第29卷,第3期
2009年3月

光 谱 学 与 光 谱 分 析
Spectroscopy and Spectral Analysis

Vol. 29, No. 3, pp777-780
March, 2009

新的植物毒素蒜头果蛋白的荧光光谱研究

袁 燕[1,2], 肖 涵[1], 康洪钧[1], 陈睿彦[1], 戴晓畅[1*]

1. 云南大学化学科学与工程学院教育部自然资源药物化学重点实验室, 云南 昆明 650091
2. 昆明学院生命科学与技术系, 云南 昆明 650031

摘 要 蒜头果蛋白(Malanin)是从我国稀有植物蒜头果中分离纯化出的一种具有高细胞毒性的蛋白质。用荧光光谱法研究在温度、酸度、有机溶剂、表面活性剂、变性剂及荧光猝灭剂等不同条件对蒜头果蛋白溶液构象的变化。实验表明, Malanin在天然状态下荧光发射峰位于340 nm处, 色氨酸(Trp)残基较大程度位于Malanin分子的疏水区。十二烷基硫酸钠、异硫氰酸胍、丙烯酰胺和碘化钾的加入均可使Malanin的分子构象发生变化, 导致分子内Trp残基的荧光猝灭。异硫氰酸胍的加入使Trp残基的荧光发射峰位明显红移, 表明位于Malanin分子较疏水环境内的Trp残基相对外露。

关键词 蒜头果蛋白; 荧光光谱; 蛋白质构象
中图分类号: O629.7 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)03-0777-04

引 言

蒜头果(*Malania oleifera* Chun et S. Lee)属于铁青树科(Olacaceae)蒜头果属[1], 是中国特有单种属稀有植物, 国家二级保护树种, 仅分布在广西西部和云南东南部的狭窄地带[2,3]。国内对蒜头果的研究主要集中在蒜头果的开发利用、种质资源调查、育苗技术、营林、濒危机制等方面, 国外无资源也无相关研究, 对蒜头果种子进行蛋白质分析至今无相关报道。

采用硫酸铵分级分离和疏水过滤层析法从蒜头果种仁中首次分离、纯化出一种毒性蛋白质, 命名为蒜头果蛋白(Malanin)。该蛋白质的分子量为61875 Da, 由A和B两条肽链通过一对链内二硫键连接而成。其A和B链N-端序列分别为DYPKLTFTTS和为DETXTDEEFN(X一般情况下为C), 用NCBI-BLASTP程序对nr数据库和其他蛋白质数据库进行检索, 未发现有相同的序列存在。经基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)及分析各自的肽质量指纹图谱(PMF), 结果没有匹配数据库中的任何记录, 说明Malanin为新蛋白质。

本文研究了温度、酸度、有机溶剂、表面活性剂、变性剂及荧光猝灭剂等不同条件下对Malanin荧光光谱的影响, 旨在准确地表征Malanin溶液的构象, 为以后更好地研究其结构与功能的关系奠定基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-4500型荧光分光光度计(HITACHI), Milli-Q纯水机(MILLIRORE), 万分之一天平(Sartorius, BP110 S)。

Malanin为本课题组制备; SDS为Biom产品; 丙烯酰胺为Pharmacia产品; 二甲基亚砜为华美生物工程公司分装; 异硫氰酸胍为Sigma公司产品。其余试剂均为国产分析纯, 水为超纯去离子水。

1.2 实验方法

用F-4500荧光分光光度计测样品的荧光光谱。使用光径为1 cm的荧光池, 激发狭缝5 nm, 发射狭缝为5 nm。Malanin的浓度为0.1 mg·mL^{-1}, 溶液体系为含0.1 mol·L^{-1} NaCl的磷酸盐缓冲液(pH 7.2)。

2 结果与讨论

2.1 Malanin的内源荧光光谱的测定

采用280和295 nm两种激发波长分别测定。当激发波长为280 nm时, 一般蛋白质的荧光光谱为Trp残基和酪氨酸(Tyr)残基共同提供, 当激发波长为295 nm时, 蛋白质的荧光光谱仅由Trp残基贡献[4]。

Malanin的荧光光谱在280和295 nm为激发波长的荧

收稿日期: 2008-02-22, **修订日期**: 2008-05-26
基金项目: 国家自然科学基金项目(30360025), 云南省教育厅基金项目(07Y40677)和昆明学院校级课题项目(z2008-008)资助
作者简介: 袁 燕, 1975年生, 云南大学化学科学与工程学院博士研究生 e-mail: yuanyanfy@yahoo.com.cn
*通讯联系人 e-mail: xchdai@ynu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

光光谱均产生在 λ_{em}^{max} = 340 nm 的发射光谱，说明该分子中存在 Trp 残基。当用既能激发 Trp 又能激 Tyr 的 280 nm 波长的激发光时，在 Malanin 的荧光发射光谱中观察不到 Tyr 残基的荧光，可见 Malanin 的内源性荧光表现为 Trp 残基的荧光。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[5]。实验测得游离 Trp 的发射峰位为 355 nm，Malanin 相对其 15 nm 的光谱蓝移意味着 Malanin 分子中 Trp 残基较大程度位于疏水的环境。

2.2 酸度对 Malanin 荧光光谱的影响

从图 1 中可以看出，Malanin 的荧光强度先是随着 pH 值的增大而增大，当 pH 增大到 6.2 附近时，其荧光强度又逐渐减小。且在低 pH 值时，Malanin 的荧光发射峰位蓝移(从 339.0 移至 333.0 nm)。

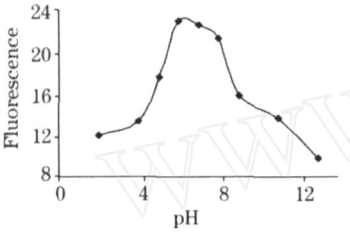

Fig. 1 Effects of acidity on the fluorescence intensities of malanin(λ_{ex} = 281 nm)

当 pH 大大低于或高于蛋白质的等电点时，会产生较多净的正或负电荷，蛋白质分子内出现的同性电荷的相互排斥以及盐键的断裂，因而使 Malanin 在很低和很高 pH 时的分子构象松散，活性降低，改变了 Trp 残基的微环境，从而使其荧光强度下降。在 pH 6.2 时 Malanin 的荧光强度最大，说明此酸度时 Malanin 有一最适构象，有利于能量的吸收传递和再发射，蛋白质的活性也最好。而在低 pH 值时，Malanin 的荧光发射峰位蓝移，表明 Trp 微环境的疏水性增加[6]。

2.3 温度对 Malanin 荧光光谱的影响

图 2 为 Malanin 在不同温度下热处理 2h 后的荧光光谱图。Malanin 的荧光强度在温度低于 50 ℃时变化不大，随着温度的升高，其荧光强度逐渐降低，荧光发射峰位出现红移。说明 Malanin 在低于 50 ℃时，能保持良好的活性，高于 50 ℃其活性逐渐降低，这与 Malanin 对肿瘤细胞的毒性是相吻合的，其在温度低于 50 ℃时，对肿瘤细胞的毒性都比较强，而在高于 50 ℃其细胞毒性就逐渐降低，90 ℃以上时，细胞毒性几乎完全丧失。可见随着温度的升高，Malanin 逐

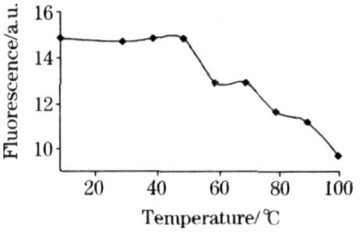

Fig. 2 Effects of temperature on the fluorescence intensities of malanin(λ_{ex} = 280 nm)

渐变性，从有序结构转变为无序结构，Trp 残基的微环境发生较大变化，极性明显增强，从而引起 Malanin 的荧光强度逐渐降低，荧光发射峰位出现红移[7]。

2.4 表面活性剂 SDS 和变性剂异硫氰酸胍对 Malanin 荧光光谱的影响

十二烷基硫酸钠(SDS)很容易与蛋白质分子结合并能使其肽链伸展[8]。图 3 显示，随着 SDS 浓度增大，它可能破坏了 Malanin 分子的高级结构，也可能阻断了分子内能量的传递和转移，使 Malanin 的荧光强度下降。其荧光发射峰位不变，可能是由于在 SDS 的作用下，虽然 Malanin 分子由球形变成杆形，构象发生了很大的变化，但 SDS 的疏水基与蛋白质分子侧链的 Trp 残基的疏水区形成共同的疏水区，Trp 残基的微环境并没有受到影响[9]。

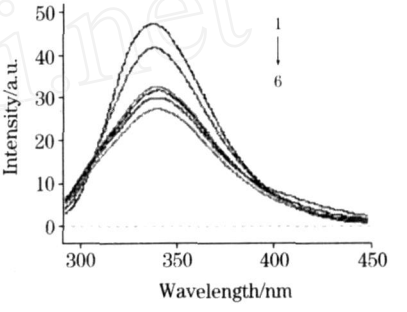

Fig. 3 Fluorescence spectra of malanin in different SDS concentration(λ_{ex} = 281 nm)

1: 0; 2: 0.1 ×10^{-2}; 3: 0.5 ×10^{-2}; 4: 2.0 ×10^{-2}; 5: 4.0 ×10^{-2}; 6: 8.0 ×10^{-2} mol·L^{-1}

异硫氰酸胍是蛋白质常见的变性剂，蛋白质在高浓度的异硫氰酸胍介质中变性后，从有序结构转变为无序结构，发生去折叠过程[10]。图 4 的实验表明 Malanin 变性后，Trp 残基的裸露使其所处微环境的性质有较大变化，极性明显增强，从而引起 Malanin 的荧光光谱有较大的变化，峰位明显红移(从 337 nm 红移至 372 nm)，Stokes 位移也明显增大，同时荧光强度降低。

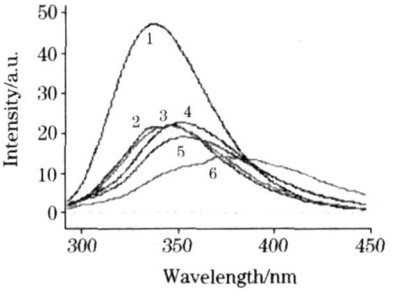

Fig. 4 Fluorescence spectra of malanin in different CH_5N_3·HSCN concentration(λ_{ex} = 281 nm)

1: 0; 2: 0.4; 3: 08; 4: 2.0; 5: 3.0; 6: 6.0 mol·L^{-1}

2.5 有机溶剂对 Malanin 荧光光谱的影响

Malanin 在 30 %的二甲亚砜、30 %乙醇、30 %甘油及 30 %异丙醇有机试剂的溶液中，其 λ_{em}^{max} 相对于 Malanin 在水溶液中的荧光强度均加强(见图 5)。30 %的二甲亚砜、30 %

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

乙醇及 30 %异丙醇的 λ_{em}^{max} 相对于 Malanin 水溶液的 λ_{em}^{max} 几乎不变，λ_{em}^{max} = 340 nm，而 30 %甘油 λ_{max}^{em} 蓝移了 5 nm，λ_{em}^{max} = 335 nm。

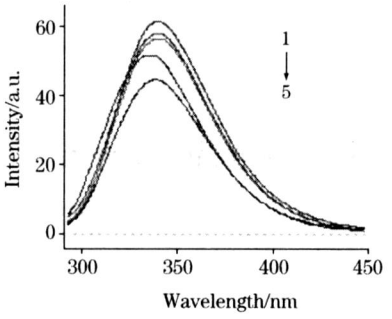

Fig. 5　Fluorescence spectra of malanin in different orgnic solvents(λ_{ex} = 281 nm)

1: 30 % DMSO; 2: 2. 30 % isoprooanol; 3: 30 % ethanol; 4: 30 % glycerol; 5: H_2O

峰位蓝移说明 Malnain 的 Trp 残基位于蛋白质分子表面，或者由于溶剂诱导构象变化，减弱了 Malanin 间的疏水作用，而把 Trp 残基带到蛋白质分子的表面。荧光强度增强说明有机溶剂不仅可以破坏疏水相互作用，还能促进天然蛋白质的伸长，有利于 Trp 残基的暴露，使 Malanin 构象发生变化，从而使荧光强度增加。

2. 6　Malanin 的荧光猝灭

2. 6. 1　I^- 对 Malanin 的荧光猝灭

I^- 是一种典型的 Trp 荧光碰撞猝灭剂，可猝灭蛋白质表面的 Trp 残基荧光，但不能进入蛋白质分子内部而猝灭荧光。将 1 mg ·L^{-1} Malanin 和游离 Trp 溶解在 0. 02 mol ·L^{-1} PBS pH 7. 2(2 mmol ·L^{-1} $Na_2S_2O_3$ 作还原剂)缓冲液中，向此溶液中加入不同浓度的 KI，分别测定它们的荧光变化。

从图 6 可以看出，游离 Trp 和 Malanin 的荧光强度都随着 KI 浓度的增大而明显减小，出现明显的荧光猝灭现象。与游离 Trp 相比，I^- 对 Malanin 荧光碰撞猝灭程度要小于游离态的 Trp。在 I^- 浓度为 2. 0 mol ·L^{-1} 时，I^- 可完全猝灭游离 Trp 的荧光，但同浓度的 I^- 却只能猝灭部分 Malanin 的荧光，这说明 Malanin 中的 Trp 残基周围的介质条件和缓冲液中的自由 Trp 有很大区别，同时也说明在 Malanin 中两种类型的 Trp 都存在，即有暴露于分子外部的 Trp 残基，也有处于疏水内核的 Trp 残基[11]。

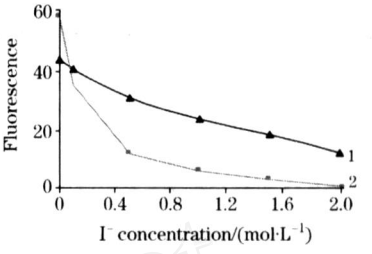

Fig. 6　Effects of malanin and Trp quenched by KI (λ_{ex} = 282 nm, λ_{em}^{max} = 336 nm)

1: Malanin; 2: Trp

2. 6. 2　丙烯酰胺对 Malanin 的荧光猝灭

1 mg ·L^{-1} Malanin 溶解在 0. 02 mol ·L^{-1} PBS pH 7. 2 (含 2 mmol ·L^{-1} $Na_2S_2O_3$ 作还原剂)缓冲液中，加入不同浓度的丙烯酰胺(Acr)时，激发峰和发射峰没有移位，但发射峰强度明显减弱，出现典型的荧光猝灭现象。

Acr 是一种非常有效、不带电荷的极性 Trp 荧光猝灭剂，是通过碰撞过程猝灭吲哚衍生物的荧光，可以进入到蛋白质的疏水内核，无论是 Trp 残基位于蛋白质表面还是非极性的内部，均能猝灭与其发生碰撞的被激发的 Trp 残基荧光[12]。Acr 浓度为 1. 0 mol ·L^{-1} 时，几乎可完全猝灭游离 Trp 的荧光，说明 Acr 猝灭了其大部分 Trp 残基的荧光，同时也说明 Malanin 的 Trp 残基绝大部分位于分子的表面或者 Acr 可以到达的内部疏水核中。因此当 I^- 不能很好地猝灭蛋白质的荧光时，其原因可能是部分位于蛋白质分子表面的 Trp 残基周围存在带电荷区，排斥了 I^- 的接近，Trp 残基所处的疏水穴内，使 I^- 不能进入[13]。

参　考　文　献

[1] QIU Hua-xing, LIN You-run(丘华兴，林有润). Flora of China(中国植物志). Beijing: Science Press(北京：科学出版社), 1988. 24, 34.

[2] FU Li-guo(傅立国). China Plant Red Book Rare and Endangered Plant Species(中国植物红皮书-稀有濒危植物). Beijing: Science Press (北京：科学出版社), 1992. 1, 480.

[3] WANG Cai-ming, HUANG Shi-xun, WANG Yan(王才明，黄仕训，王　燕). Guihaia(广西植物), 1994, 14(3): 277.

[4] WANG Shou-ye, YU Hua-ming(王守业，余华明). Acta Biochimica et Biophysica Sinica(生物化学与生物物理学报), 1998, 30(3): 303.

[5] XU Jin-gou, WANG Zun-ben(许金钩，王尊本). Fluorescence Analytical Approach(荧光分析法，第 3 版). Beijing: Science Press(北京：科学出版社), 2006.

[6] 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.

[7] FENG Shang-yuan, CHEN Rong, YANG Wen-qin, et al(冯尚源，陈　荣，杨文琴，等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(11): 2279.

[8] YAN Yuan, LIU Tao, HUANG Jian-feng(鄢　远，刘　韬，黄坚锋). Acta Chimica Sinica(化学学报), 1997, 55: 1214.

[9] CHEN Zhen-long, ZHAO Da-qing, LIU Qing-liang(陈真龙，赵大庆，刘清亮). Chinese Journal of Inorganic Chemistry(无机化学学报), 1999, 15(2): 185.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[10] ZHANG Jing(张 静). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(4): 455.
[11] LÜ Hong-zhou, LIU Chao, BAO Jin-ku(吕鸿周, 刘 超, 鲍锦库). Journal of Sichuan University(Natural Science Edition)(四川大学学报·自然科学版), 2006, 43(6): 1389.
[12] WANG Ke-yi, SUN Jian-zhong(王克夷, 孙建忠). Acta Biochimica et Biophysica Sinica(生物化学与生物物理学报), 1994, 26(6): 649.
[13] YAN Cheng-nong, XIE Ze-yu, MEI Ping, et al(颜承农, 谢泽钰, 梅 平, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(12): 2542.

Fluorescence Spectra Study of a New Toxic Protein from *Malania Oleifera*

YUAN Yan[1,2], XIAO Han[1], KANG Hong-jun[1], CHEN Rui-yan[1], DAI Xiao-chang[1*]
1. Key Laboratory of Medical Chemistry for Natural Resource, Ministry of Education, School of Chemical Science and Technology, Yunan University, Kunming 650091, China
2. Department of Life Science and Technology, Kunming University, Kunming 650031, China

Abstract A new toxic protein named malanin was isolated from seeds of *Malania oleifera* by hydrophobic chromatography, whose cytotoxic activities against carcinoma cells were very strong. The conformational changes of malanin at various temperatures, pH, organic solvents, surfactant, denaturant and fluorescence quenching solvents were studied by fluorescence spectra. The fluorescence spectra of malanin excited at 280 nm and 295 nm showed a maximum at 340 nm. The emission spectra of malanin showed that Trp residues were located by a great degree in the hydrophobic area. Addition of SDS, $CH_5N_3 \cdot HSCN$, acrylamide and KI led to changes in the molecular conformation of malanin, and caused the fluorescence quenching of Trp residues. The red-shifted emission band of malanin after adding $CH_5N_3 \cdot HSCN$ showed that Trp residues were exposed in polar solvents.

Keywords Malanin; Fluorescence spectrum; Protein conformations

(Received Feb. 22, 2008; accepted May 26, 2008)

* Corresponding author

(上接 772 页)

July 2009
19-23 51st Rocky Mountain Conference on Analytical Chemistry,
Snowmass, CO;
Contact: E-mail: info @rockychem.com
Web site: http://www.rockychem.com/

August 2009
30-September 4 18th International Mass Spectrometry Conference (IMSC),
Bremen, Germany;
Contact: 18IMSC Secretariat, Institute of Chemistry, Brook-Taylor-Str. 2, 12489 Berlin, Germany; Fax: 49 30 2093 6985;
E-mail: office @imsc-bremen-2009.de
Web site: http://www.imsc-bremen-2009.de/

Short Courses
April 20-23, 2009 CETAC Technologies ICP-AES/ICP-MS Continuing Education Series;
Contact: Web site: http://www.cetac.com/news_events/icp-training.asp

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net