

脉冲电场与牛血清白蛋白相互作用的 同步荧光光谱和拉曼光谱比较研究

李乐军, 陈树德*, 乔登江

华东师范大学光谱学与波谱学教育部重点实验室, 华东师范大学物理系, 上海 200062

摘要 应用同步荧光光谱和拉曼光谱研究了脉冲电场与牛血清白蛋白的相互作用。同步荧光光谱研究表明, 脉冲电场对牛血清白蛋白的发射荧光光谱强度产生影响, 降低了处于其活性部位的色氨酸和酪氨酸残基的发射荧光强度。拉曼光谱进一步验证了这种实验结果。两种实验表明: 脉冲电场改变了处于牛血清白蛋白活性中心的芳香族氨基酸所处的微环境, 进而表明了蛋白质的构象发生了变化, 从而影响它的生物学功能。

主题词 同步荧光光谱; 拉曼光谱; 脉冲电场(PEF); 牛血清白蛋白(BSA)

中图分类号: O657.3; Q64 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)01-0081-05

引言

电磁场与蛋白质相互作用的研究正越来越引起人们的关注。1996年, Verma等^[1]就用拉曼光谱研究了50mT的磁场对多聚赖氨酸的构象变化。由Lloyd提出的同步荧光光谱技术与普通荧光光谱不同, 通过选择合适的波长差可将荧光光谱上相互重叠的荧光峰分开, 在用于研究外部电磁场与其靶体蛋白质相互作用时, 可以分辨蛋白质色氨酸和酪氨酸残基的微环境变化^[2]。激光拉曼光谱由于其非破坏性、灵敏度高、样品用量少以及可以运用于水溶液的研究, 被广泛应用于生物方面的研究。运用拉曼光谱, 可以得到蛋白质溶液的各种功能键、氨基酸侧链以及二级结构的信息^[3]。本文运用同步荧光光谱和激光拉曼光谱研究了脉冲电场与牛血清白蛋白的相互作用。

1 实验材料和仪器

牛血清白蛋白(BSA)(生化试剂, 华美生物工程公司); 三次蒸馏水。

脉冲电场发生装置: ACHV-III型脉冲电场发生仪, (由华东师范大学物理系生物物理研究室自行设计), 产生的脉冲电场重复频率为50Hz(一个脉冲持续时间为20 μ s), 上升沿为13 μ s, 脉冲电压峰值 $U_{pp}=3.3 \times 10^4$ V。

F-4500型荧光扫描分光光度计(日本日立公司); 法国

Dilor公司Ram-1B显微拉曼光谱仪; 96孔细胞培养板(Corning Company)。

2 实验方法

2.1 同步荧光光谱

将BSA溶解于三次蒸馏水, 终浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。实验分5组样品。对照组: BSA溶液不受脉冲电场刺激, 置于5mL离心管, 记为BSAC。实验组1~4: 将BSA溶液50 μ L接于4块96孔细胞培养板, 然后将培养板置于脉冲电场下分别刺激15, 30, 45和60min, 收集于5mL离心管, 分别记为BSAE15, BSAE30, BSAE45和BSAE60。电场作用在21 $^{\circ}$ C条件下进行。

移取3mL蛋白溶液于1cm石英比色池中, 改变发射波长 λ_{em} 和激发波长 λ_{ex} 的波长差 $\Delta\lambda$, 使 $\lambda_{em} = \lambda_{ex} + \Delta\lambda$, 分别在 $\Delta\lambda$ 为20和60nm下测定5种BSA溶液的同步荧光光谱, 记录各发射峰峰位以及强度。荧光分光光度计的狭缝(带通)设置为: 5/5nm, 测量在室温下进行。

2.2 拉曼光谱

与晶体拉曼光谱相比较, 很难获得理想的蛋白溶液光谱; 与荧光光谱和园二色光谱相比, 样品要求的量虽然少得多, 但是对于蛋白浓度的要求还是很高的。经过前期实验的探索, 我们最终选择 $400 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为拉曼光谱测量的浓度, 缓冲液是三次蒸馏水。水的拉曼峰较少, 有利于获得理想的蛋白溶液的拉曼光谱。

收稿日期: 2004-08-15, 修订日期: 2005-01-20

基金项目: 国家自然科学基金(50137030)和上海市科技发展基金(036105019)资助

作者简介: 李乐军, 女, 1980年生, 华东师范大学物理系硕士研究生 * 通讯联系人

脉冲电场刺激同 2.1 节, 只是这里每个样品只接 4 孔, 总量 200 μL 。

拉曼光谱测量: 激发波长为 632.8 nm, 功率为 4.6 mW, 光栅为 1 800 lines $\cdot\text{cm}^{-1}$, 狭缝宽度为 100 μm , 扫描范围为 200~1 800 cm^{-1} , 每次扫描时间为 50 s, 积分 2 次, 累加得拉曼光谱。为了定量地比较各组溶液谱带之间的差异, 选择苯丙氨酸峰(1 004 cm^{-1})作为归一化因子^[4]。

3 结果与讨论

3.1 脉冲电场与 BSA 相互作用的同步荧光光谱

BSA 是一种荧光较强的蛋白质大分子, 分子量为 66 000 道尔顿, 含 585 个氨基酸, 每个分子含有 26 个苯丙氨酸(Phe), 19 个酪氨酸(Tyr)和 2 个色氨酸(Trp), 这三种氨基酸都会发荧光。在蛋白质分子内, 由 Phe 到 Tyr 或 Trp 的能量转移是非常有效的, 因此在大多数情况下, 蛋白质所显现出来的荧光几乎唯一的是色氨酸的荧光^[2], 无法将酪氨酸和色氨酸各自的贡献区分开来, 也无法较精细地了解外部脉冲电场对 BSA 分子构象的影响。但是如果使用同步荧光方法, 采用固定波长同步扫描的方法, 就可以明确地分辨 BSA 中的酪氨酸和色氨酸残基的荧光^[5]。

BSA 中, 2 个 Trp 残基位于第 134 位和 212 位, 荧光主要来源于 212 位的 Trp 残基。BSA 分子表面附近有一较大的疏水区域, 是该蛋白质的活性部位, Trp212 残基就位于该疏水区附近^[6], 所以, 通过研究同步荧光光谱, 可以知道这种疏水性较强的氨基酸残基所处的微环境, 从而探测脉冲电场对 BSA 表面疏水性的影响。同时, 通过研究也可以得出酪氨酸残基所处微环境的变化。

脉冲电场作用不同时间的 BSA 的同步荧光光谱如图 1 所示, 表 1 给出了 $\Delta\lambda$ 为 20 和 60 nm 时的 BSA 同步荧光的各参数值。

固定激发波长和发射波长的波长差为 20 nm, 改变激发波长在 260~380 nm 范围, 同时记录下各发射波长处的荧光强度, 经过作图可以得到五种溶液中 Tyr 荧光光谱^[7][见图 1(a)]。从图中可以看出, 脉冲电场作用没有改变 Tyr 的荧光峰位, 但是减弱了它的荧光强度。随着脉冲电场作用时间的

增加, 荧光强度分别降低为对照组的 88%(BSAE15), 85%(BSAE30), 82%(BSAE45)和 74%(BSAE60)。

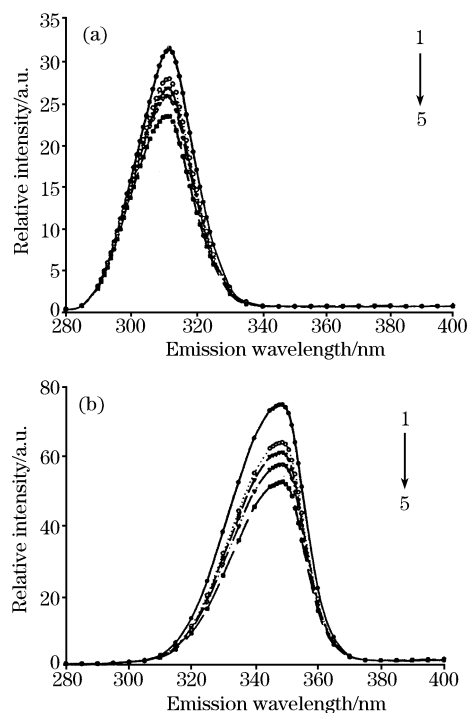


Fig. 1 Synchronous fluorescence spectra of BSA with different PEF exposure time

(a), $\Delta\lambda=20$ nm; (b), $\Delta\lambda=60$ nm. 1 to 5: 0, 15, 30, 45 and 60 min-PEF-exposed BSA

当固定 $\Delta\lambda=60$ nm 时, 同样得到了 5 种 BSA 中 Trp 的荧光光谱^[7][见图 1(b)]。从图中可以看出, 与对照组的 BSA 的同步荧光光谱相比, 脉冲电场作用也没有改变 Trp 的荧光峰位, 但同样减弱了它的荧光强度。随着脉冲电场作用时间的增加, Trp 的荧光强度分别降低为对照组的 85%(BSAE15), 82%(BSAE30), 77%(BSAE45)和 70%(BSAE60)。

以上同步荧光光谱的实验结果初步表明: 脉冲电场猝灭了 BSA 的芳香氨基酸(Tyr 和 Trp)的荧光, 从而表明脉冲电

Table 1 Variation of synchronous fluorescence parameters of BSA

$\Delta\lambda/\text{nm}$	组别	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}^*$	Relative intensity/(a. u.)	$I_{\text{R}}/(I/I_{\text{BSAC}})^{**}$	Decrease percentage/% ^{***}
20	BSAC	312	31.4	1.00	—
	BSAE15	312	27.7	0.88	-11.78
	BSAE30	312	26.6	0.85	-15.29
	BSAE45	312	25.6	0.82	-18.47
	BSAE60	312	23.3	0.74	-25.80
60	BSAC	349	74.5	1.00	—
	BSAE15	349	63.5	0.85	-14.77
	BSAE30	349	60.8	0.82	-18.39
	BSAE45	349	57.4	0.77	-22.95
	BSAE60	349	52.3	0.70	-29.80

* λ_{max} 是指 $\Delta\lambda=20$ 或 60 nm 时 BSA 同步荧光最大发射光谱的峰位;

** I_{R} 是各实验组 BSA 荧光发射峰的强度与对照组 BSAC 的荧光发射峰的强度的比值;

*** (实验组荧光强度-对照组荧光强度)/对照组荧光强度 $\times 100\%$

场改变了这两种氨基酸所处的微环境,使它们处于更加“埋藏”的状态。由于 Trp 残基处于这种蛋白质的活性部位,所以它所处的微环境的改变,会进一步影响这种蛋白质的构象,从而影响其生物学功能。

3.2 脉冲电场与 BSA 相互作用的拉曼光谱研究

Table 2 Raman spectra of non-exposed and PEF-exposed BSA

Frequency (cm ⁻¹)(Intensity (a. u.)*)					
BSAC	BSAE15	BSAE30	BSAE45	BSAE60	Assignment
644(2.42)	644(1.85)	643(1.84)	643(1.46)	643(1.23)	Tyr
756(3.22)	756(2.26)	756(1.91)	756(1.55)	759(1.38)	Trp
830(3.20)	829(2.06)	830(2.03)	830(2.04)	830(2.60)	Tyr
850(3.31)	850(2.51)	852(2.60)	853(2.36)	851(2.65)	Tyr
883(0.93)	883(0.55)	883(1.36)	883(0.64)	883(0.72)	Trp (N ₁ H)
1 004(10)	1 004(10)	1 004(10)	1 005(10)	1 005(10)	Phe
1 338(3.85)	1 339(4.26)	1 340(4.16)	1 340(4.35)	1 340(4.10)	Trp/γ(CH ₂)
1 357(1.59)	1 357(1.79)	1 357(1.49)	1 356(1.64)	1 357(1.70)	Trp
1 623(2.62)	1 618(1.63)	1 617(2.34)	1 617(2.36)	1 617(2.57)	Tyr

* 各谱峰强度是以其各自的 1 004 cm⁻¹强度为归一化因子 10,得到的相对强度。

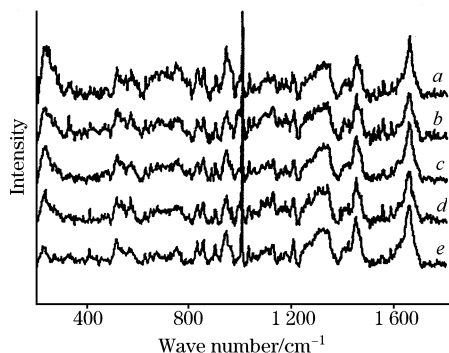


Fig. 2 Raman spectra in the 200-1 800 cm⁻¹ region of non-exposed and PEF-exposed BSA in three-distilled water

pH 7.0, a, BSAC; b, BSAE15;
c, BSAE30; d, BSAE45; e, BSAE60

3.2.1 酪氨酸侧链分析

(1)酪氨酸残基的环境

830 和 850 cm⁻¹是酪氨酸残基的费米共振谱线^[8],运用其强度比,可以知道蛋白质分子中的酪氨酸残基的疏水性,即“暴露”与“埋藏”。如果两者的比值为 10:4,说明酪氨酸的苯环上的羟基的氧原子是一个强的氢键受体;如果比值为 10:8,说明为一个中强度氢键的供体或受体;如果比值为 3:10,说明是强氢键的供体;如果比值为 7:10,说明苯环的羟基已经电离了。

通常由方程式 $0.5 N_{\text{包埋}} + 1.25 N_{\text{暴露}} = I_{850}/I_{830}$ 和 $N_{\text{包埋}} + N_{\text{暴露}} = 1$,可以计算包埋在分子内部和暴露于分子表面的酪氨酸残基的克分子数 $N^{[9]}$ 。

五种 BSA 溶液的这 2 个峰的比值以及暴露和包埋的分子数如表 3 所示。可以看出,5 组 BSA 溶液的酪氨酸苯环的羟基上的氧原子均为中强度氢键的供体或受体。BSA 有 19 个酪氨酸,对照组 BSAC 有 15 个酪氨酸暴露,4 个酪氨酸包

为了进一步验证同步荧光光谱的实验结果,我们对脉冲电场作用于 BSA 的两种氨基酸的拉曼谱带进行了研究,五种 BSA 溶液的拉曼光谱如图 2 所示,色氨酸和酪氨酸侧链的拉曼谱带的峰值如表 2 所示。

埋在分子内部;BSAE15 和 BSAE30 两组几乎全部的酪氨酸暴露于分子表面;BSAE45 有 17 个酪氨酸处于分子表面,2 个包埋在分子内部;BSAE60 有 13 个酪氨酸暴露于分子表面,有 6 个酪氨酸包埋于分子内部。

所以,可以得出结论:短时间内(30 min 以内),脉冲电场可以使 BSA 的酪氨酸逐渐暴露于分子表面,而后随着电场处理时间的增加,又开始包埋到分子内部了。

Table 3 Effects of PEF exposure on fermi resonance doublet of tyrosine of BSA

组别	I_{850}/I_{830}	$N_{\text{包}}$	$N_{\text{暴}}$	$N_{\text{暴}} : N_{\text{包}}$
BSAC	1.10	0.2	0.8	4
BSAE15	1.22	0.04	0.96	24
BSAE30	1.28	-0.04	1.04	-
BSAE45	1.16	0.12	0.88	7.33
BSAE60	1.02	0.31	0.69	2.23

(2)其他酪氨酸残基峰位研究

644 和 1 615 cm⁻¹来自于酪氨酸侧链^[10]。从表 2 可以看出,随着脉冲电场作用时间的增加,644 cm⁻¹处的拉曼强度有所下降:对照组 BSAC 的强度为 2.42,脉冲电场处理组分别降低为对照组的 76.45%(BSAE15),76.03%(BSAE30),60.33%(BSAE45)和 50.83%(BSAE60)。这与用同步荧光光谱测得的结果是一致的。

对照组 1 615 cm⁻¹处的拉曼峰出现在 1 623 cm⁻¹处,强度为 2.62,脉冲电场处理组出现在 1 617~1 618 cm⁻¹处,强度为对照组的 66.21%(BSAE15),89.31%(BSAE30),90.08%(BSAE45)和 98.09%(BSAE60)。

由这些变化可以看出,经脉冲电场作用,BSA 溶液的酪氨酸残基所处的微环境出现明显变化。

3.2.2 色氨酸侧链分析

756 cm⁻¹附近的拉曼谱带归属为色氨酸侧链^[11],由表 2

可以看出, 对照组该谱线的强度为 3.22, 脉冲电场处理的各组的强度均有所降低, 分别降为对照组的 70.19% (BSAE15), 59.32% (BSAE30), 48.14% (BSAE45) 和 42.86% (BSAE60), 这一结果也与同步荧光光谱的实验结果相一致。结合拉曼光谱和同步荧光光谱的实验结果, 我们推测 756 cm^{-1} 的拉曼谱峰来源于 212 位色氨酸。

880 cm^{-1} 附近的拉曼谱带反应了蛋白质的色氨酸侧链吡啶环的 N_1H 的氢键的强弱, 频率越低, 表明氢键越强。如果出现在 $883\sim 882\text{ cm}^{-1}$ 附近, 则表明 N_1H 没有氢键, 出现在 871 cm^{-1} 处, 表明 N_1H 形成了很强的氢键^[11]。从表 2 可以看出, 各组 BSA 溶液均出现在 883 cm^{-1} 处, 表明它们的色氨酸残基的 N_1H 均没有形成氢键。

1340 处和 1360 cm^{-1} 处的色氨酸双峰是环境亲脂性的标志: 吡啶环与环境中的脂肪类基团之间的亲脂反应会使 1360 cm^{-1} 处的峰增强, 而 1340 cm^{-1} 处的峰减弱^[12]。但是, 由于 CH_2 的扭曲振动也出现在 1340 cm^{-1} 处^[12], 可能对分析会造成影响。然而, 由表 3 可以看出, 对照组出现在 1357 cm^{-1} 处, 其拉曼强度为 1.59, 脉冲电场处理组的强度分别为对照组的 112.58% (BSAE15), 93.71% (BSAE30), 103.14% (BSAE45) 和 106.92% (BSAE60)。可以看出, 脉冲

电场对 BSA 的色氨酸残基的微环境的亲脂性产生了“扰动”, 但是这种环境亲脂性的改变并不十分明显。

4 结 论

综合以上实验研究, 可以得出以下几个结论:

(1) 脉冲电场改变了 BSA 的同步荧光光谱, 降低了最大发射荧光峰的强度, 猝灭了两种芳香族氨基酸的内源荧光。荧光光谱和荧光强度的改变, 表明这两种氨基酸所处的微环境发生了改变, 使其更趋向于“包埋”状态。同时, 由于 Trp 处于 BSA 的活性部位, Trp 的微环境的改变, 必然会影响蛋白质的构象, 从而影响 BSA 的生物学功能。

(2) 运用拉曼光谱进一步研究脉冲电场对这两种氨基酸侧链的影响, 发现脉冲电场改变了 BSA 的氨基酸侧链 (Trp 和 Tyr) 的拉曼光谱强度, 从而说明这两种氨基酸侧链微环境发生了改变, 结果与同步荧光光谱相一致。同时, 拉曼光谱对这两种氨基酸所处微环境变化引起的“包埋”状态给出了量化结果, 这对深入研究脉冲电场生物效应的分子机理提供了重要的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Verma S P, Goldner R B. *Bioelectromagnetics*, 1996, 17(1): 33.
- [2] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). *Method of Fluorescence Analysis(荧光分析法)*. Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990.
- [3] ZHENG Shun-xuan(郑顺旋). *Laser Raman Spectroscopy(激光拉曼光谱学)*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press(上海: 上海科学技术出版社), 1985.
- [4] Tu A T. *Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications*. New York: Wiley, 1982.
- [5] WEI Xiao-fang, DING Xi-ming, LIU Hui-zhou(魏晓芳, 丁西明, 刘会洲). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2000, 20(4): 556.
- [6] Eftink M R, Zajicek J L, Ghiron C A. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 491: 473.
- [7] XIAO Hou-rong, SHENG Liang-quan, SHI Chun-hua, et al(肖厚荣, 盛良全, 施春华, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(1): 78.
- [8] Mwindace N Siamwiza, Richard C Lord, Michael C Chen. *Biochemistry*, 1975, 14(22): 4870.
- [9] Carig W S, Gaber B. J. *Am. Chem. Soc.*, 1977, 99: 4130.
- [10] Yu N T, Liu C S, O'Shea D C. *Journal of Molecular Biology*, 1972, 70: 117.
- [11] Kelly L Aubrey, George J Jr. *J Biophys.*, 1991, 60: 1337.
- [12] Chen M C, Lord R C. *Journal of American Chemical Society*, 1976, 98(4): 990.

Synchronous Fluorescence and Raman Spectroscopy Study on the Interaction of Pulsed Electric Field (PEF) and Bovine Serum Albumin (BSA)

LI Le-jun, CHEN Shu-de* , QIAO Deng-jiang

Key Laboratory of Optical and Magnetic Resonance Spectroscopy, Department of Physics, East China Normal University, Shanghai 200062, China

Abstract The interaction of pulsed electric field (PEF) and bovine serum albumin (BSA) was studied by synchronous fluorescence and Raman spectroscopy. The results of synchronous fluorescence showed that pulsed electric field exerted its effects on the emission fluorescence spectrum and reduced the fluorescence intensities of the tyrosine and tryptophan side chains. The results of Raman spectroscopy verified this. These two experiments indicated that PEF exposure changed the microenvironments of the two aromatic amino acids, which were located in the active parts of BSA, and further indicated the conformational changes of the proteins, and the change in its biological functions.

Keywords Synchronous fluorescence spectroscopy; Raman spectroscopy; Pulsed electric field; Bovine serum albumin (BSA)

(Received Aug. 15, 2004; accepted Jan. 20, 2005)

* Corresponding author