

光谱法研究埃洛石纳米管与溶菌酶间的相互作用

王素娟*, 彭茜茜, 李彤彤, 宋洪赞, 巴信武*

(河北大学 化学与环境科学学院, 保定 071002)

摘要:以溶菌酶作为模型蛋白,主要利用光谱法研究了埃洛石纳米管与溶菌酶之间的相互作用。荧光光谱结果表明向溶菌酶体系中加入埃洛石纳米管会出现荧光猝灭现象,猝灭机理符合静态猝灭规律。共振光散射强度的增加可能与埃洛石纳米管-溶菌酶复合物的形成而导致的分子尺寸的增加有关,这与紫外-可见吸收光谱的变化和静态猝灭机理相一致。同步荧光光谱分析表明两者之间的相互作用可能发生在色氨酸所处位置附近,作用过程使溶菌酶的二级结构发生变化,分子链错误折叠,加入浓度为 100 mg/L 和 200 mg/L 的埃洛石纳米管时,通过圆二色谱数据计算出分别导致 α -螺旋的含量降低 3.28% 和 6.89%。

关键词:埃洛石纳米管; 溶菌酶; 荧光猝灭; 共振光散射; 圆二色谱

引言

埃洛石纳米管(HNTs)是一种结晶良好的天然中空管状纳米管,由铝氧八面体和硅氧四面体晶格错位卷曲而成,其分子式为 $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n=0$ 或 2)^[1~3]。埃洛石纳米管作为一种新兴的纳米材料,与碳纳米管相比其具有以下优点:(1)含量丰富,价格便宜,来源广泛;(2)无毒无害,具有很好的生物相容性;(3)较高的吸附性和较强的热稳定性^[4,5]。近年来有研究报道,埃洛石纳米管作为药物载体时可有效延缓药物释放,故引起了生物药学领域研究人员的广泛关注^[6~8]。

在生物医药领域,为防止药物发生化学或酶降解反应造成损失,同时降低副作用并提高生物利用度,将药物分子包裹在载体材料中就具有重要战略意义^[9~11]。因此,寻找新的药物载体并研究它的载药能力及药物在体内的运输和代谢过程成为该领域的研究热点之一。药物在人体内运输代谢过程中,可能与体内重要组成成分蛋白质发生相互作用,研究可能的新型药物载体与体内蛋白质分子的相互作用,以及对蛋白质分子二级结构的影响,可以为它们成为一种新型的药物载体提供重要的理论依据。

现阶段国内外埃洛石纳米管作为药物载体方面的研究处于起步阶段,大部分研究内容集中于能否载药和载药能力的研究,对于载药体系在体内的代谢,尤其载体埃洛石纳米管与蛋白质的相互作用方面的研究未见系统报道。基于此,本文以溶菌酶(来源于鸡蛋清)(HEWL)作为模型蛋白,主要利用荧光光谱、紫外-可见吸收光谱、同步荧光光谱和圆二色谱系统地研究了埃洛石纳米管(HNTs)与溶菌酶的相互作用。结果表明埃洛石纳米管对溶菌酶分子有荧光猝灭作用,荧光猝灭数据分析猝灭过程符合静态猝灭规律。埃洛石纳米管与溶菌酶相互作用过程中,使溶菌酶的二级结构发生变化,分子链发生错误折叠,导致 α -螺旋结构的含量降低。

1 实验部分

1.1 紫外-可见吸收光谱测试条件

以 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液($\text{pH}=7.4$)作为溶剂,测量狭缝宽为 1nm,扫描波长为 200nm~

10.14028/j.cnki.1003-3726.2017.07.006

收稿:2016-10-26;修回:2017-05-16;

基金项目:河北省自然科学基金(B2016201129),国家自然科学基金(21274037);

作者简介:王素娟(1979—),女,副教授,现主要从事高分子化学与物理方面的教学与研究工作。Tel: 15933761396;

* 通讯联系人,E-mail: wangxsjsj@126.com; Baxw@hbu.edu.cn.

600nm。仪器型号为 UV-2550。

1.2 荧光光谱测试条件

荧光光谱测试所用仪器为岛津 RF-5301PC,以 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液($\text{pH}=7.4$)作为溶剂,溶菌酶最终浓度为 $5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。激发波长为 280nm,荧光激发和发射狭缝宽分别为 3nm 和 5nm,扫描波长范围为 290nm~600nm,得出荧光猝灭谱图。

激发和发射狭缝宽分别为 3nm 和 5nm,设定发射波长与激发波长的波长差分别为 60nm 和 15nm 得到同步荧光光谱。两波长差为 0nm,狭缝都为 1.5nm 时,得到共振散射光谱。

1.3 圆二色谱测试条件

测试用圆二色谱仪为法国 Bio-logic 公司 MOS-450/SFM300,使用 0.1cm 宽的比色池测试,测试范围:190nm~280nm。以 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液($\text{pH}=7.4$)作为溶剂。

2 结果与讨论

2.1 荧光猝灭谱图及猝灭机理

溶菌酶分子中有 129 个氨基酸残基,其中 62 和 108 位上两个色氨酸残基的存在,是溶菌酶分子能够发射内源荧光的主要原因^[12~13]。将埃洛石纳米管逐渐加入到溶菌酶溶液时,埃洛石纳米管与溶菌酶分子间发生相互作用,有可能使得溶菌酶分子中氨基酸残基所处环境发生变化。当激发波长为 280nm 时,溶菌酶的荧光最大发射峰在 342nm 处,是由溶菌酶分子中的色氨酸残基产生的。如图 1 为 298K 下不同用量的埃洛石纳米管对溶菌酶的荧光发射谱图的影响,从图可以看出,随着加入的埃洛石纳米管浓度的增加,342nm 处溶菌酶的荧光发射峰的峰形基本没有变化,强度明显减弱,出现荧光猝灭现象,同时特征发射波长发生了微弱的红移现象。荧光猝灭和红移现象表明,随着埃洛石纳米管加入到溶菌酶体系中,使得溶菌酶分子中色氨酸残基所处的微环境发生了变化,位于疏水区域的色氨酸残基逐渐暴露在水溶剂中。

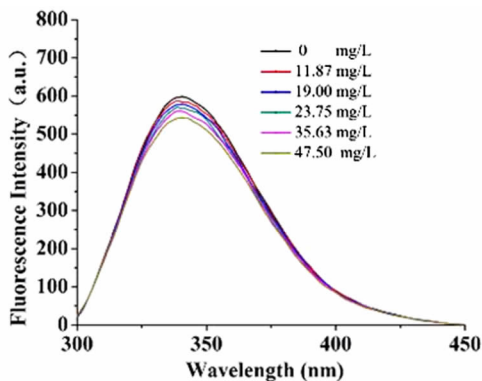


图 1 不同用量埃洛石纳米管对溶菌酶的荧光猝灭 (298K)

Figure 1 Fluorescence quenching of lysozyme in absence and presence of halloysite nanotubes (298K)

荧光猝灭过程一般可以分为动态猝灭、静态猝灭和动态猝灭及静态猝灭同时存在的复合猝灭^[14,15]。为了研究埃洛石纳米管对溶菌酶的猝灭机理,首先假设该过程为动态猝灭,则遵循 Stern-Volmer 方程:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$$

式中, F_0 和 F 分别为不存在和存在荧光猝灭剂时的荧光强度; $[Q]$ 为荧光猝灭剂的浓度。根据上述方程,以 $[Q]$ 为横坐标, F_0/F 为纵坐标作图,如图 2 所示。由于埃洛石纳米管的分子量无法确定,数据处理中用埃洛石纳米管的质量浓度乘以常数 C 作为准摩尔浓度,由曲线的斜率得出 298K 和 308K 时的动态猝灭常数分别为 $2.24/\text{CL} \cdot \text{M}^{-1}$ 和 $1.97/\text{CL} \cdot \text{M}^{-1}$ 。对于动态猝灭,溶液粘度随着温度的升高而降低,分

子运动速度加快,分子的扩散系数增加,从而导致分子与分子之间的碰撞频率增加,使得动态猝灭常数增大。而根据埃洛石纳米管对溶菌酶荧光猝灭数据,得出 308K 时的动态猝灭常数小于 298K 时的动态猝灭常数,所以埃洛石纳米管对溶菌酶的荧光猝灭不符合动态猝灭规律。

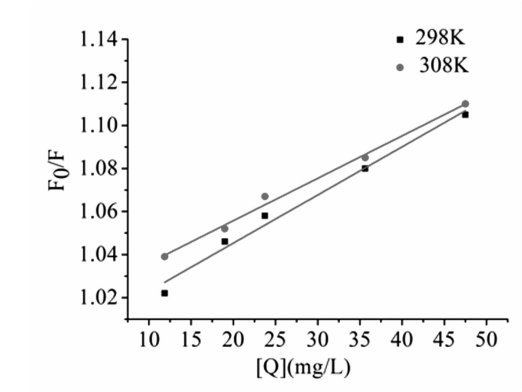


图 2 不同温度下埃洛石纳米管猝灭溶菌酶的 Stern-Volmer 图

Figure 2 Stern-Volmer plots for quenching effect of halloysite nanotubes on lysozyme at different temperature

静态猝灭机理符合 Lineweaver-Burk 双倒数方程：

$$\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{F_0} + \frac{1}{[Q]F_0K}$$

式中, F_0 和 F 分别为不存在和存在荧光猝灭剂时的荧光强度; $[Q]$ 为荧光猝灭剂的浓度。以 $1/(F_0 - F)$ 对 $1/[Q]$ 作图,如图 3 所示,可以由直线的斜率求出 298K 和 308K 时的结合常数分别为 $0.945/\text{CL}\cdot\text{M}^{-1}$ 和 $0.598/\text{CL}\cdot\text{M}^{-1}$ 。静态猝灭过程中,两种相互作用物质之间通过非共价键形成了新的复合物,升高温度可能破坏它们之间的相互作用,降低复合物的稳定性,导致猝灭常数减小。通过对埃洛石纳米管对溶菌酶猝灭的数据进行分析,得出 308K 时的猝灭常数小于 298K 时的猝灭常数,可以推断,埃洛石纳米管对溶菌酶的荧光猝灭过程符合静态猝灭规律,所以为静态猝灭。

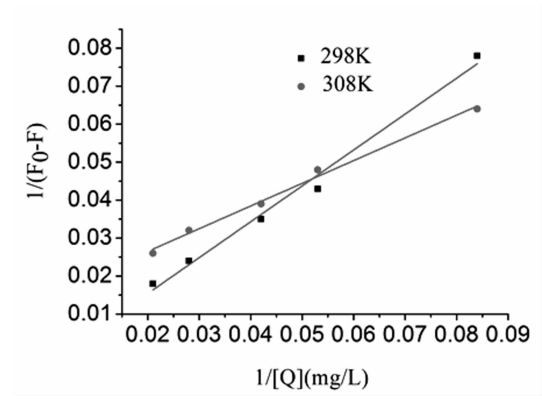


图 3 不同温度下埃洛石纳米管猝灭溶菌酶的 Lineweaver-Burk 图

Figure 3 Lineweaver-Burk plots for quenching effect of halloysite nanotubes on lysozyme at different temperature

2.2 共振散射光谱

当埃洛石纳米管加入到溶菌酶溶液中时,它们之间发生非共价键相互作用导致分子尺寸发生了改变,这可以通过共振光散射强度的变化来表征。如图 4 所示为不同用量的埃洛石纳米管对溶菌酶的共振光散射谱图的影响。纯溶菌酶的共振光散射谱在 310nm 和 530nm 处有两个强峰,随着向体系中加入的埃洛石纳米管的浓度从 11.87mg/mL 增加到 35.63mg/mL,共振光散射谱中两个峰的强度逐渐增加,峰形没有发生明显变化,这可能是由于埃洛石纳米管和溶菌酶分子之间发生非共价相互作用形成了新的复

合物所造成分子尺寸的变化,与荧光猝灭机理分析中存在静态猝灭机理相一致。

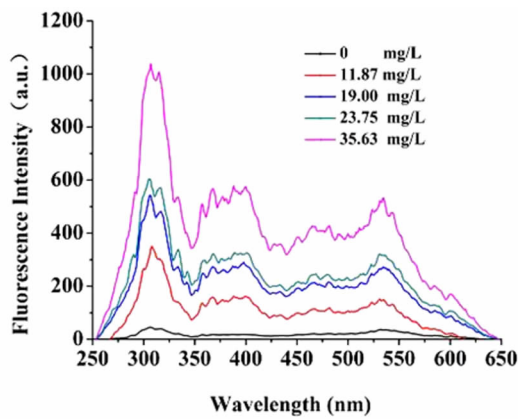


图 4 不同埃洛石纳米管用量对溶菌酶共振光散射谱的影响

Figure 4 Resonance light scattering spectra for lysozyme in absence and presence of halloysite nanotubes

2.3 埃洛石纳米管对溶菌酶二级结构的影响

2.3.1 紫外-可见吸收光谱 图 5 为溶菌酶、埃洛石纳米管及溶菌酶-埃洛石纳米管复合物的紫外-可见吸收谱图,由图可以看出纯溶菌酶在 280nm 处存在吸收峰,主要是由于溶菌酶分子中酪氨酸和色氨酸残基的 $\pi-\pi^*$ 跃迁所造成的,氨基酸残基所处微环境的变化会引起紫外-可见吸收谱图的变化。因此,可以通过溶菌酶紫外-可见吸收光谱的变化来研究埃洛石纳米管对溶菌酶构象的影响。向溶菌酶体系中逐渐加入埃洛石纳米管后,吸收峰与纯溶菌酶吸收峰相比发生微弱的蓝移,说明溶菌酶中氨基酸残基的疏水性增加,随着埃洛石纳米管的加入,色氨酸中的吡咯环中的 N 原子或者酪氨酸中酚羟基中的 O 原子逐渐暴露出来。相同的测试条件下,随着埃洛石纳米管的加入,吸光度值逐渐增加,这可能是由于埃洛石纳米管和溶菌酶之间通过非共价键相互作用形成了基态复合物,并且所形成的复合物的摩尔消光系数大于纯溶菌酶的摩尔消光系数所造成的。这与荧光猝灭机理分析中存在静态猝灭机理及共振光散射的分析结果都相一致。

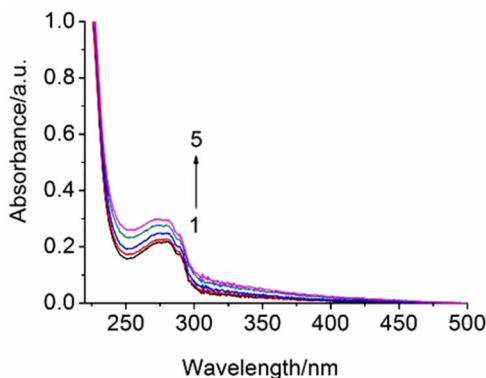


图 5 不同埃洛石纳米管用量对溶菌酶紫外可见吸收光谱的影响

埃洛石纳米管的浓度从 1~5 分别是 0、0.0152、0.0177、0.0203、0.0253mg/mL

Figure 5 Effects on UV absorption spectra for lysozyme in absence and presence of halloysite nanotubes

From 1 to 5 [halloysite nanotube]=0, 0.0152, 0.0177, 0.0203, 0.0253mg/mL

2.3.2 同步荧光光谱 如图 6 所示为不同用量的埃洛石纳米管对溶菌酶同步荧光光谱的影响,图(a)和(b)分别为激发和发射波长差 $\Delta\lambda$ 为 15nm 和 60nm 时的谱图,分别对应的是酪氨酸和色氨酸残基的结构变化。由图可知,酪氨酸在 310nm 有一个强峰,随着埃洛石纳米管的加入,吸收峰位置没有发生变化,表

明埃洛石纳米管与溶菌酶相互作用过程中酪氨酸所处的微环境没有改变;色氨酸在 342nm 处存在强峰,随着埃洛石纳米管的加入使色氨酸的同步荧光光谱发生了微弱红移,表明色氨酸所处的微环境发生变化,预测埃洛石纳米管与溶菌酶的结合可能在色氨酸所处位置附近。

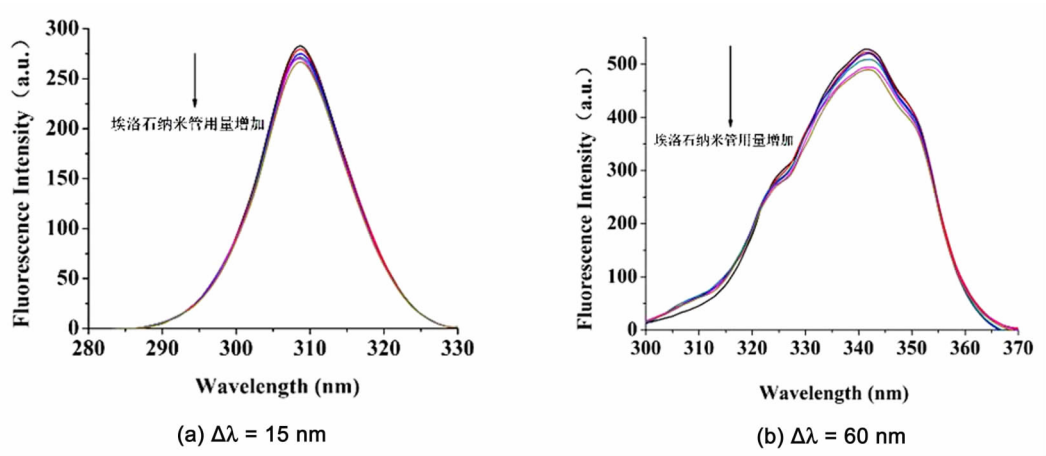


图 6 不同埃洛石纳米管用量对溶菌酶同步荧光光谱的影响
埃洛石纳米管的浓度为 0,0.0285,0.0309,0.0333,0.0356,0.0475 mg/mL
Figure 6 Synchronous fluorescence spectra for lysozyme in absence and presence of halloysite nanotubes,
[c-halloysite nanotube]=0, 0.0285, 0.0309, 0.0333, 0.0356, 0.0475mg/mL

2.3.3 圆二色谱 图 7 为埃洛石纳米管对溶菌酶圆二色谱图的影响,溶菌酶分别在 208nm 和 222nm 有 2 个负峰,分别对应溶菌酶分子中肽链 α -螺旋的 $\pi-\pi^*$ 和 $n-\pi^*$ 转变。逐渐向溶菌酶中加入不同量的埃洛石纳米管,由图可以发现 2 个负峰的峰位置均未发生明显变化,但强度随着埃洛石纳米管用量的增加而减小。利用如下公式:

$$MRE = \frac{\text{observedCD(m}^\circ\text{)}}{C_p \times n \times L \times 10}$$
$$\alpha - \text{helix}(\%) = \frac{-MRE_{208} - 4,000}{33,000 - 4,000} \times 100$$

式中,MRE 为平均残基椭圆率(Mean Residual Ellipticity,单位 $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}\cdot\text{L}$), L 是测量用比色池厚度(单位 cm); C_p 是溶菌酶的摩尔浓度(单位 mol/L); n 为溶菌酶中氨基酸残基数(129 个),计算得出 α -螺旋结构含量数据列于下表 1。由此可知,加入浓度为 100mg/L 和 200mg/L 的埃洛石纳米管后,分别导致 α -螺旋的含量降低了 3.28%和 6.89%,说明埃洛石纳米管导致溶菌酶的二级结构发生了变化,发生了分子链错误折叠,正常 α -螺旋结构的含量降低。

表 1 不同用量埃洛石纳米管对溶菌酶 α -螺旋含量的影响
Table 1 Effect of halloysite nanotubes concentration on the α -helix structure content

样品	纯溶菌酶	埃洛石用量(100mg·L ⁻¹)	埃洛石用量(200mg·L ⁻¹)
α -螺旋含量/%	27.88	24.60	20.99

3 结论

本文主要利用光谱法研究了埃洛石纳米管和溶菌酶之间的相互作用。荧光光谱分析表明埃洛石纳米管可以对溶菌酶发生荧光猝灭现象,猝灭机理为静态猝灭。埃洛石纳米管和溶菌酶之间通过非共价键形成了新的复合物,同步荧光光谱表明相互作用发生在色氨酸所处的位置附近。相互作用的发生导致溶

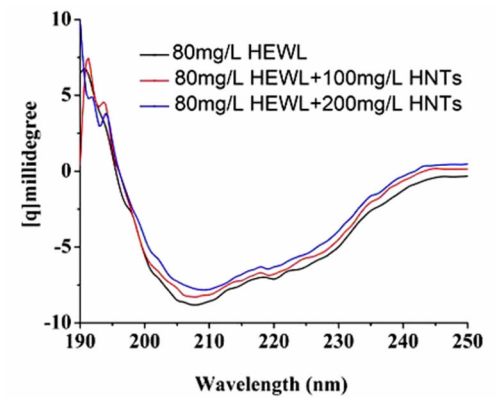


图 7 不同埃洛石纳米管用量对溶菌酶圆二色谱的影响

Figure 7 Circular dichroism spectra for lysozyme in absence and presence of halloysite nanotubes

菌酶分子链发生错误折叠，二级结构发生变化，圆二色谱数据表明 α -螺旋结构的含量降低。

参考文献：

[1] 马智, 王金叶, 高祥, 丁彤, 秦永宁. 化学进展, 2012, 24: 275.

[2] Du M L, Guo B C, Jia D M. Polym Int, 2012, 59: 574.

[3] 黄汉雄, 吴泽, 关伟盛, 汪斌. 高分子学报, 2013, 12: 1514.

[4] Vergaro V, Abdullayev E, Lvov Y M, Zeitoun A, Cingolani R, Rinaldi R, Leporatti S. Biomacromolecules, 2010, 11: 820.

[5] Veerabadran N G, Mongayt D, Torchilin V, Price R R, Lvov Y M. Macromol Rapid Commun, 2009, 30: 99.

[6] Levis S R, Deasy P B. Int J Pharm, 2002, 243: 125.

[7] Tu J X, Cao Z, Jing Y H, Fan C J, Zhang C, Liao L Q, Liu L J. Compos Sci Technol, 2013, 85: 126.

[8] Price R R, Gaber B, Lvov Y J. Microencapsul, 2001, 18: 713.

[9] Cavallaro G, Lazzara G, Massaro M, Milioto S, Noto R, Parisi F, Riela S. J Phys Chem C, 2015, 119: 8944.

[10] Tan D Y, Yuan P, Annabi-Bergaya F, Liu D, Wang L J, Liu H M, He H P. Appl Clay Sci, 2014, 96: 50.

[11] Tan D Y, Yuan P, Annabi-Bergaya F, Yu H G, Liu D, Liu H M, He H P. Microporous Mesoporous Mater, 2013, 179: 89.

[12] Sajid A M, Al-Lohedan H A, Rafiquee M Z A, Ayman M A, Abdurrahman O E. Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc, 2015, 135: 147.

[13] Kathiravan A, Jhonsi M A, Renganathan R. J Lumin, 2011, 131: 1975.

[14] Li L L, Lin R, He H, Jiang L, Gao M M. Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectros, 2013, 105: 45.

[15] Guan Y H, Zhang H M, Wang Y Q. Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectros, 2014, 124: 556.

Spectroscopic Study on the Interaction between Halloysite Nanotubes with Lysozyme

WANG Su-juan*, PENG Xi-xi, LI Tong-tong, SONG Hong-zan, BA Xin-wu*
(College of Chemistry And Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: In this article, the interaction between halloysite nanotube and lysozyme used as model protein was studied by spectroscopic method. The fluorescence of lysozyme was quenched upon addition of halloysite nanotubes and the quenching mechanism belonged to static quenching. Intensity increase of resonance light scattering may be caused by the increase of molecular size as a result of halloysite nanotube-lysozyme complex formation, which was consistent with the data of UV-vis absorption spectra and static quenching mechanism. Interaction site between halloysite nanotubes and lysozyme was around the tryptophan in lysozyme based on synchronous fluorescence spectra, where the secondary structure of lysozyme was changed. When the concentrations of halloysite nanotubes were 100 mg/mL and 200 mg/mL, the decreased α -helix structure content were 3.28% and 6.89%, respectively, calculated by the data of circular dichroism spectra.

Key words: Halloysite nanotube; Lysozyme; Fluorescence quenching; Resonance light scattering; Circular dichroism spectraspectroscopic