

硬脂酸对 SpA 的修饰及其平面人工生物膜的特征

陆 斌 叶 宁 韦 钰

(东南大学分子与生物分子电子学实验室, 南京 210018)

摘要 通过 LB 膜技术将硬脂酸酯修饰的 SpA 嵌入到气液界面的磷脂膜中, 并沉积于疏水化石英表面, 形成了平面人工双层生物膜. 此人工膜可作为免疫球蛋白的通用诱导膜. 结果表明, 硬脂酸脂对 SpA 的修饰是影响该蛋白质构象变化的主要因素. 当修饰 SpA 嵌入到磷脂 DPPA 单分子膜中时, 膜中蛋白质密度增加, 且呈现良好的成膜特性. 人工膜中 SpA 的活性下降与硬脂酸的修饰及其在膜中的嵌入作用有关.

关键词 SpA, 脂质分子修饰, 构象变化, 人工膜, IgG 结合能力

Langmuir Blodgett (LB) 膜技术是继脂质体及双层脂膜 (BLM) 技术后, 生物膜重组的又一行之有效的. 运用 LB 膜技术, 可在平面载体表面获得蛋白质均匀分布、磷脂疏密程度可控的双层重组生物膜^[1,2]. 与脂质体及双层脂膜相比, 它具有如下的特点: a. 可利用表面敏感检测技术测量细胞或配体与该人工膜的相互作用; b. 提供具有选择性识别, 可应用于生物传感器制作的生物敏感膜. SpA (staphylococcal protein A) 是金黄色葡萄球菌的外周蛋白, 也是多种免疫球蛋白 (IgG) 的 Fc 端受体^[4]. 由于 SpA 与 IgG 的结合不影响抗体 IgG 对其抗原的识别作用, 当含有 SpA 的磷脂沉积到载体表面后, 结合到此膜中的 IgG 其抗原结合部位暴露, 有利于抗原的进一步结合^[5]. 因而含有 SpA 的重组膜可作为免疫球蛋白的通用诱导膜.

我们先前的工作表明, 气液界面的磷脂-天然 SpA 混合单分子膜中, 部分 SpA 会随着膜表面压的升高被“挤出”磷脂膜, 而降低膜中的蛋白质密度^[6]. 本文中, 我们使用合成的硬脂酸酯对 SpA 进行了适当的化学修饰, 以增加其膜结合能力. 并将修饰 SpA-磷脂单分子膜沉积

于石英载体表面形成人工双层膜. 同时研究了化学修饰及成膜过程对蛋白质构象及其生物学活性的影响.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

DPPA (*L*- α -二棕榈酰磷脂酸) 为 Sigma 公司产品, N-羟基丁二酰亚胺 (NHS)、硬脂酸、十八烷基三氯硅烷 (OTS) 均来自于东京化成公司. 金黄色葡萄球菌蛋白 A (SpA) 和 HRP-SpA 为上海生物制品所产品, 马抗 HBsAg IgG 与辣根过氧化物酶标记的同种 IgG (HRP-IgG) 为南京军事医学研究所产品. 脱氧胆酸钠 (DOC) 等其它试剂为国产分析纯. 石英玻片尺寸为 4cm $\times$ 1cm $\times$ 0.1cm. LB 膜仪系日本 Face 公司产品, 亚相容积为 70cm $\times$ 14cm $\times$ 0.5cm. 紫外吸收光谱及圆二色 (CD) 谱分别在 UV-256 紫外分光光度计及 J-500C 分光偏振仪 (spectropolarimeter) 上测量.

1.2 实验方法

硬脂酸脂 (NHSS) 通过硬脂酸与 NHS 的一步合成得到, 合成反应按 Lapidot^[7]提出的方

法进行. NHSS 对 SpA 的修饰按 Huang 的方法^[8], 初始反应比 R_i ($R_i = [\text{NHSS}] / [\text{SpA}]$) 为 0、10、20、30、40. 使用 Sephadex G-75 柱对反应液进行分离. 凝胶柱使用无 DOC 的 PBS 平衡与洗脱.

SpA-磷脂混合单分子膜的制备按 Heckl^[9]的方法在 LB 膜仪上进行. 加样前使用 PBS 将修饰 SpA 溶液 (含 0.1% DOC) 稀释 10 倍, 取 40 μl 稀释液立即均匀滴加于表面压为 0.1 mN/m 的 DPPA 单分子膜中. 1h 后, 以 12 cm^2/min 的速度压膜. 石英表面按 Maoz^[10]的方法进行疏水化处理, 处理后的表面形成含 18 碳烃链的致密单分子层. 使用水平提拉法在表面压为 25 mN/m 处将单层 SpA-磷脂混合膜沉积到该石英表面即形成重组双分子膜.

膜中蛋白质的密度通过多层沉积 LB 膜的紫外吸收光谱^[6]测定. 根据比尔定律, 推导出适合于沉积 LB 膜中蛋白质密度的计算公式:

$$A = 10^{-3} \cdot n\epsilon\Gamma/Mr$$

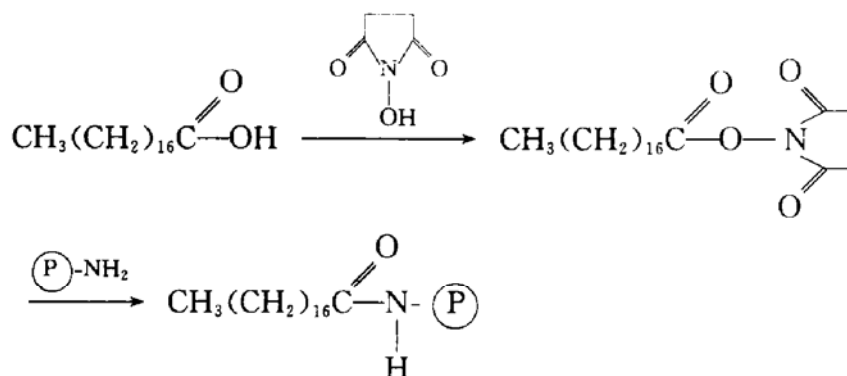
其中 A 为 n 层 LB 膜在波长为 193 nm 的光吸收, ϵ 为蛋白质的摩尔吸收系数, Γ 为单层膜中的蛋白质密度 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), Mr 为蛋白质分子量. 使用垂直提拉法将混合膜在石英片上垒积 32 层后进行光吸收测量. ϵ 为 $2.96 \times 10^6 (\text{mol}/\text{L})^{-1}\text{cm}^6$.

使用修饰 SpA 与酶标 SpA (HRP-SpA) 对固相 IgG 的竞争结合能力判断修饰 SpA 的相对活性. HRP-SpA 与固相 IgG 的结合使用 ELISA 法测定^[11]. 测试在 4×10 孔的酶标板上进行. 在 SpA-磷脂混合膜沉积到疏水链修饰的石英表面后, 使用 HRP-IgG 与膜中 SpA 的结合反应测定膜中蛋白的 IgG 结合能力, 测试在自制的测试架中进行.

2 结 果

2.1 NHSS 的合成及对 SpA 的化学修饰

NHSS 的合成及对 SpA 化学修饰的基本反应如下:



产物 NHSS 为白色结晶, 熔点为 92—94 $^{\circ}\text{C}$, 其红外光谱在 2940 cm^{-1} , 2870 cm^{-1} 处有 $\text{V}_{\text{C-H}}$ 吸收峰, 在 1730 cm^{-1} , 1800 cm^{-1} 及 1830 cm^{-1} 处有 $\text{V}_{\text{C=O}}$ 吸收峰. 其质谱图中主质谱峰的位置在 382、354、325 及 267, 分别与 NHSS 的几个主要基团的分子量吻合. NHSS 元素分析计算值为 C: 69.24, H: 10.30, N: 3.67; 实测值为 C: 68.79, H: 10.45, N: 3.55.

NHSS 对 SpA 的修饰在含有 2% DOC 的磷酸缓冲液 (PBS, 100 mmol/L, pH 7.2) 中进行. 使用不含 DOC 的 PBS 平衡的 Sephadex G-75 柱洗脱.

图 1 显示了不同 R_i 值时修饰 SpA 由凝胶柱分离的洗脱曲线. 除了 $R_i=0$ 的情况, 洗脱曲线均由两个峰组成, 一个峰与天然 SpA 的洗脱峰重合 (0.42 V_b), 另一峰则位于高分子量区域 (0.3—0.28 V_b). 此洗脱峰的蛋白质以聚集体形式存在, 且聚集体的大小与数量随 R_i 增加而增加. $R_i=0$ 时, 未修饰 SpA 的洗脱峰中无聚集体存在. 因而在未含 DOC 的溶液中, SpA 形成聚集体是硬脂酸成功地修饰到 SpA 表面的有力证据. 聚集体的形成由修饰蛋白质表面疏水性增加而引起, 聚集体的大小反映了修饰蛋白质的疏水化程度. 此结果暗示了蛋白质表面的

修饰程度与 R_i 成正比. 该蛋白质聚集体易溶于含 0.1%DOC 的 PBS 缓冲液.

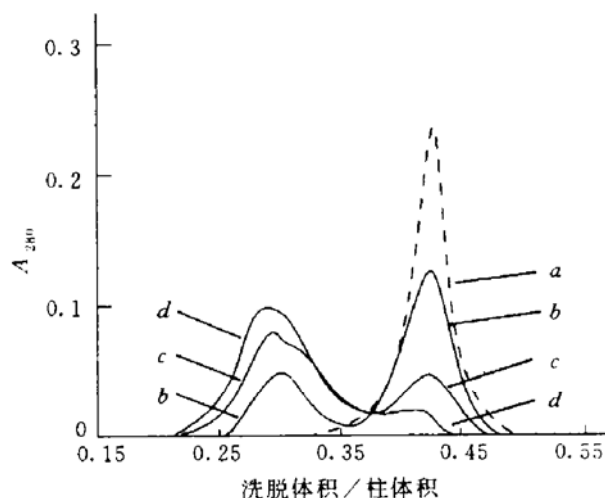


图1 修饰 SpA 在凝胶柱中的洗脱曲线
洗脱液中不含 DOC. a: $R_i=0$, b: $R_i=10$, c: $R_i=20$, d: $R_i=40$.

2.2 修饰 SpA 的构象分析

修饰 SpA 溶液 (含 0.1%DOC) 的 CD 谱如图 2 所示, 天然 SpA 的 CD 谱在 219nm 及

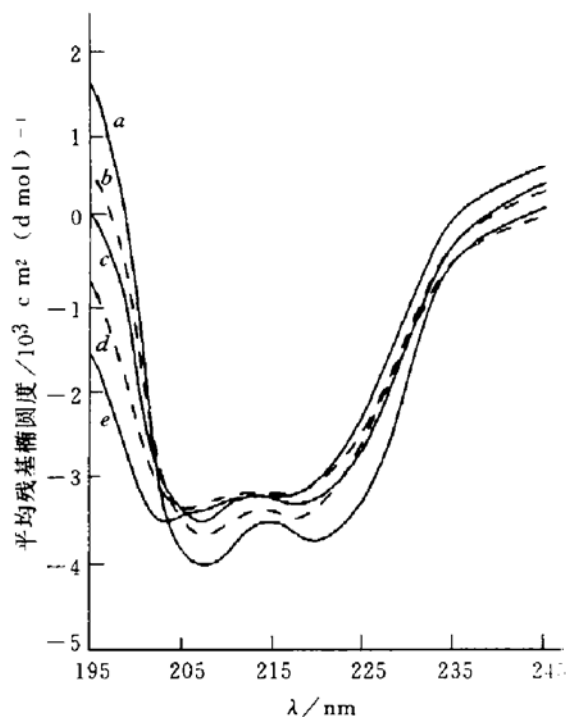


图2 天然与修饰 SpA 的 CD 谱
谱 a 为天然 SpA 的 CD 谱, 谱 b—e 分别为 $R_i=10-40$ 的修饰 SpA 的 CD 谱.

207nm 处呈现两个特征负峰, 其二级结构中 α 螺旋, β 结构及自由卷曲组分分别为 48%、21% 及 31%^[12]. 当 $R_i=10$ 或 20 时, 蛋白质中 β 结构的组分增加. 而当 $R_i=30$ 或 40 时, 蛋白中有序结构的组分降低. 这说明, 硬脂酸脂对 SpA 修饰程度的大小是影响该蛋白质二级构象变化的主要原因.

2.3 修饰 SpA-磷脂混合膜的成膜特性

当修饰 SpA 溶液均匀铺展于 DPPA 膜中时, 溶液中的 DOC 分子同样会嵌入到磷脂膜中. 我们将等量的 DOC 溶液 (不含 SpA) 以相同的方式铺展到膜中, 评估 DOC 对磷脂单分子膜 π - σ 特性的影响. 其结果 (未给出) 表明, 当 $\pi > 15 \text{ mN/m}$ 时, DOC 嵌入而导致的膜表面积的增加仅 1%. 因而忽略了 DOC 对膜特性的影响.

图 3 为具有不同 R_i 的 SpA 溶液加入前后的 DPPA 磷脂膜的 π - σ 压缩等温线. 当未修饰

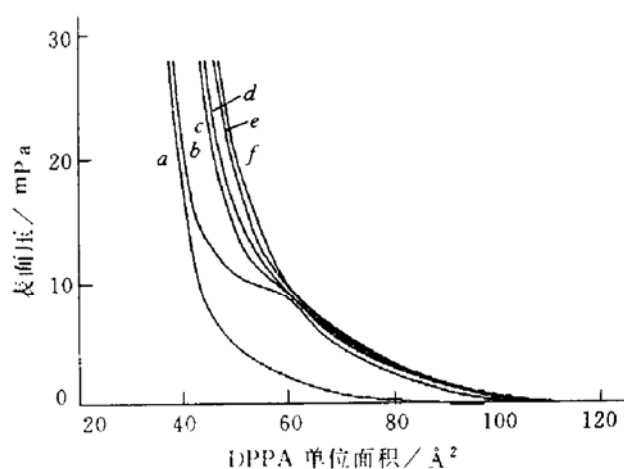


图3 修饰 SpA-磷脂 (DPPA) 混合单分子膜的 π - σ 压缩等温线

a: 纯 DPPA, b—f: 分别为 R_i 值为 0—40 的修饰 SpA-DPPA 混合膜. 亚相: pH4.4; 10mmol/L 醋酸缓冲液; $t=20^\circ\text{C}$.

SpA 与磷脂膜形成混合膜时其压缩等温线 (曲线 b) 在 8.5—11.0mN/m 处出现一“平台”, 这与通过亚相吸附方式形成的天然 SpA-DPPA 混合膜的特性相同^[6]. “平台”的出现是该混合膜不稳定的标志之一. 而修饰 SpA-DPPA 膜的

等温线(曲线c—f)无类似的“平台”出现,且膜中磷脂单分子面积的增加与膜中修饰蛋白质的 R_i 值密切相关. 这说明含有修饰 SpA 的混合膜呈现良好的成膜特性.

膜中蛋白质密度的结果(表1)表明,随着蛋白质修饰度的增加,蛋白质密度由 $3.4\text{ng}/\text{cm}^2$ 增至 $17.5\text{ng}/\text{cm}^2$. 这说明膜表面积的增加由嵌入到膜中的蛋白质引起,且修饰 SpA 对磷脂膜的亲和力随 R_i 增加而相应增加.

表1 混合单分子膜中修饰 SpA 的密度

[NHSS] / [SpA] R_i	蛋白质密度 / $\text{ng} \cdot \text{cm}^{-2}$
0	3.4
10	12.9
20	15.1
30	15.5
40	17.5

2.4 膜中修饰 SpA 的活性分析

表2为竞争反应中,将 HRP-SpA 的 IgG 结合能力抑制 50%所需的天然与修饰 SpA 的含量,它代表了溶液中 SpA 的 IgG 相对结合能力. 与天然 SpA 相比,该蛋白的活性约在 90%至 30%之间. 活力的降低主要归因于硬脂酸对 SpA 的修饰.

表2 不同条件下 SpA 的相对 IgG 结合能力

[NHSS] / [SpA] R_i	修饰 SpA 含量 / nmol	相对活性 /%
天然 SpA	23.1	100
0	25.0	92
10	28.2	82
20	35.8	64
30	72.5	32
40	82.6	28

表3为溶液中 HRP-IgG 结合到重组膜中的相对含量,它代表了膜中修饰 SpA 的 IgG 结

合能力. 与溶液中具有对应 R_i 值的 SpA 相比,膜中 SpA 的活性继续下降. 这说明 SpA 在磷脂膜中的嵌入同样会导致其活性的降低.

表3 重组膜中修饰 SpA 的相对 IgG 结合能力

R_i	光吸收 ¹⁾	相对活性 ²⁾
天然 SpA	0.84	100
0	0.81	94
10	1.44	61
20	1.32	46
30	0.64	21
40	0.29	10

1) 膜中 IgG 的相对结合量使用酶联免疫检测中的光吸收表示. 2) 设定重组膜中天然 SpA 的活性为 100%, 修饰 SpA 的活性以此基准计算.

3 讨 论

本文中我们成功地将硬脂酸修饰到 SpA 表面,并在石英载体表面形成含有修饰 SpA 的重组双层膜. 修饰 SpA 的凝胶洗脱曲线表明,在不含 DOC 的情况下,存在两个洗脱峰,分别含有聚集体形式及单体形式的 SpA. 修饰 SpA 具有与膜蛋白类似的溶解特性,易于形成稳定的 SpA-磷脂混合单分子膜.

气液界面 SpA-磷脂单分子膜的稳定性及膜中蛋白质的密度与初始反应比 R_i 及硬脂酸对 SpA 的修饰程度成正比. 这一特性,可从如下两方面解释. 一方面,水溶性的 SpA 表面经硬脂酸修饰后由亲水性分子转变为两亲性分子,随着 R_i 的提高,蛋白质的疏水特性相应增加,修饰蛋白质在气/液界面的成膜稳定性相应提高. 另一方面,硬脂酸与蛋白质的共价结合,使得 SpA 与磷脂膜的相互作用发生变化. 膜中两者间的相互作用主要由静电作用力与疏水作用力所贡献. 天然 SpA 的等电点为 5.3. 在 pH4.4, 未修饰 SpA 与磷脂膜的电荷特性相反,相互吸引. 在修饰蛋白中, NHSS 与 SpA 表面自由氨基的共价反应,使该蛋白质在 pH4.4 时表面正电荷数降低,此电荷的降低与

蛋白质的修饰度成正比,同时也与 R_i 成正比.因而修饰 SpA 与磷脂膜的静电吸引力随 R_i 的增加而降低.所以,静电作用不是导致修饰 SpA 对膜亲和性增加的主要因素.而当硬脂酸的修饰度增加时,该蛋白质的疏水性增加,其与磷脂膜的疏水相互作用增强.因而可认为疏水作用是致使修饰蛋白质的膜亲和性增加的另一原因.通过脂类分子的修饰改善蛋白质膜亲和能力的工作前人已有报道. Afzelius^[3]将活化的磷脂修饰到铁蛋白表面,使得该蛋白质在脂质体中的密度与其修饰度成正比. Huang^[8]的研究结果表明,棕榈酸修饰的 IgG 与脂质体的结合具有类似的特性.

与溶液状态的修饰 SpA 相比,重组膜中具有对应 R_i 值的 SpA 的 IgG 相对结合能力有所下降,这种现象不能完全用硬脂酸的修饰来解释,而与 SpA 在膜中的嵌入作用有关.前人的实验结果已表明,当脂质分子修饰的功能蛋白质嵌入到脂质体的双层脂膜中时,蛋白质会由于旋转自由度的限制及空间取向的阻碍而导致部分失活^[8].本文中,嵌入到膜中的 SpA 除因上述因素而导致部分失活外,嵌入过程的环境改变而导致的构象变化是其活性丧失的另一因素.二级结构测试结果表明,硬脂酸的修饰会

干扰 SpA 内维持其构象稳定的各作用力的平衡,而使其构象改变.当修饰蛋白质嵌入磷脂膜时,蛋白质与膜间的疏水作用的加强,可能会引起其二级结构的进一步变化,从而导致其生物活性的降低.

参 考 文 献

- 1 McConnell H M, Watts T H, Weis R M *et al.* Biochim Biophys Acta, 1986; **864**: 95
- 2 Lu Bin, Wei Yu. J Colloid Interface Sci, 1993; **161**: 120
- 3 Afzelius P, Demant E J F, Hansen G H *et al.* Biochim Biophys Acta, 1989; **979**: 231
- 4 Lindmark R, Thoren-Tolling K, Sjoquist J. J Immunol Meths, 1983; **62**: 1
- 5 Truko I V, Yurkevich I S, Chashchin V L. Thin Solid Films, 1992; **210/211**: 710
- 6 陆 斌, 韦 钰. 生物物理学报, 1993; **9**: 541
- 7 Lapidot Y, Rappoport S, Wolman Y. J Lipid Res, 1967; **8**: 142
- 8 Huang A, Huang L, Kennel S J. J Biol Chem, 1980; **255**: 8015
- 9 Heckl W M, Losche M, Scheer H. Biochim Biophys Acta, 1985; **810**: 73
- 10 Maoz R, Sagiv J. J Colloid Interface Sci, 1984; **100**: 465
- 11 Morimoto K. J Biochem Biophys Meth, 1992; **24**: 107
- 12 Sjodahl J. Eur J Biochem, 1977; **73**: 343

Tb³⁺ 探针法研究蛇毒中纤溶组分的 Ca²⁺ 结合环境 *

夏文胜¹⁾ 卢景雯²⁾ 刘宏宇 刘清亮³⁾

(北京医科大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 采用 Tb³⁺ 作为荧光探针研究了皖南尖吻蝮蛇蛇毒中纤溶组分中钙离子的结合环境. 实验表明每个纤溶组分中含有一个高亲和点. 钙离子位于发色团色氨酸 (Trp) 附近, 并可能和苯丙氨酸 (Phe) 结合. 在不同波长的激发下能产生 Trp→Tb³⁺, Trp→Tb³⁺→Phe, Tb³⁺→Phe 和 Tb³⁺→Trp 之间的能量转移. Tb³⁺ 位于 Trp 附近并可能与 Phe 结合. 计算表明 Tb³⁺ 与 Trp 之间的距离约为 5.66 Å.

关键词 尖吻蝮蛇, 蛇毒, 纤溶组分 (FP), 荧光探针

* 国家自然科学基金资助项目. ¹⁾ 北京医科大学与中国科学技术大学应用化学系联合培养的研究生; ²⁾ 通讯联系人;

³⁾ 中国科学技术大学应用化学系, 合肥 230026. 收稿日期: 1993-12-09, 修回日期: 1994-03-21

ognized antigen with molecular weights of 51, 56, 67 and 73 kD. Immunohistochemical staining showed that the antigen mainly existed in the cytoplasm and on the membrane of breast cancer cell, and also could be observed in some other tumors, but no staining was detected in normal tissues. The AF9-recognized antigen may be a new tumor-associated antigen.

Key words breast carcinoma, tumor-associated antigen, monoclonal antibody

Application of PF Gel as New Carrier for the Immobilization of Enzyme. Li Yuanxun, Ye Qingling. (*Department of Chemistry, Hebei University, Baoding 071002*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (6): 523—527

PF gel-type resin has been synthesised by polycondensation of hydroquinone with formaldehyde in the presence of acidic solution. The gel-type resin is cheap and easy to produce, non-toxic, porous, hydrophilic, extremely stable. It is a effective carrier for the simple and rapid immobilization of various enzymes and proteins. The amounts of bound protein (BSA) and glycoamylase in one gramme of the dry carrier were 558mg and 330mg respectively, the activity recovery of 84% for immobilized glycoamylase was obtained. The conversion (%) for starch into glycoase, using immobilized glycoamylase is as high as 93%. A new kind of modified PF gel-type resins were synthesised by copolymerization of hydroquinone and some resorcin with formaldehyde. Thus PF and modified PF gel-type resins are superior carriers for immobilization of enzyme.

Key words phenolic-formaldehyde resin, hydroquinone-formaldehyde resin, immobilization, glycoamylase, bovine serum albumin (BSA)

Characterization of Modified Staphylococcal Protein A and Its Artificial Membrane on Substrate Surface. Lu Bin, Yie Ning, Wei Yu. (*Laboratory of Molecular and Biomolecular Electronics, Southeast University, Nanjing 210018*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (6): 528—532

A method is described for incorporation of water-soluble SpA into phospholipid monolayer using covalent SpA-stearate conjugates, and then transferring the monolayer on a pre-treated silica surface to form a SpA containing membrane. Stearic acid containing a reactive N-hydroxysuccinimide ester group is synthesized, and the derivative is reacted with SpA in a deoxycholate buffer. The modified SpA (m-SpA) has the solubility properties very similar to integral membrane proteins. The CD results show that the content of β structure in the m-SpA is increased in lower lipid coupling degree, but in higher modification the random coil content rapidly increased. After SpA is incorporated in the DPPA monolayer, unmodified SpA is readily ejected from the monolayer but m-SpA incorporates into the monolayer stably. The incorporation of the protein is proportional to the lipid coupling degree. The IgG binding ability of m-SpA decreases with the increase of the lipid coupling degree. The ability is further reduced about 20%—30% when m-SpA is incorporated in the membrane, which might be due to the incorporating procedure.

Key words SpA, lipid modification, conformation changes, artificial membrane, IgG binding activity

A Study of Combining Surroundings of Ca^{2+} in Fibrinolytic Principle of the Venoms in *Agkistrodon Acutus* Using Tb^{3+} as a Fluorescent Probe. Xia Wensheng, Lu Jingfen, Liu