

文章编号:1673-1689(2008)06-0090-03

荧光光谱分析家蝇幼虫抗菌肽 MDL-2 的结构特性

宫霞¹, 凌庆枝², 乐国伟^{*3}

(1. 上海商学院 食品学院, 上海 200235; 2. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100; 3. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究了家蝇幼虫抗菌肽 MDL-2 的荧光光谱和淬灭剂对内源性荧光的影响。家蝇幼虫抗菌肽 MDL-2 在 280 nm 波长的激发光时, 荧光光谱为 Tyr 残基和 Trp 残基共同提供, KI 不能淬灭抗菌肽 MDL-2 的 Trp 残基的荧光, 而 Acr 能淬灭几乎所有的 Trp 残基的荧光($f = 0.74$), 说明 Trp 残基不是位于抗菌肽分子的表面, 而是位于分子的内部。

关键词: 抗菌肽; 色氨酸残基; 荧光光谱; 荧光淬灭

中图分类号: O 657.31

文献标识码: A

Fluorescence Analysis of the Antibacterial Peptide MDL-2 from *Musua Domestica* Larvae

GONG Xia¹, LING Qing-zhi², LE Guo-Wei^{*3}

(1. Department of Food Science, Shanghai Business School, Shanghai 200235, China; 2. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China; 3. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Effects of quenching agents on the intrinsic fluorescence and fluorescence spectroscopy of the antibacterial peptide MDL-2 from *Musua Domestica* Larvae were studied. The result showed that fluorescence spectra of MDL-2 excited to exhibit characteristic absorbency of Trp residues and Tyr residues at 280 nm. The Trp residue fluorescence of MDL-2 wasn't quenched by KI, but almost was quenched by acrylamide, respectively. The fraction of Trp quenched was obtained by the modified Stern-Volmer equation as 0.74. It was concluded that the Trp residues of MDL-2 were located in the inner district with negative dielectric instead of the surface.

Key words: antibacterial peptide; tryptophan (Trp); fluorescence spectrum; fluorescence quenching

昆虫抗菌肽是昆虫细胞特定基因编码产生的一类有免疫效应的多肽, 具有相对分子质量低、热稳定性好和广谱高效抗菌活性, 不会产生耐药性,

不具有抗原性^[1], 而且与抗生素不同的抗菌机制引起了国际上许多学者的重视。采用荧光光谱方法研究蛋白质或多肽在溶液中的构象亦有一些报道,

收稿日期: 2007-11-28.

基金项目: 中央级科研院所基础性专项资金工作项目——重点项目(2001DEA-20022)

作者简介: 宫霞(1966-), 女, 山东济宁人, 工学博士, 教授, 主要从事食品生物化学方面的研究。

Email: gongxia789@sina.com

* 通讯作者: 乐国伟(1956-), 男, 浙江宁波人, 农学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事食品营养与安全方面的研究。Email: lgw@jiangnan.edu.cn

然而对抗菌肽在溶液中微环的构象信息方面的研究尚未见报道,荧光光谱法则能揭示荧光基团的周围环境和空间结构的变化,其中荧光淬灭反应是研究蛋白质和其体系中荧光基团位置的重要手段,多肽和蛋白质分子中能够发射荧光的氨基酸残基最主要的是色氨酸(Trp)残基(内源性荧光),可通过与淬灭剂(如丙烯酰胺、I 等)的作用得到 Trp 残基的位置及微环境等结构信息^[2]。

家蝇幼虫抗菌肽 MDL-2 的分离纯化、抗菌特性和抗菌机理已见报道^[3]。作者着重研究家蝇幼虫抗菌肽 MDL-2 的荧光光谱和荧光淬灭剂对其内源荧光的影响,并讨论色氨酸(Trp)残基在分子中所处的环境位置,为进一步研究抗菌肽的构效关系提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

家蝇幼虫抗菌肽 MDL-2:作者所在实验室制备,经 Tricine-SDS-PAGE 和 HPLC 纯化检测 MDL-2 为均一样品^[1],符合实验要求。

650-60 荧光分光光度计:日本日立公司产品;UV1100 型紫外可见分光光度计:北京瑞利公司产品。

1.2 抗菌肽中色氨酸(Trp)残基数的测定

采用紫外分析法^[4],得到 Trp 与 Tyr 之比:

$$\text{Trp 残基数/Tyr 残基数} = [(A_{288} \times 1280) - (A_{280} \times 385)] / [(A_{280} \times 4815) - (A_{288} \times 5690)]$$

Tyr 残基的个数可由氨基酸序列仪测得,因此 Trp 的残基个数可计算得出。

1.3 抗菌肽内源性荧光光谱的测定

用荧光分光光度计将抗菌肽水溶液在 230~700 nm 之间扫描,得到最大激发波长 $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm,固定激发波长 280 nm,在 300~500 nm 之间扫描得到抗菌肽的荧光光谱。

2 结果与讨论

2.1 抗菌肽 MDL-2 中色氨酸(Trp)的残基数

由酸水解法进行抗菌肽 MDL-2 的氨基酸组成分析,得知该分子中的酪氨酸(Tyr)残基数为 1 个^[3]。代入公式中计算得:抗菌肽 MDL-2 每个分子中 Trp 残基为 4 个。根据抗菌肽在 280 nm 和 288 nm 紫外吸收值测定结果,得到抗菌肽 OD 值,在 $\lambda = 280$ nm 时为 0.762, $\lambda = 288$ nm 时为 0.611。

2.2 抗菌肽的内源性荧光光谱

用荧光分光光度计将抗菌肽水溶液在激发波长 230~700 nm 之间扫描,得到最大激发波长 $\lambda_{\text{ex}} =$

280 nm,见图 1。激发波长 $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm,在 300~500 nm 之间扫描得到抗菌肽的荧光光谱,见图 2。

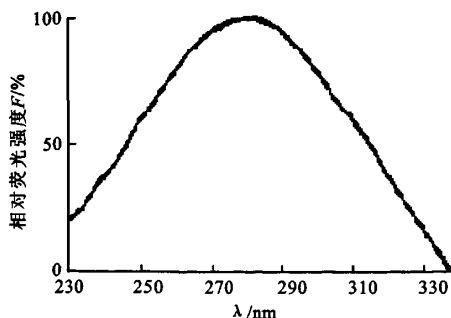


图 1 MDL-2 的荧光扫描图谱

Fig. 1 Fluorescence excitation spectra of MDL-2

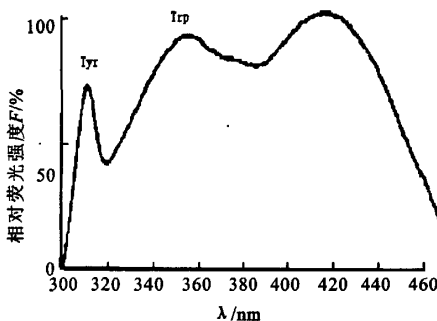


图 2 MDL-2 的荧光光谱($\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm)

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of MDL-2, excited at 280 nm

图 2 表明,MDL-2 在 $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm 时的荧光光谱均产生 Trp($\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 360$ nm)和 Tyr 的特征峰($\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 313$ nm),因此该抗菌肽的荧光光谱为 Tyr 残基和 Trp 残基共同提供。该抗菌肽在荧光性质上属于 A 类蛋白^[7]。同时说明抗菌肽分子中 Tyr 残基和 Trp 残基的空间位置相距较远或 Tyr 残基和 Trp 残基所处空间结构相似,在 $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm 时, Tyr 残基不能把能量转移给 Trp 残基。

游离的 Trp 的 $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm,最大吸收峰为 $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 355$ nm,而 MDL-2 的 Trp 残基最大发射吸收峰相对游离的 Trp 的发射峰红移 5 nm,说明抗菌肽分子中的 Trp 残基不是位于表面,而是位于分子内部的荷电区。

2.3 淬灭剂对抗菌肽荧光的影响

荧光淬灭反应是研究蛋白质和其体系中荧光基团位置的重要手段,荧光淬灭的难易取决于荧光基团对淬灭剂“暴露”程度。当激发波长为 $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm 时,一般蛋白质的荧光光谱为 Trp 残基和 Tyr 残基共同提供,当激发波长为 295 nm 时,蛋白质的荧光光谱仅有 Trp 残基贡献^[5]。因此在以下实验

中均采用激发波长为 295 nm, 发射波长为 360 nm, 测定荧光强度(F)。

I^- 为阴离子型淬灭剂, 只能淬灭位于分子表面或接近分子表面的极性环境中的 Trp 荧光, 而不能进入蛋白质分子的内部淬灭荧光^[8], 实验结果 I^- 不能有效淬灭抗菌肽的 Trp 的荧光, 可能是由于 Trp 残基位于负电区, 带负电荷的 I^- 被排斥而不能进入负电区, 或者 Trp 残基位于分子表面的疏水袋中, 使 I^- 不能接近 Trp 残基。丙烯酰胺(Acr)是一种不带电荷的极性淬灭剂, 因其分子小, 易扩散而特别有效, Acr 是通过碰撞过程淬灭 Trp 的荧光, 因此无论 Trp 残基位于蛋白质的表面还是非极性的内部, Acr 作为探针均能淬灭与其发生碰撞的被激发的蛋白质中 Trp 残基的荧光^[10]。在抗菌肽溶液中加入不同浓度的 Acr, 其荧光淬灭结果见图 3。

由图 3 可见, 在 Acr 的浓度为 0~0.5 mol/L 时, 抗菌肽的 F_0/F 与 Acr 的浓度基本成线性关系, 因此 Acr 的淬灭作用属于扩散控制机制, 而不是静态淬灭, 且符合 Stern-Volmer 公式。

Acr 对抗菌肽 MDL-2 荧光淬灭的 Stern-Volmer 公式: $F_0/F_{MDL-2} = 2.542 \times c_Q + 1$, (F_0 为没有淬灭剂时的荧光强度, F 为有淬灭剂时的荧光强度, c_Q 为淬灭剂浓度, 淬灭常数为 2.542), 上式经推导可得^[6]: $F_0/\Delta F_{MDL-2} = 0.177/c_Q + 1.36$, 则, 截距 $1/f = 1.36$, 得 $f = 0.74$ (ΔF 为加入淬灭剂前后荧

光强度的差值, f 为可被荧光淬灭剂所接近的发色基团占总的荧光发射基团的百分比)。表明 Acr 能淬灭 74% 的抗菌肽 MDL-2 中的 Trp 残基的荧光。

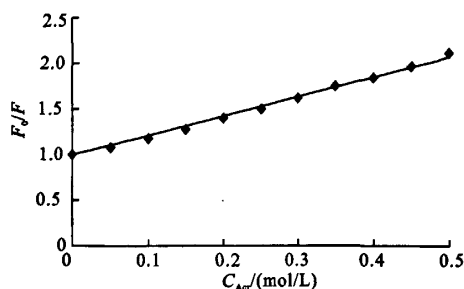


图3 Acr对抗菌肽荧光淬灭图

Fig. 3 The plot of F_0/F against C_{Acr}

3 结 语

荧光淬灭实验表明, 由于 I^- 不能淬灭抗菌肽 MDL-2 的 Trp 残基的荧光, 而 Acr 因其是不带电荷的极性淬灭剂, 分子小易扩散而能够到达 Trp 残基的负电区域而使其荧光淬灭, Acr 只能淬灭 MDL-2 中 74% 的 Trp 残基的荧光 ($f = 0.74$), 进一步说明 Trp 残基不是位于抗菌肽分子的表面, 而是位于分子的内部, 且可能深藏于分子内部 Acr 不能到达的部位, 导致其荧光不能完全淬灭。

参考文献(References):

- [1] Bevins C. Antimicrobial peptides as agents of mucosal immunity[J]. *Ciba Found Symp*, 1994, 186:250-269.
- [2] 孙崇民, 李玉民. 蛋白质化学导论[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1991.
- [3] 宫霞, 乐国伟. 电泳制备家蝇幼虫抗菌肽及其性质[J]. 食品与生物技术学报, 2003, 22(6): 25-30.
GONG Xia, LE Guo-wei. Electrophoretic preparation and Biologic characterization of antibacterial peptides from *Musca Domestica* larvae[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2003, 22(6): 25-30. (in Chinese)
- [4] 陶慰孙, 李惟, 姜涌明. 蛋白质分子基础[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 78.
- [5] 周红, 曾仲奎, 陈静. 白茯苓凝集素的荧光光谱研究[J]. 生物物理学报, 1996, 12(1): 27-32.
ZHOU Hong, ZENG Zhong-kui, CHEN Jing. A study of lectin from *Smilax lauceaefolia* Roxb Var. *opaca* A. DC by fluorescence spectroscopy[J]. *Acta Biophysica Sinica*, 1996, 12(1): 27-32. (in Chinese)
- [6] 王守业, 余华明, 陈真龙. 皖南尖吻蝮蛇毒中纤溶组分的荧光特性[J]. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(3): 303-306.
WANG Shou-ye, YU Hua-ming, Chen Zhen-long. Fluorescence characteristics of fibrinolytic principle from snake venom of *Agkistrodon acutus*[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 1998, 30(3): 303-306. (in Chinese)
- [7] 阎隆飞, 孙之荣. 蛋白质分子结构[M]. 北京: 清华大学出版社, 1999.
- [8] 王守业, 徐小龙, 刘清亮. 荧光光谱在蛋白质分子构象研究中的应用[J]. 化学进展, 2001, 13(4): 257-260.
WANG Shou-ye, XU Xiao-long, LIU Qing-liang. The application of fluorescence spectroscopy in the study on protein conformation[J]. *Progress in Chemistry*, 2001, 13(4): 257-260. (in Chinese)
- [9] 陈真龙, 张利民, 丁兰. 皖南尖吻蝮蛇毒出血毒素Ⅲ的荧光淬灭研究[J]. 化学物理学报, 1998, 11(5): 465-469.
CHEN Zhen-long, ZHANG Li-ming, DING Lan. Fluorescence quenching studies on the hemorrhagin III from snake venom of *Agkistrodon*[J]. *Journal of Chemistry and Physics*, 1998, 11(5): 465-469. (in Chinese)
- [10] Eftink M, Gbiron A. Exposure of tryptophanyl residues in protein, quantitative determination by fluorescence quenching studies[J]. *Biochemistry*, 1976, 15: 672-680.

(责任编辑: 朱明)