

• 研究通讯 •

异硫氰酸荧光素-溶菌酶的制备及晶体生长预研究

戴国亮* 代连花 于 泳 谢 莹

(中国科学院力学研究所 国家微重力实验室 北京 100080)

摘要 迄今尚未有适用于光源为 488 nm 激光扫描共聚焦显微镜研究用的溶菌酶。为此, 用异硫氰酸荧光素作为探针标记了溶菌酶, 测定了溶菌酶标记物的紫外-可见吸收光谱和荧光光谱, 摸索了其晶体的生长条件。实验结果表明, 在标记过程中异硫氰酸荧光素没有影响溶菌酶的生化性质, 标记后的溶菌酶可用于激光扫描共聚焦显微镜进行后续研究。

关键词 异硫氰酸荧光素; 溶菌酶; 荧光特性; 晶体生长

Preparation and Crystallization Preinvestigation of the Fluorescein-5-isothiocyanate Derivatives of Chicken Egg White Lysozyme

DAI, Guo-Liang* DAI, Lian-Hua YU, Yong XIE, Ying

(State Key Laboratory of National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract The laser scanning confocal microscopy has been a powerful tool in research of protein crystal growth, which requires the protein to be extrinsically fluorescent. According to our laser source (488 nm Ar⁺), fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) was used as a probe to label the lysozyme. The absorption fluorescence spectra of the labeled lysozyme indicate that FITC has little effect on the biological and chemical characteristics of lysozyme. So the FITC derivatives of lysozyme can be used in research of protein crystal growth by the laser scanning confocal microscopy utilizing 488 nm laser source.

Keywords fluorescein-5-isothiocyanate; lysozyme; fluorescence characterization; crystal growth

用于研究蛋白质晶体生长的常用仪器有光散射仪^[1]、原子力显微镜^[2]和干涉仪^[3]等, 2001 年有文献报道了用激光扫描共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscopy, LSCM) 来研究蛋白质晶体生长的过程^[4], 同时获得了晶体生长速度以及重构的三维图象^[5]等。这些结果中, 有些结果是采用其他研究方法所无法获得的, 例如, 无损伤断层扫描和三维构建样品形貌等。因此, LSCM 可成为研究蛋白质晶体生长的一个强有力的工具。然而用 LSCM 研究时, 要求研究的样品具有荧光特性, 但蛋白质本身所具有的内源荧光一般却无法直接应用于蛋白质晶体生长研究中。这是因为蛋白质在结晶过

程中的浓度非常高, 而荧光技术却要求荧光探针的浓度尽可能的低, 以保持在线性反映区域内, 所以在研究蛋白质晶体生长时需要引入外源性荧光物质来解决这一问题。目前常用方法是用荧光探针标记蛋白质^[6]。通常, 溶菌酶常采用罗丹明作为荧光标记的荧光分子, 但由于罗丹明的最大吸收光谱为 550 nm, 最大发射光谱 620 nm, 不适用于我们实验室拥有的 410 倒置激光扫描共聚焦显微镜 (德国 ZEISS 公司) 的光源为 488 nm 的激光器上。因此, 生长出适于在 488 nm 下进行 LSCM 观察和测量的荧光蛋白质显得十分必要和迫切。

488 nm Ar⁺光源是一种广泛应用的激光光源, 为充

* E-mail: dspr@imech.ac.cn

Received June 30, 2004; revised November 16, 2004; accepted December 5, 2004.

国家自然科学基金 (No. 30270302) 和中国科学院知识创新工程基金 (No. KSCX2-SW-L05) 资助项目。

分利用我们实验室已有的 LSCM 这一研究晶体生长的有力工具, 本文采用了常用蛋白质——溶菌酶作为研究对象并对其进行了荧光标记. 在考虑了激发波长和发射波长范围后, 我们选择了异硫氰酸荧光素(FITC)作为探针. 另外本文还对标记后的溶菌酶的一些性质进行了研究.

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

溶菌酶, Sigma 公司(批号: L6876, 已经三次重结晶, 未进一步处理); 异硫氰酸荧光素, 美国 Sigma 公司(批号: F7250); $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HOAc-NaOAc 缓冲液: pH 4.5; $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二甲砷酸钠缓冲溶液 (CB): pH 9.0; 聚乙二醇 (PEG20000): 分析纯; PD10 柱(瑞典 Pharmacia 公司, Sephadex G25 柱); 紫外分光光度计: 日本 HITACHI 公司, UV-2800 型; 生化培养箱: 上海一恒科技有限公司, LRH-150 型; 荧光光度计: 日本 HITACHI 公司, F-2500 型; 荧光显微镜: 日本 Olympus 公司, BX60F5 型.

1.2 荧光标记方法

在碱性条件下 FITC 的碳酰胺键可与蛋白质赖氨酸残基的 ϵ 氨基共价结合, 在荧光标记后要求它与蛋白质的结合不影响蛋白质原有的生化性质^[7]. 本文采用搅拌法标记蛋白质. 将溶菌酶加入到 CB 缓冲溶液中, 使浓度为每毫升 CB 中含 20 mg 溶菌酶, 然后再称取适量 FITC 加入到 CB 溶液中使浓度为每毫升 CB 中含 3 mg FITC. 将 FITC-CB 溶液逐滴加入到溶菌酶-CB 溶液中, 室温避光搅拌 2 h 后用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOAc-HOAc 缓冲液透析过夜. 透析后溶液用 PD10 柱除去游离 FITC, 然后用 PEG 20000 浓缩, 离心后取上层清液, -4°C 保存. 用 NaOAc-HOAc 缓冲液洗脱第一个 FITC 结合蛋白峰时要测定 F (荧光素个数)和 P (蛋白质分子个数)的比值, 计算公式如下:

$$F/P = \frac{2.87 \times A_{280}}{A_{280} - 0.35 \times A_{495}}$$

其中, A_{280} 和 A_{495} 分别是 280 和 495 nm 处的吸光度. 结果表明, 每分子溶菌酶上标记的 FITC 约为 11 个.

1.3 紫外-可见吸收光谱和荧光光谱测定

根据 FITC-溶菌酶中每分子溶菌酶上标记的 FITC 约为 11 个($F/P=11$), 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HOAc-NaOAc 缓冲液来配制与 FITC-溶菌酶含量相同的溶菌酶和 FITC 做样品, 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HOAc-NaOAc 缓冲溶液做参比. 测量均在室温下进行. 在波长范围 200~500 nm 进行紫外-可见光测定. 荧光光谱的测定条件为: 激发波长 488

nm; 激发狭缝 10 nm; 发射狭缝 10 nm.

在浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ FITC-溶菌酶溶液中等体积加 13%(体积含量)NaCl 的 HOAc-NaOAc 溶液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 4.5), 在 20°C 生化培养箱中批量法生长晶体, 一段时间后可观察到晶体出现.

2 结果与讨论

图 1 为溶菌酶、FITC 和 FITC-溶菌酶的紫外-可见吸收谱图. 从图 1 中可以看出, FITC 在 488 nm 处有吸收峰. 在 280 nm 附近, FITC-溶菌酶表现出强的吸收, 并且在此峰附近, 溶菌酶、FITC 都有吸收. FITC 和溶菌酶的吸收谱图之和与 FITC-溶菌酶吸收谱图基本吻合, 这说明溶菌酶与 FITC 之间通过 ϵ 氨基共价结合后, 没有干扰各自的吸收特性.

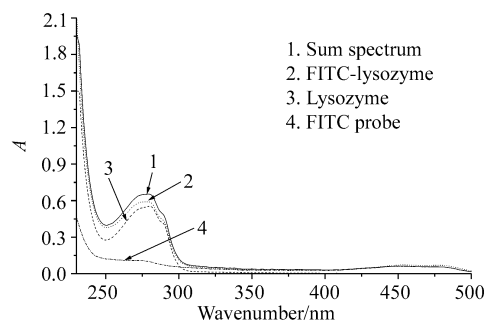


图 1 溶菌酶、FITC 和 FITC-溶菌酶吸收谱图

Figure 1 Absorption spectra of lysozyme, FITC and FITC-lysozyme, and the sum spectrum of lysozyme and FITC

图 2 是 FITC-溶菌酶在激发波长为 488 nm 下的荧光发射谱图, 其最大发射峰为 518 nm, 与 FITC 和溶菌酶最大发射峰相比基本相同. 并且在 518 nm 下, FITC-溶菌酶峰强度比 FITC 和溶菌酶高, 这说明如果用 LSCM 观察, FITC-溶菌酶将得到比 FITC 和溶菌酶更灵敏的信号.

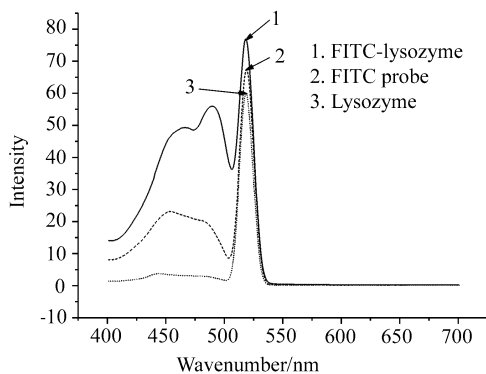


图 2 溶菌酶、FITC 和 FITC-溶菌酶的荧光发射谱图

Figure 2 Fluorescence emission spectra of lysozyme, FITC and FITC-lysozyme

在 20 °C 下, 用批量法培养出的晶体如图 3 所示. 生长出的 FITC-溶菌酶的大小约为 1.2 mm, 荧光强度也符合 LSCM 观察的要求, 因此利用这样的晶体进行 LSCM 观察是完全可行的.

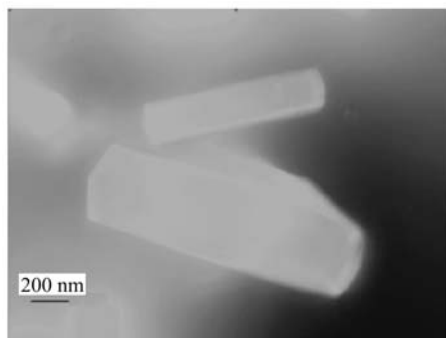


图 3 荧光显微镜下拍摄的 FITC-溶菌酶晶体

Figure 3 Crystals of FITC-lysozyme under reflected light fluorescence microscope

从上述实验结果看, 引入的荧光探针 FITC 满足了实验的要求, 与溶菌酶结合后没有影响蛋白质原有的生化性质; FITC 含量较低(每分子溶菌酶上标记的 FITC 约为 11 个), 生成的标记溶菌酶不但适宜于 488 nm 光源的使用, 而且初步研究发现, 其与未标记的溶菌酶的晶体

生长条件差别不大, 也较容易生长出晶体. 同时, 用 LSCM 作为工具来观察时必须要有晶体出现, 因此, 我们打算将用这种标记溶菌酶作为样品, 在 LSCM 上进行溶菌酶晶体生长动力学(如晶体三维重建、晶面生长速度和晶面缺陷)等方面的研究.

References

- 1 William, W. W. *J. Struct. Biol.* **2003**, 142, 56.
- 2 McPherson, A.; Kuznetsov, Y. G.; Malkin, A.; Plomp, M. *J. Struct. Biol.* **2003**, 142, 32.
- 3 Peter, G.; Vekilov, L. A.; Monaco, F. R. *J. Cryst. Growth* **1995**, 148, 289.
- 4 Mühlig, P.; Klupsch, T.; Schell, U.; Hilgenfeld, R. *J. Cryst. Growth* **2001**, 232, 93.
- 5 Mühlig, P.; Klupsch, T.; Kaulmann, U.; Hilgenfeld, R. *J. Struct. Biol.* **2003**, 142, 47.
- 6 Sumida, J. P.; Forsythe, E. L.; Pusey, M. L. *J. Cryst. Growth* **2001**, 232, 308.
- 7 Guo, Y.-J. *The Technique and the Application in the Molecule Biology of the Fluorescent Experiment*, Science Press, Beijing, **1979** (in Chinese).
(郭尧, 荧光实验技术及其在分子生物学中的应用, 科学出版社, 北京, **1979**.)

(A0406306 SHEN, H.)