

基于双十二烷基二甲基溴化铵、琼脂糖修饰电极的中心蛋白金属结合性质研究

荣志江¹, 孙红艳¹, 杨艳¹, 周焕新¹, 杨斌盛²

(1.太原科技大学 化学与生物工程学院,太原 030024;2.山西大学 分子科学研究所,太原 030006)

摘要:应用热解石墨电极(pyrolytic graphite electrode,PG)、双十二烷基二甲基溴化铵(Didodecyldimethylammonium bromide,DDAB)修饰电极,以及应用琼脂糖修饰电极研究了八肋游仆虫 N 端中心蛋白(N-terminal ciliate *Euplotes octocarinatus* centrin,N-EoCen)、C 端中心蛋白(C-EoCen)与 Eu^{3+} 结合反应的循环伏安特性.研究发现在琼脂糖修饰电极上出现了配合物 Eu^{3+} -N-EoCen 一对氧化还原峰,与仅有 Eu^{3+} 存在时相比,负向移动 0.24 V.在 DDAB 修饰电极上出现了配合物 Eu^{3+} -N-EoCen 微弱的不可逆还原峰.经过计算 N-EoCen,C-EoCen 与 Eu^{3+} 结合反应的结合常数 β 和结合数 n ,显示 N-EoCen 与 Eu^{3+} 形成 1:2 型分子复合物,结合常数 $\beta=1.26 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; C-EoCen 与 Eu^{3+} 结合比为 1:2,结合常数 $\beta=1.38 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$.

关键词:中心蛋白;循环伏安;DDAB;琼脂糖

中图分类号:O646

文献标志码:A

中心蛋白(centrin)是小分子量(20 KD)的酸性蛋白,属于 EF-hand Ca^{2+} 结合蛋白亚族的高度保守蛋白,含 168 个氨基酸残基^[1-2],在微管组织中心(MOTC)的复制、分离,细胞信号转导,信使 RNA 前体的形成,核苷酸切除修复等过程中发挥着重要作用^[3-4].八肋游仆虫中心蛋白(ciliate *Euplotes octocarinatus* centrin, EoCen)是从一种在进化上处于特殊地位的单细胞真核生物—八肋游仆虫中克隆得到的,其包含两个结构域,N-端域和 C-端域,每个结构域含有两个 Ca^{2+} 离子结合位点,C 端为高亲和位点.

随着稀土在农业及医学应用领域的不断扩展,稀土离子与生物大分子的配位作用及对生物大分子结构、功能的影响日益受到重视.稀土离子与中心蛋白的相互作用研究可以为中心蛋白在生物体内功能的发挥提供理论依据,同时也有助于了解稀土对生物体的长期效应.课题组前期对 EoCen 与稀土离子结合的光谱研究显示,稀土离子在 N 端有两个低亲和位点,在 C 端有两个高亲和位点^[5-6].研究过程中发现在众多的稀土离子中,可被 EoCen 敏化的离子只有 Tb^{3+} .各种属中心蛋白 N 端和 C 端在结构和功能上非常不同,N-端域属高度可变区,负责中心蛋白功能的多样性,C 端域则是高度保守区域.EoCen 的光谱研究发现 N 端域易发生 Ca^{2+} 依赖性聚集,发挥着与纤维收缩密切相关的收缩功能^[7],C 端域则非常不同,其可以结合靶蛋白且含有磷酸化位点,可能在信号转导过程中发挥着重要作用^[8].前期对中心蛋白电化学研究也显示 N 端与 C 端的吸附曲线明显不同,预示着二者的结构和聚集状态的不同.基于此,本文对 C-EoCen 和 N-EoCen 的电化学行为继续进行深入研究.文献^[9-11]应用电化学方法对 EoCen 在电极表面的吸附性研究发现,中心蛋白在电极表面具有较好的吸附性,符合 Langmuir 吸附等温式.同时考虑到大量蛋白质在生物膜环境中发挥其生物功能,本文利用双十二烷基二甲基溴化铵(DDAB)和琼脂糖较好的生物相容性以及中心蛋白的吸附性,制备包含有中心蛋白的 DDAB 和琼脂糖修饰电极,进一步研究稀土离子 Eu^{3+} 与 C 端、N 端中心蛋白在模拟生

收稿日期:2020-03-25;修回日期:2020-08-18.

基金项目:国家自然科学基金(21571117;31401319);山西省重点研发计划项目(201903D221066);山西省回国留学人员科研资助项目(2017-083);太原科技大学博士科研基金(20162018).

作者简介:荣志江(1971—),女,山西寿阳人,太原科技大学副教授,博士,研究方向为生物电化学,E-mail:rongzhijiang@tyust.edu.cn.

通信作者:杨斌盛,E-mail:yangbs@sxu.edu.cn.

物膜环境下的相互作用.

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(Hepes),双十二烷基二甲基溴化铵(DDAB),分析纯,是Sigma分装产品,未进一步纯化.三氧化二铈(Eu_2O_3 ,纯度99.99%),购自湖南稀土金属材料研究所.琼脂糖购自国药集团化学试剂有限公司,其他化学试剂为分析纯试剂.电化学测试使用CHI-660C电化学工作站(上海辰华仪器有限公司),UV-Vis吸收光谱测定使用HP8453 UV-Vis吸收光谱仪.

1.2 实验方法

1.2.1 电化学测定方法

采用含3电极体系的5 mL电解池,修饰的棱面热解石墨电极(EPG)为工作电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,铂丝为对电极.在电化学实验前,向缓冲溶液中通入高纯氮20 min以除去氧气,实验过程中,体系始终保持氮气环境.EPG电极在使用前先用金相砂纸打磨,再用高纯 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (粒径为0.3和0.05 μm)在麂皮上抛光成镜面,然后依次用水和95%(体积分数)的乙醇分别超声清洗5 min.循环伏安(CV)和示差脉冲伏安(DPV)在含有 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl支持电解质的Hepes($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)缓冲溶液中进行,扫描电势范围为 $-0.2\sim-1.3\text{ V}$.

1.2.2 Eu^{3+} 储备液的配制

取一定量铈的氧化物(Eu_2O_3),溶解在稀盐酸中,用去离子水配成pH约5~6的微酸性溶液.取一定量的该溶液,用乙二胺四乙酸(EDTA)标准溶液进行滴定,滴定在pH 5.7的盐酸六次甲基四胺缓冲液中进行,然后测出其准确浓度.

1.2.3 蛋白储备液的制备

本文使用的蛋白质为N端及C端野生型八肋游仆虫中心蛋白(N-EoCen,C-EoCen),蛋白质的诱导、表达和纯化按照文献[12]中方法进行.经谷胱甘肽-S转移酶(GST)亲和层析得到的蛋白存在于磷酸盐缓冲液(PBS)中,经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析鉴定均为单一条带,达到实验所需纯度.由于磷酸盐对镧系离子有很强的络合能力,影响蛋白质与金属离子的结合,故需要通过超滤的方法将得到的蛋白质转入更接近生理环境的Hepes缓冲溶液中($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH 7.4).

1.2.4 蛋白浓度的测定

EoCen含有四个酪氨酸残基,不含色氨酸.N-EoCen蛋白浓度可依据所含酪氨酸残基在280 nm处的紫外吸收来确定.蛋白质的摩尔吸光系数由PACE等人^[13]提出的基于发光氨基酸含量的方法计算得到.N-EoCen的摩尔吸光系数 $\epsilon_{280}=4\ 350\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.C-EoCen的摩尔吸光系数 $\epsilon_{280}=1\ 400\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.蛋白质的紫外吸收使用光程为1 cm的石英比色皿在HP8453 UV-Vis吸收光谱仪上进行检测,选择 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH 7.4的Hepes缓冲溶液做空白,温度为 $25\text{ }^\circ\text{C}$.

1.2.5 修饰电极的制备

DDAB- Eu^{3+} -N-EoCen修饰电极制备:配制 Eu^{3+} 和N-EoCen混合溶液($[\text{Eu}^{3+}]:[\text{N-EoCen}]=3:1$),将EPG打磨清洗干净后,在电极表面滴加 $5\ \mu\text{L}$ 上述溶液,再滴加 $5\ \mu\text{L}$ DDAB溶液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱放置过夜晾干.

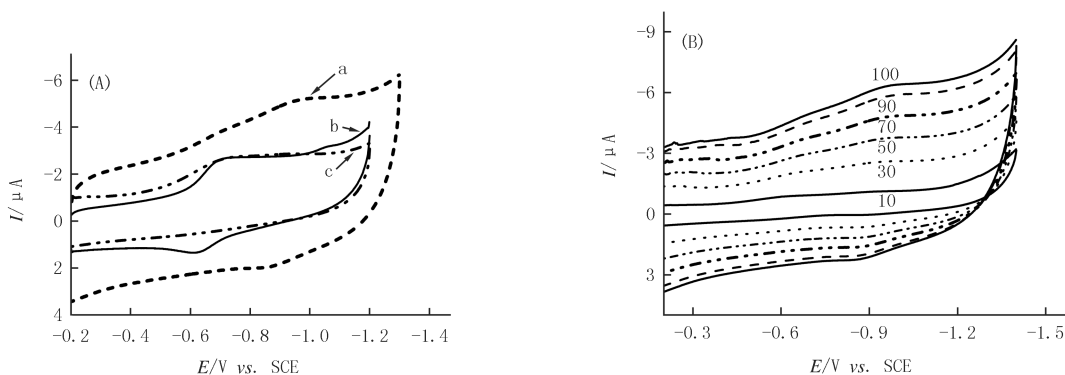
琼脂糖凝胶- Eu^{3+} -修饰电极制备:将0.1 g琼脂糖溶解在25 mL沸水中,待冷却后取此液体 $40\ \mu\text{L}$ 和 $10\ \mu\text{L}$ 二甲基甲酰胺(DMF)混合,取混合液 $30\ \mu\text{L}$ 加入 $30\ \mu\text{L}$ 的 Eu^{3+} 溶液将溶液充分混合后,取 $20\ \mu\text{L}$ 滴加到已经打磨清洗干净的EPG电极表面,放入 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱过夜干燥.

琼脂糖凝胶- Eu^{3+} -N-EoCen修饰电极制备:将0.1 g琼脂糖溶解在25 mL沸水中,待冷却后取此液体 $40\ \mu\text{L}$ 和 $10\ \mu\text{L}$ DMF混合,取此混合液 $30\ \mu\text{L}$ 加入 $30\ \mu\text{L}$ 的N-EoCen与 Eu^{3+} 混合溶液($[\text{Eu}^{3+}]:[\text{N-EoCen}]=1:1$),将溶液充分混合后,取 $20\ \mu\text{L}$ 滴加到打磨清洗干净的EPG电极表面,放入 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱过夜干燥.

2 结果和讨论

2.1 琼脂糖修饰电极

琼脂糖(agrose)是D-半乳糖和3,6位脱水的L-半乳糖连接构成的多链糖,在热水中呈黏稠无序状,冷却时聚糖链呈螺旋状并且聚集成空腔,在空腔中的大量水为蛋白质提供了适宜的微环境,因此,琼脂糖水凝胶是一种较好的蛋白质固定化材料,固定在此膜中的氧化还原蛋白与电极之间可以发生直接的电子传递^[14].在此,拟使用琼脂糖凝胶-Eu³⁺-N-EoCen修饰电极(制备方法见1.2.5节)对N-EoCen与Eu³⁺的配位性质进行研究.图1(A)中曲线a是在10 mmol·L⁻¹ Hepes缓冲溶液中(pH 7.4),琼脂糖凝胶-Eu³⁺-N-EoCen修饰电极(膜中[Eu³⁺]:[N-EoCen]=1:1)的CV曲线,曲线上有一对氧化还原峰,此峰的氧化还原电位分别位于-0.86 V(E_{pa} :氧化峰电位)和-0.97 V(E_{pc} :还原峰电位),式电位 $E^{0'}$ = -0.92 V.图1(A)中曲线b是Eu³⁺在10 mmol·L⁻¹ Hepes缓冲溶液(pH 7.4)中EPG电极上的CV曲线,在式电位为-0.68 V处有一对良好的氧化还原峰,此峰为Eu³⁺的氧化还原峰.图1(A)中曲线c是琼脂糖凝胶-Eu³⁺-修饰电极在10 mmol·L⁻¹ Hepes缓冲溶液(pH 7.4)中的CV曲线,曲线上有一个微弱的不可逆还原峰,峰电位(-0.73 V)与溶液中Eu³⁺在EPG电极上的还原峰电位相近(曲线b),推测其为Eu³⁺在琼脂糖膜中的还原峰.曲线a与c相比还原峰电位负向移动0.24 V,说明a曲线上的—对峰为配合物Eu³⁺-N-EoCen的氧化还原峰.

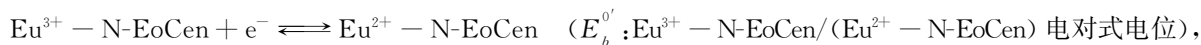


(A)图:(a)配合物Eu³⁺-N-EoCen在琼脂糖凝胶-Eu³⁺-N-EoCen修饰电极上的CV图;(b)溶液中Eu³⁺(6.36×10⁻⁶ mol·L⁻¹)在EPG电极上的CV图;(c)琼脂糖凝胶-Eu³⁺-修饰电极的CV图(膜中C_{Eu³⁺}=1.06×10⁻⁴ mol·L⁻¹)。 (B)图:不同扫描速度下的琼脂糖凝胶-Eu³⁺-N-EoCen修饰电极CV图。(膜中C_{Eu³⁺}=C_{N-EoCen}=1.06×10⁻⁴ mol·L⁻¹)。

图1 Eu³⁺和配合物Eu³⁺-N-EoCen的循环伏安图

Fig.1 The CV behavior of Eu³⁺ and Eu³⁺-N-EoCen

根据平衡式(1)^[15]:



(1)

能斯特方程与反应平衡常数的关系式 $E_b^{0'} - E_f^{0'} = 0.0591 \lg \left(\frac{K_{2+}}{K_{3+}} \right)$ 及式电位移动-0.24 V,可得 $K_{2+}/K_{3+} = 8.71 \times 10^{-5}$,说明在琼脂糖膜中配合物Eu³⁺-N-EoCen较Eu²⁺-N-EoCen稳定的多,Eu³⁺与N-EoCen的结合能力要强于Eu²⁺.正如文献中所报道,由于N-EoCen配位基团中含有许多羧酸根,易与Eu³⁺结合从而稳定了配合物Eu³⁺-N-EoCen^[16-17].琼脂糖凝胶-Eu³⁺-修饰电极与琼脂糖凝胶-Eu³⁺-N-EoCen修饰电极相比,峰电流较小且不可逆,这可能是膜中一部分Eu³⁺由于不被蛋白质结合固定而被电解池中的缓冲溶

液稀释,膜中 Eu^{3+} 浓度减小所致。

使用琼脂糖凝胶- Eu^{3+} -N-EoCen 修饰电极对配合物的氧化还原特性进行了进一步的研究。图 1(B)是在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES 缓冲溶液中,配合物 Eu^{3+} -N-EoCen 的循环伏安曲线随扫描速度变化的图。在 $10 \sim 500 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 扫描速度范围内配合物氧化还原电位随 $\ln \nu$ 呈线性变化(见图 2),可以得到线性方程: $E_{\text{pa}} = 0.0189 \ln \nu - 0.9497$ ($R = 0.99$), $E_{\text{pc}} = -0.0192 \ln \nu - 0.8935$ ($R = 0.98$), 式中 E_{pa} 为氧化峰电位(V), E_{pc} 为还原峰电位(V), ν 是扫描速度 ($\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$)。根据

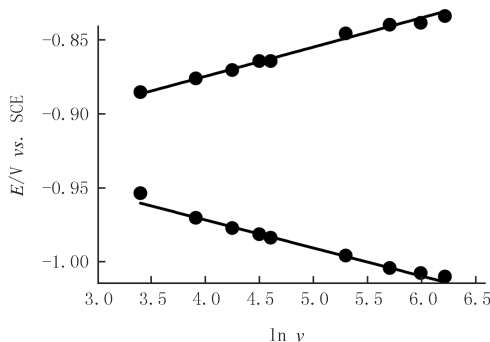


图2 由图1(B)图得到的氧化还原峰电位(E_p)随 $\ln \nu$ 变化的线性图
Fig.2 Plot of cathodic and anodic peak potential (E_p) versus $\ln \nu$ from Fig.1(B)

Laviron 的非扩散控制模型,由 $E_p = f(\ln \nu)$ 得出两条线性关系的斜率。由于 $0.3 < \alpha$ (电子转移系数) < 0.7 , 可以得出 n (电子转移数) = 2, $\alpha = 0.33$ 。根据 Laviron 公式^[18] $\lg K_s = \alpha \lg(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \lg \alpha - \lg \frac{RT}{nF\nu} -$

$\alpha(1 - \alpha) \frac{nF\Delta E_p}{2.3RT}$ (式中 R 为摩尔气体常数, T 为热力学温度, F 为法拉第常数, ΔE_p 为氧化还原峰电位差)。

进一步计算得出 $K_s = (4.85 \pm 0.21) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 。

2.2 DDAB 修饰电极

DDAB 是一种阳离子表面活性剂,当其借助吸附、涂布、共价键合等方法引入电极表面,可形成有序排列的双分子层结构,这种结构与生物膜的双层结构类似,因而被称为模拟生物膜。将某些蛋白固定于 DDAB 修饰的热解石墨电极上,会发现其电子传递速率显著加快^[19]。在此,为了得到较好的 Eu^{3+} 与 N-EoCen 配合物的氧化还原峰,拟利用 DDAB 膜良好的生物相容性,将配合物置于 DDAB 膜中,测定其电化学性质。图 3(A)是将 $[\text{Eu}^{3+}] : [\text{N-EoCen}] = 3 : 1$ 溶液置于 DDAB 膜中,在 DDAB- Eu^{3+} -N-EoCen 修饰电极(制备过程见 1.2.5 节)上的 CV 图,图 3(A)中隐约出现两个还原峰,但是峰电流极小。为了清楚显示这两个峰,测定了示差脉冲伏安(DPV)曲线,如图 3(B)中曲线 a 上清楚显示有两个还原峰,分别位于 -0.65 V 和 -0.87 V ,与裸电极上 Eu^{3+} 的 DPV 曲线相比(见图 3(B)曲线 b), a, b 曲线都具有的位于 -0.65 V 的峰显然为 Eu^{3+} 的峰,由此推测位于 -0.87 V 的峰是配合物的峰。由于光谱研究显示稀土离子与 N-EoCen 以 $2 : 1$ 配位^[5],因此当膜中 $[\text{Eu}^{3+}] : [\text{N-EoCen}] = 3 : 1$ 时,出现了配合物 Eu_2^{3+} -N-EoCen 峰电流的同时也呈现出未配位的游离 Eu^{3+} 还原峰电流。这一电化学测定结果充分证明 Eu^{3+} 与 N-EoCen 的确是以 $2 : 1$ 配位的。

与琼脂糖修饰电极相比,DDAB 修饰电极上配合物 Eu^{3+} -N-EoCen 的电化学响应可逆性更差。这可能源于两个原因,一是 DDAB 对中心蛋白二级结构的影响要强于琼脂糖,使中心蛋白构象变化,疏水性增强,不利于接近亲水的 EPG 电极表面所致;二是结合了两个金属离子的中心蛋白比结合了一个金属离子的中心蛋白聚集性增强^[8],从而不利于与电极表面的直接电子传递。实验结果显示,在研究 Eu^{3+} 与中心蛋白相互作用的修饰电极选择中,琼脂糖修饰电极更具优越性,其与中心蛋白的生物相容性较好,表现出较可逆的配合物与电极之间的电子传递。相比之下,DDAB 膜中配合物的氧化还原行为不可逆,说明修饰电极中的 DDAB 可能会干扰 Eu^{3+} 与中心蛋白相互作用。

2.3 Eu^{3+} 与 N-EoCen 及 C-EoCen 结合常数 β 和结合数 n

对于 Eu^{3+} -N-EoCen 的复合物,可根据文献[20-21]算出两者之间的结合比和结合常数,假定 Eu^{3+} 与 N-EoCen 只形成一种简单的复合物 $n\text{Eu}^{3+}$ -N-EoCen,则结合反应如下:



$$\beta = [n\text{Eu}^{3+} - \text{N-EoCen}] / [\text{N-EoCen}][\text{Eu}^{3+}]^n, \quad (3)$$

式中 β 为结合常数。

$$\text{由} \quad \Delta I_{p,\max} = BC_{N-\text{EoCen}}, \quad (4)$$

$$\Delta I_p = B[n\text{Eu}^{3+} - N-\text{EoCen}], \quad (5)$$

$$[N-\text{EoCen}] = C_{N-\text{EoCen}} - [n\text{Eu}^{3+} - N-\text{EoCen}], \quad (6)$$

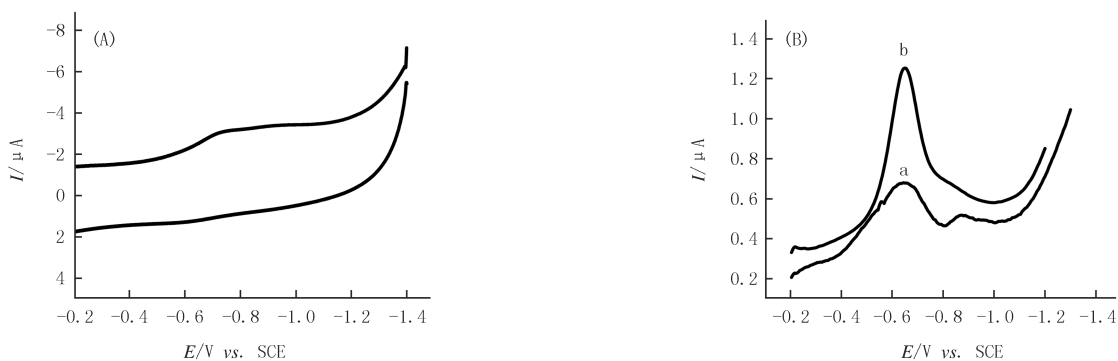
可推导出:

$$\Delta I_{p,\max} - \Delta I_p = B(C_{N-\text{EoCen}} - [n\text{Eu}^{3+} - N-\text{EoCen}]) = B[N-\text{EoCen}]. \quad (7)$$

将(3)式和(5)式代入(7)式可得:

$$\lg[\Delta I_p / (\Delta I_{p,\max} - \Delta I_p)] = \lg \beta + n \lg[\text{Eu}^{3+}], \quad (8)$$

式中 B 为与实验仪器相关的比例常数, ΔI_p 是加入 $N-\text{EoCen}$ 前后的峰电流之差, $\Delta I_{p,\max}$ 为加入 $N-\text{EoCen}$ 前后氧化峰电流差值的最大值, $C_{N-\text{EoCen}}$, $[N-\text{EoCen}]$ 和 $[n\text{Eu}^{3+} - N-\text{EoCen}]$ 则分别指的是蛋白质的总浓度、游离浓度和结合蛋白浓度。



(A): 配合物 $\text{Eu}_2^{3+}-N-\text{EoCen}$ 在 $\text{DDAB}-\text{Eu}^{3+}-N-\text{EoCen}$ 电极上的 CV 曲线。(B): (a) 配合物 $\text{Eu}_2^{3+}-N-\text{EoCen}$ 在 $\text{DDAB}-\text{Eu}^{3+}-N-\text{EoCen}$ 电极上的 DPV 图; (b) Eu^{3+} 在 DDAB 修饰的 EPG 电极上的 DPV 图。

图3 DDAB- $\text{Eu}^{3+}-N-\text{EoCen}$ 修饰电极上配合物 ($\text{Eu}_2^{3+}-N-\text{EoCen}$) 电化学行为 ($[\text{Eu}^{3+}]:[N-\text{EoCen}]=3:1$)

Fig.3 The electrochemical behavior of $\text{Eu}_2^{3+}-N-\text{EoCen}$ at $\text{DDAB}-\text{Eu}^{3+}-N-\text{EoCen}$ ($[\text{Eu}^{3+}]:[N-\text{EoCen}]=3:1$) electrode

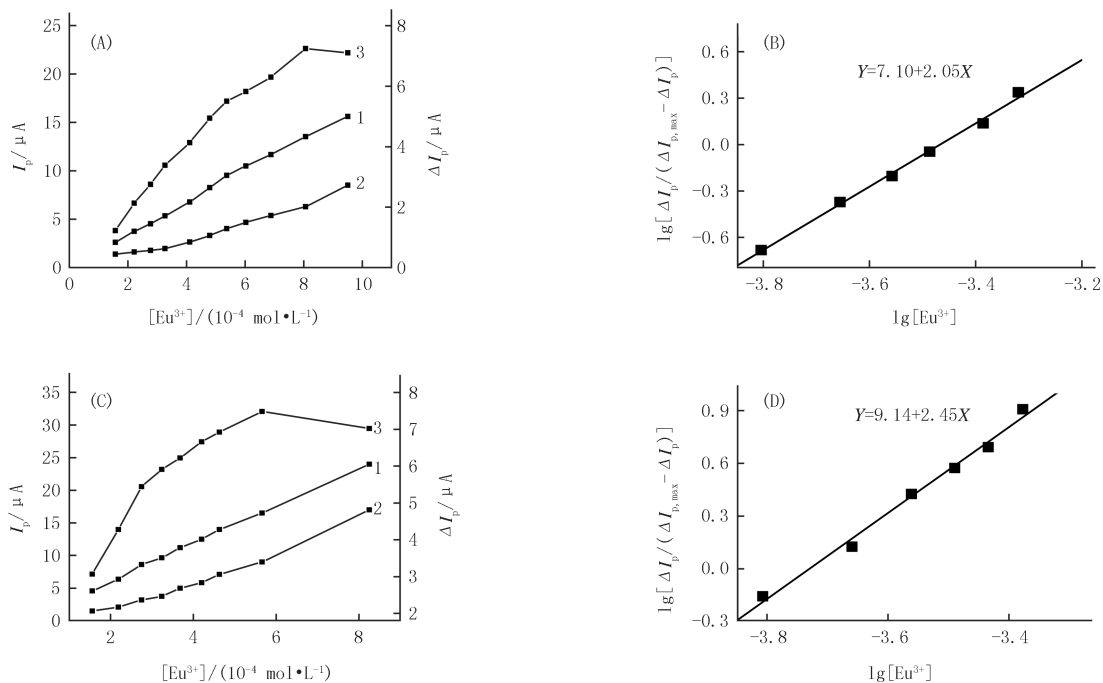
氧化峰电流 I_p 与 Eu^{3+} 浓度及 ΔI_p 与 Eu^{3+} 浓度的关系见图 4(A)。图 4(A) 中曲线 1 为未加入 $N-\text{EoCen}$ 时 $\text{Eu}^{3+}/\text{Eu}^{2+}$ 的氧化峰电流 I_p 随 Eu^{3+} 浓度变化的关系曲线, 曲线 2 为加入 $2.08 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $N-\text{EoCen}$ 反应后, I_p 随 Eu^{3+} 浓度变化的关系曲线, 曲线 3 为曲线 1 和曲线 2 的氧化峰电流差值 $\Delta I_p (=I_{p,1} - I_{p,2})$ 随 Eu^{3+} 浓度变化的关系曲线。

根据(8)式, 若 Eu^{3+} 与 $N-\text{EoCen}$ 只形成一种简单的复合物, 则 $\lg[\Delta I_p / (\Delta I_{p,\max} - \Delta I_p)] \sim \lg[\text{Eu}^{3+}]$ 关系曲线应为一一直线, 可从直线的斜率和截距分别求得结合数 n 和结合常数 β , 在曲线上读取多点 ΔI_p , 再从曲线 1、2 上找出各个点相应的 Eu^{3+} 的平衡浓度, 计算 $\lg[\Delta I_p / (\Delta I_{p,\max} - \Delta I_p)]$ 和 $\lg[\text{Eu}^{3+}]$ (见图 4(B)) 由斜率求得结合数 $n = 2.05 \approx 2$, 由截距求得结合常数 $\beta = 1.26 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明 $N-\text{EoCen}$ 与 Eu^{3+} 形成 1:2 型分子复合物。用相同的方法研究 C 端中心蛋白 ($C-\text{EoCen}$) 与 Eu^{3+} 的相互作用 (见图 4(C) 和图 4(D)) 可以得出线性方程 $\lg[\Delta I_p / (\Delta I_{p,\max} - \Delta I_p)] = 9.14 + 2.45 \lg[\text{Eu}^{3+}]$, 则可知 $n = 2.45 \approx 2$, 结合常数 $\beta = 1.38 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明 $C-\text{EoCen}$ 与 Eu^{3+} 形成 1:2 型分子复合物。 $C-\text{EoCen}$ 与 Eu^{3+} 的结合能力是 $N-\text{EoCen}$ 的近 100 倍, 这一结果与使用光谱方法得出的结论一致^[5,22]。

3 结论

本研究在 EPG 以及各类修饰电极上研究了 $N-\text{EoCen}$ 与 Eu^{3+} 相互作用, 结果显示琼脂糖凝胶- $\text{Eu}^{3+}-N-\text{EoCen}$ 修饰电极上有配合物 $\text{Eu}^{3+}-N-\text{EoCen}$ 的一对氧化还原峰, 其还原电位与膜中 Eu^{3+} 的还原电位相比, 负向移动 0.24 V, 说明配合物 $\text{Eu}^{3+}-N-\text{EoCen}$ 较 $\text{Eu}^{2+}-N-\text{EoCen}$ 稳定。依据配合物氧化还原电位随 $\ln \nu$ 线性变化, 计算得出电子转移数 $n = 2$, 电子转移系数 $\alpha = 0.33$, 电子转移速率常数 $K_s = (4.85 \pm 0.21) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 。DDAB- $\text{Eu}^{3+}-N-\text{EoCen}$ 修饰电极上, 配合物 $\text{Eu}_2^{3+}-N-\text{EoCen}$ 的峰电流较小且不可逆, 由 DPV 显示同时存在 Eu^{3+} 和配合物的峰, 证明 $N-\text{EoCen}$ 只有两个 Eu^{3+} 结合位点。进一步对 Eu^{3+} 与 $N-\text{EoCen}$ 及 $C-$

Eu³⁺结合常数 β 和结合数 n 的计算显示, N-EoCen 与 Eu³⁺ 形成 1 : 2 型分子复合物, 结合常数 $\beta = 1.26 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. C-EoCen 与 Eu³⁺ 亦形成 1 : 2 型分子复合物, 结合常数 $\beta = 1.38 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, Eu³⁺ 与 C-EoCen 的结合能力是 N-EoCen 的近 100 倍, 这一结果与光谱法测定结果相似. 本研究证明了不同种类的类生物膜对配合物中金属离子电化学响应有影响, 膜中配合物与电极有直接的电子传递, 为进一步研究配合物与各类靶肽的结合能力提供了条件, 同时本文也进一步证明了稀土离子可以竞争中心蛋白上四个钙离子结合位点且 C 端蛋白结合能力较强, 这些结果为揭示中心蛋白 C 端和 N 端不同生物功能的分子基础提供了新的证据.



(A) 图: 1. 未加入 N-EoCen 时 $\text{Eu}^{3+}/\text{Eu}^{2+}$ 的氧化峰电流 I_p 随 Eu^{3+} 浓度变化的曲线; 2. 加入 N-EoCen ($2.08 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 后 I_p 随 Eu^{3+} 浓度变化的曲线; 3. $\Delta I_p (= \Delta I_{p,1} - \Delta I_{p,2})$ 随 Eu^{3+} 浓度变化的曲线. (B) 图: 依据图 (A), $\lg[\Delta I_p / (\Delta I_{p,\max} - \Delta I_p)]$ 与 $\lg[\text{Eu}^{3+}]$ 关系曲线. (C) 图: 1. 未加入 C-EoCen 时 $\text{Eu}^{3+}/\text{Eu}^{2+}$ 的氧化峰电流 I_p 随 Eu^{3+} 浓度变化的曲线; 2. 加入 C-EoCen ($1.20 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 后 I_p 随 Eu^{3+} 浓度变化的曲线; 3. $\Delta I_p (= I_{p,1} - I_{p,2})$ 随 Eu^{3+} 浓度变化的曲线. (D) 图: 依据图 (C), $\lg[\Delta I_p / (\Delta I_{p,\max} - \Delta I_p)]$ 与 $\lg[\text{Eu}^{3+}]$ 关系曲线.

图 4 $\text{Eu}^{3+}/\text{Eu}^{2+}$ 的氧化峰电流 I_p 和加入中心蛋白前后峰电流差 ΔI_p 与 Eu^{3+} 浓度的关系图

Fig. 4 Relationship between oxidation peak current I_p of $\text{Eu}^{3+}/\text{Eu}^{2+}$ and $[\text{Eu}^{3+}]$, the peak current difference before and after adding centrin ΔI_p and $[\text{Eu}^{3+}]$

参 考 文 献

- [1] SCHIEBEL E, BORNEN M. In search of function for centrin[J]. Trends Cell Biol, 1995, 5: 197-201.
- [2] ZHAO Y Q, GUO X J, YANG B S. Regulation of centrin self-assembly investigated by fluorescence resonance light scattering[J]. RSC Adv, 2017, 7(17): 10206-10214.
- [3] BHATTACHARYA D, STEINKÖTTER J, MELKONIAN M. Molecular cloning and evolutionary analysis of the calcium-modulated contractile protein, centrin, in green algae and landplants[J]. Plant Mol Biol, 1993, 23: 1243-1254.
- [4] ZHANG W L, SHI E X, FENG Y N, et al. Endonuclease-like activity of the N-terminal domain of euplotes octocarinatus centrin[J]. RSC Adv, 2017, 7(82): 51773-51788.
- [5] 叶旭文, 张文龙, 王志军, 等. 三氟拉嗪与八肋游仆虫中心蛋 N 端半分子的结合及对蛋白功能的影响[J]. 高等学校化学学报, 2019, 40(11): 2257-2264.
- [6] YE X W, ZHANG W L, WANG Z J, et al. Binding of trifluoperazine to N-terminal domain of euplotes octocarinatus centrin and the influence on its function[J]. Chem J Chinese U, 2019, 40(11): 2257-2264.
- [7] LIU W, DUAN L, SUN T, et al. Role of four conserved aspartic acid residues of EF-loops in the metal ion binding and in the self-assembly of ciliate Euplotes octocarinatus centrin[J]. BioMetals, 2016, 29(6): 1047-1058.
- [8] ZHAO Y Q, DIAO X L, YAN J, et al. Analysis of Tb^{3+} - and melittin-binding with the C-terminal domain of centrin in Euplotes octocarinatus[J]. J Lumin, 2012, 132(4): 924-930.

- [8] 石恩娟,张敏,李婷婷,等.盐酸胍诱导八肋游仆虫中心蛋白与 XPC 肽复合物的解折叠[J].分子科学学报,2019,3:37-42.
SHI E X,ZHANG M,LI T T,et al.Unfolding of Euplotes octocarinatus centrin-xeroderma pigmentosum group C protein(XPC) peptide complex induced by guanidine hydrochloride[J].J Mol Sci,2019,3:37-42.
- [9] RONG Z J,ZHAO Y Q,SHI E X,et al.Comparative electrochemical study of N-,C-terminal and integral centrin on adsorption and metal-binding properties[J].Electroanal,2017,29:1232-1242.
- [10] RONG Z J,MA L,LIU B,et al.Electrochemistry of Eu(III)binding to N-terminal of Euplotes octocarinatus centrin[J].Electrochemistry,2014,82:663-669.
- [11] RONG Z J,TIAN Y N,YANG B S.A comparative study on binding ability of three lanthanide ions with centrin using impedance method [J].RSC Adv,2014,4:43262-43269.
- [12] HE X J,FENG J Y,WANG W,et al.High level expression of a Euplotes centrin in Eschericia coli and preparation of its polyclonal antibody[J].Acta Zool Sin,2004,50:447-451.
- [13] PACE C N,VAJDOS F,FEE L,et al.How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein[J].Protein Sci,1995,4:2411-2423.
- [14] GUO Z Y,ZHANG H N,GAO P P,et al.Direct electrochemistry of cytochrome *c* entrapped in agarose hydrogel by protein film voltammetry[J].Russ J ElectroChem,2011,47:175-180.
- [15] JEUKEN L J C,ARMSTRONG F A.Electrochemical origin of hysteresis in the electron-transfer reactions of adsorbed proteins;contrasting behavior of the 'Blue' copper protein,azurin,adsorbed on pyrolytic graphite and modified gold electrodes[J].J Phys Chem B,2001,105:5271-5282.
- [16] CATES M S,TEODOROM L,PHILLIPS G N.Molecular mechanisms of calcium and magnesium binding to parvalbumin[J].Biophys J,2002,82:1133-1146.
- [17] ZHAO Y Q,YAN J,SONG L,et al.The interaction between lanthanide(III)and N-terminal domain of Euplotes octocarinatus centrin[J].Spectrochim Acta A,2012,87:163-170.
- [18] LAVIRON E.General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems[J].Electroanal Chem,1979,101:19-28.
- [19] SUPRUN E V,ARDUINI F,MOSCONI D,et al.Direct electrochemistry of heme proteins on electrodes modified with didodecyldimethyl ammonium bromide and carbon black[J].Electroanal,2012,24(10):1923-1931.
- [20] 李南强,闵静.抗-胭脂红酸非电活性络合物的极谱研究[J].分析化学,1989,17:346-348.
LI N Q,MIN J.Polarographic study on the non-electroactive complex of scandium-carminic acid[J].Chinese J Anal Chem,1989,17:346-348.
- [21] HUI N,NIU X L,HAN J Y,et al.Voltammetric investigation on interaction of protein with chromotrope 2R and its analytical application [J].Amino Acids,2010,38(3):711-719.
- [22] ZHAO Y Q,YAN J,SONG L,et al.Analysis of Lanthanide-Induced Conformational Change of the C-Terminal Domain on Centrin[J].J Fluoresc,2012,22(1):485-494.

The studies on the metal binding characteristic of centrin based on Didodecyldimethylammonium bromide and agarose modified electrode

Rong Zhijiang¹, Sun Hongyan¹, Yang Yan¹, Zhou Huanxin¹, Yang Binsheng²

(1. School of Chemical and Biological Engineering, Taiyuan University of Science and Technology, Taiyuan 030024, China;

2. Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The interaction between N-terminal ciliate Euplotes octocarinatus centrin(N-EoCen), C-terminal EoCen(C-EoCen)and Eu^{3+} was investigated by cyclic voltammetry and pulse voltammetry using a Didodecyldimethylammonium bromide (DDAB)and agarose modified pyrolytic graphite electrode. It was found that a pair of REDOX(oxidation-reduction) peaks of the complex $\text{Eu}^{3+} - \text{N-EoCen}$ appeared on the agarose modified electrode, which moved in a negative of 0.24 V compared with the presence of Eu^{3+} alone. However, a weak irreversible reduction peak of the complex $\text{Eu}^{3+} - \text{N-EoCen}$ appeared on the DDAB modified electrode. The binding constant β of Eu^{3+} to N-EoCen(C-EoCen)and the binding number n could be obtained. From the intercept and slope the $n=2$ and $\beta=1.26 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ are deduced for N-EoCen, which indicated that a stable 2 : 1 complex of $\text{Eu}^{3+} - \text{N-EoCen}$ was formed. The binding ratio between C-EoCen and Eu^{3+} is 1 : 2, and the binding constant $\beta=1.38 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Keywords: centrin; cyclic voltammetry; DDAB; agarose

[责任编辑 赵晓华 陈留院]