

## 海藻糖对虫荧光素酶活性保护作用研究

王燕 朱海华 刘红伟 (河南省商业科学研究所有限责任公司, 河南郑州 450002)

**摘要** 研究在室温、低温冷藏以及反复冻融等条件下, 海藻糖对虫荧光素酶(luciferase)活性的保护作用。结果表明, 海藻糖对虫荧光素酶活性有明显的保护作用。反复冻融时, 海藻糖的保护作用尤为显著。反复冻融3次时, 含海藻糖的酶制剂的保活率为51.8%, 不含海藻糖的酶制剂的保活率为19.1%, 含糖组保活率是无糖组平均保活率的2.71倍。海藻糖对虫荧光素酶的最适保活浓度约为0.1 mol/L。

**关键词** 海藻糖; 虫荧光素酶; 酶活

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)12-03663-02

**Study on the Trehalose Protection on Activity of Luciferase**

WANG Yan et al (The Commercial Scientific Research Limit Company of Henan Province, Zhengzhou, Henan 450002)

**Abstract** The purpose of this study was to investigate the trehalose protection of luciferase at freeze-thawing, refrigeration and room temperature. The result indicated that, trehalose had the obvious protective function to the enzyme activity of luciferase, especially at freeze-thawing. After 3 times of freeze-thawing, the remained enzyme activity of trehalose group was 51.8%, the remained enzyme activity of non-trehalose group was 19.1% and trehalose group was 2.71 times as large as non-trehalose group. The best activity concentration on trehalose was 0.1 mol/L.

**Key words** Trehalose; Luciferase; Enzyme activity

海藻糖是一种非还原性二糖, 广泛存在于生物界, 具有保护生物细胞和生物活性物质在脱水、高温、冷冻、高渗透压及有毒试剂等不良环境条件下免遭破坏的功能<sup>[1]</sup>。有研究表明, 外源性海藻糖对生物大分子同样具有良好的非特异性保护作用<sup>[2-3]</sup>。

虫荧光素酶能有效地催化由三磷酸腺苷(ATP)、荧光素、氧气组成的反应, 将生物能转变成光能发出荧光。虫荧光素酶生物发光技术在食品、医学、农业、生命科学等领域有广阔的应用前景。但虫荧光素酶对温度及冻融等因素极为敏感, 使用时需分装保存在-18℃冰箱中, 否则极易失活。虫荧光素酶的酶活不稳定性, 较大地影响了其开发应用。

笔者利用海藻糖独特的生物学特性, 探讨在室温、低温冷藏以及反复冻融等条件下海藻糖对虫荧光素酶活性的保护作用, 为虫荧光素酶的进一步开发应用提供理论帮助。

**1 材料与方**

**1.1 材料** 海藻糖购于南宁中诺生物工程公司, 纯度99%。虫荧光素粉剂、虫荧光素酶粉剂、ATP标准品均为美国promega产品。缓冲体系采用Tris-乙酸(pH=7.8)。其他试剂均为国产分析纯。

**1.2 实验仪器** LB9507型生物发光检测仪(德国产)、低温冰箱(-18℃)、恒温水浴锅。

**1.3 实验方法**

**1.3.1 虫荧光素酶的酶活测定。**取虫荧光素-虫荧光素酶试剂100 μl放入测试管中, 加入100 μl ATP标准品(0.1 μmol/L), 混合后立刻放入生物发光检测仪中, 检测1 min, 记录相对发光值。

**1.3.2 海藻糖浓度对酶活性的影响。**配制含有0.05、0.1、0.15、0.2 mol/L海藻糖的系列虫荧光素-虫荧光素酶试剂, 分别在25℃下避光保存0、4、8、12、16、20、24、28 h, 取样与ATP标准品反应检测酶活。以不含海藻糖的虫荧光素-虫荧光素酶试剂为对照。

**1.3.3 时间对酶活性的影响。**配制含有0.1 mol/L海藻糖的虫荧光素-虫荧光素酶试剂, 分别在4℃下避光保存1、2、3、4、5、6、7 d, 取样与ATP标准品反应检测酶活。以不含海藻糖的虫荧光素-虫荧光素酶试剂为对照。

**1.3.4 反复冻融时海藻糖对酶活性的影响。**配制含有0.1 mol/L海藻糖的虫荧光素-虫荧光素酶试剂, 在-18℃的环境中反复冻融。每次冻融后取样与ATP标准品反应检测酶活。以不含海藻糖的虫荧光素-虫荧光素酶试剂为对照。

**1.3.5 酶保活率计算。**酶保活率(%) = (海藻糖处理后的酶活/未处理时的酶活) × 100%。

**2 结果与分析**

**2.1 海藻糖浓度对虫荧光素酶活性的影响** 图1显示, 室温(25℃)保存时, 温度对酶制剂的活性影响很大, 随着时间的推移, 虫荧光素酶活性迅速下降。但添加了海藻糖的酶制剂酶保活率明显高于对照组。其中, 不同浓度的海藻糖对虫荧光素酶活性保护程度不同, 浓度为0.1 mol/L时, 海藻糖对酶活的保护性最佳。室温保持12 h后, 对照组酶保活率在40%左右, 而添加0.1 mol/L海藻糖的酶制剂酶保活率在60%左右, 海藻糖的保护作用使酶的保活率增加20%左右。

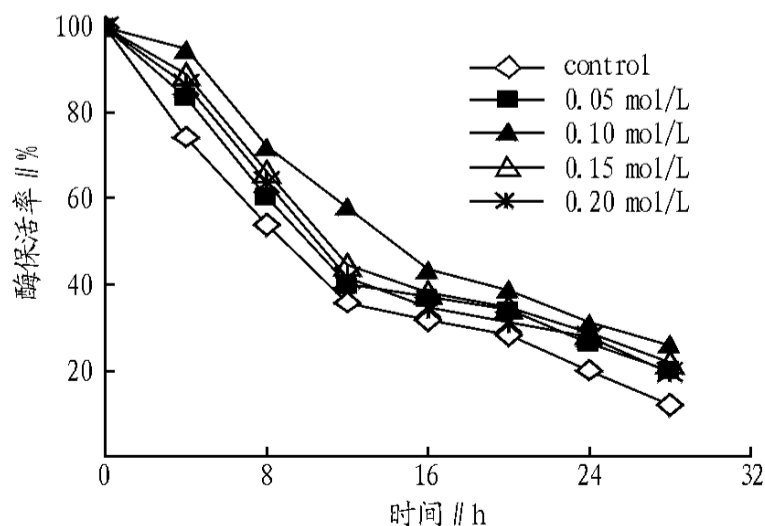


图1 不同浓度海藻糖对酶活性的影响

**2.2 不同时间下, 海藻糖对虫荧光素酶活性的影响** 图2显示, 在同一温度下保存, 随着时间的推移, 海藻糖对虫荧光素酶保护作用效率呈阶梯性变化。在0~2 d时, 海藻糖对酶的保护效率很高; 3~5 d时, 海藻糖对虫荧光素酶的保护效率则保持在一个相对较低的水平。

基金项目 河南省科技攻关项目(0624290019)。

作者简介 王燕(1982-), 女, 湖北黄梅人, 助理工程师, 从事食品质量安全控制研究。

收稿日期 2007-01-18

由图2 还可看出,4 保存时,海藻糖对虫荧光素酶活性具有明显的保护作用。4 保存3 d 时,对照组酶活性保活率仅有50%,而含海藻糖的虫荧光素酶制剂活性还有80%左右,海藻糖的保护作用使酶的保活率增加了30%左右。

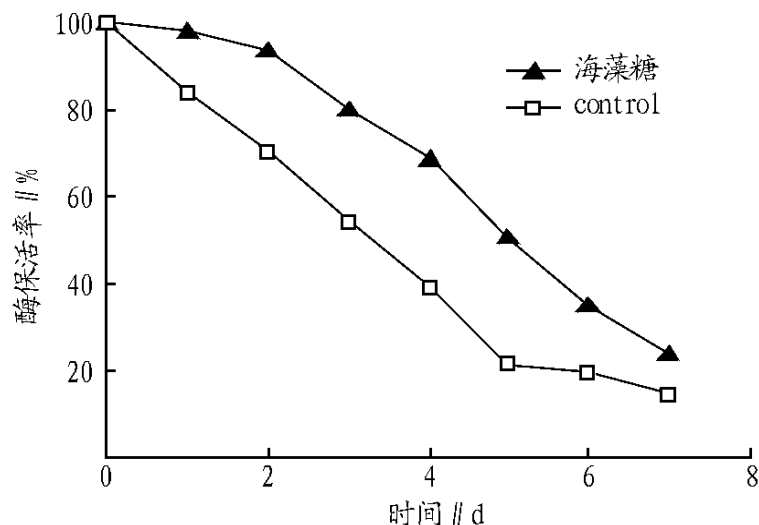


图2 不同时间下海藻糖对酶活性的影响

**2.3 反复冻融时海藻糖对虫荧光素酶活性的影响** 图3 显示,反复冻融时,海藻糖对虫荧光素酶制剂的活性有显著的保护作用。反复冻融3 次时,不含海藻糖的酶制剂的保活率为19.1%,含海藻糖的酶制剂的保活率为51.8%,含糖组保活率是无糖组的2.71 倍。

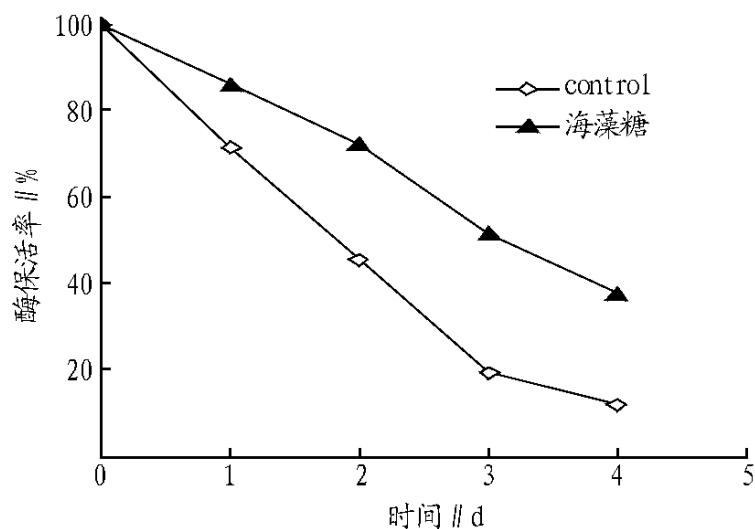


图3 反复冻融时海藻糖对酶活性的影响

### 3 结论与讨论

(1) 实验中浓度为0.1 ml/L 时海藻糖对酶的保活作用最佳,表明海藻糖对虫荧光素酶的保护效果与浓度相关。

(2) 实验表明,在相同的温度下海藻糖对虫荧光素酶的保护效率随时间的延长而逐步下降。此结果与文献报道的海藻糖对其他酶类的保护效率略有不同,可能与虫荧光素酶极易失活的特性有关。

(3) 在室温、低温冷藏以及反复冻融等条件下,海藻糖对虫荧光素酶的活性都有明显的保护作用。反复冻融时,海藻糖的保护作用尤为显著。

目前关于海藻糖的保护机理主要有“水替代”学说、“玻璃态”学说和“优先排阻”学说等<sup>[4-6]</sup>。“水替代”学说认为海藻糖可以形成大量氢键来取代支持空间结构的水分子,从而使蛋白质空间结构稳定。“玻璃态”学说认为海藻糖在玻璃转化温度下形成一种无定形胶体系,减弱分子的活动能力,维持酶的稳定<sup>[7]</sup>。“优先排斥”学说认为海藻糖不直接与蛋白质接触,而是和水结合,使它们从蛋白质水化层中排除出来,使酶的溶剂化半径减小,可移动性降低,稳定性增加,抵御外界环境变化的能力也增加<sup>[8]</sup>。目前不同的实验结果似乎支持不同的假说,具体的保护机制还需进一步的理论研究,但在实际过程中,可能是几种作用产生交互效应。

将当前生物上常用的蛋白质类非特异性酶保护剂,针对虫荧光素酶生物特性的巯基保护剂、无机盐等酶保护剂和海藻糖复配,可能对虫荧光素酶活性有更好的保护作用。

### 参考文献

- [1] 封德顺. 海藻糖的生物学功能简介[J]. 生物学通报,1999,34(2):13-14.
- [2] COLACO C, SENS, THANGAVELU M, et al. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: a simplified molecular biology[J]. Bio/ Tech, 1992, 10:1007-1010.
- [3] 尤新. 功能性发酵制品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 92.
- [4] LOPEZ DIEZ EC, BONES. The interaction of trypsin with trehalose: an investigation of protein preservation mechanisms[J]. Biologica et Biophysica Acta, 2004, 1673:139-148.
- [5] ALPTEKIN AKSAN, MEHMET TONER. Isothermal desiccation and vitrification kinetics of trehalose-dextran solutions[J]. J. Larmuir, 2004, 20:5521-5529.
- [6] LUS ESHINOSA, CAROLINA SCHEBOR, NORMA S, et al. Stability of enzymes and proteins in dried glassy systems: effect of simulated sunlight conditions[J]. Biotechnol Prog, 2004, 20:1220-1224.
- [7] SOEDA, TAKAHIKO, ONDO, et al. Stabilized transglutaminase and enzyme preparation containing the same[Z]. USPTO 6030821, 2000.
- [8] 葛宇, 袁勤生. 海藻糖对生物活性物质的保护作用机理研究进展[J]. 药物生物技术, 2002, 9(5):297-300.