

7185-190

第2期
1999年3月无机化学学报
CHINESE JOURNAL OF INORGANIC CHEMISTRYVol. 15, No. 2
March, 1999

尖吻蝮蛇蛇毒出血毒素Ⅲ的荧光光谱

陈真龙^{a,b} 赵大庆^b 刘清亮^{a,b,*} 丁兰^b 张祖德^a 倪嘉缙^b(^a 中国科学技术大学化学系, 合肥 230026)(^b 中科院长春应用化学研究所稀土化学与物理开放实验室, 长春 130022)

皖南尖吻蝮蛇蛇毒经分离和纯化得到出血毒素Ⅲ(AaHⅢ), 质谱测定分子量为 23,284.4 ± 0.1。实验表明, Trp 残基较大程度位于 AaHⅢ 分子的疏水区。十二烷基磺酸钠(SDS)和盐酸胍的加入使 AaHⅢ 的分子构象发生变化, 导致分子内色氨酸(Trp)残基的荧光淬灭。盐酸胍的加入使 Trp 残基的荧光发射峰位明显红移, 表明位于 AaHⅢ 分子较疏水环境的 Trp 残基相对外露。我们还就酸度、EDTA 和金属离子对 AaHⅢ 分子内 Trp 残基荧光光谱的影响进行了研究和讨论。

关键词: 尖吻蝮蛇 出血毒素Ⅲ 荧光光谱
分类号: O629.73

R996.2

蛇毒

0 引言

尖吻蝮蛇蛇毒内含有许多种具有不同生物活性的蛋白质, 经过色层柱的分离和纯化, 可得到多种纯蛋白, 例如抗凝血因子(ACF)、糖苷水解酶(NADase)、纤溶组份(FP)和出血毒素等, 并研究了它们的许多生物活性、荧光光谱和结构的性质^[1-3]。Nikai^[4]、Sugihara^[5]和 Mori^[6]等分别从台湾尖吻蝮蛇蛇毒中分离出 5 种出血毒素。陶勇等^[7]从湖南尖吻蝮蛇蛇毒中分离出两种出血毒素 DaHT-1、DaHT-2。皖南尖吻蝮蛇蛇毒也含有多种出血毒素, 徐洵等^[8]从其中分离得到 AaHⅠ、AaHⅡ、AaHⅢ 并研究了它们的分子量、出血活性和金属含量等基本性质, 并确定 AaHⅢ 的分子量约为 22,000, 是一种碱性(pI>9)毒蛋白。我们也从皖南尖吻蝮蛇蛇毒分离纯化得到 AaHⅢ, 质谱法精确测定其分子量为 23,284.4 ± 0.1, 并研究了酸度、SDS、盐酸胍及金属离子对其荧光光谱的影响。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

皖南尖吻蝮蛇蛇毒, 安徽祁门蛇伤所提供。DEAE-Sephadex A-50, Sephadex C-50 为 Pharmacia 产品, 其它试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 1998-01-08。 收修改稿日期: 1998-04-03。

国家自然科学基金(No 29471027)和中科院长春应化所稀土与物理开放实验室基金资助项目。

* 通讯联系人。

第一作者: 陈真龙, 男, 26 岁, 博士生, 研究方向: 生物无机化学。

不同 pH 值的缓冲液: pH 2.5~3.5, Gly-HCl 缓冲液; pH 4.0~5.5, NaAc-HAc 缓冲液; pH 6.0, 磷酸缓冲液; pH 7.0~8.5, Tris-HCl 缓冲液; pH 9.0~12.0, Gly-NaOH 缓冲液, 以上各种缓冲液浓度均为 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 实验中所有溶液均用 Milli-Qsp 超纯水配制。

RF-5000 荧光分光光度计(岛津); 5060 型液相色谱仪(Varian 公司), G2000SW(30×7.5) 分离柱(日本, TOYO SDDA Manufacturing Co. Ltd); 激光解析飞行时间质谱仪 LD11700-MALDI-TOF-MS(Biomolecular, U. S. A); DY-A 型电泳仪(上海康达电子仪器厂); V16 夹心式垂直电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂)。

1.2 荧光光谱测定方法

用 RF-5000 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 3 nm, 发射狭缝为 5 nm。AaH III 的浓度为 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Trp 为 $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 测定时这两种样品均溶解在生理盐水缓冲液中。

2 结果

2.1 样品的分离纯化

2.1.1 样品的分离

根据徐洵等人的方法^[1]并加以改进, 粗蛇毒经 DEAE-Sephadex A-50 柱分离, 得到 14 个组分, 其中第一组分具有出血活性, 该组分再经 Sephadex C-50 柱分离得到 5 个细组分, 出血活性集中在第五细组分中, 即为 AaH III。

2.1.2 样品纯度的检验

分离纯化的 AaH III 在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳上为均一带, 高效液相色谱(HPLC)检测为单一峰。

2.1.3 分子量的测定

分离纯化的 AaH III 经激光解析飞行时间质谱仪测定的结果如图 1, 可精确得到 AaH III 的分子量为 $23,284.4 \pm 0.1$ 。由质谱图也可以看出, AaH III 是一纯蛋白。

2.2 AaH III 的荧光光谱

2.2.1 AaH III 的荧光光谱

在 pH 7.6 的 Tris-HCl 缓冲液中, 记录了 AaH III 的发射光谱(见图 2)。在最大激发波长 282.4 nm 及在 295 nm 处的荧光发射峰位均为 344 nm。

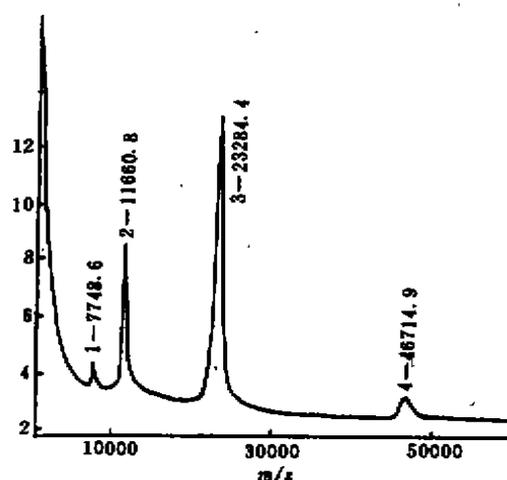


图 1 AaH III 的质谱图

Fig. 1 Mass spectrum of AaH III

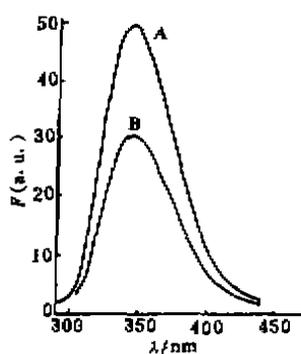


图 2 AaH II 荧光发射光谱
Fig. 2 Fluorescence emission spectra of AaH II
(A, λ_{ex} = 282.4 nm; B, λ_{ex} = 295 nm)

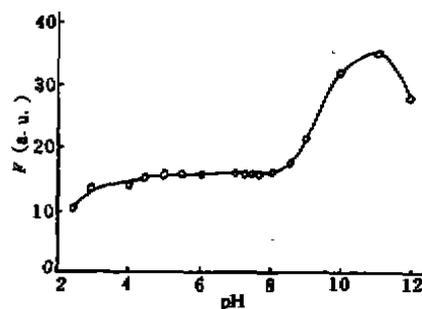


图 3 酸度对游离色氨酸荧光强度的影响
Fig. 3 Effects of acidity on the fluorescence intensities of free Trp
(λ_{ex} = 280.0 nm; λ_{em} = 355 nm, pK_a = 9.39)

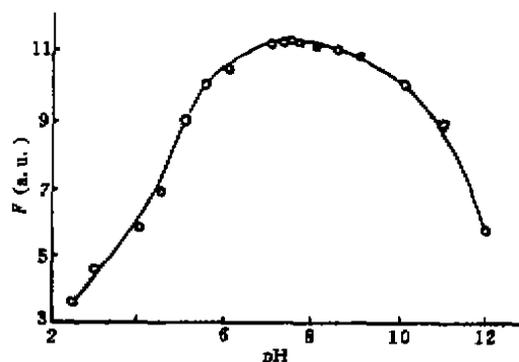


图 4 酸度对 AaH II 荧光强度的影响
Fig. 4 Effects of acidity on the fluorescence intensities of AaH II
(λ_{ex} = 282.4 nm; λ_{em} = 344 nm, $pI > 9$)

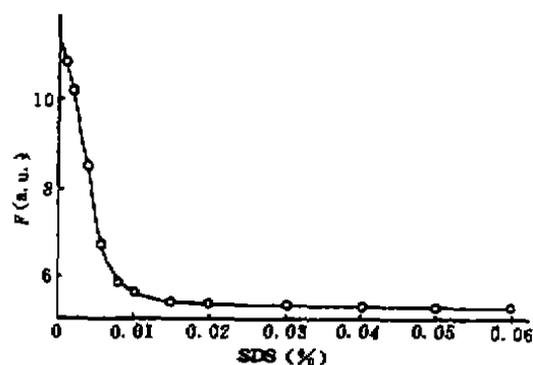


图 5 SDS 对 AaH II 荧光光谱的影响
Fig. 5 Effects of SDS on the fluorescence intensities of AaH II
(λ_{ex} = 282.4 nm; λ_{em} = 344 nm)

2.2.2 酸度对 AaH II 的荧光光谱的影响

游离 Trp 和 AaH II 的荧光发射强度与酸度的关系如图 3、图 4。可见 AaH II 和游离 Trp 的荧光强度随酸度的变化不完全一致。AaH II 的荧光强度在 pH 7.5 附近最大, 高或低 pH 时较小; 游离 Trp 的荧光强度在 pH 11.0 附近最大, pH < 8.0 时则变化不大。

2.2.3 SDS 和盐酸胍对 AaH II 的荧光光谱的影响

不同浓度的 SDS、盐酸胍对 AaH II 荧光光谱的影响如图 5、图 6。SDS 对游离 Trp 的荧光强度没有影响, 但一定浓度的 SDS、盐酸胍均使 AaH II 的荧光强度随其浓度的升高而下降。当 SDS 的质量百分比浓度升高到 0.03% 以上, 荧光强度趋于稳定, 荧光发射峰位始终为 344 nm; 随着盐酸胍浓度逐渐增大 (0 ~ 3.0 mol · L⁻¹), AaH II 的荧光发射峰位从 344 nm 红移至 357

nm。

2.2.4 EDTA 对 AaH Ⅲ 的荧光光谱的影响

测定了在不同浓度 EDTA 作用下 AaH Ⅲ 和游离 Trp 的荧光光谱(图 7)。结果表明 EDTA 对游离 Trp 的荧光强度没有影响; AaH Ⅲ 的荧光发射峰位始终为 344 nm, 而荧光强度却随 EDTA 浓度的增加而逐渐下降。

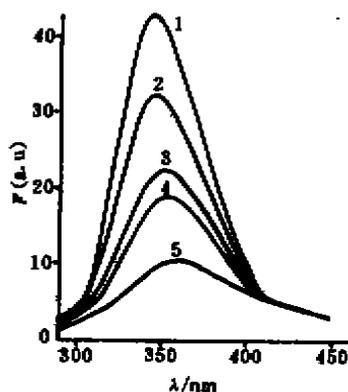


图 6 盐酸胍对 AaH Ⅲ 荧光强度的影响
Fig. 6 Effects of guanidine-HCl on the fluorescence spectra of AaH Ⅲ
(λ_{ex} = 282.4 nm; λ_{em} = 344 nm.)
(concentrations of guanidine-HCl: 1, 0; 2, 0.4; 3, 0.8; 4, 2.0; 5, 3.0 mol · L⁻¹)

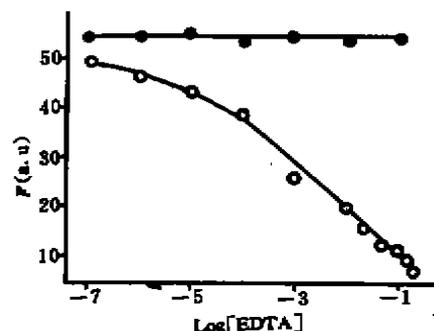


图 7 EDTA 对 AaH Ⅲ 的荧光强度的影响
Fig. 7 Effects of EDTA on the fluorescence intensities of free Trp and AaH Ⅲ
(●, Trp ○, AaH Ⅲ
Trp; λ_{ex} = 280.0 nm λ_{em} = 355 nm.
AaH Ⅲ; λ_{ex} = 282.4 nm λ_{em} = 344 nm)

2.2.5 金属离子对 AaH Ⅲ 的荧光光谱的影响

分别向 AaH Ⅲ 和经 EDTA 脱去金属离子并透析后的 AaH Ⅲ 中加入 6 种不同金属离子(见表 1)。其中 Cu²⁺ 对 AaH Ⅲ 的荧光强度影响最大。Cu²⁺ 以外的金属离子影响较小, 而 Zn²⁺ 比其它离子的影响稍大一些; AaH Ⅲ 经 EDTA 处理并透析后再加入金属离子, 只有 Ca²⁺ 使其荧光强度增大。6 种金属离子对蛋白的荧光发射峰位均无影响。

表 1 金属离子对 AaH Ⅲ 荧光强度的影响

Table 1 Effects of Metal Ion on the Fluorescence Intensities of AaH Ⅲ ($[M^{1+}]$: 1 mmol · L⁻¹)

metal ion	Ca ²⁺	Zn ²⁺	Co ²⁺	Mn ²⁺	Cu ²⁺	Mg ²⁺
F/F_0 (%)	98.24	95.29	98.97	100.17	9.41	98.82
F^*/F_0^* (%)	112.18	87.08	87.82	91.51	51.66	92.99

F, F_0 represent fluorescence intensities of AaH Ⅲ added and not added metal ions, respectively; F^*, F_0^* represent fluorescence intensities of apo-AaH Ⅲ added and not added metal ions, respectively

3 讨论

按 Bjarnason 等^[9]的分类方法, AaH Ⅲ 属于小分子量出血毒素。徐洵等^[8]用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测得 AaH Ⅲ 的分子量约为 22,000, 这种方法测定蛋白质分子量较粗略, 出现误差

的可能性较大。质谱法可以精确测定蛋白质的分子量,我们用该法测得 AaH III 的分子量为 $23,284.4 \pm 0.1$ (图 1)。

当激发波长为 295 nm 时,蛋白质分子中仅有 Trp 残基被激发并产生荧光。AaH III 的荧光光谱(图 2)说明该分子中存在 Trp 残基。当用既能激发 Trp 又能激发酪氨酸(Tyr)的 280 nm 波长的激发光时,在 AaH III 的荧光发射光谱中观察不到 Tyr 残基的荧光,可见 AaH III 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。实验测得游离 Trp 的发射峰位为 355 nm, AaH III 相对其 11 nm 的光谱蓝移意味着 AaH III 分子中 Trp 残基较大程度位于疏水的环境。

当 pH 大大低于或高于蛋白质的等电点时,会产生较多的净的正或负电荷。由于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 AaH III 在很低和很高 pH 时的分子构象松散,改变了 Trp 残基的微环境,从而使其荧光强度下降。AaH III 的荧光强度最大值不是出现在其等电点附近,而是在 pH 7.5 左右(图 4),与 AaH III 在此酸度附近的酪蛋白活性最大一致^[10],可能在此酸度时 AaH III 有一最适构象,这种最适构象有利于能量的吸收传递和再发射。

SDS 很容易与蛋白质分子结合并能使其肽链伸展。图 5 中随着 SDS 浓度增大,它可能破坏了 AaH III 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 AaH III 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 AaH III 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^[11]。

盐酸胍是蛋白质常见的变性剂,蛋白质在高浓度的盐酸胍介质中变性后,从有序结构转变为无序结构,发生去折叠过程^[12]。图 6 的实验表明 AaH III 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 AaH III 的荧光光谱有较大的变化,峰位明显红移(从 344 nm 红移至 357 nm),Stokes 位移也明显增大,同时荧光强度降低。这与 AaH III 的 Trp 残基位于较疏水环境的结论是一致的。

AaH III 是一种含锌金属蛋白酶,还含有 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等其它金属离子。加入的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 可能与蛋白的其它部位结合,EDTA 的加入配合了 AaH III 中的金属离子,它们均改变了该蛋白质分子原有的构象及 Trp 残基的微环境,从而使 AaH III 的荧光强度减弱(图 7)。CD 谱的结果^[16]也表明 EDTA 脱去金属离子后,AaH III 的二级结构发生了很大变化。EDTA 脱去 AaH III 中的金属离子后,再加入金属离子,只有 Ca^{2+} 使脱去金属离子后的 AaH III 荧光强度有所增大,是由于 Ca^{2+} 与 AaH III 分子的结合是可逆的,加入的 Ca^{2+} 重新结合到 AaH III 分子中原来的位点上,从而有一定程度回复到原来的构象。根据以上结果可以推断, Ca^{2+} 对维持 AaH III 分子天然构象有重要作用。

参 考 文 献

- [1] LIU Qing-Liang(刘清亮), XU Xiao-Long(徐晓龙), WANG Chun(王 淳) et al *Zhongguo Xitu Xuebao (J. Chinese Rare Earth Soc.)*, 1992, 10(2), 106.
- [2] LIU Qing-Liang(刘清亮), CHEN Li-Xin(陈立新), QU Bao-Gou(瞿保钧) et al *Wuxi Huaxue Xue bao (Chinese J. Inorg. Chem.)*, 1992, 8(2), 120.
- [3] XIA Wen-Sheng(夏文胜), LU Jing-Fen(卢景芬), LIU Hong-Yu(刘宏宇) et al *Shengwu Xuebao Yu Shengwu Wuli*

- Juzhen (Proce. Biochem. Biophys.)*, 1994, 21(6), 532.
- [4] Nika T., Sugihara H., Tanaka T. *J. Pharm. Soc. Japan*, 1977, 97, 507.
- [5] Sugihara H., Nika T., Kinoshita G. *J. Pharm. Soc. Japan*, 1980, 99, 1161.
- [6] Mori N., Nika T., Sugihara H. *Toxicol*, 1984, 22(3), 451.
- [7] TAO Yong(陶 勇), RAN Yong-Lu(冉永禄) *Shengwu Huaxue Zazhi (Chinese Biochem. J.)*, 1995, 11(2), 189.
- [8] XU Xun, WANG Chun, LIU Jing, et al *Toxicol*, 1981, 19(5), 633.
- [9] Bjarnason J. B., Fox, J. W. *Methods in enzymology*, 1995, 248, 345.
- [10] ZHU Xue-Yong(朱学勇), ZHU Zhong-Liang(朱中良), GONG Wei-Ming(龚为民) et al *Shengwu Xueye Yu Shengwu Wuli Xuebao (Acta Biochim. Biophys. Sinica)*, 1997, 29(2), 163.
- [11] TAO Wei-Sun(陶慰孙) Ed *Basis of Protein Molecules, 2nd Ed(蛋白质分子基础, 第二版)*, Beijing: Higher Education Publishing House, 1995, 321.
- [12] HU Chao-Hong(胡朝红), ZHOU Cheng-Lu(邹承鲁) *Zhongguo Kexue, B Ji, (Sci. China, Ser. B)*, 1982, 22(5), 497.

FLUORESCENCE SPECTRA OF HEMORRHAGIN II FROM THE SNAKE VENOM OF AGKISTRODON ACUTUS

CHEN Zhen-Long^{a,b} ZHAO Da-Qing^b LIU Qing-Liang^{a,b} DING Lan^a
ZHANG Zu-De^a NI Jia-Zan^a

(^aDepartment of Chemistry of University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

(^bLaboratory of Rare Earth Chemistry and Physics, Changchun Institute of Applied Chemistry, Changchun 130022)

Hemorrhagin II (AaH II) was separated and purified from the crude snake venom of *Agkistrodon acutus*, and its molecule weight was determined accurately to be $23,284.4 \pm 0.1$ by LD11700-MALDI-TOF-MS. Emission spectra of AaH II showed that Trp residues were located by a great degree in the hydrophobic area. Addition of SDS and guanidine-HCl led to change of the molecular conformation of AaH II, and caused the fluorescence quenching of Trp residues. The red-shifted emission band of AaH II after adding guanidine-HCl showed that Trp residues exposed in polar solvents. The effects of pH, EDTA and metal ions on the fluorescence spectra of AaH II were also investigated.

Keywords: *Agkistrodon acutus* hemorrhagin II fluorescence spectra