

# 胍变及脲变 $\alpha$ -淀粉酶的研究

## I. 用高效疏水色谱法研究变性机理和复性效率\*

白 泉 卫引茂 耿信笃\*

(西北大学现代分离科学研究所 西安 710069)

提 要 用疏水性强弱不同的两种色谱柱对 7.0m ol/L 盐酸胍及 8.0m ol/L 脲变性的 $\alpha$ -淀粉酶变体和疏水色谱介质表面上折叠的中间体进行了分离和复性。通过研究和比较发现,两者的变性机理和形成折叠中间体的个数以及复性效率均不相同。在用疏水性较弱的疏水色谱柱对脲变 $\alpha$ -淀粉酶的折叠中间体进行分离时,得到了疏水性接近连续的、数目很多的中间体。用疏水性较强的疏水色谱柱对胍变 $\alpha$ -淀粉酶进行复性的效果较好。还研究了柱温变化对其折叠、分离效果和复性效率的影响。

关键词 高效疏水色谱法, 蛋白折叠,  $\alpha$ -淀粉酶, 蛋白变性机理

分类号 O658/Q55

### 1 前言

蛋白折叠是生物化学中十分活跃的研究领域。Tanford<sup>[1,2]</sup>等人用 7.0m ol/L 盐酸胍和 8.0m ol/L 脲对蛋白质的变性作用进行了系统的研究。他们认为,在高浓度变性剂溶液中,许多蛋白质分子都是以高度伸展的构象存在的。到目前为止,对这两种变性剂使蛋白变性的变性机理尚不清楚。文献[3~5]分别对胍变及脲变 $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -Amy)的研究作过报道。Geng<sup>[6]</sup>曾对胍变 $\alpha$ -Amy的复性进行过研究。本文拟用高效疏水相互作用色谱法(HPHIC)对 $\alpha$ -Amy的胍变性及脲变性作用进行比较研究。

在色谱进样的一瞬间,变性剂不被吸附并与变性蛋白迅速分离,变性蛋白则被疏水固定相吸附,同时从水合蛋白分子与水合固定相接触表面上瞬时挤出水分子并进行折叠。因为疏水相互作用力为蛋白分离和折叠的主要驱动力,变性蛋白在折叠过程中形成的中间体的疏水性大小应当是有差异的,所以有可能用疏水色谱法进行分离。如果其中有一些变性蛋白中间体经 HPHIC 柱后会完全折叠或复性的话,则须用中止剂使折叠中止后,再用 HPHIC 法进行分离。然而,某些蛋白,如 $\alpha$ -Amy,用 HPHIC 只能使胍变后的变体部分复性,故这些不能用 HPHIC 复性的中间体便可在不用中止剂的条件下用 HPHIC 法进行相互分离。

### 2 实验部分

#### 2.1 主要试剂

$\alpha$ -淀粉酶(枯草杆菌)由上海生物化学所生产。称取标准 $\alpha$ -Amy 2.0mg 和 5.0mg 分别溶于 7.0m ol/L GuHCl 和 8.0m ol/L 脲溶液中,使胍变 $\alpha$ -Amy 和脲变 $\alpha$ -Amy 浓度分别为 2.0 和 5.0g/L。胍变 $\alpha$ -Amy 在 20℃ 恒温变性 24h 后使用,脲变 $\alpha$ -Amy(pH 6.4)在 20℃ 恒温变性一周后使用,脲需重结晶后使用。其它试剂均为分析纯。

#### 2.2 仪器和所用材料

Shimadzu LC-6A 高效液相色谱仪,包括双泵、梯度洗脱体系、紫外检测器;色谱柱为 100mm  $\times$  4mm 不锈钢管,用匀浆法在装柱机(日本,Chemico 公司)上分别装填自己合成的 XDF-GM 和 XDF-SGM 型疏水填料。

#### 2.3 色谱条件

流动相 A 液为 3.0m ol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 0.050m ol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0; B 液为 0.050m ol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0。从 100% 的 A 液到 100% 的 B 液线性梯度洗脱 25 或 50min,再用 100% B 液洗脱 10min。流速 0.8mL/min,检测波长 280nm,0.08AUFS。收集各种色谱流分,用文献[7]的方法对 $\alpha$ -Amy 进行活性测定。

\* 国家自然科学基金资助课题

\*\* 通讯联系人

本文收稿日期:1996-08-17,修回日期:1996-11-02

### 3 结果与讨论

#### 3.1 固定相的选择

如前所述,若选用复性效果差而分离效果好的 HPHIC 柱,则有可能在不使用折叠中止剂的情况下使 HPHIC 基本上起到分离的作用。在完全相同的条件下,未被复性的折叠中间体的任何差别都来源于两种变性剂的变性机理的不同,这便为我们研究这两种变性剂的变性机理提供了一种有效的方法。我们选用 XDF-GM (端基为酯基)和 XDF-SGM (端基为羟基)两种不同的 HPHIC 柱对胍变和脲变  $\alpha$ -Amy 进行分离。前者的疏水性大于后者<sup>[8]</sup>。图 1-a, c 和 d, f 分别表示在 20°C 条件下胍变和脲变  $\alpha$ -Amy 在 XDF-GM 和 XDF-SGM 型 HPHIC 柱上的色谱图;图 1-b 和 e (以虚线表示)则分别表示在这两种色谱柱上天然  $\alpha$ -Amy 的色谱图。从图 1-a 看出,胍变的  $\alpha$ -Amy 显示出近 10 个小的色谱峰,而用相同的色谱柱分离脲变  $\alpha$ -Amy (图 1-c)则显示出超过 15 个  $\alpha$ -Amy 中间体。XDF-SGM 型色谱柱对胍变  $\alpha$ -Amy 分离得到的色谱峰较图 1-a 的少。图 1-f 较图 1-c 所示的脲变  $\alpha$ -Amy 变体数目多一个,但是,两者峰形不同,且各变体的保留时间亦有许多差异。虽然上述情况都显示了有与天然  $\alpha$ -Amy 保留时间相同的色谱峰(图 1-c 中的第 14 个峰以  $\alpha$ -Amy<sub>14</sub> 表示,在 f 中为  $\alpha$ -Amy<sub>Y11-12</sub>),但绝大多数变体的保留时间比天然的  $\alpha$ -Amy 为短,说明它们的疏水性比天然  $\alpha$ -Amy 要弱。图 1 还表明,愈是接近天然  $\alpha$ -Amy 的峰,它所代表的  $\alpha$ -Amy 变体的构象愈接近天然  $\alpha$ -Amy 的构象。

文献中有关胍变和脲变  $\alpha$ -Amy 变性机理差异的报道甚少,而常规的对蛋白变性过程中蛋白分子构象变化的各种不同的物理化学检测手段,如紫外、荧光、CD 色谱等,是从不同侧面揭示了蛋白质变性时肽链的伸展过程,得到的信息都是各种变体总的加和特性,因而无法真实地反映蛋白质在胍和脲变性过程中有何异同。此外,亦未曾见到对如图 1 所示的差异进行合理的解释。但 Hibbard<sup>[9]</sup>曾用浸泡的方法分别得到胍变和脲变  $\alpha$ -Chymotrypsin 晶体,并研究了在晶态下胍变和脲变  $\alpha$ -Chymotrypsin 的差异,初步认为胍变与蛋白表面基团及邻近的溶剂区间作用,这种作用只引起蛋白结构的较小变化。而脲与蛋白作用的本质则更为复杂些,它不仅与蛋白分子表面基团发生作用,而且还可以与蛋白分子的疏水内核发生作用,从而导致了结构较大的变化。这种解

释与图 1 中脲变所得的中间体比胍变多的实验结果相吻合。这进一步表明 HPHIC 不仅能对胍变和脲变蛋白质的各种变体进行分离,而且还能对变性机理的异同进行比较,所以 HPHIC 可作为研究 GuHCl 和脲变性机理的一种有效的方法,图 1 中的这些色谱图的不同也只能给出胍变及脲变  $\alpha$ -Amy 变性机理间的差别,目前还不能给出有关各变体结构的详尽信息。

#### 3.2 HPHIC 蛋白活性回收率

如上所述,脲变  $\alpha$ -Amy 的变性机理要比胍变  $\alpha$ -Amy 的复杂得多,因而可以预计脲变  $\alpha$ -Amy 的复性效果要比胍变的差。通过实验选择出最佳的、适合于脲变  $\alpha$ -Amy 复性的 XDF-SGM 型色谱柱和适合于胍变  $\alpha$ -Amy 复性的 XDF-GM 型色谱柱,经测定复性后的  $\alpha$ -Amy 生物活性发现,前者的活性回收率仅为 3.5%,而后者为 13.2%。这进一步表明,由于脲对蛋白变性机理的复杂性,造成了脲变  $\alpha$ -Amy 比胍变  $\alpha$ -Amy 更难以复性。另外,我们还发现胍变  $\alpha$ -Amy 经 HPHIC 复性时,在柱头上很容易形成沉淀,而脲变  $\alpha$ -Amy 则不会产生这种现象。蛋白沉淀是造成复性活性回收率低的主要原因。虽然如此,胍变  $\alpha$ -Amy 的活性回收率仍比脲变的高。

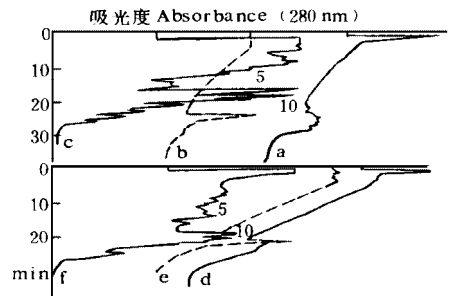


图 1 不同类型 HPHIC 填料对胍变和脲变  $\alpha$ -淀粉酶折叠中间体分离的影响(20°C)

Fig. 1 Effects of the different types of packings on the separation of the refolded intermediates of  $\alpha$ -amylase denatured by GuHCl and urea(20°C)  
a-c. XDF-GM, d-f. XDF-SGM.

#### 3.3 柱温的比较

在 0, 10, 20, 30, 40, 50°C 柱温条件下,用 HPHIC 对胍变和脲变  $\alpha$ -Amy 进行了分离。图 2 和图 3 给出了胍变和脲变  $\alpha$ -Amy 分别在 XDF-GM 型和 XDF-SGM 型 HPHIC 柱上于 30°C (图 2-a, 3-a)和 40°C (图 2-c, 3-c)时中间体的色谱分离图,图 2-b 和 d 所示的虚线表示在 30°C 和 40°C 条件下的天然  $\alpha$

-Amy 分离图。分离结果表明,随着色谱柱温度的升高,脲变  $\alpha$ -Amy 色谱峰由图 1-f 所示的 14 个增加到图 3-c 所示的 24 个,而胍变  $\alpha$ -Amy 色谱峰的个数在 30°C 条件下增至 8 个,当温度升至 40°C 时分离效果基本不变。表 1 分别列出了胍变及脲变  $\alpha$ -Amy 在不同温度下的活性回收率。可以看出,随着温度的升高,用 HPHIC 对  $\alpha$ -Amy 复性的活性回收率在不断地降低。由于疏水色谱特殊的温度效应,蛋白的保留随温度的升高而增大,所以,温度升高有可能提高对  $\alpha$ -Amy 折叠中间体的分离能力,加上温度升高亦可能会使中间体的数目有所增加,因此,随着温度的升高, $\alpha$ -Amy 折叠中间体的数目将会增多。此外,从图 3-a 和图 3-c 看出,在脲变  $\alpha$ -Amy 色谱流出液中几乎全部含有不同的折叠中间体和天然  $\alpha$ -Amy,这与由标准聚苯乙烯分子量分布所得的色谱图极为相似<sup>[10]</sup>。若改善色谱分离条件,脲变  $\alpha$ -Amy 折叠中间体色谱峰的个数还会增加,可以认为  $\alpha$ -Amy 的中间体同标准聚苯乙烯的分子量一样,其分布也可能是接近连续的,中间体的数目也可能是很多的。与前者相比,后者的这种差别不是由分子量不同造成的,而是因复性过程中中间体的疏水性不同所致。此外,这与 Weissman 等<sup>[11]</sup>对牛胰脏胰蛋白酶抑制剂 (bovine pancreatic trypsin inhibitor, BPTI) 中间体分离共得到 8 个中间体相比, $\alpha$ -Amy 所形成的中间体的数目要多得多。

表 1 在两种疏水色谱柱上温度对胍变和脲变  $\alpha$ -Amy 活性回收率的影响 (%)

Table 1 Effects of temperature on the bioactivity recovery of  $\alpha$ -amylase renatured with two types of HPHIC packings (%)

Temperature (°C)	0	10	20	30	40	50
XDF-GM (GuHCl)	2.8	13.3	13.2	3.7	0.8	0.2
XDF-SGM (urea)	0.7	3.3	3.5	1.2	0.4	*

\* 无活性 (no activity)。

#### 4 结论

由高效疏水色谱柱对脲变及胍变  $\alpha$ -Amy 折叠中间体的复性和分离表明,两种变性剂的变性机理和产生的中间体的数目是不同的。脲变  $\alpha$ -Amy 折叠中间体的疏水性大小可能是接近连续的,而中间体的数目要比 BPTI 的多得多。对脲变及胍变  $\alpha$ -Amy 的分离优劣及复性效率在相当大的程度上取决于所用色谱柱的疏水性。胍变  $\alpha$ -Amy 在疏水色谱中的复性效率比脲变要好些。此外,胍变及脲变  $\alpha$ -Amy 在

疏水色谱中折叠亦会受柱温的影响,据此,HPHIC 可能成为一种潜在的研究蛋白折叠的有效方法。

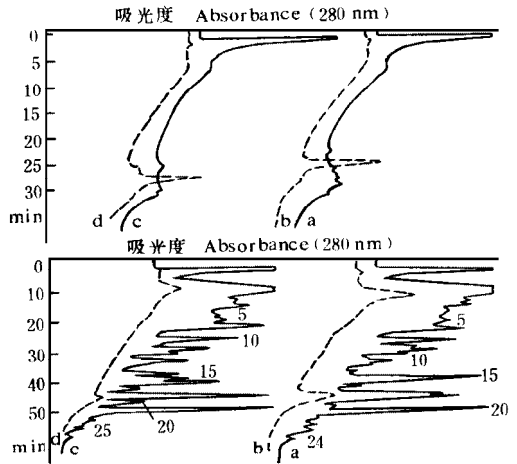


图 2(上) 柱温对 XDF-GM 型疏水柱分离脲变  $\alpha$ -Amy 折叠中间体的影响

Fig. 2(above) Effects of column temperature on the separations of the refolded intermediates of  $\alpha$ -amylase denatured with GuHCl using XDF-GM column in HPHIC  
a. 30°C, c. 40°C.

图 3(下) 柱温对 XDF-SGM 型疏水柱分离脲变  $\alpha$ -Amy 折叠中间体的影响

Fig. 3(below) Effects of column temperature on the separations of the refolded intermediates of  $\alpha$ -amylase denatured with urea by XDF-SGM column in HPHIC  
a. 30°C, c. 40°C.

#### 参 考 文 献

- 1 Tanford C. Adv Protein Chem, 1968; 23: 121
- 2 Tanford C. Adv Protein Chem, 1970; 24: 1
- 3 张学忠, 吴 华, 汪大伟等. 生物化学杂志, 1990; 6(1): 76
- 4 Isemura T, Im anishi A. J Biochem (Tokyo), 1962; 51: 172
- 5 程克勤, 党鑫让, 李华儒. 色谱, 1995; 13(1): 51
- 6 Geng X D, Chang X Q. J Chrom atogr, 1992; 599: 185
- 7 李华儒, 党鸿喜. 西北大学学报(自然科学版), 1991; 21: 93
- 8 常建华, 耿信笃, 殷剑宁. 色谱, 1991; 9(2): 110
- 9 Hibbard L S, Tulinsky A. Biochemistry, 1978; 17: 5460
- 10 Jandra P, Rozkosan J. J Chrom atogr, 1986; 362: 325
- 11 Weissman J S, Kim P S. Science, 1991; 253: 1386

## Investigation of $\alpha$ -Amylase Denatured by Urea and Guanidine Hydrochloride

### I. Studies on Denaturation Mechanism and Renaturation Efficiency by High-Performance Hydrophobic Interaction Chromatography

Bai Quan, Wei Yinmao and Geng Xindu\*

(Institute of Modern Separation Science, Northwest University, Xi'an, 710069)

**Abstract** The varieties of  $\alpha$ -amylase denatured with 8.0 mol/L urea and 7.0 mol/L guanidine hydrochloride (GuHCl) solutions and their refolded intermediates were separated and renatured through high performance hydrophobic interaction chromatography (HPHIC). With investigating and comparing the numbers of the refolded intermediates and the bioactivity recovery of renaturation by means of HPHIC, it was found that these are quite different. The results can be attributed to the different denaturation mechanism of  $\alpha$ -amylase with the two denaturing agents. The numbers of the refolded intermediates of urea-unfolded  $\alpha$ -amylase were found to be more than that denatured by GuHCl, because GuHCl may make the changes in the surface of  $\alpha$ -amylase molecules, by contrast, urea may do the changes not only in the surface of the protein, but also in the hydrophobic packet interior of the molecules. The HPHIC packings with weak hydrophobicity was found to have good separation efficiency and to have almost continuous and many peaks denoting these intermediates, while that with strong hydrophobicity was found to have higher bioactivity recovery. The numbers of the intermediates of urea-unfolded  $\alpha$ -amylase were much more than that of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) separated by Weissman *et al.* The effect of temperature on the separations and the renaturations were investigated too. The result showed that the higher the column temperature, the more the refolded intermediates of unfolded  $\alpha$ -amylase separated and the lower bioactivity recovery were obtained from HPHIC.

**Key words** high-performance hydrophobic interaction chromatography, protein refolding,  $\alpha$ -amylase, denaturation mechanism

## 《气相色谱专家系统》征购

中国科学院大连化学物理研究所-国家色谱研究分析中心卢佩章教授(中国科学院院士)、许国旺博士的专著《气相色谱专家系统——最佳柱系统的选择及其软件》获得山东科技出版社“泰山科技专著出版基金”资助,已于1994年夏出版。本书由浅入深地对气相色谱专家系统的理论和实践依据及其计算机软件作了详细介绍。书中既总结了作者三十余年在色谱理论和实践方面的成果,又较全面地归纳了大量文献中的色谱实践,对目前国际上尚未彻底解决的两个问题即“什么样品应采用气相色谱法分析”和“应采用哪种气相色谱柱系统”作了系统的回答,并给出了相应的气相色谱专家系统软件。全书分三章,两个附录,共约45万字。书价38元,包装费、邮费7元。

欲订购者请与《色谱》编辑部孙树平联系,地址:大连市中山路161号,邮编:116012,电话:3693405。