

## 溶菌酶热变性的 DSC 研究

方盈盈<sup>1</sup> 胡新根<sup>1,\*</sup> 于丽<sup>2</sup> 李文兵<sup>1</sup> 林瑞森<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>温州大学化学与材料科学学院, 浙江温州 325027; <sup>2</sup>山东大学胶体与界面化学教育部重点实验室, 济南 250100;  
<sup>3</sup>浙江大学化学系, 杭州 310027)

**摘要:** 用差示扫描量热法研究了固体溶菌酶的热变性以及水溶液中不同变性剂与浓度对溶菌酶变性的影响. 结果表明, 溶剂水的存在及变性剂尿素和盐酸胍的加入使溶菌酶的变性温度降低, 变性焓减小; 同时, 在一定的浓度范围内, 溶菌酶的变性温度和变性焓随变性剂浓度的增大而降低. 盐酸胍的变性效果较尿素强, 这是由于盐酸胍与蛋白质分子间除了氢键作用外还存在着静电作用.

**关键词:** 溶菌酶; 尿素; 盐酸胍; DSC; 热变性  
**中图分类号:** O642

## Study on Thermal Denaturation of Lysozyme by DSC

FANG Ying-Ying<sup>1</sup> HU Xin-Gen<sup>1,\*</sup> YU Li<sup>2</sup> LI Wen-Bing<sup>1</sup> LIN Rui-Sen<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>School of Chemistry and Materials Science, Wenzhou University, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, P. R. China;  
<sup>2</sup>Key Laboratory for Colloid and Interface Chemistry of the Ministry of Education, Shandong University, Jinan 250100, P. R. China;  
<sup>3</sup>Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, P. R. China)

**Abstract:** The thermal denaturation of solid lysozyme and the effects of denaturants and their concentrations on denaturation of lysozyme in aqueous solutions were studied by differential scanning calorimetry (DSC). The results showed that both denaturation temperature and denaturation enthalpy of lysozyme decreased as the existence of water and the addition of urea and guanidine hydrochloride (GuHCl). In addition, denaturation temperature and denaturation enthalpy decreased as the concentrations of urea and GuHCl increased. As a denaturant, GuHCl is more effective than urea due to its added ability of electrostatic interaction.

**Key Words:** Lysozyme; Urea; GuHCl; DSC; Thermal denaturation

在现代生物化学、生物物理学领域中, 基因组计划的实施产生了大量的 DNA 序列信息. 如何有效地利用这些信息来研究基因产物蛋白质的结构与功能成为引人注目的研究领域<sup>[1]</sup>. 蛋白质的折叠问题是研究蛋白质结构和组成的有效方法, 因而引起人们极大的兴趣. 有关蛋白质变性的研究工作始于 20 世纪 20 年代. 1931 年 Wu<sup>[2]</sup>首先提出了蛋白质变性的概念, 指出蛋白质变性不是蛋白质分子化学结构变化而是其空间结构的变化所导致的, 这一观点已为生物化学界所普遍接受. 蛋白质变性过程中, 维系其空间结构的次级键被破坏, 原有的空

间结构解体, 整个分子的形状由天然蛋白紧密的球形结构伸展为松散的无特定空间结构的链状分子. 在去除变性因素后, 很多变性蛋白质可以自发地恢复它原有的空间结构和生物活性, 这一过程称为变性蛋白质的重折叠. 蛋白质分子的折叠和去折叠是一个具有高度协同性的过程, 伴随着焓、熵的显著变化<sup>[3]</sup>. 研究蛋白质在不同条件下的变性/复性过程, 对于理解具有一定氨基酸序列结构的多肽链如何逐步卷曲形成具有特定空间结构的蛋白质分子具有重要意义<sup>[4,5]</sup>.

溶菌酶是一种小的单体球蛋白, 由 129 个氨基

Received: June 2, 2006; Revised: August 21, 2006.

\*Corresponding author. Email: hxgwzu@126.com.

国家自然科学基金(20073039)、浙江省教育厅科研项目(20031104)和胶体与界面化学教育部重点实验室(山东大学)开放课题(200506)资助项目

© Editorial office of Acta Physico-Chimica Sinica

酸组成,含有4个二硫键,是蛋白质折叠和去折叠研究的良好模型蛋白<sup>[6-18]</sup>.本文主要利用DSC研究固体溶菌酶的热变性及其在变性剂尿素和盐酸胍存在下水溶液中溶菌酶的变性行为,考察变性剂的种类和浓度对变性过程热力学性质的影响.

## 1 实验部分

溶菌酶为冻干粉末,超纯级,Amresco 0663;盐酸胍,纯度 $\geq 98.5\%$ ,Amresco E424;氯化钠,纯度 $\geq 99.5\%$ ,Amresco X190.尿素,纯度 $\geq 99.0\%$ ;Bis-Tris,纯度 $\geq 99.0\%$ ,均购自Sigma公司.配制含NaCl为 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,pH=6.45的Bis-Tris缓冲液;尿素浓度为 $10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,盐酸胍(GuHCl)浓度为 $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的贮备液.

测量时配制含不同浓度变性剂的溶菌酶溶液,酶的浓度均为 $40.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .用TA-Q1000型DSC记录各样品的热转变曲线.仪器温度精度 $\pm 0.05 \text{ }^\circ\text{C}$ ,量热精度(金属标样) $\pm 1\%$ ,灵敏度 $0.2 \text{ W}$ .使用前用高纯钢对仪器作温度和热量标定.实验扫描温度范围为 $10\text{--}90 \text{ }^\circ\text{C}$ ,扫描速率为 $3 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ,以99.999%高纯氮气作为载气,流速 $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .实验取 $T_c$ 为开始出峰的温度, $T_m$ 为峰顶温度, $\Delta H_m$ 为变性焓,FWHM为半峰宽, $A_s$ 为峰对称参数(峰左侧的斜率/峰右侧的斜率).

## 2 结果和讨论

### 2.1 固体溶菌酶的热变性以及在变性剂存在下水溶液中溶菌酶的变性

图1为固体溶菌酶的典型DSC热转变曲线.从图可见,当温度达到 $75.90 \text{ }^\circ\text{C}$ 后,样品快速吸热形成峰顶温度 $T_m$ 为 $125.06 \text{ }^\circ\text{C}$ ,焓变 $\Delta H_m$ 为 $181.0 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ ,

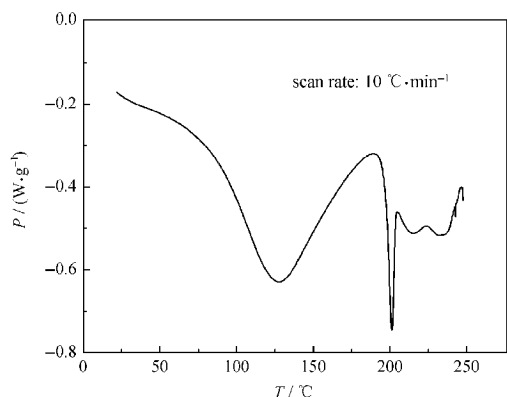


图1 固体溶菌酶的DSC热转变曲线

Fig.1 Typic DSC curve of solid lysozyme

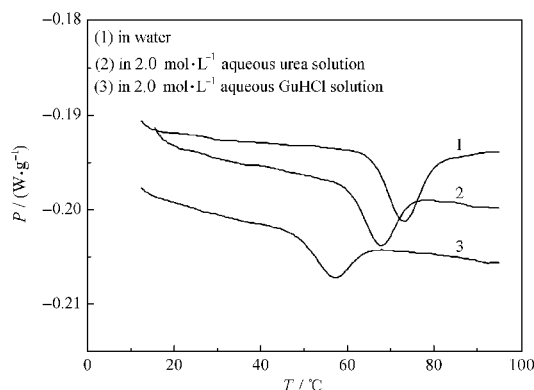


图2 溶菌酶在水、尿素水溶液以及盐酸胍水溶液中的DSC热转变曲线

Fig.2 Typic DSC curves of lysozyme in water, aqueous urea solution and GuHCl solution

半峰宽FWHM为 $56.09 \text{ }^\circ\text{C}$ ,峰对称参数 $A_s$ 为1.37的深且宽的峰.这是由于温度的升高,样品吸收的能量也逐渐的上升.当能量达到了固体溶菌酶的二、三级结构的域能时,固体溶菌酶将吸热逐渐伸展变性成肽链,即该样品的热容发生了明显的变化.继续加热到 $200 \text{ }^\circ\text{C}$ 后,出现了系列不规则的峰系,推测样品发生了热分解.

图2为三种溶菌酶溶液的DSC热转变曲线.相应的热力学参数列于表1中.从图可见,当溶菌酶溶于水后,在 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 左右形成一个对称的吸热单峰.峰形较固体样品明显变小变窄, $T_c$ 、 $T_m$ 降低, $\Delta H_m$ 变小,且具有更好的对称性,在 $10\text{--}90 \text{ }^\circ\text{C}$ 内无热分解现象.说明样品变成溶液形式后,结构发生了变化,稳定性降低,使能量较低时便能引起二、三级结构的破坏,但并未影响其一级结构的化学键.这是由于水的加入,使溶菌酶内部的疏水侧链间的相互作用减弱,维系蛋白质立体结构的疏水腔变得松散,因此相应蛋白质伸展的能量随之降低.蛋白质和溶剂的相互作用在决定天然蛋白质的构象和稳定性中起重要作用<sup>[19]</sup>.世界上第一个蛋白质结构发表就是基于球蛋白中憎水氨基酸侧链避开水的此热力学依据<sup>[20]</sup>.

表1 溶菌酶在水、尿素水溶液和盐酸胍水溶液中热变性的热力学参数

Table 1 The thermodynamic parameters of thermal denaturation of lysozyme in water, aqueous urea solution and GuHCl solution

$c/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$T_c/^\circ\text{C}$	$T_m/^\circ\text{C}$	$\Delta H_m/(\text{J}\cdot\text{g}^{-1})$	FWHM( $^\circ\text{C}$ )	$A_s$
0	65.97	72.83	1.4137	7.65	1.61
2.0(urea)	59.85	67.35	1.1060	8.05	1.41
2.0(GuHCl)	47.61	56.37	0.8247	9.36	1.55

同时可以发现,一定量的变性剂尿素和盐酸胍的加入, DSC 曲线的  $T_e$ 、 $T_m$  移向更低温度,  $\Delta H_m$  也相应减小, 说明溶菌酶的热稳定性更低, 更易处于伸展的变状态. 蛋白质的二级等空间结构主要由氢键的种类和数量来决定. 变性剂的加入对溶菌酶的二、三级结构变化起了诱导作用. 除溶剂部分对溶菌酶的疏水腔存在作用外, 主要是由于尿素和盐酸胍能与溶菌酶氨基酸残基形成多种氢键. 尿素是个极性分子, 尿素分子的结构决定了它与其它分子形成氢键时, 既可以作为质子供体, 也可以作为质子受体. 具体分析盐酸胍结构, 可知分子中有四个基团可作为质子供体<sup>[21]</sup>, 易形成各种氢键. 模型化合物实验表明<sup>[22]</sup>, 盐酸胍分子与肽链上的两个相邻肽段间可形成一个环状结构, 这种双氢键结合形式较单氢键结合在水中更稳定. Privalov 等<sup>[23]</sup>对结合位点与蛋白质结构参数之间的关联进行分析, 发现可以认为一个盐酸胍分子与蛋白质分子主链上的两个相邻肽段的羰基氧原子形成双氢键.

## 2.2 变性剂浓度对溶菌酶热变性的影响

如图 3, 当尿素浓度  $< 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 尿素的量对溶菌酶的变性影响较小, 其 DSC 热转变曲线几乎与水中的一致, 变性峰基本对称(线 a、b、c). 当  $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \leq \text{尿素浓度} \leq 8.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, DSC 热转变曲线的变性峰随浓度的增加逐渐变小变平坦,  $T_m$  和  $\Delta H_m$  值随尿素浓度的增大而减小. 当尿素浓度增加到  $8.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 热变性峰变得很平坦且很小, 说明酶蛋白在这种条件下可以瞬间变成变状态. 有关的热力学参数列于表 2, 发现  $T_m$ - $c$ 、 $\Delta H_m$ - $c$  成良好的线性关

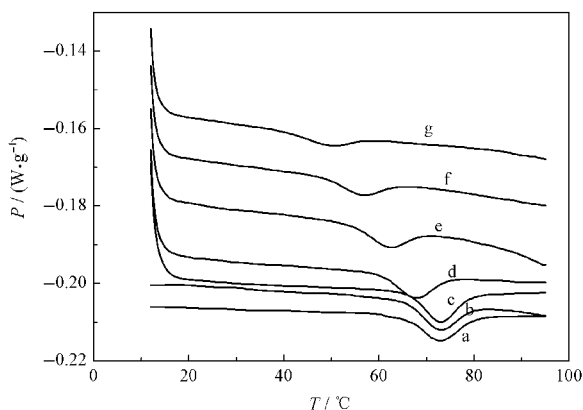


图 3 不同尿素浓度时溶菌酶的 DSC 热转变曲线

Fig.3 Typic DSC curves of lysozyme in various aqueous urea solutions

The concentrations of urea are (a) 0; (b) 0.00592; (c) 0.00119; (d) 2.0; (e) 4.0; (f) 6.0; (g)  $8.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively.

表 2 不同尿素浓度时溶菌酶热变性的热力学参数  
Table 2 The thermodynamic parameters of thermal denaturation of lysozyme in various aqueous urea solutions

$c/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$T_f/^\circ\text{C}$	$T_m/^\circ\text{C}$	$\Delta H_m/(\text{J} \cdot \text{g}^{-1})$	FWHM( $^\circ\text{C}$ )	As
0	65.97	72.83	1.437	7.65	1.61
0.00952	65.41	72.76	1.313	8.67	1.50
0.0119	65.22	72.41	1.363	7.93	1.54
2.0	59.85	67.35	1.106	8.05	1.41
4.0	53.07	61.32	1.023	8.36	1.62
6.0	46.77	55.62	0.7791	8.74	1.67
8.0	37.85	48.11	0.5737	10.55	1.64

系(图 4).

另一种变性剂盐酸胍对溶菌酶热变性也有类似的影响. 盐酸胍浓度在  $0-3.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  之间时, 其变性峰峰形基本对称, 并随浓度的增大逐渐变小变坦, 越来越不显著(图 5). 有关的热力学参数列于表 3, 发现  $T_m$ - $c$ 、 $\Delta H_m$ - $c$  也呈良好的线性关系(图 4). 但与尿素不同的是, 盐酸胍在较低浓度时就可以使蛋白质发生变性. 另外发现, 从图 5 曲线 a 到 c, 再从 c 到 f, 曲线先向下(吸热方向)位移, 然后向上(放热方向)位移.

尿素和盐酸胍两种变性剂诱导溶菌酶变性的过程之所以比较相似, 主要是因为两种变性剂都能与酶蛋白的多肽主链竞争氢键, 并增加非极性侧基在水中的溶解度, 从而破坏蛋白质的二级结构, 并降低维持三级结构的各种作用力<sup>[6]</sup>. 而盐酸胍在使蛋白质变性时能够产生更强的变性效应, 是由于盐酸胍在诱导蛋白质变性时, 除氢键外还存在着静电作用(胍离子正效应)<sup>[24,25]</sup>. 盐酸胍在较低浓度时就可以诱

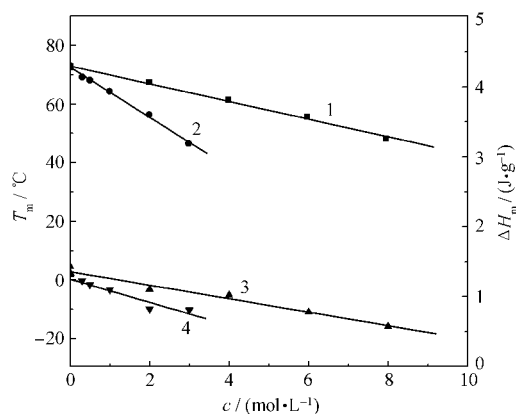


图 4 溶菌酶的变性温度、变性焓与变性剂浓度的关系图

Fig.4 Denaturation temperatures ( $T_m$ ) and denaturation enthalpies ( $\Delta H_m$ ) of lysozyme as functions of concentrations of denaturants (urea and GuHCl)

(1)  $T_m$ - $c$ : urea; (2)  $T_m$ - $c$ : GuHCl; (3)  $\Delta H_m$ - $c$ : urea; (4)  $\Delta H_m$ - $c$ : GuHCl

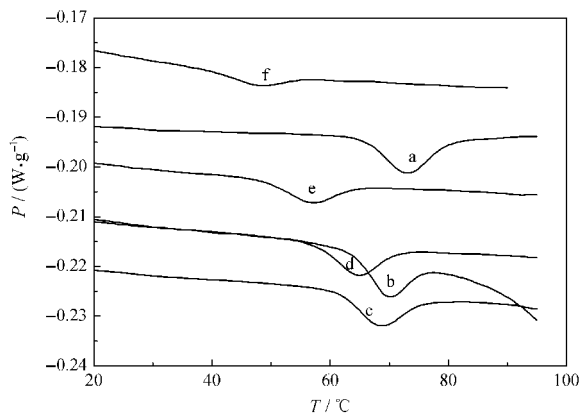


图5 不同盐酸胍浓度时溶菌酶的DSC热转变曲线  
Fig.5 Typic DSC curves of lysozyme in various aqueous GuHCl solutions

The concentrations of GuHCl are (a) 0; (b) 0.3; (c) 0.5; (d) 1.0; (e) 2.0; (f) 3.0 mol·L<sup>-1</sup>, respectively.

导蛋白质发生变性,而尿素则需较高的浓度,这种现象可用诱导变性的吸附动力学模型来解释:



式中, P 代表蛋白质, G 代表变性剂, n 为吸附变性剂分子的数目,  $k_a$  为吸附速率常数,  $k_b$  为解吸速率常数. 由(1)式, 反应平衡常数为

$$K = \frac{c_{PG}}{c_G^n \cdot c_P} \quad (2)$$

若忽略  $K$  的微小变化,  $n$  取值为 1, 则  $c_{PG} = K \cdot c_G \cdot c_P$ ,  $c_{PG}$  与  $c_G$  成正比, 随着变性剂浓度的增大, 反应向吸附变性剂的方向移动, 等价于变性温度降低, 变性峰向左移动. 由于盐酸胍分子吸附到蛋白质分子上的能力较尿素强, 因此吸附平衡常数  $K$  值较大, 发生等量变性时所需变性剂浓度较小.

## References

- Ni, L. S.; Mao, F. L.; Han, Y. Z. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2001**, **17** (5): 389 [倪立生,毛凤楼,韩玉真.物理化学学报, **2001**, **17**(5): 389]
- Wu, H. *Chin. J. Physiol.*, **1931**, **5**: 321
- Murphy, K. P.; Bhakuni, V.; Xie, D.; Freire, E. *J. Mol. Biol.*, **1992**, **227**: 293
- Anna, M.; Zofia, D. *Biophysical Chemistry*, **2005**, **118**: 88
- Sang, Z. C.; Yi, P. G.; Yu, Q. S.; Lin, R. S. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2001**, **17**(1): 48 [商志才,易平贵,俞庆森,林瑞森.物理化学学报, **2001**, **17**(1): 48]
- Yang, F.; Liang, L. *Acta Chim. Sin.*, **2003**, **61**: 803 [杨芳,梁毅.化学学报, **2003**, **61**: 803]
- Chang, J. Y.; Li, L. *FEBS Lett*, **2002**, **511**: 73
- Canet, D.; Last, A. M.; Tito, P.; Sunde, M.; Spencer, A.; Archer, D. B.; Redfield, C.; Robinson, C. V.; Dobson, C. M. *Nat. Struct. Biol.*, **2002**, **9**: 308
- Sasahara, K.; Demura, M.; Nitta, K. *Proteins*, **2002**, **49**: 472
- Sasahara, K.; Sakurai, M.; Nitta, K. *Proteins*, **2001**, **44**: 180
- Kobashigawa, Y.; Demura, M.; Koshihara, T.; Kumaki, Y.; Kuwajima, K.; Nitta, K. *Proteins*, **2000**, **40**: 579
- Laurents, D. V.; Baldwin, R. L. *Biochemistry*, **1997**, **36**: 1496
- Bachmann, A.; Segel, D.; Kiefhaber, T. *Biophys. Chem.*, **2002**, **96**: 141
- Canet, D.; Sunde, M.; Last, A. M.; Miranker, A.; Spencer, A.; Robinson, C. V.; Dobson, C. M. *Biochemistry*, **1999**, **38**: 6419
- Ibarra-Molero, B.; Sanchez-Ruiz, J. M. *Biochemistry*, **1997**, **36**: 9616
- Ibarra-Molero, B.; Sanchez-Ruiz, J. M. *Biochemistry*, **1996**, **35**: 14689
- Sasahara, K.; Sakurai, M.; Nitta, K. *J. Mol. Biol.*, **1999**, **291**: 693
- Fang, M. J.; Luo, S. N.; Wang, H. Q.; Liu, W. Y.; Zhao, Y. F. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2005**, **21**(9): 1042 [方美娟,骆书娜,王河清,刘万云,赵玉芬.物理化学学报, **2005**, **21**(9): 1042]
- Oobatake, M. *Pro. Biophys. Molec. Biol.*, **1993**, **59**: 237
- Kuntz, I. D. The protein flofing problem. Wetlaufer, D. B. Ed. USA: Westview Press, 1984: 65
- Sachu, E. F.; Luo, L. F. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis NeiMongol*, **2003**, **34**(1): 47 [萨楚尔夫,罗辽复.内蒙古大学学报, **2003**, **34**(1): 47]
- Robison, D. R.; Jencks, W. P. *J. Amer. Chem. Soc.*, **1965**, **87**: 2462
- Makhatadze, G. I.; Privalov, P. L. *J. Mol. Biol.*, **1992**, **226**: 321
- Couthon, F.; Clottes, E.; Ebel, C.; Vial, C. *Eur. J. Biochem.*, **1995**, **234**: 160
- Fan, Y. X.; McPhie, P.; Miles, E. W. *Biochemistry*, **1999**, **38**: 7881