

研究简报

色氨酸类似物标记法研究 DsbA 蛋白的结构环境*

李琦¹⁾ 胡红雨^{1)**} 盛宛云²⁾ 赵新颜¹⁾ 许根俊¹⁾(¹⁾中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031; ²⁾上海计划生育研究所, 上海 200031)

摘要 用生物标记的方法将色氨酸类似物标记在 DsbA 蛋白中的色氨酸位置, 分析标记蛋白质的谱学性质、色氨酸结构环境和潜在应用前景. 5-OH-Trp 标记的 DsbA 蛋白具有 315 nm 激发的荧光发射光谱; ¹⁹F-NMR 能分辨 5-F-Trp 标记的 DsbA 蛋白的两个 F-Trp 残基 (Trp76 和 Trp126), Trp76 化学位移变化反映二硫键交换引起的结构转化. 进一步将利用标记蛋白的独特荧光和 ¹⁹F-NMR 性质, 研究 DsbA 蛋白的氧化还原及与底物蛋白的结合作用.

关键词 生物标记, 荧光, ¹⁹F-NMR, DsbA 蛋白, 色氨酸环境

学科分类号 Q51

色氨酸 (Trp) 残基虽然在蛋白质中含量较少, 但对蛋白质的结构和功能至关重要, 在序列上也相对保守. 内源色氨酸的荧光已得到广泛应用. 但是, 由于蛋白质及复合物中或许存在几个 Trp 残基及 Tyr 残基荧光的干扰, 使内源荧光方法的应用受到一定限制. Trp 的类似物, 如 5-hydroxy-Trp (5-OH-Trp) 和 7-aza-Trp, 由于激发和发射荧光红移, 就能有效地避开 Tyr 和其他蛋白质 (研究蛋白质相互作用时) 中荧光生色基团的干扰^[1]. 而且, 它们发射的荧光强度或最大波长对所处的环境很敏感. 氟代 Trp 的 ¹⁹F-NMR 的化学位移和弛豫速率也对蛋白质环境的变化十分敏感, 且容易对每个标记氟的化学位移进行归属^[2]. 另外, Trp 类似物标记对于蛋白质的结构和功能影响很小, 标记后的蛋白质基本上反映天然蛋白质的性质. 分子生物学的发展为特殊生色团的定点标记提供了有利条件. 由于可以通过点突变法在蛋白质中的不同位置引进单 Trp 密码子, 使 Trp 类似物的应用范围扩大. 因此, 通过标记法在蛋白质中引进 Trp 的类似物能更好地发挥荧光和 NMR 的独特应用, 有效地研究蛋白质局部结构环境、动态行为、相互作用 (如结合、结构域运动和作用)、局部区域折叠和生物功能^[1,2].

本文以大肠杆菌 DsbA 蛋白为例^[3], 用生物标记的方法在 DsbA 蛋白中的两个色氨酸 (Trp76 和 Trp126) 位置分别标记 5-OH-Trp 和 5-F-Trp, 再用紫外、圆二色性、荧光和 ¹⁹F-NMR 方法鉴定, 分析标记蛋白质的谱学性质、色氨酸环境. 进一步将利用标记的 Trp 类似物的荧光和 ¹⁹F-NMR, 研究 DsbA 蛋白的活性中心二硫键交换及与底物相互作用, 了

解 DsbA 蛋白催化底物蛋白二硫键形成的机理.

1 材料与方法

1.1 材料

色氨酸 (Trp), 5-羟色氨酸 (5-OH-Trp), 7-aza 色氨酸 (7-aza-Trp), 5-氟色氨酸 (5-F-Trp) 均购自 Sigma 公司; *dsbA* 基因由本实验室克隆; pTrc-2B 质粒和色氨酸营养缺陷型菌株 CY15077 (W3110ΔtrpEA2) 由本所王恩多研究员提供.

1.2 表达菌株的准备

将 *dsbA* 基因克隆到 pTrc-2B 表达质粒中, 然后转化色氨酸营养缺陷型菌株 CY15077 感受态细胞. 挑选转化好的 CY15077 单克隆进行培养, 确定该克隆只在含色氨酸的 M9 基本培养基中生长, 并无泄漏表达.

1.3 标记的 DsbA 蛋白的表达

将 CY15077 菌株过夜培养, 再以 1:100 的比例转入 1 L 只含天然色氨酸 (30 mg/L) 的 M9 培养基中. 在 37℃、300 r/min 条件下培养 5~7 h, 直到 A₆₀₀ 的读数达到 1.2. 收集菌液, 以 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清并倒入 100 ml 冰冷的不含色氨酸的 M9 培养液重悬菌体, 然后再以 3 000 r/min 离心 10 min, 离心后弃上清, 这一步的目的在于清洗残留在菌体间隙中的天然色氨酸. 把菌体重悬并转入 1 000 ml 含 40 mg/L 色氨酸类似物的 M9 培养基中, 37℃ 摇菌 30 min, 以造成细菌色氨酸饥饿,

* 国家自然科学基金资助项目 (NSFC39700026, NSFC30070165).

** 通讯联系人.

Tel: 021-64374430-5121, E-mail: hyhu@sunm.shenc.ac.cn

收稿日期: 2001-07-23, 接受日期: 2001-10-20

最后加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达。经试验, 在 37℃、300 r/min 条件下, 诱导表达 5 h, 可得到最高产量标记的 DsbA 蛋白。

1.4 标记的 DsbA 蛋白的纯化

从培养液中收集菌体, 用渗透方法抽提 *E. coli* 周质空间蛋白 DsbA。先后经 DEAE-Sephadex 和 FPLC Superose 12 柱层析两步纯化, 得到纯度 98% 的标记的 DsbA 蛋白用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定^[4]。

1.5 标记的 DsbA 蛋白的谱学鉴定

紫外吸收光谱在岛津 UV-2100 紫外可见分光光度计上进行。圆二色性谱在 JASCO J-715 圆二色性仪上测定。荧光测定在 Hitachi F-4010 荧光分光光度计上完成。¹⁹F-NMR 在配有氟灵敏探头的 300 MHz 核磁共振仪 (美国 Varian 公司) 上进行。

2 结果与讨论

2.1 DsbA 蛋白的标记效率

标记的 DsbA 蛋白经光吸收和荧光量子产率方法测定^[5], 估计其标记效率均达到 90% 以上。同时实验发现, 色氨酸类似物的加入会影响细菌的生长, 因此要在菌生长到较高浓度时 (例如 $A_{600} > 1.0$), 再加入异丙基硫代 β -D-半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达。

2.2 标记的 DsbA 蛋白的紫外和圆二色性谱

从紫外吸收光谱 (图 1) 中可以看到, 标记蛋

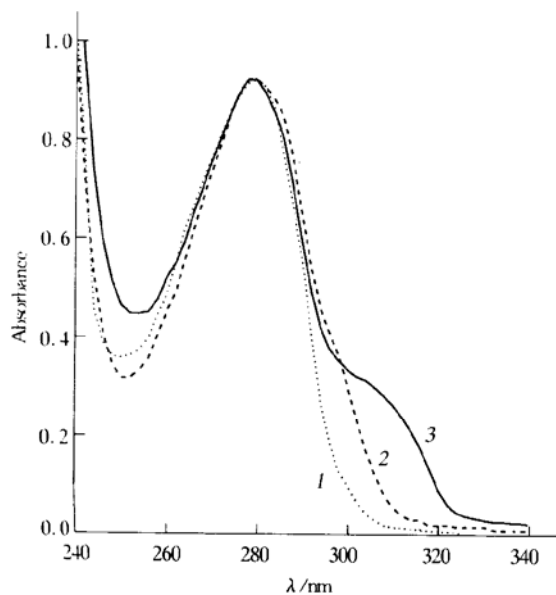


Fig. 1 UV absorbance spectra of Trp analog labeled DsbA proteins

1: Natural DsbA protein; 2: 5-F-Trp labeled DsbA protein; 3: 5-OH-Trp labeled DsbA protein, where a broad shoulder appears near 315 nm.

白的吸收峰出现红移, 其中 5-OH-Trp 标记的 DsbA 蛋白, 在 315 nm 处有较强的吸收肩峰。蛋白标记前后 DsbA 蛋白的远紫外圆二色性图谱, 没有明显差异 (图略), 说明 5-OH-Trp 和 5-F-Trp 标记并不影响 DsbA 蛋白的二级结构。图 2 中显示标记前后 DsbA 蛋白的近紫外圆二色性图谱。其中 5-OH-Trp 标记的蛋白在 297 nm 和 322 nm 处出现一个较强的正峰。从它的紫外和圆二色性谱可以看出, 5-OH-Trp 在较长波长的紫外吸收和圆二色性质可以作为蛋白质结构和性质鉴定的探针。

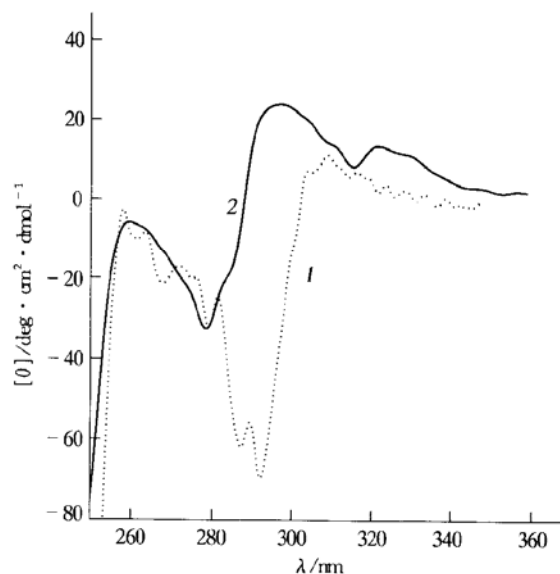


Fig. 2 Near-UV circular dichroic spectra of Trp analog labeled DsbA proteins

1: Natural DsbA protein, where there is a strong negative peak at around 290 nm; 2: 5-OH-Trp labeled DsbA protein, where there have two positive peaks at 297 nm and 322 nm and a negative peak at 279 nm. The pathlength of the cuvette is 1 cm and the protein concentrations for the measurements are 41.4 μ mol/L for natural DsbA and 51.4 μ mol/L for the labeled protein.

2.3 标记的 DsbA 蛋白的荧光光谱

以 295 nm 作为激发波长, 两种标记蛋白的荧光发射光谱与天然蛋白相比, 均出现红移现象 (图略)。若以 315 nm 波长激发 5-OH-Trp 标记的 DsbA 蛋白, 在 337 nm 处出现很强的荧光发射光谱, 而天然蛋白则没有荧光发射 (图 3)。另外, 我们还用 7-az-Trp 标记蛋白质, 并进行荧光光谱实验, 其荧光激发波长为 315 nm (图略)。这一特殊的荧光激发波长红移性质可以用来研究标记蛋白与靶蛋白的相互作用, 而有效地避开靶蛋白的内源荧光的干扰。进一步的工作可利用标记产生的荧光性质, 来研究 DsbA 蛋白与底物靶蛋白的结合和氧

化还原作用.

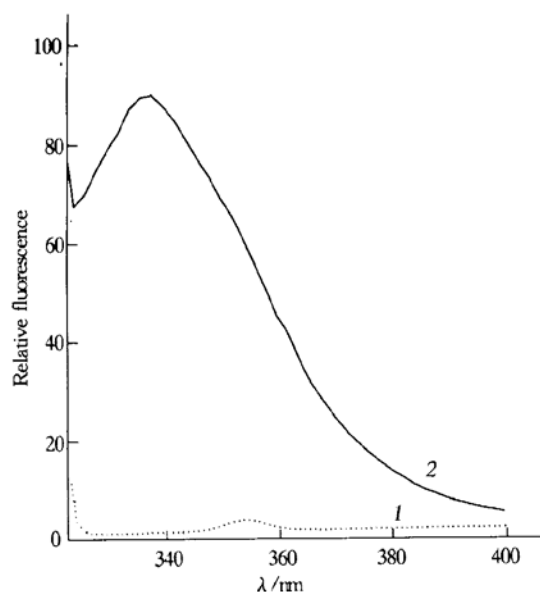


Fig. 3 Fluorescence emission spectrum of 5-OH-Trp labeled protein

1: Natural DsbA protein, where there is no detectable emission fluorescence when excitation at 315 nm; 2: 5-OH-Trp labeled DsbA protein. When excitation at 315 nm, there presents a strong fluorescence emission with the maximum at 337 nm.

2.4 氧化态和还原态 DsbA 蛋白的核磁共振

用 5-F-Trp 标记的氧化态 DsbA 蛋白进行核磁共

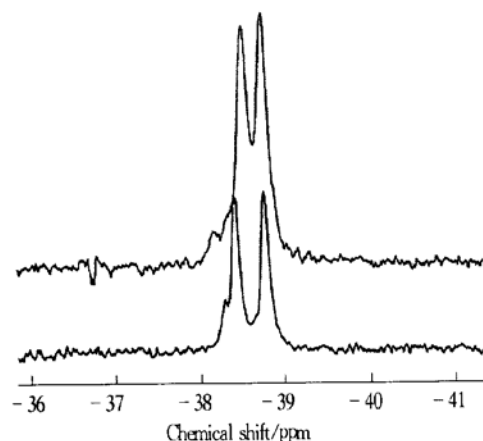


Fig. 4 ^{19}F -NMR spectra of 5-F-Trp labeled DsbA protein

The one dimensional ^{19}F -NMR was performed on a 300 MHz NMR spectrometer, and the resonance frequency of ^{19}F nuclei was 282 MHz. The concentration of the labeled protein was ~ 5 mmol/L buffered with phosphate (D_2O , pH 4.0). The sampling time was about 1 h and the temperature was 22 $^{\circ}\text{C}$. The chemical shift of ^{19}F was calibrated by trifluoroacetic acid. The oxidized DsbA protein (upper) exhibits two peaks, -38.64 ppm and -38.87 ppm, which were assigned to contribution of F-Trp76 and F-Trp126, respectively. The reduced DsbA (down) shows a chemical shift change in the F-Trp76 peak to a lower field of 0.20 ppm and no change in F-Trp126 peak.

振实验, 得到区分良好的两个 ^{19}F 共振信号峰 (图 4), 分别为 -38.64 ppm 和 -38.87 ppm (以三氟乙酸定标). 经进一步 Trp 定点突变, 归属 -38.64 ppm 峰为 F-Trp76 所贡献, 而 -38.87 ppm 峰为 F-Trp126 (待发表结果). 当 DsbA 被 DTT 还原后, F-Trp76 的化学位移向低场移动 (为 -38.44 ppm), 而 F-Trp126 的化学位移却基本不变. 此结果表明活性中心的二硫键交换反应引起 DsbA 蛋白的结构变化, 这种变化影响到 Trp76 残基附近的结构环境, 而 Trp126 的环境却保持相对稳定. ^{19}F 在自然界的丰度达 100%, 核磁共振信号灵敏度与 ^1H 相当. 在蛋白质中引进氟, 可以利用 ^{19}F 作为探针, 灵敏地反映色氨酸吲哚环化学环境的变化, 从而研究蛋白质的结构变化和功能关系.

用氨基酸类似物生物标记的方法在蛋白质中标记敏感的探针基团, 能有效地利用特殊谱学性质, 提供常规方法所不能得到的有用信息. 如果再结合定点突变技术在蛋白质的特殊位点专一性引入特殊探针, 可以更好地研究蛋白质结构及功能和蛋白质的相互作用. 在实际应用中, 色氨酸类似物和硒代甲硫氨酸^[6,7]是两种常用的标记氨基酸类似物.

参 考 文 献

- 1 Millar D P. Time-resolved fluorescence spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 1996, **6** (5): 637~ 642
- 2 Danielson M A, Falke J J. Use of ^{19}F NMR to probe protein structure and conformational changes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1996, **25**: 163~ 195
- 3 Guddat L W, Bardwell J C A, Martin J L. Crystal structures of reduced and oxidized DsbA: investigation of domain motion and thiolate stabilization. *Structure*, 1998, **6** (6): 757~ 767
- 4 Hu H Y, Cheng H Q, Li Q, *et al.* Study of the redox properties of metallothionein *in vitro* by reacting with DsbA protein. *J Prot Chem*, 1999, **18** (6): 665~ 670
- 5 Wong C Y, Eftink M R. Incorporation of tryptophan analogues into staphylococcal nuclease, its V66W mutant, and $\Delta 137\sim 149$ fragment: spectroscopic studies. *Biochemistry*, 1998, **37** (25): 8938~ 8946
- 6 Service R F. Brightness speeds search for structures great and small. *Science*, 1997, **277** (5330): 1217~ 1219
- 7 Doublet S. Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Meth Enzymol*, 1997, **276** (part A): 523~ 537

Study of the Structural Environment of DsbA Protein by Labeling of Tryptophan Analogs*

LI Qi¹⁾, HU Hong-Yu^{1)**}, SHENG Warr-Yun²⁾, ZHAO Xin-Yan¹⁾, XU Gen-Jun¹⁾

(¹⁾ Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,

The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ²⁾ Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai 200031, China)

Abstract Tryptophan analogs were biosynthetically incorporated into the tryptophan sites of DsbA protein to investigate the spectroscopic characteristics, local environments of tryptophans. This technique by using tryptophan analog labeling may be of potential application to studying structure-function relationships and protein-protein interactions. 5-hydroxytryptophan labeled DsbA protein presents a fluorescence excitation wavelength at 315 nm and an emission near 340 nm. The chemical shifts of Trp76 and Trp126 in 5-fluorotryptophan labeled DsbA were identified in ¹⁹F-NMR spectra, and change of the chemical shift of Trp76 can reflect the conformational change of DsbA protein during redox reaction. The future work is to use specific fluorescence and ¹⁹F-NMR of labeled DsbA protein to study its redox properties and interaction with substrates.

Key words biosynthetic labeling, fluorescence, ¹⁹F-NMR, DsbA protein, structural environment

* This work was supported by grants from the National Natural Sciences Foundation of China (NSFC39700026, NSFC30070165).

** Corresponding author. Tel: 86-21-64374430-5121, E-mail: hyhu@sunm.shnc.ac.cn

Received: July 23, 2001 Accepted: October 20, 2001

BIO CHINA 2002

第二届中国国际生物技术展览会

中国国际生物创新项目成果交易洽谈会

中国国际贸易中心 北京

2002年8月28~31日

21世纪,中国将成为世界上最具有吸引力的国家。随着中国加入世界贸易组织和成功申办2008年奥运会,中国正面临着前所未有的发展机遇,世界各大公司均加大了在华的投资力度,而作为现代科技的一个重要组成部分,生物技术必将得到迅猛发展,从而成为整个世界的聚焦点。生物技术的发展和运用将掀起一场新的工业革命。

继2001第一届中国国际生物技术展览会成功举办以来,受到了生物界各位同仁的普遍好评,组委会决定2002年继续举办第二届展览会。与此同时,为进一步加快生物科技成果项目转化的步伐,本次大会将把最新前沿性及实用性科技成果展示给到会的投资商,为您提供广泛合作与发展的契机,来迎接新世纪的发展机遇。在洽谈会中,与会专家学者将重点介绍其科技成果的情况。期间众多公司主管、政府官员和投资界人士将就生物技术产业及在农业、医疗、工业与环境等方面的应用及发展方向,投资商机和投资策略进行讨论。

通过本次洽谈会,您将清晰了解到目前生物技术领域最新的科研成果和投资机会,将有机会与该领域内的专家进行面对面地交流,同时也有利于迅速提升贵公司在行业中的知名度,找到适合您的投资商机,因此,我们诚邀您参加本次洽谈会。

电话: 010-88211620 传真: 010-88211621 E-mail: genefax@263.net 网站: www.genefax.com

开户行: 广东发展银行北京分行建国路支行

帐号: 78651601046179