

# 蛋白三态去折叠自由能计算新方法

郑晓艳, 杨斌盛\*

山西大学分子科学研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006

\* 联系人, E-mail: yangbs@sxu.edu.cn

2010-03-17 收稿, 2010-05-12 接受

国家自然科学基金(20771068, 20901048)、教育部博士点基金(20091401110007)和山西省自然科学基金(2010011011-1)资助项目

**摘要** 基于三态模型中的传统假设, 三态解折叠蛋白的解折叠过程可以看作是一个连续而独立的两个两态过程. 本文提出一种新的三态解折叠蛋白去折叠自由能计算新方法, 且将该方法用于计算三态解折叠蛋白 Y79W-W83F-Cu 的去折叠自由能. 数据分析表明, 用该方法求得的蛋白去折叠自由能较用先前报道的方法更精确.

**关键词**

蛋白质稳定性  
三态模型  
Y79W-W83F  
解折叠

在化学变性剂(如盐酸胍或脲)、酸、碱存在或升高温度等条件下, 蛋白质会发生解折叠, 由紧密、折叠构象变为链状分子(去折叠态). 蛋白质去折叠自由能是蛋白质天然态和去折叠态之间的吉布斯自由能差( $\Delta G^0(\text{H}_2\text{O})$ ). 大多数蛋白质的解折叠过程中只存在天然态(F)和去折叠态(U). 在解折叠过程中这种只存在两种状态的变性模型为两态模型<sup>[1-4]</sup>. 遵循两态模型的蛋白质解折叠曲线呈现典型“S”型. 目前, 两态解折叠蛋白去折叠自由能主要采用线性外推法来进行计算( $\Delta G = \Delta G^0(\text{H}_2\text{O}) + m[D]$ , 其中  $m$  表示解折叠过程中蛋白质对变性剂浓度[D]的灵敏度)<sup>[5]</sup>. 但在另一些情况, 蛋白质解折叠过程中出现一明显中间过渡态, 表明该过程不遵循简单两态模型, 而是存在部分解折叠中间态的三态过程. 该蛋白的解折叠曲线可以用三态模型( $F \xrightleftharpoons{K_{FI}} I \xrightleftharpoons{K_{IU}} U$ )<sup>[6]</sup>拟合. Perrett 等人<sup>[7-9]</sup>认为三态解折叠蛋白去折叠自由能( $\Delta G_{\text{total}}^0(\text{H}_2\text{O})$ )可以表示为两态去折叠自由能之和(公式(1)).

$$\Delta G_{\text{total}}^0(\text{H}_2\text{O}) = \Delta G_{\text{FI}}^0(\text{H}_2\text{O}) + \Delta G_{\text{IU}}^0(\text{H}_2\text{O}). \quad (1)$$

在比较结构相似的两态和三态解折叠蛋白稳定性时发现, 即使从变性曲线上明显观察到两态解折叠蛋白的稳定性大于三态解折叠蛋白, 但按公式(1)

求算所得三态解折叠蛋白去折叠自由能却远远大于两态蛋白, 明显与实际不符. 本文基于传统三态解折叠蛋白去折叠自由能计算方法中的假设: 三态解折叠蛋白去折叠过程是一个连续而独立的 2 个两态过程, 任一两态过程的自由能变与变性剂浓度成正比, 提出一个三态解折叠蛋白去折叠自由能( $\Delta G_{\text{total}}^0(\text{H}_2\text{O})$ )计算的新方法.

## 1 实验

(i) 材料. 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)和盐酸胍(GdnHCl)均购于 Sigma 公司, 生化试剂、分子生物学所用酶为 TaKaRa 公司产品, 实验所用蒸馏水均为双蒸水.

(ii) 定点突变. 以野生型 pET-20b-CopC 质粒为模板, 设计特异性引物(5'-cg gca ggc acc tgg aag gtc gat tg-3', 5'-t cag agg tga ggc cgg ggt aat cac cat g-3', 5'-gtg tct tcc gat acc cac ccg att ac-3', and 5'-tgc ccg gaa atc gac ctt cca ggt gc-3'), 根据 TaKaRa MutanBEST kit 获得重组质粒, 并由 DNA 测序鉴定.

(iii) 蛋白质纯化和表达. 在较低的诱导剂浓度(IPTG,  $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )和诱导温度(16°C)条件下, 采用与野生型 apoCopC 类似的表达、纯化过程, 可得纯度较高的突变体蛋白 Y79W-W83F<sup>[10]</sup>. Y79W-W83F 浓

度根据公式(2)计算求得.

$$\epsilon_{280} = n_{\text{Trp}} \times 5500 + n_{\text{Tyr}} \times 1490 + n_{\text{Cys}} \times 125 \text{ (L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}. \quad (2)$$

(iv) 光谱测定. 蛋白质的紫外吸收光谱在 Hewlett-Packard UV-Vis 吸收光谱仪上, 以所用缓冲溶液调零后测量, 蛋白质浓度为  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Y79W-W83F-Cu 的制备是将等当量的  $\text{CuCl}_2$  溶液直接加入 Y79W-W83F 溶液中得到.

盐酸胍变性实验在 Cary Varian Eclipse 上进行. Y79W-W83F-Cu 溶液中加入一定量 GdnHCl 溶液, 反应 30 min 后扫描荧光光谱. 荧光激发波长设为 295 nm, 激发和发射狭缝均为 10 nm. 实验过程中通过循环水浴控制温度, 所有测定均恒定在  $25^\circ\text{C}$ , 所用缓冲液均为  $\text{pH } 7.4, 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Hepes.

(v) 数据分析. 按照传统三态解折叠蛋白去折叠自由能计算方法中的假设: 三态解折叠蛋白去折叠过程是一个连续而独立的 2 个两态过程, 任一两态过程的自由能变与变性剂浓度成正比, 提出下列 3 个假设以计算三态解折叠蛋白去折叠自由能 ( $\Delta G_{\text{total}}^0(\text{H}_2\text{O})$ ).

假设一: 当变性体系中蛋白质完全处于天然态 (F)、中间过渡态(部分解折叠态) (I) 或去折叠态 (U) 时, 其光谱信号随体系中变性剂浓度变化而保持不变.

将变性过程中观察到的光谱信号 ( $S_C$ ) 根据公式(3) 转化为表观变性百分数 (unfolding fraction)  $Y_{\text{app}}$ ,  $Y_{\text{app}}$  随变性剂浓度变化的曲线即为蛋白质解折叠曲线. 实验测得的表观变性百分数随变性剂浓度的变化如图 1(A) 中 (○) 所示. 从中可观察到一明显中间态, 该中间态将蛋白解折叠过程分为两个解折叠过程, 即三态解折叠.

$$Y_{\text{app}} = \frac{S_C - S_F}{S_U - S_F}, \quad (3)$$

其中  $S_C$  是在一定变性剂浓度下观察到的体系的光谱信号;  $S_F$  和  $S_U$  分别是体系中蛋白质完全处于天然态和去折叠态时的光谱信号.

三态解折叠曲线在每一解折叠过程中的实验数据均可按照两态模型处理 (公式(4a), (4b)).

$$\Delta G_{\text{FI}} = -RT \ln \frac{S_C - S_F}{S_I - S_C} = \Delta G_{\text{FI}}^0(\text{H}_2\text{O}) + m_{\text{FI}}[D], \quad (4a)$$

$$\Delta G_{\text{IU}} = -RT \ln \frac{S_C - S_I}{S_U - S_C} = \Delta G_{\text{IU}}^0(\text{H}_2\text{O}) + m_{\text{IU}}[D], \quad (4b)$$

其中  $S_I$  是体系中蛋白质完全处于中间态时的光谱信号.

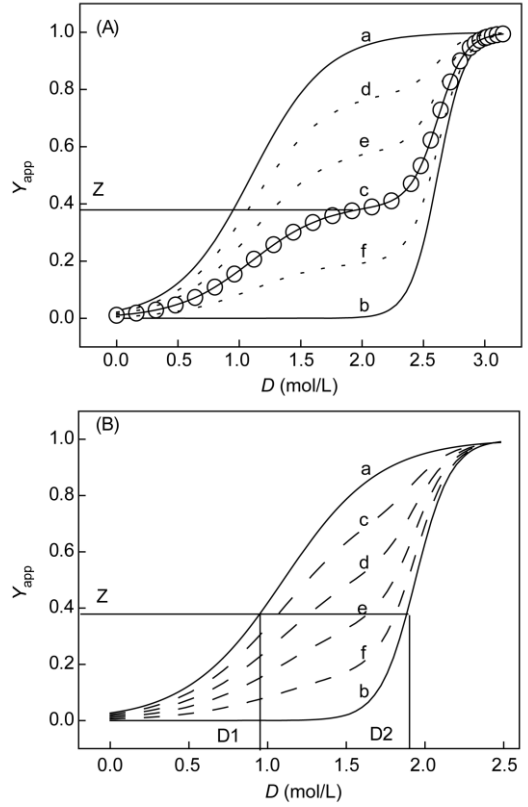


图 1 蛋白质三态解折叠曲线

(A) (○) 是实验测得的表观变性百分数, 曲线 a 和 b 由公式(5a)和(5b) 拟合得到, 实验点的拟合线 c 可由公式(7)拟合得到, 且  $\Delta D = 1.6$ . 当曲线 a 所占的百分数分别为 80%, 60%, 20% 时, 根据公式(7) 可得不同的解折叠曲线 d, e, f. 图(B) 中曲线 a 与图(A) 的相同, 曲线 b 是将(A) 中曲线 b 向左平移  $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  得到, 即  $\Delta D = 1$ . 当曲线 a 所占的百分数分别为 80%, 60%, 40% 和 20% 时, 根据公式(7) 可得不同的解折叠曲线 c, d, e 和 f

两条假想的解折叠曲线 a, b 可根据公式(5a), (5b) 拟合得到.

$$Y_a = \frac{\exp(-\Delta G_{\text{FI}} / RT)}{1 + \exp(-\Delta G_{\text{FI}} / RT)}, \quad (5a)$$

$$Y_b = \frac{\exp(-\Delta G_{\text{IU}} / RT)}{1 + \exp(-\Delta G_{\text{IU}} / RT)}, \quad (5b)$$

其中  $Y_a$  和  $Y_b$  分别表示在任一变性剂浓度下, 拟合曲线 a 和 b 的表观变性百分数.  $\Delta G_{\text{FI}}^0(\text{H}_2\text{O})$  和  $\Delta G_{\text{IU}}^0(\text{H}_2\text{O})$ ,  $m_{\text{FI}}$  和  $m_{\text{IU}}$  分别是每一解折叠过程中自由能变对变性剂浓度作图的截距和斜率. 显然, 解折叠曲线 a 和 b 遵循两态模型, 是典型的“S”型两态解折叠曲线. 根据线性外推法和公式(4)和(5), 可以推出:

$$\Delta G_a^0(\text{H}_2\text{O}) = \Delta G_{\text{FI}}^0(\text{H}_2\text{O}) \quad m_a = m_{\text{FI}}, \quad (6a)$$

$$\Delta G_b^0(\text{H}_2\text{O}) = \Delta G_{\text{IU}}^0(\text{H}_2\text{O}) \quad m_b = m_{1\text{U}} \quad (6b)$$

其中  $\Delta G_a^0(\text{H}_2\text{O})$  和  $\Delta G_b^0(\text{H}_2\text{O})$  为拟合曲线 a 和 b 代表的解折叠曲线自由能;  $m_a$  和  $m_b$  分别反映拟合曲线 a 和 b 解折叠过程对变性剂浓度的灵敏度.

假设二: 图 1(A)中实验测得的表现变性百分数( $\circ$ )可以通过解折叠曲线 a 和 b 以一定的摩尔分数叠加来拟合, 即:

$$Y_c = ZY_a + (1-Z)Y_b, \quad (7)$$

$Y_c$  代表拟合曲线 c 在任一变性剂浓度的表现变性百分数;  $Z$  是蛋白从天然态到部分解折叠态时的去折叠百分数, 定义为:  $Z = (S_I - S_F) / (S_U - S_F)$ .

根据公式(7), 由曲线 a 和 b 拟合得到的蛋白解折叠曲线与实验测得的表现变性百分数数据点较好地吻合(图 1(A)中曲线 c).

假设三: 三态解折叠曲线 c 的去折叠自由能可以表示为两态解折叠曲线 a 与 b 去折叠自由能以一定的摩尔分数相加.

$$\Delta G_{\text{total}}^0(\text{H}_2\text{O}) = Z\Delta G_a^0(\text{H}_2\text{O}) + (1-Z)\Delta G_b^0(\text{H}_2\text{O}), \quad (8)$$

根据公式(6), (8), 可得:

$$\Delta G_{\text{total}}^0(\text{H}_2\text{O}) = Z\Delta G_{\text{FI}}^0(\text{H}_2\text{O}) + (1-Z)\Delta G_{\text{IU}}^0(\text{H}_2\text{O}). \quad (9)$$

值得注意的是, 由  $Z$  的定义可知其变化范围为 0~1. 根据公式(7), 当  $Z=1$  时, 曲线 c 由三态解折叠过程转化为两态解折叠过程, 且与曲线 a 重合. 同理, 当  $Z=0$  时, 曲线 c 与曲线 b 重合. 另外, 由不同  $Z$  和  $\Delta D (D=D_2-D_1)$ , 其中  $D_1, D_2$  代表在特定变性百分数  $Z$  时, 解折叠曲线 a 和 b 所对应的变性剂浓度)将得到不同三态解折叠曲线. 图 1(A)中曲线 d, e, f 即为给定曲线 a, b 时, 根据公式(7), 由不同  $Z$  给出. 图 1(B)中给出类似的解折叠曲线, 但图 1(B)中  $\Delta D$  明显小于图 1(A).

该方法与以往报道的方法不同(见公式(9)和公式(1)). 从图 1(A)观察到, 曲线 c 或 a 所代表的蛋白质去折叠自由能小于曲线 b. 因此, 通过三态解折叠蛋白去折叠自由能计算方法求得曲线 c 的去折叠自由能应该小于根据线性外推法求得的解折叠曲线 b 的去折叠自由能. 根据公式(8)所得解折叠曲线稳定性的顺序与事实相符; 而根据公式(1)所得解折叠曲线稳定性顺序与实际相悖. 以计算 Y79W-W83F-Cu 蛋白在盐酸胍变性过程中的去折叠自由能计算为例来证明本文所提出的三态解折叠蛋白去折叠自由能计算新方法的合理性.

## 2 结果与讨论

apoCopC 溶液核磁共振结构显示该蛋白由 9 股  $\beta$  折叠通过“loop”结构连接围成希腊桶状结构<sup>[10,11]</sup>, 其中两股平行, 其余反平行, 其核心结构为  $\beta$ -疏水桶<sup>[12]</sup>. 突变体蛋白 Y79W-W83F 的荧光主要来源于位于 79 位的色氨酸残基, 其最大荧光发射峰位于 328 nm, 表明蛋白中色氨酸残基处于疏水性较强的微环境中<sup>[13]</sup>. 图 2 为 Y79W-W83F 荧光光谱随溶液中  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的变化. 由图 2 可见, 随着溶液中  $\text{Cu}^{2+}$  离子浓度逐渐增大, 蛋白质 328 nm 处的荧光被逐渐猝灭, 但荧光峰并不发生位移. 这意味着  $\text{Cu}^{2+}$  与 Y79W-W83F 蛋白发生相互作用, 且  $\text{Cu}^{2+}$  的结合并不会引起蛋白中 79 位色氨酸微环境的改变. 图 2 中插图为其滴定曲线, 从中可见, 蛋白 328 nm 处荧光强度随  $r$  的增大而逐渐减小. 当  $r=1$  时, 可观察到一个明显的转折点, 之后蛋白荧光强度将不再随  $r$  增加而变化. 这表明 Y79W-W83F 与  $\text{Cu}^{2+}$  可形成 1:1 的稳定配合物.

图 3 是实验测得的盐酸胍引起 Y79W-W83F-Cu 解折叠的表现变性百分数( $\circ$ )随盐酸胍浓度的变化. 若按两态模型处理实验数据, 并将变性过程中吉布斯自由能变对盐酸胍浓度作图可得图 3 中插图, 从中观察到自由能变随着盐酸胍浓度的变化不是简单的线性关系, 而是两个线性变化的组合. 表明蛋白(Y79W-W83F-Cu)的解折叠经历 2 个两态过程, 即蛋白解折叠遵循三态模型.

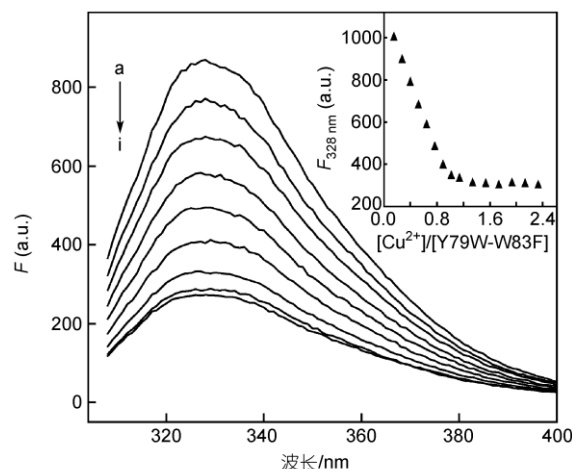


图 2 Y79W-W83F 荧光随溶液中  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的变化 Y79W-W83F ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), pH 7.4, 曲线 a-i 中  $\text{Cu}^{2+}$  浓度分别为: 0, 5, 10, 15, 23, 31, 40, 45,  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 插图为其滴定曲线

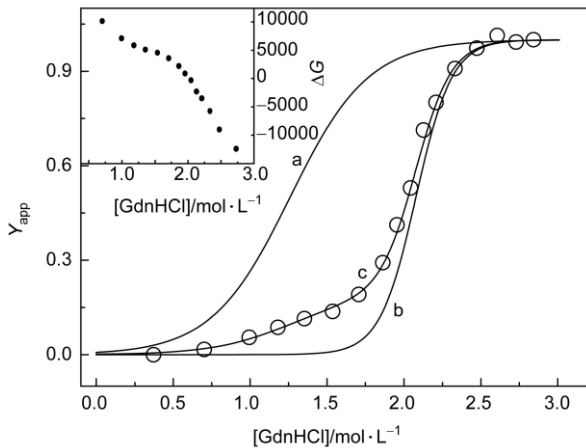


图3 由盐酸胍引起的Y79W-W83F-Cu解折叠曲线

曲线 a 和 b 由公式(5)拟合得到, Y79W-W83F-Cu 去折叠实验数据拟合曲线 c 可按公式(7)拟合得到. 插图为去折叠自由能随变性剂浓度的变化

由图3可见, Y79W-W83F-Cu 在解折叠过程中没有明显的中间过渡平台出现. 因此, 可以在图3中拐点附近选一 Z 值, 将蛋白质解折叠曲线分为两个解折叠过程. 根据公式(5a)和(5b)可得两条两态拟合曲线 a 和 b. 调整 Z 值, 将得到的不同拟合线 a 和 b 用于公式(7), 以得到与实验测得的表现变性百分数最吻合的拟合曲线 c (图3中曲线 c). 由公式(9)计算的 Y79W-W83F-Cu 去

折叠自由能及有关热力学数据见表 1.

由新方法求得蛋白 Y79W-W83F-Cu 的去折叠自由能  $\Delta G_{total}^0(H_2O)$  为  $9.05 \pm 0.02 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $1 \text{ cal} = 4.18 \text{ J}$ ). 显然该计算值大于  $\Delta G_a^0(H_2O)$  ( $\Delta G_{FI}^0(H_2O)$ ,  $2.95 \pm 0.01 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), 而小于  $\Delta G_b^0(H_2O)$  ( $\Delta G_{IU}^0(H_2O)$ ,  $10.58 \pm 0.01 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), 与通过观察去折叠曲线所得稳定性顺序一致. 若按文献报道方法(公式(1))计算, Y79W-W83F-Cu 的去折叠自由能为  $13.53 \pm 0.02 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 远远大于曲线 b 所表示的去折叠自由能 ( $10.58 \pm 0.01 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), 与实际不符. 上述结果表明本文所提出的三态解折叠蛋白去折叠自由能计算方法较文献报道方法更精确.

### 3 结论

在“蛋白三态去折叠过程中, 经历连续而又独立的两个两态变性过程, 且每个两态变性过程均遵循自由能变与变性剂浓度成正比”这一假设的基础上, 本文提出一个具有普遍适用性的三态解折叠蛋白去折叠自由能计算新方法. 通过对突变体蛋白 Y79W-W83F-Cu 去折叠自由能数据分析表明, 用该方法计算得到的三态解折叠蛋白质去折叠自由能较传统方法更合理、精确.

表 1 盐酸胍引起的 Y79W-W83F-Cu 蛋白解折叠热力学数据

$\Delta G_{FI}^0(H_2O)$ /kcal · mol <sup>-1</sup>	$m_{FI}$ /kcal · mol <sup>-2</sup> · L	$\Delta G_{IU}^0(H_2O)$ /kcal · mol <sup>-1</sup>	$m_{IU}$ /kcal · mol <sup>-2</sup> · L	$\Delta G_{total}^0(H_2O)^a$ /kcal · mol <sup>-1</sup>	$\Delta G_{total}^0(H_2O)^b$ /kcal · mol <sup>-1</sup>
$2.95 \pm 0.01$	$-2.34 \pm 0.02$	$10.58 \pm 0.01$	$-5.09 \pm 0.03$	$9.05 \pm 0.02$	$13.53 \pm 0.02$

a)  $\Delta G_{total}^0(H_2O)$ 由公式(9)得到; b)  $\Delta G_{total}^0(H_2O)$ 由公式(1)得到

### 参考文献

- 1 Ferreone A C M, Bolen D W. Thermodynamics of denaturant-induced unfolding of a protein that exhibits variable two-state denaturation. *Biochemistry*, 2004, 43: 13357—13369
- 2 Greene R F, Pace C N. Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, R-chymotrypsin, and  $\alpha$ -lactoglobulin. *J Biol Chem*, 1974, 249: 5388—5393
- 3 Bhuyan A K. Protein stabilization by urea and guanidine hydrochloride. *Biochemistry*, 2002, 41: 13386—13394
- 4 Santoro M M, Bolen D W. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. Unfolding of phenylmethanesulfonyl R-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, 1988, 27: 8063—8068
- 5 Gupta R, Ahmad F. Protein stability: Functional dependence of denaturation Gibbs energy on urea concentration. *Biochemistry*, 1999, 38: 2471—2479
- 6 Palleros D R, Shi L, Reid K L, et al. Three-state denaturation of DnaK induced by guanidine hydrochloride: Evidence for an expandable intermediate. *Biochemistry*, 1993, 32: 4314—4321
- 7 Matthews C R, Crisanti M M. Urea-induced unfolding of  $\alpha$  subunit of tryptophan synthase: Evidence for a multistate process. *Biochemistry*, 1981, 20: 784—792

- 8 Wang X Y, Zhang Z R, Perrett S. Characterization of the activity and folding of the glutathione transferase from Escherichia coli and the roles of residues Cys<sup>10</sup> and His<sup>106</sup>. *Biochem J*, 2009, 417: 55—64
- 9 Boehm K, Guddorf J, Albers A, et al. Thermodynamic analysis of denaturant-induced unfolding of HodC69S protein supports a three-state mechanism. *Biochemistry*, 2008, 47: 7116—7126
- 10 Arnesano F, Banci L, Bertini I, et al. Solution structure of CopC: A cupredoxin-like protein involved in copper homeostasis. *Structure*, 2002, 10: 1337—1347
- 11 Arnesano F, Banci L, Bertini I, et al. A strategy for the NMR characterization of type II copper(II) proteins: The case of the copper trafficking protein CopC from *Pseudomonas syringae*. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 7200—7208
- 12 Zheng X Y, Pang E G, Zhao Y Q, et al. Spectral studies on the interaction between mercuric ion and apoCopC. *Chin J Chem*, 2007, 25: 630—634
- 13 Wang X H, Ren J S, Qu X G. Biophysical studies on the full-length human cyclin A: Protein stability and folding/unfolding thermodynamics. *J Phys Chem B*, 2008, 112: 8346—8353

· 书 讯 ·

## 《手性合成——不对称反应及其应用》(第四版)

作者: 林国强, 李月明, 陈耀全, 孙兴文, 陈新滋

出版单位: 科学出版社

出版时间: 2010年11月

书号: 978-7-03-029060-1

本书系统地讨论了当今有机化学的前沿课题——手性合成(不对称合成). 论述不对称合成的基本概念和方法学, 从羰基化合物不对称的 $\alpha$ -烷基化及相关反应开始, 介绍了羰基化合物的立体选择性亲核加成反应、不对称羟醛缩合及相关反应、不对称氧化反应、不对称Diels-Alder反应及其他成环反应, 不对称催化氢化及其他还原反应和不对称反应方法学在天然产物合成中的应用; 并介绍了生物催化手性合成反应和其他类型的不对称反应, 不对称反应的新概念及不对称反应催化剂的回收与多次重复使用问题. 书中列举了大量已报道的成果, 特别是金属-配体和有机小分子催化的不对称反应的最新进展, 对不同不对称合成途径的优点和局限进行了对比分析.

本书将基础知识介绍和最新研究成果概述相结合, 深入浅出, 可作为有机化学、药物化学及精细化工等相关专业高年级本科生、研究生的教材, 也可作为教师和相关专业科研人员的参考书.

