

盐酸胍变性烟草多酚氧化酶的复性

肖厚荣 徐小龙 解永树 刘清亮*

(中国科学技术大学化学与材料科学学院 合肥 230026)

摘要 研究了盐酸胍变性烟草多酚氧化酶后的复性。结果表明,在没有外加添加剂存在的条件下,最优的复性条件为:盐酸胍浓度为 1.5 mol/L,适宜的酶浓度为 1.5×10^{-4} g/mL,变性时间短(30 min);复性温度低(4 °C),此时,复性收率最高达到 63.36%。1.0 mol/L 硫酸铵具有一定的促进烟草多酚氧化酶复性的作用,与此相比,100 μ mol/L 硫酸铜促进烟草多酚氧化酶复性的效果较大,硫酸铜和硫酸铵存在协同作用,联合使用可获得最高的烟草多酚氧化酶复性收率。 β -环糊精对变性烟草多酚氧化酶的复性具有一定辅助作用,溴化十六烷基三甲基铵(CTAB)可增强 β -环糊精辅助变性蛋白质复性的作用。

关键词 多酚氧化酶,复性,盐酸胍, β -环糊精,溴化十六烷基三甲基铵

中图分类号:O629.7

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2005)01-0009-05

多酚氧化酶(简称PPO)是一类广泛存在于生物体内的铜蛋白^[1],在处理含酚废水方面有潜在应用价值^[2]。蛋白质的变性与复性是个相当复杂的过程,温度^[3,4]、压力^[5,6]、pH^[7-9]、二硫键^[10]以及金属离子^[11,12]都可制约蛋白酶的变性与复性。在蛋白质复性过程中,存在蛋白质分子内的疏水相互作用和肽链部分折叠的分子间的疏水相互作用,前者可促进蛋白质正确折叠成天然活性状态,而后者导致蛋白质形成无活性的聚集体,影响蛋白质的复性。为了抑制蛋白质的聚集作用,可以向变性液中加入适当浓度的添加剂,如聚乙二醇、 β -环糊精(β -CD)、表面活性剂^[13]以及广泛存在于原核和真核细胞体内的分子伴侣 GroEL 等,它们均能与伸展肽链的疏水基结合,防止变性蛋白质凝聚,促进其折叠成天然活性蛋白质^[14]。本文研究了盐酸胍变性的烟草多酚氧化酶的复性条件,为恢复多酚氧化酶提取纯化或使用过程中失去的部分活性,以及未来从基因工程生产多酚氧化酶中提取活性多酚氧化酶提供参考数据。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

盐酸胍(GdnHCl)、邻苯二酚、 β -环糊精(β -CD)、硫酸铜、硫酸铵、溴化十六烷基三甲基铵(CTAB)均为分析纯试剂。多酚氧化酶的分离纯化按文献[15]方法进行(烟草采自中国科学技术大学试验田),PAGE电泳显一条带,表明达到单一组分纯度。

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);721型分光光度计(上海第三分析仪器厂);pHS-10A数字酸度/离子计;Z型系列层析柱(上海锦华实验器械厂);BS-100型自动部分收集器(上海沪西电子仪器厂);1 000 mL梯度混合器(上海西巴琪生物技术开发公司);HD-21-88蛋白核酸检测仪,超级恒温水浴装置(上海医疗器械三厂)。

1.2 多酚氧化酶的活性测定、变性及复性

多酚氧化酶的活性测定采用分光光度法,以 0.05 mol/L 的邻苯二酚(磷酸缓冲液, pH = 6.5)为底物,加入一定量的酶液,25 °C 下催化反应 15 min 后,直接测 420 nm 处的吸光度,表示酶活的大小。以同浓度的邻苯二酚溶液为参比,以每分钟引起吸光度增加 0.01 定为一个酶活力单位。以未变性的相同量的酶的活性为 100 计算相对酶活性。

向 4.0×10^{-4} g/mL 的烟草多酚氧化酶溶液(0.02 mol/L, pH = 7.0 磷酸缓冲液), 添加盐酸胍至 6 mol/L, 在室温下搅拌均匀后静置。30 min 后酶不催化邻苯二酚氧化, 表明此时酶完全失活。

将变性 30 min 的酶液装入透析袋, 分别置于一定浓度的盐酸胍溶液中透析, 每隔一定时间从透析袋中取复性液, 测定其多酚氧化酶的活性。

2 结果与讨论

2.1 复性条件对盐酸胍复性多酚氧化酶效果的影响

2.1.1 盐酸胍浓度 图 1 为不同浓度盐酸胍溶液中 1.5×10^{-4} g/mL 的变性后 PPO 相对酶活性随时间的变化。从图中可以看出, 当浓度为 1.5 mol/L 时复性收率最高。这是由于: 一方面低浓度的盐酸胍在溶液中提供阴离子, 结合于蛋白质的荷正电基团上, 从而屏蔽静电排斥作用, 稳定其结构以及盐酸胍能够保护伸展肽链和部分折叠片断的疏水基, 抑制复性中间体的分子间聚集, 为复性制造条件。另一方面也能抑制分子内折叠, 而不利于酶的复性。当 GdnHCl 浓度为 1.5 mol/L 时, 盐酸胍对分子间聚集和对分子内折叠的 2 种抑制作用处于稳定的平衡之中所致。

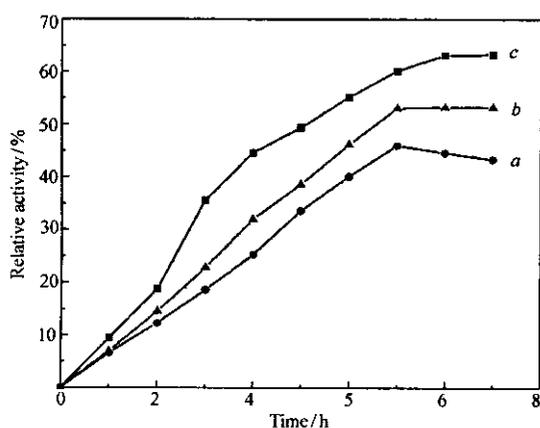


图 1 盐酸胍浓度对多酚氧化酶复性的影响

Fig. 1 Effect of GdnHCl concentration on PPO renaturation

(c GdnHCl) ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) a. 0.5; b. 2.5; c. 1.5;
(c PPO) = 1.5×10^{-4} g/mL; $t = 22$ °C

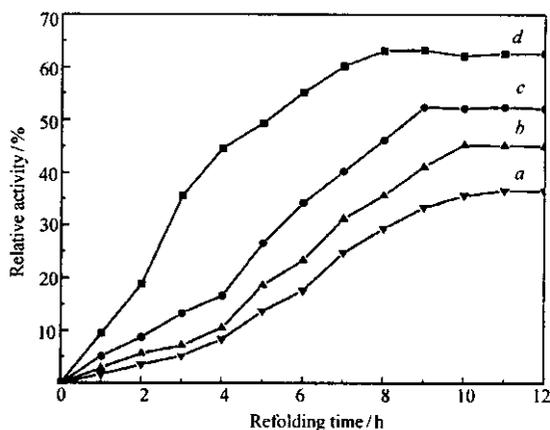


图 2 变性时间对多酚氧化酶复性的影响

Fig. 2 Effect of denaturation time on PPO renaturation

Denaturation time/min a. 180; b. 130; c. 80; d. 30
(c GdnHCl) = 1.5 mol/L; (c PPO) = 1.5×10^{-4} g/mL; $t = 22$ °C

2.1.2 变性时间、温度和酶浓度 图 2 是分别取变性不同时间的酶液装入透析袋, 置于 1.5 mol/L 盐酸胍溶液中透析, 相对酶活性随时间的变化。图中可以看到, 酶液的变性时间越短, 最大复性收率越大。这是由于蛋白质长时间处于高浓度变性剂下, 其伸展的肽链趋向于无序的松散状态, 分子表面结构发生变化, 亲水基减少, 疏水基暴露, 这种无序的程度越高, 正确折叠成活性蛋白质的几率就越小。所以, 变性时间越长, 伸展的蛋白质肽链恢复到天然活性结构的可能性就越小。

取 3 份变性 30 min 的酶液于试管中, 用稀释法降低其盐酸胍浓度至 1.5 mol/L, 然后将试管分别置于不同温度的水浴中, 开始计时, 每隔一定时间测复性液的酶活性, 结果见图 3。从图中可以看出, 随着温度的升高, 复性速率和复性收率都在下降。由于盐酸胍的作用使蛋白质的肽链呈现无序的松散状态, 分子表面结构发生变化, 亲水基减少, 疏水基暴露。温度的升高, 使得分子运动加剧, 导致分子间的碰撞几率增大, 造成中间体结构不能正确折叠, 能够折叠成天然活性构象的蛋白质数量减少, 使复性速率降低。

按上述实验方法, 得到不同酶浓度的变性酶液, 稀释盐酸胍至最终浓度均为 1.5 mol/L。每隔一定时间, 测其酶活性。由图 4 可以看出, 浓度为 0.15 mol/L 时, 变性烟草 PPO 复性速率和复性收率最好, 其次是浓度为 0.2 mol/L 的变性酶液, 其余 3 个浓度的的情况, 复性收率和复性速率存在交替变化现

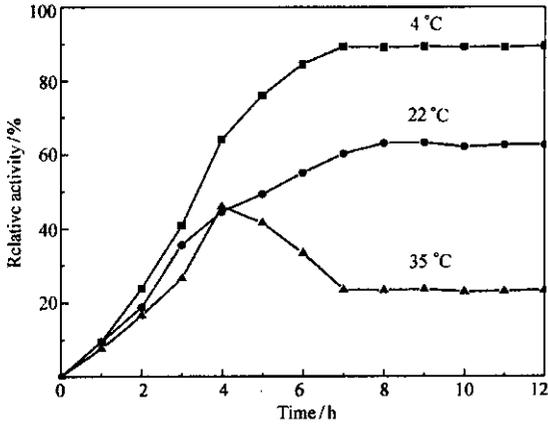


图 3 温度对多酚氧化酶复性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on PPO renaturation

$\alpha(\text{GdnHCl}) = 1.5 \text{ mol/L}$;
 $\alpha(\text{PPO}) = 1.5 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$

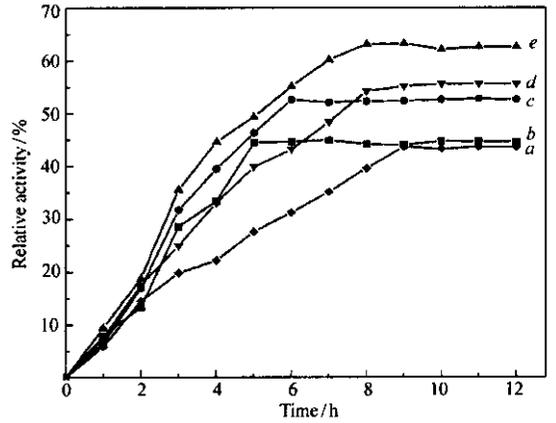


图 4 酶浓度对多酚氧化酶复性的影响

Fig. 4 Effect of PPO concentration on its own renaturation

$\alpha(\text{PPO})(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ a. 0.25 ; b. 0.05 ; c. 0.10 ; d. 0.20 ; e. 0.15 ;
 $\alpha(\text{GdnHCl}) = 1.5 \text{ mol/L}$; $t = 22 \text{ }^\circ\text{C}$

象。由此可见,蛋白质浓度过高或过低对其复性均不利。

2.2 不同添加剂对复性的影响

2.2.1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 与 CuSO_4 对复性的影响 取 4 份变性 30 min 的酶液,单独或共同加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 CuSO_4 并同时稀释盐酸胍的浓度为 1.5 mol/L ,于不同时间取样测其酶活性。由图 5 可以看出,硫酸铵促进烟草 PPO 复性的效果较小,硫酸铜促进烟草 PPO 复性的效果较大,硫酸铜和硫酸铵存在协同作用,联合使用可获得最高的烟草 PPO 复性收率。铜离子的存在在一定程度上保护了蛋白质的天然结构,降低了蛋白质的活性损失。

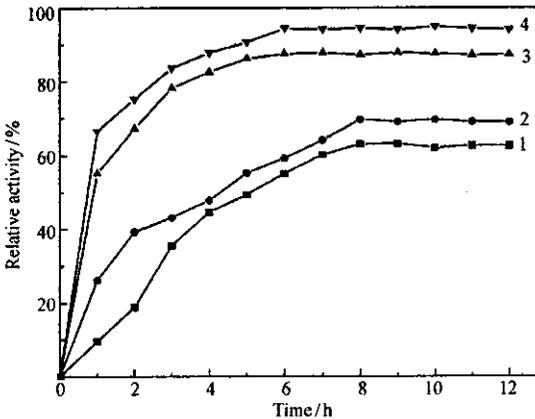


图 5 硫酸铵和硫酸铜对多酚氧化酶复性的影响

Fig. 5 Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and CuSO_4 on PPO renaturation

1. reference ; 2. $\alpha((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 1.0 \text{ mol/L}$;
3. $\alpha(\text{CuSO}_4) = 100 \text{ } \mu\text{mol/L}$; 4. $\alpha((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 1.0 \text{ mol/L}$ +
 $\alpha(\text{CuSO}_4) = 100 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $\alpha(\text{GdnHCl}) = 1.5 \text{ mol/L}$;
 $\alpha(\text{PPO}) = 1.5 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$; $t = 22 \text{ }^\circ\text{C}$

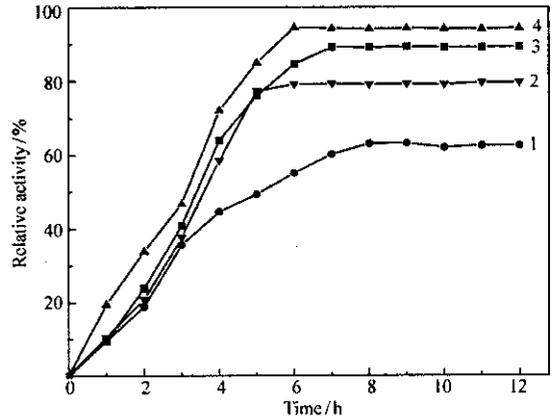


图 6 温度对 β -环糊精辅助多酚氧化酶复性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on PPO renaturation in the presence of β -CD

1. β . without β -CD ; 2. $\alpha(\beta\text{-CD}) = 72 \text{ mmol/L}$;
 $t = 4 \text{ }^\circ\text{C}$ (3 β) , $22 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 2) ; $\alpha(\text{GdnHCl}) = 1.5 \text{ mol/L}$;
 $\alpha(\text{PPO}) = 1.5 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$

2.2.2 β -环糊精与 CTAB 对复性的影响 取 8 份变性 30 min 的酶液置于试管中,分别或共同加入 β -CD 与 CTAB 并同时稀释至盐酸胍的终浓度为 1.5 mol/L ,于不同温度下复性。结果分别见图 6、图 7 和图 8。

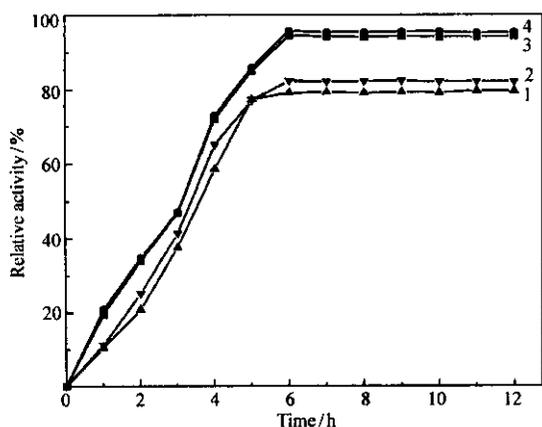


图7 2种温度下不同浓度 β -环糊精对多酚氧化酶复性的影响

Fig. 7 Effect of concentration of β -CD on PPO renaturation at different temperatures

1 β . α (β -CD) = 72 mmol/L; 2 β . α (β -CD) = 144 mol/L;
 α (GdnHCl) = 1.5 mol/L; α (PPO) = 1.5×10^{-4} g/mL;
 t 4 $^{\circ}\text{C}$ (3 β); 22 $^{\circ}\text{C}$ (1 2)

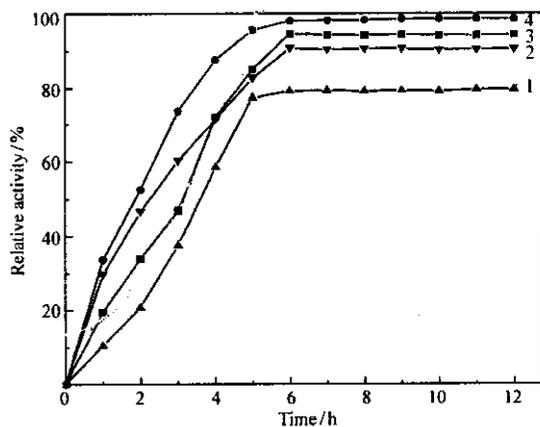


图8 β -环糊精与CTAB共同作用对多酚氧化酶复性的影响

Fig. 8 Effect of β -CD with CTAB on PPO renaturation at different temperatures

1 β . α (β -CD) = 72 mmol/L; 2 β . α (β -CD) = 72 mmol/L +
 α (CTAB) = 1.6 mmol/L; 4 $^{\circ}\text{C}$ (3 β); 22 $^{\circ}\text{C}$ (1 2);
 α (GdnHCl) = 1.5 mol/L; α (PPO) = 1.5×10^{-4} g/mL

从图6中可以看出,7 h后,各种条件下的复性液都达到了最高复性收率。在4 $^{\circ}\text{C}$ 和22 $^{\circ}\text{C}$ 环境下,自发复性最高收率分别为89.3%、63.65%。添加了72 mmol/L β -环糊精后,在4 $^{\circ}\text{C}$ 和22 $^{\circ}\text{C}$ 环境下,最高收率分别为94.36%和76.77%。图7则表明,在实验范围内 β -环糊精浓度变化影响不大。由此可见, β -环糊精对变性烟草PPO的复性具有一定辅助作用,但促进复性的效果有限,这是由于 β -环糊精并没有完全有效抑制伸展肽链间疏水性相互作用,特别是当变性酶浓度提高时,变性蛋白肽链间的相互接触几率增大,更易发生凝聚而影响复性率。

比较图6和图8可以看出,表面活性剂CTAB可增强 β -环糊精辅助变性烟草PPO复性的作用。其作用机理如下:第1步是先加入的表面活性剂与肽链间通过疏水性作用形成复合体,抑制伸展肽链间的相互作用;第2步,加入的 β -环糊精对表面活性剂有竞争性吸附作用,可剥离结合在肽链上的表面活性剂分子,启动肽链的分子内折叠和复性。结果表明,在变性酶的复性中表面活性剂与低浓度 β -环糊精联合作用比单纯提高 β -环糊精浓度的效果显著。

参 考 文 献

- 1 Mayer A M. *Phytochemistry*[J],1987 **26** :11
- 2 Sopel-Revas C ,Jolivet S ,Arpin , et al. *Microbiology Review*[J],1999 **23** :591
- 3 Scalley M L ,Baker D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*[M]. Washington :NATL ACAD Sciences ,1997 **94**(20) :10 636
- 4 Griko Y V ,Remeta D P. *Protein Sci*[J],1999 **8** :554
- 5 Valente-Mesquita V L ,Botelho M M ,Ferreira S T. *Biophys*[J],1998 **75** :471
- 6 Chapeaurouge A ,Johansson J S ,Ferreira S T. *Biol Chem*[J],2001 **276** :14 861
- 7 Whitten S T ,Wooll J O ,Razeghifard R , et al. *Mol Bio*[J],2001 **309** :1 165
- 8 Gupta S ,Warne A ,Saraste M , et al. *Biochemistry*[J],2001 **40** :1 180
- 9 Cheng H ,Sukal S ,Callender R , et al. *Biol Chem*[J],2001 **276** :9 931
- 10 Liu X Q ,Wang C C. *Biol Chem*[J],2001 **276** :1 146
- 11 Ahmad A ,Akhtar M S ,Bhakuni V. *Biochemistry*[J],2001 **40** :1 945
- 12 Xu X L ,Liu Q L ,Xie Y S. *Biochemistry*[J],2002 **41** :3 546
- 13 Rozema D ,Gellman S H. *Biol Chem*[J],1996 **271** :3 478
- 14 Houry W A ,Frishman D ,Eckerskorn C , et al. *Nature*[J],1999 **402** :147

15 Shi C H ,Dai Y ,Xu X L , *et al.* *Protein Expression Purification*[J] 2002 24 51

Renaturation of GdnHCl-denatured Polyphenol Oxidase from Tobacco

XIAO Hou-Rong , XU Xiao-Long , XIE Yong-Shu , LIU Qing-Liang *

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

Abstract The renaturation of polyphenol oxidase from Tobacco denatured in 6.0 mol/L guanidine hydrochloride(GdnHCl) was investigated. In the absence of additives(s) , the optimal renaturation conditions , with 63.36% of activity recovered , are as follows :1.5 mol/L GdnHCl , denaturation time 30 min , renaturation temperature 4 °C and enzyme concentration 1.5×10^{-4} g/mL. 1.0 mol/L(NH_4)₂SO₄ showed a limited effect on the recovering of PPO activity. Using both 1.0 mol/L(NH_4)₂SO₄ and 100 μmol/L CuSO₄ was the most effective method , and the renaturation system with both CTAB and β-CD together showed a more favorable effect on the enzyme renaturation , than that with the single β-CD.

Keywords polyphenol oxidase ,renaturation ,guanidine hydrochloride ,β-cyclodextrin ,cetyl trimethylammonium bromide

第五届全国膜与膜过程学术报告会第一轮通知

第五届全国膜与膜过程学术报告会由中国科学院长春应用化学研究所承办 ,于 2005 年 8 月上旬在长春召开。

会议宗旨 :展示新世纪以来我国膜科研、生产及应用的现状和水平 ,促进膜科研成果及信息的交流 ,鼓励创新性和前沿性的思想和理论的提出 ,注重膜的学术研究与膜的产业化及膜技术应用的结合 ,研讨“ 十一五 ”期间我国膜科技的发展思路和趋势 ,为提升我国膜科技水平和加快高技术膜产业化的进程作出贡献 ,并且结合重大项目 ,探讨膜科技如何更好地为国民经济可持续发展和振兴东北老工业基地服务。

征文范围 :1)膜科学的基础理论研究 2)新膜、新膜材料、新制膜方法及膜性能表征 3)规模化制膜工艺与工程中高技术集成的研究与开发 4)反渗透、纳滤、超滤、微滤、气体分离、渗透汽化、电渗析、膜蒸馏、控制释放膜、生物膜及其它功能膜与膜过程的理论和膜技术在各个领域中的应用研究 ,探讨膜应用过程的重大技术问题 5)新型膜过程的研究开发 ; 6)膜技术的集成研究。

征文要求 :1)符合征文范围、未公开发表的论文均可应征 2)论文用中文撰写 ,也接受英文撰写的稿件 3)应征论文请首先提供 1 000 字以内(限 1 页)的中文摘要 ,论文用 Word2000 或 Word97 排版(A4 纸) ,激光打印 ,打印版面 23 cm × 15 cm ,图尺寸 6 cm × 6 cm。论文标题用三号黑体 ,人名用四号宋体 ,工作单位、邮编及正文用五号宋体 ,采用 1.5 倍行间距 ,篇幅限制在 4 000 字以内。

会议时间表 :2004 年 9 月中旬第一轮会议通知 ;2005 年 2 月 1 日论文摘要截止 ;2005 年 3 月上旬第二轮会议通知 ;2005 年 6 月 1 日全文或详细摘要截止 ;2005 年 7 月 1 日第三轮会议通知 ;预注册 :2005 年 8 月上旬会议报到与举行。

联系方式 :投稿请邮寄或 E-mail 至下述地址(请注明会议投稿)

地址 :吉林省长春市人民大街 5625 号(130022) 单位 :中科院长春应用化学研究所高分子工程室

联系人 :张丰 张所波 吴庸烈 郑国栋 ;电话 :0431-5262620、5262386、5262273 ;传真 :0431-5685653

E-mail :5thc_mem@ciac.jl.cn zhangf@ciac.jl.cn ylwu@ciac.jl.cn