

# N-溴代琥珀酰亚胺修饰菌紫质中色氨酸的光谱学研究

王哲琛\*, 钟声<sup>1</sup>, 张建平<sup>2</sup>, 胡坤生<sup>1</sup>

(1. 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101;

2. 中国科学院化学研究所分子动态与稳态结构国家重点实验室, 北京 100080)

**摘要:** 采用紫外-可见吸收光谱和荧光光谱方法研究了菌紫质 (Bacteriorhodopsin, bR) 中的 8 个色氨酸 (Tryptophan, Trp) 残基在被 N-溴代琥珀酰亚胺 (N-bromosuccinimide, NBS) 修饰过程中的残基数目及对应的光谱变化。研究结果显示: 随着 NBS/bR 摩尔比例增加逐渐被修饰的 Trp 残基有 4 个左右, 如果 NBS 过量, 则 Trp 残基的修饰个数最终可达 6~7 个; 伴随化学修饰出现 Trp 残基特征荧光峰值下降及峰位蓝移。研究结果揭示了 bR 中 Trp 残基可能的三种结构分布, 对于进一步弄清 bR 中 Trp-视黄醛 (Retinal) 偶联能量传递、单独 Trp 残基的荧光寿命和 Trp 残基在膜蛋白结构和功能中的作用具有积极而重要的意义。

**关键词:** 菌紫质 (bR); Trp 残基; N-溴代琥珀酰亚胺 (NBS); 紫外-可见吸收; 荧光  
**中图分类号:** Q632

## 1 引言

菌紫质 (Bacteriorhodopsin, bR) 是位于极端嗜盐菌 (*Halobacterium halobium*) 紫膜上的  $\alpha$ -螺旋七次跨膜蛋白, 与视觉中的视紫红质极其类似。bR 作为一种功能蛋白质, 是迄今为止所知道最为简单的光驱动质子泵。bR 具有突出的光致变色性能、瞬态光电响应性能和非线性光学性能, 是制造纳米生物器件最为理想的材料之一<sup>[1]</sup>。典型的光适应 bR 在 568 nm 可见区有吸收峰, 在 280 nm 紫外区也有吸收峰, 通过光谱分析可以得出蛋白质结构和功能及构象变化的众多信息<sup>[2]</sup>。Trp 残基和酪氨酸残基 (Tyrosine, Tyr) 是蛋白质中最重要的内源荧光发射源, Trp 残基在蛋白质中还具有膜锚定的功能<sup>[3-6]</sup>, 能促进膜组装<sup>[7]</sup>、形成和稳定离子通道或调节离子通道透性<sup>[8-11]</sup>等。bR 中有 8 个 Trp 残基和 11 个 Tyr 残基, 当用 295 nm 波长激发时, bR 在 321 nm 发射的荧光主要来自 Trp, Tyr 的荧光基本不起作用。8 个 Trp 残基分别是位于 A 螺旋的 Trp10 和 Trp12, 位于 C 螺旋的 Trp80 和 Trp86, 位于 E 螺旋的 Trp137 和 Trp138 以及位于 F 螺旋的 Trp182 和 Trp189<sup>[12]</sup>。其中 Trp86、Trp138、Trp182、Trp189 与视黄醛几乎直接接触形成 Trp-视黄醛能量传递体系<sup>[13]</sup>, 即视黄醛作为能量陷阱将 Trp 残基淬灭; 而 Trp10、Trp12、Trp80、Trp137 则距离视黄醛较远, 虽然也位于 25 nm 的分子能量传递极限距离之内, 但与视黄醛之间仅有

有限的部分能量传递<sup>[14]</sup>, 尤其是 Trp10、Trp12 处于膜表面, 在 295 nm 特征激发下具有较强烈的荧光发射峰, 它们是荧光发射的主要贡献者。本文应用紫外-可见吸收光谱和荧光光谱方法, 分别定量和定性研究了在 NBS 渐进式选择性化学修饰 bR 中 Trp 残基的过程中吸收光谱和荧光光谱的变化情况, 据此得到修饰的 Trp 残基个数并对 bR 中半淬灭和非淬灭 Trp 残基的性质作了进一步探讨。

## 2 材料与方法

### 2.1 样品处理

选用嗜盐菌 *Halobacterium Halobium* R<sub>1</sub>M<sub>1</sub> 菌种, 采用常规方法<sup>[15]</sup>培养分离得到纯化的紫膜碎片。实验中 bR 浓度为  $6.3 \times 10^{-6}$  mol/L, 明适应。NBS 是 sigma 公司产品。

### 2.2 样品的紫外-可见吸收光谱测定

使用日立公司生产的 U-2010 型紫外-可见分光光度计。采用室内空调的整体调控和测量仪器水浴循环系统的局部精确调控将温度维持在 25°C,

收稿日期: 2005-08-31

基金项目: 中国科学院重大项目 (KJ CX1-SW-07)

通讯作者: 胡坤生, 电话: (010)64888580,

E-mail: huks@sun5.ibp.ac.cn

\* 山东大学生命科学学院学生。

体系中为 pH 值 4.97 的 0.1 mol/L HAc-NaAc 缓冲液, 反应体系起始的体积为 2 ml, 然后用累加(类似于滴定)的方式逐次加入适量  $5 \times 10^{-4}$  mol/L NBS, 使每次加入 NBS 的物质的量为体系中 bR 分子的物质的量的整数倍。鉴于反应在 10 分钟之后趋于稳定, NBS 对 bR 处理的时间为 10 分钟(每隔 10 分钟加样并测量一次), 数据经朗伯-比尔定律修正, 以抵消体系体积的微量增加。

### 2.3 样品的荧光光谱测定

使用日立公司生产 F-4500FL 型荧光分光光度计。在测定完样品的紫外-可见吸收光谱后, 立刻测定荧光光谱。激发波长为 Trp 残基特征激发 295 nm。数据扣除水峰影响。

### 2.4 数据处理

根据以下公式<sup>[16]</sup>可以求出每个 bR 中被氧化的 Trp 个数:

$$\text{Trp 氧化个数} = \frac{dA_{280} \times 1.31}{5500 \times c \times l}$$

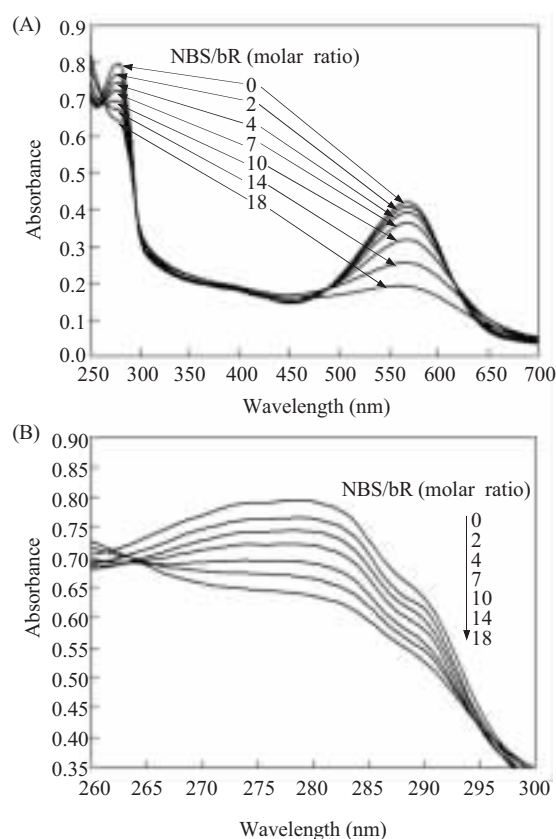
$dA_{280}$  代表天然与被修饰蛋白质在 280 nm 处的吸光度之差, 1.31 为经验常数, 5500 为 Trp 残基摩尔吸光系数,  $c$  代表蛋白质浓度,  $l$  代表比色皿光程。

光适应 bR 浓度的确定采用 570 nm 处特征摩尔吸光系数  $63000 (\text{mol/L})^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。所有数据图均采用 origin6.1 软件处理。

## 3 实验结果

### 3.1 紫外-可见吸收光谱结果

伴随 NBS 加入 bR 样品的吸光度变化, 如图 1A 所示。光谱的变化主要对应于三个波长范围, 分别是 250 nm 左右吸光度的上升, 280 nm 附近吸光度的下降和 568 nm 范围吸收峰位置的变化, 其中后两者的变化是我们主要关心的。图 1A 中的曲线是从连续变化的数据中选出的具有典型代表的曲线, 每条曲线基本代表 Trp 残基的氧化数增加一个。根据 280 nm 处峰值下降的比例, 可以确定氧化的 Trp 残基个数最多达到了 6~7 个; 568 nm 附近光谱指出当 Trp 残基氧化个数在 4 个以内时, 对 bR 特征吸收峰峰位没有明显影响; 氧化个数在 4~6 时, bR 特征吸收峰峰位蓝移。图 1B 是图 1A 在 260~300 nm 的局部放大, 明显可见 280 nm 处吸收峰值的规律性下降。



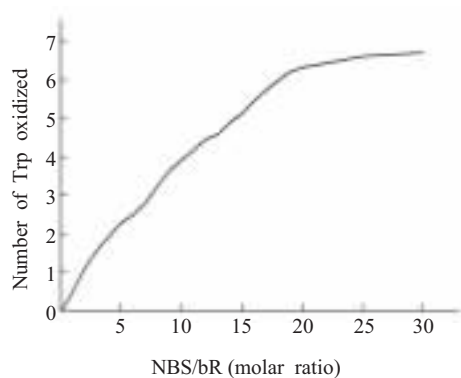
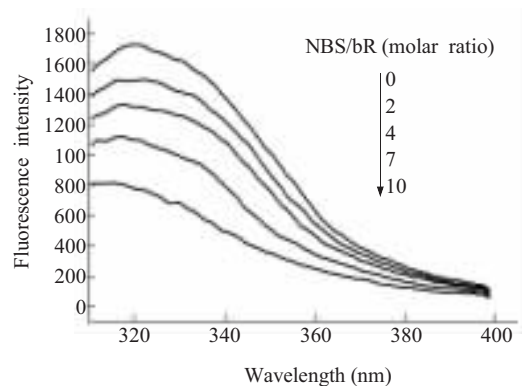
**Fig.1** The absorption curves of bR oxidized by NBS. (A) Wavelength-scanning from 250 to 700 nm, including 568 nm light-adopted bR characteristic apex; (B) The characteristic apex of Trp residues (260~300 nm). ( $[\text{BR}] = 6.3 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ;  $\text{pH} = 4.97$ )

表 1 展示了紫外-可见吸收光谱中的主要数据。其中选取的数据行对应于图 1 的单条曲线。从图表可以看出, Trp 残基氧化个数为 2, 所需 NBS/bR 摩尔比为 4, 继续氧化至 4 则所需 NBS/bR 摩尔比增了 6, 再继续氧化至 6 所需 NBS/bR 摩尔比增加了 8。bR 的 568 nm 吸收峰位在氧化个数达到 4 个左右后发生了蓝移, 显示高浓度 NBS 会对整个蛋白产生影响。

伴随 NBS 加入, Trp 残基被氧化的速度逐渐缓慢(图 2)。Trp 残基氧化个数从 1 至 6 分别对应 NBS/bR 摩尔比值为: 1.87、4.15、7.55、10.3、14.3、18.1。由图中曲线可以看出 Trp 残基的氧化个数在 2 个以内时, NBS 氧化速度最快(斜率最大), 在 2~4 个时, 氧化速度略微降低, 而当 Trp 残基的氧化个数超过 4 个, 随着 NBS/bR 摩尔比的增加, 氧化难度加大, 氧化速度迅速下降, 最大的 Trp 残基氧化个数在 6 个左右, 再加入 NBS 很难

**Table 1** The UV-Vis absorption spectrum data of NBS-Oxidized Trp Residues in bR

NBS/bR (molar ratio)	280 nm absorbance	$dA_{280}$	Oxidized number	Characteristic apex (nm)
0	0.7953	0	0	568.5
2	0.7656	0.0297	1.12266	569.5
4	0.7437	0.0516	1.95048	569.5
7	0.7211	0.0742	2.80476	569.5
10	0.6917	0.1036	3.91608	569.5
14	0.6655	0.1298	4.90644	566.5
18	0.6371	0.1582	5.97996	564

**Fig.2** Number of oxidized trp residues corresponding to the different NBS/bR molar ratio. ([BR]= $6.3 \times 10^{-6}$  mol/L; pH=4.97)**Fig.3** The fluorescence spectrum of bR oxidized by NBS. The number of Trp residues oxidized is 1.12, 1.95, 2.8 and 3.92 corresponding to the NBS/bR molar ratio 2, 4, 7 and 10 respectively. ([BR]= $6.3 \times 10^{-6}$  mol/L; pH=4.97)

继续氧化 Trp 残基, 即具备质子泵功能的光适应 bR 中的 Trp 残基无法被 NBS 完全修饰。结论说明光适应 bR 中有 4 个左右 Trp 残基处于亲水或较为柔性的环境, 1~2 个 Trp 残基处于半柔性环境中, 还有 1~2 个 Trp 残基处于深层脂双层中极端疏水和缺乏柔性的环境。

### 3.2 荧光光谱结果

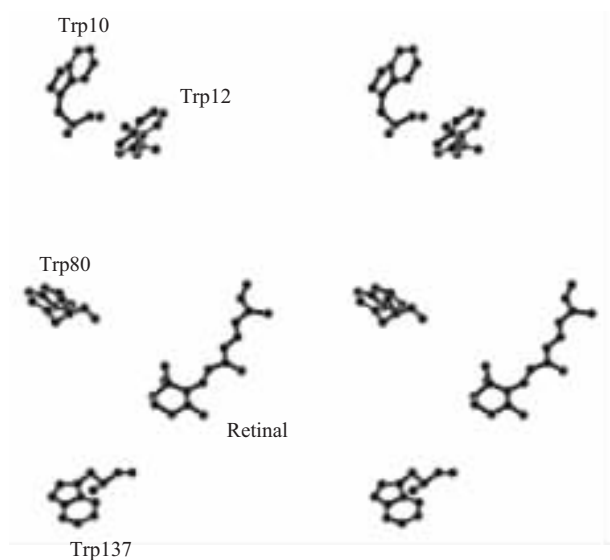
对应于 NBS 化学修饰 bR 中 Trp 残基的紫外-可见吸收光谱, 荧光光谱结果很好地说明了 Trp 残基逐渐被氧化的过程 (图 3)。与紫外-可见吸收光谱结果不同的是, 当氧化个数达到 4 个左右时, Trp 残基的荧光峰基本消失, 说明 295 nm 特征激发时, 在 bR 中荧光主要由 4 个 Trp 残基提供, 这 4 个 Trp 残基并不 (或很少) 被 Retinal 淬灭。另一方面, 发射峰峰位由起始的 321 nm 蓝移至 314 nm, 也从另一个侧面说明了 Trp 残基被修饰的顺序是由脂双层生物膜和膜蛋白的亲水或柔性环境向疏水或非柔性环境过渡<sup>[2]</sup>。

## 4 讨 论

Trp 残基在膜蛋白和细胞膜中的活性肽中发挥重要功能已经被广泛认同<sup>[3-11]</sup>。NBS 能够与蛋白质中的 Trp 残基侧链上的吲哚基团发生氧化还原反应<sup>[17]</sup>。NBS 氧化 Trp 残基时, 吲哚基团被氧化为酮式-烯醇式动态平衡的羟吲哚, 其吸收光谱由原来的 280 nm 蓝移至 250 nm, 因此其特征吸收峰消失, 对应 295 nm 的特征激发也消失, 而 250 nm 处吸光度增加。根据这一特点, 我们分别定量和定性进行了 NBS 渐进式选择性化学修饰 bR 中 Trp 残基的紫外-可见吸收光谱和荧光光谱的测定。本实验采用累加加样的方式, 虽然样品体系中离子强度会产生微弱变化<sup>[18]</sup>, 但并不影响实验结果。

本实验的结果表明, NBS 对 Trp 残基的修饰是一个渐进的过程。在光适应 bR 中存在的 8 个

Trp 残基中, 通过紫外 - 可见吸收光谱实验可以确定有 4 个左右处于亲水或较为柔性的环境, 1~2 个 Trp 残基处于半柔性环境中, 还有 1~2 个 Trp 残基处于深层脂双层中极端疏水和缺乏柔性的环境。另一方面, 荧光光谱结果说明 bR 中有 4 个左右的 Trp 残基具有较强的荧光发射效率, 剩余 4 个 Trp 残基只具有很弱荧光发射, 更多的是形成了 Trp-retinal 能量陷阱, 将 Trp 残基的荧光几乎完全淬灭。对应荧光光谱的测定和 Mita Roy 对 bR 中 Trp 残基的荧光组分的分析<sup>[19]</sup>可以初步确定最先氧化的 4 个 Trp 残基为 Trp10、Trp12、Trp80、Trp137 (见图 4), 由于 Trp10、Trp12 位于脂膜的外表面, 极有可能首先被 NBS 修饰, 从图 2 也可以看出修饰反应的起始阶段十分迅速, 前两个 Trp 残基被完全修饰时 NBS/bR 摩尔比值仅为 4, 荧光发射明显下降。紧接着被修饰的 Trp 残基可能为 Trp80 和 Trp137, 因为虽然 NBS 的修饰速度有所下降, 但仍然较快, 而且荧光发射也有所下降, 此实验结果与 Henderson、Kalisky 等人的工作<sup>[13,14]</sup>结果一致。



**Fig.4** The stereo images of retinal and the four partly-quenched or non-quenched Trp residues in bR. The distances between Retinal and the Trp residues' conjugated structure are 2.201 nm (Trp10)、1.765 nm (Trp12)、1.663 nm (Trp80) and 0.992 nm (Trp137) respectively

Trp86、Trp138、Trp182 和 Trp189 均位于同视黄醛直接接触的“视黄醛口袋”中, 但只有其中的两个 Trp 残基能够勉强被 NBS 修饰, 另外两个

很难反应, 这可能是由于它们所处的环境不同, 能够反应的 Trp 残基可能是处在一个较为柔性的环境或附近存在水分子<sup>[20,21]</sup>, 因而能够被 NBS 分子接触到。另外从吸收光谱可以看出, 当 Trp 残基修饰个数超过 4 之后, 伴随体系中 NBS 浓度的增加, bR 整体结构也明显受到影响, 这是因为高浓度的 NBS 也会对 bR 中的其它氨基酸残基产生影响, 甚至影响肽链的完整性<sup>[22]</sup>, 但在低浓度下这种影响可以忽略<sup>[23]</sup>。

本实验作为对 NBS 化学修饰 bR 中 Trp 残基的研究, 所得结果对于弄清 bR 中 Trp-Retinal 偶联能量传递、单独 Trp 残基的荧光寿命和 Trp 残基在膜蛋白结构和功能中的作用都具有积极而重要的意义。这一修饰过程的具体细节仍然有待于深入研究, 最终的理想结果是能够对某一个单独确定的 Trp 残基进行全面研究, 而这无疑是一种挑战<sup>[19]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 黄莹, 余福, 胡坤生. 紫膜蛋白(菌紫质)的应用前景. 生物化学与生物物理进展, 1993,20(4):263~266
- [2] Alexey SL. Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis. In: Meyers RA (Ed). Encyclopedia of analytical chemistry. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000. 5762~5779
- [3] Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B, Kehoe M, Palmer M. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol*, 1996,165:73~79
- [4] Vecsey-Semjen B, Lesieur C, Mollby R, Goot FG. Conformational changes due to membrane binding and channel formation by staphylococcal alpha-toxin. *J Biol Chem*, 1997,272: 5709~5717
- [5] Malovrh P, Barlic A, Podlesek Z, Macek P, Menestrina G, Anderluh G. Structure-function studies of tryptophan mutants of equinatoxin II, a sea anemone pore-forming protein. *Biochem J*, 2000,346:223~232
- [6] Montoya M, Gouaux E. Beta-barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of alpha-hemolysin. *Biochim Biophys Acta*, 2003,1609:19~27
- [7] Srinivasan S, Nichols CJ, Lawless GM, Olsen RW, Tobin AJ. Two invariant tryptophans on the alpha subunit define domains necessary for GABA(A) receptor assembly. *J Biol Chem*, 1999,274:26633~26638
- [8] Becker MD, Greathouse DV, Koeppe RE, Andersen OS. Amino acid sequence modulation of gramicidin channel function: effects of tryptophan-to-phenylalanine substitutions on the single-channel conductance and duration. *Biochemistry*, 1991,30:8830~8839
- [9] Hu W, Cross TA. Tryptophan hydrogen bonding and electric

- dipole moments: functional roles in the gramicidin channel and implications for membrane proteins. *Biochemistry*, 1995, 34:14147~14155
- [10] Koeppel RE, Andersen OS. Engineering the gramicidin channel. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1996,25:231~258
- [11] Sham SS, Shobana S, Townsley LE, Jordan JB, Fernandez JQ, Andersen OS, Greathouse DV, Hinton JF. The structure, cation binding, transport, and conductance of Gly(15)-Gramicidin A incorporated into SDS micelles and PC/PG vesicles. *Biochemistry*, 2003,42:1401~1409
- [12] Mogi T, Marti T, Khorana HG. Structure-function studies on bacteriorhodopsin. *J Biol Chem*, 1989,264:14197~14201
- [13] Henderson JM, Baldwin TA, Ceska F, Zemlin E, Beckman, Downing KH. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol*, 1990,213:899~929
- [14] Kalisky O, Fietson J, Ottolenghi M. Photochemistry and fluorescence of bacteriorhodopsin excited in its 280-nm absorption band. *Biochemistry*, 1981,20:205~209
- [15] Osterholt D, Stockenius W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fraction into red and purple membrane. *Methods Enzymol*, 1974,31:667~678
- [16] Wen SY, Hoon EK. The role of tryptophan residues in the hemolytic activity of stonustoxin: a lethal factor from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. *Biochimie*, 2000, 82 : 251~257
- [17] Luis J, Va zquez-Ibar, Lan G. Sugar recognition by the lactose permease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2004, 279(47):49214~49221
- [18] Spande TF, Witkop B. Determination of the tryptophan content of proteins with N-bromosuccinimide. *Methods Enzymol*, 1967,11:498~506
- [19] Mita R, Periasamy N. Resolution of spectral and lifetime heterogeneity of tryptophan fluorescence in bacteriorhodopsin. *Photochemistry and Photobiology*, 1995,(61):292~297
- [20] Hans JS, Georg B, Gessenich R, Hehn D, Dirck N, chlesinger R, Berendzen J, Ormos P. Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin. *Nature*, 2000,406:649~653
- [21] Lanyi JK, Schobert B. Crystallographic structure of the retinal and the protein after deprotonation of the schiff base: the switch in the bacteriorhodopsin photocycle. *J Mol Biol*, 2002,321:727~737
- [22] Tamas P, Lorand S. Trp22, Trp24, and Tyr8 play a pivotal role in the binding of the family 10 cellulose-binding module from *Pseudomonas xylanase A* to insoluble ligands. *Biochemistry*, 2000,39:985~991
- [23] Eric C, Christian V. Discrimination between the four tryptophan residues of MM-creatine kinase on the basis of the effect of N-bromosuccinimide on activity and spectral properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996,329: 97~103

## THE RESEARCH OF THE TRYPTOPHAN RESIDUES' SPECTRUM IN bR WHEN OXIDIZED BY N-BROMOSUCCINIMIDE

WANG Zhe-chen\*, ZHONG Sheng<sup>1</sup>, ZHANG Jian-ping<sup>2</sup>, HU Kun-sheng<sup>1</sup>

(1. Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. State Key Laboratory for Structural Chemistry of Unstable and Stable species, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

\*Undergrate, Lifescience college, Shandong University)

**Abstract:** The number of oxidized Tryptophan (Trp) of all the eight Trp residues of bR and the corresponding spectrum change when modified by N-bromosuccinimide (NBS) gradually (redox) via UV-Vis absorption spectrum and fluorescence spectrum were researched. The results revealed that the number of oxidized Trp residues is about 4 when increasing the NBS/bR molar ratio normally, but if more NBS is used, This number will rise to 6~7. The Trp residues' characteristic fluorescence peak will be decreased and blue-shifted during the chemical modification. Results revealed still that there may be three different kinds of Trp residue structure in bR. The research results are important and meaningful for making clear the Trp-retinal coupling energy transfer, the fluorescence lifetime of individual Trp residue and the role of Trp residues in membrane protein's structure and function.

**Key Words:** Bacteriorhodopsin (bR); Trp residues; N-bromosuccinimide (NBS); UV-Vis absorption; Fluorescence