

⑦53-57

第1期
1998年3月无机化学学报
JOURNAL OF INORGANIC CHEMISTRYVol. 14, No. 1
March, 1998

皖南尖吻蝮蛇毒糖苷水解酶(NADase)的荧光光谱研究

刘清亮* 吴双顶 余华明 张祖德

(中国科学技术大学化学系, 合肥, 230026)

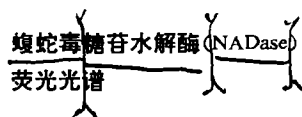
丁 兰✓

(长春应用化学研究所希土化学与物理开放实验室, 长春, 130022)

R996

本文用荧光光谱法研究了皖南尖吻蝮蛇毒糖苷水解酶(NADase)的性质。在 $\text{pH} < 6$ 时, pH 对 NADase 的荧光强度影响较大, 而在 $\text{pH} > 6$, pH 对 NADase 的荧光强度几乎没有什么影响, Cu^{2+} 的加入可引起 NADase 的内源荧光强度的降低, 通过荧光滴定测得 Cu^{2+} 与 NADase 结合常数 K_{BM} 为 $5.3 \times 10^3 (\text{mol/L})^{-1}$ 。 I^- 对 NADase 发光的淬灭作用很小, I^- 浓度为 0.1 mol/L 和 0.2 mol/L 时仅分别能淬灭为原来的 1% 和 3%, 但在 1 mmol/L EDTA 存在情况下, I^- 对 NADase 发光的淬灭作用非常显著, I^- 浓度为 0.1 mol/L 和 0.2 mol/L 时淬灭分别为原来的 25% 和 48%, 因此 Cu^{2+} 对维持 NADase 结构起重要作用。

关键词:



酸度

铜离子

碘离子

蛇毒

蛇毒是一种广泛的酶源, 近年来蛇毒的研究在神经生物学、免疫学、医学上已有很大进展。对蛇毒的研究已不再局限于分离纯化和一般理化性质, 很多研究工作已深入到蛋白质结构和功能的相关性。了解蛇毒组分的结构和功能之间的关系, 是最终利用蛇毒资源的基础。糖苷水解酶(NADase)广泛存在于许多微生物、动物的各种组织和毒液中, 能催化水解 NAD 为等摩尔的尼克酰胺和腺嘌呤二磷酸核糖。早在 1975 年 Tatsuki 等就报道了从蛇毒中提取 NADase^[1]。后来 Yost 和 Anderson 又进一步从 B. Fasciatus 纯化了 NADase, 并作了一些研究^[2]。黄婉治等也从皖南尖吻蝮蛇(Agkistrondon Acutus)蛇毒提纯得到 NADase, 并对其理化性质及功能进行了研究, 表明 Cu^{2+} 起催化活性和稳定构象的作用^[3,4]。我们对皖南尖吻蝮蛇毒 NADase 中 Cu^{2+} 的周围配位结构作了研究, Cu^{2+} 结合部位为三个组氨酸咪唑 N 和另一个 N 原子或 O 原子组成非轴对称的配位平面^[5]。

本文报道了用荧光光谱法研究皖南尖吻蝮蛇毒 NADase 的溶液构象及其 Cu^{2+} 对它的影响。

1 材料和方法

1.1 皖南尖吻蝮蛇粗毒, 安徽省祁门蛇伤所提供。参照黄婉治等人的方法^[3]分离纯化得

收稿日期: 1997-01-03。 收修改稿日期: 1997-06-12。

中科院长春应化所希土化学与物理开放实验室基金和国家自然科学基金资助。

* 通讯联系人。

第一作者: 刘清亮, 男, 58 岁, 教授, 生物无机化学。

NADase。

1.2 实验中所用试剂均为国产分析纯或优级纯,所有溶液均用去离子水配制。

1.3 酸度对 NADase 内源荧光光谱的影响

在一组 0.02 mol/L Tris-HCl(含 0.1 mol/L NaCl)缓冲液中,加入 NADase,使其浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$,它们的 pH 值分别为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0。

1.4 Cu^{2+} 对 NADase 内源荧光光谱的影响及荧光滴定实验

0.2 $\mu\text{mol/L}$ NADase 溶解在 0.02 mol/L Tris-HCl pH7.4(含 0.1 mol/L NaCl)缓冲液中,向此组溶液中加入不等量的 Cu^{2+} 溶液,以达到所需的不同的 Cu^{2+} 系列浓度。

1.5 I^- 对 NADase 的荧光淬灭

0.2 $\mu\text{mol/L}$ NADase 溶解在 0.02 mol/L Tris-HCl、pH7.4(含 0.1 mol/L NaCl)缓冲液中,向此组溶液分别加入 0.1 mol/L KI、0.2 mol/L KI、0.1 mol/L KI+1 mmol/L EDTA、0.2 mol/L KI+1 mmol/L EDTA。

1.6 蛋白质浓度用紫外吸收光谱方法标定,均在日本产 Shimadzu UV-365 紫外可见分光光度计上进行;实验中所有荧光测定都在室温条件下日本产 Shimadzu RF-5000 荧光分光光度计上进行。

2 结果与讨论

2.1 酸度对 NADase 内源荧光光谱的影响

NADase 为含有 6 个 Trp 残基,24 个 Tyr 残基的蛋白质^[3]。图 1 比较了不同酸度条件下 NADase 的内源荧光光谱。以波长为 281.6 nm 光激发时,NADase 的发射峰位于 336 nm 处,不同酸度对 NADase 的荧光谱形状没有什么影响,但对其荧光强度(F)有些影响(见图 2)。这可能是与 NADase 中 Trp 残基的量子产率及 Tyr $\rightarrow$ Trp 能量传递有关。由于 pH 影响 NADase 所带的电荷分布状态,pH<6 时,由于氢离子对蛋白质分子内残基上的羟基和含氮基团的作用,会在蛋白质分子内的残基上出现正电荷的基团,导致 Trp 残基的发光效率变化,pH>6 时就可能不会改变其电荷分布,从而对 Trp 残基的发光效率影响不大。另外,Tyr $\rightarrow$ Trp 能量传递也可能受 pH 值变化的影响,从而导致 Trp 残基总的荧光强度在 pH<6 时随 pH 值的改变而变化较大,而在 pH>6 时随 pH 值的改变则变化较小。

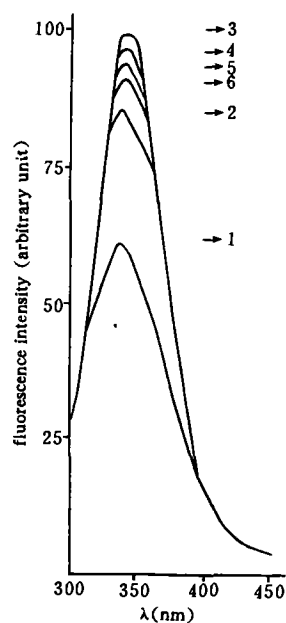


图 1 不同酸度条件下 NADase 的内源荧光光谱
Fig. 1 Fluorescence spectra of NADase at different pH
NADase concentration: 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 0.02 mol/L Tris-HCl buffer solution containing 0.1 mol/L NaCl. 1) pH4.0; 2) pH5.0; 3) pH6.0; 4) pH7.0; 5) pH8.0; 6) pH9.0; excitation wavelength: 281.6 nm

2.2 Cu^{2+} 对 NADase 内源荧光光谱的影响及荧光滴定

Cu^{2+} 对皖南尖吻蝮蛇毒 NADase 的结构和功能的影响非常重大^[4], CD 谱研究表明, 随着 EDTA 对酶分子中的 Cu^{2+} 的配位程度增加, 有序结构向无规卷曲的转变加强, 当酶溶液中存在 3.7 mmol/L EDTA 时酶活力几乎完全丧失。

从图 3 可以看出, Cu^{2+} 对 NADase 内源荧光有明显的影。铜离子对 NADase 荧光光谱形状无影响, 其发射峰仍在 336 nm 处, 但其强度明显下降。这一现象表明, NADase 中 Trp 残基周围介质的极性环境并没有因 Cu^{2+} 的存在而发生显著变化, 但可能 Cu^{2+} 与 NADase 结合而改变了 NADase 的结构, 导致了 Trp 残基的荧光效率降低, 也有可能 Cu^{2+} 与 Trp 残基相互作用, 它们之间发生了电子转移反应, 导致对 Trp 残基的荧光淬灭作用增大, 从而降低了 NADase 的荧光强度。

在一定 Cu^{2+} 浓度范围内, NADase 荧光强度随着溶液中 Cu^{2+} 浓度的增加而降低, 符合下面方程^[6]:

$$|\Delta F/F_E|/C_M = -K_{EM}(|\Delta F/F_E| - |\Delta F_{EM}/F_E|)$$

F_E 为不加 Cu^{2+} 时的 NADase 原始荧光强度, ΔF 为加入 Cu^{2+} 时的 NADase 荧光强度与 NADase 原始荧光强度之差, ΔF_{EM} 为 Cu^{2+} 浓度很大时, NADase 分子上的 Cu^{2+} 结合位点完全被 Cu^{2+} 占据时的 NADase 荧光强度与 NADase 原始荧光强度之差, C_M 为自由 Cu^{2+} 浓度, 由于 Cu^{2+} 总浓度 C_M^0 远大于 NADase 浓度, 所以可用 C_M^0 代替 C_M , K_{EM} 为 Cu^{2+} 与 NADase 结合常数可以从直线的斜率求得, 从图 4 可以求出在 pH 7.4 时结合常数 K_{EM} 为 $5.3 \times 10^3 (\text{mol/L})^{-1}$ 。

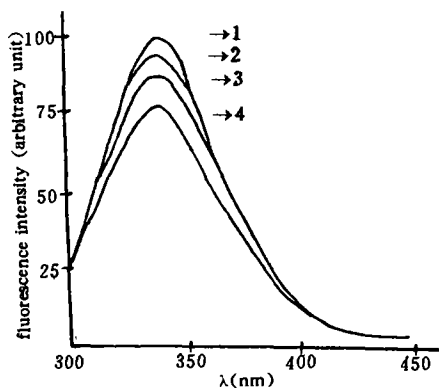


图 3 Cu^{2+} 对 NADase 内源荧光光谱的影响

Fig. 3 Effect of Cu^{2+} ion on the NADase fluorescence at pH 7.4, NADase concentration: 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 0.02 mol/L Tris-HCl buffer solution containing 0.1 mol/L NaCl; Cu^{2+} ion concentrations: 1) 0 $\mu\text{mol/L}$; 2) 10 $\mu\text{mol/L}$; 3) 20 $\mu\text{mol/L}$; 4) 40 $\mu\text{mol/L}$; excitation wavelength: 281.6 nm

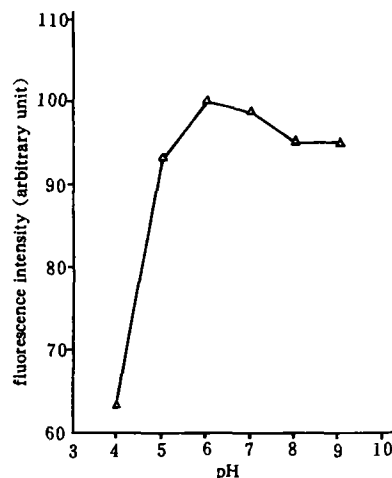


图 2 不同酸度条件下 NADase 的内源荧光光强度 (F) 对 pH 作图

Fig. 2 Plot of fluorescence intensity to pH

2.3 I^- 对 NADase 的荧光淬灭

KI 为一典型离子型淬灭剂,被广泛应用于荧光淬灭的研究,其机制一般认为:荧光生色团的单重激发态与 I^- 离子发生作用,使荧光生色团的受激电子从单重激发态跃迁到不能产生荧光的三重态上,引起荧光淬灭^[7]。

图 5 为加入 KI 或含 EDTA 的 NADase 荧光光谱。由图 5 可知,只向溶液加入 0.1 mol/L KI, 0.2 mol/L KI, 淬灭程度很低,其强度分别为不加 KI 时的 99%、97%。但再加入 1 mmol/L EDTA 时,淬灭程度大大提高,其强度分别为原始 NADase 荧光强度的 75%、52%。其原因可能是仅有 KI 存在时,由于 NADase 中 Trp 残基被深埋藏在分子内部, I^- 不能进入 Trp 残基周围,所以不能淬灭其荧光。但当向 NADase 溶液中加入 EDTA 时,由于 EDTA 夺取了 NADase 中的 Cu^{2+} ,从而使 NADase 的空间结构发生较大变化^[4],Trp 残基外露, I^- 可以到达 Trp 残基附近,与 Trp 发生自旋-轨道耦合作用,引起荧光淬灭,从这里也可以看出, Cu^{2+} 对维持 NADase 的结构具有重要作用。

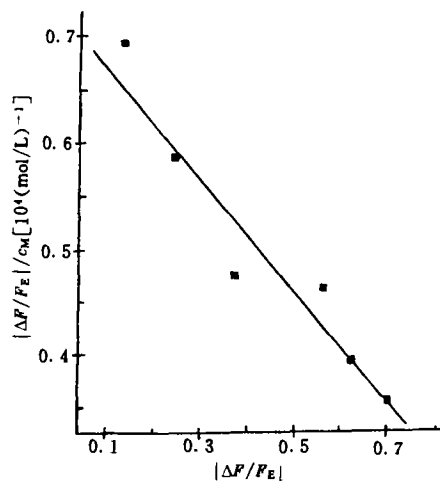


图 4 $|\Delta F/F_E|/C_M$ 对 $|\Delta F/F_E|$ 作图

Fig. 4 Plot of $|\Delta F/F_E|/C_M$ to $|\Delta F/F_E|$

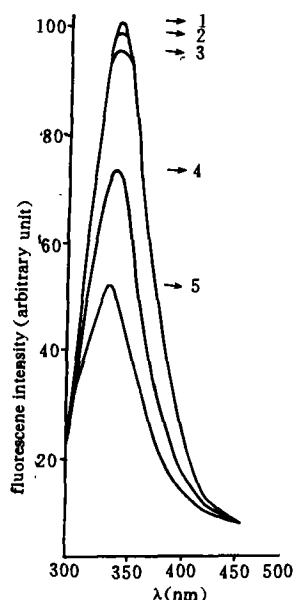


图 5 I^- 离子对 NADase 的荧光淬灭作用

Fig. 5 Fluorescence quenching of NADase by I^- ion; NADase concentration: 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 0.02 mol/L Tris-HCl buffer solution (pH = 7.4) containing 0.1 mol/L NaCl; 1) 0 mol/L KI; 2) 0.1 mol/L KI, 3) 0.2 mol/L KI; 4) 0.1 mol/L KI + 1 mmol/L EDTA; 5) 0.2 mol/L KI + 1 mmol/L EDTA; excitation wavelength: 281.6 nm

参 考 文 献

- 1 Tatsuki, T. et al *Toxicon*, 1975, 13, 211-220.
- 2 Yost, D. A.; Anderson, B. M. *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 3647-3653.
- 3 Huang W. Z. et al *Toxicon*, 1988, 26, 535-542.
- 4 黄婉治、王 淳、卢 明等,第三次全国生物无机化学学术讨论会论文摘要集, B₁₁, 广州, 1989.
- 5 刘清亮、陈立新、瞿保钧、梁任又、黄婉治, 无机化学学报, 1992, 8(2), 120.
- 6 Keizo, T. et al *J. Biochem.* 1981, 89, 13-20.
- 7 Eftink, M. R.; Ghiron, C. A. J. *Phy. Chem.*, 1976, 80, 483.

STUDIES ON THE NADase OF AGKISTRODON ACUTUS VENOM BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

Liu Qingliang Wu Shuangding Yu Huaming Zhang Zude

(Department of Chemistry, USTC, Hefei, 230026)

Ding Lan

(Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

In this paper, the properties of NADase, purified from Agkistrodon acutus venom, were studied by fluorescence spectroscopy. The fluorescence intensities of NADase is affected greatly by acidity when $\text{pH} < 6$, but weakly when $\text{pH} > 6$. The fluorescence intensity decreased when Cu^{2+} was added into the NADase solution. The binding constant (K_{EM}) of Cu^{2+} to NADase is determined as $5.3 \times 10^3 (\text{mol/L})^{-1}$ at $\text{pH} 7.4$ by the fluorescence titration of NADase with Cu^{2+} . The fluorescence intensities of NADase decrease about 1% or 3% when 0.1 mol/L I^- or 0.2 mol/L I^- is added into the NADase solution respectively. However the fluorescence intensities of NADase are quenched by about 25% or 48% with further addition of 1 mmol/L EDTA into above solutions. Cu^{2+} can maintained the structure of NADase.

Keywords: NADase acidity copper(II) ion iodine anion fluorescence spectroscopy