

盐酸胍诱导的apo-CP43去折叠过程*

谢思思 刘骥 王敬章 朱国飞 杜林方**

(四川大学生命科学学院生物资源与生物环境教育部重点实验室 成都 610064)

摘要 膜蛋白生物合成与色素组装中蛋白的稳定性可以通过去折叠条件与过程分析得到. 利用色氨酸荧光光谱和ANS荧光光谱研究了apo-CP43在盐酸胍条件下的稳定性. 色氨酸荧光光谱观测到apo-CP43在盐酸胍作用下去折叠进程的主要特征: 荧光强度先是逐渐降低, 之后再逐渐升高, 而最大荧光发射峰位置则一直持续红移. 盐酸胍处理后apo-CP43的 $F_{360\text{ nm}}/F_{335\text{ nm}}$ 比值逐渐增大, 表明荧光最大发射峰逐步红移. 当盐酸胍浓度约为5.5 mol/L时, 去折叠比例趋于相对稳定状态, 说明此时apo-CP43已经基本完成去折叠. 荧光相图法结果显示盐酸胍诱导apo-CP43变性的过程符合三态模型. ANS荧光测定数据显示盐酸胍处理之后最大ANS荧光发射峰位置红移, 并且荧光强度逐渐降低. 以上数据表明在盐酸胍条件下apo-CP43是一个相对比较稳定的蛋白. 图6 参18

关键词 apo-CP43; 盐酸胍; 去折叠过程; 蛋白稳定性; 荧光光谱; 膜蛋白生物合成

CLC Q518.4

Unfolding of apo-CP43 Induced by Guanidine Hydrochloride*

XIE Sisi, LIU Ji, WANG Jingzhang, ZHU Guofei & DU Linfang**

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract The stability of apo-CP43 induced by guanidine hydrochloride was studied by using tryptophan fluorescence spectroscopy and extrinsic ANS fluorescence spectroscopy. The main characteristics of the unfolding process in the case of guanidine hydrochloride monitored by tryptophan fluorescence were that the fluorescence intensity initially gradually decreased, and then increased, however, the maximum emission wavelength continually red-shifted. The $F_{360\text{ nm}}/F_{335\text{ nm}}$ was increased gradually under the guanidine hydrochloride, indicated that the maximum emission wavelength red-shifted. The fraction unfolding was in relatively stable state when the guanidine hydrochloride concentration in denaturation solution was about 5.5 mol/L, suggested that the unfolding of the apo-CP43 completed. The result of the phase diagrams indicated that the denaturation process of apo-CP43 induced by guanidine hydrochloride was consistent with typical three-state model. It was also revealed that ANS fluorescence decreased after guanidine hydrochloride treatment. This study suggested that apo-CP43 was a relative stability protein under guanidine hydrochloride. Fig 6, Ref 18

Keywords apo-CP43; guanidine hydrochloride; unfolding process; protein stability; fluorescence spectroscopy; membrane protein biosynthesis

CLC Q518.4

在高等植物中核心天线CP43是由叶绿体 $psbC$ 基因编码的 $M_r 43 \times 10^3$ 蛋白结合叶绿素a构成的蛋白复合物, 由6个跨膜的 α -螺旋和5个膜外亲水环组成^[1]. CP43是PSII放氧核心复合体功能行使不可缺少的组分, 对维持和调节PSII行使电荷分离、光合放氧功能具有重要的作用. 最近, 对于PSII的X-衍射结构分析表明, CP43中Glu354氨基酸残基是除D1蛋白

外, 与放氧 Mn_4Ca 簇配位的基团^[2-4]. Service等通过对CP43中Glu354突变分析结合谱学技术提出Glu354与Mn离子配位, 同时被裂解的水分子底物与Mn离子配位结合的模式^[5]. 最近对PSII的2.9 Å分辨率X-衍射图谱解析^[3], 进一步证实CP43跨膜螺旋间外亲水环的结构性. 然而, 目前还没有盐酸胍诱导的apo-CP43的去折叠行为的相关研究报道. 我们通过色氨酸荧光和ANS (8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid) 荧光对纯化的脱辅基蛋白CP43的去折叠行为进行了研究.

收稿日期: 2011-05-26 接受日期: 2011-09-13

*国家教育部博士点基金项目 (No. 20070610168) 资助 Supported by the Doctoral Foundation of Ministry of Education of China (No. 20070610168)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: dulinfang@yahoo.com)

1 材料与amp;方法

1.1 材料

已纯化的apo-CP43.

1.2 方法

1.2.1 色氨酸荧光发射光谱测定 采用Hitachi F-4500荧光分光光度计测定处理后蛋白的色氨酸荧光发射光谱, 样品池光径1 cm, 激发和发射狭缝分别设置为5 nm和10 nm. 激发波长为295 nm, 波长测定范围300~400 nm, 测定至少6次, 并计算平均值^[6]. 样品光谱均扣除了同样浓度盐酸胍溶液的背景光谱.

样品处理: 首先配制6 mol/L的盐酸胍储存液, 用缓冲液稀释后, 分别加入20 μL重组蛋白apo-CP43, 使得盐酸胍终浓度为0、0.25、0.5、0.75、1.0……6.0 mol/L, 蛋白质终浓度为0.4~0.7 μmol/L. 样品配制好后, 室温放置2~3 h.

采用 $F_{350\text{ nm}}/F_{335\text{ nm}}$ 比值法, 对apo-CP43变性的中间过程进行分析^[7].

采用如下方法对蛋白的去折叠比例进行计算^[8]:

$$f_u = (F_{\text{obs}} - F_n) / (F_d - F_n) \quad (1)$$

其中, f_u 是某盐酸胍浓度下蛋白质去折叠的比例, F_n 是蛋白质处于天然状态下的荧光强度, F_{obs} 是该盐酸胍浓度下蛋白质的荧光强度, F_d 是蛋白质完全变性状态下的荧光强度.

采用荧光相图法来检测盐酸胍诱导apo-CP43去折叠过程中有无部分折叠中间态存在. 荧光相图法的原理是将发射波长分别为 λ_1 和 λ_2 时不同实验条件下蛋白质结构发生变化(去折叠/折叠)时所测得的相应荧光强度 $I(\lambda_1)$ 对 $I(\lambda_2)$ 作图(称为荧光相图). 从原理上说, λ_1 和 λ_2 可以是荧光发射谱上的任意波长, 但实际上用荧光发射峰2个斜面上斜率最大的点所处的2个波长获得的荧光相图更精确, 并可提供更多的结构变化信息. 本文中 λ_1 和 λ_2 分别取320 nm和365 nm^[9].

1.2.2 ANS荧光光谱测定^[9] 测定仪器同上, 激发和发射狭缝均置为10 nm. 激发波长为380 nm, 波长测定范围400~600 nm, 测定3次, 并计算平均值. 重组蛋白apo-CP43浓度采用0.5 μmol/L, 盐酸胍终浓度为0、0.25、0.5、0.75、1.0……6.0 mol/L, ANS浓度采用20 μmol/L, 缓冲液为Tris-HCl, pH 7.0~7.5. 将ANS与apo-CP43的混合溶液室温平衡处理1~2 h后, 记录光谱. 样品光谱均扣除了缓冲液的背景光谱.

2 结果

2.1 盐酸胍条件下apo-CP43的荧光光谱

通过盐酸胍变性, 研究了apo-CP43的去折叠行为, 荧光光谱见图1. 从图中可以看出, 不同盐酸胍浓度处理的apo-CP43的去折叠过程中, 随着盐酸胍浓度的增大, 由于盐酸胍的作用导致了荧光淬灭^[10-11], 同时最大荧光发射峰位置也逐渐红移. 当盐酸胍浓度约5.5 mol/L时, 它的最大发射峰红移至约358 nm, 接近游离色氨酸的最大荧光发射峰位置, 标志着它的去折叠进程已完成.

盐酸胍诱导的去折叠行为, 使得蛋白质有序的折叠结构逐渐被破坏, 色氨酸等残基也逐渐暴露于溶剂中, 荧光光谱

主要的特征则变成为最大荧光发射峰位置逐渐红移^[12]. 图1为apo-CP43去折叠过程的内源荧光发射图谱. 从图中可以看出, 溶液中盐酸胍浓度从0逐渐增加到2.0 mol/L时, apo-CP43的荧光光谱并未显示明显的变化, 溶液中盐酸胍浓度继续增加到3.0 mol/L时, apo-CP43最大荧光发射峰发生了明显红移, 且因盐酸胍的作用导致了荧光淬灭^[12-13]. 随着盐酸胍浓度继续增加到5.0 mol/L时, 荧光强度也升高, 并伴随着最大峰位置的逐渐红移. 此结果表明, 随着溶液中诱导剂盐酸胍浓度的逐渐增加, apo-CP43分子的空间结构发生了序变, 而引起其分子内色氨酸残基所处微环境的变化, 使它们逐渐由apo-CP43分子内部过渡到其分子表面. 当盐酸胍浓度约5.0 mol/L时, 它的最大发射峰红移至约355 nm, 接近游离色氨酸的最大荧光发射峰位置, 标志着它的去折叠进程已完成. 值得注意的是, 盐酸胍浓度为3.0 mol/L时, 可能出现了一个过渡态的、结构相对稳定的apo-CP43分子折叠中间体.

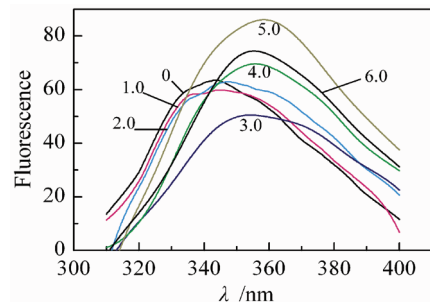


图1 apo-CP43在不同浓度盐酸胍条件下的荧光光谱图
Fig. 1 Fluorescence spectra of apo-CP43 at different concentration of GdnHCl

2.2 盐酸胍条件下apo-CP43去折叠的中间过程分析

参考蛋白去折叠行为分析的相关研究, 选择了 $F_{360\text{ nm}}/F_{330\text{ nm}}$ 研究盐酸胍条件下apo-CP43的去折叠的中间过程, 对其变性进程作了进一步分析, 该方法在分析蛋白变性过程中最大荧光发射峰位置移动时精确度较高, 且可能发现变性过程中稳定的中间状态^[7]. 从图2可以看出, 经过盐酸胍的处理之后, apo-CP43的 $F_{360\text{ nm}}/F_{330\text{ nm}}$ 比值是逐渐增大的, 说明随着盐酸胍浓度的增加, 荧光最大发射峰位置逐渐发生了红移, 即蛋白的空间结构随之发生了一定的变化. 但是可以看出 $F_{360\text{ nm}}/F_{330\text{ nm}}$ 比值的结果并未显示出apo-CP43在经过盐酸胍诱导变性后的去折叠的过程中有出现明显的中间状态. 由sigmoidal拟合得出曲线, 并计算出 c_m 值(蛋白变性一半时的变性剂浓度)为 (2.62 ± 0.3) mol/L.

2.3 盐酸胍条件下apo-CP43的荧光相图分析

荧光相图法可应用于检测蛋白质去折叠过程中有无部分去折叠中间态存在. 若蛋白质去折叠过程符合“全或无模型”或“二态模型”, 则荧光相图表现为一条直线; 若蛋白质去折叠是一个序变过程, 即符合“三态模型”或“多态模型”, 则荧光相图分别表现为两条直线或多条直线^[9]. 为了进

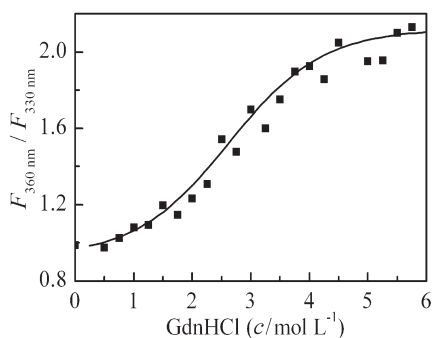


图2 $F_{360\text{ nm}}-F_{330\text{ nm}}$ 比值法分析apo-CP43盐酸胍变性的中间过程
Fig. 2 Unfolding process of apo-CP43 monitored by $F_{360\text{ nm}}-F_{330\text{ nm}}$ ratios

一步探讨盐酸胍诱导的apo-CP43的去折叠过程, 我们进一步分析了盐酸胍诱导的apo-CP43去折叠过程的荧光相图(图3)。由图3可以看出, 盐酸胍诱导的apo-CP43去折叠过程的荧光相图由两条斜率不同的直线组成, 它们相交于盐酸胍浓度约为3.0 mol/L处。与去折叠过程的内源荧光发射光谱相似, 这个结果也表明, 盐酸胍诱导的apo-CP43去折叠过程是一个序变过程, 且在溶液中盐酸胍浓度约为3.0 mol/L时存在一个apo-CP43部分折叠中间态。盐酸胍诱导apo-CP43变性的荧光相图表现为2条直线, 说明盐酸胍诱导apo-CP43变性的过程符合三态模型, 为序变过程。盐酸胍浓度由0到3.0 mol/L时, apo-CP43从天然态转变为部分折叠中间态, 盐酸胍浓度为3.0~6.0 mol/L时, apo-CP43从中间态转变为去折叠态。

2.4 盐酸胍条件下apo-CP43的去折叠效率

按照公式(1)计算了apo-CP43在盐酸胍处理下发生的去折叠比例, 见图4。从图中可以观察到, 随着盐酸胍浓度增大, apo-CP43逐渐发生了去折叠。当盐酸胍浓度为2.0 mol/L时, apo-CP43去折叠比例大概为20%, 即蛋白质的结构只发生了较小的变化, 而当盐酸胍浓度从2.0 mol/L上升到3.0 mol/L时, 蛋白的去折叠比例则达到了80%左右, 说明此期间蛋白的结构大部分被变性剂所破坏, 随后去折叠比例缓慢增长, 当盐酸胍浓度约为5.5 mol/L时, 去折叠比例趋于相对稳定状

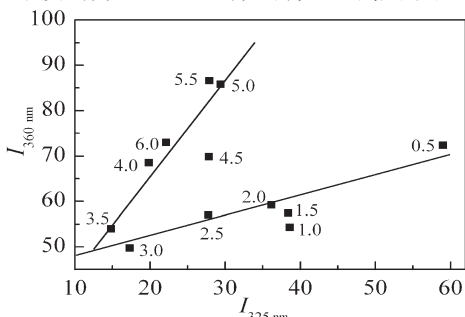


图3 盐酸胍诱导apo-CP43去折叠过程的荧光相图
Fig. 3 Fluorescence phase diagram representing the unfolding apo-CP43 induced by an increase in guanidine hydrochloride concentration

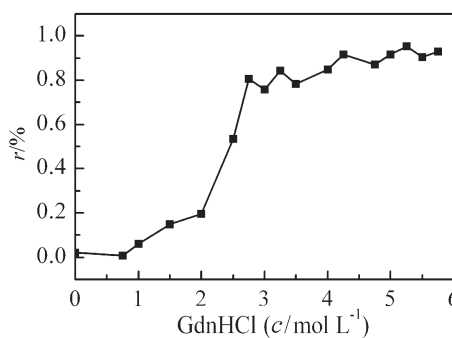


图4 在不同盐酸胍浓度下apo-CP43去折叠比例
Fig. 4 Fraction unfolding of apo-CP43 at different concentration of GdnHCl

态, 说明此时apo-CP43已经基本完成去折叠。

2.5 盐酸胍条件下apo-CP43的ANS荧光光谱

8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)为一种外源荧光探针分子, 能够与蛋白质分子中疏水区域以较强的疏水力相结合, 因此已经广泛地应用于表征和探测蛋白质的构象的变化、去折叠等。ANS一旦结合蛋白质的疏水区域后的显著特征是荧光强度增大, 最大发射峰位置蓝移, 说明结合区域的极性降低, 疏水性增大^[14-16]。Apo-CP43经过不同浓度盐酸胍处理之后, 以激发波长为380 nm时测定了ANS荧光。图5为不同盐酸胍条件下, apo-CP43的ANS荧光最大发射波长的变化情况。可以看出, 随着盐酸胍浓度增加, ANS最大发射波长值也逐渐增大, 发射峰位置逐渐红移。0~2.0 mol/L盐酸胍浓度时, apo-CP43的ANS荧光峰的位置在495 nm处, 未发生位移; 随着盐酸胍浓度的增加, 荧光峰逐渐红移。当盐酸胍浓度达到5 mol/L左右时, 基本趋于稳定状态。

图6为盐酸胍条件下apo-CP43的ANS荧光强度的变化情况。可以观察到, 随着盐酸胍浓度的增大, apo-CP43蛋白的ANS荧光强度逐渐降低。当盐酸胍浓度约为4.0~6.0 mol/L, apo-CP43的荧光强度趋于一个相对稳定时期, 说明此时蛋白基本完成了去折叠。由于apo-CP43是膜蛋白, 在天然状态下, 可以与ANS结合, 并且具有较高的ANS荧光, 去折叠后

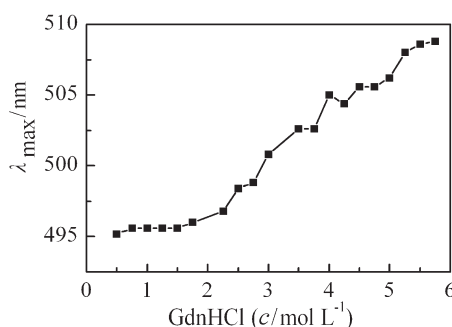


图5 盐酸胍诱导apo-CP43去折叠的ANS荧光峰位变化
Fig. 5 Changes of ANS fluorescence peak in the GdnHCl-induced unfolding of apo-CP43

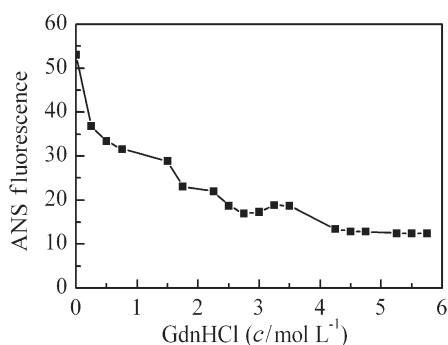


图6 盐酸胍诱导apo-CP43去折叠的ANS荧光强度变化

Fig. 6 Changes of ANS fluorescence intensity in the GdnHCl-induced unfolding of apo-CP43

反而具有较低的ANS荧光, 这表明ANS可能与apo-CP43跨膜螺旋区疏水部位结合, 盐酸胍诱导apo-CP43去折叠后, 丧失了与ANS结合能力。

3 讨论

变性一直是研究蛋白质折叠特性的有效手段。而盐酸胍是一种强电解质, 能破坏分子晶体结构的表面, 作用于内部的氨基酸残基, 通过正离子(胍离子)效应减弱维持蛋白质三级结构的静电相互作用^[17]。色氨酸荧光受其周围环境即蛋白质三级结构的影响很大, 当色氨酸被包埋在蛋白质内部疏水环境时, 其荧光强度较大, 波长较短; 当色氨酸因为蛋白质变性或其他原因引起的构象变化而暴露在极性环境中时, 其荧光强度降低, 峰位置红移。因此色氨酸荧光变化是研究蛋白构象变化的一个比较灵敏的手段^[18]。

本文中我们借助色氨酸荧光和ANS荧光研究了脱辅基蛋白apo-CP43在盐酸胍条件的稳定性。研究显示, 通过荧光光谱法分析, apo-CP43在盐酸胍条件下, 其最大荧光发射峰位置逐渐红移, 荧光强度逐渐降低。这些说明在盐酸胍诱导的去折叠过程中, 蛋白的空间结构也发生了连续的变化, 位于蛋白内部的色氨酸残基也逐渐由其分子内部暴露于分子表面^[12]。通过对去折叠中间过程的研究也发现, 随着盐酸胍浓度的增加, $F_{360\text{ nm}}/F_{335\text{ nm}}$ 比值显示apo-CP43的色氨酸荧光发射峰逐步红移, 但是并未发现明显的中间状态。而荧光相谱图结果显示盐酸胍诱导apo-CP43变性的过程符合三态模型, 即盐酸胍浓度为3 mol/L时存在一个折叠中间状态。可以看出, 荧光相谱图检测apo-CP43在变性剂盐酸胍条件下的去折叠中间态的灵敏度相对于 $F_{360\text{ nm}}/F_{335\text{ nm}}$ 比值的检测较高。这些说明, 基于荧光强度和最大发射峰位置分析蛋白质的去折叠过程, 进行不同方法的分析可以检测到不同的结构中间体。ANS荧光测定数据显示apo-CP43经过盐酸胍处理变性之后ANS荧光强度逐渐减小, 并且光谱的最大发射峰逐步红

移, 说明结合区域的极性增大, 疏水性降低。CP43具有6个跨螺旋膜区, 并被5个膜外环分开(即A-E环)^[3, 13]。推测可能与apo-CP43为膜蛋白相关, 而CP43与类囊体膜相嵌的跨膜螺旋区的疏水部位可能为ANS的结合位点, 随着盐酸胍浓度的增加, 蛋白的结构相继发生变化, 疏水簇显示更不易于与ANS结合。但是具体机制尚不清楚, 还有待进一步研究。后续我们将进一步采取更多的方法来研究apo-CP43在其它外界条件下的稳定性。

References

- 1 Bricker TM. The structure and function of Cpa-1 and Cpa-2 in photosystem II. *Photosyn Res*, 1990, **24**: 1-13
- 2 Loll B, Kern J, Saenger W, Zouni A, Biesiadka J. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature*, 2005, **438**: 1040-1044
- 3 Guskov A, Kern J, Gabdulkhakov A, Broser M, Zouni A, Saenger W. Cyanobacterial photosystem II at 2.9 Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, **16**: 334-342
- 4 Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*, 2004, **303**: 1831-1838
- 5 Service RJ, Yano J, McConnell I, Hwang HJ, Niks D, Hille R, Wydrzynski T, Burnap RL, Hillier W, Debus RJ. Participation of glutamate-354 of the CP43 polypeptide in the ligation of manganese and the binding of substrate water in photosystem II. *Biochemistry*, 2011, **50**: 63-81
- 6 Meng L (孟乐), Yuan XH (袁向华), Zhang NH (张年辉), Jin J (晋军), Du LF (杜林方). Study on binding of Hg²⁺ to native or NBS modified BSA and HSA. *J Sichuan Univ Nat Sci* (四川大学学报自然科学版), 2006, **43** (1):184-189
- 7 Samuel D, Kumar TK, Srimathi T, Srimathi T, Hsieh HC, Yu C. Identification and characterization of an equilibrium intermediate in the unfolding pathway of an all beta-barrel protein. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 34968-34975
- 8 Pace CN. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Method Enzymol*, 1986, **131**: 266-280
- 9 Yang F, Zhang M, Chen J, Liang Y. Structural changes of α -lactalbumin induced by low pH and oleic acid. *Acta Biochim Biophys*, 2006, **1764**: 1389-1396
- 10 Royer CA. Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. *Chem Rev*, 2006, **106**: 1769-1784

- 11 Roumestand C, Boyer M, Guignard L, Barthe P, Royer CA. Characterization of the folding and unfolding reactions of a small β -barrel protein of novel topology, the MTCPI oncogene product P13. *J Mol Biol*, 2001, **312**: 247~259
- 12 Cervellati C, Franzoni L, Squerzanti M, Bergamini CM, Spinozzi F, Mariani P, Lanzara V, Spisni A. Unfolding studies of tissue transglutaminase. *Amino Acids*, 2009, **36**: 633~641
- 13 Müh F, Renger T, Zouni A. Crystal structure of cyanobacterial photosystem II at 3.0 Å resolution: A closer look at the antenna system and the small membrane-intrinsic subunits. *Plant Physiol Biochem*, 2008, **46**: 238~264
- 14 Yang J, Jing ZH, Jie JJ, Guo P. Fluorescence spectroscopy study on the interaction between Gossypol and bovine serum albumin. *J Mol Struct*, 2009, **920**: 227~230
- 15 Zhang C, Zhang H, Zhao XY, Ma Y, Yao HY. The secondary structure of winter wheat bran antifreeze protein determined by FTIR and CD spectrum. *Spect Spect Anal*, 2009, **29**: 1764~1767
- 16 Dobson CM. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol*, 2004, **15**: 3~16
- 17 Ahmad B, Shamim TA, Khan RH. Identification and characterization of functional intermediates of stem bromelain during urea and guanidine hydrochloride unfolding. *J Biochem*, 2006, **141**: 251~259
- 18 Wang Z (王铮), Lai B (赖兵), Cao J (曹洁), Li Z (李竹), Qu LL (瞿丽丽), Cao AN (曹傲能), Lai LH (来鲁华). Hierarchical unfolding of mj HSP16.5. *Acta Phys-Chim Sin* (物理化学学报), 2008, **24** (10): 1745~1750