

## 应用圆二色光谱研究电场对脂肪酶二级结构的影响

姚占全<sup>1,2</sup>, 敖敦格日勒<sup>1</sup>, 许强<sup>1</sup>, 杨体强<sup>1</sup>

1. 内蒙古大学理工学院, 内蒙古 呼和浩特 010021

2. 内蒙古农业大学水利与土木建筑工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018

**摘要** 脂肪酶被不同强度的电场处理 5 min, 用圆二色光谱(circular dichroism, CD)研究电场对脂肪酶(Lipase)二级结构的影响。研究表明: 在 0.5~6.0 kV·cm<sup>-1</sup> 范围内, 不同强度的电场对脂肪酶的  $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 折叠、 $\beta$ 转角及无规卷曲相对含量的影响程度不同。随场强的增加, 各二级结构单元含量呈非单调变化。电场作用可使脂肪酶二级结构中  $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 折叠、 $\beta$ 转角及无规卷曲发生转化。总体上, 电场使脂肪酶的二级结构由  $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 折叠向转角及无规卷曲转化。 $\alpha$ 螺旋含量和  $\beta$ 折叠的含量降低幅度分别为 4.6%~48.0%和 13.2%~35.1%,  $\beta$ 转角含量与无规卷曲含量增加幅度分别为 2.8%~33.3%和 0.9%~48.1%。文章结果对研究电场处理植物种子的宏观生物效应作用机理提供了重要理论依据。

**关键词** 电场; 脂肪酶; 圆二色谱; 二级结构

**中图分类号**: Q683 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2006)12-2311-04

### 引言

人们就物理因素(包括力学、电、磁、温度、光和离子束等)对植物体的影响做了许多工作, 目前已积累了大量宏观实验资料<sup>[1-6]</sup>。已有研究表明, 电场处理植物种子能明显改善种子的发芽势、发芽率、根长、芽长及鲜重和产质量等表观特性<sup>[7-9]</sup>, 且不同强度电场对种子的萌发和幼苗生长的影响也不同<sup>[10]</sup>。还有研究证明电场处理植物种子具有提高种子抗逆能力等作用<sup>[11, 12]</sup>。但是, 有关电场作用于生物系统的什么成分, 导致宏观生物效应的微观机理研究工作却很少。在一定程度上, 这已成为目前制约电场生物效应开发研究的主要因素。

酶在生命活动过程中, 扮演着极其重要的角色。理论研究表明, 酶蛋白的空间结构对酶的功能至关重要, 即使极其细微的扰乱, 也能够极大地影响酶的活性。而且酶蛋白质不是刚性分子, 它的功能依赖于结构的这种运动性<sup>[13]</sup>。

光谱技术是研究生物蛋白质构象与功能关系的一种有效途径, 其中圆二色光谱可以灵敏地反映出蛋白质构象的变化, 已被广泛应用于蛋白质的构象研究中<sup>[14-18]</sup>。本文应用圆二色光谱研究了不同电场强度处理脂肪酶对其二级结构的影响, 为进一步研究电场处理植物种子的宏观生物效应作用机理提供一定的理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料及仪器

麦芽脂肪酶(购于美国 Sigma 公司, 比活力为 10 u·mg<sup>-1</sup>)。

电场处理器: 内蒙古大学自制。圆二色光谱仪: Jasco-715 型圆二色光谱仪(清华大学生物系生物膜与膜生物工程国家重点实验室)。

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 样品的制备

根据所设电场强度条件个数  $N$ , 取  $N$  份适量麦芽脂肪酶样品。每一个样品用不同强度电场处理。电场由平板电极形成, 极板电压波形为 50 Hz 半波整流。本实验所用电场强度  $E_N = 0.5 \times N(\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1})$ ,  $N = 1, 2, \dots, 12$ , 共 12 个处理条件, 对照组为  $E_0 = 0.0 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。电场处理时间 5 min。将经不同电场强度处理后的样品及对照组分别溶于 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中, 配制成浓度为 0.50 g·L<sup>-1</sup> 的蛋白溶液备用。

##### 1.2.2 圆二色谱测定

样品池光程为 0.1cm, 灵敏度为 2 mdeg·cm<sup>-1</sup>, 扫描测定波长范围为 190~250 nm, 扫描时间 0.5 s, 扫描速度为 3.3 nm·s<sup>-1</sup>, 在室温下进行测定。平均残基分子量取 112,

收稿日期: 2005-09-19, 修订日期: 2006-02-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30260028)和内蒙古自治区教育厅重大项目(ZD0009)资助

作者简介: 姚占全, 1971 年生, 内蒙古农业大学水利与土木建筑工程学院讲师

CD 谱用平均残基摩尔椭圆度表示, 单位为  $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ , 数据经五次扫描取平均值。得出 CD 谱后, 用 Selcon3<sup>[19, 20]</sup> 软件计算脂肪酶的二级结构含量。

## 2 实验结果

### 2.1 电场对脂肪酶圆二色光谱的影响

图 1 给出了不同电场强度处理的脂肪酶与对照组的圆二色谱。可以看出, 不同强度的电场对脂肪酶圆二色谱的影响程度不同。

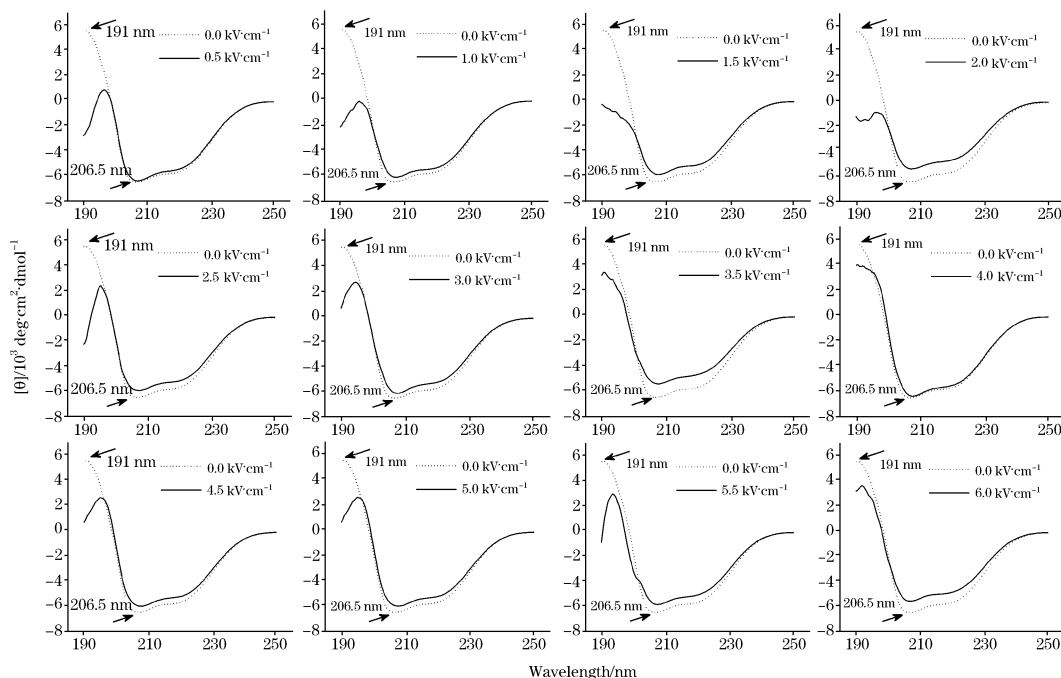


Fig. 1 CD spectra of lipase treated with different electric field strength

Table 1 The contents of secondary structures of lipase treated with different intensities of electric fields

Sample number	Electric field strength / ( $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ )	The contents of secondary structures			
		$\alpha$ -helix / %	$\beta$ -sheet / %	$\beta$ -turn / %	random coil / %
E <sub>0</sub>	0.0	15.33	38.58	18.24	27.86
E <sub>1</sub>	0.5	11.80	31.30	22.80	34.10
E <sub>2</sub>	1.0	9.11	31.09	23.37	36.44
E <sub>3</sub>	1.5	9.66	25.05	24.04	41.25
E <sub>4</sub>	2.0	7.97	28.09	24.30	39.64
E <sub>5</sub>	2.5	9.61	32.36	22.95	35.09
E <sub>6</sub>	3.0	13.10	31.17	20.00	35.74
E <sub>7</sub>	3.5	20.97	38.59	14.52	25.92
E <sub>8</sub>	4.0	9.25	41.93	21.56	27.26
E <sub>9</sub>	4.5	13.40	26.59	20.76	39.26
E <sub>10</sub>	5.0	10.82	30.00	22.14	37.04
E <sub>11</sub>	5.5	14.62	33.47	22.55	29.35
E <sub>12</sub>	6.0	13.31	39.83	18.74	28.12

与对照相比, 处理后的脂肪酶 CD 谱线在 191 nm 处峰

与对照相比, 处理后的脂肪酶 CD 谱线, 谱峰峰位和峰高均发生不同程度的变化。处理组在 191 nm 处的光谱峰位变化表现为: 在场强为 0.5, 1.0, 2.5, 3.0, 4.5 和 5.5  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时, 峰位红移, 幅度在 2.5~5.5 nm 之间, 其中场强为 5.5  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时幅度最小为 2.5 nm, 场强为 0.5, 1.0  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时幅度最大为 5.5 nm; 在场强为 1.5 和 4.0  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时, 191 nm 处的谱峰消失; 在场强为 2.0, 3.5, 5.0 和 6.0  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时, 191 nm 处的谱峰没有移动, 同时在这些电场下, 194 nm 附近形成一小肩。

高发生了不同程度的降低, 幅度在 30.1%~129.3% 之间, 其中场强为 4.0  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时降幅最小, 场强为 2.0  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时降幅最大。在 206.5 nm 处的吸收峰, 其峰位普遍发生小的红移, 幅度在 0.5~1.0 nm 之间, 而峰高普遍降低, 幅度在 1.3%~16.7% 之间, 其中场强为 0.5  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时降幅最小, 3.5  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时降幅最大。对照组在 216~227 nm 之间有一宽肩, 经不同电场强度处理后, 变化却不太明显。

### 2.2 电场对脂肪酶二级结构的影响

表 1 是利用 Selcon3 软件计算脂肪酶在不同场强下的二级结构含量。由表 1 可知, 经不同电场强度处理脂肪酶, 其二级结构含量在一定范围内发生了变化。图 2 给出脂肪酶在不同电场强度下各二级结构含量变化关系。

从表 1 及图 2 中对照组的结果可知, 脂肪酶是一种以折叠与无规卷曲构象为主的蛋白酶。与对照组相比, 各处理组中二级结构单元百分含量有不同程度的变化。计算表明: 脂肪酶的二级结构单元的变化, 随着电场强度呈非单调变化。

$\alpha$ -螺旋含量在场强为 3.5  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时增加; 其他各场强下均有不同程度降低, 降幅在 4.6%~48.0% 之间, 其中以

场强为  $2.0 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时降幅最大, 场强为  $5.5 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时降幅最小。 $\beta$ -折叠含量在场强为  $4.0, 6.0 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时增加; 场强为  $3.5 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时基本无变化; 其余各场强下均有不同程度的降低, 降幅在  $13.2\% \sim 35.1\%$  之间, 其中以场强为  $1.5 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时最大, 场强为  $5.5 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时最小。 $\beta$  转角含量在场强为  $3.5 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时降低; 其余各场强下均有不同程度的增加, 增幅在  $2.8\% \sim 33.3\%$  之间, 其中以场强为  $2.0 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时最大, 场强为  $6.0 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时最小。无规卷曲含量在场强为  $3.5, 4.0 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时降低; 其余各场强下均有不同程度的增加, 增幅在  $0.9\% \sim 48.1\%$  之间, 其中以场强为  $1.5 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时增幅最大, 场强为  $6.0 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时增幅最小。

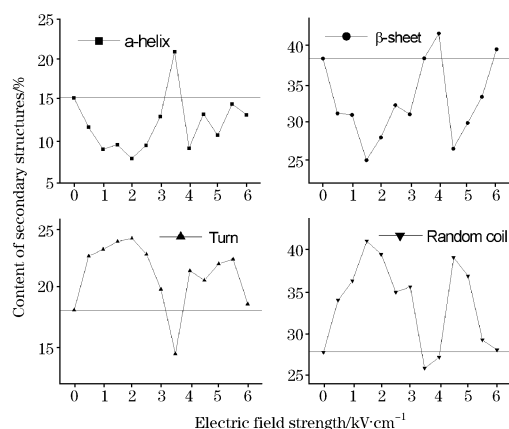


Fig. 2 The contents of secondary structures of lipase with different intensities of electric fields

从图 2 中可知, 经不同强度电场处理, 脂肪酶的二级结构含量在一定范围内发生了变化。总体上,  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠的含量普遍降低,  $\beta$  转角与无规卷曲的含量明显增加, 即: 电场作用可使脂肪酶的二级结构中  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠向  $\beta$  转角及无规卷曲转化。

### 3 讨论

已有研究表明, 电场处理可使酶的活性发生改变<sup>[21-24]</sup>, 并提出酶活发生变化的机制可能是电场处理导致酶的静电性质和构象发生改变<sup>[25]</sup>。我们知道, 蛋白质的二级结构是指多肽链骨架中局部肽段的构象,  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠结构中存在较多的氢键, 导致规则二级结构具有一定的刚性;  $\beta$  转角以及无规卷曲中不存在氢键或其他的相互作用, 使肽段中的各个残基间有更大的自由度, 没有刚性, 从而表现出极大的柔性。蛋白质分子中  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠的稳定性主要取决于分子内部的氢键。蛋白质分子中氢键是其中一个氨基酸残基上的氢原子与另一个氨基酸残基上的氧原子由于静电引力而形成。本文研究结果说明, 电场对脂肪酶作用, 使  $\alpha$  螺旋与  $\beta$  折叠含量的减少,  $\beta$  转角以及无规卷曲的含量增加, 表明电场的作用, 影响分子内部的电荷分布, 导致酶构象的改变。电场使原有维系其螺旋结构的稳定性的氢键取向发生改变, 稳定性降低, 结构松散, 柔性变大。

本文研究结果还表明, 随着电场强度的增加, 脂肪酶的二级结构单元的变化呈非单调变化, 这与电场处理植物种子的宏观生物效应规律<sup>[10]</sup> 完全一致。这为电场处理植物种子的宏观生物效应作用机理提供了重要的理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] XUE Yu-hua, WANG Li-li, CAI Su-wen (薛毓华, 王莉莉, 蔡素雯). Progress in Biochemistry and Biophysics (生物化学与生物物理进展), 1991, 18(3): 234.
- [2] SUN Ke-li, XI Bao-shu, CAI Guo-you (孙克利, 席保树, 蔡国友). Acta Biophysica Sinica (生物物理学报), 1999, 15(3): 579.
- [3] LU Ting (陆挺). Journal of Beijing Normal University (Natural Science) (北京师范大学学报·自然科学版), 1996, 32(2): 227.
- [4] Sidaway G H, Aspray G F. Int. J. Biometeor., 1968, 12: 321.
- [5] Kazimierz C. Modern Electrostatics. Beijing: International Academic Publishers, 1989, 137.
- [6] ZHANG Hong-ming (张宏名). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 1994, 14(5): 25.
- [7] WANG Xin, LI Su-hua, MIN Wei-hong, et al (王莘, 李肃华, 闵伟红, 等). Acta Biophysica Sinica (生物物理学报), 1997, 13(4): 665.
- [8] WANG Shu-hui, LI Xian-dong, SONG Chang-xian (王淑惠, 黎先栋, 宋长铨). Progress in Biochemistry and Biophysics (生物化学与生物物理进展), 1991, 18(5): 392.
- [9] ZHAO Jian, MA Fu-rong, YANG Wen-jie, et al (赵剑, 马福荣, 杨文杰, 等). Acta Biophysica Sinica (生物物理学报), 1997, 13(3): 489.
- [10] YANG Ti-qiang, LI Jin-mei, CHEN Yan, et al (杨体强, 李金梅, 陈燕, 等). Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Neimongol (内蒙古大学学报·自然科学版), 1997, 28(6): 778.
- [11] YANG Ti-qiang, HOU Jian-hua, SU En-guang, et al (杨体强, 侯建华, 苏恩光, 等). Acta Biophysica Sinica (生物物理学报), 2000, 16(4): 780.
- [12] Ren Luquan, Li Xiaoguang, et al. Applied Electrostatics. Dalian: Dalian University of Technology Press. 570.
- [13] HAO Bo-lin, LIU Ji-xing (郝柏林, 刘寄星). Theory Physics and Life Science (理论物理与生命科学). Shanghai Scientific and Technological Education Publishing House (上海: 上海科学技术出版社), 1997. 3.
- [14] HONG Fa-shui (洪法水). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2003, 23(3): 583.
- [15] SHEN Zi-wei, SUN Ke-li, YANG Jun, et al (沈子威, 孙克利, 杨钧, 等). Acta Photonica Sinica (光子学报), 1999, 28(7): 600.

- [16] GAO Feng, SHA Yin-lin, QIU Yang, et al(高峰, 沙印林, 邱阳, 等). Acta Phys. Chim. Sin. (物理化学学报), 2001, 17(7): 619.
- [17] LU Zi-xian, CUI Tao, SHI Qing-luo, et al(鲁子贤, 崔涛, 施庆洛, 等). Application of Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion in Biology(圆二色性和旋光色散在分子生物中的应用). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1987.
- [18] WANG Ao-jin, HU Kun-sheng, SUN Yong-tai(王敖金, 胡坤生, 孙永泰). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1994, 14(3): 41.
- [19] Yee-Hsiung Chen, Jen Tsi Yang, Kue Hung Chau, Biochemistry, 1974, 13(16), 3350.
- [20] Sreerama H, Venyaminov S Y, Woody R W. Anal. Biochem., 2000, 287: 243.
- [21] ZENG Xin-an, GAO Da-wei, LI Guo-ji, et al(曾新安, 高大维, 李国基, 等), Food Science(食品科学), 1997, (18)6: 3.
- [22] ZENG Zhong-kui, ZHANG Peng-fei, BAO Jin-ku, et al(曾仲奎, 张鹏飞, 鲍锦库, 等). Journal of Sichuan University(Natural Science Edition)(四川大学学报·自然科学版), 1997, 34(4): 516.
- [23] HoS Y, Mittal G S. Journal of Food Science Engineering, 1997, 31: 69.
- [24] Humber Vega mercado, Joseph R Powers, et al. Journal of Food Science, 1995, 60(5): 1143.
- [25] HE Xi, HU Fei(何熙, 胡飞). Journal of Wuxi University of Light Industry(无锡轻工业大学学报), 2003, 22(4): 65.

## Study on the Effect of Electric Field on the Secondary Structure of Lipase by Circular Dichroism

YAO Zhan-quan<sup>1, 2</sup>, AO Dun-ge-ri-le<sup>1</sup>, XU Qiang<sup>1</sup>, YANG Ti-qiang<sup>1</sup>

1. College of Science and Technology, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China

2. College of Water Conservancy and Civil Architecture Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China

**Abstract** After the lipase was treated with electric field for five minutes, the effect of electric field on the secondary structure of lipase was studied by circular dichroism (CD). The results showed that different electric field strength in the range from 0.5 to 6.0 kV · cm<sup>-1</sup> has a different effect on the relative contents of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turn and random coil of the lipase, and whose changes were non-monotonous with the raising of electric field. In general, the electric treatment tends to transform the  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet into  $\beta$ -turn and random coil. The decrease in  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet ranged respectively from 4.6% to 48.0% and from 13.2% to 35.1%, and the increase in  $\beta$ -turn and random coil ranged respectively from 2.8% to 33.3% and from 0.9% to 48.1%. The result of this study has important meaning to explain the biological effect of electric treatment seeds.

**Keywords** Electric field; Lipase; CD; Secondary structure

(Received Sep. 19, 2005; accepted Feb. 8, 2006)