

铜(II)离子与神经红蛋白的相互作用

穆建帅 邱章磊 郭玉静 李海丽 李连之*

(聊城大学化学化工学院, 聊城 252059)

摘要: 利用紫外可见吸收光谱、荧光光谱、同步荧光光谱及圆二色(CD)光谱研究了铜(II)离子与神经红蛋白(NGB)的相互作用。结果表明, Cu^{2+} 离子使 NGB 在 280 nm 处的紫外吸收增强, 说明 Cu^{2+} 与 NGB 发生了相互作用; Cu^{2+} 使 NGB 内源性荧光发生猝灭, 其猝灭机制为静态猝灭; 同步荧光光谱表明, Cu^{2+} 使色氨酸微环境的疏水性有所降低, Cu^{2+} 对 NGB 的作用位点更接近于色氨酸; CD 光谱显示 Cu^{2+} 没有引起 NGB 二级结构明显的变化。

关键词: 铜(II)离子; 神经红蛋白; 紫外可见吸收光谱; 荧光光谱; 圆二色光谱

中图分类号: O629.73; Q518.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2010)02-0245-06

Interaction of Copper(II) Ion with Neuroglobin

MU Jian-Shuai QIU Zhang-Lei GUO Yu-Jing LI Hai-Li LI Lian-Zhi*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059)

Abstract: The interaction of copper(II) ion with Neuroglobin (NGB) was investigated by UV-Vis absorption spectra, fluorescence spectra, synchronous fluorescence spectra and circular dichroism (CD) spectra. The results show that Cu^{2+} can enhance the absorption intensity of NGB at 280 nm, intrinsic fluorescence of NGB is quenched with the addition of Cu^{2+} , which belongs to static fluorescence quenching. The synchronous fluorescence spectra indicate the slight change of the microenvironment of tryptophan residues and that the binding site is closer to tryptophan than tyrosine residues. The secondary structure of NGB has no obvious change with the addition of Cu^{2+} as shown in CD spectra.

Key words: copper(II) Ion; neuroglobin; UV-Vis absorption spectra; fluorescence spectra; CD spectra

神经红蛋白(Neuroglobin, NGB)是近期由德国科学家 Burmester 等^[1]在人和鼠中发现的一种新颖的珠蛋白, 它主要在脑、视网膜等神经组织中表达。人源神经红蛋白是由一条含 151 个氨基酸的多肽链和一个血红素 b 辅基构成。与血红蛋白和肌红蛋白相比, 其氨基酸序列的同源性虽然只有 20%~25%^[2], 但它们的空间结构却很相似^[3]。神经红蛋白中的血红素 Fe 在无外源配体存在时是六配位的, 即血红素 Fe 以 4 个吡咯 N 原子作为赤道配体、以蛋白肽链上的 2 个组氨酸(His64 和 His96)上的咪唑 N 原子作为

轴向配体形成八面体结构, 而血红蛋白和肌红蛋白中的血红素 Fe 则是五配位形式。新的结构必将赋予其新的性质和功能。研究表明, NGB 是一种低氧/缺血条件下诱导的神经组织蛋白, 当脑缺血时 NGB 的表达量增加, NGB 的高表达对神经红细胞具有保护作用^[4], 但关于 NGB 的确切生物学功能还不清楚。因此, 该蛋白的发现为生物无机化学工作者提出了新的课题, 对它的化学生物学基本问题的研究有助于了解其结构与功能之间的关系, 并为阐明它的生物功能提供线索。

收稿日期: 2009-09-27。收修改稿日期: 2009-11-08。

国家自然科学基金资助项目(No.20471025)。

*通讯联系人。E-mail: lilianzhi1963@163.com

第一作者: 穆建帅, 男, 24 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物无机化学。

至今,有关金属离子与 NGB 的相互作用未见报道。铜是生物必需的微量元素之一,在生命过程中起着重要的作用。特别是在神经系统中铜含量较高,铜与神经系统的正常生理功能和神经退行性疾病(如阿尔茨海默病和疯牛病)都密切相关。因此,研究铜离子与在神经系统中特异性表达的神经红蛋白之间的相互作用及对它的结构的影响,不但有助于进一步了解 Cu^{2+} 的生理功能,而且对 NGB 的基本化学生物学性质及其生物功能的探讨都具有十分重要的意义。关于含血红蛋白的生物分子与金属离子的相互作用机理有两种不同的作用方式:一是重金属离子能取代含血红蛋白的生物分子中铁卟啉的 Fe(II) 而使该分子的光谱性质发生变化^[5];二是重金属离子与生物分子中的多肽链相互作用,改变了多肽链的构象而使其光谱性质发生变化^[6]。本实验室已进行了 NGB 的基因表达、分离纯化和谱学表征,并对 NGB 的某些化学生物学性质进行了初步研究^[7]。本文运用紫外可见吸收光谱、荧光光谱、同步荧光光谱及圆二色光谱研究了 Cu^{2+} 与神经红蛋白的相互作用。实验结果显示, Cu^{2+} 以第二种作用方式与 NGB 发生反应,为了解金属离子与神经红蛋白相互作用提供了有用的实验数据和理论依据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

神经红蛋白(本实验室制备^[7],电泳纯),使用时配制成一定浓度的储备液(现配现用);硫酸铜(分析纯),配制成 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (均为分析纯),配制成 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲溶液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0);实验用水为去离子水。

HP8453A 型紫外可见阵列二极管分光光度计(USA),LS55 型荧光分光光度计(Perkin Elmer, USA),Jasco J-810 圆二色光谱仪(Japan)。

1.2 实验方法

1.2.1 紫外可见吸收光谱的测定

取一定量 NGB 母液与不同试管中,用 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 (pH 7.0)缓冲溶液稀释,再分别加入不同量的 CuSO_4 溶液。每个试管中 NGB 的终浓度为 $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,混合均匀后,使之充分反应。以磷酸盐缓冲溶液作参比,于 1 cm 的石英比色皿中测定室温下不同物质的量比的 Cu^{2+} 与 NGB 相互作用的紫外可见吸收光谱。

1.2.2 荧光光谱的测定

将所配 1.2.1 溶液以 280 nm 为激发波长,于 LS 55 型荧光分光光度计记录荧光发射光谱。激发和发射狭缝均为 10 nm ,扫描速度 $300 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$,所有光谱均扣除了其本底溶液的干扰。

1.2.3 同步荧光光谱的测定

将所配 1.2.1 溶液,在 LS 55 型荧光分光光度计上利用同步荧光模式扫描同步荧光光谱。固定激发波长和发射波长间隔 $\Delta\lambda$ 分别为 20 和 80 nm ,扫描速度 $300 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$,激发和发射狭缝均为 10 nm 。

1.2.4 圆二色光谱的测定

取一定量 NGB 母液与不同试管中,用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 (pH 7.0)缓冲溶液稀释,再分别加入不同量的 CuSO_4 溶液。每个试管中 NGB 的终浓度为 $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,混合均匀后,使之充分反应,进行圆二色光谱测定。光源系统用氮气保护(流量为 $5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$),采用 1 mm 光径样品池,光谱扫描时均扣除溶液空白的干扰,测量参数为:扫描波长范围为 $190 \sim 250 \text{ nm}$,扫描速度为 $100 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$,分辨率 0.1 nm ,响应时间为 1 s ,狭缝宽度 1 nm ,累计次数为 3 次。

2 结果与讨论

2.1 紫外可见吸收光谱

一般来说氨基酸的微环境由蛋白质分子的构象决定,蛋白构象改变,微环境改变,生色基团的吸收光谱随之发生改变,因此由光谱特征的变化可获得蛋白质构象变化的信息^[8]。NGB 在 280 nm 处的吸收峰是其肽链上的色氨酸和酪氨酸的芳香环 π - π^* 跃迁引起的。

由图 1 可见,随着 Cu^{2+} 浓度的增加,NGB 在 280 nm 处的吸收强度逐渐增强。 280 nm 处的吸收峰发生明显的增色效应,说明 Cu^{2+} 与 NGB 发生了相互作用,而这种作用有利于 π - π^* 跃迁的发生。这与文献报道 Cu^{2+} 与肌红蛋白的研究结果类似^[9]。氧化态 NGB 在 413 nm 处有强吸收峰,它对应于金属卟啉的 Soret 吸收带^[10],是电子在卟啉环中非定域化 π 电子轨道跃迁($\pi \rightarrow \pi^*$)的结果^[11]。图 1 所示,Soret 带的吸光度略微减小,并且峰位没有发生移动。这说明铜离子作用于 NGB 后对血红素环境产生轻微的影响,但是并没有替换出血红素中的铁离子。这和以前报道的五配位的肌红蛋白中血红素铁可被 Cu^{2+} 替换不同^[12],表明六配位神经红蛋白的稳定性。

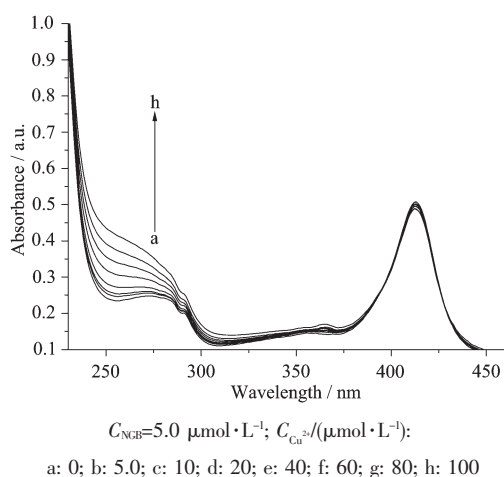


图1 Cu^{2+} 与神经红蛋白相互作用的吸收光谱
Fig.1 UV-Vis absorption spectra of the interaction of Cu^{2+} with NGB

2.2 荧光光谱

蛋白质分子产生荧光的结构基础在于它本身的(内源性)荧光基团:色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸^[13]。蛋白质的荧光一般是在吸收最大值的波长 280 nm 附近激发,因此,在多数实验条件下不能激发苯丙氨酸。此外,蛋白质中的苯丙氨酸的量子产率低,实际上也很少能观察到该氨基酸的发射,大多数蛋白质的荧光主要来源于色氨酸和酪氨酸残基。在 280 nm 激发时,大多数天然蛋白质的荧光发射主要归于色氨酸残基的荧光或色氨酸与酪氨酸残基的共同贡献^[14]。蛋白质的内源荧光变化在一定程度上可反应蛋白质中荧光生色团微环境的变化^[15]。

由图 2 可以看出,280 nm 激发下,NGB 的荧光最大发射峰出现在 343 nm 处。随着 NGB 溶液中

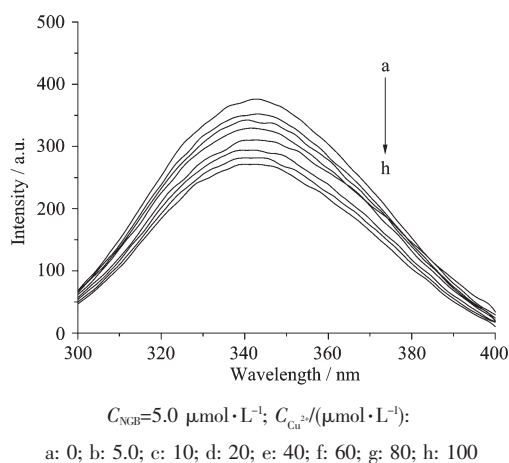


图2 Cu^{2+} 和 NGB 相互作用的荧光光谱图
Fig.2 Fluorescence spectra of the interaction of Cu^{2+} with NGB

Cu^{2+} 浓度的增加,荧光最大发射峰位没有产生位移,而荧光强度逐渐降低,出现有规律的猝灭。这说明 Cu^{2+} 与 NGB 分子存在相互作用,发生了能量转移,且 Cu^{2+} 作用使荧光生色团的微环境发生改变。也就是说, Cu^{2+} 与 NGB 的相互作用使 NGB 的分子构象发生了变化。

2.2.1 荧光猝灭机理

荧光猝灭作用因机制不同可分为静态猝灭作用和动态猝灭作用。静态猝灭是猝灭剂和荧光物质在基态时生成不发光的配合物,从而导致荧光强度降低的过程。动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间的相互作用,是与自身的发射过程相竞争从而缩短激发态寿命的过程。假设荧光体与猝灭剂的荧光猝灭为动态猝灭,则该猝灭服从 Stern-Volmer^[16]方程:

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0C_Q = 1 + K_{sv}C_Q \quad (1)$$

式中, F_0 和 F 分别为未加入猝灭剂 Q 及加入猝灭剂 Q 时 NGB 溶液的荧光强度; K_q 为双分子猝灭常数; τ_0 为猝灭剂不存在时生物分子平均寿命约为 10^{-8} s; K_{sv} 为 Stern-Volmer 猝灭常数; C_Q 为猝灭剂 Q 的浓度;显然 $K_{sv} = K_q\tau_0$ 。

根据公式(1),将 F_0/F 对 Cu^{2+} 的浓度作图,得到 Cu^{2+} 对 NGB 荧光的 Stern-Volmer 猝灭曲线(见图 3)。由图 3 可以看出, Cu^{2+} 对 NGB 荧光的 Stern-Volmer 猝灭曲线是一条直线。由直线斜率求得 K_{sv} 为 $3.29 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,那么 K_q 为 $3.29 \times 10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。而各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数为 $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[15]。显然, Cu^{2+} 对 NGB 荧光猝灭常数大于此值,这说明此猝灭过程不是因为分子扩散和碰撞所引起的动态猝灭,而是分子之间结合形成复合物所引起的静态猝灭。动态猝灭只影响荧光分子

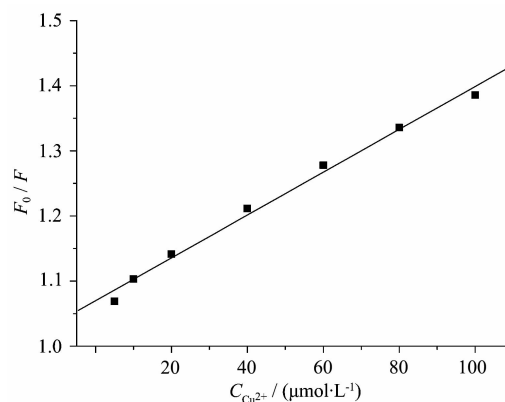


图3 Cu^{2+} 对 NGB 荧光的 Stern-Volmer 图
Fig.3 Stern-Volmer plot of Cu^{2+} to fluorescence of NGB

的激发态,并不改变荧光物质的电子吸收光谱,而如果生成复合物则引起荧光物质的电子吸收光谱的变化^[17]。由图 1 的吸收光谱可见,加入 Cu^{2+} 后, NGB 的 280 nm 处的吸收强度增加,吸收峰的形状也发生了变化,进一步说明 Cu^{2+} 对 NGB 的猝灭是静态猝灭。

2.2.2 结合常数和结合位点数^[18]

设 NGB 与 Cu^{2+} 形成 n 个相同且独立的结合位点的复合物,且这种复合物无荧光。则 NGB(设为 B)与猝灭剂 Cu^{2+} (设为 Q)间的猝灭反应可表示为: $n\text{Q} + \text{B} = \text{Q}_n\text{B}$, 其结合常数为:

$$K_A = \frac{C_{\text{Q}_n\text{B}}}{C_{\text{Q}}^n C_{\text{B}}} \quad (2)$$

C_{B} 是游离荧光体浓度, C_{Q} 是猝灭剂浓度, $C_{\text{Q}_n\text{B}}$ 是复合物的浓度。若荧光体总浓度为 $C_{\text{B},0}$, 则 $C_{\text{B},0} = C_{\text{B}} + C_{\text{Q}_n\text{B}}$, 代入(2)式得:

$$K_A = \frac{C_{\text{B},0} - C_{\text{B}}}{C_{\text{Q}}^n C_{\text{B}}} \quad (3)$$

在静态猝灭过程中,荧光复合物不发荧光,因此荧光体系的荧光强度 F 与荧光体的游离浓度成正比:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{C_{\text{B}}}{C_{\text{B},0}} \quad (4)$$

由(3)式和(4)式得:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg C_{\text{Q}} \quad (5)$$

作 $\lg[(F_0 - F)/F] \sim \lg C_{\text{Q}}$ 图, 得出猝灭体与荧光体分子的结合常数 K_A 和结合位点数 n 。求得 Cu^{2+} 与 NGB 的结合常数 K_A 为 68.8, 结合位点数 n 为 0.5657。而 Cu^{2+} 与肌红蛋白的结合常数 K_A 为 3.74×10^3 , 结合位点数 n 为 0.9596^[9]。这说明 Cu^{2+} 与 NGB 的结合较肌红蛋白弱, 可能是由 NGB 六配位结构的高稳定性和

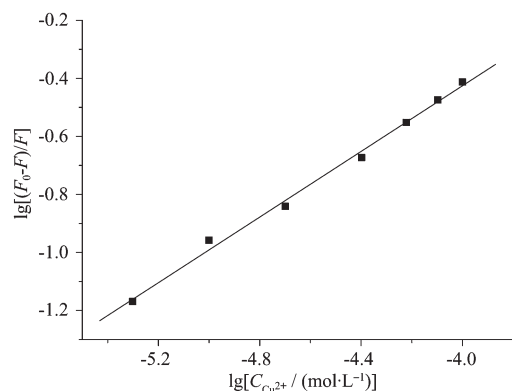


图 4 双对数图

Fig.4 Double-logarithm plot

氨基酸序列所决定的。

2.3 同步荧光光谱

在蛋白质分子内的 3 种内源荧光生色团中,常用色氨酸荧光变化来跟踪蛋白构象的变化。在普通荧光发射光谱中,3 种内源荧光生色团的发射荧光有时会发生重叠而难以区分,但同步荧光光谱能将其分开。固定激发波长和发射波长间距($\Delta\lambda$),同步扫描激发波和发射波,即可得到同步荧光光谱图。蛋白质的同步荧光光谱已被用来判断蛋白质的构象变化。图 5 所示,由 $\Delta\lambda=20$ nm 所得到的 NGB 的同步荧光光谱最大峰位在 309 nm,其同步荧光光谱是由酪氨酸残基贡献的;由 $\Delta\lambda=80$ nm 所得到的同步荧光光谱最大峰位在 354 nm 处,其同步荧光光谱是由色氨酸残基所贡献^[19]。

对于蛋白的同步荧光,一般说来红移表明蛋白质所处环境的疏水性降低。蓝移表明蛋白质所处环境疏水性增强^[20]。图 5 显示,随 Cu^{2+} 浓度的增加,同步荧光的荧光强度逐渐降低,这与图 2 中的内源荧光猝灭现象一致。酪氨酸的荧光最大发射峰位没变,

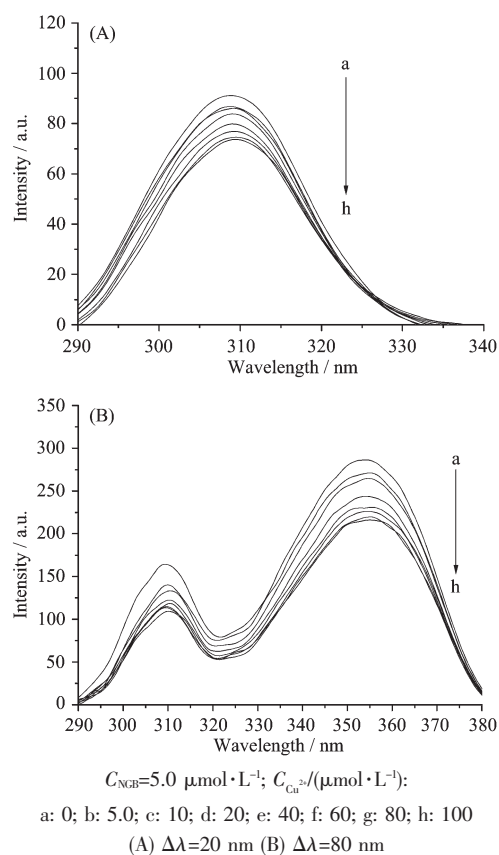


图 5 Cu^{2+} 和 NGB 相互作用的同步荧光光谱

Fig.5 Synchronous fluorescence spectra of the interaction of Cu^{2+} with NGB

而色氨酸的荧光最大发射峰位发生了轻微的红移,说明色氨酸所处的微环境疏水性有所降低。经计算发现色氨酸残基的荧光猝灭比酪氨酸残基更显著(见图6),说明 Cu^{2+} 与 NGB 相互作用的结合位点更接近于色氨酸残基。

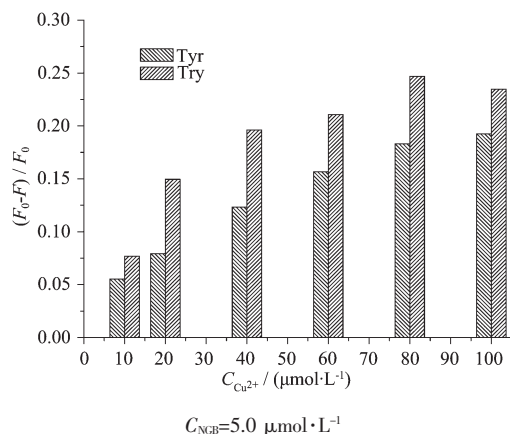


图6 Cu^{2+} 对NGB的色氨酸和酪氨酸的荧光猝灭效率图

Fig.6 Fluorescence quenching efficiency of Cu^{2+} to tryptophan and tyrosine residues of NGB

2.4 圆二色光谱

蛋白质在溶液中存在多种二级结构,如 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角以及无规卷曲等。加入金属离子后,由于金属离子和蛋白质发生相互作用,因此可导致蛋白质的二级结构发生变化。在蛋白质或多肽的规则二级结构中,肽键是高度有规律排列的,排列的方向决定了肽键能级跃迁的分裂情况,因此具有不同二级结构的蛋白质或多肽所产生的CD谱带的位置、吸收的强弱都不相同^[21]。因此,CD光谱可以灵敏地检测蛋白分子的二级结构变化。

如图7所示,NGB分子在192 nm有一正峰,

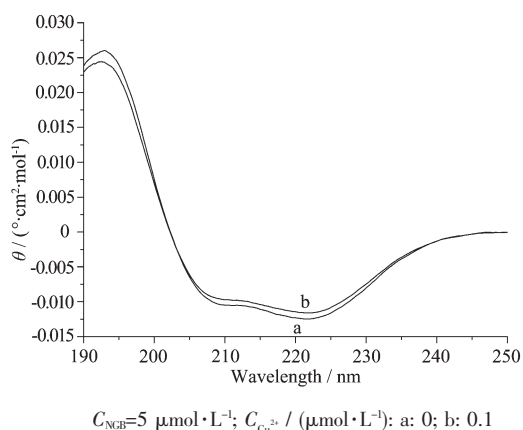


图7 Cu^{2+} 与NGB相互作用的远紫外圆二色光谱

Fig.7 Far-UV CD spectra of the interaction of Cu^{2+} with NGB

208和222 nm出现双负峰,这是蛋白质中典型的 α -螺旋结构的CD光谱特征。随着 Cu^{2+} 浓度的增加,CD光谱的正峰和双负峰的强度略有减少,而形状和峰位没有发生明显改变。通过CD光谱仪附带的杨氏法二级结构分析软件计算, α -螺旋的含量变化不大,由65.6%下降到64.9%,表明在铜离子的作用下NGB蛋白的二级结构没有明显的变化。与 Cu^{2+} 使肌红蛋白二级结构的明显改变相比^[9], Cu^{2+} 对神经红蛋白二级结构影响较小,也反映了六配位神经红蛋白的高稳定性。这与荧光光谱的研究结果是一致的。

3 结论

以上研究表明, Cu^{2+} 与神经红蛋白相互作用,使NGB在280 nm处的吸收强度增强;导致NGB的内源荧光的猝灭,猝灭机制为静态猝灭; Cu^{2+} 对神经红蛋白中色氨酸残基的荧光猝灭比酪氨酸残基更显著,表明 Cu^{2+} 与NGB相互作用的结合位点更接近于色氨酸残基; Cu^{2+} 使NGB色氨酸的微环境疏水性有所降低,说明NGB的分子构象发生了变化,但并没有引起蛋白二级结构的明显改变。同时,铜离子并没有取代血红素内部的铁离子,这与肌红蛋白中的血红素辅基发生的亚铁离子与铜离子的置换^[12]存在着显著的不同,这也从另一个方面反应了具有六配位结构的神经红蛋白的高稳定性。这些实验结果为研究金属离子与神经红蛋白相互作用提供了有用的实验数据,同时为进一步了解NGB结构与功能的关系提供了一定的参考。

参考文献:

- [1] Burmester T, Weich B, Reinhardt S, et al. *Nature*, **2000**,**407** (6803):520-523
- [2] Awenius C, Hankeln T, Burmester T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**,**287**(2):418-421
- [3] Pesce A, Dewilde S, Nardini M, et al. *Structure*, **2003**,**11**: 1087-1095
- [4] Sun Y, Jin K, Mao X O, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2001**,**98**(26):15306-15311
- [5] JIA Ying-Ping(贾颖萍), ZHENG Xue-Fang(郑学仿), HU Ji-Han (胡皆汉). *Spectrosc. Spect. Anal. (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, **2001**,**21**(1):54-56
- [6] WANG Xiao-Feng(王小锋), JIANG Hui-Jun(姜慧君), CHEN Ting-Ting(陈婷婷), et al. *J. Nanjing Nor. Univ.: Natural Science (Nanjing Shifan Daxue Xuebao: Ziran Kexue Ban)*, **2002**,**25**(2):123-124

- [7] LI Lian-Zhi(李连之), JI Hai-Wei(冀海伟), ZHAO Chao(赵超), et al. *Chin. Sci. Bull. (Kexue Tongbao)*, **2005**, **50**: 964-969
- [8] WU Dan(吴丹), XU Gui-Ying(徐桂英). *Acta. Phys.-Chim. Sin. (Wuli Huaxue Xuebao)*, **2006**, **22**(2):254-260
- [9] MA Jing(马静), ZHENG Xue-Fang(郑学仿), TANG Qian(唐乾), et al. *Chem. J. Chinese Universities (Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, **2008**, **29**(2):258-263
- [10] Dewilde S, Kiger L, Burmester T, et al. *J. Biol. Chem.*, **2001**, **276**(42):38949-38955
- [11] WANG Kui(王夔). *Bioinorganic Chemistry* (生物无机化学). Beijing: Tsinghua University Press, **1988**.
- [12] FENG Yu-Ying(冯玉英), YANG Hui(杨辉), GU Xiao-Tian(顾晓天), et al. *Spectrosc. Spect. Anal. (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, **2003**, **23**(3):532-534
- [13] Lakowicz J R. *Quenching of fluorescence, Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York : Plenum Press, **1983**. 342
- [14] Bismuto E, Irace G, Gratton E. *Biochem.*, **1989**, **28** (4):1508-1512
- [15] CHANG Xi-Jun(常希俊), HUANG Yan(黄艳), HE Qun(贺群). *Acta Chim. Sinica (Huaxue Xuebao)*, **2005**, **63**(3): 223-228
- [16] Hu Y J, Liu Y, Wang J B, et al. *Pharm. Biomed. Anal.*, **2004**, **36**(4):915-919
- [17] Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd Ed. Berlin: Springer, **2006**. 277
- [18] BIAN He-Dong(边贺东), LI Mei(李梅), YU Qing(于青), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2006**, **22**(5):845-850
- [19] Yin H, Toob H P, Chow G M. *Biomaterials*, **2005**, **26**(29):5818-5826
- [20] LIANG Yan-Qiu(梁彦秋), DENG Bin(邓斌), LIU Ting-Ting(刘婷婷), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2007**, **23**(4):688-692
- [21] SHEN Xing-Can(沈星灿), LIANG Hong(梁宏), HE Xi-Wen(何锡文), et al. *Chin. J. Anal. Chem. (Fenxi Huaxue)*, **2004**, **3**(32):388-394