

光谱法研究变性剂对苦荞麦蛋白质构象的影响

郭晓娜, 姚惠源

江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122

摘要 采用紫外差示光谱和荧光光谱研究了不同浓度的乙醇溶液和盐酸胍溶液对苦荞麦蛋白质(TBWSP31)构象变化的影响。研究表明, TBWSP31的色氨酸残基和酪氨酸残基有的位于分子内部, 有的暴露于分子表面。乙醇溶液使TBWSP31变性时, 仅仅是分子的外层结构发生了变化, 分子内部疏水核的变化较小, 高浓度的盐酸胍使位于TBWSP31分子内部疏水核的酪氨酸和色氨酸转移到分子表面, 暴露于溶剂中, 所处的微环境发生了很大的变化。

关键词 苦荞麦; 蛋白质; 结构; 紫外差示光谱; 荧光光谱

中图分类号: S157 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)06-1611-04

引言

蛋白质分子具有生色基团, 生色基团处于不同的微环境, 蛋白质的分子构象影响微环境的性质。改变蛋白质的分子构象, 其所处的微环境发生变化, 生色基团的紫外吸收光谱随之改变。采用紫外差示光谱检测生色基团紫外吸收光谱的变化, 研究其微环境的改变, 可以推断出蛋白质分子在溶液中的构象变化^[1]。

荧光光谱法可以研究蛋白质分子在溶液中的构象变化。它能够提供许多物理参数, 包括激发光谱和发射光谱、荧光强度、荧光寿命和量子产率。通过对这些参数的测定, 可推断蛋白质分子在各种环境下的构象变化, 研究蛋白质的结构和生理功能的关系^[2]。

在生命活动过程中, 不同的蛋白质具有不同的生理活性功能。蛋白质的活性功能不仅决定于蛋白质分子的一级结构, 更决定于其三维结构。因此对蛋白质的结构进行深入的研究是十分必要的, 这对于其生理活性功能的解释具有非常重要的意义。

本文采用紫外差示光谱和荧光光谱研究了不同浓度的乙醇溶液和盐酸胍对苦荞麦蛋白质构象变化的影响。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

ZOPR-52D冷冻离心机(日本 Hitachi Koki 公司); UV-

2800 紫外-可见分光光度计(海尤尼柯仪器有限公司); BSZ-100 自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂); HD-3 紫外检测仪(上海沪西分析仪器厂); SP2558 多功能光谱测量仪(美国 Roper Scientific Inc.); DEAE-Sepharose FF 和 Sephacryl S-200 购自瑞典 Pharmacia 公司; Sephadex G-100 购自上海华美生物工程公司; 所用试剂均为分析纯。

1.2 苦荞麦抗肿瘤蛋白的制备

采用硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sepharose FF 离子交换色谱、Sephadex G-100 凝胶过滤色谱对苦荞麦水溶性蛋白质逐步分离纯化, 并结合细胞实验, 筛选出苦荞麦蛋白 TBWSP31^[3]。

1.3 紫外差示光谱分析

紫外差示光谱研究了不同浓度的乙醇溶液和盐酸胍溶液对TBWSP31构象变化的影响。配制 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液(用 pH 7.0, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液溶解), 作为储液, 然后分别用乙醇溶液和盐酸胍溶液稀释, 最终样品浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

紫外差示光谱是在紫外-分光光度计上测定的^[4], 采用匹配的隔板式比色皿, 比色皿宽度 1 cm, 样品按照如下方式置入光路中。

参比光路: 样品溶液(未处理)和变性剂溶液; 样品光路: 含有样品的变性剂溶液和磷酸盐缓冲液; 扫描波长范围 200~300 nm。

1.4 荧光光谱分析

荧光光谱主要研究了不同浓度的乙醇溶液和盐酸胍溶液对TBWSP31构象变化的影响。样品处理见 1.3。分别以 280

收稿日期: 2010-06-22, 修订日期: 2010-09-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30900999)和高等学校博士学科点专项科研基金项目(200802951003)资助

作者简介: 郭晓娜, 女, 1978年生, 江南大学食品学院副教授 e-mail: gxn1978@hotmail.com; xiaonaguo@jiangnan.edu.cn

和 295 nm 的波长激发, 发射光波长 300~500 nm, 由多功能光谱测量仪测定^[5]。

2 结果与讨论

2.1 紫外差示光谱分析

蛋白质分子的生色基团处于不同的微环境。当生色基团位于蛋白质分子表面时, 改变所接触的溶剂极性, 生色基团的吸收峰则发生变化。当生色基团位于蛋白质分子内部的疏水性环境中时, 非极性溶剂对生色基团的吸收峰产生影响。改变生色基团的微环境, 其紫外吸收光谱随之发生变化, 吸收峰红移或蓝移, 变化后与变化前的光谱差即为紫外差示光谱。本实验采用紫外差示光谱研究了 TBWSP31 在不同浓度的乙醇溶液和盐酸胍溶液中的构象变化。

2.1.1 TBWSP31 在不同浓度乙醇溶液中的紫外差示光谱分析

TBWSP31 在不同浓度乙醇溶液中的紫外差示光谱如图 1 所示。在不同浓度的乙醇溶液中, TBWSP31 的紫外差示光谱在 225~240 nm 范围内出现吸收峰, 并且随着乙醇浓度的增大, 峰的吸收强度逐渐增大。

在紫外差示光谱中, 溶剂或邻近基团的极性对于分子中生色基团的吸收峰有很大的影响, 可以改变吸收峰的位置和吸收强度。一般来说, 减小溶剂极性, 吸收峰向长波方向移动, 称为红移。

紫外差示光谱中, 色氨酸在 220 nm 附近有强吸收峰^[6], 本实验在 225~240 nm 范围内出现吸收峰, 反映了色氨酸残基微环境的变化。可能的解释是 TBWSP31 经乙醇溶液处理后, 位于分子表面的色氨酸残基微环境的极性减弱, 导致色氨酸在 220 nm 附近的吸收峰红移, 在 225~240 nm 范围内出现吸收峰^[7, 8]。此外, 紫外差示光谱中强吸收正峰的出现同时也说明乙醇溶液使 TBWSP31 变性时, 仅仅是分子的外层结构发生了变化, 分子内部疏水核的变化较小或不受影响^[9]。

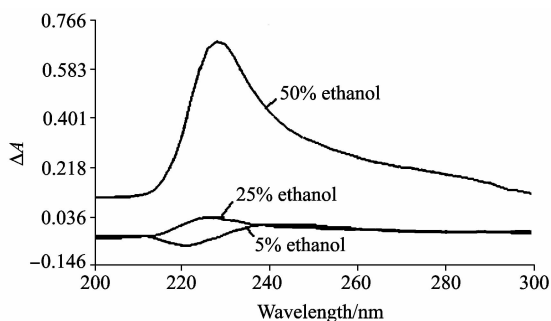


Fig. 1 UV differential absorption spectra of TBWSP31 in ethanol solution of various concentrations

2.1.2 TBWSP31 在不同浓度盐酸胍溶液中的紫外差示光谱分析

TBWSP31 在不同浓度盐酸胍溶液中的紫外差示光谱如图 2 所示。经过 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸胍溶液处理, TBWSP31 的紫外差示光谱只在 225 nm 附近出现正吸收峰; 经

过 1.5 和 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸胍溶液处理, 不仅在 225 nm 附近出现正吸收峰, 还在 235 nm 附近出现负吸收峰, 并且随着盐酸胍浓度的增大, 负峰的吸收强度增大。据文献报道, 色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸三种氨基酸残基发色基团的紫外吸收峰分别为 292 nm(吡啶环), 259 nm(苯环), 287 nm(苯酚环)^[10]。正峰的出现可解释为 TBWSP31 分子表面色氨酸残基微环境的极性减弱, 负峰的出现说明原来埋藏在分子内部的芳香族氨基酸转移到分子表面, 暴露到盐酸胍溶液中, 并且发生蓝移。也有学者认为, 235 nm 差吸收的变化可能与蛋白质 α -螺旋结构的变化直接相关^[11, 12]。

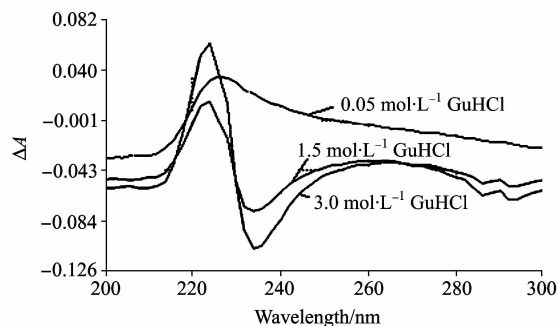


Fig. 2 UV differential absorption spectra of TBWSP31 in GuHCl solution of various concentrations

2.2 荧光光谱分析

在蛋白质分子中, 能发射荧光的氨基酸有色氨酸、酪氨酸以及苯丙氨酸。蛋白质的内源荧光主要来自色氨酸和酪氨酸残基^[13]。通常处于非极性环境中的色氨酸残基在 310~324 nm 附近有最大荧光发射峰, 包埋于蛋白质分子内部的色氨酸残基在 326~332 nm 之间有最大荧光发射峰, 而暴露于蛋白质分子表面的色氨酸残基在 350~353 nm 范围内具有最大荧光发射峰^[14]。色氨酸残基对微环境的变化很敏感, 并且大多数蛋白质都含有几个不同的色氨酸残基, 因而常作为内源荧光探针来研究溶液状态下蛋白质的构象。

2.2.1 TBWSP31 在不同浓度乙醇溶液中的荧光发射光谱分析

图 3(a)和(b)分别表示激发光为 280 和 295 nm 波长时, TBWSP31 在不同浓度乙醇溶液中的荧光发射光谱。从图中可知, TBWSP31(未处理)共出现 3 个吸收峰, 其中两个分别位于 331 和 351 nm, 副峰位于 380 nm 附近, 非常平缓。随着乙醇浓度的增大, 吸收峰的荧光强度逐渐增大, 峰的位置有所红移, 但幅度很小。331 nm 的荧光吸收峰来自分子内部的酪氨酸和色氨酸残基, 351 nm 的荧光吸收峰来自暴露于蛋白质分子表面的色氨酸残基。实验中 380 nm 附近出现平缓的副峰, 在所检索的文献中没有发现相关的报道, 推测其原因可能是由于蛋白质分子表面的酪氨酸残基和部分色氨酸残基发生了能量转移。从 3(b)可知, 当激发光为 295 nm 波长时, 吸收峰的位置基本上和激发光为 280 nm 波长时一致, 只是峰的吸收强度有所降低。

2.2.2 TBWSP31 在不同浓度盐酸胍溶液中的荧光发射光谱分析

图 4(a)和(b)分别表示激发光为 280 和 295 nm 波长时, TBWSP31 在不同浓度盐酸胍溶液中的荧光发射光谱。从图中可以看到, 0.5 mol · L⁻¹ 盐酸胍处理后的荧光光谱和未处理样品的荧光光谱十分相似, 说明在盐酸胍浓度较低时, TBWSP31 中芳香族氨基酸残基所处的微环境不受其影响或影响很小。继续增大盐酸胍浓度(1.5 和 3 mol · L⁻¹), 荧光光谱发生了很大的变化, 331 nm 的吸收峰强度降低, 并且逐

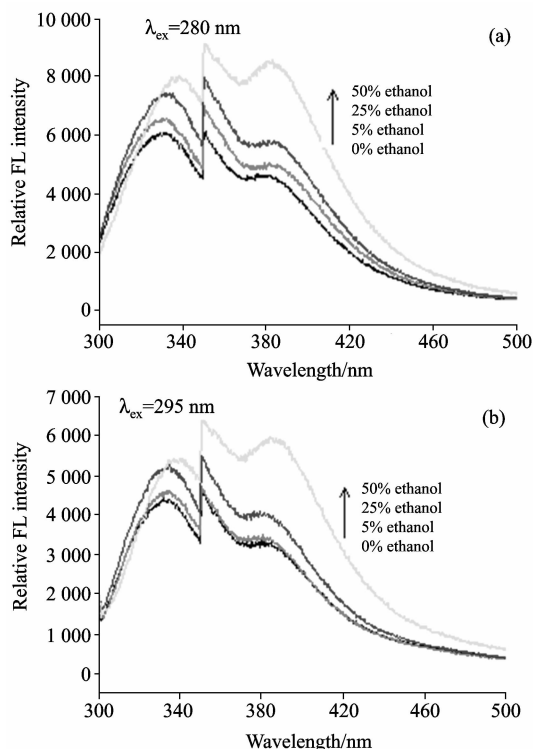


Fig. 3 Fluorescence emission spectra of TBWSP31 in ethanol solution of various concentrations

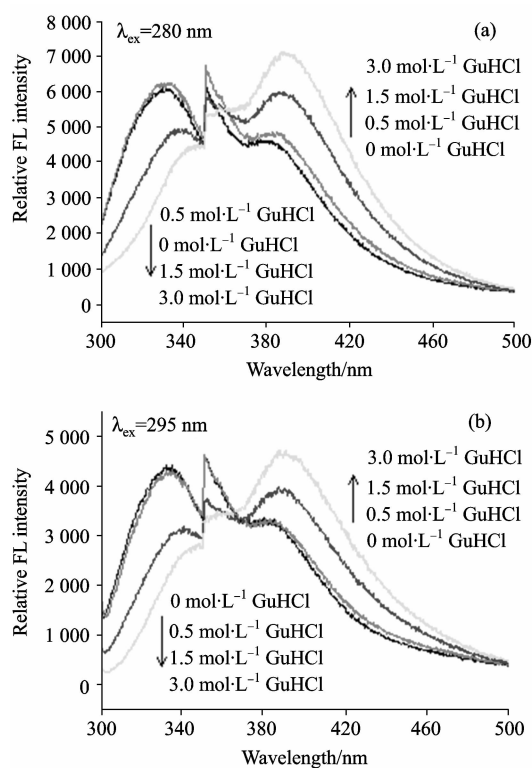


Fig. 4 Fluorescence emission spectra of TBWSP31 in GuHCl solution of various concentrations

渐红移, 在 385 nm 附近出现最大吸收, 这说明 TBWSP31 经高浓度的盐酸胍处理后, 位于蛋白质分子内部疏水核的酪氨酸和色氨酸转移到分子表面, 暴露于溶剂中, 所处的微环境发生了很大的变化。从图 4(b)可知, 当激发光为 295 nm 波长时, 吸收峰的位置基本上和激发光为 280 nm 波长时一致, 只是峰的吸收强度有所降低。

References

- [1] TAO Wei-sun, LI Wei, JIANG Yong-ming(陶慰孙, 李 惟, 姜涌明). Molecular Foundation of Protein(蛋白质分子基础). Beijing: Higher Education Press(北京: 高等教育出版社), 1995. 250.
- [2] GUO Yao-jun(郭尧君). Fluorescence Experimental Techniques and Its Application in Molecular Biology(荧光实验技术及其在分子生物学中的应用). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1983. 121.
- [3] Guo Xiaona, Zhang Hui, Yao Huiyuan. J. Agric. Food Chem., 2007, 55 (17): 6958.
- [4] JIAO Jin-an, TANG Xiao-yi, ZHA Jing-juan(焦进安, 汤小仪, 查静娟). Acta Phytophysiologica Sinica(植物生理学报), 1986, 12(3): 266.
- [5] GUO Wei, ZHENG Lü-yin, WU Yong-quan, et al(郭 维, 郑绿茵, 吴勇权, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2009, 3: 378.
- [6] LI Ying-qi, YANG Bin-sheng(李英奇, 杨斌盛). Chinese Journal of Inorganic Chemistry(无机化学学报), 2000, 6: 939.
- [7] LIN Qing-song, YAN Qing, YAN Si-xu(林青松, 颜 青, 颜思旭). Journal of Xiamen University(厦门大学学报), 1995, 34(4): 608.
- [8] LIN Qing-song, YAN Si-xu(林青松, 颜思旭). Journal of Xiamen University(厦门大学学报), 1994, 33(1): 100.
- [9] HUA Yu-fei, GU Wen-ying, SHEN Pei-ying, et al(华欲飞, 谷文英, 沈培英, 等). Journal of Wuxi University of Light Industry(无锡轻工大学学报), 1996, 15(2): 129.
- [10] Wetlaufer D B. Advance in Protein Chemistry, 1962, 17: 304.
- [11] Glazer A N, Smith E L. J. Biol. Chem., 1961, 236: 2942.
- [12] CHEN Qing-xi, YAN Si-xu(陈清西, 颜思旭). Chinese Biochemical Journal(生物化学杂志), 1991, 7(3): 301.

- [13] WANG Shou-ye, XU Xiao-long, LIU Qing-liang, et al(王守业, 徐小龙, 刘清亮, 等). Progress in Chemistry(化学进展), 2001, 13(4): 257.
- [14] Lakowicz J R. Principle of Fluorescence Spectroscopy. New York: Plenum Press, 1983. 341.

Spectrometric Study on the Effect of Denaturant on the Conformation of Tartary Buckwheat Protein

GUO Xiao-na, YAO Hui-yuan

School of Foodstuff, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract The effect of ethanol and GuHCl solution on the structure of tartary buckwheat protein(TBWSP31) was studied by UV differential absorption and fluorescence emission spectra. The alcohol denaturation of TBWSP31 was a kind of partial denaturation. The hydrophobic core of TBWSP31 remained intact and the conformation of the hydrophilic shell was changed. When TBWSP31 was denatured by GuHCl solution with higher concentration, Tyr and Trp residues were exposed to the polar aqueous solvents from the hydrophobic core, and the microenvironment showed a great change.

Keywords Tartary buckwheat; Protein; Structure; UV differential absorption spectra; Fluorescence emission spectra

(Received Jun. 22, 2010; accepted Sep. 15, 2010)