

## 磷酸丙糖异构酶的折叠及稳定性研究

刘江红<sup>1,2)</sup> 石毅<sup>1,2)</sup> 周筠梅<sup>1)\*</sup>

<sup>(1)</sup>中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101;

<sup>(2)</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要** 从鸡胸肌中纯化出磷酸丙糖异构酶 (triose phosphate isomerase, TIM), 通过蛋白质内源荧光, 圆二色性, 紫外吸收二阶导数光谱等多种研究溶液构象的方法, 对 TIM 被盐酸胍和热变性过程进行了详细的研究. 结果表明, 用不同测量方法得到 TIM 的变性过程均高度协同, 没有观察到折叠中间态, 应用单分子二态去折叠模型计算了 TIM 去折叠的热力学参数. 通过圆二色光谱在 222 nm 处的变化监测的 TIM 热变性过程也是高度协同的二态过程, 天然态 TIM 的表观  $T_m$  为 64.6°C. 在低浓度盐酸胍存在下, TIM 的热稳定性降低. 讨论了二体蛋白质的可能去折叠机制, 证明在使用的实验条件下磷酸丙糖异构酶去折叠过程中二级结构与三级结构的变化是同时发生的, 其去折叠遵循观察不到二体解离的表观二态过程.

**关键词** 磷酸丙糖异构酶, 变性, 构象变化, 折叠中间态, 二态模型

**学科分类号** Q5

磷酸丙糖异构酶 (triose phosphate isomerase, TIM, EC 5.3.1.1.) 是糖酵解过程中重要的异构酶, 存在于多种组织中. 它催化二羟丙酮磷酸和 D- 甘油醛 -3- 磷酸之间的可逆转化. TIM 缺乏导致免疫系统先天失调的多系统疾病<sup>[1]</sup>, 患者的细胞内二羟丙酮磷酸明显增多, TIM 活性降低, ATP 合成率减小, 轻者肌肉强直, 重者全身松弛, 肌萎缩, 出现语言障碍. 最近的研究表明, TIM 缺乏症也是神经退行性蛋白质错误折叠病<sup>[2]</sup>. 因此, 对 TIM 的结构功能, 特别是对影响构象稳定性和促进错误折叠因素的研究, 对探讨该疾病的发生机制具有一定的意义.

磷酸丙糖异构酶的分子质量为 52 ku, 由两个相同的亚基组成对称的双体, 每个亚基含 247 个氨基酸残基, 亚基的结构近似球形, 直径约 3.5 nm. 其多肽链很有规律地折叠成 8 段  $\beta/\alpha$  barrel 结构, 简称为  $(\beta\alpha)_8$ . 其中 55% 的氨基酸残基形成螺旋结构, 22% 形成平行的折叠片. 亚基间的相互作用主要是通过 70 ~ 80 位氨基酸残基形成的 loop, 此 loop 绕相邻亚基的第 14 位甲硫氨酸残基形成处于亚基界面边缘的疏水口袋, 通过大量氢键相互作用, 使亚基界面所占接触残基的比例非常高, 所以其二体结构相当稳定<sup>[3,4]</sup>. TIM 的结构模式存在于许多功能不同的蛋白质中, 对这种存在于多种蛋白质中的结

构单元的折叠机制的研究具有一定的代表性. Rietveld 等曾对来源于兔肌的 TIM 进行了一系列的去折叠和再折叠分析. 他们在 1996 年用静态水压方法研究了兔肌 TIM 的亚基解离和去折叠, 稳态实验和快速加压的动力学实验结果都表明 TIM 的亚基解离和二体蛋白的去折叠是同步发生的, 并且压力诱导的变性过程对蛋白质浓度没有依赖关系<sup>[5]</sup>. 他们还研究了盐酸胍诱导的兔肌 TIM 的变性, 结果表明, 变性过程高度协同, 没有出现折叠中间体, 却蛋白质浓度降低到原浓度的 10%, 变性过程对蛋白质浓度有依赖性<sup>[6]</sup>. 用内源荧光和圆二色性方法研究 TIM 在盐酸胍中的变性过程, 观察到二级结构和三级结构的变化是同时发生的<sup>[7]</sup>. 最近, Ch3nez-C3rdenas 等<sup>[8]</sup>在对来源于 *Trypanosoma cruzi* 的 TIM (*TcTIM*) 被盐酸胍变性的研究中, 发现了稳定的二体和单体中间体. 然而, 对来源于鸡肌 TIM 的去折叠和再折叠的稳态研究工作较少, 早期研究只侧重盐酸胍诱导的变性动力学过程, 也没有采用较多的结构探针和方法对其做系统的研究<sup>[9]</sup>. 本文报道了用蛋白质内源荧光, 圆二色性, 紫外吸收二阶导数光谱等研究溶液构象的方法, 对鸡肌

\* 通讯联系人. Tel: 010-64889859, E-mail: zhoujm@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2006-02-14, 接受日期: 2006-03-28

TIM被盐酸胍和热变性过程的研究结果, 讨论了TIM的折叠机制及影响其稳定性的因素.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料和试剂

磷酸丙糖异构酶从新鲜的鸡胸肌中提取. D-甘油醛-3-磷酸、 $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶、Tris、盐酸胍、脲、巯基乙醇购自Sigma公司; DTT购自Merck公司; 其他试剂为国产分析纯.

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 从鸡胸肌中提纯TIM.

参照文献方法<sup>[10~12]</sup>进行了适当的改进. 将新鲜的鸡胸肌在冰浴中剪去筋膜后搅成肉糜, 用含1.3 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 巯基乙醇, pH 7.0的缓冲液轻柔搅拌抽提30 min后离心去除沉淀, 向上清液中加入硫酸铵至饱和度为65%, 4℃过夜, 以沉淀杂蛋白. 第二天将悬浊液离心去除沉淀, 向上清液中继续加入硫酸铵至饱和度为90%, 以沉淀TIM, 4℃下静置4 h后离心, 所得沉淀用少量的20 mmol/L pH 7.8的Tris-HCl缓冲液溶解, 4℃下对20 mmol/L pH 7.8的Tris-HCl缓冲液透析过夜.

将透析好的酶液依次过DEAE-Sepharose Fast

Flow和Q-Sepharose离子交换柱, 用20 mmol/L pH 7.8的Tris-HCl缓冲液平衡离子交换柱, 用20 mmol/L pH 7.8含NaCl的Tris-HCl缓冲液洗脱, 当NaCl浓度达到0.03 mol/L时将TIM洗脱下来, 样品走SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 结果见图1.

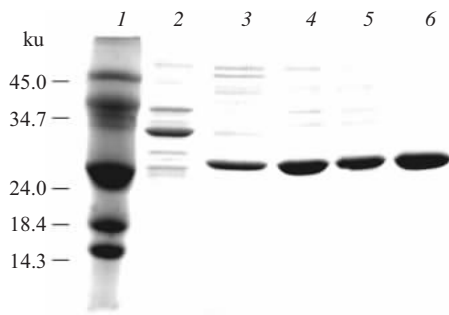
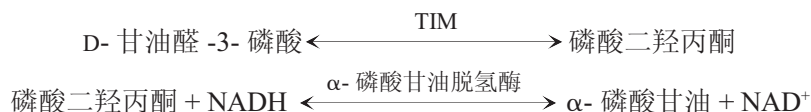


Fig. 1 SDS-PAGE of the proteins purified from chicken breast muscle

1: Low molecular mass marker; 2: Eluates from DEAE-Sepharose Fast Flow column at lower than 0.03 mol/L NaCl; 3: Higher than 1 mol/L NaCl; 4,5: 0.03 mol/L NaCl respectively; 6: Further purified mixture of 4 and 5 by Q-Sepharose column.

#### 1.2.2 TIM的活性测定——偶联酶法<sup>[12]</sup>.

偶联酶反应如下式:



测活时以D-甘油醛-3-磷酸和NADH为底物, TIM催化D-甘油醛-3-磷酸形成的磷酸二羟丙酮, 被 $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶继续催化生成 $\alpha$ -磷酸甘油和 $\text{NAD}^+$ , 用紫外分光光度计监测反应体系中加入TIM后, NADH在340 nm处光吸收值的降低来计算TIM的活性<sup>[11,12]</sup>, 比活(units/mg) =  $\frac{\Delta A \times V \times D}{C \times 6.3}$ , 其

中 $\Delta A$ 为每分钟在340 nm处光吸收的变化值,  $V$ 是总反应体积(ml),  $D$ 是TIM的稀释倍数,  $C$ 是TIM的浓度(g/L), 6.3 mmol/ml·cm是NADH的毫摩尔消光系数. 一个活力单位定义为, 在所使用的实验条件下, 每分钟转化1微摩尔的底物形成产物所需要的酶量. 我们纯化得到的TIM的比活为7 200 units/mg.

#### 1.2.3 蛋白质内源荧光光谱测定. 蛋白质内源荧光

光谱的测量在Toshiba FC4500荧光分光光谱仪上进行, 恒温25℃, 设定激发波长为280 nm, 激发和发射狭缝均为5 nm, 测量300~400 nm之间的发射光谱. 选择在327 nm处的荧光强度随盐酸胍浓度的变化, 来表征TIM因变性而发生的整体结构变化.

1.2.4 蛋白质的圆二色谱测定. 蛋白质圆二色谱的测量在Applied Photophysics  $\pi^*$ -180圆二色仪上进行, 温度由恒温水浴控制, 稳态盐酸胍变性的测定温度是25℃. TIM热变性的温度范围是20℃到75℃, 每个温度均做200~240 nm的扫描, 在数据处理时读每个温度在222 nm处的椭圆度值. 用222 nm处椭圆度值的变化, 来表征TIM二级结构的变化.

**1.2.5 蛋白质紫外吸收二阶导数光谱的测定.** TIM 的紫外吸收光谱在 UNIC UV-4802 型紫外分光光度计上测量. 准确测定被不同浓度盐酸胍变性样品的吸收光谱 (200~240 nm), 得到的谱线用 Origin 7.5 程序做谱线的二阶导数转换得到二阶导数谱.

**1.2.6 TIM 的盐酸胍变性和热变性.** 将 TIM 与溶于 50 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液 (含 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 100 mmol/L NaCl) 中不同浓度的盐酸胍分别混合均匀后, 25℃ 保温 18 h 制成 TIM 的胍变性样品, 用于稳态内源荧光, 圆二色谱和紫外吸收二阶导数光谱的测量.

### 1.2.7 平衡态去折叠反应的数据分析.

蛋白质变性的理论长期以来被普遍接受的是“二态模型”, 或“全或无”模型, 这一理论假设蛋白质变性过程中只有天然态和完全去折叠态, 没有折叠中间态. 虽然现在发现, 许多蛋白质的变性过程并非简单的二态过程, 但是实验中经常遇到表观的二态过程, 或者需要将复杂的过程化解为若干二态过程来进行数据处理. TIM 的变性过程符合表观的二态过程, 可以用简单二态去折叠模型处理数据.

(1) 式为蛋白质变性过程的简单二态去折叠模型:  $N$  代表蛋白质的天然态,  $D$  代表蛋白质的完全变性态, 在变性过程中  $N$  与  $D$  处于平衡:



假设在每一个变性剂浓度下测得的光谱学信号幅度 ( $y$ ) 是体系中每一组分变化分数的总和<sup>[13]</sup>:

$$y = f_N y_N + f_D y_D \quad (2)$$

其中

$f_N$  和  $f_D$  是天然态和去折叠态在某一个变性剂浓度时分别所占的分数的,  $y_N$  和  $y_D$  是天然态和去折叠态在某一个变性剂浓度时分别所测得的光谱信号强度. 所以

$$f_N + f_D = 1 \quad (3)$$

将(3)代入(2), 得

$$y = y_N + f_D (y_D - y_N) \quad (4)$$

且反应的平衡常数

$$K = \frac{[D]}{[N]} \quad (5)$$

$$f_D = \frac{[D]}{[D] + [N]} \quad (6)$$

将(5)代入(6), 则

$$f_D = \frac{K}{K+1} \quad (7)$$

去折叠的自由能变化与平衡常数的关系是<sup>[13]</sup>

$$\Delta G_U = -RT \ln K \quad (8)$$

$R$  为吉布森常数,  $R=8.31451$ .  $T$  是绝对温度, 25℃ 的  $T=298$ .

并且在一定的变性剂浓度范围内, 去折叠的自由能变化与变性剂的浓度呈线性关系, 即符合线性外推模型<sup>[13,14]</sup>:

$$\Delta G_U = \Delta G(H_2O) - m[D] \quad (9)$$

其中  $\Delta G(H_2O)$  是在没有变性剂时去折叠反应的自由能变化, 它可以用来衡量蛋白质的结构稳定性.  $m$  是 transition 对变性剂的依赖系数 (或斜率), 相当于单位变性剂引起的蛋白质变性分数, 其单位是焦耳·摩尔<sup>-1</sup>/摩尔(变性剂).  $[D]$  是变性剂的浓度. 变性曲线的变性中点,  $[D]_{1/2}$  是一个非常有用的参数, 由于它的固有误差比  $\Delta G(H_2O)$  小, 因而可以比较同一蛋白质在不同变性剂作用下的差别<sup>[13]</sup>.

将(9)代入(8), 得到

$$K = e^{-(\Delta G(H_2O) - m[D])/RT} \quad (10)$$

这样, 使用 Sigmaplot 回归程序, 根据(4), (7), (10) 三个公式的关系, 通过拟合分别得到  $m$ ,  $y_N$ ,  $y_D$ ,  $\Delta G(H_2O)$  的值.

另外方程(10)可以变形为

$$K = e^{m([D] - [D]_{1/2})/RT} \quad (11)$$

使用 Sigmaplot 回归程序, 根据(4), (7), (11) 三个公式的关系, 通过拟合分别得到  $m$ ,  $y_N$ ,  $y_D$ ,  $[D]_{1/2}$  的值.

## 2 结 果

### 2.1 盐酸胍变性过程中 TIM 内源荧光光谱的变化

天然态 TIM 的荧光最大发射峰位于 327 nm, 表明其芳香族氨基酸处于蛋白质内部的疏水环境中<sup>[15]</sup>. TIM 被盐酸胍变性过程中, 随盐酸胍浓度的增加, TIM 荧光在 327 nm 处发射强度下降, 最大发射峰位逐渐红移. 在 3.0 mol/L 盐酸胍作用下, 最大发射峰位移至 355 nm, 表明芳香族氨基酸已暴露到溶剂中, 蛋白质处于去折叠状态. 通过分析 TIM 被盐酸胍变性的程度与盐酸胍浓度的依赖关系, 可以提供有关蛋白质热力学稳定性和去折叠机制的信息. TIM 荧光在 327 nm 处的发射强度, 随盐酸胍浓度的相对变化如图 2 所示. 在低浓度盐酸胍作用下, 荧光强度没有明显的变化, 随盐酸胍浓度增加, 荧光强度逐渐降低, 在 0.5~1.0 mol/L 间发生陡变, 然后缓慢降低至 3.0 mol/L 盐酸胍时达最低值. 荧光强度随盐酸胍浓度的变化呈简单的二

态过程: 即从天然态直接变成完全变状态, 没有观察到折叠中间态. 按方法中所述的二态去折叠方程拟合得到的 TIM 去折叠自由能变化等参数见表 1.

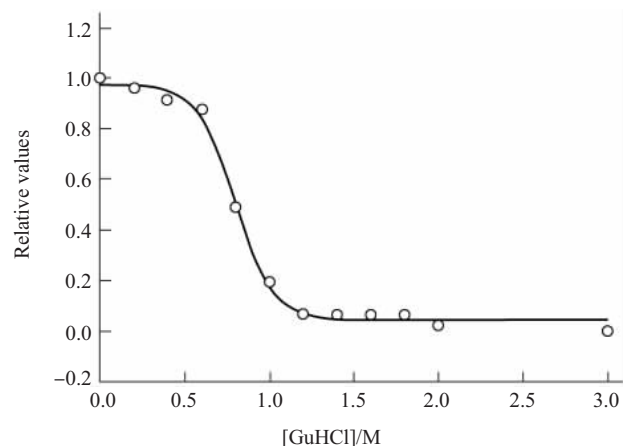


**Fig. 2 Effect of guanidine hydrochloride concentration on the denaturation of TIM by monitoring intrinsic fluorescence changes at 327 nm**

The symbols represent the experimental data. The line is the theoretical curve generated by using equation (4), (7) and (10) with  $m = 22.10 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ,  $\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = 17.68 \text{ kJ/mol}$  and  $[\text{GuHCl}]_{1/2} = 0.80 \text{ M}$ .

**Table 1 The thermodynamic parameters of TIM during guanidine denaturation**

| Parameters                                                       | Method                 |                    |
|------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------|
|                                                                  | Intrinsic fluorescence | Circular dichroism |
| $m/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1})$        | 22.10                  | 22.78              |
| $\Delta G(\text{H}_2\text{O})/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ | 17.68                  | 17.60              |
| $[\text{GuHCl}]_{1/2}/\text{M}$                                  | 0.80                   | 0.87               |

## 2.2 盐酸胍变性过程中 TIM 二级结构的变化

TIM 是典型的  $\alpha/\beta$  结构蛋白质, 天然态 TIM 的圆二色谱在 222 nm 和 208 nm 处有双负峰, 去折叠状态时双峰消失(图 3b). 跟踪 TIM 被盐酸胍变性过程中圆二色谱的变化, 能反映去折叠过程中蛋白质二级结构的变化. 图 3a 显示了 TIM 的圆二色谱在 222 nm 处的椭圆度随盐酸胍浓度的相对变化关系, 其变化规律与图 2 基本相似. 按二态方程拟合得到的 TIM 二级结构变化的热力学参数见表 1.

## 2.3 盐酸胍变性过程中 Tyr 暴露程度的变化

在蛋白质变性过程中, 组成蛋白质的氨基酸残基构象和微环境随之发生变化, 监测侧链基团的物化性质和微环境的变化, 就可以推测蛋白质内局部

区域的构象变化. 蛋白质的紫外吸收光谱通常是由其所含的 Trp、Tyr 和 Phe 贡献的重叠连续谱, 无法区分某种氨基酸的贡献. 紫外吸收二阶导数谱可将三者分开, 使单独测定每种氨基酸残基的微环境变化成为可能. 图 4 为天然态和完全变状态 TIM 的紫外吸收二阶导数谱.

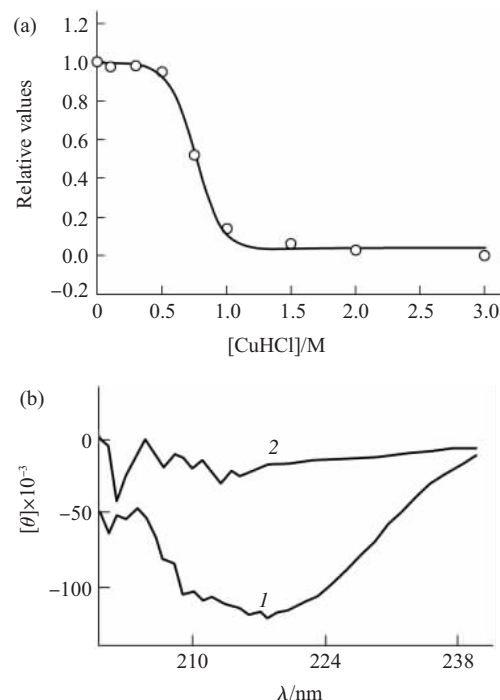


**Fig. 3 Effect of guanidine hydrochloride concentration on the denaturation of TIM by monitoring circular dichroism signal changes at 222 nm**

(b) is circular dichroism spectra of native (curve 1) and denatured (curve 2) TIM. The symbols represent the experimental data. The line is the theoretical curve generated by using equation (4),(7) and (10) with  $m = 22.78 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ,  $\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = 17.60 \text{ kJ/mol}$  and  $[\text{GuHCl}]_{1/2} = 0.87 \text{ M}$ .

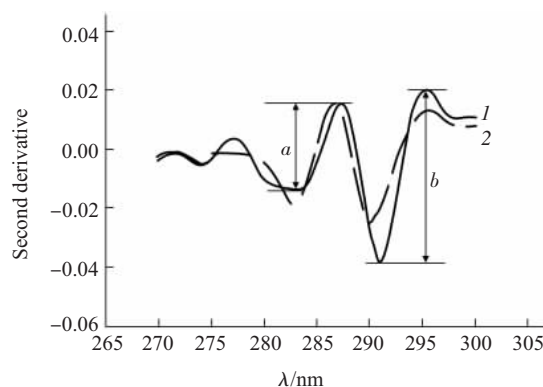


**Fig. 4 Second-derivative spectra of native (curve 1) and denatured (curve 2) TIM**

TIM的两个亚基中各含 4 个 Tyr 和 5 个 Trp 残基. Ragone 等<sup>[16]</sup>对于既含 Tyr 又含 Trp 的蛋白质二阶导数谱做了详细的研究,他们通过对含有不同比例的 Tyr 和 Trp 的模型化合物,在不同极性的溶剂中紫外吸收二阶导数谱的比较研究,发现对于含 Tyr 和 Trp 的蛋白质,其 Tyr 的暴露程度能用 283 nm 和 287 nm 之间的距离  $a$  与 290.5 nm 和 295 nm 之间的距离  $b$  之比 ( $r$  值) 来定量估算. 同时也能利用  $r$  值的变化来跟踪此蛋白质在变性过程中 Tyr 暴露程度的变化<sup>[17]</sup>.

$$r = \frac{a}{b}$$

表 2 列出了 TIM 变性过程中  $r$  值随盐酸胍浓度的变化关系. 从 TIM 的晶体结构可以知道, 每个亚基的 4 个 Tyr 残基中, 有两个暴露在表面, 另外两个包埋在蛋白质的内部<sup>[3]</sup>. 这与我们测出的天然态 TIM  $r$  值为 0.54 的结果非常吻合. 完全变性态的  $r$  值为 0.95, 说明 TIM 处于变性终态时, 结构松散, 两个包埋在内部的 Tyr 也完全暴露出来. Tyr 残基的暴露对盐酸胍浓度的依赖关系也是高度协同的二态过程.

**Table 2** Effect of guanidine hydrochloride concentration on the  $r$  value which calculated from the second derivative spectra of TIM

| [GuHCl]/M | $r$  |
|-----------|------|
| 0         | 0.54 |
| 0.3       | 0.56 |
| 0.5       | 0.56 |
| 0.75      | 0.59 |
| 0.8       | 0.62 |
| 0.85      | 0.81 |
| 0.9       | 0.86 |
| 1.0       | 0.90 |
| 1.5       | 0.92 |
| 2.0       | 0.94 |
| 3.0       | 0.95 |

2.4 TIM 的热变性

**2.4.1** 天然态 TIM 的热变性过程. TIM 的结构比较稳定, 加热到 55℃ 时二级结构才开始变化, 去折叠的陡变区发生在 60~70℃, 高于 70℃ 达完全变性. 在 222 nm 处的椭圆度值随温度增加的相对变化也是高度协同的二态过程(图 5, 曲线 1), 也可以用方法中所述方程进行拟合, 得到的相应热力学参数见表 3.

**2.4.2** 低浓度盐酸胍对 TIM 热稳定性的影响.

前面的结果表明, 在低浓度盐酸胍 (0.1~0.5 mol/L) 的作用下, 用内源荧光和圆二色光谱的方法均监测不到 TIM 构象的明显变化(图 2 和图 3), 我们进一步研究了在低浓度盐酸胍存在下 TIM 的热变性过程, 发现低浓度盐酸胍使 TIM 的热稳定性明显降低(图 5, 曲线 2~5). 随盐酸胍浓度的增加, 其热变性的  $T_m$ ,  $m$  和  $\Delta G(H_2O)$ , 以及变性开始的温度 ( $T_1$ ) 和达到完全变性的温度 ( $T_2$ ) 均降低(表 3), 这表明, 低浓度盐酸胍的存在, 虽然

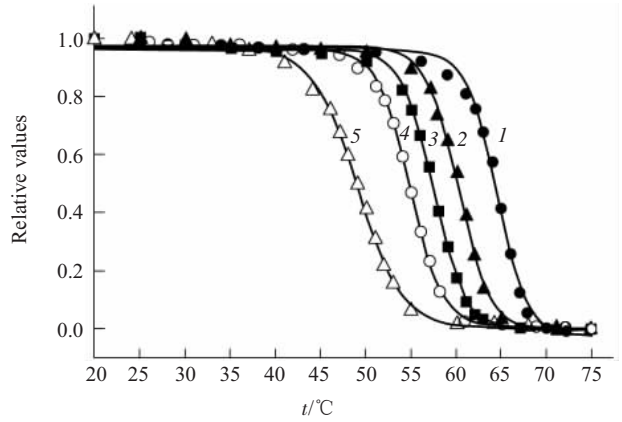


**Fig. 5** Thermal denaturation of TIM induced in different guanidine hydrochloride concentrations by monitoring circular dichroism signal changes at 222 nm

Guanidine hydrochloride concentrations are: 0 mol/L (curve 1); 0.1 mol/L (curve 2); 0.2 mol/L (curve 3); 0.3 mol/L (curve 4); 0.5 mol/L (curve 5), respectively. The symbols represent the experimental data. The lines are the theoretical curves generated by using equation (4),(7) and (10) respectively.

**Table 3** Effect of guanidine hydrochloride on the thermodynamic stability of TIM

| [GuHCl]/M | $m/(kJ \cdot mol^{-1} \cdot ^\circ C^{-1})$ | $\Delta G(H_2O)/(kJ \cdot mol^{-1})$ | $T_1/^\circ C$ | $T_m/^\circ C$ | $T_2/^\circ C$ |
|-----------|---------------------------------------------|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| 0         | 1.46                                        | 94.5                                 | 55             | 64.6           | 70             |
| 0.1       | 1.37                                        | 82.9                                 | 52             | 60.3           | 65             |
| 0.2       | 1.36                                        | 78.5                                 | 50             | 57.5           | 62             |
| 0.3       | 1.32                                        | 72.3                                 | 48             | 54.9           | 60             |
| 0.5       | 0.98                                        | 48.0                                 | 40             | 49.1           | 56             |

在使用的实验条件下没有观察到 TIM 分子三级结构、二级结构的明显变化, 但已明显降低了其热稳定性. 图 6 为热变性过程中的自由能变化与盐酸胍浓度的关系. 在一定的变性剂浓度范围内, 去折叠的自由能变化与变性剂的浓度呈线性关系<sup>[13]</sup>, 表明变化是渐进的, 没有观察到二体的解离.

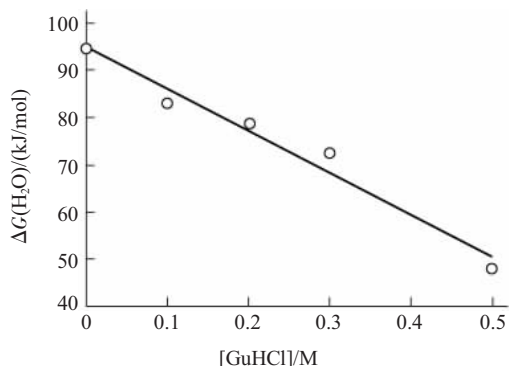


Fig. 6 Effect of guanidine hydrochloride concentration on the free energy of TIM during thermal denaturation

### 3 讨 论

#### 3.1 TIM 去折叠过程中二级结构与三级结构的变化是同时发生的

在研究蛋白质去折叠时, 通常跟踪蛋白质内源荧光和圆二色光谱(CD)在变性过程中的变化. 因为内源荧光的变化主要反映芳香族氨基酸从内埋转变为暴露的环境变化, 即蛋白质三级结构的变化, 圆二色光谱的变化代表蛋白质二级结构的变化. 如果蛋白质三级结构的变化与二级结构的变化不是同步发生的, 以内源荧光监测得到变性曲线上的陡变区与以 CD 监测得到的二级结构变化或其他指标监测的构象变化会出现差别, 使其变性 50% 所需的变性剂浓度  $D_{1/2}$  值不同<sup>[8]</sup>. TIM 的每个亚基含有 4 个 Tyr 和 5 个 Trp 残基, 其二级结构富含  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠结构. 我们分别应用内源荧光和圆二色光谱监测 TIM 被盐酸胍变性的过程, 得到的变性曲线完全一致, 可以重合在一起, 获得的热力学参数也基本一致(图 2, 3 和表 1). 这表明, 在使用的实验条件下, TIM 去折叠过程中其二级结构与三级结构的变化是同时发生的高度协同的过程.

#### 3.2 TIM 的去折叠遵循观察不到二体解离的二态过程

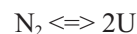
二体蛋白质的去折叠过程比较复杂, 已发现许多二体球蛋白质的去折叠过程表现上是二态的, 也有一些存在稳定的折叠中间态, Neet 等<sup>[19]</sup>对二体蛋

白质的构象稳定性进行了详细的研究. TIM 是由两个相同的亚基组成的双体蛋白质, 其变性过程应该包括亚基的解离和肽链的伸展. 因此, 它可能是经过一个二体中间体的三态去折叠过程, 即在变性的溶液中存在蛋白质的天然态二聚体( $N_2$ )、二体中间体( $I_2$ )或单体折叠中间体( $I$ )和去折叠的单体( $U$ )之间的平衡:



如果 TIM 的去折叠遵循这个过程, 在被盐酸胍变性的曲线上应该出现由  $N_2 \rightleftharpoons I_2$  和由  $I_2 \rightleftharpoons 2U$  的两个 transition 过程, 且  $I_2 \rightleftharpoons 2U$  或  $N_2 \rightleftharpoons 2I$  的过程是蛋白质浓度依赖的<sup>[20,21]</sup>. 但是, 我们的实验结果表明, TIM 的去折叠过程中, 只有一个 transition, 没有观察到折叠中间态, 且蛋白质浓度降低到原浓度的 10%, 得到的变性曲线基本重合. 因此, 在我们的实验条件下, TIM 的去折叠不是按这个过程进行的.

另外, 如果应用各种结构探针监测蛋白质的变性过程, 都只观察到一个去折叠 transition 过程, 则基本上表明该蛋白质的去折叠和解离是同时发生的, 不存在折叠中间态, 即只有天然二体和完全去折叠的单体处于平衡中:



如果 TIM 的去折叠遵循这个过程, 在其变性曲线上应该观察到对蛋白质浓度的依赖<sup>[22,23]</sup>. 但是在本研究中我们采用的所有监测方法(包括内源荧光光谱、圆二色光谱、紫外吸收二阶导数谱)测得的变性曲线, 都只观察到一个 transition, 而且用不同方法测得的去折叠变化曲线都可以重合在一起, 表明观察到的去折叠过程不包括二体解离引起的变化, 所以也不符合这个机制.

虽然我们得到的实验数据可以用单分子二态模型进行拟合, 但实际上 TIM 的去折叠应该是从二体开始的过程. 因此它可能是通过如下所示观察不到二体解离的二态过程进行的:



在此模型中,  $D_2$  代表变性的二体中间体,  $N'$  代表一个类天然单体的状态, 括号内的变化是伴随发生的, 不引起所监测信号的变化. 换句话说, 我们监测到的变化是  $N_2 \rightleftharpoons D_2$  的变化或  $2N' \rightleftharpoons 2U$  的变化, 所以没有观察到对蛋白质浓度的依赖关系. 这种情况与我们的实验结果符合. 因此, 在使用的实验条件下, TIM 的去折叠是按观察不到二体解离的二态过程进行的<sup>[24]</sup>.

二体蛋白质的构象稳定能, 由其大小及亚基间相互作用性质决定<sup>[20]</sup>. 野生型 TIM 的二体间通过 loop 相互作用, 其 70~80 位氨基酸形成的 loop, 绕相邻亚基的第 14 位甲硫氨酸残基形成处于亚基界面边缘的疏水口袋, 主要通过主链与主链、主链与带电侧链、主链与不带电荷侧链间氢键的相互作用, 使亚基界面占所接触残基的比例高达 84%, 所以其二体结构相当稳定<sup>[34]</sup>. Borchert 等<sup>[25]</sup>通过对其亚基界面的 loop3 进行突变, 得到了稳定的单体 TIM, 但其性质发生了很大的变化, 丧失了催化活性. 表明在 TIM 二体界面上的刚性 loop 结构是其催化活性所必需的.

### 参 考 文 献

- Eber S W, Pekrun A, Bardosi A, *et al.* Triosephosphate isomerase deficiency: haemolytic anaemia, myopathy with altered mitochondria and mental retardation due to a new variant with accelerated enzyme catabolism and diminished specific activity. *Eur J Pediatr*, 1991, **150** (11): 761~766
- Oláh J, Orosz F, Keserü G M, *et al.* Triosephosphate isomerase deficiency: a neurodegenerative misfolding disease. *Biochemical Society Transactions*, 2002, **30** (2): 30~38
- Banner D W, Bloomer A D, Petsko G A, *et al.* Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature*, 1975, **255**: 609~614
- Miller S. The structure of interfaces between subunits of dimeric and tetrameric proteins. *Protein Engineering*, 1989, **3**: 77~83
- Rietveld A W M and Ferreira S T. Deterministic pressure dissociation and unfolding of triose phosphate isomerase: persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry*, 1996, **35**: 7743~7751
- Rietveld A W M, Ferreira S T. Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of triose phosphate isomerase: the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry*, 1998, **37**: 933~937
- Moreau V H, Rietveld A W M, Ferreira S T. Persistent conformational heterogeneity of triose phosphate isomerase: separation and characterization of conformational isomerase in solution. *Biochemistry*, 2003, **42**: 14831~14837
- Chávez-Cárdenas M E, Pérez-Hernández G, Sánchez-Rebollar B G, *et al.* Reversible equilibrium of triose phosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry*, 2005, **44**: 10883~10892
- McVittie J D, Esnouf M P, Peacocke A R. The denaturation-renaturation of chicken-muscle triose phosphate isomerase in guanidinium hydrochloride. *Eur J Biochem*, 1977, **81**: 307~315
- McVittie J D, Esnouf M P, Peacocke A R. The preparation and properties of triosephosphate isomerase from chicken muscle and a comparison with that from rabbit muscle. *Eur J Biochem*, 1972, **29**: 67~73
- Putman S J, Coulson A F W, Farley I R, *et al.* Specificity and kinetics of triose phosphate isomerase from chicken muscle. *Biochem J*, 1972, **129**: 301~310
- Esnouf M P, Harros R P, McVittie J D. Triosephosphate isomerase from chicken and rabbit muscle. *Methods in Enzymology*, 1989, **89**: 579~583
- Pace C N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods in Enzymology*, 1986, **131**: 266~280
- Tanford C. Protein denaturation. *Adv Protein Chem*, 1968, **23**: 121~282
- 邹承鲁, 周筠梅, 周海梦. 酶活性部位的柔性. 山东: 山东科学技术出版社, 2004. 126~127
- TSOU Chen-Lu, Zhou J M, Zhou H M. Flexibility of Enzyme Active Sites. Shandong: Shandong Science and Technology Press, 2004. 126~127
- Ragone R, Colonna G, Balestrieri C L, *et al.* Determination of tyrosine exposure in proteins by second derivative spectroscopy. *Biochemistry*, 1984, **23**: 1871~1875
- 邹承鲁, 周筠梅, 周海梦. 酶活性部位的柔性. 山东: 山东科学技术出版社, 2004. 122~125
- TSOU Chen-Lu, Zhou J M, Zhou H M. Flexibility of Enzyme Active Sites. Shandong: Shandong Science and Technology Press, 2004. 122~125
- Yao Q Z, Tian M, Liang S J, *et al.* Changes in circular dichroism and exposure of buried thiol groups during denaturation of rabbit muscle creatine kinase. *Science in China*, 1985, **28B**: 484~493
- Neet K E, Timm D E. Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein Science*, 1994, **3**: 2167~2174
- Clark A C, Sinclair J F, Baldwin T O. Folding of bacterial luciferase involves a non-native heterodimeric intermediate in equilibrium with the native enzyme and the unfolded subunits. *J Biol Chem*, 1993, **268** (15): 10773~10779
- Gross M, Lustig A, Wallimann T, *et al.* Multiple-state equilibrium unfolding of guanidine kinases. *Biochemistry*, 1995, **34**: 10350~10357
- Timm D E, de Haseth P L, Neet K E. Comparative equilibrium denaturation studies of the neurotrophins: nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin 3, and neurotrophin 4/5. *Biochemistry*, 1994, **33** (15): 4667~4676
- Robinson C R, Rentzeperis D, Silva J L, *et al.* Formation of a denatured dimer limits the thermal stability of Arc repressor. *J Biol Chem*, 1997, **273**: 692~700
- Zhu L, Zhang X J, Wang L Y, *et al.* Relationship between stability of folding intermediates and amyloid formation for the yeast prion protein Ure2p: A quantitative analysis of the effects of pH and buffer system. *J Mol Biol*, 2003, **328**: 235~254
- Borchert T V, Kishan K V, Zeelen J P, *et al.* Three new crystal structures of point mutation variants of monoTIM conformational flexibility of loop-1, loop-4 and loop-8. *Structure*, 1995, **3** (7): 669~679

## Folding and Conformation Stability of Triose Phosphate Isomerase

LIU Jiang-Hong<sup>1,2)</sup>, SHI Yi<sup>1,2)</sup>, ZHOU Jun-Mei<sup>1)</sup>\*

<sup>1)</sup>National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

<sup>2)</sup>Graduate University of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** Triose phosphate isomerase (TIM) was prepared and purified from chicken breast muscle. The equilibrium unfolding of TIM induced by guanidine hydrochloride was investigated by following the changes in intrinsic fluorescence, circular dichroism and second-derivative spectroscopy. Results show that the unfolding of TIM is highly cooperative and no folding intermediate was detected in the experimental conditions used. The thermodynamic parameters of TIM during guanidine denaturation were calculated according to a two-state unimolecular unfolding model. Thermal denaturation of TIM monitored by CD at 222 nm shows also a single, cooperative transition with an apparent  $T_m$  of 64.6°C and the thermal stability of TIM was decreased in the presence of low concentrations of guanidine. The possible unfolding pathway of the dimeric TIM was discussed. It shows that the secondary and tertiary structural changes of TIM occur simultaneously during guanidine denaturation and the unfolding of dimeric TIM follows an apparent two-state transition without detectable dissociation model.

**Key words** triose phosphate isomerase (TIM), denaturation, conformational change, folding intermediate, two-state transition model

---

\*Corresponding author . Tel: 86-10-64889859, E-mail: zhoujm@sun5.ibp.ac.cn

Received: February 14, 2006 Accepted: March 28, 2006