

光谱技术分析尿素对 BSA 糖基化反应的影响

李雪¹, 王丽¹, 刘光宪^{1*}, 涂宗财²

1. 江西省农业科学院农产品加工研究所, 江西 南昌 330200

2. 江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022

摘要 以牛血清白蛋白(BSA)和葡萄糖为原料,采用光谱技术从分子水平上研究不同浓度尿素(0~7 mol·L⁻¹)对 BSA 糖基化反应的影响。结果表明:BSA 经过尿素处理后,其糖基化产物的自由氨基含量和内源荧光强度均显著下降;同步荧光光谱表明 BSA 与尿素的结合点更接近于色氨酸(Trp)残基;紫外光谱分析表明经尿素处理后 BSA 的糖基化产物的紫外吸收值均有不同程度的增加;三维荧光光谱表明随着尿素浓度的增加,BSA 的最大发射波长产生先红移再蓝移的变化趋势,说明其结构展开,促进了 BSA 的糖基化反应。结果表明,尿素处理会使 BSA 的空间结构发生不同程度的伸展,且当尿素浓度为 3 mol·L⁻¹时 BSA 的糖基化反应程度最大。

关键词 尿素;牛血清白蛋白;糖基化;光谱分析

中图分类号: TS201.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)02-0478-06

引言

蛋白质的结构展开与其糖基化反应之间存在较大的相关性,可以促进蛋白质结构展开的有化学试剂^[1-2](尿素、二硫苏糖醇等)、超声波^[3]、动态高压微射流^[4]等, Yang 等^[3]研究发现高强度超声波可以促进卵清蛋白结构的去折叠,提高糖基化反应程度; Zhong 等^[4]研究发现动态高压微射流在 80 MPa 以下时会使 β -乳球蛋白结构展开; Huang 等^[2]研究发现二硫苏糖醇可使卵白蛋白的二硫键断裂,蛋白质结构展开,糖基化位点从 7 个增加至 12 个。但是尚未见研究尿素对牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)糖基化产物影响的报道。

由于大部分蛋白质都具有荧光特性,在外力作用或与其他物质作用后,其荧光特性和高级结构可能发生改变。Tang 等^[5]采用光谱技术测定了不同条件下云扁豆蛋白与葡萄糖反应的结构和理化性质的变化; Anjana Roy 等^[6]通过荧光光谱和圆二光谱分析了葡萄糖修饰血红素蛋白前后的二级和三级结构变化; Zhong 等^[7]采用紫外分析和内源荧光光谱分析法,研究了动态高压微射流对 β -乳球蛋白与低聚半乳糖糖基化反应前后构象的变化,因此,可以运用蛋白质的光谱学特

性分析不同尿素浓度对蛋白质糖基化产物的影响。

血清白蛋白是脊椎动物的血浆和血清中含量最高的一种可溶于水的大分子蛋白^[8],含量高达 40 mg·mL⁻¹,约占血浆中总蛋白的 52%~62%,具有维持血液渗透压、调节血液 pH 及转运脂肪酸、氨基酸、金属离子、类固醇、药物等多种物质的生理功能^[9-10]。其中,BSA 是牛血液和牛奶中常见的一种球状蛋白,其序列与人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)具有 76%的同源性,是由 583 个氨基酸残基组成的单肽链,是一种常用的模式蛋白,可作为动物来源的代表蛋白^[11]。故本文选用 BSA 为模式蛋白,开展相关研究可为其他动物蛋白的糖基化改性提供理论参考。尿素常作为非蛋白氮原料添加至动物饲料中,因此,本研究的开展可为探索尿素对动物体内甚至是人体内新陈代谢的影响提供理论支撑。

首先采用不同浓度尿素诱导 BSA 结构发生不同程度的展开,再与葡萄糖进行糖基化反应,基于三维荧光光谱、同步荧光光谱、内源荧光光谱和紫外光谱技术分析不同浓度尿素诱导对 BSA 糖基化反应产物空间结构的影响,揭示尿素对 BSA 糖基化的作用规律,为基于尿素导致的蛋白质结构展开对蛋白质糖基化反应的影响提供理论依据。

收稿日期: 2020-01-19, 修订日期: 2020-05-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(21878135), 国家自然科学基金地区基金项目(32060525), 江西省杰出青年人才资助计划(20192BCBL23026), 江西省重点研发计划项目(20192BBF60039)资助

作者简介: 李雪,女,1991年生,江西省农业科学院农产品加工研究所研究实习生 e-mail: journey0802@163.com

* 通讯作者 e-mail: liugx178@163.com

1 实验部分

1.1 材料、试剂及仪器

BSA、D-葡萄糖均购于 Sigma 化学试剂公司；尿素、Tris-HCl 均为国产分纯。

U-2910 紫外光谱扫描仪，日本 HITACHI 公司；F-7000 荧光光谱扫描仪，日本 HITACHI 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

用 pH 为 7.4 浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 溶液配置成 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 BSA 溶液，用同浓度的 Tris-HCl 溶液配置尿素溶液，浓度分别为 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 和 $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，尿素浓度 $0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为本实验对照组；在 15 mL 的离心管中加入 0.1 mL BSA 溶液，将不同浓度尿素溶液等体积分别加入离心管混合均匀， $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 2 h 后加入与蛋白质量比为 1:1 的葡萄糖， $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 3 h，样品制备完成，置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

1.2.2 自由氨基的测定

采用邻苯二甲醛 (o-phthalaldehyde, OPA) 法测定 BSA 糖基化产物中自由氨基的含量，OPA 试剂的配制方法参照文献[12]。取 $200 \mu\text{L}$ 样品溶液，加入配好的 OPA 试剂溶液 4.0 mL ，混匀， $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光反应 2 min，于 340 nm 处测定其吸光值，空白采用 $200 \mu\text{L}$ 蒸馏水。以赖氨酸做标准工作曲线，然后根据标准曲线计算样品中自由氨基的含量。

1.2.3 内源荧光光谱分析

对不同浓度尿素处理的 BSA 糖基化样品溶液 ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行内源荧光光谱分析。内源荧光参数设置：激发波长为 280 nm ，发射光谱扫描范围为 $300 \sim 500 \text{ nm}$ ，扫描速度为 $240 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ ，激发和发射的狭缝宽度均为 5 nm 。

1.2.4 同步荧光光谱分析

对不同浓度尿素处理的 BSA 糖基化样品溶液 ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行同步荧光光谱分析。固定激发和发射波长的间隔为 $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ ，在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下扫描同步荧光光谱。

1.2.5 紫外光谱分析

对不同浓度尿素处理的 BSA 糖基化样品溶液 ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行紫外扫描，扫描范围为 $190 \sim 450 \text{ nm}$ ，扫描速度为 $200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ ，狭缝宽度为 1.50 nm 。

1.2.6 三维荧光光谱分析

对不同浓度尿素处理的 BSA 和 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素浓度处理的糖基化 BSA 样品溶液 ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行三维荧光光谱分析。三维荧光分析的参数为激发波长扫描范围： $200 \sim 600 \text{ nm}$ ，发射波长扫描范围： $200 \sim 600 \text{ nm}$ ，扫描速率为 $12000 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ ，狭缝宽为 5 nm 。

2 结果与讨论

2.1 自由氨基含量变化

BSA 的糖基化反应是葡萄糖分子的羰基与蛋白质分子

的氨基通过共价键相互交联而形成的糖蛋白化学反应，因此 BSA 自由氨基含量的变化可以反映其糖基化程度。从图 1 可以看出，经过不同浓度尿素处理的 BSA，其糖基化产物的自由氨基含量均显著下降。这说明尿素处理可使 BSA 分子的空间结构发生不同程度的伸展，使 BSA 分子中的氨基暴露在蛋白质分子表面，葡萄糖的羰基更易与 BSA 分子中的氨基发生共价交联反应，促进了 BSA 与葡萄糖的糖基化反应。故经过尿素处理的 BSA，其糖基化产物中的自由氨基含量均显著下降。从图 1 还可看出，在尿素浓度为 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，BSA 糖基化产物的自由氨基含量降至最低为 $8.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，糖基化程度达到最大。而高浓度尿素 ($4 \sim 7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理的 BSA 糖基化产物的自由氨基含量高于尿素浓度为 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的自由氨基含量，可能是由于高浓度的尿素对 BSA 的糖基化反应形成了空间位阻，阻碍了葡萄糖分子与 BSA 分子的共价交联。

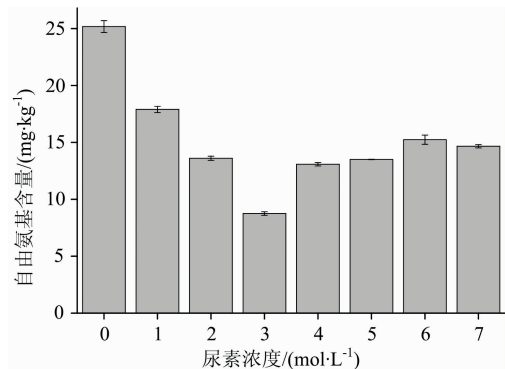


图 1 不同浓度尿素处理的 BSA 糖基化产物的自由氨基含量分析

Fig. 1 The free amino group content of glycosylation of BSA treated with different concentrations of urea

2.2 内源荧光光谱分析

BSA 的内源性荧光主要来自分子内部的色氨酸残基 (Trp)、酪氨酸残基 (Tyr) 和苯丙氨酸残基 (Phe)，其中 BSA 分子中 Trp 残基的荧光强度远远大于 Tyr 残基和 Phe 残基，因此可以用 BSA 分子中的 Trp 残基作为内源荧光探针来分析不同尿素浓度对 BSA 糖基化产物内源性荧光强度的影响。

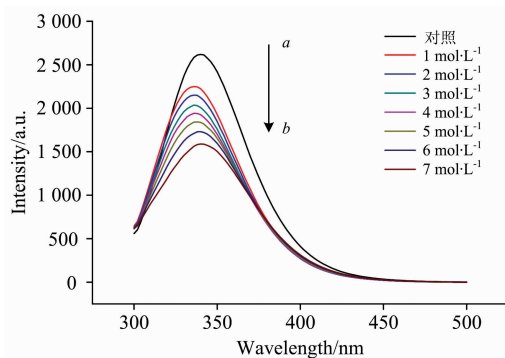


图 2 不同浓度尿素处理的 BSA 糖基化产物的荧光光谱
Fig. 2 Fluorescence spectra of glycosylation of BSA treated with different concentrations of urea

$a \rightarrow b$: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

从图 2 可以看出,尿素的加入使 BSA 糖基化产物的内源荧光强度显著下降,且随着尿素浓度的增加 BSA 糖基化产物的内源性荧光强度呈逐渐降低的趋势。BSA 有两个色氨酸残基 Trp₁₃₄ 和 Trp₂₁₃ (如图 3 所示),其中 Trp₂₁₃ 位于 BSA 分子疏水腔内,而 Trp₁₃₄ 位于 BSA 分子表面^[13],因此引起 BSA 糖基化产物内源性荧光强度显著下降的原因可能是由于尿素诱导后的 BSA 发生了去折叠,降低了 Trp 残基之间的能量传递,导致 BSA 分子疏水腔内的 Trp₂₁₃ 外翻至分子表面,且随着尿素浓度的增加,Trp₂₁₃ 逐渐暴露于溶剂中,从而发生荧光猝灭,使得糖基化产物的内源性荧光强度显著下降。从图 2 还可以看出尿素浓度为 1~4 mol·L⁻¹ 时,BSA 糖基化产物的最大发射波长发生了轻微的蓝移(从 340 到 336 nm),这是由于 BSA 与葡萄糖糖发生糖基化反应后,Trp 所处的微环境发生变化,疏水性增加,使得 BSA 糖基化产物的最大发射波长蓝移。此外,与对照样品对比,当尿素

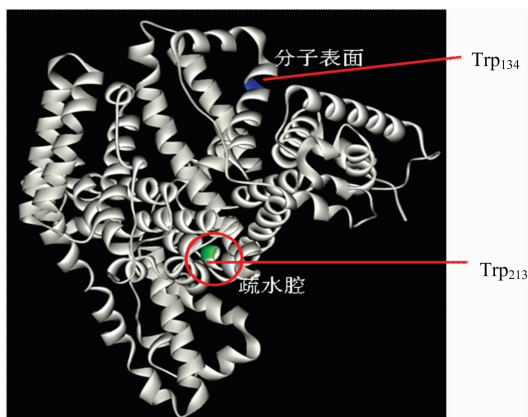


图 3 BSA 的空间结构图

Fig. 3 The space structure of BSA

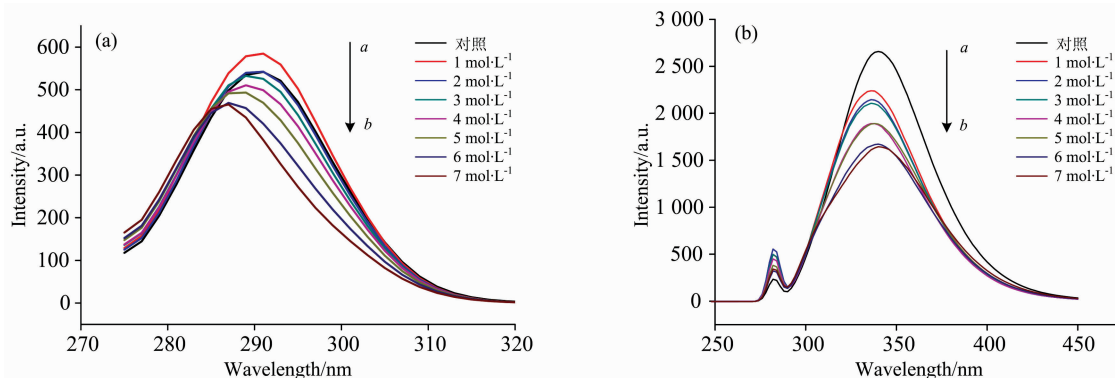


图 4 不同浓度尿素处理的 BSA 糖基化产物的同步荧光光谱

Fig. 4 Synchronous fluorescence spectra after glycosylation of BSA in different urea treatments

(a): $\Delta\lambda=15\text{ nm}$, ($a\rightarrow b$): 1, 2, 3, 0, 4, 5, 6, 7 mol·L⁻¹; (b): $\Delta\lambda=60\text{ nm}$, ($a\rightarrow b$): 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 mol·L⁻¹

2.4 紫外光谱扫描分析

紫外扫描分析是一种简单易行的分析蛋白质空间构象变化的方法^[14]。BSA 在紫外区(190~450 nm)有紫外吸收,这与 BSA 分子中的芳香族氨基酸 Trp, Tyr 和 Phe 具有密切的关系。因此,可采用紫外扫描的方法来研究不同浓度尿素处

浓度大于 4 mol·L⁻¹,最大发射波长逐渐发生红移,从 336 nm 红移至 340 nm,这可能是由于高浓度的尿素处理使得 Trp 残基周围环境的疏水性降低,亲水性增加,BSA 分子已经完全伸展变形,使 Trp 残基完全暴露于溶剂中。

2.3 同步荧光光谱分析

蛋白质的同步荧光光谱已被广泛用于研究蛋白质的结构变化,是一种快速、灵敏、无损的分析方法,可用来研究蛋白质分子中发色基团空间结构的变化以及周围微环境的变化。由于内源荧光无法区分 BSA 分子中 Trp 残基和 Tyr 残基的荧光光谱,因此,采用同步荧光光谱法测定不同浓度尿素处理的 BSA 糖基化样品空间结构的变化。 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 同步荧光光谱显示 BSA 糖基化产物中 Tyr 残基的光谱特征, $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 所得到的同步荧光光谱图显示 BSA 糖基化产物中 Trp 残基的荧光光谱特征,其残基的最大发射波长与 BSA 糖基化产物所处的环境极性有关,如果最大发射波长发生改变,说明残基所处的微环境发生改变。图 4 为不同浓度尿素处理对 BSA 糖基化产物同步荧光强度的影响。如图 4(a)所示,在 BSA 浓度固定在 1 mg·mL⁻¹ 时,随着尿素浓度的增加,1~3 mol·L⁻¹ 尿素浓度处理后 BSA 最大发射波长的强度高于未加尿素对照组,而 4~7 mol·L⁻¹ 的尿素浓度处理后的 BSA 最大发射波长的强度低于未加尿素对照组,且 Tyr 残基的特征荧光光谱峰位置发生蓝移,说明经过 4~7 mol·L⁻¹ 尿素处理之后的 BSA 糖基化产物的 Tyr 残基所在的微环境发生改变,疏水性增加,亲水性降低。对比图 4(a)和(b)可知,Trp 残基的荧光强度远远高于 Tyr 残基的荧光强度,而且相比 Tyr 残基的荧光强度,Trp 残基的荧光强度下降更为显著,表明尿素与 BSA 的结合点更接近于 Trp 残基,但同时 Trp 残基的最大发射波长略有蓝移,说明其附近的疏水性发生一定程度地增强,极性减小,疏水性增加,BSA 分子发生去折叠,Trp 残基由分子内部展开至蛋白质表面。

理对 BSA 糖基化产物空间结构的影响。由图 5 可知,经尿素处理后的 BSA 糖基化产物的紫外吸收值均大于对照组,而且 3 mol·L⁻¹ 尿素浓度处理后的 BSA 糖基化产物的紫外吸收值均大于其他浓度,说明尿素的加入,在不同程度上打开了 BSA 的蛋白质分子结构,使 BSA 分子内部的芳香族氨基

酸残基暴露于蛋白质表面；也可能是尿素处理使蛋白质结构展开，从而有利于 BSA 与葡萄糖发生羰胺缩合反应，产生较多的糖基化产物羟甲基糠醛，其在 278 nm 附近也有紫外吸收^[15]，且在 3 mol · L⁻¹ 的尿素浓度时最有利于糖基化产物的生成，此结果与上述自由氨基含量的测定结果一致。

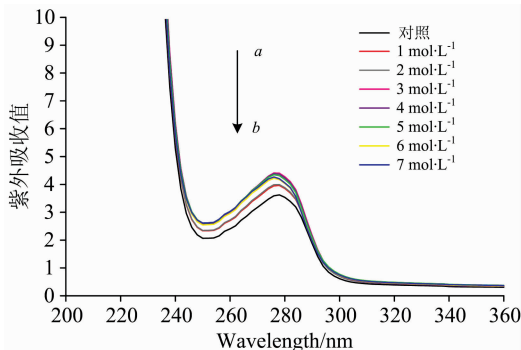


图 5 不同浓度尿素处理 BSA 糖基化样品的紫外扫描光谱

Fig. 5 Ultraviolet scanning spectra after glycosylation of BSA in different urea treatments

a→*b*: 3, 4, 5, 7, 6, 2, 1, 0 mol · L⁻¹

2.5 尿素对 BSA 三维荧光光谱的影响

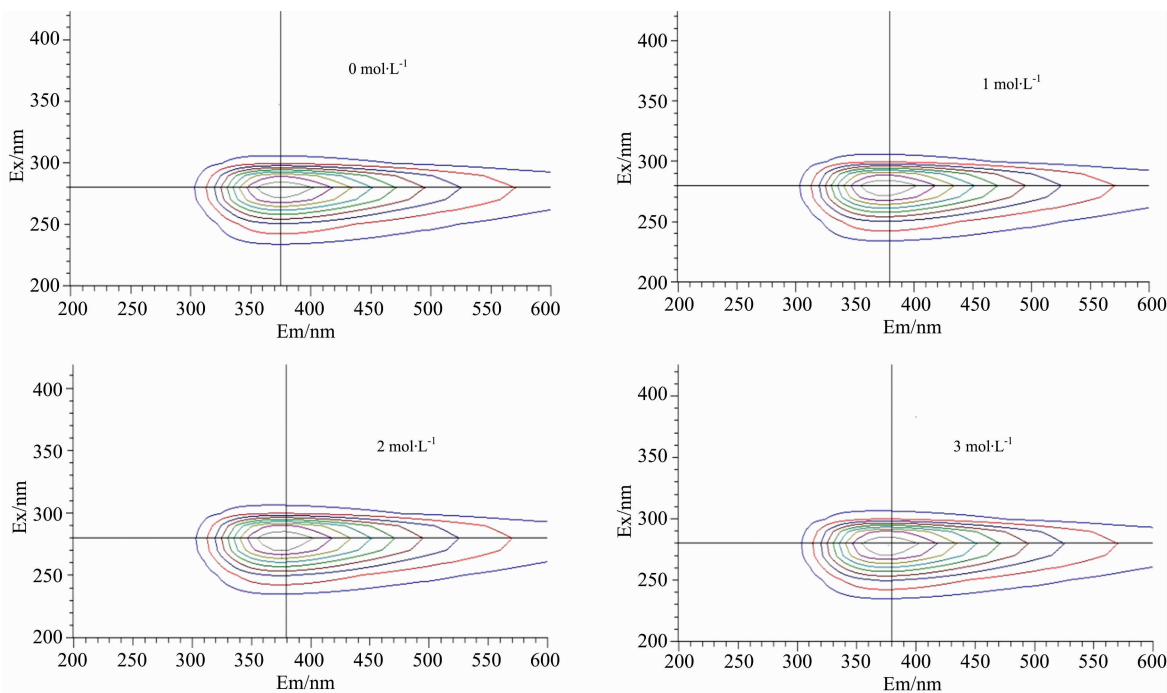
三维荧光技术可以用于蛋白质空间结构变化研究，主要是由于其激发波长、发射波长和荧光强度与蛋白质微环境的变化息息相关。因此，为了探究尿素对 BSA 展开作用的影响以及后期糖基化产物的结构变化，通过三维荧光光谱揭示不同尿素浓度下 BSA 的结构变化以及糖基化后 BSA 的构象变

化(如图 6 和表 1 所示)，利用三维荧光光谱的等高线显示其激发波长、发射波长和荧光强度。由图 6 和表 1 可见，三维荧光均拥有一个典型荧光峰。BSA 在激发波长为 280 nm 时，荧光峰主要揭示 BSA 中 Tyr 和 Trp 残基的光谱特性，添加不同比例尿素的 BSA 的荧光光谱最大发射波长逐渐发生红移，从原样的 Ex/Em: 280/375 变化到尿素添加量为 4 mol · L⁻¹ 条件下的 Ex/Em: 280/380，光谱峰强度由 1 116 增加到 1 243。可能是由于尿素的加入使 BSA 的微环境发生改变，疏水性降低，亲水性增加，同时也表明具有亲水性的尿素与 BSA 发生了相互作用，导致 BSA 结构改变，最大发射波长 Em 发生红移。但是当尿素添加量到 7 mol · L⁻¹ 时，荧光峰又变化为 Ex/Em: 280/371，最大发射波长发生蓝移，可能是由于蛋白质中多肽链间 C=O 结构的 π→π* 跃迁增大，高浓度的尿素使蛋白质完全变性，疏水性增加，从而使荧光峰发生蓝移。

从糖基化样品(尿素添加量为 3 mol · L⁻¹)的三维荧光光谱图(图 6)和表 1 分析可发现，糖基化后 BSA 的荧光峰 Ex/Em 出现在 280/370，与未糖基化反应的 BSA 和 3 mol · L⁻¹ 尿素浓度处理的 BSA 相比，其三维荧光有显著差异，最大发射波长发生了 5 和 10 nm 的蓝移，该现象表明经过尿素处理的 BSA 糖基化产物的肽链骨架发生了空间构象变化，其高级结构发生改变，BSA 环境的疏水性增加，极性减小，该结果与同步荧光的研究结果一致。

3 结 论

利用光谱技术来研究不同尿素浓度对 BSA 糖基化反应



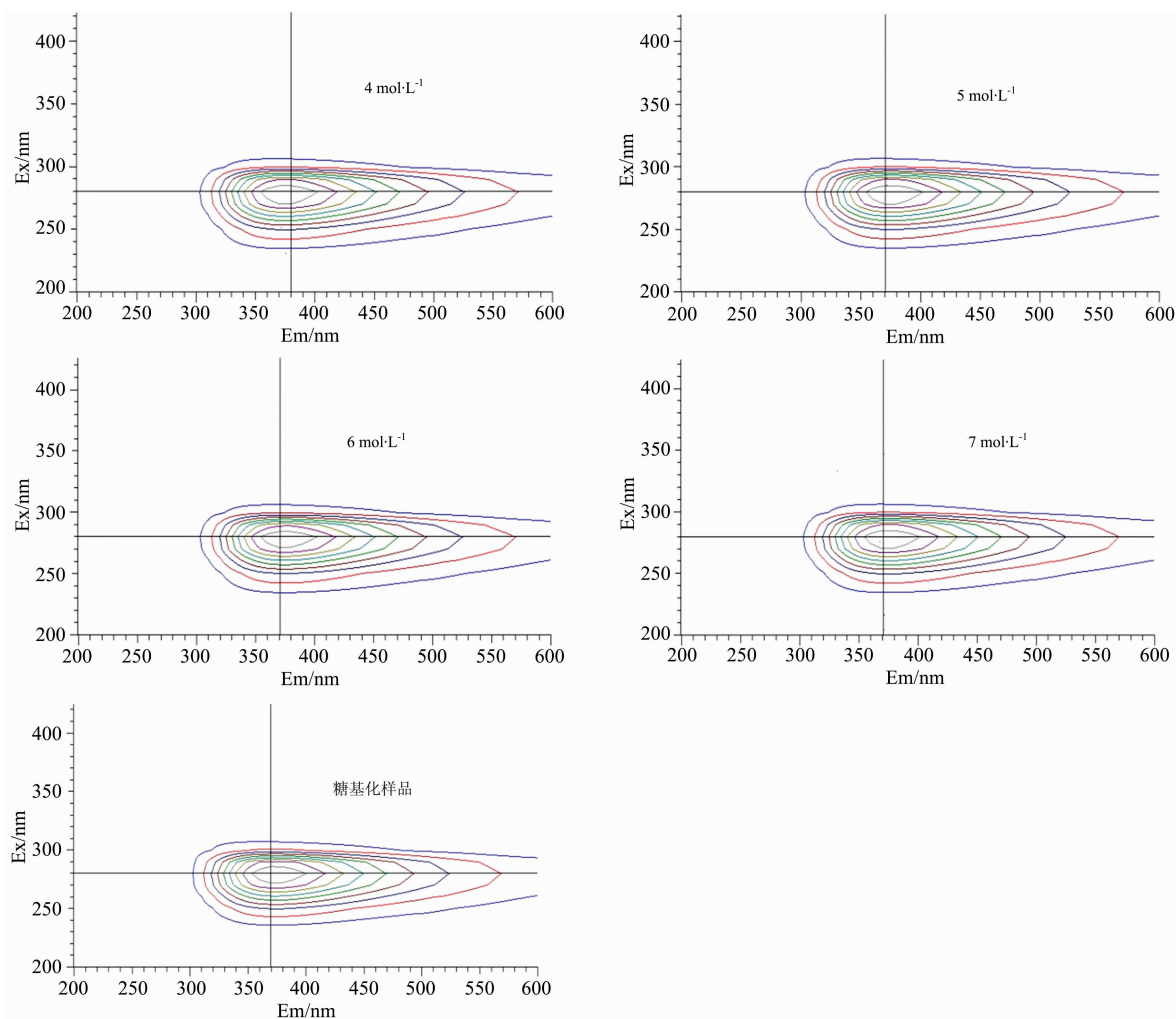


图 6 不同浓度尿素处理的 BSA 和糖基化 BSA 产物的三维荧光光谱图

Fig. 6 3D fluorescence spectra after glycosylation of BSA and BSA in different urea treatments

表 1 典型三维荧光峰

Table 1 Typical three-dimensional fluorescence peaks

Samples	Ex/Emmax/nm	a. u.
0 mol · L ⁻¹	280/375	1 116
1 mol · L ⁻¹	280/380	1 160
2 mol · L ⁻¹	280/380	1 212
3 mol · L ⁻¹	280/380	1 239
4 mol · L ⁻¹	280/380	1 243
5 mol · L ⁻¹	280/370	1 237
6 mol · L ⁻¹	280/370	1 197
7 mol · L ⁻¹	280/370	1 247
糖基化样品	280/370	1 334

产物空间结构的影响, 得到以下结论:

(1) 通过内源荧光光谱分析可以看出, 尿素的加入会使 BSA 分子去折叠从而促进蛋白质的糖基化反应, 导致其糖基化产物的内源性荧光发生猝灭。

(2) 通过同步荧光光谱分析得出 BSA 与尿素的结合点更接近于 Trp 残基。

(3) 通过自由氨基和紫外吸收光谱分析得出 BSA 分子在尿素的诱导下紧密的空间结构变得松散, 芳香族氨基酸暴露至表面, 可促进糖基化反应进行, 且 3 mol · L⁻¹ 尿素浓度下最有利与糖基化产物的生成。

(4) 通过三维荧光光谱分析得出随着尿素浓度的增加, BSA 的最大发射波长先红移再蓝移, 经 3 mol · L⁻¹ 尿素诱导的 BSA 糖基化产物的肽链骨架的空间构象发生变化。

References

- [1] Kalita J, Shukla R, Tripathi T. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(4): 4491.
- [2] Huang X, Tu Z, Wang H, et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(9): 2253.
- [3] Yang W H, Tu Z C, Wang H, et al. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(9): 2714.

- [4] Zhong J Z, Liu W, Liu C M, et al. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(8): 4237.
- [5] Tang C H, Sun X, Foegeding E A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(18): 10114.
- [6] Roy A, Sil R, Chakraborti A S. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2010, 338(1-2): 105.
- [7] Zhong J, Tu Y, Liu W, et al. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(8): 4695.
- [8] Ráfols C, Amézqueta S, Fuguet E, et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 150: 452.
- [9] Brandes N, Welzel P B, Werner C, et al. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, 299(1): 56.
- [10] Kopac T, Bozgeyik K, Yener J. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, 322(1-3): 19.
- [11] Chakraborty N, Banik S, Chakraborty A, et al. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2019, 377: 236.
- [12] Jiang Z, Rai D K, O'Connor P M, et al. *Food Research International*, 2013, 50(1): 266.
- [13] Ghosh K, Rathi S, Arora D. *Journal of Luminescence*, 2016, 175: 135.
- [14] Manouchehri F, Izadmanesh Y, Aghae E, et al. *Bioorganic Chemistry*, 2016, 68: 124.
- [15] Bhattacharjee A, Chakraborti A S. *International Journal of Biological Acromolecules*, 2011, 48(1): 202.

Effect of Urea on Glycosylation of BSA Based on Spectral Techniques

LI Xue¹, WANG Li¹, LIU Guang-xian^{1*}, TU Zong-cai²

1. Institute of Agricultural Processing, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China

2. College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

Abstract In this experiment, the effect of urea with different concentrations ($0\sim 7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the glycosylation of BSA with D-Glucose was investigated at the molecular level by spectral techniques. After urea treatment, the intrinsic fluorescence intensity and the free amino group content of BSA-Glucose glycosylation product were all significantly decreased. Synchronous fluorescence spectra showed that the binding point of BSA and urea was near tryptophan residue. Ultraviolet spectrum analysis showed that the ultraviolet absorption value of glycosylation product was all increased with different the increase of urea concentration. The three-dimensional fluorescence spectra showed that the maximum emission wavelength of BSA firstly shifted red and then blue with the increase of urea concentration, indicating that its structure extended, which promoting the glycosylation reaction of BSA. These results indicated that urea treatment could make the spatial structure of BSA extend to different degrees, and the degree of glycosylation is maximum when urea concentration is $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Keywords Urea; Bovine serum albumin; Glycation; Spectral analysis

(Received Jan. 19, 2020; accepted May 24, 2020)

* Corresponding author