

多种肌红蛋白突变体与 Cu(Ⅱ)相互作用机制光谱法研究

唐 乾^{1,2}, 张 越², 曹洪玉², 马 静², 郑学仿², 王静云^{*1}

(1. 大连理工大学 化工与环境生命学部, 辽宁 大连 116024;

2. 大连大学 生物有机化学重点实验室, 辽宁 大连 116622)

摘要: 运用多种光谱法研究 PCR 定点突变获得的肌红蛋白突变体(D44K、D60K、K56D)与 Cu(Ⅱ)的相互作用. 结果表明: Cu(Ⅱ)对突变体的猝灭机理与野生型相同, 均为静态猝灭, 但结合常数、结合位点数、热力学常数、结合距离以及三维构象方面发生了一些变化. 在相同温度下, 蛋白与 Cu(Ⅱ)的结合能力顺序为 Mb(WT) < Mb(D60K) < Mb(K56D) < Mb(D44K), 结合力主要以静电和疏水相互作用为主; 结合距离顺序为 Mb(WT) < Mb(K56D) < Mb(D60K) < Mb(D44K). 同时, 借由多种光谱测定了 Cu(Ⅱ)引起肌红蛋白及其突变体的构象变化情况, 得出突变后蛋白更易与 Cu(Ⅱ)发生相互作用, α -螺旋含量下降的幅度更大. 总之, 肌红蛋白表面 44、60、56 位带电氨基酸突变后对其构象和功能产生了一定影响.

关键词: 肌红蛋白; 突变体(D44K/D60K/K56D); Cu(Ⅱ); 相互作用; 光谱法

中图分类号: O657

文献标识码: A

doi: 10.7511/dllgxb201401004

0 引言

蛋白质是生命活动的执行者, 在生物体内发挥重要的生物功能, 例如物质的运输、机体免疫防护、生物催化、营养物质贮存等^[1]. 生物小分子或金属离子在生物体内往往起到维持或激活某一种蛋白质生物功能的作用^[2]. 铜离子作为生物体内分布较广的一种微量金属元素, 在生物体内参与众多的生物过程. 它是铁的得力助手, 能促进生物体对铁的吸收、运送和利用, 参与造血过程. 同时铜离子还参与多种酶的合成, 是生物体内 30 余种酶的活性成分, 具有提高机体免疫力等功能. 但是生物体内的铜摄入过量会引起中毒反应, 例如会引起血红蛋白变性, 导致溶血性贫血, 更严重的会引起神经组织病变, 最终引起小脑运动失常等^[3-4]. 因此, 研究铜在生物体内的作用意义重大.

肌红蛋白(myoglobin, Mb)是哺乳动物肌肉细胞中执行贮存和分配氧功能的蛋白质. 因为它具有结构简单的特点, 一直被用作血红素蛋白与

各种配体结合动力学和构象改变研究的模型蛋白. 近几年的研究发现蛋白质表面带电氨基酸的改变使蛋白结构和功能发生了一定的改变. Hoffman等^[5]将马心肌红蛋白表面 44 位氨基酸从 Asp 突变为 Lys 后, 发现肌红蛋白突变体与细胞色素 b5 之间的电子转移速率升高了一个数量级. 本课题组已经探讨过某种肌红蛋白突变体在去氧能力^[6]、与离子型表面活性剂相互作用^[7], 以及光化还原方面的问题^[8-9]. 在肌红蛋白与金属离子的相互作用方面仅有本课题组在野生型肌红蛋白与各种金属离子相互作用的研究报道^[10-13], 而关于金属离子与肌红蛋白突变体相互作用的研究论文鲜见^[14].

本文研究 PCR 定点突变获得的肌红蛋白突变体(D44K、D60K、K56D)与 Cu(Ⅱ)的相互作用. 研究蛋白质与 Cu(Ⅱ)的相互作用, 对于在分子水平上认识蛋白质与生物活性小分子的作用机理和规律, 以及蛋白质表面带电氨基酸的改变对蛋白质结构与功能的影响方面意义重大, 有利于更好

收稿日期: 2012-10-11; 修回日期: 2013-11-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21271036); 辽宁省教育厅资助项目(L2013470).

作者简介: 唐 乾(1978-), 女, 博士, 副教授, E-mail: tangqian@dlu.edu.cn; 王静云*(1967-), 女, 副教授, 博士生导师, E-mail: wangjingyun67@126.com.

地了解生命系统内各种生物分子的相互作用。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器:Jasco FP-6500 型荧光光谱仪(日本);Jasco J-810 型圆二色光谱仪(日本);Jasco V-560 型紫外-可见分光光谱仪(日本);Julabo F-12 型制冷和加热循环器(德国)。

试剂:肌红蛋白购自美国 Sigma 公司,突变体 D44K、D60K、K56D 由王静云通过 PCR 定点突变获得。使用时各种蛋白配制成 $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,并置于 4°C 保存,不要放置时间过长;所用的溶液 CuCl_2 (分析纯),配制成 $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液;缓冲溶液为 PB 缓冲液,浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.40;配制试剂所用水为超纯水。

1.2 实验方法

(1) 荧光光谱的测定

移取 $2.0 \text{ mL } 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Mb(K56D) 溶液于 10 mm 石英比色杯中,用 $5 \mu\text{L}$ 微量进样器逐次加入金属 Cu(II) 溶液(每次 $1 \mu\text{L}$, 累计总体积小于 $10 \mu\text{L}$), 298 K 下保温 3 min , 激发波长为 280 nm , 记录 $290 \sim 400 \text{ nm}$ 的荧光发射光谱,再以 $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 80 \text{ nm}$ 获得同步荧光光谱。依次测量 303 K 和 310 K 的荧光光谱和同步荧光光谱。再按照相同的条件测定野生型、Mb(D44K) 和 Mb(D60K)。

(2) 紫外吸收光谱的测定

方法同上,测定温度仅 298 K 。

(3) 圆二色光谱的测定

方法同上,参数为波长 $200 \sim 250 \text{ nm}$, 速度 $50 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 响应时间 2 s , 比色池光径 1 mm , 狭缝宽 1 nm , 结果累计 3 次的平均值。

2 结果与讨论

2.1 紫外吸收光谱

由于本实验涉及的谱图太多,就不一一列举,仅以 Mb(K56D) 与 Cu(II) 作用谱图为例进行解说。本实验中所有蛋白的特征吸收峰均在 280 nm 附近。它是由蛋白质中芳香族氨基酸的芳香苯环 $\pi-\pi^*$ 跃迁引起的。图 1 中 Mb(K56D) 的紫外吸收

强度随 Cu(II) 加入量的增加而增强,且波长略微蓝移,这是因为 Cu(II) 与 Mb(K56D) 作用后使蛋白质疏水盒内的芳香环疏水基团逐渐裸露出来,致使其处在极性增强的环境, $\pi-\pi^*$ 跃迁能量增大,进而导致吸收强度增强,吸收峰发生蓝移^[15]。上述结果也证明肌红蛋白与 Cu(II) 发生了较强的相互作用。

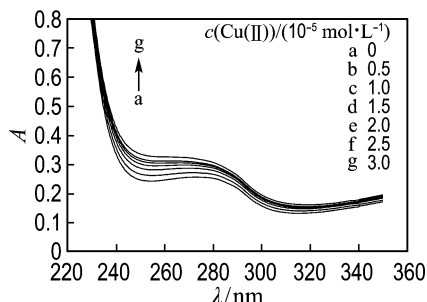


图 1 不同 Cu(II) 浓度下 Mb(K56D) 溶液的紫外吸收光谱 ($c(\text{Mb(K56D)}) = 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig. 1 UV absorption spectra of Mb(K56D) with different concentrations of Cu(II) ($c(\text{Mb(K56D)}) = 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.2 荧光光谱

图 2 的荧光光谱显示随着 Cu(II) 浓度的增加, 331 nm 处的 Mb(K56D) 荧光强度逐渐减弱,说明金属铜离子与 Mb(K56D) 发生了较强的相互作用,导致蛋白的内源荧光猝灭。本实验中的 3 种突变体的荧光发射峰位置都在 330 nm , 仅野

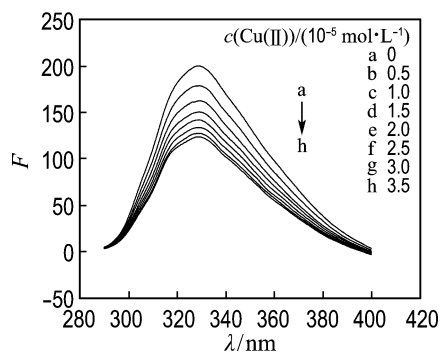


图 2 不同 Cu(II) 浓度下 Mb(K56D) 溶液的荧光光谱 ($c(\text{Mb(K56D)}) = 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig. 2 Fluorescence spectra of Mb(K56D) with different concentrations of Cu(II) ($c(\text{Mb(K56D)}) = 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

生型的荧光发射峰位置位于 323 nm. 突变后的蛋白的荧光峰位置均红移,说明表面氨基酸突变后蛋白内部疏水区外露,这一结果有利于突变体与金属离子的相互作用. 与紫外吸收光谱结果一致,均说明金属 Cu(Ⅱ)与肌红蛋白发生较强的相互作用. 为了证明这种相互作用机理,本文展开下面的工作.

2.2.1 荧光猝灭机理 在生理温度 37 ℃ 以下,肌红蛋白能很有效地保持天然结构. 本实验选取 3 个不同温度,考察不同温度对 Cu(Ⅱ)与肌红蛋白及突变体相互作用的影响. 所选取的这 3 个温度,一个是室温(298 K,即 25 ℃),一个是生理温度(310 K,即 37 ℃),另一个是在室温和生理温度中间的一个温度(303 K),如果再细分,数据差距很小. 观察在室温至生理温度范围内金属离子 Cu(Ⅱ)与肌红蛋白及突变体之间作用的变化规律,这一温度范围不受较高温度对蛋白质结构的影响干扰,通过 3 个温度的变化,能研究温度对此类相互作用的影响规律. 根据 Stern-Volmer^[16]方程(式(1))作图,见图 3,得出 K_{sv} 和 K_q 列于表 1 中.

$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 c(Q) = 1 + K_{sv} c(Q)$ (1)
式中: F_0 和 F 分别为未加入和加入猝灭剂(Q)时荧光物质的荧光强度; τ_0 为猝灭剂不存在时荧光物质的平均寿命; $c(Q)$ 为猝灭剂浓度; K_q 为双分子猝灭常数; K_{sv} 为动态猝灭常数.

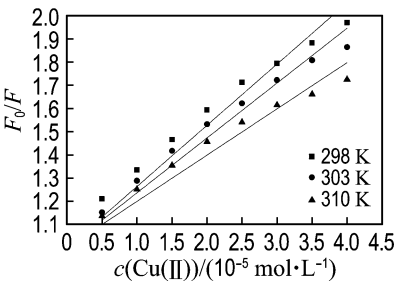


图 3 不同温度下 Cu(Ⅱ)与 Mb(K56D)相互作用的 Stern-Volmer 图
Fig. 3 Stern-Volmer plot of Mb(K56D) with Cu(Ⅱ) at different temperatures

据文献[17-18]报道各种猝灭剂对蛋白质等生物大分子的最大扩散猝灭常数为 $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,表 1 中所列出的不同温度下双分子

猝灭常数 K_q 均大于这个常数;在所选取的 3 个温度点上, K_q 随着温度升高而呈现降低的趋势,说明在选取的温度范围内,温度对这类作用的影响是有规律性的. K_q 随着环境温度升高而降低,说明 Mb(K56D)被 Cu(Ⅱ)猝灭的过程是因为分子之间结合形成了不发荧光的静态复合物所引起的.

表 1 不同温度下的双分子猝灭常数(K_q)、动态猝灭常数(K_{sv})及结合常数(K_a)

Tab. 1 The bimolecular quenching constant (K_q), the dynamic quenching constant (K_{sv}) and the binding constant (K_a) at different temperatures

T/K	$K_q/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$K_{sv}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_a/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$
298	2.64×10^{12}	2.64×10^4	3.10×10^4
303	2.37×10^{12}	2.37×10^4	2.92×10^4
310	2.00×10^{12}	2.00×10^4	2.57×10^4

如果 Cu(Ⅱ)与 Mb(K56D)之间是静态猝灭,则服从 Lineweaver-Burk 双倒数方程^[16]:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_a \cdot F_0^{-1} c^{-1}(Q) \quad (2)$$

根据式(2)作图,见图 4,求得 Cu(Ⅱ)与 Mb(K56D)相互作用的结合常数 K_a ,列于表 1 中. 结果表明温度越低越有利于 Cu(Ⅱ)与 Mb(K56D)结合形成复合物. 进一步证明二者作用是属于形成静态复合物的静态猝灭过程.

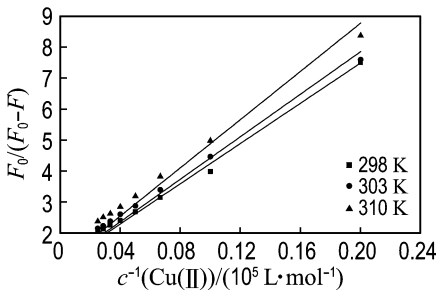


图 4 不同温度下 Cu(Ⅱ)与 Mb(K56D)相互作用的 Lineweaver-Burk 图
Fig. 4 Lineweaver-Burk plot of Mb(K56D) with Cu(Ⅱ) at different temperatures

2.2.2 结合常数和结合位点数 如果蛋白质上有 n 个相同且独立的结合位点,可由双对数公式(式(3))得出 Cu(Ⅱ)与 Mb(K56D)结合常数(K)和结合位点数(n)^[19-20].

$$\lg [(F_0 - F)/F] = \lg K + n \lg c(Q) \quad (3)$$

根据式(3)作图,见图 5.

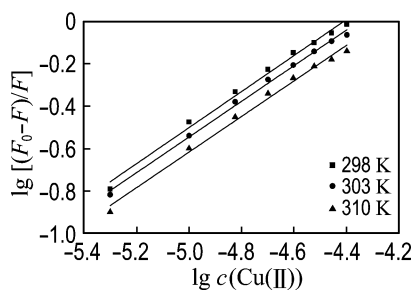


图 5 不同温度下 Cu(Ⅱ) 与 Mb(K56D) 相互作用的双对数图

Fig. 5 Double-lg plot of Mb(K56D) with Cu(Ⅱ) at different temperatures

表 2 显示的结合常数数值与 Lineweaver-Burk 法计算出的结合常数 K_a 在数量级上基本相符,低温有利于静态复合物的形成,结合位点数约为 1,表明 Mb(K56D)与 Cu(Ⅱ) 形成静态复合物是以接近 1 : 1 的比例形成的.

表 2 Mb(K56D) 与 Cu(Ⅱ) 相互作用的结合常数、结合位点数及热力学参数

Tab.2 The binding constants, the numbers of the binding sites and thermodynamic parameters for the binding of Cu(Ⅱ) to Mb(K56D)

T/K	相关系数	n	$K/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
298	0.996	0.851 7	0.57×10^4	-25.641
303	0.998	0.843 1	0.46×10^4	-25.868
310	0.996	0.841 0	0.39×10^4	-26.185

2.3 作用力类型的判定

生物活性小分子可通过次级键与蛋白质等生物大分子形成复合物. 这些次级键包括氢键、疏水相互作用、静电引力和范德华力等. 根据焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的热力学数值,可计算出形成静态复合物的主要作用力类型^[21-22].

$$\ln K_a = -\Delta H/RT + \Delta S/R \tag{4}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \tag{5}$$

根据式(4),以 $\ln K_a$ 对 $1/T$ 作图,算出焓变 $\Delta H(-12.126 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ 和熵变 $\Delta S(45.353 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$. 根据式(5)计算 3 个温度下的 ΔG ,见表 2. $\Delta H < 0, \Delta G < 0$,说明 Cu(Ⅱ) 与 Mb(K56D) 的相互作用是一个自发的发热反应;

$\Delta H < 0, \Delta S > 0$,可判断静电作用力是 Cu(Ⅱ) 与 Mb(K56D)形成复合物的主要维持力,在温度为 298 K 时, ΔG 中有 52.7% 的贡献来自于熵变 ΔS ,因此,疏水作用也是此类作用中不可忽视的作用力.

2.4 结合距离的计算

为了进一步说明 Cu(Ⅱ) 与 Mb(K56D)形成静态复合物的情况,从能量转移的角度来计算二者形成静态复合物的距离. 能量转移有辐射能量转移和非辐射能量转移两种. 图 2 中的蛋白荧光光谱没有发生畸变,说明二者的相互作用是非辐射能量转移. 非辐射能量转移有分子内和分子间能量转移两种. 供体和受体形成复合物为分子内的能量转移,不形成复合物则为分子间的能量转移^[23]. 通过分析可知,Mb(K56D)与 Cu(Ⅱ) 之间的能量转移是分子内的非辐射能量转移.

图 6 中显示相同浓度下的 Mb(K56D) 荧光光谱和 Cu(Ⅱ) 吸收光谱,重叠部分即为二者能量转移部分. K^2 、 N 和 Φ 分别按文献取值为 2/3、1.336 和 0.118,按照 Förster 非辐射能量转移理论^[24],可计算出供体与受体分子之间的结合距离 $r=2.86 \text{ nm}$,这一数值小于 7 nm,符合分子内的能量转移理论. 因此,Mb(K56D)与 Cu(Ⅱ) 形成分子内复合物,并将能量转移给受体 Cu(Ⅱ),而使得 Mb(K56D)的荧光发生猝灭.

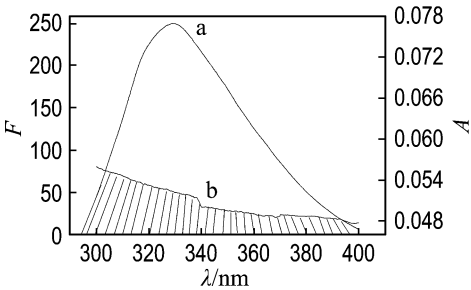


图 6 Mb(K56D) 荧光光谱(a)和 Cu(Ⅱ) (b) 吸收光谱的重叠图

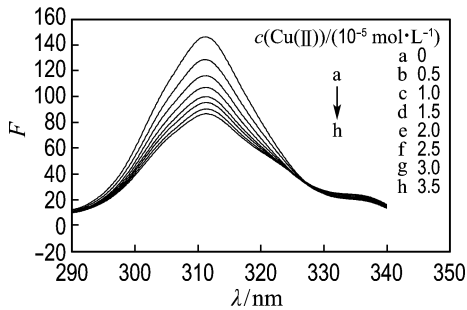
Fig. 6 Overlap of the fluorescence spectra of Mb(K56D) (a) and the absorption spectra of Cu(Ⅱ) (b)

2.5 同步荧光光谱

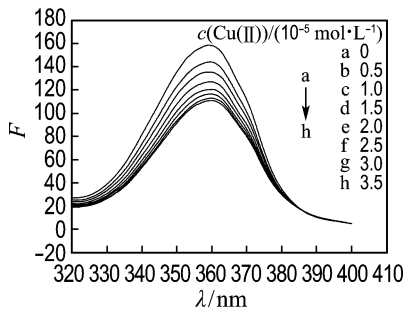
同步荧光光谱可被用来研究芳香族氨基酸构象变化的信息. $\Delta\lambda=20 \text{ nm}$ 显示酪氨酸残基荧光光谱特性, $\Delta\lambda=80 \text{ nm}$ 显示色氨酸残基荧光光谱

特性^[25].

图 7 显示酪氨酸和色氨酸残基的荧光均随着 Cu(Ⅱ)加入量的增多逐渐猝灭,且色氨酸变化更加明显,后者处于更“暴露”的状态中,极性增强,说明加入的 Cu(Ⅱ)主要是与蛋白质中的色氨酸残基区域发生相互作用.



(a) $\Delta\lambda=20\text{ nm}$



(b) $\Delta\lambda=80\text{ nm}$

图 7 Mb(K56D)与 Cu(Ⅱ)相互作用的同步荧光光谱($c(\text{Mb(K56D)})=5\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Fig. 7 Synchronous fluorescence spectra of the interaction between Mb(K56D) and Cu(Ⅱ) ($c(\text{Mb(K56D)})=5\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

2.6 圆二色光谱

圆二色光谱(circular dichroism, CD)能非常灵敏地检测处于溶液状态的蛋白质分子的二级结构信息.不同空间结构的蛋白质或多肽所形成的 CD 谱峰位置、峰强度也不同^[26].如图 8 所示,208 和 222 nm 处的两个负吸收峰是典型的 α -螺旋结构的 CD 特征峰.不断向体系中添加 Cu(Ⅱ),两个负吸收峰的强度逐渐降低,但峰位置和形状未发生变化,说明 Mb(K56D)中的 α -螺旋的比例虽逐渐降低,但仍占主要部分.通过 Yang 方程计算, Mb(K56D)与 Cu(Ⅱ)相互作用后 α -螺旋的含量由 72%降低至 67.5%,因此,由 CD 光谱得知,

Cu(Ⅱ)与 Mb(K56D)结合形成复合物后诱导了蛋白质的二级结构发生了轻微的改变.

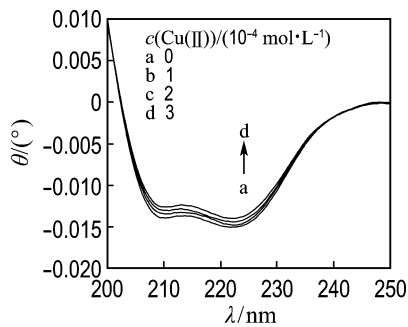


图 8 不同 Cu(Ⅱ)浓度下 Mb(K56D)溶液的圆二色光谱($c(\text{Mb(K56D)})=5\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Fig. 8 CD spectra of Mb(K56D) with different concentrations of Cu(Ⅱ) ($c(\text{Mb(K56D)})=5\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

2.7 其他肌红蛋白与 Cu(Ⅱ)相互作用的实验数据比较

所有肌红蛋白与 Cu(Ⅱ)相互作用数据见表 3. Cu(Ⅱ)与 4 种肌红蛋白作用时,展现出多方面的不同,例如结合常数、结合距离、结合强弱、二级结构受干扰程度等.在温度为 298 K 下,4 种肌红蛋白与 Cu(Ⅱ)结合的能力顺序为 $\text{Mb(WT)}<\text{Mb(D60K)}<\text{Mb(K56D)}<\text{Mb(D44K)}$,这说明突变之后蛋白更易于与 Cu(Ⅱ)发生作用,形成二元复合物,因此结合能力增强.二者的结合距离排序为 $\text{Mb(WT)}<\text{Mb(K56D)}<\text{Mb(D60K)}<\text{Mb(D44K)}$.在有效结合距离范围内,即 $<7\text{ nm}$,距离越大,两分子间的空间排阻越小,蛋白质与配体的结合越容易发生.肌红蛋白表面氨基酸突变之后,二级结构变化更明显,也更有利于与金属离子结合生成复合物.在肌红蛋白与 Cu(Ⅱ)结合时,主要作用力是静电作用,但疏水作用也不容忽视,而且疏水作用对于不同蛋白的贡献大小不同.总之,肌红蛋白表面带电氨基酸 Asp 变为 Lys 之后,对蛋白质的立体结构和功能均产生了一定的影响.有报道认为^[27-28],这是因为氨基酸的变化会引起相应氨基酸残基带电能力的改变,解离状态也发生变化,而且与之相邻近的氨基酸残基配位也发生变化,最终引起蛋白表面或者内部的构象发生相应的改变.

表3 肌红蛋白与 Cu(Ⅱ)相互作用实验数据比较(298 K)

Tab. 3 The comparison of experimental data of interaction between Mbs and Cu(Ⅱ) (298 K)

肌红蛋白	$K_a/$ (L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹)(L·mol ⁻¹)	$K_s/$ (L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹)(L·mol ⁻¹)	n	r/nm	结合力	$\Delta S/(J\cdot mol^{-1}\cdot K^{-1})$	$\Delta H/(kJ\cdot mol^{-1})$	α -螺旋 减少/%
Mb(WT)	4.16×10 ¹¹	6.07×10 ³	0.959 6	2.56	静电和疏水作用力	33.77	−11.60	2.2
Mb(D44K)	7.84×10 ¹²	8.69×10 ⁴	0.961 4	3.11	静电和疏水作用力	54.23	−12.04	4.4
Mb(D60K)	1.10×10 ¹²	1.50×10 ⁴	0.952 6	2.96	静电和疏水作用力	26.43	−14.03	3.0
Mb(K56D)	2.64×10 ¹²	3.10×10 ⁴	0.851 7	2.86	静电和疏水作用力	45.35	−12.13	4.5

3 结 语

上述的研究结果表明:Cu(Ⅱ)能引起肌红蛋白及其突变体发生荧光猝灭,猝灭机制都为静态猝灭.突变后的肌红蛋白与 Cu(Ⅱ)的结合能力增强,二级结构受干扰强度增大,结合距离变大,说明突变后更容易发生与金属离子 Cu(Ⅱ)的配位反应;配位作用力主要以静电和疏水作用为主.吸收光谱、同步荧光光谱和圆二色光谱都说明肌红蛋白及其突变体与 Cu(Ⅱ)相互作用之后构象发生了一定的变化.

参考文献：

[1] 王镜岩,朱圣庚,徐长发. 生物化学[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2002.
WANG Jing-yan, ZHU Sheng-geng, XU Chang-fa. **Biochemistry** [M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2002. (in Chinese)

[2] 阎书春. 微量元素与人体健康[J]. 化学世界, 1991(5):234-236.
YAN Shu-chun. Trace element and human health [J]. **Chemical World**, 1991 (5): 234-236. (in Chinese)

[3] 夏淑贤,程忠河,杨波. 铜的缺乏症及中毒救治措施[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011(10):89-90.
XIA Shu-xian, CHENG Zhong-he, YANG Bo. Deficiency disease of copper and treatment ways of poisoning [J]. **Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine**, 2011(10):89-90. (in Chinese)

[4] 李青仁,王月梅. 微量元素铜与人体健康[J]. 微量元素与健康研究, 2007, 24(3):61-63.
LI Qing-ren, WANG Yue-mei. Trace element copper and human health [J]. **Studies of Trace Elements and Health**, 2007, 24 (3): 61-63. (in

Chinese)

[5] Hoffman B M, Celis L M, Cull D A, *et al.* Differential influence of dynamic processes on forward and reverse electron transfer across a protein-protein interface [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2005, 102(10):3564-3569.

[6] 马君燕,马静,郑学仿,等. 荧光法对光诱导野生型肌红蛋白和突变体(D44K)去氧的对照研究[J]. 分析化学, 2008, 36(4):454-458.
MA Jun-yan, MA Jing, ZHENG Xue-fang, *et al.* Spectroscopic investigation of the photo-induced deoxygenization of myoglobin and its mutant Mb(D44K) [J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2008, 36(4):454-458. (in Chinese)

[7] 李宜雯,曹洪玉,唐乾,等. 光谱与停流荧光法研究肌红蛋白及其突变体 D60K 与表面活性剂的相互作用[J]. 物理化学学报, 2010, 26(6):1687-1692.
LI Yi-wen, CAO Hong-yu, TANG Qian, *et al.* Spectroscopy and stopped-flow/fluorescence studies on the interaction of myoglobin and its mutant (D60K) with surfactants [J]. **Acta Physico-Chimica Sinica**, 2010, 26(6):1687-1692. (in Chinese)

[8] 周华伟,曹洪玉,唐乾,等. 光诱导高铁肌红蛋白还原的光谱法研究[J]. 化学学报, 2011, 69(13):1559-1564.
ZHOU Hua-wei, CAO Hong-yu, TANG Qian, *et al.* Spectral study on the photoreduction of metmyoglobin [J]. **Acta Chimica Sinica**, 2011, 69(13):1559-1564. (in Chinese)

[9] 安良梅,曹洪玉,唐乾,等. 紫外光照下高铁肌红蛋白的还原[J]. 无机化学学报, 2012, 28(7):1461-1468.
AN Liang-mei, CAO Hong-yu, TANG Qian, *et al.* Photoreduction of metmyoglobin by ultraviolet

- irradiation [J]. **Chinese Journal of Inorganic Chemistry**, 2012, **28**(7):1461-1468. (in Chinese)
- [10] TANG Qian, PENG Xiao-jun, CAO Hong-yu, *et al.* Spectroscopic techniques study on the quenching mechanism of cytochrome *b5* affected by Cu(II) [J]. **Asian Journal of Chemistry**, 2013, **25**(4):2054-2058.
- [11] 唐 乾, 郑学仿, 王静云, 等. 可见光谱法研究肌红蛋白血红素铁与金属离子相互作用(I) [J]. 光谱学与光谱分析, 2009, **29**(7):1958-1961.
- TANG Qian, ZHENG Xue-fang, WANG Jing-yun, *et al.* Study on interaction between heme-iron of myoglobin and metal ions by visible spectroscopy (I) [J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, 2009, **29**(7):1958-1961. (in Chinese)
- [12] 马 静, 郑学仿, 唐 乾, 等. 光谱法研究 Cu^{2+} 与肌红蛋白的相互作用 [J]. 高等学校化学学报, 2008, **29**(2):258-263.
- MA Jing, ZHENG Xue-fang, TANG Qian, *et al.* Spectroscopic studies on the interaction of Cu^{2+} with myoglobin [J]. **Chemical Journal of Chinese Universities**, 2008, **29**(2):258-263. (in Chinese)
- [13] 唐 乾, 曹洪玉, 王静云, 等. 温度和时间对肌红蛋白血红素铁与金属离子相互作用的影响 [J]. 生物技术通讯, 2011, **22**(4):548-551.
- TANG Qian, CAO Hong-yu, WANG Jing-yun, *et al.* Study on the effect of temperature and time on the direct interaction between heme-iron of myoglobin and metal ions [J]. **Letters in Biotechnology**, 2011, **22**(4):548-551. (in Chinese)
- [14] TANG Qian, PENG Xiao-jun, CAO Hong-yu, *et al.* Site-directed mutagenesis of myoglobin for studies of their interaction with iron(III) by multi-spectroscopic techniques [J]. **Journal of Spectroscopy**, 2013, **2013**:Article ID 314345.
- [15] 马 静. 肌红蛋白及其突变体与金属离子相互作用的光谱学研究[D]. 大连:大连大学, 2008.
- MA Jing. Studies on the interaction of myoglobin and its mutants with metal ions by spectral technology [D]. Dalian: Dalian University, 2008. (in Chinese)
- [16] 裴明砚, 郑学仿, 曹洪玉, 等. 3-溴丙酮酸与人血清白蛋白相互作用的光谱学研究 [J]. 分析化学, 2010, **38**(7):948-952.
- PEI Ming-yan, ZHENG Xue-fang, CAO Hong-yu, *et al.* Spectroscopic studies on interaction between 3-bromopyruvic acid and human serum albumin [J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2010, **38**(7):948-952. (in Chinese)
- [17] 周 能, 周 振. 拉米夫定与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 分子科学学报, 2011, **27**(5):309-313.
- ZHOU Neng, ZHOU Zhen. Study on the interaction between lamivudine and bovine serum albumin [J]. **Journal of Molecular Science**, 2011, **27**(5):309-313. (in Chinese)
- [18] XIE Meng-xia, LONG Mei, LIU Yuan, *et al.* Characterization of the interaction between human serum albumin and morin [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2006, **1760**(8):1184-1191.
- [19] ZHAO Hong-wei, GE Min, ZHANG Zhao-xia, *et al.* Spectroscopic studies on the interaction between riboflavin and albumins [J]. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2006, **65**(3-4):811-817.
- [20] 刘亚楠, 杨 芳, 梅文杰, 等. 手性钆配合物的合成、抗肿瘤活性及其与血清蛋白的相互作用 [J]. 高等学校化学学报, 2010, **31**(3):435-441.
- LIU Ya-nan, YANG Fang, MEI Wen-jie, *et al.* Synthesis and *in vitro* anticancer activities of chiral ruthenium complexes and interaction of the complex with bovine serum albumin [J]. **Chemical Journal of Chinese Universities**, 2010, **31**(3):435-441. (in Chinese)
- [21] 马君燕, 陈克海, 郑学仿, 等. 秋水仙碱与人血清白蛋白相互作用的谱学研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2007, **27**(12):2485-2489.
- MA Jun-yan, CHEN Ke-hai, ZHENG Xue-fang, *et al.* Spectroscopy study on the interaction of colchicine and human serum albumin [J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, 2007, **27**(12):2485-2489. (in Chinese)
- [22] 陈克海, 郑学仿, 郭 明, 等. 长春新碱与人血清白蛋白的相互作用研究 [J]. 化学学报, 2007, **65**(17):1887-1891.
- CHEN Ke-hai, ZHENG Xue-fang, GUO Ming, *et al.* Investigation on the interaction of vincristine with human serum albumin [J]. **Acta Chimica Sinica**, 2007, **65**(17):1887-1891. (in Chinese)

- [23] 颜承农, 张华新, 刘 义, 等. 百草枯与牛血清白蛋白结合作用的荧光光谱[J]. 化学学报, 2005, **63**(18):1727-1732.
- YAN Cheng-nong, ZHANG Hua-xin, LIU Yi, *et al.* Fluorescence spectra of the binding reaction between paraquat and bovine serum albumin [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2005, **63**(18):1727-1732. (in Chinese)
- [24] 马贵斌, 高 飞, 任斌知, 等. 荧光法研究药物分子与人血清白蛋白的结合作用[J]. 化学学报, 1995, **53**(12):1193-1197.
- MA Gui-bin, GAO Fei, REN Bin-zhi, *et al.* Study on the interaction of human serum albumin and drug molecules by the fluorescence method [J]. *Acta Chimica Sinica*, 1995, **53**(12):1193-1197. (in Chinese)
- [25] 俞 菊, 杜江燕, 冯玉英, 等. 肌红蛋白的同步荧光光谱[J]. 分析化学, 2001, **29**(2):219-221.
- CHOU Ju, DU Jiang-yan, FENG Yu-ying, *et al.* Synchronous fluorescence spectra of myoglobin [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2001, **29**(2):219-221. (in Chinese)
- [26] 聂新华, 张 涛, 李 元, 等. 截短胰高血糖素样肽-1的构象研究[J]. 高等学校化学学报, 2010, **31**(7):1337-1341.
- NIE Xin-hua, ZHANG Tao, LI Yuan, *et al.* Conformation research of shorted glucagon-like peptide-1 [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2010, **31**(7):1337-1341. (in Chinese)
- [27] SU Hui, LU Jun-xia, WANG Yun-hua, *et al.* Study on the DME-cytochrome *b*₅ and its mutants at site of F58 [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2004, **49**(18):1914-1919.
- [28] Sirangelo I, Tavassi S, Martelli P L, *et al.* The effect of tryptophanyl substitution on folding and structure of myoglobin [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, **267**(13):3937-3945.

Investigation on mechanism of interaction between Cu(Ⅱ) and multifold mutants of myoglobin by spectroscopic techniques

TANG Qian^{1,2}, ZHANG Yue², CAO Hong-yu², MA Jing², ZHENG Xue-fang^{1,2}, WANG Jing-yun^{*1}

(1. Faculty of Chemical, Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

2. Key Laboratory of Bio-organic Chemistry, Dalian University, Dalian 116622, China)

Abstract: The interaction between Cu(Ⅱ) and the mutant proteins (D44K, D60K and K56D) which are attained by PCR site-directed mutagenesis is investigated by multi-spectroscopic techniques. The results show that the fluorescence of all the Mbs is quenched regularly with the addition of Cu(Ⅱ). The quenching belongs to the static fluorescence quenching. But the binding constants, the numbers of the binding sites, the thermodynamic parameters, the binding distance and three-dimensional conformation of mutants are different from wild type. At the same temperature, the sequence for binding strength is Mb(WT) < Mb(D60K) < Mb(K56D) < Mb(D44K), the electrostatic interaction and hydrophobic power play dominating roles in the course of binding. The binding distance sequence is Mb(WT) < Mb(K56D) < Mb(D60K) < Mb(D44K). The effects of Cu(Ⅱ) on conformation of Mb and mutants are further analyzed by multi-spectroscopic techniques. The experimental results indicate that the mutants of Mb become easier to interact with Cu(Ⅱ), and α -helix content of the mutants decreases more after interaction with Cu(Ⅱ). In all, mutation in surface-charged residue Asp44, Asp60 and Lys56 has an effect on the conformation and function of myoglobin.

Key words: myoglobin; mutants (D44K/D60K/K56D); Cu(Ⅱ); interaction; spectroscopic techniques