doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.15.002

AUT 凝胶电泳在牛胰核糖核酸酶折叠研究中的应用*

邓丽刚 冯崔香 王 楠△

(中国医学科学院&北京协和医学院药物研究所新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室 北京100050)

摘要目的:牛胰核糖核酸酶是一种用于蛋白折叠研究的经典模式蛋白,在折叠研究过程中主要使用高效液相色谱用于分离检测 不同阶段的蛋白折叠中间体。高效液相色谱具有自动化、分离效果好、样品可回收等优点,同时也存在检测通量较低、仪器设备较 为昂贵等不足。AUT 凝胶电泳筒便、快捷、检测通量较高,本文尝试将其应用于牛胰核糖核酸酶的折叠研究。方法:使用 AUT 凝胶 电泳、酶活性检测、质谱对牛胰核糖核酸酶还原变性过程及产生的折叠中间体进行检测;通过高效液相色谱和质谱对折叠中间单 体进行分离检测,并分别进行 AUT 凝胶电泳检测以解析各折叠中间单体在电泳中的条带位置;通过 AUT 凝胶电泳和酶切后质 谱鉴定各折叠中间单体的二硫键配对方式。结果:AUT 凝胶电泳可以有效区分不同条件下的牛胰核糖核酸酶还原变性过程,检测 结果与酶活性、质谱结果相符,并可以很好地区分牛胰核糖核酸酶还原变性过程折叠中间体。高效液相色谱将牛胰核糖核酸酶还 原变性过程折叠中间单体的二硫键配对方式,并与 AUT 凝胶电泳争的11 个条带位置进行匹配。确认牛胰核糖核酸酶还原变性过 程折叠中间单体的二硫键配对方式,并与 AUT 凝胶电泳条带进行匹配,Cys58-Cys110 和 Cys26-Cys84 构象熵减作用强于 Cys40-Cys95 和 Cys65-Cys72。结论:AUT 凝胶电泳适用于检测牛胰核糖核酸酶折叠中间体,可以与高效液相色谱、质谱等检测技 术相互补充,共同应用于牛胰核糖核酸酶的折叠研究。

关键词:AUT 凝胶电泳;牛胰核糖核酸酶;还原变性;折叠中间体;二硫键 中图分类号:Q71;Q814;O657 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)15-2806-08

Application of Acetic Acid-Urea-Triton Polyacrylamide Gel Electrophoresis in the Study of Bovine Pancreatic Ribonuclease A Folding*

DENG Li-gang, FENG Cui-xiang, WANG Nan^A

(Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Institute of Materia Medica, Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study, Beijing, 100050, China)

ABSTRACT Objective: Bovine pancreatic ribonuclease A (RNase A) is widely applied as a benchmark protein in folding studies for its stable structure and easy renaturation. And high performance liquid chromatography (HPLC) is commonly used in the research on RNase A folding for its advantage of automation, effective separation and sample recycling. However, with the deficiency of low-throughput detection and high-cost equipment, the application of HPLC is limited to a certain extent in the study of RNase A folding. In this study we will introduce acetic acid-urea-Triton polyacrylamide (AUT) gel electrophoresis as a new simple technology into RNase A folding. Methods: Reductive unfolding of RNase A and the folding intermediates with native disulfide bonds were detected by AUT gel electrophoresis, enzyme activity and mass spectrometry. Intermediate monomers were separated and identified by HPLC and mass spectrometry, respectively, followed by detection of AUT gel electrophoresis to match band positions. And the native disulfide pairing of intermediate monomers were determined by detection of AUT gel electrophoresis to the partial reduction of 3ss with native disulfide bonds and of mass spectrometry to trypsin digestion products of intermediate monomers. Results: AUT gel electrophoresis could monitor the whole process of reductive unfolding of RNase A, consistent with the result of enzyme activity and mass spectrometry, and well distinguish disulfide-bonded intermediates of RNase A folding based on their difference in compactness caused by disulfide bonds and effective charges. Intermediates with native disulfide bonds can be divided into 13 chromatographic peaks by HPLC, and matched to 11 bands detected by AUT gel electrophoresis. Furthermore, disulfide pairing of intermediate monomers were identified completely and matched to bands of AUT gel electrophoresis, which referred that entropy decrease caused by Cys58-Cys110 or Cys26-Cys84 is larger than that by Cys40-Cys95 or Cys65-Cys72. Conclusions: As a relatively simple, rapid, accurate and economical technology, AUT gel electrophoresis is competent for the separation of folding intermediates, complemented with HPLC and mass spectrometry, and must be

^{*}基金项目:国家新药创制重大资助项目(十二五综合大平台成药性关键技术子课题 2012ZX09301002-001-002 和 药效学评价子课题 2012ZX09301002-002-006)

作者简介:邓丽刚(1986-),博士,主要从事分子生物学研究,E-mail:375996060@qq.com

[△] 通讯作者:王楠(1964-),中国医学科学院药物研究所研究员,博士,博士生导师,主要从事分子生物学、分子肿瘤学和肿瘤药理学研究,

电话:010-83172984, E-mail: wangnan@imm.ac.cn

⁽收稿日期:2017-12-27 接受日期:2018-01-23)

promising in the study of RNase A folding.

Key words: AUT gel electrophoresis; Bovine pancreatic ribonuclease A; Reductive unfolding; Folding intermediates; Disulfide bonds

Chinese Library Classification(CLC): Q71; Q814; O657 Document code: A Article ID: 1673-6273(2018)15-2806-08

前言

蛋白质折叠研究对于阐明蛋白质的折叠机制、蛋白质设计 改造、蛋白折叠相关疾病以及生物工程等领域均具有很大的潜 在应用价值,目前蛋白质折叠机制仍属于科学难题。牛胰核糖 核酸酶(bovine pancreatic ribonuclease A, RNase A)含有四对二 硫键(Cys26-Cys84, Cys40-Cys95, Cys65-Cys72, Cys58-Cys110), 具有高度的结构和生物活性稳定性以及变性后易复性等特点, 是一种用于蛋白折叠研究的经典模式蛋白^[1]。目前 Scheraga 等 ^[2]提出的氧化折叠途径理论模型被较为接受,认为 RNase A 折 叠过程中形成的 0-4SS 稳态平衡经过 3SS*(des[40-95]和 des [65-72])快速氧化完成复性,但是 RNase A 具体的折叠机制目 前仍然还是存在较多争议。

高效液相色谱(HPLC)技术常被用于 RNaseA 的折叠过程 检测,它具有自动化、分离效果好、样品可回收等优点,不过其 检测通量较低,仪器设备也较为昂贵。AUT 凝胶电泳(acetic acid-urea-Triton polyacrylamide gel electrophoresis)为非连续反 向电泳系统,凝胶电泳环境为 pH 3、8 mol/L 脲,可依据分子量、 空间体积及所带正电荷数的不同对碱性蛋白质进行有效分离, 操作简便、快捷、检测通量较高,目前主要用于核心组蛋白及其 变异体或修饰后组分的分离检测^[3-7]。RNase A 属于碱性蛋白 (pI = 9.45),所以考虑尝试将 AUT 凝胶电泳应用于模式蛋白 RNase A 的折叠研究。

1 材料与方法

1.1 试剂

1.2 方法

牛胰核糖核酸酶购自美国 Worthington;丙烯酰胺、甲叉双 丙烯酰胺、甘氨酸、Triton X-100、Tris base、考马斯亮蓝 R-250、 派洛宁 Y 均购自美国 Ameresco; 色谱纯乙腈、四甲基乙二胺 (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, TEMED)、三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT^{red})均购 自德国 Merck; 无水甲醇、冰醋酸、25%氨水均购自北京化工 厂;核黄素购自北京医药采购供应站;脲、α-氰基-4-羟基肉桂 酸(α-cyano-4-hydroxycinnamicacid, CHCA)、三(2- 羧乙基)膦 盐酸盐(tris(2-carboxyethyl)phosphinehydrochloride, TCEP)均购 自美国 Sigma;酵母核糖核酸(酵母 rRNA)购自北京索莱宝科 技有限公司;三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)、盐酸胍、十二 水合磷酸氢二钠均购自国药集团化学试剂有限公司;二水合磷 酸二氢钠购自北京市红星化工厂;Ar购自北京如源如泉科技 有限公司; 巯基标记试剂(2-aminoethyl methane thio sulfonate hydrobromide, AEMTS)参考文献¹⁸化学合成;反式-4,5-二羟基 -1,2- 二噻烷(trans-4,5-dihydroxy-1,2-dithiane, DTT^{ox})参考文献⁹ 化学合成。

1.2.1 还原变性 10 g/L RNase A 在 30℃、pH 6.5、8 moL/L 脲、40 mmoL/L DTT^{red}条件下处理至少 3 h,制得还原变性态 RNase A;18 g/L RNase A 在 23 ℃、pH 2、6 mol/L 盐酸胍、40 mmol/L TCEP条件下处理 5-10 min,加入足量溶解于醋酸酸性 溶液的 DTT^{wx},在室温条件下反应 10 min 以终止反应,制得 RNase A 变性过程折叠中间体。

1.2.2 HPLC **分离中间体** RNase A 变性过程折叠中间体样品 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后进行 HPLC 分离,色谱条件为:色 谱柱 SULPELCO Discovery BIO Wide Pore C18 (25 cm × 4.6 mm, 5 μm, 300Å),流动相 A (0.09 % TFA) 和流动相 B (乙腈),梯度洗脱,流速 1 mL/min,柱温 25℃,检测波长 210 nm。具体梯 度洗脱条件(B %):0 min (20 %) - 5 min (25 %) - 30 min (26 %) - 55 min (27 %) - 75 min (28 %) - 80 min (55 %) - 85 min (100 %) - 90 min (20 %)。分别收取各洗脱峰位样品,超滤浓缩后于 -20 ℃ 、Ar 中保存。

1.2.3 脉冲还原 脉冲还原 (pulse reduction)可用于鉴别 RNase A 折叠中间体是否具有稳定结构:具有稳定结构的中间 体能够耐受脉冲还原而维持其二硫键;不具有稳定结构的中间 体,其二硫键则被迅速还原成为游离巯基^[10]。具体方式为:室温 条件下,将 RNase A 变性过程折叠中间体(超滤浓缩样品)先升 高至 pH 5 稳定 30 s,再升高至 pH 8,经低浓度还原剂(5 mmol/L DTT^{red})短暂处理 5 min,醋酸酸化终止。

1.2.4 活性检测 采用 TCA 沉淀法^[11]测定 RNase A 活性:50 μL 反应体系中,还原变性样品与过量底物酵母 rRNA 在 37℃、 pH 7、20 mmol/L 磷酸盐条件下反应 15 min, 加入 50 μL 10 % TCA 终止反应, 冰浴 15 min,12000 rpm 于 4℃离心 15 min,对 上清中经 RNase A 酶解的核苷酸片段浓度用 OD₂₈₀ 检测。以初 始 RNase A 的阳性反应数据计为 100 %活性,计算还原变性样 品的相对活性。

1.2.5 胰酶酶切 测序级胰酶可以在肽链 Lys 及 Arg 羧基端 进行切割,产生相应的特异性酶切肽段。具体反应条件为:37℃ 空气浴、pH 7-8、样品与胰酶质量比(1:20-1:50)条件下反应1h, 醋酸酸化终止。

1.2.6 质谱检测 AEMTS 标记后,游离巯基-SH 转变为-S-SCH₂CH₂NH₂,分子量增加 75 Da^[812]。含有不同游离巯基数目的折叠中间体,被 AEMTS 标记后分子量增加值相应也会不同。因此,质谱检测可以有效判断其所含二硫键数目。具体方式为:将酸化后的样品与 CHCA 饱和溶液(30 g/L CHCA、70 %乙腈、30 %甲醇、0.1 % TFA)等体积混合,点样于靶板,自然晾干并结晶,经激光(强度 4000-5000 W/cm²)辅助解离,进行线性模式或反射模式检测,获得各组分质荷比图谱。

1.2.7 AUT 电泳检测 4 %浓缩胶(常温光聚合约2h):8 mol/L 脲、1 mol/L 醋酸、1.4 %(25 %氨水)、13 %(30 %丙烯酰胺 /1.6 %甲叉双丙烯酰胺)、1 % TEMED、0.003 ‰核黄素;14 %分

离胶(常温光聚合约4h):8 mol/L 脲、1 mol/L 醋酸、0.43%(25%氨水)、45.5%(30%丙烯酰胺/0.8%甲叉双丙烯酰胺)、1.5% Triton X-100、0.45% TEMED、0.003‰核黄素;电泳液:0.1 mol/L 甘氨酸、1 mol/L 醋酸;AUT 上样缓冲液(2×):8 mol/L脲、 1 mol/L 醋酸、0.1%派洛宁 Y;电泳条件:反向电泳,常温恒压 120 V 约 2.5 h,之后考马斯亮蓝 R-250染色,脱色至条带清晰。

2 结果

2.1 AUT 电泳检测 RNase A 还原变性过程



图 1 AUT 电泳区分不同状态 RNase A Fig. 1 AUT gel electrophoresis for fully reduced RNase A N,天然态 RNase A;R,还原变性态 RNase A;R-AEMTS,AEMTS 标记 的还原变性态 RNase A。 N, native RNase A; R, fully reduced RNase A; R-AEMTS, fully reduced

RNase A blocked by AEMTS.

天然态 RNase A(N)含有四对天然二硫键,其空间体积较

小;还原变性态 RNase A(R)不含二硫键,其空间体积因缺少 二硫键的束缚作用而相对较大^[2]。而且,AEMTS 完全标记的 R (R-AEMTS)引入了额外的巯基标记基团 -SCH₂CH₂NH₂,其所 带正电荷数较 R 更多^[8,12]。基于上述差异性,尝试性将 AUT 电 泳用于检测 N_xR 和 R-AEMTS。结果发现,区分效果很好(见图 1):N 泳动最快,R 泳动最慢,R-AEMTS 介于 N 和 R 之间。

进一步对 RNase A 在 23℃、pH 2/6.5、6 mol/L 盐酸胍、40 mmol/L TCEP 条件下还原变性不同时间(0、1、5、10 min),加入 过量 AEMTS 终止反应,进行 AUT 电泳、MS 及酶活性检测,结 果如图 2 所示。RNase A 稳定结构在 6 mol/L 盐酸胍变性条件 下可以被充分地破坏,有效暴露二硫键,进而被溶剂中的 TCEP 快速还原,在6mol/L盐酸胍变性环境中,pH 6.5条件下 RNase A还原变性速度明显快于 pH 2,这与 TCEP 化学反应性趋势一 致。在 pH 2(图 2A)反应条件下, AUT 结果显示, 反应 10 min 内均出现一系列分立条带,同时 MS 结果显示,出现明显的 AEMTS 部分标记的 RNase A, 酶活性变化与 AUT、MS 结果中 天然态 RNase A 变化趋势一致。表明, RNase A 被部分还原变 性,生成了变性过程折叠中间体。结果表明,AUT 检测结果与 MS、酶活性结果完全匹配,可以有效区分不同条件下的 RNase A还原变性过程,而且在合适的还原变性条件下可以清楚地检 测到并有效区分 AEMTS 标记的 RNase A 还原变性过程折叠 中间体,即含天然二硫键的折叠中间体。



Fig. 2 Reductive unfolding of RNase A with GdnHCl as denaturant and TCEP as reducing agent

RNase A 在 23℃、pH 2(A)/pH 6.5(B)、6 mol/L 盐酸胍、40 mmol/L TCEP 条件下还原变性不同时间(0、1、5、10 min),加入过量 AEMTS 终止反应。 上图为 AUT 检测结果,左下图为酶活性检测结果,右下图为质谱检测结果。N,天然态 RNase A;R-AEMTS,AEMTS 标记的还原变性态 RNase A。N和 R-AEMTS 在质谱图中用竖虚线标出。

Reductive unfolding of RNase A had been carried out at 23°C, 6 mol/L GdnHCl, 40 mmol/L TCEP and different pH (pH 2 (A) and pH 6.5 (B)) for different time (0, 1, 5, 10 min), quenched by AEMTS. All samples were detected by AUT gels (upper panel in each group), MALDI-TOF-MS (lower left panel in each group) and enzyme activity (lower right panel in each group). N, native RNase A; R-AEMTS, fully reduced RNase A blocked by AEMTS. N and R-AEMTS are labeled with vertical dotted lines.

2.2 AUT 电泳检测 RNase A 还原变性过程折叠中间体

将 RNase A 在 23℃、pH 2、6 mol/L 盐酸胍、40 mmol/L

TCEP 条件下还原变性不同时间(0 s, 50 s, 5 min, 10 min, 25 min, 12 h), 加入过量 DTT[∞] 反应 10 min 终止还原变性反应, 以

获得不同成分配比的保留游离巯基的 RNase A 还原变性过程 折叠中间体。使用 AUT 电泳并结合 MS 技术对所得中间体的 变化情况进行检测分析,结果如图 3 所示:AUT 结果显示,还 原变性过程中出现明显的分立条带(最多时显示 11 条),反应 50 s 时仅出现部分分立条带,反应 5 min 时 R 存在较少,反应 10 min 时 N 基本消失,反应 25 min 时仅存在部分分立条带,至 反应 12 h 时已仅存在 R 条带; 经 AEMTS 标记后仍呈现分立 条带,部分条带泳动速度快于 N。MS 结果显示,还原变性过程 中出现明显的 AEMTS 部分标记的 RNase A,反应 50 s 时以 N 和 3ss 为主要峰位,反应 5 min 时以 N、3ss、2ss 为主要峰位,反 应 10 min 时以 1ss-3ss 为主要峰位,反应 25 min 时以 1ss 和 R 为主要峰位,至反应 12 h 时已仅存在 R 峰位。可见,AUT 电泳 结果与 MS 检测结果相符,而且可以很好地区分保留游离巯基 的 RNase A 还原变性过程折叠中间体的变化。



图 3 RNase A 还原变性过程折叠中间体检测

Fig. 3 Detection of native folding intermediates of RNase A by AUT gels and MALDI-TOF-MS

RNase A 在 23℃、pH 2、6 mol/L 盐酸胍、40 mmol/L TCEP 条件下还原变性不同时间(0 s, 50 s, 5 min, 10 min, 25 min, 12 h),加入过量 DTT[∞] 终止反 应,获得保留游离巯基的 RNase A 还原变性过程折叠中间体。A 图为 AUT 检测保留游离巯基的 RNase A 还原变性过程折叠中间体结果,B 图为 AUT 检测 AEMTS 标记后的 RNase A 还原变性过程折叠中间体结果,C 图为质谱检测结果。N,天然态 RNase A;R,还原变性态 RNase A; R-AEMTS,AEMTS 标记的还原变性态 RNase A。N 和 R-AEMTS 在质谱图中用竖虚线标出。

Native folding intermediates of RNase A were prepared by the partial reductive unfolding of RNase A with GdnHCl and TCEP for different reaction time (0 s, 50 s, 5 min, 10 min, 25 min, 12 h), and detected by AUT gels, blocked by AEMTS (B) or not (A), and by MALDI-TOF-MS (C). N, native RNase A; R, fully reduced RNase A; R-AEMTS, fully reduced RNase A blocked by AEMTS. N and R-AEMTS are marked with vertical dotted lines.

2.3 HPLC 分离 RNase A 还原变性过程折叠中间体

RNase A 含有 4 对二硫键,随着还原变性反应的进行,被还原的二硫键数目逐渐增多,依次生成 4ss (N)→3ss→2ss→1ss→0ss (R)五大类中间体。不同大类的中间体被 AEMTS 标记的巯基数目不同,通过 MS 检测可以大致判断其所含的二硫键数目。HPLC 是分离与分析蛋白质氧化折叠中间体的经典技术。使用反相 HPLC 分离检测保留游离巯基的 RNase A 变性过程折叠中间体,对反相 HPLC 分离后收集的各色谱峰样品进行AEMTS 标记后 MS 检测,结果如图 4B 所示,出现明显的 13 个色谱峰。理论上,RNase A 还原变性后可以产生 R 和 14 种含天然二硫键的折叠中间体(4 种 3ss、6 种 2ss、4 种 1ss),所以 13 个色谱峰应该包含 16 种单体成分(包含 N),部分色谱峰含有多个单体。

峰 1 不能被 AEMTS 标记,为天然态 RNase A(4ss/N);峰 2、3、5、8 均标记 2 个 AEMTS,属于 3ss;峰 4、6、9 均标记 4 个 AEMTS,属于 2ss;峰 7、11、12 均标记 6 个 AEMTS,属于 1ss; 峰 13 标记 8 个 AEMTS,为还原变性态 RNase A(0ss/R);峰 9 和峰 10 的连接部分(9-10)和峰 10 前部分(10-1)均标记 4 个 AEMTS,峰 10 后部分(10-2)则明显地含有 4 个和 6 个 AEMTS标记,表明峰 10 同时含有 2ss 和 1ss。反相 HPLC 图谱 中,峰 6、峰 9 明显可见双叠峰,表明均含有至少两种 2ss。

2.4 RNase A 还原变性过程折叠中间体在 AUT 电泳中解析

对 HPLC 分离的 RNase A 变性过程折叠中间体分别进行 AUT 电泳检测,相应的整体分布如图 5A 所示。为便于表述,各 分立条带的分布位置分别用 a-k 表示,其中 h 带和 i 带没有明 显界限,以 i 带表示该范围内 h 带以外的弥散条带。通过对反 相 HPLC 各色谱峰样品进行超滤浓缩,经不同处理(不烷化、 AEMTS 烷化、脉冲还原)后 AUT、MS 检测不同色谱峰所含折 叠中间体单体,结果如图 5B-E 所示:

4ss、3ss 单体分析结果如图 5B-E(左)所示:峰 1、2、5、3、8 分别表示为 N、3ss-I、3ss-II、3ss-II、3ss-IV;AEMTS 烷化后, 3ss-I、3ss-II 的泳动速度快于 N,表明 3ss-I、3ss-II 在 AUT 胶中 空间体积与 N 接近,由于 AEMTS 可以标记 3ss-I、3ss-II 中的游 离巯基,而不能标记 N,使得 3ss-I、3ss-II 所带正电荷数多于 N, 从而其泳动速度较 N 更快。脉冲还原样品 AUT 结果(图 5D 左)显示,3ss-III、3ss-IV 基本不能耐受脉冲还原,而 3ss-I、3ss-II 可以有效耐受脉冲还原,并且 3ss-I 较 3ss-II 耐受性更强。表明, 3ss-I、3ss-II 具有较紧密的稳定结构,这与文献^[2,13]中 des[65-72] 和 des[40-95]中间体性质一致;3ss-III、3ss-IV 基本不具备稳定 结构,这与文献^[2]中 des[26-84]和 des[58-110]中间体性质一致。

2ss 单体分析结果如图 5B-E(中)所示:各 2ss 大类中间体

分别表示为 2ss-I、2ss-II、2ss-III、2ss-IV、2ss-V、2ss-VI, 且在 AUT 中相应条带分布位置处标出(图 5B 中)。2ss-II 在 AUT 胶 中空间体积与 N 接近,经 AEMTS 标记后,在更多正电荷的驱 动下泳动速度快于 N。脉冲还原样品 AUT 结果(图 5D 中)显 示,各中间体均不能耐受脉冲还原,表明其均不具有稳定结构, 这与文献^[2,4]中 2ss 中间体性质一致。



图 4 RNase A 还原变性折叠中间体的 HPLC 分离和二硫键数质谱分类检测

Fig. 4 Chromatographic separation by reversed-phase HPLC (A) and classification by MALDI-TOF-MS (B) of species of native folding intermediates of RNase A

A 图为 RNaseA 还原变性折叠中间体的 HPLC 分离图谱,分离的 13 个主峰分别用阿拉伯数字标出,其中 9-10 表示峰 9 和峰 10 重叠部分,10-1 表示峰 10 前半部分,10-2 表示峰 10 后半部分。B 图为 RNase A 还原变性折叠中间体(未超滤浓缩)所含二硫键数目的质谱分类结果,其中阿拉伯数字对应 A 图峰位,括号内容表示对应峰位中间体的类型 nss(含有 n 对天然二硫键)。N,天然态 RNase A;R,还原变性态 RNase A;R-AEMTS, AEMTS 标记的还原变性态 RNase A。N 和 R-AEMTS 在质谱图中用竖虚线标出。

In (A), chromatographic peaks are labeled by Arabic numerals. In (B), classifications of species of native folding intermediates of RNase A are indicated in brackets, corresponding to respective peaks. 9-10, the overlap of peak 9 and peak 10; 10-1, the former part of peak 10; 10-2, the later part of peak 10. N, native RNase A; nss, folding intermediates of RNase A with n native disulfide bonds; R, fully reduced RNase A; R-AEMTS, fully reduced RNase A blocked by AEMTS. N and R-AEMTS are labeled with vertical dotted lines.

1ss、0ss 单体分析结果如图 5B-E(右)所示:1ss-(I-IV)、R 在 AUT 中相应条带分布位置处标出(图 5B 右),1ss-IV 烷化后可 与 R 迁移至相同位置,在未烷化情况下 1ss-I 和 1ss-III 泳动位 置很接近,但是烷化后 1ss-I 泳动速度快于 1ss-III,表明在 AUT 胶中 1ss-I 空间体积略小于 1ss-III。脉冲还原样品 AUT 结果 (图 5D 右)显示,各 1ss 单体均不能耐受脉冲还原,表明其均不 具有稳定结构,这与文献^[2]中 1ss 中间体性质一致。

2.5 RNase A 还原变性过程折叠中间体的特征鉴定

RNase A 氧化折叠过程与折叠中间体的二硫键配对方

式直接相关^[2],进一步通过 3ss 折叠中间体不完全还原变性的 AUT 凝胶电泳检测和各单体胰酶酶切后质谱检测,对所获得的 RNase A 还原变性过程折叠中间单体进行二硫键配对方式鉴 定,结果如表 1 所示。为便于表述,以(X-Y)表示二硫键 CysX-CysY,以(X/Y)表示二硫键 CysX-CysY 被还原为游离巯基。

结果显示,3ss-(I-IV)中已还原的二硫键分别为 Cys65-Cys72、Cys40-Cys95、Cys26-Cys84、Cys58-Cys110,与前面预测 结果一致,AUT 中泳动速度依次减慢;2ss-(I-VI)中保留的二硫 键分别为 Cys40-Cys95 和 Cys58-Cys110、Cys26-Cys84 和 Cys58-Cys110、Cys65-Cys72 和 Cys58-Cys110、Cys40-Cys95 和 Cys26-Cys84、Cys65-Cys72 和 Cys40-Cys95、Cys65-Cys72 和 Cys26-Cys84,AUT 中泳动速度顺序依次为 2ss-II > 2ss-IV > 2ss-II ≈ 2ss-VI > 2ss-V; 1ss-(I-IV)中保留的二硫键分 别为 Cys58-Cys110、Cys40-Cys95、Cys26-Cys84、Cys65-Cys72,

AUT 中泳动速度顺序依次为 1ss-II≈1ss-III>1ss-II>1ss-IV。所 有含天然二硫键的 RNase A 折叠中间体在 AUT 中的泳动速度 顺序依次为 N>3ss-I≈3ss-II>2ss-II>3ss-III>2ss-I≈3ss-IV> 2ss-IV >2ss-III ≈2ss-VI >1ss-I ≈1ss-III >2ss-V ≈1ss-II > 1ss-IV>R。





A 图为含天然二硫键的 RNase A 折叠中间体在 AUT 电泳检测中的整体位置分布图(M),B 图为含天然二硫键的 RNase A 折叠中间体单体在 AUT 电泳检测中的位置分布图,C 图为 AEMTS 标记后的含天然二硫键的 RNase A 折叠中间体单体在 AUT 电泳检测中的位置分布图,D 图为脉 冲还原后的含天然二硫键的 RNase A 折叠中间体单体在 AUT 电泳检测中的位置分布图,E 图为超滤浓缩后含天然二硫键的 RNase A 折叠中间 体单体质谱检测结果。其中,阿拉伯数字对应图 4 峰位,英文字母对应 AUT 电泳中的条带位置,罗马数字表示具体的折叠中间体分类。N,天然 态 RNase A;R,还原变性态 RNase A;R-AEMTS,AEMTS 标记的还原变性态 RNase A,折叠中间体单体 nss 表示含有 n 对天然二硫键。N 和 R-AEMTS 在质谱图中用竖虚线标出。

(A) Discrete bands of native folding intermediates of RNase A displayed in AUT gels are labeled by lowercase letters (a-k), respectively. After ultrafiltration, species of native folding intermediates of RNase A blocked by AEMTS (C) or not (B), or treated by pulse reduction (D) were all tested by AUT gels, and all ultrafiltration samples were verified by MALDI-TOF-MS (E). Informations related to species of native folding intermediates of RNase A (represented by Roman numerals), including peak numbers of HPLC, numbers of disulfide bonds, and band positions in AUT gels, are indicated in detail. M, markers consisting of native disulfide species of folding intermediates of RNase A; N, native RNase A; R-AEMTS, fully reduced RNase A blocked by AEMTS. N and R-AEMTS are labeled with vertical dotted lines.

Position of bands	Component (monomer)	Disulfide bonds			
k	0ss (R)	(65/72)	(40/95)	(26/84)	(58/110)
j	1ss-IV	(65-72)	(40/95)	(26/84)	(58/110)
i	1ss-II	(65/72)	(40-95)	(26/84)	(58/110)
i	2ss-V	(65-72)	(40-95)	(26/84)	(58/110)
h	1ss-III	(65/72)	(40/95)	(26-84)	(58/110)
h	1ss-I	(65/72)	(40/95)	(26/84)	(58-110)
g	2ss-VI	(65-72)	(40/95)	(26-84)	(58/110)
g	2ss-III	(65-72)	(40/95)	(26/84)	(58-110)
f	2ss-IV	(65/72)	(40-95)	(26-84)	(58/110)
e	3ss-IV	(65-72)	(40-95)	(26-84)	(58/110)
e	2ss-I	(65/72)	(40-95)	(26/84)	(58-110)
d	3ss-III	(65-72)	(40-95)	(26/84)	(58-110)
c	2ss-II	(65/72)	(40/95)	(26-84)	(58-110)
b	3ss-II	(65-72)	(40/95)	(26-84)	(58-110)
b	3ss-I	(65/72)	(40-95)	(26-84)	(58-110)
a	4ss (N)	(65-72)	(40-95)	(26-84)	(58-110)

表 1 含天然二硫键的 RNase A 折叠中间体二硫键配对方式鉴定及其在 AUT 电泳检测中的位置分布表

Table 1 Distribution of native disulfide species of folding intermediates of RNase A in AUT gels

Note: Native disulfide bonds are highlighted by the grey background.

3 讨论

含有天然二硫键的 RNase A 折叠中间体含有丰富的天然 二硫键信息,对于研究二硫键在 RNase A 结构与折叠中的作用 非常重要。但是目前,除了对 des [65-72]^[15:2]、des [40-95] ^[15,18,20,21,23-25]、des[26-84]^[15,18,19,26]、des[58-110]^[15,18,19,26]折叠中间体进行 了较为详细的研究之外,其他含天然二硫键的折叠中间体研究 甚少,主要原因在于它们大多在折叠中间体中占比很低而难以 大量富集^[2,13,26-29],以及与其他含有非天然二硫键的折叠中间体 混合存在而难以有效分离^[30,31]。结合反相 HPLC、MS 技术,实现 了对 RNase A 变性过程折叠中间体各单体的分离和独立性检 测,该类中间体含有正确配对的二硫键,因此对于研究 RNase A 折叠过程中的关键中间体具有重要的研究价值。

从 RNase A 还原变性过程出发,分离得到了所有含天然二 硫键的 RNase A 折叠中间体,并进行了具体二硫键类型的鉴 定。AUT 凝胶属于强变性环境,可以通过观察 AUT 电泳中各 具体中间体的分布位置,分析比较相应二硫键所引入构象熵 (conformational entropy)的熵减作用,从而研究不同天然二硫 键对 RNase A 结构的单独稳定作用及协同稳定作用。中间体分 布位置越接近 R,其所含二硫键引入的构象熵减值越小;越接 近 N,其引入的构象熵减值越大。

从各中间体在 AUT 中的分布情况(表 1)分析:对 1ss 而 言,各天然二硫键所引入的构象熵减值由大到小顺序为 (58-110)≈(26-84)>(40-95)>>(65-72);对 2ss 而言,各中间 体二硫键协同作用引入的构象熵减值由大到小顺序为(26-84, 58-110)>(40-95, 58-110)>(40-95, 26-84)>(65-72, 58-110) ≈(65-72, 26-84)>(65-72, 40-95);对 3ss 而言,各中间体二硫 键协同作用引入的构象熵减值由大到小顺序为(40-95, 26-84, 58-110)≈(65-72, 26-84, 58-110)>>(65-72, 40-95, 58-110)> (65-72, 40-95, 26-84);对 1-3ss 而言,部分中间体其所含二硫键 协同作用引入的构象熵减值由大到小顺序为(58-110)> (26-84)>(65-72, 40-95)≈(40-95),以及(40-95, 26-84, 58-110)≈(65-72, 26-84, 58-110)>(26-84, 58-110)>(65-72, 40-95, 58-110)>(40-95, 58-110)≈(65-72, 40-95, 26-84)> (40-95, 26-84)。

可见,不同二硫键构象熵减作用程度不同,导致不同大类 中间体在 AUT 中分布差异很大,甚至出现明显的大类间交叉。 二硫键 (58-110) 和 (26-84) 构象熵减作用明显强于二硫键 (40-95)和(65-72),单一二硫键(58-110)或(26-84)所引入的构 象熵减作用甚至强于二硫键(40-95)和(65-72)的协同构象熵减作 用,在(58-110)和(26-84)的强协同构象熵减作用下二硫键(65-72) 和(40-95)在协同构象熵减作用中的贡献已没有明显差别。

AUT 电泳可以比较全面地反映不同二硫键所引入的单独 构象熵减作用及协同构象熵减作用,从而为研究二硫键对 RNase A 结构的稳定作用提供更丰富、有效的信息。3ss 中间体 在 AUT 中的分布结果显示,在多对二硫键协同构象熵减作用 下,不同二硫键构象熵减值贡献(58-110)>(26-84)>> (40-95)≈(65-72),与文献^{II5]}中不同 3ss 中间体稳定性差异完 全相符,表明二硫键的构象熵减作用对稳定 RNase A 结构非常 重要,尤其是二硫键(58-110)和(26-84)。

HPLC 具有自动化、分离效果好、样品可回收等优点,不过 单样品检测时长一般 1-2 h,仪器及色谱柱成本较为昂贵,且需 要定期的维护和保养,仪器操作也较为复杂和专业;AUT凝胶 电泳操作简便、快捷、检测通量较高,使用4板胶同时电泳约3 h即可检测多达60个样品,检测全程只需进行一次电压变换 和胶的染色、脱色处理而不需要进行其他复杂的操作。AUT凝 胶电泳基于蛋白分子量、空间体积及所带正电荷数的综合差异 对碱性蛋白质实现分离,可以有效区分不同 RNase A 折叠中间 体,分离效果与反相 HPLC 相当,很好地弥补了质谱检测不能 分辨含相同二硫键数目的 RNase A 折叠中间体具体成分以及 AEMTS标记样品在离子化过程中存在少部分标记基团巯基断 裂现象而出现次级质谱峰^[22,33]的缺点。此外,AUT凝胶电泳不 仅可以检测 RNase A 的折叠中间体,也可以用于其他碱性蛋白 的折叠中间体检测,如溶菌酶等,还可以用于分析二硫键的构 象熵减作用、后续的 western blot 以及胶内酶切检测等。综上, AUT 电凝胶泳与 HPLC、质谱检测原理不同,三种技术可以相 互补充,共同应用于 RNase A 的折叠机制研究。

参考文献(References)

- Anfinsen CB, Haber E. Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds[J]. J Biol Chem, 1961, 236: 1361-1363
- [2] Wedemeyer WJ, Welker E, Narayan M, et al. Disulfide bonds and protein folding[J]. Biochemistry, 2000, 39(15): 4207-4216
- [3] Waterborg JH. Acid-urea-Triton polyacrylamide gels for histones[A]. In: Walker JM. The Protein Protocols Handbook[M]. Totowa NJ: Humana Press Inc, 1996: 91-100
- [4] Bonner WM, West MH, Stedman JD. Two-dimensional gel analysis of histones in acid extracts of nuclei, cells, and tissues [J]. Eur J Biochem, 1980, 109(1): 17-23
- [5] Clarke DJ, O'Neill LP, Turner BM. Selective use of H4 acetylation sitesintheyeastSaccharomycescerevisiae [J].Biochem J, 1993, 294(Pt 2): 557-561
- [6] Arts J, Lansink M, Grimbergen J, et al. Stimulation of tissue-type plasminogen activator gene expression by sodium butyrate and trichostatin A in human endothelial cells involves histone acetylation [J]. Biochem J, 1995, 310(Pt 1): 171-176
- [7] Kölle D, Brosch G, Lechner T, et al. Different types of maize histone deacetylases are distinguished by a highly complex substrate and site specificity[J]. Biochemistry, 1999, 38(21): 6769-6773
- [8] Bruice TW, Kenyon GL. Novel alkyl alkanethiolsulfonate sulfhydryl reagents. Modification of derivatives of Lcysteine[J]. J Protein Chem, 1982, 1(1): 47-58
- [9] Von Kieseritzky F, Hellberg J. dl-BiTOT-a novel building block for electroactive oligomers and polymers in semiconductor applications
 [J]. Synthesis-Stuttgart, 2002, 2002(8): 1004-1006
- [10] Welker E, Hathaway L, Scheraga HA. A new method for rapid characterization of the folding pathways of multidisulfide-containing proteins[J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(12): 3720-3721
- Blackburn P, Wilson G, Moore S. Ribonuclease inhibitor from human placenta. Purification and properties[J]. J Biol Chem, 1977, 252(16): 5904-5910
- [12] Thannhauser TW, Sherwood RW, Scheraga HA. Determination of the cysteine and cystine content of proteins by amino acid analysis: application to the characterization of disulfide-coupled folding intermediates[J]. J Protein Chem, 1998, 17(1): 37-43

- [13] Rothwarf DM, Li YJ, Scheraga HA. Regeneration of bovine pancreatic ribonuclease A: detailed kinetic analysis of two independent folding pathways[J]. Biochemistry, 1998, 37(11): 3767-3776
- [14] English BP, Welker E, Narayan M, et al. Development of a novel method to populate native disulfide-bonded intermediates for structural characterization of proteins: implications for the mechanism of oxidative folding of RNase A[J]. J Am Chem Soc, 2002, 124(18): 4995-4999
- [15] Klink TA, Woycechowsky KJ, Taylor KM, et al. Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(2): 566-572
- [16] Talluri S, Rothwarf DM, Scheraga HA. Structural characterization of a three-disulfide intermediate of ribonuclease A involved in both the folding and unfolding pathways[J]. Biochemistry, 1994, 33(34): 10437-10449
- [17] Shimotakahara S, Rios CB, Laity JH, et al. NMR structural analysis of an analog of an intermediate formed in the rate-determining step of one pathway in the oxidative folding of bovine pancreatic ribonuclease A: automated analysis of 1H, 13C, and 15N resonance assignments for wild-type and [C65S, C72S] mutant forms[J]. Biochemistry, 1997, 36(23): 6915-6929
- [18] Laity JH, Shimotakahara S, Scheraga HA. Expression of wild-type and mutant bovine pancreatic ribonuclease A in Escherichia coli [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(2): 615-619
- [19] Ruoppolo M, Vinci F, Klink TA, et al. Contribution of individual disulfide bonds to the oxidative folding of ribonuclease A[J]. Biochemistry, 2000, 39(39): 12033-12042
- [20] Li YJ, Rothwarf DM, Scheraga HA. Mechanism of reductive protein unfolding[J]. Nat Struct Biol, 1995, 2(6): 489-494
- [21] Iwaoka M, Wedemeyer WJ, Scheraga HA. Conformational unfolding studies of three-disulfide mutants of bovine pancreatic ribonuclease A and the coupling of proline isomerization to disulfide redox reactions [J]. Biochemistry, 1999, 38(9): 2805-2815
- [22] Iwaoka M, Juminaga D, Scheraga HA. Regeneration of three-disulfide mutants of bovine pancreatic ribonuclease A missing the 65-72 disulfide bond: characterization of a minor folding pathway of ribonuclease A and kinetic roles of Cys65 and Cys72 [J]. Biochemistry, 1998, 37(13): 4490-4501
- [23] Laity JH, Lester CC, Shimotakahara S, et al. Structural characterization of an analog of the major rate-determining disulfide folding intermediate of bovine pancreatic ribonuclease A [J]. Biochemistry, 1997, 36 (42): 12683-12699
- [24] Pearson MA, Karplus PA, Dodge RW, et al. Crystal structures of two mutants that have implications for the folding of bovine pancreatic ribonuclease A[J]. Protein Sci, 1998, 7(5): 1255-1258
- [25] Laity JH, Montelione GT, Scheraga HA. Comparison of local and global stability of an analogue of a disulfide-folding intermediate with those of the wild-type protein in bovine pancreatic ribonuclease A: identification of specific regions of stable structure along the oxidative folding pathway[J]. Biochemistry, 1999, 38(50): 16432-16442
- [26] Welker E, Narayan M, Volles MJ, et al. Two new structured intermediates in the oxidative folding of RNase A[J]. FEBS Lett, 1999, 460(3): 477-479 (下转第 2818 页)

nases: Diverse and Complex Roles in Development and Disease [J]. Current Topics in Developmental Biology, 2017, 123: 73-103

- [7] Rodriguez-Gil A, Ritter O, Hornung J, et al. HIPK family kinases bind and regulate the function of the CCR4-NOT complex [J]. Molecular Biology of the Cell, 2016, 27(12): 1969-1980
- [8] Kuwano Y, Nishida K, Akaike Y, et al. Homeodomain-Interacting Protein Kinase-2: A Critical Regulator of the DNA Damage Response and the Epigenome [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(10): 1638
- [9] Choi J R, Shin K S, Choi C Y, et al. PARP1 regulates the protein stability and proapoptotic function of HIPK2 [J]. Cell Death & Disease, 2016, 7(10): e2438
- [10] He P, Yu Z J, Sun C Y, et al. Knockdown of HIPK2 attenuates the pro-fibrogenic response of hepatic stellate cells induced by TGF-beta1[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 85: 575-581
- [11] Li R, Zhang L M, Sun W B. Erythropoietin rescues primary rat cortical neurons from pyroptosis and apoptosis via Erk1/2-Nrf2/Bach1 signal pathway[J]. Brain Research Bulletin, 2017, 130: 236-244
- [12] Li X, Wu Z, Zhang Y, et al. Activation of Autophagy Contributes to Sevoflurane-Induced Neurotoxicity in Fetal Rats [J]. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2017, 10: 432
- [13] Zhou X, Lu D, Li W D, et al. Sevoflurane Affects Oxidative Stress and Alters Apoptosis Status in Children and Cultured Neural Stem Cells[J]. Neurotoxicity Research, 2017(Suppl 1): 1-11
- [14] Song R, Ling X, Peng M, et al. Maternal Sevoflurane Exposure Causes Abnormal Development of Fetal Prefrontal Cortex and Induces Cognitive Dysfunction in Offspring [J]. Stem Cells Int, 2017, 2017(23): 6158468
- [15] Xiao X, Zhu Y, Bu J, et al. The autophagy inhibitor 3-methyladenine restores sevoflurane anesthesiainduced cognitive dysfunction and neurons apoptosis [J].Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 72(4): 214-218
- [16] Qin J H, Zhang X R, He L, et al. Effect of sevoflurane and halothane anesthesia on cognitive function and immune function in young rats
 [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2018, 25(1): 47-51
- [17] Chen X, Zhou X, Yang L, et al. Neonatal Exposure to Low-Dose

(上接第 2813 页)

- [27] Xu X, Rothwarf DM, Scheraga HA. Nonrandom distribution of the one-disulfide intermediates in the regeneration of ribonuclease A[J]. Biochemistry, 1996, 35(20): 6406-6417
- [28] Volles MJ, Xu X, Scheraga HA. Distribution of disulfide bonds in the two-disulfide intermediates in the regeneration of bovine pancreatic ribonuclease A: further insights into the folding process[J]. Biochemistry, 1999, 38(22): 7284-7293
- [29] Rothwarf DM, Scheraga HA. Regeneration of bovine pancreatic ribonuclease A. 1. Steady-state distribution [J]. Biochemistry, 1993, 32 (10): 2671-2679
- [30] Arai K, Kumakura F, Iwaoka M. Characterization of kinetic and thermodynamic phases in the prefolding process of bovine pancreatic ri-

(1.2%) Sevoflurane Increases Rats' Hippocampal Neurogenesis and Synaptic Plasticity in Later Life [J]. Neurotoxicity Research, 2018: 1-10

- [18] Park J W, Lim M S, Ji S Y, et al. Effects of short-term exposure to sevoflurane on the survival, proliferation, apoptosis, and differentiation of neural precursor cells derived from human embryonic stem cells[J]. Journal of Anesthesia, 2017, 31(6): 821-828
- [19] Scaglione A, Monteonofrio L, Parisi G, et al. Effects of Y361-autophosphorylation on structural plasticity of the HIPK2 kinase domain
 [J]. Protein Science A Publication of the Protein Society, 2018, 27(3): 725-737
- [20] Tan X, Tang H, Bi J, et al. MicroRNA-222-3p associated with Helicobacter pylori targets HIPK2 to promote cell proliferation, invasion and inhibits apoptosis in gastric cancer [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2017[Epub ahead of print]
- [21] Choi J R, Lee S Y, Shin K S, et al. p300-mediated acetylation increased the protein stability of HIPK2 and enhanced its tumor suppressor function[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 16136
- [22] Verdina A, Rocco G D, Virdia I, et al. HIPK2-T566 autophosphorylation diversely contributes to UV- and doxorubicin-induced HIPK2 activation[J]. Oncotarget, 2017, 8(10): 16744-16754
- [23] Baldari S, Garufi A, Granato M, et al. Hyperglycemia triggers HIPK2 protein degradation[J]. Oncotarget, 2016, 8(1): 1190-1203
- [24] Mancini F, Pieroni L, Monteleone V, et al. MDM4/HIPK2/p53 cytoplasmic assembly uncovers coordinated repression of molecules with anti-apoptotic activity during early DNA damage response [J]. Oncogene, 2016, 35(2): 228-240
- [25] Upadhyay M, Bhadauriya P, Ganesh S. Heat shock modulates the subcellular localization, stability, and activity of HIPK2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 472(4): 580-584
- [26] Fan Y, Wang N, Chuang P, et al. Role of HIPK2 in kidney fibrosis[J]. Kidney International Supplements, 2014, 4(1): 97-101
- [27] Zhao Y X, Zhang G Y, Wang A Y, et al. Role of Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2 in the Pathogenesis of Tissue Fibrosis in Keloid-Derived Keratinocytes[J]. Annals of Plastic Surgery, 2017, 79 (6): 546-551

bonuclease A coupled with fast SS formation and SS reshuffling[J]. Biochemistry, 2010, 49(49): 10535-10542

- [31] Iwaoka M, Kumakura F, Yoneda M, et al. Direct observation of conformational folding coupled with disulphide rearrangement by using a water-soluble selenoxide reagent--a case of oxidative regeneration of ribonuclease A under weakly basic conditions [J]. J Biochem, 2008, 144(1): 121-130
- [32] Thannhauser TW, Rothwarf DM, Scheraga HA. Kinetic studies of the regeneration of recombinant hirudin variant 1 with oxidized and reduced dithiothreitol[J]. Biochemistry, 1997, 36(8): 2154-2165
- [33] Beavis RC, Chait BT. Factors affecting the ultraviolet laser desorption of proteins [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1989, 3 (7): 233-237