

UN NOUVEAU COLORANT FLUORESCENT POUR LA MESURE DU TEMPS DE RELAXATION BROWNIENNE DES PROTEINES

F. RODIER, M. HILL, B. ARRIO et C. PARQUET

Laboratoire de Biologie Physico-Chimique, Faculté des Sciences, Orsay 91, France

Received 5 October 1970

Several authors have described the NBD-chloride (7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole) as a fluorogenic reagent of the amino groups and the sulfhydryl groups. It reacts rapidly with the trypsin to produce a stable and highly fluorescent conjugate. The determination of the labelled residues was made with thin layer chromatographies; the lysin residues were preferentially labelled.

Fluorescence depolarization measurements of the conjugate were used to determine the brownian relaxation of the enzyme. The temperature dependance of the life-time is very strong and the corrected Perrin's plot demonstrates that the relaxation time of the enzyme decreases rapidly with the temperature.

The conclusion is that the NBD-chloride can be used, like the DNS-chloride but is more reactive and stable, and its fixation, on trypsin can be followed by measuring the absorbance of the dye at 470 nm.

1. Introduction

Le NBD* ou le chlorure de NBD a été décrit dans la littérature comme réactif des groupes amine [1] et des groupes sulfhydryle [2] pour donner des composés fortement fluorescents et stables.

Afin de le tester comme indicateur fluorescent de temps de relaxation brownienne [3], nous l'avons fixé sur la trypsine (EC 3.4.4.4) dans les conditions classiques utilisées pour les marqueurs du type chlorure de dansyl [4, 5].

2. Matériaux et méthodes

Le colorant a été synthétisé au laboratoire [6, 7]. Nous avons utilisé de la trypsine Novo lyophilisée.

La fixation se fait à pH 8 en présence d'un inhibiteur de la trypsine, la butylamine, pour éviter l'auto-

lyse, le colorant étant ajouté en solution alcoolique. Le mélange incube pendant 18 h à 4° sous agitation et est chromatographié sur colonne de Sephadex G-25, pour séparer le colorant hydrolysé qui n'a pas réagi. La protéine dénaturée est éliminée par précipitation au chlorure de sodium molaire. Le conjugué est ensuite dialysé contre HCl 10^{-2} N. L'activité de l'enzyme a été mesurée dans les conditions classiques par le jet de NPGb [8]. L'enzyme est actif à 100%.

Les mesures du taux de polarisation ont été effectuées sur l'appareil construit par les auteurs au laboratoire [9]. Nous avons mesuré les durées de vie avec un TRW Nanosecond Fluorimeter.

3. Résultats

Le conjugué ainsi préparé, T-NBD, est fortement fluorescent. Son spectre de fluorescence possède un maximum vers 530 nm, c'est-à-dire dans la même région que les spectres des conjugués trypsine-DNS et trypsine-FITC [9]. Le spectre d'absorption, outre la bande caractéristique de la protéine à 280 nm, présente une bande centrée à 465 nm avec un épaulement à 480 nm et une bande dont le maximum se situe vers 345 nm, cette dernière existant déjà dans le

* Abréviations:

NBD: 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole;

NPGb: paranitrophényl guanidinobenzoate;

FITC: fluorescein isothiocyanate;

T-NBD: conjugate trypsin-NBD;

NBD-OH: 7-hydroxyl-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole.

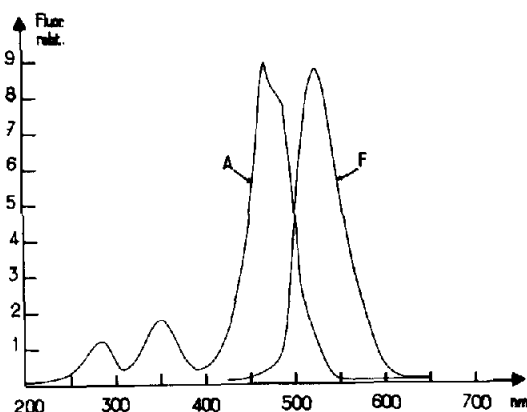


Fig. 1. A) Spectre d'excitation du conjugué T-NBD à pH 2 pour une émission à 530 nm (unités relatives). F) Spectre d'émission du conjugué T-NBD à pH 2 pour une excitation à 470 nm (unités relatives). Ces spectres sont non corrigés et ont été faits sur un fluorimètre Aminco Bowman.

spectre d'absorption du NBD. Le spectre d'action du colorant fixé comporte en plus du spectre normal du colorant hydrolysé, le NBD-OH, un pic d'excitation à 285 nm (fig. 1).

Nous avons cherché quels amino-acides pouvaient donner une liaison covalente avec le colorant. Pour cela on fait une hydrolyse acide du conjugué. L'hydrolysate est chromatographié sur couche mince de silica gel et les taches obtenues sont identifiées par comparaison avec des amino-acides conjugués [10, 11]. Nous obtenons 2 taches principales identifiées comme étant la eNBD lysine et le NBD-OH, libéré lors du traitement à l'acide chlorhydrique.

Cette fixation du colorant sur une ou plusieurs lysines est obtenu pour des "taux de marquage statistique faibles", c'est-à-dire quand les quantités de colorant et d'enzyme réagissent en proportions stoechiométriques.

Pour déterminer les variations de temps de relaxation du conjugué avec la température, nous avons mesuré le taux de polarisation de fluorescence entre 0° et 30°.

Au cours de ces "analyses thermiques", nous avons observé une diminution importante de l'intensité de fluorescence en fonction de la température, ce qui n'est pas le cas pour les conjugués trypsine-DNS et trypsine-FITC [9]. Pour trancher entre les deux hypo-

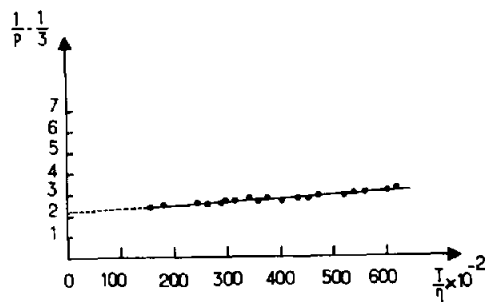


Fig. 2. Représentation classique de Perrin pour le conjugué T-NBD à pH 2, concentration 0,2 mg/ml, force ionique 0,1. Excitation 406 nm, émission 530 nm.

thèses possibles, à savoir extinction statique ou extinction dynamique, nous avons mesuré directement la durée de vie de fluorescence du conjugué à différentes températures entre 0° et 30°. Les résultats semblent en faveur d'une extinction dynamique, tout au moins dans la zone de température étudiée. En admettant que la durée de vie dépend de la température selon une loi exponentielle [12], nous avons pu calculer la durée de vie naturelle du colorant fixé. Cette durée de vie est de l'ordre de 30 nsec, alors que vers 20° elle tombe jusqu'à 3,6 nsec.

Pour analyser les résultats obtenus, nous avons essayé deux représentations: la première est celle de Perrin, à savoir $1/p - 1/3 = f(T/\eta)$ et la deuxième, où l'on a tenu compte de la variation de la durée de vie avec la température $1/p - 1/3 = f(T\tau/\eta)$.

La première représentation est une droite parfaite qui, par extrapolation donne une valeur de polarisation fondamentale égale à 0,40 (fig. 2).

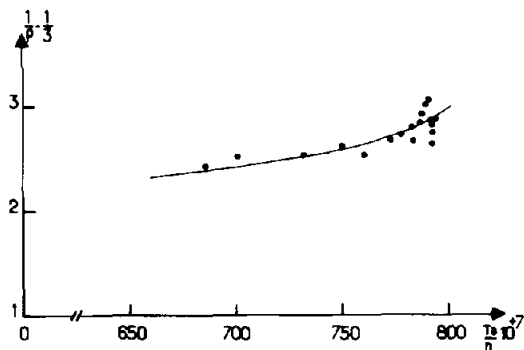


Fig. 3. Représentation modifiée de Perrin. Mêmes conditions expérimentales que la figure 2.

La deuxième représentation est une courbe convexe vers l'axe des abscisses pour les fortes valeurs de $T\tau/\eta$ (fig. 3).

Pour vérifier que la diminution de taux de polarisation n'était pas due à la libération du colorant sous l'influence de la température, nous avons chromatographié sur Sephadex une solution de conjugué incubée à 50° pendant 10 min à pH 2. Nous n'avons pas décelé de colorant hydrolysé.

4. Discussion

Le NBD se fixe sur un ou plusieurs résidus "lysyl" de la trypsine par une liaison covalente très stable. L'analyse des spectres d'absorption et d'excitation du conjugué laisse supposer qu'une de ces lysines au moins est à proximité d'un résidu aromatique de la trypsine pour permettre un transfert d'excitation. Pour interpréter les résultats des analyses thermiques nous avons supposé une répartition statistique des molécules de colorant sur la molécule d'enzyme. La linéarité obtenue par la première représentation est surprenante quand on considère la variation non négligeable de durée de vie. Elle s'interprète en admettant que la diminution de durée de vie du colorant est compensée par la diminution du temps de relaxation du conjugué. En tenant compte de la variation de durée de vie dans la deuxième représentation, nous avons fait apparaître de la diminution de temps de relaxation qui se traduit sur la figure 3 par une convexité de la courbe par rapport à l'axe des abscisses. En tout cas la diminution du taux de polarisation obtenue par augmentation de température ne peut absolument pas être attribuée à

la libération de NBD-OH dans la solution. Ce colorant a l'avantage sur les autres marqueurs fluorescents de posséder un spectre caractéristique lorsqu'il est lié à un résidu amine ou sulfhydryle [2]. On peut alors suivre la cinétique de fixation sur les protéines par mesure de l'absorbance à 470 nm. La recherche des inhibiteurs de fluorescence spécifiques du NBD est actuellement entreprise afin d'utiliser la technique d'extinction dynamique de fluorescence pour déceler des changements de conformation de la trypsine, méthode d'étude déjà utilisée dans le cas du FITC [13].

Références

- [1] P.B.Ghosh et M.W.Whitehouse, *Biochem. J.* 108 (1968) 155.
- [2] D.J.Birkett, N.C.Price, G.K.Radda et A.G.Salmon, *FEBS Letters* 6 (1970) 346.
- [3] R.F.Steiner et A.J.Mc Alister, *J. Polymer Sci.* 24 (1957) 105.
- [4] R.F.Chen, *Arch. Biochem. Biophys.* 120 (1967) 609.
- [5] G.Weber, *Biochem. J.* 51 (1952) 155.
- [6] A.J.Boulton, P.B.Ghosh et Katritzky, *J. Chem. Soc. B* (1966) 1004.
- [7] A.J.Boulton, P.B.Ghosh et Katritzky, *Tetrahedron Letters* 2 (1966) 2887.
- [8] T.Chase Jr. et E.Shaw, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29 (1967) 508.
- [9] B.Arrio et F.Rodier, à paraître.
- [10] D.Morse et B.L.Horecker, *Anal. Biochem.* 14 (1966) 429.
- [11] D.T.N.Pillay et R.Mehdi, *J. Chromatogr.* 47 (1970) 119.
- [12] J.A.Gally et G.M.Edelman, *Biopolymers* 1 (1964) 367.
- [13] B.Arrio, F.Rodier, C.Parquet et C.Vernotte, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39 (1970) 589.