

唐 功,任朝琴,戴先芝,等. 辣根过氧化物酶生物印迹与交联[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):53-54.

辣根过氧化物酶生物印迹与交联

唐 功,任朝琴,戴先芝,鲜雪梅

(阿坝师范高等专科学校化学化工与生命科学系,四川汶川 623002)

摘要:对辣根过氧化物酶进行生物印迹,最佳模板选择根据检测印迹后酶活力大小来定,并对印迹的辣根过氧化物酶进行了乙酰化和交联,用三硝基苯磺酸法检测乙酰化和交联的程度。结果表明,以对苯二胺为模板最佳,印迹酶活性比游离酶增加约 10 倍。

关键词:辣根;过氧化物酶;生物印迹;交联

中图分类号: Q554⁺.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0053-02

Russell 等发现有机溶剂中酶有一个非常奇特的现象,通过配体与酶之间的相互诱导、相互作用可以改变酶的构象,即生物印迹^[1]。通过生物印迹提高酶在有机溶剂中的催化活性,增加其作为催化剂的应用,如印迹脂肪酶在手性药物中间体的拆分、食品分析、有机合成等过程中,都表现出了较好的催化活性^[1]。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)是一种糖蛋白,以铁卟啉为辅基,在过氧化氢存在时能催化苯酚、苯胺及其取代物聚合,由于在辣根中含量很高而得名。试

验以 HRP 为印迹对象,以底物及底物类似物为模板,分别对 HRP 进行生物印迹,通过检测印迹后酶活力大小来确定最佳模板,后对印迹的辣根过氧化物酶进行乙酰化和交联,用三硝基苯磺酸法检测乙酰化和交联的程度。印迹酶具有抗恶劣环境、高稳定、长寿命、可设计性和催化效率高等特点,为酶的人工模拟开拓了新的途径。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂:HRP:Ec1.11.1.7,250 U/mg,上海生工;马来酸酐,江阴市顺飞精细化工厂;乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA),上海生工;对苯二胺 C. P,上海生工;偶氮二异丁腈(AIBN) A. R,上海市四赫维化工有限公司;二甲苯 A. R,天津市巴斯夫化工有限公司;对甲苯磺酸 A. R,天津市科密欧化学试剂有

收稿日期:2013-03-05

基金项目:四川省教育厅 2011 年自然科学重点项目(编号:11ZA179)。

作者简介:唐 功(1970—),男,硕士,讲师,主要从事生物化学-酶工程研究。E-mail:sdezgt@163.com。

养条件中,30 d 后统计试验结果,结果增殖倍率高达 4.800,优于正交试验中的各组,故金线兰根状茎茎段增殖培养最佳培养条件为:MS+6-BA 3.0 mg/L+KT 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L。

3 讨论

根状茎外形与根相似,蔓生于土层下,具有明显的节和节间,叶退化成非绿色的鳞片叶,叶腋中的腋芽或根状茎的顶芽可形成背地性之力的地上枝,同时节上产生不定根。根状茎贮有丰富的营养物质,可存活 1 年以上,若因耕犁等外力切断时,茎段上的腋芽仍可再生为新株^[4]。根状茎比地上茎有更强的生活力,以根状茎为材料诱导的试管苗可能比以地状茎为材料诱导的试管苗具有更强适应力。相关报道中,以根状茎为材料诱导的试管苗研究较少,笔者报道了金线兰根状茎初代培养研究^[5],王建勤等报道了金线兰根状茎增殖培养研究,他以 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA3.0 mg/L 的培养条件获得了 5.4 倍的增殖倍率^[6],比本试验的增殖倍率高 0.6,原因可能是:(1)王建勤等使用的外植体产自福建省,而本试验所用外植体产自贵州省,不同外植体对植物生长调节物质的响应程度不同;(2)王建勤等的试验周期为 45 d,本试验的周期为 30 d,较长的培养时间有利于更多芽的产生。

在金线兰组织培养研究结论中,植物生长调节物质

6-BA 对组织培养结果的影响强于 KT,本研究发现植物生长调节物质 KT 对根状茎腋芽的增殖作用达到 $\alpha=0.10$ 的显著影响,而植物生长调节物质 6-BA 和 NAA 对根状茎腋芽的诱导作用没有达到显著水平,3 种植物生长物质作用强弱依次是:NAA>6-BA>KT。原因可能为:目前大多数金线兰组织培养选用的材料为地上茎和原球茎,而本研究采用的试验材料为金线兰地下茎,不同材料部位可能对不同的植物生长调节物质的响应程度不同。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志:第 17 卷[M]. 北京:科学出版社,2000:220.
- [2] 顾德峰,刘 喆,宋彦君,等. 蝴蝶兰类原球茎玻璃化产生的原因及恢复效果研究[J]. 北方园艺,2007(8):183-185.
- [3] 黄云华,陈庆富. 普通养麦植株茎段快速繁殖技术的研究[J]. 武汉植物学研究,2009(4):417-422.
- [4] 叶创兴,朱念德,廖文波,等. 植物学[M]. 北京:高等教育出版社,2007:29.
- [5] 李 光,龚 宁,周伟香,等. 应用正交设计优选花叶开唇兰初代培养基[J]. 种子,2006(11):69-71.
- [6] 王建勤,林兰英,陈 钢. 药用金线莲根状茎组培育苗研究[J]. 时珍国药研究,1995(1):36-37.

限公司;对甲氧基苯甲酸 A. R, 中国医药集团化学试剂有限公司;三硝基苯磺酸(TNBS) A. R, Sigma 公司。

仪器:冷冻离心机;真空冷冻干燥机;紫外光聚合仪;UV-1800 紫外可见分光光度计(日本岛津);Digilab Merlin FT-IR 分光光度计;电子天平;LSHZ-300 型水浴恒温振荡器;H-IS-Z 型数显恒温水浴锅。

1.2 试验方法

1.2.1 印迹酶制备 取 15 mg HRP, 用 0.2 mol/L、pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液 1 mL 进行溶解, 然后加入 0.01 mol/L 模板, 在 0 ℃ 保存 40 min 后, 加入 2 mL 的二氧六环, 温度保持在 -20 ℃, 搅拌 30 min, 4 000 rpm 冷冻离心机离心 10 min, 弃去上清液, 沉淀物用二氧六环洗 3 次, 每次 3 mL, 真空冷冻干燥, 即得印迹酶(NIE)。

1.2.2 乙酰化印迹酶制备 取 20 mg HRP, 用 0.01 mol/L、pH 值为 7.8 的磷酸盐缓冲液 5 mL 进行溶解, 加入模板, 在 0 ℃ 下保存 30 min 后, 加入 60 mg 马来酸酐, 5 mol/L NaOH 滴定, 保持 pH 值为 7.8, 搅拌 40 min 后加入 2 mL 二氧六环, 温度保持在 -20 ℃, 继续搅拌 30 min, 4000 rpm 冷冻离心机离心 15 min, 弃去上清液, 沉淀物用二氧六环溶液洗 3 次, 每次 3 mL, 真空冷冻干燥, 即得乙酰化印迹酶(AIE)。

1.2.3 交联印迹酶制备 取 15 mg HRP, 用 0.5 mL 二氧六环溶液进行溶解, 振荡得悬液, 依次加入 0.25 mL 交联剂 EDMA 和 5 mg 引发剂偶氮二异丁腈(AIBN), 在 366 nm 光照、4 ℃ 下聚合 5 h, 用二氧六环洗涤 3 次, 真空冷冻干燥, 即得交联印迹酶(CLIE)。

1.2.4 三硝基苯磺酸法检测游离氨基 [2-3] 用过量三硝基苯磺酸分别与印迹酶(NIE)、乙酰化印迹酶(AIE)、交联印迹酶(CLIE)作用, 剩余的三硝基苯磺酸和过量的 L-缬氨酸反应, 生成淡黄色三硝基苯衍生物, 用紫外分光光度计在 410 nm 下进行分析。通过三硝基苯磺酸加入量与测得值的差, 间接测量乙酰化和交联的程度 [2]。具体方法为: 称取印迹酶(NIE)、乙酰化印迹酶(AIE)、交联印迹酶(CLIE)各 15 mg, 放置于 10 mL 棕色瓶中, 加入 4% NaHCO₃ 溶液 5 mL, 振荡 5 min, 观察有无聚集, 加入 4 μmol/mL 三硝基苯磺酸液 5 mL 搅拌, 然后置于 40 ℃ 水浴里, 避光反应 1 h 后, 加入 40 μmol/mL L-缬氨酸溶液 0.2 mL, 均匀混合后, 置于 40 ℃ 水浴里, 避光反应 1 h 后, 用纤维素膜抽滤, 取滤液 1 mL, 加 0.5 mol/L HCl 溶液 5 mL, 直至形成稳定的淡黄色三硝基苯衍生物, 用紫外分光光度计在 410 nm 波长处测定吸光度。

2 结果与分析

2.1 印迹模板选择

由图 1 可见, 与游离酶相比, 4 种模板印迹后酶活力都有不同程度的增加, 其中以对苯二胺为模板的印迹酶活力增加最为显著, 其次为对甲氧基苯甲酸, 这说明印迹后酶的构象发生了不同程度的变化, 新结构更有利于酶-底物复合物的形成。

2.2 游离氨基检测

由图 2 可见, 待测样品印迹酶(NIE)、乙酰化印迹酶(AIE)、交联印迹酶(CLIE)中, 印迹酶中游离氨基数目最多, 交联印迹酶游离氨基数目最少, 这说明酶中一部分游离氨基与交联化试剂发生了交联化反应, 交联过程中酶的一些活性

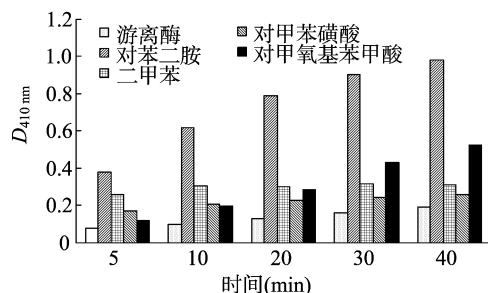


图1 不同模板印迹酶对酶促反应速率的影响

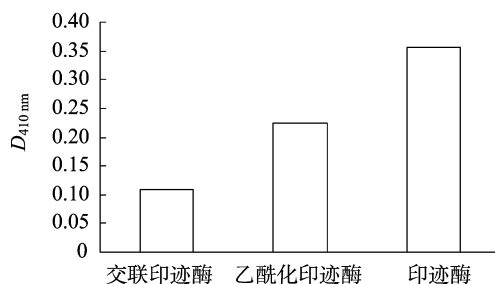


图2 TNBS法检测游离氨基

基团被包埋, 交联后游离氨基显著减少。

3 小结与讨论

从 HRP 的结构与作用机制进行分析, 在没有 H₂O₂ 存在的情况下, 芳香族底物和 HRP 及其一部分衍生物形成 1:1 可逆的杂合体, 这一过程主要依靠酶、底物以及酶活性位点水分子之间的疏水作用力和氢键 [4]。对苯二胺是 HRP 的底物, 它们之间能形成牢固的结合力, 使酶的构象发生改变, 在除去底物后有有机溶剂中这一构象仍能保持。对于底物类似物对甲氧基苯甲酸来说, 甲氧基中的氧原子以及苯甲酸基团能与 HRP 中 Arg 的 -NH₂ 形成氢键, 同时苯甲酸基团与活性位点的一个水分子形成氢键, 这一结合使酶的构象发生改变, 并在除去配体后的有机溶剂中仍能保持。二甲苯和对甲苯磺酸则有所不同, 除芳香环能与 HRP 活性位点血红素“裸露”边缘的末梢位点结合外, 几乎不能形成其他作用力。试验结果进一步证明, 以底物对苯二胺为模板的印迹酶活性最高, 比游离酶活性增加约 10 倍。另外, TNBS 法检测表明, 乙酰化和交联后游离氨基数均减少, 证明这种改造酶的方法是可行的。

参考文献:

- [1] Russell A J, Klibanov A M. Inhibitor-induced enzyme activation in organic solvents[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1988, 263 (24): 11624-11626.
- [2] Izco M, Torre P, Barcina Y, et al. Ripening of Ossauiraty cheese: determination of free amino acids by RP HPLC and of total free amino acids by the TBNS method[J]. Food Control, 2000, 11(1): 7-11.
- [3] Vana S F, McCormac K T. sequential injection spectrophotometric determination of amino acid using 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid[J]. Analytica Chimica Acta, 1998, 369(12): 163-170.
- [4] 张朝晖, 芦国营. 辣根过氧化物酶的结构与作用机制[J]. 生命的化学, 2005, 1(25): 33-36.