

Z 及 log I 对离子交换色谱中脲变溶菌酶分子构象变化的表征

李 敏, 王 彦, 龚波林, 耿信笃

(西北大学现代分离科学研究所 现代分离科学陕西省重点实验室, 陕西 西安 710069)

摘要 :以溶菌酶(Lys)为目标蛋白,用计量置换保留理论(SDT-R)中的参数 Z 和 $\log I$ 对弱阳离子交换色谱(WCX)中“准天然态”和脲变还原与非还原的两种变性状态的 Lys 的分子构象变化进行了表征。发现在流动相中含有脲时,蛋白的保留仍服从 SDT 理论,可以准确测定在特定脲浓度条件下 Lys 的 Z 及 $\log I$ 值。结果表明 3 种分子构象状态的 Lys 的 Z 值均随脲浓度改变呈现不连续变化;“准天然态”Lys 在同一脲浓度条件下的 Z 值比变性状态的大, $\log I$ 比变性状态的小,而非还原变性和“准天然态”Lys 的 Z 和 $\log I$ 值比较接近。还对不同脲浓度条件下 Lys 的活性回收率与 Z 值之间的关系进行了研究。

关键词 :弱阳离子交换色谱;溶菌酶;分子构象;蛋白复性;表征

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2003)03-0214-04

Characterization of the Changes in the Molecular Conformation of Lysozyme with Various Urea Concentrations by Parameters Z and $\log I$ in Ion Exchange Chromatography

LI Min, WANG Yan, GONG Bolin, GENG Xindu

(Shaanxi Province Key Laboratory of Modern Separation Science, Institute of Modern Separation Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract : The parameters Z and $\log I$ of lysozyme(Lys), which serves as a model protein for the stoichiometric displacement theory for retention(SDT-R), were used to characterize the molecular conformational changes of Lys for different molecular conformation states (pseudo-native, urea-unfolded, urea-reduced-unfolded) with various urea concentrations in weak cation exchange chromatography (WCX). It was found that the retention of the three molecular conformations of Lys behaved as predicted by the SDT-R theory provided that the urea concentration remained constant in the mobile phase. The Z value of the Lys in its pseudo-native state decreased with the increase of the urea concentration in the mobile phase and was the largest of the three molecular conformational states, while its corresponding $\log I$ was the smallest. The values of both Z and $\log I$ of Lys in their pseudo-native and urea-unfolded states were closed with each other. The changes of Z of Lys in the three molecular conformational states as a function of urea concentration in mobile phase were found to be discontinuous. The relationship between the Z value and bioactivity recovery of Lys with different urea concentrations was also investigated.

Key words : weak cation exchange chromatography; lysozyme; molecular conformation; protein renaturation; characterization

计量置换保留理论(stoichiometric displacement theory for retention, SDT-R)中的线性参数 Z 值已被成功地用于表征生物大分子的构象变化^[1,2]。Snyder 等^[3]测定了 30 余种白细胞介素-2 突变体的 Z 值以研究它们的分子构象差异。Karger 等^[4]用计量置换参数 $\log I$ 和 Z 比较了一些蛋白在反相色

谱(RPLC)中天然态与变性态蛋白分子构象之间的变化。Witika 等^[5]和 Parente 等^[6]分别研究了流动相中脲存在时一些蛋白在离子交换色谱(IEC)中保留行为的变化。卫引茂等^[7]用 Z 值表征了疏水色谱(HIC)中脲浓度与蛋白分子的构象变化。虽然 SDT-R 也可应用于 IEC,但未见用 Z 或 $\log I$ 对不同

收稿日期:2002-12-06

作者简介:李敏,女,1973年生,硕士研究生。

通讯联系人:耿信笃,男,教授,博士生导师, Tel (029)8303817, E-mail:xdgeng@nwu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(批准号:20175016)。

变性状态的蛋白随脲浓度的变化而产生的分子构象变化进行表征的报道。

同反相高效液相色谱(RP-HPLC)一样,IEC被广泛地用于肽、蛋白质和其他生物大分子的分离中。并且由于IEC使用的流动相为盐水体系,操作条件比RP-HPLC温和,使得许多蛋白质在分离之后仍能保持高的生物学活性,因此IEC在基因工程下游的分离纯化中占有举足轻重的地位。用参数Z与logI在弱阳离子交换色谱(WCX)中研究蛋白分子的构象变化,对用色谱法进行蛋白折叠研究具有一定的指导意义。

文献^[8]报道了不同变性状态的蛋白与离子交换固定相作用时其表面电荷分布的不同。在IEC中,对于某一种蛋白而言,只要分子构象不变,蛋白质分子与固定相之间的接触电荷数就不会变,蛋白质分子中电荷密度分布自然就不会改变,Z为定值。相反,流动相中脲的存在所引起的蛋白分子构象的微小变化就会引起它与固定相接触电荷数的变化,Z值也变化。因此Z值可以作为平衡状态下蛋白质分子构象变化及其变化程度的表征参数。

本文以溶菌酶(lysozyme,Lys)为目标蛋白,在WCX中首次用Z及logI值定量地研究了Lys处于不同状态(准天然、脲变非还原、脲变还原)时分子构象变化与脲浓度之间的关系。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

所用仪器参见王彦等^[9]的文章。色谱柱为100 mm×4.0 mm i.d.,装填弱阳离子交换填料(本实验室自己合成^[10])。Lys天然蛋白(chicken egg white,美国Sigma公司);二巯苏糖醇(DTT,华美生物工程公司,美国Amresco公司进口分装);三羟甲基氨基甲烷(Tris)、脲、乙二胺四乙酸(EDTA)和硫酸铵均为国产分析纯。其他试剂均为分析纯,未经再纯化。

1.2 不同状态溶菌酶的制备

Lys天然蛋白用蒸馏水配成2.0 g/L溶液并在4℃条件下保存;Lys的非还原变性是将2.0 mg的天然Lys溶解在1 mL 8.0 mol/L脲变溶液(0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.5)+8.0 mol/L脲+1 mmol/L EDTA)中,室温放置过夜;Lys的还原变性是将20.0 mg的天然Lys溶解在1 mL 8.0 mol/L脲变溶液(0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.5)+8.0 mol/L脲+1 mmol/L EDTA+0.15 mol/L DTT)中,在40℃水浴恒温3 h,用1 mol/L HCl调节其pH为3.0,用0.1 mol/L醋酸透析过夜,冷冻干燥。

1.3 实验方法

首先保持流动相中的脲浓度不变,通过改变盐浓度来改变Lys的保留因子k值以求得在某一脲浓度时的Z及logI值,然后再研究脲浓度变化时的Z及logI值,以对WCX中不同状态溶菌酶构象变化及Lys复性回收率间的关系进行表征。

Lys在不同脲浓度下保留因子的测定采用了等度洗脱法。在检测灵敏度最高条件下用最低浓度、最少进样体积的NaNO₂测定t₀。流动相A液为pH 8.0的0.1 mol/L Tris-HCl+1 mmol/L EDTA+X mol/L脲,B液为pH 8.0的1.0 mol/L(NH₄)₂SO₄+0.1 mol/L Tris-HCl+1 mmol/L EDTA+X mol/L脲溶液(X=0,1.0,2.0,3.0,4.0和5.0)。每次进样前,色谱柱均用相应的流动相平衡20 min,流速为1.0 mL/min,检测波长280 nm。

2 结果与讨论

2.1 不同脲浓度条件下logk与log[1/[NH₄⁺]]的线性关系

脲是一个有效的蛋白溶剂,它既能抑制蛋白质聚集,增加失活蛋白的溶解度,又可以使蛋白解离^[11]。本文选用0.0~5.0 mol/L的脲进行Lys在IEC中的分子构象变化的研究。由于脲变还原Lys在2.0 mol/L的脲浓度以下时在IEC中几乎不出峰,故选2.0~5.0 mol/L的脲来研究还原变性Lys的分子构象变化。因NH₄⁺的置换能力较强,且对Lys有稳定作用,故流动相中所选盐为(NH₄)₂SO₄。

蛋白质在WCX上的分离是依据蛋白与配体间的静电作用力不同进行分离的。流动相中脲的存在会使蛋白的保留值减小。这一现象主要是由蛋白分子构象变化引起的。当脲浓度逐渐增大时,蛋白分子构象会向失去立体结构的方向转变,所以在IEC中Lys的保留值会随脲浓度变化而变化。但是,当脲浓度一定时,在蛋白能够洗脱的盐浓度范围内,其分子构象会维持不变,此时蛋白的保留应取决于流动相中盐的浓度。本文以3种状态(天然态、脲变非还原态(urea-unfolded)和脲变还原态(urea-reduced-unfolded))下Lys的logk对log[1/[NH₄⁺]]作图(见图1),以便从该线性关系图的斜率和截距得到SDT-R中Lys的参数Z和logI。结果表明所有的线性相关系数r均大于0.99,即线性关系良好。说明当脲浓度一定时,这3种状态的Lys在IEC上的保留值仍然可以用SDT-R的基本公式来描述。换言之,可准确测定出不同脲浓度条件下对应于Lys分子不同构象时的Z及logI值,这就为用Z及logI定量表征Lys分子构象变化奠定了实验基础。

天然 Lys 样品在含脲的流动相中会产生分子构象变化,故测定的 Lys 的 Z 和 log I 值与在流动相中无脲时的不同,但为了在相同流动相组成下对未变性(天然)放置过的非还原变性和还原变性 3 种不

同 Lys 进行比较,仍称前者为天然 Lys,但又为区别流动相中有和无脲存在对 Lys 的影响,将天然 Lys 进样流动相中有脲存在的称之为“准天然态”(pseudo-native state)。图 1-a 所表示的便是这种情况。

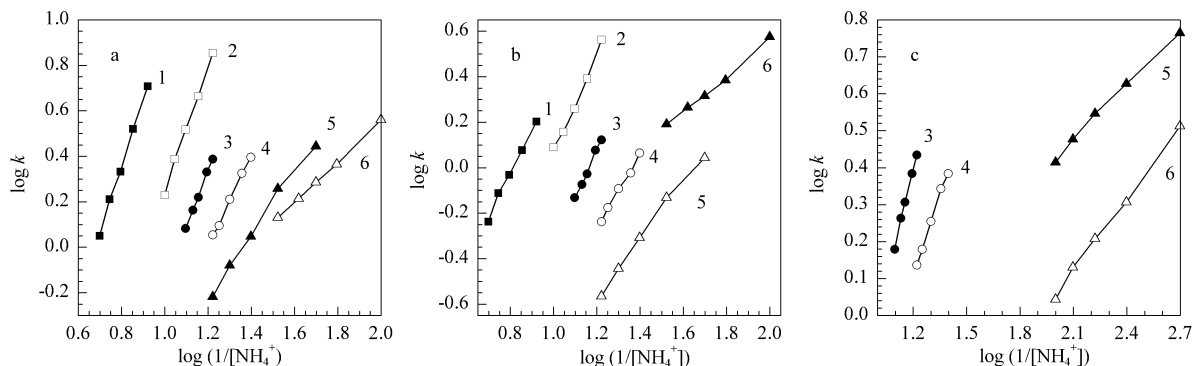


图 1 不同状态的溶菌酶在不同脲浓度下的 log k 与 log(1/[NH₄⁺])的关系图

Fig. 1 Plots of log k of Lys vs. log(1/[NH₄⁺]) under different molecular conformation states with different urea concentrations

a. pseudo-native; b. urea-unfolded; c. urea-reduced-unfolded.

Urea concentrations: 1) 0 mol/L; 2) 1.0 mol/L; 3) 2.0 mol/L; 4) 3.0 mol/L; 5) 4.0 mol/L; 6) 5.0 mol/L.

2.2 用不同脲浓度下 Z 值表征 Lys 分子构象变化

蛋白质分子在天然状态下都有一个特殊的三级或四级结构,其分子外表面上大多数为亲水性的氨基酸残基,分子内部则主要为疏水性的氨基酸残基。当蛋白分子靠近一个带电荷的表面(如 WCX 的固定相表面)时,蛋白分子中正电荷密度重心就会向 IEC 表面移动,而负电荷密度重心就向流动相的方向转移,因此,即便是天然态的蛋白分子也会发生构象变化。对于 3 种不同状态 Lys:“准天然态”Lys 暴露在外部的疏水性氨基酸残基最少;非还原变性态,只是有部分埋藏于 Lys 分子内部的疏水性氨基酸暴露出来(此时 Lys 中的二硫键未打开,埋藏于 Lys 分子内部的疏水性氨基酸并没有完全暴露出来);还原变性的 Lys,由于二硫键已经打开,三维结构完全被破坏,疏水性氨基酸完全暴露出来。

图 2 是当其他条件(温度、pH、盐浓度等)不变时,以不同脲浓度下的 Z 对脲浓度所作的图。

从图 2 可看出,随脲浓度增大,“准天然态”Lys 的 Z 值减小,表明蛋白质与固定相作用的电荷数在减小,蛋白在向失去立体结构的方向变化;非还原变性 Lys 的 Z 值先增大后减小,而还原脲变性 Lys 的 Z 值先减小后增大,均呈现出非单一方向的变化。这 3 种状态的 Z 值变化曲线看似连续,实际上变化方面发生了方向改变,均为不连续性变化,说明在此脲浓度范围内,随脲浓度的增大,蛋白分子构象发生了突变,导致了蛋白质与固定相接触电荷数的显著变化。而且各种蛋白发生突变的脲浓度值是不同的,且以还原变性 Lys 变化最大。

的 Z 值在脲浓度大于 2.0 mol/L 时相近,说明此时这两种构象状态的 Lys 分子表面与弱阳离子交换柱的接触电荷数相近;脲变非还原的 Z 值比“准天然态”的稍小,这是因为脲变非还原 Lys 结构较疏松的缘故。而脲变还原的 Z 值则明显小于前两种构象状态的 Z 值,且变化趋势相差较大。这恰好表明了具有三维或四维结构的“准天然态”Lys 分子仍具有一定的弹性。如上所述,当其分子中的正电荷与阳离子交换柱的固定相接触时,原有 Lys 分子中电荷分布的对称性遭到破坏,其邻近固定相的正电荷密度增大,而负电荷密度则向流动相一端集中,使具有弹性的“准天然态”Lys 蛋白分子发生变形。而失去三维结构的变性态蛋白分子只用正电荷密度大的氨基酸残基与固定相作用,从而使 Lys 直链上其他处正电荷的氨基酸残基因远离固定相表面,没有向固定相移动的倾向,故在 WCX 中天然蛋白的 Z 值较变性态的大。

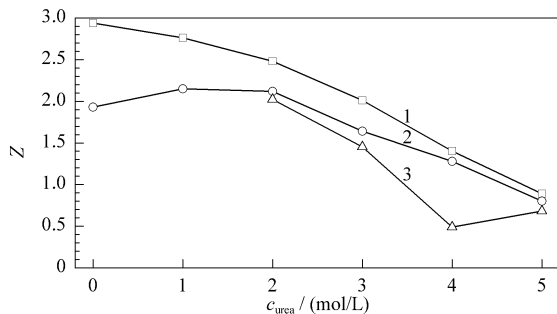


图 2 不同状态的溶菌酶的 Z 与脲浓度的关系

Fig. 2 Plot of Z of Lys vs. urea concentration under different molecular conformation states

1. pseudo-native state; 2. urea-unfolded; 3. urea-reduced-unfolded.

图 2 结果还显示,天然态和非还原变性态 Lys

2.3 用不同脲浓度下的logI值表征不同构象Lys分子与固定相的亲和力

图3为3种不同变性状态的Lys的logI与脲浓度关系图。从图3看出,在相同脲浓度下“准天然态”的logI值较还原变性态的logI值小;“准天然态”和非还原变性态的logI值非常相近,说明这两种构象状态的Lys分子对同一固定相的亲和力相近,而脲变还原态的logI值则大于前两种分子构象状态。这是因为变性Lys分子的结构较疏松,伸展的较远,与固定相作用的机会多,亲和力大。这与准天然蛋白的Z值比变性态的Z值大并不矛盾,因为蛋白分子中,即便改变一个氨基酸,也会严重影响蛋白的保留,因为蛋白只有以一定的区域接触固定相才会保留^[12]。

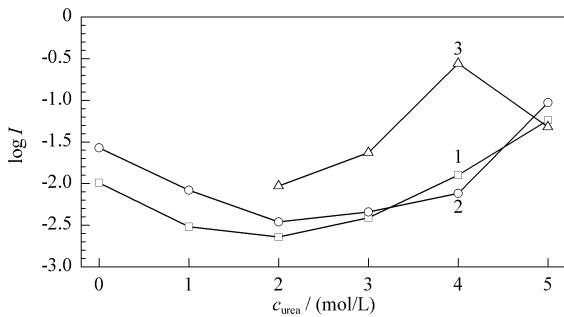


图3 不同变性状态溶菌酶的logI与脲浓度关系图

Fig.3 Plot of log I of Lys vs. urea concentration under different molecular conformations

1. pseudo-native state; 2. urea-unfolded; 3. urea-reduced-unfolded.

2.4 不同变性状态的溶菌酶分子的Z及活性回收率随脲浓度变化趋势

研究蛋白在液-固界面上的分子构象变化,对研究蛋白折叠特征及规律,以及防止天然蛋白失活和提高变性蛋白复性的活性回收率有着十分重要的作用。对于脲变还原Lys来说,在脲浓度为4.0 mol/L时Z值最小(见图2),logI最大(见图3),表明此时脲变还原态Lys与固定相接触电荷数较少,作用力强度最大,有助于蛋白折叠。图4-a显示出了脲变还原态Lys的复性效率与流动相脲浓度的关系,说明在此WCX的复性体系中,脲变还原态Lys活性回收率的最大值发生在变性蛋白与固定相作用最强、接触电荷数最少时。这是因为当变性蛋白与固定相作用时,与固定相接触的位点数越少,其面向流动相的区域越大。一方面蛋白与固定相之间强的作用力保证了蛋白与蛋白之间互相不接触,不发生分子间的聚集;另一方面最大部分的区域面向流动相给予一维结构充分的自由度,使得它在合适的情况下向三维结构卷曲,开始协同的折叠过程。而与固定相接触的位点过多,则不利于其向天然态折叠。

脲变非还原的Lys的Z值随脲浓度的增大先增大而后减小,脲浓度大于2.0 mol/L时与“准天然态”的Lys相似,其经WCX柱后活性均在80%以上(见图4-b),这与其复性的双态机理是一致的^[13]。

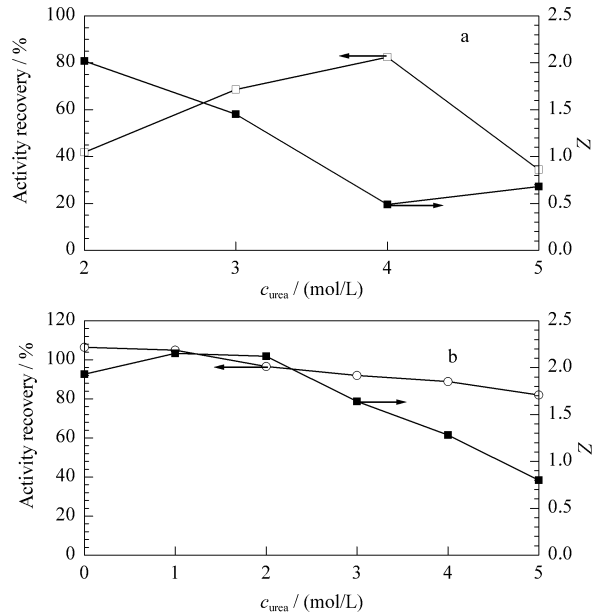


图4 不同变性状态溶菌酶的Z及活性回收率与脲浓度的关系

Fig.4 Plots of Z and bioactivity recovery of Lys vs. urea concentration under different molecular conformation states

a. urea-reduced-unfolded; b. urea-unfolded.

参考文献:

- [1] Shi Yali, Ma Feng, Geng Xindu. Chemical Journal of Chinese Universities, 1994, 15(9): 1288
时亚丽, 马凤, 耿信笃. 高等学校化学学报, 1994, 15(9): 1288
- [2] Shi Yali, Ma Feng, Geng Xindu. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 1994, 22(7): 712
时亚丽, 马凤, 耿信笃. 分析化学, 1994, 22(7): 712
- [3] Kunitani M, Johnson D, Snyder L R. J Chromatogr, 1986, 371: 313
- [4] Lin S W, Karger B L. J Chromatogr, 1990, 499: 89
- [5] Withka J, Moncuse P, Baziotis A, Maskiewicz R. J Chromatogr, 1987, 398: 175
- [6] Parente E S, Wetlaufer D B. J Chromatogr, 1984, 288: 389
- [7] Wei Yinmao, Chang Xiaoqing, Geng Xindu. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 1997, 25(4): 396
卫引茂, 常晓青, 耿信笃. 分析化学, 1997, 25(4): 396
- [8] Wang Yan, Li Min, Geng Xindu. Chemical Journal of Chinese Universities, accepted
王彦, 李敏, 耿信笃. 高等学校化学学报, 已接受
- [9] Wang Yan, Geng Xindu. Chinese Journal of Chromatography, 2003, 21(3): 218
王彦, 耿信笃. 色谱, 2003, 21(3): 218
- [10] Li Rong, Chen Guoliang, Lei Jiandu, Li Baozhang, Li Huaru. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 1999, 27(5): 517
李蓉, 陈国亮, 雷建都, 李宝璋, 李华儒. 分析化学, 1999, 27(5): 517
- [11] Kato Y, Komiya K, Sasaki H, Hashimoto T. J Chromatogr, 1980, 193: 29
- [12] Drager R R, Regnier F E. J Chromatogr, 1986, 359: 147
- [13] Anfinsen C B. Science, 1973, 181: 223