

研究论文

# 渗透剂对苹果酸脱氢酶包含体的复性作用

刘建华, 董晓燕, 付敏玲, 孙彦

(天津大学化工学院, 天津 300072)

**摘要:** 将甜菜碱和海藻糖两种渗透剂作为添加剂, 考察了其促进苹果酸脱氢酶包含体的复性作用。结果显示, 甜菜碱和海藻糖均可有效促进大肠杆菌苹果酸脱氢酶包含体的复性。在本文实验条件下, 随添加甜菜碱浓度的升高, 复性后苹果酸脱氢酶的比活增大; 而海藻糖则出现最佳添加浓度使复性后苹果酸脱氢酶的比活最大; 同时在盐酸胍浓度较高、不添加渗透剂时复性效果较差的复性体系中, 若添加合适浓度的甜菜碱或海藻糖即可有效促进苹果酸脱氢酶的复性, 显示出渗透剂作为添加剂在实际包含体蛋白质复性过程中的应用前景。另外, 通过外源荧光分析发现, 添加甜菜碱和海藻糖均可降低苹果酸脱氢酶表面疏水性区域的暴露程度; 圆二色光谱分析则表明, 甜菜碱和海藻糖可以促进苹果酸脱氢酶  $\alpha$ -螺旋结构的生成。

**关键词:** 渗透剂; 大肠杆菌苹果酸脱氢酶; 复性; 1-苯胺基萘-8-磺酸; 圆二色光谱

**中图分类号:** O 629.73; O 643.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0438-1157 (2007) 11-2864-07

## Effect of osmolytes on refolding of *E. coli* malate dehydrogenase

LIU Jianhua, DONG Xiaoyan, FU Minling, SUN Yan

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** Recombinant *E. coli* malate dehydrogenase (eMDH) was expressed as inclusion bodies (IBs), and the eMDH IBs was used as a real oligomeric protein to study protein refolding from IBs assisted by two major osmolytes, betaine and trehalose. It was observed that the specific activity of eMDH was enhanced by increasing betaine concentration, while there was an optimal trehalose concentration at which the protein was favorably renatured. Furthermore, the renaturation could be improved even at high guanidinium chloride concentrations (up to  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in the presence of betaine or trehalose. It was shown by binding of 1-anilino-8-naphthalene sulfonic acid (ANS) to eMDH as a function of osmolyte concentration at different guanidinium chloride concentrations that the hydrophobic residue exposure on eMDH surface was reduced in the presence of osmolyte. Circular dichroism (CD) spectra indicated that osmolyte could promote the formation of  $\alpha$ -helical in eMDH.

**Key words:** osmolyte; *E. coli* malate dehydrogenase; refolding; 1-anilino-8-naphthalene sulfonic acid; circular dichroism

## 引 言

外界环境如温度、压力及盐浓度等的变化均会

导致生物大分子性质的改变, 但研究发现, 大部分生物体都可利用其体内的小分子渗透剂 (osmolyte) 来对抗外界环境对生物大分子的破坏

2006-12-30 收到初稿, 2007-02-12 收到修改稿。

**联系人:** 董晓燕。第一作者: 刘建华 (1978—), 男, 博士研究生。

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (20476081, 20676098)。

**Received date:** 2006-12-30.

**Corresponding author:** Prof. DONG Xiaoyan. **E-mail:** d\_xy@tju.edu.cn

**Foundation item:** supported by the National Natural Science Foundation of China (20476081, 20676098).

作用<sup>[3]</sup>。渗透剂包括碳水化合物类、甲胺类及氨基酸类等<sup>[1]</sup>，其中碳水化合物类的海藻糖和甲胺类的甜菜碱均广泛存在于生物体内。体外研究实验表明，海藻糖和甜菜碱不但可以提高蛋白质的热稳定性<sup>[2-3]</sup>，可以用作蛋白质药物及酶类等蛋白质分子加工过程中的保护剂及存放过程中的稳定剂<sup>[4]</sup>，还可以促进蛋白质的折叠，抑制蛋白质的聚集，作为添加剂用于辅助多种蛋白质的复性<sup>[5-7]</sup>；本课题组之前的研究则发现甜菜碱和海藻糖都可以促进含二硫键的单分子球蛋白——变性还原溶菌酶的复性<sup>[8-9]</sup>。Bolen 等<sup>[10-11]</sup>也发现渗透剂溶液中蛋白质可以自发折叠，并通过蛋白质从水溶液进入渗透剂溶液中的转移自由能的变化分析了这一过程的机制。

大肠杆菌苹果酸脱氢酶 (*E. coli* malate dehydrogenase, eMDH) 是由相同的亚基结合而成的同源二聚体分子，分子内不存在二硫键，亚基间的结合主要通过氢键及疏水性相互作用，常作为寡聚蛋白质的模型蛋白质研究其折叠行为<sup>[12-14]</sup>。对于 MDH 的复性研究则表明，分子伴侣体系、硫氧还原蛋白和二硫键异构酶等均可以促进其复性<sup>[12-14]</sup>，但是这些物质的生物属性限制了其大规模的应用；在其他蛋白质复性中经常使用的添加剂中，甘油对 MDH 的复性效果不很明显，精氨酸更是会抑制 MDH 的复性<sup>[15]</sup>。通过对猪心线粒体苹果酸脱氢酶 (sMDH) 的折叠研究表明，MDH 的折叠可能通过两种途径进行：由部分折叠的单体生成正确折叠的单体，进而生成二聚体；或者是由部分折叠的单体直接生成部分折叠的二聚体结构，经折叠后生成天然态二聚体。折叠的速率控制步骤分别为部分折叠体或部分折叠二聚体的正确折叠<sup>[16-17]</sup>。基于渗透剂具有促进蛋白质折叠的作用，本文考虑将渗透剂作为添加剂用于辅助 eMDH 复性。为了考察将渗透剂这种生物相容性的小分子物质作为实用蛋白质复性添加剂的应用前景，并分析渗透剂作为添加剂辅助 eMDH 复性的作用机制，本文研究了不同盐酸胍浓度下海藻糖和甜菜碱对 eMDH 包含体复性的影响，并通过 1-苯胺基萘-8-磺酸 (ANS) 外源荧光及圆二色光谱 (CD) 定性分析了不同复性条件下复性产物的结构特性。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

甜菜碱 (betaine)、海藻糖 (trehalose)、二硫苏糖醇 (DTT)、L-苹果酸 (L-malate)、氧化型辅酶 I (NAD<sup>+</sup>)、1-苯胺基萘-8-磺酸 (ANS) 购自 Sigma 公司；盐酸胍 (guanidinium chloride, GdnCl)、Tris、EDTA Na<sub>2</sub> 购自 Genview 公司；猪心线粒体苹果酸脱氢酶 (sMDH) 购自 Amersco 公司。其他试剂均为国产分析纯。

采用本课题组自行构建的以大肠杆菌 DH 5 $\alpha$  为宿主的苹果酸脱氢酶工程菌 (pBV220-eMDH)，通过摇瓶培养，经热诱导使得 eMDH 以包含体形式在菌体内高效表达。

### 1.2 eMDH 包含体的制备及溶解变性

以超声波细胞粉碎机将诱导表达后的基因工程菌冰上超声破菌，于 4℃ 下 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 收集沉淀。将沉淀分别用含 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 的 20 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲体系 (pH 7.2)、2 mol·L<sup>-1</sup> 尿素和含 10 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 的 0.5% Triton X-100 反复洗涤后得到 eMDH 包含体。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，得到的包含体与 MDH 亚基分子量一致 (32000)。

以含 8 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸胍、20 mmol·L<sup>-1</sup> DTT 的 100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7.6) 缓冲液作为包含体的变性缓冲液。取一定质量的 eMDH 包含体，用变性缓冲液溶解后，置于 37℃ 恒温 1 h。通过 Bradford 蛋白质定量法测定变性液的蛋白质浓度。

### 1.3 eMDH 复性及活性测定

向含有一定量的甜菜碱或海藻糖的复性缓冲液 (100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.6) 中加入一定量的包含体变性液，充分振荡后置于 4℃，24 h 后参照文献 [18] 方法测定其比活，定义每分钟生成 1  $\mu$ mol NADH 所需的 eMDH 量为 1 个酶活性单位 (U)。最终复性液组成为一定浓度的盐酸胍和渗透剂、5 mmol·L<sup>-1</sup> DTT、100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7.6)，最终复性液体积为 1 ml。所有复性实验均重复 3 次取平均值。

### 1.4 ANS 外源荧光光谱分析

向在不同盐酸胍和渗透剂 (甜菜碱或海藻糖) 浓度下复性后的 eMDH 溶液中加入一定量的

ANS, 使得 eMDH 与 ANS 的摩尔比为 1 : 200。待 eMDH 与 ANS 结合 30 min 后, 应用 Perkin Elmer LS 55 荧光光谱仪测定溶液的荧光发射光谱。荧光激发波长设定为 380 nm, 扣除对照体系的荧光发射谱后得到苹果酸脱氢酶在不同溶液条件下的 ANS 外源荧光光谱。

由于未见商品化 eMDH, 选取与 eMDH 结构最相近的 sMDH, 测定天然态 sMDH 的 ANS 外源荧光作为实验参照。

### 1.5 圆二色光谱分析

以 Jasco J-810 spectrophotometer 圆二色光谱仪测定变性 eMDH 溶液及在不同盐酸胍和渗透剂(甜菜碱或海藻糖)浓度下复性后的 eMDH 的圆二色光谱。扫描范围为 220~250 nm, 酶浓度为 0.05 mg · ml<sup>-1</sup>。各试样均扫描 3 次后取平均值; 最终结果用摩尔椭圆度 ( $\theta$ ) 表示。并测定天然态 sMDH 的圆二色光谱作为实验参照。

## 2 结果与讨论

### 2.1 盐酸胍浓度对 eMDH 复性的影响

由于复性液中盐酸胍的终浓度对变性蛋白质的复性收率影响很大<sup>[8-9]</sup>, 首先考察了复性液中盐酸胍浓度对复性后 eMDH 活性的影响。图 1 是在 0.06~0.6 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸胍浓度范围内、eMDH 的终浓度为 0.05 mg · ml<sup>-1</sup> 时, 4℃ 复性 24 h 后 eMDH 的比活变化。

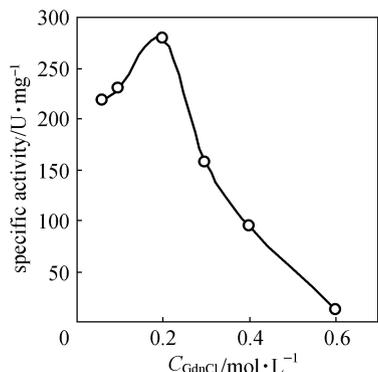


图 1 盐酸胍浓度对苹果酸脱氢酶复性的影响

Fig. 1 Effect of GdnCl on refolding of eMDH

从图 1 可以看出, 在盐酸胍浓度为 0.2 mol · L<sup>-1</sup> 时 eMDH 复性后比活达到最大值, 而过高或过低的盐酸胍浓度均不能获得较好的复性效果。eMDH 是由相同的亚基结合而成的同源二聚体分子, 亚基间的结合主要通过氢键及疏水相互作用。

过高的盐酸胍浓度会破坏亚基之间的疏水性相互作用, 使 eMDH 的二聚体形成受到抑制而丧失活性。Sanyal 等<sup>[16]</sup>发现 0.5~0.75 mol · L<sup>-1</sup> 的盐酸胍即可完全破坏 sMDH 的二聚体结构。但在过低的盐酸胍浓度下, 盐酸胍抑制复性过程中 eMDH 的中间体聚集的效果就会相应减弱, eMDH 比活也随之降低。

### 2.2 渗透剂对 eMDH 复性的促进作用

为了分析甜菜碱和海藻糖在 eMDH 复性过程中的作用, 考察了不同的盐酸胍浓度下, 在复性液中分别添加 0.05~2.0 mol · L<sup>-1</sup> 甜菜碱或 0.05~1.0 mol · L<sup>-1</sup> 海藻糖, 4℃ 复性 24 h 后 eMDH 的比活, 结果列于表 1。最终酶浓度为 0.05 mg · ml<sup>-1</sup>。

表 1 eMDH 在不同盐酸胍和渗透剂浓度下复性后比活  
Table 1 Effect of osmolyte on eMDH refolding at different GdnCl concentrations

C <sub>GdnCl</sub> / mol · L <sup>-1</sup>	C <sub>trehalose</sub> / mol · L <sup>-1</sup>	Specific activity / U · mg <sup>-1</sup>	C <sub>betaine</sub> / mol · L <sup>-1</sup>	Specific activity / U · mg <sup>-1</sup>
0.1	0	226.35 ± 5.35	0	226.35 ± 5.35
	0.05	264.52 ± 6.88	0.05	262.19 ± 4.73
	0.1	304.87 ± 6.06	0.1	291.78 ± 3.87
	0.2	331.60 ± 4.43	0.5	336.06 ± 5.16
	0.5	399.11 ± 7.27	1.0	381.77 ± 6.44
	1.0	355.86 ± 10.10	2.0	394.40 ± 8.31
0.2	0	280.63 ± 3.08	0	280.63 ± 3.08
	0.05	304.34 ± 5.41	0.05	288.31 ± 3.99
	0.1	327.15 ± 5.72	0.1	290.57 ± 7.47
	0.2	356.40 ± 7.39	0.5	355.48 ± 2.66
	0.5	416.65 ± 2.73	1.0	400.07 ± 9.25
	1.0	363.45 ± 8.36	2.0	427.50 ± 14.53
0.3	0	155.44 ± 2.31	0	155.44 ± 2.31
	0.05	200.12 ± 4.48	0.05	158.83 ± 5.45
	0.1	243.26 ± 9.25	0.1	175.41 ± 7.11
	0.2	265.33 ± 3.74	0.5	250.36 ± 3.68
	0.5	369.20 ± 6.18	1.0	318.42 ± 5.66
	1.0	323.06 ± 8.22	2.0	375.54 ± 11.85
0.4	0	91.13 ± 7.36	0	91.13 ± 7.36
	0.05	119.07 ± 6.03	0.05	116.35 ± 6.07
	0.1	151.41 ± 4.99	0.1	131.25 ± 3.94
	0.2	223.92 ± 5.11	0.5	240.18 ± 5.73
	0.5	355.15 ± 5.26	1.0	272.39 ± 7.92
	1.0	301.13 ± 8.78	2.0	358.44 ± 10.32
0.6	0	10.98 ± 2.10	0	10.98 ± 2.10
	0.05	15.45 ± 3.03	0.05	11.58 ± 3.01
	0.1	22.03 ± 4.13	0.1	16.12 ± 3.79
	0.2	46.18 ± 4.00	0.5	31.44 ± 5.81
	0.5	88.78 ± 3.86	1.0	66.05 ± 6.24
	1.0	58.25 ± 3.86	2.0	91.31 ± 8.57

从表 1 中可以看出,  $0.1 \sim 0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸胍浓度范围内, 甜菜碱和海藻糖作为添加剂都可以促进 eMDH 复性, 且各盐酸胍浓度下甜菜碱或海藻糖对复性效果的影响趋势均一致。随甜菜碱浓度的逐渐升高, eMDH 比活逐渐增大; 而随海藻糖浓度的逐渐升高, eMDH 比活先逐渐增大, 当海藻糖浓度达到  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时又略为减小。

作者对变性还原溶菌酶的复性研究中同样发现, 存在最佳的海藻糖浓度使其复性收率最高<sup>[8]</sup>。分析认为, 由于海藻糖降低变性蛋白质之间的不可逆聚集, 同时可使正确折叠的蛋白质分子更加稳定<sup>[7]</sup>, 因而添加浓度适当时可以提高蛋白质复性收率; 但由于海藻糖还可以稳定变性态蛋白质<sup>[7]</sup>, 因而添加浓度过高又会在一定程度上抑制变性态蛋白质的正确折叠。

整体而言, 盐酸胍浓度范围为  $0.1 \sim 0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 合适的甜菜碱或海藻糖浓度都可使复性后 eMDH 的比活达到  $350 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  以上, 明显高于无添加剂时最适盐酸胍浓度 ( $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 下 eMDH 的比活 ( $280 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ )。

在自发复性的最适盐酸胍浓度 ( $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 下 (图 2), 添加  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甜菜碱或  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  海藻糖, 复性后 eMDH 的比活可达  $420 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 较自发复性酶活 ( $280 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) 提高了 50%。

当未添加渗透剂时, 盐酸胍浓度超过  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, eMDH 单体内部及单体之间疏水性相互作用被抑制, 其复性也被抑制。但在盐酸胍浓度为  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 添加合适浓度的甜菜碱或海藻糖仍可保证 eMDH 复性后获得相对的高比活 (图 2)。这一结果显示甜菜碱或海藻糖作为添加剂应用于 eMDH 复性的工业化应用前景, 添加适当浓度的甜菜碱或海藻糖, 可以在较高的盐酸胍浓度下得到较好的复性效果, 因此在生产过程中可以减小复性体系的稀释倍数, 亦即大幅度降低复性后的蛋白质溶液的体积, 从而降低进一步分离纯化过程的料液处理量。如本实验中, 适当添加渗透剂后, 达到较好复性效果的盐酸胍浓度可从  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  升高至  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 料液处理量可减少 1/2, 有利于实现大规模生产。

### 2.3 复性产物结构分析

很多研究都表明渗透剂可以稳定天然态蛋白质的结构<sup>[1-3,10,19]</sup>。如甜菜碱和海藻糖都可以提高盐

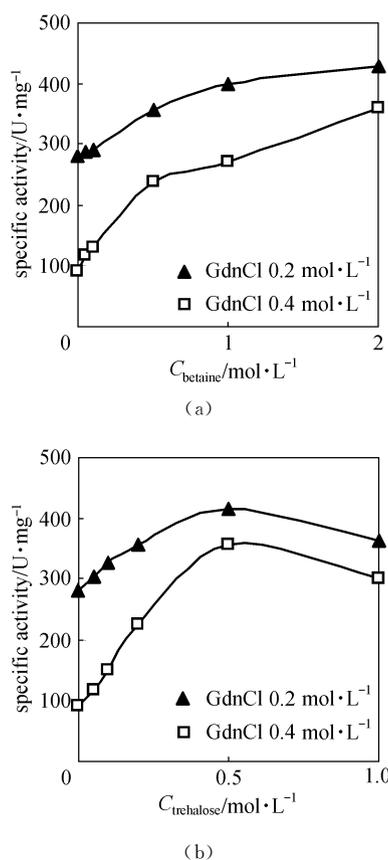
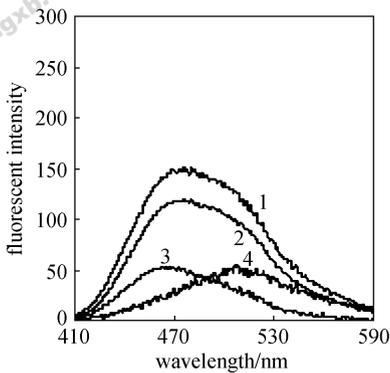


图 2 不同盐酸胍浓度下渗透剂浓度对 eMDH 复性的影响  
Fig. 2 Effect of osmolyte on eMDH refolding in the presence of GdnCl

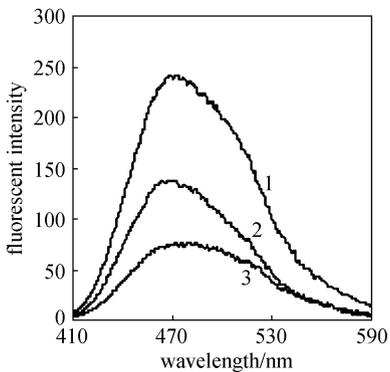
酸胍诱导的溶菌酶去折叠过程的自由能变化, 在相同的盐酸胍浓度下, 甜菜碱和海藻糖溶液中的溶菌酶分子更易于保持天然态的构象<sup>[9]</sup>。另外, 渗透剂可以促进未折叠的蛋白质分子正确折叠<sup>[10-11,19]</sup>, 并且可以抑制热变性过程中蛋白质的聚集、诱发伸展肽链产生  $\alpha$ -螺旋和三级结构<sup>[20]</sup>。为了考察甜菜碱和海藻糖对 eMDH 作用后产物的结构变化特性, 利用荧光探针 (ANS) 和 CD 对自发复性和添加剂辅助复性后的产物进行了分析。

2.3.1 复性产物的 ANS 外源荧光分析 在盐酸胍浓度为  $0.1$ 、 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 分别考察了不添加渗透剂, 添加  $0.5$ 、 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甜菜碱或添加  $0.2$ 、 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  海藻糖时, 复性后 eMDH 的 ANS 外源荧光光谱, 结果见图 3、图 4 (所有荧光实验中 eMDH 浓度均为  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )。图 3 中同时给出了天然态 sMDH 的 ANS 外源荧光作为对照。

对于天然态 sMDH, 其 ANS 外源荧光很弱 (图 3), 说明天然态 MDH 表面的疏水性残基暴露



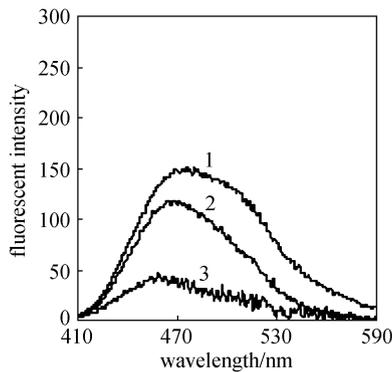
(a)  $C_{\text{GdnCl}} = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$



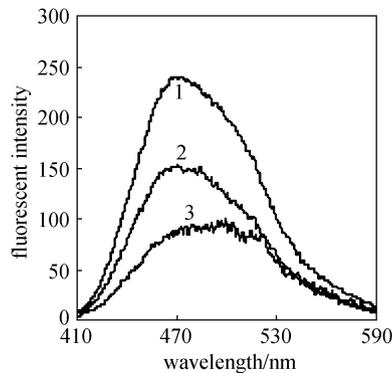
(b)  $C_{\text{GdnCl}} = 0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 3 不同盐酸胍浓度下甜菜碱浓度对 eMDH 复性产物 ANS 外源荧光的影响

Fig. 3 Fluorescent intensity of ANS bound to eMDH refolded at different GdnCl and betaine concentration  
betaine concentration/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  
1—0; 2—0.5; 3—2; 4—native sMDH



(a)  $C_{\text{GdnCl}} = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$



(b)  $C_{\text{GdnCl}} = 0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 4 不同盐酸胍浓度下海藻糖浓度对 eMDH 复性产物 ANS 外源荧光的影响

Fig. 4 Fluorescent intensity of ANS bound to eMDH refolded at different GdnCl and trehalose concentration  
trehalose concentration/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  
1—0; 2—0.2; 3—0.5

较少。对比图 3、图 4，未添加渗透剂时，在  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸胍溶液中 ANS 外源荧光强度明显升高，且在  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸胍溶液中 ANS 外源荧光强度更大。这说明在这两种盐酸胍浓度下，eMDH 的表面疏水性残基暴露程度都明显高于天然态，且  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸胍溶液中疏水性残基的暴露程度更高，这与 Sanyal 等<sup>[16]</sup>对 sMDH 的研究结果一致。此时 eMDH 复性产物的结构相对松散，特别是当盐酸胍浓度较高 ( $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 时，由于盐酸胍抑制 eMDH 亚基内部和亚基之间的疏水性相互作用，使肽链不易折叠，疏水性基团暴露更为明显，即折叠单体和二聚体的正确结构均不易形成，因而体现出较低的比活 (表 1)。但当添加渗透剂甜菜碱或海藻糖后 (图 3、图 4)，两种盐酸胍浓度下，复性后 eMDH 的 ANS 外源荧光强度均明显降低，且添加浓度越高，荧光强

度越低，表明甜菜碱或海藻糖均可以有效抑制 eMDH 疏水性残基的暴露，即有效促进 eMDH 亚基的折叠以及亚基之间通过疏水性相互作用的结合，因此也表现出较高的活性 (表 1)。

2.3.2 复性产物的圆二色光谱分析 在盐酸胍浓度为  $0.1$ 、 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时，分别考察了不添加渗透剂、添加  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甜菜碱或添加  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  海藻糖时 eMDH 复性产物的圆二色光谱，结果见图 5，eMDH 浓度均为  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。由于溶液中盐酸胍的影响，圆二色光谱仅能正确扫描  $220 \sim 250 \text{ nm}$  波长。

圆二色光谱可以反映蛋白质分子的二级结构信息， $222 \text{ nm}$  附近的  $\theta$  值的绝对值越大则表示分子中含有更多的  $\alpha$ -螺旋。从图 5 可以看出，变性态的 eMDH 基本丧失了其  $\alpha$ -螺旋结构，而不同条件下

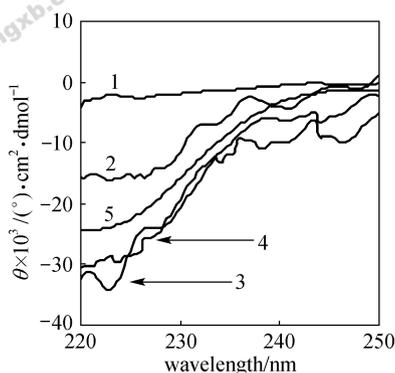
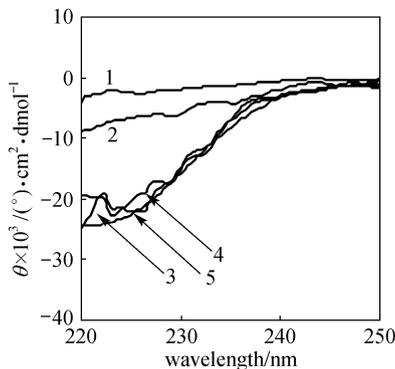
(a)  $C_{\text{GdnCl}} = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (b)  $C_{\text{GdnCl}} = 0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 

图 5 eMDH 复性产物的圆二色光谱图

Fig. 5 CD spectra of eMDH

1—denatured eMDH; 2—refolded eMDH without osmolyte; 3—refolded eMDH in the presence of  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  betaine; 4—refolded eMDH in the presence of  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  trehalose; 5—native sMDH

的复性产物均形成了  $\alpha$ -螺旋结构, 且复性产物的比活随  $\alpha$ -螺旋结构的形成而增大。

晶体结构研究显示, eMDH 二聚体界面处的相互作用主要是由结构紧密的  $\alpha$ -螺旋相互作用<sup>[18]</sup>。在溶液环境中, 苹果酸脱氢酶的二聚体结构对于其催化活性有很重要的意义<sup>[18,21]</sup>。本文结果证明, 由于甜菜碱或海藻糖均可有效促进不同浓度盐酸胍溶液中 eMDH 的  $\alpha$ -螺旋结构的生成, 促进其二聚体结构的形成, 因此表现出其促进复性的作用。研究表明<sup>[20]</sup>, 渗透剂可以诱导溶菌酶分子的  $\alpha$ -螺旋和三级结构形成, 同时抑制分子间的相互作用, 这也与本文结果一致。

如前所述, MDH 折叠可以由部分折叠的单体生成正确折叠的单体, 进而生成天然态二聚体; 也可以由部分折叠的单体直接生成部分折叠的二聚体

结构, 经折叠后生成天然态二聚体<sup>[15-16]</sup>。一般认为, 渗透剂溶液中, 蛋白质是优先水合的<sup>[11,19]</sup>, 部分折叠态蛋白质在渗透剂溶液中化学势增大<sup>[9]</sup>, 蛋白质更易于以天然态存在。结合本文通过 ANS 外源荧光及 CD 分析, 可以认为甜菜碱和海藻糖均可以通过促进 eMDH 部分折叠单体或部分折叠二聚体的正确折叠而促进其复性, 提高酶活性。

### 3 结 论

在不同的盐酸胍浓度下, 甜菜碱和海藻糖均可以促进大肠杆菌苹果酸脱氢酶复性。在本文实验条件下, 随甜菜碱浓度逐渐升高, 复性后苹果酸脱氢酶的比活逐渐增大; 而海藻糖则出现最佳浓度 ( $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 使得复性效果达到最高。通过 ANS 外源荧光分析发现, 添加甜菜碱和海藻糖均可以降低苹果酸脱氢酶表面疏水性区域的暴露程度, 促进  $\alpha$ -螺旋结构的生成。在盐酸胍浓度较高的复性体系中, 加入合适浓度的甜菜碱或海藻糖仍可有效促进苹果酸脱氢酶的复性, 显示出渗透剂作为添加剂在实际蛋白质复性过程中的应用前景。

### References

- [1] Yancey P H, Clark M E, Hand S C, *et al.* Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 1982, **217**: 1214-1222
- [2] Timasheff S N, Xie G. Preferential interactions of urea with lysozyme and their linkage to protein denaturation. *Biophysical Chemistry*, 2003, **105**: 421-448
- [3] Santoro M M, Liu Y, Khan S M A, *et al.* Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry*, 1992, **31**: 5278-5283
- [4] Singer M A, Lindquist S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends in Biotechnology*, 1998, **16**: 460-468
- [5] Caldas T, Demont-Caulet N, Ghazi A, *et al.* Thermoprotection by glycine betaine and choline. *Microbiology*, 1999, **145**: 2543-2548
- [6] Bourot S, Sire O, Trautwetter A. Glycine betaine-assisted protein folding in a LysA mutant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**: 1050-1056
- [7] Singer M A, Lindquist S. Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Cell*, 1998, **1**: 639-648
- [8] Wu Yang (武扬), Jia Changhong (贾长虹), Lu Chenxing (陆晨星), Dong Xiaoyan (董晓燕). Refolding of denatured lysozyme assisted by trehalose and refolding kinetics. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)*(化工学报), 2006, **57** (10): 2378-2382

- [9] Liu Jianhua (刘建华), Dong Xiaoyan (董晓燕), Wu Yang (武扬), Sun Yan (孙彦). Effect of betaine on unfolding thermodynamics and refolding kinetics of lysozyme. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)*(化工学报), 2007, **58** (2): 465-470
- [10] Street T O, Bolen D W, Rose G D. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**: 13997-14002
- [11] Baskakov I, Bolen D W. Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**: 4831-4834
- [12] Miller A D, Maghlaoui K, Albanese G, *et al.* *Escherichia coli* chaperonins cpn60 GroEL and cpn10 GroES do not catalyse the refolding of mitochondrial malate dehydrogenase. *Biochem. J.*, 1993, **291**: 139-144
- [13] Neil A R, Nicholas J D, Steven G B, *et al.* Chaperonins can catalyse the reversal of early aggregation steps when a protein misfolds. *J. Mol. Biol.*, 1995, **250**: 581-586
- [14] Cipbnaoki T, Yasushi T, Hiroyuki H, *et al.* Interaction of the N-terminal domain of *Escherichia coli* heat-shock protein ClpB and protein aggregates during chaperone activity. *Protein Sci.*, 2004, **13**: 3214-3221
- [15] Christoph S, Frank H, Niesen R S. An automated *in vitro* protein folding screen. *Protein Sci.*, 2004, **13**: 370-380
- [16] Sanyal S C, Bhattacharyya D, Gupta C D. The folding of dimeric cytoplasmic malate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 2002, **269**: 3856-3866
- [17] Rudolph R, Fuchs I, Jaenicke R. Reassociation of dimeric cytoplasmic malate dehydrogenase is determined by slow and very slow folding reactions. *Biochemistry*, 1986, **25**: 1662-1669
- [18] Christopher R, David J N. Review malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci.*, 1994, **3**: 1883-1888
- [19] Bolen D W, Baskakov I. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J. Mol. Biol.*, 2001, **310**: 955-963
- [20] Ueda T, Nagata M, Imoto T. Aggregation and chemical reaction in hen lysozyme caused by heating at pH 6 are depressed by osmolytes, sucrose and trehalose. *J. Biochem.*, 2001, **130**: 491-496
- [21] Deborah B, Ernesto R, Leonard J B. Engineering the quaternary structure of an enzyme: construction and analysis of a monomeric form of malate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Protein Sci.*, 1994, **3**: 2023-2026