

文章编号: 0258-7025(2005)04-0576-05

人脑硫氧还蛋白还原酶的光谱学研究

兰秀风¹, 周唐建¹, 杨 涛², 骆晓森^{1,2}, 倪晓武^{1,3}, 许 琳²

¹南京理工大学应用物理系, 江苏 南京 210094
²中国人民解放军第二军医大学南京军医学院, 江苏 南京 210099
³徐州师范大学物理系, 江苏 徐州 221009

摘要 在紫外光诱导硫氧还蛋白还原酶(TrxR)产生荧光光谱的实验基础上,对 TrxR 溶液的谱线特性及其产生机理进行了研究。实验结果表明,在波长为 253.7 nm 的紫外光激励下,TrxR 溶液能够产生较强的荧光,其光谱覆盖了 280~720 nm 的范围,谱峰形状主要由两个宽阔的峰及分布在宽峰上的诸多细锐的次峰组成;随着 TrxR 溶液浓度的改变,宽峰和锐峰分别表现出不同的变化趋势。根据分子内部能量转换理论以及共振拉曼散射理论,对 TrxR 产生的荧光光谱的机理进行了理论分析。理论和实验研究结果均表明中心波长位于 336 nm 的宽峰是来自于 TrxR 分子中的色氨酸的荧光峰,而诸多锐峰则是 TrxR 分子的共振拉曼散射。对波长为 253.7 nm 的紫外光激励的 TrxR 溶液荧光光谱的研究有助于研究溶液状态下 TrxR 分子的构像、结构以及分子的电子振动态等。

关键词 光谱学; 硫氧还蛋白还原酶; 荧光光谱; 紫外光激励; 共振拉曼散射

中图分类号 Q632; Q71 **文献标识码** A

Spectroscopy Study on Thioredoxin Reductase From Human Brain

LAN Xiu-feng¹, ZHOU Tang-jian¹, YANG Tao², LUO Xiao-sen^{1,2}, NI Xiao-wu^{1,3}, XU Lin²

¹ Department of Applied Physics, Nanjing University of Science and Technology,
Nanjing, Jiangsu 210094, China
² Nanjing Medical College, Second Military Medical University, Nanjing, Jiangsu 210099, China
³ Physics Department, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221009, China

Abstract Based on the experiment of fluorescence spectra of thioredoxin reductase (TrxR) from human brain by the excitation of ultraviolet light (UV-light), this paper studies the spectral characteristics and their origins. The experimental results show that, under the excitation of UV-light, TrxR solution emits spectra of region from 280 nm to 720 nm, including two wider bands and many sharper peaks. The wider bands and the sharper peaks represent different tendency along with the change of solution concentration. According to the theory of conversion of internal energy and resonant Raman scattering, the theoretical analyses of TrxR fluorescence spectra are educed. The results indicate that the wide band with the peak locating at 336 nm is the fluorescence from tryptophan in TrxR and the sharper peaks mostly come from the resonant Raman scattering of TrxR. These researches on the emission spectra of TrxR solution may represent an effort to better understand the conformation, structure and vibration of TrxR molecule.

Key words spectroscopy; thloredoxin reductase; fluorescence spectra; ultraviolet light excitation; resonant Raman scattering

1 引 言

硫氧还蛋白还原酶(TrxR)是硫氧还蛋白(Trx)系统的组成成分之一,广泛分布于肝细胞、上皮细胞、神经细胞及不同类型的分泌细胞中。在参与细

胞增殖、维持细胞内氧化还原平衡、调节蛋白质正确折叠、维持蛋白质生物学活性及功能等方面起重要作用^[1]。自 1964 年 Reichard 对该系统进行命名以来,人们从不同的生物来源,通过不同研究方法,从

收稿日期: 2004-03-11; 收到修改稿日期: 2004-08-05

基金项目: 高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划项目(2003-2008)资助。

作者简介: 兰秀风(1976—),女,南京理工大学应用物理系博士研究生,主要从事光与生物组织相互作用的实验与理论研究。E-mail: nxw@mail.njust.edu.cn

不同的方面来研究 Trx 系统自身的结构功能与人类疾病的关系,已发现 Trx 系统在肿瘤发展、病毒感染、中枢神经系统的退行性病变等疾病中起重要作用^[2,3]。近年来,对 TrxR 基因的研究又得到深入,但对 TrxR 本身特别是对 TrxR 的构像、空间结构等的研究尚不多见,而蛋白质构像、空间结构与其功能密切相关,因此有必要展开对 TrxR 的构像与空间结构的研究。

研究蛋白质的方法很多,可以概括为两类:一类是测定溶液中蛋白质分子的构像。如核磁共振(NMR)波谱法^[4]、拉曼光谱法^[5]以及荧光光谱法^[6]等。另一类是测定晶体蛋白质的分子结构。如 X 射线衍射分析法^[7]和小角中子衍射法^[8]。X 射线衍射分析法可以较准确地测量晶态蛋白质分子的空间结构,但许多蛋白质并不能培养出单晶,且生命体中的蛋白质多数以溶液状态存在,实际与晶体的结构有一定的差别,因而难以准确地获得其空间结构。中子衍射法由于仪器昂贵等原因,目前该方法用于蛋白质分子的构像研究刚起步。荧光光谱法是研究蛋白质分子的构像和空间结构的一种有效方法。它能提供激发光谱、荧光光谱、荧光强度、量子产额、荧光寿命、荧光偏振等许多物理参量,这些参量从各个角度反映了分子的成键和结构情况,通过对这些参量的测定,不仅可以进行一般的定量分析,而且还可以推知蛋白质分子在各种环境下的构像变化,从而阐明蛋白质结构与功能之间的关系。同时,荧光光谱法还具有灵敏度高、选择性强、用样量少、方法简便等优点。所以该方法在蛋白质分子构像和生物分子结构与功能的^[9~11]研究中得到越来越广泛的应用。

在 2003 年初,笔者曾报道了波长为 407 nm 的紫色 LED 光诱导的 TrxR 荧光特性及产生机理^[12],实验与理论研究结果均表明在紫色的 LED 光诱导下,TrxR 能够发射出荧光光谱,且变性前后的荧光光谱有明显的区别。为了进一步了解 TrxR 分子的结构与生理特性,笔者又对溶液状态下的 TrxR 在波长 253.7 nm 的紫外光激励下的荧光光谱进行了研究。本文主要报道该方面的最新实验结果,并对波长为 253.7 nm 的紫外光激励下的 TrxR 荧光产生机理作了初步分析,研究结果有助于进一步研究 TrxR 的结构及其人体内 TrxR 含量与其生理功能的关系等。

2 实验材料与方法

2.1 实验仪器

获得 TrxR 荧光光谱的实验装置如图 1 所示,

采用天津港东公司生产的 WGD-8 型多功能光栅光谱仪测量溶液的荧光光谱,其中的分光元件采用每毫米 1200 刻线的闪耀光栅;光电转换器件是日本的 Hamamatsu 公司生产的 R928 型光电倍增管(PM),其输出端与计算机连接。波长扫描范围为 200~850 nm。由于本文所涉及的实验曲线在 750~850 nm 波段均未见荧光光谱,为突出重点,仅给出了 200~750 nm 波段的光谱图。激发光源是波长为 253.7 nm 的紫外光源,输出功率约为 1 mW,其光谱曲线如图 2 所示。考虑到光栅光谱仪中的负高压和增益参量不同时,获取的谱线高度差异较大,如光电倍增管的负高压 V ,共分八档;而后置放大器的放大率,即增益 P ,共分七个档次,这两者中的任一项对应的数值增大,都会使谱线的幅值产生较大的增加,尤其以负高压的影响为甚。因而以下所列光谱图中纵轴所给出的将是相对光强。

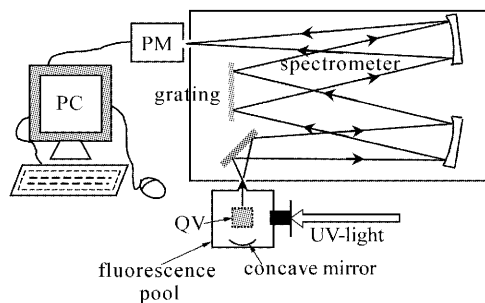


图 1 实验装置简图

Fig. 1 Schematic diagram of the experimental setup

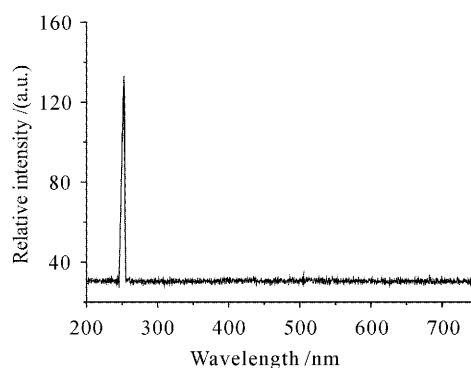


图 2 激发光光谱

Fig. 2 Spectrum of ultraviolet light

2.2 实验样品制备

实验用的 TrxR 溶液由中国人民解放军第二军医大学南京军医学院生物基因研究中心提供的人脑 TrxR 基因表达产物。将 TrxR 的基因重组到大肠杆菌(宿主菌)的基因上进行蛋白质表达,表达的蛋白质存在于细胞质中。当该目的蛋白在宿主菌中表达量

达到 30% 以上时,它以包涵体(Inclusion body, IB)形式存在^[13]。用超声破碎细胞、冷冻离心收集包涵体,然后用高浓度的变性剂溶解并纯化得到 TrxR 原液。不同浓度的溶液为三次蒸馏水稀释 TrxR 原液所得。

2.3 实验方法

2.3.1 用紫外吸收法确定 TrxR 原液的浓度

取待测 TrxR 溶液 30 μL 加水稀释成 4.5 mL,测得 280 nm 波长下的光密度值及 260 nm 波长下光密度值。按照华伯氏-克里斯琴(Warburg-Christian)公式^[14]:

$$W = 1.55A_{280} - 0.76A_{260},$$

其中 W 表示蛋白质浓度(单位为 mg/mL), A_{280} 和 A_{260} 分别是溶液在 280 nm 和 260 nm 处的吸收度。

计算得所测定的 TrxR 浓度,乘上稀释倍数(150),即得到样品 TrxR 溶液的浓度。

2.3.2 荧光光谱的获取

用不发荧光的石英比色皿盛装被测样品 0.8 mL,并将其置于荧光池内(见图 1)。波长为 253.7 nm 的紫外光照射样品后,采用 T 字形光路接收样品的荧光。所有样品的荧光光谱检测均在 29 $^{\circ}\text{C}$ 的室温下进行,扫描间隔为 0.1 nm,每一样品均进行

三次扫描测试,三次测得的实验结果基本稳定一致。

3 实验结果

3.1 TrxR 溶液的浓度

采用紫外吸收法测得 $A_{280} = 0.294$; $A_{260} = 0.332$,根据华伯氏-克里斯琴经验公式计算得 TrxR 溶液浓度为 30 mg/mL。

3.2 荧光光谱

采用图 1 给出的实验装置测得浓度为 30 mg/mL 的 TrxR 溶液的荧光光谱如图 3(a) 所示。由光谱图可知,在波长为 253.7 nm 的紫外光激励下,TrxR 可以发射出三个比较强的光谱峰:两个宽峰及一个锐峰。宽峰的波长范围分别为 287~484 nm,560~720 nm,中心波长分别位于 336 nm,644 nm;锐峰位于 545 nm。此外,在两个宽峰上还有若干锐峰出现,如波长位于 336 nm 的宽峰上主要有四个锐峰,分别位于 310 nm,363 nm,402 nm,433 nm;波长位于 644 nm 的宽峰上主要有四个锐峰,分别位于 575 nm,591 nm,603 nm,624 nm。在这些锐峰中 433 nm 和 624 nm 的相对强度最大。

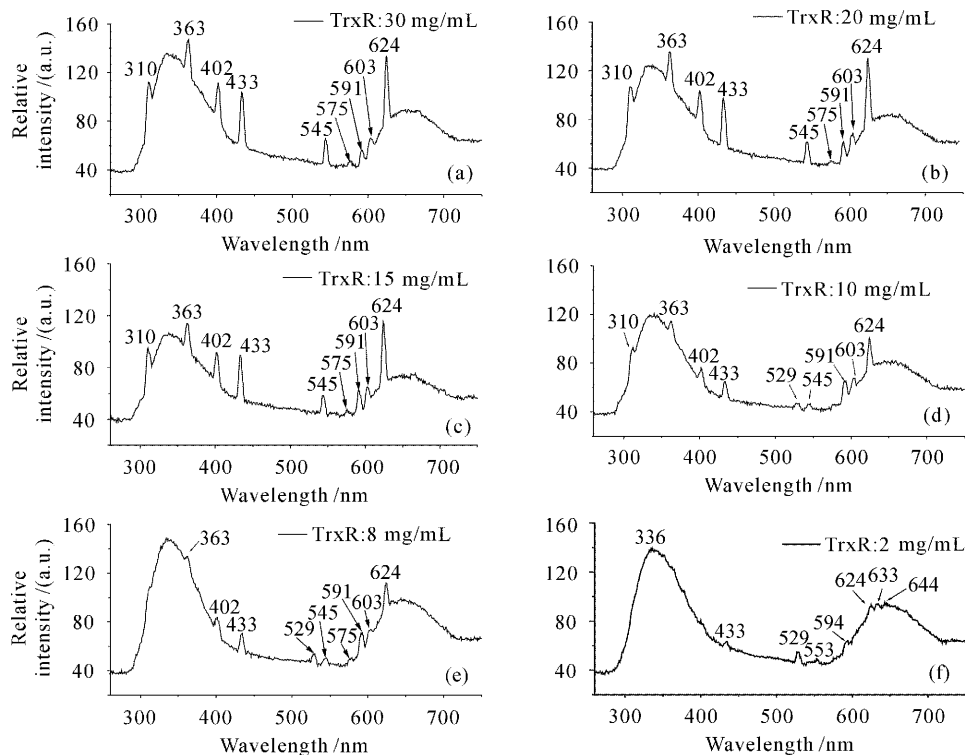


图 3 不同浓度的 TrxR 溶液产生的荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence spectra of TrxR with different concentrations

为了更好地了解 TrxR 的荧光光谱特性,还检测了不同浓度的 TrxR 溶液的光谱。实验结果表

明,发射光宽峰与锐峰表现出不同的变化规律。当浓度降低但仍大于 10 mg/mL 时[见图 3(b),(c)],

各个光谱峰,尤其是锐峰的变化趋势主要是相对强度随浓度的降低而降低;当浓度降到 10 mg/mL 以下[见图 3(d),(e)]时,宽峰的强度有所增加,而各锐峰的变化比较复杂,在峰值为 545 nm 的荧光峰左侧,又出现了一个中心波长位于 529 nm 左右的小峰,且随着浓度的降低,该峰的相对强度有增加的趋势,而其他锐峰的强度仍继续降低并逐渐消失;当浓度降低到 2 mg/mL[见图 3(f)]时,只有波长为 529 nm 的锐峰依然存在,其他的锐峰基本消失,但在 433 nm, 553 nm, 594 nm, 624 nm, 633 nm 及 644 nm 六处仍有小峰隐约可见。

4 理论分析

由实验结果可知,在波长为 253.7 nm 的紫外光激励下,TrxR 能够吸收激励光光子能量并产生较强的荧光。根据分子荧光发射原理、分子内部能量转换理论、共振拉曼光谱理论以及 TrxR 的分子组成特点,可以得出以下几个结论:

1) 中心波长位于 336 nm 的宽峰为荧光峰,主要来自 TrxR 分子中的色氨酸。这是因为在组成蛋白质的 20 种氨基酸中,能够发荧光的主要是色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸,它们都属于芳香氨基酸一类。其共同的特点是具有共轭结构,如吲哚、酚和苯

等,因而都具有 π 电子,易于激发,如图 4 中的(a),(b),(c)所示。相比于其他两种芳香氨基酸,苯丙氨酸的吸收是很小的,而且苯丙氨酸的量子产额也很小,即使苯丙氨酸在蛋白质中的含量比酪氨酸、色氨酸两者往往要大,但是它对蛋白质产生荧光的贡献仍然很小,同时由于苯丙氨酸的荧光光谱重叠于酪氨酸、色氨酸的吸收光谱上,所以苯丙氨酸吸收的能量可以通过非辐射共振转移到这两种氨基酸上,因而在通常情况下苯丙氨酸的荧光在蛋白质中表现不出来。对于酪氨酸和色氨酸,这两种氨基酸的量子产额都比较高,但是酪氨酸的吸收效率要低于色氨酸的吸收效率(约为色氨酸的 1/4~1/5),因而如两种氨基酸的含量相当时,酪氨酸产生荧光的现象要远低于色氨酸。另外如在蛋白质中两种氨基酸的距离比较近时(1.5 nm),期间的能量转移可以达到 50%;而在酪氨酸-色氨酸的二肽中,该能量转移可以达到 100%。在实验中可以认为大部分酪氨酸的能量转移至色氨酸,即在存在色氨酸的蛋白质中将不易观察到酪氨酸的荧光峰。事实上,典型的色氨酸产生的荧光峰最大值在 330~350 nm 波段之间^[15]。而在本实验中,激励光是波长为 253.7 nm 的紫外光,获得的荧光峰值位置位于 336 nm,来自 TrxR 分子中色氨酸的贡献。

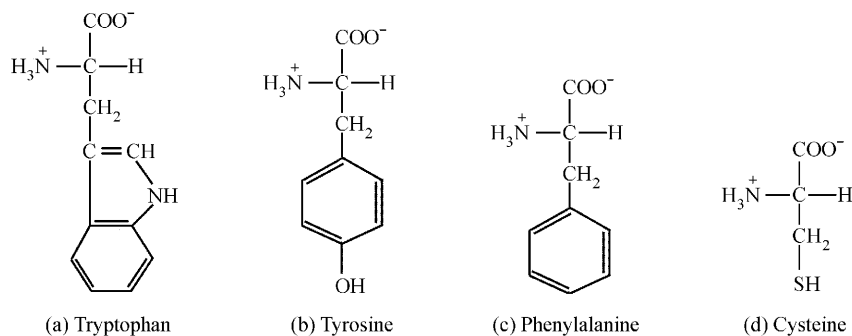


图 4 四种氨基酸的分子式

Fig. 4 Molecular formula of four amino acids

2) 荧光宽峰上的诸多锐峰为 TrxR 溶液的共振拉曼光谱。由光谱学知识可知,要得到共振拉曼光谱线,必须使得入射光谱的光子能量等于或接近于生物分子的激发态能级与基态的能量差。生物蛋白质分子中基团的第一激发能级多集中在 5~6 eV,所对应的光波波长大约为 250~210 nm 左右,例如 C=C 的激发态与基态的跃迁波长为 250 nm 左右,当激发光在 250 nm 附近时,产生的拉曼光谱比使用远离 250 nm 的光源照射大很多,即此时较易发生共振拉曼散射^[16]。而我们使用的激发光波长为 253.7 nm,非常

接近于共振拉曼光谱光源的谱段,对于蛋白质而言,因为其吸收和散射光谱都比较宽,出现共振拉曼现象的概率较大。共振拉曼效应并不是对所有的振动模的拉曼效应都一样增强的,只有那些能够耦合两个邻近的电子激发态的振动模才能激发共振拉曼活性,这也是实验中只得到 310 nm, 363 nm, 402 nm, 433 nm, 545 nm, 575 nm, 591 nm, 603 nm, 624 nm 等几个锐峰的原因。由生物大分子的振动光谱知识可知^[14],多肽链和蛋白质中的主链肽键会产生一系列被称为酰胺带的振动光谱,蛋白质的侧链、二级结构等也有特

定的振动带频率,它们的波数范围主要集中在 $600\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ 之间。实验中所得到的锐峰的波数主要位于这一波数范围之内,据此我们认为锐峰主要来自于 TrxR 主链中的 C=O 键上的伸缩振动,C=O 键旁的 C-N 伸缩和 N-H 弯折、半胱氨酸[如图 4 中(d)所示]侧链的 S-H 伸缩振动等。

3) 对于中心波长为 644 nm 的荧光宽峰的产生机理,可认为此宽峰为 TrxR 的荧光峰,但不是它的二次荧光。这是因为由二次荧光的定义可知,二次荧光一般是在共振能量转移的基础上发生的,而共振能量转移要求能量供体和能量受体分子之间的距离要在 $5\sim 10\text{ nm}$ 之间,因此二次荧光的强度受溶液的浓度影响很大,即随着溶液浓度的降低,TrxR 分子之间的距离变大,其基团相互之间的能量交换将迅速下降,二次荧光产额将迅速降低。但是实验测得的中心波长为 644 nm 的宽峰随着溶液浓度的变化其强度的变化不是很明显,可见该荧光峰不是 TrxR 二次荧光。

由于该荧光峰随浓度的变化特性跟第一个峰有着惊人的一致性,可认为它同样为 TrxR 中的芳香氨基酸的苯环基团所发的荧光,由于该荧光峰值位于 336 nm 处的荧光峰变化而变化,我们认为它很有可能是芳香基团的第二激发态对应荧光。

当然蛋白质类生物大分子的结构比较复杂,位于波长为 644 nm 左右的荧光峰可能是诸多因素共同作用引起的,这有待于今后进一步的研究探讨。

此外,随着 TrxR 浓度的减少,荧光宽峰与共振拉曼峰表现出不同的变化规律,尤其各拉曼峰的变化比较复杂。根据以上关于拉曼峰产生机理与微观结构的关系,说明随着 TrxR 微环境的变化,其分子构像发生了微小变化,这也为我们今后研究人体内 TrxR 含量与其生理功能的关系奠定了基础。

5 结 论

利用光栅光谱仪获得了波长为 253.7 nm 的紫外光激励下 TrxR 的荧光光谱,其荧光光谱主要由中心波长分别位于 336 nm, 644 nm 的两个宽峰和一个峰值位于 545 nm 的锐峰组成,且宽峰上分布着若干细锐的次峰。理论研究结果表明,中心波长位于 336 nm 的宽峰是来自于 TrxR 分子中的色氨酸的荧光峰,若干锐峰则是 TrxR 分子的共振拉曼光谱,而中心波长位于 644 nm 的荧光宽峰可能是 TrxR 分子中芳香基团的第二激发态对应荧光。研

究结果有助于研究溶液状态下 TrxR 分子的构像、空间结构、分子的电子电子振动态以及人体内 TrxR 含量与其生理功能的关系等。

参 考 文 献

- 1 Jose R. Pedrajas, Effie Kosmidou, Antonio Miranda-Vizuete *et al.*. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**(10): 6366~6373
- 2 S. Kojima, O. Matsuki, T. Nomura *et al.*. Elevation of antioxidant potency in the brain of mice by low-dose γ ray irradiation and its effect on 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced brain damage [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, **26**(3/4): 388~395
- 3 Zhao Lei, Gao Jing. Thioredoxin and the disease of nerve degenerative [J]. *Progress in Physiology Science*, 2002, **33**(1): 74~76
赵蕾,高静. 硫氧还蛋白与神经退行性病变 [J]. 生理科学进展, 2002, **33**(1): 74~76
- 4 Neel S. Bhavesh, Sanjay C. Panchal, R. V. Hosur. An efficient high-throughput resonance assignment procedure for structural genomics and protein folding research by NMR [J]. *Biochemistry*, 2001, **40**(49): 14727~14735
- 5 Melissa R. Thomas, Derek Brown, Stefan Franzen *et al.*. FTIR and resonance Raman studies of nitric oxide binding to H93G cavity mutants of myoglobin [J]. *Biochemistry*, 2001, **40**(49): 15047~15056
- 6 Wang Shouye, Xu Xiaolong, Liu Qingliang *et al.*. The application of fluorescence spectroscopy in the study on protein conformation [J]. *Progress in Chemistry*, 2001, **13**(4): 257~260
王守业,徐小龙,刘清亮等. 荧光光谱在蛋白质分子构像研究中的应用 [J]. 化学进展, 2001, **13**(4): 257~260
- 7 A.-K. Duhme, W. Meyer-Klaucke, D. J. White *et al.*. Extend X-ray absorption fine structure studies on periplasmic and intracellular molybdenum-binding proteins [J]. *JBIC*, 1999, **4**: 588~592
- 8 D. Huster, A. Vogel, C. Katzka *et al.*. Membrane insertion of a lipidated ras peptide studied by FTIR, solid-state NMR, and neutron diffraction spectroscopy [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**(14): 4070~4079
- 9 Gao Shumei, Luo Xiaosen, Lan Xiufeng *et al.*. Analyzing of LED-induced blood fluorescent spectra [J]. *Chinese J. Lasers*, 2002, **B11**(4): 315~318
- 10 Luo Xiaosen, Ni Xiaowu, Lu Jian *et al.*. Study of fluorescent spectrum of blood induced by lights of different wavelengths [J]. *Chinese J. Lasers*, 2003, **30**(1): 93~96
骆晓森,倪晓武,陆建等. 不同波长光照射血液诱发的荧光光谱研究 [J]. 中国激光, 2003, **30**(1): 93~96
- 11 Shumei Gao, Xiufeng Lan, Ying Liu *et al.*. Characteristics of blood fluorescence spectra using low-level, 457.9 nm excitation from Ar⁺ laser [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2004, **2**(3): 160~161
- 12 Xiufeng Lan, Tao Yang, Shumei Gao *et al.*. Study of violet LED-induced fluorescence spectra of thioredoxin reductase from human brain [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2003, **1**(3): 171~173
- 13 P. C. Turner, A. G. McLennan, A. D. Bates *et al.*. Instant Notes in Molecular Biology [M]. Beijing: Science Press, 2001. 163
- 14 Zhao Nan-ming, Zhou Hai-meng. Biophysics [M]. Beijing: China Higher Education Press, 2000: 284; 322~330
赵南明,周海梦编. 生物物理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 284; 322~330
- 15 Cheng Ji-ji. Photobiophysics [M]. Beijing: High Education Press, 1987. 108~161
程极济. 光生物物理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1987. 108~161
- 16 Wu Guozhen. Foundation of Molecular Vibration Spectroscopy [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1990. 108
吴国祯编著. 分子振动光谱学基础 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1990. 108