

三维荧光光谱法研究蛋白质溶液构象*

鄢 远** 许金钩*** 陈国珍

(厦门大学化学系, 厦门 361005)

摘要 采用三维荧光光谱法(三维荧光光谱、三维荧光偏振光谱)结合内源荧光探针色氨酸对牛血清白蛋白(BSA)和鸡蛋白蛋白(EA)及其在不同条件下的构象变化进行了研究. 结果表明, 三维荧光光谱法是一种研究蛋白质溶液构象很有效的分析方法, 该方法能够较直观地表明色氨酸残基在蛋白质分子中的微环境及其在不同条件下的构象变化, 并得出了一些有价值的结果.

关键词 三维荧光光谱法 牛血清白蛋白(BSA) 鸡蛋白蛋白(EA) 蛋白质构象

蛋白质是生物体中一种起着极其重要作用的活性物质, 溶液状态下蛋白质构象变化的研究对阐明蛋白质结构与功能的关系具有重要的意义. 目前常用于蛋白质分子构象研究的实验方法主要有 X 射线结构分析、紫外差示光谱、圆二色光谱、核磁共振、荧光光谱等^[1,2]. 其中, X-射线结构分析法虽然可以较准确地测定晶态蛋白质分子的构象, 但对蛋白质晶体要求比较高, 方法复杂, 同时不能用于测定溶液中蛋白质的分子构象. 总的来说, 发展一种研究溶液状态下蛋白质分子构象的行之有效的的方法是很有意义的.

三维荧光光谱法是近 20 年来提出的一种荧光分析新方法^[3], 尤其是最近提出的三维荧光偏振光谱在研究溶液中荧光体分子的行为特征方面具有较大的优越性^[4,5]. 本文首次运用三维荧光光谱法研究溶液状态下的蛋白质分子构象, 利用蛋白质内源荧光探针色氨酸残基研究牛血清白蛋白(BSA)、鸡蛋白蛋白(EA)的构象及其在不同条件下如 6.0 mol/L 盐酸胍、十二烷基硫酸钠(SDS)和十六烷基三甲基铵(CTAB)等不同介质中的构象变化. 结果表明, 三维荧光光谱法是研究溶液状态下蛋白质分子构象一种很有效的方法, 可望得到广泛的应用.

1 实验部分

1.1 主要仪器和药品

日立 Hitachi-650 10 S 荧光分光光度计自编多功能数据采集系统, 岛津 UV-240 紫外可见分光光度计.

BSA 和 EA 均购自华美生物工程公司, BSA, EA(未经进一步纯化)标准液的配制方法是称取一定量的蛋白质, 将其溶于 50 mmol/L NaCl 溶液中配成 1.0 mg/mL 的水溶液, 保存于 4℃

1996-02-20 收稿, 1996-07-17 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目

** 95 届博士生, 现在南昌大学应用化学研究所工作

*** 联系人

冰箱中, 2 次去离子-重蒸水。

1.2 实验方法

于 10 mL 容量瓶中, 加入 pH7.0 Tris 缓冲液 2.0 mL, 不同环境介质若干, BSA 或 EA 溶液 1.0 mL, 稀至刻度, 轻轻摇匀。于 Hitachi-650 10S 荧光分光光度计自编多功能数据采集系统采集三维荧光光谱和三维荧光偏振光谱(激发波长间隔和发射波长间隔分别为 5 和 2 nm), 狭缝宽度均为 5 nm, 三维光谱由 SURF 软件绘出。并于 UV-240 紫外可见分光光度计上测试紫外吸收光谱。

2 原理

三维荧光光谱法通常表示的是与荧光物质的荧光特性有关的三维分析技术, 其中, 通常意义上的三维荧光光谱表示的是荧光物质的荧光强度同时随激发波长、发射波长变化的关系谱图。由于三维荧光光谱所含的光谱信息非常丰富, 有效地克服了常规荧光光谱特征性差的缺陷, 其光谱的指纹信息、荧光峰位置和荧光强度能够较好地反映荧光体分子状态的变化, 因而在荧光探针性质的研究方面具有较大的优越性^[4]。

三维荧光偏振光谱反映的是荧光体分子同时随激发波长、发射波长变化的偏振光谱, 其三维向量分别为激发波长、发射波长和偏振度。偏振度 P 是根据下式计算^[6]:

$$P = \frac{I_{vv} - I_{vh} \times G}{I_{vv} + I_{vh} \times G},$$

其中, G 为校正因子($= I_{hv}/I_{hh}$), I_{vv} 和 I_{vh} 分别为垂直偏振光激发下的垂直偏振的发射光强度和水平偏振的发射光强度, I_{hv} 和 I_{hh} 分别为水平偏振光激发下的垂直偏振的发射光强度和水平偏振的发射光强度。

偏振光谱反映了荧光体分子对偏振光激发的取向、光选择性及激发矩与发射矩的共线等特征, 光谱形状和偏振度的变化与荧光体的转动速度、分子的形状等有关, 因此常应用于生化领域, 如研究蛋白质的变性、缔合和转动速度等^[6]。三维荧光偏振光谱的信息量丰富, 有力地弥补了常规偏振光谱特征性差的缺陷, 增大了三维荧光光谱的选择性; 不同荧光物质及同一荧光物质在不同条件下的三维荧光偏振光谱能够表现出较强的指纹特征, 在一定程度上揭示了荧光体分子状态的差异, 因而在荧光体分子行为的研究中显示出较大的优越性^[4]。

3 结果与讨论

3.1 蛋白质色氨酸残基的三维荧光光谱

图 1, 2 分别表示的是 BSA, EA 母体及其在 6.0 mol/L 盐酸胍、 2.0×10^{-2} mol/L SDS 和 2.0×10^{-3} mol/L CTAB 介质中的三维荧光光谱, 荧光峰位置和荧光强度数据见表 1。实验表明, BSA 三维荧光光谱的荧光峰($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)为 287/350 nm, Stokes 位移为 63 nm, EA 三维荧光光谱的荧光峰为 289/342 nm, Stokes 位移为 53 nm, 两者的峰位置和峰形显示出一定的差别, 同时可以看出蛋白质仅表现为色氨酸残基的荧光。BSA 中色氨酸残基的 λ_{em} (350 nm) 较长, Stokes 位移较大(63 nm), EA 中色氨酸残基的 λ_{em} (342 nm) 较短, Stokes 位移较小(53 nm), 说明了两者的色氨酸残基所处的微环境差异, 根据经验规则^[2], 在 BSA 中色氨酸残基应处在分子表面或分子内部的亲水区, 在 EA 中色氨酸残基应处在分子内部的疏水区。

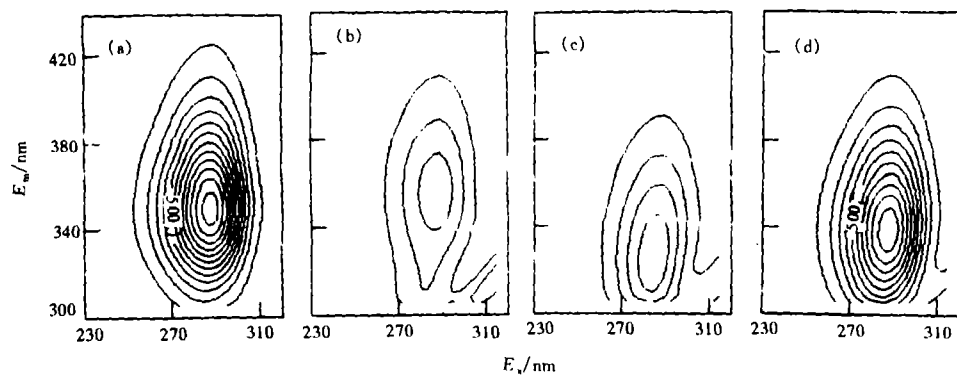


图 1 BSA(a)及其在 6.0 mol/L 盐酸胍(b), 2.0×10^{-2} mol/L SDS(c)和 2.0×10^{-3} mol/L CTAB(d)介质中的三维荧光光谱
BSA 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH7.0 Tris 缓冲液

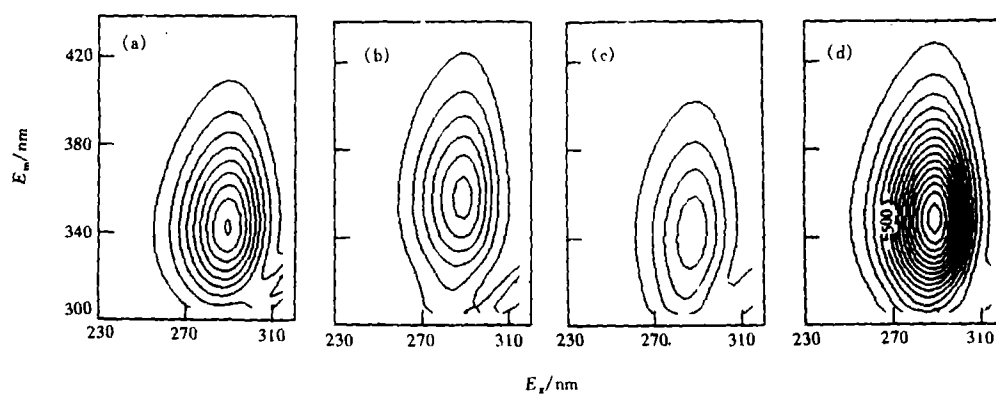


图 2 EA(a)及其在 6.0 mol/L 盐酸胍(b), 2.0×10^{-2} mol/L SDS(c)和 2.0×10^{-3} mol/L CTAB(d)介质中的三维荧光光谱
EA 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH7.0 Tris 缓冲液

表 1 BSA 和 EA 在不同条件下的荧光光谱参数^{a)}

条件	BSA				EA			
	$\lambda_{\text{ex}}:\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\Delta\lambda/\text{nm}$	F	P	$\lambda_{\text{ex}}:\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\Delta\lambda/\text{nm}$	F	P
蛋白质母体	287:350	63	449	0.117	289:342	53	325	0.143
盐酸胍 $6.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$	288:356	68	119	0.065	289:358	69	228	0.065
SDS $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$	288:326	38	155	0.094	289:342	53	164	0.097
CTAB $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$	288:338	50	378	0.087	289:350	61	549	0.081

a)表中 $\Delta\lambda$ 为 Stokes 位移; F 为峰值荧光强度; P 为荧光偏振度, 其区域均值范围: λ_{ex} 为 260~290 nm, λ_{em} 为 350~390 nm

蛋白质在 6.0 mol/L 盐酸胍介质中的三维荧光光谱变化进一步说明了 BSA 和 EA 分子中色氨酸残基的构象的差异. 盐酸胍是蛋白质常用的变性剂, 蛋白质在高浓度的盐酸胍介质中

变性后,从有序结构转变为无序结构,发生去折叠过程^[7]. 变性实验表明,BSA 变性后色氨酸残基的峰位略有红移,Stokes 位移也略有增大,说明其所处微环境的极性有增强,从而说明色氨酸残基更可能是处在 BSA 分子内部的亲水区,在蛋白质变性后色氨酸残基较完全裸露到水溶液中,导致所处微环境极性增大,同时荧光强度明显降低. 而在 EA 中,由于色氨酸残基是处在蛋白质内部的疏水区,因而在蛋白质变性后,色氨酸残基的裸露使得其所处的微环境性质有较大的变化,极性明显增强,从而引起其三维荧光光谱发生较大的变化,荧光峰明显红移,Stokes 位移也明显增大,同时荧光强度有一定的降低.

表面活性剂是影响蛋白质活性的一类较常用的物质,本文试验了两种不同的表面活性剂(阴离子表面活性剂 SDS 和阳离子表面活性剂 CTAB)对蛋白质构象的影响. 结果表明 SDS 的加入使得 BSA 中色氨酸残基的荧光峰明显紫移,Stokes 位移明显减小(表 1),说明 BSA 中色氨酸残基所处微环境的极性有显著的降低;然而 SDS 的加入对 EA 中色氨酸残基的荧光峰无明显影响,Stokes 位移亦基本不变. 试验了 SDS 浓度对蛋白质中色氨酸残基荧光强度的影响,结果显示加入少量的 SDS 即使得蛋白质的荧光明显降低,见图 3(a),其影响曲线显示与临界胶束浓度无明显关系,这预示了 SDS 的单体分子可能插入到蛋白质内部的亲水区,从而导致处在 BSA 分子中亲水区的色氨酸残基所处的微环境发生较大的变化,极性明显降低,表现出其荧光峰形有较大的改变,荧光峰明显蓝移,Stokes 位移减小. 但对处在 EA 分子中疏水区的色氨酸残基却无明显影响,这进一步预示了 SDS 可能是以单体分子插入到蛋白质分子内亲水区的方式与蛋白质发生作用. CTAB 的加入使得 BSA 中色氨酸残基的峰有一定的紫移,荧光强度也有一定的降低,使得 EA 中色氨酸残基的峰有一定的红移,荧光强度有明显的增强,试验 CTAB 浓度对蛋白质荧光强度的影响见图 3(b),均在其临界胶束浓度($9.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$)附近出现了一个拐点,说明 CTAB 对蛋白质构象的影响主要是以胶团方式作用,其影响方式和 SDS 有较大的差异,这一现象预示着 SDS 是以阴离子头基插入到蛋白质内部亲水区,CTAB 较难插入到蛋白质中,加入 CTAB 后,BSA 分子的色氨酸残基所处微环境的极性降低(峰紫移,Stokes 位移减小,荧光强度降低);EA 分子的色氨酸残基所处微环境的极性提高(峰红移,

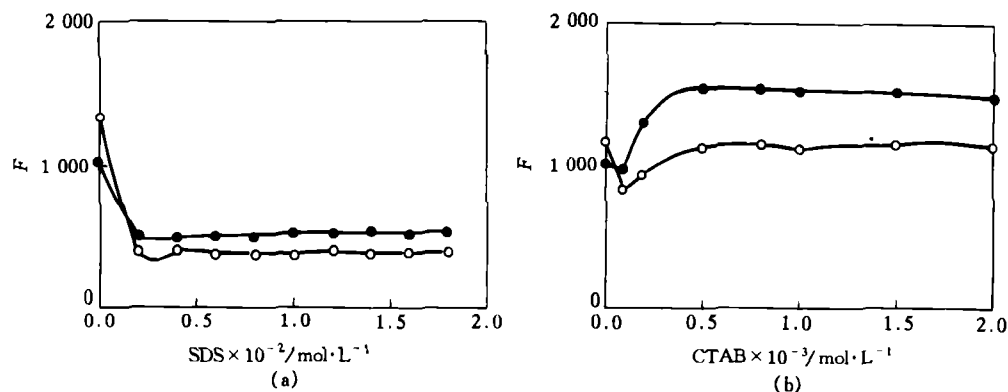


图 3 SDS(a)和 CTAB(b)对蛋白质荧光强度的影响

○为 BSA, ●为 EA

Stokes 位移增大, 荧光强度增强)。这一实验不仅表明了色氨酸残基所处蛋白质分子中构象的差异, 同时也较好地表明了三维荧光光谱能够用来研究表面活性剂和蛋白质分子相互作用的机制。

3.2 蛋白质色氨酸残基的三维荧光偏振光谱

图 4、图 5 分别表示的是 BSA, EA 母体及其在 6.0 mol/L 盐酸胍、 $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ SDS 和 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ CTAB 介质中的三维荧光偏振光谱, 荧光偏振度数据见表 1。实验表明, BSA 和 EA 的三维荧光偏振光谱的光谱指纹特征明显, BSA 表现为较有规则的条形偏振峰, 荧光偏振度为 0.117 ; EA 表现为一个较大的平台, 荧光偏振度为 0.143 , 较直观地显示了两者色氨酸残基构象的差异。

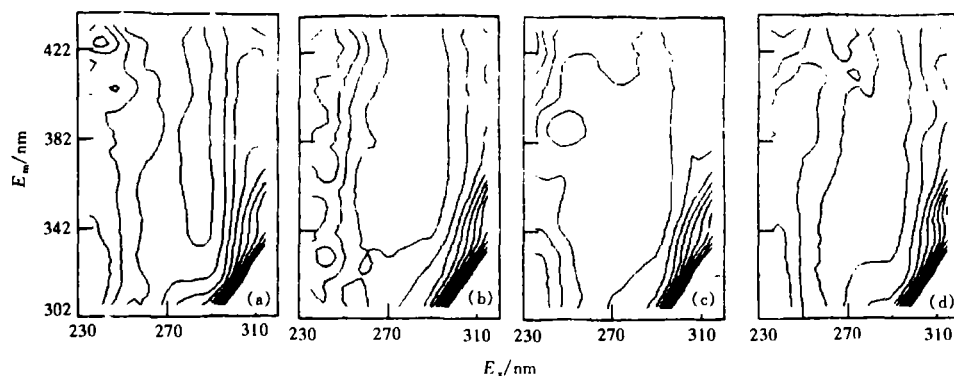


图 4 BSA(a)及其在 6.0 mol/L 盐酸胍(b), $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ SDS(c)和 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ CTAB(d)介质中的三维荧光偏振光谱
BSA 浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$, pH 7.0 Tris 缓冲液

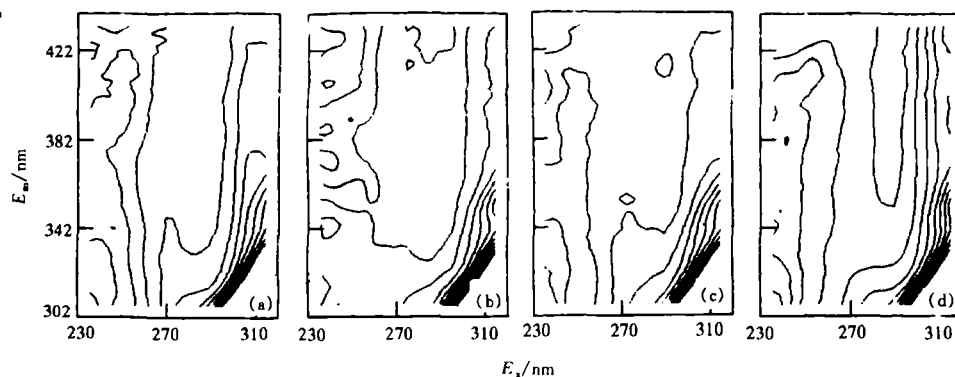


图 5 EA(a)及其在 6.0 mol/L 盐酸胍(b), $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ SDS(c)和 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ CTAB(d)介质中的三维荧光偏振光谱
EA 浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$, pH 7.0 Tris 缓冲液

我们曾试验色氨酸分子在不同胶束中的三维荧光偏振光谱变化^[4],表明色氨酸进入到胶束后,随着所处微环境极性的降低并受到胶束的一定保护,色氨酸的三维荧光偏振光谱的特征性增加.从这一事实,并结合三维荧光光谱所表现出来的特征,BSA 中色氨酸残基表现出来的较有规则的条形偏振峰便说明了色氨酸残基所处微环境的极性比水溶液略低,应处在 BSA 内部亲水区;EA 中色氨酸残基所处微环境介质的非极性使得其荧光偏振度比 BSA 略高,虽然其微环境极性的进一步降低,其三维荧光偏振光谱又表现为一平台,但仍和变性后暴露在水溶液中的情况有一定的区别(后面将进一步讨论).

在 6.0 mol/L 盐酸胍变性介质中蛋白质的三维荧光偏振光谱变化表明,BSA 在变性后三维荧光偏振光谱由原来的条形偏振峰变为一平台,说明了色氨酸残基由原来的内部亲水区暴露到水溶液中,因而偏振度和光谱特征性降低;变性后 EA 的色氨酸残基裸露到蛋白质分子表面水溶液中,偏振度降低,其三维荧光偏振光谱虽然仍表现为一个平台,但其平台周围的特征和变性前有较明显的差异. SDS 的加入对 BSA 的三维荧光偏振光谱影响较显著(特征性和偏振度均降低),而对 EA 的三维荧光偏振光谱的影响较不明显,光谱特征性变化较小,这一结果进一步说明了三维荧光光谱所得到的结果,即 SDS 主要是以单体分子插入到蛋白质分子内部的亲水区与蛋白质分子相互作用的. 三维荧光偏振光谱同时较好地表明了 CTAB 对蛋白质分子构象的影响,CTAB 的加入使得 BSA 中色氨酸残基的光谱特征性降低,同时结合三维荧光光谱的变化情况,进一步说明了此时色氨酸残基构象的变化,其所处微环境的极性有明显的降低. EA 中色氨酸残基的光谱特征性明显增强,并且和 BSA 母体分子中色氨酸残基的光谱特征非常相似,显示了色氨酸残基所处微环境的极性有一定的提高,蛋白质构象的变化使得色氨酸残基处于蛋白质分子内部的亲水区.

毕竟三维荧光偏振光谱是最近提出的新荧光分析法,虽然提供了荧光体分子行为特征的丰富信息,表现了不同蛋白质分子及其在不同条件下的指纹特征,但尚有某些现象难于解释.如蛋白质分子中色氨酸残基暴露在水溶液中表现为一个平台,处在 BSA 内部亲水区时(微环境极性较水溶液略低)的光谱特征性较强,而处在 EA 内部疏水区时(微环境极性进一步降低)又表现为一平台,虽然和水溶液仍有一定的差别. 这些现象的机制尚待进一步的研究.

3.3 荧光猝灭实验

KI 是一种常用的荧光猝灭剂,常用来考察蛋白质中色氨酸残基的构象. 试验 KI 对 BSA 和 EA 的作用情况表明(见图 6),KI 对 BSA 分子的荧光有一定的猝灭,而对 EA 分子的荧光仅有轻微的猝灭,其影响程度说明 BSA 和 EA 中色氨酸残基均处在蛋白质分子的内部,KI 对 BSA 的荧光猝灭程度比 EA 强一些是由于少许碘离子能够进入蛋白质的亲水区,从而一定程度地猝灭 BSA 分子内部亲水区的色氨酸残基的荧光,而对 EA 分子内部疏水区的色氨酸残基无明显影响. 同时试验了 BSA 和 EA 在 6.0 mol/L 盐酸胍变性介质中的紫外差示光谱(图略),结果和

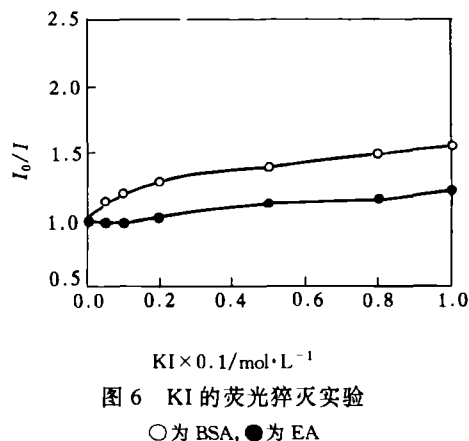


图 6 KI 的荧光猝灭实验

○为 BSA, ●为 EA

文献相似^[7],均在 286 nm 出现一个负峰,说明色氨酸残基在蛋白质变性后均从蛋白质分子内部裸露到溶液中,进一步表明色氨酸残基均处在蛋白质分子内部.

综上所述,利用其丰富的信息量,三维荧光光谱和三维荧光偏振光谱是研究蛋白质溶液构象较有力的工具.

参 考 文 献

- 1 Creighton T E. Proteins-Structures & Molecular Properties. New York: W H Freeman and Company, 1983. 267
- 2 陶慰孙. 蛋白质分子基础. 北京:人民教育出版社,1982. 225
- 3 Ndou T T, Warner I M. Application of multidimensional absorption and luminescence spectroscopies in analytical chemistry. Chem Rev, 1991, 91:493
- 4 郦 远. 三维荧光光谱法研究及其在生命科学中的应用. 厦门大学博士论文. 1995. 7
- 5 Destrampe K A, Hieftje G M. New instrumentation for use in excitation-emission fluorescence-polarization measurements. Appl. Spectrosc, 1993, 47:1 548
- 6 陈国珍,黄贤智,许金钩,等. 荧光分析法. 北京:科学出版社,1990. 262
- 7 胡朝红,邹承鲁. 含有二硫键的蛋白质在 6 mol/L 盐酸胍中变性后不是完全无序的. 中国科学, B 辑, 1992, (5):497~502