

等转化率法分析溶菌酶在变性剂影响下的变性过程

曹小敏¹ 王志勇² 刘欲文² 汪存信² 吴同华¹ 田 耘³

1. 长沙环境保护职业技术学院监测系,长沙 410004; 2. 武汉大学化学与分子科学学院,武汉 430072;
3. 湖南省环境监测中心站分析室,长沙 410014

摘要 利用差示扫描量热法(DSC)研究了溶菌酶在变性剂(乙醇、二甲基亚砷)影响下的变性过程,并用等转化率法对该过程进行了分析。结果表明:在有、无变性剂存在情况下,随着扫描速率的增加,溶菌酶的变性温度都缓慢增加;变性剂可加速溶菌酶的变性过程,降低溶菌酶的热稳定性;其中,乙醇对溶菌酶热稳定性的影响大于 DMSO。等转化率法分析表明:溶菌酶在有、无变性剂的条件下,其表观活化能在不同的转化率下未保持不变,而是随转化率增大而减小;溶菌酶的变性过程并不是标准两态可逆过程,而是一个涉及多种蛋白质状态的复杂过程。等转化率法为蛋白质单步或是多步变性过程的研究提供了一种新思路。

关键词 差示扫描量热法;溶菌酶;变性剂;等转化率法

中图分类号 O 643 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)01-0063-04

蛋白通常可以通过 2 条途径发生变性:通过温度的改变(热变性)或者通过溶剂中有机小分子浓度的改变,如尿素和盐酸胍(化学变性)。溶菌酶结构稳定,是研究蛋白质折叠和去折叠的理想工具。变性剂对溶菌酶变性的影响虽然已有很多报道^[1-2],但这些报道多从热力学角度来研究溶菌酶在变性剂影响下的变性过程,有关其动力学研究工作较少,且很少用等转化率法研究蛋白^[3-4]。等转化率法是目前热分析动力学中普遍采用的一种计算活化能的方法,被广泛应用于处理各种非等温反应的数据,它能较好地描述单一机理的过程,对于复杂过程也能得到活化能与转化率的关系,采用该方法计算得到的表观活化能不依赖于机理函数,更加合理和可信,能为机理的深入分析提供有用的信息^[5]。

醇类被广泛用作蛋白质的变性剂,沉淀剂和晶化试剂^[2]。醇类能诱发蛋白质的螺旋结构,扰乱天然状态蛋白质的三级结构,能引起一些蛋白质在高浓度时形成淀粉纤维^[6]。然而这些影响的动力学机理仍然是不清楚的。而二甲基亚砷作为蛋白质和肽的结构强干扰剂已为人所知。笔者在以往的研究中发现溶菌酶的热变性是部分可逆的多态反应的过程。溶菌酶在变性剂影响下的变性动力学规律与热变性的动力学规律是否一致尚未见报道。本试验利

用热分析动力学中的等转化率法,以鸡蛋清溶菌酶为研究对象,采用差示扫描量热仪(DSC)监测溶菌酶在变性剂乙醇、二甲基亚砷影响下的变性过程,分析了变性过程的动力学机理及乙醇、二甲基亚砷对变性过程的影响,为蛋白质单步或是多步变性过程研究提供一种新的思路。

材料与方 法

仪器与试剂

DSC 822^o型差示扫描量热仪,瑞士 Mettler Toledo 公司生产;Lysozyme 国产,使用前未做进一步纯化。

含有 20% 添加剂的磷酸盐缓冲液:0.020 mol/L Na₂HPO₄, 0.020 mol/L KH₂PO₄, 0.150 mol/L NaCl, 20% 乙醇和 0.020 mol/L Na₂HPO₄, 0.020 mol/L KH₂PO₄, 0.150 mol/L NaCl, 20% DMSO。

乙醇、DMSO、磷酸盐均为国产分析纯。

样品制备采用称重法,准确称取一定量的溶菌酶溶于定量体积含有不同浓度变性剂的磷酸缓冲液中,得到 60 mg/mL 的溶菌酶溶液。所用溶液均用去离子水配制。

测定

分别取 60 mg/mL 的溶菌酶溶液 30 μL,置于

收稿日期:2009-08-28; 修回日期:2009-11-12

* 国家自然科学基金项目(20373050, 30600116)资助

曹小敏,女,1980 年生,博士,讲师。研究方向:热分析动力学。E-mail: tianyunchemistry@163.com

40 μL 的铝坩埚中,密封后作为样品置于 DSC 中。参比为等量未含溶菌酶的相应的缓冲溶液,同样封盖。DSC 的温度测量系统用标准金属 In 进行标定校准。载气为 N₂ (纯度大于 99%),流速为 50 mL/min。整个实验过程的升温速率均小于 2.5 K/min,以避免坩埚中液体样品发生对流影响实验结果的重现性^[7]。每组试验进行 3 次,取其平均值。DSC 图谱采用 Mettler Star822° 软件进行处理。

等转化率法计算表观活化能

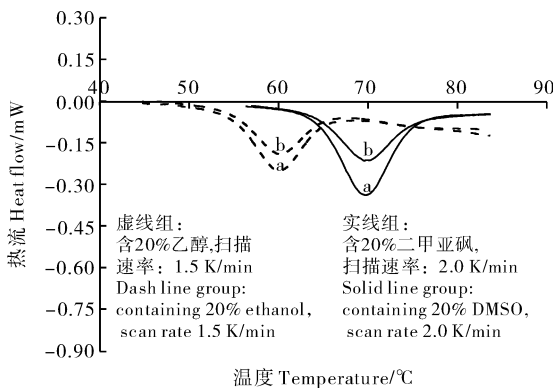
参照文献[8],运用等转化率法计算表观活化能

E_a 。

结果与分析

溶菌酶在乙醇和 DMSO 影响下的变性

为了确定溶菌酶在乙醇和 DMSO 影响下的变性过程是否可逆,在第 1 次升温扫描结束后,利用液氮降温装置将样品和系统的温度迅速降低到 35℃,再在相同的条件下对样品进行第 2 次升温扫描,如图 1 所示。任何不可逆变性蛋白将不会对第 2 次扫描的变性峰面积有贡献。图 1 表明,在乙醇和 DMSO 影响下,第 2 次扫描同样会出现一个吸热峰,但是峰面积相应减少。这表明一部分的溶菌酶分子在第 1 次伸展循环后没有再折叠,也就意味着这一部分溶菌酶发生了不可逆的转变。第 1 次升温扫描后,从坩埚中取出的溶菌酶展示出凝胶状态,说明有不可逆的聚集发生。结果表明:溶菌酶在变性剂乙醇和 DMSO 影响下的变性过程,一部分不可逆,另一部分则可逆。

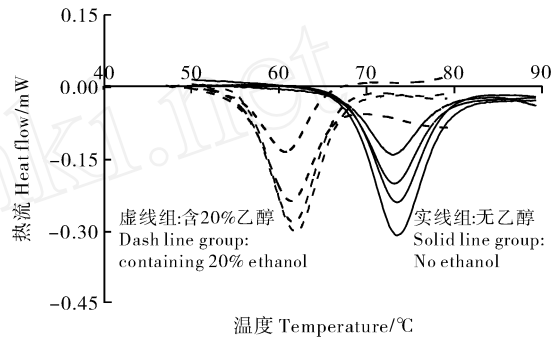


a. 第 1 次升温扫描 The first heating scan; b. 第 2 次升温扫描 The second heating scans, respectively.

图 1 60 mg/mL 溶菌酶在含有不同变性剂的磷酸盐缓冲液中的 DSC 重复扫描曲线

Fig. 1 DSC repetitively scan curves for 60 mg/mL lysozyme in phosphate buffer containing different denaturants

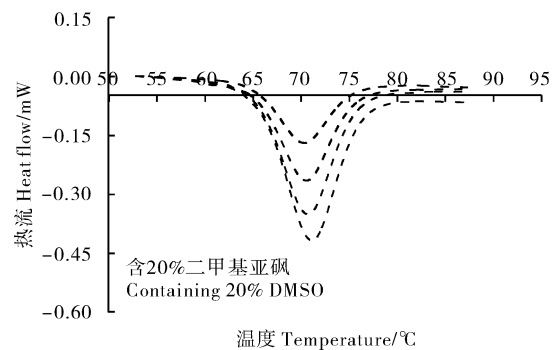
图 2、3 分别为 60 mg/mL 溶菌酶在含有乙醇和 DMSO 的 0.020 mol/L 磷酸盐缓冲液中,在不同扫描速率下的 DSC 曲线,从图中可以看出加入乙醇及 DMSO 后,同一扫描速率下溶菌酶的变性温度 t_m 显著降低,说明变性剂加速了溶菌酶的变性过程,降低了溶菌酶的热稳定性,相对于溶菌酶的折叠状态,更有利于它的伸展状态,对溶菌酶起去稳定作用。



图中扫描速率从上至下依次为 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 K/min From the top to bottom, the heating rate is 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 K/min, respectively.

图 2 60 mg/mL 溶菌酶在有乙醇存在时不同扫描速率下的 DSC 曲线

Fig. 2 DSC curves for 60 mg/mL lysozyme in the presence and the absence of ethanol at different heating rates



图中扫描速率从上至下依次为 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 K/min From the top to bottom, the heating rate is 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 K/min, respectively.

图 3 60 mg/mL 溶菌酶在二甲基亚砷存在时不同扫描速率下的 DSC 曲线

Fig. 3 DSC curves for 60 mg/mL lysozyme in the presence and the absence of DMSO at different heating rates

从表 1 可看出在有、无变性剂存在情况下,随着扫描速率的增加,溶菌酶的变性温度都在缓慢增加。而从图 2 也看出,在有、无变性剂存在情况下的 DSC 曲线都不是严格对称的。

表 1 60 mg/mL 溶菌酶在有无变性剂存在时
不同的扫描速率下的变性温度

Table 1 t_m of 60 mg/mL lysozyme in the present and the absence
of denaturants at different heating rates

扫描速率 Scan rate/ (K/min)	变性剂 Denaturant		
	无变性剂 No denaturant	20%乙醇 20% ethanol	20%二甲基亚砷 20% DMSO
1.0	72.65 ± 0.04	60.98 ± 0.10	70.42 ± 0.02
1.5	72.82 ± 0.04	61.47 ± 0.14	70.60 ± 0.04
2.0	72.99 ± 0.10	61.83 ± 0.20	70.70 ± 0.03
2.5	73.17 ± 0.06	62.08 ± 0.05	71.17 ± 0.02

等转化率法分析溶菌酶在乙醇和 影响
下的表观活化能 与转化率 间的关系

采用从 DSC 转化率曲线得到的 $-T$ 数据,通过
公式 $\ln \frac{1}{T^{1.89466100}} =$

$$\ln \frac{AE_a}{Rg(\cdot) + 3.63504095 - 1.89466100 \ln E_a} - \frac{1.00145033 E_a}{RT}$$

计算,得到有无变性剂影响下的表观活化能,其线性
回归系数均大于 0.99。一方面,在主要的转化区域
0.2 ~ 0.8 内,在有无变性剂乙醇和 DMSO 存在
的情况下,表观活化能都未保持不变,而是均随转化
率的增大而减小。这说明溶菌酶在变性剂影响下的
变性过程并不是一步简单的反应过程,即不是标准
的两态反应,而是一个涉及多种蛋白质状态的复杂
变性过程。一个简单的反应机理并不能用来描述溶
菌酶在变性剂影响下的变性过程。这和溶菌酶在无
变性剂存在下的热变性过程是一样的。

讨 论

DMSO 变性剂的特性归因于亚砷基团强的氢
键接受能力,而 2 个甲基基团能和蛋白质的疏水残
基之间产生相互作用^[9]。乙醇通过形成化学键削弱
蛋白质非极性残基的疏水作用,使蛋白质变得不稳
定^[10]。变性剂对蛋白质的去稳定的作用被解释为
直接的结合成化学键或间接的通过溶剂的调停作
用。在相同体积分数的变性剂存在时,同一扫描速
率下,乙醇比 DMSO 降低溶菌酶变性温度的作用更
大一些。因此,乙醇对溶菌酶的去稳定作用大于
DMSO。在水和乙醇的混合溶液中,当乙醇的浓度
增加时,鸡蛋清溶菌酶连续地以单体、二聚体、初
纤维和淀粉状纤维状态存在^[11]。初步说明对于溶
菌酶在乙醇影响下变性过程,并不是一个两态变
性过程。

根据 van't Hoff 的理论,一个标准的两态可逆
变性过程,DSC 热量峰曲线应是对称的,且 t_m 的
值不会因为升温速率的改变而改变^[12]。本研究
中 DSC 热量峰曲线应却是不对称的,且 t_m 的
值随升温速率的改变而改变,因此,笔者认为:溶
菌酶在有无变性剂影响下的变性过程,都不是一个
两态可逆变性过程。

溶菌酶在有无变性剂影响下,表观活化能均
随转化率的增加而减小,这与 Vyazovkin 等^[3]
用等转化率法研究的胶原质的热变性过程类似,
他们也发现胶原质变性表观活化能 E_a 随转化
率的增加而强烈的减少,认为表观活化能 E_a 在
1 时, $E_a = E_a$ (不可逆步骤的活化能),在 0 时,
 $E_a = E_a$ (可逆步骤的活化能) + H (可逆步骤
的标准焓变)。 E_a 值较大^[13]是可以被预见的,
因为自然态蛋白的高协作性意味着蛋白质在折
叠态和变性态之间有巨大的变性焓 H ,而 E_a
总是大于变性焓 H 的^[14]。

等转化率法虽然被广泛应用于处理各种热
分解非等温反应的数据,但却很少被运用到蛋
白质变性动力学过程中来。笔者应用 DSC 研
究了溶菌酶在变性剂乙醇、DMSO 影响下的
变性过程,并用等转化率法对其进行了分析,发
现乙醇对溶菌酶去稳定性的影响大于 DMSO。
溶菌酶在变性剂影响下的变性与热变性过程
是一样的,仍然不是标准的两态可逆过程,而
是一个涉及多种蛋白质状态的复杂过程,表明
等转化率法为蛋白质单步或多步变性过程的
研究提供了一种崭新的思路。

参 考 文 献

- [1] KOVRIGIN EL, POTEKHIN S A. On the stabilizing action of protein denaturants: acetonitrile effect on stability of lysozyme in aqueous solutions [J]. Biophysical Chemistry, 2000, 83: 45-59.
- [2] LIU W, BRATKO D, PRAUSNITZ J M, et al. Effect of alcohols on aqueous lysozyme lysozyme interactions from static light-scattering measurements [J]. Biophysical Chemistry, 2004, 107: 289-298.
- [3] V YAZOV KIN S, VINCENT L, SBIRRAZZUOLI N. Thermal denaturation of collagen analyzed by isoconversional method [J]. Macromolecular Bioscience, 2007, 7: 1181-1186.
- [4] 金良, 甘莉. 毛细管电泳在蛋白质和核酸分析研究中的应用 [J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(1): 73-76.
- [5] V YAZOV KIN S, WIGHT C A. Model-free and model-fitting approaches to kinetic analysis of isothermal and nonisothermal

- data[J]. *Thermochimica Acta*, 1999, 340/341:53-68.
- [6] GODA S, TAKANO K, YAMAGATA Y. Amyloid protofibril formation of hen egg lysozyme in highly concentrated ethanol solution[J]. *Protein Science*, 2000, 9:369-375.
- [7] HATAKEYAMA T, QUINN F X. Thermal analysis fundamentals and applications to polymer science[M]. Baffins Lane, Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons Ltd, 1999.
- [8] CAO X M, LI J, YANG X, et al. Nonisothermal kinetic analysis of the effect of protein concentration on BSA aggregation at high concentration by DSC[J]. *Thermochimica Acta*, 2008, 467:99-106.
- [9] LEHMANN S M, STANSFIELD R. Binding of dimethyl sulfoxide to lysozyme in crystals studied with neutron diffraction[J]. *Biochemistry*, 1989, 28:7028-7033.
- [10] VELICELEBI G, STURTEVANT J M. Thermodynamics of the denaturation of lysozyme in alcohol-water mixtures[J]. *Biochemistry*, 1979, 18:1180-1186.
- [11] YONEZAWA Y, TANAKA S, KUBOTA T, et al. An insight into the pathway of the amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme obtained from a small-angle X-ray and neutron scattering study[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 323:237-251.
- [12] CUETO M, DORTA M J, MUNGUÍA O, et al. New approach to stability assessment of protein solution formulations by differential scanning calorimetry[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, 252:159-166.
- [13] MOHAMED A A, DUARTEP R, KIM S. Effect of starch on the thermal kinetics and transmittance properties of lysozyme[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005, 85:450-458.
- [14] WEJERS M, BARNEVELD P A, STUART M A, et al. Heat-induced denaturation and aggregation of ovalbumin at neutral pH described by irreversible first-order kinetics[J]. *Protein Science*, 2003, 12:2693-2703.

Effects of Denaturant on the Denaturation of Lysozyme Assayed by the Iso-Conversional Method

CAO Xiao-min¹ WANG Zhi-yong² LIU Yu-wen² WANG Cun-xin² WU Tong-hua¹ TIAN Yun³

1. Department of Environmental Monitoring, Changsha Environmental Protection College, Changsha 410004, China;

2. College of Chemistry and Molecular Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

3. Department of Analytical Chemistry, Environmental Monitoring Center of Hunan Province, Changsha 410014, China

Abstract The denaturation of lysozyme was analyzed under two different denaturants (ethanol, dimethyl sulphoxide (DMSO)) using differential scanning calorimetry (DSC) and the isoconversional method. The lysozyme denaturation temperature t_m increased slowly with the increase of the scan rate in the presence/absence of denaturants. The denaturants accelerated the denaturation of lysozyme and reduced the thermal stability of lysozyme. Ethanol has much more influence on the thermal stability of lysozyme than DMSO has. With the isoconversional method, the apparent activation energy of denaturation process did not keep constant at different conversion ratios () in the presence/absence of the two denaturants, but decreased with the increase of , indicating that a simple reaction mechanism could not be used for explaining the denaturation process of lysozyme. The denaturation process was not standard reversible two states but multi-step process. The isoconversional method provides new opportunities in exploring the multi-step or one-step kinetics of protein denaturation.

Key words DSC; lysozyme; denaturants; iso-conversional method

(责任编辑:张志钰)