

大分子拥挤环境中溶菌酶的去折叠过程

王莉衡, 钦传光, 尚晓娅, 牛卫宁

(西北工业大学, 生命科学院, 陕西, 西安, 710072)

【摘要】 **【目的】**研究不同大分子拥挤体系对盐酸胍诱导的溶菌酶去折叠过程的影响。**【方法】**以葡聚糖 70 (Dextran 70)、菲可 70 (Ficoll 70)、聚乙二醇 2000 (PEG 2000) 作为大分子拥挤试剂, 模拟体内高度拥挤的环境, 用荧光相图法研究不同大分子拥挤试剂中, 有无还原剂 2-巯基乙醇存在时, 盐酸胍诱导溶菌酶去折叠过程的变化及其特点, 探讨大分子拥挤环境对蛋白质去折叠的影响。**【结果】**Dextran 70、Ficoll 70 和 PEG 2000 3 种大分子拥挤试剂对溶菌酶活性几乎没有影响。无大分子拥挤试剂条件下, 溶菌酶从天然态转变为去折叠态的过程中 (盐酸胍浓度为 0~6.0 mol/L), 当无还原剂 2-巯基乙醇时, 溶菌酶的去折叠过程符合“三态模型”, 有 1 个中间态; 当存在还原剂 2-巯基乙醇时, 该变性过程则符合“二态模型”, 不存在任何中间态, 溶菌酶可直接从天然态转变为去折叠态。溶菌酶在大分子拥挤体系中变性时, 当不存在还原剂 2-巯基乙醇, 变性过程符合“四态模型”, 存在 2 个中间态; 而当存在还原剂 2-巯基乙醇时, 变性过程则符合“三态模型”, 有 1 个中间态。**【结论】**通过添加大分子拥挤试剂, 增加了溶菌酶变性过程的中间态, 改变了蛋白由天然态到完全去折叠态的变性过程。

【关键词】 大分子拥挤; 溶菌酶; 去折叠; 荧光相图法; 盐酸胍

【中图分类号】 Q518.4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)09-0187-06

Studies on unfolding of lysozyme Induced by guanidine hydrochloride at different macromolecular crowding

WANG Li-heng, QIN Chuan-guang, SHANG Xiao-ya, NIU Wei-ning

(Faculty of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an, shaanxi 710072, China)

Abstract: **【Objective】** The effect of different macromolecular crowding agents on the unfolding of lysozyme induced by guanidine hydrochloride was studied. **【Method】** Three nonspecific high molecular mass crowding agents, dextran 70, Ficoll 70 and poly(ethylene glycol) 2000, were used to mimic a crowded environment in vivo. Lysozyme was denatured from native state to unfolded state by GuHCl in this crowded solutions with or without 2-mercaptoethanol and studied by “phase diagram” method of fluorescence in order to investigate the effect of different macromolecular crowding agents on the unfolding of lysozyme. **【Result】** Three crowding agents, dextran 70, Ficoll 70 and poly(ethylene glycol) 2000, had no effect on the activity of lysozyme. In the range of GuHCl concentration (0—6.0 mol/L), lysozyme was denatured from native state to unfolded state. In absence of crowding agents and 2-mercaptoethanol, the denaturation procedure of lysozyme conformed with the three-state model and one folded intermediate was detected, and in the presence of 2-mercaptoethanol it conformed with the two-state model and no folded intermediate was detected. However, in crowded solutions it conformed with the four-state model (having two intermediates) and the three-state model (having one intermediate) respectively at the same conditions. **【Conclusion】** Experimental results showed that the unfolding process of lysozyme was changed obviously by the addition of

* [收稿日期] 2009-01-08

[基金项目] 西北工业大学科技创新基金项目(2008KJ02038)

[作者简介] 王莉衡(1977—), 女, 陕西西安人, 讲师, 博士, 主要从事蛋白质结构与功能研究。E-mail: hengheng_1103@163.com

[通信作者] 钦传光(1965—), 男, 湖北随州人, 教授, 博士, 主要从事化学生物学与药物化学研究。E-mail: qinchg@nwpu.edu.cn

macromolecular crowding agent and increased the folded intermediates.

Key words: macromolecular crowding; lysozyme; unfolding; “phase diagram” method of fluorescence; guanidine hydrochloride

细胞体系极其复杂,细胞内含有大量不同浓度的可溶或者不可溶的大分子物质,如多糖、蛋白质、核酸等^[1-3],这些不同种类的大分子物质占据了细胞总体积的 20%~30%。生物大分子活动的环境称为“大分子拥挤环境”^[4],其对生物大分子行为的影响称为“排斥容积效应”,此效应如同重力一样,是不可避免的,而大多数的生命化学反应正是在这种环境体系中完成的。

我国著名生物化学家吴宪教授在 1931 年首先提出了蛋白质变性的概念^[5]。作为从分子水平上阐明生命奥秘的中心课题之一,蛋白质去折叠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^[6-7]。迄今,体外试验仍然是生物化学和分子生物学研究的主要方法,但长期以来,由于某些原因,对蛋白质去折叠的研究均是在简单体系——稀溶液中进行的,而简单的稀溶液并不能真实反映胞内蛋白质的去折叠过程。因此,模拟细胞内的环境,尽可能地在接近真实细胞体系进行体外研究是十分必要的。目前,有关大分子拥挤环境对蛋白质折叠过程影响的研究,尚仅处于起步阶段。

相图法由 Burstein 于 1971 年首先提出,并将其应用于荧光数据分析中^[8]。荧光相图法是一种根据蛋白质内源荧光发射光谱特定部位的荧光强度作出荧光相图,进而直观地获得蛋白质去折叠过程中结构变化信息的方法。与其他检测蛋白质结构变化的物理、化学方法相比,荧光相图法能够提供更多有关蛋白质去折叠过程的信息,并可捕捉到未被发现的部分折叠中间态。应用荧光相图法研究蛋白质的去折叠和折叠过程已有相关报道^[9-16],但这些研究均未涉及大分子拥挤环境。本试验以溶菌酶为研究对象,选用葡聚糖 70 (Dextran 70)、菲可 70 (Ficoll 70)、聚乙二醇 2000 (PEG 2000) 作为大分子拥挤试剂,应用荧光相图法分别对不同大分子拥挤试剂中,有还原剂和无还原剂时,盐酸胍诱导溶菌酶的去折叠过程进行了研究,以期了解蛋白质较为真实地去折叠过程及其特点,探讨大分子拥挤环境对蛋白质去折叠过程的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 溶菌酶, Genview 公司产品;微球

菌 (Micococcus Lysodeikticus), Sigma 公司产品;盐酸胍 (纯度 > 99%) 和 2-巯基乙醇 (纯度 99%), Amresco 产品; Ficoll 70, pharmacia 公司产品;其他试剂均为国产分析纯试剂。试验所用水均为去离子蒸馏水,所有试样溶液均用磷酸盐 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$) 缓冲溶液配制,其浓度为 0.1 mol/L, pH 为 7.2~7.4。

1.1.2 仪器 日立 F-4500 型荧光光谱仪和日立 U-3310 紫外可见分光光度计, HITACHI 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 荧光相图法 荧光相图法是以在发射波长 λ_1 和 λ_2 下所测得的蛋白质,在不同试验条件下的荧光强度 $I(\lambda_1)$ 和 $I(\lambda_2)$ 的变化来描述蛋白质的结构变化。由于荧光强度是一种广度性质,因此以上这 2 个变量间存在如下关系^[8]:

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

式中: $a = I_1(\lambda_1) - \frac{I_2(\lambda_1) - I_1(\lambda_1)}{I_2(\lambda_2) - I_1(\lambda_2)} I_1(\lambda_2)$, $b = \frac{I_2(\lambda_1) - I_1(\lambda_1)}{I_2(\lambda_2) - I_1(\lambda_2)}$, 其中 $I_1(\lambda_1)$ 和 $I_2(\lambda_1)$ 分别是发射波长为 λ_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 $I_2(\lambda_2)$ 分别是发射波长为 λ_2 条件下,蛋白质结构发生变化时始态和终态的荧光强度。

对于蛋白质的去折叠过程而言,若荧光相图表现为一条直线,即关系式(1)表现为线性,则表示相应的去折叠过程符合“全或无模型”或“二态模型”,无部分折叠中间态存在;若荧光相图表现为 2 条直线和多条直线,即关系式(1)表现为非线性,则蛋白质去折叠是一个序变过程,可能存在 1 个或多个折叠中间态,即符合“三态模型”和“多态模型”。换言之,荧光相图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。原则上说, λ_1 和 λ_2 可以是荧光发射谱上的任意波长,但实际上如果用荧光发射峰 2 个斜面上斜率最大的点所处的 2 个波长扫描,获得的荧光相图将更精确,并能提供更多的结构变化信息^[9-11]。对于内源荧光发射谱, λ_1 和 λ_2 通常分别取 320 和 365 nm。所以,本研究中 λ_1 和 λ_2 分别取 320 和 365 nm,在此波长下测定的荧光强度分

别为 I_{320} 和 I_{365} 。

1.2.2 溶菌酶质量浓度与活性的测定 (1)溶菌酶质量浓度的测定。称取 1 mg 溶菌酶溶于 3 mL 磷酸盐缓冲液(pH 7.2~7.4)中,4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液,测得其蛋白质质量浓度约为 0.15 g/L。用相同缓冲液配制盐酸胍溶液。(2)溶菌酶活性的测定。以微球菌溶液为底物,测定溶菌酶的活性。首先向 1.5 mL 含有微球菌(0.25 mg/mL)的磷酸盐缓冲液中加入 100 μ L 溶菌酶液,在 450 nm 下分别测定 15 和 135 s 时的光密度,再通过吸光度值的降低速率计算溶菌酶的活性,计算方法如下:

酶活性(U)=($OD_{t_0}-OD_{t_1}$) $\times$ 1 000 $\times$ A 。
式中: OD_{t_0} 为 15 s 时的光密度, OD_{t_1} 为 135 s 时的光密度, A 为酶的稀释倍数。

1.3 大分子拥挤试剂对溶菌酶活性的影响

将溶菌酶溶液与质量浓度 200 g/L Ficoll 70、Dextran 70 和 PEG2000 混合放置 4 h 后,分别测定酶活性,并与天然酶的活性进行比较。

1.4 大分子拥挤体系中盐酸胍诱导溶菌酶去折叠的荧光相图

将溶菌酶、大分子拥挤试剂(Dextran 70、Ficoll 70 和 PEG 2000)溶于不同浓度(0,0.0625,0.125,0.25,0.4,0.5,0.6,0.75,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,5.0,5.5,和 6.0 mol/L)的盐酸胍溶液中,制成不同的蛋白质变性体系,并使溶菌酶的最终质量浓度为 12 μ g/mL。按此法作 2 组,一组直接于 4 ℃ 条件下放置过夜,使溶菌酶不同程度变性;另一组加入 0.1 mmol/L 2-巯基乙醇(还原剂),于 4 ℃ 条件下放置过夜,使溶菌酶不同程度变性。对照体系除不含溶菌酶外,其他条件与变性蛋白溶液完全相同。

用日立 F-4500 型荧光光谱仪,在 25 ℃、激发波长 295 nm、激发狭缝和发射狭缝宽均为 5 nm、扫描范围 310~420 nm、扫描速度 1 200 nm/min 条件下,测定溶菌酶的内源荧光发射谱。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,然后根据式(1)分别做不同大分子拥挤体系中盐酸胍诱导溶菌酶去折叠的荧光相图。

2 结果与分析

2.1 大分子拥挤试剂对溶菌酶活性的影响

以天然酶的活性为 100%,计算与大分子拥挤

试剂混合方置 4 h 后溶菌酶的相对活性,结果见图 1。由图 1 可知,Ficoll 70、Dextran 70、PEG 2000 对溶菌酶的活性几乎没有影响,混合放置 4 h 后,酶活性仍然保持在 90% 以上。因此,选用 Ficoll 70、Dextran 70、PEG 2000 作为以下试验的拥挤试剂。

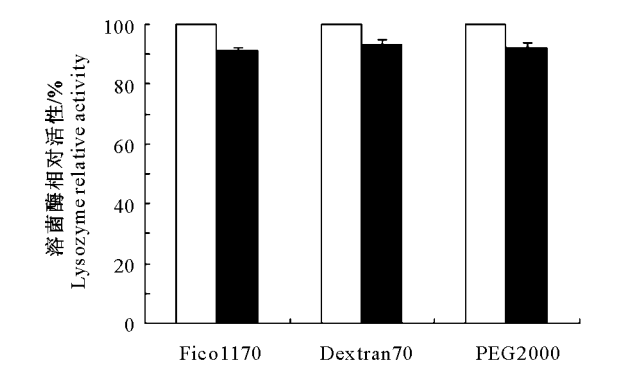


图 1 不同拥挤试剂对溶菌酶活性的影响
□.天然酶活性;■.加入大分子拥挤试剂 4 h 后的酶活性
Fig.1 Effect of different macromolecular crowding agents on lysozyme activity
□.Lysozyme activity;■.Lysozyme activity after adding macromolecular crowding agent

2.2 无还原剂时盐酸胍诱导溶菌酶的去折叠过程

将溶菌酶分别加入质量浓度 0.25 mg/mL 的 Ficoll 70、Dextran 70、PEG 2000 的盐酸胍溶液中进行变性。图 2 为不同的大分子拥挤体系中,无 2-巯基乙醇存在时盐酸胍诱导溶菌酶去折叠的荧光相图。从图 2 可以看出,无大分子拥挤试剂时,盐酸胍诱导溶菌酶去折叠的荧光相图有 2 条直线,而有大分子拥挤试剂时则均呈现 3 条直线。这说明在无大分子拥挤试剂的环境中,盐酸胍诱导溶菌酶的去折叠过程存在 1 个中间态,大约出现在盐酸胍浓度为 3.0 mol/L 时,即溶菌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;而当缓冲溶液中存在大分子拥挤试剂时,盐酸胍诱导溶菌酶的去折叠过程发生变化,存在 2 个中间态,且 3 种大分子拥挤试剂的中间态基本上都是出现在盐酸胍浓度为 2.5~3.5 mol/L 时。表明通过添加大分子拥挤试剂可明显改变溶菌酶的变性过程。这可能是由于大分子的存在,形成了体系高度拥挤的环境,进而影响了溶菌酶去折叠过程,增加了去折叠过程的中间态,但至于其内在的作用机制还有待于进一步研究探讨。

2.3 有还原剂时盐酸胍诱导溶菌酶的去折叠过程

图 3 为不同大分子拥挤体系中有 2-巯基乙醇存

在时,盐酸胍诱导溶菌酶去折叠的荧光相图。由图 3 可见,有还原剂 2-巯基乙醇存在时,在无大分子拥挤试剂的环境条件下,盐酸胍诱导溶菌酶去折叠的荧光相图由 1 条直线组成,表明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;在不同的 大分子拥挤环境中,盐酸胍诱导溶菌酶去折叠的荧光相图均由 2 条直线组成,表明溶菌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,可见加入还原剂 2-巯基乙醇,可明显减

少折叠的中间态。这是因为二硫键在维持蛋白分子的二级和三级结构方面起着重要作用^[17],而加入还原剂,可打断分子中的二硫键,从而影响蛋白质的去折叠过程。因此,当变性体系中含有还原剂时,会促进蛋白质分子中的二硫键断裂,破坏蛋白质分子的空间结构,加快蛋白质分子的去折叠过程,不利于部分折叠中间态的形成,使其更容易被变性剂变性,使变性过程变得简单。

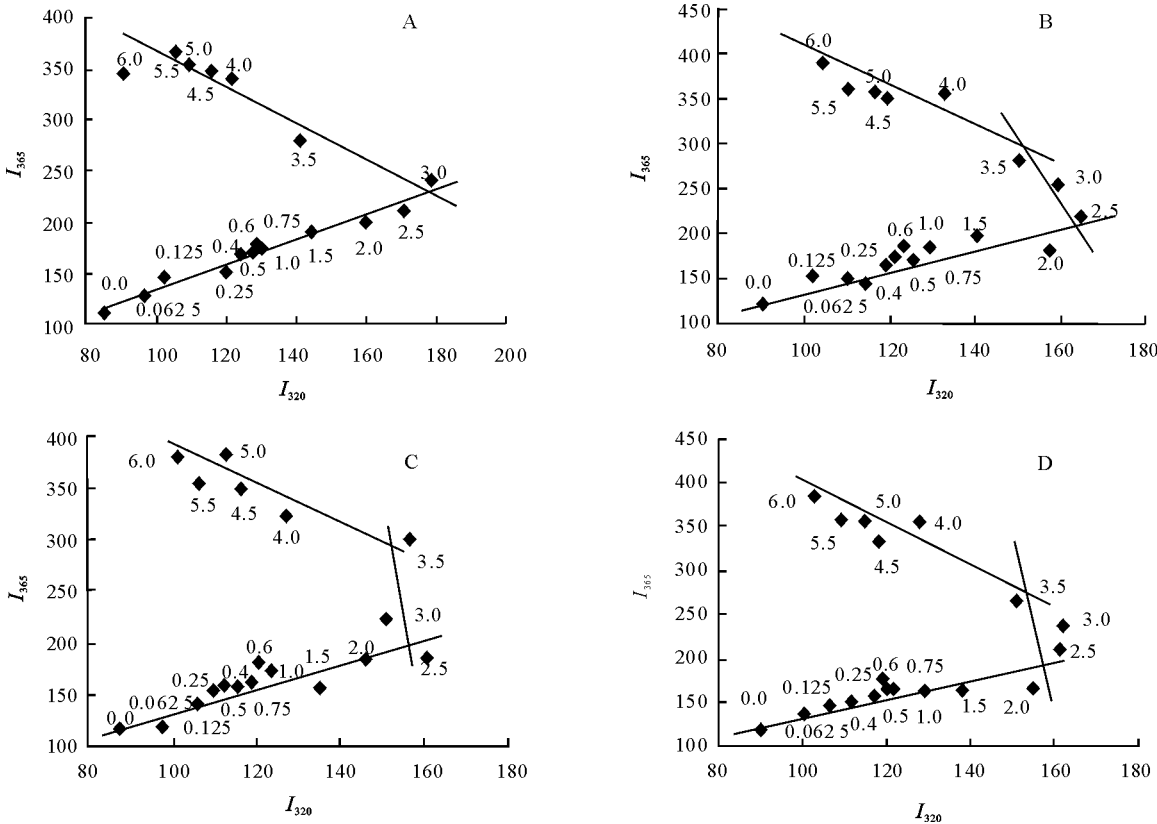


图 2 无还原剂时大分子拥挤环境中盐酸胍诱导溶菌酶去折叠的荧光相图

A. 无拥挤试剂;B. Ficoll 70;C. Dextran 70;D. PEG 2000;图中数据为盐酸胍浓度

Fig. 2 Fluorescence phase diagram for the unfolding of lysozyme induced by an increase in guanidine hydrochloride concentration in the absence of 2-mercaptoethanol at different macromolecular crowding agent

A. No macromolecular crowding agent;B. Ficoll 70;C. Dextran 70;D. PEG 2000;The data in figure are GuHCl concentration

3 结论与讨论

本研究中,当变性体系中不存在还原剂 2-巯基乙醇,无大分子拥挤试剂时,盐酸胍诱导溶菌酶的变性过程符合“三态模型”,存在 1 个中间态;而当缓冲溶液中存在大分子拥挤试剂时,变性过程符合“四态模型”,存在 2 个中间态。表明,通过添加大分子拥挤试剂,可明显改变溶菌酶的变性过程及途径,但其内在机制还需进一步研究。

当变性体系中存在还原剂 2-巯基乙醇,无大分子拥挤试剂时,溶菌酶的盐酸胍变性过程符合“二态模型”,其间不形成折叠中间态;当缓冲溶液中存在大分子拥挤试剂时,变性过程符合“三态模型”,其间会形成 1 个部分折叠中间态。表明加入还原剂 2-巯基乙醇可明显减少折叠的中间态,加快蛋白质分子的去折叠过程,不利于部分折叠中间态的形成,使其更容易被变性剂变性,使变性过程变得简单。

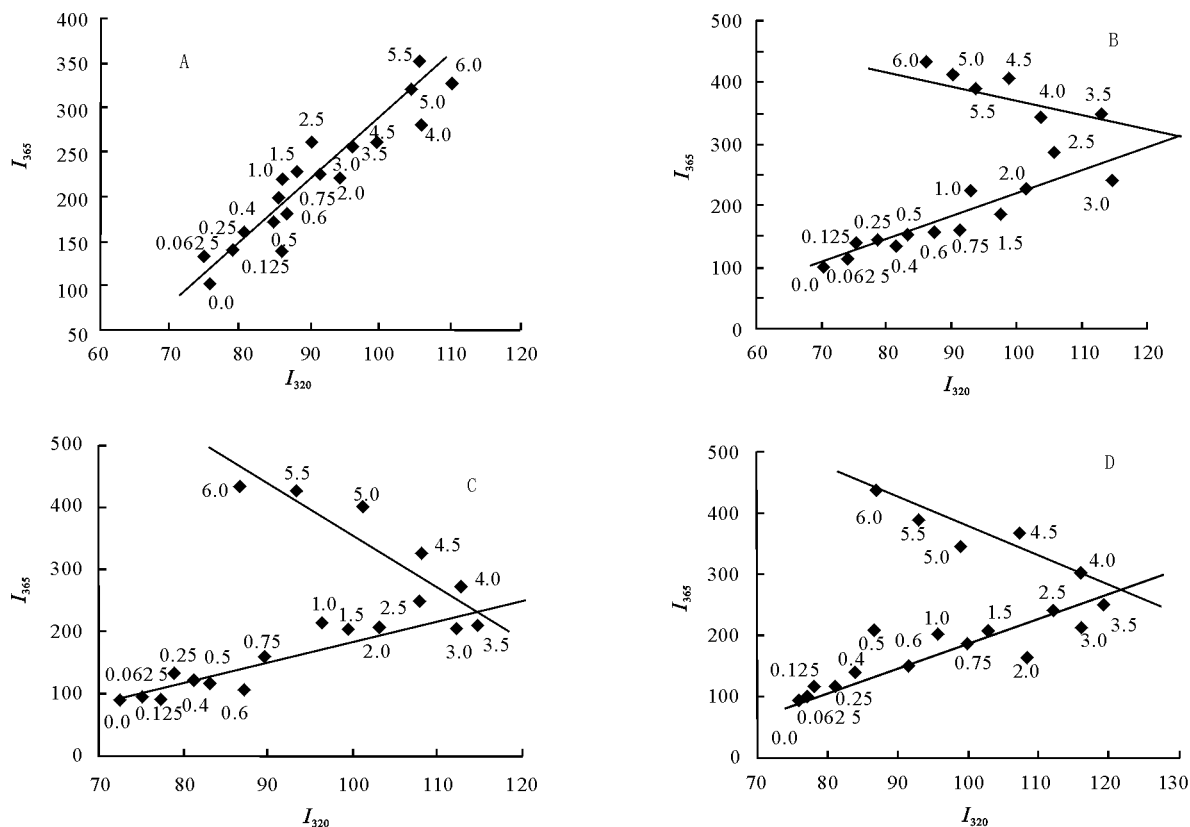


图 3 有还原剂时大分子拥挤环境中盐酸胍诱导溶菌酶去折叠的荧光相图

A. 无拥挤试剂;B. Ficoll 70;C. Dextran 70;D. PEG 2000;图中数据为盐酸胍浓度

Fig. 3 Fluorescence phase diagram for the unfolding of lysozyme induced by an increase in guanidine hydrochloride concentration with 2-mercaptoethanol at different macromolecular crowding agent

A. No macromolecular crowding agent;B. Ficoll 70;C. Dextran 70;D. PEG 2000;The data in figure are GuHCl concentration

蛋白质的去折叠过程涉及到很多因素,是一个很复杂的过程。但可以肯定,当变性体系中存在大分子拥挤试剂时,溶菌酶的变性过程发生显著变化,而至于大分子拥挤试剂对去折叠过程影响的内在机制还需进一步研究。本试验仅是应用荧光相图法对蛋白质变性过程进行的初步研究和摸索,其结果还需通过其他检测方法进行验证。

[参考文献]

[1] Dogan J, Lendel C, Härd T. Thermodynamics of folding and binding in an affibody:affibody complex [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 359(5): 1305-1315.

[2] Nasrollah R G, Azadeh E H, Mohsen N G. Effect of polyamines on the structure, thermal stability and 2,2,2-trifluoroethanol-induced aggregation of α -chymotrypsin [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007, 41: 597-604.

[3] Salvetti G, Tombari E. The endothermic effects during denaturation of lysozyme by temperature modulated calorimetry and an intermediate reaction equilibrium [J]. *The Journal of Physical chemistry B*, 2002, 106(23): 6081-6087.

[4] Minton A P. Holobiochemistry: The effect of local environment

upon the equilibria and rates of biochemical reactions [J]. *International Journal of Biochemistry*, 1990, 22(10): 1063-1067.

[5] Wu H. Studies on denaturation of proteins XIII. a theory of denaturation [J]. *Chinese Journal of Physiology*, 1931, 5: 321-344.

[6] Baker T A. Protein unfolding, trapped in the act [J]. *Nature*, 1999, 401: 29-30.

[7] Makhatadze G I. Thermodynamics of protein interactions with urea and guanidinium hydrochloride [J]. *The Journal of Physical chemistry B*, 1999, 103 (23): 4781-4785.

[8] 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.

[9] Bushmarina N A, Kuznetsova I M, Biktashev A G, et al. Partially folded conformations in the folding pathway of bovine carbonic anhydrase II: a fluorescence spectroscopic analysis [J]. *Chem Bio Chem*, 2001, 2(11): 813-821.

[10] Kuznetsova I M, Stepanenko O V, Turoverov K K, et al. Unraveling multistate unfolding of rabbit muscle creatine kinase [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1596(1): 138-155.

[11] Kuznetsova I M, Turoverov K K, Verkhusha V V, et al. Ki-

- netics of actin unfolding induced by guanidine hydrochloride [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(3): 1014-1019.
- [12] 杨 芳, 梁 毅, 杨 芳. 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.
Yang F, Liang Y, Yang F. Unfolding of lysozyme induced by urea and guanidine hydrochloride studied by "phase diagram" method of fluorescence [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2003, 61(6): 803-807. (in Chinese)
- [13] 焦 铭, 梁 毅, 李洪涛, 等. 脲和盐酸胍诱导过氧化氢酶去折叠的研究 [J]. *化学学报*, 2003, 61(9): 1362-1368.
Jiao M, Liang Y, Li H T, et al. Studies on the unfolding of catalase induced by urea and guanidine hydrochloride [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2003, 61(9): 1362-1368. (in Chinese)
- [14] 师江波, 边六交, 董发昕. 荧光相图法研究猪胰腺 α -淀粉酶在脲和盐酸胍溶液中的去折叠过程 [J]. *分析化学研究简报*, 2007, 35(5): 707-710.
Shi J B, Bian L J, Dong F X. Unfolding procedure of porcine pancreatic α -Amylase by phase diagram method of fluorescence [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2007, 35(5): 707-710. (in Chinese)
- [15] 傅容湛, 董发昕, 边六交. 荧光相图法研究脲诱导牛血清白蛋白的去折叠过程 [J]. *分析测试学报*, 2006, 25(6): 19-22.
Fu R Z, Dong F X, Bian L J. Studies on unfolding of bovine serum albumins induced by urea in the presence of denaturant by fluorescence phase diagram [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2006, 25(6): 19-22. (in Chinese)
- [16] 刘 莉, 董发昕, 胥耀平, 等. 用荧光相图法研究胃蛋白酶的去折叠过程 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2007, 35(11): 187-190.
Liu L, Dong F X, Xu Y P, et al. Unfolding of pepsin induced by urea or guanidine hydrochloride with fluorescence phase diagram [J]. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2007, 35(11): 187-190. (in Chinese)
- [17] Tachibana H, Oka T, Akasaka K. Native-like tertiary structure formation in the α -domain of a hen lysozyme two-disulfide variant [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 314 (2): 311-320.
-
- (上接第 186)
- [5] 袁志发, 周静芋, 郭满才, 等. 决策系数-通经分析中的决策指标 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2001, 29(5): 131-133.
Yuan Z F, Zhou J Y, Guo M C, et al. Decision coefficient —the decision index of path analysis [J]. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2001, 29(5): 131-133. (in Chinese)
- [6] 袁志发, 周静芋. 多元统计分析 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 128-133.
Yuan Z F, Zhou J Y. *Multivariate statistical analysis* [M]. Beijing: Science Press, 2001: 128-133. (in Chinese)
- [7] 秦豪荣, 袁志发, 吉俊玲, 等. 长白猪典范选择指数的构建与通经分析化研究 [J]. *生物数学学报*, 2007, 22(4): 679-684.
Qin H R, Yuan Z F, Ji J L, et al. Canonical selection index and its path analysis in landrace pigs [J]. *Journal of Biomathematics*, 2007, 22(4): 679-684. (in Chinese)
- [8] 周以飞, 周德银. 春播菜用大豆生育期农艺性状与品质性状的典范相关分析 [J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2005, 34(1): 11-17.
Zhou Y F, Zhou D Y. Canonical correlation analysis of growing period, agronomic character, yield and quality character in the spring vegetable soybean [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition* 2005, 34(1): 11-17. (in Chinese)