脉冲电场与牛血清白蛋白相互作用的 同步荧光光谱和拉曼光谱比较研究

李乐军,陈树德*,乔登江

华东师范大学光谱学与波谱学教育部重点实验室,华东师范大学物理系,上海 20062

摘 要 应用同步荧光光谱和拉曼光谱研究了脉冲电场与牛血清白蛋白的相互作用。同步荧光光谱研究表 明,脉冲电场对牛血清白蛋白的发射荧光光谱强度产生影响,降低了处于其活性部位的色氨酸和酪氨酸残 基的发射荧光强度。拉曼光谱进一步验证了这种实验结果。两种实验表明:脉冲电场改变了处于牛血清白蛋 白活性中心的芳香族氨基酸所处的微环境,进而表明了蛋白质的构象发生了变化,从而影响它的生物学功 能。

主题词 同步荧光光谱; 拉曼光谱; 脉冲电场(PEF); 牛血清白蛋白(BSA) 中图分类号: 0657.3; 064 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2006)01-0081-05

引 言

电磁场与蛋白质相互作用的研究正越来越引起人们的关 注。1996年, Vema 等^[1] 就用拉曼光谱研究了 50mT 的磁场对 多聚赖氨酸的构象变化。由 Iloyd 提出的同步荧光光谱技术 与普通荧光光谱不同, 通过选择合适的波长差可将在荧光光 谱上相互重叠的荧光峰分开, 在用于研究外部电磁场与其靶 体蛋白质相互作用时, 可以分辨蛋白质色氨酸和酪氨酸残基 的微环境变化^[2]。激光拉曼光谱由于其非破坏性、灵敏度 高、样品用量少以及可以运用于水溶液的研究, 被广泛应用 于生物方面的研究。运用拉曼光谱, 可以得到蛋白质溶液的 各种功能键、氨基酸侧链以及二级结构的信息^[3]。本文运用 同步荧光光谱和激光拉曼光谱研究了脉冲电场与牛血清白蛋 白的相互作用。

1 实验材料和仪器

牛血清白蛋白(BSA)(生化试剂,华美生物工程公司); 三次蒸馏水。

脉冲电场发生装置: ACHV- III型脉冲电场发生仪,(由华 东师范大学物理系生物物理研究室自行设计),产生的脉冲 电场重复频率为 50 Hz(-个脉冲持续时间为 $20 \text{ } \mu_{s})$,上升沿 为 $13 \text{ } \mu_{s}$,脉冲电压峰值 Upp= $3.3 \times 10^4 \text{ V}$ 。

F4500型荧光扫描分光光度计(日本日立公司);法国

- 收稿日期: 2004-08-15, 修订日期: 2005-01-20
- 基金项目: 国家自然科学基金(50137030)和上海市科技发展基金(036105019)资助

Dilor 公司 Rame 1B 显微拉曼光谱仪; 96 孔细胞培养板(Coming Company)。

2 实验方法

2.1 同步荧光光谱

将 BSA 溶解于三次蒸馏水,终浓度为 1 mg mL⁻¹(1.5× 10⁻⁵ mol·L⁻¹)。实验分5 组样品。对照组: BSA 溶液不受脉冲 电场刺激,置于 5 mL 离心管,记为 BSAC。实验组 1~4:将 BSA 溶液 50 µL 接于 4 块 96 孔细胞培养板,然后将培养板置 于脉冲电场下分别刺激 15,30,45 和 60 min,收集于 5 mL 离 心管,分别记为 BSAE15, BSAE30, BSAE45 和 BSAE60。电场 作用在 21 ℃条件下进行。

移取 3 mL 蛋白溶液于 1 cm 石英比色池中,改变发射波 长 λ_{m} 和激发波长 λ_{x} 的波长差 $\Delta\lambda$,使 $\lambda_{m} = \lambda_{x} + \Delta\lambda$,分别 在 $\Delta\lambda$ 为 20 和 60 rm 下测定 5 种 BSA 溶液的同步荧光光谱, 记录各发射峰峰位以及强度。荧光分光光度计的狭缝(带通) 设置为: 5/5 nm,测量在室温下进行。

2.2 拉曼光谱

与晶体拉曼光谱相比较,很难获得理想的蛋白溶液光 谱;与荧光光谱和园二色光谱相比,样品要求的量虽然少得 多,但是对于蛋白浓度的要求还是很高的。经过前期实验的 探索,我们最终选择 400 mg• mL⁻¹作为拉曼光谱测量的浓度, 缓冲液是三次蒸馏水。水的拉曼峰较少,有利于获得理想的 蛋白溶液的拉曼光谱。

作者简介: 李乐军, 女, 1980 年生, 华东师范大学物理系硕士研究生 * 通讯联系人 © 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net 脉冲电场刺激同 2 1 节,只是这里每个样品只接 4 孔, 总量 200 ^µL。

拉曼光谱测量:激发波长为632.8 nm,功率为4.6 mW, 光栅为1.800 lines \cdot cm⁻¹,狭缝宽度为100 µm,扫描范围为200~1.800 cm⁻¹,每次扫描时间为50 s,积分2 次,累加得拉曼 光谱。为了定量地比较各组溶液谱带之间的差异,选择苯丙 氨酸峰(1.004 cm⁻¹)作为归一化因子^[4]。

3 结果与讨论

3.1 脉冲电场与 BSA 相互作用的同步荧光光谱

ISA 是一种荧光较强的蛋白质大分子,分子量为 66 000 道尔顿,含 585 个氨基酸,每个分子 含有 26 个苯丙氨酸 (Phe),19 个酪氨酸(Tyr)和 2 个色氨酸(Trp),这三种氨基酸 都会发荧光。在蛋白质分子内,由 Phe 到Tyr 或 Trp 的能量转 移是非常有效的,因此在大多数情况下,蛋白质所显现出来 的荧光几乎唯一的是色氨酸的荧光^[2],无法将酪氨酸和色氨 酸各自的贡献区分开来,也无法较精细地了解外部脉冲电场 对 BSA 分子构象的影响。但是如果使用同步荧光方法,采用 固定波长同步扫描的方法,就可以明确地分辨 BSA 中的酪氨 酸和色氨酸残基的荧光^[5]。

BSA 中, 2个 Trp 残基位于第 134 位和 212位, 荧光主要 来源于 212 位的 Trp 残基。BSA 分子表面附近有一较大的疏 水区域, 是该蛋白质的活性部位, Trp212 残基就位于该疏水 区附近^[6], 所以, 通过研究同步荧光光谱, 可以知道这种疏 水性较强的氨基酸残基所处的微环境, 从而探测脉冲电场对 BSA 表面疏水性的影响。同时, 通过研究也可以得出酪氨酸 残基所处微环境的变化。

脉冲电场作用不同时间的 BSA 的同步荧光光谱如图 1 所 示,表 1 给出了 $\Delta\lambda$ 为 20 和 60 nm 时的 BSA 同步荧光的各参 数值。

固定激发波长和发射波长的波长差为 20 nm,改变激发 波长在 260~380 nm 范围,同时记录下各发射波长处的荧光 强度,经过作图可以得到五种溶液中 Tyr 荧光光谱^[7][见图 1 (a)]。从图中可以看出,脉冲电场作用没有改变 Tyr 的荧光 峰位,但是减弱了它的荧光强度。随着脉冲电场作用时间的 增加, 荧光强度分别降低为对照组的 88% (BSAE15), 85% (BSAE30), 82% (BSAE45)和 74% (BSAE60)。



Fig 1 Synchronous fluorescence spectra of BSA with different PEF exposure time

(a), $\Delta\lambda=$ 20 nm; (b), $\Delta\lambda=$ 60 nm. 1 to 5: 0, 15, 30, 45 and 60 min-PEF-exposed BSA

当固定 $\Delta \lambda$ = 60 nm 时,同样得到了 5 种 BSA 中 Trp 的荧 光光谱^[7][见图 1(b)]。从图中可以看出,与对照组的 BSA 的 同步荧光光谱相比,脉冲电场作用也没有改变 Trp 的荧光峰 位,但同样减弱了它的荧光强度。随着脉冲电场作用时间的 增加,Trp 的荧光强度分别降低为对照组的 85% (BSAE15), 82% (BSAE30),77% (BSAE45)和 70% (BSAE60)。

以上同步荧光光谱的实验结果初步表明: 脉冲电场猝灭 了 BSA 的芳香氨基酸(Tyr 和 Trp) 的荧光, 从而表明脉冲电

$\Delta \lambda$ / nm	组别	$\lambda_{ m max}$ / nm *	Relative intensity/(a.u.)	$I_{\mathrm{R}}/\left(I/I_{\mathrm{BSAC}}\right)^{**}$	Decrease percentage/ $\%$ * * *
20	BSAC	312	31. 4	1.00	-
	BSAE 15	312	27. 7	0.88	- 11.78
	BSAE 30	312	26. 6	0.85	- 15 29
	BSAE45	312	25. 6	0.82	- 18 47
	BSAE60	312	23. 3	0.74	- 25 80
60	BSAC	349	74. 5	1.00	_
	BSAE 15	349	63. 5	0.85	- 14 77
	BSAE 30	349	60.8	0.82	- 18 39
	BSAE45	349	57. 4	0.77	- 22 95
	BSAE60	349	52. 3	0.70	- 29.80

 Table 1
 Variation of synchronous fluorescence parameters of BSA

* λmax 是指 Δλ= 20 或 60 nm 时 BSA 同步荧光最大发射光谱的峰位;

** I_R 是各实验组 BSA 荧光发射峰的强度与对照组 BSAC 的荧光发射峰的强度的比值;

<u>****(实验组荧光强度,对照组荧光强度)/对照组荧光强度×100%</u>

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

场改变了这两种氨基酸所处的微环境,使它们处于更加"埋 藏"的状态。由于Trp 残基处于这种蛋白质的活性部位,所以 它所处的微环境的改变,会进一步影响这种蛋白质的构象, 从而影响其生物学功能。

3.2 脉冲电场与 BSA 相互作用的拉曼光谱研究

为了进一步验证同步荧光光谱的实验结果,我们对脉冲 电场作用于 ISA 的两种氨基酸的拉曼谱带进行了研究,五种 BSA 溶液的拉曼光谱如图 2 所示,色氨酸和酪氨酸侧链的拉 曼谱带的峰值如表 2 所示。

Table 2	Raman	spectra	of	non-exposed	and	PEF- ex	mosed	BSA
I GOLU A	1 4441114411	DD CC CL CL	•••	non chooca		111 00	a obca	10041

Frequency $(\text{ cm}^{-1})(\text{ Intensity } (\mathbf{a} \mathbf{u})^*)$					
BSAC	BSAC BSAE 15		BSAE30 BSAE45		Assignment
644(2.42)	644(1.85)	643(1.84)	643(1.46)	643(1.23)	Tyr
756(3.22)	756(2 26)	756(1.91)	756(1.55)	759(1.38)	Τp
830(3. 20)	829(2 06)	830(2.03)	830(2.04)	830(2.60)	Tyr
850(3.31)	850(2 51)	852(2.60)	853(2.36)	851(2.65)	Tyr
883(0.93)	883(0 55)	883(1.36)	883(0.64)	883(0.72)	$Trp (N_1H)$
1 004(10)	1 004(10)	1 004(10)	1 005(10)	1 005(10)	Phe
1 338(3.85)	1 339(4.26)	1 340(4.16)	1 340(4. 35)	1 340(4 10)	$Trp Y(CH_2)$
1 357(1.59)	1 357(1.79)	1 357(1.49)	1 356(1.64)	1 357(1.70)	Ттр
1 623(2.62)	1 618(1.63)	1 617(2.34)	1 617(2.36)	1 617(2 57)	Tyr

* 各谱峰强度是以其各自的 1 004 cm⁻¹强度为归一化因子 10,得到的相对强度。





c, BSAE30, d, BSAE45; e, BSAE60

3.2.1 酪氨酸侧链分析

(1) 酪氨酸残基的环境

830和850 cm⁻¹是酪氨酸残基的费米共振谱线^[8],运用 其强度比,可以知道蛋白质分子中的酪氨酸残基的疏水性, 即'暴露"与'埋藏"。如果两者的比值为10:4,说明酪氨酸的 苯环上的羟基的氧原子是一个强的氢键受体;如果比值为10 :8,说明为一个中强度氢键的供体或受体;如果比值为3 10,说明是强氢键的供体;如果比值为7 10,说明苯环的羟 基已经电离了。

通常由方程式 0.5 N_{包埋} + 1.25 N_{暴露} = I_{80}/I_{80} 和 N_{包埋} + N_{暴露} = 1,可以计算包埋在分子内部和暴露于分子表面的酪氨酸残基的克分子数 N^[9]。

五种 BSA 溶液的这 2 个峰的比值以及暴露和包埋的分子数如表 3 所示。可以看出, 5 组 BSA 溶液的酪氨酸苯环的羟基上的氧原子均为中强度氢键的供体或受体。BSA 有 19 个酪氨酸。对照组 BSAC 有 15 个酪氨酸最露。4 个酪氨酸包摆

在分子内部; BSAE15 和 BSAE30 两组几乎全部的酪氨酸暴露 于分子表面; BSAE45 有17个酪氨酸处于分子表面, 2 个包埋 在分子内部; BSAE60 有13 个酪氨酸暴露于分子表面, 有 6 个酪氨酸包埋于分子内部。

所以,可以得出结论:短时间内(30 min 以内),脉冲电 场可以使 ISA 的酪氨酸逐渐暴露于分子表面,而后随着电场 处理时间的增加,又开始包埋到分子内部了。

Table 3	Effects	of	PEF	exposure	on	fermi
---------	---------	----	-----	----------	----	-------

	reson	ance doublet	t of tyrosin	e of BSA	
组别	I 850/ I 830	Ne	N _暴	N _暴 :N _包	
BSAC	1. 10	0.2	08	4	
BSAE15	1. 22	0.04	0.96	24	
BSAE30	1. 28	- 0.04	1.04	-	
BSAE45	1. 16	0.12	0.88	7.33	
BSAE60	1. 02	0.31	0.69	2, 23	

(2) 其他酪氨酸残基峰位研究

644 和 1 615 cm⁻¹来自于酪氨酸侧链¹⁰⁰。从表 2 可以看 出,随着脉冲电场作用时间的增加,644 cm⁻¹处的拉曼强度 有所下降:对照组 BSAC 的强度为 2 42,脉冲电场处理组分 别降低为对照组的 76 45% (BSAE15),76 03% (BSAE30), 60 33% (BSAE45)和 50 83% (BSAE60)。这与用同步荧光光谱 测得的结果是一致的。

对照组 1 615 cm⁻¹处的拉曼峰出现在 1 623 cm⁻¹处,强度 为 2 62,脉冲电场处理组出现在 1 617~1 618 cm⁻¹处,强度 为对照组的 66 21% (BSAE15),89.31% (BSAE30),90.08% (BSAE45)和 98.09% (BSAE60)。

由这些变化可以看出,经脉冲电场作用,BSA 溶液的酪 氨酸残基所处的微环境出现明显变化。

3.2.2 色氨酸侧链分析

氯酸9对照组 BSAC 有 15 个酪氨酸暴露. 4 个酪氨酸包提。 994-2012 China Academic Bounal Electropic Fublishing House. All rights reserved. http://www.chki.net 可以看出,对照组该谱线的强度为 3.22,脉冲电场处理的各 组的强度均有所降低,分别降为对照组的 70.19% (BSAE15), 59.32% (BSAE30),48.14% (BSAE45)和 42.86% (BSAE60),这 一结果也与同步荧光光谱的实验结果相一致。结合拉曼光谱 和同步荧光光谱的实验结果,我们推测 756 cm⁻¹的拉曼谱峰 来源于 212 位色氨酸。

880 cm⁻¹附近的拉曼谱带反应了蛋白质的色氨酸侧链吲 哚环的 N₁H 的氢键的强弱,频率越低,表明氢键越强。如果 出现在 883~ 882 cm⁻¹附近,则表明 N₁H 没有氢键,出现在 871 cm⁻¹处,表明 N₁H 形成了很强的氢键^[11]。从表 2 可以看 出,各组 BSA 溶液均出现在 883 cm⁻¹处,表明它们的色氨酸 残基的 N₁H 均没有形成氢键。

1 340 处和1 360 cm⁻¹处的色氨酸双线是环境亲脂性的标志: 吲哚环与环境中的脂肪类基团之间的亲脂反应会使1 360 cm⁻¹处的峰增强,而1 340 cm⁻¹处的峰减弱^{12]}。但是,由于 CH₂ 的扭曲振动也出现在1 340 cm⁻¹处^[12],可能对分析会造 成影响。然而,由表 3 可以看出,对照组出现在1 357 cm⁻¹ 处,其拉曼强度为1.59,脉冲电场处理组的强度分别为对照 组的 112 58% (BSAE15), 93.71% (BSAE30), 103.14% (BSAE45)和 106.92% (BSAE60)。可以看出,脉冲电场对 BSA

的色氨酸残基的微环境的亲脂性产生了"扰动",但是这种环 境亲脂性的改变并不十分明显。

4 结 论

综合以上实验研究,可以得出以下几个结论:

(1)脉冲电场改变了 BSA 的同步荧光光谱,降低了最大 发射荧光峰的强度,猝灭了两种芳香族氨基酸的内源荧光。 荧光光谱和荧光强度的改变,表明这两种氨基酸所处的微环 境发生了改变,使其更趋向于"包埋"状态。同时,由于 Trp 处于 BSA 的活性部位,Tp 的微环境的改变,必然会影响蛋 白质的构象,从而影响 BSA 的生物学功能。

(2)运用拉曼光谱进一步研究脉冲电场对这两种氨基酸 侧链的影响,发现脉冲电场改变了 BSA 的氨基酸侧链(Trp 和 Tyr)的拉曼光谱强度,从而说明这两种氨基酸侧链微环境发 生了改变,结果与同步荧光光谱相一致。同时,拉曼光谱对 这两种氨基酸所处微环境变化引起的'包埋"状态给出了量化 结果,这对深入研究脉冲电场生物效应的分子机理提供了重 要的实验依据。

85

参考文献

- [1] Verma S P, Goldner R B. Bioelectromagnetics, 1996, 17(1): 33.
- [2] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Method of Fluorescence Analysis(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990.
- [3] ZHENG Shun+xuan(郑顺旋). Laser Raman Spectroscopy(激光拉曼光谱学). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press(上海:上海科学技术 出版社), 1985.
- [4] Tu A T. Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications. New York: Wiley, 1982.
- [5] WEI Xiao-fang, DING Xi-ming, LIU Hui-zhou(魏晓芳,丁西明,刘会洲). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2000, 20(4): 556.
- [6] Effink M R, Zajicek J L, Ghiron C A. Biochim. Biophys. Acta, 1977, 491: 473.
- [7] XIAO Hou-rong, SHENG Liang-quan, SHI Chun-hua, et al (肖厚荣, 盛良全, 施春华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(1): 78.
- [8] Mwindacce N Siamwiza, Richard C Lord, Michael C Chen. Biochemistry, 1975, 14(22): 4870.
- [9] Carig W S, Gaber B. J. Am. Chem. Soc., 1977, 99: 4130.
- [10] Yu N T, Liu C S, O' Shea D C. Journal of Molecular Biology, 1972, 70: 117.
- [11] Kelly L Aubrey, George J Jr. J Biophys., 1991, 60: 1337.
- [12] Chen M C, Lord R C. Journal of American Chemical Society, 1976, 98(4): 990.

Synchronous Fluorescence and Raman Spectroscopy Study on the Interaction of Pulsed Electric Field (PEF) and Bovine Serum Albumin (BSA)

LI Le jun, CHEN Shu de^{*}, QIAO Deng-jiang

Key Laboratory of Optical and Magnetic Resonance Spectroscopy, Department of Physics, East China Normal University, Shanghai 200062, China

Abstract The interaction of pulsed electric field (PEF) and bovine serum albumin (BSA) was studied by synchronous fluorescence and Raman spectroscopy. The results of synchronous fluorescence showed that pulsed electric field exerted its effects on the emission fluorescence spectrum and reduced the fluorescence intensities of the tyrosine and tryptophan side chains. The results of Raman spectroscopy verified this. These two experiments indicated that PEF exposure changed the microenvironments of the two aromatic amino acids, which were located in the active parts of BSA, and further indicated the conformational changes of the proteins, and the change in its biological functions.

Keywords Synchronous fluorescence spectroscopy; Raman spectroscopy; Pulsed electric field; Bovine serum albumin (BSA)

(Received Aug. 15, 2004; accepted Jan. 20, 2005)

* Corresponding author