

# 用荧光相图法研究胃蛋白酶的去折叠过程

刘 莉<sup>1</sup>,董发昕<sup>2a</sup>,胥耀平<sup>1</sup>,边六交<sup>2b</sup>

(1 西北农林科技大学 林学院,陕西 杨凌 712100;

2 西北大学 a 化学系,b 生命科学院 基因工程药物研究开发中心,陕西 西安 710069)

**[摘 要]** 蛋白质折叠机理的研究是基因重组蛋白质高效生产的前提条件,对于工业化生产重组蛋白以及治疗与蛋白集聚密切相关的疾病都有重要意义。为了探索一个统一的蛋白质折叠机理,用荧光相图法分别对脲和盐酸胍诱导的胃蛋白酶的去折叠过程进行了研究。结果表明,无论变性体系中有无还原剂 2-巯基乙醇存在,当脲浓度为 0~8.0 mol/L 时,脲诱导胃蛋白酶的变性过程都符合“二态模型”;而无论变性体系中有无还原剂 2-巯基乙醇存在,当盐酸胍浓度为 0~6.0 mol/L 时,该蛋白的变性过程均符合“三态模型”。

**[关键词]** 胃蛋白酶;去折叠;折叠中间态;荧光相图法

**[中图分类号]** Q518.4

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)11-0187-04

## Unfolding of pepsin induced by urea or guanidine hydrochloride with fluorescence phase diagram

LIU Li<sup>1</sup>,DONG Fa-xin<sup>2a</sup>,XU Yao-ping<sup>1</sup>,BIAN Liu-jiao<sup>2b</sup>

(1 College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 a Department of Chemistry, b Center of Gene-engineering, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

**Abstract:** The research of the mechanism of the protein folding is the precondition of highly efficient production of genetic recombinant proteins, which has important significance to the industrial production of recombinant protein and treatment of those diseases closely related to the protein aggregation. To explore a unified mechanism of protein folding, the unfolding of pepsin induced by urea or guanidine hydrochloride has been studied by “phase diagram” method of fluorescence. The experimental results show that whether 2-mercaptoethanol exists in the denaturant solution or not, when urea concentrations are changed under the range of 0 to 8.0 mol/L, the unfolding procedures of pepsin obey a typical “two-state model”; while whether the 2-mercaptoethanol exists in the denaturant solution or not, when guanidine hydrochloride concentrations are changed under the range of 0 to 6.0 mol/L, the unfolding of pepsin obey a typical “three-state model”.

**Key words:** pepsin; protein unfolding; intermediates; phase diagram method of fluorescence

蛋白质的变性过程实际上是一个序变过程,在其变性过程中蛋白质有 3 种存在状态:天然态、中间态和去折叠态。若在变性过程中,蛋白质从天然态

直接转变为去折叠态,则符合“二态模型”;若在变性过程中,蛋白质从天然态转变为部分折叠中间态,并最终转变为去折叠态,则符合“三态模型”。新生的

1 收稿日期] 2006-09-28

[作者简介] 刘 莉(1977-),女,陕西泾阳人,在读硕士,主要从事蛋白质研究。

[通讯作者] 边六交(1965-),男,陕西兴平人,副教授,博士生导师,主要从事蛋白质研究。

多肽链经过一系列折叠才能形成具有特定三级结构及生物学功能的天然构象。蛋白质三级结构的信息与多肽链的物理化学性质有关,与单个氨基酸残基的结构特征关系并不紧密<sup>[1]</sup>。蛋白质的变性并非总是伴随着完全去折叠,在蛋白去折叠过程中存在着不同的部分折叠中间态,这些部分折叠中间态在蛋白质的自组织、功能和错误折叠中扮演一个重要角色<sup>[1]</sup>。变性状(即去折叠态)是蛋白质独特的三级结构瓦解而丧失相应生物学功能的一种存在形式,蛋白质的变性作用若不过于剧烈,其变性过程则是一种可逆过程<sup>[1]</sup>。蛋白质在体外的变性和复性过程是解释蛋白质自组织的一个基本步骤,作为从分子水平上阐明生命奥秘的中心课题之一,蛋白质的变性和复性机理研究一直是生物界的热点问题之一。因此,对蛋白质去折叠过程的研究一直受到生物化学、生物物理学和结构生物学领域科研工作者的关注<sup>[2]</sup>。

胃蛋白酶是由 326(7) 个氨基酸残基组成的单肽链单体酶,含有 2 个构象相似的结构域、2 个活性位点(asp32 和 asp215)和 3 对二硫键,分子量约为 34.5 ku。在胃蛋白酶分子内含有 6 个半胱氨酸残基、5 个色氨酸残基、16 个酪氨酸残基和 14 个苯丙氨酸残基,最适 pH 在 2 左右<sup>[3-5]</sup>。因为它与 HIV 蛋白酶同属于天冬氨酸蛋白酶家族,近年来又重新成为研究热点<sup>[1]</sup>。本文用荧光相图法对脲和盐酸胍诱导的胃蛋白酶变性过程进行了研究,以期直观地获得胃蛋白酶在变性过程中结构变化的信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

猪胃蛋白酶(比活为 1 3 000)为 BBI 公司产品,脲(纯度 > 99%)、盐酸胍(纯度 > 99%)和 2-巯基乙醇(纯度 > 99%)为 Amresco 公司产品,其余试剂均为国产分析纯。试验中所用的水均为去离子蒸馏水,缓冲液为柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 2.6)。

### 1.2 试验方法

利用荧光相图法检测在脲和盐酸胍作用下胃蛋白酶的变性过程。荧光相图法是基于在不同发射波长  $\lambda_1$  和  $\lambda_2$  下,蛋白质结构发生变化(去折叠/折叠)时所测得的相应荧光强度  $I(\lambda_1)$  和  $I(\lambda_2)$  而进行测量的<sup>[1-2]</sup>。由于荧光强度是一种广度性质的变量,因此这两个变量间存在以下简单关系:

$$I(\lambda_1) = a + bI(\lambda_2) \quad (1)$$

其中

$$a = I_1(\lambda_1) - \frac{I_2(\lambda_1) - I_1(\lambda_1)}{I_2(\lambda_2) - I_1(\lambda_2)} I_1(\lambda_2),$$

$$b = \frac{I_2(\lambda_1) - I_1(\lambda_1)}{I_2(\lambda_2) - I_1(\lambda_2)} \quad (2)$$

式中:  $I_1(\lambda_1)$  和  $I_2(\lambda_1)$  分别表示发射波长为  $\lambda_1$  条件下,蛋白质结构发生变化时始态和终态的荧光强度;  $I_1(\lambda_2)$  和  $I_2(\lambda_2)$  分别表示发射波长为  $\lambda_2$  条件下,蛋白质结构发生变化时始态和终态的荧光强度;  $a$  和  $b$  分别为  $I(\lambda_1)$  对  $I(\lambda_2)$  作图所得直线的纵截距和斜率。对于蛋白质的去折叠过程,若关系(1)表现为线性,则表示由于环境的改变,蛋白质的去折叠过程符合“全或无模型”或“二态模型”;若荧光相图表现为两条或多条直线,则其中的每一条直线都描述一个“全或无”的蛋白质结构变化过程,即蛋白质的去折叠过程符合“三态模型”和“多态模型”,表示蛋白质的去折叠过程是一个序变过程。原则上说,  $\lambda_1$  和  $\lambda_2$  可以是荧光发射谱上的任意波长,但如果分别用于荧光发射峰 2 个斜面上的 2 个不同波长获得荧光相图,其结果将更精确,并能提供更多的结构变化信息<sup>[1-2]</sup>。因此,一般  $\lambda_1$  和  $\lambda_2$  分别取 320 和 365 nm。

### 1.3 胃蛋白酶去折叠荧光相图的测定

将胃蛋白酶溶于含不同浓度脲或盐酸胍(脲和盐酸胍的浓度标注于对应试验点附近)的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 2.6)中,使蛋白终质量浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (如果进行还原变性,还原剂 2-巯基乙醇的浓度为 15 mmol/L,非还原变性则不加还原剂,其余条件与还原变性相同),4 放置过夜,使其不同程度变性。对照体系除不含胃蛋白酶外,其余条件与变性酶溶液完全相同。试验用 Hitachi F-4500 型荧光光谱仪的激发波长为 295 nm,激发狭缝和发射狭缝宽均为 10 nm,扫描范围 300 ~ 420 nm,扫描速度 1 200 nm/min,试验温度 25  $^{\circ}\text{C}$ 。测定其内源荧光发射谱时,在扣除对照体系的内源荧光发射谱后读取 320 和 365 nm 的内源荧光强度  $I_{320}$  和  $I_{365}$ ,然后根据式(1),以  $I_{320}$  为横坐标,  $I_{365}$  为纵坐标分别做出脲和盐酸胍诱导的胃蛋白酶去折叠的荧光相图。

## 2 结果与分析

### 2.1 无还原剂存在时脲和盐酸胍诱导胃蛋白酶的去折叠过程

图 1 和图 2 分别给出了无还原剂存在时,胃蛋白酶在脲溶液和盐酸胍溶液中去折叠的荧光相图。

图 1 表明,当无 2-巯基乙醇存在时,脲诱导胃蛋白酶的去折叠荧光相图由 1 条直线组成,这表明当

变性体系中无还原剂存在时,胃蛋白酶的脲变性过程符合“二态模型”,即胃蛋白酶从天然态直接转变为去折叠态,其间不形成部分折叠中间态。由图 2 可见,无 2-巯基乙醇存在时,盐酸胍诱导胃蛋白酶去

折叠的荧光相图由 2 条直线组成,这表明当变性体系中无还原剂存在时,胃蛋白酶的盐酸胍变性过程符合“三态模型”,即胃蛋白酶首先从天然态转变为一个部分折叠中间态,并最终转变为去折叠态。

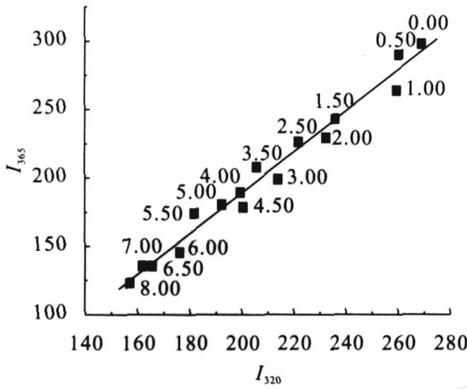


图 1 无还原剂存在时胃蛋白酶在脲溶液中  
去折叠的荧光相图  
脲浓度(单位: mol/L) 标识在相应数据点附近

Fig. 1 Fluorescence phase diagram of pepsin induced by urea in the absence of 2-mercaptoethanol  
Urea concentrations (mol/L) in denaturation solution are indicated in the vicinity of the corresponding symbol

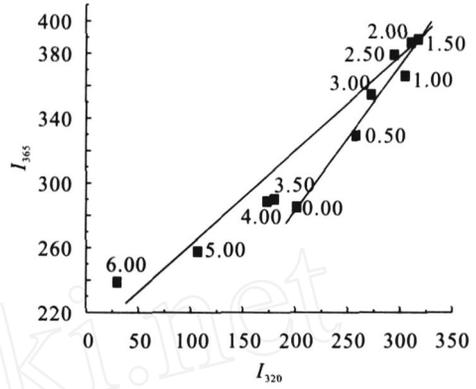


图 2 无还原剂存在时胃蛋白酶在盐酸胍溶液中  
去折叠的荧光相图  
盐酸胍浓度(单位: mol/L) 标识在相应数据点附近

Fig. 2 Fluorescence phase diagram of pepsin induced by guanidine hydrochloride in the absence of 2-mercaptoethanol  
Guanidine hydrochloride concentrations (mol/L) in denaturation solution are indicated in the vicinity of the corresponding symbol

2.2 有还原剂存在时脲和盐酸胍诱导胃蛋白酶的去折叠过程

胃蛋白酶在脲溶液和盐酸胍溶液中去折叠的荧光相图。

图 3 和图 4 分别给出了在 2-巯基乙醇存在时,

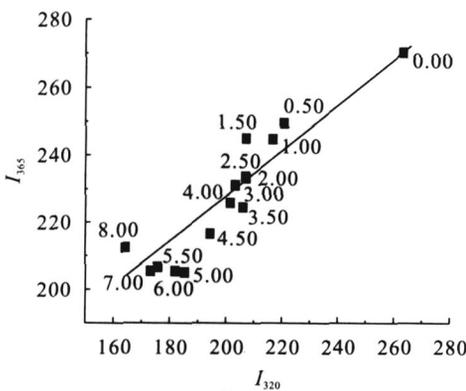


图 3 2-巯基乙醇存在时胃蛋白酶在脲溶液中  
去折叠的荧光相图  
脲浓度(单位: mol/L) 标识在相应数据点附近

Fig. 3 Fluorescence phase diagram of pepsin induced by urea in the presence of 2-mercaptoethanol  
Urea concentrations (mol/L) in denaturation solution are indicated in the vicinity of the corresponding symbol

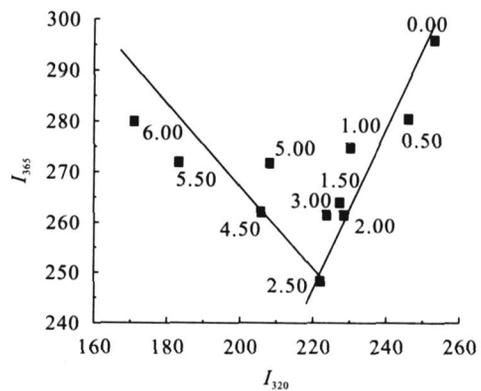


图 4 2-巯基乙醇存在时胃蛋白酶在盐酸胍溶液中  
去折叠的荧光相图  
盐酸胍浓度(单位: mol/L) 标识在相应数据点附近

Fig. 4 Fluorescence phase diagram of pepsin induced by guanidine hydrochloride in the presence of 2-mercaptoethanol  
Guanidine hydrochloride concentrations (mol/L) in denaturation solution are indicated in the vicinity of the corresponding symbol

由图 3 可见,有 2-巯基乙醇存在时,脲诱导胃蛋白酶去折叠的荧光相图也由 1 条直线组成,表明当变性体系中有还原剂存在时,胃蛋白酶的脲变性过程同样符合“二态模型”,即该蛋白从天然态直接转变为去折叠态,其间不形成部分折叠中间态。由图 4 可见,有 2-巯基乙醇存在时,盐酸胍诱导胃蛋白酶去折叠的荧光相图由 2 条直线组成,表明当变性体系中有还原剂存在时,胃蛋白酶的盐酸胍变性过程符合“三态模型”,即该蛋白也是首先从天然态转变为一个部分折叠中间态,并最终转变为去折叠态。

### 3 讨 论

本研究结果表明,用脲作变性剂时,无论有无还原剂存在,胃蛋白酶的变性过程均符合“二态模型”,也就是说,当脲浓度为 0~8.0 mol/L 时,胃蛋白酶一步直接由天然态转变为去折叠态;用盐酸胍作变性剂时,无论有无还原剂存在,胃蛋白酶的变性过程都是序变过程,均符合“三态模型”,当盐酸胍浓度从 0~2.5 mol/L 时,胃蛋白酶由天然态首先转变为部分折叠中间态;当盐酸胍浓度从 2.5~6.0 mol/L 时,胃蛋白酶再由部分折叠中间态转变为去折叠态。

脲和盐酸胍诱导胃蛋白酶的去折叠过程不同,这可能与两种变性剂诱导蛋白质去折叠的机制不同有关。虽然脲和盐酸胍都能与蛋白质的多肽链竞争氢键并增加非极性侧链在水溶液中的溶解度,进而破坏蛋白质的二级结构并降低维持其三级结构的疏水相互作用,但由于盐酸胍是一种电解质,而脲是一种非离子型变性剂,因此盐酸胍能通过正离子(胍离子)效应减弱维持蛋白质三级结构的静电相互作用,而脲不能,这就导致了盐酸胍诱导蛋白质的去折叠能力明显高于脲<sup>[6-7]</sup>,这也可能是造成胃蛋白酶在盐酸胍溶液和脲溶液中去折叠机理不同的原因。

与溶菌酶和细胞色素 C 等分子质量较小的蛋白质相比,胃蛋白酶是一个由 326(7) 个氨基酸残基组成的单肽链单体酶,分子中含有 3 对二硫键,是一

个结构比较复杂的蛋白质。但从本研究去折叠结果来看,其差别并不像想象的那样大,这可能从一个侧面验证了蛋白质三级结构决定于其一级结构的论断,也就是说,蛋白质的去折叠性质主要决定于其一级结构,而与其分子本身的大小和几何结构关系不大<sup>[8-10]</sup>。

### [参考文献]

- [1] Kuznetsova I M, Turoverov K K, Uversky V N. Use of the phase diagram method to analyze the protein unfolding-refolding reactions: fishing out the “invisible” intermediates[J]. *Journal of Proteome Research*, 2004, 3(3): 485-494.
- [2] 杨芳,梁毅,杨芳(小). 脲和盐酸胍诱导溶菌酶去折叠的荧光相图法研究[J]. *化学学报*, 2003, 61(6): 803-807.
- [3] Kageyama T. Role of S1 loop residues in the substrate specificities of pepsin A and chymosin[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(48): 15122-15130.
- [4] Campos L A, Sancho J. The active site of pepsin is formed in the intermediate conformation dominant at mildly acidic pH[J]. *FEBS Letters*, 2003, 538: 89-95.
- [5] Okoniewska M, Tanaka T, Yada R Y. The role of the flap residue, threonine 77, in the activation and catalytic activity of pepsin A[J]. *Protein Engineering*, 1999, 12(1): 55-61.
- [6] Anfinsen C B, Haber E, Sela M, et al. The kinetics of the formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1961, 47: 1309-1314.
- [7] Tanaka T, Yada R Y. N-terminal portion acts as an initiator of the inactivation of pepsin at neutral pH[J]. *Protein Engineering*, 2001, 14(9): 669-674.
- [8] Kuznetsova I M, Stepanenko O V, Stepanenko O V, et al. The place of inactivated actin and its kinetic predecessor in actin folding-unfolding[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(44): 13127-13132.
- [9] Sekiguchi H, Arakawa H, Taguchi H, et al. Specific interaction between groel and denatured protein measured by compression-free force spectroscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2003, 85(1): 484-490.
- [10] Xie Q, Zhou H M. Refolding intermediate of guanidine hydrochloride denatured aminoacylase[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, 36: 1332-1340.