

荧光寿命法研究变性剂对大肠杆菌碱性磷酸酶构象的影响

张海容^{*,a} 晋卫军^b 刘长松^{b*}

(^a 忻州师范学院化学系 忻州 034000)

(^b 山西大学化学系 太原 030006)

摘要 色氨酸残基荧光寿命监测了大肠杆菌碱性磷酸酶在不同变性剂中展开过程的构象变化. 结果表明: 不同变性剂加入蛋白质溶液中, 色氨酸残基的微环境发生了较大的变化, 荧光发射减弱, 寿命缩短, 预示了色氨酸残基从刚性的疏水内芯转移到蛋白质表面; 通过 Arrhenius 关系式获得的热力学参数如活化能 (E_a)、活化熵 (ΔS^\ddagger)、活化焓 (ΔH^\ddagger) 进一步证实了酶展开过程中中间态的形成.

关键词 大肠杆菌碱性磷酸酶, 荧光寿命, 色氨酸残基, 蛋白质构象

Study on Effects of Denaturants on the Conformation of *Escherichia coli* Alkaline Phosphatase by Phosphorescence Lifetime

ZHANG, Hai-Rong^{*,a} JIN, Wei-Jun^b LIU, Chang-Song^b

(^a Department of Chemistry, Xinzhou Teachers' University, Xinzhou 034000)

(^b Department of Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract The conformational change of *Escherichia coli* alkaline phosphatase in different denaturants during unfolding is monitored by phosphorescence lifetime of tryptophan (Trp) residue. The results suggest that addition of different denaturants to solution of protein results in a major change of microenvironment near Trp residues, causing a decrease of the phosphorescence emission and a corresponding shortening of the phosphorescence lifetimes. The results predict that the Trp residues are transferred from rigid hydrophobic core to the surface of protein. The data of thermodynamic parameters such as activation energy, activation entropy (ΔS^\ddagger) and activation enthalpy (ΔH^\ddagger) are obtained by the Arrhenius plots of AP, which further confirm that there is a stable intermediate state between the folding and unfolding conformation in AP solution.

Keywords *Escherichia coli* alkaline phosphatase, phosphorescence lifetime, tryptophan residue, conformation of protein

蛋白质中色氨酸残基荧光寿命具有很宽的范围, 从 30 μ s ~ 5 s 跨越近 6 个数量级. 荧光寿命提供了测定色氨酸所处区域的结构特点、柔性及其动力学性质的有力工具^[1~8]. 由于色氨酸残基所处的微环境的结构柔性不同、邻近基团不同、受内外界的猝灭因素不同, 因而蛋白质表现出不同的荧光寿命. 大肠杆菌碱性磷酸酶中有两个色氨酸位于蛋白质表面, 不发射荧光, 只有色氨酸 (Trp-109) 处于近核处 α -螺旋内的 β -折叠区的刚性部位而发射荧光. 改变蛋白质溶液中溶剂

成分, 由于介质环境变化, 色氨酸荧光随之变化, 变性剂和荧光性质二者的相关性进一步揭示了蛋白质展开过程中中间态的存在及其构象变化.

本文通过大肠杆菌碱性磷酸酶在 10 ~ 55 范围内不同变性剂存在下色氨酸荧光寿命变化, 测定了该酶在展开过程中形成活化过渡态的活化能、活化熵、活化焓的变化, 获得了蛋白质中色氨酸残基所处的微环境、构象变化等较多的信息.

* E-mail: zhang-hairong@sohu.com

Received September 24, 2002; revised and accepted November 21, 2002.

国家自然科学基金 (Nos. 29575204, 29875016) 资助项目.

1 实验

1.1 主要仪器和试剂

日立 F-4500 荧光光度计(日本日立公司); 激发、发射通带 10/20 nm; 501 型超级恒温槽(上海实验仪器厂); 大肠杆菌碱性磷酸酶(AP, Sigma 公司); 其余试剂分析纯; $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液, pH=7.5; 实验用水为二次去离子水。

1.2 实验方法

在 10 mL 比色管中加入 1 mL 40 $\mu\text{g/mL}$ 碱性磷酸酶工作液, 依次加入 pH=7.5 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液及适量其它变性剂; 再加入 Na_2SO_3 除氧剂, 二次水定容至刻度, 摇匀, 在荧光方式下测定不同温度荧光寿命, 荧光寿命计算按日立 F-4500 荧光光度计软件包完成。

2 结果与讨论

2.1 AP 的低温荧光(LTP)和室温荧光(RTP)光谱

用液氮低温装置(石英杜瓦瓶), 按实验方法, 将配制好的样品加入石英样品管($\phi=6\text{ mm}$)中, 记录 LTP 光谱, 结果见图 1。

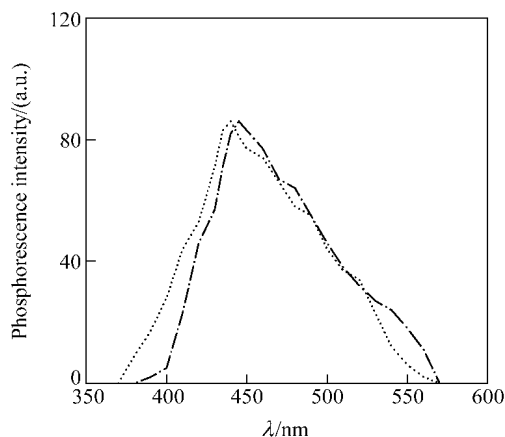


图 1 AP 的 LTP 和 RTP 光谱

Figure 1 LTP and RTP spectra of AP

- - - 77 K; — 295 K

AP 的 LTP 和 RTP 光谱分别为: $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 283/443\text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 283/446\text{ nm}$. 在相同仪器条件下, 测得的 RTP 光谱比 LTP 发射光谱红移 3 nm. 与文献[9]报道的五种蛋白质荧光室温时(293 K)比 77 K 时分别红移 1~3 nm 结果一致。

2.2 速率常数测定

蛋白质的荧光寿命和速率常数之间的关系式可表示为 $\tau^{-1} = k_p$, 一般认为 k_p 由两部分组成^[9]:

$$k_p = k_0^{-1} + k_T^{-1} \quad (1)$$

即 $k_0 = \tau_0^{-1}$, $k_T = \tau_T^{-1}$, 则

$$k_p = k_0 + k_T = k_0 + A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (2)$$

因此, 只要测得低温和不同温度时荧光寿命, 即可按式(2)作图求算有关热动力学参数。

用 $V(\text{二乙醇})/V(\text{水}) = 1/1$ 混合液(EGW)定容样品至刻度, 在 77 K 时呈透明状态. 以加入 EDTA ($1.0 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$) 为例, 按实验方法配制蛋白质溶液. 平衡、恒温育化 30 min. 测得低温和不同温度时荧光寿命见表 1, 衰减曲线见图 2。

表 1 不同温度时 AP 的荧光寿命

Table 1 Lifetimes of AP at different temperatures

T/ K	77	302	307	312	316	320	325	330
/ ms	5127	1713	1552	1263	1118	982	894	—

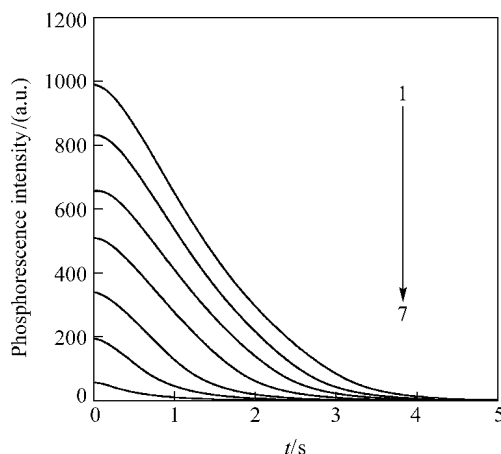


图 2 大肠杆菌碱性磷酸酶 Tip-109 残基在极少量 EDTA ($1.0 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$) 存在下室温荧光衰减曲线

Figure 2 The phosphorescence decay of Tip-109 residues in AP in the presence of micro amounts of EDTA ($1.0 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$)

Temperature: 1—29; 2—34; 3—39; 4—43; 5—47; 6—52, 7—57

2.3 不同变性剂存在下 Arrhenius 变化图

在 10~55 $^{\circ}\text{C}$ 范围内测不同温度时的荧光寿命(τ), $\ln k$ 与 T^{-1} 成线性关系, 说明碱性磷酸酶中色氨酸荧光发射在该范围内是单指数衰减(图 3)。

由 Arrhenius 方程式易知, $k = \tau^{-1} = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)$, E_a 为活化能, A 为指前因子, 分别可从斜率与截距计算获得(见图 3). 将不同变性剂中的数据作 AP 的 Arrhenius 关系图(图 3)。

2.4 过渡态时热力学函数计算

不同变性剂存在下, 有关蛋白质更多的结构信息可从动力学参数中获得. 对蛋白质溶液体系, 由于酶和变性剂之间相互作用的复杂性, 由统计力学计算配分函数是不实际的, 过渡态热力学理论处理往往是可行的^[10], 其速率常数可表示为:

$$k = \frac{k_B T}{h} \cdot \frac{q}{q_i} \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (3)$$

k_B 为 Boltzmann 因子, h 为 planck 常数, R 为气体常数, q_i 代表反应物种的单位体积的配分函数 q_i 的乘积. q 表示除了反应坐标以外过渡态中所有其它自由度的配分函数.

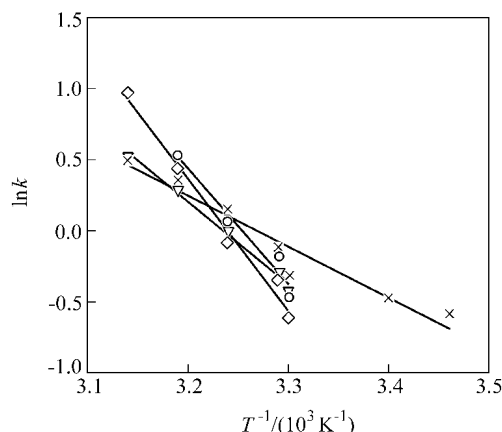


图3 不同变性剂存在下大肠杆菌碱性磷酸酶展开过程的 Arrhenius 图

Figure 3 Arrhenius plots of AP during the unfolding processes in the presence of various denaturants

▽—Gdn-HCl; ○—EDTA; ×—Buff Sol.; ●—KI

$$\text{而 } K = \frac{q}{q_i} \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (4)$$

比较式(3), (4)得:

$$k = \frac{k_B T}{h} K \quad (5)$$

两边取对数,得:

$$\ln k = \ln \frac{k_B}{h} + \ln T + \ln K \quad (6)$$

恒容条件下,式(6)对温度求偏微分,得:

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial T}\right)_v = \frac{1}{T} + \left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_v \quad (7)$$

$$E_a = RT + U \quad (8)$$

对液相反应而言,常压下 $H = U$,标准状态时

$$E_a = RT + H^\circ \quad (9)$$

由于 $G = -RT \ln K$ (G 为过渡态标准 Gibbs 自由能变化),由式(5)得,

$$k_p = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{G}{RT}\right) \quad (10)$$

而 $G = H - TS$,因此,

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{S}{R}\right) \exp\left(-\frac{H}{RT}\right)$$

式(8)结合 $H = U + nRT$,代入上式,并与 Arrhenius 公式比较,得:

$$A = e \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{S}{R}\right) \quad (11)$$

经简化后,标准状态时

$$S^\circ = R \ln \left(\frac{hA}{k_B T} \right) - R \quad (12)$$

由热力学函数关系式(9)和(12)可进一步计算反应过渡态的标准焓变和标准熵变 结果见表2.

表2 不同变性剂对大肠杆菌碱性磷酸酶展开过程的 E_a , S° , H° 的影响^a

Table 2 Effects of different denaturants on the E_a , S° , H° of AP during unfolding process

Denaturants	$E_a/$ (kJ \cdot mol $^{-1}$)	S° (J \cdot K $^{-1}$ mol $^{-1}$)	$H^\circ_{298 K}/$ (kJ \cdot mol $^{-1}$)
Buffer solution (pH = 7.5)	51.80	- 65.85	49.32
EDTA (5 $\times 10^{-5}$ mol/L)	25.03	- 158.03	22.55
Potassium iodide (0.5 mol/L)	34.33	- 116.65	31.85
Potassium sulfocyanate (0.4 mol/L)	41.74	- 96.61	39.26
Dioxane (0.293 mol/L)	43.73	- 84.14	41.25
Urea (2.0 mol/L)	35.50	- 108.75	33.02
Guanidine hydrochloride (1.0 mol/L)	47.64	- 73.25	45.16

^a $\epsilon_{\text{ex}}/\epsilon_{\text{em}} = 282/446$ nm; 每次测定平均温度间隔 4 左右,平衡孵化时间 10 min

结果表明:不同变性剂加入蛋白质溶液后,随蛋白质展开过程所形成的过渡态化合物的活化能、活化熵、活化焓呈一致下降趋势.根据蛋白质变性理论模型,由折叠态到展开态变化过程中,一般要经过若干稳定过渡态^[4].就活化能而言,与缓冲溶液体系相比,随其它变性剂加入 E_a 减小,不同变性剂加速了蛋白质的展开过程,降低了展开过程决定性步骤的活化能,使稳定中间态容易形成.由于酶的展开过程一般认为是破坏了维持折叠态分子间的作用力的无序过程,其熵值似乎应随变性剂加入而增大.实验表明, S° 负值随变性剂加入而增大,说明过渡态的结构比反应物更加“紧凑”,也即就整个溶液体系而言,不可忽视的是水分子的溶剂化过程,以及溶剂化物的形成占优势^[1],亦即伴随酶的展开过程,肽链中大量氨基酸残基的亲水性溶剂化物形成,使大量溶剂分子减少,释放热量增加,熵值下降.

References

- 1 Stephen, K.; Ely, T.; William, C. G. *Can. J. Biochem.* **1979**, 57, 1299.
- 2 Papp, S.; Vanderkooi, J. M. *Photochem. Photobiol.* **1989**, 49, 775.
- 3 Strambini, G. B.; Connelli, M.; Galley, W. C. *Biochem.* **1990**, 29, 203.
- 4 Mersol, J. V.; Steel, D. G.; Gafni, A. *Biophys. Chem.* **1993**, 48, 281.
- 5 Tölgyesi, F.; Ullrich, B.; Fidy, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1435, 1.
- 6 Vanderkooi, J. M.; Calhoun, D. B.; Englander, S. W. *Science* **1987**, 236, 568.
- 7 Sun, L.; Kantrowitz, E. R.; William, C. G. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 245, 32.
- 8 Cioni, P.; Piras, L.; Strambini, G. B. *Eur. J. Biochem.* **1989**, 185, 573.
- 9 Kai, Y.; Imakubo, K. *Photochem. Photobiol.* **1979**, 29, 261.
- 10 Han, D.-G.; Gao, P.-L. *The Bases of Chemical Dynamics*, Beijing University Press, Beijing, **1987**, p. 141 (in Chinese).
(韩德刚, 高盘良, 化学动力学基础, 北京大学出版社, 北京, **1987**, p. 141.)

(A0209248 SHEN, H.; DONG, H. Z.)