

辣根过氧化物酶的热稳定剂

毛新焕^{1,2}, 李响², 王姗姗², 张文静², 曾成鸣¹

1 陕西师范大学化学与材料科学学院, 西安 710062

2 陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062

摘要: 保持酶的天然状态和高催化特性具有重要的意义。本研究筛选了辣根过氧化物酶(HRP)的稳定剂并研究了其作用机制。结果发现硫酸镁和明胶能够显著提高 HRP 的热稳定性, 并且两者具有协同作用。在硫酸镁和明胶组成的酶稳定剂存在的条件下, HRP 在 50°C 保温 80 h 后仍能保持 89% 的活性, 常温下存放 90 d 后可保持 57% 的活性, 而未加稳定剂的对照样品中 HRP 的残留活性分别为 6% 和小于 1%。通过对 HRP 的 Soret 带吸收光谱, 色氨酸内源荧光, ANS 荧光进行分析, 揭示酶稳定剂可以明显降低在加热条件下 HRP 的变性程度, 从而维持较为稳定的天然构象。

关键词: 辣根过氧化物酶, 稳定剂, Soret 带吸收光谱, 内源荧光, ANS 荧光

Stabilizers of horseradish peroxidase

Xinhuan Mao^{1,2}, Xiang Li², Shanshan Wang², Wenjing Zhang², and Chengming Zeng¹

1 College of Chemistry and Material Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

2 College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: Keeping an enzyme in its native form with high catalytic activity is of great significance. In the present study, thermal stabilizers of horseradish peroxidase (HRP) were screened. The results indicated that thermal stability of HRP was enhanced by magnesium sulphate and gelatin. A synergic effect of magnesium sulphate and gelatin was observed. In the presence of the stabilizer, the enzymatic activity of HRP remained 89% after kept for 80 h at 50°C and 57% for 90 days at room temperature. Thermal alterations of HRP structure in the absence and presence of the stabilizers were explored by using UV absorption spectra at 402 nm (Soret band), intrinsic fluorescence and 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid (ANS) fluorescence. The results suggested that magnesium sulphate and gelatin attenuated the extent of unfolding of HRP and therefore the native enzyme structure was stabilized.

Keywords: horseradish peroxidase, stabilizers, Soret band spectra, intrinsic fluorescence, ANS fluorescence

酶是一种可以特异地将某一反应的速率提高很多数量级的催化剂, 在生物医学、分析技术、工业及环境工程中应用极为广泛。在这些应用中, 酶需要在不同的条件下进行催化反应, 而这些环境通常不是酶发挥其天然功能的环境。影响酶在体外环境中发挥功能的一个主要限制因素是它的稳定性。所以, 如何尽可能保持酶在体外环境的稳定性和催化

效能是生物技术领域的一个极为重要的课题。目前采用的增加酶稳定性的策略主要包括: 使用具有稳定作用的添加剂, 用化学方法和蛋白质工程的方法进行衍生和结构改造, 以及各种固定化方法等^[1-4]。

辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7)是过氧化物酶家族研究最广泛的一种

Received: October 5, 2008; Accepted: January 5, 2009

Corresponding author: Chengming Zeng. Tel: +86-29-85303871; E-mail: chengmingzeng@snnu.edu.cn

酶。这种含有单个血红素的植物过氧化物酶分子量约为 44 kD, 可以作为生物合成和生物转化的试剂, 并广泛应用于酶分析、免疫测定以及废水处理等。目前已有许多用于提高 HRP 稳定性的方法, 但这些方法在应用于一些需要长期保持酶的高活性场合仍然具有一定的局限性, 如经皮检测 (Transdermal detection) 生物传感器^[5], 就对酶的稳定方法提出了更高的要求。本研究从金属盐和一些天然高分子化合物中筛选了 HRP 的稳定剂, 发现硫酸镁和明胶混合物能够显著提高 HRP 的热稳定性, 可以应用于 HRP 的吸附固定。本研究报道了该稳定剂的性能, 并对其作用机制进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

实验药品及试剂: 辣根过氧化物酶 (Type C)、3, 5, 3', 5'-四甲基联苯胺 (TMB)、8-苯胺基-1-萘磺酸 (ANS)、明胶 (Type A)、藻胶、肌醇及所有聚乙烯醇 (MW 600-20000) 购自美国 Sigma 公司, 其他均为分析纯试剂。

实验仪器: UV-2450 紫外分光光度计 (日本岛津公司), LS55 荧光分光光度计 (美国 Perkin-Elmer 公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品制备及酶活力测定

HRP 用双蒸水溶解 (0.11 $\mu\text{mol/L}$), 与作为酶稳定剂的各组分混溶后, 于 96 孔板中点样, 每孔中 HRP 的量为 0.25 μg , 在空气中干燥存放。在筛选试验中, 酶与酶稳定剂的重量比范围为 1:120~1000。酶活性测定时, 样品用 200 μL 20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.5) 溶解, 吸取 20 μL 样品溶液, 加入到磷酸盐缓冲溶液中, 再加入 TMB (1 mmol/L) 和 H_2O_2 (1 mmol/L) 各 100 μL 至总体积 500 μL , 混匀后立即于 650 nm 处测定反应 30 s 至 5 min 之间的反应进程曲线, 取 3 min 时的吸光值, 以含有等量新配制 HRP 的反应体系的吸光值为 100%, 计算酶的相对活性。上述反应体系在无 HRP 存在时, 5 min 内 TMB 在 650 nm 处的吸收值无明显变化。

1.2.2 吸收光谱 (Soret band)

用分光光度计在 360~450 nm 范围内扫描酶溶液 (HRP 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$), 记录 402 nm 处最大吸收

值的变化。

1.2.3 色氨酸荧光

用荧光分光光度计在 310~490 nm 范围内扫描酶溶液 (HRP 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$) 的内源荧光, 激发光波长为 295 nm, 此时色氨酸在 330 nm 处有最大荧光值。

1.2.4 ANS 荧光

用荧光分光光度计在 400~600 nm 范围内扫描外源荧光探针 ANS (0.15 mmol/L) 在 HRP (20 $\mu\text{mol/L}$) 存在下的发射光谱, 激发波长为 350 nm。ANS 在与蛋白质结合后, 最大发射波长发生蓝移, 荧光强度也随之改变, 由此可反映蛋白质疏水区域外露的程度。

2 结果与讨论

2.1 酶保护剂的筛选

本研究分别对十几种金属的氯化物、硫酸盐, 以及一些高分子化合物和其他小分子化合物进行了实验, 结果发现, 一些金属的硫酸盐、明胶、藻胶和聚乙烯醇对 HRP 具有一定的稳定作用。其中, 以硫酸镁和明胶的作用最强, 在 50°C 条件下空气中保存 80 h 后残余酶活性分别为 53% 和 75%, 而不加稳定剂的对照样品的酶活性仅为 6% (图 1A)。进一步的试验表明, 硫酸镁和明胶具有明显的协同作用, 所以选取硫酸镁和明胶的混合物作为 HRP 的稳定剂。

2.2 硫酸镁+明胶对 HRP 的稳定作用

图 1 显示了硫酸镁和明胶混合物对 HRP 热稳定性的增强作用。在 50°C 的空气中存放 80 h 后, 添加混合稳定剂的一组酶的相对活力仍然很高, 为 89% (图 1A)。在室温 (17°C~24°C) 的空气中长期存放时, 混合稳定剂对酶稳定作用更加明显。如图 1B 所示, 在存放 90 d 以后, 添加混合稳定剂的一组酶的相对活力为 57%, 添加明胶和硫酸镁的样品组的酶活性分别为 22% 和 15%, 而无添加剂的一组酶的相对活力几乎全部丧失。

2.3 HRP 的特征吸收光谱 (Soret band)

含有卟啉结构的蛋白质在 402 nm 附近具有特征吸收, 称为 Soret 带^[6]。当蛋白质高级结构发生改变时, Soret 带吸收通常会降低, 与之对应的是蛋白质的活性可能随之发生变化。如图 2 所示, 在无稳定剂存在的情况下, HRP 在经 60°C 孵育 24 h 后, 其

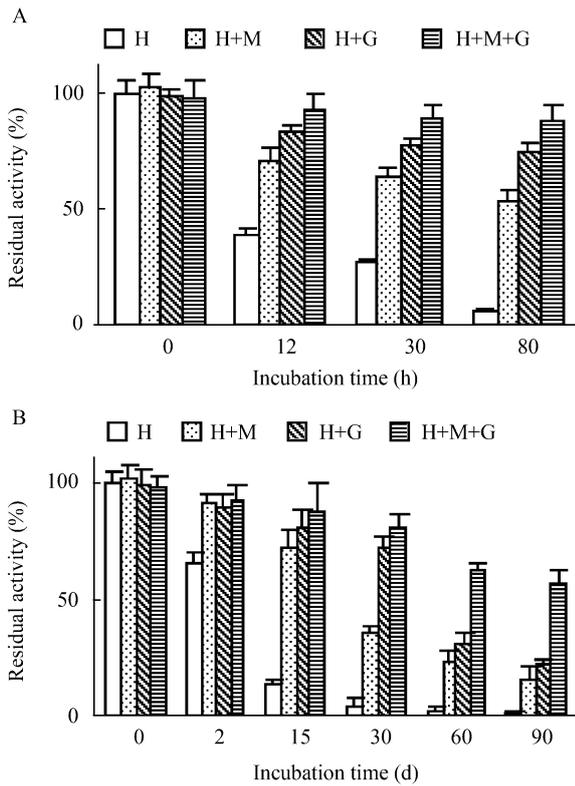


图 1 硫酸镁(M)、明胶(G)及其混合物(M+G)对 HRP(H)的稳定作用

Fig. 1 Relative activity of HRP (H) stored at 50°C for 80 h (A) and at room temperature for 90 days (B) in the presence and absence of stabilizers gelatin (G) and magnesium sulfide (M).

Soret 带吸收值下降了 66%，镁盐在此时对 HRP 的 Soret 带相关结构几乎无稳定作用，明胶有一定的稳定作用，而硫酸镁和明胶的混合物则能够在加热过程中保持 HRP 的 Soret 带特征吸收值不变，与新鲜配制的 HRP 样品基本上没有区别。

2.4 HRP 的内源荧光

蛋白质的内源荧光可在一定程度上反映其分子结构的特征，通过测定色氨酸荧光光谱的变化可以获取分子结构变化的信息。图 3 是在 70°C 条件下孵育 48 h 后 HRP 的内源荧光光谱图。未经孵育的 HRP 的色氨酸荧光在 340 nm 左右有一最大峰值(谱线 3e)，经孵育后，荧光峰发生红移，谱形发生变化，形成 M 型双峰(谱线 3a, 3b)，硫酸镁和混合稳定剂表现出一定的稳定相关结构的作用(谱线 3c, 3d)，而明胶与不加任何添加剂的 HRP 光谱基本相同(谱线 3a, 3b)。

色氨酸附近微环境极性的减小可导致其荧光峰蓝移，而极性增大时荧光峰则红移^[6]。从图 3 的结果可知，HRP 在加热条件下由于高级结构的变化使得原来处于分子内部的色氨酸残基外露，使色氨酸微

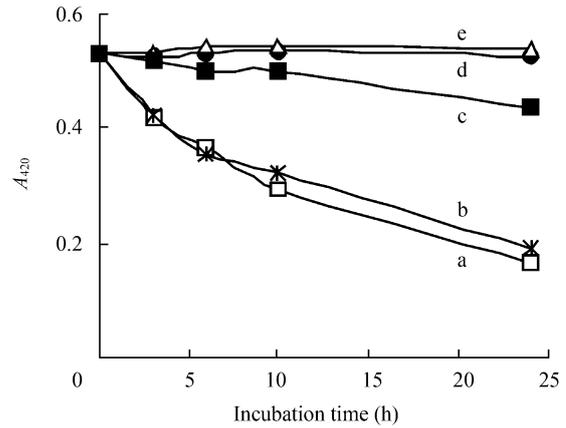


图 2 HRP 在 60°C 孵育 24 h 后 Soret 带(402 nm)吸收值的变化

Fig. 2 Soret band values (402 nm) of HRP incubated at 60°C in the presence and absence of stabilizers. a: H; b: H+M; c: H+G; d: H+M+G; e: H without incubation.

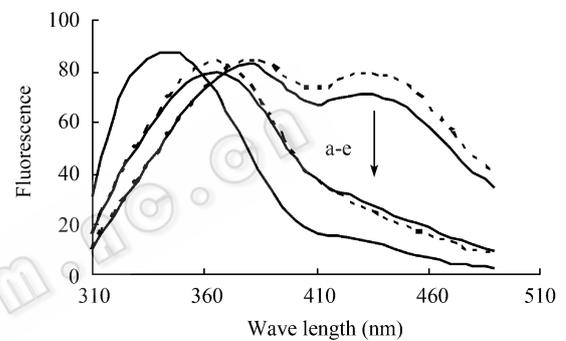


图 3 稳定剂对加热条件下 HRP 内源荧光光谱的影响

Fig. 3 Effect of stabilizers on intrinsic fluorescence of HRP incubated at 70°C for 48 h in the presence and absence of stabilizers. a: H; b: H+G; c: H+M; d: H+M+G; e: H without incubation.

环境的极性增大，荧光强度增加。添加硫酸镁和混合稳定剂的 2 组样品的荧光光谱的变化相对较小，说明硫酸镁和混合稳定剂具有稳定 HRP 分子结构，减小加热条件下色氨酸残基外露的作用。

2.5 ANS 荧光结果

ANS 是检测蛋白质疏水残基暴露程度的一种荧光探针^[7]。当蛋白质结构发生变化时，暴露于溶剂中的疏水残基增多，与之结合的 ANS 分子的荧光强度增大，荧光峰发生蓝移。如图 4 所示，作为对照(未加热处理)的 HRP 与 ANS 结合后，ANS 的荧光发射峰在 520 nm 处(图 4e)。HRP 在经 50 孵育 96 h (图 4) 后，ANS 荧光强度增加，荧光峰蓝移至 450 nm。添加硫酸镁和混合稳定剂的 2 组荧光峰与对照很相似，强度略高于对照；而添加明胶和不添加稳定剂的样品的 ANS 荧光光谱变化较大(图 4b, 4a)。

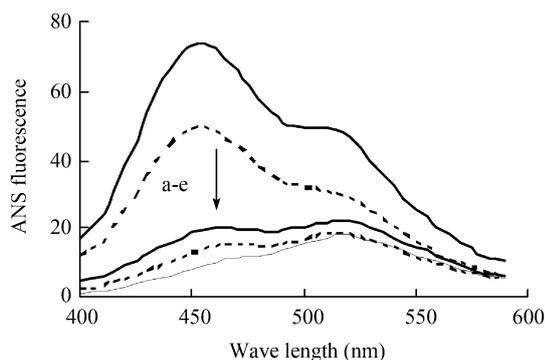


图4 稳定剂对 HRP 加热条件下的 ANS 荧光的影响
Fig. 4 Effect of stabilizers on fluorescence of ANS binding to HRP incubated at 50°C for 96 h in the presence and absence of stabilizers. a: H; b: H+G; c: H+M; d: H+M+G; e: H without incubation.

图4的ANS荧光结果表明,硫酸镁和混合稳定剂对加热条件下的HRP的分子结构有一定的稳定作用,能够降低HRP在热变性条件下的疏水区外露。这个结果与内源荧光测定结果相同。

将酶通过一定方式固定化,除了有利于重复使用,有效控制酶反应及产物分离以外,固定化本身就是一种使酶稳定的一种方法。有报道证实,在对酶进行吸附固定时,添加亲水性基质和高价阳离子化合物^[1]有利于酶的稳定性。在上述实验中,明胶和硫酸镁混合物可以显著提高HRP的热稳定性。明胶是一种富含赖氨酸、甘氨酸、脯氨酸的蛋白质,其多聚阳离子的胶质结构,加上少量甲硫氨酸提供的还原性环境,有利于HRP保持天然构象及其酶活性。硫酸镁的作用较为复杂。一方面,HRP需要金属离子以维持其天然构象^[8],镁离子的大小及其所具有的静电势能可能为HRP提供了最佳的环境;另一方面,金属离子可以改变HRP的表面自由能,在一定条件下可以使HRP的结构更加紧密^[9]。此外,在Hofmeister系列中,硫酸盐对蛋白质-水表面自由能的作用最强^[10],这与稳定剂筛选实验的结果是一致的。

HRP分子中,唯一的一个色氨酸残基(W140)处于酶活性中心附近^[8]。HRP在热变性时,W140由于多肽链去折叠而外露于极性环境,荧光强度增加,发射峰红移。同时由于蛋白质的疏水区外露而使ANS荧光增强,发射峰蓝移。复合稳定剂和硫酸镁

都能够明显地减小上述荧光光谱的改变,说明两者都能够减小HRP分子在热胁迫条件下疏水区外露,并且硫酸镁的作用是至关重要的。

Soret带是含有卟啉结构的蛋白质的特征吸收光谱,其变化与蛋白质卟啉结构活性中心的微环境变化有关。HRP在热变性时,卟啉活性中心的微环境发生变化,使Soret带的吸收降低。复合稳定剂和明胶能够明显地减小Soret带吸收光谱的改变,但硫酸镁对Soret带的变化几乎没有作用,可能与无机离子只能影响HRP分子的外部结构有关。

本研究表明,以明胶为基质,在硫酸镁的协同作用下,HRP在常温和热胁迫环境下的稳定性得到了极大的提高。其作用的主要机制是对蛋白质三维结构的稳定。该稳定剂在HRP和其他酶的固定化,特别是吸附固定技术中可能具有广泛的应用前景。

REFERENCES

- [1] Ó'Fágáin C. Enzyme stabilization—recent experimental progress. *Enzyme Microb Technol*, 2003, **33**: 137–149.
- [2] Kamal JKA, Behere DV. Kinetic stabilities of soybean and horseradish peroxidases. *Biochem Eng J*, 2008, **38**: 110–114.
- [3] Kim J, Grate JW, Wang P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem Eng Sci*, 2006, **61**: 1017–1026.
- [4] Kohda J, Kawanishi H, Suehara KI, et al. Stabilization of free and immobilized enzymes using hyperthermophilic chaperonin. *J Biosci Bioeng*, 2006, **101**: 131–136.
- [5] Chawarski MC, Fiellin DA, O'Connor PG, et al. Utility of sweat patch testing for drug use monitoring in outpatient treatment for opiate dependence. *J Subst Abuse Treat*, 2007, **33**: 411–415.
- [6] Chattopadhyay K, Mazumdar S. Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH. *Biochemistry*, 2000, **39**: 263–270.
- [7] Gasymov OK, Glasgow BJ. ANS fluorescence: Potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1774**: 403–411.
- [8] Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, et al. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Struct Biol*, 1997, **4**: 1032–1038.
- [9] Wiggins PM. Hydrophobic hydration, hydrophobic forces and protein folding. *Physica A*, 1997, **238**: 113–128.
- [10] Baldwin RL. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys J*, 1996, **71**: 2056–2063.