

拥挤环境对碱性磷酸酶去折叠过程的影响作用研究^{*}李坤义 李 森[†]

(北京师范大学生命科学学院, 北京师范大学生命科学与技术国家级实验教学示范中心, 100875, 北京)

摘要 为了更好地模拟细胞内的真实环境, 在碱性磷酸酶的变性环境中分别加入小分子渗透剂(蔗糖)和大分子拥挤试剂(葡聚糖), 创造拥挤环境, 利用酶活力测定和荧光光谱等方法, 研究该拥挤环境对碱性磷酸酶稳定性的影响作用。实验结果表明: 在碱性磷酸酶由盐酸胍导致的变性过程中, 蔗糖与葡聚糖可抑制碱性磷酸酶活力的丧失, 随着蔗糖与葡聚糖的质量浓度增加, 其抑制效果随之增强; 荧光光谱的检测结果表明蔗糖和葡聚糖对碱性磷酸酶的去折叠具有一定的抑制作用。在 2 种试剂中, 蔗糖对碱性磷酸酶活力与构象稳定性的保护能力要强于葡聚糖。

关键词 大分子拥挤试剂; 渗透剂; 碱性磷酸酶; 蛋白质稳定性

中图分类号 Q518.4; Q556

DOI: 10.12202/j.0476-0301.2020408

对蛋白质折叠与去折叠问题的研究是当前生物学的研究前沿之一, 对其相关机制的研究有助于揭示蛋白质结构与功能的奥秘, 阐明阿尔兹海默症、帕金森症、疯牛病等蛋白质折叠相关疾病的发病机制, 寻找有效的治疗方法^[1-2]。

生物学研究包括体外研究和体内研究, 以往对于蛋白质折叠与去折叠的研究主要以体外研究为主。但是长期以来, 这些体外研究都是在一些体系单一的稀溶液中进行, 这种实验环境与细胞内的真实环境有很大差异。细胞内存在着各种小分子与大分子物质, 小分子物质包括单糖、寡糖、游离的氨基酸、脂肪酸、核苷酸等, 大分子物质包括多糖、蛋白质和核酸等。小分子一般被称为“渗透剂”, 而大分子则被命名为“大分子拥挤试剂”, 这些物质占据着相当大的细胞空间, 使得细胞内的环境变得非常拥挤^[3-9]。

认识到细胞内的真实拥挤环境之后, 研究者们开始有意识地使用葡聚糖、聚蔗糖等大相对分子质量物质作为大分子拥挤试剂, 加入蛋白质的体外研究体系, 研究在这样的拥挤环境中, 一些蛋白质的折叠或去折叠过程^[10-13]。部分研究者研究了蔗糖、甘油等小分子渗透剂对蛋白质折叠或去折叠的影响作用^[14-15]。已有的这些研究并没有同时使用大分子拥挤试剂与小分子渗透剂, 研究它们对同一种蛋白质的影响作用。鉴于此, 我们分别选用了一种大分子拥挤试剂和一种小分子渗透剂, 探究其对碱性磷酸酶的去折叠过

程及其结构稳定性的影响作用。在实验中同时使用大分子拥挤试剂和小分子渗透剂, 可以更好地模拟细胞内部的真实环境, 由此出发所得到的研究成果, 能够较好地再现细胞内的真实生化过程。

本实验选用的蛋白质为碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, 简称 AKP, EC 3.1.3.1), 是动植物和微生物体内广泛存在的一类高度保守的磷酸水解酶^[16], 也是研究蛋白质折叠的良好模型^[17]。选用的小分子渗透剂为蔗糖, 大分子拥挤试剂为葡聚糖(dextran 70, 平均相对分子质量为 70 000)。

1 材料与方法

1.1 材料 碱性磷酸酶由含重组质粒 AKP-pET-21a 的宿主菌 *E.coli* K12 表达产生, 经热处理与离子交换层析纯化后, 由 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定, 具有较高的纯度。Tris(三羟甲基氨基甲烷)、dextran 70、蔗糖和盐酸胍购自 Sigma 公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 碱性磷酸酶活力测定 配制底物溶液(50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, 0.2 g · L⁻¹ BSA, 2 mmol · L⁻¹ MgAc₂, 10 mmol · L⁻¹ pNPP, pH 8.5), 将 40 μL 酶溶液加入 360 μL 底物溶液, 混合均匀后, 30 °C 反应 10 min, 加入 3.6 mL 反应终止液(0.2 mol · L⁻¹ Na₃PO₄, 5 mmol · L⁻¹ EDTA), 混合均匀后, 用 GBC U/V 双光束分光光度计测定样品在 410 nm 处的吸光度 A_{410} , 样品

^{*} 国家自然科学基金资助项目(32071222); 北京市教育委员会共建基金资助项目

[†] 通信作者: 李森(1973—), 男, 博士, 教授。研究方向: 蛋白质的结构与功能。E-mail: lisen@bnu.edu.cn

收稿日期: 2020-12-15

的酶活力计算式为

$$U_A = \frac{A_{410}}{0.04375}$$

1.3 在不同拥挤环境中, 检测碱性磷酸酶去折叠过程中酶活力的变化 在含有不同质量浓度蔗糖和葡聚糖的实验体系中, 使用高浓度盐酸胍对碱性磷酸酶进行变性处理, 每隔一定的时间, 检测碱性磷酸酶在去折叠过程中酶活力的动态变化. 将相同浓度的天然酶的活性设定为 100%, 测算出碱性磷酸酶在去折叠过程中的剩余活力. 以变性时间为横坐标, 剩余活力为纵坐标绘制碱性磷酸酶去折叠过程的活力变化曲线, 分析不同拥挤试剂对碱性磷酸酶活力变化的影响作用.

1.4 在不同拥挤环境中, 检测碱性磷酸酶去折叠过程中构象的变化 在含有不同质量浓度蔗糖和葡聚糖的实验体系中, 使用高浓度盐酸胍对碱性磷酸酶进行变性处理 1 h 后, 使用 Fluoromax-4 荧光光谱仪测定其内源荧光发射谱(激发波长为 280 nm, 扫描波长为 300~400 nm), 以葡聚糖或蔗糖质量浓度作为横坐标, 以荧光发射谱中最大吸收值所对应的波长作为纵坐标绘制曲线, 分析不同拥挤试剂对碱性磷酸酶构象变化的影响作用.

2 结果

2.1 碱性磷酸酶去折叠过程中, 不同拥挤试剂对其活性的影响作用 碱性磷酸酶在含有 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸胍以及不同质量浓度葡聚糖(0、100、150、200 和 $300 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)的体系中变性, 定时检测其活力的变化, 实验结果如图 1 所示.

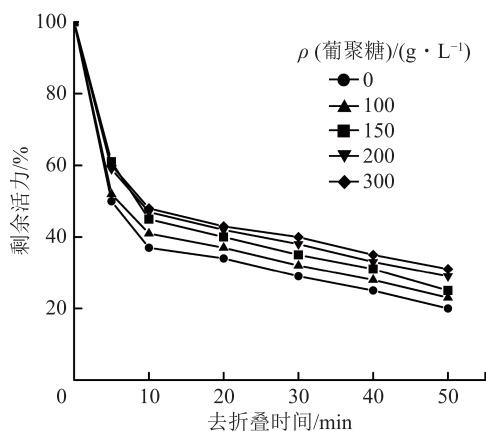


图 1 不同质量浓度的葡聚糖对 AKP 盐酸胍变性过程活力变化的影响作用

图 1 的结果表明, 碱性磷酸酶在含有葡聚糖的拥挤体系中变性时, 大分子拥挤试剂葡聚糖对碱性磷酸

酶因盐酸胍导致的变性具有一定的抑制作用, 并且葡聚糖质量浓度越高, 其抑制作用越显著.

我们继续研究小分子渗透剂的作用, 将碱性磷酸酶在含有 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸胍以及不同质量浓度蔗糖(0、100、150、200 和 $300 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)的体系中变性, 定时检测其活力的变化, 实验结果如图 2 所示.

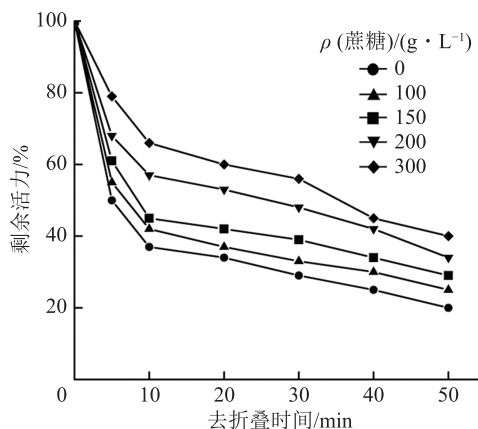


图 2 不同质量浓度的蔗糖对 AKP 盐酸胍变性过程活力变化的影响作用

图 2 的结果表明, 小分子渗透剂蔗糖对碱性磷酸酶的变性同样具有一定的抑制作用, 蔗糖质量浓度越高, 其抑制的效果越明显. 与葡聚糖相比, 对同样质量浓度的蔗糖的抑制作用更强.

用盐酸胍处理相同时间(50 min)后, 比较分别处于不同质量浓度的葡聚糖溶液与蔗糖溶液中的碱性磷酸酶的剩余活力, 结果如图 3 所示.

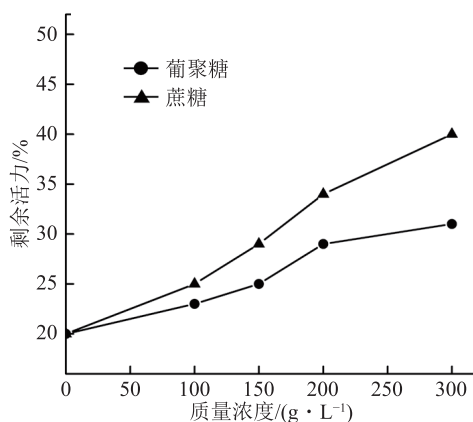
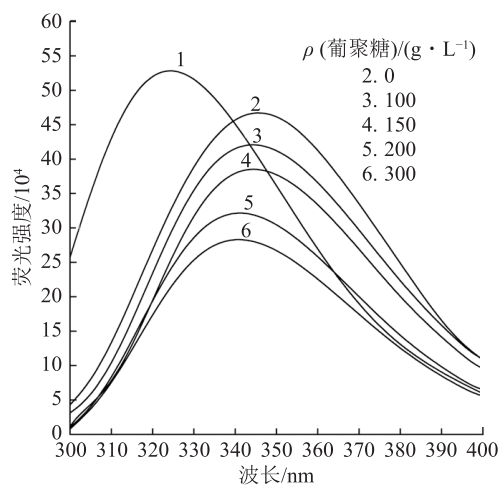


图 3 不同质量浓度的葡聚糖与蔗糖对 AKP 盐酸胍变性过程活力变化的影响作用比较

图 3 直观地表明, 小分子渗透剂蔗糖相比于相同质量浓度的大分子拥挤试剂葡聚糖, 具有更强的抑制碱性磷酸酶变性的能力.

2.2 碱性磷酸酶去折叠过程中, 不同拥挤试剂对其构象变化的影响作用 碱性磷酸酶在含有 $4.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

盐酸胍以及不同质量浓度葡聚糖(0、100、150、200和 $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)的体系中变性,1 h后检测其荧光光谱,实验结果如图4所示。



曲线1为天然酶的荧光光谱,
曲线2~6为变性酶的荧光光谱。

图4 不同质量浓度的葡聚糖对AKP
盐酸胍变性过程构象变化的影响作用

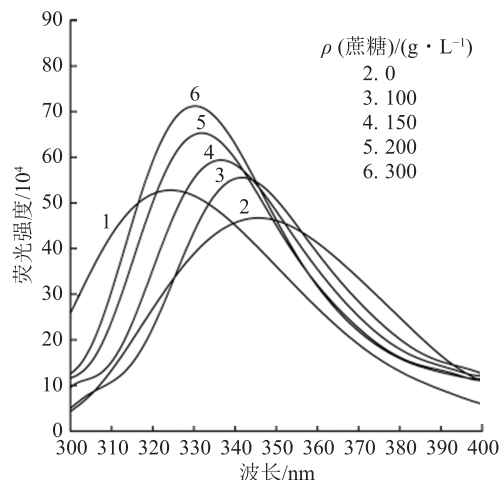
图4中结果显示,天然酶(曲线1)荧光光谱中最大吸收峰所对应的波长为325 nm,在盐酸胍溶液中变性1 h后,变性酶(曲线2)的最大吸收峰所对应的波长红移为346 nm,表明碱性磷酸酶发生了显著的构象变化。在含有一定质量浓度的葡聚糖溶液体系中,碱性磷酸酶的最大吸收峰所对应的波长与变性酶相比,发生一定程度的蓝移,葡聚糖质量浓度越高,蓝移程度越大,在 $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡聚糖溶液中,变性酶的最大吸收峰蓝移至340 nm。这表明葡聚糖对碱性磷酸酶在去折叠过程中的构象变化有一定的抑制作用,且葡聚糖质量浓度越高,抑制作用越强。

进一步研究了小分子渗透剂蔗糖的作用,将碱性磷酸酶在含有 $4.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸胍以及不同质量浓度蔗糖(0、100、150、200和 $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)的体系中变性,1 h后检测其荧光光谱,实验结果如图5所示。

图5的结果表明,小分子渗透剂蔗糖对碱性磷酸酶去折叠过程构象的变化同样有抑制作用,且与葡聚糖相比,同样质量浓度的蔗糖的抑制作用更加显著,导致变性酶的最大吸收峰的蓝移程度增强。

经盐酸胍处理后,比较分别处于不同质量浓度的葡聚糖溶液与蔗糖溶液中的碱性磷酸酶荧光光谱曲线最大吸收峰的波长变化情况,结果如图6所示。

图6中的结果进一步表明,小分子渗透剂蔗糖相比于大分子拥挤试剂葡聚糖,具有更强的抑制碱性磷酸酶在去折叠过程中发生构象变化的能力。



曲线1为天然酶的荧光光谱,
曲线2~6为变性酶的荧光光谱。

图5 不同质量浓度的蔗糖对AKP
盐酸胍变性过程构象变化的影响作用

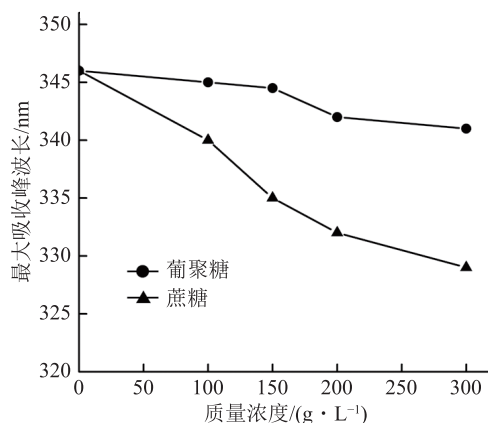


图6 不同质量浓度的葡聚糖与蔗糖对AKP
盐酸胍变性过程构象变化的影响作用比较

2.3 碱性磷酸酶去折叠过程中,混合拥挤体系对其活力与构象变化的影响作用 在研究每一种拥挤试剂对碱性磷酸酶去折叠过程的影响作用的基础上,采用2种方法,以获得混合拥挤体系,模拟细胞内的真实环境,并研究其对碱性磷酸酶去折叠过程的影响作用。第1种方法是固定葡聚糖的质量浓度($200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),逐步提高在盐酸胍变性体系中添加的蔗糖的质量浓度;第2种方法是固定蔗糖的质量浓度($200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),逐步提高添加的葡聚糖的质量浓度。对应每一种方法,均在混合拥挤体系中,使用 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸胍处理碱性磷酸酶,50 min后测定其剩余活力,对另一份酶样品使用 $4.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸胍进行处理,1 h后测定其荧光光谱曲线最大吸收峰波长,结果如图7所示。

图7表明,在含有 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡聚糖的体系中混合蔗糖时,葡聚糖与蔗糖对碱性磷酸酶去折叠的抑制作用是可叠加的,而且随着蔗糖质量浓度的提高,

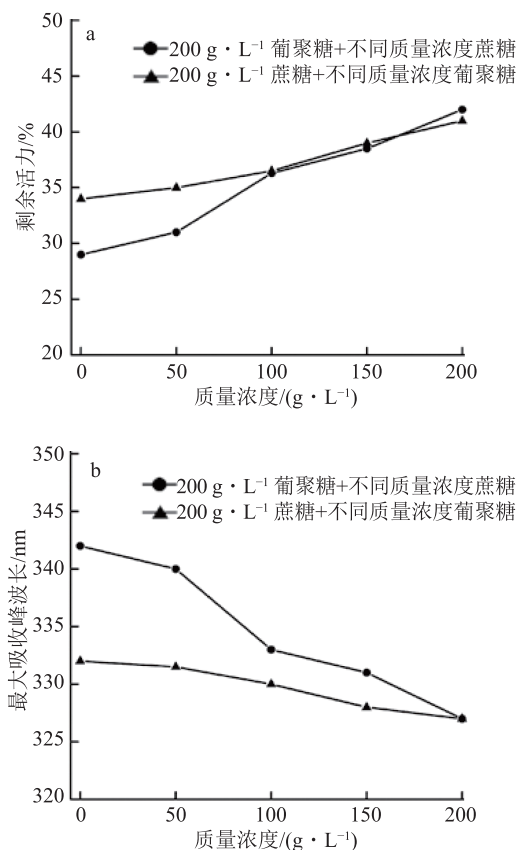


图 7 葡聚糖与蔗糖组成的混合拥挤体系对 AKP 盐酸胍变性过程活力(a)与构象变化(b)的影响作用

2 种拥挤试剂叠加后的抑制作用随之增强. 在含有 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的体系中混合葡聚糖时, 二者的作用同样可以叠加, 但叠加后的抑制作用增强的幅度较低.

3 结论与讨论

本实验研究结果表明, 大分子拥挤试剂(葡聚糖)和小分子渗透剂(蔗糖)都可以提高碱性磷酸酶的稳定性, 抑制该酶在变性剂作用下的去折叠. 在碱性磷酸酶的盐酸胍变性过程中, 小分子渗透剂(蔗糖)可以显著地增强碱性磷酸酶的活力与构象的稳定性, 而大分子拥挤试剂(葡聚糖)与相同质量浓度的蔗糖相比, 其保护碱性磷酸酶的作用更弱一些. 在此基础上, 进一步研究了由不同质量浓度的葡聚糖与蔗糖组成的混合拥挤体系对碱性磷酸酶盐酸胍变性的影响作用, 发现葡聚糖与蔗糖的保护作用是可叠加的, 当盐酸胍变性体系中同时存在葡聚糖和蔗糖时, 提高蔗糖的质量浓度, 可进一步阻止碱性磷酸酶构象的改变与活力的下降; 提高葡聚糖的质量浓度时, 混合拥挤体系对酶构象与活力的保护作用也有一定程度的提高.

科学家们提出了“排斥容积效应”(excluded volume effect)理论, 解释大分子拥挤试剂对蛋白质结

构与功能的影响作用. 这是一种由于空间排斥而引起的非特异性效应, 根据该理论, 细胞中的很大一部分空间被大分子占据, 这些被占据的空间不能被其他分子利用, 从而使每一个大分子的实际可及空间大为减少, 导致包括蛋白质折叠在内的多种分子内和分子间作用受到影响. 这一理论得到许多实验证据的支持, 并不断得以完善^[18-19]. 葡聚糖是一种以葡萄糖为单体聚合而成的大分子多糖类物质, 具有多种螺旋结构^[20], 其主要通过排斥容积效应促使蛋白质的结构变化往形成具有更小体积的天然构象的方向进行, 从而起到增加蛋白质稳定性, 抑制去折叠的作用.

对于小分子渗透剂蔗糖来说, 其同样具有排斥容积效应, 此外蔗糖分子在水溶液中均匀分布, 分子之间空隙小, 除了排斥容积效应之外, 还具有黏度效应^[21]. 这一黏度效应可以很好地稳定碱性磷酸酶的结构, 抑制其变性过程中活力和构象的改变. 此外当蛋白质溶液中加入盐酸胍后, 盐酸胍会破坏蛋白质分子周围的有序水分子结构, 而蔗糖可以减弱盐酸胍的这一作用, 从而间接稳定碱性磷酸酶的结构^[8]. 可以看出蔗糖对碱性磷酸酶去折叠的保护是一个综合效应, 多种因素导致其保护作用比相同质量浓度的葡聚糖更强.

由于葡聚糖是大分子, 具有交联网状结构, 蔗糖是小分子, 可以填充葡聚糖大分子之间的空隙, 二者在水溶液中不会相互干扰, 因此二者的混合可以加强对碱性磷酸酶结构与活力的保护作用, 不会因相互干扰而削弱整体的效果.

已有的研究发现, 不同的拥挤试剂保护蛋白质的能力不同^[22-23], 本次研究结果表明蔗糖保护碱性磷酸酶的能力比葡聚糖更强, 同时我们发现葡聚糖与蔗糖对该酶的保护作用具有彼此叠加的特点, 这进一步提示我们可以充分利用拥挤试剂的特点以及蛋白质去折叠的机制, 设计出在体外保存蛋白质的最优方案. 另一方面, 在细胞内拥挤的体系中, 很多生理反应(如蛋白质的折叠与去折叠、酶的催化作用、生物分子的组装与聚合等)都会受到其所处拥挤环境的影响^[24], 所以在体外研究蛋白质的结构与功能时, 在研究体系中加入拥挤试剂以模拟细胞内的真实环境是一大发展趋势.

4 参考文献

- [1] DILL K A, OZKAN S B, WEIKL T R, et al. The protein folding problem: when will it be solved[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2007, 17(3): 342
- [2] DILL K A, MACCALLUM J L. The protein-folding problem, 50 years on[J]. *Science*, 2012, 338(6110): 1042
- [3] CHEBOTAREVA N A, KURGANOV B I, LIVANOVA N

- B. Biochemical effects of molecular crowding[J]. Biochemistry (Moscow), 2004, 69(11): 1239
- [4] MA Q, FAN J B, ZHOU Z, et al. The contrasting effect of macromolecular crowding on amyloid fibril formation[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e36288
- [5] CHRISTIANSEN A, WANG Q, CHEUNG M S, et al. Effects of macromolecular crowding agents on protein folding in vitro and in silico[J]. Biophysical Reviews, 2013, 5(2): 137
- [6] 闫菡, 郭占云, 冯佑民. 大分子拥挤及其对蛋白质折叠的影响[J]. 陕西医学杂志, 2003, 32(3): 246
- [7] MELO E P, ESTRELA N, LOPES C, et al. Compacting proteins: pros and cons of osmolyte-induced folding[J]. Current Protein & Peptide Science, 2010, 11(8): 744
- [8] SHARMA G S, DAR T A, SINGH L R. Reshaping the protein folding pathway by osmolyte via its effects on the folding intermediates[J]. Current Protein & Peptide Science, 2015, 16(6): 513
- [9] MOJTABAVI S, SAMADI N, FARAMARZI M A. Osmolyte-induced folding and stability of proteins: concepts and characterization[J]. Iranian Journal of Pharmaceutical Research (IJPR), 2019, 18(Sup. 1): 13
- [10] ÁDÉN J, WITTUNG-STAFSHEDE P. Folding of an unfolded protein by macromolecular crowding *in vitro*[J]. Biochemistry, 2014, 53(14): 2271
- [11] 王莉衡, 钦传光, 尚晓娅, 等. 大分子拥挤环境中溶菌酶的去折叠过程[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(9): 187
- [12] ZHU J, HE H W, LI S. Macromolecular crowding enhances thermal stability of rabbit muscle creatine kinase[J]. Tsinghua Science & Technology, 2008, 13(4): 454
- [13] WANG Y J, HE H W, LI S. Effect of Ficoll 70 on thermal stability and structure of creatine kinase[J]. Biochemistry (Moscow), 2010, 75(5): 648
- [14] JETHVA P N, UDGAONKAR J B. The osmolyte TMAO modulates protein folding cooperativity by altering global protein stability[J]. Biochemistry, 2018, 57(40): 5851
- [15] ADAMCZAK B, WIECZÓR M, KOGUT M, et al. Molecular basis of the osmolyte effect on protein stability: a lesson from the mechanical unfolding of lysozyme[J]. Biochemical Journal, 2016, 473(20): 3705
- [16] 何华伟, 王叶菁, 侯丽, 等. 家蚕碱性磷酸酶原核表达纯化、结构与活性分析[J]. 中国农业科学, 2017, 50(14): 2837
- [17] WANG Z J, LEE J, SI Y X, et al. A folding study of Antarctic krill (*Euphausia superba*) alkaline phosphatase using denaturants[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 70: 266
- [18] MINTON A P. Excluded volume as a determinant of macromolecular structure and reactivity[J]. Biopolymers, 1981, 20(10): 2093
- [19] ELLIS R J, MINTON A P. Cell biology: join the crowd[J]. Nature, 2003, 425(6953): 27
- [20] 王森, 丁霄霖. 葡聚糖生物活性与结构的关系[J]. 无锡轻工大学学报, 1997, 16(2): 90
- [21] MUKHERJEE S, WAEGELE M M, CHOWDHURY P, et al. Effect of macromolecular crowding on protein folding dynamics at the secondary structure level[J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 393(1): 227
- [22] DESPA F, ORGILL D P, LEE R C. Molecular crowding effects on protein stability[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005, 1066(1): 54
- [23] MINTON A P. Influence of macromolecular crowding upon the stability and state of association of proteins: Predictions and observations[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005, 94(8): 1668
- [24] ELLIS R J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2001, 26(10): 597

Effect of crowded environment on unfolding of alkaline phosphatase

LI Kunyi LI Sen[†]

(College of Life Sciences, National Demonstration Center for Experimental Life Sciences & Biotechnology Education, Beijing Normal University, 100875, Beijing, China)

Abstract The effect of macromolecular crowding agent dextran 70 and osmolyte sucrose on unfolding of alkaline phosphatase was studied by monitoring changes in enzymatic activity and fluorescence emission spectra. Both dextran 70 and sucrose were found to stabilize the activity and conformation of alkaline phosphatase in GdmCl-induced unfolding. Protection against GdmCl-induced unfolding afforded by sucrose was stronger than by dextran 70.

Keywords macromolecular crowding; osmolyte; alkaline phosphatase; protein stability

【责任编辑: 武 佳】