

铽离子发光探针研究 pH 诱导的植物钙调素构象变化

肖凤娟¹, 常虹², 刘德龙³

1. 石家庄铁道学院材料科学与工程分院, 河北 石家庄 050043
2. 河北师范大学物理科学与信息工程学院, 河北 石家庄 050016
3. 河北师范大学化学学院, 河北 石家庄 050016

摘要 利用脱钙钙调素(apo-CaM), Tb. CaM 和 Ca. CaM 系统的荧光光谱及酪氨酸-铽离子(Tyr-Tb³⁺)敏化荧光光谱, 研究了 pH 诱导钙调素构象的改变。随着 pH 值的降低, apo-CaM 的荧光强度下降并出现蓝移, Ca. CaM 系统的荧光强度较 Tb. CaM 下降显著, Tyr-Tb³⁺ 敏化荧光光谱也有相当程度的降低。对荧光强度的变化与钙调素分子结构和构象的关系和 pH 诱导钙调素构象改变的机理作了详细的解释, H⁺ 可通过与 Ca²⁺ 和 Tb³⁺ 产生竞争结合, 影响金属离子与钙调素的结合作用, 还可以通过正电相斥或与肽链上带负电荷原子相结合而使 CaM 分子的极性增强, 改变 CaM 表面的疏水性, 降低 CaM 的活性。文章对 pH 诱导钙调素构象改变在胞外钙调素信号转导机制中的重要意义进行了阐述。

关键词 Tb³⁺ 发光探针; 荧光光谱; 构象改变; 钙调素; pH 值

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)08-1560-05

引言

钙调素(CaM)是一种普遍存在的多功能 Ca²⁺ 受体蛋白, 它以 Ca²⁺ 依赖的形式参与细胞中 30 多种酶的调节及许多钙依赖性的生理反应过程^[1, 2]。现已知不同种属的 CaM 均有四个 E-F 手型的 Ca²⁺ 结合位点^[3]。正常生理条件下, CaM 与 Ca²⁺ 结合后活化并与靶酶结合发挥其生物功能^[4]。现已查明, 细胞外普遍存在钙调素, 可以在胞外发挥多种生物学功能。因其既是胞内信号转导途径组分之一又起胞外信使作用, 所以称之为‘兼性’信使, 由此提出胞外钙调素信号转导机制假说^[5]。但对其信号转导的调节等诸多因素仍未搞清楚, 其原因之一是胞外钙调素作用的环境与胞内有很大差别。胞内的 pH 为中性, 胞外的环境是微酸性的, 有研究表明, 一般质外体组织的 pH 值在 4.5~5.5 之间^[6]; 胞内 Ca²⁺ 浓度约为 10⁻⁶ mol·L⁻¹, 胞外 Ca²⁺ 浓度约为 10⁻³ mol·L⁻¹。因此胞外 CaM 是在高钙浓度和低 pH 的条件下发挥作用的, 与胞内环境相比, CaM 不可能总是处于激活状态, 是否 H⁺ 使 CaM 的构象发生了改变进而影响了 Ca²⁺ 与 CaM 的结合力, 而这种改变可以使胞外 CaM 即使在高 Ca²⁺ 的条件下仍然正常发挥作用? 本研究拟通过体外研究 pH 诱导钙调素构象的改变而影响 CaM 与 Ca²⁺ 的结合力, 为低 pH、高

钙条件下胞外 CaM 信号转导假说提供佐证。

离子探针技术已成为研究金属离子与生物大分子的相互作用以及探测生物大分子结构的强有力手段。由于 Ca²⁺ 既无颜色又无磁性, Ca²⁺ 本身及其与蛋白质结合后, 均不具有光谱性质, 不能直接利用发光光谱研究其与生物大分子的相互作用, 稀土离子 Tb³⁺ 与 Ca²⁺ 具有相近的离子半径和配位化学性质, 且 Tb³⁺ 独特的发光特性使 Tb³⁺ 可以取代 Ca²⁺ 而作为钙调素的结构探针。本实验以稀土 Tb³⁺ 为结构探针研究了 pH 诱导钙调素荧光光谱的变化。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Hitachi F-2500 荧光分光光度计(日本), 高纯氮气(纯度为 99.999%, 石家庄大明气体厂生产), 450 nm 截止型滤光片, 可调式自动取液器(美国 Eppendorf), Chelex-100(美国 Sigma), Tb₄O₇ 纯度为 99.95%(珠江冶炼厂生产), 配成 pH 5~6 的溶液, 用 EDTA 法确定其准确浓度, Tris, HCl, KCl, CaCl₂·5H₂O。花椰菜 CaM, 由河北师范大学分子细胞生物学研究室例行方法提纯^[7], 钙调素浓度以凯氏定氮法及以牛脑 CaM 为标准蛋白的 Bradford 法进行校正。全部缓冲溶液及 CaM 均经过 Chelex-100 脱钙^[8], 全部玻璃仪器及

收稿日期: 2006-05-10, 修订日期: 2006-08-20

基金项目: 国家重点基础研究资助项目(G1999011702), 河北省自然科学基金资助项目(B200400413 1223)及河北省博士基金项目资助

作者简介: 肖凤娟, 女, 1966 年生, 石家庄铁道学院材料科学与工程分院副教授 e-mail: xjf66@126.com

塑料制品均经 1 : 1 硝酸浸泡并用重蒸水多次冲洗以去除杂质离子。

1.2 实验方法

在荧光比色皿中加入一定浓度 apo-CaM(脱钙 CaM), 内含 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲溶液, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl (pH 7.0), 测定 CaM 内源荧光光谱。取不同浓度 Ca^{2+} 于 CaM 中, 摇匀, 对比加 Ca^{2+} 后荧光光谱的改变。在 apo-CaM 和 Ca. CaM 系统中加入不同浓度盐酸, 分别调节系统的 pH 7.0, 6.0, 5.0, 4.3, 3.0, 2.0 或在荧光比色皿中加入一定浓度 apo-CaM(脱钙 CaM), (缓冲溶液同上 pH 6.5), 通入氮气 40 min 后, 加入不同浓度的 Tb^{3+} 充分混合, 每次加入 Tb^{3+} 以后均通氮气 10 min 用以防止氧气对荧光的猝灭作用, 用 HCl 调解系统 pH 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.0, 测定不同 pH 值条件下 Tb. CaM 系统内源荧光和 CaM 敏化 Tb^{3+} 荧光强度的改变, CaM 内源荧光光谱测定时, 激发波长 280 nm, 扫描 280~400 nm 的发射光谱, 测定 CaM 敏化 Tb^{3+} 荧光光谱时, 扫描 300~600 nm 发射光谱, 用 450 nm 截止型滤光片滤二级散射峰, 激发缝宽 10 nm, 发射缝宽 10 nm。

2 结果与分析

2.1 pH 值对 apo-CaM 内源荧光光谱的影响

pH 值对 apo-CaM 内源荧光光谱的影响, 见图 1。当 pH 由 7.0 到 5.0 左右变化时, 荧光强度的变化并不显著, Tyr 最大吸收峰的位置也未发生改变, 当 pH 低于 4.0 以后, 荧光强度显著降低, 且吸收峰位置有所蓝移。研究表明 CaM 是具有高度保守性的蛋白质, 其肽链上不含组氨酸(Trp), 280 nm 处的特征吸收峰主要是由酪氨酸残基(Tyr)的苯环 $\pi-\pi^*$ 跃迁所引起。在 apo-CaM 中, β 折叠结构多于 α 螺旋结构^[9], tyr 很大程度被包埋在 β 折叠的疏水结构中, 在弱酸性环境中, H^+ 可以与 CaM 的 Ca^{2+} 结合位点的带负电荷的原子通过静电引力而结合, 但 CaM 分子的极性未发生改变, 因而其构象变化甚小, 荧光强度上下变化的幅度也较小。当 pH 低于 4.0 的较强酸性环境中, Tyr 残基的微环境极性增强, 亲水性增加, Tyr 残基被“暴露”在极性环境中, 酚羟基在酸性

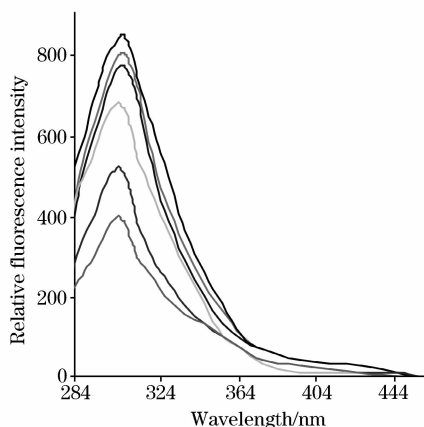


Fig. 1 The influence of pH on the fluorescence spectra of apo-CaM(CaM concentration is $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

环境中电离受阻, 酚氧原子的孤对电子与芳环之间的激发态电荷转移作用会部分受到抑制, 使荧光蓝移^[4], 加之在酸性环境下, H^+ 使分子表面正电荷增加, 静电斥力使蛋白质的分子过渡伸展, 增加了芳香氨基酸残基(phe)之间的距离, 降低了芳香氨基酸之间的共振能量转移, 使 Tyr 残基荧光强度降低, 峰位蓝移。

2.2 Ca. CaM 荧光光谱的测定

在 apo-CaM 中加入 Ca^{2+} , 随着 Ca^{2+} 的不断加入, 蛋白内源荧光不断增强, 如图 2 所示。随着 Ca^{2+} 的加入, α 螺旋含量增加, 中心螺旋伸直, 疏水区显露, 被包埋的 tyr 逐渐显露出来, 使 CaM 内源荧光较 apo-CaM 增强^[5], 当加入的钙离子与钙调素按物质的量之比 4 : 1 完全结合后, CaM 构象稳定, 荧光强度随之稳定(见图 3)。

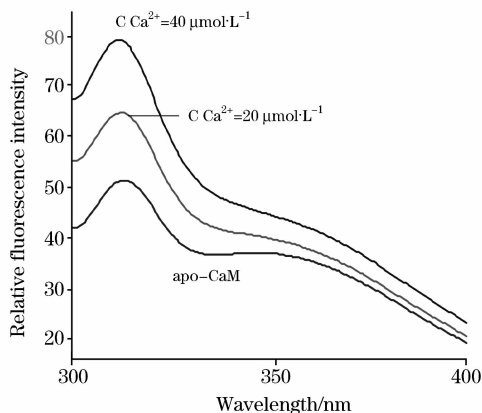


Fig. 2 The influence of Ca^{2+} concentration on the fluorescence spectra intensity

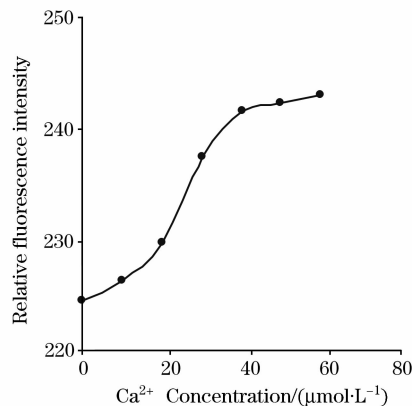


Fig. 3 The influence of Ca^{2+} concentration on the fluorescence intensity of apo-CaM system (CaM concentration is $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.3 pH 值对 Ca. CaM 荧光光谱的影响

pH 值对 Ca. CaM 内源荧光强度的影响见图 4, 可见随着 pH 值逐渐减小, 原有 Ca. CaM 内源荧光强度亦逐渐降低, 当 pH 值由 6.0 降到 5.0、荧光强度降低幅度很小仅为 11.5%, 但当 pH 值下降到 4.0, 3.0 和 2.0 时, 荧光强度分别降低, 33.9%, 52.7% 和 65.2%。CaM 为酸性小分子蛋白质, Ca^{2+} 在哑铃球部与氨基酸的羧基、羰基 O 原子或氨基上

的 N 原子配位, 当 Ca^{2+} 与 CaM 结合后, CaM 形成紧密而非伸展的球形构象, 荧光强度较强而且较稳定, 此时哑铃球部疏水穴暴露, 易于与靶酶的疏水区结合, 此即 CaM 被激活的状态^[10]。当某一因素影响到 Ca. CaM 紧密的球形构象和易于与靶酶结合的疏水环境后, 就有可能使 CaM 的活性受到影响。在酸性环境中, H^+ 由于具有小的离子半径, 可以容易地从蛋白质的缝隙中进入 CaM 的结合位点与 Ca^{2+} 产生竞争, 降低 Ca^{2+} 与 CaM 结合力, 当 H^+ 浓度较低时, 可以模拟 Ca^{2+} 与 CaM 结合的行为, 蛋白构象改变不显著。但当 H^+ 浓度较高时, H^+ 与蛋白质氨基酸上侧链的羧基 O 原子或氨基上的 N 原子配位, 链间原有的氢键断裂, 使 CaM 的极性增强, 蛋白质分子的肽链过渡伸展, 构象转而开放, 把荧光生色团暴露在更为亲水的环境中, 造成荧光强度下降。由此推测, 酸性环境下 H^+ 因与 Ca^{2+} 产生竞争结合和诱发 CaM 构象改变而使 CaM 活性降低。特别值得一提的事, 在 CaM 分子的 C 端存在一含蛋氨酸(Met)的疏水穴, 对靶酶的认识至关重要^[5], 当 H^+ 浓度较高时, 该疏水环境可能变得亲水了, 造成与靶酶的认识困难, 进一步降低 CaM 的活性。

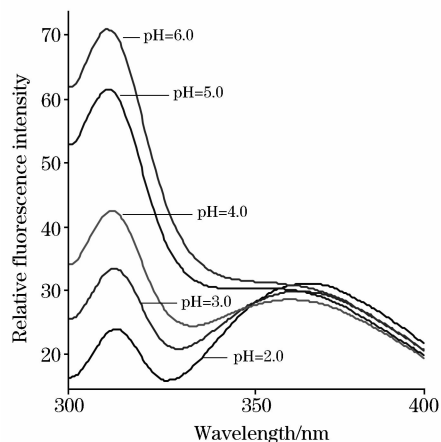


Fig. 4 Influence of pH on the fluorescence intensity of Ca-CaM system ($c_{\text{Ca}^{2+}}/c_{\text{CaM}} = 4:1$)

2.4 Tb^{3+} . CaM 内源荧光光谱的特点

Tb^{3+} 引起的蛋白内源荧光光谱变化与 CaM 并不相同, 如图 5 所示。当加入 $n\text{Tb}^{3+}/n\text{CaM} = 1 \sim 4$ 时, CaM 内源荧光逐渐上升, 当 $n\text{Tb}^{3+}/n\text{CaM} > 4$ 以后, CaM 内源荧光便开始下降, 这是因为 Tb^{3+} 与 CaM 结合后占据 4 个 Ca^{2+} 结合位点, 而 Tb^{3+} 与 CaM 优先结合位点为 I 和 II 位, 与 Ca^{2+} 正好相反, 当 CaM 结合 1~2 个 Tb^{3+} 后, CaM 的构象与 Ca^{2+} . CaM 的构象相似, 但当 Tb^{3+} 与 III 和 IV 位点结合后, 位于此区附近的 Tyr 残基对 Tb^{3+} 发生了共振能量转移, 使 Tyr 荧光量子产率下降, 所以荧光强度较 Ca^{2+} . CaM 系统为低^[11], 但因植物 CaM 只含一个 Tyr 残基, 在能量转移程度上不如动物大, 所以 CaM 内源荧光在加入 $n\text{Tb}^{3+}/n\text{CaM} > 3$ 时荧光强度增强不如 Ca^{2+} . CaM 系统增加的幅度大。有研究表明, 稀土离子与 CaM 可以产生较强烈的键合, 当 Tb^{3+} 浓度超过 4 以后, 更大浓度的 Tb^{3+} 与 CaM 侧链的负电荷羧基 O 和胺基或酰胺基的 N 形成高灵敏度的配合物^[12], 是因为在 CaM

中可存在 10 个金属离子结合位点^[13]。高浓度的 Tb^{3+} 使 CaM 结构更加密实, 因而 Tyr 发光集团区域能量转移加强, 荧光强度降低。

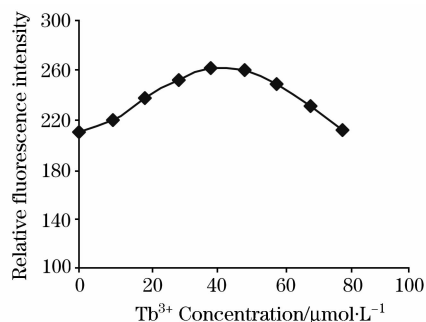


Fig. 5 Influence of Tb^{3+} concentration on the fluorescence intensity of CaM (CaM concentration is $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.5 pH 值对 Tb. CaM 内源荧光光谱的影响

pH 值对 Tb. CaM 内源荧光光谱的影响结果见图 6, 随 pH 值由高到低的变化, CaM 内源荧光强度呈下降趋势, 这一结果与 Ca^{2+} . CaM 内源荧光随 pH 变化情况一致, 但比 pH 值对 Ca^{2+} . CaM 的影响为弱, 可能的解释是: 在酸性条件下 H^+ 与 Tb^{3+} 产生竞争结合, 造成 CaM 内源荧光强度下降, 酸性的强极性环境, 影响了 CaM 原有的构象形式, 也使荧光强度降低。但 Tb^{3+} 与 CaM 的结合力强于 Ca^{2+} ^[14], 故 H^+ 与 Tb^{3+} 的竞争作用较 Ca^{2+} 弱, 加之 Tb^{3+} 被 H^+ 取代后, 肽链的伸展, 降低了 Tyr 对 Tb^{3+} 的能量转移, 使 Tyr 荧光部分恢复增强。两方面因素相互作用, 使 Tb. CaM 内源荧光下降趋势较小。

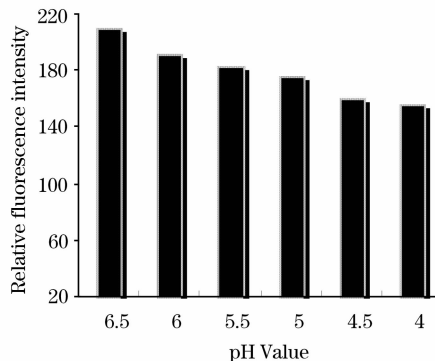


Fig. 6 The influence of pH on the fluorescence intensity of Tb-CaM system ($c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{CaM}} = 4:1$)

2.6 pH 值对 Tb. CaM 敏化荧光光谱的影响

在 280 nm 激发, 扫描 450~650 nm 范围内的 Tb^{3+} 发射光谱可以得到 CaM 分子中 Tyr 敏化 Tb^{3+} 发光光谱, 此即为钙调素敏化 Tb^{3+} 发光, 见图 7。pH 值对 Tb. CaM 敏化荧光光谱的影响如图 8 所示。随着 pH 值由大到小的变化 Tb. CaM 系统的敏化荧光强度亦呈减小的趋势。这是因为在酸性环境中, Tyr 苯环上的 $\pi-\pi^*$ 跃迁受阻, Tyr 残基荧光量子产率降低。另有研究表明, Tyr 与 Tb^{3+} 之间发生能量转移的有效距离为 0.5 nm, 在酸性条件下, CaM 中肽链的过

渡伸展和开放,势必造成 Tyr-Tb³⁺之间距离的增大,两种因素都可导致 Tyr-Tb³⁺的传能效率降低,荧光强度下降。

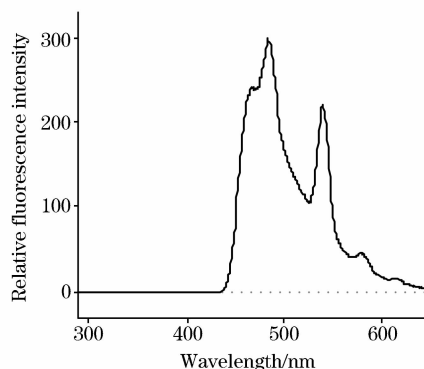


Fig. 7 Tyr sensitized Tb³⁺ fluorescence spectra of CaM ($c_{Tb^{3+}}/c_{CaM} = 4 : 1$)

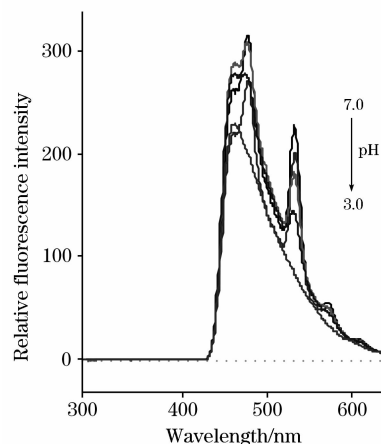


Fig. 8 The influence of pH on the Tyr sensitized Tb³⁺ fluorescence intensity of CaM ($c_{Tb^{3+}}/c_{CaM} = 4 : 1$)

3 结 论

荧光强度的改变提示了蛋白质分子结构变化的重要信息,在 pH 低于 5.0 以后,由 Tb. CaM、apo-CaM 和 Ca. CaM 系统的内源荧光光谱和 Tyr-Tb³⁺ 敏化荧光光谱强度的降低可以推测: H⁺ 可通过与 Ca²⁺ 和 Tb³⁺ 产生竞争结合,影响金属离子与钙调素的结合作用,还可以通过正电相斥以及与蛋白质氨基酸侧链上的羧基 O 原子或氨基上的 N 原子配位,使 CaM 的极性增强,分子的肽链伸展,把 Tyr 暴露在更为亲

水的环境中,致使共振能量转移受阻,荧光强度降低。钙调素分子结构的变化对疏水性氨基酸残基在蛋白质分子内外的分配产生影响,从而改变了蛋白质分子的表面的疏水性,干扰了与靶酶的识别,进而降低了 CaM 的活性。进一步联系细胞外的环境因素可以推断:低 pH 条件下 CaM 的活性降低可以使胞外 CaM 即使在高 Ca²⁺ 的条件下仍然正常发挥作用而不总被激活,恰恰说明低 pH 条件下 H⁺ 可能成为胞外 CaM 作用的调控因子,这可为低 pH 高钙条件下胞外 CaM 信号转导假说提供重要佐证。

参 考 文 献

- [1] Cheung W Y. Science, 1980, 207: 19.
- [2] Wayne A Snedden, Hillel Fromm. New Phytologist, 2001, 151: 35.
- [3] Mladen Milos, Michelle Comte, Joseph A Cox. Journal of Inorganic Biochemistry, 1989, 36: 11.
- [4] WEI Xiao-fang, DING Xi-ming, LIU Hui-zhou(魏晓芳, 丁西明, 刘会洲). Spectroscopy and Spectral Analysis, 2000, 20(4): 556.
- [5] SUN Da-ye, MA Li-geng, GUO Yan-lin(孙大业, 马力耕, 郭艳林). Cell Signal Transduction 3th ed(细胞信号传导, 第 3 版). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2001. 123.
- [6] Douglas P Taylor, James Slattery, Carl A Leopold. Physiologia Plantarum, 1996, 97: 35.
- [7] LIU De-long, SUN Da-ye, YANG Yan-sheng(刘德龙, 孙大业, 杨燕生). Chemical J. of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2000, 21(6): 860.
- [8] XIAO Feng-juan, LIU De-long, BAI Juan, et al(肖凤娟, 刘德龙, 白娟, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(8): 984.
- [9] Zhang Xuan, Chen Xu, Fang Shunming, et al. Tsinghua Science and Technology, 1999, 4(3): 1560.
- [10] Jeann M Buccigross, Donald J. Journal of the Less-Common Metals, 1986, 126: 343.
- [11] Nursen Coruh, James P. Riehl. Collect. Czech. Chem. Commun., 1991, 56: 3028.
- [12] Joanne Bruno, William De W. Horrocks Jr, Randy J Zauhar. Biochemistry, 1992, 31(31): 7016.
- [13] Hui Ouyang, Hans J Vogel. Biometals, 1998, 11: 213.
- [14] XIAO Feng-juan, LIU De-long, BAI Juan(肖凤娟, 刘德龙, 白娟). Journal of the Chinese Rare Earth Society(中国稀土学报), 2004, (22)3: 408.

Study on the pH Induced Conformational Change of Plant CaM by Using Tb³⁺ Luminescence Probe

XIAO Feng-juan¹, CHANG Hong², LIU De-long³

1. Material Science and Engineering Department, Shijiazhuang Railway Institute, Shijiazhuang 050043, China

2. College of Physics Science and Information Engineering, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

3. College of Chemistry, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

Abstract Calmodulin(CaM) is a ubiquitous Ca²⁺ binding protein of eukaryotes, and regulates a broad spectrum of fundamental cellular processes. It has been established that CaM has both intracellular and extracellular signal transduction functions, but the mechanism of the fact that extracellular CaM can be activated by Ca²⁺ has been unclear. In order to establish the binding parameters of Ca²⁺ to extracellular CaM at high Ca²⁺ level and low pH, Tb³⁺ fluorescence probe and fluorescence spectroscopy were used to investigate the influence of pH values on the conformational change of plant CaM. The fluorescence spectra in apo-CaM had blue shift and were quenched along with the change of pH value from 7.0 to 2.0. The fluorescence intensity of Ca-CaM system was remarkably lower than that of the Tb-CaM system and the Tyr-sensitized Tb³⁺ fluorescence in Tb³⁺-CaM was quenched with the addition of H⁺. On the basis of the results the relation between fluorescence intensity and conformational change of plant CaM and the mechanism of the changes in Tyr microenvironment induced by pH were discussed. It can be assumed that H⁺ can not only bind to CaM competing with Ca²⁺ or Tb³⁺ but also alter the hydrophobic environment on the surface of CaM molecules, which may affect the activity of CaM. The study supports the extracellular CaM signal transduction mechanism significantly.

Keywords Tb³⁺ fluorescence probe; Fluorescence spectroscopy; Conformational change; Calmodulin; pH value

(Received May 10, 2006; accepted Aug. 20, 2006)

首届沈阳国际微流控学学术论坛(SICOM I)第一轮会议通知

首届沈阳国际微流控学学术论坛(The First Shenyang International Colloquium on Microfluidics)将于2007年10月21~24日在沈阳举行。本届会议由沈阳市政府、国家自然科学基金委员会主办,东北大学承办。方肇伦院士担任会议主席。

会议主要议题包括:微流控和纳流控操控技术和理论模型、微流控和纳流控元件和装置加工方法和技术、微流控芯片新材料及材料改性方法和技术、微流控系统的进样与试样处理和分离、微流控检测系统的微型化与集成化以及微流控系统在化学、生物学和医学中的应用。会议同时举办相关设备和产品的展览会。

会议将邀请微流控学领域14位世界顶尖或知名学者作大会报告。此次会议旨在为全世界,尤其是亚洲和发展中国家从事微流控学基础、应用和开发研究的学者提供多学科交叉的、可实现广泛和深入学术交流的平台,促进微流控学的发展。我们竭诚欢迎从事微流控学及相关领域研究的专家、学者以及从事微流控学领域内产品研发的公司代表参加首届沈阳国际微流控学学术论坛。

详细信息请浏览 www.sicom.org.cn

联系方式:东北大学分析科学研究中心332信箱秘书处;邮政编码:110004;

电话:024-83687659;传真:024-83676698;电子邮件:sicom@mail.neu.edu.cn

首届沈阳国际微流控学学术论坛组委会