

体积排阻色谱法研究变性溶菌酶分子复性过程中集聚体的形成

边六交, 杨晓燕, 刘 莉

(西北大学生命科学院基因工程中心, 陕西 西安 710069)

摘要 :在体积排阻色谱柱上研究了还原剂存在时脲和盐酸胍变性的 3 种溶菌酶溶液的复性和分离过程。当变性液中原始溶菌酶浓度大于 10 g/L 时,变性溶菌酶在体积排阻色谱柱上除了复性为与未变性溶菌酶出峰时间相同的复性态溶菌酶分子外,还形成了溶菌酶折叠中间体的二分子集聚体。这个结果得到了用稀释法复性时溶菌酶的蛋白电泳检测结果的支持。与稀释法复性相比较,用体积排阻色谱法复性时所形成的折叠中间体二分子集聚体的量要远远低于用稀释法所形成的集聚体的量。

关键词 :体积排阻色谱法 ;溶菌酶 ;复性过程 ;集聚体

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)02-0129-05

Studies on Formation of Aggregates from Denatured Lysozymes upon Renaturing with Size Exclusion Chromatography

BIAN Liujiao, YANG Xiaoyan, LIU Li

(Center of Gene-engineering, College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract :In order to study the renaturation mechanism of denatured protein in denaturant solution, the renaturation and separation process for three kinds of lysozyme molecules, which were separately denatured by urea and guanidine hydrochloride in the presence of reducing agents, was studied by size exclusion chromatography. When initial lysozyme concentration in denaturant solution was more than 10 g/L, the denatured lysozyme molecules were renatured and isolated in a size exclusion chromatographic column. A refolded lysozyme intermediate, a bi-molecular aggregate, was found. This result was confirmed by non-reducing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of renatured lysozyme molecules with the dilution method. Compared with the dilution method, the amount of the bi-molecular aggregate found by size exclusion chromatography was far less than that found in the dilution method. This result shows that the process for the renaturing of denatured lysozyme molecules in solution can be well described with three-state model in the presence of reducing agents.

Key words :size exclusion chromatography ; lysozyme ; renaturation process ; aggregate

变性蛋白质在复性过程中的复性机理研究一直是生物物理学和应用生物技术研究的热点之一。实际上,人们对于蛋白质折叠过程的了解主要来自于对脲、盐酸胍、酸碱和热等变性的蛋白质的复性过程的研究。目前,三态模型一般被认为是描述变性蛋白质复性过程的较有代表性的模型之一^[1-3]。这个模型认为,当变性蛋白质从完全变性态折叠到完全复性态时一般要经过一个折叠状态中间体。而正是折叠状态中间体的存在,才可能导致变性蛋白质分子之间形成集聚体。到目前为止,人们对于变性蛋白质复性过程中集聚体的形成机理和组成了解得并

不多,由于在折叠中间体分子中存在着许多疏水区域和可能被还原的半胱氨酸残基,因此当它们进一步复性时,在它们的分子内或分子间就会发生疏水相互作用或形成二硫键。一般来讲,分子内的作用有利于蛋白质的正确折叠,会促进蛋白质的复性,而分子间的作用则会导致蛋白质的错误折叠,使折叠中间体分子之间发生集聚反应从而形成集聚体,不利于变性蛋白质的复性^[4-6]。这种特异集聚体的形成是变性蛋白质复性过程中的主要副反应^[7],它能够反映出这些折叠中间体形成“错误的”链间相互作用或“正确的”链内相互作用的能力^[8,9]。

用体积排阻色谱进行变性蛋白质的折叠是近几年发展起来的一种蛋白质折叠的新方法。由于蛋白质分子和变性剂分子的体积差别较大,因此利用排阻色谱介质就能够逐渐局部降低变性剂分子的浓度,降低分子间疏水相互作用或二硫键错配发生的几率。这种方法将蛋白质折叠与分离过程结合起来,在进行蛋白质折叠的同时也实现了产品的纯化^[10-13]。这种方法同时也提示我们,采用体积排阻色谱很有可能监测蛋白质在复性过程中集聚体的形成。在本文中,我们利用体积排阻色谱法研究了3种溶菌酶在脲和盐酸胍溶液中复性时集聚体的形成,并以凝胶电泳的检测结果对体积排阻色谱的检测结果进行佐证。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

日本 Shimadzu 公司的 LC-10A 型高效液相色谱仪,美国 BIO-RAD 公司的 Mini-PROTEIN® II 型垂直板蛋白电泳仪。

母鸡蛋白溶菌酶(hen egg white lysozyme, 40 000 U/mg)购自 Boehringer Mannheim 公司;蛋白溶菌酶(egg white lysozyme 20 000 U/mg)购自上海生工生物工程公司(Amresco 公司分装);两种溶菌酶氨基酸序列相同。火鸡蛋白溶菌酶(turkey egg white lysozyme, 77 000 U/mg)购自 Sigma 公司,它与上述溶菌酶的差异在于其 101 位是 Gly 而不是 Asp。 α -淀粉酶(α -amylase)和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自上海丽珠东风生物技术有限公司;微球菌干细胞(micrococcus lysodeikticus)购自 Sigma 公司;盐酸胍(guanidine hydrochloride, 高纯度)、还原型和氧化型谷胱甘肽(reduced and oxidized glutathione, 高纯度)均购自上海生工生物工程公司,其余试剂均为分析纯。

1.2 溶菌酶的变性和复性

3 种溶菌酶的变性和复性过程分别参照 Ristow 和 Wetlaufer^[14]及 Wetlaufer 和 Saxena^[15]的方法并稍加改进。母鸡溶菌酶和火鸡溶菌酶在盐酸胍溶液中的变性过程为:在含 6.0 mol/L 盐酸胍和 0.15 mol/L 2-巯基乙醇的 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲液(pH 8.6)中加入溶菌酶,使其终浓度为 10.0 g/L,并置于 20 °C 摇床中振荡 2 h。它们的复性过程为:将变性溶菌酶溶液快速稀释到不同体积的含给定浓度的盐酸胍溶液中,使最终复性液中盐酸胍的浓度均保持在 1.25 mol/L,在 20 °C 摇床中振荡至少 3 h。复性液中除盐酸胍外,还含有 0.1 mol/L Tris-HCl, 1 mmol/L 乙二胺四乙酸

(EDTA)、3.0 mmol/L 还原型谷胱甘肽和 0.3 mmol/L 氧化型谷胱甘肽(pH 8.2)。蛋白溶菌酶在脲溶液中的变性和复性过程与上述溶菌酶的变性过程基本一致,只是此时变性液中脲的浓度是 10 mol/L,复性液中脲的最终浓度是 3.0 mol/L。

1.3 溶菌酶活性和蛋白质浓度的测定

溶菌酶活性的测定参照文献^[16],通过在 25 °C、450 nm 检测波长下反应液在不同时间内光吸收的减少量来测定。在 1 mL 含 0.06 mol/L 磷酸钾的 0.25 g/L 微球菌干细胞悬浮液(pH 6.2)中加入 0.1 mL 复性溶菌酶溶液,测定不同时间的光密度。一个活性单位相当于每分钟减少 0.0026 的光吸收。蛋白质浓度的测定采用 Bradford 法,以 BSA 作为标准物。

1.4 凝胶体积排阻色谱分析

变性溶菌酶溶液的色谱分析在凝胶体积排阻色谱柱上进行。色谱柱为日本 Shimadzu 公司的 Shim-pack DIOL-300 型色谱柱(7.9 mm i. d. × 25 cm,分离物质的相对分子质量范围为 5 000 ~ 8 000),流动相为含 0.2 mol/L 硫酸钠的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0),流速 1.0 mL/min,上样量 50 μ L,检测波长 280 nm。

1.5 电泳分析

复性溶菌酶溶液的电泳分析通过不连续十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行,浓缩胶和分离胶分别是 5%和 15%,样品处理液中不含巯基乙醇,用考马斯亮蓝 R-250 染色。

2 结果和讨论

2.1 溶菌酶复性过程的体积排阻色谱分析

将经过脲和盐酸胍变性的蛋白溶菌酶、母鸡溶菌酶和火鸡溶菌酶溶液在 Shim-pack DIOL-300 体积排阻色谱柱上进行复性,结果发现 3 种溶菌酶在此柱上的复性和分离图谱几乎完全一致。图 1、图 2 和图 3 分别给出了未变性的蛋白溶菌酶、经过脲和盐酸胍变性的蛋白溶菌酶在此柱上的复性和分离图谱。为了能够更清楚地观察它们的复性和分离图谱,在图 2 和图 3 中的右半部分同时给出了各自色谱图在基线附近的放大图谱。活性测定结果表明,图 2 和图 3 中约 9.4 min 的流出峰具有溶菌酶活性,而约 12 min 的流出峰没有活性。Bradford 法分析结果表明,约 9.4 min 的流出峰为蛋白质峰,而约 12 min 的流出峰为复性液中 2-巯基乙醇、还原型和氧化型谷胱甘肽等其他小分子组分。

比较图 2、3 和 1,可以看出(1)经过脲和盐酸胍变性的蛋白溶菌酶在 Shim-pack DIOL-300 柱上

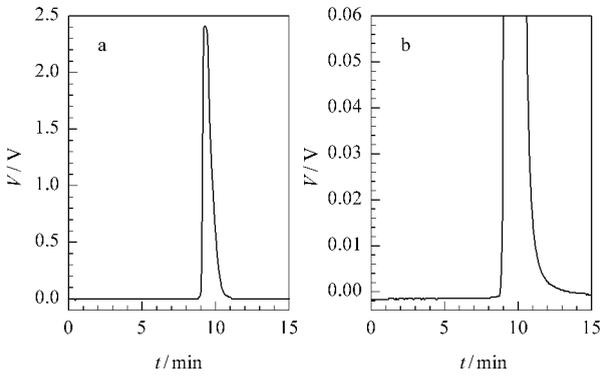


图 1 未变性蛋白溶菌酶在凝胶排阻色谱柱上的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of native lysozyme on a size exclusion chromatographic column

Chromatographic column: Shim-pack DIOL-300 (7.9 mm i. d. × 25 cm); mobile phase: 10 mmol/L PBS including 0.2 mol/L Na_2SO_4 (pH 7.0); flow-rate of mobile phase: 1.0 mL/min; sample solution: 50 μL egg white lysozyme solution (15 g/L).

a. original chromatogram; b. amplified chromatogram.

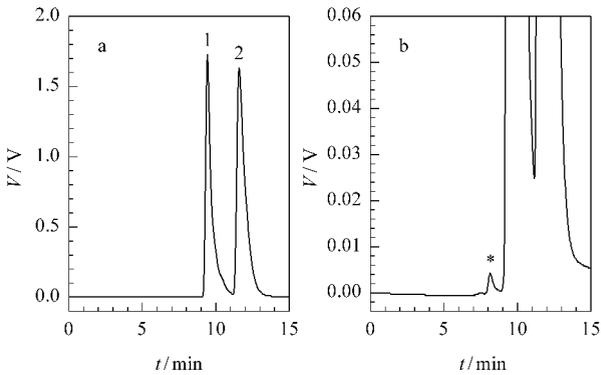


图 2 脲变性蛋白溶菌酶在凝胶排阻色谱柱上的复性过程色谱图

Fig. 2 Chromatograms of egg white lysozyme denatured by 10 mol/L urea on a size exclusion chromatographic column

Sample solution: 50 μL egg white lysozyme solution (15 g/L) denatured by 10 mol/L urea. The other chromatographic conditions are the same as in Fig. 1.

a. original chromatogram; 1. lysozyme; 2. other non-protein components. b. amplified chromatogram; *. lysozyme aggregate.

复性后的出峰时间分别为 9.40 和 9.46 min, 它们和未变性的蛋白溶菌酶の出峰时间(9.36 min)几乎一致。这个结果与卢滇楠和刘铮的结果^[13]并不一致。(2) 经过脲和盐酸胍变性的蛋白溶菌酶在 Shim-pack DIOL-300 柱上复性和分离后, 均在已经复性的蛋白溶菌酶色谱峰前出现了蛋白溶菌酶的集聚体。在脲变性的蛋白溶菌酶的复性和分离图谱中, 集聚体的出峰时间约为 8.14 min, 而在盐酸胍变性的蛋白溶菌酶的复性和分离图谱中, 集聚体的出峰时间约为 8.42 min。同时实验发现, 只有当变性液中原始溶菌酶的浓度大于 10 g/L 时才会出现

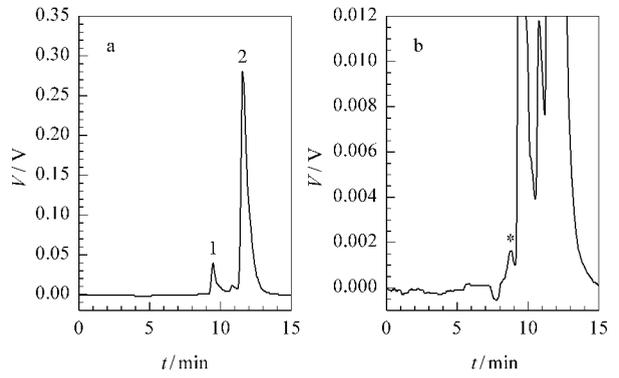


图 3 盐酸胍变性蛋白溶菌酶在凝胶排阻色谱柱上的复性过程色谱图

Fig. 3 Chromatograms of egg white lysozyme denatured by 6.0 mol/L guanidine hydrochloride on a size exclusion chromatographic column

Sample solution: 10 μL egg white lysozyme solution (15 g/L) denatured by 6.0 mol/L guanidine hydrochloride. The other chromatographic conditions are the same as in Fig. 1.

a. original chromatogram; 1. lysozyme; 2. other non-protein components. b. amplified chromatogram; *. lysozyme aggregate.

变性溶菌酶的集聚体; 而当变性液中原始溶菌酶的质量浓度小于 10 g/L 时, 则很难观察到变性溶菌酶的集聚体。这表明尽管凝胶色谱介质的存在降低了变性蛋白质的局部浓度, 减少了溶菌酶折叠中间体集聚体的形成几率, 但它并不能完全防止集聚体的形成。(3) 在脲和盐酸胍变性的蛋白溶菌酶的复性过程中, 形成蛋白溶菌酶折叠中间体的集聚体的量是非常少的。在脲变性的蛋白溶菌酶的体积排阻色谱复性过程中, 产生的折叠中间体集聚体的量约是已经复性的蛋白溶菌酶的 1/850; 而在盐酸胍变性的蛋白溶菌酶的复性过程中, 产生的集聚体的量约是已经复性的蛋白溶菌酶的 1/40(均为紫外吸收比较)。这同时也说明了体积排阻色谱不失为一种较好的变性蛋白质的复性方法。

2.2 集聚体相对分子质量的测定

为了能够测定经过脲和盐酸胍变性的蛋白溶菌酶在 Shim-pack DIOL-300 柱上复性过程中所形成的集聚体的相对分子质量, 我们用几种蛋白质标准物测定了所用体积排阻色谱柱的校正曲线。图 4 给出了以牛血清白蛋白、 α -淀粉酶和蛋白溶菌酶为蛋白质标准物的 Shim-pack DIOL-300 柱的校正曲线。校正曲线的线性方程为:

$$\ln M_r = -0.617V_e + 15.354 \quad (r^2 = 0.993) \quad (1)$$

其中 M_r 表示所用校正蛋白质标准物的相对分子质量, V_e 为校正蛋白质标准物的出峰体积(由出峰时间换算而来, mL), r^2 为线性拟合的相关系数。用线性方程(1)进行集聚体相对分子质量的测定, 经过脲变性的蛋白溶菌酶在 Shim-pack DIOL-300 柱

上复性时所形成的集聚体的相对分子质量约为 30 700 经过盐酸胍变性的蛋白溶菌酶复性时所形成的集聚体的相对分子质量约为 25 800。

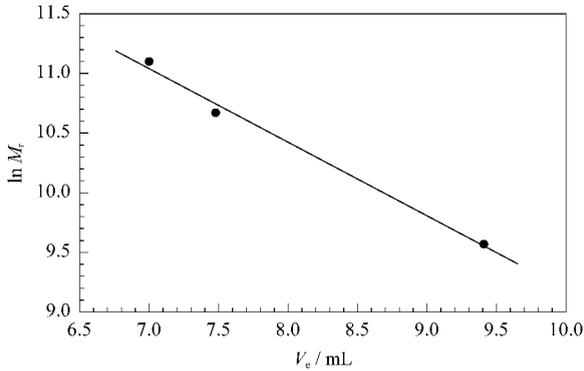


图 4 几种蛋白质标准物在 Shim-pack DIOL-300 柱上的 $\ln M_r - V_e$ 校正曲线

Fig. 4 Calibration curve $\ln M_r - V_e$ for some proteins on a Shim-pack DIOL-300 column

Sample solution : 10 μL egg white lysozyme , α -amylase and BSA intermixture solution (2.0 g/L , respectively). The other chromatographic conditions are the same as in Fig. 1.

蛋白溶菌酶的相对分子质量约为 14 400 ,它的二聚体的相对分子质量应约为 28 800。经过脲变性的蛋白溶菌酶在 Shim-pack DIOL-300 柱上复性过程中所形成的集聚体的相对分子质量约为 30 700 ,比蛋白溶菌酶二聚体的相对分子质量约高 7% ;而经过盐酸胍变性的蛋白溶菌酶在复性过程中所形成的集聚体的相对分子质量约为 25 800 ,比蛋白溶菌酶二聚体的相对分子质量约低 10%。考虑到实验误差 ,我们可以得出结论 ,经过脲和盐酸胍变性的蛋白溶菌酶在 Shim-pack DIOL-300 柱上复性时形成了二分子折叠中间体的集聚体。

2.3 复性溶菌酶的电泳分析

为了证实由体积排阻色谱检测的变性溶菌酶复性过程中集聚体的形成 ,我们对 3 种溶菌酶在脲和盐酸胍溶液中的复性溶液进行了电泳检测 ,图 5 给出了这 3 种溶菌酶在两种变性剂溶液中的电泳分析图谱。图 5 中的 1 ~ 5 道电泳图谱显示出这 3 种溶菌酶在脲溶液中复性时 ,除了复性成相对分子质量为 14 400 的单分子复性态溶菌酶外 ,同时在溶液中也形成了相对分子质量约为 29 000 的双分子折叠中间态的集聚体。由于盐酸胍变性的溶菌酶溶液的粘度非常高 ,它们的电泳分析非常困难 ,在图 5 的第 6 道中 ,似乎只能看出相对分子质量为 14 400 的单分子复性态溶菌酶 ,几乎看不到折叠中间体溶菌酶的集聚体。可是经过我们多次仔细反复实验和叠加扫描 ,还是能够观察到变性溶菌酶分子在盐酸胍溶液中复性时所形成的相对分子质量约为 29 000 的二分

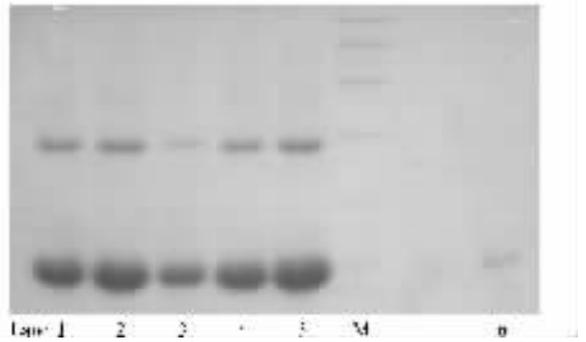


图 5 变性溶菌酶在脲和盐酸胍溶液中复性的非还原 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 The non-reducing SDS-PAGE of denatured lysozymes in urea and guanidine hydrochloride solutions

Lanes 1 and 2 : denatured turkey egg white lysozyme in urea solution ; lane 3 : denatured hen egg white lysozyme in urea solution ; lanes 4 and 5 : denatured egg white lysozyme in urea solution ; lane 6 : denatured egg white lysozyme in guanidine hydrochloride solution ; M : molecular weight marker (from up to bottom , they are 97 400 , 66 200 , 43 000 , 31 000 , 22 100 and 14 400 , respectively).

子折叠中间体的集聚体。这样溶菌酶在盐酸胍和脲溶液中复性的电泳检测结果与上面的体积排阻色谱检测结果是一致的 ,从而证实了它们在脲和盐酸胍溶液中复性时形成了二分子集聚体的推测。

在图 5 中 ,溶菌酶在脲溶液中复性形成的二分子折叠中间体集聚体的量约是单分子复性态溶菌酶的 20%。与经过 Shim-pack DIOL-300 柱的复性过程相比较 ,此时形成的二分子集聚体的量要远远高于用体积排阻色谱复性所形成的二分子集聚体的量。这也从另一个方面说明了用体积排阻色谱复性变性蛋白质的有效性。

溶菌酶分子是由 129 个氨基酸残基组成的单体蛋白质 ,其中含有 4 个二硫键(6-127 ,30-115 ,64-80 和 76-94) ,活性部位为 35 位的谷氨酸残基和 52 位的天冬氨酸残基 ,是一类结构比较稳定的蛋白质^[17 ,18]。溶菌酶分子经过变性剂和还原剂变性后 ,分子中的二硫键被打断 ,当这些变性的溶菌酶分子复性时 ,一方面由于其折叠中间体分子之间存在着二硫键错接的可能 ,另一方面由于其折叠中间体分子之间的疏水区域存在着发生非特异性疏水相互作用的可能 ,从而导致了折叠中间体溶菌酶分子之间形成了无活性的二分子集聚体。至于到底是由于分子之间二硫键的错接还是由于分子之间的疏水相互作用亦或是它们二者共同导致了变性溶菌酶分子在复性过程中形成了二分子集聚体 ,则还需进一步的实验进行证实。

当还原剂二硫苏糖醇(DTT)存在时 ,溶菌酶在

盐酸胍和脲溶液中的变性过程符合二态模型;而当变性液中不存在还原剂 DTT 时,它在盐酸胍和脲溶液中的变性过程符合三态模型^[19];但溶菌酶在盐酸胍和脲溶液中的复性过程到底符合三态模型还是二态模型则未见文献报道。本文的实验结果似乎更支持有还原剂存在时溶菌酶在盐酸胍和脲溶液中的复性过程符合三态模型,由此看来溶菌酶在脲和盐酸胍溶液中的复性过程要比它的变性过程来得更为复杂。

参考文献:

- [1] Ptitsyn O B. *Protein Eng*, 1994, 7(5): 593
- [2] Hinds D A, Levitt M. *Trends Biotechnol*, 1995, 13(1): 23
- [3] Gorovits B M, McGee W A, Horowitz P M. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1382(1): 120
- [4] Rudolph R, Zettlmeissl G, Jaenicke R. *Biochemistry*, 1979, 18(25): 5 572
- [5] Brems D N. *Biochemistry*, 1988, 27(12): 4 541
- [6] Serrano L, Matouschek A, Fersht A R. *J Mol Biol*, 1992, 224(3): 805
- [7] Hagen A J, Hatton T A, Wang D I C. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 35(10): 966
- [8] London J, Skrzynia C, Goldberg M E. *Eur J Biochem*, 1974, 47(2): 409
- [9] Goldberg M E, Zetina C R. In: Jaenicke R. *Protein Folding*. Amsterdam and New York: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980. 469
- [10] Batas B, Jones H R, Chaudhuri J B. *J Chromatogr A*, 1997, 766 : 109
- [11] Batas B, Schiraldic C, Chaudhuri J B. *J Biotechnology*, 1997, 68 : 149
- [12] Batas B, Chaudhuri J B. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 50(1): 16
- [13] Lu Diannan, Liu Zheng. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (卢滇楠, 刘 铮. 化工学报), 2002, 53(10): 1 028
- [14] Ristow S S, Wetlaufer D B. *Biochem Biophys Res Commun*, 1973, 50(2): 544
- [15] Wetlaufer D B, Saxena V P. *Biochemistry*, 1970, 9(25): 5 015
- [16] Dudley K S, Lars J L, Dwight E N, Ingemar B. *Biochemistry*, 1991, 30(11): 2 797
- [17] Chang J Y, Li L. *FEBS Lett*, 2002, 511 : 73
- [18] Sasahara K, Demura M, Nitta K. *Proteins*, 2002, 49 : 472
- [19] Yang Fang, Liang Yi, Yang Fang (Jr). *Acta Chimica Sinica* (杨 芳, 梁 毅, 杨 芳(小). 化学学报), 2003, 61(6): 803

作者更正

由于本人的失误,导致《色谱》2004 年第 1 期第 33 ~ 35 页上发表的本文为第一作者的论文“微柱高效液相色谱法测定大鼠脑微透析液中的乙酰胆碱和胆碱”有 3 处需要更正:

中文摘要的第三行及正文中“结果与讨论”部分(2)的第一段最后一句中有关乙酰胆碱和胆碱的检测限数据应由 50 nmol/L 改为 10 fmol; “结果与讨论”部分(2)的第二段最后一句的相关数据应由 50 fmol/L 改为 50 fmol。

在此,我向曾关注这篇论文的《色谱》读者表示深深的歉意!

贾兴元
2005 年 2 月 28 日