

一性,防止酸性条件下可能发生的非特异洗脱;也可以防止酸性条件洗脱对噬菌体活性可能造成的影响;还能减少目标蛋白的用量,节省费用,因为谷胱甘肽通常要比目标蛋白更容易得到。

总之,GST融合蛋白的表达系统为从噬菌体肽库中筛选目标蛋白的结合肽提供了一种简便、快速和应用范围更为广泛的途径。

参 考 文 献

- 1 Clackson T, Wells J A. *In vitro* selection from protein and peptide libraries. Trends Biotechnol, 1994, 12 (5): 173~ 183
- 2 唐为钢,甘人宝,王克夷 (Tang W G, Gan R B, Wang K Y). 多肽噬菌体展示. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1997, 24 (3): 203~ 207
- 3 Emerman M. HIV-1, Vpr and the cell cycle. Current Biology, 1996, 6 (9): 1096~ 1103
- 4 Smith D B, Johnson K S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. Gene, 1988, 67 (1): 31~ 40
- 5 Guan K L, Dixon J E. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: An improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. Ann Biochem, 1991, 192 (2): 262~ 267

Binding Peptide Selection from Phage Peptide Library by Using GST Fusion Protein as Target.

XUE Yan-Ning (*Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China*); DUAN Ling-Xun, R. J. POMERANTZ (*Division of Infectious Disease, Thomas Jefferson University, PA 19107, USA*).

Abstract Recombinant glutathione S-transferase (GST) Vpr fusion protein was used as target to select Vpr binding peptide from phage peptide library. By immobilized the GST or GST fusion protein to glutathione agarose gel, binding phage could be quickly panned and eluted by reduced glutathione. The sequencing result show that a WWXF motif exist among the Vpr binding peptide. Comparing with the classic biopanning method by coating target protein on plate this provide more quick and convenient way to screen binding protein from phage peptide library.

Key words phage display, GST fusion protein, peptide library, Vpr

用碱水解的方法测定蛋白质的消光系数*

周 波 静国忠

(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)

摘要 在蛋白质结构与功能的研究中,有时蛋白质溶液的浓度是一个重要的参数.紫外吸收法是测定蛋白质溶液浓度最为常用的方法,而已知蛋白质的消光系数是用紫外吸收法准确测定蛋白质溶液浓度的前提条件.在0.1 mol/L NaOH 溶液中,蛋白质发生碱性水解,因而蛋白质溶液可以看作是色氨酸和酪氨酸的二元体系.以此为依据,给出了用碱水解的方法测定蛋白质消光系数的方法.这一方法操作步骤简便易行,蛋白质消光系数的计算公式简单明了.用这一碱水解的方法分别测定了几种氨基酸组成不同的蛋白质的消光系数,与文献数据对照,得到了令人满意的结果,测定误差均小于 $\pm 5\%$.

关键词 蛋白质消光系数,碱水解,紫外吸收法,酪氨酸,色氨酸

学科分类号 Q5-33, Q53

在蛋白质结构与功能的研究中,往往需要知道蛋白质溶液的准确浓度,如酶比活的测定,蛋白质与蛋白质的相互作用以及蛋白质与配体的相互作用的研究等等.目前,测定蛋白质溶液浓度的方法很多,较常用的有紫外吸收法、双缩脲法、福林酚试剂法、考马斯亮蓝染色法等.其中紫外吸收法由于具有简便、快捷且不消耗样品等优点,已成为实验室中测定蛋白质溶液浓度的最为常用的方法.但

是,不同蛋白质中芳香族氨基酸残基(如色氨酸和酪氨酸)的含量不同,所处的微环境也不同,因此不同蛋白质溶液的紫外吸光度值会相差很大.据初步统计,浓度为1 mg/L的1 800余种蛋白质及蛋白质亚基在280 nm的光吸收值在0.3~ 3.0之间,平均值为 $1.25 \pm 0.51^{[1]}$.因此在不知道所测蛋白质

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1998-04-24, 修回日期: 1998-09-14

的消光系数时, 紫外吸收法无法给出定量的结果。

无从查找所研究蛋白质的消光系数是在实验中常常遇到的问题, 尤其是用基因工程技术得到的融合蛋白或突变体, 它们的消光系数显然无法从文献中查到。利用基因工程技术得到的蛋白质的一个特点是可以由其 DNA 序列推知蛋白质的一级序列即氨基酸组成。因此, 寻找一种根据蛋白质的氨基酸组成测定消光系数的方法无疑具有广泛的应用价值。

蛋白质的紫外吸收主要来源于色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 和苯丙氨酸 (Phe) 等芳香族氨基酸残基。早在 1946 年, Goodwin 和 Morton 测定了 Tyr 和 Trp 在 0.1 mol/L NaOH 溶液中不同紫外波长处的一系列消光系数。同时他们的结果表明, 在 0.1 mol/L NaOH 溶液中蛋白质发生碱性水解, 芳香族氨基酸残基的苯酚基团完全离子化, 此时 Phe 的紫外吸收忽略不计, 蛋白质溶液可以看作是 Tyr 和 Trp 的二元体系^[2]。因此, 可通过碱水解的方法准确测定蛋白质样品中 Tyr 和 Trp 的含量, 进而对于已知氨基酸组成即已知 Tyr 和 Trp 的残基数的蛋白质, 可以用这一方法推算出蛋白质溶液的浓度。有些实验室已经用这种碱水解的方法通过测定蛋白质溶液中 Tyr 的含量来得到蛋白质的浓度^[3, 4], 但用这种方法测定同时含有 Tyr 和 Trp 残基的蛋白质溶液浓度尚未见报道。并且没有一套操作方法供人们应用。因此, 确定一套简便易行的操作步骤, 并以 0.1 mol/L NaOH 中 Tyr 和 Trp 的消光系数为依据, 推导出适用于各种氨基酸组成的计算蛋白质的消光系数的公式, 将为具体研究工作带来极大方便。

在本文中, 通过给出具体的操作步骤和计算公式确定了用碱水解的方法测定蛋白质消光系数的方法, 并用这一方法分别测定了几种氨基酸组成不同的蛋白质的消光系数, 得到了令人满意的结果。

1 材料和方法

1.1 蛋白质样品及其他试剂

金黄色葡萄球菌核酸酶 A (SNase A), 相对分子质量 16 800, 含有 7 个 Tyr 和 1 个 Trp 残基^[5], 由本实验室在 *E. coli* 中表达并纯化至在 15% PAGE 电泳上为一条带。

金黄色葡萄球菌核酸酶 R (SNase R), SNase A 的类似物, 相对分子质量 17 400, 含有 8 个 Tyr 和 1 个 Trp 残基^[6], 由本实验室在 *E. coli* 中表达并

纯化至在 15% PAGE 电泳上为一条带。

胰蛋白酶 (trypsin), 相对分子质量 24 000, 含有 10 个 Tyr 和 4 个 Trp 残基^[7], 购于 Sigma 公司。

溶菌酶 (lysozyme), 相对分子质量 14 300, 含有 3 个 Tyr 和 6 个 Trp 残基^[8], 购于中国科学院上海生物化学研究所。

RNA 酶 (RNase A), 相对分子质量 13 700, 含有 6 个 Tyr, 不含 Trp 残基^[9], 购于 Sigma 公司。

Tris, NaOH, HCl 等试剂的等级均为分析纯。

1.2 样品制备和紫外吸光度的测定

取 1~2 mg 样品蛋白的干粉, 用去离子水溶解并定容至 1 ml, 然后将其等分为两份 0.5 ml 的蛋白质溶液。一份蛋白质溶液中加入 0.2 mol/L NaOH 溶液 0.5 ml, 混合均匀后放置 5 min 以上, 得到 0.1 mol/L NaOH 中碱水解的蛋白质样品。另一份蛋白质溶液中加入 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4 缓冲液 0.5 ml, 混合均匀, 得到天然态的蛋白质样品。两份蛋白质样品中的蛋白质含量相等。

蛋白质溶液的紫外吸光度值用分光光度计 (如日本岛津 UV-250) 在 20℃ 测定。用光径为 1 cm 的 1 ml 体积的石英样品杯, 分别测定碱水解的和天然态的蛋白质样品在 280 nm 的吸光度 (A_{280}), 并使所测的吸光度值在 0.3~0.8 之间 (Beer 定律)。为排除碱水解样品中肽段终端的紫外吸收对测量的影响, 可将 350 nm 的吸光度作为本底从碱水解样品的 A_{280} 中扣除^[2]。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质消光系数的计算公式

图 1 是根据 Goodwin 和 Morton 的结果^[2]绘制出的 Tyr 和 Trp 在 0.1 mol/L NaOH 溶液中的紫外吸收光谱。其中, Tyr: $\lambda = 293$ nm 时, 消光系数最大, $\epsilon_{\max} = 2390$ (L/mol) $\cdot$ cm⁻¹, $\lambda = 280$ nm 时, $\epsilon = 1576$ (L/mol) $\cdot$ cm⁻¹。Trp: $\lambda = 280$ nm 时, 消光系数最大, $\epsilon_{\max} = 5250$ (L/mol) $\cdot$ cm⁻¹。

因为碱水解的蛋白质溶液可以看作是 Tyr 和 Trp 的二元体系^[2], 0.1 mol/L NaOH 溶液中, 蛋白质的消光系数可以用 Tyr 和 Trp 的消光系数计算, 即:

$$\epsilon^{\text{NaOH}} = a \times \epsilon^{\text{Tyr}} + b \times \epsilon^{\text{Trp}} \quad (1)$$

其中, ϵ^{NaOH} 是蛋白质在 0.1 mol/L NaOH 溶液中的消光系数, ϵ^{Tyr} 和 ϵ^{Trp} 分别是 Tyr 和 Trp 在

0.1 mol/L NaOH 溶液中的消光系数, a 和 b 分别是蛋白质中 Tyr 和 Trp 的残基数.

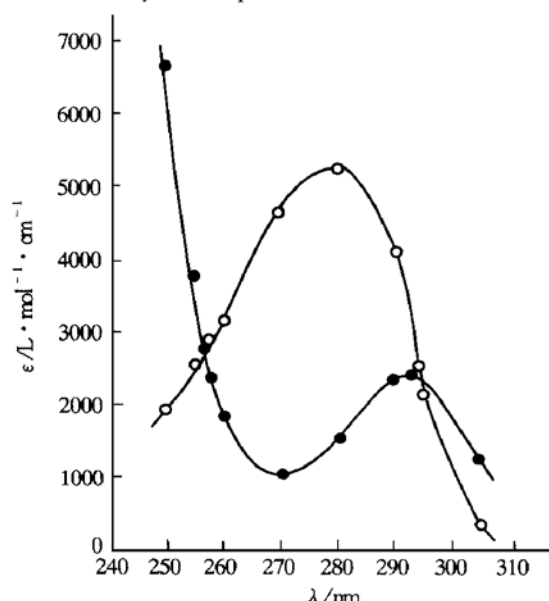


图1 0.1 mol/L NaOH 溶液中色氨酸和酪氨酸的紫外吸收光谱
●—●: 酪氨酸; ○—○: 色氨酸.

根据 Beer 定律, 在 0.1 mol/L NaOH 溶液中蛋白质的浓度可表示为:

$$c_{\text{NaOH}} = A_{280}^{\text{NaOH}} / \epsilon_{280}^{\text{NaOH}} \quad (2)$$

其中, c_{NaOH} 是蛋白质在 0.1 mol/L NaOH 溶液中的浓度, A_{280}^{NaOH} 是 0.1 mol/L NaOH 溶液中蛋白质在 280 nm 的吸光度值, $\epsilon_{280}^{\text{NaOH}}$ 是 0.1 mol/L NaOH 溶液中蛋白质在 280 nm 的消光系数.

同样, 在中性缓冲溶液中天然态的蛋白质的浓度可表示为:

$$c_{\text{nat}} = A_{280}^{\text{nat}} / \epsilon_{280}^{\text{nat}} \quad (3)$$

其中, c_{nat} 是天然态蛋白质的溶液浓度, A_{280}^{nat} 是中性缓冲溶液中蛋白质在 280 nm 的吸光度值, $\epsilon_{280}^{\text{nat}}$ 是天然态蛋白质在 280 nm 的消光系数.

因为在制备样品时, $c_{\text{nat}} = c_{\text{NaOH}}$, 所以公式 (2) 和 (3) 可以合并, 得到:

$$\epsilon_{280}^{\text{nat}} = \epsilon_{280}^{\text{NaOH}} \times A_{280}^{\text{nat}} / A_{280}^{\text{NaOH}} \quad (4)$$

将公式 (1) 代入公式 (4), 可以得到天然态蛋白质消光系数的计算公式:

$$\begin{aligned} \epsilon_{280}^{\text{nat}} &= (a \times \epsilon^{\text{Tyr}} + b \times \epsilon^{\text{Trp}}) \times A_{280}^{\text{nat}} / A_{280}^{\text{NaOH}} \\ &= (a \times 1576 + b \times 5250) \times A_{280}^{\text{nat}} / A_{280}^{\text{NaOH}} \end{aligned} \quad (5)$$

当蛋白质中不含有 Tyr 残基 (即 $a = 0$) 或 Trp 残基 (即 $b = 0$) 时, 公式 (5) 可分别简化

为:

$$\epsilon_{280}^{\text{nat}} = b \times 5250 \times A_{280}^{\text{nat}} / A_{280}^{\text{NaOH}} \quad (6)$$

$$\epsilon_{280}^{\text{nat}} = a \times 1576 \times A_{280}^{\text{nat}} / A_{280}^{\text{NaOH}} \quad (7)$$

因此, 在已知蛋白质的氨基酸组成, 即已知蛋白质中 Tyr 和 Trp 残基数时, 可以根据公式 (5) 或 (6), (7), 准确地计算出蛋白质的摩尔消光系数.

因为 0.1 mol/L NaOH 中 Tyr 的最大消光系数出现在 293 nm, 所以对于不含 Trp 残基的蛋白质, 为提高检测的灵敏度, 可以用 A_{293}^{NaOH} 计算消光系数, 即:

$$\begin{aligned} \epsilon_{280}^{\text{nat}} &= a \times \epsilon_{293}^{\text{NaOH}} \times A_{280}^{\text{nat}} / A_{293}^{\text{NaOH}} \\ &= a \times 2390 \times A_{280}^{\text{nat}} / A_{293}^{\text{NaOH}} \end{aligned} \quad (7')$$

在实验中较常用的消光系数的形式为 $\epsilon_{280}^{\text{mg/L}}$, 可用下面的公式换算得到:

$$\epsilon_{280}^{\text{mg/L}} = \epsilon_{280}^{\text{nat}} / M_r \quad (8)$$

其中, M_r 是蛋白质相对分子质量, 可以由氨基酸组成推算出来.

2.2 实验结果

分别测定了几种 Tyr 和 Trp 含量不同的样品蛋白质在中性缓冲体系 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4) 和 0.1 mol/L NaOH 中的 A_{280} 值, 用公式 (5) 和 (8) 分别计算出它们的消光系数 ($\epsilon_{280}^{\text{mg/L}}$), 测定结果列于表 1.

蛋白质的消光系数是紫外吸收法准确测定蛋白质溶液浓度的前提条件. 从表 1 中的结果可以看到, 用碱水解的方法测定的蛋白质消光系数与文献结果符合的很好, 误差均不超过 $\pm 5\%$ (其中 lysozyme 的测量结果与文献值相差较大的原因是所用样品的纯度不够). 这一结果充分说明, 在已知蛋白质氨基酸组成的条件下, 用碱水解的方法可以简便、快捷准确地测定蛋白质的消光系数, 进而通过测定蛋白质样品的 A_{280} , 用 Beer 定律:

$$A_{280} = \epsilon_{280}^{\text{mg/L}} \times c \times L$$

计算出蛋白质溶液的准确浓度 (c).

用碱水解法测定蛋白质消光系数, 确保结果准确的关键在于: 首先, 所用蛋白质样品应有较高的纯度. 蛋白质中含有的杂质, 特别是杂蛋白会使测定结果不准确. 另外, 在操作上要使碱水解样品和中性体系中样品的蛋白质含量相等, 并且蛋白质样品的紫外吸光度值在 0.3~0.8 之间, 保证吸光度值与蛋白质浓度间的线性关系.

表 1 用碱水解的方法测定蛋白质的消光系数

蛋白质	相对分子质量	Tyr	Trp	$\epsilon_{280}^{1\text{ mg/L}}$ (expt.)	$\epsilon_{280}^{1\text{ mg/L}}$ (ref.)	$\Delta/\%$
SNase A	16 800	7	1	0.95	0.93 ^[10]	+ 2.1
				0.94		+ 1.1
SNase R	17 400	8	1	0.97	0.97 ^[11]	0
				0.98		+ 1.0
胰蛋白酶 (牛)	24 000	10	4	1.39	1.39 ^[12]	0
				1.34		- 3.6
溶菌酶 (鸡)	14 300	3	6	2.49	2.64 ^[13]	- 5.7
				2.44		- 7.5
RNase A (小牛)	13 700	6	0	0.712	0.695 ^[14]	+ 2.4

其中, $\epsilon_{280}^{1\text{ mg/L}}$ (expt.) 是实验测定结果, $\epsilon_{280}^{1\text{ mg/L}}$ (ref.) 是文献结果, $\Delta/\% = (\epsilon_{280}^{1\text{ mg/L}}$ (expt.) - $\epsilon_{280}^{1\text{ mg/L}}$ (ref.)) / $\epsilon_{280}^{1\text{ mg/L}}$ (ref.).

随着基因工程技术的成熟与应用, 人们可以根据研究的需要对蛋白质进行设计和改造. 当表达所需的蛋白时, 最初得到的关于蛋白质的数据通常是其氨基酸序列. 因此, 用碱水解的方法测定这类蛋白质的消光系数会对蛋白质的浓度测定以及蛋白质结构与功能等方面的研究带来很大的方便.

参 考 文 献

- 1 吴丹如. 溶液中蛋白质浓度的测定. 见: 鲁子贤主编. 蛋白质和酶学研究方法 (第一册). 北京: 科学出版社 (Wu D R. Methods in Protein and Enzymology. Beijing: Science Press), 1989. 1~ 7
- 2 Goodwin T W, Morton R A. Tyrosine and tryptophan in proteins. Biochem J, 1946, **40**: 628~ 632
- 3 Kuliopulos A, Mildvan A S, Shortle D, *et al.* Kinetic and ultraviolet spectroscopic studies of active-site mutants of Δ^5 -3-ketosteroid isomerase. Biochemistry, 1989, **28** (1): 149~ 159
- 4 Shortle D, Meeker A K. Residual structure in large fragments of staphylococcal nuclease: effects of amino acid substitutions. Biochemistry, 1989, **28** (3): 936~ 944
- 5 Hynes T R, Fox R O. The crystal structure of staphylococcal nuclease refined at 0.17 nm resolution. Proteins, 1991, **10** (2): 92~ 105
- 6 Jing G Z, Zhou B, Xie L, *et al.* Comparative studies of the conformation of the N-terminal fragments of staphylococcal nuclease R in solution. Biochim Biophys Acta, 1995, **1250** (2): 189~ 196
- 7 Mikes O, Heleysovsky V, Tomasek V, *et al.* Covalent structure of bovine trypsinogen the position of the remaining amides. Biochem Biophys Res Commun, 1966, **24** (3): 346~ 352
- 8 Jung A, Sipel A E, Grez M, *et al.* Exons encode functional and structural units of chicken lysozyme. Proc Nat Acad Sci USA, 1980, **77** (10): 5759~ 5763
- 9 Smyth D G, Stein W H, Moore S. The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and conformations. J Biol Chem, 1963, **238** (1): 227~ 234
- 10 Fuchs S, Cuatrecasas P, Anfinsen C B. An improved method for the purification of staphylococcal nuclease. J Biol Chem, 1967, **242** (20): 4768~ 4770
- 11 毕喜平, 蒋美岩, 静国忠 (Bi X P, Jiang M Y, Jing G Z). NaCl

浓度对金黄色葡萄球菌核酸酶变性态结构的影响. 中国科学 (B辑) (Science in China (B)), 1995, **25** (1): 60~ 67

- 12 Davie E W, Neurath H. Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. J Biol Chem, 1955, **212** (2): 515~ 529
- 13 Steiner R F. Structural transitions of lysozyme. Biochim Biophys Acta, 1964, **79** (1): 51~ 63
- 14 Sherwood L M, Potts J T Jr. Conformational studies of pancreatic ribonuclease and its subtilisin-produced derivatives. J Biol Chem, 1965, **240** (10): 3799

Determination of Protein Extinction Coefficients by Alkaline Hydrolysis. ZHOU Bo, JING Guo-Zhong (National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China).

Abstract Quantitative study of protein requires accurate determination of protein concentration. Yet without a reliable value of protein extinction coefficient, it is difficult or impossible to determine protein concentration by the usual UV spectroscopic means. On the basis of the extinction coefficients of tyrosine and tryptophan in 0.1 mol/L NaOH solution, a method was introduced for determining accurate extinction coefficients for proteins at 280 nm by protein alkaline hydrolysis. Meanwhile, this method is calibrated against several proteins whose extinction coefficients are known from references. The results show that the extinction coefficients of these proteins determined by the alkaline hydrolysis method are accurate.

Key words protein extinction coefficient, alkaline hydrolysis, UV spectrometry, tyrosine, tryptophan