

荧光光谱分析超氧化物歧化酶的 构象变化及其功能^①

李 阳 赵 怡 谢丽思 李任强^②

(暨南大学生物工程学系 广州市黄埔大道西 601 号 510632)

摘 要 通过荧光光谱研究了枯草芽孢杆菌超氧化物歧化酶(SOD)的分子构象在不同浓度盐酸胍、尿素以及不同 pH 条件下的变化及其与功能的关系。结果表明,SOD 构象与功能的变化与其荧光光谱的变化有明显的对应关系。随着盐酸胍浓度的增加,SOD 发射峰红移,荧光强度不断下降,且这两种变化同步发生;酶则出现快失活慢变构现象。而利用尿素变性 SOD 时,SOD 先是荧光强度增强,然后发射峰红移,酶活力的下降与构象变化同步进行。尿素和盐酸胍使 SOD 变性的机理明显不同。处于不同酸碱度时,SOD 活力的变化与荧光光谱所表现出的构象变化几乎一致。通过荧光分析法是可以对不同条件下 SOD 分子的构象变化及其酶活进行快速测定的。

关键词 荧光光谱;超氧化物歧化酶;构象变化;酶活力

中图分类号: O657.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8138(2011)06-2763-07

1 引言

荧光分析法是研究蛋白质分子构象的一种有效方法,具有灵敏度高、选择性强、重现性好、试样量少和方法简便等优点。由于常存在有色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe),蛋白质分子能吸收 270—300nm 波长的光而发出紫外荧光。这 3 种氨基酸中 Trp 的荧光强度最大,Tyr 次之,Phe 最小。蛋白质的荧光通常在 280nm 或更长的波长被激发,其内源荧光主要由 Trp 和 Tyr 产生。Tyr 荧光光谱最大发射波长一般位于 303nm,而 Trp 的荧光光谱对微环境的变化很敏感,其峰位一般在 325—350nm 波长之间变动^[1]。Trp 与 Tyr 残基作为高度疏水的基团,常常位于蛋白质分子内部。蛋白质变性的过程就是其内部的疏水氨基酸逐渐向外暴露的过程。因此,可以通过 Trp 残基和 Tyr 残基荧光光谱的动态变化分析蛋白质分子所处的构象状态。若结合蛋白生物功能的分析,就可研究蛋白结构与功能之间的关系。

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是生物体内能清除超氧阴离子自由基、防御氧化损伤的一种十分重要的酶类,已作为保健医药产品应用于食品、饮料、化妆品等行业。为了了解 SOD 分子构象与功能之间的关系,使其性质更好地被掌握利用,本研究特选用荧光分析这个工具对 SOD 进行构象变化的测定,因为 SOD 具有稳定性较差,易失活,活力测定也较麻烦等特点,而这样的特点反而有利于用荧光进行分析。同时通过荧光分析还可能提供直接利用荧光对 SOD 活力进行测定的方法。因为不同来源的 SOD 分子结构有差别,为了掌握荧光光谱与 SOD 分子结构的关系,本研究所用的模型蛋白为已知一级结构、通过基因工程菌制备的枯草芽孢杆菌 Mn-SOD。

① 暨南大学自然科学基金(640073)

② 联系人,电话:(020)85228392; E-mail:trqli@jnu.edu.cn

作者简介:李阳(1987—),女,山东省潍坊市人,在读硕士,主要从事蛋白质工程研究工作。

另外, 盐酸胍、尿素等作为蛋白质变性的常用试剂, 一直被广泛的用于实验研究中, 但有关盐酸胍或尿素与蛋白质分子相互作用使蛋白变性的机理报道并不多。本研究中, 利用盐酸胍和尿素作为 SOD 的变性剂, 通过荧光分析 SOD 分子的动态构象, 试图探索这两种变性剂使蛋白变性的机理。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

F-4500 荧光分光光度计(日本日立公司); JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

盐酸胍(GuHCl, 分析纯, 美国 Amresco 公司); 尿素(Urea, 分析纯, 美国 Amresco 公司); 磷酸氢二钠(分析纯, 广州化学试剂厂); 柠檬酸(分析纯, 广州化学试剂厂); 碳酸钠(分析纯, 广州化学试剂厂); 碳酸氢钠(分析纯, 广州化学试剂厂)。实验用水为二次蒸馏水。

2.2 方法

2.2.1 枯草芽孢杆菌 Mn-SOD 的表达纯化

利用本实验室已经构建好的工程菌为材料, 以异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG) 诱导枯草芽孢杆菌 ATCC 9372 Mn-SOD 基因在大肠杆菌中高效表达, 菌细胞经超声波细胞粉碎机破碎后经镍柱亲和层析进行重组 SOD 的纯化, 进行 SDS-PAGE 以检测 SOD 的纯度。

2.2.2 盐酸胍、尿素及不同 pH 值缓冲液对 SOD 的处理

用 $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4 的 PBS 缓冲液对获得的纯 SOD 进行透析后, 取相同体积 $50\mu\text{L}$ 的 SOD 分别与 $950\mu\text{L}$ pH 为 7.4 含有不同浓度盐酸胍的缓冲液混合, 使各样品中 SOD 的质量浓度都相同为 $0.0274\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 盐酸胍终浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、6.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 30°C 水浴 24h 后进行荧光光谱的测定; 取相同体积 $50\mu\text{L}$ 的 SOD 分别与 $1050\mu\text{L}$ pH 为 7.4 含有不同浓度尿素的缓冲液混合, 使各样品中 SOD 的质量浓度都相同为 $0.0249\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 尿素终浓度分别为 0、0.7、1.0、2.0、2.5、3.0、3.5、4.5、5.0、6.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 30°C 水浴 24h 后进行荧光光谱的测定; 取相同体积 $50\mu\text{L}$ 的 SOD 分别与 $200\mu\text{L}$ pH 为 7.4 含有不同浓度盐酸胍和尿素的缓冲液混合, 使各样品中 SOD 的质量浓度都相同为 $0.1096\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而盐酸胍终浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 尿素终浓度分别为 0、0.7、1.0、2.0、2.5、3.0、3.5、4.5、5.0、6.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 30°C 水浴 24h 后进行酶活的测定。

取相同体积经水透析后的 SOD 溶液 $50\mu\text{L}$ 分别与相同体积 $950\mu\text{L}$ pH 值分别为 3、4、5、6、7、8 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液($10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 以及 pH 值分别为 9、10、11 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液($10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 混合, 使各样品中 SOD 的质量浓度都相同为 $0.0197\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 但 pH 不同, 在 30°C 水浴 24h 后进行荧光光谱的测定; 取相同体积 $50\mu\text{L}$ 的 SOD 分别与 $200\mu\text{L}$ 以上各 pH 缓冲液混合, 使各样品中 SOD 的质量浓度都相同为 $0.0788\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 但 pH 不同, 在 30°C 水浴 24h 后进行酶活的测定。

2.2.3 SOD 酶活以及内源荧光光谱的测定

对以上各样品进行酶活的测定是采用改良的连苯三酚自氧化法^[2]。荧光光谱的测定是在室温 (25°C) 下用荧光分光光度计对各样品 SOD 进行扫描, 激发波长(EX WL) 为 280 nm, 发射起始波长(EM Start WL) 和终止波长(EM End WL) 分别为 300nm 和 400nm。激发单元狭缝(EX Slit) 以及发射单元狭缝(EM Slit) 均设定为 5nm。比色皿厚度为 5mm。

3 结果与讨论

3.1 重组 SOD 的 SDS-PAGE 检测

对由大肠杆菌高效表达的枯草芽孢杆菌 Mn-SOD 及其纯化品进行电泳鉴定的结果如图 1。按该蛋白一级结构预测, 其分子量约为 26 千道尔顿(kD)。实验结果显示该蛋白大小约为 26kD, 与理论值相符, 且得到的 SOD 为单一条带, 达到电泳纯。

3.2 不同浓度盐酸胍处理后 SOD 的酶活及其荧光光谱

图 2 为相同浓度的 SOD 经过不同浓度盐酸胍处理后, 以 280nm 紫外光进行激发得到的内源荧光光谱。可以看出, 未经盐酸胍处理的 SOD(pH 7.4) 其最大发射波长位于 335nm 左右, 主要表现的是 Trp 残基的荧光光谱。该 SOD 分子是一种同型二聚体, 一级结构含有 6 个 Trp, 其中 Trp166、Trp131 以及 Trp86 靠近金属活性中心, 其芳香环侧链构成围绕金属结合位点的外层, Trp166 还与另一亚基上参与构成亚基间相互作用的主要氨基酸 Phe127 之间形成亚基间的疏水作用^[3], 因此推测 Trp166、Trp131 以及 Trp86 在 SOD 分子构象变化引起的荧光改变中为主要贡献氨基酸残基。

从图 2 明显可以看到, 随着盐酸胍浓度的增加, SOD 的发射峰产生红移且荧光强度逐次减少, 说明盐酸胍可以使 SOD 分子构象发生明显变化。

不同浓度盐酸胍处理的 SOD 其活性变化与荧光光谱变化的关系列于图 3。当盐酸胍浓度达到 $1.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 酶活力已经下降了 55%, 而荧光光谱所表现出的发射峰荧光强度以及最大发射波长才刚刚开始变化。当盐酸胍浓度增加到 $2.0\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SOD 基本失活, 而发射峰

的荧光强度以及最大发射波长在盐酸胍浓度增加到 $2.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时才达到偏离对照光谱的最大值。这说明在 SOD 的整体构象状态尚未发生明显变化时, 酶活力已经大部分丧失了, 即出现所谓的快失活慢变构现象, 这与李学刚^[4]研究肌酸激酶变性以及陈素丽等^[5]所研究的盐酸胍对文昌鱼酸性磷酸酯酶构象与活力的影响结果相同。这些结果可能说明, 与 SOD 分子的整体构象相比, 活性部

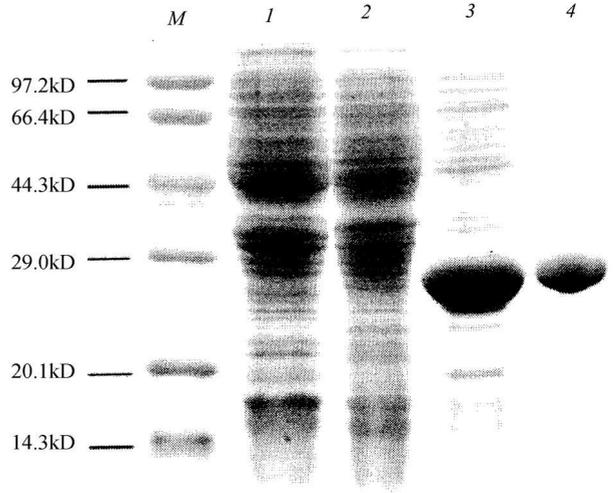


图 1 重组 SOD 的表达与纯化

M——低分子量蛋白 M marker(kDa); 1——*E. coli* 诱导后的全蛋白; 2——*E. coli* (含 pET28a-sodA) 未经诱导时的全蛋白; 3——*E. coli* (含 pET28a-sodA) 诱导后的全蛋白; 4——纯化后的 Mn-SOD。

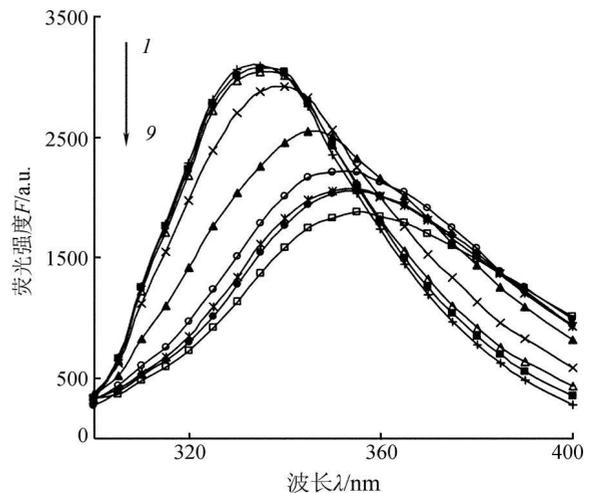


图 2 不同盐酸胍浓度变性 SOD 荧光图谱

1—9 曲线盐酸胍浓度分别为 $(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、6.0。

位的构象对盐酸胍更为敏感。在低浓度盐酸胍的作用下,活性部位构象改变导致 SOD 活性下降,而活性部位构象的变化并不能引起表征 SOD 整个分子构象的荧光光谱的大的改变,因此荧光光谱的变化不明显。另一种可能是在低浓度盐酸胍的作用下,SOD 二聚体解聚,破坏了其催化活力,而分子的空间结构尚未遭到破坏,荧光光谱变化表现不明显。

随着盐酸胍浓度的增加,SOD 的发射峰产生红移越明显,而荧光的红移或蓝移与分子的共轭程度有关^[6]。据此推断,SOD 变性过程中二聚体解聚,肽链不断伸展、松散,使 SOD 分子的共轭度不断增加,导致其最大发射波长红移。盐酸胍与蛋白质生成氢键的能力比水分子强。随着盐酸胍浓度的增大,发射峰荧光强度下降,这显然是酶分子构象的破坏,使处于分子内的 Tyr、Trp 暴露并与盐酸胍形成新的氢键,即形成氢键热焓值增大所致,这支持了盐酸胍是通过破坏蛋白质分子内原有的氢键而使蛋白质变性的推论^[7]。

图 3 还表明,随着盐酸胍浓度的增加,SOD 发射峰荧光强度以及最大发射波长的变化几乎是同步的。这说明经过胍处理后 SOD 分子内部 Trp 残基和 Tyr 残基的暴露程度与分子共轭结构的变化是相互联系,相互制约的。

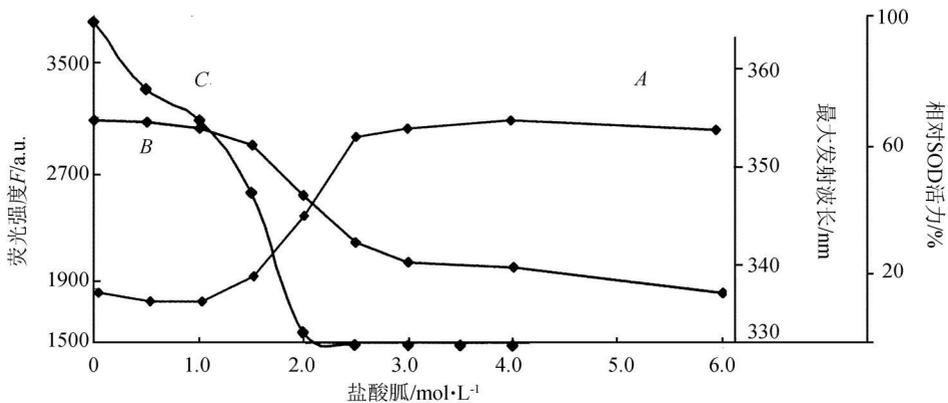


图 3 不同浓度盐酸胍处理的 SOD 活性变化与荧光光谱变化的关系

- A——不同盐酸胍浓度对 SOD 最大发射波长的影响;
 B——不同盐酸胍浓度对 SOD 最大发射峰荧光强度的影响;
 C——不同盐酸胍浓度对 SOD 相对活性的影响。

3.3 不同浓度尿素处理后 SOD 的酶活及其荧光光谱

经不同浓度尿素处理后,以 280nm 紫外光进行激发得到的 SOD 内源荧光光谱列于图 4。当尿素浓度为 0—2.5mol·L⁻¹时,SOD 的发射峰荧光强度随尿素浓度增大而不断增强,而最大发射光波长几乎没有什么明显变化。当尿素浓度增大到 3.0mol·L⁻¹时,发射峰荧光强度不再变化,而最大发射光波长开始红移。此过程 SOD 活性变化与荧光光谱变化的关系列于图 5。当尿素浓度为 2.5—3.5mol·L⁻¹时,酶的相对活力逐次下降,而此浓度范围正是 SOD 最大发射光波长开始变化与发射峰荧光强度停止变化的交接点。随着尿素浓度的提高,酶活一直下降,直到尿素浓度达到 6.0mol·L⁻¹时,酶的活性才完全丧失,此时,最大发射光波长的变化也趋于平稳。可见,尿素变性 SOD 并没有表现出像盐酸胍那样明显的快失活慢变构现象,酶活力的下降与构象变化几乎是同步进行的。这说明,即使是同种酶,由于所用变性剂的不同,其变性机制也有所不同。显然,尿素与盐酸胍使蛋白变性的机理有区别。

比较盐酸胍与尿素变性 SOD 的荧光光谱,一个很明显的区别是尿素变性 SOD 的发射峰荧光强度随尿素浓度的增加而增加,这点在盐酸胍变性 SOD 的荧光图谱上表现出相反的趋势。产生这

种区别的原因可能是由于尿素在起作用时会裂解形成氰酸盐, 对蛋白质的氨基进行不可逆的共价修饰^[8], 从而使 Tyr 和 Trp 残基在从分子内部疏水区外露过程中原有的氢键断裂而又不能与尿素配对形成新的氢键, 使处于猝灭状态的 Tyr 和 Trp 荧光得以恢复, 导致荧光强度的增加。此外, 在尿素变性 SOD 的过程中, 最大发射光波长与发射峰荧光强度的变化并不像盐酸胍那样是同步进行的, 而是分为先是荧光强度增强, 然后发射峰产生红移两个阶段, 这可能说明尿素对 SOD 的作用存在着一种有序的变性过程, 先是对分子构象产生影响, 然后对分子的共轭结构起作用。另外, 尿素变性 SOD 需要的质量浓度比盐酸胍高, 这是因为盐酸胍是一种电解质, 能通过正离子效应减弱维持蛋白质三级结构的静电相互作用, 而脲是一种非离子型变性剂, 其变性作用没有盐酸胍强^[9]。

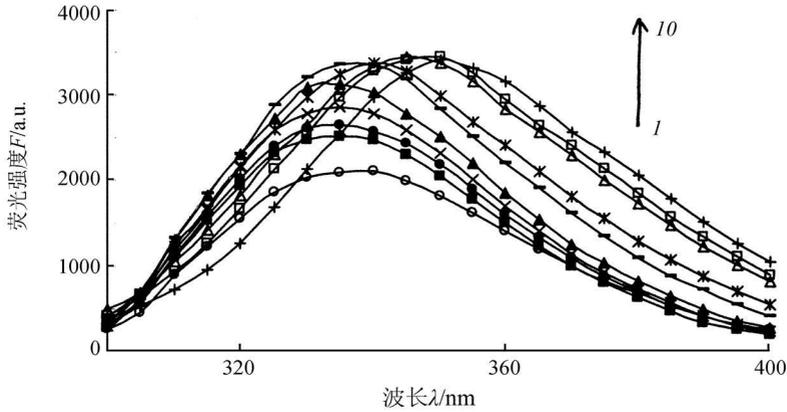


图 4 不同尿素浓度变性 SOD 荧光图谱

1—10 曲线尿素浓度分别为($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 0、0.7、1.0、2.0、2.5、3.0、3.5、4.5、5.0、6.0。

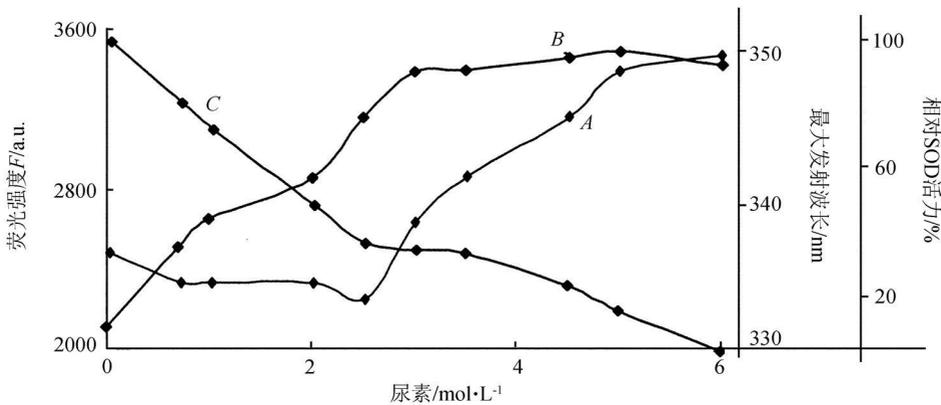


图 5 不同浓度尿素处理的 SOD 活性变化与荧光光谱变化的关系

- A——不同尿素浓度对 SOD 最大发射波长的影响;
- B——不同尿素浓度对 SOD 最大发射峰荧光强度的影响;
- C——不同尿素浓度对 SOD 相对活力的影响。

3.4 不同 pH 下 SOD 的酶活及其荧光光谱

不同 pH 下 SOD 的荧光光谱如图 6 所示。荧光光谱变化与酶活变化的关系列于图 7。SOD 的最适 pH 值为 7—8, 在此范围外, 随着 pH 值的升高或降低, SOD 的活力都出现下降, 而其发射峰荧

光强度则出现增强的趋势。当 pH 值降低为 5 时, 酶活基本丧失, 最大发射光波长蓝移至最大波长; 而在较高 pH 值时, 最大发射波长表现出明显的红移。可见, 酶活力的变化与荧光光谱所表现出来的蛋白质构象的变化几乎是一致的。

SOD 的最大发射光波长随 pH 的降低而蓝移可能是由于蛋白分子在低 pH 值的溶液中由于质子化程度较高而具有比较低的共轭度。而其最大发射光波长随着 pH 的增加而红移可能是正好相反, 由于 SOD 在高 pH 值的溶液中质子化程度较低而具有比较高的共轭度。

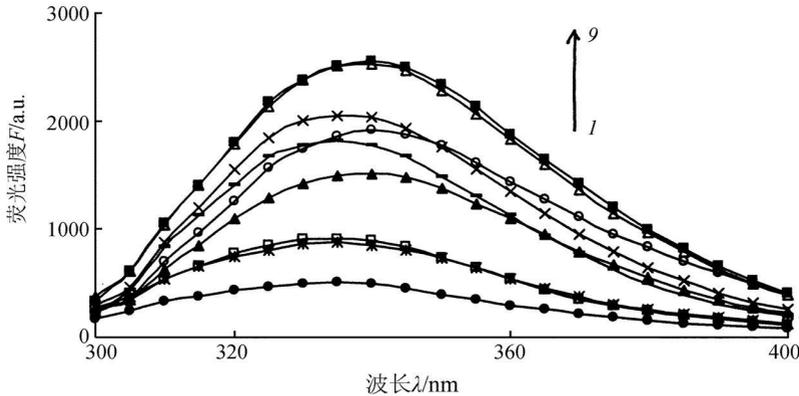


图 6 不同 pH 值缓冲液处理后的 SOD 荧光图谱

1—9 曲线 pH 值分别为: 8、7、6、5、9、11、10、3、4(曲线按 $\lambda = 340\text{nm}$ 处的按列顺序)

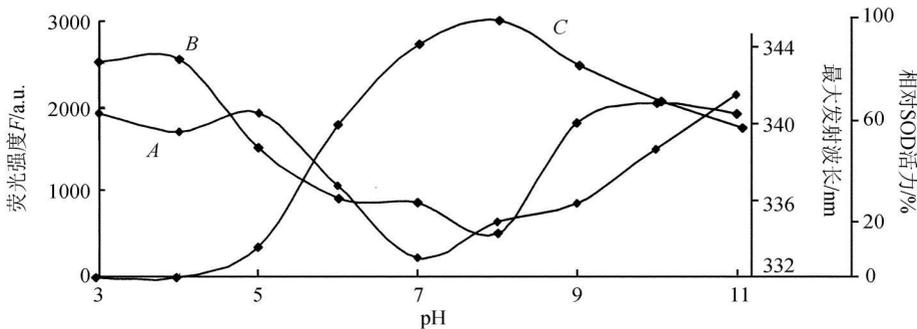


图 7 不同 pH 下 SOD 活性变化与荧光光谱变化的关系

- A — pH 值对 SOD 最大发射波长的影响;
 B — pH 值对 SOD 最大发射峰荧光强度的影响;
 C — pH 值对 SOD 相对活力的影响。

4 结论

SOD 分子构象与功能的变化与其荧光光谱的变化有明显的对应关系。不同条件下 SOD 的构象变化表现出不同的荧光变化。利用盐酸胍变性 SOD 时, 随着盐酸胍浓度的增加, SOD 的荧光发射峰红移, 强度减少, 且峰位红移与荧光强度减少是同步发生的。在 SOD 的整体构象尚未发生明显变化时其活力已经大部分丧失, 胍变性 SOD 出现快失活慢变构现象。而利用尿素变性 SOD 时, 随着尿素浓度的增加, SOD 先是荧光强度增强, 然后发射峰产生红移。酶活力的下降与构象变化同步进行。尿素使 SOD 变性的机理与盐酸胍变性的机理明显不同。处于不同的酸碱度, SOD 活力的变化与荧光光谱所表现出来的蛋白质构象的变化几乎是一致的。以上结果说明通过荧光光谱法可快速检测不同条件下 SOD 分子的构象变化及其酶活。

参考文献

- [1] 杨家祥, 张玉慧, 许兴友等. 荧光光谱在蛋白质分子构象研究中的应用[J]. 淮海工学院学报, 1999, **8**(4): 28—31.
- [2] 邓碧玉, 袁勤生, 李文杰. 改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, **18**(2): 163.
- [3] Liu P, Ewis H E, Huang Y J *et al*. Structure of Bacillus Subtilis Superoxide Dismutase[J]. *Acta Cryst*, 2007, **F63**: 1003—1007.
- [4] 李学刚. 不同变性条件下肌酸激酶活力和构象变化的比较[J]. 生物物理学报, 1995, **11**(1): 11—15.
- [5] 陈素丽, 丁焱, 陈灿和. 盐酸胍对文昌鱼 *Branchiostoma becheri* (Gray) 酸性酯酶构象与活力的影响[J]. 台湾海峡, 1993, **12**(4): 359—363.
- [6] 刘翠格, 徐怡庄, 魏永巨等. 环丙沙星的光谱性质, 质子化作用与荧光量子产率[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, **25**(9): 1446—1450.
- [7] 陶慰孙, 李惟, 姜涌明等. 蛋白质分子基础[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1995.
- [8] 于海东, 张雪莲, 王宝林等. 结核分支杆菌 H37 R_v 莽草酸脱氢酶基因的克隆、表达及酶学性质的研究[J]. 复旦学报, 2004, **43**(2): 195—199.
- [9] 杨芳, 梁毅, 杨芳(小). 脲和盐酸胍诱导溶菌酶去折叠的荧光相图法研究[J]. 化学学报, 2003, **61**(6): 803—807.

Fluorescence Spectra Analysis of Conformational Changes and Its Function of Superoxide Dismutase

LI Yang ZHAO Yi XIE Li-Si LI Ren-Qiang

(Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, P. R. China)

Abstract The molecular conformational changes of bacillus subtilis superoxide dismutase (SOD) and the relationship of conformations with functions were investigated by fluorescence spectra in the different concentrations and pH value of GuHCl and urea. Changes of conformation with function of SOD were well reflected on their fluorescence spectra. The emission peaks of SOD appeared red-shifted along with increase of GuHCl concentration and decrease of fluorescence intensity, and the two changes occurred, simultaneously, while the enzyme appeared proksim inactivation and slow allostherism. With denaturation of SOD by urea, firstly, the fluorescence intensity of SOD was increased, then the emission peaks were appeared red-shifted, and the decrease of enzymatic activity and conformational changes simultaneously occurred. The denaturation mechanisms of SOD by GuHCl and urea were obviously different. The changes of SOD activity were almost agree with conformational changes of fluorescence spectra. The molecular conformational changes of SOD and its enzymatic activity were quickly determined by fluorescence analysis under different conditions.

Key words Fluorescence Spectra; Superoxide Dismutase; Conformational Change; Enzymatic