

# 乙二醇对长毛对虾酸性磷酸酶 活力与构象的影响<sup>\*</sup>

陈清西 周兴旺 杨佩真 陈素丽

(厦门大学生物系, 厦门, 361005)

**摘 要** 应用荧光光谱、紫外差示光谱及圆二色性光谱等生物物理技术研究长毛对虾酸性磷酸酶经乙二醇微扰后的分子构象变化情况, 结果表明乙二醇对酶分子构象有显著的影响。酶的内源荧光强度随乙二醇浓度增大而增强, Tyr、Trp 残基的微环境发生明显的变化; 紫外差示光谱在 220 和 275 nm 出现 2 个负峰, 而 236 nm 出现正峰, 220 和 236 nm 的差吸收与酶分子主链去折叠有关, 而 275 nm 主要与 Trp 残基微环境变化有关; 乙二醇变性后, 酶的圆二色性光谱变化说明酶分子二级结构也发生了明显的变化。比较酶在乙二醇溶液中失活与去折叠的关系, 结果表明: 酶在乙二醇溶液中的失活作用明显快于构象的变化, 说明酶活性中心处于对变性剂乙二醇较为敏感的区域。

**关键词** 长毛对虾 酸性磷酸酶 酶构象与活力 乙二醇

**中国图书分类号** Q556.1

近年来, 在蛋白质(酶)分子溶液构象的研究中, 以紫外差光谱、荧光光谱和圆二色光谱等方法起了及其重要的作用<sup>[1,2]</sup>。我们曾经用这些技术研究青蟹碱性磷酸酶<sup>[3]</sup>、菠萝蛋白酶<sup>[4]</sup>和长毛对虾(*Penaeus penicillatus*)酸性磷酸酶<sup>[5]</sup>在盐酸胍溶液中的分子构象变化和酶活力的变化情况, 并对变性与失活速度进行比较, 表明酶的失活速度明显大于变性速度, 酶活性部位处于对变性剂较为敏感的脆弱区域, 表现酶活性部位的柔曲性, 酶活力的表现很大程度上依赖于酶分子构象的稳定性。本文报道长毛对虾酸性磷酸酶(ACPase)在有机溶剂乙二醇微扰下, 酶分子构象与活力的变化, 从另一侧面揭示酶活力表现与酶分子构象完整性密切相关; 同时, 研究有机溶剂对重要的海洋水产长毛对虾的酸性磷酸酶的活力与构象的影响, 可尝试利用酶的高度灵敏性为海洋养殖污染提供一种新的监测指标。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

对-硝基苯磷酸二钠(pNPP), CM-纤维素(CM-52), Sephadex G-200 均为进口生化试剂, 乙二醇为国产 AR 纯试剂, 试剂均为玻璃重蒸水。长毛对虾酸性磷酸酶按前文方法<sup>[5]</sup>制备, 获得 SDS 电泳及 HPLC 柱层析检验为单一蛋白纯酶制剂。

\* 国家自然科学基金资助项目(39570569号)。陈清西, 男, 1959年2月出生, 博士, 教授。

本文于1999年1月27日收到。

## 1.2 方法

蛋白浓度和酶活力测定见前文<sup>[6]</sup>;酶在不同浓度乙二醇溶液中构象变性测定是在  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  NaAc-HAc 缓冲液 pH4.5、 $4^\circ\text{C}$  下处理 24h, 以紫外差示光谱、荧光光谱和 CD 光谱分析测定。荧光光谱用 Hitadhi-850 型荧光仪测定, 激发光波长 284nm, 测定温度  $25^\circ\text{C}$ 。紫外差示在 Shimadzu UV-3000 型双光束分光光度计上测定, 在含隔板的一对石英杯中, 参比光路上的杯子两池分别只含酶溶液和有机溶剂, 在样品光路的杯子中, 一池含酶和有机溶剂混合液, 另一池只含缓冲液,  $25^\circ\text{C}$  恒温, 从 200 nm 扫描到 320 nm。CD 谱是在 Jasco 500C 型圆二色谱仪上测定,  $25^\circ\text{C}$  恒温, 扫描范围为 200~250nm, 吸收池光路 2 mm。

## 2 实验结果

### 2.1 酶经乙二醇微扰后的荧光发射光谱的变化

长毛对虾 ACPase 在不同浓度乙二醇溶液中 (于  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  NaAc-HAc 缓冲液, pH 4.5) 于  $4^\circ\text{C}$  下处理 24h 后, 酶的荧光发射光谱变化结果见图 1。天然酶内源荧光在 340nm 处有特征的荧光发射峰, 其强度随着乙二醇浓度上升而增强。当乙二醇浓度达 40% 时, 荧光强度还继续增强, 但荧光发射峰基本未出现位移现象。

### 2.2 酶经乙二醇微扰后的紫外差吸收光谱的变化

长毛对虾 ACPase 在不同浓度乙二醇溶液中 ( $0.1 \text{ mol/dm}^3$  NaAc-HAc 缓冲液, pH4.5)  $4^\circ\text{C}$  下处理 24h 后, 酶的紫外差示光谱测定结果见图 2。在 220 和 268nm 处出现明显的负吸收峰, 而在 236 和 280nm 有正吸收峰, 这些差吸收均随着有机溶剂浓度增大而增大。

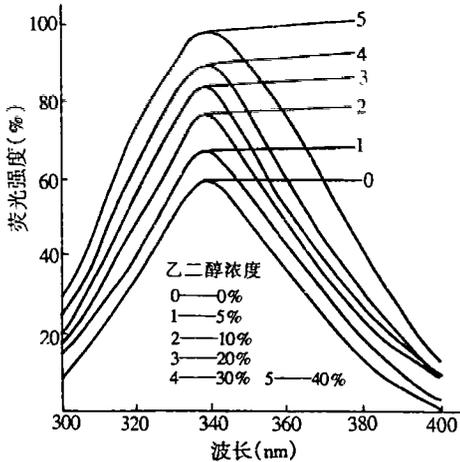


图 1 ACPase 在乙二醇变性后的荧光发射光谱

Fig.1 Fluorescence emission spectra of ACPase during denaturation in Ethylene glycol solutions

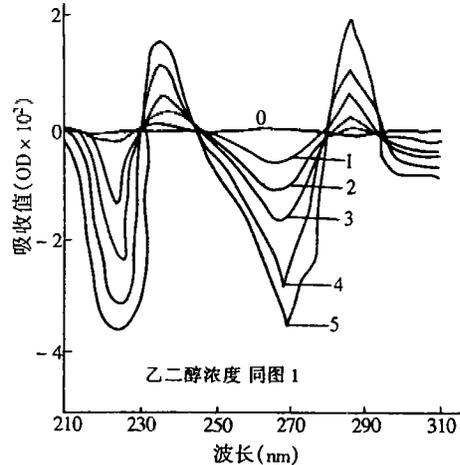


图 2 ACPase 在乙二醇变性后的紫外差吸收光谱

Fig.2 Differential UV-absorption spectra of ACPase during denaturation in Ethylene glycol solutions

### 2.3 酶经乙二醇微扰后的 CD 光谱变化

长毛对虾 ACPase 在不同浓度乙二醇溶液中 (于  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  NaAc-HAc 缓冲液, pH 4.5) 于  $4^\circ\text{C}$  下处理 24h 后, 酶的圆二光谱变化结果见图 3。天然酶在 210nm 处有一个负吸收峰, 在 218nm 有一个吸收平台。在乙二醇溶液中, CD 吸收峰型发生了明显的变化, 在 210nm

的吸收负峰红移到 215nm, 并且负吸收值随着乙二醇浓度的增大逐渐增大, 说明酶分子的有序结构(主要是  $\alpha$ -螺旋结构)发生了变化, 其变化随着乙二醇浓度的增大而增大。

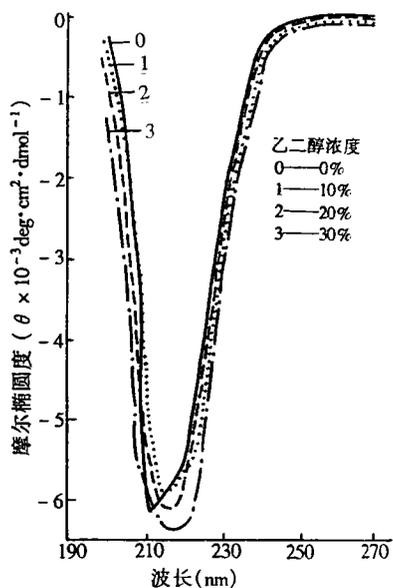


图 3 乙二醇变性后酶的 CD 光谱

Fig. 3 CD spectra of ACPase during denaturation in Ethylene glycol solutions

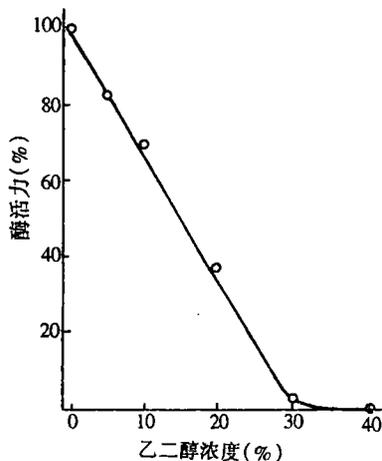


图 4 乙二醇对酶活力的影响

Fig. 4 Influence of ethylene glycol on ACPase activity

### 2.4 乙二醇对酶活力的影响

长毛对虾 ACPase 在不同浓度乙二醇溶液中(于 0.1mol/dm<sup>3</sup> NaAc-HAc 缓冲液, pH 4.5)于 4℃下处理 24h 后, 取出 20mm<sup>3</sup> 处理的酶液在含相对应乙二醇浓度的测活体系中检测酶的剩余活力。结果表明, 随着乙二醇浓度的增大, 酶的活力迅速地呈直线下降直至完全丧失, 当乙二醇浓度达 15%时, 酶活力丧失了一半; 当乙二醇浓度达 30%时, 酶活力完全丧失(图 4)。而这时酶的荧光发射峰的强度(F<sub>340nm</sub>)、220nm 的紫外差吸收以及 215nm 的 CD 椭圆度仍然还在继续变化, 酶分子构象的变化尚未达到终态。说明对虾 ACPase 在乙二醇变性过程中, 酶活力丧失明显快于构象的变化。说明酶活性中心处于对有机溶剂乙二醇较为敏感的区域, 30%的乙二醇可以使酶活性中心构象完全改变而导致酶活力完全丧失, 但必需更高的乙二醇浓度才能使酶分子整体构象变化完全。

### 3 讨论

对虾 ACPase 是二聚体酶, 酶分子构象变化主要表现在于酶分子主肽链以紧密的三维构象变成松散状态; 从有序的二级结构变成无规线团。用不同的物理化学监测手段, 可以从不同的侧面揭示蛋白质变性的肽链伸展及构象变化概貌。我们用 284nm 波长激发得到 340nm 荧光发射峰主要由生色基团 Trp 和 Tyr 残基所贡献<sup>[7]</sup>。有机溶剂乙二醇微扰长毛对虾 ACPase 后, 荧光强度显著增大, 其原因可能是由于乙二醇介入酶分子, 改变酶分子所处环境的介电常数, 引起肽链伸展, 从而改变了 Tyr、Trp 残基的微环境极性, Tyr 形成的氢键遭到

破坏,致使处于淬灭状态的 Tyr 荧光得以恢复,并使其量子率增加。荧光强度的增大随着乙二醇浓度的增高而增大。Trp 微环境非极性也引起 Trp 残基的荧光强度增大。紫外差示光谱在 268nm 出现负吸收峰及在 280nm 出现正吸收峰,是与 Trp 残基微环境变化直接相关,在 220nm 处出现负峰则与酶主链去折叠变化相关<sup>[1]</sup>,对虾 ACPase 在有机溶剂乙二醇的微扰作用下,肽链构象发生变化,由有序的结构变成无规则卷曲,从而在 220nm 处出现差吸收峰。酶经乙二醇变性后主肽链构象变化也可以从 CD 谱中体现。远紫外的 CD 谱直接反映了酶的二级结构变化情况<sup>[9]</sup>,酶经乙二醇变性后,CD 光谱由天然酶在 210nm 负峰红移至 215nm 处,并且吸收强度也逐渐加强。

随着有机溶剂乙二醇浓度增大,酶分子构象逐渐从有序结构变为无序的无规则卷曲,同时伴随酶活力的丧失。乙二醇浓度增大,酶活力快速下降,当乙二醇浓度达 30% 时,酶活力已经近于完全丧失,说明酶活性中心构象已变性达终态,但整体酶分子构象尚未完全变化,荧光强度、紫外差示光谱及 CD 谱仍还在继续变化,表明酶活性中心处于对乙二醇较为敏感的区域,酶活力的表现与酶分子构象的完整性密切相关。

环境污染对海洋水产养殖有很大影响,化工厂排放的有机溶剂污染也是常见的污染源之一,本文中 15% 的乙二醇就能使长毛对虾 ACPase 酶活力下降一半,可见该酶对有机污染反应灵敏。目前,用酶作为水产养殖有机污染的监测尚少报道,本文的研究可以揭示其影响的本质所在。研究活力变化的同时,研究酶分子构象的变化,为污染监测提供理论基础和依据。

#### 参考文献

- 1 陈清西,颜思旭.果菠萝蛋白酶的分子构象与活力变化的研究.生物化学杂志,1991,7(3):301~307
- 2 陈清西,颜思旭.果菠萝蛋白酶在有机溶剂微扰时的分子折叠与活力变化的研究.高等学校化学学报,1993,14(3):424~427
- 3 Chen Q X, Zhang W, Zheng W Z, et al., Comparison of inactivation and unfolding of green crab ALPase during denaturation by GuHCl. *J. Protein Chemistry*, 1996,15(4):359~365
- 4 陈清西,颜思旭.果菠萝蛋白酶在胍和 SDS 变性时的酶活力与构象变化的研究.生物化学与生物物理学报,1992,24(5):477~482
- 5 Chen S L, Chen Q X, Yang P Z, et al., Unfolding and inactivation of *Penaeus Penicillatus* ACPase during denaturation by guanidinium hydrochloride. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1997,42(3):517~526
- 6 陈素丽,陈清西,胡天惠等.长毛对虾酸性磷酸酶的纯化与性质.厦门大学学报(自然科学版),1997,36(1):121~125
- 7 侯立向,邹承鲁.兔肌酸激酶在 SDS 变性时的构象及活力变化的比较研究.生物化学与生物物理学报,1995,17(3):420~425
- 8 Adler A J. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods in Enzymology*. 1973.27:657~662

# Effect of ethylene glycol on activity and conformation of acid phosphatase from *Penaeus penicillatus*

Chen Qingxi, Zhou Xingwang, Yang Peizhen and Chen Suli

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen, 361005)

## Abstract

Conformational changes of acid phosphatase from *Penaeus penicillatus* in ethylene glycol solutions of different concentrations were measured by fluorescence spectra, differential UV-absorption spectra and circular dichroism spectra. The fluorescence emission peak intensity of the enzyme gradually strengthened with increasing ethylene glycol concentration, which is in concordance with the conformational change of the microenvironments of tyrosine and tryptophan residues. Differential UV-absorption spectra of the enzyme denatured in ethylene glycol solutions of different concentrations showed that there were two negative peaks at 220nm and 275nm, and a positive peak at 236nm. 220nm and 236nm peaks on the differential UV-absorption spectra are in concordance with the conformational change of the main chain of the enzyme molecule, while the 275nm peak is in concordance with the change of the microenvironments of the tryptophan residue. The circular dichroism spectra showed that the natural enzyme has a negative peak at 215nm, and the negative peak descended obviously with increasing ethylene glycol concentration. The inactivation and the unfolding of the enzyme during denaturation in ethylene glycol solution had been compared. The results showed that inactivation occurs before noticeable conformational change can be detected. It is suggested that the active site of the enzyme is situated in a limited area of the enzyme molecule that is more fragile to ethylene glycol than the protein as a whole.

**KEYWORDS** *Penaeus penicillatus*, acid phosphatase, conformation and activity of enzyme, ethylene glycol