

盐酸胍诱导的猪血红蛋白分子解离过程中各亚基的分布

段 栋, 蔚 萍, 边六交*

(西北大学生命科学学院, 陕西西安 710069)

摘 要:以内源荧光光谱、荧光相图、高效凝胶排阻色谱和相对释氧曲线等方法,研究了盐酸胍诱导的猪血红蛋白分子解离过程中各亚基的分布状况。实验发现,当溶液中盐酸胍浓度小于 3.5 mol/L 时,猪血红蛋白分子仅仅以四聚体形式存在;而当溶液中盐酸胍浓度达到和超过 3.5 mol/L 时,部分猪血红蛋白分子开始从四聚体解离成二聚体和单体,并且随着溶液中盐酸胍浓度的增加,单体含量逐渐增加,二聚体含量逐渐减小,四聚体含量变化不大。通过比较猪血红蛋白分子在不同浓度盐酸胍溶液中的结构变化和相对释氧曲线,发现猪血红蛋白分子的活性变化快于它们的结构变化。

关键词:猪血红蛋白分子;解离;分布;盐酸胍

中图分类号:O657 文献标识码:A

具有输氧功能的血红蛋白在哺乳动物体内分布十分广泛。它主要由两条 α 链和两条 β 链结合而成,四条链以非共价键形式结合,两个不同链之间的亚基相互作用较大,而 $\alpha_1-\alpha_2$ 、 $\beta_1-\beta_2$ 彼此之间相互作用较小^[1-4]。近年来,复杂蛋白质分子的解离过程受到了越来越多生物学家的关注,已成为蛋白质科学研究的重要组成部分。血红蛋白由于其分布十分广泛,来源相对容易,成为科学家们经常研究的一个模型蛋白。目前为止,国内外对于血红蛋白解离过程的研究主要集中在使用不同种类的盐溶液^[5-8],或者通过改变溶液酸碱度^[9-10]等方法引起的结构变化上,而对于阐明血红蛋白解离过程中不同亚基的分布状况都未能给出相应的描述。

本文在前期有关胍和盐酸胍诱导的单体小分子蛋白质去折叠过程研究的基础上^[11-18],以猪血红蛋白四聚体分子 $\alpha_2\beta_2$ (64.0 kD) 为研究对象,采用内源荧光光谱、荧光相图、高效凝胶排阻色谱和相对释氧曲线等方法,研究了盐酸胍诱导的猪血红蛋白分子解离过程中各亚基的分布状况。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

F-4500 型荧光分光光度计, U-3310 型紫外-可见分光光度计(日本,日立公司); Agilent 1200 型液相色谱仪(美国,安捷伦公司); B 型 Hemox-analyzer(血氧平衡测定仪)(TCS scientific CORP)。

猪血红蛋白分子(纯度 > 99.9%)由本实验室提供,牛血清白蛋白(66.0 kD)、枯草杆菌 α -淀粉酶(45.0 kD)、牛碳酸酐酶 b(29.0 kD)和母鸡蛋白溶菌酶(14.4 kD)均购自上海生工生物工程公司,盐酸胍(分析纯,纯度 > 99%)为 Ameresco 公司产品,其余均为国产分析纯试剂。

1.2 盐酸胍诱导猪血红蛋白解离过程的高效凝胶排阻色谱

将天然态猪血红蛋白溶解在 pH=7.4 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,以 Bradford 法测定其中的蛋白浓度(以牛血清蛋白为标准制作蛋白含量标准曲线)。将上述猪血红蛋白溶液与不同量 8.0 mol/L 盐酸胍溶液和 PBS 混合,配制成含不同盐酸胍浓度(0~6.0 mol/L)的 2.0 g/L 猪血红蛋白溶液,

收稿日期: 2010-12-09 修回日期: 2011-03-15

基金项目: 国家自然科学基金(No. 21075097)

* 通讯作者: 边六交,男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事基因工程药物和蛋白质分离与纯化。

4℃放置过夜使其不同程度解离,然后用高效凝胶排阻色谱检测它们的亚基在盐酸胍诱导下的分布状况。凝胶排阻色谱柱为日本岛津公司的 Shim-pack DIOL-300 色谱柱(250×7.9 mm i. d.),流动相为含 0.2 mol/L 氯化钠的 20 mmol/L PBS(pH=7.4),其中流动相含有的盐酸胍浓度与不同程度解离的进样样品中所含的盐酸胍浓度始终保持一致。上样 50 μL,280 nm 波长检测,温度 20℃。

1.3 盐酸胍诱导猪血红蛋白解离过程的内源荧光光谱和荧光相图

将天然态猪血红蛋白溶解在 0.1 mol/L PBS(pH=7.4)中,以 Bradford 法测定其中的蛋白浓度(以牛血清蛋白为标准制作蛋白含量标准曲线)。将上述猪血红蛋白溶液与不同量 8.0 mol/L 盐酸胍溶液和 PBS 混合,配制成含不同盐酸胍浓度(0~3.5 mol/L)的 15 mg/L 猪血红蛋白溶液,4℃放置过夜使其不同程度解离,然后用荧光光谱仪测定其内源荧光发射图谱。在此基础上扣除对照体系的内源荧光发射后读取 320 nm 和 365 nm 波长处的内源荧光强度,绘制盐酸胍诱导的猪血红蛋白解离过程的荧光相图。对照体系除不含猪血红蛋白外,其余成分和浓度均与上述猪血红蛋白的变性溶液相同。仪器参数为:激发波长 295 nm,激发狭缝和发射狭缝宽度均为 10 nm,扫描范围 300~420 nm,扫描速度 1 200 nm/min,温度 20℃。

1.4 不同盐酸胍浓度下猪血红蛋白相对释氧活性的测定

血红蛋白的氧离曲线反映了血红蛋白的释氧能力,通常用血红蛋白氧饱和度为 50%时的氧分压 P_{50} 作为衡量血红蛋白与氧气结合以及释放功能的常用指标。参考人体生理环境,与上述方法相同,将天然态猪血红蛋白溶液(pH=7.4),配制成含不同盐酸胍浓度(0~6.0 mol/L)的 5.0 g/L 猪血红蛋白溶液,4℃放置过夜使其不同程度解离,然后使用血氧平衡测定仪测定其释氧 P_{50} 值,再将天然态猪血红蛋白分子的 P_{50} 值作为 100%,以不同浓度盐酸胍溶液中猪血红蛋白的相对 P_{50} 值对盐酸胍浓度作图。

2 结果与讨论

2.1 盐酸胍诱导猪血红蛋白分子解离过程的高效凝胶排阻色谱

2.1.1 高效凝胶排阻色谱 图 1 给出了盐酸胍诱导的猪血红蛋白分子解离过程的高效凝胶排阻色谱图。

由于溶液中盐酸胍浓度在 3.5 mol/L 以前的色谱分离图与溶液无盐酸胍存在时的色谱分离图一致,因此,图中仅仅示出了溶液中无盐酸胍存在和盐酸胍浓度大于等于 3.5 mol/L 的分离图谱。

经 Bradford 法分析表明,图 1 中约 25.4、27.0 和 28.2 min 的色谱峰含有蛋白质成分,而约 29.5 min 的色谱峰不含蛋白质成分。不同程度解离的猪血红蛋白分子在约 25.4 min 出现的色谱峰与天然猪血红蛋白的出峰时间一致。为了确定约 25.4、27.0 和 28.2 min 色谱峰的分子量,实验分别测定了以牛血清白蛋白、枯草杆菌 α -淀粉酶、牛碳酸酐酶 b 和母鸡蛋白溶菌酶为蛋白标准物的 Shim-pack DIOL 300 柱的校正曲线,从校正曲线中可以计算出约 25.4、27.0 和 28.2 min 色谱峰的分子量分别为 66.0 kD、34.5 kD 和 16.3 kD。因此,约 25.4、27.0 和 28.2 min 的色谱峰分别对应于猪血红蛋白四聚体分子、二聚体分子和单体分子(猪血红蛋白二聚体分子和单体分子的理论分子量分别为 32.0 kD 和 16.0 kD)。

2.1.2 不同盐酸胍浓度下各亚基的分布 图 2 给出了在不同盐酸胍浓度下,由图 1 色谱峰面积积分所获得的猪血红蛋白分子四聚体、二聚体和单体摩尔分数分布图。由图 2 可以看出,在盐酸胍诱导猪血红蛋白分子的解离过程中,猪血红蛋白分子整体上主要是以四聚体形式存在;当溶液中盐酸胍浓度在 3.5 mol/L 以下时,猪血红蛋白分子仅仅以

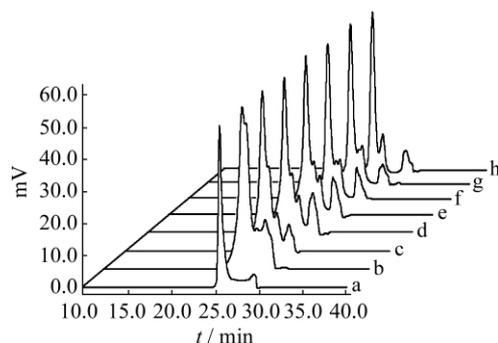


图 1 盐酸胍诱导的猪血红蛋白分子解离过程的高效凝胶排阻色谱图

Fig. 1 High performance size-exclusion chromatograms of the porcine hemoglobin molecules induced with different concentrations of guanidine hydrochloride in denaturation solution

The size-exclusion chromatographic column: Shim-pack DIOL-300(250×7.9 mm i. d.); mobile phases: 20.0 mmol/L phosphate buffer(pH=7.4) with the addition of 0.2 mol/L sodium chloride and different concentrations of guanidine hydrochloride whose concentrations always consistent with these in the loaded sample solutions; sample size: 50 μL of the denatured porcine hemoglobin solution; the flow rate of mobile phase: 0.3 mL/min; detection at 280 nm; experimental temperature: 20℃; the concentration of porcine hemoglobin in denaturation solution: 2.0 g/L. From a to h, the guanidine hydrochloride concentrations in both the final denaturation solutions and the mobile phases were 0, 0.3, 0.5, 3.8, 4.0, 4.5, 4.8, 5.0 and 6.0 mol/L, respectively.

四聚体形式存在;当溶液中盐酸胍浓度达到 3.5 mol/L 时,部分猪血红蛋白分子开始从四聚体解离成二聚体,并进一步解离成单体,但它们在溶液中主要还是以四聚体的形式存在,而且溶液中二聚体的含量比单体的含量要高很多。当溶液中盐酸胍浓度在 3.5~4.5 mol/L 范围时,四聚体、二聚体和单体间相互转化,处于一种动态平衡;而当盐酸胍浓度在 4.5~6.0 mol/L 范围时,四聚体摩尔分数大约维持在 80%左右不变。随着盐酸胍浓度的进步增大,主要是猪血红蛋白分子二聚体和单体之间的平衡,二聚体的摩尔分数从大约 12%减少到 0%,而单体从大约 12%增加到 20%。

2.2 盐酸胍诱导猪血红蛋白分子解离过程的内源荧光发射光谱和荧光相图

由盐酸胍诱导猪血红蛋白分子解离过程的高效凝胶排阻色谱图,可以直观的了解当溶液中盐酸胍浓度大于等于 3.5 mol/L 时猪血红蛋白分子各个亚基的分布状况。然而,图 1 和图 2 却无法反映出溶液中盐酸胍浓度小于 3.5 mol/L 时猪血红蛋白分子的结构变化过程。为了解盐酸胍浓度小于 3.5 mol/L 时猪血红蛋白分子的结构变化过程,进一步测定了盐酸胍诱导的猪血红蛋白分子解离过程的内源荧光发射光谱和荧光相图。

2.2.1 内源荧光发射光谱

在蛋白质分子中,能发射荧光的氨基酸残基有色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe),它们的最大发射波长分别为 348、303 和 282 nm。其中,Trp 残基的荧光强度最强、对微环境的变化最敏感。当采用 295 nm 作为激发波长时,此时的蛋白质荧光几乎全部来源于 Trp^[22],因此 Trp 残基的荧光变化被广泛地应用于蛋白质分子构象变化的研究。已知猪血红蛋白分子结构中含有 6 个 Trp 残基,所以可以根据不同盐酸胍浓度下它们分子内 Trp 残基的荧光变化来研究它们的空间结构变化。

图 3 给出了不同浓度盐酸胍(0.0~3.5 mol/L)诱导的猪血红蛋白分子解离过程的内源荧光发射图谱。从图 3 可以看出,随着溶液中盐酸胍浓度的增加,猪血红蛋白分子的荧光发射强度逐渐增强且伴随着

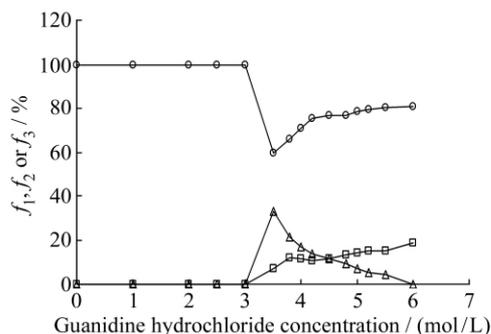


图 2 不同盐酸胍浓度下猪血红蛋白四聚体、二聚体和单体的摩尔分数分布

Fig.2 The molar fractions of porcine hemoglobin tetramers, dimers and monomers under different concentrations of guanidine hydrochloride in denaturation solution

○:the molar fractions f_1 of porcine hemoglobin tetramers;
△:the molar fractions f_2 of porcine hemoglobin dimers;□:
the molar fractions f_3 of porcine hemoglobin monomers.

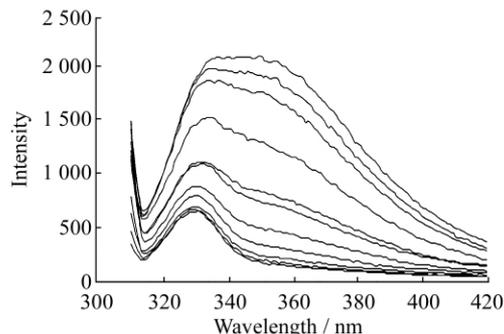


图 3 不同浓度盐酸胍诱导的猪血红蛋白分子解离过程的内源荧光发射图谱

Fig.3 Intrinsic fluorescence emission spectra of porcine hemoglobin molecules under different guanidine hydrochloride concentrations in denaturation solution

From bottom to top, the guanidine hydrochloride concentrations in final denaturation solution were 0.0, 0.3, 1.0, 1.3, 1.8, 2.0, 2.2, 2.5, 2.8, 3.0 and 3.5 mol/L, respectively. Porcine hemoglobin molecules concentration in all the denaturation solutions was 15.0 mg/L. Fluorescence was excited at 295 nm and measurements were carried out at 20°C.

最大荧光发射峰的明显红移。当溶液中盐酸胍浓度从 0 mol/L 逐渐增加到 1.0 mol/L 时,最大荧光发射峰位(约 330 nm)和荧光发射强度变化不是很明显;当盐酸胍浓度从 1.0 mol/L 逐渐增加到 2.0 mol/L 时,最大荧光发射强度明显增大并且在 340~360 nm 处的荧光发射明显展宽;当盐酸胍浓度从 2.0 mol/L 逐渐增加到 3.0 mol/L 时,最大荧光发射强度继续逐渐增大,340~360 nm 处的荧光发射也相应增强;直到盐酸胍浓度达到 3.5 mol/L 时,最大荧光发射峰位大约变化到 350 nm 左右,荧光发射强度也相应达到最大值。结果表明,随着溶液中盐酸胍浓度的增加,猪血红蛋白分子的空间结构发生了序变,使其分子内的色氨酸残基逐渐由分子内部过渡到分子表面,从而裸露在盐酸胍溶液中。

2.2.2 荧光相图

相图法是由 Burstein 首先提出并应用于蛋白质结构变化荧光数据分析的一种分析方法^[19-21]。荧光相图法是基于在不同发射波长 λ_1 和 λ_2 下所测得的蛋白质分子在不同实验条件下的荧光强度

$I(\lambda_1)$ 和 $I(\lambda_2)$ 的变化来描述蛋白质的结构变化的。如果荧光相图表现为一条直线,则说明此过程中蛋白质只存在一种结构形式;若有两条或者两条以上的直线存在,则说明此过程中蛋白质分子存在两种或者两种以上的结构形式。与其他检测蛋白质结构变化的物理化学方法相比较,荧光相图法能够提供更多的有关蛋白质结构变化过程的信息。

在本文中,为了进一步研究猪血红蛋白分子在变性剂浓度 0.0~3.5 mol/L 范围内的结构变化,测定了盐酸胍诱导的猪血红蛋白分子解离过程的荧光相图。从图 4 可以看出,此过程表现为一条直线,表明盐酸胍浓度在 0.0~3.5 mol/L 变化时,溶液中的猪血红蛋白分子不存在除了四聚体之外的其他亚基形式(这与凝胶排阻色谱的实验结果相吻合),同时也印证了内源荧光发射光谱的实验结果。这个结果表明,在此变性剂浓度范围内,猪血红蛋白分子四聚体的空间结构是一个由紧密球状到疏松结构的序变过程。

2.3 不同盐酸胍浓度下猪血红蛋白的相对释氧曲线

图 5 给出了猪血红蛋白分子在不同盐酸胍浓度下的相对释氧曲线,它可以表示猪血红蛋白分子的活性。从图中可以看出,随着盐酸胍浓度的增加,猪血红蛋白分子的相对活性逐渐降低。当盐酸胍浓度从 0 mol/L 逐渐增加到 1.0 mol/L 时,猪血红蛋白分子的相对活性从 100% 缓慢降低到约 87%;当盐酸胍浓度从 1.0 mol/L 逐渐增加到 2.0 mol/L 时,其相对活性从约 87% 快速降低到约 30%;当盐酸胍浓度从 2.0 mol/L 逐渐增加到 3.0 mol/L 时,相对活性从约 30% 缓慢降低到约 20%;而当盐酸胍浓度从 3.0 mol/L 逐渐增加到 3.5 mol/L 时,它们的相对活性从约 20% 快速降低到约 0%。

由前面的凝胶排阻色谱实验结果可知,当溶液中盐酸胍浓度在 3.5 mol/L 以下时,猪血红蛋白分子仅仅以四聚体形式存在。而由相对释氧曲线可知,即使溶液中盐酸胍浓度在 3.5 mol/L 以下时,猪血红蛋白分子的活性也随着溶液中盐酸胍浓度的增加而降低;而当溶液中盐酸胍浓度为 3.5 mol/L 时,猪血红蛋白分子已经完全失去了活性。因此,在盐酸胍诱导的猪血红蛋白分子的解离过程中,猪血红蛋白分子活性的变化要快于它们结构的变化,这与很多蛋白质分子的结构变化过程是一致的。

3 结论

在盐酸胍诱导的猪血红蛋白分子解离过程中,当溶液中盐酸胍浓度小于 3.5 mol/L 时,猪血红蛋白分子仅仅以四聚体的形式存在;当溶液中盐酸胍浓度大于等于 3.5 mol/L 时,部分猪血红蛋白分子从四聚体解离成二聚体和单体,并且在此过程中,随着溶液中盐酸胍浓度的增加,猪血红蛋白分子的单体含量逐渐增加,二聚体含量逐渐减小,四聚体含量基本保持恒定。

参考文献:

- [1] Perutz M F, Fermi G, Poyart C, Pagnier J, Kister J. J. Mol. Biol. [J], 1993, 233(3): 536.
- [2] Katz D S, White S P, Huang W, Kumar R, Christianson D W. J. Mol. Biol. [J], 1994, 244(5): 541.
- [3] Kroeger K S, Kundrot C E. Structure[J], 1997, 5(2): 227.

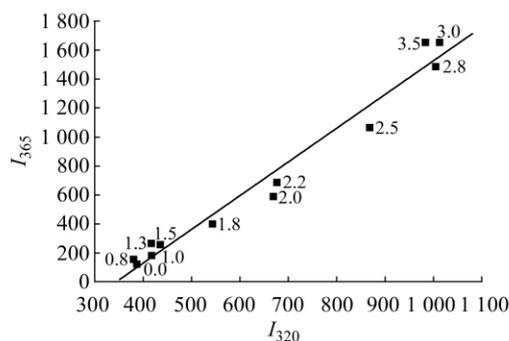


图 4 盐酸胍诱导的猪血红蛋白分子解离过程的荧光相图

Fig. 4 Fluorescence phase diagram representing the dissociation of porcine hemoglobin molecules induced by guanidine hydrochloride

Mainguanidine hydrochloride concentrations in mol/L were indicated in the vicinity of the curve. I_{365} and I_{320} separately represented the fluorescence intensities at emission wavelengths of 365 and 320 nm. Porcine hemoglobin molecules concentration was 15.0 mg/L. Fluorescence was excited at 295 nm and measurements were carried out at 20°C.

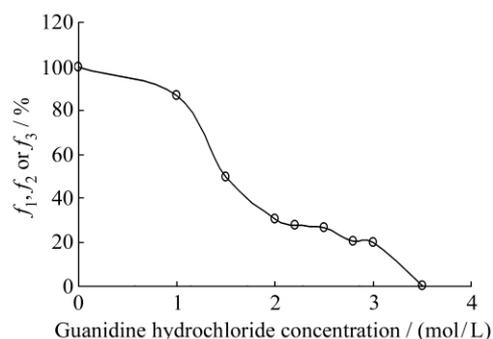


图 5 猪血红蛋白分子在不同盐酸胍浓度中的相对释氧活性曲线

Fig. 5 The relative oxygen release curve of porcine hemoglobin molecules under different concentrations of guanidine hydrochloride in denaturation solution

The concentration of porcine hemoglobin in solution; 5.0 g/L; the experimental temperature; 20°C.

- [4] Olson J S, Foley E W, Rogge C, Tsai A L, Doyle M P, Lemon D D. *Free Radical Biol. Med.* [J], 2004, **36**(6):685.
- [5] Saleh A A M, Ghaly G M, Darwish I A. *J. Pharm. Sci.* [J], 1987, **1**(2):118.
- [6] Herskovits T T, Cavanagh S M, San George R C. *Biochemistry*[J], 1977, **16**(26):5795.
- [7] Tomita S, Maeda N, Enoki Y, Okuda T. *J. Mol. Biol.* [J], 1972, **69**:303.
- [8] Li X C, Zheng W, Zhang L M, Yu P, Lin Y Q, Su L, Mao L Q. *Anal. Chem.* [J], 2009, **81**(20):8557.
- [9] Atha D H, Riggs A. *J. Biol. Chem.* [J], 1976, **251**(18):5537.
- [10] Wu Y, Huang Y X, Kang L L, Wu Z J, Luo M. *Biopolymers*[J], 2010, **93**(4):348.
- [11] BIAN Liu-jiao(边六交), YANG Xiao-yan(杨晓燕), LIU Li(刘 莉). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*[J], 2005, **63**(12):1081.
- [12] BIAN, Liu-jiao(边六交), YANG Xiao-yan(杨晓燕), LIU Li(刘 莉). *Chinese Journal of Chromatography(色谱)*[J], 2005, **23**(2):129.
- [13] Bian L J, Yang X Y. *Chin. J. Chem.* [J], 2006, **24**(5):653.
- [14] BIAN Liu-jiao(边六交), LIANG Chang-li(梁长利), YANG Xiao-yan(杨晓燕), LIU Li(刘 莉). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*[J], 2007, **65**(24):2891.
- [15] Bian L J, Liang C L, Yang X Y, Liu L. *Chin. J. Chem.* [J], 2007, **25**(3):364.
- [16] Bian L J, Dong F X, Liang C L, Yang X Y, Liu L. *Chin. J. Chem.* [J], 2007, **25**(12):1896.
- [17] ZHENG Hui-juan(郑会娟), BIAN Liu-jiao(边六交), DONG Fa-xin(董发昕), ZHENG Xiao-hui(郑晓晖). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*[J], 2009, **67**(8):786.
- [18] SHI Jiang-bo(师江波), BIAN Liu-jiao(边六交), DONG Fa-xin(董发昕). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*[J], 2007, **35**(5):707.
- [19] Bushmarina N A, Kuznetsova I M, Biktashev A G, Turoverov K K, Uversky V N. *ChemBioChem.* [J], 2001, **2**(11):813.
- [20] Kuznetsova I M, Stepanenko O V, Turoverov K K, Zhu L, Zhou J M, Fink A L, Uversky V N. *Biochim. Biophys. Acta* [J], 2002, **1596**(1):138.
- [21] Kuznetsova I M, Stepanenko O V, Stepanenko O V, Povarova O I, Biktashev A G, Verkhusha V V, Shavlovsky M M, Turoverov K K. *Biochemistry*[J], 2002, **41**(44):13127.
- [22] Lakowicz J R, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*[M]. New York:Springer, 2006:63.

Distribution of the Subunits of Porcine Hemoglobin Molecules Induced by Guanidine Hydrochloride

DUAN Dong, WEI Ping, BIAN Liu-jiao*

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069)

Abstract: The distribution of the subunits in the dissociation of porcine hemoglobin molecules induced by guanidine hydrochloride was studied by using intrinsic fluorescence emission spectrum, fluorescence phase diagram, high-performance size-exclusion chromatography and relative oxygen release curve. The experimental results showed that when guanidine hydrochloride concentration in denaturation solution was below 3.5 mol/L, porcine hemoglobin molecules existed only as a form of their native tetramers; while when guanidine hydrochloride concentration was equal to or more than 3.5 mol/L, part of them started to dissociate from their tetrameric molecules into their dimeric and monomeric molecules, and with the increasing of guanidine hydrochloride concentration in denaturation solution, the monomeric molecules continuously increased, dimeric molecules continuously decreased and tetrameric molecules did not change much. At the same time, by comparing the structural changes of porcine hemoglobin molecules with their relative oxygen release curves under different guanidine hydrochloride concentrations in denaturation solution, it was found that the biological activity changes of porcine hemoglobin molecules were faster than their structural changes during their dissociation processes.

Keywords: Porcine hemoglobin molecule; Dissociation; Distribution; Guanidine hydrochloride