

硫酸铜诱导烟草多酚氧化酶抗变性的研究*

肖厚荣, 朱仁发, 徐小龙, 解永树, 刘清亮**

(中国科学技术大学化学系, 合肥 230026)

摘要: 为了进一步探讨外源铜与多酚氧化酶的相互作用, 通过酶活性测定, 荧光光谱和圆二色光谱 (CD) 对外源 Cu^{2+} 诱导烟草多酚氧化酶抗变性进行了研究. 荧光光谱结果表明, 没有外源铜存在的情况下, 盐酸胍诱导的烟草多酚氧化酶变性是一个二态过程, 烟草多酚氧化酶在 6 mol/L 盐酸胍中变性 5 min, 酶活性降至 18.6%, 变性 30 min 便彻底失活; 10.0 mmol/L 外源铜存在时, 盐酸胍诱导的烟草多酚氧化酶变性是一个三态过程, 上述相同盐酸胍浓度下变性相同时间, 酶的剩余活性分别为 60.6% 和 24.9%. CD 谱数据结果表明, 6 mol/L 盐酸胍中变性 30 min, 烟草 PPO 二级结构中 α -螺旋、反平行 β -折叠、 β -转角/平行 β -折叠、芳香残基和二硫键、无规卷曲/ γ -转角的百分含量分别为 1.1、3.8、3.3、7.5 和 84.3; 在 10.0 mmol/L Cu^{2+} 存在时, 上述相同变性条件下, 各种二级结构百分含量分别为 34.2、13.7、21.0、9.5 和 21.6. 适量外源铜可明显提高烟草多酚氧化酶结构的稳定性.

关键词: 硫酸铜; 多酚氧化酶; 荧光光谱; 圆二色光谱; 变性

中图分类号: O629.73 文献标识码: A

Studies on Cu^{2+} -induced Resistant-denaturation of PPO from *Nictiana Tobacum* *

Xiao Hourong, Zhu Renfa, Xu Xiaolong, Xie Yongshu, Liu Qingliang**

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract In order to investigate the interaction between exogenous Cu^{2+} and Polyphenol oxidase (PPO) from *Nictiana Tobacum*, the Cu^{2+} -induced resistant-denaturation against guanidine hydrochloride (Gdn-HCl) was studied by the following enzymatic activity assay, fluorescence spectroscopy and circular dichroism (CD). The results show that the GdnHCl-induced unfolding is a two-state process with no detectable intermediate state in the absence of exogenous Cu^{2+} , while the GdnHCl-induced unfolding in the presence of 10.0 mmol/L exogenous Cu^{2+} follows a three-state transition with an intermediate state, which results from the fact that Cu^{2+} increases the structural stability of native PPO and its intermediate. In terms of enzymatic activities, 6 mol/L GdnHCl makes PPO lose 81.4% of its original activity after 5 min, inactivate completely after 30 min, while in the presence of 10.0 mmol/L exogenous Cu^{2+} , only 39.4% and 75.1%, after 5 and 30 min respectively. According to the CD measurements, the relative average fractions of α -helix, anti-parallel β -sheet, β -turn/parallel β -sheet, aromatic residues and disulfide bond, and random coil/ γ -turn are 1.1%, 3.8%, 3.3%, 7.5% and 84.3%, respectively, in the 6.0 mol/L GdnHCl containing no CuSO_4 , but 34.2%, 13.7%, 21.0%, 9.5% and 21.6%, respectively, in the same concentration of Gdn-HCl containing 10mmol/L CuSO_4 .

Keywords Cu^{2+} , Polyphenol oxidase, Fluorescence spectroscopy, Circular dichroism, Unfolding

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (30270321).

** Corresponding author, E-mail: qliu@ustc.edu.cn Received 20 April 2004; in final form 10 September 2004.

1 引 言

多酚氧化酶(简称 PPO)是一类从真菌到哺乳动物中都广泛存在的铜蛋白,它们的共同特征是都有通过分子氧氧化多酚到醌的过程^[1],从而导致水果、蔬菜的褐变和营养损失.近年来,有文献利用多酚氧化酶氧化除去废水中的酚类污染物的^[2],但在分离、纯化和使用等过程中,不可避免地会造成多酚氧化酶的部分变性.因此,进行多酚氧化酶的抗变性研究具有重要的现实意义.荧光光谱法是研究生物大分子,特别是蛋白质与各种有机小分子、金属离子和无机化合物相互作用的重要手段.通过对荧光特征峰及其在不同条件下的位移情况、荧光偏振、同步荧光、能量转移效率、荧光寿命、荧光猝灭、荧光增强等的研究,可以获得蛋白质分子中荧光生色基团的种类、结构和所处微环境及其分布情况、蛋白质分子构象变化等有用信息,同时还可以得到外源物质与生物大分子相互作用的有关数据.圆二色谱(CD谱)作为一种独特的光学技术,使我们能够推断和定量计算蛋白质的主链构象.本工作利用酶活性测定,荧光光谱和圆二色光谱等研究 Cu^{2+} 存在下多酚氧化酶的抗盐酸胍变性^[3-5].

2 实 验

2.1 试剂和仪器

盐酸胍(GdnHCl),邻苯二酚,中国医药集团上海化学试剂公司;磷酸二氢钠,浙江省湖州化学试剂厂;磷酸氢二钠,上海新华化工厂;磷酸,江苏省徐州试剂总厂;盐酸,氢氧化钠,安徽省蚌埠电化试剂厂.以上试剂均为分析纯. Tris(三羟甲基氨基甲烷, Ultra pure, AMRESCO 分装);按文献^[6]分离纯化烟草 PPO(电泳纯).

JASCO J-715 分光偏振仪,日本分光公司;电子天平(万分之一),上海分析仪器厂;微量进样器,上海高欣玻璃仪器厂; Finnpiptette 可调式移液器. 721 分光光度计,上海第三分析仪器厂; RF-5301pc 型荧光光谱仪,日本岛津制造所.

2.2 实验方法

2.2.1 盐酸胍对烟草 PPO 酶活性的影响. 采用分光光度法测定多酚氧化酶的活性:以 50 mmol/L 的邻苯二酚(磷酸缓冲液, $\text{pH}=6.5$)为底物,加入适量酶液,作用 5 min 后测产物在 420 nm 处的吸光

度. 直接用吸光度表示酶活的大小.

向 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 的烟草 PPO 中分别加盐酸胍至不同浓度,各种浓度下每隔一定时间取样测酶活性,以不加盐酸胍的酶样作为参比,用百分数表示剩余活力.

2.2.2 盐酸胍诱导烟草 PPO 变性的荧光光谱研究. 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 的烟草 PPO(用 20 mmol/L Tris 缓冲溶液,内含 0.1 mol/L NaCl, $\text{pH}=6.5$)分别加盐酸胍至不同浓度,作用 30 min 后,进行荧光光谱测定. 在 30℃ 下, λ_{ex} 为 282 nm,在 RF-5301pc 型荧光分光光度计上记录 300~500 nm 的发射光谱.

2.2.3 硫酸铜抑制烟草 PPO 变性的研究.

酶活性测定:取五份烟草 PPO 溶液,按顺序依次加入不同量硫酸铜,作用 30 min. 加入固体盐酸胍至 6.0 mmol/L. 开始计时,每隔 5 min,取适量酶液,测定其吸光度.

荧光光谱测定:取五份烟草 PPO 溶液,按顺序依次加入不同量硫酸铜,作用 30 min. 然后加入固体盐酸胍至 6.0 mmol/L,作用 30 min,测定普通荧光光谱.

CD 谱测定:取五份烟草 PPO 溶液(蛋白质浓度均为 0.2 g/L,缓冲液为 25 mmol/L 的磷酸盐,内含 50 mmol/L 的 NaCl),按顺序依次加入不同量硫酸铜,平衡 30 min,加入固体盐酸胍至 6.0 mmol/L,作用 30 min. 在 JASCO J-715 分光偏振仪上测定远紫外 CD 谱,石英样品池光径 0.1 cm,灵敏度 2 $\text{m}^{\circ}/\text{cm}$,测定波长范围 195~250 nm,以不含蛋白质的相应溶液作为各自的空白. CD 谱数据为三次扫描平均值. 采用程序 LINCOMB(由北京大学易涛老师提供)处理 CD 谱数据,计算烟草 PPO 各种二级结构含量. 该程序是参照 Perczel 等人的方法^[7],并进行了改进.

3 结果与讨论

3.1 盐酸胍对烟草 PPO 酶活性、荧光光谱的影响

3.1.1 盐酸胍对烟草 PPO 酶活性的影响. 实验结果见图 1. 从图 1 可以看出,烟草 PPO 在 6 mol/L 的盐酸胍溶液中变性 30 min 后完全酶失活;当盐酸胍在 3 mol/L 以上时,变性 5 min 即使得酶活性有较大幅度失活;当盐酸胍从 2 mol/L 增加到 3 mol/L 时,相同变性时间下酶失活有一个跳跃式变化.

3.1.2 盐酸胍浓度对烟草 PPO 荧光光谱的影响.

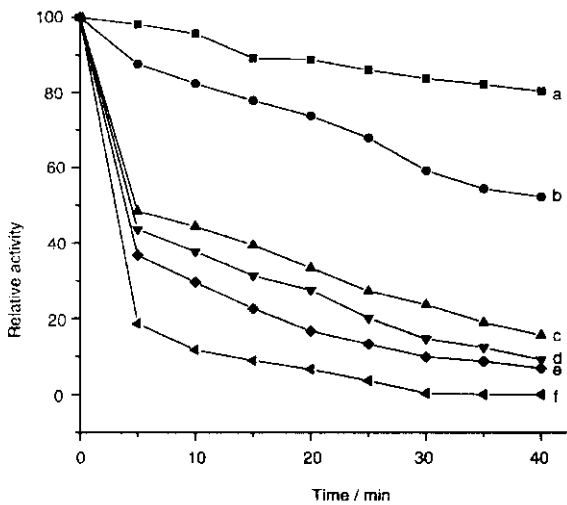


图 1 盐酸胍对烟草 PPO 酶活性的影响

Fig. 1 Effect of the concentration of GdnHCl on the activity of PPO
a~f : 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mol/L

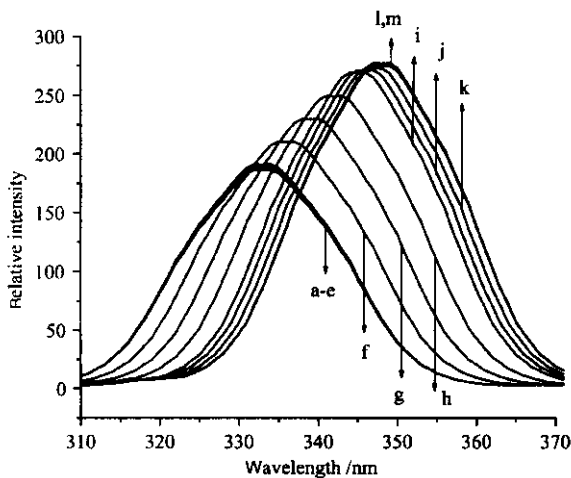


图 2 盐酸胍浓度对烟草 PPO 荧光光谱的影响

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of PPO at different concentrations of GdnHCl
a~m: 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 mol/L

蛋白质中由于色氨酸、酪氨酸的存在使其具有内源荧光. 由图 2 可以看出, 随着盐酸胍浓度的增加, 烟草 PPO 荧光峰发生了红移, 并且强度逐渐增大, 表明加入盐酸胍后色氨酸残基、酪氨酸残基的微环境发生了变化, 使它们对溶剂的暴露程度增加^[8,9]. 盐酸胍浓度的增大, 进一步破坏了酶分子内氢键, 使得蛋白质的肽链变得伸展、松散无序, 引起了生色基团微环境的变化. 峰值强度的增加说明生色基团的暴露激发了更多的电子跃迁, 从而表现在强度上的增加, 最大发射峰位红移更加说明生色基团残基的暴露程度增加. 陆天虹等人的研究表明^[10], 在细胞色

素 C 活性区域分布有赖氨酸, 而赖氨酸的氨基带正电荷, 对酪氨酸残基的荧光有淬灭作用. 肽链的伸展可能使一些在天然状态下有淬灭作用的物质或基团远离了生色基团, 从而降低淬灭作用, 成为荧光强度增大的另一个原因.

图 3 是盐酸胍浓度与烟草 PPO 最大发射处荧光强度的关系. 从图 3 可以看出, 盐酸胍诱导的烟草 PPO 变性是一个两态过程.

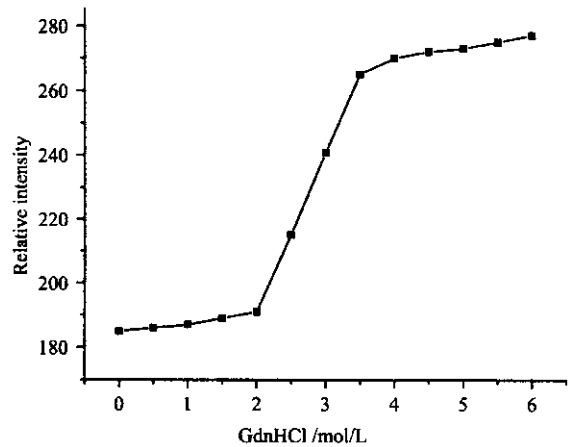


图 3 盐酸胍浓度与烟草 PPO 最大发射处荧光强度的关系

Fig. 3 The relationship between fluorescent intensity at λ_{max} of PPO and GdnHCl concentration

3.2 硫酸铜作用下烟草 PPO 的抗变性

图 4 是在不同浓度硫酸铜存在下, 6.0 mol/L 盐酸胍变性不同时间, 烟草 PPO 的剩余活力. 从图 4 可见, 当硫酸铜为 5.0 或 10.0 mmol/L 时, 它对抑制烟草 PPO 变性有较明显的作用. 而其余 3 个浓度的硫酸铜溶液对抑制蛋白质变性的作用微乎其微.

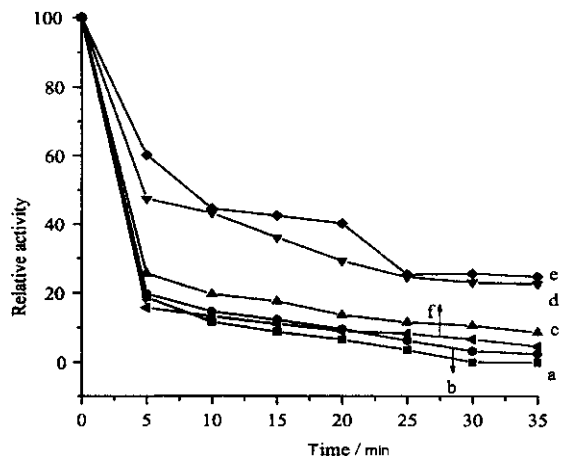


图 4 硫酸铜浓度对烟草 PPO 抗变性的影响

Fig. 4 Effect of 6.0 mol/L GdnHCl on the activity of PPO in the presence of different concentrations of $CuSO_4$
a~f: 0.0、0.1、1.0、5.0、10.0、100 mmol/L

蛋白质是含有多配位基团的生物大分子,同时也含有大量荷负电荷的基团.许多蛋白质的侧基和端基与大多数金属离子均有潜在的键合能力.如 Ag^+ 在水溶液中可以与肽、蛋白质和氨基酸形成配位化合物^[11,12],铜和牛血清白蛋白、 α -酪蛋白、 β -乳球蛋白、 γ -球蛋白和细胞色素、RNA、DNA 等形成的配合物都有报道^[13-15].Lin 等用量热法对伴清蛋白与 Fe^{3+} 结合的热力学研究表明, Fe^{3+} 占据 C-端结合部位是热力学稳定的^[16].对于多个金属与蛋白质的协同作用也有研究.张朝平等用 IR、Raman 和 UV-Vis 光谱研究了 BSA、Hb 和 γ -GB 同 Ag^+ 、 Cu^{2+} 形成的配合物,蛋白质分子起着阴离子配位基的作用^[15].这些结果表明, Ag^+ 、 Cu^{2+} 同蛋白质中羧基中的氧和胺基或酰胺基的氮形成强烈配位的混配配合物;这些混配配合物的形成对研究蛋白质的侧基的禁制、配位成键及氧化-还原反应等方面均有重要作用.

图 5 是荧光光谱研究硫酸铜对烟草 PPO 抗变性的实验结果.以盐酸胍浓度为横坐标,以最大发射波长处的荧光强度为纵坐标得到图 6.图 6 显示在 10 mmol/L CuSO_4 存在下,盐酸胍使烟草 PPO 变性是一个三态过程,这是由于 Cu^{2+} 与烟草 PPO 的氨基酸残基结合,形成配合物.我们曾研究了外源铜与烟草 PPO 的相互作用^[17],进一步的研究表明,每个烟草 PPO 分子与 5 个 Cu^{2+} 作用形成蛋白质-金属离子配合物.

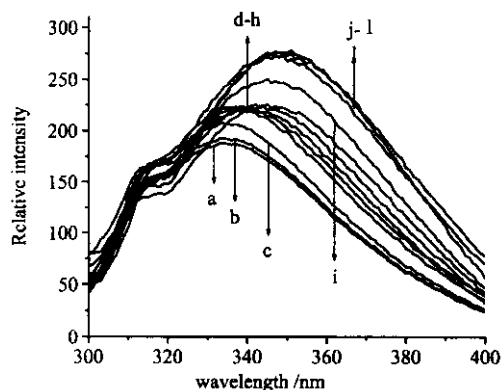


图 5 硫酸铜存在下盐酸胍浓度对烟草 PPO 荧光光谱的影响

Fig. 5 The fluorescence emission spectra of PPO at different concentrations of GdnHCl in 10 mmol/L CuSO_4

a~l: 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0 mol/L

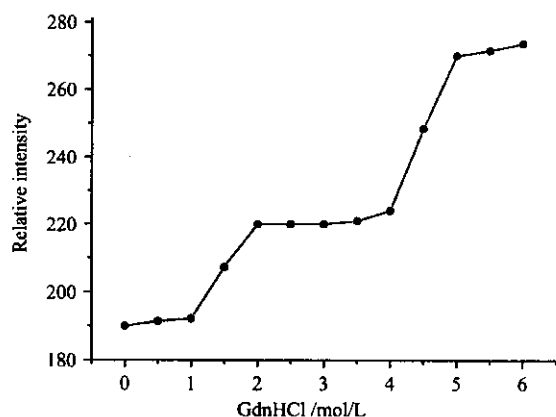


图 6 添加硫酸铜时盐酸胍浓度与烟草 PPO 最大发射处荧光强度的关系

Fig. 6 The relationship between fluorescent intensity at λ_{\max} of PPO and GdnHCl concentration in 10 mmol/L of CuSO_4

Cu^{2+} 诱导烟草 PPO 抗盐酸胍变性作用的 CD 谱见图 7.从图 7 可见, Cu^{2+} 浓度为 5.0、10.0 mmol/L 时,有明显的稳定烟草 PPO 二级结构的作用,与酶活性测定的结果一致. Cu^{2+} 为 100 mmol/L 时,烟草 PPO 在盐酸胍变性 30 min 后,其 α -helix 含量虽比不含 CuSO_4 时的高,但反而比 Cu^{2+} 为 10.0 mmol/L 时低,这是由于 Cu^{2+} 浓度高于一定值,其本身就能够诱导烟草 PPO 变性.表 1 是 LINCOMB 程序计算的结果,其中“ck”为天然烟草 PPO 在缓冲溶液中的各种二级结构质量分数.

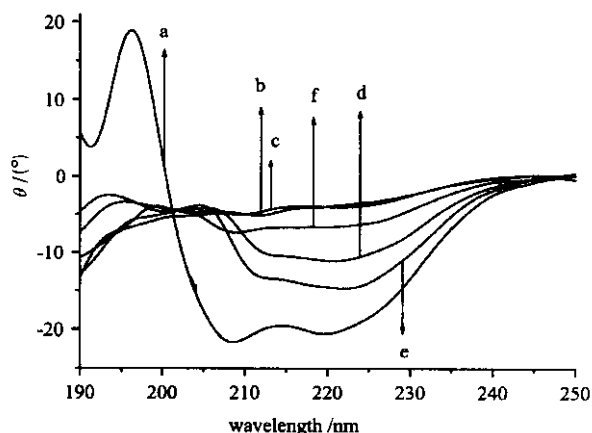


图 7 硫酸铜阻止盐酸胍变性烟草 PPO 的 CD 谱

Fig. 7 The CD spectra of PPO at different concentrations of CuSO_4

a~f: 0.0, 0.0, 0.1, 5.0, 10.0, 100 mmol/L. a. 0.0 mol/L GdnHCl, b~f. 6.0 mol/L GdnHCl

表 1 硫酸铜存在下烟草 PPO 在盐酸胍(6 mol/L)溶液中各种二级结构的含量

Table 1 Effect of 6 mol/L GdnHCl on the secondary structure of PPO from tobacco in the presence of different concentrations of CuSO_4

CuSO_4 /(mmol/L)	α -helix	Anti-parallel β -sheet	β -turn/ parallel β -sheet	Aromatic residues and disulfide bond	Random coil/ γ -turn
ck	41.7	16.7	23.5	11.3	6.8
100.0	13.3	8.6	20.5	8.9	38.7
10.0	34.2	13.7	21.0	9.5	21.6
5.0	27.7	8.3	19.5	9.5	50.0
0.1	4.9	5.3	7.6	9.5	72.7
0.0	1.1	3.8	3.3	7.5	84.3

ck; Native PPO.

参 考 文 献

- [1] Mayer A M. *Phytochemistry*, 1987, **26**: 11
- [2] Edwards W, Leukes W D, Rose P D, *et al. Enzyme and Microbial Technology*, 1999, **25**: 769
- [3] Chen Xiyi (陈习意), Lin Hai (林海), Wang Dong (王东), Zhu Qingshi (朱清时). *Chin. J. Chem. Phys.* (化学物理学报), 2000, **13**: 129
- [4] Ren Li (任丽), Kong Fanao (孔繁敖). *Chin. J. Chem. Phys.* (化学物理学报), 2002, **15**: 81
- [5] Xiao Hourong (肖厚荣), Xu Xiaolong (徐小龙), Xie Yongshu (解永树), Liu Qingliang (刘清亮). *Chin. J. Chem. Phys.* (化学物理学报), 2004, **17**: 196
- [6] Shi C H, Dai Y, Xu X L, *et al. Protein Expression and Purification*, 2002, **24**: 51
- [7] Perczel A, Park K, Fasman G D. *Anal. Biochem.*, 1992, **203**: 83
- [8] Chapeaurouge A, Johansson J S, Ferreira S T. *Biol. Chem.* 2001, **276**: 14861
- [9] Whitten S T, Wooll J O, Razeghifard R, *et al. Mol. Biol.*, 2001, **309**: 1165
- [10] Lu Tianhong (陆天虹). *Spectroscopy and Spectral Analysis* (光谱学与光谱分析), 1997, **17**: 108
- [11] Herne T M, Ahern A, Garrell R L. *J. Chem. Soc.*, 1991, **113**: 846
- [12] Berthon G. *Pure Appl. Chem.*, 1995, **67**: 1117
- [13] Moody A J, Rich P R. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, **1015**: 205
- [14] Chepuri V, Lemieux L, Hill J, *et al. Biochim. Biophys. Acta*, 1990, **1018**: 124
- [15] Zhang Chaoping (张朝平), Xia Min (夏敏). *Spectroscopy and Spectral Analysis* (光谱学与光谱分析), 1996, **16**: 43
- [16] Lin L N, Mason A B, Woodworth R C, *et al. Biochemistry*, 1994, **33**: 1881
- [17] Xiao Hourong (肖厚荣), Shi Chunhua (施春华), Xia Bingle (夏炳乐), Liu Qingliang (刘清亮), *et al. Chin. J. Inor. Chem.* (无机化学学报), 2003, **19**: 589