

• 研究论文 •

## 牛血清 IgG 热化学变性和热变性的研究

叶茂青<sup>a</sup> 易同寅<sup>b</sup> 李华屏<sup>a</sup> 郭骊骊<sup>a</sup> 邹国林<sup>\*a</sup>

(<sup>a</sup> 武汉大学生命科学学院 <sup>b</sup> 纳米科学与技术中心 武汉 430072)

**摘要** 使用差示扫描量热仪(DSC)和荧光光谱法研究了在 pH 7.4 时牛血清 IgG (bIgG)热变性, 热化学变性和等温化学变性过程(变性剂为尿素和盐酸胍), 首次报道了 bIgG 在热化学变性和等温化学变性过程中的相关热力学参数. DSC 和荧光光谱实验结果表明, bIgG 的热变性和热化学变性过程都是较复杂的不可逆过程, 这个过程可被看作一个三态变构过程. DSC 实验表明在热化学变性过程中 bIgG 的变性温度和焓变值会随着环境中的变性剂浓度的升高而降低. 使用荧光光谱法对 bIgG 在尿素或盐酸胍存在下的等温化学变性过程进行了研究, 结果显示 bIgG 的化学变性过程也是一个较复杂的非二态过程. 实验数据分析表明, 变性剂尿素和盐酸胍与 bIgG 之间主要是依靠氢键相互作用的, 而热变性过程中 bIgG 的凝集是由于 bIgG 热变性时结构改变后暴露出的疏水结构互作用造成的. 实验结果还表明单纯的热变性只能导致 bIgG 的不完全变性, 而即使是在高浓度变性剂存在时的 bIgG 热化学变性, 尿素和盐酸胍分别导致的 bIgG 热化学变性的去折叠态也是不同的.

**关键词** 牛血清 IgG; 蛋白折叠; 蛋白变性; 化学变性剂; 差示扫描量热(DSC); 荧光光谱法

## Study on Thermal and Thermal Chemical Denaturation of Bovine Immunoglobulin G

YE, Mao-Qing<sup>a</sup> YI, Tong-Yin<sup>b</sup> LI, Hua-Ping<sup>a</sup> Guo, Li-Li<sup>a</sup> ZOU, Guo-Lin<sup>\*a</sup>

(<sup>a</sup> College of Life Sciences, <sup>b</sup> Research Center of Nanoscience and Nanotechnology, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract** The thermal denaturation, isothermal chemical denaturation and thermal chemical denaturation of bovine immunoglobulin G (bIgG) at pH 7.4 were studied by differential scanning calorimetry (DSC) and fluorescence spectroscopy adopting guanidine hydrochloride (GuHCl) and urea as denaturant. The thermodynamic parameters of thermal and chemical denaturation were determined for bIgG using both methods. The experimental results of DSC and fluorescence spectroscopy showed that the thermal denaturation and thermal chemical denaturation of bIgG were both a complex irreversible process, and might follow a three-state mechanism. Isothermal chemical denaturation studies of bIgG were carried out in the presence of GuHCl or urea to observe that denaturant induced isothermal chemical denaturation of bIgG also followed a multistate process. The thermal denaturation measured in the presence of the denaturant displayed that the transition temperature and enthalpy change on denaturation of bIgG strongly depended on denaturant concentration, and GuHCl and urea interacted with bIgG primarily by hydrogen bonds, yielding a randomly coiled conformation in its unfolded state, while thermal denaturation produced an incompletely unfolded aggregation of bIgG. Therefore, both chemical denaturation methods can yield different structurally unfolded states of the bIgG.

**Keywords** bovine immunoglobulin G; protein folding; protein denaturation; chemical denaturant; differential scanning calorimetry; fluorescence spectroscopy

\* E-mail: zougoulin@whu.edu.cn; Fax: +86-27-68752560.

Received March 9, 2005; revised May 12, 2005; accepted July 6, 2005.

国家自然科学基金(No. 30370366)、高等学校博士学科专项科研基金资助项目.

蛋白变性和去折叠过程的研究目前已引起科研工作者的广泛关注<sup>[1,2]</sup>. 蛋白通常可以通过两条途径发生变性: 通过温度的改变(热变性)或者通过改变溶剂中的特殊有机小分子的浓度, 如尿素和盐酸胍(化学变性). 这两种技术在蛋白结构和稳定性受溶剂环境变化或蛋白一级结构变化的影响的研究中发挥了重要作用, 但蛋白的热变性和化学变性对蛋白结构去折叠过程的影响是不相同的. Tanford 等<sup>[3]</sup>证明蛋白结构在高浓度的尿素和盐酸胍环境中呈现出一种无规则卷曲状态, 而在热变性中这种无规则卷曲是不完全的. Dill 等<sup>[4,5]</sup>也认为在温度导致的蛋白变性的终末结构与溶剂中高浓度小分子有机物导致的蛋白去折叠的状态不是完全相同的.

IgG 是一类重要的体液免疫蛋白, 在机体抵抗外源感染的免疫反应过程中起了十分重要的作用. IgG 是一个大分子量的多结构域蛋白, 其主要由两条轻链和两条重链组成. IgG 是一个热不稳定蛋白, 溶液中的 IgG 即使在 323 K 的环境中存放稍久也很容易发生不可逆变性, 发生凝聚并产生白色沉淀<sup>[6,7]</sup>. IgG 的热变性过程是一个复杂的不可逆过程, 这个过程中包含了至少一步可逆过程. Brody<sup>[8]</sup>曾经报道了 IgG 热变性过程中可能存在变性中间体, 但是稳定的 IgG 的热变性中间体至今尚未被证实存在, IgG 的化学变性过程也未被系统研究过.

不同物种 IgG 的空间结构都大致相同, 但不同物种 IgG 的分子量, 轻重链长度比例, 氨基酸组成具有一定的差异性, 因此不同的 IgG 在热变性过程中的变性温度等热力学参数是有一定差异的<sup>[9]</sup>. bIgG 在牛的血液, 组织及牛奶中都大量存在, 对 bIgG 热化学变性的研究不仅可以对 IgG 分子折叠的研究提供理论支持, 对牛肉、牛奶等牛畜制品保鲜的研究也具有一定的指导意义. 目前虽已有学者对 IgG 的热变性过程进行了一些研究<sup>[10-13]</sup>, 但尚无对 bIgG 热化学变性过程的系统性研究报道.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

牛血清 IgG 购自美国 Sigma 公司, 直接使用时未经进一步纯化. bIgG 溶解于缓冲液中后使用超滤管对溶液进行了透析, 除去冻干粉中的盐离子, 蛋白溶液在实验前经过真空脱气 10 min. 蛋白浓度通过紫外分光光度仪在 280 nm 下测得的吸光值计算获得. bIgG 的分子量为 150 kD. 高纯度盐酸胍(GuHCl)和尿素(Urea)购自美国 Amresco 公司, 其它试剂均为国产分析纯. 实验中所用的缓冲液为 100 mmol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液.

### 1.2 方法

使用 Netzsch DSC-200 PC 差示扫描量热仪

(differential scanning calorimeter, DSC)对 bIgG 热变性和热化学变性过程进行了研究, 该系统配有一个液氮冷却装置. 在 Netzsch DSC-200 的样品室里有二个样品池, 一个放样品一个放空白参比. 在实验过程中两个样品池之间的热量差被仪器测定, 可获得一个热容( $C_p$ )对温度( $T$ )的热力学曲线. 实验前将 30  $\mu$ L bIgG 样品溶液(含 3 mg bIgG)精确地加入到容积为 40  $\mu$ L 的铝制样品坩锅中并密封好, 以空坩锅为空白参比, 将两个坩锅置入样品室中. 实验中使用 5 K/min 的升温速率将样品由 283 K 加热到 373 K, 测量此过程中样品溶液的  $C_p$  变化. 实验中 bIgG 溶液质量含量为 10% (w/w), 样品在加入铝制坩锅后于真空中脱气后再密封坩锅. 使用 Netzsch 公司提供的 Proteus 4.3 作为 DSC 数据分析软件.

使用 Hitachi F-4500 荧光分光光度仪测量 bIgG 在不同温度和变性剂浓度下的内源性荧光光谱. 实验中使用了 10 mm 的石英比色杯, 通过循环水浴(Julabo F25 水浴锅)控制荧光分光光度仪系统温度. 等温化学变性实验时系统温度为 298 K, 热化学变性实验时系统升温速率为 0.8 K/min, 实验温度范围为 303~358 K. 荧光分光光度仪的激发波和发射波狭缝均为 5 nm, 激发波长( $E_x$ )使用 295 nm (检测蛋白色氨酸残基的内源性荧光)和 280 nm (检测蛋白酪氨酸残基的内源性荧光), 分别记录相应的发射波长( $E_m$ )300~400 nm 波谱图. 荧光光谱实验中使用的 bIgG 溶液样品浓度为 0.05~0.2 mg/mL. 实验前将 bIgG 样品先配制成 1 mg/mL 储存溶液, 再与不同浓度变性剂溶液混合后于 4  $^{\circ}$ C 平衡过夜, 待 bIgG 分子与变性剂分子充分作用后再检测样品的荧光光谱. 在所有荧光实验中都使用了相应浓度的变性剂溶液作为空白对照, 以消除变性剂产生的荧光对实验结果的干扰.

所有的实验重复次数不低于 3 次, 并取其平均值作为结果计算. 实验结果中  $T_m$  的误差小于 0.4 K,  $\Delta H_D$  的误差小于 5%. 软件 Origin 6.0 (Microcal Software, Inc)被用于热分析数据的计算.

## 2 结果与讨论

### 2.1 DSC 对 bIgG 热变性过程的研究

使用 DSC 研究了 bIgG 的热变性过程, 一个典型的 bIgG 热变性 DSC 热力学谱图见图 1. 如图 1 所示, bIgG 的 DSC 热变性图谱显示出一个吸热变性峰和相对应的变性温度  $T_m$  (在  $T_m$  时  $C_p$  表现为最大值), 80.2  $^{\circ}$ C, 而相应的 bIgG 变性焓( $\Delta H_D$ )值为 2937.65 kJ/mol. 这与大多数文献报道的其它种类 IgG 的典型热变性图谱包含一个吸热峰的实验结果相一致, bIgG 变性  $\Delta H_D$  值也与文献报道的 IgG 变性  $\Delta H_D$  值相似<sup>[13,14]</sup>.

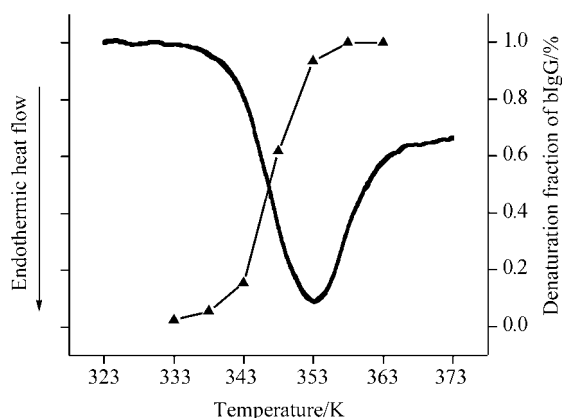


图1 bIgG 热变性过程的 DSC 热图谱

Figure 1 DSC thermogram of thermal denaturation of bIgG

Heating rate was 5 K/min, (▲) fraction of irreversibly denatured protein for the denaturation of bIgG

为了确定 bIgG 的热变性过程是否可逆, 在 DSC 实验中当第一次升温扫描结束后利用液氮降温装置将样品和系统的温度在 3 min 内迅速降低到 283 K 后, 再以同样的条件对样品进行第二次升温扫描. 因为在第一次升温扫描中不可逆变性的 bIgG 在二次扫描中不再会有明显的热焓变化, 因此计算两次扫描时样品变性焓的比值, 可以计算出第一次扫描时不可逆变性 bIgG 的比例<sup>[15]</sup>. 实验中还通过控制第一次扫描温度的终止温度获得了在不同温度下的 bIgG 不可逆变性比例(图 1). 两次 DSC 升温扫描的速率都为 5 K/min. 实验结果表明 bIgG 的热变性是不可逆变性.

用 DSC 研究了不同升温速率对 bIgG 热变性过程的影响, 图 2 展示了在不同升温速率(2.5~10 K/min)条件下 bIgG 的热变性 DSC 曲线, 相应热变性曲线的  $T_m$  和  $\Delta H_D$  数值也列入了表 1. 根据 van't Hoff 方程的理论,

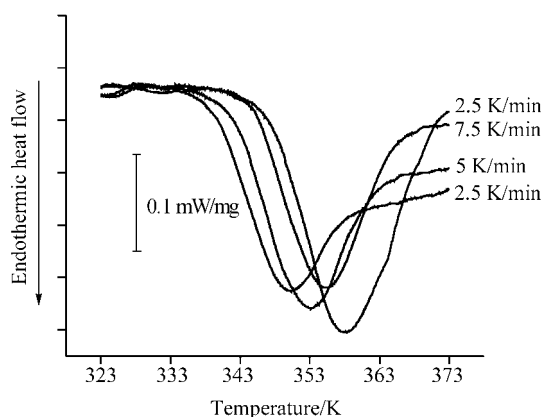


图2 bIgG 在不同升温速率下热变性的 DSC 热图谱

Figure 2 DSC thermogram of thermal denaturation of bIgG in different heating rate

一个标准的两态蛋白热变性过程的 DSC 热量峰曲线应是对称的, 且  $T_m$  和  $\Delta H_D$  的值不会因为升温速率的改变而改变<sup>[16]</sup>. 如表 1 所列出的数据所示, DSC 扫描升温速率的提高会导致 bIgG 热变性过程中的  $T_m$  和  $\Delta H_D$  值的增加, 而图 2 中可见 bIgG 热变性的 DSC 曲线热量峰也是不对称的. 根据以上判断标准, 可以得出结论: bIgG 的热变性过程是一个动力学过程, 具有特定的动力学参数, bIgG 的热变性过程是一个非两态不可逆热变性过程.

表1 bIgG 在不同升温速率下由 DSC 测得的热变性热力学参数

Table 1 Thermodynamic parameters as a function of heating rate

Heating rate/(K·min <sup>-1</sup> )	$T_m$ /K	$\Delta H_D$ /(kJ·mol <sup>-1</sup> )
2.5	350.5	2521.50
5.0	353.2	2938.21
7.5	355.5	2987.66
10	358.1	3344.46

我们在实验中发现 bIgG 和其它 IgG 一样, 在热变性过程中是会发生凝集产生白色沉淀的. Lepock 等<sup>[17~19]</sup>曾使用了一个简单的过程模型描述了此类会发生凝集的不可逆蛋白变性过程: 该过程可以被描述为一个可逆变性过程和随后的一个不可逆变性过程形成的两步三态变构过程, 在这个变构过程中蛋白首先发生可逆变性, 随后变性的蛋白互相作用并发生凝集, 变性蛋白被锁定成不可回复的去折叠状态. 使用 Sanchez-Ruiz 的理论<sup>[20]</sup>, 假定此不可逆变性过程遵从以下的公式:



这里 D 表示 bIgG 热变性后的最终态(凝聚状态, 去折叠态), U 表示变性过程中途的可逆变性态(中间态),  $k$  是因温度改变导致 bIgG 结构变化的 Arrhenius 方程一级反应常数. 如果  $k_3 \gg k_2$ , 表明所有的去折叠态分子都凝集成为不可逆去折叠态, 而不是回复为天然态. 基于这个动力学模式,  $T_m$  与升温速率  $v$  之间的关系可以用式(2)表示, 这里  $A$  (min<sup>-1</sup>)是频率因子,  $E_a$  (kJ/mol)是变性过程的活化能,  $R$  为气态常数.

$$\ln(v/T_m^2) = \ln(AR/E_a) - E_a/RT_m \quad (2)$$

很明显, 该方程反映了  $\ln(v/T_m^2)$  和变量  $E_a/R$  之间的关系. 由此可以看出对于符合式(1)的这样一个三态不可逆变构过程, 其  $T_m$  和  $\Delta H_D$  是受升温速率影响的<sup>[12]</sup>.

综合以上分析, 认为 bIgG 热变性过程中 bIgG 的凝集是导致 bIgG 热变性过程不可逆的主要因素, 是这个

热变性过程中的不可逆过程. 由此和其它 IgG 热变性过程一样<sup>[10]</sup>, 可以将 bIgG 的热变性过程描述为如式(1)所示的一个三态变构过程.

但是, 因为在 bIgG 热变性过程中 bIgG 的凝集过程相对于 bIgG 的变性过程来说是一个快反应过程 ( $K_3 \gg K_1, K_3 \gg K_2$ ), 所以 bIgG 的变性动力学过程可以近似地表示为一个两态反应机制<sup>[16]</sup>, 因此在对本实验数据进行分析时, 可以使用一些基于两态模型基础上的公式.

## 2.2 DSC 对牛血清 IgG 热化学变性过程的研究

使用 DSC 对 bIgG 在不同浓度尿素(0~6 mol/L)和盐酸胍(0~3 mol/L)中的热化学变性过程进行了研究, 所得热力学图谱如图 3 所示. 由图 3 所计算获得的热力学参数如表 2 所示. 所有的热图谱都显示不同条件下 bIgG 的热化学变性过程中仅有一个吸热峰, 并且变性剂浓度的提高会导致  $T_m$  和  $\Delta H_D$  的降低.

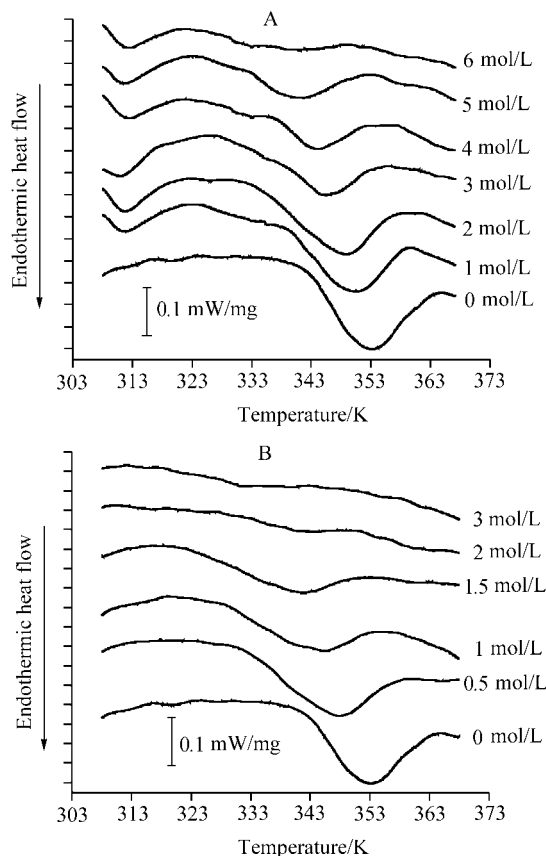
为了验证 bIgG 在热化学变性过程中是否也是一个不可逆过程, 所有的 bIgG 样品也都进行了二次升温扫描. 实验结果显示(部分 DSC 热图谱见图 4), 即使在 5.0 mol/L 尿素或 1.5 mol/L 盐酸胍条件下 bIgG 的热化学变性过程仍然是不可逆的, 而且此热化学变性过程的  $T_m$  和  $\Delta H_D$  值也还是随着升温速率的提升而增大. 从这些结果看来 bIgG 的热化学变性过程仍然是一个多态变构过程. bIgG 的热化学变性过程与 bIgG 的热变性过程相似, 但不同的是 bIgG 在热化学变性过程中的不可逆

**表 2** DSC 测得的不同浓度变性剂中 bIgG 热化学变性的热力学参数

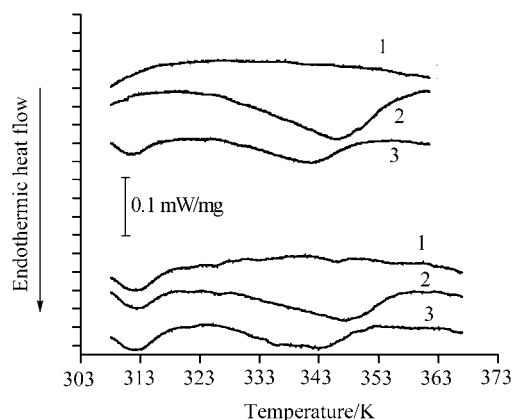
**Table 2** Results of the DSC determination of thermal parameters of bIgG in different concentration of urea and GuHCl

Denaturant concentration/(mol·L <sup>-1</sup> )	$T_m$ /K	$\Delta H_D$ /(kJ·mol <sup>-1</sup> )
Urea		
0	353.2	2938.21
1	350.5	2843.76
2	348.8	2614.82
3	345.6	2011.76
4	344.1	1764.32
5	341.7	1616.23
6	340.9	790.55
GuHCl		
0	353.2	2938.21
0.5	348.1	3149.56
1.0	345.4	2385.47
1.5	342.2	1793.75
2.0	340.1	523.02
3.0	—	—

变性是由于化学变性剂引起的(见等温化学变性实验部分), 而在 bIgG 热变性过程中的不可逆变性过程是由于



**图 3** 不同浓度变性剂中 bIgG 热化学变性的 DSC 热图谱  
**Figure 3** DSC thermogram of thermal denaturation of bIgG in the presence of different concentrations of Urea (A) and GuHCl (B) Heating rates was 5 K/min. The concentrations of denaturant are shown in the figure



**图 4** bIgG 在 1.5 mol/L 盐酸胍和 5 mol/L 尿素中热化学变性的 DSC 热图谱

**Figure 4** DSC thermogram of thermal denaturation of bIgG in 5 mol/L urea or 1.5 mol/L GuHCl at different scanning rate 1—Rescanning, GuHCl 1.5 mol/L, heating-rate 5 K/min; 2—GuHCl 1.5 mol/L, heating rate 10 K/min; 3—GuHCl 1.5 mol/L, heating rate 5 K/min

蛋白凝集造成的. 值得注意的是在低浓度变性剂中, 如尿素在 1 mol/L 时的 bIgG 热化学变性过程中仍然会有 bIgG 的凝集现象被观察到, 这表明在低浓度变性剂中 bIgG 热化学变性过程的不可逆性是由蛋白凝集和变性剂共同造成的.

如图 3 和图 4 所示的, bIgG 的 DSC 图谱吸热峰的不对称性随着变性剂浓度的增加而增加, 变性起始温度和  $T_m$  之间的间隔也增大了. 我们认为这是因为化学变性剂造成 bIgG 不可逆变性的速率低于 bIgG 凝集的速率, 使 bIgG 由可逆变状态转变为不可逆变状态的过程在变性剂存在时延长. 由此也可以证明在 bIgG 的热化学变性过程中有变性中间态[式(1)中 U 态]的存在.

因此可以得出结论, bIgG 的热化学变性过程也是一个复杂的不可逆变构过程, 这个过程也可以描述为式(1)所示的三态变构过程. 在此过程中, 天然结构的蛋白必须经过至少一个部分独立的变性过程中间态.

### 2.3 荧光光谱法研究牛血清 IgG 的等温化学变性

使用荧光光谱法研究了在 298 K 下 bIgG 的等温化学变性过程. 实验中 bIgG 内源性荧光的测量使用的荧光激发波长为 295 和 280 nm, 记录发射波长为 300~400

nm 的荧光光谱. 含不同浓度变性剂的缓冲液在实验中作为空白对照. 图 5 展示了 bIgG 在不同尿素和盐酸胍浓度下的等温化学变性过程的荧光光谱. 实验结果表明 bIgG 天然状态下内源荧光在激发波长为 295 或 280 nm 时发射波最大荧光值波长  $\lambda_{max}$  为 330 nm, 在高浓度尿素中完全变性后发射波长  $\lambda_{max}$  变为 347 nm, 而在高浓度盐酸胍中变性后发射波长  $\lambda_{max}$  变为 351 nm, 且高浓度下 bIgG 的内源荧光强度显著增强了.

使用非线性拟合的方法通过对 bIgG 等温化学变性过程中内源荧光数据的计算得到蛋白在不同变性剂浓度下的变性量  $f_U$ . 同时, 变性过程中 bIgG 变性一半时变性剂的浓度  $c_m$  也被使用以下公式计算得出<sup>[5,21]</sup>:

$$f_U = (F_N - F) / (F_N - F_D) \quad (4)$$

在此,  $F_N$  和  $F_D$  分别表示 bIgG 的天然状态和高变性剂浓度下变性的内源性荧光值,  $F$  表示不同变性剂条件下的 bIgG 实时荧光值. 分别使用 bIgG 在激发波长为 295 或 280 nm 时, 发射波  $\lambda_{max}$  和发射波长 350 nm 处的荧光强度共四个特征性指标, 计算出了 bIgG 的化学等温变性曲线如图 6 所示.

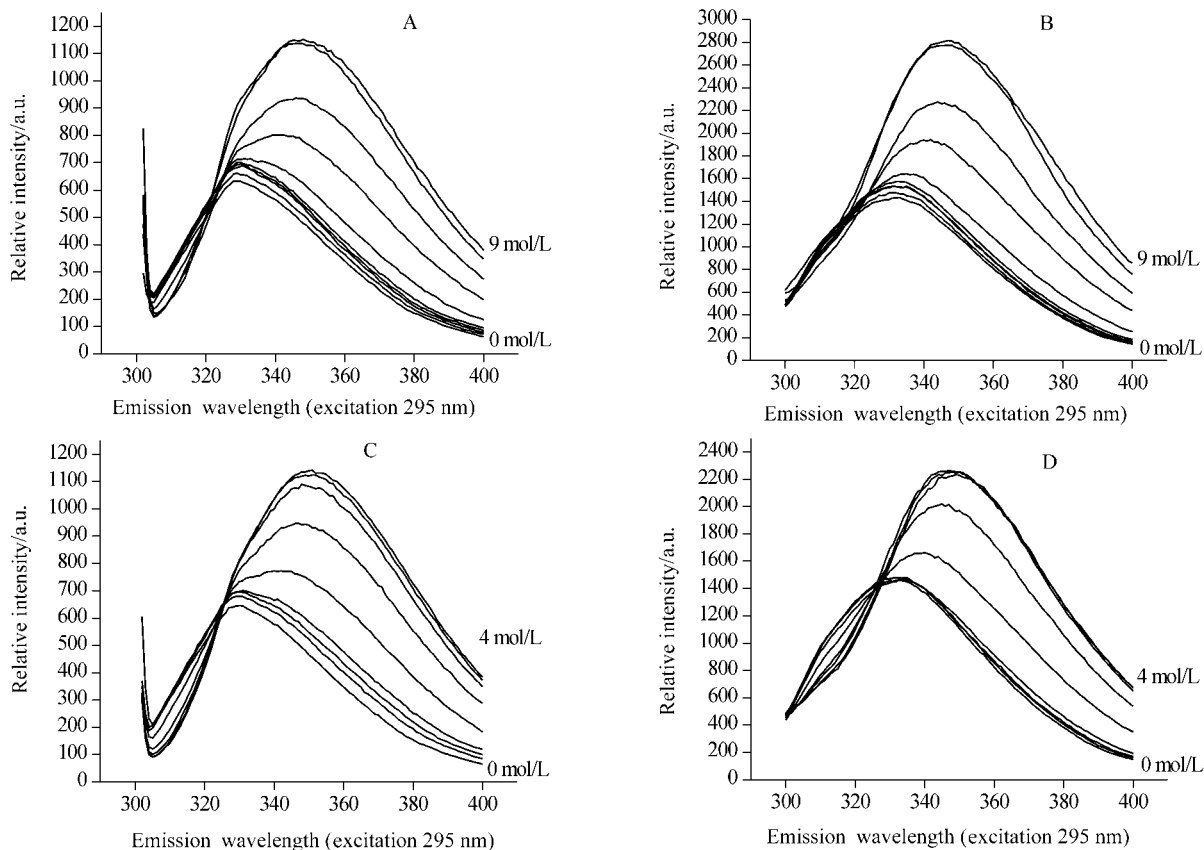


图 5 bIgG 等温变性过程的内源荧光光谱图

Figure 5 Fluorescence spectra of isothermal chemical denaturation of bIgG in 298 K

A—Urea,  $E_x = 295$  nm; B—urea,  $E_x = 280$  nm; C—GuHCl,  $E_x = 295$  nm; D—GuHCl,  $E_x = 280$  nm

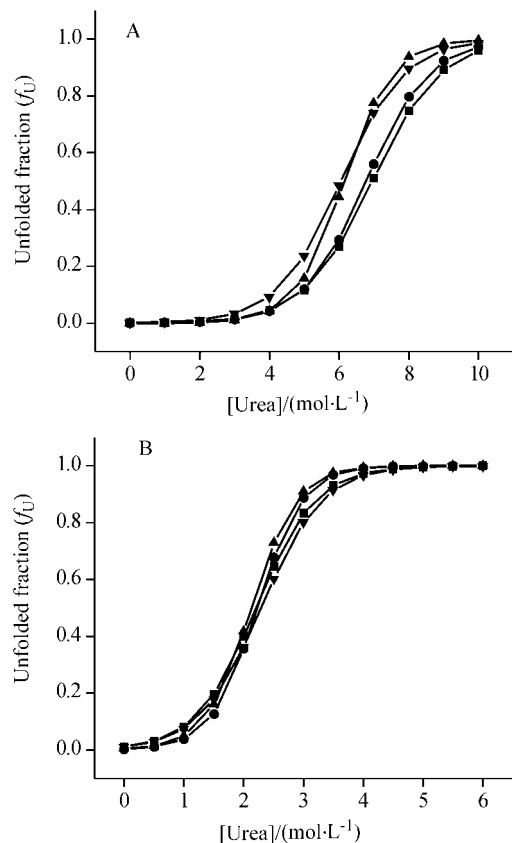


图6 荧光光谱法测得 bIgG 在 298 K 下的等温化学变性曲线  
**Figure 6** Equilibrium unfolding curves of bIgG in different concentration of urea (A) and GuHCl (B) at 298 K  
 (■)  $E_x=295$  nm,  $E_m=350$  nm, (▲)  $E_x=295$  nm,  $E_m=\lambda_{\max}$ , (●)  $E_x=280$  nm,  $E_m=350$  nm, (▼)  $E_x=280$  nm,  $E_m=\lambda_{\min}$

使用非线性拟合方法, 将实验测得数据( $F$ ,  $[C]$ )代入方程(5)中, 可计算得到每条等温变性曲线的  $\Delta G_D$  和  $m_g$  值<sup>[22,23]</sup>:

$$F = F_N + F_D \times \frac{\text{Exp}\{-(\Delta G_D + m_g[C])/RT\}}{1 + \text{Exp}\{-(\Delta G_D + m_g[C])/RT\}} \quad (5)$$

在此  $F$  表示在变性剂浓度为  $[C]$ (变性剂的摩尔浓度)时的蛋白荧光值,  $F_N$  和  $F_D$  是蛋白在天然态和变性态时的荧光值,  $\Delta G_D$  是在没有变性剂情况下的 bIgG 的吉布斯自由能的值,  $m_g$  是斜率( $\partial \Delta G_D / \partial [C]$ ),  $R$  是气态常数,  $T$  是 Kelvin 温度.  $c_m$  (变性剂中浓度,  $f_u=0.5$  时的变性剂浓度), bIgG 的  $m_g$  和  $\Delta G_D$  的值如表 3 所示.

对于一个标准的蛋白二态变构过程, 由蛋白不同的内源荧光指标计算所得的变性曲线应能互相吻合, 不同荧光参数计算所得的  $\Delta G_D$ ,  $c_m$  和  $m_g$  值相互之间应该能很好地匹配<sup>[23]</sup>. 对于 298 K 时由变性剂引起的 bIgG 的化学变性过程使用荧光法进行的研究结果显示, bIgG 不同的内源荧光指标所得的等温化学变性曲线不能互相吻合(图 6), 不同荧光参数计算所得 bIgG 等温化学变性过

程的  $\Delta G_D$ ,  $c_m$  和  $m_g$  值相互之间不能很好地匹配(表 3), 因此表明 bIgG 的化学变性剂引起的去折叠变性过程也是一个存在中间态的多态变构过程.

表 3 bIgG 等温化学变性热力学参数

**Table 3** Thermodynamic parameters for the isothermal chemical denaturation of bIgG

	$c_m /$ (mol·L <sup>-1</sup> )	$m_g /$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )(mol·L <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup>	$\Delta G_D /$ (kJ·mol <sup>-1</sup> ) (298 K)
Urea			
$E_x=295$ nm			
$E_m=\lambda_{\max}$	6.12 ± 0.1	-3.61 ± 0.050	22.19 ± 0.327
$E_m=350$ nm	7.01 ± 0.1	-2.56 ± 0.025	17.80 ± 0.197
$E_x=280$ nm			
$E_m=\lambda_{\max}$	6.01 ± 0.1	-2.75 ± 0.059	16.63 ± 0.188
$E_m=350$ nm	6.75 ± 0.1	-2.78 ± 0.046	18.82 ± 0.142
GuHCl			
$E_x=295$ nm			
$E_m=\lambda_{\max}$	2.25 ± 0.1	-6.55 ± 0.126	13.93 ± 0.281
$E_m=350$ nm	2.44 ± 0.1	-4.97 ± 0.050	10.94 ± 0.067
$E_x=280$ nm			
$E_m=\lambda_{\max}$	2.61 ± 0.1	-4.80 ± 0.100	10.97 ± 0.243
$E_m=350$ nm	2.42 ± 0.1	-6.56 ± 0.122	14.59 ± 0.281

## 2.4 荧光光谱法研究牛血清 IgG 的热化学变性

使用荧光光谱法对不同浓度尿素(0~8 mol/L)或盐酸胍(0~5 mol/L)条件下的 bIgG 热变性的过程进行了研究. 在使用荧光光谱法研究 bIgG 热化学变性实验中, 所有样品在升温结束后也都降温到 303 K 后再次测量样品内源荧光值, 并与升温前的样品荧光参数进行比较. 变性后 bIgG 溶液在冷却后的二次荧光测量结果表明, bIgG 热化学变性过程是不可逆的(图谱未列出). 这个结果也证实了 DSC 实验中 bIgG 热化学变性过程是不可逆过程的结论.

以 bIgG 在不同条件下荧光激发波 295 或 280 nm 时发射波  $\lambda_{\max}$  的变化做出了 bIgG 的热化学变性曲线, 图 7 分别显示了在不同浓度尿素或盐酸胍溶液中 bIgG 在激发波 295 nm 时发射波  $\lambda_{\max}$  的热化学变性曲线(280 nm 的变性曲线相似, 未列出), 由图 7 可见 bIgG 内源荧光发射波  $\lambda_{\max}$  的变化受变性剂浓度  $[C]$  和温度的双重影响. 蛋白色氨酸和酪氨酸残基的内源荧光发射波  $\lambda_{\max}$  的位置变化反映了相应残基所处外环境的极性变化, 如在非极性环境中色氨酸残基在荧光激发波 295 nm 时的发射波  $\lambda_{\max}$  为 320 nm, 而当在极性环境中时其发射波  $\lambda_{\max}$  变为 355 nm. 发射波  $\lambda_{\max}$  的红移反映了 bIgG 色氨酸和酪氨酸残基从一个非极性环境因蛋白结构改变而进入到一个极性环境中. bIgG 色氨酸和酪氨酸残基所处外环境的改变是因为 bIgG 的结构在变性剂和温度的影响下, 三

级结构变为无序, 多肽链因去折叠而伸展的结果。

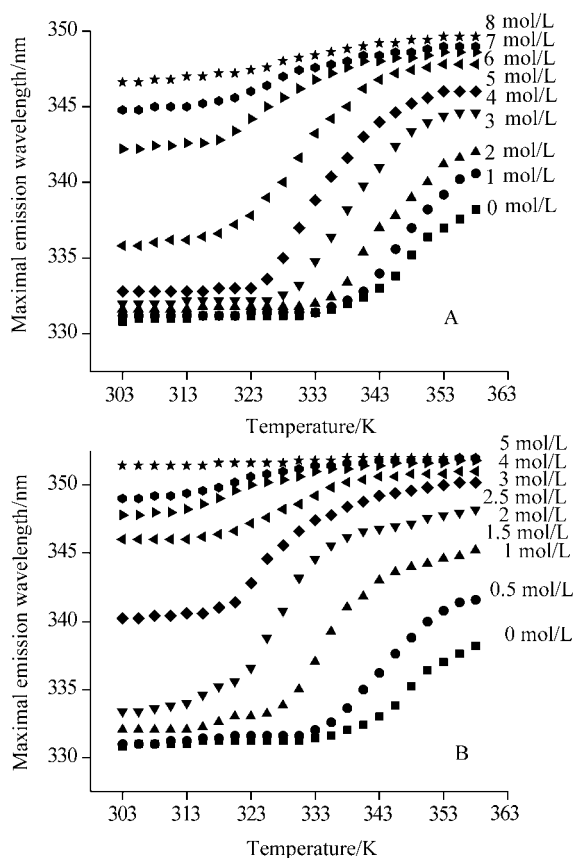


图7 荧光光谱法测得的 bIgG 热化学变性曲线

**Figure 7** Thermal denaturation curves of bIgG in the presence of various concentrations of urea (A) and GuHCl (B) at pH 7.4. Fluorescence  $E_x=295$  nm,  $E_m=\lambda_{max}$ . The concentrations of GuHCl and urea are shown in the figure

在 bIgG 的整个热变性, 等温化学变性和热化学变性过程中, bIgG 在荧光激发波长 295 和 280 nm 下, 在 300~400 nm 区段的发射波谱始终呈现为 1 个峰, 但这个发射波谱峰的位置( $\lambda_{max}$ )在不同的条件下是不同的(如表 4 所示)。

表4 不同条件下 bIgG 的荧光发射波谱峰的位置( $\lambda_{max}$ )

**Table 4** Fluorescence  $E_m$  ( $\lambda_{max}$ ) of bIgG in different denaturation condition

$T/K$	$c/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$E_x/\text{nm}$	$E_m$ ( $\lambda_{max}$ )/nm
303	0	280, 295	330
358	0	280, 295	338
303	Urea $\geq$ 8.0	280, 295	347
303	GuHCl $\geq$ 3.5	280, 295	351
358	Urea $\geq$ 8.0	280, 295	349
358	GuHCl $\geq$ 3.5	280, 295	352

bIgG 在不同变性过程的终末态的发射波谱峰的位置( $\lambda_{max}$ )的差异表明, 在经历了不同变构过程后 bIgG 去

折叠态的空间结构是不同的, 其去折叠程度因外环境的变化相差巨大. 由表 4 可知, bIgG 在热变性过程中的去折叠是非常不充分的, 这是由于 bIgG 在热变性过程中疏水基团暴露出来后, bIgG 之间的疏水基团互相吸附, 使 bIgG 在充分去折叠前就发生凝集造成的<sup>[6,7]</sup>. 我们在实验中观察到 bIgG 的热变性过程中, bIgG 在温度达到一定程度时首先蛋白溶液变为白色浑浊, 然后很快出现白色絮状沉淀. 但在在尿素浓度高于 2 mol/L 或盐酸胍浓度大于 0.5 mol/L 的条件下(蛋白浓度 0.1 mg/mL)即使在 358 K 下数小时, bIgG 溶液中也无白色浑浊可被观察到. 这是由于小分子变性剂与 bIgG 折叠过程中暴露出来的疏水基团相结合, 阻止了 bIgG 的凝集, 使 bIgG 能充分的伸展并去折叠. 由于 bIgG 折叠链伸展后是疏水较强的残基向水溶液中暴露, 因此 bIgG 与尿素和盐酸胍的结合力主要是氢键, 静电作用力在此起辅助作用<sup>[24,25]</sup>. 值得注意的是, 即使在高浓度化学变性剂下的热化学变性过程中, 尿素和盐酸胍所引起的 bIgG 的热化学变性的终末态也是不完全相同的, 与肽链结合能力更强的盐酸胍会导致 bIgG 更完全的去折叠.

### 3 结论

通过对牛血清 IgG 的热化学变性研究得出以下结论:

1. bIgG 的热变性和热化学变性过程都是复杂的不可逆变构过程, 这个过程可以被描述为一个三态变构过程, 在这个过程中存在一个或数个 bIgG 的中间态. bIgG 在热化学变性过程中的变性温度和焓变值与变性剂的浓度呈负相关性.
2. bIgG 的等温化学变性过程也是复杂的多态变性过程, 其变性过程中也可能存在变性中间态.
3. 使用 DSC 和荧光光谱法报道了 bIgG 的热变性, 等温化学变性和热化学变性过程的主要热力学参数.

### References

- 1 Schellman, J. A. *Biophys. Chem.* **2002**, *96*, 91.
- 2 Jiao, M.; Liang, Y.; Li, H.-T.; Wang, X. *Acta Chim. Sinica* **2003**, *61*, 1362 (in Chinese). (焦铭, 梁毅, 李洪涛, 王曦, 化学学报, **2003**, *61*, 1362.)
- 3 Tanford, C.; Buzzell, J.; Rands, D.; Swanson, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *76*, 6421.
- 4 Dill, K.; Alonso, D.; Hutchinson, K. *Biochemistry* **1989**, *28*, 5439.
- 5 Farruggia, B.; Picó, G. A. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *26*, 317.
- 6 Oreskes, I.; Mandel, D. *Anal. Biochem.* **1983**, *134*, 199.
- 7 Rosenqvist, E.; Jossng, T.; Feder, J. *Mol. Immunol.* **1987**,

- 24, 495.
- 8 Brody, T. *Anal. Biochem.* **1997**, *247*, 247.
- 9 Shimizu, M.; Nagashima, H.; Hashimoto, K. *Comp. Biochem. Physiol. B* **1993**, *106*, 255.
- 10 Cioci, F.; Lavecchia, R. *Biotechnol. Tech.* **1998**, *12*, 855.
- 11 Vermeer, A. P.; Bremer, M. G. E. G.; Norde, W. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1425*, 1.
- 12 Vermeer, A. W. P.; Norde, W. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 394.
- 13 Vermeer, A. W. P.; Norde, W.; Amerongen, A. V. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 2150.
- 14 Cieřła, K.; Roos, Y.; Głuszewski, W. *Radiat. Phys. Chem.* **2000**, *58*, 233.
- 15 Singh, N.; Liu, Z.; Fisher, H. F. *Biophys. Chem.* **1996**, *63*, 27.
- 16 Sanchez-Ruiz, J. M. *Biophys. J.* **1992**, *61*, 921.
- 17 Castronouvo, G. *Thermochim. Acta* **1991**, *193*, 363.
- 18 Lepock, J. R.; Ritchie, K. P.; Kolios, M. C.; Rodahl, A. M.; Heinz, K. A.; Kruuv, J. *Biochemistry* **1992**, *31*, 12706.
- 19 McCarthy, D. A.; Drake, A. F. *Mol. Immunol.* **1989**, *26*, 875.
- 20 Sanchez-Ruiz, J. M.; López-Lacomba, J. L.; Cortijo, M.; Mateo, P. L. *Biochemistry* **1988**, *27*, 1648.
- 21 Moosavi-Movahedi, A. A.; Nazari, K. *Int. J. Biol. Macromol.* **1995**, *17*, 43.
- 22 Santoro, M. M.; Bolen, D. W. *Biochemistry* **1988**, *27*, 8063.
- 23 Moza, B.; Qureshi, S. H.; Ahmad, F. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1646*, 49.
- 24 Wang, B.-N.; Tan, F. *Sci. China, Ser. B* **1997**, *27*, 271 (in Chinese).  
(王邦宁, 谈夫, 中国科学 B 辑, **1997**, *27*, 271.)
- 25 Makhatadse, G. I.; Privalov, P. L. *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 491.

(A0503094 SHEN, H.; LING, J.)