 的强度分布图

Fig. 2　α-Syn binding to Zn^{2+}: (a) binding intensity distribution of three representative charge states; (b) intensity distribution of all charge states binding one Zn^{2+}

Zn^{2+}结合前后的代表性价态进行 UVPD 解离分析。结果显示,Zn^{2+}结合后各构象的 FYs 整体下降(图 4a~4c),这一现象证实了 α-Syn 结构的紧缩效应,与文献报道的离子淌度实验结果高度一致[12,16]。然而,不同构象的 ΔFYs 均值和变化位点存在显著差异(图 4a~4c)。此外,按照 α-Syn 的结构区域划分,

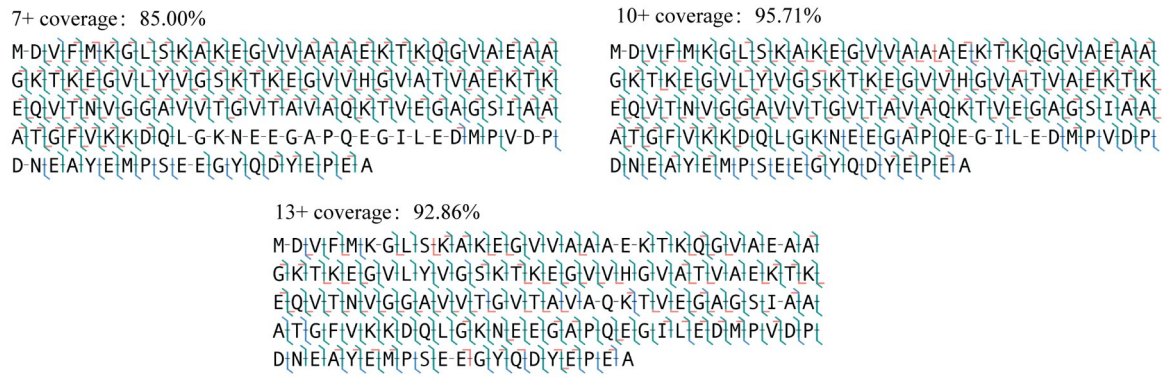


图 3 α-Syn 不同构象的 UVPD 覆盖图

Fig. 3 Ultraviolet photodissociation (UVPD) fragmentation coverage maps of α-Syn in different conformations

对 Nterm、NAC 和 Cterm 3 个区域的 ΔFYs 均值进行计算，发现这 3 个区域的 ΔFYs 均值也存在显著差异。

低价态构象(7+)与 Zn^{2+}结合后，FYs 下调的主要区域为 AA1~100、AA120~140，所有变化位点的 ΔFYs 均值为−1.69(图 4a)。Nterm、NAC 区域、Cterm 变化位点的 ΔFYs 均值分别为−1.81、−1.48 和−1.48(图 4a)。中间价态构象(10+)与 Zn^{2+}结合后，FYs 下调的主要区域为 AA5~100、AA120~140，所有变化位点的 ΔFYs 均值为−0.95(图 4b)。Nterm、NAC 区域、Cterm 变化位点的 ΔFYs 均值分别为−0.92、−1.41 和−0.46(图 4b)。高价态构象(13+)与 Zn^{2+}结合后，FYs 下调的主要区域为 AA20~80、AA96~140，所有变化位点 ΔFYs 均值为−0.93(图 4c)。Nterm、NAC 区域、Cterm 变化位点的 ΔFYs 均值分别为−0.93、−0.98 和−0.73(图 4c)。

为进一步确认不同构象结合 Zn^{2+}后的差异，对 3 种构象的结合 Zn^{2+}(holo)碎片与未结合 Zn^{2+}(apo)碎片比值进行分析。结果显示，不同构象的 holo 碎片分布特征存在显著差异(图 4d 和 4e)：在低价态构象中，Cterm 的 holo 碎片主要分布在 AA1~50 区域，Nterm 主要分布在 AA120~140 区域，二者分布区域无重叠(图 4d)；中间价态构象的 Cterm 的 holo 碎片分布区域扩展至 AA1~130，Nterm 的 holo 碎片分布于 AA40~140，二者主要重叠于 AA40~80 区域，该区域与已知的 Zn^{2+}配位结合位点高度吻合(图 4e)；高价态构象的 Cterm 的 holo 碎片同样分布于 AA1~130，Nterm 的 holo 碎片分布于 AA40~140，但二者的重叠区域进一步扩大至 AA40~130，且碎片分布较为分散(图 4f)。

结合一级谱数据与 UVPD 分析结果进行综合解析表明：低价态构象的 Zn^{2+}结合数量最多、结合强度最高(图 2)，结合 Zn^{2+}后，其 Cterm 区域 ΔFYs 下降最为显著(图 4a)，且 Nterm 的 holo 碎片仅分布于 AA120~140 区间(图 4d)，其 holo 碎片总数最少(表 1)；中间价态构象仅结合 1 个 Zn^{2+}(图 2)且结合强度最弱，Zn^{2+}结合后，AA40~80 区域的 ΔFYs 下降最为明显(图 4b)，Nterm 和 Cterm 的 holo 碎片主要在该区段重叠分布(图 4e)，但保留了最多的 holo 碎片(表 1)；高价态构象的 Zn^{2+}结合数量和强度介于低、中价态之间(图 2)，Zn^{2+}结合后，在 Cterm 和 AA40~80 区域均呈现显著的 ΔFYs 下降(图 4c)，且 Nterm 和 Cterm 的 holo 碎片重叠区域扩展至 AA40~130 范围(图 4f)，其 holo 碎片数量也处于中间水平(表 1)。

研究表明，α-Syn 中 Zn^{2+}的主要结合位点包括 AA40~80 区段(该区域含有可与 Zn^{2+}形成配位键的组氨酸残基)和 CtermAA96~140(强酸性区域，可通过静电相互作用与 Zn^{2+}形成金属盐)[10,12,16]。考虑到配位作用的结合能普遍高于静电作用[28,29]，我们推测在 UVPD 解离下 Zn^{2+}与 Cterm 的静电相互作用易被破坏[30,31]，导致其较难保留 holo 碎片，而 AA40~80 区段的配位作用则更有助于 holo 碎片的保留。本实验观察到的 ΔFYs 下降最显著区域、Nterm 和 Cterm 的 holo 碎片的重叠分布区以及 holo 碎片数量与文献报道的结合位点高度吻合(图 4)。基于此，我们可以推断不同构象的 α-Syn 与 Zn^{2+}的结合模式存在差异：低价态构象主要通过 Cterm 酸性区域的静电相互作用与 Zn^{2+}结合；中间价态构象主要依赖 AA40~80 区段的配位作用与 Zn^{2+}结合；而高价态构象与 Zn^{2+}结合同时涉及静电和配位相互作用两种机制。

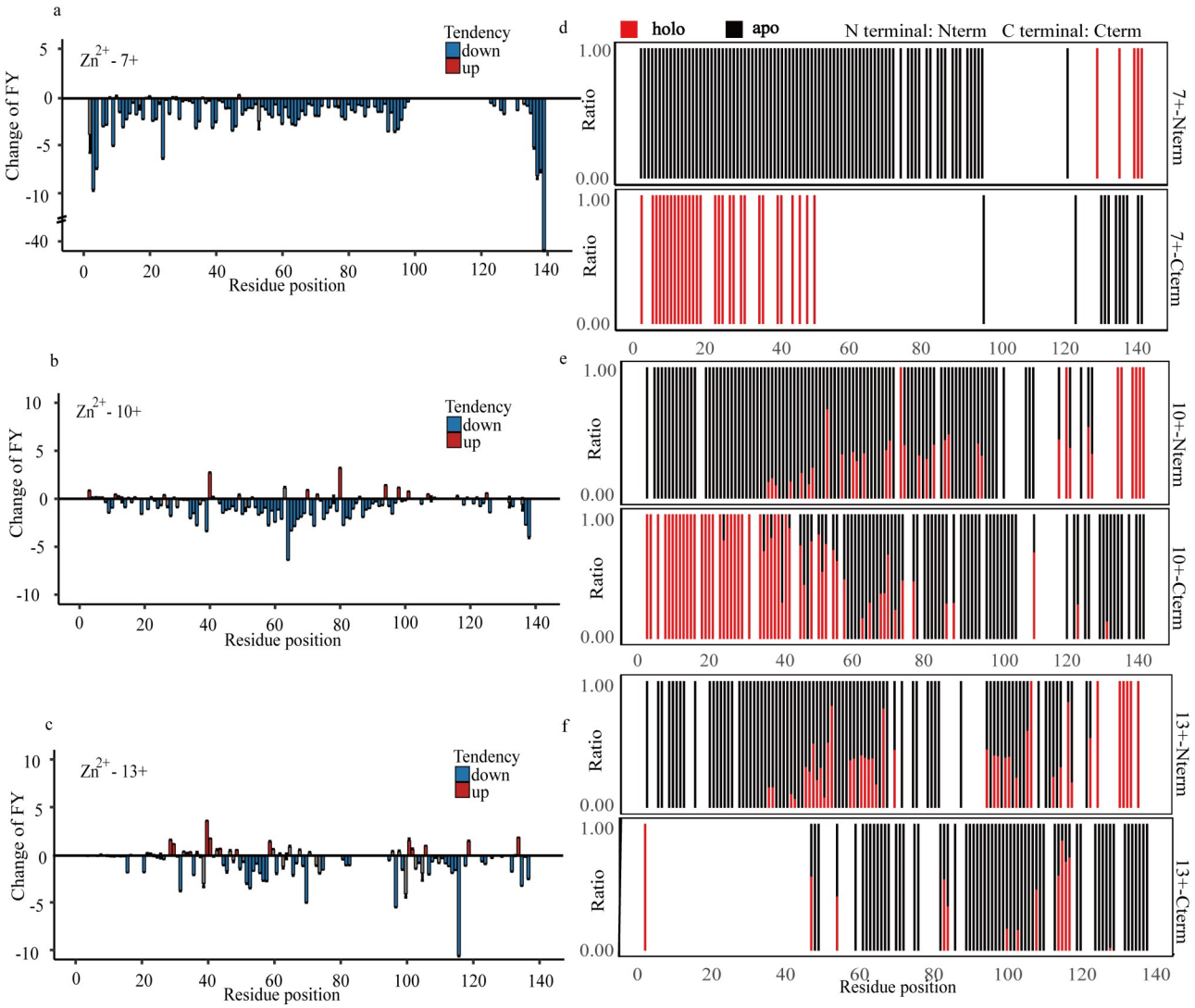


图 4　UVPD 分析不同构象(7+、10+、13+)的 α-Syn

Fig. 4　UVPD analysis of different conformations of α-Syn (7+, 10+, 13+)

a−c. residue-level changes of fragment yields (ΔFYs) before and after Zn^{2+} binding; d−f. ratio distribution of Zn^{2+}-bound (holo) and unbound (apo) fragment ions.

表 1　α-Syn 结合 Zn^{2+} 后的 holo 碎片数量

Table 1　Holo fragment counts of α-Syn binding to Zn^{2+}

Conformation	Nterm holo	Cterm holo	Sum
Low-charge (7+)	6	31	37
Intermediate-charge (10+)	34	55	89
High-charge (13+)	40	13	53

3　结论

本研究采用 nMS 联用 193 nm UVPD 解离技术,实现了对 α-Syn 构象异质性及其与 Zn^{2+} 结合特征的高分辨率分离与结构解析。该方法充分结合了 nMS 在保持蛋白天然构象方面的优势与 193 nm UVPD 在结构域特异性断裂中的高灵敏探测能力,使我们得以从分子层面深入揭示 α-Syn 与 Zn^{2+} 结合的构象选择性机制。研究结果表明,α-Syn 可划分为低、中、高 3 种构象亚群,且各亚群与 Zn^{2+} 的结合表现出明显的结构依赖性,突显了其构象对金属离子结合的显著影响。本研究展示了 nMS-UVPD 技术在 IDPs 与配体相互作用研究中的高分辨能力与机制探测深度。该方法不仅为深入理解 Zn^{2+} 在 α-Syn 相关神经退行性疾病中的作用提供了重要理论支持,也为 IDPs 结构功能关系的研究开辟了新的技术路径与分析范式。

参考文献:

[1] Park H, Kam T I, Dawson V L, et al. Nat Rev Neurol,

2025, 21(1): 32
[2] Kuo G, Kumbhar R, Blair W, et al. Mol Neurodegener, 2025, 20(1): 10
[3] Yamaguchi K, Nakajima K, Ogi H, et al. NPJ Biosensing, 2025, 2(1): 7
[4] Stephens A D, Zacharopoulou M, Moons R, et al. Nat Commun, 2020, 11(1): 2820
[5] Galvagnion C, Buell A K, Meisl G, et al. Nat Chem Biol, 2015, 11(3): 229
[6] Li Y, Zhao C Y, Luo F, et al. Cell Research, 2018, 28(9): 897
[7] Xu C K, Meisl G, Andrzejewska E A, et al. Nat Commun, 2024, 15(1): 7083
[8] Nielsen M S, Vorum H, Lindersson E, et al. J Biol Chem, 2001, 276(25): 22680
[9] Ueda J, Uemura N, Ishimoto T, et al. Mov Disord, 2023, 38(6): 1056
[10] Al-Harthi S, Kharchenko V, Mandal P, et al. Int J Biol Macromol, 2022, 222: 2878
[11] Yamin G, Glaser C B, Uversky V N, et al. J Biol Chem, 2003, 278(30): 27630
[12] Moons R, Konijnenberg A, Mensch C, et al. Sci Rep, 2020, 10(1): 16293
[13] Uversky V N, Li J, Fink A L. J Biol Chem, 2001, 276(47): 44284
[14] Breydo L, Uversky V N. Metallomics, 2011, 3(11): 1163
[15] Valiente-Gabioud A A, Torres-Monserrat V, Molina-Rubino L, et al. J Inorg Biochem, 2012, 117: 334
[16] Byrd E J, Wilkinson M, Radford S E, et al. J Am Soc Mass Spectrom, 2023, 34(3): 493
[17] Tuttle M D, Comellas G, Nieuwkoop A J, et al. Nat Struct Mol Biol, 2016, 23(5): 409
[18] Theillet F X, Binolfi A, Bekei B, et al. Nature, 2016, 530(7588): 45
[19] Du X Y, Xie X X, Liu R T. Int J Mol Sci, 2020, 21(22): 8645
[20] Jeacock K, Chappard A, Gallagher K J, et al. J Am Soc Mass Spectrom, 2023, 34(5): 847
[21] Phillips A S, Gomes A F, Kalapothakis J M D, et al. The Analyst, 2015, 140(9): 3070
[22] Wongkongkathep P, Han J Y, Choi T S, et al. J Am Soc Mass Spectrom, 2018, 29(9): 1870
[23] Lantz C, Lopez J, Goring A K, et al. J Am Soc Mass Spectrom, 2023, 34(12): 2739
[24] Zhou L Q, Liu Z Y, Guo Y J, et al. J Am Chem Soc, 2022, 145(2): 1285
[25] Luo P, Liu Z Y, Lai C, et al. J Am Chem Soc, 2024, 146(13): 8832
[26] Chambers M C, Maclean B, Burke R, et al. Nat Biotechnol, 2012, 30(10): 918
[27] Kou Q, Xun L, Liu X. Bioinformatics, 2016, 32(22): 3495
[28] Jung W K, Heo S J, Jeon Y J, et al. J Agric Food Chem, 2009, 57(10): 4439
[29] Maret W, Li Y. Chem Rev, 2009, 109(10): 4683
[30] Crittenden C M, Novelli E T, Mehaffey M R, et al. J Am Chem Soc, 2020, 31(5): 1140
[31] Yang S R, Hou Z H, Liu Z Y, et al. J Am Chem Soc, 2025, 147(6): 4714