

德国小蠊变应原 Bla g 2 蛋白变复性的荧光光谱研究

朱健琦¹, 刘志刚^{1*}, 黄海珍², 朱永峰¹, 徐 宏¹

1. 深圳大学生命科学学院, 广东 深圳 518060

2. 中国科学院应用化学研究所电分析化学国家重点实验室, 吉林 长春 130022

摘 要 包涵体中的重组蛋白经抽提后可以在变性状态下纯化, 而纯化后的复性过程是基因工程下游处理的重要环节。通过对变应原 Bla g 2 蛋白复性前后荧光光谱的比较和分析、变性剂(尿素和 SDS)对复性后 Bla g 2 蛋白的荧光滴定实验、以及复性后 Bla g 2 在不同 pH 下的荧光光谱分析, 推断出 Bla g 2 蛋白分子在不同环境下构象的变化及其光谱学特征, 初步建立了一种新的检测重组变应原蛋白变复性的光谱实验方法。

主题词 德国小蠊; 变应原; Bla g 2; 变性; 复性; 荧光光谱

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)12-2254-04

引 言

德国小蠊变应原 Bla g 2 蛋白是一种天冬氨酸酶, 是引起过敏性疾病如过敏性哮喘、过敏性鼻炎、过敏性皮炎及过敏性结膜炎的主要致敏变应原之一。Bla g 2 蛋白由 352 个氨基酸残基组成, 分子量为 38558 道尔顿, 含有 3 个 N 末端糖基化位点。但通过原核表达载体获得的重组蛋白以包涵体的形式存在, 并不具备生物学活性。为获得有活性的蛋白, 需使用变性剂将包涵体溶解, 但同时也破坏了蛋白的构象。由于蛋白质的生物学功能在很大程度上取决于其空间结构和构象, 一个伸展开来或随机排布的肽链是没有生物活性的, 因此需对变性后的蛋白重新进行折叠, 以得到正确构象及具有生物学活性的蛋白。对重组变应原蛋白复性过程中的构象分析, 可检测变应原的复性程度, 了解变应原蛋白结构与其免疫学活性之间的关系。目前对 Bla g 2 蛋白结构的研究主要集中在其晶体结构的分析方面^[1], 对于 Bla g 2 在溶液中的复性过程及其伴随的构象变化和光谱学特征尚未见系统报道。

光谱学方法和生物活性检测是目前重组蛋白折叠研究的主要实验方法^[2]。其中荧光光谱是 20 世纪 70 年代发展起来的用于研究溶液中蛋白质构象的一种有效方法。该方法通过对蛋白质中色氨酸和酪氨酸等发光残基的内源荧光或荧光标记物的外源荧光随自身微环境的改变而变化来推断蛋白质分子构象和结构的变化, 从而进一步阐明蛋白质结构与功能之间的关系^[3]。荧光分析法能提供包括激发光谱、发射光谱以

及荧光强度、量子产率、荧光寿命、荧光偏振等许多光物理信息, 从各个角度反映样品分子的成键和结构情况。该方法具有灵敏性高, 选择性强, 用样量少, 方法简便以及能够提供较多的光物理信息等优点, 已经广泛用于生物大分子的构象研究中^[4, 5]。

本文采用基因工程技术, 在大肠杆菌中表达德国小蠊的重组变应原, 通过亲和层析纯化得到不具有生物学活性的蛋白, 再通过透析复性得到活性 Bla g 2 蛋白。通过荧光光谱进一步来研究 Bla g 2 蛋白变复性前后及其在加入变性剂和不同的酸碱度等不同微环境中的光谱学特征及其变化规律, 初步建立起一种新的检测重组变应原蛋白变复性的光谱实验方法。

1 实 验

1.1 主要试剂与仪器

蛋白质定量试剂盒(Protein assay)购自 Bio-Rad 公司, 其他所用试剂均为分析纯。F-4500 荧光分光光度计(日本日立公司), Perkin Elmer LS 50B 荧光分光光度计。

1.2 实验方法

1.2.1 Bla g 2 蛋白的提取和纯化

用基因工程的方法, 采用质粒 pET24a(+) 为表达载体, 大肠杆菌 BL21 star(DE3) 为宿主菌, 诱导表达, 得到含有 Bla g 2 蛋白的包涵体。包涵体经过分离回收, 变性溶解, 用亲和层析纯化, 得到复性前的 Bla g 2 蛋白, 再通过梯度透析复性, 得到具有生物活性的 Bla g 2 蛋白。

收稿日期: 2005-11-06, 修订日期: 2006-02-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(39860071); 广东省科技重点项目(2003A3080502)和深圳市科技计划项目资助

作者简介: 朱健琦, 1981 年生, 深圳大学生命科学学院在读硕士研究生 * 通讯联系人

1.2.2 荧光实验

将 1 mL 浓度 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的变复性前后 Bla g 2 蛋白溶液置于比色皿中, 以 280 nm 激发光激发后记录 Bla g 2 蛋白在 300~500 nm 之间的发射光谱。激发和发射狭缝均为 5 nm。缓冲液体系是 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0 的 PB 缓冲液。

2 结果与讨论

蛋白质分子中, 含有荧光生色团的氨基酸有色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 及苯丙氨酸 (Phe)。其中 Trp 的荧光强度最大, Tyr 次之, Phe 最小。Bla g 2 是荧光较强的一种蛋白质大分子, 每个分子中有 2 个 Trp, 12 个 Tyr 残基和 22 个 Phe 残基, 这 3 种生色基团都有自己的特征荧光峰, 由于在蛋白质大分子内, 由 Phe 到 Tyr 或 Trp 的能量转移可能是非常有效的, 因此含有这些基团的蛋白质的吸收和发射性质不是这些单体组分光学性质的简单加和, 往往 Trp 残基的荧光占优势地位^[6]。Trp, Tyr 及 Phe 由于其侧链生色基团的不同而有不同的荧光激发和发射光谱。其中 Phe 的最大激发波长位于 257 nm, 由于蛋白质的荧光通常在 280 nm 或更长的波长被激发, 因此 Phe 在绝大多数实验条件下不被激发, 所以很少能观察到 Phe 的发射光谱。这样蛋白质的内源荧光主要来自 Trp 和 Tyr 残基。当在 270~290 nm 激发蛋白质时, 不能忽略 Tyr 残基的贡献, 当激发波长大于 290 nm 时, 可认为荧光仅仅来自于 Trp 残基。

蛋白质中 Trp, Phe 和 Tyr 三种芳香氨基酸残基与其他氨基酸残基相比疏水性较强, 其中 Trp 和 Phe 残基是高度疏水的非极性基团, Tyr 残基是中度疏水基团^[7]。蛋白质分子的表面常被一层亲水残基所包围, 带有疏水侧链的残基原则上处于分子内部。蛋白质结构的特征是疏水-亲水间的平衡, 其结构的稳定在很大程度上有赖于分子内的疏水作用。蛋白质变性的过程就是其内部的疏水性氨基酸逐渐向外暴露的过程, 所以可以借助于疏水性较强的 Trp 和 Phe 残基的微环境变化来预测蛋白质表面疏水性的变化以对其变性过程进行动态研究^[8]。

2.1 Bla g 2 复性前后的荧光光谱

Bla g 2 复性前后的荧光光谱如图 1 和图 2 所示。

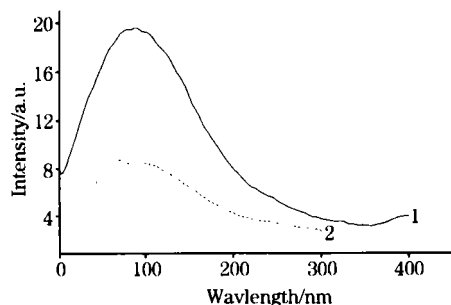


Fig 1 Fluorescence spectra of denatured Bla g 2 excited at different wavelength

1: 280 nm; 2: 295 nm

2 蛋白的荧光发射峰波长为 350 nm, 而复性后 Bla g 2 蛋白的荧光发射峰波长为 343 nm, 与复性前相比发生了明显的蓝移, 这说明复性前后 Bla g 2 蛋白中的 Trp 残基所处微环境有较大变化。复性前 Bla g 2 蛋白中的 Trp 残基的裸露程度较复性后大, 其极性相应地比复性后明显增强, 导致复性后 Bla g 2 的荧光光谱的最大发射峰波长的明显蓝移。当激发波长为 295 nm 时, 蛋白质分子中仅有 Trp 残基被激发并产生荧光。Trp 的荧光发射光谱对周围介质的极性十分敏感, 当极性减弱, 疏水性增强时, 会产生明显的蓝移。实验测得复性前 Bla g 2 蛋白的荧光发射峰波长为 360.5 nm, 而复性后 Bla g 2 蛋白的荧光发射峰波长为 334 nm, 较复性前 Trp 的发射峰位相对蓝移 26.5 nm。根据 Birstern 提出的 3 种基本 Trp 残基微环境的特点^[9], 即: (1) $\lambda_{\text{max}} = 330 \sim 332 \text{ nm}$, 埋藏在非极性区域内, (2) $\lambda_{\text{max}} = 340 \sim 342 \text{ nm}$, 固定在蛋白质分子表面, 且与水的接触受到限制, (3) $\lambda_{\text{max}} = 350 \sim 352 \text{ nm}$, 彻底暴露于水中 (λ_{max} 为荧光发射光谱的峰位)。可以看出在 Bla g 2 复性后, 分子中 Trp 残基与水的接触受到限制, 蛋白质分子的构象向更高级的折叠和卷曲转化, 对应于其复性的蛋白质结构和构象。

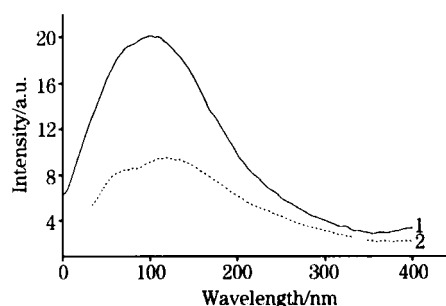


Fig 2 Fluorescence spectra of renatured Bla g 2 excited at different wavelength

1: 280 nm; 2: 295 nm

2.2 尿素和 SDS 对复性后 Bla g 2 蛋白的荧光光谱的影响

为了进一步研究 Bla g 2 蛋白在变复性过程中荧光光谱的变化情况, 我们采用变性剂对复性后的 Bla g 2 蛋白进行变性处理, 通过对 Bla g 2 蛋白的荧光光谱随变性剂的加入而变化情况的分析, 进一步研究 Bla g 2 蛋白变复性的荧光光谱特征。蛋白质的变性剂有多种, 其中常用变性剂盐酸胍对蛋白质荧光光谱的影响已经有文献报道^[8, 10], 本研究采用的是另外两种常见的变性剂, 尿素和十二烷基酸钠 (SDS)。

2.2.1 尿素对复性后 Bla g 2 蛋白的荧光强度的影响

尿素通过离子间的相互作用, 打断包涵体蛋白质分子内和分子间的各种化学键, 使多肽伸展。相对于 SDS, 尿素是一种较弱的变性剂。低浓度的尿素 (对于 Bla g 2 来说, 低于 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对蛋白的变性能力很小, 当去除尿素后, 蛋白可以复性, 随着尿素浓度的增加, 它对蛋白的变性能力也会增强, 因此不同浓度的尿素对 Bla g 2 的变性程度不同。

图 3(a) 为不同浓度梯度的尿素对 Bla g 2 蛋白荧光光谱的影响。实验结果表明蛋白的荧光强度随着尿素浓度的升高而逐渐降低, 当尿素的浓度达到 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 荧光强度趋

实验结果表明, 当激发波长为 280 nm 时, 复性前 Bla g

于稳定; 到达 $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Bla g 2 蛋白完全变性, 相对荧光强度由不加尿素时的 12.73 降到 6.973。说明经过尿素变性后, 多肽链的结构松散。发射峰的荧光强度逐渐下降, 说明 Bla g 2 复性后形成的结构趋于更加稳定的状态, 而加入变性剂后, 使蛋白的疏水部分处于运动不定的状态, 即三维结构仍然没有序化, 在完全去折叠的基础上又开始折叠, 因而荧光强度发生动态猝灭^[11]。从荧光发射光谱与尿素浓度的关系[见图 3(b)] 来看, 尿素对维系 Bla g 2 蛋白的空间结构的次级键的破坏是一个弱协同的过程, 基本符合蛋白质变性的“二态模型”^[12]。另外, 变性后蛋白荧光发射峰的波长发生明显的红移, 由不加尿素时的 338 nm 红移到 345 nm。

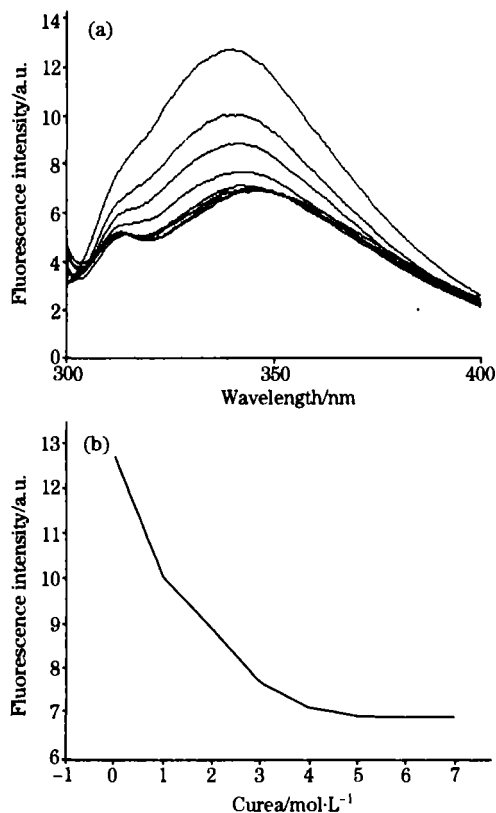


Fig 3 Effects of various urea concentration

(a): Different fluorescence spectra of renatured Bla g 2, urea concentration ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8, from top to bottom, respectively ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$); (b): Effects of urea concentration on the fluorescence intensity of Bla g 2

2.2.2 SDS 对复性后 Bla g 2 蛋白的荧光强度的影响

SDS 是一种表面活性剂, 具有很强的变性能力。在蛋白溶液中, SDS 的带电荷基团与蛋白质表面所带相反电荷结合, 破坏蛋白质分子内的疏水作用, 使蛋白发生去折叠, 非极性基团暴露于介质中, 从而引起蛋白三、四级结构解体。

图 4(a) 为不同浓度梯度的 SDS 对 Bla g 2 蛋白荧光光谱的影响。实验结果表明蛋白的荧光强度随着 SDS 浓度升高而降低。当 SDS 浓度在 $0.001\% \sim 0.01\%$ (ρ) 之间时, 荧光强度缓慢降低, 而当 SDS 浓度升高至 0.02% 时, 荧光强度骤然大幅度降低。当 SDS 浓度达到 0.03% 时, 蛋白已完全变性, 蛋白的发射峰已检测不到。

图 4(b) 表明, SDS 使 Bla g 2 蛋白变性的过程与尿素不同。在高浓度尿素的强碱性环境下, 蛋白处于完全去折叠状态。而用 SDS 作为变性剂时, 当变性剂浓度较低时蛋白处于一种不完全变性的中间体状态, 而在变性剂浓度很高时达到完全变性, 处于肽链完全展开的状态。图 4(b) 中出现的缓变区(荧光强度在 11 左右)即对应于蛋白折叠过程中出现的中间体。

因此, 通过蛋白变性过程中的荧光光谱发射峰的位置及其强度的分析与比较, 可以初步判断蛋白在变性过程中的构象变化, 并进一步判断蛋白折叠的途径与程度。

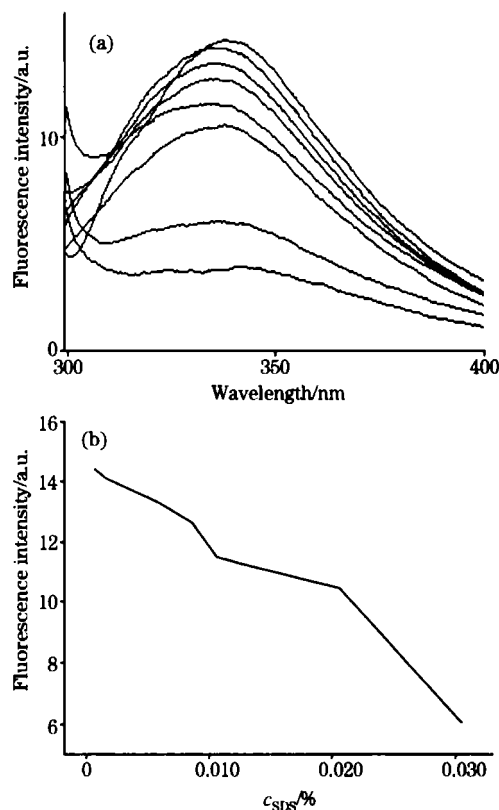


Fig 4 Effects of various SDS concentration

(a): Different fluorescence spectra of renatured Bla g 2, SDS concentrations ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0; 0.001 ; 0.005 ; 0.008 ; 0.01 ; 0.02 ; 0.03 ; 0.05 , from top to bottom, respectively ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$); (b): Effects of SDS concentration on the fluorescence intensity of Bla g 2

2.3 复性后的 Bla g 2 在不同 pH 条件下的荧光光谱实验

复性后 Bla g 2 蛋白在不同 pH 条件下的荧光光谱强度如图 5 所示。当溶液 pH 偏酸或偏碱时, 蛋白质的荧光强度都下降很快, 这是由于 Bla g 2 蛋白的活性降低引起的, Bla g 2 蛋白溶液的最合适的 pH 值在 6.0 左右, 此时蛋白质的结构最为稳定。

随着 pH 值降低, Bla g 2 的荧光发射峰位发生蓝移, 表明 Trp 微环境的疏水性增加, 荧光强度的下降是酸诱导蛋白质分子伸展, 降低了芳香氨基酸残基间的能量传递, 使 Trp 残基荧光强度降低。在实验范围内, pH 6.0 左右, BSA 的荧光强度最大, 且比较稳定, 这是由于在等电点附近, 蛋白质分子结构相对紧密, 由 Phe 残基和 Tyr 残基向 Trp 残基的能

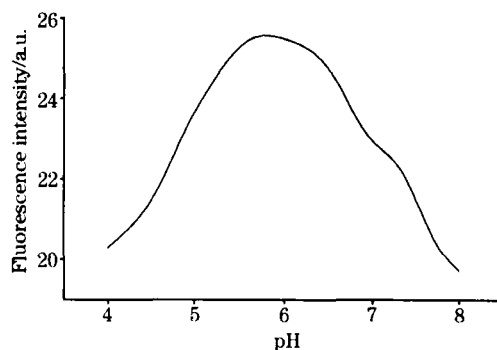


Fig 5 Fluorescence spectra of renatured Bla g 2 at different pH

(λ_{ex} = 280 nm; λ_{em} = 338 nm)

量转移是非常有效的。提高 pH 直到大于 8 时, 荧光发射强度显著减弱, 主要是由于解离后 Tyr 残基自身的荧光消失, 且阴离子状态的 Tyr 残基猝灭了 Trp 残基的荧光^[7]。

3 结 论

通过对变应原 Bla g 2 蛋白复性前后荧光光谱的比较和分析、不同变性剂(尿素和 SDS)对复性后 Bla g 2 蛋白的荧光滴定实验、以及复性后 Bla g 2 在不同 pH 下的荧光光谱分析, 得到了 Bla g 2 蛋白分子在不同环境下构象的变化及其光谱学特征, 以及 Bla g 2 蛋白结构保持稳定的最适 pH 值。反之, 可以通过 Bla g 2 蛋白荧光光谱的特征判断重组变应原蛋白变性过程中的构象变化以及变复性的程度。初步建立了一种新的检测重组变应原蛋白变复性的光谱实验方法。

参 考 文 献

- [1] Alla G, Mi L, Sabina W. J. Mol. Biol., 2005, 348: 433.
- [2] Jaenicke R. In: Creighton T E. ed. Protein Structure: A Practical Approach, IRL, 1989.
- [3] XU Ming bo, MENG Wen hua, MA Xian kai (徐明波, 孟文华, 马贤凯). Chinese Biochemical Journal (生物化学杂志), 1994, 10(3): 376.
- [4] FU Ya zhen (傅亚珍). Acta Biophysica Sinica (生物物理学报), 1995, 11(3): 295.
- [5] YAN Yuan, XU Jin gou, CHEN Guo zhen (鄢 远, 许金钩, 陈国珍). Science in China (中国科学), 1997, 27(1): 16.
- [6] CHEN Guo zhen, HUANG Xian zhi, ZHENG Zhu zi, et al (陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorescent Analytical Method (荧光分析法). Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 1990. 131.
- [7] 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.
- [8] ZHANG Jing (张 静). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2004, 24(4): 455.
- [9] Burstein E A, Vedenkina N S, Ivkova M N. Photobio., 1973, 8: 267.
- [10] Guo Q, Zhao F, Guo Z. J. Biochem., 2004, 136(1): 49.
- [11] WANG Fan, ZHOU Hai meng (王 帆, 周海梦). Progress in Natural Science (自然科学进展), 1995, 5(2): 216.
- [12] ZHOU Cheng-lu (邹承鲁). Second Genetic Code Study of New Synthesis Peptide and Protein Folding (第二遗传密码—新生肽链及蛋白质折叠研究). Changsha: Hunan Science and Technology Press (长沙: 湖南科学技术出版社), 1997. 51.

Study of Fluorescence Spectra of Blattella Germanica Allergen, Denatured and Renatured Bla g 2

ZHU Jiar qi¹, LIU Zhi gang^{1*}, HUANG Hai zhen², ZHU Yong feng¹, XU Hong¹

1. College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

2. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China

Abstract Recombinant proteins extracted from inclusion body remain in denaturation status. Renaturation *in vitro* after initial purification is a key step of downstream processing. A common method of renaturation of recombinant proteins is the dilution method. With Bla g 2 as a model protein, the conformational changes of denatured and renatured Bla g 2 were investigated by applying fluorescence spectra. The effects of different urea concentrations, different SDS concentrations and different pH on the fluorescence intensity of renatured protein were also investigated. The reasons for these were studied with the knowledge of molecular structure.

Keywords Blattella germanica; Allergen; Bla g 2; Denaturation; Renaturation; Fluorescence spectra

* Corresponding author

(Received Nov. 6, 2005; accepted Feb. 20, 2006)