

二硫键的氧化还原状态对 Trx 融合赤霉酸诱导富含半胱氨酸蛋白内源荧光及变性过程影响

张腾¹, 冯娟^{1*}, 李阳¹, 陈锐¹, 汤丽霞¹, 庞小峰¹, 任正隆^{1,2}

1. 电子科技大学生命科学与技术学院, 四川 成都 610054

2. 四川农业大学植物遗传育种省级重点实验室, 四川 雅安 625014

摘要 在采用亲和层析、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对原核表达的赤霉酸诱导的富含半胱氨酸蛋白(Trx-GcGASA)进行纯化、鉴定的基础上,运用稳态荧光光谱手段研究了二硫苏糖醇(DTT)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)、过氧化氢、盐酸胍(GdnHCl)对 Trx-GcGASA 内源荧光及变性过程的影响,发现(1)在中性缓冲体系中融合蛋白的内源荧光以 305 nm 的酪氨酸的荧光发射为主;(2)伴随着二硫键还原,融合蛋白中色氨酸和酪氨酸的相对荧光强度比值从 0.7 变化至 1.8 倍左右;(3)经过 0.5 mmol·L⁻¹ GSSG、5 mmol·L⁻¹ 过氧化氢处理后,酪氨酸和色氨酸的荧光强度下降约 12~21%;(4)无论是否采用 1 mmol·L⁻¹ DTT 处理,6 mol·L⁻¹ 盐酸胍均不能诱导融合蛋白彻底变性;(5)二硫键的存在与否影响了盐酸胍诱导的变性过程。通过两态模型拟合获得 Trx-GcGASA 变性过程 Gibbs 自由能变化 ΔG 约为 3.7 kJ·mol⁻¹。相关工作不仅为深入研究融合伴侣 Trx 对 GcGASA 变性热力学、动力学及复性过程影响奠定了基础;同时,也为通过光谱手段获取 GcGASA 的结构信息提供了基础的数据。

关键词 赤霉酸诱导的富含半胱氨酸蛋白;内源荧光;二硫键;变性

中图分类号: Q657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)02-0395-06

引言

赤霉酸诱导的富含半胱氨酸蛋白(Gibberellin-induced cysteine-rich protein)是一类在植物生长发育^[1-6]、抗菌^[7-9]、抗氧化^[10]等过程中发挥重要作用的蛋白,它由 N-端信号肽,中间不同长度的亲水区域,及含有 12 个保守半胱氨酸的 C-端区域组成^[11]。在本文的前期工作中曾从藏医学和蒙医学的重要药材手掌参(*Gymnadenia conopsea*)幼芽 cDNA 文库中筛选到了该类基因 *gcgasa*。通过与携带硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx)基因的原核表达载体 pET-32(a)构建重组质粒,目标基因在大肠杆菌宿主菌 BL21(DE3)中实现了水溶性、高效表达,表达获得的融合蛋白称为 Trx-GcGASA^[12, 13]。通过分析融合蛋白的氨基酸序列(图 1),发现 Trx-GcGASA 融合蛋白由 234 个氨基酸组成,其中包括 2 个 Trp(分别位于第 28 和第 31 位)、7 个 Tyr(其中 5 个残基位于 GcGASA 区域)和 6 个 Phe 残基(仅有 1 个位于 GcGASA 区域)。除上述芳香类氨基酸残基外,融合蛋白中还含有 14 个半胱氨酸,其中 2

个分布于融合伴侣中,其余 12 个位于 GcGASA 区域。在这些半胱氨酸中存在 CysXXCys 和 CysXCys 序列分布(X 为其氨基酸残基),它们通常在体内具有氧化还原活性,那么在体外原核表达获得的 Trx-GcGASA 融合蛋白中,这些半胱氨酸残基的氧化或还原形式(即二硫键或巯基)对于蛋白内源荧光究竟有什么影响呢?它们是否影响蛋白的变性过程呢?围绕上述问题,在采用亲和层析、SDS-PAGE 对融合蛋白进行纯化、鉴定的基础上,运用稳态荧光光谱手段研究了融合蛋白在 DTT、氧化剂、盐酸胍存在下的内源荧光,并初步比较了 DTT 对于盐酸胍诱导的变性过程的影响,为深入研究 Trx-GcGASA 的变性、复性动力学及结构等奠定了基础。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

蛋白质分离纯化采用 Amersham Biosciences 公司 FPLC 快速蛋白纯化系统(AKTA Explorer100),荧光光谱检测在日立 F-7000 荧光光谱仪上进行。实验中 DTT 和 GSSG 分别

收稿日期:2009-08-10,修订日期:2009-11-16

基金项目:国家自然科学基金项目(30730065,20973034)和(973 计划)项目(2007CB936103)资助

作者简介:张腾,1985 年生,电子科技大学生命科学与技术学院硕士研究生 e-mail:284708797@qq.com

* 通讯联系人 e-mail:fengjuan@uestc.edu.cn

购自 Genaray 有限公司(上海)和 Ameresco 公司(美国), 纯度超过 99.5% GdnHCl 购自美国 Sigma 公司, 其余试剂均为

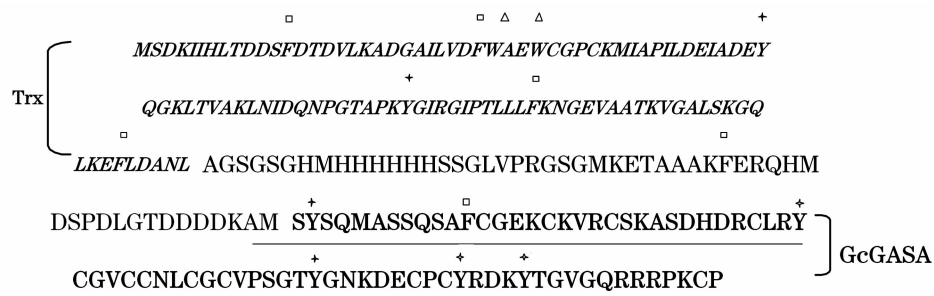


Fig. 1 Deduced amino acid sequence of the fusion protein Trx-GcGASA. Thioredoxin and GcGASA are indicated by italic letters and bold letters, respectively. Trp, Tyr and Phe are labelled by triangle, asterisk and squares, respectively

1.2 融合蛋白的纯化、SDS-PAGE 鉴定及处理

融合蛋白的诱导表达见参考文献^[13]。对于细胞破碎后的上清, 首先通过 Bradford 法检测蛋白浓度, 然后采用 FPLC 快速蛋白纯化系统对目标融合蛋白进行纯化, 分离柱为 HisTrap 亲和层析柱, 检测波长为 280 nm。操作时平衡缓冲液为 20 mmol · L⁻¹ Tris (pH 7.4, 含有 300 mmol · L⁻¹ NaCl 和 10 mmol · L⁻¹ 咪唑), 淋洗缓冲液为 20 mmol · L⁻¹ Tris (pH 7.4, 含有 300 mmol · L⁻¹ NaCl 和 20 mmol · L⁻¹ 咪唑), 洗脱缓冲液为 20 mmol · L⁻¹ Tris (pH 7.4, 含有 300 mmol · L⁻¹ NaCl 和 500 mmol · L⁻¹ 咪唑)。手工收集流出组分, 进一步采用 Superdex G25 脱盐柱脱盐, 流动相为 20 mmol · L⁻¹ 磷酸缓冲液 (PB, pH 7.0), 然后采用 15% SDS-PAGE 检测。

在获得足够纯度的样品后, 通过 Bradford 方法检测蛋白浓度约为 2 mg · mL⁻¹; 然后采用 20 mmol · L⁻¹ PB 缓冲液稀释至浓度约 10 μmol · L⁻¹ 左右。在氧化还原实验中, 通过将样品与 1 mmol · L⁻¹ DTT、0.5 mmol · L⁻¹ GSSG 和 5 mmol · L⁻¹ H₂O₂ 在室温下孵育 50 min 分别获得还原型、氧化型样品。在蛋白变性实验中, 采用不同浓度盐酸胍与融合蛋白在 4 °C 下处理过夜的方法获得变性蛋白; 对于变性还原

的蛋白在处理过程中加入 1 mmol · L⁻¹ DTT 共同孵育。

1.3 吸收及荧光光谱检测

吸收光谱检测范围为 190~400 nm, 测量融合蛋白时空白对照为 20 mmol · L⁻¹ PB (pH 7.0)。测量荧光时蛋白样品浓度控制在 ~10 μmol · L⁻¹ 左右, 入射和出射狭缝分别固定为 2.5 和 5 nm, 扫描速度为 240 nm · min⁻¹; 此外, 所有试剂和样品均经过 0.22 μm 滤器过滤处理。

2 实验结果与讨论

2.1 Trx-GcGASA 融合蛋白的纯化

如图 2(a) 所示, 当原核表达细胞破碎后的上清经过 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱后, 通过梯度洗脱在 280 nm 对应的流出曲线上除了穿透峰外(不能跟 Ni²⁺ 结合的组分), 还检测到 3 个主要的流出组分 A, B 和 C, 它们的 SDS-PAGE 结果见图 2(b)。从图中可知, 流分 B 和 C 中的蛋白经过 SDS 变性及 β-巯基乙醇还原处理后, 在分子量约 27 kD 附近出现类似的蛋白条带(图中箭头所示)。此位置比预期融合蛋白分子量(~25.5 kD) 偏高, 这主要是由于融合蛋白中 His-Tag 的存在导致外源蛋白在 SDS-PAGE 电泳上分子量发生偏

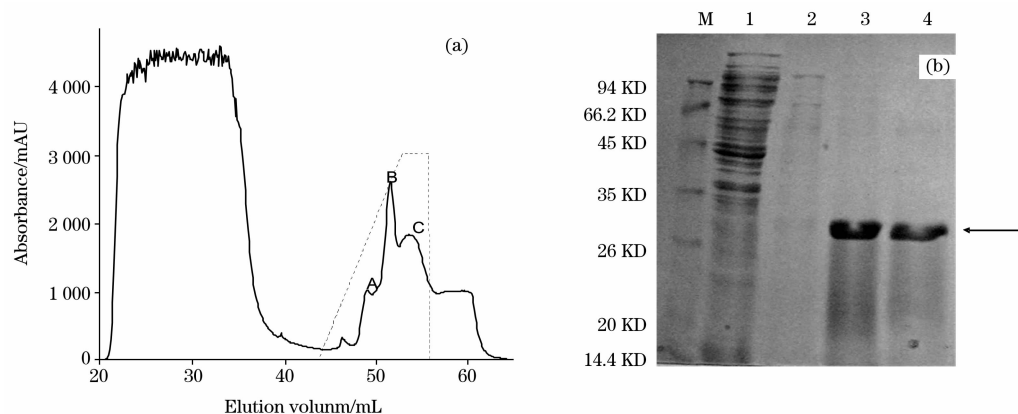


Fig. 2 Elution profile of the supernatant of Trx-GcGASA through Ni²⁺-NTA affinity column and 15% SDS-PAGE analysis of the collected fractions. (a): The monitoring wavelength was set at 280 nm. The protein was eluted from the column with a linear gradient from 20 mmol · L⁻¹ imidazole to 200 mmol · L⁻¹ imidazole in 20 mmol · L⁻¹ Tris-HCl and 500 mmol · L⁻¹ NaCl. (b): The different lanes are: 1. Flowing through, 2. Elution A, 3. Elution B, 4. Elution C, M. standard protein marker. The target protein was shown by arrow

差^[14]。鉴于非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测到样品 C 可能是 B 的聚集体,因此本文中仅手工收集了样品 B,并采用脱盐柱进行了纯化(图未显示)。

2.2 不同激发波长下 Trx-GcGASA 融合蛋白的内源荧光

图 3 显示了 Trx-GcGASA 融合蛋白在 pH 7.0 的磷酸缓冲液中不同激发波长下的荧光发射谱。如图所示,当激发波长为 260 nm 时,体系中 Phe, Tyr 和 Trp 同时被激发,融合蛋白的最大荧光发射峰出现在 305 nm 左右,它与中性缓冲体系中酪氨酸的荧光发射接近。同时,Trx-GcGASA 在 330~340 nm 范围内还有一个不显著的肩峰,它归属于色氨酸的荧光发射。至于 400~500 nm 范围内出现的弱的宽峰主要来源于酪氨酸磷光发射的贡献。在此激发波长下,虽然 Phe 同时被激发,但由于存在 Phe→Tyr 的荧光共振能量传递,因此未检测到 Phe 的荧光发射。当激发波长红移至 280 和 285 nm 时,体系中色氨酸和酪氨酸同时被激发,色氨酸的相对荧光强度显著增强。当激发波长进一步红移至 290 nm 时,体系中仅有色氨酸被激发,色氨酸的最大荧光发射峰出现在 338.5 nm 附近,这反映出色氨酸处于部分疏水的微环境中。随着激发波长在 290~300 nm 范围变化, λ_{\max} 发生了微弱变化(见图 3 插图),这与体系中不同 Trp 残基处在不同的微环境有关。

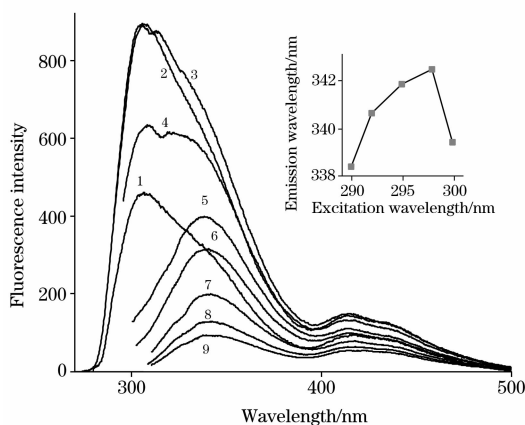


Fig. 3 Fluorescence emission spectra of Trx-GcGASA in 20 mmol·L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.0) upon excitation at 260 nm (line 1), 270 nm (line 2), 280 nm (line 3), 285 nm (line 4), 290 nm (line 5), 292 nm (line 6), 295 nm (line 7), 298 nm (line 8) and 300 nm (line 9), respectively

上述酪氨酸荧光发射占主导地位的现象在 Trp 和 Tyr 共存的体系中鲜见报道。推测一方面是由于在原核表达获得的融合蛋白 Trx-GcGASA 中,发射荧光的 Tyr 与 Trp 之间的空间距离较远,不利于发生 Tyr→Trp 的荧光共振能量传递;另一方面,融合蛋白中色氨酸的荧光可能受到诸多因素影响而严重猝灭。

2.3 DTT 对 Trx-GcGASA 融合蛋白内源荧光的影响

为了探讨上述现象是否与该体系富含二硫键有关,可采用 1 mmol·L⁻¹ DTT 对蛋白样品进行了处理,发现当激发波长为 260 或 280 nm 时,伴随着二硫键的还原,酪氨酸在

305 nm 附近的荧光强度变化不大,但色氨酸在~337 nm 附近的荧光强度却显著增加,最终导致两者的相对荧光强度比值 F_{337}/F_{305} 约为 1.8~1.9 左右[见图 4(a), 4(b)和表 1]。究竟如何解释上述现象呢,经分析认为主要是由于色氨酸的吲哚环与二硫键在空间上靠近,因此其荧光容易被二硫键强烈猝灭,这导致在氧化条件下色氨酸的荧光强度低于酪氨酸;而伴随着二硫键被还原成巯基,色氨酸的荧光显著增强变成优势地位。至于酪氨酸荧光强度变化不大的现象可能是由于发射荧光的酪氨酸残基与二硫键距离较远所致。

当激发波长固定在 295 nm 时,可观察到色氨酸的最大荧光发射峰出现在 342 nm 左右,它的位置几乎不随 DTT 处理而改变,这表明融合蛋白中色氨酸所处的微环境在还原前后变化不大。至于图 4(c)中色氨酸荧光强度增加了约 3.4 倍的现象主要是由于二硫键被还原所致。

2.4 不同氧化剂对 Trx-GcGASA 融合蛋白内源荧光的影响

如图 5(a)和 5(b)所示,当融合蛋白经过 0.5 mmol·L⁻¹ GSSG 处理后,酪氨酸和色氨酸的荧光强度分别降低了约 19%和 12%左右。与此类似,伴随着 5 mmol·L⁻¹ 过氧化氢处理,融合蛋白中酪氨酸和色氨酸的荧光强度均有所降低,但降低程度几乎一致(19%~21%,见图 5(c)和图 5(d))。鉴于氧化型谷胱甘肽 GSSG 和过氧化氢是常用的氧化剂,它们在适当条件下均能氧化游离巯基形成二硫键,因此分析在融合蛋白中可能存在部分游离巯基,它们在上述氧化剂作用下能被氧化成二硫键,进而导致酪氨酸和色氨酸的部分荧光被猝灭。

2.5 盐酸胍对 Trx-GcGASA 融合蛋白内源荧光的影响

图 6(a)显示了 290 nm 激发下融合蛋白的内源荧光随盐酸胍浓度的变化。从图中可知,当盐酸胍浓度 < 2 mol·L⁻¹ 时, λ_{\max} 位于 338 nm 附近;当盐酸胍浓度从 2 mol·L⁻¹ 变化至 3 mol·L⁻¹ 时, λ_{\max} 从 338 nm 突变至 346 nm 左右;随着盐酸胍浓度进一步增加至 6 mol·L⁻¹,色氨酸的最大荧光发射峰位置无显著变化。这表明盐酸胍能够诱导融合蛋白变性,导致色氨酸从部分疏水的微环境暴露于更加亲水的表面,但由于 λ_{\max} < 350 nm,因此蛋白质并未彻底变性。为了验证此现象是否与体系富含二硫键有关,则将样品采用 DTT 和 GdnHCl 同时处理,获得了类似结果[见图 6(b)],这说明二硫键的还原对于融合蛋白的稳定性没有显著影响,由此初步推断融合蛋白的结构紧密,不易受变性剂进攻。

在此基础上,可选择了 346.2 nm 作为检测波长,研究了其荧光强度随盐酸胍浓度的变化,获得图 6(c)所示的去折叠平衡曲线。对于融合蛋白 Trx-GcGASA,当盐酸胍浓度低于 2 mol·L⁻¹ 时,色氨酸在 346.2 nm 处的荧光强度几乎不变;当盐酸胍浓度增加至 2~3 mol·L⁻¹ 之间时,荧光强度发生突变,这主要是由于各种荧光猝灭因素被削弱或远离所致;当盐酸胍浓度进一步增加时,荧光强度变化不显著。上述变化规律与“两态模型”基本相符,由此可粗略计算出该蛋白变性的 $\Delta G=3.7$ kJ·mol⁻¹。对于还原型蛋白,其变化趋势与氧化型截然不同。当盐酸胍浓度低于 1 mol·L⁻¹ 时,随着盐酸胍浓度增加,色氨酸荧光强度显著增加;当盐酸胍浓度继续增加至 3 mol·L⁻¹ 时,荧光强度出现降低的趋势;此

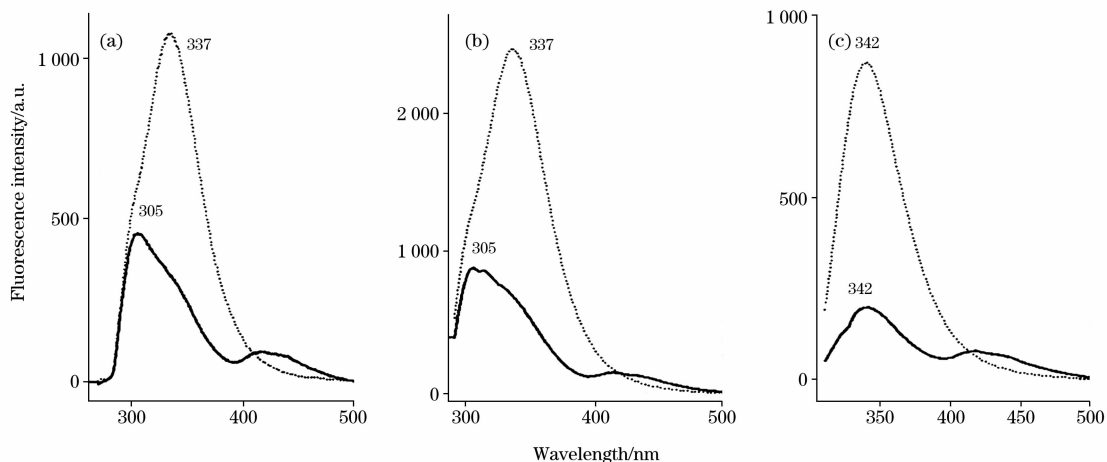


Fig. 4 Fluorescence emission spectra of Trx-GcGASA in $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer (pH 7.0) in the absence of DTT (solid line) and in the presence of DTT (dotted line) with the excitation wavelength of 260 nm (a), 280 nm (b) and 295 nm (c), respectively

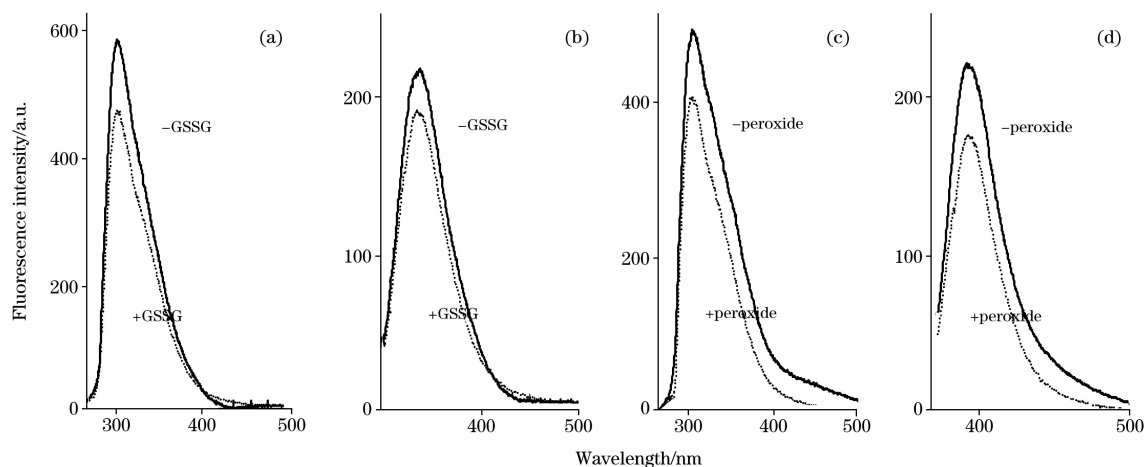


Fig. 5 Effects of $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSSG and $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ peroxide on the intrinsic fluorescence of fusion protein Trx-GcGASA with the excitation wavelength of 260 nm ((a) and (c)) and 295 nm ((b) and (d))

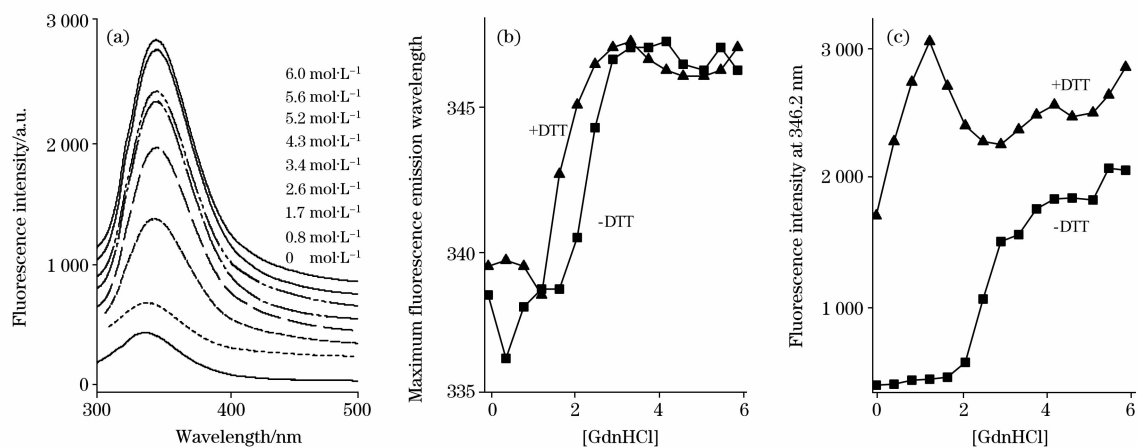


Fig. 6 Various concentration GdnHCl-induced changes of λ_{max} (a) and changes of fluorescence intensity at 346.2 nm (b) upon excitation at 290 nm. In panel (c), the excitation wavelength was 260 nm

后变化规律与氧化型类似。

在上述变性过程中,还观察到当激发波长为 260 和 280 nm 时,伴随着 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸胍处理融合蛋白,色氨酸和酪氨酸的相对荧光强度发生了变化(见图 7 和表 1),其中色

氨酸荧光增强的原因同上。至于酪氨酸荧光的增强主要是由于蛋白变性后,肽链伸展,芳香类氨基酸残基之间的距离增加, $\text{Tyr} \rightarrow \text{Trp}$ 的荧光共振能量传递效率下降所致^[15]。

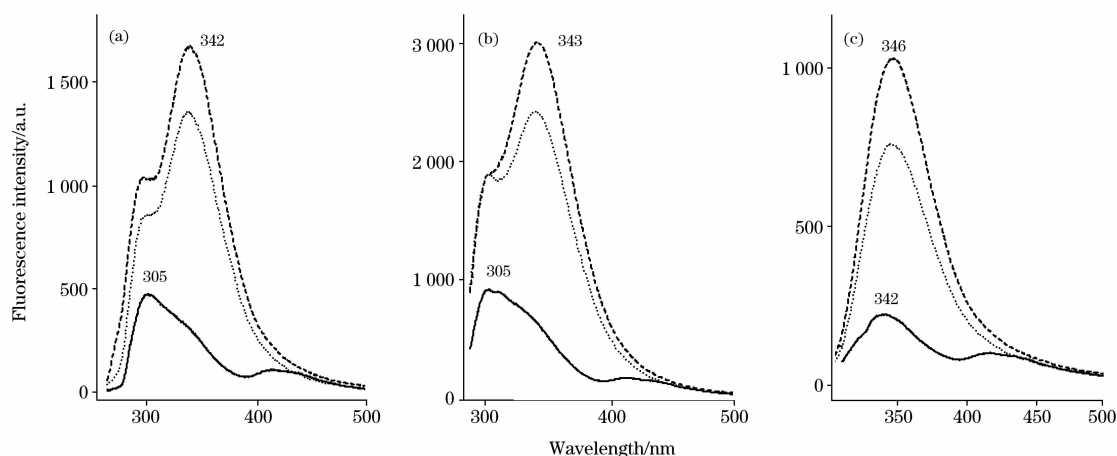


Fig. 7 Fluorescence emission spectra of Trx-GcGASA in $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer (pH 7.0) in the absence of $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GdnHCl and $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT (solid line), in the presence of $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GdnHCl without $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT (dotted line) and in the presence of both $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GdnHCl and $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT (dashed line) with the excitation wavelength of 260 nm (a), 280 nm (b) and 295 nm (c), respectively

Table 1 Relative ratio of fluorescence intensity at λ_{max} for Trp and 305 nm for Tyr, i. e. F_{Trp}/F_{305} . In the case of a and b, Trp had the maximum fluorescence emission wavelength at 337.2 or 342.2 nm

λ_{ex}	Trx-GcGASA ^a	Trx-GcGASA+DTT ^a	Trx-GcGASA+DTT+ $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GdnHCl ^b	Trx-GcGASA+DTT+ $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GdnHCl ^b
260 nm	0.7	1.8	1.6	1.6
270 nm	0.7	1.7	1.2	1.4
280 nm	0.8	1.9	1.3	1.6

3 结 论

本文运用稳态荧光光谱学方法研究了富含半胱氨酸的 Trx-GcGASA 融合蛋白的内源荧光及其影响因素,发现在经过宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)原核表达、纯化的 Trx-GcGASA 中蛋白质的内源荧光以 305 nm 对应的酪氨酸的荧光发射为主;伴随着二硫键的还原、蛋白质的变性、还原,色氨酸和

酪氨酸的相对荧光强度发生了改变;此外,通过检测氧化剂对融合蛋白内源荧光的影响,推测融合蛋白中存在游离巯基,这与宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)的胞质空间含有大量硫氧还蛋白还原酶有关。同时, H_2O_2 与 Trx-GcGASA 在体外的反应也为解释该类蛋白的抗氧化机理提供了一些初步的数据。此外,通过研究盐酸胍诱导的变性过程,获得了一些初步结果,为后续深入研究去折叠、重折叠热力学、动力学等奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Herzog M, Dorne A M, Grellet F. *Plant Mol. Biol.*, 1995, 27: 743.
- [2] Roxrud I, Lid S E, Fletcher J C, et al. *Plant Cell. Physiol.*, 2007, 48(3): 471.
- [3] Taylor B H, Scheuring C F. *Mol. and General Genetics*, 1994, 243(2): 148.
- [4] Medina-Escobar N, Cardenas J, Valpuesta V, et al. *Anal. Biochem.*, 1997, 248: 288.
- [5] de la Fuente J I, Amaya I, Castillejo C, et al. *J. Experimental Bot.*, 2006, 57(10): 2401.
- [6] Schunmann P HD, Smith R C, Langm V, et al. *Plant Cell and Environ.*, 1997, 20: 1439.
- [7] Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, et al. *Plant Physiol.*, 2002, 128: 951.
- [8] Segura A, Moreno M, Madueno F, et al. *Mol. Plant-Microbe-Interaction*, 1999, 12(1): 16.
- [9] Kovalskaya N, Hammond R W. *Protein Expression and Purification*, 2009, 63: 12.
- [10] Wigoda N, Ben-Nissan G, Granot D, et al. *Plant J.*, 2006, 48(5): 796.
- [11] Peng J Z, Lai L J, Wang X J. *Sci. China, Ser. C-Life Sci.*, 2008, 51(6): 520.

- [12] ZHOU Jian-ping, YANG Zu-jun, BAI Li-li, et al(周建平, 杨足君, 白莉莉, 等). Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica(西北植物学报), 2006, 26(9): 1874.
- [13] LIU Yuan, MENG Guo-quan, ZHOU Jian-ping, et al(刘 渊, 蒙国权, 周建平, 等). J. Agr. Biotechnology(农业生物技术学报), 2009, 17(3): 510.
- [14] TANG Wei-hua, ZHANG Jing-liu, WANG Zong-yang(唐威华, 张景六, 王宗阳). Bot. Physiol. Acta(植物生理学报), 2000, 26(1): 64.
- [15] YUAN Yan, XIAO Han, KANG Hong-jun, et al(袁 燕, 肖 涵, 康洪钧, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2009, 29(3): 777.

Effects of Redox State of Disulfide Bonds on the Intrinsic Fluorescence and Denaturation of Trx-Fused Gibberellin-Induced Cysteine-Rich Protein from *Gymnadenia conopsea*

ZHANG Teng¹, FENG Juan^{1*}, LI Yang¹, CHEN Rui¹, TANG Li-xia¹, PANG Xiao-feng¹, REN Zheng-long^{1, 2}

1. School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China

2. Sichuan Province Key Laboratory of Plant Genetics and Breeding, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract In the present paper, thioredoxin-fused gibberellin-induced cysteine-rich protein from *Gymnadenia conopsea*, designated as Trx-GcGASA and expressed prokaryotically, was purified and identified by using Ni²⁺-NTA affinity chromatography column and SDS-PAGE, and then its intrinsic fluorescence was investigated in the absence and presence of dithiothreitol (DTT), oxidized glutathione (GSSG), peroxide and guanidine hydrochloride (GdnHCl) by means of steady-state fluorescence spectroscopic methods. It was found that (1) at the neutral pH Trx-GcGASA had maximum fluorescence emission at 305 nm following excitation at different wavelengths varying from 250 to 280 nm, which was ascribed to the fluorescence emission from tyrosine residues. (2) The reduction of disulphide bonds lead to the changes in the relative fluorescence intensity between tyrosine and tryptophan residues from 0.7 to 1.8. (3) Both Tyr and Trp residues underwent 12%-21% decrease in fluorescence intensity with the addition of 0.5 mmol · L⁻¹ GSSG or 5 mmol · L⁻¹ peroxide. The latter was roughly consistent with the antioxidative activity reported in vivo. (4) No matter whether 1 mmol · L⁻¹ DTT was absent or present, the fusion protein could not be fully unfolded with $\lambda_{\max} < 350$ nm following the treatment of 6 mol · L⁻¹ GdnHCl. (5) Fusion protein Trx-GcGASA experienced GdnHCl-induced denaturation process, and the unfolding equilibrium curve could be well fitted by using two-state model, giving the Gibbs free energy change (ΔG) of 3.7 kJ · mol⁻¹. However, it was not the case for reduced Trx-GcGASA protein. The aforementioned experimental results will not only provide some guides to investigate the effects of fusion partner Trx on the unfolding thermodynamics, kinetics and refolding process of Trx-GcGASA, but also will be useful for further studies on the structure of GA-induced cysteine-rich protein with the help of spectroscopic methods.

Keywords Gibberellin-induced cysteine-rich protein; Intrinsic fluorescence; Disulphide bonds; Denaturation

(Received Aug. 10, 2009; accepted Nov. 16, 2009)

* Corresponding author