

钙离子对 HRPC 结构和电催化活性影响的研究

周楠迪^{1,2} 朱彤阳² 黄吟曦² 刘山莉^{*,1}

(¹上海大学生命科学学院,生物传感技术实验室,上海 200444)

(²南京大学生物化学系,医药生物技术国家重点实验室,南京 210093)

摘要: 通过比较辣根过氧化物酶同工酶 C(HRPC)中 Ca^{2+} 移除前后的 HRPC 的光谱和电化学特性,阐明了 Ca^{2+} 的存在对 HRPC 的重要作用。移除 Ca^{2+} 后 HRPC 的紫外-可见吸收光谱发生了变化,Soret 带的最大特征吸收峰以及 α 带和 β 带特征吸收峰均发生不同程度的蓝移和峰强减弱,表明其血红素微环境及结构发生了变化。移除 Ca^{2+} 后的 HRPC 也可在与聚 L 型赖氨酸共修饰的石墨电极上表现出对 H_2O_2 的催化响应,但是天然 HRPC 比去除 Ca^{2+} 后的 HRPC 对 H_2O_2 表现出更低的检测限,更宽的检测范围,更高的灵敏度以及更好的稳定性。实验结果表明, Ca^{2+} 对 HRPC 血红素微环境的保持、催化活性和稳定性均有重要的作用。

关键词: 生物电化学;辣根过氧化物酶同工酶 C;钙离子

中图分类号: O614.23[†]

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2008)07-1089-05

Effect of Calcium Ion on Structure and Electrocatalysis of Horseradish Peroxidase Isoenzyme C

ZHOU Nan-Di^{1,2} ZHU Tong-Yang² HUANG Yin-Xi² LIU Shan-Li^{*,1}

(¹Laboratory of Biosensing Technology, School of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200444)

(²Department of Biochemistry and National Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract: Effect of Ca^{2+} on the structural and electrocatalytic properties of horseradish peroxidase isoenzyme C (HRPC) was investigated. UV-Vis absorption spectra of HRPC are found to be changed after removal of calcium. The absorption peaks of Soret region and α , β band are all blue-shifted and decreased, which indicates that the heme microenvironment and structure of HRPC can be changed due to calcium removal. Calcium-depleted HRPC is also able to catalyze the reduction of H_2O_2 ; however, native HRPC has lower detection limit, wider detection range, higher sensitivity to H_2O_2 , as well as better stability. These results indicate that Ca^{2+} plays critical role in maintaining the heme microenvironment, catalytic activity and stability of HRPC.

Key words: bioelectrochemistry; horseradish peroxidase isoenzyme C; calcium ion

辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP, EC.1.11.1.7)以血红素作为辅基,能利用 H_2O_2 氧化许多有机及无机化合物,是一种典型的过氧化物酶^[1-4]。该酶的应用领域很广,特别是在临床诊断和酶联免疫测定等方面用途非常广泛。辣根过氧化物酶是一系列同工酶的总称,其中以辣根过氧化物酶同工酶 C(HRPC)的含量最为丰富,相关研究也最多^[5-10]。

HRPC 是由 308 个氨基酸残基组成的单链,其结构中还包含有 8 个糖链、1 个血红素辅基和 2 个 Ca^{2+} ^[11,12]。HRPC 的活性中心为血红素结合区域,反应基团是 38 位 Arg、43 位 Asp 和血红素上的铁离子。在血红素平面的上下两侧存在着 2 个 Ca^{2+} 结合位点,它们通过 1 个氢键群与血红素结合区域相连,形成七配位的结构,能同时与多肽主链上的羰

收稿日期:2008-03-07。收修改稿日期:2008-04-24。

国家自然科学基金资助项目(No.20575028)。

*通讯联系人。E-mail: slliu@staff.shu.edu.cn

第一作者:周楠迪,男,33岁,讲师;研究方向:生物无机化学。

基, Asp, Ser 和 Thr 的侧链基团, 以及 1 个末端结构水分子结合^[13-17]。Ca²⁺的丢失将会导致 HRPc 酶活和热稳定性的下降^[18-20], 这种下降是由于血红素平面的构型以及铁离子自旋状态发生改变所引起的^[21-23]。

采用电化学方法对 HRP 的电子传递特性和电催化活性进行研究目前已开展了很多工作^[24,25], 然而用此方法对天然 HRPc 和 Ca²⁺移除后 HRPc 的直接电化学和电催化进行比较研究尚未有报道。本文尝试了用电化学方法并结合紫外-可见光谱, 研究了 Ca²⁺对 HRPc 结构以及 H₂O₂ 催化活性的影响, 为进一步了解该酶的结构和功能提供了有价值的信息。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

辣根过氧化物酶同工酶 C 和聚 L-赖氨酸(PLL) 购自 Sigma 公司, 使用前未经进一步纯化。其他试剂均为分析纯试剂。实验用水通过 Milli-Q 系统纯化至电阻率大于 18 M Ω ·cm⁻¹。

电化学仪是 PARC 263 Potentiostat/Galvanostat (EG&G, USA)。实验中采用三电极系统, 自制的热解石墨电极作为工作电极; 饱和甘汞电极(SCE)作为参比电极; 铂丝电极作为对电极。紫外-可见光谱测量的仪器是 UV-2201 分光光度计(Shimadzu, Japan)。

1.2 HRPc 中钙离子的去除

按照 Haschke 等报道的方法来移除 HRPc 中的 Ca²⁺^[16]。将 HRPc 溶解于 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH=8.0) 缓冲溶液中使之浓度为 0.1 mmol·L⁻¹, 溶液中含 6 mol·L⁻¹ 盐酸胍和 10 mmol·L⁻¹ EDTA, 室温下放置 4 h, 然后用 5 mmol·L⁻¹ EDTA 溶液(pH=7.0) 透析 12 h, 最后用水透析 4 h。

1.3 工作电极的制备

石墨电极制备如下: 将热解石墨块(截面 2.4 mm², 用棱面作为工作面)置于直径 5 mm 硬质玻璃管中并用环氧树脂填充空隙, 利用武德合金将铜丝和石墨连接起来作为电极引线。将自制热解石墨电极先在粗刚玉砂纸(400 目, 相当于 37 μ m)和细刚玉砂纸(1 000 目, 相当于 7 μ m)上打磨, 然后在含有氧化铝(粒度为 0.05 μ m)砂浆的丝绸上打磨至镜面, 最后用乙醇、水分别超声清洗 3 min。将 10 μ L 浓度为 0.1 mmol·L⁻¹ 的 HRPc 溶液与 10 μ L 浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的 PLL 溶液混合, 用微量注射器将该溶液涂布于热解石墨电极的表面, 在最初的 2 h 内, 先将电极

表面用 Eppendorf 管盖盖, 以使溶液缓慢挥发, 从而形成均一的薄膜, 然后在室温条件下自然干燥。修饰好的电极保存在 4 $^{\circ}$ C 的冰箱中, 使用前用去离子水再次将表面清洗。去除 Ca²⁺的 HRPc 电极用同样的方法修饰。

1.4 电化学实验

电化学实验是在无氧条件下进行的, 实验中使用的工作溶液为 pH=8.0 的 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲溶液, 先通高纯氮气除氧 10~15 min, 然后将氮气流平稳的通过液面上方形成氮气氛, 以保持实验中的无氧条件。所有实验均在室温下进行(18 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C)。循环伏安法(CV)的扫描范围为+0.2~-0.8 V, 扫速为 200 mV·s⁻¹。在对 H₂O₂ 的电催化实验中, 分别往工作溶液中添加 H₂O₂ 溶液至不同浓度, 然后进行 CV 扫描, 扫描范围和扫速同上。

2 结果与讨论

图 1 为 HRPc 去除 Ca²⁺前后的紫外-可见吸收光谱。结果显示, 天然 HRPc 在波长为 403 nm 处有一典型的 Soret 吸收带, 在 501 和 643 nm 处有其特征吸收峰(α , β 带), 这些谱带是 HRPc 中血红素辅基定域于卟啉的 π - π 跃迁的反映。而 Ca²⁺移除后的 HRPc(CaD-HRPc)的紫外-可见吸收光谱图发生了一些变化, Soret 带的最大特征吸收峰以及 α 带和 β 带特征吸收峰均发生不同程度的蓝移, 且峰强略有减弱, β 带特征吸收峰甚至几乎消失。说明 Ca²⁺对 HRPc 的血红素微环境的保持具有明显的作用, 去除 Ca²⁺后卟啉 π 电子体系的空间结构发生了明显变化。

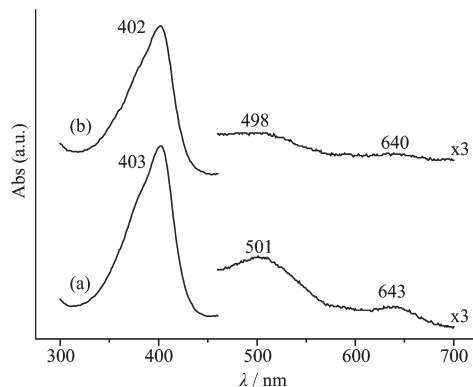


图 1 1 mg·mL⁻¹ 天然 HRPc(a) 和去除 Ca²⁺的 HRPc (b) 在 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0) 中的紫外-可见吸收光谱图

Fig.1 UV-Visible absorption spectra of 1 mg·mL⁻¹ native HRPc (a) and Ca²⁺-depleted HRPc (b) in 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl buffer solution (pH=8.0)

进一步采用电化学技术考察了 Ca^{2+} 对 HRPC 结构,尤其是其电催化活性的影响。经过大量的实验发现,PLL 可以帮助 HRPC 获得其电化学响应,并保持其电催化活性。在采用循环伏安法检测 HRPC 的催化活性之前,首先用紫外-可见吸收光谱考察了 PLL 是否会对酶结构产生影响。结果表明,PLL 和 HRPC 等体积混合后,HRPC 的 Soret 带、 α 带和 β 带特征吸收峰的位置和强度均基本不变(图 2),说明其血红素微环境在 PLL 膜中能保持与天然态近似的微结构。去除 Ca^{2+} 后的 HRPC 也有着类似的现象。因此,我们可以采用 PLL 膜包埋 HRPC 进行电化学研究。

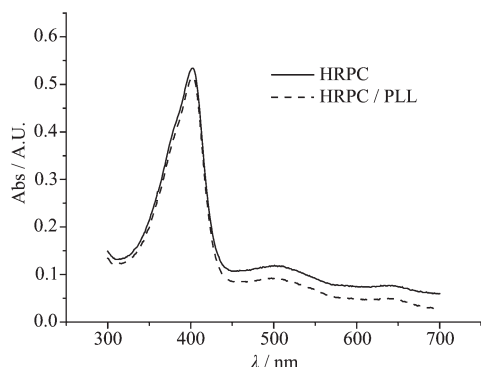


图 2 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ HRPC 溶液(—)和 HRPC 与 PLL 混合液(---)在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(pH=8.0)中的紫外-可见吸收光谱图

Fig.2 UV-Visible absorption spectra of $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ HRPC (—) and mixture of HRPC and PLL (---) in $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl buffer solution (pH=8.0)

将 HRPC/PLL 共修饰的石墨电极以及 CaD-HRPC/PLL 共修饰的石墨电极分别放入氮气除氧后的工作溶液中,在 $+0.2 \sim -0.8 \text{ V}$ 间循环扫描,得到循环伏安曲线如图 3 所示。去除 Ca^{2+} 前后的 HRPC 均可得到一对稳定的、峰形对称的氧化还原峰。去除 Ca^{2+} 后的 HRPC 其表观标准电极电位 $E^{\ominus'} = -289 \text{ mV}$,比天然 HRPC($E^{\ominus'} = -270 \text{ mV}$)略有负移,而峰间距 $\Delta E = 42 \text{ mV}$,略小于天然 HRPC 的峰间距(61 mV),二者的电极反应均为准可逆(ΔE 为 $59/n$)的,是有单电子参与了的电极过程。由图 3 又可以看出,去除 Ca^{2+} 后的 HRPC 其氧化还原峰电流比天然 HRPC 略有下降。以上实验结果表明,将 Ca^{2+} 去除前后的 HRPC 血红素微环境出现了一些变化,导致其氧化还原响应发生了一些改变,但总体来说,去除 Ca^{2+} 以后,HRPC 的结构虽然发生了一些改变,其电化性质也相应出现了一些变化,但因为电化学信号来自

该酶的血红素部分, Ca^{2+} 的缺失虽然影响了血红素微环境,但该酶的整体结构并没有发生根本的改变,所以,去除 Ca^{2+} 前后,其电化学特征基本相同。

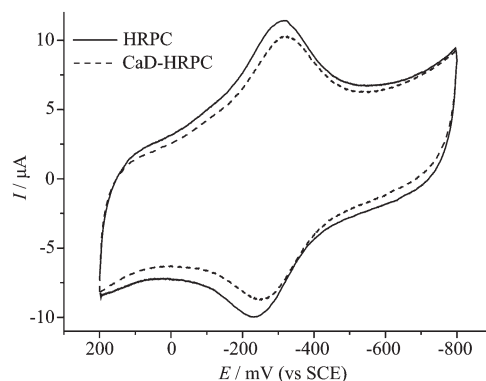


图 3 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 天然 HRPC(—)和去除 Ca^{2+} 的 HRPC (---)与 PLL 共修饰石墨电极在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(pH=8.0)中的循环伏安图

Fig.3 Cyclic voltammograms of $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl buffer solution (pH=8.0) obtained at $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ of native HRPC/PLL (—) and Ca^{2+} -depleted HRPC/PLL (---) modified pyrolytic graphite electrode; Scan rate $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

然而,进一步研究发现, Ca^{2+} 的缺失对 HRPC 电催化活性的影响较大。图 4 是在工作溶液中加入不同浓度的 H_2O_2 后,天然 HRPC 的循环伏安曲线。从图中可以看出,随溶液中 H_2O_2 浓度的增加,循环伏安曲线中还原峰电流增大,而氧化峰电流减小,当 H_2O_2 浓度达到 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之后,还原峰电流上升幅度变缓。图 5 显示了催化电流和 H_2O_2 浓度的关系,此方法对 H_2O_2 的检测限为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 当 H_2O_2 的

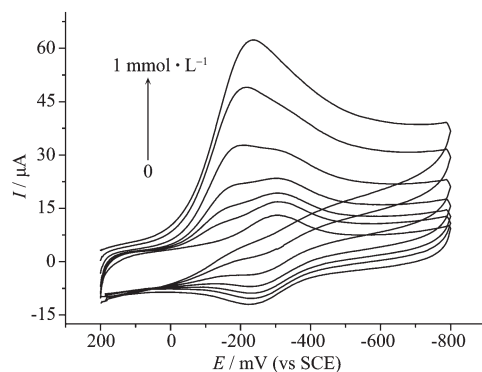


图 4 HRPC/PLL 修饰电极在含不同浓度 H_2O_2 的缓冲液中的循环伏安图

Fig.4 Cyclic voltammograms obtained at HRPC/PLL modified pyrolytic graphite electrode for a buffer solution containing 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.7 or $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 ; Other conditions are the same as in Fig.3

浓度高于 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 催化还原电流不再增加。图 5 的内嵌图表明, 在 H_2O_2 浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ 和 $1.0 \times 10^{-4} \sim 9.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内催化电流和 H_2O_2 浓度显示出两段线性关系, 灵敏度分别为 64.75 和 $47.82 \text{ } \mu\text{A} \cdot \text{L} \cdot \text{mmol}^{-1}$ 。

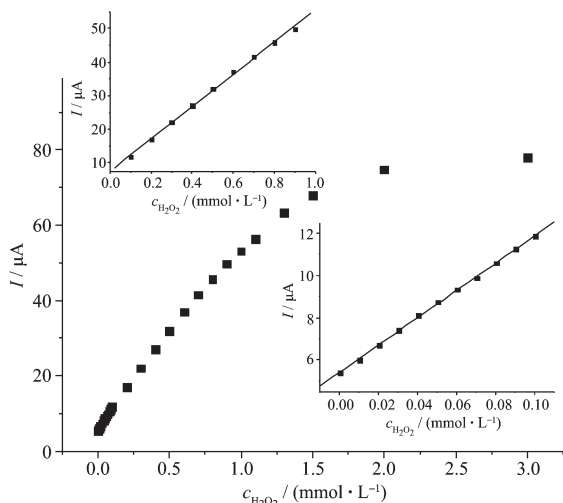


图 5 使用天然 HRPC/PLL 修饰电极时, 缓冲液中 H_2O_2 浓度与催化峰电流的关系(内嵌为 H_2O_2 浓度 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.0 \times 10^{-4} \sim 9.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内的线性关系)

Fig.5 Relationship between the catalytic peak current obtained at native HRPC/PLL modified electrode and the concentration of H_2O_2 ; Insets are the derived linear relationships in the range of $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $1.0 \times 10^{-4} \sim 9.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$; Other conditions are the same as in Fig.4

用同样方法检测去除 Ca^{2+} 后的 HRPC 对 H_2O_2 的催化活性, 可以得到类似的结果, 如图 6 所示。这是因为, 如前所述, 去除 Ca^{2+} 后, HRPC 的血红素微环境发生了改变, 但其整体结构并未发生根本的变化。然而, 从图 6 中可以看出, 酶的催化活性有明显的下降, 其对 H_2O_2 的检测限为 $8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 明显高于天然 HRPC, 并且当 H_2O_2 的浓度高于 $1.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 催化电流即开始下降(图 7)。图 7 内嵌图显示了仅在 H_2O_2 浓度 $1.0 \times 10^{-5} \sim 3.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围, 催化电流和 H_2O_2 浓度呈线性关系, 检测灵敏度也仅为 $29.1 \text{ } \mu\text{A} \cdot \text{L} \cdot \text{mmol}^{-1}$ 。此外, 利用对 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ 的催化电流值作为指标, 研究发现, 天然 HRPC 修饰电极保存在缓冲溶液中 1 周后进行测定, 仍然能够保持 90% 的催化电流值, 而去除 Ca^{2+} 后的 HRPC 修饰电极仅能保留 50% 的电流值。

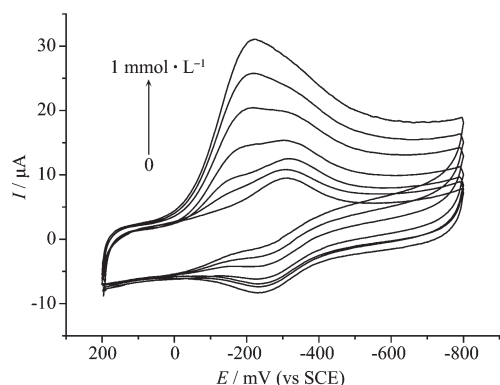


图 6 CaD-HRPC/PLL 修饰电极在含不同浓度 H_2O_2 的缓冲液中的循环伏安图

Fig.6 Cyclic voltammograms obtained at CaD-HRPC/PLL modified pyrolytic graphite electrode for a buffer solution containing 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.7 or $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$; Other conditions are the same as in Fig.3

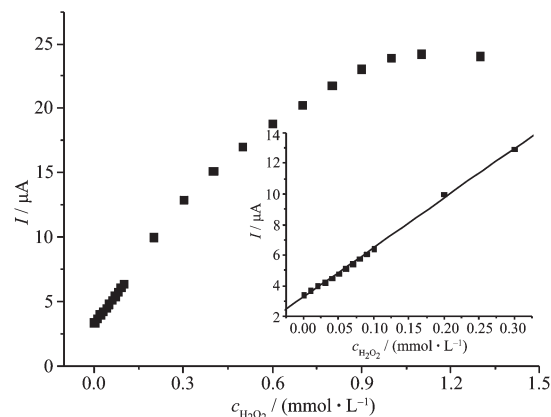


图 7 使用 CaD-HRPC/PLL 修饰电极时, 缓冲液中 H_2O_2 浓度与催化峰电流的关系(内嵌为 H_2O_2 浓度 $1.0 \times 10^{-5} \sim 3.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内的线性关系)

Fig.7 Relationship between the catalytic peak current obtained at CaD-HRPC/PLL modified electrode and the concentration of H_2O_2 ; Inset is the derived linear relationship in the range of $1.0 \times 10^{-5} \sim 3.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$; Other conditions are the same as in Fig.6

3 结 论

Ca^{2+} 去除后的 HRPC 紫外-可见吸收光谱发生了变化, Soret 带的最大特征吸收峰和 α, β 带吸收峰均发生不同程度的蓝移和峰强减弱。用天然 HRPC 修饰得到的酶电极比去除 Ca^{2+} 后的 HRPC 修饰的酶电极显示出更强的对 H_2O_2 电催化还原的能力, 在用于 H_2O_2 浓度测定时表现出更低的检测限、更宽的检测范围以及更高的灵敏度, 并且酶本身的稳

定性也更好。实验结果表明, Ca^{2+} 对 HRPC 血红素微环境的保持、催化活性和稳定性有着重要的作用。

致谢: 感谢南京大学生化系李根喜教授对这一工作的指导和帮助。

参考文献:

- [1] Tognolli M, Penel C, Greppin H, et al. *Gene*, **2002**,**288**:129~138
- [2] Welinder K G, Justesen A F, Kjærsgård I V H, et al. *Eur. J. Biochem.*, **2002**,**269**:6063~6081
- [3] Welinder K G. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1992**,**2**:388~393
- [4] Dunford B H, Everse J, Everse K E, et al. *Horseradish Peroxidase: Structure and Kinetic Properties, in Peroxidases in Chemistry and Biology*. Boca Raton: CRC Press, **1991**.
- [5] Veitch N C, Williams R J P. *Eur. J. Biochem.*, **1990**,**189**:351~362
- [6] Shannon L M, Kay E, Lew J Y. *J. Biol. Chem.*, **1966**,**241**:2166~2172
- [7] Zhao D Q, Gilfoyle D J, Smith A T, et al. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, **1996**,**26**:204~216
- [8] Smulevich G, Paoli M, Burke J F, et al. *Biochemistry*, **1995**,**33**:7398~7407
- [9] Smith A T, Santama N, Dacey S, et al. *J. Biol. Chem.*, **1990**,**265**:13335~13343
- [10] Veitch N C, Williams R J P, Bray R C, et al. *Eur. J. Biochem.*, **1992**,**207**:521~531
- [11] Welinder K G. *J. Biol. Chem.*, **1979**,**96**:483~502
- [12] Gajhede M, Schuller D, Henriksen A, et al. *Nat. Struct. Biol.*, **1997**,**4**:1032~1038
- [13] Ogawa S, Shiro Y, Morishima I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1979**,**90**:674~678
- [14] Shiro Y, Kurono M, Morishima I. *J. Biol. Chem.*, **1986**,**261**:9382~9390
- [15] Haschke R H, Friedhoff J M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1978**,**80**:1039~1042
- [16] Howes B D, Feis A, Raimondi L, et al. *J. Biol. Chem.*, **2001**,**276**:40704~40711
- [17] Morishima I, Kurono M, Shiro Y. *J. Biol. Chem.*, **1986**,**261**:9391~9399
- [18] Adamsa J B, Browna H M, Ledwardb D A, et al. *Food Chem.*, **2003**,**80**:499~510
- [19] Smeller L, Meersman F, Fidy J, et al. *Biochemistry*, **2003**,**42**:553~561
- [20] Kaposi A D, Fidy J, Manas E S, et al. *Biochimicaet Biophysica Acta*, **1999**,**1435**:41~50
- [21] Huang Q, Laberge M, Szigeti K, et al. *Biopolymers*, **2003**,**72**:241~248
- [22] Laberge M, Huang Q, Stenner R, et al. *Biophys. J.*, **2003**,**84**:2542~2552
- [23] Laberge M, Szigeti K, Fidy J. *Biopolymers*, **2004**,**74**:41~45
- [24] Wang Z, Li M, Su P, et al. *Electrochem. Commun.*, **2008**,**10**:306~310
- [25] Chen H, Wang Y, Liu Y, et al. *Electrochem. Commun.*, **2007**,**9**:469~474