

胍变蛋白的构象变化及尺寸排阻色谱行为*

陈国亮 邱泽梅 李 蓉 李华儒* *

(西北大学化工系 西安 710069)

提 要 通过比较6种天然和变性蛋白的色谱行为, 提出在不含盐酸胍的非变性体系中利用尺寸排阻色谱法研究蛋白质的构象变化. 根据色谱峰数可以判断蛋白质变性时形成变体的数目; 利用峰高可以描述蛋白质变性的完全程度; 根据不同波长下峰高的变化可以推断蛋白质表面氨基酸残基暴露情况; 利用保留时间可以比较各种变体相对体积的大小.

关键词 尺寸排阻色谱法, 蛋白质变性, 盐酸胍, 构象变化

分类号 O658/Q51

1 前言

测定蛋白质构象变化的经典方法有紫外差光谱^[1,2]、荧光光谱和圆二色谱^[2,3]等. 虽然这些方法能从不同侧面揭示蛋白质变性时的构象变化, 但得到的信息往往是各种变性体、中间体和聚集体的加和特性. 为了有效地观测蛋白质变性时形成的各种变体, 近年一些作者提出利用高效液相色谱法(HPLC)进行监测^[4-6], 但在不含盐酸胍(Gua·HCl)的非变性体系中利用尺寸排阻色谱法(SEC)研究胍变蛋白的构象变化未见报道. 本文通过比较6种标准蛋白在盐酸胍中变性前后的色谱行为, 讨论色谱参数与构象变化的关系, 探索用 SEC 在非变性体系中研究蛋白质变性的可能性.

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

LC-6A 型高效液相色谱仪(日本岛津).

牛血清蛋白(BSA, 电泳级)由上海岳阳制药厂生产. 肌红蛋白(Mb)、伴刀豆球蛋白(Con A)、 β -乳球蛋白(β -Lactoglobulin)、核糖核酸酶(RNase)和 α -淀粉酶(α -Amylase)从 Sigma 公司购进. 盐酸胍由天津试剂厂生产, 其它试剂均为分析纯, 水为二次蒸馏水. 天然和胍变蛋白分别用流动相缓冲液和盐酸胍配制浓度为5g/L 的蛋白溶液.

2.2 色谱试验

向备有 SEC 柱(Shim-pack, Diol-150 7.9mm i.d. \times 250mm)的 LC-6A 型高效液相色谱仪中分别注入同体积(50 μ L)、同浓度(5g/L)的天然蛋白及在 7mol/L Gua·HCl 中变性1h 的胍变蛋白溶液, 用含

0.1mol/L NaCl 的 0.02mol/L Tris (pH 7.0) 缓冲液作流动相, 在 1mL/min 流速下进行等浓度冲洗. 用波长为 280nm 的紫外检测器检测.

2.3 活性检验

α -淀粉酶活性用 I₂-淀粉分光光度法测定^[7].

3 结果与讨论

3.1 变性蛋白在非变性体系中的再折叠

从理论上讲, 经 Gua·HCl 变性的蛋白质用不含 Gua·HCl 的非变性流动相体系进行 SEC 检测时, 由于除胍和稀释作用, 胍变蛋白有可能自发产生再折叠(复性). 如果这个过程发生, 用 SEC 得到的构象信息将是变性与复性的复合结果. 为了考察胍变蛋白在非变性体系中复性的可能性, 将在不同浓度的 Gua·HCl 溶液中变性1h 的 α -淀粉酶用不含 Gua·HCl 的流动相进行 SEC 检测试验, 测定色谱分析前后胍变酶的活性, 并以未过柱胍变酶的活性为基准计算过柱后胍变酶的活性回收率(见表1). 从表1 可以看出, 在高浓度或低浓度 Gua·HCl 中变性的 α -淀粉酶通过 SEC 柱测得的活性均低于未过柱胍变酶中残留酶的活性, 并且回收率与未变性天然酶回收率一致. 这个事实表明, 非变性 SEC 体系对胍变蛋白无明显的复性作用.

表1 胍变 α -淀粉酶在 SEC 柱的活性回收率(%)
Table 1 Activity recovery of α -amylase denatured in Gua·HCl on SEC column (%)

Gua·HCl 浓度(Concentration) (mol/L)	3.0	5.0	7.0
活性回收率(Recovery)*	92	90	89

* denatured enzyme before through the column as standard.

由于本实验使用高浓度(7mol/L)的强变性剂

* 陕西省教委资助项目内容之一

* * 通讯联系人

本文收稿日期: 1997-02-21, 修回日期: 1997-04-11

($\text{Gua} \cdot \text{HCl}$)对天然蛋白进行长期变性(1h), 蛋白质构象受到严重破坏产生不可逆变性, 因此在非变性体系中进行色谱分析时复性的可能性很小。这样就有可能利用 SEC 在不改变胍变蛋白原有构象的情况下研究蛋白质的构象变化。

3.2 酶在盐酸胍中的构象变化

如果把天然 α -淀粉酶与在 7 mol/L $\text{Gua} \cdot \text{HCl}$ 中平衡 1h 的胍变酶的色谱图加以比较(见图 1-a, b), 可发现二者的保留时间、峰高、峰形和峰数很不相同。天然 α -淀粉酶在 SEC 谱图上仅有一个保留时间为 6.51 min 的活性峰, 而经盐酸胍变性后, 除在原保留时间残留极少量带有活性的天然酶外, 在 8.79 , 9.18 , 9.62 , 10.40 和 12.17 min 处还分别有 5 个无活性的胍变体, 和天然酶相比峰高大大降低, 与未经变性的天然酶峰高比依次为 0.08 , 0.06 , 0.038 , 0.044 , 0.019 。变性前后色谱参数的大幅度变化, 表明 α -淀粉酶在高浓度 $\text{Gua} \cdot \text{HCl}$ 长期作用下, 构象受到严重破坏, 其展开程度可用色谱参数表征。新增加的 5 个峰代表 5 个新生的变体(胍变性体、中间体或变性聚集体), 变性前后峰高的变化, 表明蛋白质变性的完全程度和分子表面氨基酸残基暴露情况。通常变性后残留天然酶峰越低, 酶变性越完全。图 1-b 残留 α -淀粉酶峰高约为变性前峰高的 1% , 表明酶在盐酸胍作用下几乎完全转变为变性体。与天然酶(图 1-a)相比, 胍变体峰高大幅度降低, 表明变体外部仅含少量

生色基团, 天然酶分子表面含有相当数量的色氨酸和离解态的酪氨酸残基(α -淀粉酶分子共有 15 个色氨酸, 其中 5~6 个暴露在分子表面, 24 个酪氨酸中有 17 个处于不正常离解状态)。为了进一步考察变性后氨基酸残基暴露情况, 可通过改变紫外光波长观测胍变体峰高的变化(图 1-b, c)。当波长从 280 nm 变为 254 nm 时, 除第 2 个峰(8.79 min)的峰高减小外, 其它各变体峰高均明显增大, 分别提高 12, 8, 5 和 40 倍。这个事实说明变体 2 表面可能含少量酪氨酸残基, 变体 3 和 6 表面主要分布有苯丙氨酸, 而变体 4 和 5 表面苯丙氨酸含量比变体 3 和 6 相对少得多。上述推断是基于酪氨酸和色氨酸的特征吸收波长为 280 nm , 而苯丙氨酸仅在 254 nm 吸光。蛋白质在变性过程中氨基酸残基的暴露也为荧光法所证实。从图 2 可看出, 变性后胍变体较天然酶荧光强度大大降低, 这是由于埋藏在蛋白质分子深处的色氨酸和酪氨酸残基从疏水内环境暴露到极性溶剂中, 发色团与极性分子碰撞产生能量淬灭的缘故。

根据保留时间可以比较各变体相对体积的大小。在 SEC 中保留时间越大, 变体体积越小。从标准蛋白分子量对数 $\lg M$ 与蛋白质流出体积 V_e 的线性关系(图 3)可以粗略估算图 1-b 中变体的分子量。假定蛋白呈球形, 则图 1-b 中 2~6 峰各变体的体积依次为天然酶的 0.41 , 0.35 , 0.30 , 0.21 和 0.11 倍。显然它们是天然酶在盐酸胍中的降解产物。

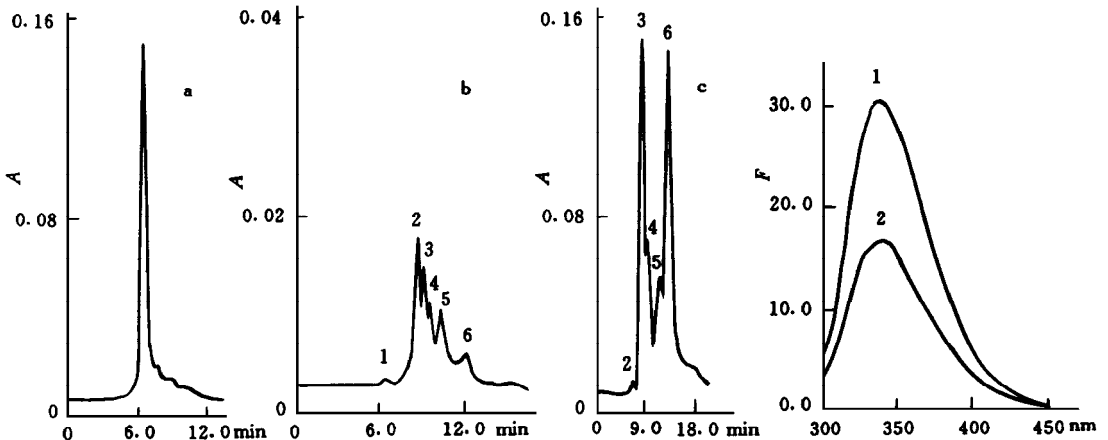


图 1(左起 1, 2, 3) α -淀粉酶的 SEC 谱图

Fig. 1(from the left 1, 2, 3) Chromatograms of α -amylase

a. 天然 α -淀粉酶(native α -amylase)($\lambda = 280\text{ nm}$), b. 胍变 α -淀粉酶(α -amylase denatured by $\text{Gua} \cdot \text{HCl}$)($\lambda = 280\text{ nm}$), c. 胍变 α -淀粉酶(α -amylase denatured by $\text{Gua} \cdot \text{HCl}$)($\lambda = 254\text{ nm}$).

图 2(右) α -淀粉酶和变性酶的荧光发射光谱

Fig. 2(R) The fluorescence emission spectra of α -amylase and its denatured enzyme

1. 天然酶(native enzyme), 2. 盐酸胍变性酶(denatured enzyme in $\text{Gua} \cdot \text{HCl}$).

酶浓度(enzyme concentration): 130 mg/L , $\lambda_{\text{ex}} = 280\text{ nm}$.

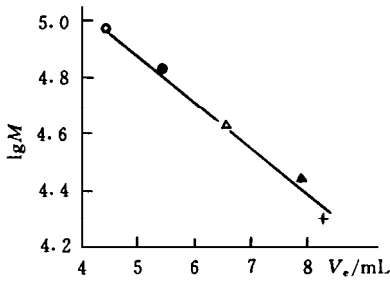


图3 SEC 测定肌变蛋白分子量标准曲线

Fig. 3 The calibration curve for determining molecular weight of denatured proteins in Gua·HCl by SEC

○. 磷酸化酶 B (phosphorylase B 94 000), ●. 清蛋白 (albumin 76 000), △. 肌动蛋白 (actin 43 000), ▲. 碳酸酐酶 (carbonic anhydrase 30 000), +. 外壳蛋白 (TMV 17 000).

进样量 (size of sample): 50 μ L, 各蛋白浓度 (concentration of each protein): 0.2g/L.

除了 α -淀粉酶外, 我们利用 SEC 在非变性体系中也考察了天然和肌变态 BSA, ConA, Mb, β -Lactoglobulin 和 RNase 的色谱行为。发现天然蛋白经 Gua·HCl 变性后, 色谱峰数、峰形以及残留蛋白峰高都发生明显变化。峰数分别从天然态的 3, 1, 2, 1, 1 个依次增加到 5, 4, 3, 2, 2 个。残留蛋白峰除 ConA 和

β -Lactoglobulin 变性后峰消失外, BSA、Mb 和 RNase 峰高分别为变性前的 0.16, 0.30, 0.93 倍。这些实验表明, 蛋白质在变性过程中的色谱行为与其构象变化紧密相关。

参 考 文 献

- 1 姚启智, 侯立向, 周海梦等. 中国科学 B 辑, 1982, 10: 892~ 897
- 2 张学忠, 吴 华, 汪大伟等. 生物化学杂志, 1990, 6(1): 76~ 81
- 3 姚启智, 梁树坚, 田 敏等. 中国科学 B 辑, 1984, 10: 903~ 909
- 4 Karim A, Al-Obeidi M, Light A. Journal of Biological Chemistry, 1986, 263(18): 8642-8645
- 5 Withka J, Moncuse P, Baziotis A et al. J Chromatogr, 1987, 398: 175-202
- 6 Fridan M, Aguilar M I, Hearn M T W. J Chromatogr, 1990, 512: 57-75
- 7 李华儒, 党鸿喜. 西北大学学报 (博士学科专辑), 1991, 21(2): 93~ 98

Conformational Changes and Size-Exclusion Chromatographic Behaviors of Proteins Denatured in Guanidine

Chen Guoliang, Di Zemei, Li Rong and Li Huaru*

(Department of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an, 710069)

Abstract A chromatographic method used to study the conformational changes of proteins is proposed. In this method native proteins are denatured for 1h in 7mol/L guanidine hydrochloride (Gua·HCl) and then operated under size-exclusion chromatographic (SEC) condition in the mobile phase without Gua·HCl. Taking α -amylase denatured by Gua·HCl as an example it was shown that there was no obvious renaturation in this chromatographic system for completely denatured proteins. In comparing the chromatographic behaviors of six native proteins (bovine serum albumin, myoglobin, concanavalin A, β -lactoglobulin, ribonuclease and α -amylase) with their denatured species, the relationships between the chromatographic parameters and the conformation of protein were investigated. Some useful informations for characterizing the conformational changes of protein were obtained. The chromatographic peak numbers can be used to determine the numbers of denatured species, intermediates and aggregates formed during protein denaturation. The unfolding extent of proteins in Gua·HCl can be judged by the change of chromatographic peak height for the native protein before and after the denaturation. The exposure of aromatic amino acid residues on the surface of protein molecule during the denaturation can be deduced from the changes of peak height under different wavelength. The relative volume of individual denatured species can be evaluated with the retention time or the plot of lgM- V_e . When its relative retention to native protein is less than 1.0, it may be a dimer or polymer. When relative retention is more than 1.0, it is a degradation product from intact protein.

Key words size-exclusion chromatography, denaturation of protein, guanidine hydrochloride, conformational change