

# H/D 交换质谱分析法在结构生物学研究中的应用

袁航, 刘艳, 陈培燕, 林东海, 赵玉芬

5 (厦门大学化学化工学院, 化学生物学系, 化学生物学福建省重点实验室,  
福建 厦门 361005)

摘要: 氢氘交换和质谱相结合的分析方法广泛应用于蛋白质的构象及其动力学研究, 其具有  
样品用量少、快速、灵敏、简便的优点。本论文着重从氢氘交换的原理及相关机制; 影响氢  
10 氘交换的各个因素; 氢氘交换质谱法中常用质谱检测仪器, 以及质谱检测分析法等四个方面  
进行概述。

关键词: 生物有机质谱; 氢氘交换; 结构生物学; 综述

## H/D exchange and mass spectrometry in Structural Biology

Yuan Hang, Liu Yan, Chen Peiyan, Lin Donghai, Zhao Yufen

15 (Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, Department of Chemical Biology,  
Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University,  
FuJian XiaMen 361005)

**Abstract:** The combination of H/D exchange (HDX) and mass spectrometry technology is widely  
applied to the kinetic and conformational studies of proteins. The HDX-MS method has some  
20 advantages, such as fewer samples, fast detection and more sensitive than the traditional methods.  
In this review, we discussed four main contents in details, containing the principle and the  
mechanism of the exchange, the effects on the HDX, the application of the equipments, and the  
specific HDX-MS methods.

**Keywords:** bioorganic mass spectrometry; H/D exchange; structural biology; review

25

### 0 引言

目前, 结构生物学的研究方法主要包括 X-Ray<sup>[1]</sup>, NMR<sup>[2]</sup>和 MS<sup>[3]</sup>等技术。X-Ray 能够  
获得详细的结构信息, 然而衍射效果好的蛋白质晶体不容易得到, 耗时长, 往往事倍功半,  
因此这种方法具有很大的局限性<sup>[4-7]</sup>。NMR 和 MS 是研究结构生物学最常用的两种工具, 但  
30 是 NMR 对浓度的要求要高于质谱 2 个数量级, 同时核磁的检测受到蛋白质大小的限制, 在  
 $\leq 30\text{KDa}$  的条件下才能够准确测定。此外, NMR 的灵敏度、蛋白质的溶解度、分析时间的  
长短、独立氨基质子的分配等也是 NMR 技术的障碍<sup>[8]</sup>。MS 可以在 fmol 水平上准确分析分  
子量高达几万到几十万的生物大分子, 具有样品消耗量少、分辨率高、准确性强、操作简便  
35 的优势, 并且能够和其他的技术如液相色谱、气相色谱、毛细管电泳技术联用进行复杂样品  
的分离分析<sup>[9]</sup>。

最初在 1954 年 Havidt<sup>[10]</sup> 等人发现蛋白质主链氨基上的氢原子能够和溶液中的 D 交换,  
从而通过对蛋白质主链的氢氘交换来调控蛋白质在溶液中的溶解度。1993 年, Zhang<sup>[11]</sup> 等人  
将氢氘交换和 MS 联用能够在不改变蛋白质结构的情况来探测蛋白质的溶解度。NMR 和 H/D  
40 交换联用可以测得蛋白质特定位点的氢氘交换率, 但是有些氨基上的氢原子交换速率太快,  
对于绝大部分的蛋白质和蛋白质之间的相互作用的研究, 采用 NMR 技术还是无法做到的  
<sup>[12-14]</sup>。Mandell<sup>[15]</sup> 等人将 MALDI-TOF MS 和 H/D 交换联合起来并将其作为研究蛋白质之间

基金项目: 教育部新教师基金 (200803841009)

作者简介: 袁航, (1987-), 女, 研究生, 主要研究方向: 生物有机质谱。

通信联系人: 刘艳, (1976-), 女, 副教授, 主要研究方向: 生物有机质谱. E-mail: stacyliu@xmu.edu.cn

和蛋白质配体相互作用的最佳手段。近年来，氢氘交换（HDX）质谱分析法被广泛应用于蛋白质配体相互作用<sup>[16-17]</sup>、蛋白质结构的表征<sup>[18]</sup>、蛋白质动力学<sup>[19-20]</sup>、抗原决定部位的标记<sup>[21]</sup>和蛋白质稳定性<sup>[22]</sup>等研究领域，受到人们的广泛关注。因此，本论文着重从氢氘交换的原理及相关机制；影响氢氘交换的各个因素；氢氘交换质谱法中常用质谱检测仪器，以及质谱检测分析法等四个方面作了简要的论述。

## 1 氢氘交换原理及其相关机制

### 1.1 氢氘交换原理

氢氘交换是指蛋白质、多肽链中支链上与杂原子（N,O,S）相连的极性氢原子、氮端和碳端的氢原子以及主链酰胺键中氨基氢原子与氘原子的交换。在中性条件下，支链上的极性氢原子交换时间是主链氨基氢原子的  $10^3 \sim 10^6$  倍，其交换时间太快而无法测定，所以通常所说的氢氘交换是指主链氨基上的氢与氘的交换。蛋白质、多肽链中氢可分为三类，如图 1 所示。

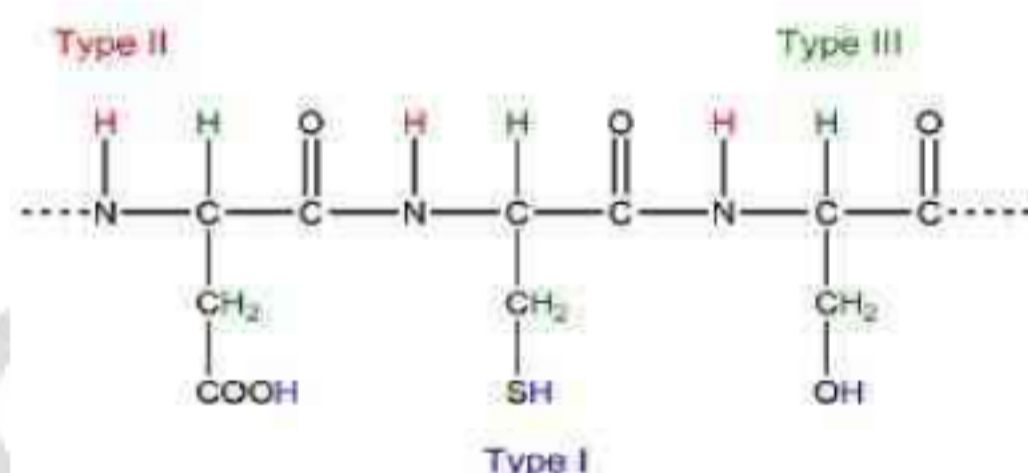


图.1 多肽链上的氢的种类

Fig. 1 The types of hydrogen in the polypeptide chain

图 1 中，侧链极性氢（Type I，蓝色）的交换速率非常快，影响其交换速率的因素有 pH 和温度；主链氨基氢（Type II，红色）的交换受溶液条件影响很大，pH 和温度的降低通常会导致交换速率的降低，该类氢常用于研究主链折叠和去折叠动力学；直接与碳相连的氢（Type III，绿色）不会发生交换，因此可以忽略。

### 1.2 氢氘交换的相关机制

氢氘交换机制有 EX1、EX2、EXX、络合阳离子机制、延迟机制、盐桥机制和触发机制等，其中液相中最主要的是 EX1、EX2 机制，而气相中氢氘交换比较复杂。

#### 1.2.1 EX1, EX2 机制

氢氘交换的位点会受到溶剂的屏蔽作用影响，稳定氢键的存在会使交换过程中蛋白质的结构发生波动。实验发现交换动力学和多肽链的构象动力学相关<sup>[23-25]</sup>。在液相中，蛋白质氨基的氢氘交换涉及两种不同的反应：1) 蛋白质的折叠反应，其可逆性会对氢键网络造成扰动；2) 活泼氨基的同位素离子交换。因此整个的氢氘交换也受这两个反应的制约。通常是考虑两种极端的情况，也就是 EX1, EX2 交换机制，如图 2 所示<sup>[26]</sup>：

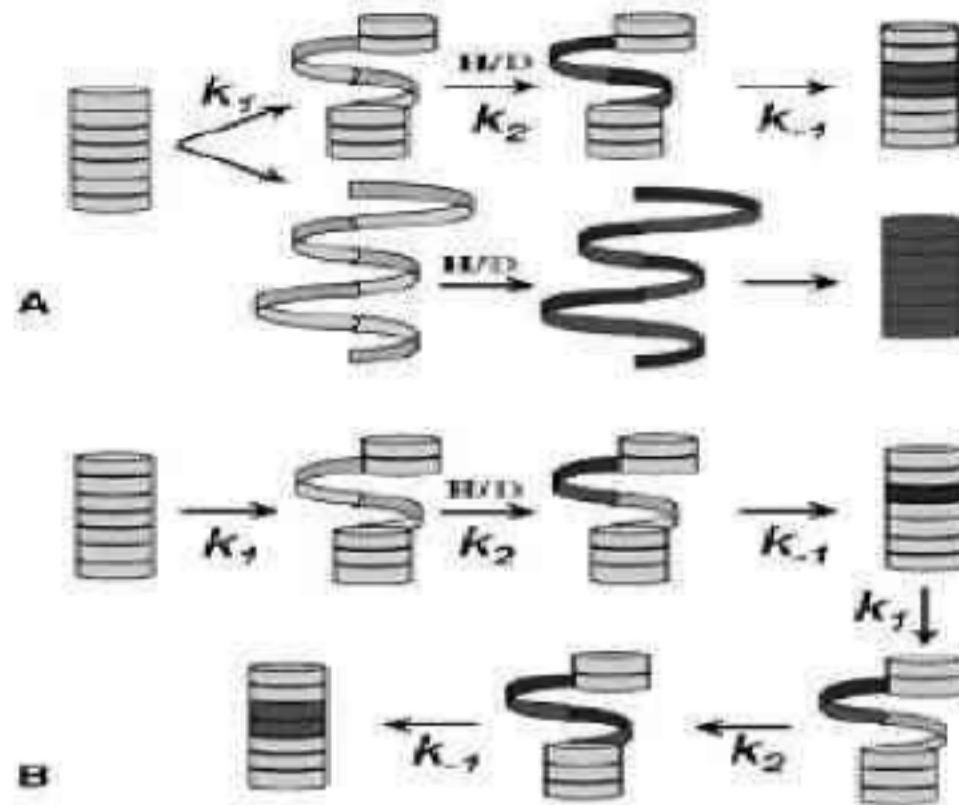


图.2 HDX 交换机制示意图。A 为 EX1 机制，B 为 EX2 机制。  
Fig. 2 The H/ D exchange mechanism. A: EX1; B: EX2

75 EX1 机制 (图.2 A) 中，氢氘交换速率  $K_2$  远远大于重新折叠的速率；而 EX2 机制 (图.2 B) 中，重新折叠和内在的氢氘交换反应发生竞争，只有在发生了一部分重新折叠反应后，氢氘交换才能进行完全。

EX 机制用公式表示如下式 1 所示<sup>[27]</sup>：



80 其中， $K_{op}$  和  $K_{cl}$  分别是特定交换位点的开关速率常数， $K_{ch}$  为化学交换速率常数，可以表征完全未被保护的氢的交换动力学，对于氨基上的氢，某位点上  $K_{ch}$  值取决于其相邻的氨基酸侧链和 pD 值 ( $pD=pH+0.4$ )<sup>[28]</sup>。在  $pH \geq 4$  时，化学交换速率受碱催化的影响，因此  $K_{ex}$  随着 pH 的增加而增大，因此可以依据  $K_{ex}$  随 pH 的变化来判断 EX1 和 EX2<sup>[23]</sup>。从二肽模型化合物中获得的参考数据对于任意溶剂条件下的  $K_{ch}$  值的评估很有参考价值<sup>[29-31]</sup>。

85 在 EX2 机制中， $K_{cl} \gg K_{ch}$ ，整体的交换速率常数为  $K_{ex}$ 。 $K_{ex} = K_{op} \cdot K_{ch}$ ，则  $K_{op} = K_{ex} / K_{cl}$  是特定位点打开反应的速率常数，在 EX2 条件下，在交换反应未发生之前许多的位点处于打开的构象状态。相反的，在 EX1 条件下， $K_{ch} \gg K_{cl}$ ，在蛋白质的开放区域将会发生完全的氘标记，此时  $K_{ex} = K_{op}$  <sup>[32]</sup>

90 在自然状态下，氨基 HDX 会遵循 EX2 机制，但是在蛋白质失活的条件下，交换更倾向于 EX1<sup>[33-37]</sup>。如果某种蛋白质有两种构象，当交换速率远远大于构象转换速率时，质谱会检测到双峰 (EX1)；如果结构转换速率远远大于交换速率时，只可能检测到单峰，此时采用的是 EX2 机制，如图 3 所示：

从图 3 可以看出 hMb 在标记时间达 2.1s 时出现双峰，这是由于 EX2 机制下其结构发生了改变，并且质量大的碎片峰逐渐升高，质量小的逐渐消失，这是由于 EX1 机制的作用。

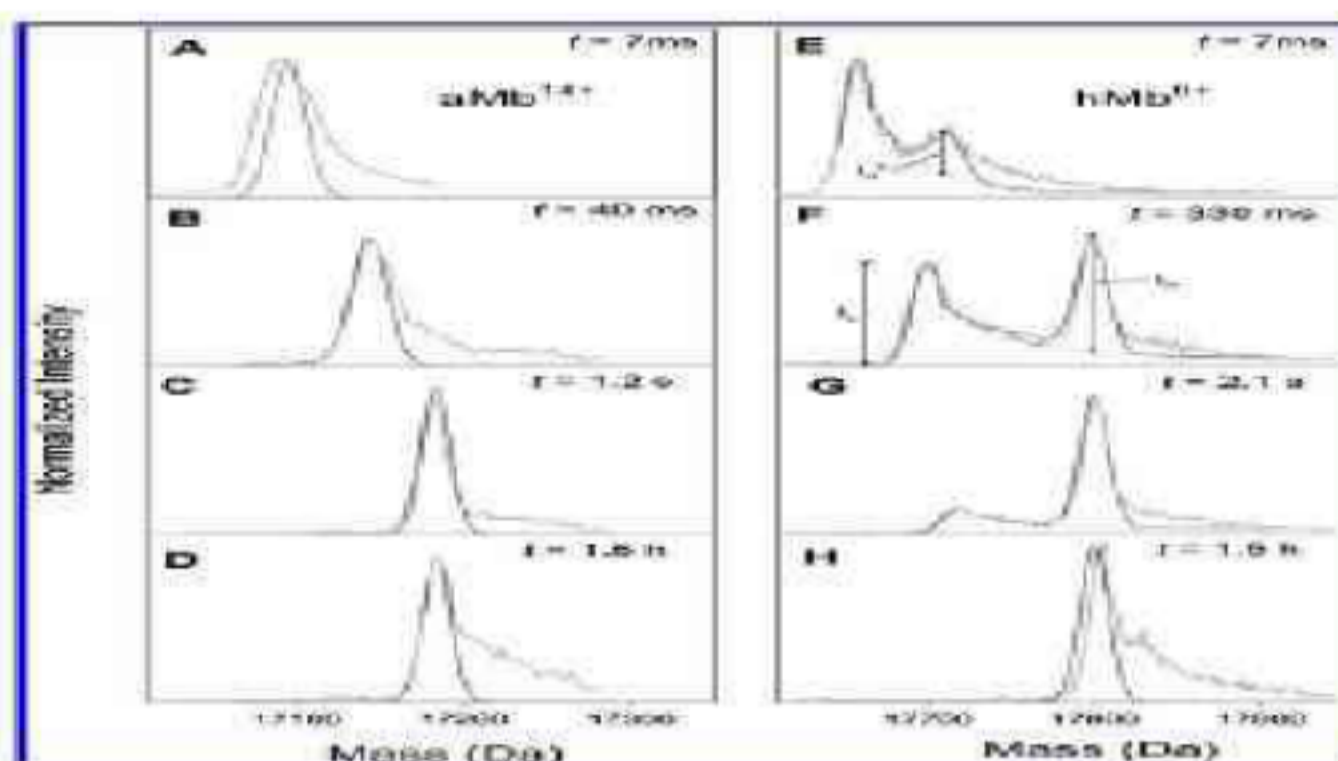


图.3 特定时间的 aMb (apomyoglobin) (A-D) 和 hMb (holomyoglobin) (E-H) 的同位素交换图 (灰线代表仪器的干扰线, 黑线是动力学模型线) [32]

Fig.3 Isotope exchange behavior diagrams observed for ions aMb<sub>4</sub><sup>+</sup> (Apomyoglobin) (A-D) and hMb<sub>8</sub><sup>+</sup> (Holomyoglobin) (E-H). The gray lines represent experimental noise, and smooth black lines are stimulated peak shapes, calculated from a kinetic model.

### 1.2.2 气相条件下的氢氘交换机制

相比之下, 气相条件下的氢氘交换机制则要复杂得多, Campbell 教授<sup>[38]</sup>就曾提出了一些机制。对于蛋白质气相条件下的 HDX, 由液相中的氢氘交换类推, 开放的去折叠部分的氘代量比折叠部分的氘代量大。虽然折叠部分和氘代量之间的关系未知, 但是如果交换率和交换量不同, 那么可以推断构象也不同, 但是如果交换率和交换量相似, 则可以说明构象也是相似的。

## 2 影响氢氘交换的因素

N-H, O-H 和 S-H 中的活泼氢原子可以和 D<sub>2</sub>O 中的 D 交换, 反应非常剧烈, 但是其交换速度受到底物蛋白中活泼氢原子的化学环境影响, 包括蛋白质本身的结构、氢键和溶剂的屏蔽效应。同时也包括溶液的 pH、温度及溶剂的极性, 这些因素为质谱检测条件的改进提供了一个依据。多肽氨基质子同位素交换率依赖于其是否参与分子内氢键和溶剂的屏蔽程度。因为分子内氢键和溶剂的屏蔽作用会直接关系到蛋白质的结构, 利用氨基化合物的氢交换率可以进行蛋白质结构的快速探测。

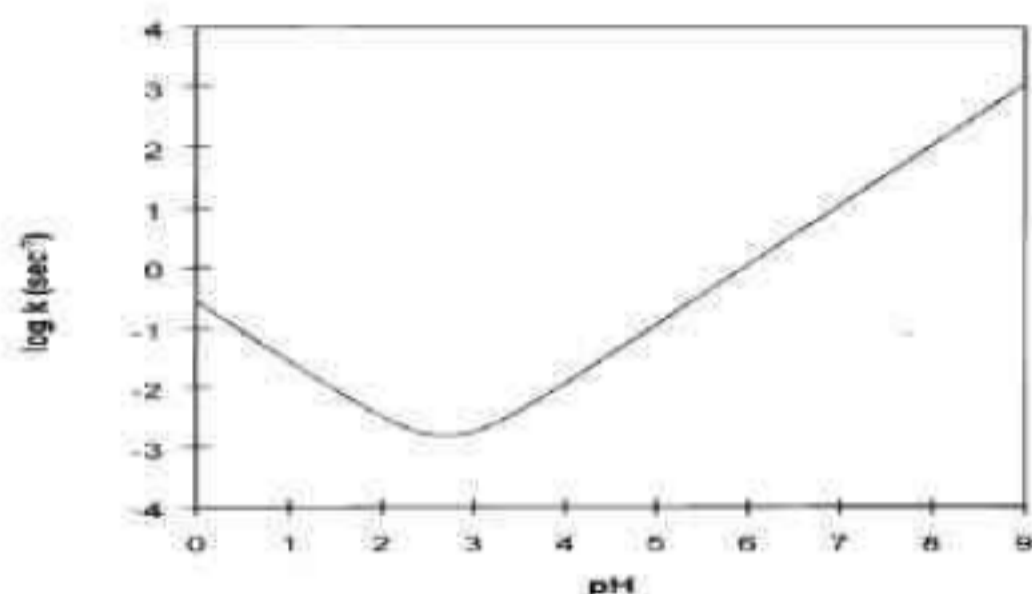
### 2.1 蛋白质的结构

主链氨基上的氢原子交换速率则主要受蛋白质本身结构的影响。一般暴露在溶剂中的氨基氢可以和溶剂快速交换, 因此在 β 折叠和 α 螺旋中, 当有稳定的氢键存在时, 氢氘交换的速率降低<sup>[39]</sup>。如果主链氨基难以接近溶剂或存在于一个稳定的氢键中, 就需要通过瞬时性的结构改变并伴随更慢的动力学来实现交换<sup>[40]</sup>。

### 2.2 pH 值

蛋白质的 N, O, S 上的氢很容易和氘发生反应, 并且受到水合氢离子和氢氧根离子的催化, 因此, 氢氘交换率很容易受到 pH 的影响<sup>[41]</sup>。通过对不同的 pH 条件下氨基酸氢氘交换率的比较, 发现当处于生理条件下, 氢氘交换率最高, 但是当 pH 条件处于 2~3 之间时, 交换率达到最低, 并可以以此作为蛋白质猝灭的条件之一 (图.4)。多肽周围的溶液 pH 对于

125 氢氘反交换 (Back Change) 影响最大。因此, 在发生猝灭反应后, 流动相的 pH 也是必须注意的。氢氘反交换的程度和流动相的 pH 有关, 因为反交换的量随着流动相中酸 pKa 的增加而降低。但是质谱信号却是会随着酸增强而降低。有时候为了获得比较好的信号, 通常会提高流动相的 pH 或者是少用酸<sup>[42]</sup>。



130 图 4. 多肽主链氨基的氢氘交换速率常数随 pH 的变化图  
Fig.4 The exchange rate of H and D in the backbone chain of polypeptide

### 2.3 温度<sup>[43]</sup>

135 在进行氢氘交换反应之前, 各种质谱条件需要进行优化以实现最佳的信噪比 (S/N) 和高氘代量, 同时也要保证在分离过程中的反交换量最低。这里所说的温度包括猝灭溶液温度、水浴温度以及毛细管的温度。其中猝灭溶液的温度在实验允许的误差范围内对于氢氘交换的进行无影响; 水浴的温度在某种程度上会对反交换的程度造成很大的影响; 流动相的温度从 0°C 到 1°C, 反交换的量也会随之降低。在通常情况下, 毛细管的温度越低, 氘代量就越大。温度的改变对于那些质荷比较小的碎片离子影响不大。毛细管温度越低, 对于那些电荷量较低, 但是质荷比较高的离子来说, 氘代的量越大。但是这种关系并不是绝对的, 因为到目前为止还无法给出氘代量和毛细管温度的完整解释, 并且温度越高, 仪器的信噪比越大, 这就需要寻找一种兼顾的方法来获得最佳的温度条件。

### 2.4 溶剂

145 氨基酸残基的氢氘交换率也和试剂有关, 常用的氘代试剂有 D<sub>2</sub>O, CD<sub>3</sub>OD, CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D, ND<sub>3</sub> 等。在碱性条件下, D<sub>2</sub>O < CD<sub>3</sub>OD < CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D < ND<sub>3</sub>。D<sub>2</sub>O 能够有力的判断出氢氘交换是否发生, ND<sub>3</sub> 可以和多肽链上所有的活泼氢发生交换。在 ND<sub>3</sub> 中, 氮端氢交换并伴随着络合阳离子的形成, 同时结构发生转换, 氮端的氢转移到酰基上, 方向与氨基质子和溶剂的交换方向一致。碳端的氢则通过盐桥进行质子交换, 在电荷中心产生稳定的离子对。随着溶剂碱性的减弱, 碳端的交换率降低, 所采用的机制为多电荷中心触发机制。对于 D<sub>2</sub>O, 由于不能吸收足够的能量克服质子亲和力, 因此氨基质子的交换要低于氮端氢离子<sup>[44]</sup>。

155 Orit Geller<sup>[45]</sup>等人对 L-精氨酸的气相氢氘交换在 ND<sub>3</sub> 和 CH<sub>3</sub>OD 的结果进行对比时发现, CH<sub>3</sub>OD 的反应速率明显低于 ND<sub>3</sub>, 这是因为 CH<sub>3</sub>OD 的质子亲和力 (Protein Affinity) (PA=180.3kcal/mol) 低于 ND<sub>3</sub> (PA=204kcal/mol), 并由此推断氢氘交换在两种溶剂中的机理可能会有所不同。ND<sub>3</sub> 碱性强极易被大多数的氨基酸和多肽质子化, 然而 CH<sub>3</sub>OD 则不那么容易使它们去质子化, 推测其可能是通过延迟机制进行反应<sup>[46-47]</sup>。

### 3 质谱检测仪器

#### 3.1 ESI-MS

电喷雾质谱是在毛细管的出口处施加一个高电压，将从毛细管中流出的溶液雾化为带电小液滴，随着溶剂的蒸发，液滴表面的电荷强度逐渐增大，最后随着液滴崩解为大量带一个或多个电荷的离子，使分析物以单电荷或多电荷离子的形式进入气相。电喷雾离子化的特点是产生高电荷离子而不是碎片离子，使质荷比降低到多数质量分析仪器都可以检测的范围。它可以方便的与多种分离技术联合使用，如 LC-MS 用来分离检测大分子物质。

ESI 在正离子模式下会产生完整的多电荷的气相蛋白质离子，这种质子化反应使得多肽的结构变得敏感。在液相条件下，去折叠状态的构象会比折叠构象的蛋白质带上更多的电荷<sup>[48-50]</sup>。在温和的氘代条件下，ESI 的电荷分布通常会出现多重峰的状态，这样就可以解释溶液中的共存构象<sup>[51-53]</sup>。通常情况下 ESI 能够使完整的非共价化合物转换成气相，使之易于检测<sup>[54-58]</sup>。ESI-MS 的优势在于能够监测液相中蛋白质结构的变化，同时提供金属离子，辅基或其他蛋白质的非共价作用信息<sup>[59-61]</sup>。当 ESI-MS 和在线氢氘交换相联系，能够获得额外的结构尺寸信息<sup>[62-63]</sup>。

#### 3.2 MALDI-MS

基质辅助激光解析质谱技术 (MALDI-MS) 的基本原理是将分析物分散在基质分子中并形成晶体，当用激光照射晶体时，基质分子吸收辐射能量迅速升高并快速产热使基质晶体升华，基质和分析物由此进入气相，MALDI 所产生的质谱图多为单电荷离子，因而质谱图中的离子，多肽和蛋白质的质量有一一对应关系。MALDI 产生的离子常用飞行时间检测器来检测，适合于蛋白质、多肽、核酸和多糖等生物大分子的研究<sup>[64]</sup>。

采用 MALDI-TOF 来检测氢氘交换时，会发现样品中有残余的 HOD，这些 HOD 会和部分侧链上的 NH 和 OH 发生快速交换<sup>[65]</sup>，但是主链氨基交换速率不大，并且在猝灭条件下轻微可逆。由于侧链上的 NH 和 OH 也会发生氘化作用，因此需要用氢氘交换的总量去除侧链部分的交换量（或比例）即可获得主链氨基交换量（或比例）。但是，ESI-MS 中，则检测不到 HOD 的残留。因此可以通过消除这种交换来精确的测定主链氨基交换的数量和比例，而 ESI-MS 却无法做到<sup>[66]</sup>。

各种氨基酸侧链氢氘交换数量总结于表 1，由于 MALDI-MS 所获得的多肽片段均带一个电荷，通常测得结果是碳端含有一个质子，即为 COOH，而氮端获得一个质子成为 NH<sub>3</sub><sup>+</sup>。特定多肽的快速氢交换的总数就是每个多肽侧链数与碳端、氮端的四个快速交换氢数目之和。

表 1.  $z=+1$ , pH=2.5 时，每种氨基酸残基的快速氢交换数目

Table 1. The number of fast-exchanging hydrogen of each amino acids residue type with  $z=+1$ , pH=2.5 by MS

各种氨基酸的快速氢交换数目				
A=0	C=1	D=1	E=1	F=0
G=0	H=1	I=0	K=2	L=0
M=0	N=2	P=0	Q=2	R=4
S=1	T=1	V=0	W=1	Y=1

### 4 质谱检测方法

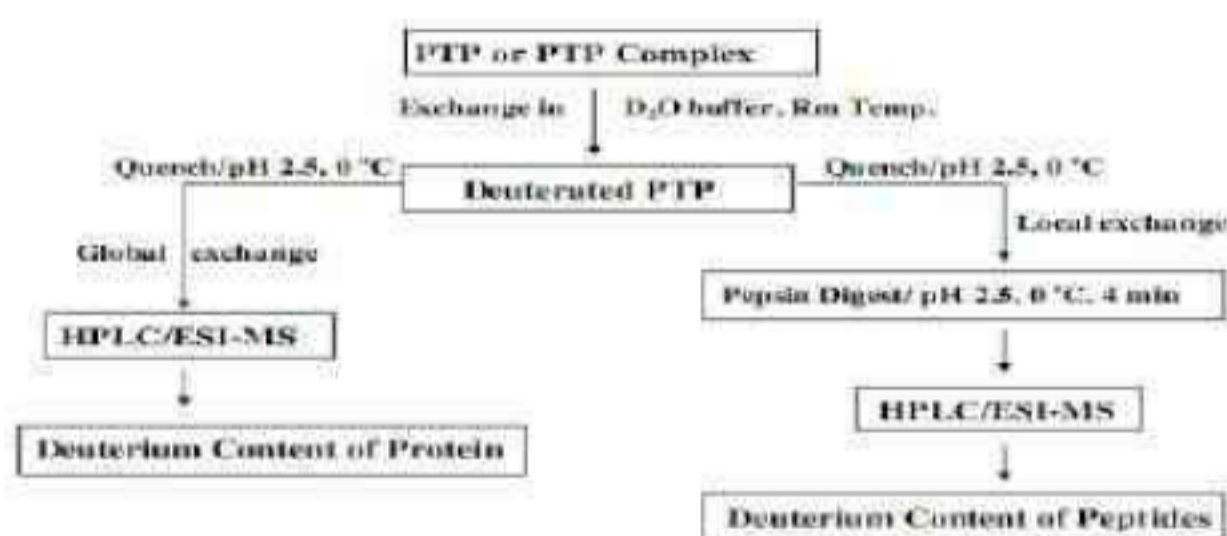
#### 4.1 蛋白质碎片质谱检测法

以蛋白络氨酸磷酸酶(PTP)为例，其每个肽段通常会产生 5~15 个残基，通过控制 pH

和降低温度使得主链氨基的交换速度达到最低，但在此条件下，其他部分的氘交换速率却增大，在分析过程中可以通过液相色谱将这部分洗脱出去。

195 当折叠蛋白质在理想的 pD 下溶于 D<sub>2</sub>O 缓冲液中，不断地降低 pD 直至 2.4，温度降至 0 °C 时，肽键氨基同位素交换停止，在此条件下肽键氨基的同位素半衰期是 30~120 分钟，为了降低人为的同位素交换，同位素的分析检测必须在几分钟内完成。

200 为了将同位素交换控制在小的特定区域内，酸性蛋白酶可以用来将蛋白质转化为多肽。同位素的猝灭条件可以通过酶解来控制，为了降低酶解时间 (< 10min)，通常使用大量的胃蛋白酶（培养基：酶=1:1）。然后通过 HPLC-MS 来检测胃蛋白酶酶解的碎片分子质量，从而获得相应蛋白质碎片的氘代情况。蛋白质碎片质谱检测法的氘交换流程如图 5 所示。



205 图 5. 氘交换流程图 (PTP: Protein Tyrosine Phosphatase) [40]  
Fig.5 The flow chart of HDX (PTP: Protein Tyrosine Phosphatase)

在 HPLC 的质子流动相中，氘标记位点快速改变，比如支链或者氮端氢被取代，因此分子质量增加。由于胃蛋白酶对于肽键的酶解并没有特异性，因此不能单独通过多肽碎片的质量变化来鉴定。

210 虽然蛋白质碎片质谱法能够克服蛋白质浓度、尺寸、纯度和复杂性的问题，但是实际上这些优势会因为样品稀释而降低。该方法多用于蛋白质折叠、构象分析，配体诱导结构变化及配体结合热力学等研究。用于 HDX-MS 的酸性蛋白酶灵敏度低，并且得到大量非特异性的肽段，这些产物峰低于同等条件下胰蛋白酶的酶解产物。由于 HDX-MS 在 >90% D<sub>2</sub>O 中进行，稀释了蛋白质样品，减弱了信号强度，使得肽段的质谱信号峰变宽 [67]。

215 HDX-LC/MS 的局限性在于氘反交换的发生 [68]，并且只能够检测到 5~10 个残余物，这是由蛋白质水解所得的碎片尺寸有关 [69]。因此，人们采用 Top-down 方法来取代酶解技术，将完整的气相蛋白质离子碎片导入质谱仪真空管中 [70-71]。通常采用的 Top-down 方法包括 ECD (Electron capture dissociation) [72-73]，CID 及 ETD (Electron transfer dissociation) [74-75]。最早人们多采用 CID 技术，但是 CID 技术会发生分子内 H/D 转移 [76-80]，然而 ETD 和 ECD

220 技术因为不会在样品界面产生碰撞热而检测不到明显的分子内氘转移现象。ECD-HDX-MS 将主链裂解，形成大量 c 和 z 碎片离子 [81]，并且在分裂过程能够保持液相条件下的多肽形式 [82-85]。ETD-HDX-MS 也可以进行相似的实验 [78-79]。酶解质谱法和 Top-down 质谱法的流程比较如图 6 所示。

225 用 “top-down” 取代酶解步骤，在气相中将蛋白质分解成完整的离子碎片 [83]。这种方法具有以下优势：1) 在慢交换的条件下避免反交换的进行；2) 能够获得天然 [86] 或非天然状态 [87-88] 下的蛋白质的动力学和结构信息，同时能够得到蛋白质配位键 [89] 在蛋白质动力学上所起的作用；3) 最大的优势在于能够在离子被活化之前采用质量选择方法将参与同位素交

换的部分和特定的蛋白质构象联系起来，从而获得来自于特定构象下的特定蛋白质的氘代碎片。其劣势在于气相中质子同蛋白质碎片离子的随机结合。事实上，已有报道显示气相中质子的流动性缺失会对 HDX-CAD-MS 气相中短肽链的测定造成影响<sup>[90]</sup>。ECD 和 ETD 技术能够提供完全的序列，尤其是大分子量的多肽，但是这两种蛋白质离子的活化方法需要更高的分辨率才能够探测到蛋白质的构象和动力学信息。总之 top-down 技术的硬伤在于质子的随机性结合。最新研究发现这种随机行为取决于离子形成初期的电荷状态，当初期高电荷密度低离子被碰撞活化，质子的流动性就被大大的抑制住了。

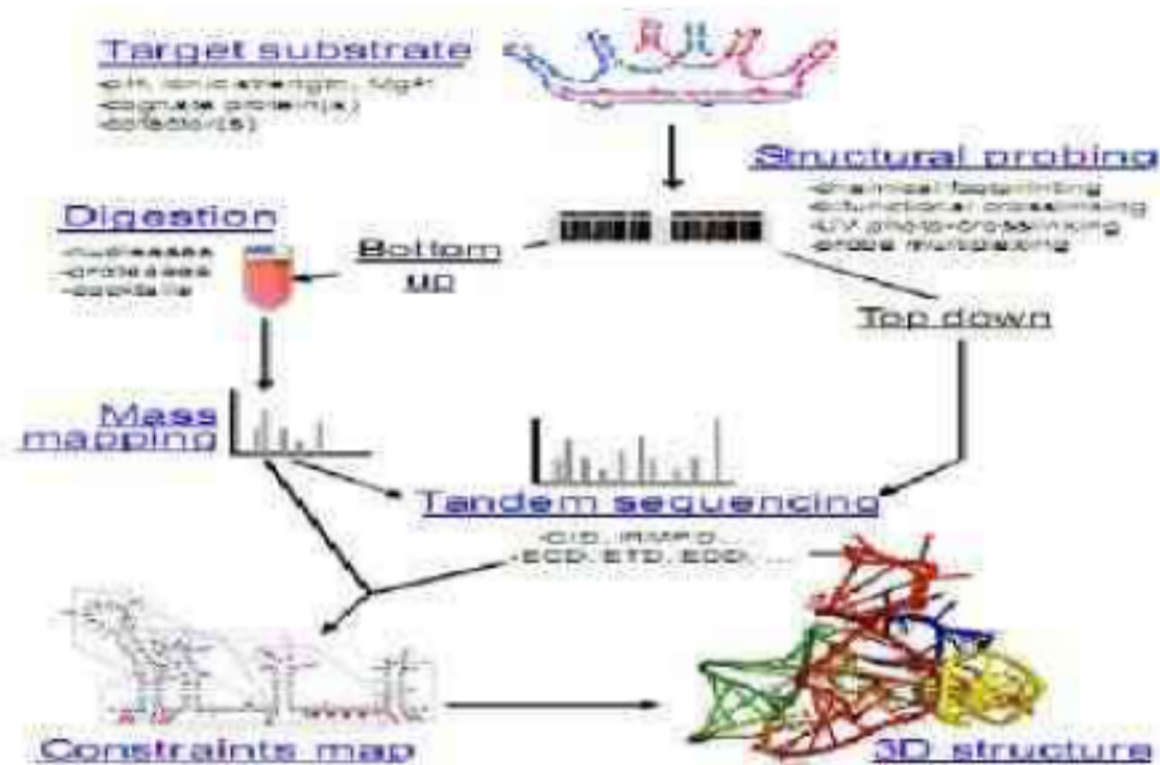


图 6 酶解质谱法和 Top-down 质谱法的流程比较<sup>[86]</sup>  
Fig 6. The comparison diagram of enzyme digestion and TOP-down MS method

#### 4.2 SUPREX<sup>[91]</sup> – ( Stability of Unpurified Proteins from Rates of H/D Exchange )

该方法采用氘交换和 MALDI-MS 相结合的技术来测定蛋白质热力学稳定自由能 ( $\Delta G_r$ )<sup>[91]</sup>。不论是体内还是体外蛋白，该方法对于 $G_r$ 的测定具有高准确性、高精密度、用料少，可对复杂蛋白质化合物进行分析的优势<sup>[96]</sup>。Kendall 等人<sup>[92]</sup>根据 $G_r$ 随着结合常数的变化而变化的特点，通过考察蛋白质的 $G_r$ 来研究蛋白质—配体的结合常数。SUPREX 亦可以检测蛋白质的去折叠自由能 ( $G_u$ )<sup>[93]</sup>，但是要求氘交换在 EX2 下进行（蛋白质重新折叠的速率比未保护氨基质子的交换速率快得多）。

#### 4.3 PLIMSTEX- ( mass spectrometry, titration and H/D exchange )

该方法是依靠滴定过程中的氘交换导致质谱中  $m/z$  值的变化，通过改变滴定过程中配体的浓度来绘制滴定曲线，最终得到 $m$ 和配体浓度曲线，与 SUPREX 相比无需变性剂，能够适应各种蛋白、配体、缓冲液、盐浓度、pH 和温度<sup>[94]</sup>。

PLIMSTEX 广泛用于量化溶液中蛋白质与配合物的作用<sup>[95]</sup>；测定结合的化学计量和宽范围的配合物相互作用亲和力<sup>[96]</sup>及评价各种模型结合常数的准确度和精密度<sup>[97]</sup>等研究领域。

蛋白质配体化合物的氘交换研究的目的大多在于分离蛋白质及其蛋白质配体化合物。在分析前进行蛋白质的消化和 MS/MS 的使用，使信息水平提高至多肽甚至是氨基酸<sup>[38]</sup>。通常使用 PLIMSTEX (H/D exchange , MALDI-MS ) 技术，可以获得蛋白质配体的  $K_d$ ，依此来进行溶液中蛋白质配体结合热力学的量化分析。 PLIMSTEX 还可应用于蛋白质构象的



变化、结合常数计量和宽范围的蛋白质配体相互作用研究, 包括小分子, 金属离子和多肽与蛋白质的相互作用<sup>[98]</sup>。

## 260 5 结论

本论文着重从氢氘交换的原理及相关机制; 影响氢氘交换的各个因素; 氢氘交换质谱法中常用质谱检测仪器, 以及质谱检测分析法等四个方面对 H/D 交换质谱分析法在结构生物学研究中的应用进行概述。但是, 该技术的应用还有些不足之处。蛋白质的分子质量大, 许多多肽会发生多重的同位素交换, 并且蛋白质的不同亚组也会出现同分异构体的碎片峰, 因此经过胃蛋白酶水解后得到的碎片会出现大量的质谱峰重叠。通过采用 <sup>13</sup>C 或者 <sup>15</sup>N 标记可以降低这些干扰, 提高碎片离子的信噪比, 消除质荷比值的模糊性以获得准确的多肽片段同位素峰。

265 由于没有明确的证据显示气相和液相的构象相似性, 用 ESI-MS 的气相数据来表示液相的非共价键作用似乎还存在争议。因此今后可以考虑将液相和气相化学联系起来作为深入表征生物分子结构的工具, 并努力拓展 HDX 的应用领域, 寻找出更灵敏、更精确的检测方法。

### [参考文献] (References)

- [1] Raino K H, Broadhurst R W. Hydrogen/Deuterium Exchange of Hydrophobic Peptides in Model Membranes by Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J], *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, 2002, 13: 1376-1387.
- 275 [2] Deng Y Z, Zhang H Q. Probing the Non-covalent Structure of Proteins by Amide Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry[J], *J. Mass Spectrom.*, 1997, 32: 135-146.
- [3] Ghaemmaghami S, Oas T G. Quantative Protein Stability Measurement in Vivo [J], *Nat. Struct. Biol.*, 2001, 8: 879-882.
- 280 [4] Saphire E O, Parren P W, Pantophlet R et al. Crystal Structure of A Neutralizing IgG against HIV-1:A Template for Vaccine Design [J], *Science*, 2001, 293: 1155-1159.
- [5] Harris L J, Larson S B, Hasel K W et al. Refined Structure of An Intact IgG2a Monoconal Antibody [J], *Biochem.*, 1997, 36: 1581-1597.
- [6] Harris L J, Skaletsky E, McPherson A. Crystallographic Structure of An Intact IgG1 Monoclonal Antibody [J], *J. Mol. Biol.*, 1998, 275: 861-872.
- 285 [7] Guddat L W, Herron J N, Edmundson A B. Three-dimensional Structure of A Human Immunoglobulin with A Hinge Deletion [J], *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, 90: 4271-4275.
- [8] Delepierre M, Dobson C M, Karplus M et al. Electrostatic effects and hydrogen exchange behavior in proteins: The pH dependence of exchange rates in lysozyme[J]. *J. Mol. Biol.*, 1987, 197: 111-130.
- 290 [9] Kaltashov I A, Eyles S J. *Mass Spectrometry in Biophysics* [M], John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ, 2005.
- [10] Hvidt A, Linderstrøm Lang K. Exchange of hydrogen atoms in insulin with deuterium atoms in aqueous solutions [J]. *Biochem. Biophys. Acta*, 1954, 14: 574-575.
- [11] Zhang Z, Smith D L. Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: A new tool for protein structure elucidation [J]. *Protein Sci.*, 1993, 2: 522-531.
- 295 [12] Jeng M, Dyson J. Comparison of the hydrogen-exchange behavior of reduced and oxidized Escherichia coli thioredoxin[J]. *Biochem.*, 1995, 34: 611-619.
- [13] Dempsey C E. Hydrogen exchange in peptides and proteins using NMR spectroscopy [J], *Progr. Nuclear Magn. Reson. Spectr.*, 2001, 39: 135-170.
- [14] Mandell J G, Falick A M, Komives E A. Identification of protein-protein interfaces by decreased amide proton solvent accessibility [J], *Proc. Natl Acad. Sci.*, 1998, 95: 14705-14710.
- 300 [15] Mandell J G, Baerga-Ortiz A, Akashi S et al. Solvent accessibility of the thrombin-thrombomodulin interface [J], *J. Mol. Biol.*, 2001, 306: 575-589.
- [16] Garcia R A, Pantazatos D, Villarreal F J. Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry for Investigating Protein-Ligand Interactions [J], *Assay Drug Dev. Technol.*, 2004, 2: 81-91.
- 305 [17] Tang L, Hopper E D, Tong Y et al. H/D Exchange and Mass Spectrometry-Based Strategy for the Thermodynamic Analysis of Protein-Ligand [J], *Anal. Chem.*, 2007, 79: 5869-5877.
- [18] Li Y, Williams T D, Schowen R L et al. Characterizing Protein Structure in Amorphous Solids Using Hydrogen/deuterium Exchange with Mass Spectrometry [J], *Anal Biochem*, 2007, 366: 18-28.
- [19] Hamuro Y, Coales S J, Southern M R et al. Rapid Analysis of Protein Structure and Dynamics by Hydrogen/deuterium Exchange Mass Spectrometry[J], *J. Biomol. Technol.*, 2003, 14: 171-182.
- 310 [20] Nishimura C, Dyson H J, Wright PE. Enhanced Picture of Protein-folding Intermediates Using Organic Solvents in H/D Exchange and Quench-flow Experiments[J], *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2005, 102: 4765-4770.

- [21] Baerga-Ortiz A, Hughes C A, Mandell J G et al. Epitope Mapping of A Monoclonal Antibody against Human Thrombin by H/D-exchange Mass Spectrometry Reveals Selection of a Diverse Sequence in a Highly Conserved Protein [J], *Protein Sci.*, 2002, 11: 1300-1308.
- [22] Powell K D, Ghaemmaghami S, Wang M Z et al. A General Mass Spectrometry-Based Assay for the Quantitation of Protein Ligand Binding Interactions in Solution [J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124: 10256-10257.
- [23] Li R, Woodward C. The Hydrogen Exchange Core and Protein Folding [J], *Protein Sci.*, 1999, 8: 1571-1590.
- [24] Maity H, Lim W K, Rumbley J N et al. Protein Hydrogen Exchange Mechanism: Local Fluctuations [J], *Protein Sci.*, 2003, 12: 153-160.
- [25] Englander S W, Mayne L, Rumbley J N. Submolecular Cooperativity Produces Multi-state Protein Unfolding and Refolding [J], *Biophys. Chem.*, 2002, 101-102: 57-65.
- [26] Igor A K, Stephen J E. Studies of Biomolecular Conformations And Conformational Dynamics by Mass Spectrometry [J], *Mass Spectrom. Rev.*, 2002, 21: 37-71.
- [27] Hvidt A, Nielsen S O. H Exchange in Protein [J], *Adv. Protein. Chem.*, 2002, 12: 287-386.
- [28] Glasoe P K, Long F A. Use of Glass Electrodes to Measure Acidities in Deuterium Oxide [J], *J. Physical.Chem.*, 1960, 64: 188-190.
- [29] Mayo S, Baldwin R L. Guanidinium Chloride Induction of Partial Unfolding in Amide Proton Exchange in RNase A [J], *Science*, 1993, 262: 873-876.
- [30] Bai Y, Milne J S, Mayne L et al. Primary Structure Effects on Peptide Group Hydrogen Exchange [J], *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, 1993, 17: 75-86.
- [31] Bieri O, Kiefhaber T J. Origin of Apparent Fast and Non-exponential Kinetics of Lysozyme Folding Measured in Pulsed Hydrogen Exchange Experiments [J], *Mol. Biol.*, 2001, 310: 919-935.
- [32] Douglas A S, Stanley D D, Lars K. Conformational Dynamics of Partially Denatured Myoglobin Studied by Time-Resolved Electrospray Mass Spectrometry with Online Hydrogen Deuterium Exchange [J], *Biochem.*, 2003, 42: 5896-5905.
- [33] Wagner D S, Anderegg R J. Conformation of Cytochrome c Studied by Deuterium Exchange Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J], *Anal. Chem.*, 1994, 66: 706-711.
- [34] Eyles S J, Speir J P, Kruppa G H et al. Protein Conformational Stability Probed by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry [J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122: 495-500.
- [35] Eyles S J, Dresch T, Gierasch L M et al. Unfolding Dynamics of A  $\beta$ -sheet Protein Studied by Mass Spectrometry [J], *J. Mass Spectrom.*, 1999, 34: 1289-1295.
- [36] Maier C S, Schimerlik M I, Deinzer M L. Thermal Denaturation of Escherichia Coli Thioredoxin Studied by Hydrogen/deuterium Exchange and Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Monitoring a Two-state Protein Unfolding Transition [J], *Biochem.*, 1999, 38: 1136-1143.
- [37] Kim M Y, Maier C S, Reed D J et al. Conformational Changes in Chemically Modified Escherichia Coli Thioredoxin Monitored by H/D Exchange and Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J], *Protein Sci.*, 2002, 11: 1320-1329.
- [38] Campbell S, Rodgers M T, Marzluff E M et al. Deuterium Exchange Reactions as a Probe of Biomolecule Structure. Fundamental Studies of Gas Phase H/D Exchange Reactions of Protonated Glycine Oligomers with D<sub>2</sub>O, CD<sub>3</sub>OD, CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D, and ND<sub>3</sub> [J], *J. Am. Chem.Soc.*, 1995, 117: 12840-12854.
- [39] Hoofnagle AN, Resing KA, Ahn NG., Protein Analysis by Hydrogen Exchange Mass Spectrometry [J], *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 2003, 32: 1-25.
- [40] Zhou B, Zhang Z Y. Application of Hydrogen/deuterium Exchange Mass Spectrometry to Study Protein Tyrosine Phosphatase Dynamics, Ligand Binding and Substrate Specificity [J], *Methods*, 2007, 42: 227-233.
- [41] Matthew J B, Richards F M. The pH Dependence of Hydrogen Exchange in Proteins [J], *J. Biol Chem*, 1982, 258: 3039-3044.
- [42] William B, Gavin O C. Assessment of the Repeatability and Reproducibility of Hydrogen/deuterium Exchange Mass Spectrometry Measurements [J], *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, 22: 3893-3901.
- [43] Stephen J C, Justine C T, Yoshitomo H. Effects of Electrospray Capillary Temperature on Amide hydrogen Exchange [J], *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, 22: 1367-1371.
- [44] Fenn J B, Mann M, Meng C K et al. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules [J], *Science*, 1989, 246: 64-71.
- [45] Protein Folding [M], W. H. Freeman and Company: New York, 1999, p 551.
- [46] Green M K, Lebrilla C B. Ion-molecule Reactions as Probes of Gas-phase Structures of Peptides and Proteins [J], *Mass Spectrom. Re.*, 1997, 16: 53-71.
- [47] Geller O, Lifshitz C. Gas Phase H/D Exchange of Protonated Arginine Monomers and Dimers [J], *J. Phys. Chem. A*, 2003, 107: 5654-5659.
- [48] Chowdhury S K, Katta V, Chait B T. Probing Conformational Changes in Proteins by Mass Spectrometry [J], *J. Am. Chem.Soc.*, 1990, 112: 9012-9013.
- [49] Konermann L, Douglas D J. Acid-Induced Unfolding of Cytochrome c at Different Methanol Concentrations: Electrospray Ionization Mass Spectrometry Specifically Monitors Changes in the Tertiary Structure [J], *Biochem.*, 1997, 36: 12296-12302.
- [50] Grandori R. Origin of the Conformation Dependence of Protein Charge-state Distributions in Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J], *J. Mass. Spectrom.*, 2003, 38: 11-15.
- [51] Dobo A, Kaltashov I A. Detection of Multiple Protein Conformational Ensembles in Solution via Deconvolution of Charge-State Distributions in ESI MS [J], *Anal. Chem.*, 2001, 73: 4763-4773.
- [52] Grandori R. Detecting Equilibrium Cytochrome c Folding Intermediates by Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Two Partially Folded Forms Populate the Molten-globule State [J], *Protein Sci.*, 2002, 11: 453-458.

- 380 [53] Loo J A. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: a Technology for Studying Noncovalent  
Macromolecular Complexes [J], *Int. J. Mass Spectrom.*, 2000, 200: 175-186.
- [54] Zhang Z, Krutchinsky A, Endicott S et al, Proteasome Activator 11S REG or PA28: Recombinant REG $\alpha$   
/REG $\beta$  Hetero-oligomers Are Heptamers1 [J], *Biochem.*, 1999, 38: 5651-5658.
- 385 [55] Rostom A A, Fucini P, Benjamin D R et al, Detection and Selective Dissociation of Intact Ribosomes in a  
Mass Spectrometer [J], *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97: 5185-5190.
- [56] Berkel W J H, Heuvel R H H, Versluis C et al, Detection of Intact MegaDalton Protein Assemblies of  
Vanillyl-alcohol Oxidase by Mass Spectrometry [J], *Protein Sci.*, 2000, 9: 435-439.
- [57] Daniel J M, Friess S D, Rajagopalan S et al, Quantitative Determination of Noncovalent Binding Interactions  
Using Soft Ionization Mass Spectrometry [J], *Int. J. Mass Spectrom.*, 2002, 216: 1-27.
- 390 [58] Feng R, Konishi Y. Stepwise Refolding of Acid-denatured Myoglobin: Evidence from Electrospray Mass  
Spectrometry [J], *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1993, 4: 638-645.
- [59] Vis H, Heinemann U, Dobson C M et al, Detection of a Monomeric Intermediate Associated with  
Dimerization of Protein Hu by Mass Spectrometry [J], *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120: 6427-6428.
- 395 [60] Nemirovskiy O V, Ramanathan R, Gross M L. Investigation of Calcium-induced, Noncovalent Association of  
Calmodulin with Melittin by Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J], *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1997, 8:  
809-812.
- [61] Katta V, Chait B T. Hydrogen/deuterium Exchange Electrospray Ion- ization Mass Spectrometry a Method  
for Probing Protein Conformational Changes in Solution[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115: 6317-6321.
- 400 [62] Wang F, Tang X. Conformational Heterogeneity and Stability of Apomyoglobin Studied by  
Hydrogen/Deuterium Exchange and Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J], *Biochem.*, 1996, 35:  
4069-4078.
- [63] Babu K R, Douglas D J. Methanol-Induced Conformations of Myoglobin at pH 4.0 [J], *Biochem.*, 2000, 39:  
14702-14710.
- [64] 钱小红,蛋白质组与生物质谱技术, 质谱学报, 1998, 19: 48-54.
- 405 [65] Sivaraman T, Arrington C B, Robertson A D. Kinetics of Unfolding and Folding from Amide Hydrogen  
Exchange in Native Ubiquitin [J]. *Nat. Struct. Biol.*, 2001, 8: 331-333.
- [66] Hotchko M, Automated Extraction of Backbone Deuteration Levels from Amide H/2H Mass Spectrometry  
Experiments [J], *Protein Sci.*, 2006, 15:583-601.
- [67] Gordon W S, Andrew J P, David C. S, 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: 7004-7011.
- 410 [68] Wu Y, Kaveti S, Engen J R. Extensive Deuterium Back-Exchange in Certain Immobilized Pepsin Columns  
Used for H/D Exchange Mass Spectrometry[J], *Anal. Chem.*, 2006, 78: 1719-1723.
- [69] Kaltashov I A, Bobst C E, Abzalimov R R. H/D Exchange and Mass Spectrometry in the Studies of Protein  
Conformation and Dynamics: Is There a Need for a Top-Down Approach?[J], *Anal. Chem.*, 2009, 81:  
415 7892-7899.
- [70] Siuti N, Kelleher N L. Decoding Protein Modifications Using Top-down Mass Spectrometry [J], *Nat.  
Methods*, 2007, 4: 817-821.
- [71] Han X, Jin M, Breuker K, McLafferty F-W. Extending Top-Down Mass Spectrometry to Proteins with  
Masses Greater Than 200 Kilodaltons [J], *Science*, 2006, 314: 109-112.
- 420 [72] Zubarev R A, Zubarev A R, Savitski M M. Electron Capture/transfer Versus Collisionally Activated/induced  
Dissociations: Solo or Duet [J], *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2008, 19: 753-761.
- [73] Cooper H J, Hakansson K, Marshall A G. The Role of Electron Capture Dissociation in Biomolecular  
Analysis [J], *Mass Spectrom. Rev.*, 2005, 24: 201-222.
- [74] Abzalimov R R, Kaplan D A, Easterling M L, Kaltashov I A. Protein Conformations Can be Probed in  
425 Top-down HDX MS Experiments Utilizing Electron Transfer Dissociation of Protein Ions without Hydrogen  
Scrambling [J], *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, 20: 1514-1517.
- [75] Rand K D, Zehl M, Jensen O N et al, Protein Hydrogen Exchange Measured at Single-residue Resolution by  
Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry [J], *Anal. Chem.*, 2009, 81: 5577-5584.
- [76] Jørgensen T J D, Gårdsvoll H, Ploug M et al, Intramolecular Migration of Amide Hydrogens in Protonated  
430 Peptides upon Collisional Activation [J], *J. Am. Chem.Soc.*, 2005, 127: 2785-2793.
- [77] Demmers J A A, Rijkers D T S, Haverkamp J et al, Factors Affecting Gas-phase Deuterium Scrambling in  
Peptide Ions and Their Implications for Protein Structure Determination [J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2002,  
124:11191-11198.
- [78] Ferguson P L, Pan J, Wilson D J, et al, Hydrogen/deuterium Scrambling During Quadrupole Time-of-flight  
435 MS/MS Analysis of a Zinc-binding Protein Domain [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 153-160.
- [79] Percy A J, Slysz G W, Schriemer D C. Surrogate H/D Detection Strategy for Protein Conformational Analysis  
Using MS/MS Data [J], *Anal. Chem.*, 2009, 81:7900-7907.
- [80] Johnson R S, Krylov D, Walsh K A. Proton Mobility within Electrosprayed Peptide Ions [J], *J. Mass.  
Spectrom.*, 1995, 30: 386-387.
- 440 [81] Kruger N A, Zubarev R A, Horn D M, et al, Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Peptide  
Cations1 [J], *Int. J. Mass Spectrom.*, 1999, 185-187: 787-793.
- [82] Pan J, Han J, Borchers C H, et al, Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry with Top-Down  
Electron Capture Dissociation for Characterizing Structural Transitions of a 17 kDa Protein [J], *J. Am. Chem. Soc.*,  
2009, 131: 12801-12808.
- 445 [83] Pan J, Jun H, Borchers C H, Konermann L. Electron Capture Dissociation of Electrosprayed Protein Ions for  
Spatially Resolved Hydrogen Exchange Measurements[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130:11574-11575.

- [84] Rand K D, Adams C M, Zubarev R A, et al, Electron Capture Dissociation Proceeds with a Low Degree of Intramolecular Migration of Peptide Amide Hydrogens [J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130: 1341-1349.
- 450 [85] Daniele F, A Role for the MS Analysis of Nucleic Acids in the Post-Genomics Age [J], *J. Am. Soc Mass Spectrom*, 2010, 21: 1-13.
- [86] Hoerner J K, Xiao H, Dobo A, et al. Is There Hydrogen Scrambling in The Gas Phase? Energetic and Structural Determinants of Proton Mobility within Protein Ions [J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126:7709-7717.
- [87] Hoerner J K, Xiao H, Kaltashov I A. Structural and Dynamic Characteristics of a Partially Folded State of Ubiquitin Revealed by Hydrogen Exchange Mass Spectrometry [J], *Biochem.*, 2005, 44: 11286-11294.
- 455 [88] Kaltashov I A. Probing Protein Dynamics and Function Under Native and Mildly Denaturing Conditions with Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry [J], *Int. J. Mass Spectrom.*, 2005, 240: 249-259.
- [89] Xiao H, Kaltashov I A. Transient Structural Disorder as a Facilitator of Protein-Ligand Binding: Native H/D Exchange–Mass Spectrometry Study of Cellular Retinoic Acid Binding Protein I [J], *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, 16:869-879.
- 460 [90] Hamuro Y, Tomasso J C, Coales S. A Simple Test To Detect Hydrogen/Deuterium Scrambling during Gas-Phase Peptide Fragmentation [J], *Anal. Chem.*, 2008, 80:6785-6790.
- [91] Ghaemmaghami S, Fitzgerald M C, Oas T G, A quantitative, high-throughput screen for protein stability [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97:8296-8301.
- [92] Powell K D, and Fitzgerald M C. Measurements of protein stability by H/D exchange and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using picomoles of materia [J], *Anal. Chem.*, 2001, 73:3300-3304.
- 465 [93] Powell K D, Wales T E, and Fitzgerald M C, Thermodynamic stability measurements on multimeric proteins using a new H/D exchange and matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry-based method [J], *Protein Sci.*, 2002, 11:841-851.
- [94] Demmers J A, Rijkers D T, Haverkamp J, et al, Factors Affecting Gas-phase Deuterium Scrambling in Peptide Ions and Their Implications for Protein Structure Determination [J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124:11191-11198.
- 470 [95] Zhu M M, Rempel D L, Du Z H and Michael L et al, Quantification of Protein Ligand Interactions by Mass Spectrometry, Titration, and H/D Exchange: PLIMSTEX [J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 5252-5253.
- [96] Zhu M M, Rempel D L, Zhao J, et al, Probing Ca<sup>2+</sup> induced Conformational Changes in Porcine Calmodulin by H/D Exchange and ESI-MS: Effect of Cation and Ionic Strength [J], *Biochem.*, 2003, 42:15388-15397.
- 475 [97] Zhu M M, Rempel D L, Gross M L. Modeling Data from Titration, amide H/D Exchange, and Mass Spectrometry to Obtain Protein-ligand Binding Constants [J], *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2004, 15:388-397.
- [98] Powell K D, Fitzgerald M C., Accuracy and Precision of a New H/D Exchange and Mass Spectrometry Based Technique for Measuring the Thermodynamic Properties of Protein-peptide Complexes [J], *Biochem.*, 2003, 42:4962-4970.
- 480