

光谱法对照研究肌红蛋白及其突变体 Mb(D60K) 与 H₂O₂ 的相互作用

职秋艳^{1,2}, 唐 乾^{1,2}, 曹洪玉^{1,2}, 安良梅², 张莹莹², 郑学仿^{1,2*}

1. 大连大学, 辽宁省生物有机化学重点实验室, 辽宁 大连 116622

2. 大连大学生物工程学院, 辽宁 大连 116622

摘要 为了解肌红蛋白(Mb)表面 60 位天冬氨酸(Asp)突变为赖氨酸(Lys)后对蛋白结构稳定性的影响, 本文通过紫外-可见吸收光谱、荧光光谱和停流荧光光谱对照研究了模拟生理条件下野生型肌红蛋白 Mb(WT)及其突变体 Mb(D60K)与过氧化氢(H₂O₂)的相互作用。结果表明: 在 Mb(D60K)与 H₂O₂ 发生相互作用过程中, 铁卟啉部位的紫外和荧光发射光谱数据与 Mb(WT)相比, 性质与功能均表现出显著差异。虽然只有一个氨基酸的改变, 但其结构和性质发生明显变化, 说明 60 位氨基酸在稳定蛋白结构中有重要的作用。同步荧光光谱和停流光谱的结果同样表明 Mb(D60K)的结构与功能受 H₂O₂ 的影响较小, Mb(WT)受 H₂O₂ 影响明显。综合分析表明, Mb(D60K)在与 H₂O₂ 相互作用过程中, 蛋白结构稳定性提高。

关键词 肌红蛋白; Mb(D60K); 过氧化氢; 光谱法; 蛋白结构

中图分类号: O433.4 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)09-2512-05

引言

特定位点氨基酸的改变对蛋白结构与功能有着重要的影响, 为了能够更清楚的了解肌红蛋白(Mb)的活性位点和结构域的功能, 基因工程和化学修饰手段被广泛用于该研究领域^[1]。王静云等报道马心肌肌红蛋白突变体 Mb(D44K)增强了 Mb 的耐热、耐酸变性能力。Raffaella Roncone^[2] 等将 Mb(T67R/S92D)与原血红素-L-组氨酸甲酯重建, 得到稳定的衍生物 T67R/S92D-H, 经过配体结合实验发现, T67R/S92D-H 比 Mb(WT)对叠氮化物和咪唑有更强的亲和力; 当有酚类底物存在时, 具有更强的拟过氧化氢酶活性。Lloyd 等^[3] 将马心 Mb 血红素结合腔中处于亚铁血红素(heme)远端的 Val68 用组氨酸进行了替换, 得到的突变体蛋白 Mb(V68H)具有低自旋双组氨酸(bis-His)配位的血红素辅基(His68/His93), 使得 Mb(V68H)具有了类似细胞色素 b₅ 的光谱学与生物电化学的性质和功能, 这是野生型 Mb 所不具备的。长期以来人们认为蛋白表面的氨基酸残基暴露在溶剂中, 对蛋白的稳定性影响甚微, 但最近几年研究成果对这一观念提出了质疑, 发现蛋白表面带电氨基酸残基对蛋白的稳定性及性质具有非常大的影响, 从而开辟了通过优化蛋白表

面电荷与电荷的作用来调节蛋白结构稳定性及功能的新思路^[4]。

Mb 是由一条肽链组成的含血红素的储氧蛋白, 由于 Mb 血红素辅基的存在, 其可以催化 H₂O₂ 分解为 H₂O 和 O₂。在没有底物存在的条件下与 H₂O₂ 形成稳定的过氧化氢复合物(Cpd II)^[5]。作为一种模型蛋白, H₂O₂ 对 Mb 结构与功能的影响以及其与 H₂O₂ 的作用机制一直是科研工作者的研究热点^[6]。

本文中以野生型肌红蛋白基因为模板^[7], 通过 PCR 定点突变方法将肌红蛋白第 60 位天冬氨酸 Asp(D)突变为赖氨酸 Lys(K), 经热激转化到大肠杆菌 BL21 中, 进行高效表达, 得到表达产物经过分离纯化, 获得突变体 Mb(D60K)用于其结构和功能的研究。

本实验室在研究中发现 Mb(D60K)在与表面活性剂相互作用的过程中其稳定性有很大程度的提高^[8], 为进一步研究表面氨基酸在蛋白结构稳定性中发挥的作用, 本文对照研究了 H₂O₂ 对 Mb(WT)和 Mb(D60K)结构稳定性及功能的影响。

1 试剂与仪器

Mb(WT)样品(美国 Sigma 公司), 使用时配制成 1×

收稿日期: 2010-11-30, 修订日期: 2011-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(20871024), 辽宁省优秀人才培养计划项目(RC-04-10), 辽宁省高校创新团队项目(2006T002, 2008T005, 2009T003), 辽宁省教育厅项目(2009A069)和大连市科技计划项目(2008E11SF170)资助

作者简介: 职秋艳, 女, 1984 年生, 大连大学生物工程学院硕士研究生 e-mail: dlzhiqy@163.com

*通讯联系人 e-mail: dlxfzheng@163.com

$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液; Mb(D60K) 通过微生物法培养含有 Mb(D60K) 基因的大肠杆菌提取获得, 实验前稀释为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液; 过氧化氢 (H_2O_2 , 质量分数大于等于 30%), 稀释为 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (紫外测 240 nm 处的吸光度, $\epsilon_{240 \text{ nm}} = 39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [9]); 缓冲溶液为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.40), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (分析纯); 以上试剂均置于冰箱中 (4°C) 保存; 实验用水为超纯水。

SFM-300 停流仪 (法国 BioLogic 公司), J-810 型圆二色分光光谱仪 (日本 Jasco 公司), FP-6500 荧光-磷光光谱仪 (日本 Jasco 公司), V-560 型紫外-可见分光光谱仪 (日本 Jasco 公司), PHSJ-4A 型实验室 pH 计 (上海雷磁分析仪器厂), F12-ME 型制冷和加热循环器 (德国 Julabo 公司), Gilson 可调式移液器 (法国)。

2 实验方法

2.1 紫外-可见吸收光谱

取 2 mL Mb(WT) 溶液加入比色池中, 用微量注射器依次加入定量的 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 溶液 (累积体积小于 $50 \mu\text{L}$), 混匀, 避光作用 10 min 后, 以磷酸缓冲液为参比, 记录 Mb(WT) 与 H_2O_2 相互作用的紫外吸收光谱, Mb(D60K) 与 H_2O_2 相互作用的紫外吸收光谱测定步骤同上。

2.2 同步荧光光谱

同步荧光光谱一般是指同时扫描激发和发射波长, 而保持两者有一个固定波长差 λ 时所得的荧光光谱[10]。当 $\lambda = 20 \text{ nm}$ 时, 同步荧光光谱仅显示酪氨酸残基的荧光特性; 当 $\lambda = 60 \text{ nm}$ 时, 同步荧光光谱仅显示色氨酸残基的荧光特性[11]。设置波长差为 20 nm, 在比色池中加入 2 mL 的 Mb(WT) 溶液, 用微量注射器依次加入定量的 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 溶

液, 混匀, 避光作用 10 min 后, 记录 260~400 nm 的荧光光谱。Mb(D60K) 与 H_2O_2 相互作用的同步荧光光谱测定步骤同上。再以同样的方法记录波长差为 60 nm 时, Mb(WT) 和 Mb(D60K) 与 H_2O_2 相互作用的同步荧光光谱; 以同样的方法检测当激发波长为 430 nm 时的荧光光谱图的变化。

2.3 停流-荧光光谱

Mb(WT) 和 H_2O_2 分别被装在 S_3 和 S_2 中, 设定激发波长为 409 nm, 通过微机控制气动泵将不同体积的反应物溶液 (控制反应物的浓度比) 迅速推入光信号检测室进行荧光信号检测。温度控制采用制冷和加热循环器, 其他步骤同上。不同浓度、温度条件下, Mb(D60K) 与 H_2O_2 相互作用的测定步骤同上。

3 结果与讨论

3.1 Mb(WT) 和 Mb(D60K) 的紫外-可见光谱

随着 H_2O_2 的逐渐加入, Mb(WT) 和 Mb(D60K) 在 409 nm 处的特征峰均发生红移, Mb(WT) 移至 421.5 nm 处, 而 Mb(D60K) 位移至 421 nm 处。421.5 nm 处是过氧化氢复合物 (高价血红素蛋白, Cpd II) 的特征峰[6], 即当 Mb(WT) 和 Mb(D60K) 与适量 H_2O_2 发生作用后, 均形成 Cpd II。在 Mb(WT) 溶液中, 当 H_2O_2 的浓度达到 $3.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 (H_2O_2 与 Mb(WT) 的摩尔浓度比为 5 : 1), 421.5 nm 处的特征峰已经出现, 继续增加 H_2O_2 的浓度, 峰位置不再移动; 而在 Mb(D60K) 溶液中, 当 H_2O_2 的浓度为 $4.48 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 (H_2O_2 与 Mb(D60K) 的摩尔浓度比为 7 : 1), 421 nm 处特征峰才出现, 说明突变后的蛋白结构更加稳定。

3.2 Mb(WT) 和 Mb(D60K) 卟啉部位的荧光发射谱

图 1 是 Mb(WT) 和 Mb(D60K) 与 H_2O_2 相互作用的荧光光谱的变化, 激发波长为 430 nm (铁卟啉在 Soret 带的吸

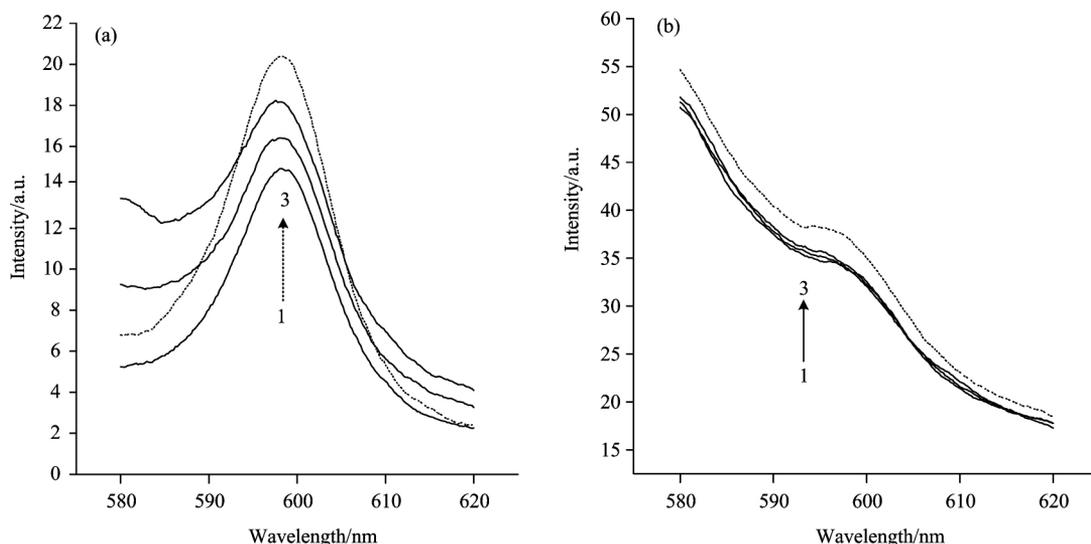


Fig 1 Emission spectra of Mb(WT) and Mb(D60K) interacting with hydrogen peroxide. The dashed line shows the fluorescence spectra of myoglobin without adding H_2O_2

(a): $[\text{Fe}^{3+}] = 0.60 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in Mb(WT), 1-3, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1.20, 2.40, 6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 (b): $[\text{Fe}^{3+}] = 0.64 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in Mb(D60K), 1-3; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1.28, 2.56, 6.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

收), Mb(WT)和 Mb(D60K)均在 597 nm 处出现最大荧光发射峰。本实验室在前期的工作中发现, 氙灯照射可使与卟啉结合的氧去掉, 导致 597 nm 处的荧光强度急剧降低^[12, 13]; 在本实验中, 对于 Mb(WT), 在没加入 H_2O_2 之前, 其荧光强度为 20.47, 当加入 H_2O_2 与蛋白比例 2:1 时, 597 nm 处的荧光强度减少为 14.93, 比之不加 H_2O_2 的减少速率减慢, 随着 H_2O_2 的逐渐加入, 荧光强度呈增加趋势, 说明 H_2O_2 分解产生的单线态氧与 Mb 卟啉环上的 Fe 结合, 使荧光强度逐渐增加, 但不会增加至初始状态; 对于 Mb(D60K), 虽然其荧光强度一样会下降, 但是下降幅度较小, 随着 H_2O_2 的增加, 597 nm 处的荧光强度维持在相对稳定的范围之内。

3.3 Mb(WT)和 Mb(D60K)的同步荧光光谱

同步荧光光谱具有简化光谱、窄化谱带、减小光谱重叠和减小散射光等优点^[10], 且可以分别检测到酪氨酸残基和色氨酸残基的荧光发射光谱, 已经被大量用于判断蛋白质构象的变化^[12]。如图 2 所示, (a)为 $\Delta\lambda=20$ nm 时 Mb(WT)酪氨酸残基的荧光光谱特征, 其最大荧光发射峰在 311 nm 处,

荧光强度为 100.1, 随着 H_2O_2 浓度的不断增加, 荧光强度逐渐增大, 当 H_2O_2 的浓度超过 $3.6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时(即 H_2O_2 与 Mb(WT)的摩尔比超过 6:1 时), 荧光强度趋于一个极值, 不再发生明显变化, 峰位一直没有发生变化; (c)为 $\Delta\lambda=60$ nm 时 Mb(WT)色氨酸残基的荧光光谱特征, 340 nm 为其最大荧光发射峰, 荧光强度为 144.2, 随着 H_2O_2 的不断加入荧光峰强度逐渐增大, 峰位发生略微的红移, 说明在 Mb(WT)与 H_2O_2 相互作用过程中, 使得色氨酸残基处于更加“暴露”的状态中, 对环境的疏水性减弱, 极性增强; (b)和 (d)分别为 $\Delta\lambda=20$ nm 和 $\Delta\lambda=60$ nm 时 Mb(D60K)的同步荧光光谱图, 其最大荧光发射峰同样分别出现在 311 和 340 nm 处, 荧光强度为分别为 479.6 和 960.5, 随着 H_2O_2 浓度的不断增加, 峰位置和强度均未发生明显的变化。通过同步荧光光谱对酪氨酸残基和色氨酸残基受周围环境影响的考察, 我们更进一步的证明当蛋白第 60 位的 Asp 突变为 Lys 以后, 蛋白表面电荷发生改变, H_2O_2 可以更容易到达作用位点, 而对蛋白的结构几乎不产生影响。

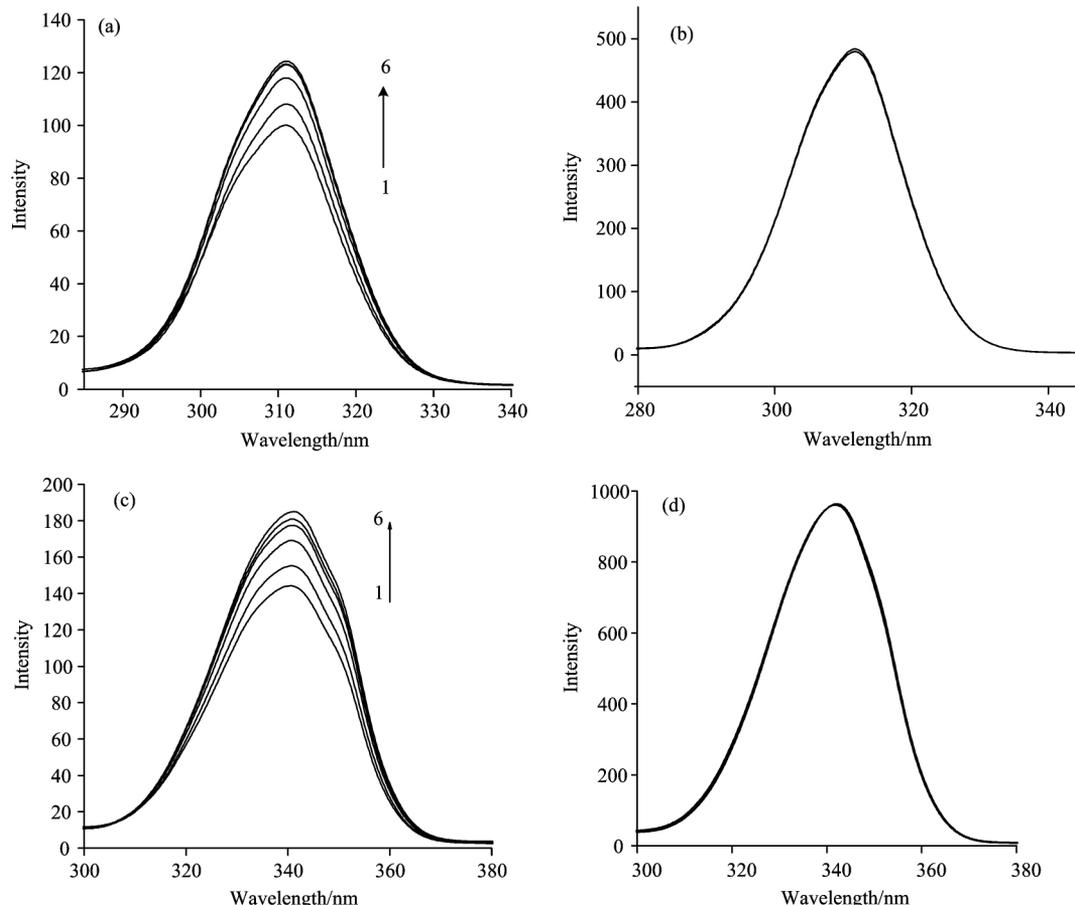


Fig 2 Synchronous fluorescence spectra(260~360 nm) of Mb(WT)[(a), (c)] and Mb(D60K)[(b), (d)] interacting with hydrogen peroxide, $\Delta\lambda=20$ nm [(a) and (b)]; $\Delta\lambda=60$ nm [(c) and (d)]

(a), (c): 1-6: $[H_2O_2]=0, 1.2, 2.4, 3.6, 4.8, 6.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[Mb(WT)]=0.60 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (b): $[H_2O_2]=0, 2.56, 3.84, 6.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (d): $[H_2O_2]=0, 2.56, 6.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[Mb(D60K)]=0.64 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

3.4 Mb(WT)与 Mb(D60K)的在线-停流荧光光谱

利用在线-停流荧光光谱技术对不同温度和浓度条件下

Mb(WT)和 Mb(D60K)与 H_2O_2 相互作用的过程进行研究。由于在本实验过程中 $c(H_2O_2) \gg c(Mb)$, 因此该反应为准一

级反应, 对实验曲线用停流软件(Bio-Logic3. 2)按方程(1)在 $i=2$ 时拟合较好, 即该总反应是二步反应。

$$Y(t) = at + b + \sum_{i=1}^N c_i \exp(-k_i t) \quad (1)$$

式中, Y 为仪器检测值(电压), t 为时间, a 为斜率(slope), b 为截距(offset), c_i 为振幅(amplitude), k_i 是反应速率常数。最终确定 H_2O_2 与 Mb(WT) 与 Mb(D60K) 均属于二步反应, 进一步验证了蛋白与 H_2O_2 相互作用过程中, 先生成中间产物 Cpd I (Fe(IV)=O/porphyrin π -cation radical), 在缺少底物的条件下, 最终生成一个较长寿命, 且相对稳定的高铁血红素, 即 Cpd II; 随着反应温度的升高, k_1 和 k_2 均逐渐增大。不同温度下以 H_2O_2 和蛋白浓度比为 500:1 反应, 根据 Arrhenius 方程, $k = Ae^{-E_a/RT}$ (其中 E_a 为反应活化能, A 为指前因子, R 为摩尔气体常数, T 为开尔文温度), 以 $\ln k$ 对 $1/T$

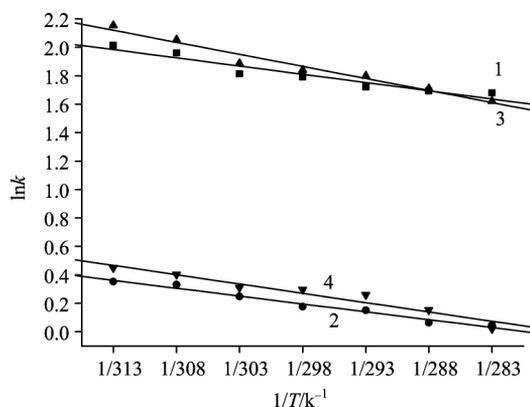


Fig 3 Effect of temperature on the formation process of Mb (WT) and Mb(D60K) interacting with hydrogen peroxide

(1): k_1 of Mb(WT) interacting with hydrogen peroxide; (2): k_2 of Mb(WT) interacting with hydrogen peroxide; (3): k_1 of Mb(D60K) interacting with hydrogen peroxide; (4): k_2 of Mb(D60K) interacting with hydrogen peroxide

作图, 如图 3 所示, 对于 Mb(WT) 与 H_2O_2 相互作用的过程, 得到 k_1 的回归曲线方程为 $\ln k = 2.04164 - 0.05788/T$, 相关系数 r 为 -0.95893 , k_2 的回归曲线方程为 $\ln k = 0.41706 - 0.05526/T$, 相关系数 r 为 -0.98907 。对于 Mb(D60K) 与 H_2O_2 相互作用的过程, 得到 k_1 的回归曲线方程为 $\ln k = 2.20435 - 0.08467/T$, 相关系数 r 为 -0.98343 , k_2 的回归曲线方程为 $\ln k = 0.53264 - 0.06548/T$, 相关系数 r 为 -0.97 。由于 E_a/R 即为图 3 中直线的斜率, 而 $R = 8.314510 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, 可计算 Mb(WT) 和 Mb(D60K) 与 H_2O_2 相互作用过程的活化能 $E_{a1\text{Mb(WT)}}$, $E_{a2\text{Mb(WT)}}$, $E_{a1\text{Mb(D60K)}}$, $E_{a2\text{Mb(D60K)}}$ 分别为 0.481244 , 0.459460 , 0.703990 , $0.544434 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。一般情况下, 活化能越高, 活化分子就越多, 反应难度越大。通过比较活化能数据可知, Mb(D60K) 和 H_2O_2 反应难于 Mb(WT); 而前面的荧光光谱数据显示在反应过程中, 突变体蛋白的氨基酸部位光谱变化小, 说明整个突变体的结构更加稳定。

4 结 论

Mb(WT) 和 Mb(D60K) 与 H_2O_2 相互作用过程中铁卟啉的紫外-可见吸收光谱显示, Mb(D60K) 与 H_2O_2 作用生成 Cpd II 的速率要慢于 Mb(WT); 荧光光谱数据表明, 随着 H_2O_2 的加入, 铁卟啉在 597 nm 处的峰强度逐渐减弱, 但是与 Mb(WT) 相比 Mb(D60K) 更容易达到稳定状态。同步荧光光谱和 CD 光谱结果显示, 肌红蛋白 60 位氨基酸的改变使得蛋白的作用部位可以更直接与 H_2O_2 发生作用, 而对蛋白结构的影响很小; 停流-荧光实验中 Mb(D60K) 与 H_2O_2 的相互作用过程中的活化能高于 Mb(WT)。综合数据表明, 由于 60 位 Asp 突变为 Lys, 使得蛋白表面电荷发生改变, H_2O_2 可以更直接到达活性位点与蛋白发生作用, 而对蛋白的结构基本不产生影响, 进而证明 Mb(D60K) 的结构稳定性提高, 经分析认为此种现象是由于突变后的蛋白表面电荷和蛋白的三维结构发生变化而造成的影响, 这在蛋白仿生学和蛋白药理学研究中具有重要的意义。

References

- [1] Ozaki S, Roach M P, Matsui T, et al. Accounts of Chemical Research, 2001, 34: 818.
- [2] Raffaella R, Enrico M, Monica M. Biochemistry, 2004, 377: 717.
- [3] Lloyd E, Tu K M, Mauk A G, et al. American Chemical Society, 1995, 117: 6434.
- [4] Marshall S A, Morgan C S, Mayo S L. Journal of Molecular Biology, 2002, 316: 189.
- [5] Egawa T, Yoshioka S, Takahashi S, et al. Biology Chemistry, 2003, 278: 41597.
- [6] Shiga T, Imaizumi K. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1975, 167: 469.
- [7] Hoffman B M, Celis L M, Cull D A, et al. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102: 3564.
- [8] LI Yi-wen, CAO Hong-yu, TANG Qian, et al(李宜雯, 曹洪玉, 唐 乾, 等). Acta Physical-Chemistry(物理化学学报), 2010, 26(6): 1687.
- [9] Kanner J, Harel S. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1985, 237: 314.
- [10] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, XU Jin-gou(陈国珍, 黄贤智, 许金钧). Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second Edition (荧光分析法, 第 2 版). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 201.
- [11] Trynda-Lemiesz L, Karaczyn A, Keppler B K. Inorganic Biochemistry, 2000, 78(4): 341.
- [12] Zhu Changqing, Zhao Danhua, Chen Jinlong. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, 378: 811.

- [13] MA Jun-yan, ZHENG Xue-fang, GUO Ming, et al(马君燕, 郑学仿, 郭明, 等). Science in China Series B-Chemistry(中国科学, B辑-化学), 2008, 38(1): 55.

Comparison between Myoglobin and Its Mutant(D60K) Interacting with Hydrogen Peroxide by Spectrum

ZHI Qiu-yan^{1,2}, TANG Qian^{1,2}, CAO Hong-yu^{1,2}, AN Liang-mei², ZHANG Ying-ying², ZHENG Xue-fang^{1,2*}

1. Liaoning Key Lab of Bioorganic Chemistry, Dalian University, Dalian 116622, China

2. College of Bioengineering, Dalian University, Dalian 116622, China

Abstract To characterize the roles played by surface-charged residue Asp60 in the structure stability of myoglobin when it was replaced with Lys, the interaction of myoglobin[Mb(WT)] and its mutant[Mb(D60K)] with hydrogen peroxide (H_2O_2) were studied by the method of ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy and stopped-flow fluorescence spectroscopy under simulative physiological conditions. There are remarkable differences between Mb(D60K) and Mb(WT) in the UV-Vis absorption spectroscopy and fluorescence spectroscopy of iron porphyrin during the process of interaction. Although we only altered one external amino acid, the data showed that the function and structure stability of Mb(D60K) was greatly changed. Furthermore, results from synchronous fluorescence spectroscopy and stopped-flow fluorescence spectroscopy all indicated that H_2O_2 had less effect on the structure of Mb(D60K) while the structure of Mb(WT) was notably changed. From a comprehensive and comparative data analysis, the authors determined that the structure of Mb(D60K) was improved when it interacted with H_2O_2 .

Keywords Myoglobin; Mb(D60K); Hydrogen peroxide; Spectroscopy; Protein structure

(Received Nov. 30, 2010; accepted Mar. 20, 2011)

* Corresponding author