

蛋白质变性作用研究动向

郭志鲲

(中国科学院上海生物化学研究所)

天然蛋白质在受环境因素作用时,若共价结不构变,而构象发生显著改变,称为变性作用。伴随着变性,蛋白质失去生物功能。因此,变性作用是研究蛋白质结构与功能的一个重要课题。

从上世纪末开始研究蛋白质变性,至今大体经历了三个阶段。第一个阶段以1931年吴宪发表变性理论而告终,这阶段着重现象观察。第二个阶段主要是研究分子形状的改变及反应特征。在这阶段的后期,由于晶体X衍射分析方法测定蛋白质构象技术的逐渐建立,促进了蛋白质构象研究的迅速发展。变性研究也随之从分子形状的研究转入到构象变化的研究。可以认为从六十年代起,蛋白质变性研究进入了第三阶段——构象研究阶段。

关于蛋白质变性的研究资料很多。本文试图从变性反应热力学、动力学、构象转变和变性剂作用原理等几个方面,概括介绍一些最近趋向。

一、变性反应热力学

1. 二态可逆变性反应

变性反应的特征很早就被注意,其中关于可逆性问题*和近来的发展有关。自从 Northrop 首先发现胰蛋白酶热变性是可逆反应后,曾产生过一个疑问,即由变性蛋白质重天然化所生成的再生蛋白质是否完全恢复到天然状态。Anfinsen 等人的实验证明,核糖核酸酶的一级结构决定它的空间结构,这样疑问才完全消失。

随后积累了一些使变性反应作到热力学可逆的经验,例如低蛋白质浓度、反应平衡地进行及蛋白质处于完全变性态的时间尽可能短等。在此基础上,以 Brandis (1969) 和 Tanford (1968) 为首的二组研究者进一步证明,若干蛋白质可逆变性时体系中只存在天然态和完全变性态,不存在稳定的中间态。他们称这些变性反应为二态可逆变性反应。图1是二态可逆变性反应的一个实例。

如果用 N 、 D 分别表示蛋白质的天然态和变性态,二态可逆变性反应可以写成: $N \xrightleftharpoons[1-\alpha]{\alpha} D$ 和 $(1-\alpha)$ 是它们在平衡时的分子比数。由实验测出 $\Delta\epsilon_N$ 、 $\Delta\epsilon_D$

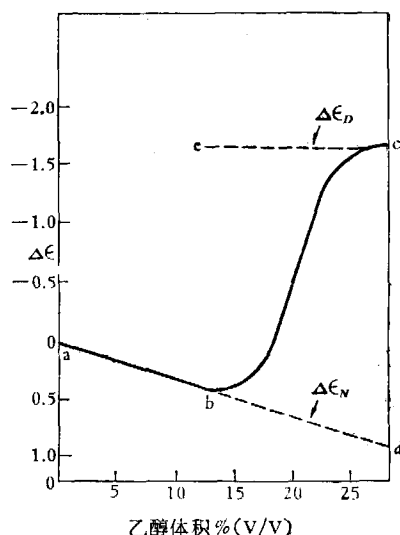


图1 乙醇对胰凝乳蛋白酶原293nm消光系数的影响
条件: 39.1℃, 盐酸化到pH 3.27

(图1 bd 和 ce 区)及 $\Delta\epsilon_0$

$$\Delta\epsilon = (1-\alpha)\Delta\epsilon_D + \alpha\Delta\epsilon_N \quad (1)$$

$$\alpha = \frac{\Delta\epsilon - \Delta\epsilon_D}{\Delta\epsilon_N - \Delta\epsilon_D} \quad (2)$$

平衡常数

$$K_D = \frac{1-\alpha}{\alpha} = \frac{\Delta\epsilon - \Delta\epsilon_N}{\Delta\epsilon_D - \Delta\epsilon} \quad (3)$$

由 K_D 再算出热力学常数。他们还建立了几项标准来检验是否有稳定的中间态。(1) 用几种方法测同一变性过程,若转变曲线重合则属二态。(2) 由转变曲线计算的表观反应焓(即热函) ΔH_{app} 与卡计算直接测量的 ΔH_{cal} 比较,若相同很可能是二态。其它热力学参数也可比较;如比较 $\Delta C_p, app$ 和直接测量 $\Delta C_p, D$, 能更灵敏地鉴别是否属二态。Tsong 等对比了 RNase 的 ΔH_{app} 和 ΔH_{cal} (表1)。

在 pH2.8 以下二者相符;在 2.8 以上随着 pH 的增高,二者差距越来越大,显然这时不属二态。(3) 从滴定曲线测变性态和天然态之间结合质子数差,与根据 K_D

* 资料中可逆性有二种含义。一种是指热力学可逆。另一种是指不论采用何种手段,使变性蛋白质重天然化。

表 1 RNaseA 在各种 pH 值的转变

pH	溶 剂	$T_m^\dagger$ °C	$\Delta H_{cat}(T_m)$ (kcal · mole ⁻¹)	$\Delta H_{app}(T_m)$ (kcal · mole ⁻¹)
0.36	HCl	31.5	61.2	62
1.05	0.1 N NaCl, HCl	29.9	59.0	59
2.02	0.2 N 甘氨酸缓冲液	31.2	65.6	67
2.80	0.2 N 甘氨酸缓冲液	40.6	87.7	68
3.28	0.2 N 甘氨酸缓冲液	45.6	105.0	67
4.04	0.2 N 乙酸缓冲液	52.3	126.0	64
5.00	0.2 N 乙酸缓冲液	57.8	151.0	60
6.23	0.2 N 乙酸缓冲液	60.8	155.5	66
7.00	0.2 N NaCl	61.3	168.0	(88)
7.80	0.2 N NaCl	61.2	178.0	72
				平均 65
				平均误差 ± 3

† T_m 是热变性转变曲线的中点温度。

和氢离子活度 a_{H^+} 求出的质子数差相比, 相同者属二态。(4) 动力学分析以及其它一些标准。根据这些标准, 证明 RNase 静压、盐酸胍、热变性, 胰凝乳蛋白酶原乙醇、静压变性, 核酸酶变性, 溶菌酶酸、热、盐酸胍变性, β -乳球蛋白变性, 肌红蛋白热、醇、酸、盐酸胍变性和原肌球蛋白盐酸胍变性等, 均按二态可逆地进行。Tanford (1968) 和 Brandts (1969) 总结了二态可逆变性反应的热力学特征: (1) 变性平衡常数 K_D 或变性自由能 ΔF° 不是温度的简单函数, 因此推导出蛋白质有一个最稳定的温度 T_0^* 例如 RNase 和胰凝乳蛋白酶原的 T^* 是 0° 和 12°C; β -乳球蛋白变性 T^* 是 35°C; 卵

清蛋白变性 T^* 大约是 22°C (图 2)。高或低于 T^* 蛋白质即处于易变性状况。这点已被证实。

(2) 温度低时变性焓可能是正值也可能为负值; 温度上升时焓也迅速增加。(3) 热容 ΔC_p 较大。(4) 变性熵 ΔS 值高, 但随温度下降甚至可变成负值 (表 2)。

表 2 温度对变性焓值的影响

变 性 体 系	$\Delta S_{Dcal}/deg/mole$			
	0°C	25°C	50°C	75°C
核酸酶热转变, pH2.5	+31	+155	+340	—
胰凝乳蛋白酶原热转变, pH2.5	-81	+105	+360	+680
β -乳球蛋白 5M 脲, pH3	-260	-72	+100	+260

因为 ΔS 一方面反映了天然蛋白构象丧失的熵增加; 另一方面又反映了疏水结构破坏后, 水围绕着这些非极性基团作规则排列, 造成熵的减少。水的这种结构易熔融, 所以温度升高后, ΔS 迅速增加。(5) 变性的体积增量 Δv 为负值。用二态理论处理这类最简单的变性反应基本是成功的, 然而也存在一些问题。例如, 要靠转变曲线两端外延才能测量 K_D , 增加了数据不可靠性; 其次卡计测量所需要的蛋白质浓度往往较高, 妨碍了反应的可逆性。此外, 还有很多变性反应不属二态, 例如原肌球蛋白变性在 34°C 及 54°C 各有一个转变区, 肌肉磷酸化酶 b 脲变性有二个中间态。以 β -乳球蛋白在 25°C pH3.2 下的盐酸胍变性为例, 反应按 $N \rightleftharpoons Y \rightleftharpoons D$ 进行, 式中 N , Y 和 D 分别表示天然、中间和变状态。如它们的分子比数各为 α_n , α_y 和 $(1 - \alpha_n - \alpha_y)$, 单位浓度实验观察值为 $\Delta \epsilon_N$, $\Delta \epsilon_y$ 和 $\Delta \epsilon_D$ 。因为 K_D 仅与 N 和 D 态有关而与过程无关, 所以

$$K_D = \frac{[D]}{[N]} = \frac{1 - \alpha_n - \alpha_y}{\alpha_n}$$

现在实验只能测出 $\Delta \epsilon_N$, $\Delta \epsilon_D$, 及 $\Delta \epsilon (= \alpha_n \Delta \epsilon_N +$

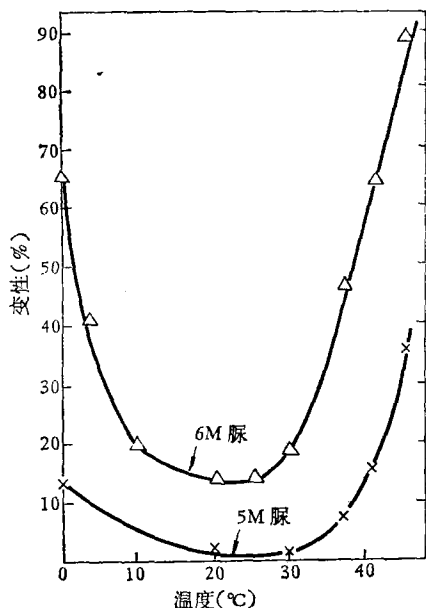


图 2 卵清蛋白脲变性的温度影响

条件: 蛋白浓度 1.5%, pH7.1, 4 小时。

变性指标: 等电点沉淀

$\alpha, \Delta \epsilon, \pm (1 - \alpha_p - \alpha_s) \Delta \epsilon_D$), 所以不能求得 K_D 值。象这些比二态复杂的变性反应, 如何测出热力学参数, 还有待于解决。

2. 变性可逆问题

实际上在所研究过的变性反应中大部分是热力学不可逆的, 并且很多变性蛋白质目前还无法使它们完全重天然化。这些事实促使 Ullmann 等人 (1969) 设想天然蛋白质可分二类。一类处于位能最低状态。另一类处于动力学稳定而热力学不稳定状态。这类蛋白质变性后不能自发折叠成天然蛋白质。例如, 链球菌蛋白酶原经过酶解, N 端切去 100 个残基, 激活成链球菌蛋白酶。酶原经脲、胍、酸和热变性是可逆的, 而链球菌蛋白酶受到同样的变性处理, 则是不可逆的。其它如 RNaseA 羧端切去四肽生成 RNaseP, 它的构象基本和 RNaseA 相似, 但热力学稳定性已大大下降。另外一些蛋白质, 如胰凝乳蛋白酶同样是由前体经酶解生成, 它的变性是可逆的。这很可能是由于链球菌蛋白酶分子没有二硫键, 而胰凝乳蛋白酶有二硫键, 从而使变性分子不能充分伸展以利于折叠。此外, 加入底物或辅基等配体, 往往也有利于变性酶的重天然化。由此可见, 实验条件对变性蛋白质能否重天然化有很大影响。因此, 如果能找到适宜的实验条件, 除去少数由前体经过酶解生成的蛋白质外, 有希望使大多数变性蛋白质完全重天然化。然而, 目前还缺乏迅速找到这些实验条件的理论依据。寻找可逆变性条件之一是为了得到一些热力学参数, 以利于进一步分析。Tanford (1970) 曾尝试了以模型化合物的热力学参数计算蛋白质变性参数, 想由此阐明变性的一些机制。现在虽然还没有得到满意的结果, 但这个方向颇为重要。

二、变性反应动力学

近来在二态转变基础上, 采用快速反应技术, 变性动力学也取得很大进展。Eisenberg 和 Schwert 最早注意到胰凝乳蛋白酶原可逆热变性平衡能在 5 秒钟内迅速改变。后来 Biltonen Lumry 和 Kim 从热力学特征预计变性反应动力学应分二步: 先是分子膨胀; 然后是结构协同区熔融, 即蛋白质分子通过各种相互作用形成的次级键, 这些次级键常常互为依托, 当受到破坏时, 不是个别次级键逐渐断裂, 而是很接近“全或无”的方式崩解, 类似于晶体在熔点附近一个很小的温度范围内融化。Jardetzky 等人 (1971) 首先使用快速反应技术研究链球菌核酸酶可逆变性的重天然化反应过程。他们发现反应分二步: 第一步是快反应, 半时间为 55 毫秒; 第二步是慢反应, 半时间为 350 毫秒。经过分析认为, 反应按 $D \xrightarrow{k_1} X \xrightarrow{k_2} N$ 进行。D、X 和 N 分别是变性、部分折叠和天然态。 k_1 、 k_2 是快慢反应速度常

数。快反应和规则结构(可能是螺旋区)形成有关, 他们称之为核晶作用。第二步可能和蛋白质的疏水区形成有关。Tsong 等也使用类似方法观察 RNaseA 可逆变性, 发现在伸展或重天然化过程中都有动力学上快、慢二阶段反应。而且用 Lys 41 经过二硝基苯变性的 RNaseA 作样品, 同样可以观察到伸展有快、慢二阶段反应, 其速度和未变性的 RNaseA 相似。从而肯定了上述动力学特征是 RNaseA 构象广泛改变的结果。他们进一步又设计了一套伸展动力学模型。但按模型重天然化不应有快反应, 实际上快反应普遍存在, 因此这个模型还不能完全解释实验事实。这种分快、慢二阶段的现象在胰凝乳蛋白酶原 A、鲸肌红蛋白、马心正铁肌红蛋白的变性动力学实验中也观察到。变性反应的快速动力学研究不仅可以提供反应过程的详细情况, 而且有助于了解蛋白质折叠机制。Ikai 等分析了一些可逆变性反应的动力学特征后, 他们认为存在着 $N \rightleftharpoons D \rightleftharpoons X$ 型变性反应。式中 X 是部分不正确折叠物。在今天还无法从热力学角度研究比二态更复杂的变性反应情况下, 采用动力学方法研究蛋白质变性, 可能是一种很有用的手段。

三、变性过程中的构象转变

1. 球状蛋白质的伸展过程

蛋白质在折叠或伸展过程中肽链构象如何转变是一个引人注意的问题, 也是当今蛋白质溶液构象研究中的一个重要问题。现在大多数测量蛋白质溶液构象的技术, 往往只能提供总的变化程度, 不能观察分子各区域构象变化的次序。高分辨核磁共振 (NMR) 仪有可能提供这方面的信息, 观察的各个原子核由于所处的微环境不同, 反映共振信号的化学位移和峰形也不同。蛋白质分子的氢原子数目很多, 它们的共振信号常常互相重叠, 不能清楚区别开来。Jardetzky 等 (1971) 利用芳香环重氢化, 从核酸酶大量的质子共振信号中把芳香氨基酸的信号区分出来, 观察这些信号的变化, 来追踪有关芳香氨基酸所属的微区构象变化。他们观察到在 pH8.5—11 区域内, 核酸酶分子的四个组氨酸、七个酪氨酸及一个色氨酸残基的重氢化学位移值不同, 随 pH 升高波峰变动的先后次序也不同。由此取得这些芳香氨基酸所属的微区构象转变次序: $8 < 121, 124 < 113, 115 < 91, 93 < 27, 34 < 76, 85 < 54, 61 < 140$ 。即肽链第 8 位残基所属的结构微区最先伸展, 接着是 121 和 124 位残基区, ……第 140 位残基区最后伸展。再利用核酸酶空间结构模型, 描绘了分子伸展过程的顺序图。这幅图的特点是螺旋区最后伸展。虽然图 3 的可靠性有待进一步证实, 但确实提供了研究蛋白质构象变化的颇有前途的实验

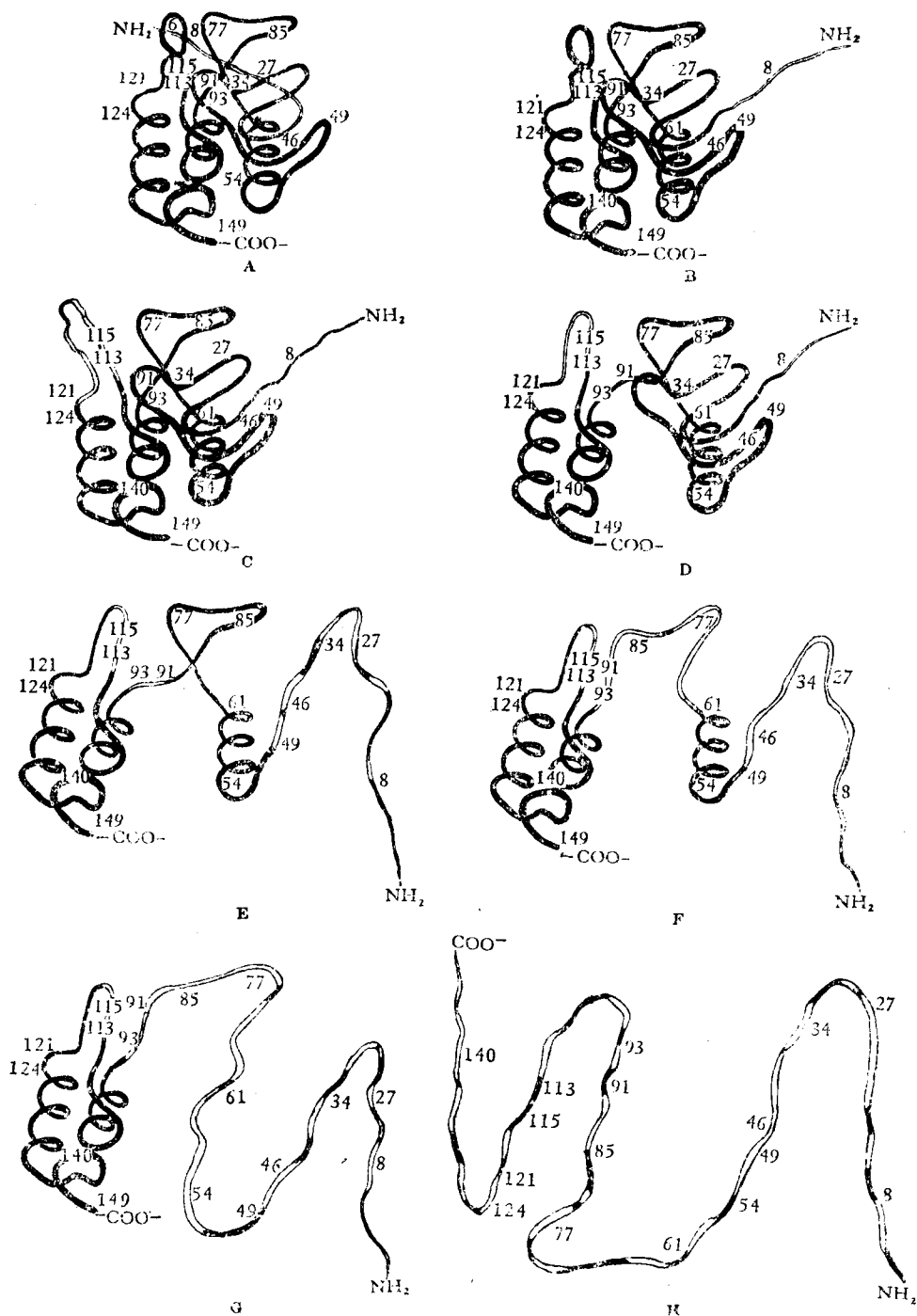


图3 链球菌核酸酶松散和重折叠程序 A为天然态,H为完全伸展态,图中数字表示从肽链N端到C端的残基次序

途径。

2. 肽链折叠机制

变性蛋白质重天然化,即所谓蛋白质折叠机制,今天已成为研究构象的一个重要生长点。球状蛋白质肽链不规则结构所占的残基数量相当多,而且许多事实

表明酶分子活性区结构也是不规则的。但是为了便于研究,往往从一些简单的、易于理论处理和实验测量的规则结构着手研究蛋白质折叠机制。Scheraga 等从构象能最低原则出发,分析了残基和肽构象之间的关系。结果认为二级结构主要由短程相互作用决定。即肽链构象主要由N端方向的残基 R_i 基团(图示)和肽单位

相互作用所决定,和C端残基的 R_i 关系不大。这意味着肽单位N端残基带有决定螺旋能否形成的信号,称这个残基为肽单位构象的信号残基。这样二十种残基可以分成二类信号残基,即右手螺旋(α_R)构成者——它们的C端肽单位构象常常是 α_R -和破坏者二类。促使C端形成 α_R 的信号残基有Ala、Val、Leu等;破坏C端 α_R 的信号残基有Ser、Asn、Asp等。在此基础上,根据一级结构用统计力学处理了十一种蛋白质,计算得出的螺旋区大部分和观察值符合。Pain和Robson等人从信息论角度进行研究,设想肽链每个残基 R_i 能否形成螺旋的信息 S_i ,来自本身 R_i 和它前后的几个残基: $R_{j-m}\cdots R_j\cdots R_{j+m}$, $m\leq 8$ 。他们也计算了十一种蛋白质的各种氨基酸残基构成 α_R 的能力,结论和

Scheraga等非常一致。再根据每种残基形成螺旋的能力,计算蛋白质的螺旋区和观察值也很符合。他们得出下列结论:(1)Ala、Leu、及Ileu有利于它们两端的肽链形成螺旋;(2)Pro、Asp、Glu、Gly及Ser倾向破坏它们N端肽链形成螺旋;(3)Lys、His、Arg、Phe及Thr倾向使N端肽链形成螺旋;而破坏C端肽链形成螺旋。

另一个正在研究中的蛋白质结构是转折(Bends或Turns)。关于转折的定义目前还没有一个较为一致的看法,各组研究者常从自己工作需要描述了一些转折的结构特征。为了便于理解,这里引用Kuntz的转折定义(表3)。同时图示Scheraga等曾详细研究过的 β -转折立体结构(图4)。他们在三种球状蛋白质的 β

表3 肽链转折的分类

转 折 类 型	残 基 数 目	θ_n^* (度)	S_n^* (Å)
U型 (Hairpin)	4	$\theta_4 \geq 135^\circ$	$S_4 \leq 5.5$
近U型	4	$\begin{cases} 135^\circ > \theta_4 \geq 120^\circ \\ \theta_4 \geq 135^\circ \end{cases}$	$\begin{cases} S_4 \leq 5.5 \\ 5.5 < S_4 \leq 6.5 \end{cases}$
转角型 (Corners)	4	$\begin{cases} 135^\circ > \theta_4 \geq 90^\circ \\ 120^\circ > \theta_4 \geq 90^\circ \end{cases}$	$\begin{cases} 5.5 < S_4 \leq 6.5 \\ S_4 \leq 5.5 \end{cases}$
环型 (Loops)	≥ 5	$\theta_n \geq 120^\circ$	$S_n \leq 6.5$

* θ_n 是肽链第 i 和 $(i+1)$ 残基的 α -碳原子连结线同 $(i+n-2)$ 和 $(i+n-1)$ 残基的 α -碳原子连结线之间的夹角。
 S_n 是第 i 和 $(i+n-1)$ 残基的 α -碳原子之间相隔距离。

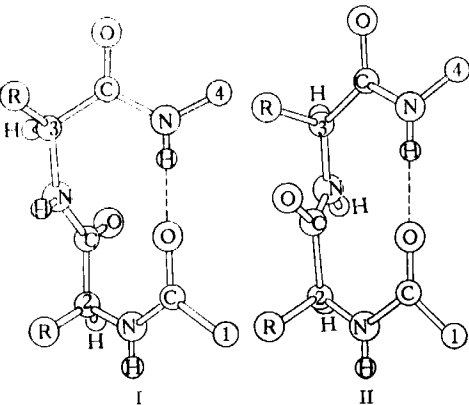


图4 β 转折的立体结构图

图4 数字1,.....4代表残基 i $i+3$ 的 α -碳原子。图中II的第三位残基必须是甘氨酸

转折中,发现残基Asp、Gly、Ser、Thr、Pro及Tyr出现的频率非常高。这三种蛋白质的Asp总数是22个,有16个出现在 β 转折。Crawford等也得出类似的结论。经过计算,Scheraga等(1973)证明出现在转折区的Ser、Thr、Gly或Asp残基,确实有稳定该区构象的作用,并且转折区附近的残基也有稳定转折构象的作用,扩大了短程相互作用的范围。经过这些修改,象 α -胰

凝乳蛋白酶125—128肽段的转折构象也可以解释了;如果只计算这4个残基的构象能,结果不是处于最低点,扩大计算短程相互作用范围后,证明是处于稳定状态。通过这些研究(1973, 1971),作者们假设蛋白质折叠过程如下,伸展的肽链先从某些二肽开始折叠,形成转折;这些二肽很可能含有Ser、Thr、Asp或Pro,这里前面三种残基是可以同主链形成氢键,“锁”住肽链,有利于转折的稳定。转折起着“导向”(directing)功能,引导 α_R 或 β 结构的肽段与链其它部位的残基互相靠拢,使这些结构区的残基取得长程相互作用,增加它们的稳定性。由此形成随后继续折叠的基质。余下的肽链围绕它们进一步折叠成天然蛋白质。他们认为核晶作用发生在转折形成的时候。很显然,这个蛋白质折叠学说突出了转折形成的重要性。Wetlaufer分析了一些球状蛋白质立体结构后,认为球状蛋白质分子可以划分成相对独立的几个结构区,每个区各自有独立的核晶作用,在折叠时各个区同时并进,这有助于说明蛋白质折叠的快速。

球状蛋白质的转折约占整个分子残基总数的45%,而其中将近60%的转折又处在分子的表面。因此研究转折也有助于阐明球状蛋白质的稳定和变性。根据Kuntz分析的结果,羧肽酶螺旋区主链和侧链的

80% 氢键供受体互相成键;而转折区互相形成氢键的供受体少于 50%。据此, Kuntz 推测这些互相不能形成氢键的供体和受体,是和水形成氢键。若确实如此,则溶剂对转折的稳定也有影响。他还认为,使球状蛋白质变性必需的脲分子数是每个转折一到二个。转折另一特点是疏水性比较小。

关于蛋白质折叠的实验资料现在还不多。说明存在着短程相互作用的证据有 RNaseS 肽可以保存 α 螺旋和 β 转折结构。此外肌红蛋白二个酶解碎片螺旋量比在母体蛋白中少。用钠-氨法断裂的肌红蛋白五个碎片在 60% 甲醇溶液中,虽然螺旋量可以增加些,但仍达不到这些碎片在母体蛋白中的螺旋量;这表明长程相互作用也参与螺旋结构的形式。

四、变性产物的构象

伸展的变性蛋白质容易发生聚集和共价键反应。凝胶电泳清楚证明,牛血清清蛋白脲变性的最初产物随放置时间增长,逐渐变成性质不同的多种产物,给研究变性产物的构象带来困难。关于变性产物构象最早的学说是吴宪(1931)提出的,他认为变性蛋白质分子基本是松散的。此后很长一段时期内,基本停留在这个水平上。五十年代末发现氯乙醇之类变性的蛋白质构象和有机溶剂浓度密切相关。有机溶剂浓度低时,变性蛋白质呈易聚集的伸展状态,浓度高时又逐渐变成 α 螺旋,有时候螺旋量甚至可超过天然状态。从而证明变性蛋白质的构象也可以不属于无规则卷曲型,补充了吴宪观点不足之处。近来进一步观察到 α -淀粉酶和本周氏(Bence-jones)蛋白的阴离子或阳离子型表面活性剂变性产物的螺旋量也有增加。SDS 变性的 L-门冬酰胺酶也有类似现象。Reynold 等在测定了许多 SDS 变性的蛋白质旋光后,认为 SDS 的疏水基和蛋白质侧链的疏水基共同形成疏水区,螺旋即处于这种疏水壳内。这类蛋白质螺旋度增加的变性, jirgensons 称谓“重构造”(reconstructive)变性。Tanford (1968) 曾讨论过变性产物的各类构象状态,大致可概括成三种:(1) 盐酸胍变性的蛋白质,构象完全是无规则卷曲型;如果把它们二硫键断裂开,则呈线状无规则卷曲。浓脲变性的蛋白质基本也属此类,但程度常不够完全,尤其有二硫键的蛋白质。象溶菌酶必须在酸性 pH 下才发生脲变性。(2) 热、酸、碱及盐变性的产物往往保存着部分结构。添加盐酸胍可破坏这部分残存结构,然而热变性的溶菌酶 NMR 谱表明所有侧链是和溶剂接触的,因此,如果有残存结构,也只可能是螺旋结构。(3) 高浓度的脂肪族醇、二氧六环及氯乙醇等有机溶剂变性的产物螺旋度可以增加,不存在疏水结构。表面活性剂变性的产物有所不同,可以有一些协同疏水结构。

五、变性剂作用原理

至今研究过的变性反应绝大部分都在水溶液中进行,水又是生物体的主要组成部分,所以围绕着水讨论蛋白质变性机制是比较适宜的。自从 1890 年 Lewith 发表了水加速卵清蛋白热变性之后,至今水在变性过程中的重要性始终未予忽视。初期曾用水合蛋白质脱水来解释变性现象,1951 年 Eisenberg 和 Schwert 引入了蛋白质冰状水合层概念。后来, Klotz 又发展成“冰袋说”解释蛋白质变性。不久 Kauzmann 创立了疏水键理论。从疏水键概念出发,似乎不难理解有机溶剂和表面活性剂变性原理。实际并不如此,新近发现非离子型或二性表面活性剂不引起枯草杆菌蛋白酶变性,而阴离子型或阳离子型表面活性剂却能变性,所以破坏疏水键不是这类变性的唯一作用原理。同样,加热(Lewin, 1971)或加盐(Barone 等, 1971)也是通过多功能作用导致蛋白质变性,这些变性因素破坏水的结构、增加非极性基团的溶解度以及肽基团的盐溶、导致蛋白质变性。醇、烷基盐及锂盐(Barone 等, 1971)既是水的结构形成剂,有利于蛋白质稳定,又能强烈地增加碳氢基团的溶解引起变性。脲、胍类变性剂的作用原理,现在仍然颇有不同看法。Jencks 和 Gorden 等提出脲、胍类主要通过和肽基团作用使蛋白质变性。大多数研究者根据模型化合物在脲-水三元体系中行为推测脲、胍变性主要通过破坏水结构。二种说法都有实验证据,可能各自反应了脲、胍类一部分作用原理。Lewis 提出醇脲等变性剂作用原理,是使表面张力下降,引起疏水键强度削弱而导致蛋白质变性。总之,变性剂作用原理现在仍然不够了解。

六、抗变性手段

虽然,蛋白质变性可用于许多目的。例如,利用各种蛋白质对变性剂的敏感程度不同,使杂蛋白变性沉淀,达到提纯生物制品的目的;工业上也曾经使球状蛋白质变性制成纤维,生产织物;从豆饼制造含蛋白质高的食品。但是,在另一些场合,如在人工心肺机内循环的血液,食品,疫苗保藏等方面,却希望避免变性。不言而喻,使蛋白质稳定也是一个亟待解决的问题。影响蛋白质稳定的因素很多,为了便于讨论,我们把蛋白质稳定因素分成二类:(1) 内源性稳定因素。它包括蛋白质的共价结构和由共价结构决定的空间结构。(2) 外源性稳定因素。这类包括非共价结合的辅基及环境的物理和化学条件,象温度、压力和溶液内其它溶质等。外源性稳定因素发挥稳定功能是和内源性稳定因素紧密相关的,并且受它制约。例如, Ca^{++} 能稳定细菌蛋白水解酶 thermolysin 是因为酶空间结构适宜于

和它紧密结合, Ca^{++} 对于其它蛋白质就不一定也有稳定作用。由此可见, 外源性稳定因素是否有效, 主要视蛋白质的性质而定。稳定蛋白质的方法很多, 近来利用不溶性技术使许多酶稳定的方法正在迅速增加, 它涉及面较广, 因此本文不拟讨论这方面的进展。这里只扼要概述一些其它的外源性稳定因素。一般地说, 添加蛋白质(包括明胶)、树脂、底物、抑制剂、辅基、必需金属离子及某些盐, 在适宜的缓冲液中可以增强蛋白质稳定性。但也有些酶在底物等配体存在下, 反而促使热稳定性下降。另一方面, 很多实验指出多元酶及糖类可以增进蛋白质的稳定性, 并且有助于变性蛋白质的重天然化; 加入抗体也可以增加蛋白质抗原的稳定性。最耐人寻味的是某些变性剂, 象丙酮或乙醇, 有时表观上竟然也能稳定脱氢酶(表 4)。此外, 如 5900Kg/cm^2 以上的静压可使蛋白质变性, 而 $1000-3000\text{Kg/cm}^2$ 中等强度的静压也有稳定蛋白质抗热变性。相反糖、甘油等稳定剂有时却能抑制酶活性。这些事实足以说明变性剂或稳定剂与蛋白质相互作用的复杂性, 又表明我们对蛋白质的稳定性认识还很肤浅。

表 4 猪心苹果酸脱氢酶的有机溶剂稳定作用
(25°C 保存 30 分钟)

化 合 物	有机溶剂浓度 (V/V) %				
	0	10	30	50	70
	酶 活 性 %				
甲 醇	50	63	59	66	20
乙 醇	50	72	87	79	62
丙 酮	50	77	99	101	—
甘 油	50	57	96	94	109

七、蛋白质变性的生物学意义

尽管关于蛋白质变性的资料已积累了很多, 但是变性的生物学意义仍然不了解。最初, Linderström-Lang 曾经提出过蛋白酶水解变性的变性蛋白质。Walleik 在这一个看法指导下, 研究了人离体脱脂血清清蛋白构象变化。他得出在生理条件下约有 35% 的血清清蛋白处于某种易被酶水解的伸展状态。可是已知, 脂质能够稳定血清清蛋白。因此, 虽然 Walleik 的结论还有待证实, 但他设想的体内可能存在着变性现象, 值得进一步讨论。其实 Johnson 等早在 1942 年就提出过可逆变性可能是生物学的一个基本现象。它们的依据是某些细菌发光有热可逆现象。很久以后, 发现大肠杆菌体内有酶可逆热失活现象。但是第一个证明体内存在蛋白质可逆变性是 Airas (1972), 他仔细研究了萤光假单胞杆菌活菌体内的泛酸水解酶, 证明这酶在体内 40°C 时, 出现可逆变性。值得注意, 琥珀酸等代谢中间物能够影响这酶的可逆变性(表 5)。并且

表 5 泛酸水解酶热失活的碳源影响
(泛酸盐中生长的细胞移入各种碳源 25°C 一小时, 然后转到 40°C , 每隔 10 分钟测一次酶活性。)

碳 源	失活速度 %/分钟	40°C 半小时后活力 %
丙 酸 盐	0.56	90
琥珀酸盐	0.60	83
葡 萄 糖	0.91	72
谷氨酸盐	1.15	78
缬 氨 酸	2.0	69
乙 醇 胺	6.0	31
甘 氨 酸	10.3	8
无	11.1	7

表 6 各种碳源下泛酸水解酶重活化速度
(细胞 25°C 一小时, 然后 40°C 一小时, 再回复到 25°C)

碳 源	重活化速度(原来活力%/小时)
谷 氨 酸 盐	63
4-氨基丁酸盐	52
葡 萄 糖	37
琥 珀 酸 盐	35
乙 醇 胺	33
丙 酸 盐	24
缬 氨 酸	24
β -丙 氨 酸	18
鸟 氨 酸	17
丝 氨 酸	6
肌 氨 酸	5
二羟基乙酸盐	4
甘 氨 酸	0
无	11

在不同碳源下, 菌体内的泛酸水解酶失活和重活化速度相差很大(表 6)。说明碳源通过某些代谢途径, 起着调节酶活性的作用。反之, 酶可逆变性也影响到细胞代谢。特别是该细菌在 40°C 时, 并没有死亡, 这证明可逆变性有代谢调节控制作用。大鼠肝腺苷环化酶也有类似的构象转变现象(图 5)。这酶在 $20-40^\circ\text{C}$ 范围内, 活性随温度上升而平稳地增加; 如果有肾上腺素或糖元, 直线在 32°C 出现转折, 活性随温度上升, 迅速增加。显然在这条件下, 酶构象发生了明显改变。另外, 代谢中间物也可以加速或阻碍大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的热变性(表 7)。但在 37°C 时, 它们并不影响酶活性。因此, 如果把上述种种实验证据和许多酶有冷变性现象一并考虑, 可以设想, 在正常生活环境条件下, 机体或许通过变构等途径调节控制蛋白质功能。如果遇到环境条件激烈改变时, 可逆变性很可能也参与了代谢的调节控制。这也许是生物体经过亿万年自然选择后, 取得的适应机制之一。

(下接 49 页)

续 表

出现的问题	可能的原因	处 理 方 法
5. 雾点在 某些细胞或 组织成分上。	5. 组织可能含有 还原物质。	5. 用蒸馏水较长时间 冲洗标本。
III. 细胞 上银粒不多, 背景上有一 些雾点。	1. 曝光时间太 短。 2. 同位素剂量不 够或用前同位素溶 液已分解。 3. 乳胶玻片贮在 潮湿的空气中, 潜 影消退。	1. 增加曝光时间。 2. 核对计算和稀释过 程。检查同位素溶液有 无细菌生长。 3. 玻片贮存前应保证 干燥。
IV. 细胞 上没有银粒 及背景上无 雾点。	1. 显影前把玻片 错放入定影液中。	1. 检查暗室操作。
V. 玻片 上某些区域 已知含有同 位素的细胞 上很少或没 有颗粒, 背 景上很少或 没有雾点。	1. 滴乳胶时由于 有气泡涂布不均 匀, 或乳胶没有完 全覆盖玻片。	1. 检查暗室操作和在 暗淡红灯下检查乳胶是 否涂匀。
VI. 对已 衰变的总数 来说, 银粒 不足。	1. 潜影消退。 2. 乳胶被玻片上 的水稀释。 3. 银粒被酸性定 影液溶解。 4. 银粒在染色过 程中被溶解。 5. 乳胶由于细菌 或过热而变坏。	1. 曝光过程保持干 燥, 用氮气代替空气, 把 乳胶玻片贮存在带干燥 剂的塑料盒中。 2. 滴乳胶前去掉玻片 上多余的水。 3. 在硫代硫酸钠和醋 酸中时间太长, 银粒会 被溶解。硫代硫酸胺定 影液可很快溶解银粒。 4. 某些染料和酸会溶 解银粒, 用前应先试验。 5. 更换乳胶。
VII. 银粒 消退或随时 间变褐。	1. 定影液没完全 去掉。	1. 定影后充分水洗, 去掉海波和酸。
VIII. 明胶 过染, 使区 分细胞困 难。	1. 明胶迅速吸收 某些染料。	1. 调整染液酸碱度。 2. 用带酸的甲醇脱 色。
IX. 细胞 不着色。	1. 染色时间不足 (染料穿过明胶的 时间不够)。	1. 增加染色时间。 2. 用等量蒸馏水稀释 乳胶。

参 考 资 料

- [1] Boyd, G. A.: *Autoradiography in biol. and med.*, 1955, New York.
- [2] Rogers, A. W.: *Techniques of Autoradiography*, 1973.
- [3] 陆祖荫等: 物理学报. 15 卷 (3), 139, 1959.
- [4] 何泽慧等: 物理学报. 15 卷 (3), 131, 1959.
- [5] 何泽慧等: 科学通报. (2), 43, 1957.
- [6] Gay, W. I.: *Methods of Animal Experimentation*, 2, 153, 1965.
- [7] Lajtha, L. G.: *The Use of Isotope in Heametology*, P. 73, 1961.
- [8] Busoh, H.: *Methods in Cancer Res.* 1: 45, 1967.
- [9] Jacob, J.: *Int. Rev. Cytol.*, 30, 91—181, 1971.
- [10] 天津感光胶片厂技术研究室: 原子核乳胶干版显影说明书。
- [11] Speirs, R. S. et al: "Tritium in the Physical and Biological Sciences", 2, 321, 1962, IAEA.

(上接 22 页)

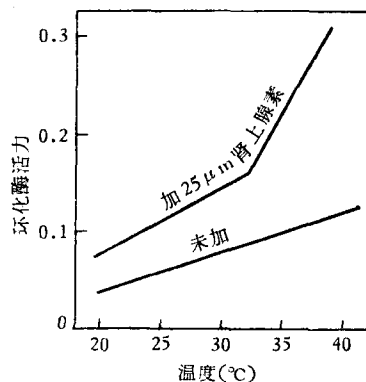


图 5 温度和肾上腺素对大鼠肝腺苷环化酶活性的影响

表 7 代谢中间物对大肠杆菌 β -半乳糖苷酶热变性的影响
(变性条件: 酶在 3.2mM 底物、4mM 代谢中间物和 1%(V/V) 巯基乙醇存在下, 55°C 恒温 20 分钟, 加 Na_2CO_3 终止反应, 比色测活性)

代 谢 中 间 物	酶 相 对 活 性 %
无	100
AMP	68
ATP	58
二羟基丙酮磷酸酯	160
5-磷酸核糖-1-焦磷酸酯	228
核糖	59