

文章编号: 1004-1656 (2009) 03-0423-04

# 溶液中金属盐对溶菌酶高级结构的影响

李文涓<sup>1,2</sup>, 李芳<sup>2</sup>, 唐燕红<sup>2</sup>, 黄波<sup>2</sup>, 曾成鸣<sup>1\*</sup>

(1. 陕西师范大学化学与材料科学学院, 陕西 西安 710062;

2 陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710062)

**摘要:** 探索蛋白质结构稳定性及其淀粉样纤维化的环境条件具有重要意义。本文采用了荧光光谱法研究溶液中的金属盐对鸡卵清溶菌酶内源荧光和淀粉样纤维化的影响。结果表明, 金属盐能够增加溶菌酶的热稳定性, 减小淬灭剂对内源荧光的作用, 对溶菌酶的高级结构具有一定的稳定作用。另一方面, 在长时间热胁迫的情况下, 金属盐可促进溶菌酶分子的聚集而纤维化。金属盐的这种双重作用分别与其阳离子和阴离子的性质有关。

**关键词:** 溶菌酶; 热变性; 淀粉样纤维化; 内源荧光

**中图分类号:** Q518.4 **文献标识码:** A

近年来, 有很多关于与蛋白质构象变化相关的人类疾病的报道, 如 Alzheimer's 疾病, 疯牛病, 帕金森氏病, 以及 2 型糖尿病等均与蛋白质或多肽的淀粉样纤维化沉积有关<sup>[1,2]</sup>。实际上, 一些与疾病不相关的蛋白质也可以形成淀粉样纤维<sup>[3]</sup>, 所以, 淀粉样纤维化是所有蛋白质的共性。蛋白质淀粉样纤维化的机制目前尚不清楚。已有的研究表明, 蛋白质的成纤维倾向除了与其序列和结构有一定的关系外, 更重要的是与蛋白质所处的环境条件密切相关。在生物体内, 蛋白质总是处于一个复杂的缓冲体系中, 其中的金属离子和酸根离子通过与蛋白质的相互作用, 使得蛋白质分子能够保持正确的结构, 从而发挥正常的生物功能。一旦这种体系失衡, 蛋白质就可能产生错误折叠而生成淀粉样聚集体。

溶菌酶是一种具有抗菌作用的小分子蛋白, 其突变体可引起家族性淀粉样变性疾病, 是最具有淀粉样纤维化倾向的蛋白质之一<sup>[4]</sup>。溶菌酶蛋白家族具有高度的序列和结构保守性。作为该超家族的成员, 鸡卵清溶菌酶蛋白同样具有淀粉样纤维化倾向<sup>[4]</sup>。本文以鸡卵清溶菌酶作为模型, 用分子荧光的方法探索  $MgSO_4$ ,  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $NaCl$ ,  $Na_2SO_4$ ,  $LiCl$  六种金属盐对鸡卵清溶菌酶热变性和淀粉样纤维化的影响, 以深入研究金属离子及重要的酸根离子在蛋白质空间结构改变和淀

粉样纤维化过程中的作用。这对于深入理解蛋白质在生命过程中的行为, 探索蛋白质构象相关疾病的机制具有重要意义。

## 1 试验部分

### 1.1 材料与仪器

**实验药品及试剂:** 鸡卵清溶菌酶, 硫黄素 (Thioflavin T, ThT), 丙烯酰胺购自美国 Sigma 公司; 金属盐和其它试剂均为国产分析纯试剂。

**实验仪器:** LS-55 型荧光分光光度计 (美国 Perkin-Elmer 公司); SPM-9500J3 型原子力显微镜 (日本岛津公司)。

### 1.2 样品制备

**溶菌酶蛋白溶液:** 200 mg 鸡卵清溶菌酶蛋白溶于 10 mL HCl (10 mmol/L, pH 2.0) 溶液, 用于内源荧光和荧光淬灭的检测, 4℃ 保存备用。加入金属离子时, 每种金属离子的终浓度均为 0.1 mol/L。

**溶菌酶淀粉样纤维:** 200 mg 鸡卵清溶菌酶蛋白溶于 10 mL HCl (10 mmol/L, pH 2.0) 溶液, 终浓度为 2% (w/v)。混合液在水浴 65℃ 中孵育 10 天<sup>[4]</sup>。纤维的生长曲线由 ThT 荧光检测。成熟纤维保存在 4℃ 备用。加入金属离子时, 每种金属离子的终浓度均为 100 mmol/L。

### 1.3 内源荧光

取 100  $\mu$ L 溶菌酶样品, 加至 10 mmol/L HCl

收稿日期: 2008-10-29; 修回日期: 2009-01-14

联系人简介: 曾成鸣 (1957-), 男, 教授, 主要研究方向: 化学生物学。Email: chengningzeng@snnu.edu.cn

(PH 2.0)中,使样品的终浓度为  $2.4 \mu\text{mol/L}$ ,用荧光分光光度计检测内源荧光,激发波长  $295 \text{ nm}$ ,于  $300\text{-}500 \text{ nm}$  之间扫描样品的荧光光谱。

#### 1.4 荧光淬灭实验

荧光淬灭剂丙烯酰胺溶于双蒸水中 ( $4 \text{ mol/L}$ ),于  $4^\circ\text{C}$  避光保存。向  $3 \text{ mL}$  溶菌酶样品 ( $2.4 \mu\text{mol/L}$ ) 中加入不同浓度淬灭剂,用荧光分光光度计扫描样品的内源荧光光谱。根据 Stern-Volmer 修正公式分析荧光淬灭结果<sup>[5]</sup>:

$$F_0 / F = f_m^{-1} + (f_m \times K)^{-1} \times [Q]^{-1}$$

其中  $F_0$  和  $F$  分别为加入淬灭剂前后样品的荧光强度,  $[Q]$  为淬灭剂的浓度,  $F = (F_0 - F)$  表示加入淬灭剂前后荧光强度的变化值,  $f_m$  为可被荧光淬灭剂所接近的发色基团占总荧光发色基团的百分比,  $K$  为淬灭常数。以  $F_0 / F$  对  $[Q]^{-1}$  作图,经回归计算出相应的常数  $f_m$  和  $K$ 。

#### 1.5 ThT 荧光检测

用  $10 \text{ mmol/L}$  磷酸盐缓冲液 (PH 7.0) 配制 ThT 溶液 ( $1 \text{ mmol/L}$ ),于  $4^\circ\text{C}$  避光保存备用。取  $10 \mu\text{L}$  孵育的溶菌酶样品,加至  $10 \text{ mmol/L}$  Tris-HCl 溶液 (pH 8.0) 中,再加入  $30 \mu\text{L}$  ThT 溶液使 ThT 的终浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$ ,振荡  $10 \text{ s}$  左右,用荧光分光光度计记录荧光强度。激发波长:  $440 \text{ nm}$ ,发射波长  $484 \text{ nm}$ 。

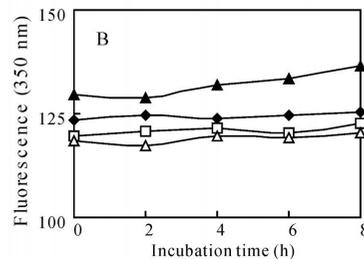
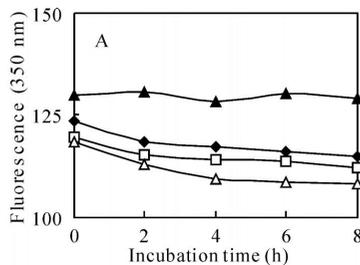


图 1 金属离子对溶菌酶内源荧光的影响

Fig 1 Effect of metal ion on the intrinsic fluorescence of lysozyme at room temperature (A) and incubated at  $65^\circ\text{C}$  (B) (●, L (lysozyme); □, L +  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; △, L +  $\text{CaCl}_2$ ; ▲, L +  $\text{LiCl}$ )

#### 2.2 丙烯酰胺对溶菌酶内源荧光的淬灭作用

丙烯酰胺是不带电荷的极性淬灭剂,处于分子表面或不太深的沟槽中的荧光发色团,较易与淬灭剂接近而产生荧光淬灭。故利用荧光淬灭的方法可以揭示荧光基团在蛋白质分子中的位置及淬灭剂对蛋白质分子的渗透程度,因而可以用来研究蛋白质分子在溶液中的构象变化。

#### 1.6 原子力显微镜 (AFM) 观察溶菌酶纤维

溶菌酶成熟纤维用水稀释至终浓度  $0.02 \text{ mg/mL}$ ,取  $10 \mu\text{L}$  滴于 AFM 专用云母片上,室温下干燥,用 AFM 扫描并记录溶菌酶纤维形态。

## 2 结果与讨论

### 2.1 溶菌酶内源荧光

溶菌酶在  $350 \text{ nm}$  左右的内源荧光峰来自于色氨酸 (Trp) 残基。蛋白质的 Trp 荧光对微环境的变化很敏感,可用来分析蛋白质内部结构的微小变化。

在室温条件下,溶菌酶的 Trp 荧光值较为稳定。所有金属盐均可使溶菌酶的内源荧光值降低 (图 1A),这种作用与荧光淬灭效应无关。水浴  $65^\circ\text{C}$  加热时,溶菌酶的 Trp 荧光值随孵育时间的增加而升高 ( $+5.3\%$ ,  $8 \text{ h}$ ; 图 1B),说明溶菌酶在热变性时,部分 Trp 荧光基团的微环境发生变化,使荧光强度增大。加入金属盐后,Trp 荧光值的变化相对较小 ( $-0.8\% \sim +2.1\%$ ,  $8 \text{ h}$ ),表明金属盐能够减小 Trp 基团微环境的改变,对溶菌酶具有一定的热稳定作用。金属盐的作用大小顺序为:  $\text{LiCl} > \text{MgSO}_4 > \text{MgCl}_2 \sim \text{CaCl}_2 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{NaCl}$ 。

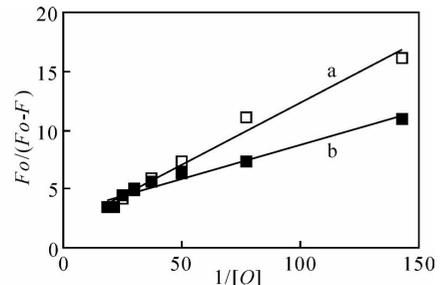


图 2 丙烯酰胺对溶菌酶内源荧光淬灭作用的 Stern-Volmer 曲线图

Fig 2 The Stern-Volmer plots for the tryptophan quenching within lysozyme by acrylamide in the absence (a) and the presence of calcium chloride (b).

丙烯酰胺可以部分淬灭溶菌酶 T<sub>1</sub>p 内源荧光, 淬灭作用的大小与其浓度呈正相关, 但 T<sub>1</sub>p 荧光发射峰波长及峰形不变。以  $F_0 / F$  对  $[Q]^{-1}$  作图均得到一条近似直线 (图 2), 表明为静态淬灭, 并且有多个 T<sub>1</sub>p 残基对溶菌酶荧光有贡献。

表 1 列出了根据 Stern-Volmer 公式计算出的  $K$  和  $f_m$  值。丙烯酰胺对溶菌酶中 T<sub>1</sub>p 残基的接近

表 1 丙烯酰胺在不同条件下对溶菌酶内源荧光淬灭的  $K$  和  $f_m$  值

Table 1 Quenching parameters of tryptophan fluorescence by acrylamide in the presence of metal ions

	L	L + MgSO <sub>4</sub>	L + NaCl	L + MgCl <sub>2</sub>	L + CaCl <sub>2</sub>	L + LiCl	L + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
$K$	7.9736	5.114	7.039	6.529	7.085	5.5015	9.142
$f_m$	0.564	0.344	0.551	0.309	0.352	0.307	0.544

2.3 溶菌酶淀粉样纤维化及其 ThT 荧光结果

ThT 是一种能与蛋白质或多肽淀粉样纤维的片层结构特异性结合的荧光探针, 在 440 nm 波长激发条件下产生特征荧光发射峰  $\lambda_{em} = 482 \text{ nm}$ 。在酸性条件下, 溶菌酶具有淀粉样纤维化倾向, 随

程度达到 56%。当体系中存在金属盐时, 丙烯酰胺对溶菌酶中 T<sub>1</sub>p 残基的接近程度降低, 进一步证明了金属盐通过对微环境的影响使溶菌酶中的 T<sub>1</sub>p 包埋于分子内部, 导致荧光淬灭剂不易接近发色基团。导致淬灭作用降低的金属盐强弱次序:  $\text{LiCl} \sim \text{MgCl}_2 > \text{MgSO}_4 > \text{CaCl}_2 > \text{NaCl} \sim \text{Na}_2\text{SO}_4$ 。

着 折叠结构成分增加, 其 ThT 荧光强度也相应增大, 纤维到达成熟阶段时, ThT 荧光强度达到最大。此时溶菌酶纤维是一种直径 6-35 nm, 长度 170-4500 nm 的特殊聚集体 (图 3A)。

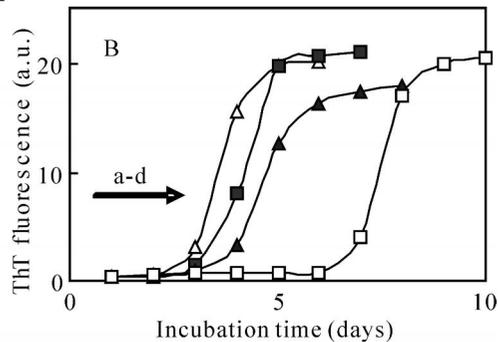
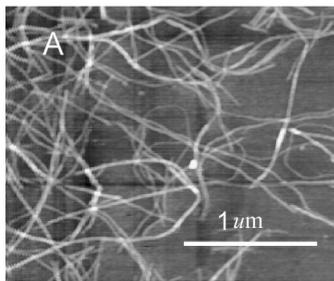


图 3 溶菌酶淀粉样纤维的形态及金属盐对纤维生长动力学的影响  
Fig 3 Morphology of lysozyme amyloid fibrils under AFM (A) and fibrillation kinetics of lysozyme in the presence and the absence of salts (B)  
(a, L + MgSO<sub>4</sub>; b, L + CaCl<sub>2</sub>; c, L + LiCl; d, lysozyme only)

如图 3B 所示, 溶菌酶纤维的生长过程以 S 型曲线为特征, S 型曲线表明蛋白质淀粉样纤维化是一个成核聚合 (Nucleation polymerization) 的动力学过程<sup>[6]</sup>。在纤维开始生长以前的一定的时间内, ThT 荧光较弱, 此阶段被称为蛋白质淀粉样纤维化过程中的延迟期 (Lag phase)。之后出现 ThT 荧光突然增强的现象, 直到荧光值达到一个稳定阶段, 为纤维生长期 (Grow phase)<sup>[7]</sup>。与对照样品相比, 加金属盐的样品 ThT 荧光增强速度较快, 延迟期相对较短。说明金属盐对溶菌酶淀粉样纤维化有促进作用, 这一作用大小顺序为:  $\text{MgSO}_4 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{CaCl}_2 > \text{NaCl} \sim \text{MgCl}_2 > \text{LiCl}$ 。金属盐的作用包括两个方面: 一是降低了蛋白质分子间的静电斥力, 使得带有正电荷的蛋白质分子更容易接近; 再就是通过加强分子间的疏水作用力使蛋白质分子产生聚集, 加速了成纤维过程。金属盐的这种作用主要与阴离子加强蛋白质分子间作用力的性质 (Kosmotropic effect) 有关, 其大小符合 Hofmeister 离

子系列规律<sup>[8]</sup>。

根据我们另外的实验结果, 虽然金属盐能够促进溶菌酶纤维的生长, 但不能改变淀粉样纤维的形态及细胞毒性。说明蛋白质淀粉样纤维的细胞毒性与其生长动力学无关, 而与纤维的其它性质, 如聚集体的 折叠结构增加和表面疏水性增强有关<sup>[9]</sup>。

鸡卵清溶菌酶含有 129 个氨基酸残基, 有 4 个链内二硫键, 整个单链分子主要以 螺旋结构为主, 以一种较为紧密的方式构成球状体, 具有很强的稳定性。其中含有的 6 个 T<sub>1</sub>p 残基有一半暴露于分子表面 (图 4), 与本文的荧光淬灭试验结果比较吻合。金属盐可以使溶菌酶的空间结构更为紧密, 因而减小了外加胁迫下 T<sub>1</sub>p 残基的微环境变化, 同时也减小了丙烯酰胺与 T<sub>1</sub>p 残基的接近程度。金属盐的这种作用与阳离子的离子势大小呈正相关。

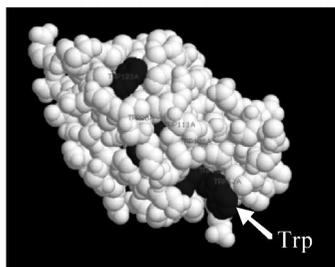


图 4 溶菌酶分子结构模型及色氨酸残基在分子中的位置

Fig 4 A hard sphere model of lysozyme by RASMOL Software using the data of hen egg white lysozyme in Protein Data Bank (Tryptophan residues are marked with deep color)

以上结果表明,金属盐既可以稳定溶液中的溶菌酶分子结构,又可以促进溶菌酶聚集而纤维

#### 参考文献:

- [1] Ross C A, Poirier M A. Protein aggregation and neurodegenerative disease [J]. *Nature Med*, 2004, 10: S10-S17.
- [2] Stefani M. Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world [J]. *Biochim. Biophys Acta*, 2004, 1739: 5-25.
- [3] Guijarró J I, Sunde M, Jones J, et al Amyloid fibril formation by an SH3 domain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 4224-4228.
- [4] Frare E, de Laureto P P, Zurdo J, et al A highly amyloidogenic region of hen lysozyme [J]. *J. Mol Biol*, 2004, 340: 1153-1165.
- [5] 安道利,李建晴,郭文奎.孔雀石绿与牛血清白蛋白作用的光谱研究 [J]. *化学研究与应用*, 2008, 20(11): 1411-1414.
- [6] Hoyer W, Antony T, Chemy D, et al Dependence of synuclein aggregate morphology on solution conditions [J]. *J. Mol Biol*, 2002, 322: 383-393.
- [7] Föndrich M. Absolute correlation between lag time and growth rate in the spontaneous formation of several amyloid-like aggregates and fibrils [J]. *J. Mol Biol*, 2007, 365: 1266-1270.
- [8] Zhang Y, Cremer P S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2006, 10: 658-663.
- [9] 王一敏,张献清,贺静,等.氨基酸对胰岛素纤维形成及细胞毒性的影响 [J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(11): 964-966.
- [10] Sikkink L A, Ramirez-Alvarado M. Salts enhance both protein stability and amyloid formation of an immunoglobulin light chain [J]. *Biochem. Biophys Res Commun*, 2008, 375: 25-31.

### Effects of salts on the tertiary structure of hen egg white lysozyme in solution

L I Wen-juan<sup>1,2</sup>, L I Fang<sup>2</sup>, TANG Yan-hong<sup>2</sup>, HUANG Bo<sup>2</sup>, ZENG Cheng-ming<sup>1\*</sup>

(1. College of Chemistry and Material Science, Shanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

2. College of Life Science, Shanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

**Abstract:** The importance of physical and chemical environment in determining stability and fibrillation of a protein has been recognized and explored extensively. In this paper, we have examined the effects of salts on intrinsic fluorescence and amyloid fibrillation of hen egg white lysozyme. The results indicated that salts enhanced thermal stability of lysozyme by rendering the protein a more rigid conformation. On another hand, salts accelerated the conversion of lysozyme from native conformation into amyloid fibrils. The dual effect of salts on the tertiary structure of lysozyme depends strongly on the properties of metal ions and anions of salts.

**Key words:** lysozyme; thermal denaturation; amyloid fibrillation; intrinsic fluorescence

(责任编辑 罗娟)