

研究论文

蛋白质水力学半径的测定及用于蛋白质 变性过程的实时监控

白丽燕¹, 陈春琴², 林东强¹, 姚善泾¹

¹ 浙江大学化学工程与生物工程学系, 浙江 杭州 310027;

² 杭州华东大药房连锁有限公司, 浙江 杭州 310002)

摘要: 采用纳米粒度分析仪 Zetasizer Nano 测定了牛血清白蛋白 (BSA) 的水力学半径, 考察了 pH、离子强度、表面活性剂等的影 响, 并用于 BSA 热变性和脲变性过程的实时跟踪。随 pH 增大, BSA 水力学半径呈“U”形变化趋势; 酸性条件下, 分子膨胀, 随着盐浓度升高, BSA 分子先小幅减小后显著增大; 中性 pH 范围, 离子强度对蛋白质分子尺寸影响很小, 蛋白质性质相对稳定。离子型表面活性剂在蛋白质表面吸附, 从而影响 BSA 水力学半径。通过水力学半径的测量实时跟踪蛋白质变性过程的分子变化, 发现增加热变性中离子强度可加快变性速率, SDS 加入增大了 BSA 变性温度 T_m 。脲在促使 BSA 分子扩张的同时, 对链伸展有抑制作用; 在 DTT 存在下, BSA 的水力学半径随着时间变化逐渐增大。结果表明, 简便的水力学半径测量可以用于蛋白质大小的表征, 并可实时跟踪蛋白变性过程的分子尺度变化。

关键词: 水力学半径; 牛血清白蛋白; 表面活性剂; 热变性; 脲

中图分类号: TQ 93

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2008) 06-1485-05

Measurement of protein hydrodynamic radius and its applications to monitor protein denaturation

BAI Liyan¹, CHEN Chunqin², LIN Dongqiang¹, YAO Shanjing¹

¹ Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027,

Zhejiang, China; ² Huadong Medicine Co., Ltd., Hangzhou 310002, Zhejiang, China)

Abstract: The hydrodynamic radius (R_h) of bovine serum albumin (BSA) was measured with the Zetasizer Nano instrument. The influences of pH, ionic strength and surfactants were investigated, and the real-time measurement of BSA size was used to monitor the thermal denaturation and urea denaturation of BSA. The results indicated that R_h showed a typical “U” form with the increase of pH. In acid solution, with increasing ionic strength the R_h decreased a little first, and then increased remarkably. At neutral pH the influence of ionic strength could be neglected. The adsorption of ionic surfactants on BSA molecular surface resulted in the change of R_h . For the thermal denaturation of BSA, the rate of denaturation increased with the increase of ionic strength. When sodium dodecyl sulfate (SDS) was added, the melting point T_m of BSA could increase. For urea denaturation, urea could cause BSA molecule to expand but also

2007-08-13 收到初稿, 2008-01-09 收到修改稿。

联系人: 姚善泾。第一作者: 白丽燕 (1983-), 女, 硕士。

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2006AA02Z210);

国家自然科学基金项目 (20206029, 20776129)。

Received date: 2007-08-13.

Corresponding author: Prof. YAO Shanjing. E-mail: yaosj@zju.edu.cn

Foundation item: supported by the High-tech Research and Development Program of China (2006AA02Z210) and the National Natural Science Foundation of China (20206029, 20776129).

restrain the extension of peptide chains. By adding dithiothreitol (DTT), the R_h of BSA increased gradually with denaturation time. The results indicated that this convenient measurement of R_h could be used for characterizing the molecular size of protein, and monitoring the change of protein molecule during the denaturation process.

Key words: hydrodynamic radius; bovine serum albumin; surfactant; thermal denaturation; urea

引 言

随着生物技术工业的快速发展,对下游分离纯化过程提出了越来越高的要求。采用有效的表征手段,准确、快速、实时地测定蛋白质分子的分子量、空间尺度、表面电荷特性等参数,可以为下游过程的优化和设计提供指导^[1-2]。文献报道,通过检测不同条件下酵母乙醇脱氢酶的大小,可协助选择最佳微滤条件,大大提高了分离收率^[3]。

常规测量蛋白质大小的方法,如电泳和凝胶过滤法,需要标准蛋白作为参照,且过程费时费力。常见的粒度分析方法有显微镜法、沉降法、光散射法和电超声法等,难以测量小于 10 nm 的蛋白质分子。水力学半径是一个和真实颗粒具有相同扩散速率的假想球体的半径,基于布朗运动,由 Stokes-Einstein 方程计算得到,常采用光子相关光谱法测定胶体等超细颗粒的水力学半径^[4]。水力学半径受温度、黏度、扩散系数、溶液 pH、离子强度以及吸附性物质等影响,这对于了解诸如蛋白质在溶液中的真实状况,以及分析蛋白质分离纯化过程中的形态变化具有重要的意义。

本文将采用 Malvern 公司的最新仪器 Zetasizer Nano 纳米粒度分析仪,以牛血清白蛋白(BSA)为模型蛋白,测定不同 pH、离子强度、表面活性剂添加等条件下 BSA 水力学半径的变化,通过实时监测来跟踪 BSA 热变性、脲变性和 DTT 变性过程中分子大小的变化,以了解蛋白质变性过程的分子变化和变性机理。

1 材料与方 法

1.1 设备与材料

Zetasizer Nano ZS 型 Zeta 电位和粒度分析仪,英国 Malvern 公司,采用光子相关光谱法,结合非侵入式背投光散射技术,排除了多角度光散射以及样品污染带来的影响,提高了测量精度和范围,可用于分析超细纳米尺度的胶体颗粒(如蛋白质分子)水力学半径,无需参照物,测量快捷,且不破

坏样品^[5]; Model 868 pH 计,美国 Thermo Orion 公司; 0.22 μm 微孔滤膜,上海兴亚净化材料厂; 牛血清白蛋白(BSA)及十二烷基磺酸钠(SDS),上海生物工程公司; 十六烷基三甲基氯化铵(CTAB),上海新华活性材料研究所; 其余试剂均为市售分析纯。

1.2 溶液条件对 BSA 水力学半径影响

Zetasizer Nano ZS 型 Zeta 电位和粒度分析仪测定 BSA 的水力学半径,BSA 浓度为 1.0 mg · ml⁻¹,溶液经 0.22 μm 微滤膜过滤,测定 9 次,取平均值。

pH 影响:配制含 100 mmol · L⁻¹ NaCl 的 BSA 溶液,调节 pH 处于 2~12,控制电导为 5.6 mS · cm⁻¹。

离子强度影响:分别以 0.01 mol · L⁻¹ HCl 配制 pH2.0 的 BSA 溶液,10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液配制 pH8.0 的 BSA 溶液,NaCl 浓度按梯度配制。

表面活性剂影响:0.2 mol · L⁻¹ 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH5.6)配制 BSA 溶液,加不同量 SDS; 0.01 mol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)配制 BSA 溶液,加不同量 CTAB。不含蛋白的表面活性剂溶液作对照。

1.3 热变性过程中 BSA 水力学半径变化

10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)配制 BSA 溶液,考察离子强度影响时,NaCl 浓度按梯度配制;考察 SDS 影响时,加适量 SDS,浓度分别为 0.4 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹ 和 0.8 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹。温度每升高 1℃测定 1 次,温度平衡时间为 3 min。

1.4 脲和 DTT 变性过程中 BSA 水力学半径变化

10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)配制 BSA 溶液,添加不同浓度的脲和 DTT,考察 BSA 水力学半径的变化。

2 结果和讨论

2.1 pH 对 BSA 水力学半径影响

测定了不同溶液 pH 下 BSA 的水力学半径,结

果如图 1。由图可知, 随着 pH 的增大, BSA 的水力学半径呈“U”形分布, 该结果与凝胶过滤法测定的分子大小变化趋势相一致^[6]。pH 对 BSA 分子尺度的影响可用 5 种状态表示^[7]: E (expanded) \longleftrightarrow F (fast) \longleftrightarrow N (normal) \longleftrightarrow B (basic) \longleftrightarrow A (aged)。BSA 水力学半径随 pH 的变化趋势正是这 5 种状态转化的表现体现。

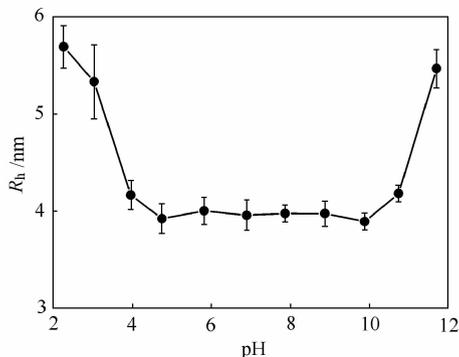


图 1 pH 对 BSA 水力学半径的影响

Fig. 1 Influence of pH on hydrodynamic radius of BSA

pH5~7 之间 BSA 处于自然状态 N, 水力学半径保持在 4 nm 左右, 蛋白质分子结构相对稳定。pH<5 时, α 螺旋向 β 折叠和自由卷曲转变, 导致 N \rightarrow F 状态的转变, 水力学半径略有增长; pH<3.5, 二硫键破坏导致 BSA 变性, 水力学半径显著增加, pH2.5 时 BSA 分子达到完全伸展的状态 E, 水力学半径接近 6 nm; 当 pH7~9 之间, BSA 分子进行 N \rightarrow B 状态的渐进转变, 四级结构微弱重组, 呈现结构上的波动; pH>10, BSA 变性, 造成水力学半径的显著增大。

2.2 离子强度对 BSA 水力学半径的影响

分别考察了两个 pH (pH2.0 和 pH8.0) 下, 不同 NaCl 浓度对 BSA 水力学半径的影响, 结果见图 2 和图 3, 表现出不同的变化规律。当 pH2.0 时, BSA 水力学半径随离子强度的增加先小幅度减小, 然后迅速增大。这种影响可以归结为静电力和疏水力共同作用的结果。在相对低的浓度范围 (0~300 mmol \cdot L⁻¹), 随着 NaCl 浓度的增加, 分子内的疏水作用增强, 抑制了 BSA 的酸性膨胀^[8], 所以水力学半径缓慢变小。随着盐浓度的增加 (大于 300 mmol \cdot L⁻¹), 分子间的静电斥力趋于零, 疏水基团逐渐暴露, BSA 分子开始聚集, 水力学半径显著增大。NaCl 浓度达到 750 mmol \cdot L⁻¹ 时, 溶液中产生白色沉淀, 即发生了盐析。pH8.0 时, 离子强度对 BSA 水力学半径几乎不产生影响, 盐

浓度高达 4.0 mol \cdot L⁻¹, BSA 水力学半径仍保持在 4.0 nm 左右, 说明该条件下 BSA 分子结构相对稳定, 始终处于紧密状态。结果表明, BSA 在中性条件下是稳定的, 这个结果在生理学上具有重要意义。

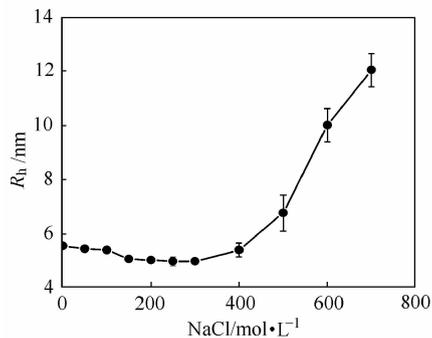


图 2 离子强度对 BSA 水力学半径的影响 (pH2.0)

Fig. 2 Influence of ionic strength on BSA hydrodynamic radius at pH2.0

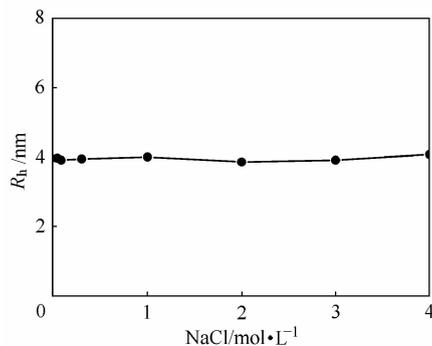


图 3 离子强度对 BSA 水力学半径的影响 (pH8.0)

Fig. 3 Influence of ionic strength on BSA hydrodynamic radius at pH8.0

2.3 表面活性剂对 BSA 水力学半径影响

考察了阴离子表面活性剂 SDS 和阳离子表面活性剂 CTAB 对 BSA 水力学半径影响, 结果见图 4 和图 5。由图可知, 随着表面活性剂浓度增加, 水力学半径增大, 并在某一浓度下达到最大值, 随后呈现下降趋势。当表面活性剂浓度较低时, 由于离子型表面活性剂在蛋白质表面的吸附, 造成蛋白质水力学半径的增大; 不同表面活性剂的吸附量和分子链长有差别, 因此水力学半径的增大幅度略有不同。当表面活性剂浓度达到临界胶束浓度 (CMC) 后, 会在溶液中形成胶束, 导致胶束和 BSA 竞争溶液中的自由表面活性剂, 并且仪器测出的是胶束和 BSA 混合物的平均水力学半径, 造成偏差, 因此测量的水力学半径达到最大值后呈现

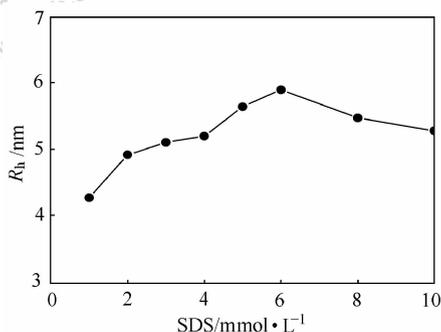


图 4 表面活性剂 SDS 对 BSA 水力学半径影响
Fig. 4 Influence of SDS on BSA hydrodynamic radius (pH5.6)

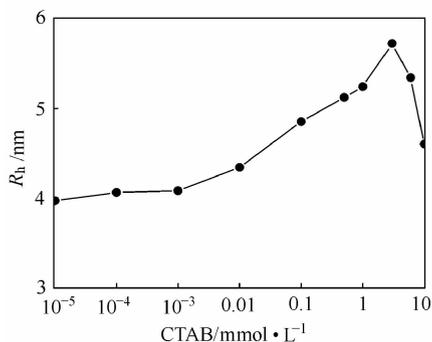


图 5 表面活性剂 CTAB 对 BSA 水力学半径影响
Fig. 5 Influence of CTAB on BSA hydrodynamic radius (pH8.0)

下降趋势, 该结果与文献报道相符^[9]。

2.4 热变性过程中 BSA 水力学半径变化

考察了 BSA 在不同 NaCl 浓度和添加 SDS 条件下, 热变性过程中水力学半径的变化。结果如图 6 和图 7。由图 6 可知, 随着温度的升高, BSA 水力学半径先保持不变, 当达到临界温度 T_m 后, 发生变性, 水力学半径开始随温度升高而显著增加。随离子强度增大, BSA 变性速率明显加快, 而变性温度 T_m 几乎不变。从图 7 中可以看出, 添加低浓度的 SDS, 明显提高了 BSA 的变性温度 T_m , 实验验证了文献报道的“低浓度 SDS 对 BSA 结构具有保护作用”^[10]。该现象可以用交联作用来解释, BSA 蛋白分子中的非极性残基和带正电残基可以通过 SDS 连接, 使得 BSA 在热变性中更加稳定。

2.5 BSA 在脲和 DTT 变性过程中水力学半径变化

考察了脲浓度以及添加 DTT 对 BSA 水力学半径影响, 结果见图 8。由图可知, 只有脲存在时, 随着脲浓度增加, BSA 水力学半径逐渐增大, 但是增大幅度有限, 蛋白质分子呈现逐步扩张的趋

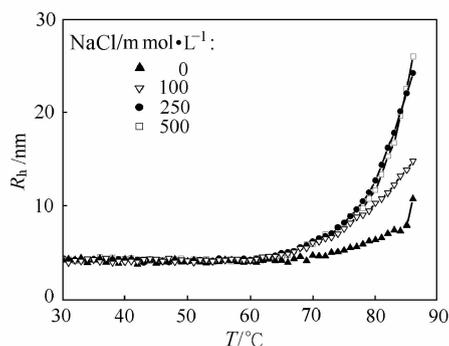


图 6 热变性过程中 NaCl 浓度对 BSA 水力学半径变化的影响

Fig. 6 Influence of NaCl concentration on BSA hydrodynamic radius during thermal denaturation

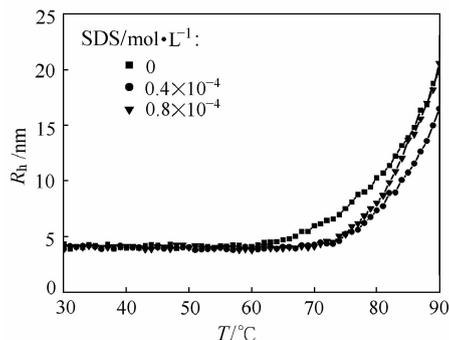


图 7 热变性过程中 SDS 浓度对 BSA 水力学半径变化的影响

Fig. 7 Influence of SDS concentration on BSA hydrodynamic radius during thermal denaturation

势, $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脲浓度下 BSA 水力学半径达到 8.7 nm 。当加入 DTT 后, 呈现不同的变化规律。溶液中存在 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT 时, 由于二硫键被破坏, BSA 分子充分展开, 水力学直径可以达到 17.5 nm ; 随着脲浓度的增加, 水力学半径先是急剧减小, 当脲浓度为 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 达到最小值 (约 6.4 nm), 随后水力学半径又呈现上升的趋势。结果表明, 脲的作用是复杂的, 具有双重作用, 一方面能够促使蛋白分子的扩张, 另一方面一定浓度下 ($< 4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 还能抑制肽链的伸展^[11]。可能原因如下: 脲可以改变水化层结构, 从而影响蛋白的高级结构使蛋白分子扩张; 而 DTT 能直接破坏蛋白分子的二硫键, 促使肽链的充分伸展; 当二硫键被打开后, 低浓度的脲又可以通过多肽链特定位点的结合, 抑制蛋白质分子的扩张; 当脲浓度大于 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 扩张作用占主导地位^[12]。进一步考察了脲变性过程中 BSA 水力学

半径随时间的变化, 结果见图 9。BSA 水力学半径在前 100 min 内, 呈直线上升趋势, 随后增长速率逐渐变小, 最后达到稳定, 结果表明 BSA 分子结构变化是个渐进的过程, 快速而精确的水力学半径测定可以用于蛋白质分子尺度变化的实时跟踪。

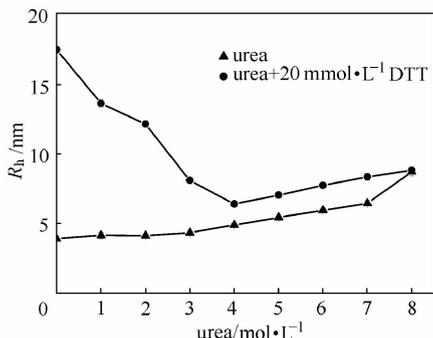


图 8 脲和 DTT 对 BSA 水力学半径影响
Fig. 8 Influence of urea and DTT on BSA hydrodynamic radius

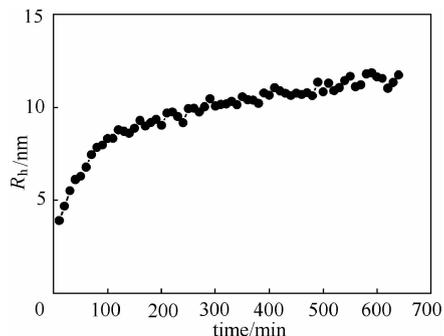


图 9 脲变性过程中 BSA 水力学半径的变化
Fig. 9 Variation of BSA hydrodynamic radius as function of time during urea denaturation

3 结 论

借助合适的纳米粒度分析仪, 测定了 BSA 水力学半径, 考察了 pH、离子强度、表面活性剂等影响, 并用于 BSA 热变性和脲变性过程的实时监控。结果表明, Zetasizer Nano 可以用于蛋白质水力学半径的测量, 结果稳定可靠, 分析过程快捷。pH、离子强度、表面活性剂等都对蛋白质分子产生影响, 可用水力学半径进行表征。初步研究表明, 通过简便的水力学半径测量, 可以实现蛋白变性过程中分子尺度变化的实时监控。进一步研究不

同的蛋白质对象, 获得规律性认识, 将有助于蛋白变性和复性的机理探讨和过程优化。

References

- [1] Bowen W R, Hall N I, Pan L C, Sharif A O, Williams P W. The relevance of particle size and zeta-potential in protein processing. *Nature Biotechnology*, 1998, **16**: 785-787
- [2] Ye Jinfu (叶进富), Lin Dongqiang (林东强), Yao Shanqing (姚善清). Zeta potential of bovine serum albumin and its correlation to the retention factor of ion exchange chromatography. *Journal of Chemical Engineering of Chinese University* (高校化学工程学报), 2007, **21** (3): 381-385
- [3] Bowen W R, Hall N I. Properties of microfiltration membranes — mechanisms of flux loss in the recovery of an enzyme. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, **46** (1): 28-35
- [4] What is hydrodynamic radius? <http://www.marvern.co.uk>
- [5] Introduction to Zetasizer Nano ZS. <http://www.marvern.co.uk>
- [6] Martenson R E. The use of gel filtration to follow conformational changes in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 1978, **253** (24): 8887-8893
- [7] Sadler P J, Tucker A. pH-induced structural transitions of bovine serum albumin. *European Journal of Biochemistry*, 1993, **212** (3): 811-817
- [8] Tanford C, Buzzell J G, Rands D G, Swanson S A. The reversible expansion of bovine serum albumin in acid solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 1955, **77**: 6421-6428
- [9] Valstar A, Almgren M, Brown W. The interaction of bovine serum albumin with surfactants studied by light scattering. *Langmuir*, 2000, **16** (3): 922-927
- [10] Moriyama Y, Kawasaka Y, Takeda K. Protective effect of small amounts of sodium dodecyl sulfate on the helical structure of bovine serum albumin in thermal denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, **257** (1): 41-46
- [11] Liepinsh E, Otting G. Specificity of urea binding to proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, **116** (21): 9670-9674
- [12] Das A, Chitra R, Choudhury R R, Ramanadham M. Structural changes during the unfolding of bovine serum albumin in the presence of urea: a small-angle neutron scattering study. *Pramana*, 2004, **63** (2): 363-368