

聚乙烯醇与葡激酶的相互作用及其对葡激酶二级结构的影响

王改珍², 贺进田¹, 周志涛¹, 朱玉昆¹, 郭茵茵²

(1. 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016;

2. 河北科技大学环境科学与工程学院, 石家庄 050018)

摘要 在生理条件下, 使用凝胶过滤色谱、荧光光谱、差示扫描量热分析、傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 和葡激酶的纤溶活性分析研究了聚乙烯醇 (PVA) 和葡激酶的相互作用及其对葡激酶高级结构的影响. 凝胶过滤色谱研究结果表明, PVA 与葡激酶之间形成了复合物; 荧光光谱和差示扫描量热分析结果提示, 葡激酶与 PVA 之间的相互作用没有破坏葡激酶的高级结构; 进一步使用红外光谱法结合可增强分辨率的傅里叶去卷积技术和高斯曲线拟合技术, 用于对葡激酶与 PVA 复合物冻干粉中葡激酶酰胺 I 带的定量分析发现, 复合物冻干粉葡激酶分子中易导致蛋白质变性的分子间 β -折叠组分含量明显减少. 纤溶活性分析结果进一步确认, PVA 与葡激酶的相互作用未影响葡激酶的活性, 并对蛋白质的活性起保护作用.

关键词 聚乙烯醇; 葡激酶; 傅里叶变换红外光谱; 凝胶过滤; 荧光光谱

中图分类号 O629.73; O657.3

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)08-1581-05

聚乙烯醇 (PVA) 是一种用途相当广泛的水溶性高分子聚合物, 已经被广泛用于纺织、食品及建筑等领域. 由于 PVA 毒性很低, 无刺激性, 安全性好, 在日本和美国已被用于医药和食品工业^[1,2]. 最近研究发现, PVA 作为添加剂可以防止溶菌酶在水/二氯甲烷界面的变性^[3]. 我们在研制葡激酶突变体 K35R 的聚乳酸羟基乙酸缓释微球过程中发现, PVA 可以有效地保护突变体 K35R 在水/二氯甲烷界面以及在微球制备和释放过程中的稳定性^[4,5]. 推测 PVA 可能与蛋白质之间存在相互作用, 这种相互作用保护了蛋白质的结构稳定性, 使 PVA 可能成为新型的蛋白质稳定剂.

葡激酶是由某些感染溶原性噬菌体的金黄色葡萄球菌产生的分泌蛋白, 由 136 个氨基酸组成. 临床研究表明, 葡激酶治疗急性心肌梗塞的溶栓疗效至少与重组组织型纤溶酶原激活剂 (rt-PA) 相当, 是很有希望的新一代溶栓剂^[6,7]. 本文选择葡激酶作为模型蛋白, 用凝胶过滤色谱、荧光光谱法、差示量热分析、FTIR 和纤溶活性分析等多种手段, 研究了葡激酶与 PVA 的相互作用, 发现葡激酶与 PVA 存在相互作用, 并形成了复合物. 这种复合物的形成没有破坏葡激酶的高级结构, 并对蛋白质的稳定性起到了保护作用.

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

荧光光谱仪 (F-2500 荧光分光光度计), 日本 Hitachi 公司; DSC-2c 型示差扫描量热仪, 美国 Perkin Elmer 公司; Avatar 360 傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Thermo Nicolet 公司; HD-1 核酸蛋白检测仪, 上海沪西分析仪器有限公司.

葡激酶由本实验室制备, HPLC 纯度超过 97%^[6]; 聚乙烯醇 (PVA, 质量分数 87% ~ 89%) 的重均分子量为 40000, 为 Aldrich 产品; 葡聚糖凝胶 Sephadex G-150 为 Pharmacia 产品; 实验中所有用水均为 MilliQ 系统制备的超纯水.

收稿日期: 2008-12-30.

基金项目: 河北师范大学应用开发基金 (批准号: 2007K05) 资助.

联系人简介: 贺进田, 男, 博士, 副教授, 主要从事蛋白质结构与功能研究. E-mail: he_jintian@sina.com

1.2 凝胶色谱层析

Sephadex G-150 凝胶层析柱(1.5 cm × 60 cm)用于检测葡激酶与 PVA 的相互作用,凝胶柱上样前用 0.02 mol/L 磷酸缓冲液(pH = 7.4)平衡过夜,控制流速在 20 cm/h. 将 2 mL 浓度为 5 mg/mL 的葡激酶样品分别与 1.0 或 2.0 mL 浓度为 26 mg/mL 的 PVA 样品混合,静置 15 min 后上样,用核酸蛋白分析仪检测洗脱过程. 为检测葡激酶的纯度和保留时间,采用葡激酶单独过柱进行对照.

1.3 荧光光谱测定

用 0.02 mol/L 磷酸缓冲液(pH = 7.4)配制葡激酶和 PVA 溶液,用 F-2500 荧光光谱仪分别检测样品的激发荧光光谱和发射荧光光谱. PVA 无激发荧光光谱和发射荧光光谱,葡激酶在 280 nm 处有一个强吸收光谱峰,设定 280 nm 为激发光,葡激酶在 350 nm 有一个强发射荧光光谱峰. 分别检测 0.03 mg/mL 葡激酶和 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 mg/mL PVA 溶液的发射荧光波长和发射荧光强度.

1.4 差示扫描量热分析

将含有 8 mg/mL PVA 和 3 mg/mL 葡激酶的混合溶液冷冻干燥,制备成固体样品. PVA 与葡激酶的混合冻干粉、葡激酶和 PVA 样品的热性质由示差扫描量热仪测定. 将研磨好的样品充分搅拌均匀,精确称量 3 ~ 6 mg 样品,用药匙将样品均匀地平铺于专用铝皿底部,加盖密封,在纯氮环境下进行相转变动态分析. 在 25 ~ 325 °C 之间以 5 °C/min 的升温速率升温,采集样品在加热过程中的热量变化.

1.5 葡激酶的纤溶活性测定

葡激酶的纤溶活性采用酪蛋白凝胶板溶圈法测定^[4,8]. 葡激酶标准品购自中国药品生物制品检定所,1000 HU/支

1.6 傅里叶变换红外光谱及数据处理

PVA、葡激酶以及 PVA 与葡激酶混合冻干粉的红外光谱参照文献[9]方法测定. 利用 Ominic 6.0a 软件得到二级导数谱和去卷积谱. 在二级导数谱指导下,对酰胺 I 带去卷积谱图进行高斯曲线拟合,分析各个吸收峰峰面积所占的百分数,数据处理过程参照文献[10]方法进行.

2 结果与讨论

2.1 凝胶层析法分析葡激酶和 PVA 的相互作用

在凝胶层析色谱图上,葡激酶呈现单一、基本对称的吸收峰[图 1(A)]. PVA 与葡激酶的混合溶液的凝胶过滤色谱发生了明显变化,在色谱主峰之前出现了明显的吸收峰,并且该吸收峰随着溶液中 PVA 浓度的增加而增大[图 1(B)和(C)].

PVA 分子在 280 nm 不发生紫外吸收,检测得到的吸收峰为葡激酶所产生的吸收. 由色谱柱上的保留时间可以推测,混合样品色谱柱上的主峰应该来自于葡激酶,而主峰之前的吸收峰是来自于 PVA 与葡激酶的复合物. 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析确认了这一结果. PVA 分子量(40000)远大于葡激酶(15000),它们所形成复合物的分子量也远大于葡激酶,可见 Sephadex G-150 凝胶层析柱可以将复合物与葡激酶有效分离. 在色谱图上可以观察到复合物形成的色谱峰,并且当样品中 PVA 浓度增加时,与复合物相关的这个吸收峰也随之增大,表明 PVA 浓度的增加导致了更多复合物的形成.

2.2 PVA 对葡激酶色氨酸荧光光谱的影响

葡激酶的紫外光谱吸收峰位于 280 nm,用 280 nm 激发光进行激发,葡激酶的发射荧光光谱峰位于

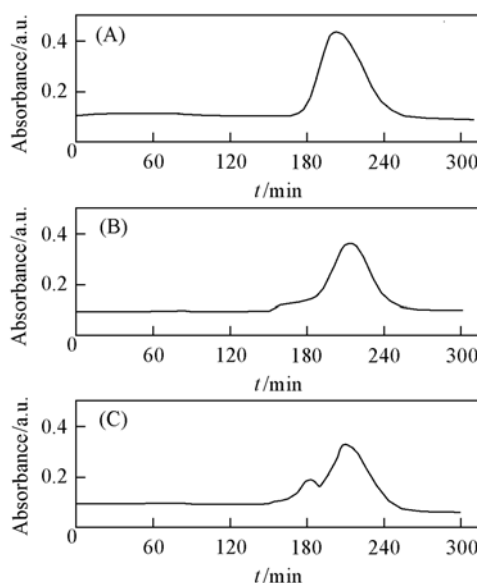


Fig. 1 Elution profiles of staphylokinase(A), mixture of staphylokinase and PVA at the molar ratio of 1:1(B) and 1:2(C) from Sephadex G-150

350 nm, 此峰主要来自于蛋白质中的色氨酸^[11]. 研究了不同浓度的 PVA 对葡激酶荧光发射波长和发射强度的影响, 结果发现, PVA 浓度在 0 ~ 0.08 mg/mL 范围内变化时, 荧光发射峰波长只在 350.5 ~ 352.5 nm 的狭窄范围内变化, 与未加入 PVA 时相比并未发生明显改变; 并且荧光发射强度在 652.3 ~ 679.5 之间变化时, 也未发生明显改变. 蛋白质色氨酸的荧光发射波长和发射强度变化可以用于检测色氨酸的微环境是否发生明显变化, 进而判断蛋白质是否发生了变性^[11]. PVA 对葡激酶的发射荧光强度和波长没有明显的影响, 表明 PVA 对葡激酶的构象影响不大, 在与 PVA 发生相互作用过程中, 葡激酶仍然处于天然构象.

2.3 差示扫描量热分析

在热流-温度曲线上, PVA 冻干粉与葡激酶的吸热峰为单峰, 分别位于 243.75 和 235.67 °C 处 [图 2(A) 和 (B)]. PVA 和葡激酶混合物冻干粉的吸热峰与葡激酶的吸热峰在同一位置 (235.50 °C), PVA 在 243.75 °C 位置的吸热峰消失 [图 2(C)]. 葡激酶在 235.67 °C 左右出现的吸热峰反映了其变性熔解的温度, 蛋白质的高级结构在此温度遭到破坏^[12]. 葡激酶与混合物冻干粉的变性温度相同, 提示葡激酶与 PVA 之间的相互作用并没有明显改变葡激酶的高级结构. PVA 冻干粉在 243.75 °C 出现了吸热峰, 说明 PVA 本身也存在分子内的相互作用, 对分子内相互作用的破坏产生了吸热峰. 在 PVA 和葡激酶混合物冻干粉谱图中不存在 PVA 吸热峰, 提示 PVA 在相互作用过程中分子结构遭到了破坏. 差示扫描量热分析的数据提示, 单独 PVA 的焓变为 2.77 kJ/g, 单独葡激酶的变性焓变为 1.30 kJ/g, 而葡激酶和 PVA 混合冻干粉的变性焓变为 1.81 kJ/g. 混合物的焓变明显低于单独的 PVA, 进一步说明 PVA 的分子结构遭到了破坏.

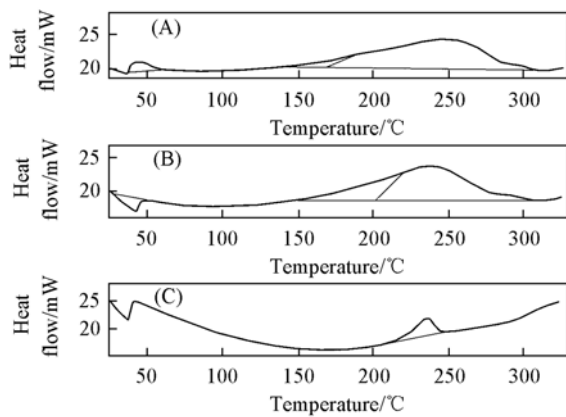


Fig. 2 DSC thermograms of PVA (A), staphylokinase (B) and the freeze-dried mixture of PVA and staphylokinase (C)

2.4 PVA 与葡激酶之间相互作用对葡激酶二级结构的影响

PVA 在酰胺 I 带 (1600 ~ 1700 cm^{-1}) 范围内没有强红外吸收, 但 PVA 在 1738 cm^{-1} 处有强吸收峰^[7], 它的峰尾会影响对酰胺 I 带的定量分析. 因此, 在测定混合冻干粉中葡激酶的红外光谱时, 应该扣除 PVA 的影响. 葡激酶和扣除 PVA 吸收后的葡激酶以及 PVA 混合冻干粉的 FTIR 谱图见图 3.

葡激酶和扣除 PVA 吸收后的葡激酶的酰胺 I 带去卷积谱的高斯曲线拟合结果见图 4. 参考葡激酶 FTIR 文献结果^[9,13], 对所得谱带进行了归属, 结果见表 1. 其中 1621.1 cm^{-1} 组分是典型的分子间相互作用形成 β -折叠的吸收峰^[3,13]. 在 PVA 与葡激酶发生作用后, 这个组分明显降低, 由此推测 PVA 与葡激酶的相互作用减少了冻干粉中葡激酶分子间的相互作用, 而这种分子间相互作用可能会导致蛋白质的变性失活^[14,15]; 1653.3 cm^{-1} 组分是 α -螺旋和无规则卷曲的吸收峰. PVA 与葡激酶的相互作用没有导致该组分的明显变化 (表 1); 在蛋白质冷冻干燥过程中, 大量的溶剂水会被蒸发, 蛋白质分子之间的相互作用会导致 β -折叠组分的改变, 因而 β -折叠组分不能用于衡量冻干粉中蛋白质的结构稳定性, 而 α -螺旋一般不会受到分子间作用的影响, 因

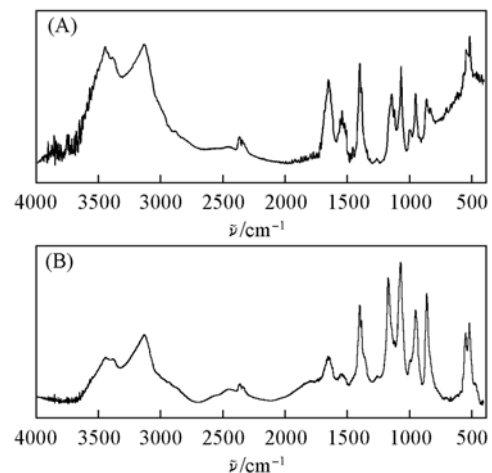


Fig. 3 FTIR spectra of the freeze-dried mixture of PVA and staphylokinase after PVA absorbance subtracted (A) and staphylokinase (B)

而可使用 α -螺旋结构衡量蛋白质的稳定性^[9,14,15]. 由此可以推测, PVA 与葡激酶的相互作用减少了冻干品中葡激酶分子间的相互作用, 没有破坏葡激酶的高级结构.

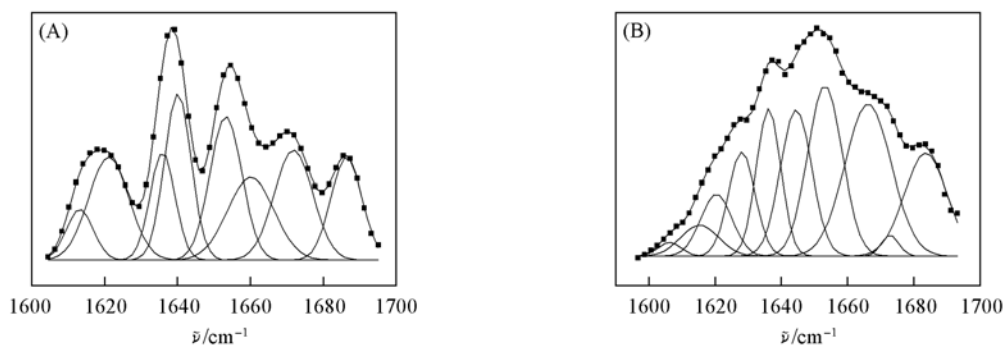


Fig. 4 Deconvoluted amide I band and Gaussian curve-fitting of staphylokinase (A) and staphylokinase within the freeze-dried mixture of PVA and staphylokinase (B)

Table 1 Infrared band position and band assignments of staphylokinase

Band position/cm ⁻¹	Band area(%)	Lyophilized mixture of PVA and lysozme assignment	Band position/cm ⁻¹	Band area(%)	Lyophilized power assignment
1606.2		Side-chain vibrations	1613.2		Side-chain vibrations
1615.3		Side-chain vibrations	1621.1	15.3	β -Sheet
1620.4	6.4	β -Sheet	1635.9	9.9	β -Sheet
1628.0	9.1	β -Sheet	1640.1	16.4	Unknown
1636.1	11.8	β -Sheet	1653.3	17.3	α -Helix, unordered
1644.5	15.0	Unknown	1660.1	14.5	β -Turn
1653.2	18.6	α -Helix, unordered	1671.8	15.6	β -Turn
1666.2	23.7	β -Turn	1686.3	11.8	β -Turn
1672.8	1.2	β -Turn			
1683.6	14.3	β -Turn			

将冷冻干燥的 PVA 样品用磷酸缓冲液溶解, 可以明显看到有较多颗粒状沉淀, 为 PVA 的不溶物, 且溶液产生较多泡沫. 而将葡激酶与 PVA 混合溶液的冻干样品溶解后, 溶液澄清, 没有发现不溶物, 溶解过程几乎不产生气泡, 这进一步说明了葡激酶与 PVA 形成了复合物. 测定溶液中葡激酶的活性, 结果表明, 葡激酶的比活性为 9.80×10^4 HU/mg, 与未冻干样品相比活性保留了 99.5%; 而未加入 PVA 的样品葡激酶的比活性为 9.34×10^4 HU/mg, 活性保留了 94.8%, 进一步确认了 PVA 与葡激酶的相互作用没有破坏葡激酶的高级结构, 并且提示 PVA 对葡激酶稳定性具有一定的保护作用.

3 结 论

PVA 作为添加剂可有效地保护蛋白质的稳定性, 可能成为新型的蛋白质稳定剂. 本文以葡激酶作为模型蛋白, 用凝胶过滤色谱、荧光光谱法、差示扫描量热分析、FTIR 和葡激酶纤溶活性分析研究了 PVA 和葡激酶的相互作用及其对葡激酶高级结构的影响. 凝胶色谱层析结果表明, PVA 与葡激酶之间存在相互作用, 并形成了复合物; PVA 对葡激酶的发射荧光强度和波长没有明显的影响, 表明在葡激酶与 PVA 的相互作用过程中, 葡激酶没有发生变性. 用差示扫描量热分析研究 PVA、葡激酶和它们复合物冻干粉的热性能, 发现葡激酶与混合物冻干粉的热变性温度相同, 提示葡激酶与 PVA 之间的相互作用并没有明显改变葡激酶的高级结构. 进一步使用傅里叶变换红外光谱法 (FTIR) 结合可增强分辨率的傅里叶去卷积技术与高斯曲线拟合技术共同用于对复合物中葡激酶酰胺 I 带的定量分析, PVA 与葡激酶的相互作用减少了冻干粉葡激酶分子中与分子间相互作用相关的 β -折叠组分含量. 葡激酶的活性分析结果进一步确认, PVA 与葡激酶的相互作用没有破坏葡激酶的高级结构.

感谢河北师范大学分析实验中心张建军研究员、化学与材料科学学院贺全林老师和生命科学学院高英杰老师在仪器使用上给予的帮助.

参 考 文 献

- [1] DeMerlis C. C. , Schoneker D. R. . Food Chem. Toxicol. [J], 2003, **41**: 319—326
- [2] Hassan C. M. , Peppas N. A. . J. Adv. Polym. Sci. [J], 2000, **153**: 37—65
- [3] Van de Weert M. , Hoehstetter J. , Hennink W. E. , *et al.* . J. Control. Release [J], 2000, **68**: 351—359
- [4] He J. T. , Su H. B. , Li G. P. , *et al.* . Int. J. Pharm. [J], 2006, **309**(1/2): 101—108
- [5] HE Jin-Tian(贺进田), TAO Xian-Mei(陶贤梅), MO Wei(莫炜), *et al.* . Acta Pharm. Sin. (药学报) [J], 2006, **41**(1): 12—18
- [6] Collen D. , Lijnen H. R. . Thromb. Haemost. [J], 2005, **93**(4): 627—630
- [7] Collen D. . Nat. Med. [J], 1998, **4**(3): 79—284
- [8] He J. T. , Di J. F. , Xu R. G. , *et al.* . Biotechnol. Appl. Bioc. [J], 2008, **50**(Pt 1): 17—23
- [9] HE Jin-Tian(贺进田), WANG Gai-Zhen(王改珍), SONG Hou-Yan(宋后燕). Spectrosc. Spect. Anal. (光谱学与光谱分析) [J], 2006, **26**(8): 1209—1212
- [10] HE Jin-Tian(贺进田), WANG Gai-Zhen(王改珍), FENG Mei-Yan(冯美艳), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2009, **30**(1): 68—71
- [11] Hillgren A. , Alden M. . Int. J. Pharm. [J], 2002, **244**: 137—149
- [12] Elkordy A. A. , Forbes R. T. , Barry B. W. . Int. J. Pharm. [J], 2002, **247**: 79—90
- [13] Dornberger U. , Fandrei D. , Backmann J. , *et al.* . Biochim. Biophys. Acta [J], 1996, **1294**(2): 168—176
- [14] Yang T. H. , Dong A. , Meyer J. , *et al.* . J. Pharm. Sci. [J], 1999, **88**: 161—165
- [15] Carrasquillo K. G. , Costantino H. R. , Cordero R. A. , *et al.* . J. Pharm. Sci. [J], 1999, **88**: 166—173

Interaction Between PVA and Staphylokinase and Its Influence on the Secondary Structure of Staphylokinase

WANG Gai-Zhen², HE Jin-Tian^{1*}, ZHOU Zhi-Tao¹, ZHU Yu-Kun¹, GUO Yin-Yin²

(1. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China;

2. College of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract Gel filtration chromatography, fluorescence spectrophotometry, differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectrophotometry (FTIR) and fibrinolytic activity analysis were used to investigate the interaction between polyvinyl alcohol (PVA) and staphylokinase under physiological conditions. The results show that staphylokinase can form complex with PVA. The results of fluorescence spectrophotometry and DSC suggested that the interaction of PVA with staphylokinase did not destroy advanced structures of staphylokinase. FTIR was combined with resolution enhancement technique Fourier deconvolution and Gaussian curve-fitting procedures to quantitate the spectral information from the amide I bands of staphylokinase within the freeze-dried mixture of PVA and staphylokinase. The results show that the interaction of PVA with staphylokinase decrease β -sheet content which is associated with intermolecular interaction and protein denaturation. Analysis of fibrinolytic activity of the staphylokinase show that interaction of PVA with the staphylokinase do not destroy the tertiary structure of the staphylokinase.

Keywords Polyvinyl alcohol; Staphylokinase; Fourier transform infrared spectrometry (FTIR); Gel chromatography; Fluorescence spectrometry

(Ed. : H, J, Z)