

二甲基亚砜对木瓜蛋白酶活性与构象的影响

何平, 黄卓烈, 巫光宏, 初志战, 黄家乐, 史清翠

(华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510642)

摘要:利用紫外吸收光谱、荧光发射光谱研究了二甲基亚砜对木瓜蛋白酶活性与构象的影响。当二甲基亚砜溶液为低体积分数时,木瓜蛋白酶活性比对照($\varphi_{\text{二甲基亚砜}}=0$)有所上升;随着二甲基亚砜溶液体积分数升高,木瓜蛋白酶活性却不断降低,紫外吸收光谱的第1吸收峰明显地向长波长方向移动;且紫外光吸收峰值逐渐降低,到 $\varphi_{\text{二甲基亚砜}}$ 为50%时又有所升高。木瓜蛋白酶在不同体积分数二甲基亚砜溶液中荧光发射光谱发生变化。在 $\varphi_{\text{二甲基亚砜}}$ 为5%、10%、20%二甲基亚砜溶液中,与对照($\varphi_{\text{二甲基亚砜}}=0$)相比,酶对底物分子的亲和力降低;最大反应速度上升。结果表明:低体积分数的二甲基亚砜对木瓜蛋白酶的构象影响较小,酶活性上升;高体积分数的二甲基亚砜对木瓜蛋白酶的构象影响较大,酶活性下降。

关键词:木瓜蛋白酶;二甲基亚砜;紫外吸收光谱;荧光发射光谱

中图分类号:Q556

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)03-0037-05

Effect of Dimethyl Sulfoxide on the Activity and Conformation of Papain

HE Ping, HUANG Zhuo-lie, WU Guang-hong, CHU Zhi-zhan, HUANG Jia-le, SHI Qing-cui

(College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the activity and conformation of papain by ultraviolet and fluorescence spectra were studied. The papain activity in the reaction system contained low volume fraction of DMSO increased as compared with that in control experiment ($\varphi_{\text{dimethyl sulfoxide}}=0$). However, with farther increasing the volume fraction of DMSO, the activity of papain constantly decreased, the first ultraviolet absorption peak exhibited a red shift, and when reduced up to $\varphi_{\text{dimethyl sulfoxide}}$ of 50% the first ultraviolet absorption increased. In different volume fraction of DMSO, the papain activity in fluorescence emission spectra had significant changes. As compared with the control experiment ($\varphi_{\text{dimethyl sulfoxide}}=0$), the K_m decreased, but the $v_{\max}$ increased in $\varphi_{\text{dimethyl sulfoxide}}$ of 5%, 10% and 20%. It was demonstrated that, in low volume fraction of DMSO, the papain activity increased and its conformation had less changes, however, in high volume fraction of DMSO, the papain activity decreased and its conformation had more changes.

Key words: papain; dimethyl sulfoxide; ultraviolet absorption spectra; fluorescence emission spectra

近年来,酶在有机介质中催化反应的研究十分活跃,日益增多的研究报道和综合评述,展示了有机溶剂中的酶优于水相酶的巨大应用潜力^[1-3]。为许多重大理论的研究提供了新的方法和手段^[4-5]。紫外吸收光谱、荧光发射光谱在蛋白质分子构象的研究中

也发挥着越来越重要的作用。紫外吸收光谱、荧光发射光谱利用化合物吸收光子,引起分子中电子的跃迁,产生吸光度的变化而进行定性和定量分析。当酶蛋白以一定的微区结构发挥作用时,这些基团具有特定的空间位置,若酶蛋白的构象发生变化,这些基

收稿日期:2007-06-20

作者简介:何平(1967—),男,副教授,博士; 通讯作者:黄卓烈(1950—),男,教授,硕士,E-mail: zhuolieh@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10074016)

团的空间位置也发生变化,从而引起了酶的变性失活^[6-8]。有机相中酶促反应动力学的研究也成了当今酶工程领域中引起广泛兴趣的一个研究方向^[9-10]。酶在非水介质中的反应动力学变化符合 Michaelis-Menten 公式,影响有机介质中酶促反应动力学变化的因素涉及底物和溶剂的性质^[11-12]。

木瓜蛋白酶(papain)是广泛存在于番木瓜 *Carica papaya* 中的巯基蛋白酶,其开发前景越来越广阔^[13-14]。木瓜蛋白酶是一单体酶,由 212 个氨基酸残基组成。此酶分子含有 19 个 Tyr 残基、5 个 Trp 残基、4 个 Phe 残基,在 275 ~ 280 nm 处有紫外吸收峰^[15]。当木瓜蛋白酶在有机溶剂中进行催化时,其酶分子光谱特性的变化与酶分子构象改变的关系尚未进行详细的研究。本文研究了在各种体积分数的二甲基亚砜溶液中木瓜蛋白酶的酶活性、酶动力学变化以及酶分子光谱的改变,有助于人们了解在有机溶剂中酶分子结构的变化,揭示有机溶剂影响酶分子催化的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料

木瓜蛋白粗酶为广西热带作物研究所产品,部分纯化。木瓜蛋白纯酶和酪蛋白为 Sigma 公司产品。其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 木瓜蛋白酶活性的测定 取 1 g/L 的木瓜蛋白酶粗酶溶液 0.2 mL,加入 0.25 mL 激活剂(0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液,内含 36 mmol/L 半胱氨酸、0.6 mmol/L EDTA)和 2.3 mL 二甲基亚砜溶液[使反应体系中二甲基亚砜体积分数分别达到 0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60% 和 70%,用 0.1 mol/L pH7.2 磷酸缓冲液配制],于 37 °C 下预热 10 min,加入 37 °C 预热的 10 g/L 酪蛋白溶液 0.5 mL,37 °C 恒温水浴振荡(160 次/min)反应 10 min,然后加入 200 g/L 三氯乙酸溶液 1.0 mL 终止酶反应。对照管先加入 200 g/L 三氯乙酸溶液,再加酪蛋白溶液,其他与测定管相同。过滤,取其上清液于波长 275 nm 处测定光密度。

将 37 °C 下木瓜蛋白酶水解酪蛋白时每分钟产生 1 μ g 酪氨酸的酶量定义为一个酶活性单位(U)。

1.2.2 二甲基亚砜溶液中木瓜蛋白酶的紫外吸收光谱、荧光发射光谱的测定 取 1 g/L 的木瓜蛋白酶纯酶液 0.2 mL,加激活剂 1 mL,加 9.8 mL 二甲基亚砜溶液[使溶液中二甲基亚砜体积分数分别达到 0%、

5%、10%、20%、30% 和 50%,二甲基亚砜溶于 0.1 mol/L pH7.2 磷酸缓冲液],37 °C 恒温水浴中保温 10 min;以 0.1 mol/L pH7.2 磷酸缓冲液代替酶液作对照。混合后,以对照调零,用 UV-2401pc 紫外光谱仪在 195 ~ 400 nm 下扫描各处理样品的紫外吸收光谱;以 280 nm 为激发光波长,用 F-4500 荧光分光光度计在 280 ~ 450 nm 下测定各处理样品的荧光发射光谱。

1.2.3 木瓜蛋白酶在不同体积分数二甲基亚砜中动力学曲线的测定 木瓜蛋白酶动力学测定采用酪蛋白为底物进行^[16-17]。取 1 g/L 木瓜蛋白酶纯酶液 0.1 mL,加入 0.25 mL 激活剂和 2.4 mL 二甲基亚砜溶液[使反应体系中二甲基亚砜体积分数分别达到 0%、5%、10% 和 20%;二甲基亚砜溶于 pH7.2 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液],于 37 °C 下预热 10 min,然后分别加入 37 °C 预热的 15 g/L 酪蛋白溶液 0.045、0.065、0.085、0.125、0.250、0.500 mL(少于 0.500 mL 的,用 pH7.2 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液补齐),37 °C 下恒温水浴振荡(160 次/min)反应 10 min,然后加入 200 g/L 三氯乙酸溶液 1.0 mL 终止酶反应。对照管先加入 200 g/L 三氯乙酸溶液,再加酪蛋白溶液,其他与测定管相同。过滤,取其上清液于波长 275 nm 处测定光密度。

1.2.4 蛋白质的测定 按 Bradford 方法^[18]测定蛋白质。并以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

2 结果与分析

2.1 不同体积分数的二甲基亚砜溶液对木瓜蛋白酶活性的影响

木瓜蛋白酶在不同体积分数二甲基亚砜中酶活性变化见图 1,当二甲基亚砜体积分数为 5%、10%、15% 和 20% 时,木瓜蛋白酶活性比对照($\varphi_{\text{二甲基亚砜}} = 0$)分别上升 4.78%、8.32%、7.06% 和 4.84%。经方差分析,不同体积分数二甲基亚砜对木瓜蛋白酶的影响差异极显著(表 1)。随着二甲基亚砜体积分数进一步升高,木瓜蛋白酶活性不断降低,当二甲基亚砜体积分数为 30%、50% 和 70% 时,木瓜蛋白酶活性比对照分别下降了 22.77%、39.13% 和 61.75%。

2.2 木瓜蛋白酶在不同体积分数二甲基亚砜溶液中的紫外吸收光谱

从图 2 可以看出,对照中($\varphi_{\text{二甲基亚砜}} = 0$)木瓜蛋白酶的紫外吸收光谱有 2 个明显吸收峰,分别在 205.8 和 274 nm 处,紫外光吸收值(光密度)分别为 0.358 和 0.03。随着二甲基亚砜体积分数的升高,第

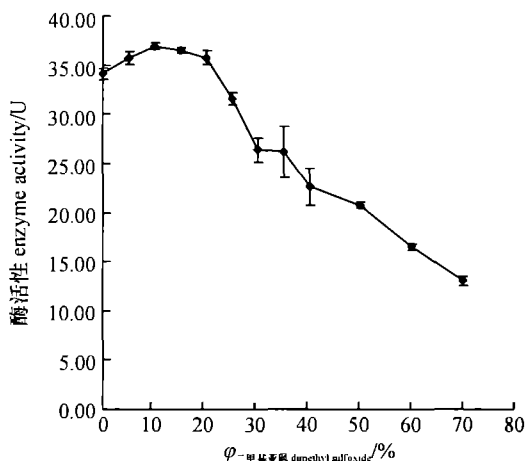


图1 不同体积分数(φ)的二甲基亚砜溶液对木瓜蛋白酶活性的影响

Fig. 1 The effect of different volume fraction (φ) of dimethyl sulfoxide on papain activities

表1 不同体积分数(φ)的二甲基亚砜溶液对木瓜蛋白酶活性影响的方差分析¹⁾

Tab. 1 Variance analysis of papain activities affected by different volume fraction (φ) of dimethyl sulfoxide

变异源	自由度	平方和	均方	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>
variation source	degree of freedom	sum of square	mean square		
不同 φ -二甲基亚砜 different φ -dimethyl sulfoxide	11	2 299. 905 289	209. 082 299	59. 21 **	<0. 000 1
误差 error	24	84. 745 733	3. 531 072		
总变异 total variation	35	2 384. 651 022			

1)表中**表示差异达到极显著

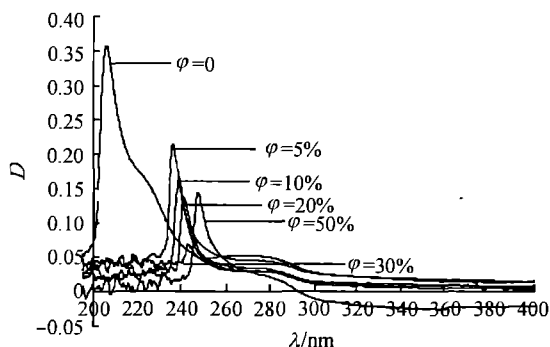


图2 木瓜蛋白酶在不同体积分数(φ)二甲基亚砜溶液中的紫外吸收光谱

Fig. 2 The ultraviolet absorption spectra of papain in different volume fraction (φ) of dimethyl sulfoxide

别为10%、0、5%、30%、20%和50%时,木瓜蛋白酶荧光发射峰值逐渐依次升高。加入二甲基亚砜后木瓜蛋白酶荧光发射峰的波长基本不变。

2.4 木瓜蛋白酶在不同体积分数二甲基亚砜中的动力学曲线

采用 Lineweaver-Burk 作图法(图4)计算得到,在 φ 为0、5%、10%和20%的二甲基亚砜溶液中,木瓜蛋白酶的米氏常数(K_m)分别为9.59、14.16、

1吸收峰明显地向长波长方向移动,在 φ 为5%、10%、20%、30%和50%的二甲基亚砜溶液中,紫外光第1吸收峰位置分别为235、238、240、242和246 nm。在二甲基亚砜溶液中,木瓜蛋白酶的紫外光吸收值低于对照中木瓜蛋白酶的吸收值。在二甲基亚砜体积分数从0提高到30%时,木瓜蛋白酶的紫外光第1吸收峰值逐渐降低,但到50%时又有所升高。在第2吸收峰区间内(270~300 nm),吸收峰宽平,没有位移的现象。

2.3 木瓜蛋白酶在不同体积分数二甲基亚砜溶液中的荧光发射光谱

从图3可以看出,在不同体积分数二甲基亚砜溶液中,木瓜蛋白酶荧光发射峰均为单峰,峰型基本相似。二甲基亚砜体积分数为10%时,木瓜蛋白酶荧光发射峰值低于对照;当二甲基亚砜体积分数分

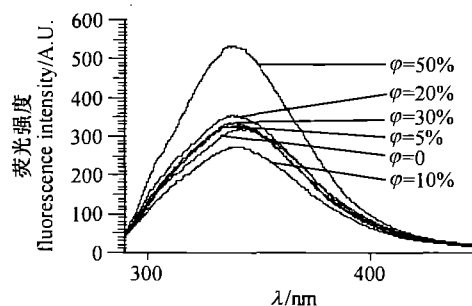


图3 木瓜蛋白酶在不同体积分数(φ)二甲基亚砜溶液中的荧光发射光谱

Fig. 3 The fluorescence emission spectra of papain in different volume fraction (φ) of dimethyl sulfoxide

17.39和14.38 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,最大反应速度($v_{\max}$)分别为101.01、147.06、185.19和144.93 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在 φ 为5%、10%、20%的二甲基亚砜溶液中, K_m 分别为对照($\varphi_{\text{二甲基亚砜}} = 0$)的147.74%、181.40%、149.98%,酶对底物分子的亲和力降低, $v_{\max}$ 分别为对照的145.59%、183.33%、143.48%,可见,在此范围内,二甲基亚砜体积分数升高,与对照相比,最大反应速度上升。

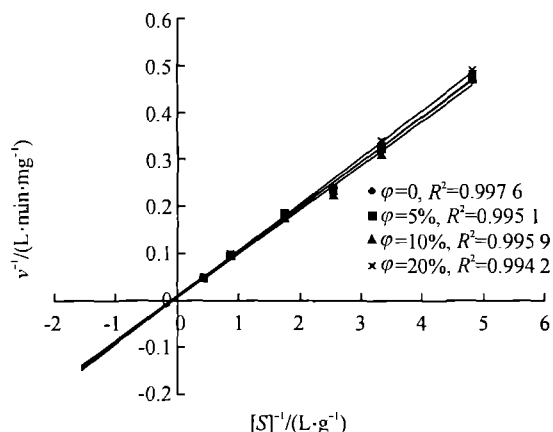


图4 不同体积分数(φ)二甲基亚砷中木瓜蛋白酶的动力学曲线

Fig. 4 The kinetic curves of papain in different volume fraction (φ) of dimethyl sulfoxide

3 讨论

蛋白质在紫外光范围内(250 ~ 300 nm)的光吸收主要是由于色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr),其次是苯丙氨酸(Phe)和组氨酸(His)的电子激发引起的。在紫外光区能吸收某一波长光的基团称为生色团,生色团的吸收光谱通常受溶剂的性质如折射率、解离度、氢键等的影响,当生色团的环境经受一定的变化时,它的吸收光谱会产生变化,吸收峰会向短波长或向长波长方向移动(分别称为蓝移或红移)^[19]。Glazer等^[20]指出,236 nm紫外差示光谱的变化可能和蛋白质的 α -螺旋结构的变化直接相关;许根俊等^[21]指出260、285和292 nm的吸收峰主要与Phe、Tyr和Trp残基有关。

在本试验中,随着二甲基亚砷体积分数的升高,木瓜蛋白酶的紫外光第1吸收峰明显地向长波长方向移动;吸收峰值逐渐降低,但到 φ 为50%时又有所升高。木瓜蛋白酶第1吸收峰的红移可能由于二甲基亚砷的加入使Trp、Tyr、Phe中的 π - π 共轭体系中 π - π^* 跃迁的吸收峰向长波长方向移动^[6];吸收峰值的降低与二甲基亚砷的影响有关。

在蛋白质分子中,能发射荧光的氨基酸有Trp、Tyr和Phe。其中Trp的荧光强度最大,Tyr次之,Phe最小。因为蛋白质的荧光通常在280 nm或更长的波长被激发,Phe在绝大多数试验条件下不被激发,所以很少能观察到Phe的发射光。这样,蛋白质的内源荧光主要来自Trp和Tyr残基。Trp残基对微环境的变化很敏感,并且大多数蛋白质都含有几个Trp残基,因而常作为内源荧光探针来研究溶液状态下蛋白质的构象^[22-23]。

用280 nm波长的激发光所得到的340 nm左右的荧光发射光谱主要与Trp残基和Tyr残基有关。本试验中,在 φ 为0、5%、30%、20%和50%二甲基亚砷溶液中,木瓜蛋白酶的荧光强度逐渐依次增大,其原因可能是随着二甲基亚砷体积分数的增大,改变了酶分子环境中的介电常数,使木瓜蛋白酶的空间结构变得松弛,从而改变了Tyr、Trp残基的微环境,使Tyr残基形成的氢键遭到破坏,致使处于淬灭状态的Tyr残基荧光发射得以恢复,从而使其荧光发射增加。在 φ 为10%二甲基亚砷溶液中,木瓜蛋白酶的荧光强度降低,其原因可能是在 φ 为10%二甲基亚砷溶液中,在分子表面Tyr残基形成更稳定的氢键,造成荧光淬灭。

在不同体积分数的二甲基亚砷溶液中,木瓜蛋白酶的紫外光吸收第1吸收峰明显地向长波长方向移动和荧光发射光谱的变化,说明木瓜蛋白酶的构象发生变化。与在低体积分数二甲基亚砷溶液中相比,在较高体积分数下(φ 为30%和50%),随着二甲基亚砷体积分数升高,第1吸收峰向长波长方向移动更多,荧光发射光谱增加更大,说明木瓜蛋白酶构象变化更大。

本试验中,木瓜蛋白酶活性在低体积分数二甲基亚砷溶液中(φ 为5%、10%和20%),与对照相比,酶对底物分子的亲和力降低,最大反应速度上升,木瓜蛋白酶活性上升;与初志战等^[14]研究乙醇溶液对木瓜蛋白酶水解酪蛋白的催化活性影响的结果相似。这可能是在低体积分数二甲基亚砷溶液中(φ 为0%、5%、10%和20%),酶分子构象变化较小,虽然酶对底物分子的亲和力降低,但最大反应速度上升,木瓜蛋白酶活性也上升。随着二甲基亚砷体积分数进一步提高(φ 为30%以上),酶分子构象变化逐步加剧,木瓜蛋白酶的空间结构变得更加松弛, α -螺旋结构向无规则卷曲方向发展,木瓜蛋白酶活性逐步降低。

参考文献:

- [1] 彭立凤. 有机溶剂对酶催化活性和选择性的影响[J]. 化学进展, 2000, 12(3): 296-304.
- [2] GRABER M, BOUSQUET D, MARIE P, et al. Water plays a different role on activation thermodynamic parameters of alcoholysis reaction catalyzed by lipase in gaseous and organic media[J]. BBA-Proteins and Proteomics, 2003, 1645(1): 56-62.
- [3] BERMUDEZ O, FORCINITI D. Decontamination of surfaces by lysozyme encapsulated in reverse micelles[J].

- Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2004, 807(1): 95-103.
- [4] THEPPAKORN T, KANASAWUD P, HALLING P J, et al. Effect of solid-state buffers on the catalytic activity of papain in low water media[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(7): 828-836.
- [5] BALDASCINI H, JANSSEN D B. Interfacial inactivation of epoxide hydrolase in a two-liquid-phase system[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(2): 285-293.
- [6] 周先碗, 胡晓倩. 生物化学仪器分析与实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 3-50.
- [7] GHOSH S. Conformational study of papain in the presence of sodium dodecyl sulfate in aqueous medium[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 41(2): 209-216.
- [8] 张若兵, 罗炜, 程伦, 等. 脉冲电场对脂肪氧化酶活性及构象的影响[J]. 高电压技术, 2007, 33(2): 94-96.
- [9] BINDHU L V, EMILIA A T. Preparation and kinetic studies of surfactant-horseradish peroxidase ion paired complex in organic media[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 15(1): 47-57.
- [10] YADAV G D, DEVI K. Manjula kinetics of hydrolysis of tetrahydrofurfuryl butyrate in a three phase system containing immobilized lipase from *Candida antarctica*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 17(1): 57-63.
- [11] ZHANG Ting-zhou, YANG Li-rong, ZHU Zi-qiang. Determination of internal diffusion limitation and its macroscopic kinetics of the transesterification of CPB alcohol catalyzed by immobilized lipase in organic media[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(2): 203-209.
- [12] KARBOUNE S, ARCHELAS A, BARATTI J. Properties of epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* for the hydrolytic kinetic resolution of epoxides in pure organic media[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(2): 318-324.
- [13] SANGEETHA K, ABRAHAM T E. Chemical modification of papain for use in alkaline medium[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 38(3): 171-177.
- [14] 初志战, 黄卓烈, 巫光宏, 等. 乙醇溶液对木瓜蛋白酶催化活性的影响[J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(4): 329-332.
- [15] DRENTH J, JANSONIUS J N, KOEKOEK R. et al. Structure of papain[J]. Nature, 1968, 218: 929-932.
- [16] ARROYO-REYNA A, HEMANDEL-ARANA A. Arreguin-espinosa circular dichroism of stem bromelain: a third spectral class within the family of cysteine proteinase[J]. Biochem J, 1994, 300: 107-110.
- [17] 舒薇, 贺丽苹, 崔堂兵, 等. 聚乙二醇修饰对木瓜凝乳蛋白酶酶学及药物生物学性质的影响[J]. 华南农业大学学报, 2006, 27(1): 65-68.
- [18] BRADFORD M A. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [19] 夏炳乐, 李敏莉, 刘清亮, 等. 烟草过氧化物酶I的紫外-可见吸收光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(7): 830-833.
- [20] GLAZER A N, SMITH E L. Studies on the ultraviolet difference spectra of proteins and polypeptides[J]. J Biol Chem, 1961, 236: 2942-2947.
- [21] 许根俊, 邹承鲁. 胰蛋白酶在尿素溶液中的失活与复活的动力学[J]. 生物化学与生物物理学报, 1963, 3: 450-458.
- [22] 王守业, 徐小龙, 刘清亮, 等. 荧光光谱在蛋白质分子构象研究中的应用[J]. 化学进展, 2001, 13(4): 257-260.
- [23] 杨家祥, 张玉慧, 许兴友, 等. 荧光光谱在蛋白质分子构象研究中的应用[J]. 淮海工学院学报, 1999, 8(4): 28-31.

【责任编辑 李晓卉】