

保护剂对胆固醇氧化酶稳定性机理的研究

陈 亦, 辛 瑜, 杨海麟, 张 玲, 张玉然, 仝艳军, 王 武*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用荧光光谱、圆二色性光谱及凝胶电泳等方法, 研究液态胆固醇氧化酶失活机理。根据失活机理, 选择添加两种不同保护剂提高酶稳定性, 研究提高酶稳定性的机理。37 ℃下, 添加15%甘油的液态酶稳定性较佳, 45 h后酶活保留率提高58%, 核黄素对酶基本无保护作用。经研究分析, 甘油主要通过有效抑制分子间聚集, 维持二级结构, 增强酶稳定性; 核黄素不能抑制酶自身聚集, 对酶保护作用不明显。

关键词: 胆固醇氧化酶; 稳定性; 保护剂; 稳定机理

中图分类号: Q 554 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)06—0661—06

Study on the Effect of Protective Additives on Stability Mechanism of Cholesterol Oxidase

CHEN Yi, XIN Yu, YANG Hai-lin, ZHANG Ling, ZHANG Yu-ran, TONG Yan-jun, WANG Wu*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: An effective method to keep the stability of cholesterol oxidase (COD) was provided by studying on stability mechanism of COD. Deactivation mechanism of COD was analyzed by fluorescence spectra, circular dichroism spectra and SDS-PAGE. We added two additives into the preparation of COD and stabilization mechanism was studied. The results indicated that 15% glycerin was selected as the best protector at 37 ℃ and the remained enzyme activity was increased by 58% after 45 hours. Riboflavin had no significant effect on enzyme stability. A mechanism for the glycerin effect on inhibiting protein aggregation, protecting protein secondary structure and maintaining high activity was proposed. It also showed that riboflavin had no protective effects against protein aggregation.

Keywords: cholesterol oxidase, stability, protective additive, protective mechanism

胆固醇氧化酶 (cholesterol oxidase; COD; EC 1.1.3.6) 属于黄素蛋白, 能专一催化胆固醇转化为胆

甾-4-烯-3-酮, 作为检测酶广泛应用于医疗检测领域, 是重要的诊断酶制剂。

收稿日期: 2012-06-08

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目 (SBE201077545 和 SBE201170578); 江南大学自主科研计划资助 (JUSRP11120)。

作者简介: 王 武 (1952—), 女, 福建福州人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程和遗传工程方面的研究。

E-mail: wangwu@jiangnan.edu.cn

诊断用酶制剂应用中,酶稳定性是重要因素之一,因此增强诊断用酶稳定性,成为了极为迫切的现实问题。提高酶稳定性方法有蛋白质工程、固定化、添加保护剂等,其中添加保护剂具有方法简单、成本低等优点,已成为一种常用的方法。酶保护剂主要有辅基、蛋白质、多元醇、防腐剂等,其中醇类能提高酶稳定性。Liao Y 等^[1]使用甘油促使冻干的过氧化氢酶复性,随着甘油浓度上升,过氧化氢酶复性速率加快;Costa 等^[2]研究多种添加剂对过氧化氢酶的影响,其中甘油和聚乙烯乙二醇能增加其储存稳定性。

作者所在实验室重组菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a 表达的 COD 稳定性较差,通过研究液态纯酶稳定机理,选择甘油和核黄素两种保护剂,结合光谱法研究保护机理,提供增强酶稳定性的有效方法,对该酶应用具有重要价值,也为其他酶类稳定性提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 菌种来源 重组菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-COD:作者所在实验室保藏。

1.1.2 主要仪器 电热恒温水浴锅:上海医疗器械五厂制造;蛋白电泳仪:美国 BIO-RAD 公司制造;F-7000 型荧光分光光度计:日立公司制造;MOS-450 AF-CD 圆二色性光谱仪:法国 Bio-Logic 公司制造。

1.2 实验方法

1.2.1 COD 纯酶制备 菌种培养发酵培养见文献[3],酶液亲和纯化见文献[4-5],制备 COD 纯酶液。

1.2.2 COD 酶活测定方法 胆固醇氧化酶测定方法:参见文献[6]。

1.2.3 甘油对 COD 稳定性影响 6 U/mL(0.15 mg/mL)、pH 7.5 的纯酶液分别添加体积分数 5%、10%、15%甘油,37 °C 水浴,定时取样测定其残余酶活,初始酶活为 100%,计算酶活保留率(%)。取样测定溶液浊度($OD_{340\text{ nm}}$),同时取样 SDS-PAGE 和圆二色性光谱分析(扫描范围 190~250 nm)。

1.2.4 核黄素对 COD 稳定性影响 6 U/mL(0.15 mg/mL)、pH 7.5 的纯酶液分别添加 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 核黄素,37 °C 水浴定时取样,测定残余酶活及浊度,并取样荧光分析。COD 激发波长 280 nm,发射波长

280~400 nm;辅基 FAD 激发波长 460 nm,发射波长 460~620 nm。

2 结果与讨论

2.1 胆固醇氧化酶(COD)稳定机理研究

COD 最适反应 pH 为 7.5^[7],故实验选择 37 °C、酶浓度 6 U/mL、pH 7.5 研究酶稳定性,结果见图 1。随时间延长酶活降低,45 h 降至 2.65%;初始酶液澄清透明,但随时间延长,酶分子运动速率加快,分子间碰撞速率增大,酶分子间聚集,溶液浑浊^[8]。

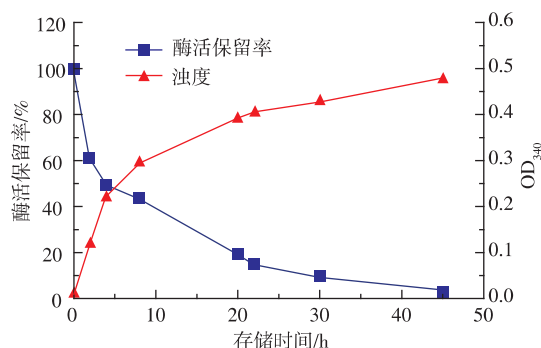


图 1 存储不同时间对 COD 酶活及浊度影响

Fig. 1 Effects of different time on cholesterol oxidase activity and turbidity

COD 为单亚基蛋白质,相对分子质量 59 000, SDS-PAGE 电泳见图 2。前 4 小时未产生多聚体,且目的条带粗细大致相同,说明酶自身未发生降解;而后逐渐出现多聚体条带,可能由于 COD 高级结构改变,导致分子间发生聚集作用。

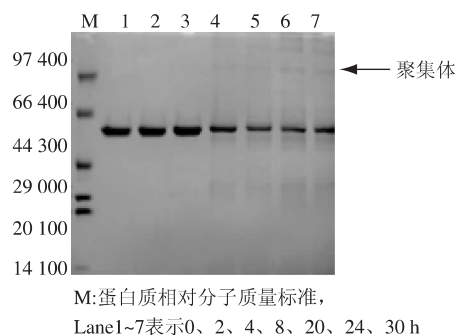


图 2 不同存储时间的 COD SDS-PAGE 图

Fig. 2 Analysis by SDS-PAGE after different time

蛋白质 Trp、Tyr、Phe 具有荧光性,FAD 为 COD 辅基,含异咯嗪环,也具荧光性^[9]。图 3a 中 COD 最大荧光强度随时间延长先增加后减小,前 8 小时最大荧光强度逐渐增强,主要由于 COD 内部 Trp、Tyr 等

疏水性基团逐渐暴露,导致荧光强度上升;后期最大荧光强度逐渐降低,可能由于聚集导致一些原本处于单分子表面的 Trp、Tyr 包裹于聚集体内部,荧光强度降低。

图 3b 显示辅基 FAD 荧光图谱,其最大荧光强度和最大发射峰变化均不明显。24 h 内 FAD 荧光强度变化不大,通常 COD 与 FAD 结合摩尔比为 1:1,图 3 中与 COD 同等摩尔浓度的核黄素(B_2)溶液荧光强度明显高于 FAD,而且大肠杆菌不能提供充足 FAD,且其自身不能进入细胞,只能通过将核黄素运输至胞内,并经浓缩和磷酸化作用转化为辅酶 FAD^[10],因此推断 COD 大量表达过程中,由于辅酶 FAD 合成速度有限,未能完全结合 FAD 辅基。

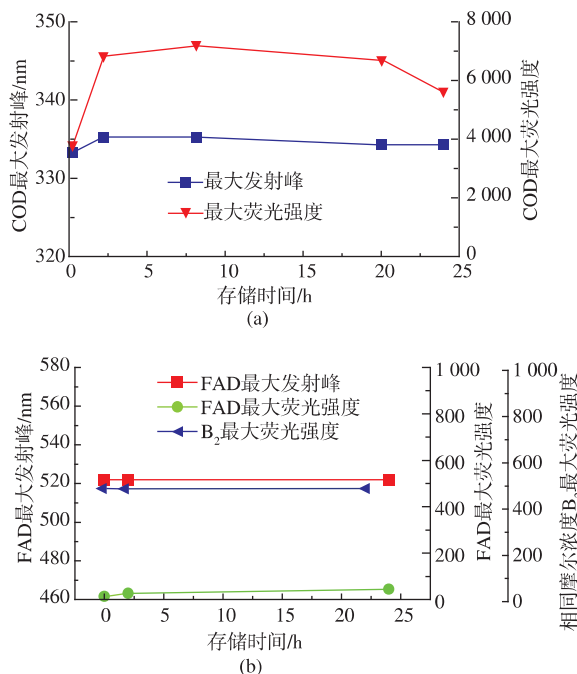


图 3 不同存储时间 COD 和 FAD 的荧光光谱图

Fig. 3 Fluorescence spectra of cholesterol oxidase (a) and FAD (b) under different time

在图 4 中,COD 在 24 h 二级结构特征峰基本消失,说明其天然构象破坏,酶变性失活。

通过酶活力、浊度、SDS-PAGE、荧光光谱及圆二色性光谱分析,37 °C 存储过程中,COD 内部疏水基团逐渐暴露,二级结构破坏,分子间聚集导致溶液浊度上升,酶分子变性,导致酶活力下降,同时荧光光谱显示 COD 在表达过程中未充分结合 FAD。因此,导致溶液 COD 不稳定因素主要有酶蛋白聚集导致构象变化以及缺乏辅基 FAD。

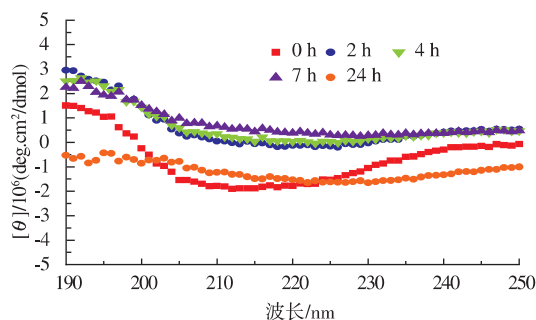


图 4 存储不同时间 COD 圆二色性光谱

Fig. 4 CD spectra of cholesterol oxidase under different time

2.2 甘油对 COD 稳定性影响

图 5 表示不同甘油浓度对 COD 酶活及浊度影响,浓度愈大保护作用愈强,45 h 时 15% 甘油组酶活保留率 60.25%,而对照组酶活保留率仅为 2.2%。图 5b 甘油组酶液浊度低于对照组,30 h 对照组 OD_{340 nm} 为 0.461,甘油组 OD_{340 nm} 最高值仅为 0.077。

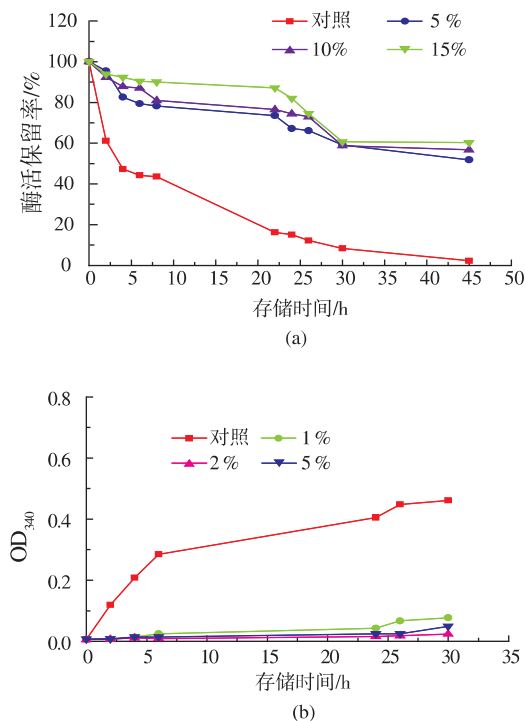


图 5 不同甘油体积分数对 COD 酶活和浊度影响

Fig. 5 Effects on cholesterol oxidase activity (a) and turbidity (b) under different glycerol concentration

图 6 为不同体积分数甘油对 COD 的 SDS-PAGE 图,a 为对照组,8 h 开始出现聚集体;5% 甘油组 30 h 出现微量聚集体条带,而 10% 和 15% 甘油组 45 h 未出现聚集。

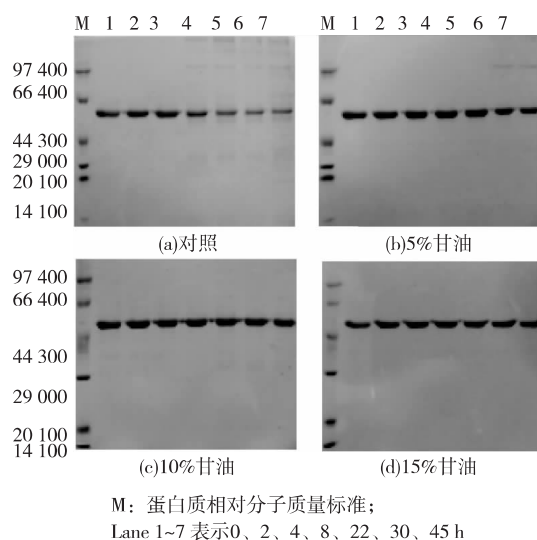


图6 不同甘油体积分数下 COD 的 SDS-PAGE 图

Fig. 6 Analysis by SDS-PAGE under different glycerol concentration

图7显示COD在添加不同体积分数甘油的CD光谱,对照组随时间的延长,二级结构逐渐丧失,24 h 二级结构特征峰基本消失,酶分子基本变性;甘油对COD的保护作用明显,24 h COD 二级结构保持较好,维持酶分子高级构象,使酶分子保持稳定。

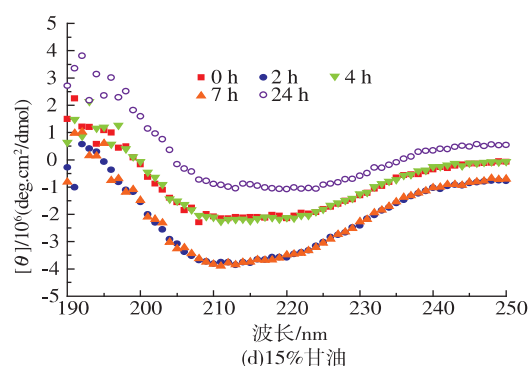
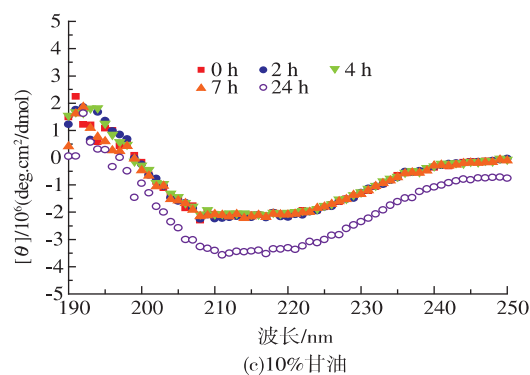
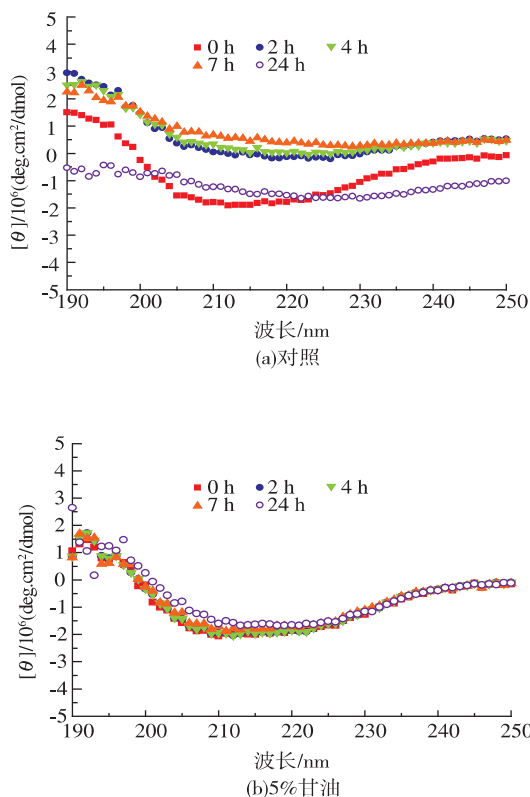


图7 不同甘油浓度下 COD 的圆二色性光谱

Fig. 7 CD spectra of cholesterol oxidase under different glycerol concentration

甘油能提高溶液粘度和增加分子表面水化层,粘度上升减少肽链间的碰撞,抑制酶分子间聚集^[11],CD光谱显示甘油维持酶分子二级构象免遭破坏,维持酶分子天然构象,提高酶稳定性,表现酶活力相对稳定。

2.3 核黄素对 COD 稳定性影响

除诺卡氏菌 *Nocardia* 产的 COD 外^[12],其他微生物源的 COD 均以 FAD 为辅基,本实验中 COD 与 FAD 属于非共价结合,而且大量表达 COD 时未完全结合 FAD,因此添加 FAD 类似物的核黄素(B_2)研究对 COD 稳定性影响。

不同浓度 B_2 对 COD 酶活及浊度的影响结果见图8。加入 B_2 的酶活保留率与对照组没有明显差别,29 h 对照组 $OD_{340\text{ nm}}$ 0.348, B_2 组 $OD_{340\text{ nm}}$ 最大为 0.431,溶液浑浊产生聚集现象, B_2 对 COD 未起保护作用,可能由于 B_2 未与 COD 结合或者 B_2 虽于 COD 结合但并未抑制其聚集。

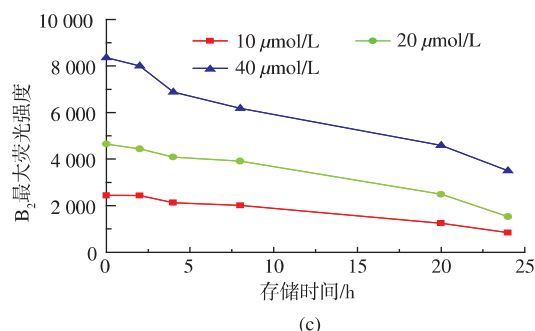
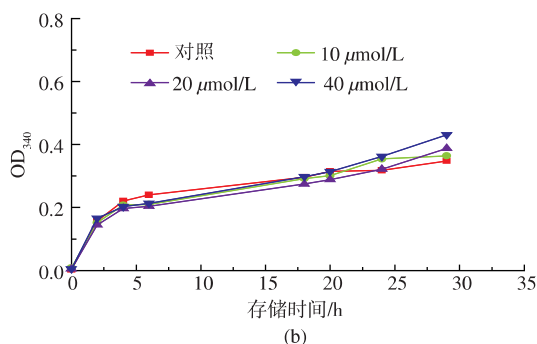
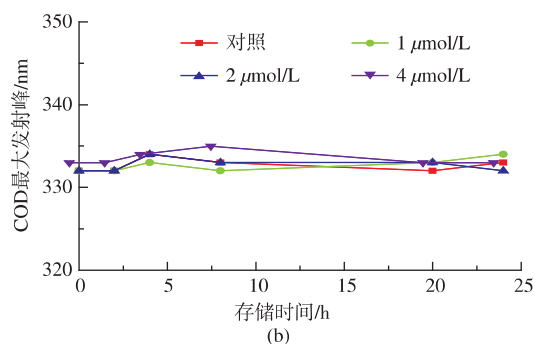
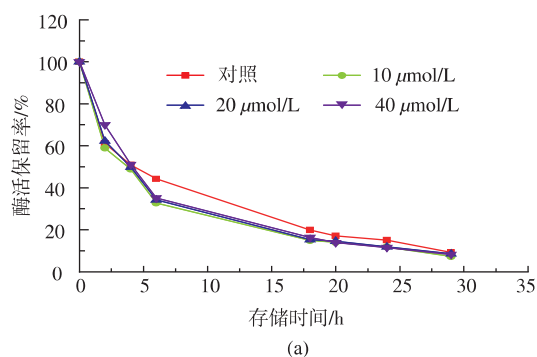


图 8 不同 B₂ 浓度对 COD 酶活和浊度影响

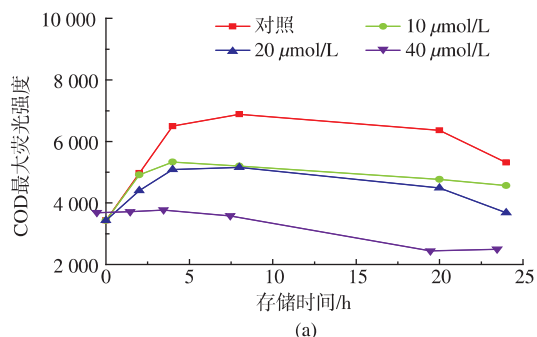
Fig. 8 Effects on cholesterol oxidase activity (a) and turbidity (b) under different riboflavin concentration

图 9 是不同浓度 B₂ 存在下, COD 内源荧光及 B₂ 荧光图谱, B₂ 具有异咯嗪环, 因此也具荧光性。图 9a 中随 B₂ 浓度增加, 荧光强度增幅愈小, 可能由于 B₂ 和 COD 结合, 使一部分疏水基团内埋于内部疏水环境中, 同时 COD 最大发射峰未明显移动, 见图 9b。图 9c 表示 B₂ 荧光光谱, 随着时间延长其荧光强度逐渐降低, 可能原因有两个, 一是 B₂ 异咯嗪环与 COD 结合导致 B₂ 荧光猝灭, 另一可能就是 B₂ 降解致使荧光强度降低。图 3b 中 B₂ 在 24 h 后荧光强度未发生明显变化, 说明 24 h 内 B₂ 未发生降解, 表示该现象是由于 B₂ 与 COD 结合导致荧光强度降低。

图 9 不同 B₂ 浓度下 COD 和相应 B₂ 荧光图谱

Fig. 9 Fluorescence spectra of cholesterol oxidase under different riboflavin concentration

荧光光谱表明 B₂ 与 COD 结合, 抑制一部分疏水基团暴露, 但由于该抑制作用较弱, 未能防止 COD 间聚集, 溶液浊度上升, COD 构象变化, 对 COD 稳定作用不佳。由于甘油能防止酶分子间聚集, 通过向酶液中添加 10% 甘油, 再以 COD 与 B₂ 摩尔比 1:1、1:5、1:10 添加不同浓度的核黄素, 分析其对 COD 稳定性影响, 结果见图 10。随摩尔比升高, 酶活保留率却逐渐降低, 65 h 对照组酶活保留率 39.3%, 摩尔比 1:1 组酶活保留率 31.4%, 而摩尔比 1:10 组的酶活保留率却只有 9.8%。核黄素由异咯嗪基和核糖醇基构成的一种 B 族维生素^[13], 核黄素的异咯嗪基虽与 FAD 结合域结合, 但由于 COD 的 FAD 结合域口袋较浅, 因此核黄素对 COD 稳定性作用不显著, 而且摩尔比越大酶活保留率越低, 可能由于过多的核黄素, 其疏水基团与 COD 分子疏水基团结合, 对 COD 构象具有不利影响, 因此产生不利的稳定作用。



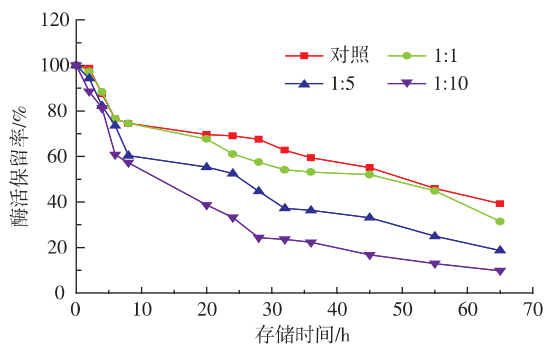


图 10 不同摩尔比 B_2 及甘油对 COD 活性影响

Fig. 10 Synthetic effects of different molar ratio of riboflavin and glycerol on cholesterol oxidase activity

3 结 语

研究分析了 COD 不稳定机理, 由于 COD 内部疏水基团暴露导致聚集以及缺乏辅基 FAD, 导致二级构象破坏, 酶变性失活, 造成酶分子不稳定。根据失活机理, 选用甘油、核黄素两种保护剂, 研究其对 COD 稳定性影响, 甘油提高溶液粘度和分子表面水化层, 防止分子间聚集, 二级构象保持良好, 酶活力相对稳定, 酶稳定性提高; 核黄素作为 COD 的辅基类似物, 虽能与 COD 结合, 抑制部分疏水基团暴露, 但由于 COD 的 FAD 结合域口袋较浅, 且过多核黄素的疏水基团与 COD 分子疏水基团结合, 对 COD 稳定性产生不利的影响; 实验结论不仅提供了可稳定 COD 酶液的方法, 而且研究了其保护机理。

参考文献:

- [1] Liao Y H, Brown M B, Quader A, et al. Protective mechanism of stabilizing excipients against dehydration in the freeze-drying of proteins[J]. *Pharm Res*, 2002, 19(12): 1854-1861.
- [2] Costa S A, Tzanov T, Cameiro A F, et al. Studies of stabilization of native catalase using additives[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 30: 387-391.
- [3] 李闯, 孙艳, 张玲, 等. 乳糖诱导重组大肠杆菌表达胆固醇氧化酶的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(5): 470-474.
LI Chuang, SUN Yan, ZHANG Ling, et al. Expression cholesterol oxidase gene in recombinant *Escherichia coli* using lactose as inducer[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2011, 30(5): 470-474. (in Chinese)
- [4] 王龙刚, 邬敏辰, 王武. 胆固醇氧化酶基因的克隆及在 *E. coli* 中的表达[J]. 微生物学通报, 2006, 336: 39-42.
WANG Long-gang, WU Min-chen, WANG Wu. Cloning and expression of *Brevibacterium sp.* DG CDC-82 cholesterol oxidase gene in *Escherichia coli*[J]. *Microbiology*, 2006, 336: 39-42. (in Chinese)
- [5] Yu Xin, Hailin Yang, Xiaole Xia, et al. Affinity purification of a cholesterol oxidase expressed in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Chromatography B*, 2011: 1-6.
- [6] 季文明, 陈毅力, 张和春. 比色法测定 COD 酶活[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(3): 251-254.
JI Wen-ming, CHEN Yi-li, ZHANG He-chun. Colorimetric determination of the activity of cholesterol oxidase [J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2000, 19(3): 251-254. (in Chinese)
- [7] 张玲, 霍惠芝. 甾短杆菌胆固醇氧化酶基因在大肠杆菌中的表达[J]. 生物加工过程, 2008, 6(1): 21-26.
ZHANG Ling, HUO Hui-zhi. Expression of cholesterol oxidase gene from *Brevibacterium sp.* DG CDC-82 in *E. coli* [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2008, 6(1): 21-26. (in Chinese)
- [8] Speed M A, King J. Polymerization mechanism of polypeptide chain aggregation[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 54: 333-343.
- [9] Martha P Brown, Catherine Royer. Fluorescence spectroscopy as a tool to investigate protein interactions [J]. *Biotechnology*, 1997, 8: 45-49.
- [10] 郝淑美, 王宣军, 张秀霞. 用乳糖作为诱导剂进行重组蛋白的表达[J]. 中国生物制品学杂志, 2005, 18(5): 409-412.
HAO Shu-mei, WANG Xuan-jun, ZHANG Xiu-xia. Expression of recombinant gene in *E. coli* using lactose as inducer[J]. *Chin J Biologicals*, 2005, 18(5): 409-412. (in Chinese)
- [11] Timasheff S N, Araka Wa T. Mechanisms of protein precipitation and stabilization by co-solvents[J]. *J Cryst Growth*, 1998, 90: 39-46.
- [12] Cheelham P S J, Dunnill P, Lilly M D. The characterization and interconversion of three forms of cholesterol oxidase extracted from *Nocardia rhodochrous*[J]. *J Biochem*, 1982, 201: 515-521.
- [13] 王希成. 生物化学[M]. 北京: 清华大学出版社, 2001.