

激光光散射研究天花粉蛋白的聚集过程

吴佩强

马星奇

吴 奇

(北京大学化学系, 北京 100871) (中国科学院生物物理所, 北京 100101) (香港中文大学化学系)

摘要 运用激光光散射技术研究天花粉蛋白在水溶液及不同浓度 KSCN 水溶液中的聚集过程. KSCN 的加入能提高天花粉在水溶液中的稳定性. KSCN 浓度大于 $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 天花粉溶液透明、稳定, 溶液中天花粉以单个分子与聚集体两种形式存在. 聚集体主要是由约 120 个天花粉分子组成, 平均流体力学半径 \overline{R}_h 值约为 49 nm, 在溶液中排列疏松. 类似 θ 溶剂中的无规线团.

关键词: 激光光散射, 天花粉蛋白, 聚集过程

天花粉蛋白 (简称 TCS) 是一种从葫芦科植物瓜蒌的块根中分离得到的碱性单链蛋白, 已成为一种我国独特的抗早孕和中期引产药物^[1]. 长期以来的系统研究, 不仅得到它的氨基酸序列结构^[2], 而且分别对 C2 空间群与 P2₁2₁2₁ 空间群的晶体结构、分子结构作出了详细的描述^[3,4]. 已知它的等电点 (PI) 为 9.4; 摩尔质量约为 $2.7\times 10^4\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 由 247 个氨基酸残基组成; 分子尺寸为 $4.9\times 3.8\times 3.7\text{nm}^3$.

作为一种植物毒素, TCS 是一大族称为核糖体失活蛋白 (RIP) 中的一员, 对真核完整细胞及无细胞系统的蛋白质合成有强烈的抑制作用, 能使核糖体失活^[5,6]. 将其制成免疫毒素, 可以有选择的作用于特殊细胞, 如癌细胞; 又由于它在急性感染的淋巴细胞或慢性感染的巨噬细胞中能有效地抑制人类免疫缺损病毒 (亦称爱滋病)^[7], 使得这类蛋白找到了新的用途, 因此天花粉蛋白在医药领域具有十分重要的应用前景. 当前存在的问题是它在血液和组织液中稳定性差以及其非专一的毒性. 目前, 生物界广泛研究 TCS 的结构与功能之间的关系.

激光光散射技术 (LLS) 广泛地用于研究高分子溶液特性, 作为经典的静态方法, 可测得高聚物的平均摩尔质量 \overline{M} 、均方半径 R_g 以及第二维利系数 A_2 . 近十几年发展起来的动态方法, 测得光强的时间相关函数, 可得高聚物的平均扩散系数 \overline{D} 与平均流体力学半径 \overline{R}_h ^[8,9]. 该技术具有不破坏样品所处的环境状态、能快速跟踪聚集过程的特点, 作者曾用它研究龙虾酶的失活过程, 取得有益的结果^[10]. 本文将用 LLS 技术研究天花粉蛋白在溶液中的稳定性.

1 实验部分

1.1 样品制备

所用天花粉为上海金山化工厂生产的纯品, KSCN 为 A.R. 级试剂, 水经二次蒸馏。

配置浓度为 0.05、0.10、0.20、0.50、1.0 mol·L⁻¹ KSCN 水溶液各 25 mL。分别取 10 mL 上述溶液, 加入 0.004 g 天花粉, 溶解后通过 0.22 μm 的微孔过滤膜进入样品池 (样品池先经过光学除尘)。恒温 10 min, 立即跟踪进行动态光散射测定。

1.2 样品浓度的确定

称取 0.0203 g 天花粉溶解在 25 mL 1.0 mol·L⁻¹ KSCN 溶液中, 用 0.22 μm 的微孔过滤膜除去不溶物, 所得清液待用。

取上述清液若干, 经冷冻离心干燥确定实际浓度为 8.12 × 10⁻⁴ g·mL⁻¹。将此清液冲稀成含天花粉浓度分别为 2.77 × 10⁻⁵、7.202 × 10⁻⁵、1.108 × 10⁻⁴ g·mL⁻¹ 的 1.0 mol·L⁻¹ KSCN 溶液, 用于聚集数的测定。

1.3 光散射测定

实验所用仪器型号为 AV DLS/SLS-5000. (Langen in Hessen, Germany)。光源是氩离子激光器 (美国相干公司, INNOVA 90)。实验中选用波长 488 nm、功率 400 mW。入射光为垂直偏振光, 可测量的散射角度范围 15–155°。该仪器可同时测定静态光强和光强的相关函数, 采用 240 通道的 ALV-5000 相关仪。实验温度 15.0 ± 0.1°C。

2 结果与讨论

2.1 天花粉在水溶液中的稳定性

采用动态光散射技术测定天花粉蛋白聚集体的大小随时间的变化, 以此来描述其在溶液中的稳定性。实验中测定的光强相关函数 $G^{(2)}(n\Delta\tau, \theta)$ 与一级电场相关函数 $g^{(1)}(n\Delta\tau, \theta)$ 之间的关系可表达为 [9]

$$G^{(2)}(n\Delta\tau, \theta) = A[1 + \beta|g^{(1)}(n\Delta\tau, \theta)|^2] \quad (1)$$

式中 A 为测量基线, β 是与仪器性能有关的常数, n 为通道数, $\Delta\tau$ 为采样时间。对于多分散样品, $g^{(1)}(n\Delta\tau, \theta)$ 与线宽分布函数 $G(\Gamma)$ 有关:

$$g^{(1)}(n\Delta\tau, \theta) = \int_0^\infty G(\Gamma)e^{-\Gamma n\Delta\tau} d\Gamma \quad (2)$$

式中 Γ 为线宽, 采用 Laplace inversion 的 Contin^[11] 方法, 可求得 $G(\Gamma)$ 、 Z 均线宽 $\bar{\Gamma}$ 和 Z 均平动扩散系数 \bar{D} 。其中

$$\bar{\Gamma} = \int_0^\infty G(\Gamma)\Gamma d\Gamma \quad (3)$$

以及 $\bar{D} = \bar{\Gamma}/q^2$ (4)

式 (4) 中波矢 $q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}$, 进而采用 Stokes-Einstein 公式:

$$\bar{R}_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta\bar{D}} \quad (5)$$

可求得平均流体力学半径 \bar{R}_h 。式 (5) 中 k_B 为 Boltzmann 常数, T 为实验温度, η 为介质粘度。本文采用水在 15°C 时的粘度值。

天花粉在水溶液中的平均流体力学半径 \overline{R}_h 随时间的变化和用 Contin 方法得到不同时间的单个分子与聚集体的 \overline{R}_h 值、所占比例 A/A_T 列于表 1.

表 1 天花粉在纯水中聚集情况

Table 1 The aggregation process of trichosanthin in deionized water

Time	t/min	23	55	100	110	130	155	163
Average radius	\overline{R}_h/nm	3.4	5.2	12.9	14.8	17.2	26.7	28.2
Individual molecules	\overline{R}_h/nm	2.5	2.5	2.6	2.5	2.7	2.6	2.6
	A/A_T	0.74	0.47	0.18	0.14	0.13	0.09	0.07
Aggregates	\overline{R}_h/nm	69.7	69.8	80.3	84.3	86.4	96.6	101.3
	A/A_T	0.26	0.53	0.82	0.86	0.87	0.91	0.93

A/A_T the peak area ratio

A_T the total area under the two peaks

表中数据显示, 在近 3h 天花粉“粒子”的平均流体力学半径 \overline{R}_h 由 3.4 nm 长大到 28.2 nm. 用 Contin 方法得到流体力学半径 \overline{R}_h 的分布 (图 1) 显示, 即使在刚配得的天花粉溶液中也存在两种不同尺寸的“粒子”, 小“粒子” \overline{R}_h 约为 2.5 nm, 占总量的 0.74 (表 1), 其对应于单个天花粉蛋白的分子; 大“粒子” \overline{R}_h 值为 69.7 nm, 占总量的 0.26, 对应于天花粉蛋白的聚集体. 随着时间的增长, 聚集体不断长大, 约 3h, \overline{R}_h 值为 101 nm, 占总量的 0.93, 此时小“粒子”的尺寸基本不变, 但仅占总量的 0.07. 这进一步证明小“粒子”对应于天花粉单个分子, 而大“粒子”是 n 个天花粉分子形成的聚集体. 上述结果表明天花粉分子在水溶液中极不稳定, 随着时间的增加, 聚集体增大, 以致于发生沉淀.

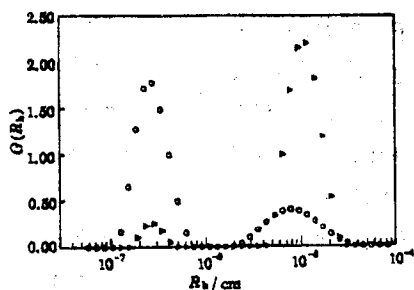


图 1 天花粉在纯水中 R_h 的分布图

Fig.1 Hydrodynamic radius distribution $G(R_h) \sim R_h$ (TCS in water)

○ $t=23\text{min}$, △ $t=163\text{min}$

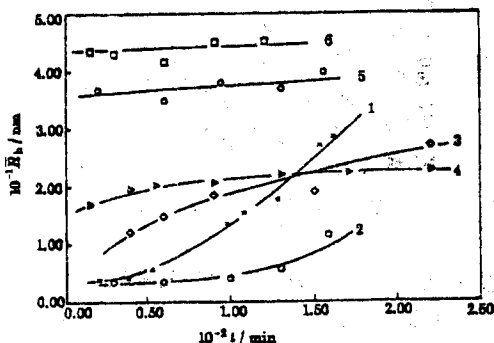


图 2 天花粉在 KSCN 水溶液中的 $\overline{R}_h \sim t$ 图

Fig.2 Plot of $\overline{R}_h \sim t$ (TCS in KSCN solution)

1) water, 2) $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,
3) $0.10\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 4) $0.20\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,
5) $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 6) $1.0\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

2.2 KSCN 的影响

分别在 0.05、0.10、0.20、0.50、 $1.0\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 KSCN 水溶液中, 加入天花粉, 按实验部分所述方法制得溶液, 测定 \overline{R}_h 值随时间的变化, 结果见图 2. 由图可见, 在

0.05、0.10 mol·L⁻¹ KSCN 的溶液中, 天花粉“粒子”的 \overline{R}_h 值随时间有些变化, 体系仍不稳定; 在 0.20 mol·L⁻¹ KSCN 溶液中, \overline{R}_h 值变化不大, 体系趋于稳定; 对于 0.50 mol·L⁻¹ KSCN 的样品跟踪 16 天、1.0 mol·L⁻¹ KSCN 的样品跟踪了 21 天, \overline{R}_h 值几乎都没有变化, 表明 KSCN 的加入有助于提高天花粉在水溶液中的稳定性。

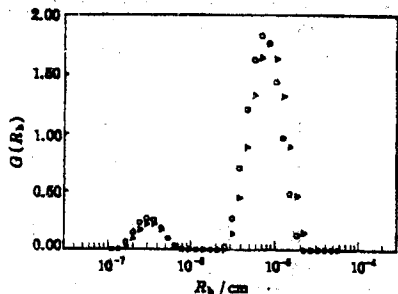


图 3 天花粉在 0.20 mol·L⁻¹ KSCN 水溶液中 R_h 的分布图

Fig.3 Hydrodynamic radius distribution $G(R_h) \sim R$ (TCS in 0.20 mol·L⁻¹)

○ $t=15\text{min}$, △ $t=400\text{min}$

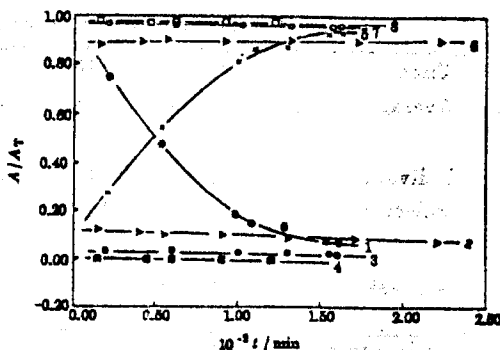


图 4 天花粉在水与 KSCN 溶液中 $A/A_T \sim t$ 图

Fig.4 Plot of peak area ratio $A/A_T \sim t$ (TCS in KSCN solution & water)

1) water; 2) 、6) 0.20 mol·L⁻¹; 3) 、7) 0.50 mol·L⁻¹; 4) 、8) 1.0 mol·L⁻¹;
1) 、2) 、3) 、4) individual molecules;
5) 、6) 、7) 、8) aggregates

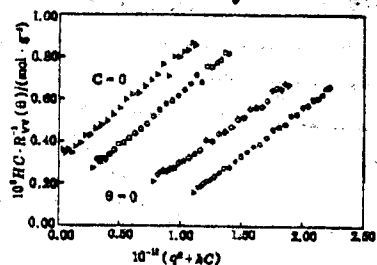


图 5 天花粉在 1.0 mol·L⁻¹ KSCN 溶液中 Zimm 图

Fig.5 Zimm Plot (TCS in 1.0 mol·L⁻¹ KSCN solution)

随着 KSCN 浓度的增加, 天花粉“粒子”的平均流体力学半径增加, 在 0.05、0.10、0.20、0.50、1.0 mol·L⁻¹ KSCN 溶液中, 对于刚配得的天花粉溶液, \overline{R}_h 值分别为 4.6、12.0、19.5、36.8、45.1 nm; 用 Contin 方法得到这些体系流体力学半径分布的情况与在纯水中的分布相似 (图 3)。当盐浓度大于 0.20 mol·L⁻¹ 时, 只存在两种尺寸的质点; 且随盐浓度增加, 大质点所占比例增加。在 KSCN 浓度为 0.50、1.0 mol·L⁻¹ 时, 大小质点所占比例不变, 趋于定值 (图 4)。

实验所用 KSCN 水溶液的 pH 值范围为 7.2 左右, 天花粉蛋白在此介质中带正电, 由于静电相互作用, SCN⁻ 屏蔽电荷, 促使天花粉分子形成聚集体; 同时, SCN⁻ 的水化离子大, 水化层的存在又削弱了静电引力, 这两种作用的结果, 使体系达到平衡, 可能是天花粉分子在浓度大于 0.5 mol·L⁻¹ KSCN 水溶液中形成一定大小聚集体的原因。

2.3 聚集数的测定

用静态光散射方法对每一浓度的样品在 20-150° 范围内测定其散射光强, 采用甲苯作标准, 所测光强可换算成溶质贡献的 Rayleigh 比 $[R_{vv}(\theta)]$, 即绝对散射光强, 其与溶质分子的 \overline{M} 、均方半径 $\langle R_g^2 \rangle^{1/2}$ 和第二维利系数 A_2 的关系为 [12]

$$\frac{HC}{R_{vv}(\theta)} \cong \frac{1}{\overline{M}} \left(1 + \frac{1}{3} \langle R_g^2 \rangle q^2 \right) + 2A_2C \quad (6)$$

式中 $H = 4\pi^2 n^2 \left(\frac{\partial n}{\partial C} \right)^2 / N_A \lambda_0^4$, $q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}$. 其中 N_A 为 Avogadro 常数, n 为溶剂的折光指数, λ_0 为入射光在真空中的波长. 本文采用 $\frac{\partial n}{\partial C} = 0.18$ 进行计算.

在 KSCN 溶液浓度大于 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 天花粉主要以聚集体的形式存在, 占 97% 以上. 为此, 我们用静态光散射测定了 KSCN 浓度为 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同天花粉浓度样品, 图 5 显示所测的 Zimm 图. 通过对浓度与角度外推至零, 可得 \overline{M} 、 R_g 和 A_2 , 结果列于表 2. 即此条件下天花粉聚集体的摩尔质量为 3.23×10^6 , 已知天花粉单个分子摩尔质量约为 2.7×10^4 , 所以此聚集体约由 120 个天花粉子组成.

类似于静态光散射的 Zimm 图, 有下述的关系式 [13]:

$$\overline{D} = \overline{D}_0 (1 + k_d C) (1 + f \langle R_g^2 \rangle q^2) \quad (7)$$

式中 k_d 为扩散第二维利系数, f 为无量纲的数. 同样, 对上述样品用动态光散射进行测定, 通过对浓度和角度外推至零, 可得 \overline{D}_0 和 $(\overline{R}_h)_0$, 结果见表 2. 由此可知, 在 KSCN 为 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对应于约由 120 个分子组成的天花粉聚集体, 其平均流体力学半径为 49 nm, R_g 与 R_h 的比值为 1.43, 表明天花粉聚集体是一种松散的结构, 类似于在 θ 溶剂中的无规线团 [14].

表 2 静态与动态光散射结果

Table 2 Static and dynamic LLS results (TCS in $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KSCN solution, 15°C)

$10^{-6} M$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$10^4 A_2$ $\text{mol}\cdot\text{mL}\cdot\text{g}^{-2}$	R_g nm	$10^5 \overline{D}_0$ $\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$	$(\overline{R}_h)_0$ nm	$10^{-3} k_d$ $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$	f	R_g/R_h
3.23	-6.7	70	3.8	49	-2.5	~ 0	1.43

3 结论

天花粉蛋白在水溶液中不稳定, 易聚集而沉淀. KSCN 的加入能提高天花粉在水溶液中的稳定性. 当 KSCN 的浓度大于 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 天花粉溶液透明、稳定. 溶液中天花粉以单个分子与聚集体两种形式存在, 聚集体主要是由约 120 个天花粉分子组成, \overline{R}_h 值为 49 nm, 在溶液中排列疏松, 类似在 θ 溶剂中的无规线团.

参 考 文 献

- 1 上海实验生物研究所二室. 动物学报, 1974, 22:126
- 2 Collins E J, Robertus J D, Lopresti M, et al. J. Biol. Chem., 1990, 265(15):8665
- 3 Pan K Z, Ma X Q, Ni C Z, et al. Scientia Sinica (Series B), 1987, 15:386

- 4 Ma X Q, Jin L, Wang D C, et al. XVI Congress and General Assembly International Union Crystallography. Beijing China: 21-29 August, 1993, 121
- 5 张劲松, 刘望夷. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(1):51
- 6 张劲松, 刘望夷. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(2):131
- 7 McGrath M S, Hwang K M, Caldwell S E, et al. Proc. Natl. Acad., Sci., USA, 1989, 86:2844
- 8 Chu B. Laser Light Scattering, New York: Academic Press, 1974
- 9 Pecora R. Dynamic Light Scattering: applications of photon correlation spectroscopy. New York: Plenum Press, 1985
- 10 Liang S J, Tsou C L, Wu P Q, et al. Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1038:247
- 11 Provencher S W. Biophys. J., 1976, 16:29; J. Chem. Phys., 1976, 64:2772; Makromol. Chem., 1979, 180:201
- 12 Zimm B H. J. Chem. Phys., 1948, 16:1099
- 13 Jin S W, Sun X X. Acta Chim. Sin., 1981, 39:917
- 14 Chu, B, Park I H, Wu C, et al. Macromolecules, 1987, 20(11):2833

Laser Light Scattering Investigation of the Aggregation Process of Trichosanthin in Aqueous Solution

Wu Peiqiang^a Ma Xingqi^b Wu Chi^c

(a Department of Chemistry, Peking University, Beijing 100871; b Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101; c Department of Chemistry, The Chinese University of Hong Kong)

Abstract Trichosanthin (TCS) is a single-chain protein containing 247 amino acid residues, it belongs to the plant ribosome-inactivating protein (RIP). The isoelectric point is about 9.4 and the mole mass is about $2.7 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. It is an effective plant protein of a popular chinese herb medicine and a kind of cytotoxin. Recently, it has been reported that it can be used to inhibit trophoblastic tumors and may also be useful in the treatment of AIDS disease, and therefore has attracted more attention to the RIP and its applications. However, the problem encountered is its low stability in blood and tissue fluids. It has become essential to understand the behaviour of TCS in solution.

Laser light-scattering has been used to investigate the aggregation process of TCS in both deionized water and KSCN aqueous solution. TCS is more stable in KSCN aqueous solution than in water. When the KSCN concentration is higher than $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, it is found that the size distribution is always a bimodal one. One peak corresponds to single TCS molecule; the other, the aggregate which is composed of about 120 TCS molecules and has an average hydrodynamic radius of about 49 nm. The aggregates are made of loosely packed TCS molecules and behave as flexible polymer chain in θ solvent.

Keywords: Laser light scattering, Trichosanthin, Aggregation process