中国科学 B 辑:化学 2008 年 第 38 卷 第 1 期: 55 ~ 59
www.scichina.com chem.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

荧光法研究光诱导肌红蛋白的去氧过程

马君燕[①], 郑学仿[①②,*], 郭明[①], 唐乾[①②], 马静[①], 高大彬[①], 胡皆汉[①]

① 辽宁省生物有机化学重点实验室, 大连大学, 大连 116622;

② 大连大学生物工程学院, 大连 116622

* 联系人, E-mail: dlxfzheng@163.com

收稿日期: 2007-02-10; 接受日期: 2007-09-25

国家自然科学基金(批准号: 20271010)、辽宁省优秀人才培养计划项目(批准号: RC-04-10)和辽宁省高校创新团队支持项目(批准号: 2006T002)

摘要 用荧光光谱法对光诱导下肌红蛋白的去氧过程进行了研究. 含氧肌红蛋白在光照下发生去氧作用, 光照量越大, 去氧量越大; 光照下的温度越高, 去氧越快; N_2 可以把肌红蛋白活性中心铁卟啉中的配位氧脱下来, 因而可用荧光光谱法作含氧肌红蛋白与各种气体相互作用的去氧研究. 此外, 荧光光谱法还可用作肌红蛋白中色氨酸和酪氨酸残基与铁卟啉之间的传能研究.

关键词 肌红蛋白 荧光光谱 光诱导 去氧

1 引言

现今光谱方法已被广泛地应用于蛋白质结构的研究. 传统的X晶体衍射法只适用于晶体结构的研究. 但是对蛋白质结构研究的最新发展不仅利用它的晶体形式, 而且更需要了解它在溶液中的结构、功能与物理性质. 随着基因工程和生物技术应用的迅速发展, 应用于溶液中蛋白质结构的光谱方法研究, 已引起人们的极大兴趣. 圆二色谱(CD)、荧光、紫外(UV)、红外(IR)与拉曼光谱(传统的、共振的、时间分辨的)是几种可以揭示在溶液中蛋白质结构和功能的光谱方法[1].

荧光法是一种已广泛应用的现代分子光谱分析方法, 因其具有灵敏度高、选择性高、信息量丰富、检测极限低等特点, 逐渐受到了科研工作者的青睐. 荧光法应用的范围很广, 生物学和医学的各个学科, 包括生理、生化、生物物理、药理、免疫、细胞、遗传等, 都可以使用这一技术. 比如: 张华新[2,3]等综述了荧光法在小分子配体与蛋白质相互作用以及酶催化反应动力学中的研究进展. 荧光法可用作药物分子、微量元素、毒性分子(主要是染料)与蛋白质相互作用的研究, 并可用同步荧光法考察蛋白质的构象. 本文则是应用荧光光谱法研究肌红蛋白在光诱导下的去氧过程.

含血红素(Fe-卟啉)蛋白质与配体结合的动力学研究是分子生物学中的一个经典课题, 其中氧气又是研究此类配体动力学中的一个重要的配体. 国外对具有储存和输送氧气功能的含血红素蛋白质与配体O_2, CO, NO[4]等结合的动力学研究, 多以较稳定和最容易光解的MbCO为模型[5]. 在采用光谱方法研究时, 多使用共振拉曼光谱[6]、表面增强拉曼光谱[7]、时间分辨红外光谱[8,9]、圆二色光谱[10]、时间分辨圆二色光谱[11]和紫外、原子吸收光谱[12,13]等方法, 使用荧光光谱法研究含氧肌红蛋白的去氧过程, 目前未见报道.

本文以 Sigma 公司生产的肌红蛋白为样品, 采用荧光光谱法, 对它在光照下的去氧过程进行了研究, 发现荧光光谱法在研究肌红蛋白的去氧过程, 比之拉曼光谱法或紫外吸收光谱法灵敏、方便、谱峰单一容易识别. N_2 可以把肌红蛋白活性中心铁卟啉中的配位氧脱下来, 因而可用荧光光谱法作含氧肌红蛋

白的去氧研究. 此外, 以肌红蛋白中色氨酸和酪氨酸残基共振吸收波长的光激发肌红蛋白时, 氨基酸的激发能被传递给铁卟啉, 因此荧光光谱法还可用作肌红蛋白中色氨酸和酪氨酸残基与铁卟啉之间的激发能转移研究.

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

FP-6500 型荧光分光光度计(日本 Jasco 公司); V-560 型紫外可见分光光度计(日本 Jasco 公司); JulaboF-12 型制冷和加热循环器(德国).

马心肌红蛋白样品(美国 Sigma 公司), 使用前未经进一步提纯; Tris-HCl, NaCl 均为分析纯; 0.05 mol/L pH = 7.40 的 Tris-HCl(含 0.10 mol/L 的 NaCl)缓冲溶液备用; 实验用水为石英亚沸二次蒸馏水.

2.2 实验方法

2.2.1 荧光光谱的测量

移取 2 mL 肌红蛋白溶液于 1 cm 石英比色池中, 以 430 nm 为激发波长, 扫描速度为 500 nm/min, 在 FP-6500 型荧光分光光度计上记录发射光谱.

2.2.2 紫外光谱的测量

将新配好的肌红蛋白溶液分成两份, 一份直接置于 1 cm 紫外比色池中, 以 Tris-HCl 做参比, 400 nm/min 为扫描速度, 在 V-560 型紫外可见分光光度计上记录 450~700 nm 之间的紫外光谱图; 另一份放在荧光光谱仪的氙灯下以 430 nm 为激发波长, 狭缝宽度 5~5 nm, 照射 30 min, 直到 597 nm 处的荧光发射峰消失, 再将溶液倒入紫外比色池中以上述相同的条件进行紫外吸收光谱的测定, 然后将照射前后的紫外光谱图对照.

3 结果与讨论

3.1 发射荧光强度下降的现象

将从 Sigma 公司购得的肌红蛋白溶于 0.05 mol/L pH=7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 配成浓度为 1×10^{-5} mol/L 的溶液, 置于荧光仪的样品池, 以血红素(Fe-卟啉)Soret 带 430 nm 为激发光波长, 狭缝宽度 5~5 nm, 进行扫描, 连续扫十次, 得到的荧光光谱如图 1 所示, 最大荧光发射峰出现在 597 nm.

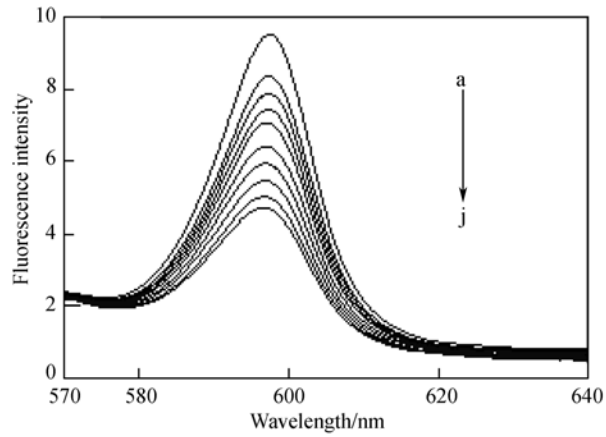


图 1 肌红蛋白的荧光发射谱

激发波长为 430 nm

谱图的最大特征是每扫描一次, 荧光强度衰减一次, 而且每次衰减的强度都很大, 这是一种很值得注意的现象. 造成荧光强度衰减的原因, 有可能是在测试过程中肌红蛋白的不断沉淀; 或肌红蛋白形成了二聚体(肌红蛋白溶液在pH>9 时为二聚体, 在酸性条件下为单体[14]); 甚至是操作仪器的不稳定. 但是我们测试溶液的pH为 7.4, 不能形成二聚体; 此外, 我们利用肌红蛋白中含有色氨酸和酪氨酸残基, 吸收波长在 280 nm附近, 以此波长为激发波长, 在 328 nm出现了最大荧光发射峰, 它在连续扫描中, 荧光峰和强度并不改变, 说明在测试过程中肌红蛋白并不沉淀, 同样也说明仪器是稳定的. 排除了这些因素之后, 并考虑到溶液并没有加入其他物质与肌红蛋白进行相互作用, 每次扫描引起荧光强度的衰减, 就只有激发光照时间长短不同, 越往后的扫描激发光照的时间越长, 样品接受的光能量越多, 荧光强度衰减也就越大, 所以光照射是引起 597 nm荧光峰强度衰减的一个原因.

3.2 光照与肌红蛋白去氧的相关性

3.2.1 光照与不同狭缝宽度的实验

为了证实此种原因, 我们设计了两组实验. 第一组实验是将制得的新鲜溶液分为三份, 一份放于黑暗处, 一份受自然光的照射, 一份在氙灯下照射, 30 min 后三份样品再作荧光测试, 得荧光图如图 2 所示.

置于黑暗处的样品其荧光强度最强, 自然光照射的次之, 而氙灯照射的其荧光强度已几乎接近于零, 这充分证实光照的强弱是引起荧光强度弱强的

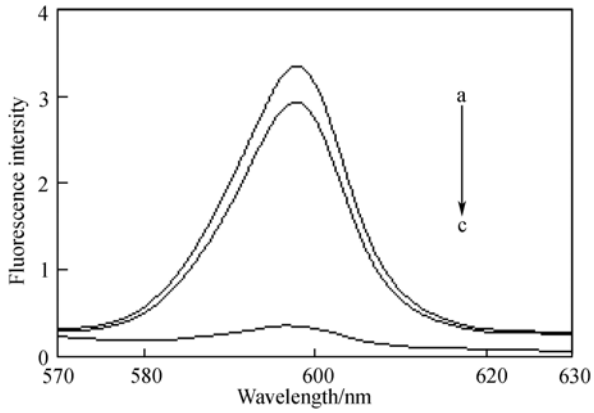


图 2 不同处置条件 30 min 后记录到的肌红蛋白溶液荧光谱图(以 430 nm 光激发)

a: 黑暗下放置 30 min 后; b: 自然光下放置 30 min 后; c: 氙灯下照射 30 min 后

原因, 也就是说光照量越多, 荧光强度衰减越大. 第二组实验, 我们采用改变荧光仪器的激发狭缝来进行. 将同等浓度的肌红蛋白溶液, 以 430 nm 为激发波长, 狭缝宽度 5~5 nm, 10~10 nm, 20~20 nm 时分别扫发射光谱, 等氙灯照射 2 min 后再次分别扫发射光谱, 做同等狭缝宽度下的第一与第二次发射光谱的差谱, 然后将不同狭缝宽度的差谱进行比较, 得到的荧光谱图如图 3 所示. 狭缝越大的光照量越多, 狭缝为 20~20 nm 时, 由于它照射的光量最大, 所以降幅最大, 这种实验同样说明光照是引起 597 nm 荧光峰强度衰减的原因.

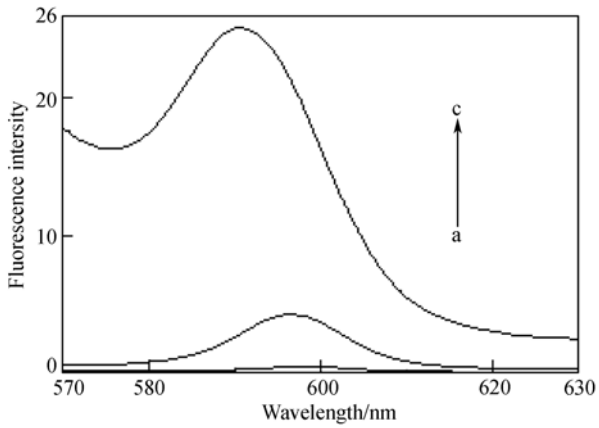


图 3 不同激发狭缝宽度下肌红蛋白溶液荧光差谱的实验谱图

a: 5~5 nm; b:10~10 nm; c:20~20 nm

3.2.2 肌红蛋白去氧实验

Nollmann等[6]曾用干冻的Sigma公司生产的血红蛋白为对象, 采用拉曼光谱方法对用激光照射后的样品进行了研究, 得到的结果为Sigma公司生产的血红蛋白有相当部分的含氧血红蛋白, 在激光照射后, 含氧的血红蛋白因脱掉了氧而变为不含氧的血红蛋白. 我们在实验中所用的样品是Sigma公司生产的肌红蛋白, 也可能是由于激发光照后, 发生了去氧作用, 而造成荧光强度的衰减. 为此我们做了去氧实验, 将制得的溶液分为两份. 在自然光下, 一份置于离心管中加盖封好, 防止大气中的氧进入溶液. 另一份则用真空泵抽氧机进行抽氧, 相同时间后再将两份样品进行荧光测试, 得到的谱图如图 4 所示. 抽氧后的样品, 荧光强度大为降低, 这可以说明荧光强度的衰减, 的确是由在光照射下肌红蛋白去氧造成的.

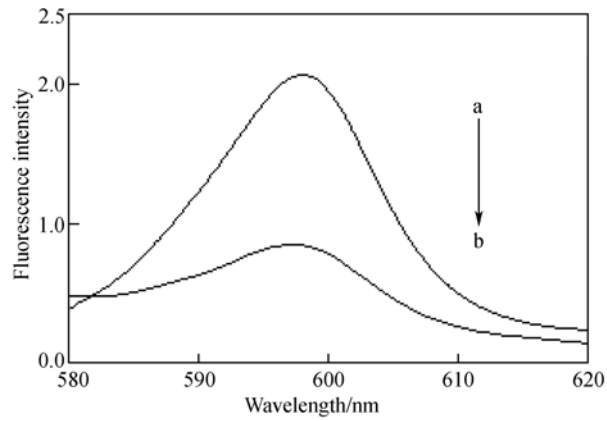


图 4 肌红蛋白溶液的抽氧实验荧光谱图

a: 密封样品; b: 抽氧后

3.3 氙灯照射前后肌红蛋白的紫外吸收实验

此外, 我们又测定了氙灯照射 30 min后样品与不照射样品的紫外吸收光谱图, 如图 5 所示. 光照后的谱带吸收值要比不照样品的吸收值略为低些, 这与Nollmann等[6]用激光照射去氧后得到的紫外吸收光谱吸收值略微减少相一致, 这也充分说明光照下的含氧肌红蛋白的分子结构因去氧而发生了变化.

3.4 荧光法对肌红蛋白去氧的初步研究

在弄清肌红蛋白光照去氧致使其 597nm 荧光峰强度发生下降的原因之后, 我们便把此种荧光测试方法做了下列三方面初步探索:

3.4.1 变温实验

将同等浓度的肌红蛋白, 分别在 4℃、14℃、35℃下以 430 nm 为激发波长, 狭缝宽度 5~5 nm, 进行连续扫描, 扫描 8 次后, 每个温度下做第一次与第八次的差谱, 然后将不同温度下的差谱进行比较, 如图 6 所示. 图中差谱越大的去氧速度越快, 去氧速度幅度大小的顺序依次为 35℃>14℃>4℃. 这说明在肌红蛋白不变性的情况下, 在同样光照下, 温度越高去氧越快. 作为一种方法, 这种实验例子, 显然可以推广应用于各种不同条件下肌红蛋白去氧过程的研究.

3.4.2 通 N_2 的实验

往盛有肌红蛋白溶液的离心管中通 N_2 40 min, 另一个做对照, 以 430 nm 为激发波长, 分别进行荧光光谱扫描, 将两个谱图进行对照, 如图 7 所示. 通 N_2 样品的荧光强度只有不通 N_2 荧光强度的约五分之一, 说明 N_2 可以把肌红蛋白活性中心铁卟啉中的氧脱下来. 这说明可以应用荧光光谱法作肌红蛋白与各种气体相互作用的去氧研究, 有关肌红蛋白与 CO, CO_2, H_2, Cl_2, NO, CS_2 等气体相互作用的详细研究结果将另文报道.

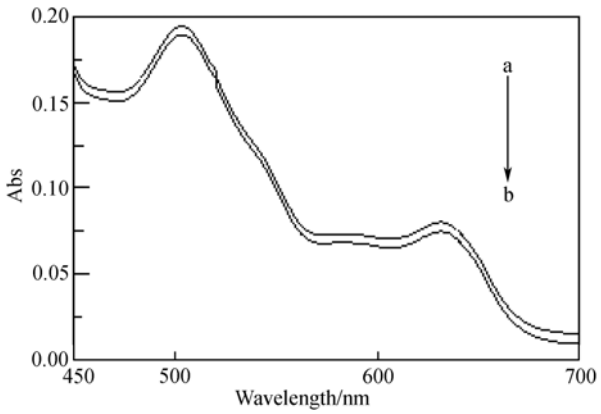


图 5 肌红蛋白溶液的紫外吸收谱图

a: 不照射前; b: 氙灯照射 30 min 后

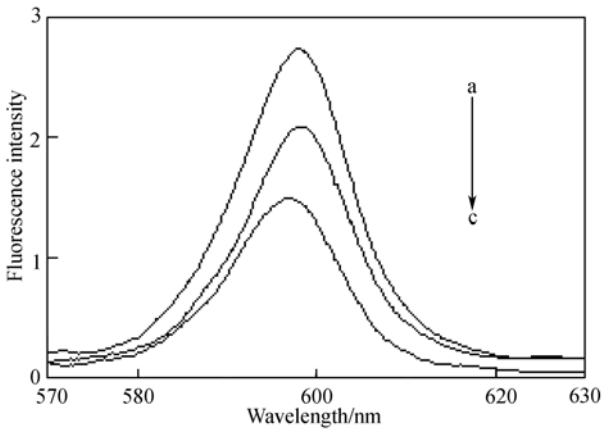


图 6 肌红蛋白溶液在不同温度下荧光差谱图

a: 35℃; b: 14℃; c: 4 ℃

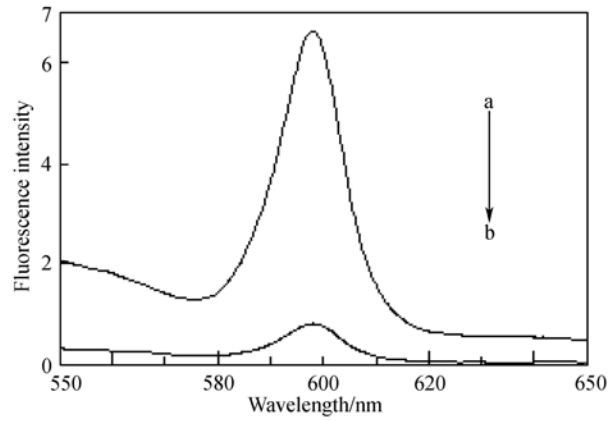


图 7 肌红蛋白溶液通 N_2 的荧光谱图

a: 对照; b: 通 N_2 40 min 后

3.4.3 传能的实验

上述各图都是以 Fe-卟啉基团的 Soret 带的波长 430 nm 为激发波长的, 而光照下所去的氧也正好配位于铁卟啉基团上, 现在改用肌红蛋白中的色氨酸和酪氨酸残基的紫外吸收波长 280 nm 作为激发波长, 得到的荧光光谱图如图 8 所示. 从图中看到, 在

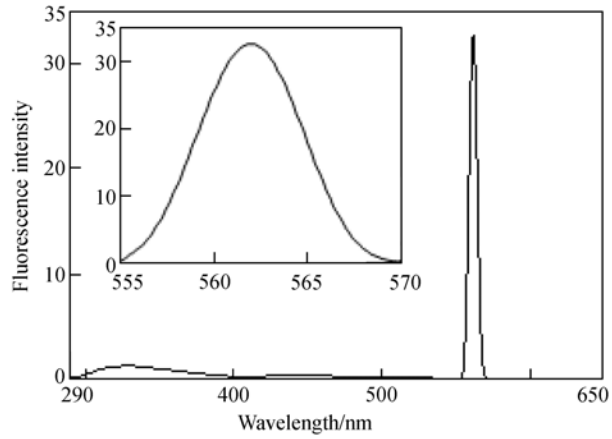


图 8 肌红蛋白溶液的传能实验荧光谱图

激发波长为 280 nm

328 nm 与在 562 nm 处分别出现两个最大荧光发射峰. 328 nm 为肌红蛋白中色氨酸和酪氨酸贡献的, 而 562 nm 处的荧光峰是由铁卟啉基团贡献的, 我们没有以铁卟啉基团的共振吸收光进行激发, 铁卟啉基团没有吸收光子但是却发出了 562 nm 的荧光. 这说明色氨酸和酪氨酸吸收 280 nm 光子生成的激发态, 可以通过激发能转移生成铁卟啉基团激发态, 该激发态回到基态同时放出荧光, 该荧光与铁卟啉基团直接激发所产生的荧光相一致, 但荧光峰发生了蓝移, 很有可能肌红蛋白中的色氨酸和酪氨酸残基在被激发的同时, 使得铁卟啉基团与肌红蛋白的相互作用变得更强, 从而使铁卟啉基团的荧光发生了蓝移, 更确凿的证据还有待进一步深入研究. 由此可以推断, 荧光光谱法可以应用于肌红蛋白中色氨酸和酪氨酸残基与铁卟啉基团之间的激发能转移机理研究, 也可通过激发能转移反应动力学等研究探索肌红蛋白在水溶液中的分子结构.

4 结论

应用荧光光谱法研究了光诱导下肌红蛋白去氧过程, 发现测定方法非常方便、灵敏、谱峰单一容易识别. 认为光照是引起含氧肌红蛋白中铁卟啉基团去氧的主要原因, 光照量越大, 含氧肌红蛋白脱氧量越大; 光照下的温度越高脱氧越快; N_2 可以把肌红蛋白铁卟啉中的配位氧脱下来, 因而有可能用荧光光谱法开展含氧肌红蛋白与各种气体相互作用的去氧研究. 此外, 荧光光谱法还可用作肌红蛋白中色氨酸和酪氨酸残基与铁卟啉之间的激发能转移研究.

参考文献

1 Havel H A. Overview of protein structure and spectroscopic methods. In: Havel H A ed. Spectroscopic Methods for Determining Protein Structure in Solution. New York: VCH, 1996, 1—5

2 张华新, 颜承农, 黄兴, 刘义, 梅平. 小分子配体与蛋白质作用的荧光法研究进展. 化学与生物工程, 2005, 9: 4~6

3 张华新, 黄星, 颜承农, 梅平. 酶催化反应动力学的荧光法研究进展. 化学与生物工程, 2006, 23: 4—6

4 Meuwlya M, Becker O M, Stotea R, Karplus M. NO rebinding to myo globin: a reactive molecular dynamics study. Biophysical chemist ry, 2002, 98 : 183—207[DOI]

5 Schotte F, Lim M, Jackson T A, Smirnov A V, Soman J, Olson J S, Phillps G N, Wulff M, Anfinrud P A. Watching a protein as it functions with 150-pstime-resolved X-ray crystallography. Science, 2003, 300: 1944—1947[DOI]

6 Nollmann M, Etchegoin P. Photoinduced oxygen dynamics in lyophilized hemoglobin. Spectrochimica Acta Part A, 2000, 56: 2817—2829[DOI]

7 Etchegoin P, Liem H, Maher R C, Cohen L F, Brown R J C, Milton M J T, Gallop J C. Observation of dynamic oxygen release in hemoglobin using surface enhanced Raman scattering. Chem Phys Lett, 2003, 367: 223—229[DOI]

8 Lim M, Jackson T A, Anfinrud P A. Ultrafast rotation and trapping of carbon momoxide dissociated from myoglobin. Nat Struct Biol, 1997, 4: 209—214[DOI]

9 Cansgrove T P, Dyer R B. Picosecond structural dynamics of myoglobin following photolysis of carbon monoxide. J Phys Chem, 1996,100: 3273—3277[DOI]

10 Xie X, Simon J D. Protein conformational relaxation following photodissociation of CO fromcarbonmonoxymyoglobin: picosecond circular dichroism and absorption studies. Biochemistry, 1991, 30: 3682—3692[DOI]

11 Dartigalongue T, Hache F. Observation of sub-100ps conformational changes in photolyzed carbonmonoxy-myoglobin probed by time-resolved circular dichroism. Chem Phys Lett, 2005, 415: 313—316[DOI]

12 Esquerra R M, Goldbeck R A, Kim-Shapiro D B, Kliger D S. Spectroscopic evidence for nanosecond protein relaxation after photo dissociation of myoglobin-CO. Biochemistry, 1998, 37: 17527 —17536[DOI]

13 Ansari A, Jones C M, Henry E R, Hofrichter J, Eaton WA. Conformational relaxation and ligand binding in myoglobin. Biochemistry, 1994, 33: 512 8 —5145[DOI]

14 Fleischer E B, Palmer J M, Srivastava T S, Chatterjee A. The rmodynamic and kinetic properties of an iron-porphyrin system. J Am Chem Soc, 1971, 93: 3162—3167