

# 重组人神经红蛋白的圆二色光谱研究

赵超 李连之\* 王莉 冀海伟

(聊城大学化学化工学院, 聊城 252059; 南京大学配位化学国家重点实验室, 南京 210093.)

\* 联系人, E-mail: [lilianzhi1963@163.com](mailto:lilianzhi1963@163.com)

**摘要** 神经红蛋白(neuroglobin, NGB)是近期在人和其他脊椎动物脑中发现的一种新颖的血红素蛋白。利用远紫外圆二色(CD)光谱的方法,研究了NGB的浓度、溶剂性质、溶液pH值以及温度对NGB二级结构的影响。结果表明,NGB浓度小于10  $\mu\text{mol/L}$ 时,它主要以 $\alpha$ -螺旋形式存在,浓度大于10  $\mu\text{mol/L}$ 时,随着浓度的增大其 $\alpha$ -螺旋含量逐渐减少,当浓度达到40  $\mu\text{mol/L}$ 后基本不再变化,可能是由于NGB在浓度较高时其分子间可以形成二硫键以及蛋白分子间可相互聚集所造成的。NGB在醇中的 $\alpha$ -螺旋含量比在水中稍有增加,也表明NGB对醇类溶剂具有较高的稳定性。在酸性或碱性溶液中,NGB的二级结构都有不同程度的破坏。随着温度的逐渐升高,NGB的 $\alpha$ -螺旋含量逐渐减少,但温度高达110 $^{\circ}\text{C}$ 时仍有16.8%的 $\alpha$ -螺旋存在,说明NGB具有高热稳定性。

**关键词** 神经红蛋白 圆二色光谱 二级结构 稳定性

神经红蛋白(neuroglobin, NGB)是一种新颖的脊椎动物珠蛋白类型,它主要在脑和其他神经组织中表达<sup>[1,2]</sup>,在视网膜中具有较高的浓度<sup>[3]</sup>。虽然它的氨基酸序列与血红蛋白(Hb)和肌红蛋白(Mb)的同源性很低(20%~25%)<sup>[4-6]</sup>,但它们的空间结构却很相似<sup>[7,8]</sup>。在没有外源配体存在的条件下,无论是高铁( $\text{Fe}^{2+}$ )还是高铁( $\text{Fe}^{3+}$ )态的神经红蛋白都表现出六配位(双组氨酸配位)的血红素结构,这在脊椎动物中尚属首例<sup>[9]</sup>。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的高表达对神经细胞有保护作用<sup>[10]</sup>,但关于NGB的确切生物学功能仍不清楚。

NGB三点突变体(C46G/C55S/C120S)的三维结构分析显示<sup>[8,11]</sup>,突变体NGB的晶体属单斜晶系,每个不对称单元中含有4条蛋白链,同Mb和Hb一样,每个亚基中的氨基酸链形成三上三下的 $\alpha$ -螺旋三明治结构<sup>[12,13]</sup>。与Mb相比,其三维结构中最大的结构差异在于CD-D区和血红素远侧E螺旋部分的N端,而且,在蛋白血红素远端位点和E、F螺旋转折点区段有一大的蛋白质基质空腔,这可能是其生理功能的关键所在。但到目前为止,野生型NGB的晶体结构还未得到。对于溶液中蛋白质的结构分析和环境因素的改变所导致的蛋白质结构和构象变化的研究,愈来愈引起人们的极大关注。由于蛋白质的二级结构特征在圆二色光谱的远紫外区(178~250 nm)都有其对应的特征谱峰,蛋白质所表现出的CD谱是其所含有

的各种二级结构的光谱叠加之和。因此,CD谱是研究溶液中蛋白质二级结构的非常有用的光谱技术<sup>[14]</sup>。我们已对重组人神经红蛋白及其突变体蛋白进行了表达、分离纯化和谱学表征<sup>[15,16]</sup>,这为进一步研究NGB的化学生物学性质奠定了基础。本文利用远紫外圆二色光谱研究了NGB的浓度、溶剂、温度和溶液的pH值对NGB二级结构的影响,加深了我们对NGB化学生物学基本性质的更进一步认识,从而为NGB生物功能的探讨和与之相关的神经系统疾病的治疗提供有用的信息。

## 1 实验

### 1.1 材料试剂与仪器

带有神经红蛋白基因的pET3a质粒由德国Johannes Gutenberg University of Mainz的Burmester教授提供。*E. Coli* BL21(DE3)plys菌为本实验室保存,酵母提取物和胰蛋白胨(Oxoid Ltd, England),异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG) (Sigma),二硫苏糖醇(DTT) (Canada分装),其他试剂均为分析纯或生化试剂。

AKTA Purifier 100快速蛋白纯化系统(Amersham Biosciences, Sweden),PHS-3D pH计(上海雷磁),HP8453A型紫外可见阵列二极管分光光度计(USA),Jasco J-810圆二色光谱仪(Japan)。

### 1.2 NGB蛋白样品的制备

将带有神经红蛋白基因的pET3a质粒转入*E. Coli*

BL21(DE3)plys细菌中,按文献[15,17]的方法进行表达、分离纯化,最后得到电泳纯的神经红蛋白.神经红蛋白贮存液的浓度通过测定其在 532 nm 处的吸光度值,根据其在 532 nm 处的摩尔消光系数( $\epsilon=10.7$  L/(mmol·cm))<sup>[18]</sup>计算得到.

### 1.3 圆二色光谱的测定

在测定 NGB 的浓度对其 CD 谱的影响时,用 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0),分别配制浓度依次为 1, 5, 10, 20, 40, 80, 100  $\mu$ mol/L 的蛋白样品.在测定溶剂性质对 NGB 的 CD 谱的影响时,将蛋白样品分别溶于水、甲醇和乙醇中,溶剂浓度均为 95%,蛋白浓度为 9.8  $\mu$ mol/L, 4 放置过夜.测定不同 pH 溶液对 NGB 的 CD 谱的影响,先用二次蒸馏水配制 50 mmol/L 的 Tris 碱贮存液,然后用 HCl 和 NaOH 溶液调节其 pH 值至所需范围(2.0~12.01),pH 值在 PHS-3D pH 计上用 E-201-C 型 pH 复合电极测得.蛋白浓度为 7.09  $\mu$ mol/L, 4 放置过夜.测定 NGB 的热变性实验时,蛋白样品溶于 10 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液中(pH 7.0),浓度为 1  $\mu$ mol/L,在样品上覆盖一层石蜡油以防止溶液在较高温度下蒸发,测定不同温度(25.0~110.0 )下的 CD 谱,在每个测量温度下温育 15 min,确保达到平衡状态.

圆二色光谱的测量在Jasco J-810 圆二色光谱仪上进行,并配备恒温样品池支架和Julabo F12 恒温器,光源系统用氮气保护(流量为 5 L/min),除热变性蛋白样品采用 10 mm光径样品池外,其他均采用 1 mm光径样品池,光谱扫描时均扣除溶液空白的干扰,除热变性实验外其他光谱扫描均在 25 下进行.测量参数为:波长扫描范围 250~190 nm,扫描速率 100 nm/min,分辨率 0.1 nm,响应时间 1 s,累积次数 3 次.利用圆二色光谱仪附带的杨氏法二级结构分析软件对实验数据进行各种二级结构含量的估算<sup>[19]</sup>.此软件把蛋白质的CD光谱看成是各种二级结构成分CD谱的叠加,以杨氏的参考CD谱为依据,利用最小二乘法进行拟合计算得到各种二级结构含量.杨氏参考CD谱采用的数据以 $\alpha$ -螺旋长度为 10 个氨基酸残基进行校正.

## 2 结果与讨论

### 2.1 神经红蛋白浓度的影响

图 1 是不同浓度 NGB 在 10 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液(pH 7.0)中的远紫外圆二色光谱图.图 2 是用杨

氏法计算得到的 $\alpha$ -螺旋含量随NGB浓度的变化曲线.由图 1 可以看出,当NGB的浓度小于 10  $\mu$ mol/L时,其远紫外区圆二色光谱在 208 和 222 nm处出现双负峰,在 193 nm处有一个正峰,这是典型的 $\alpha$ -螺旋结构特征<sup>[14]</sup>.而且,在这一浓度范围内,NGB的CD谱随浓度的变化很小,说明其二级结构在此浓度区间没有明显改变,这可从图 2 得到印证.随着NGB浓度的逐渐增大,其CD谱发生明显的变化,193 nm处的正峰及 208 nm处的负峰逐渐减小以至消失,222 nm处的负峰有所减小并且红移至 224 nm,最终在 224 nm处形成一宽负峰.由图 2 可知,NGB的 $\alpha$ -螺旋含量由 1  $\mu$ mol/L时的 73.1%下降至浓度为 40  $\mu$ mol/L时的 30.0%,但当浓度再继续增大时,其 $\alpha$ -螺旋含量基本不变.这些结果说明,NGB的二级结构与其浓度密切相关,这是由于NGB在浓度较高时其分子间可以形成二硫键及蛋白分子间可相互聚集的缘故<sup>[20,21]</sup>.

### 2.2 溶剂对神经红蛋白的影响

图 3 是 NGB 在不同溶剂中的 CD 光谱,表 1 是在不同溶剂中估算的 NGB 二级结构含量.由图 3 可以看出,在二次蒸馏水中 NGB 的 CD 谱在 208 和 222 nm 有两个负峰,在 193 nm 表现一强的正峰.在甲醇和乙醇中 NGB 的 CD 谱形状相似,分别在 223 nm 处有一弱负峰和 195 nm 处有一强正峰,208 nm 处的负峰已变得比较平坦.

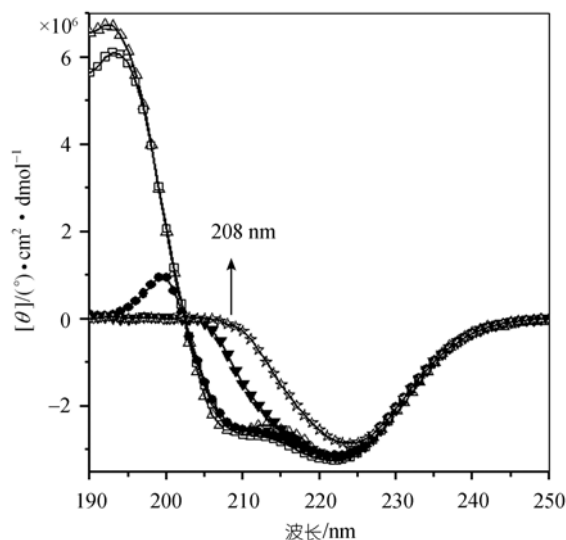


图 1 不同浓度时神经红蛋白的远紫外 CD 光谱,  $1 \times 10^{-6}$  mol/L;  $\square$ ,  $2 \times 10^{-5}$  mol/L;  $\triangle$ ,  $4 \times 10^{-5}$  mol/L;  $\blacktriangledown$ ,  $8 \times 10^{-5}$  mol/L;  $\bullet$ ,  $1 \times 10^{-4}$  mol/L. 图中箭头标示出 208 nm 处摩尔椭圆率随浓度增大的变化趋势

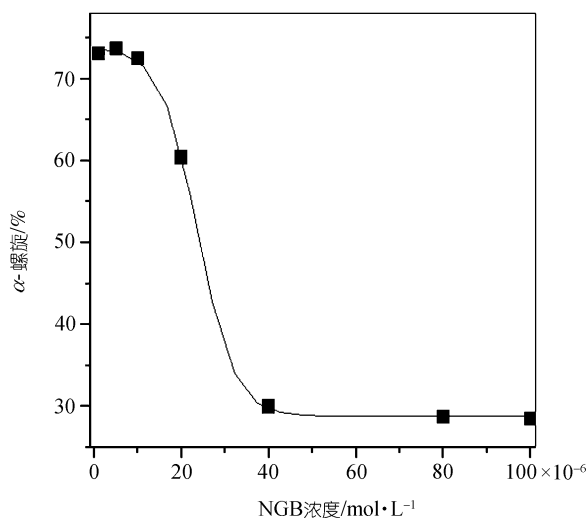


图 2 神经红蛋白的 $\alpha$ -螺旋含量随浓度变化的曲线

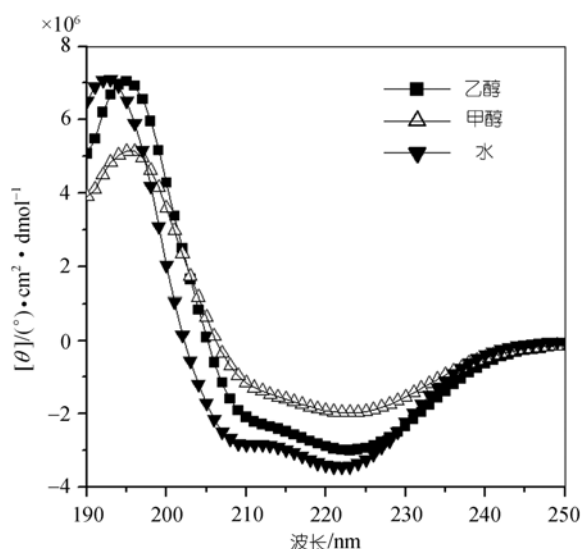


图 3 不同溶剂中神经红蛋白的远紫外 CD 光谱

从表 1 中的各种二级结构含量可知, NGB 在水、甲醇和乙醇中的 $\alpha$ -螺旋含量依次稍有增加, 分别为 67.7%, 70.3% 和 73.8%, 但在甲醇和乙醇中 NGB 的无规卷曲形式消失, 转变为 $\beta$ -转角和 $\alpha$ -螺旋形式. 这是由于高浓度的醇会使蛋白质与溶剂间的氢键作用力减弱, 导致多肽链内部的氢键相对增强<sup>[22]</sup>, 从而可形成某些二级结构, 这种作用可稳定蛋白结构. 醇类经常被看作是诱导 $\alpha$ -螺旋生成的溶剂<sup>[23]</sup>, 并且乙醇对 NGB  $\alpha$ -螺旋的这种诱导作用要大于甲醇. 另一方面也说明 NGB 对醇类溶剂的高稳定性.

表 1 不同溶剂中神经红蛋白的各种二级结构含量

溶剂	$\alpha$ -螺旋/%	$\beta$ -折叠/%	转角/%	无规卷曲/%	总量/%
乙醇	73.8	0.0	26.2	0.0	100.0
甲醇	70.3	0.0	29.7	0.0	100.0
水	67.7	0.0	10.1	22.2	100.0

### 2.3 溶液 pH 值的影响

图 4 是 NGB 在不同 pH (2.01 ~ 12.01) 值溶液中的 CD 光谱. NGB 在碱性条件下, 208 及 222 nm 处的负峰强度稍有降低, 但 193 nm 处的正峰发生红移, 当 pH 12.01 时红移至 196 nm, 并且峰强度随 pH 值的升高而减小. NGB 在酸性条件下, 193, 208 及 222 nm 处的峰强度都有明显降低. 图 5 为不同 pH 下 NGB 的 $\alpha$ -螺旋含量变化曲线. 由图 5 可看出, 在中性条件下, NGB 的 $\alpha$ -螺旋含量最高, 而在酸性及碱性条件下则明显降低, 分别由 pH 7.00 时的 68.7% 下降至 pH 2.01 时的 28.4% 和 pH 9.01 时的 32.4%.

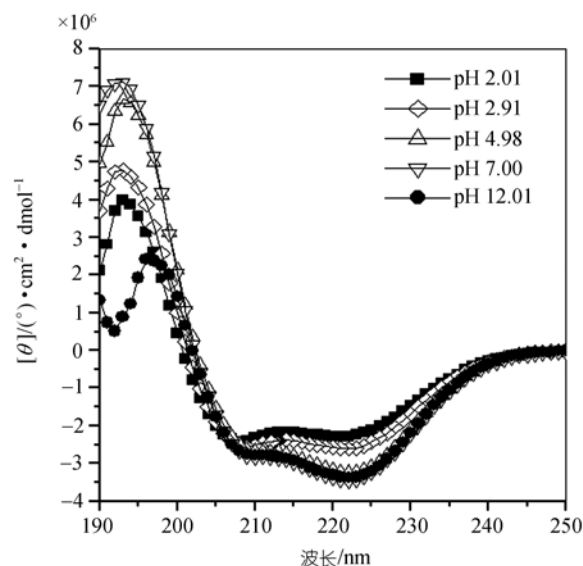


图 4 不同 pH 时神经红蛋白的远紫外 CD 光谱

这些结果说明, NGB 在不同 pH 的溶液中, 其二级结构变化显著, 酸性及碱性溶液均对其二级结构造成不同程度的破坏. 蛋白质分子中 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠的稳定性主要取决于分子内部的氢键, 显然, 溶液 pH 值的变化会影响蛋白分子内部氢键的形成, 进一步导致 $\alpha$ -螺旋等二级结构的改变.

### 2.4 神经红蛋白的热稳定性

图 6 是 NGB 热变性过程的 CD 谱. 由图 6 可以

看出, 随着温度的升高, 208 和 222 nm 处的负吸收峰强度逐渐减弱, 当温度超过 90 时, 这种减弱的趋势较为明显. 与 208 nm 处的负峰相比, 222 nm 处的峰强度降幅较大. 当温度达到 110 时, 222 nm 处的负峰基本平滑. 这说明, 随着温度的升高, 蛋白的二级结构逐渐被破坏.

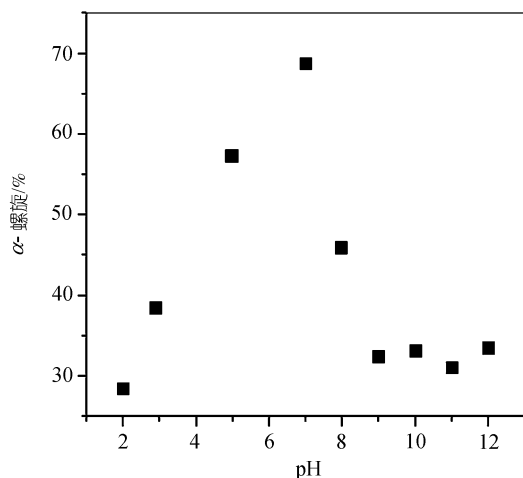


图 5 神经红蛋白的 $\alpha$ -螺旋含量随 pH 变化曲线

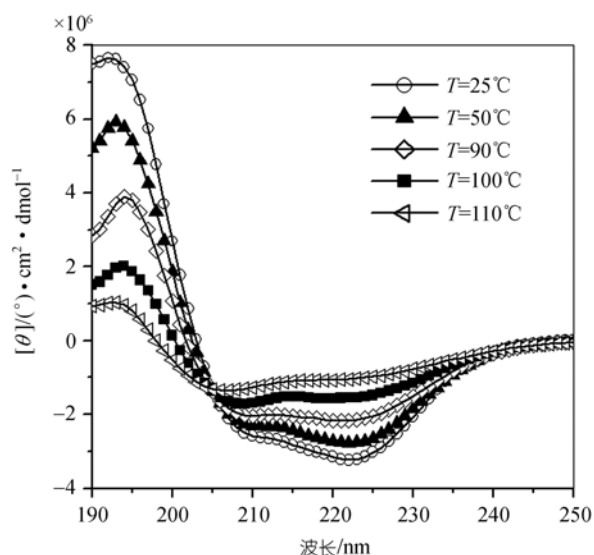


图 6 不同温度时神经红蛋白的远紫外 CD 光谱

图 7 为 NGB 的 $\alpha$ -螺旋含量随温度变化曲线. 从该曲线可以看出, 随着温度的升高, NGB 的 $\alpha$ -螺旋含量逐渐减少, 但当温度达到 110 时, 仍有 16.8% 的 $\alpha$ -螺旋形式存在. 这表明 NGB 是一个高热稳定性蛋白, 在较高温度下它也能保持相对较高的部分二级结构, 这与文献报道的结果一致<sup>[24]</sup>, 可能与 NGB 的六配位

结构相关.

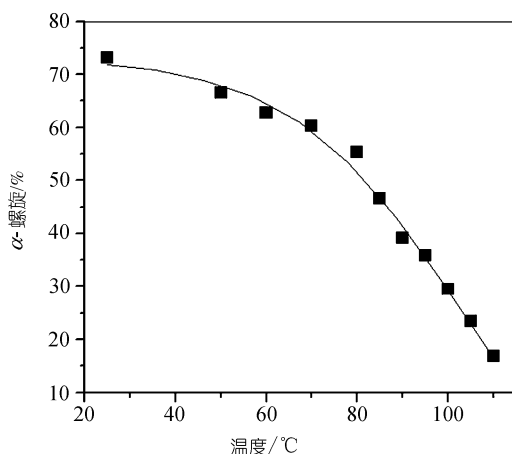


图 7 神经红蛋白的 $\alpha$ -螺旋含量随温度变化的曲线

总之, 神经红蛋白的二级结构对其周围环境比较敏感, 环境的改变将导致其二级结构的明显变化. 浓度的增加、溶剂性质的改变、溶液的酸碱性和温度的升高均能导致 NGB 二级结构中 $\alpha$ -螺旋含量不同程度的减少, 使其稳定性降低. 蛋白质的功能与其结构和构象密切相关, 了解影响 NGB 二级结构的因素, 对研究 NGB 的生物功能具有重要意义.

致谢 感谢南京大学配位化学研究所郭子建教授的支持与帮助. 本工作为国家自然科学基金(批准号: 20471025)资助项目.

### 参 考 文 献

- Burmester T, Weich B, Reinhardt S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*, 2000, 407(6803): 520—523 [\[DOI\]](#)
- Reuss S, Saaler-Reinhardt S, Weich B, et al. Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience*, 2002, 115(3): 645—656 [\[DOI\]](#)
- Schmidt M, Giessl A, Laufs T, et al. How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J Biol Chem*, 2003, 278(3): 1932—1935 [\[DOI\]](#)
- Burmester T, Ebner B, Weich B, et al. Cytoglobin: A novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol*, 2002, 19(4): 416—421
- Awenius C, Hankeln T, Burmester T. Neuroglobins from the zebrafish *Danio rerio* and the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287(2): 418—421 [\[DOI\]](#)
- Zhang C, Wang C, Deng M, et al. Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290(5): 1411—1419 [\[DOI\]](#)
- Pesce A, Dewilde S, Nardini M, et al. Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity.

- Structure, 2003, 11(9): 1087—1095 [\[DOI\]](#)
- 8 Pesce A, Dewilde S, Nardini M, et al. The human brain hexacoordinated neuroglobin three-dimensional structure. *Micron*, 2004, 35(1-2): 63—65 [\[DOI\]](#)
- 9 Trent J T 3rd, Watts R A, Hargrove M S. Human neuroglobin, a hexacoordinate hemoglobin that reversibly binds oxygen. *J Biol Chem*, 2001, 276(32): 30106—30110 [\[DOI\]](#)
- 10 Sun Y, Jin K, Mao X O, et al. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(26): 15306—15311 [\[DOI\]](#)
- 11 Pesce A, Dewilde S, Nardini M, et al. Human neuroglobin: crystals and preliminary X-ray diffraction analysis. *Acta Crystallogr D: Biol Crystallogr*, 2002, D58(102): 1848—1850 [\[DOI\]](#)
- 12 Holm L, Sander C. Structural alignment of globins, phycocyanins and colicin A. *FEBS Lett*, 1993, 315(3): 301—306 [\[DOI\]](#)
- 13 Bolognesi M, Bordo D, Rizzi M, et al. Nonvertebrate hemoglobins: structural bases for reactivity. *Prog Biophys Mol Biol*, 1997, 68(1): 29—68 [\[DOI\]](#)
- 14 Greenfield N J. Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 1999, 18(4): 236—244 [\[DOI\]](#)
- 15 李连之, 冀海伟, 赵超, 等. 神经红蛋白的表达、分离纯化和谱学表征. *科学通报*, 2005, 50(10): 964—969
- 16 赵超, 李连之, 冀海伟, 等. 神经红蛋白突变体(F28Y, F106Y)的构建、表达与表征. *高等学校化学学报*, 2006, 27(4): 641—645
- 17 Dewilde S, Kiger L, Burmester T, et al. Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 38949—38955 [\[DOI\]](#)
- 18 Fago A, Hundahl C, Dewilde S, et al. Allosteric, regulation and temperature dependence of oxygen binding in human neuroglobin and cytoglobin. *J Biol Chem*, 2004, 279(43): 44417—44426 [\[DOI\]](#)
- 19 JASCO Corporation. Model JWSSE-480 Protein Secondary Structure Estimation Program Operation Manual. J-800 for Windows, 1999. 6
- 20 Hamdane D, Kiger L, Dewilde S, et al. The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin. *J Biol Chem*, 2003, 278(51): 51713—51721 [\[DOI\]](#)
- 21 Maget-Dana R, Bonmatin J M, Hetru C, et al. The secondary structure of the insect defensin A depends on its environment, A circular dichroism study. *Biochimie*, 1995, 77(4): 240—244 [\[DOI\]](#)
- 22 Konno T, Tanaka N, Kataoka M, et al. A circular dichroism study of preferential hydration and alcohol effects on a denatured protein, pig calpastatin domain I. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1342(1): 73—82
- 23 Baskakov I V, Kumar R, Srinivasan G, et al. Trimethylamine N-oxide-induced cooperative folding of an intrinsically unfolded transcription-activating fragment of human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*, 1999, 274(16): 10693—10696 [\[DOI\]](#)
- 24 Hamdane D, Kiger L, Dewilde S, et al. Hyperthermal stability of neuroglobin and cytoglobin. *FEBS J*, 2005, 272(8): 2076—2084 [\[DOI\]](#)

(2006-03-16 收稿, 2006-05-26 接受)