

荧光猝灭法研究 NADH、Thio-NAD⁺ 与 3 α -HSD 的相互作用^①

连国军 赵长容^② 刘文涵^a 方芳 曹建明

(温州医学院环境与公共卫生学院 浙江省温州市茶山高教园区 325035)

^a浙江工业大学化材学院 杭州市 310032)

摘 要 采用荧光猝灭法研究了两种辅酶, 还原型烟酰胺嘌呤二核苷酸(NADH)、氧化型硫代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Thio-NAD⁺)与 3 α -羟类固醇脱氢酶(3 α -HSD)的相互作用。研究表明, NADH 和 Thio-NAD⁺ 的加入均能使 3 α -HSD 的内源性荧光发生猝灭, 其猝灭机制均属于生成复合物的静态猝灭; 25℃下 NADH、Thio-NAD⁺ 与 3 α -HSD 的结合常数分别为 7.38×10^4 、 $1.23 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; 37℃下 NADH、Thio-NAD⁺ 与 3 α -HSD 的结合常数分别为 4.69×10^4 、 $9.74 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; NADH 与 3 α -HSD 的结合作用力为氢键和范德华力, Thio-NAD⁺ 与 3 α -HSD 的结合作用力主要为静电引力和疏水作用力; NADH 和 Thio-NAD⁺ 均能使 3 α -HSD 构象发生变化, 导致色氨酸残基所处环境极性增大。

关键词 荧光猝灭法; 3 α -羟类固醇脱氢酶; 还原型烟酰胺嘌呤二核苷酸; 氧化型硫代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)05-2173-06

1 引言

荧光猝灭法因试剂用量少、操作简便、可提供信息丰富等诸多优点, 在研究血清蛋白与药物有机小分子作用机理方面已经得到了广泛应用^[1-4], 但在研究酶与小分子相互作用机理方面应用甚少^[5]。3 α -羟类固醇脱氢酶(3 α -HSD)是临床胆汁酸测定试剂中用到的工具酶, 在胆汁酸测定中采用该工具酶与两种辅酶还原型烟酰胺嘌呤二核苷酸(NADH)和氧化型硫代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Thio-NAD⁺)及胆汁酸底物进行循环反应, 使微量胆汁所产生的光信号得以放大, 从而实现微量胆汁酸的准确测定^[6]。本实验采用荧光猝灭法研究了 NADH、Thio-NAD⁺ 与 3 α -HSD 的结合反应机理, 获得了两种辅酶与 3 α -HSD 结合常数、结合作用力类型及结合反应对 3 α -HSD 构象的影响情况等, 为深入研究上述胆汁酸测定的酶循环反应机理奠定了基础, 也为试剂价格昂贵的酶与其他小分子作用机理研究提供了新的思路。

2 实验部分

2.1 主要仪器与试剂

RF-5000 荧光分光光度计(日本岛津公司); pHs-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

3 α -羟类固醇脱氢酶(3 α -HSD, 上海沪旦生物科技有限公司)配制成 10mg/mL 水溶液、还原型

① 浙江省科技计划项目(2008F70051)

② 联系人, 手机: (0) 13736330132; 传真: (0577) 86699122; E-mail: crzhao8017@163.com

作者简介: 连国军(1976—), 男, 浙江省上虞市人, 副教授, 硕士, 主要从事临床生化检验方法学研究工作。

收稿日期: 2010-12-06; 接受日期: 2011-01-12

烟酰胺嘌呤二核苷酸(NADH, 德国罗氏诊断有限公司); 氧化型硫代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Thio-NAD⁺, 上海沪旦生物科技有限公司) 均配制成浓度为 20mmol/L 水溶液; 以上试剂均 100 μ L/ 管分装, -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存, 临用前置室温复溶; pH 7.98 的 Tris-HCl 缓冲液(137mmol/L); 上述试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

2.2 实验方法

2.2.1 荧光猝灭实验

在 25 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 下, 分别准确移取 1.00mL Tris 缓冲液, 1.50mL 二次蒸馏水于 1cm 光径的荧光比色皿中, 采用可调移液器准确加入 10 μ L 3 α -HSD, 混匀, 恒温 20min 后, 用可调移液器逐次加入 2 μ L NADH 或 1 μ L Thio-NAD⁺ 进行荧光滴定(滴定剂累加体积 < 50 μ L), 固定激发波长 280nm, 扫描 300—500nm 的发射光谱。

2.2.2 同步荧光猝灭实验

在 37 $^{\circ}$ C 下, 准确移取 1.00mL Tris 缓冲液, 1.50mL 二次蒸馏水于 1cm 光径的荧光比色皿中, 用微量移液枪准确加入 10 μ L 3 α -HSD, 混匀, 恒温 20min 后, 逐次加入 2 μ L NADH 或 1 μ L Thio-NAD⁺, 固定 $\Delta\lambda=60$ nm 进行同步荧光扫描。

3 结果与讨论

3.1 荧光猝灭光谱

由 3 α -HSD 的基因系列可知^[7], 3 α -HSD 中含有能发射内源性紫外荧光的色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)残基。在 280nm 激发时, Trp 残基和 Tyr 残基的最大荧光强度波长分别位于 340nm 和 300nm 左右^[8]。本实验中观察到当激发波长为 280nm 时, 3 α -HSD 的最大荧光发射波长为 336nm, 它应该主要产生于 Trp 残基。辅酶 NADH 与 Thio-NAD⁺ 在 3 α -HSD 的发射峰附近均无荧光发射峰。在 25 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 下, 固定 3 α -HSD 浓度, 逐渐增加 NADH 与 Thio-NAD⁺, 3 α -HSD 的荧光峰均出现有规律的猝灭现象。图 1 为 NADH 对 3 α -HSD 的荧光猝灭图, 图 2 为 Thio-NAD⁺ 对 3 α -HSD 的荧光猝灭图。

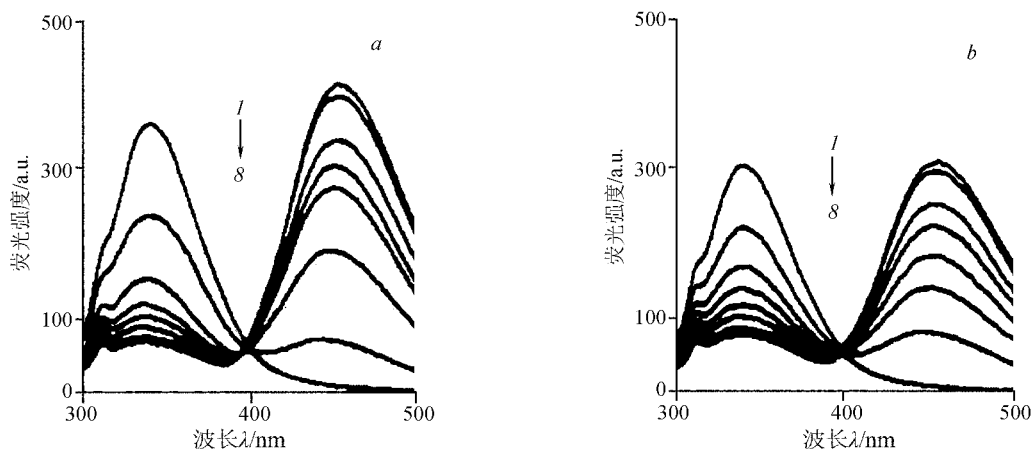


图 1 NADH 对 3 α -HSD 荧光强度的影响

a—25 $^{\circ}$ C; b—37 $^{\circ}$ C; pH=7.98, $C_{3\alpha\text{-HSD}}=1\text{ku/L}$; $C_{\text{NADH}}(\mu\text{mol/L})$: 曲线 I—8: 0、8、16、24、32、40、48、56。

由图可知 Thio-NAD⁺ 仅使 3 α -HSD 的荧光信号发生规律性的猝灭, 但并未使荧光光谱图发生畸变, 但 NADH 的加入不仅使 3 α -HSD 的荧光信号降低, 而且荧光光谱图形状发生了明显改变, 在

400nm 附近出现了等发射点, 在 460nm 附近出现了另一荧光发射峰, 这对应于 NADH 的荧光发射信号^[9], 说明 3 α -HSD 与 NADH 之间明显存在能量转移。此外, 对比图 1、图 2 还可以得知, NADH 对 3 α -HSD 的荧光猝灭程度远大于同浓度的 Thio-NAD⁺ 对 3 α -HSD 的猝灭程度, 由此初步推断 NADH 与 3 α -HSD 作用强于 Thio-NAD⁺ 与 3 α -HSD 的作用。

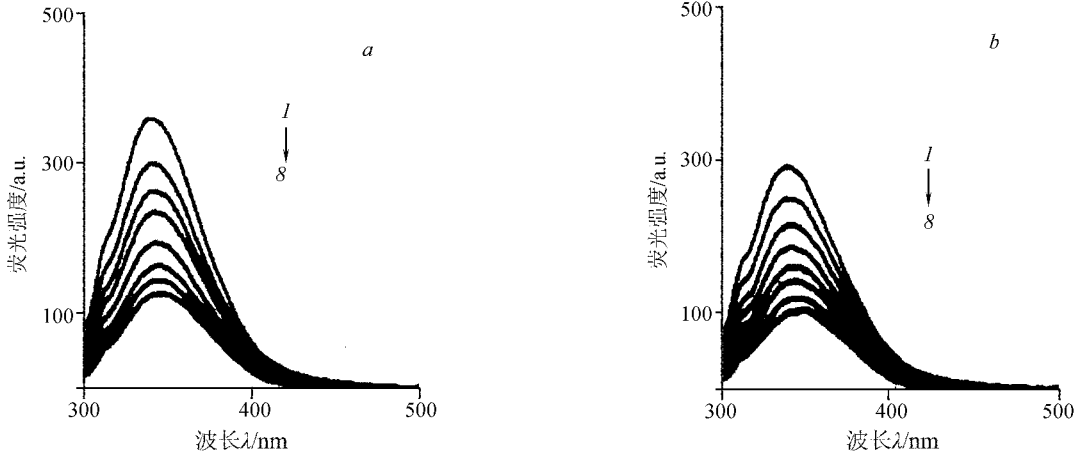


图 2 Thio-NAD⁺ 对 3 α -HSD 荧光强度的影响

a—25°C; *b*—37°C; pH= 7.98, $C_{3\alpha\text{-HSD}}= 1\text{ kU/L}$; $C_{\text{Thio-NAD}^+}$ ($\mu\text{mol/L}$) 曲线 *I*—8: 0、16、32、48、64、80、96、112。

3.2 猝灭类型

荧光猝灭作用因猝灭机制不同可分为动态猝灭和静态猝灭。动态猝灭是指荧光物质与荧光猝灭剂分子间, 因为碰撞而导致的荧光猝灭过程, 动态猝灭过程可用 Stern-Volmer 方程进行描述^[10], 即:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}C_q = 1 + K_q\tau C_q \quad (1)$$

式中: F_0 ——辅酶加入之前 3 α -HSD 的荧光强度; F ——加入辅酶后的荧光强度; C_q ——辅酶的浓度; K_{sv} ——动态猝灭常数; K_q ——荧光猝灭速率常数 (各类猝灭剂对生物分子的最大 K_q 值为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$); τ ——不存在猝灭剂时的荧光物质的平均寿命, 生物大分子的荧光平均寿命一般为 10^{-8} s 。

为了确定两种辅酶对 3 α -HSD 的荧光猝灭类型, 先按上述动态猝灭公式(1)对实验获得的数据进行处理, 作 $F_0/F - C_q$ 关系图, 得图 3, 并将相关数据列于表 1。

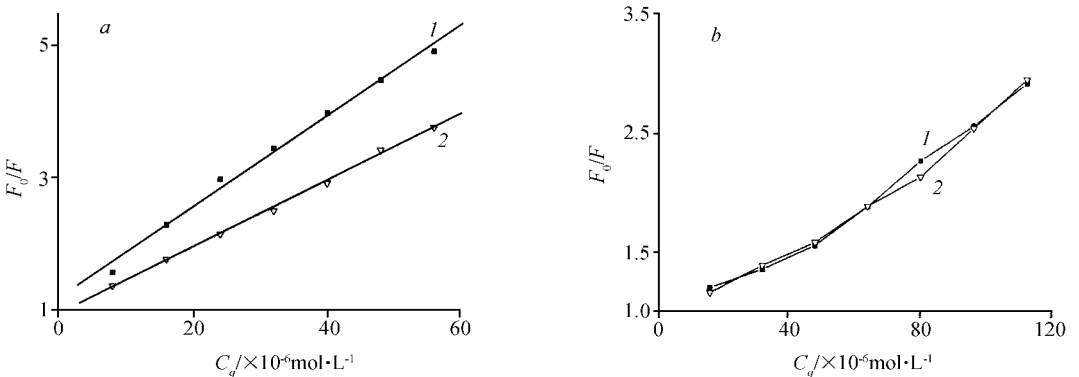


图 3 NADH、Thio-NAD⁺ 与 3 α -HSD 作用的 Stern-Volmer 曲线

a—NADH; *b*—Thio-NAD⁺; *I*—25°C; 2—37°C。

表 1 NADH、Thio-NAD⁺ 对 3 α -HSD 的荧光猝灭常数

辅酶	<i>t</i> (°C)	<i>K_{sv}</i> (L · mol ⁻¹)	<i>K_q</i> (L · mol ⁻¹ · s ⁻¹)	<i>r</i>
NADH	25	6.89 × 10 ⁴	6.89 × 10 ¹²	0.9991
	37	5.06 × 10 ⁴	5.06 × 10 ¹²	0.9959
Thio-NAD ⁺	25	1.85 × 10 ⁴	1.85 × 10 ¹²	0.9922
	37	1.84 × 10 ⁴	1.84 × 10 ¹²	0.9912

由表中数据可以看出, NADH 和 Thio-NAD⁺ 对 3 α -HSD 的荧光猝灭速率常数远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 由此推断 3 α -HSD 的荧光猝灭是静态猝灭; 此外, 二者的猝灭常数均随温度的升高呈下降趋势, 再次说明猝灭过程是静态猝灭。静态荧光猝灭作用是指荧光供体分子与荧光猝灭剂分子之间借助分子间力, 彼此结合形成了具有一定结构的不发荧光的基态复合物, 而导致荧光强度减弱的现象。以上分析结果看出, 3 α -HSD 与 NADH 及 Thio-NAD⁺ 之间结合形成了复合物。3 α -HSD 与 NADH 及 Thio-NAD⁺ 之间形成复合物的结合常数可以采用 Lineweaver-Burk 双倒数方程^[11] 进行计算:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K^{-1} F_0^{-1} C_q^{-1} \quad (2)$$

按上述公式(2), 作 $(F_0 - F)^{-1} - C_q^{-1}$ 关系图, 得图 4, 并计算 25°C 和 37°C 下 3 α -HSD 与 NADH、Thio-NAD⁺ 的结合常数, 结果见表 2。

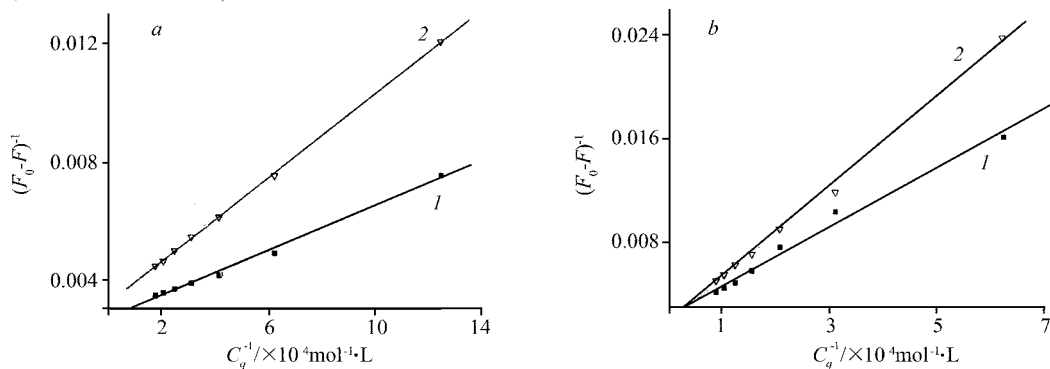


图 4 NADH、Thio-NAD⁺ 与 3 α -HSD 作用的双倒数图
a—NADH; b—Thio-NAD⁺; 1—25°C; 2—37°C。

表 2 3 α -HSD 与 NADH、Thio-NAD⁺ 的结合常数

复合物	<i>t</i> (°C)	<i>K</i> (L · mol ⁻¹)	<i>r</i>
3 α -HSD-NADH	25	7.38 × 10 ⁴	0.9972
	37	4.69 × 10 ⁴	0.9998
3 α -HSD-Thio-NAD ⁺	25	1.23 × 10 ⁴	0.9930
	37	9.74 × 10 ³	0.9986

从表中数据可以看出, NADH、Thio-NAD⁺ 与 3 α -HSD 均具有较大的结合常数, 说明结合作用较强; 其中, NADH 与 3 α -HSD 的结合作用强于 Thio-NAD⁺ 与 3 α -HSD 的结合作用, 这与直接从荧光猝灭图谱分析得到的结果一致。并且随着温度的升高, 二者结合常数呈下降趋势。

3.3 作用力类型

有机小分子和生物大分子之间的结合力主要有疏水作用力、范德华力、静电作用力和氢键作用等。当温度变化不大时, 反应的焓变 ΔH 可以看作一个常数。根据反应前后热力学参数之间的关系符合 Van't-Hoff 方程:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (4)$$

由公式(3)、(4)计算 NADH、Thio-NAD⁺ 与 3 α -HSD 结合的热力学参数, 结果见表 3。

表 3 3 α -HSD 与 NADH、Thio-NAD⁺ 结合的热力学参数

复合物	<i>t</i> (°C)	ΔH (kJ · mol ⁻¹)	ΔS (kJ · mol ⁻¹ · K ⁻¹)	ΔG (kJ · mol ⁻¹)
3 α -HSD-NADH	25	- 29.11	- 4.49	- 27.77
	37	- 29.11	- 4.49	- 27.72
3 α -HSD-Thio-NAD ⁺	25	- 15.01	27.94	- 23.33
	37	- 15.01	27.94	- 23.67

由上表可以看出, NADH、Thio-NAD⁺ 与 3 α -HSD 反应的 ΔG 均小于 0, 表明二者的结合是一个自由能降低的自发分子作用过程。研究表明 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 是典型的疏水作用; $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 是氢键和范德华力作用; $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ 是疏水作用和静电作用力^[2]。由此推测 NADH 与 3 α -HSD 以氢键和范德华力结合, 由于二者结合常数较大, 推断二者间一定存在氢键作用; 而 Thio-NAD⁺ 与 3 α -HSD 主要以疏水作用和静电作用力结合, 在本实验 pH = 7.98 的条件下, 3 α -HSD 的氨基酸残基主要带负电, 而 Thio-NAD⁺ 带正电荷, 从结构上推断二者之间一定存在静电引力作用。

3.4 3 α -HSD 构象的变化

固定激发波长与发射波长的间距 $\Delta\lambda$, 同步扫描激发和发射单色器可得同步荧光光谱, 这种光

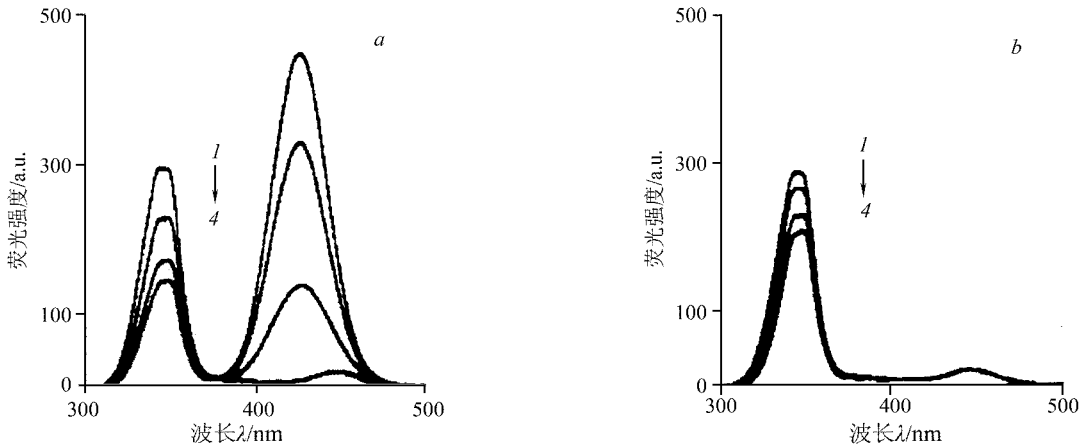


图 5 3 α -HSD-NADH 和 3 α -HSD-Thio-NAD⁺ 的同步荧光光谱

$\Delta\lambda = 60\text{nm}$, $t = 37^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7.98$, $C_{3\alpha\text{-HSD}} = 1\text{ku/L}$;

a — 3 α -HSD-NADH; $C_{\text{NADH}} (\mu\text{mol/L})$: 曲线 1—4: 0, 8, 16, 24

b — 3 α -HSD-Thio-NAD⁺; $C_{\text{Thio-NAD}^+} (\mu\text{mol/L})$: 曲线 1—4: 0, 16, 32, 48。

谱已被用于蛋白质构象变化的分析。3 α -HSD 的内源荧光主要表现为分子内色氨酸残基的发射, 当 $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ 的同步荧光光谱仅表现色氨酸残基的荧光, 且残基的最大发射波长与其所处环境之极性相关, 色氨酸处于疏水性介质时, 其 $\lambda_{\text{max}} = 331\text{nm}$, 部分暴露于水中时, 其 $\lambda_{\text{max}} = 341\text{nm}$, 而当它完全裸露于水相中时, $\lambda_{\text{max}} = 351\text{nm}$, 故可用色氨酸最大发射波长的改变来判断 3 α -HSD 构象的变化^[2]。当 $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ 时, 固定 3 α -HSD 的浓度, 逐渐增加 NADH 及 Thio-NAD⁺ 的浓度, 分别绘制其同步荧光光谱, 结果见图 5。可以看出, 3 α -HSD 色氨酸残基的最大发射波长在 345nm 左右, 这与所用 Tris 缓冲液为水相介质有关。由此可推断, 3 α -HSD 在缓冲溶液中可能有一定的伸展现象, 从而导致色氨酸残基虽处于分子内部疏水区, 但部分暴露在介质的亲水区。随着 NADH 及 Thio-NAD⁺ 的浓度的增大, 色氨酸同步荧光强度逐渐降低, 且其最大发射峰由 345nm 红移至 348nm, 表明在 NADH 和 Thio-NAD⁺ 作用下, 3 α -HSD 的构象发生了变化, 色氨酸残基所处环境的极性增大。

4 结论

本文采用荧光猝灭法获得了 NADH、Thio-NAD⁺ 与 3 α -HSD 结合作用的相关信息,为进一步研究 3 α -HSD 循环酶法测定胆汁酸这一复杂酶促反应的各步基元反应机理、从分子水平揭示这一复杂反应过程的本质奠定了基础。

辅酶 NADH、Thio-NAD⁺ 是生物体内许多氧化还原反应必需的辅酶,与其相关的脱氢酶有 300 多种^[1]。尤其是 NADH,被称为“生物火箭燃料”,够给细胞提供更多的能量,起着重要的“抗老化”作用,能调控神经细胞和修复 DNA。本文研究发现,NADH、Thio-NAD⁺ 能够有效猝灭 3 α -HSD 的内源性荧光,据此推断,可以采用荧光猝灭方法研究 NADH、Thio-NAD⁺ 与其他具有内源性荧光的生物大分子之间的结合作用,这对于深入揭示 NADH、Thio-NAD⁺ 在体内发挥作用的机制具有重要意义。

有关酶与小分子的反应机理研究一般集中在对于酶促反应的动力学研究,从分子水平角度研究酶与小分子作用的报道甚少,本研究发现对于具有荧光发射基团的酶和在该荧光发射波长范围内具有吸收的小分子,采用荧光猝灭法可以获得结合常数、结合作用力、构象变化等诸多反应机理信息。由于荧光猝灭法试剂用量极少,避免了昂贵的酶、辅酶等生化试剂的大量使用,因此该方法在酶与小分子作用机理的研究中是一类非常有潜力的分析方法。

参考文献

- [1] 刘慧娟,李鹏,张亚东等.叶酸与人血清白蛋白结合作用的光谱研究[J].光谱学与光谱分析,2009,29(7):1915—1919.
- [2] 马萍,迟燕华,庄稼等.骨螺紫及其铜配合物与人血清白蛋白相互作用的光谱学研究[J].高等学校化学学报,2009,30(8):1509—1515.
- [3] 尚永辉,吕华,孙佳娟等.光谱法研究芹菜素与牛血清白蛋白的相互作用[J].光谱实验室,2009,26(6):1414—1417.
- [4] 陈宁生,傅应强,张国庆等.荧光光度法研究金莲橙 G 与牛血清白蛋白的作用[J].光谱实验室,2010,27(5):1715—1719.
- [5] 张国文,陈秀霞,郭金保等.荧光法研究橙皮苷、淫羊藿苷与溶菌酶的相互作用[J].光谱学与光谱分析,2009,29(7):184—189.
- [6] 唐颖,尹艳,黄孟洪.全自动生化分析仪测定血清总胆汁酸的应用研究[J].中国误诊学杂志,2008,8(34):8391—8392.
- [7] 田甜.3 α -HSD 基因的克隆和表达[D].长春:吉林大学,2007.21.
- [8] 毕淑云,丁兰,宋大千等.几种抗生素与人血清白蛋白结合反应的研究[J].化学学报,2005,63(23):2169—2173.
- [9] 王晶,王静雪,林洪等.NADH 荧光法快速检测细菌总数[J].微生物学通报,2009,36(5):773—779.
- [10] Braun A M, Maurette M T. *Photochemical Technology*[M]. New York: Oliveros, E. Wiley, 1991. 41.
- [11] 陈国珍,黄贤智,许金钧等.荧光分析法[M].第2版.北京:科学出版社,1990.112.
- [12] 杨小弟,缪强,钱胜利等.铍盐存在下铝对辅酶 NADH 的结构的影响[J].光谱学与光谱分析,2005,25(1):79—82.

Study on the Interaction of NADH and Thio-NAD⁺ with 3 α -HSD by Fluorescence Quenching Method

LIAN Guo-Jun ZHAO Chang-Rong LIU Wen-Han^a FANG Fang CAO Jian-Ming

(Department of Environment Science and Public Health, Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325035, P. R. China)
(College of Chemical Engineering and Material Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, P. R. China)

Abstract The interaction of two coenzyme, reduced nicotinamide adenine dinucleotide(NADH) and oxidized thionicotinamide adenine dinucleotide (Thio-NAD⁺), with 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase(3 α -HSD) was studied by fluorescence quenching method. The fluorescence intensity of 3 α -HSD decreased after the addition of NADH or Thio-NAD⁺ and the quenching mechanism was static quenching with forming the complex. At 25 $^{\circ}$ C, the binding constants were $7.38 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ for NADH and $1.23 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ for Thio-NAD⁺, at 37 $^{\circ}$ C, the binding constants were $4.69 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ for NADH and $9.74 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ for Thio-NAD⁺. The binding power between NADH and 3 α -HSD were hydrogen bonding force and Van der force, whereas the binding power between Thio-NAD⁺ and 3 α -HSD were electrostatic force and hydrophobic force. The conformation of 3 α -HSD was changed by the addition of NADH or Thio-NAD⁺, the polarity of the environment about tryptophan residues in 3 α -HSD was increased.

Key words Fluorescence Quenching Method; 3 α -HSD; NADH; Thio-NAD⁺