

荧光光谱法研究氨基改性介孔泡沫对 DhaA 的稳定化机理

郑 禾, 钟近艺*, 崔 燕, 赵冲林, 郭 旋, 吴 琼, 赵渊中, 娄 雷

军事科学院防化研究院, 国民核生化灾害防护国家重点实验室, 北京 102205

摘 要 采用 F-4600 荧光光谱仪, 对尿素和二甲基亚砷两种变性剂中烷基卤脱卤酶 DhaA 在氨基改性介孔泡沫固定化前后的荧光光谱特征进行测定。运用荧光相图分析 DhaA 在两种变性剂中的去折叠过程, 并结合活性残留率进行了变性过程热力学参数计算, 比较固定化前后 DhaA 去折叠过程和热力学参数的区别。实验结果表明, DhaA 催化活性随变性剂浓度增加而降低。相同变性剂浓度下, 固定化 DhaA 能够比游离态 DhaA 保持更高的催化活性, 在变性剂到达临界浓度之前(尿素浓度 $5.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, DMSO 浓度 $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 氨基改性介孔泡沫的稳定化作用显著。DhaA 在尿素诱导下的变性过程符合“二态模型”, 而在 DMSO 诱导下符合“三态模型”, DhaA 中间态出现在浓度为 $5.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。氨基改性介孔泡沫固定化不改变 DhaA 变性过程, 但能够提高 DhaA 的去折叠热力学参数。在尿素诱导下, 计算得到的 DhaA 初始吉布斯自由能变 $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ 为 $8.51 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 固定化后 $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ 提高为 $9.55 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$; 但由于尿素分子容易通过静电作用进入氨基介孔泡沫孔道, 固定化后 DhaA 的溶液可及面积 m 由 $3.69 \text{ kcal} \cdot (\text{mol} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ 增大到 $4.00 \text{ kcal} \cdot (\text{mol} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$, 孔道内的氨基、羟基能够通过氢键作用增强 DhaA 的刚性, 从而有效的降低了尿素可及面积增加带来的影响, 提高了 DhaA 的尿素耐受性。在 DMSO 诱导下, 计算发现游离态与固定化 DhaA 在折叠态向中间态转变过程中的 $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ 均为 $12.12 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 由于孔道内的氨基、羟基能够有效阻碍非极性 DMSO 分子的进入, 造成 m 从 $3.39 \text{ kcal} \cdot (\text{mol} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ 降低为 $2.30 \text{ kcal} \cdot (\text{mol} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$; 当 DhaA 从中间态向去折叠态转化时, DhaA 内部疏水基团暴露导致 m 增加, 由于孔道内极性微环境作用, 固定化 DhaA 的 m 值($4.40 \text{ kcal} \cdot (\text{mol} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$) 仍然低于游离态 DhaA ($4.94 \text{ kcal} \cdot (\text{mol} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$)。荧光光谱法研究固定化对 DhaA 去折叠过程及热力学参数的影响是深入研究 DhaA 稳定性的有效手段, 能够为其他生物酶的稳定化机理研究提供方法指导。

关键词 DhaA; 荧光光谱; 稳定化机理; 尿素; 二甲基亚砷

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)06-1779-06

引 言

DhaA 属于烷基卤脱卤酶(EC3.8.1.5, Haloalkane dehalogenases, HLDs), 能够有效降解 1-氯丁烷、1,3-二氯丙烷、1,2,3-三氯丙烷以及含其他卤素原子的农用杀虫剂^[1]。2001 年, DhaA 被首次发现对化学毒剂芥子气(HD)具有较高的催化反应活性, 之后迅速成为了国内外相关领域的研究热点^[2-6]。但是, DhaA 在实际应用中稳定性不高, 特别是在尿素、DMSO 等变性剂影响下易丧失催化反应能力^[7]。固定化作为一种通用的生物酶稳定化技术, 能够通过载体与生物酶之间的相互作用提高生物酶的稳定性^[8-9]。其中, 介孔泡沫

(mesocellular foam, MCF) 是一种三维笼状硅基介孔材料, 能够利用独特的孔径结构对生物酶进行固定化; 而经过氨基改性后, MCF 还能够通过氢键作用进一步提高生物酶的稳定性, 但目前大部分研究只关注了 MCF 固定化后生物酶的功能变化, 对 MCF 固定化生物酶的稳定化机理并不清楚^[10-12]。

荧光光谱作为研究生物酶构象的有效工具, 能够测定不同变性环境下生物酶的荧光光谱强度及位移, 通过荧光光谱变化考察热力学稳定性也已经成为评价生物酶稳定化效果的重要手段^[13-14]。Meng^[15]采用 PEG 修饰增强 srcSH3 蛋白稳定性, 通过 srcSH3 蛋白在盐酸胍中荧光光谱的研究, 发现修饰后的初始吉布斯自由能变($\Delta G(\text{H}_2\text{O})$) 提高了 0.93

收稿日期: 2018-05-17, 修订日期: 2018-10-29

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFC0204205)资助

作者简介: 郑 禾, 1984 年生, 军事科学院防化研究院助理研究员

* 通讯联系人 e-mail: linfzjy@163.com

e-mail: fhjyzyh@126.com

kcal · mol⁻¹。Srimathi^[16]尝试对 α-淀粉酶进行糖基化修饰,发现 OSP400 修饰提高了淀粉酶在硫氰酸胍溶液中的稳定性, ΔG(H₂O)比未修饰的 α-淀粉酶提高了 7.86 kJ · mol⁻¹。Foord^[17]考察了添加剂对细胞色素 c 和糜蛋白酶抑制剂 2 的稳定化效果,发现盐酸胍中添加 2M 甘氨酸后,两种生物酶的 ΔG(H₂O)分别提高了 17.28 和 7.74 kcal · mol⁻¹。本文利用荧光光谱法研究了游离态 DhaA 和氨基改性介孔泡沫(MCF-NH₂)固定化的 DhaA 在尿素和 DMSO 两种变性剂诱导下的变性过程,通过比较固定化前后 DhaA 热力学参数的变化,确定了 MCF-NH₂ 固定化 DhaA 的稳定化机理。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

Infinite F50 型酶标仪(Tecan 公司,奥地利), F-4600 型荧光光谱仪(Hitachi 公司,日本)。三嵌段共聚物(P123, 平均分子量 5 800, Aldrich 公司); 正硅酸乙酯(TEOS, 分析纯, 天津市福晨化学试剂厂); 盐酸(HCl, 分析纯, 北京化工厂); 1,3,5-三甲苯(TMB, 分析纯, 成都格雷西亚化学技术有限公司); 3-氨丙基-三乙氧基硅烷(APTES, 97%, J&K Scientific 公司); 磷酸一氢钠、磷酸氢二钠均为国药分析纯; DhaA 由实验室提供, 蛋白浓度 1.0 mg · mL⁻¹, PB 缓冲液 pH 6.5。

1.2 样品制备

1.2.1 MCF-NH₂ 制备

2.0 g 模板剂 P123 和 5.7 mL 扩孔剂 TMB 混合溶于 52 mL 去离子水中, 混合下逐滴加入 10 mL 浓度 12 mol · L⁻¹ 的盐酸, 混合液 40 °C 下搅拌至澄清, 缓慢加入 4.6 mL TEOS, 40 °C 搅拌下放置 24 h。将混合液转入带聚四氟乙烯内衬的水热反应釜, 100 °C 烘箱中反应 24 h。收集产物过滤, 洗涤清除模板剂, 将滤渣在马弗炉中 550 °C 下煅烧 5 h。取 0.7 g 煅烧产物, 分散至 35 mL 甲苯中, 剧烈搅拌下逐滴加入 14 mL APTES, 110 °C 回流 24 h, 收集沉淀, 分别用乙醇和水冲洗后, 自然干燥得到 MCF-NH₂。

1.2.2 MCF-NH₂ 固定化 DhaA

取 10 mg MCF-NH₂, 超声分散后加入 1 mL 浓度为 1.0 mg · mL⁻¹ 的 DhaA, 25 °C 下吸附 4 h, 12 000 r · min⁻¹ 离心 2 min 后倒出上清, 离心沉淀中加入 pH 6.5 PB 缓冲液, 重复重悬离心三次, 得到 MCF-NH₂ 固定化的 DhaA, 命名为 DhaA@MCF-NH₂。

1.3 研究方法

1.3.1 DhaA 稳定性测定

取 200 μL 不同变性程度的游离态 DhaA(或 DhaA@MCF-NH₂)变性溶液, 加入 10 mmol · L⁻¹ 双(2-氯乙基)醚, 37 °C 下反应 1 h。加入 50 μL 体积比 30% 的硝酸终止反应, 随后加入 55 μL 硫氰化汞和 110 μL 硫酸铁铵。12 000 r · min⁻¹ 离心 2 min 后, 取 200 μL 上清加入 96 孔板, 测定 460 nm 下的吸收强度, 计算氯离子生成量。以不添加变性剂时游离态 DhaA(或 DhaA@MCF-NH₂)的氯离子生成量为 1, 计算不同变性程度下 DhaA 的活性残留率。

1.3.2 DhaA 变性荧光光谱和荧光相图测定

(1) 尿素诱导 DhaA 变性

取蛋白浓度 50 μg · mL⁻¹ 的游离 DhaA(或 DhaA@MCF-NH₂)加入试管, 加入不同浓度的尿素溶液, 保证体系尿素终浓度 0~6 mol · L⁻¹, 25 °C 下放置 12 h。取上述不同变性条件下的 DhaA 溶液 1 mL, 加入石英比色皿, 放入 F-4600 型荧光光谱仪, 固定狭缝宽度 5.0 nm, 激发波长 280 nm, 扫描范围 300~400 nm, 扫描速率 1 000 nm · min⁻¹, 测定荧光发射光谱, 读取 320 和 365 nm 波长下的荧光强度(I₃₂₀和 I₃₆₅), 扣除空白对照的荧光强度后, 绘制荧光相图。空白对照中不含 DhaA, 其余组分与上述变性溶液相同。

(2) DMSO 诱导 DhaA 变性

变性及荧光测定方法相同, 区别在于变性体系 DMSO 终浓度为 0~12 mol · L⁻¹。

1.3.3 DhaA 活性残留率与热力学参数计算

(1) 二态模型

根据文献^[18]报道的关于活性残留率与热力学参数的关系, 当 DhaA 在变性剂诱导下的变性过程符合二态模型时, 体系中 DhaA 仅存在折叠态(Folding, F)和去折叠态(Unfolding, U)两种状态。这种情况下, DhaA 分子从 F 态到 U 态的转变过程可以表示为



式中, K_U 为变性剂诱导下 F 态到 U 态的热力学平衡常数。

此时 DhaA 活性残留率与初始吉布斯自由能变符合式(2)

$\ln(1/r - 1) = n \ln[D] - (\Delta G(\text{H}_2\text{O}) - m[D])/RT$ (2)
式(2)中, n, ΔG(H₂O)和 m 分别为结合的变性剂分子数、DhaA 初始吉布斯自由能变以及单位浓度变性剂引发的自由能变。将测定的 r 和 [D] 带入公式, 拟合后可得 DhaA 热力学参数 ΔG(H₂O)和 m。

(2) 三态模型

当 DhaA 的变性过程中存在折叠态(F)、中间态(Intermediate, I)以及去折叠态(U)时, DhaA 分子从 F 态到 U 态的转变过程可以表示为



式(3)中, K_{D1}和 K_{D2}分别为变性剂诱导下 F 态到 I 态、I 态到 U 态的热力学平衡常数。DhaA 活性残留率与各阶段 ΔG(H₂O)的关系需要分开讨论:

① DhaA 从 F 态向 I 态的转变阶段, r 与 ΔG(H₂O)符合式(4)

$$\ln(1/r - 1) = n_1 \ln[D] - (\Delta G_1(\text{H}_2\text{O}) - m_1[D])/RT \quad (4)$$

② DhaA 从 I 态向 U 态的转变阶段, r 与 ΔG(H₂O)符合式(5)

$$\ln(1/rK_{D1}[D]^{n_1} - 1) = n_2 \ln[D] - (\Delta G_2(\text{H}_2\text{O}) - m_2[D])/RT \quad (5)$$

将测定的 r 和 [D] 带入公式, 拟合后可得各变性阶段的热力学参数。

2 结果与讨论

2.1 DhaA 稳定性

尿素和 DMSO 诱导 DhaA 变性过程中, DhaA 残留活性随变性剂浓度的变化如图 1 所示。可以看到, 随着尿素和 DMSO 浓度增加, 游离态 DhaA 活性逐渐降低, 当尿素浓度和 DMSO 浓度分别达到 6 和 8 mol · L⁻¹ 时, DhaA 完全失活。DhaA@MCF-NH₂ 的活性同样随变性剂浓度增加而降低, 但降低幅度明显小于游离态 DhaA, 说明在相同变性条件下 DhaA@MCF-NH₂ 比游离态 DhaA 活性更高。在变性剂浓度达到某个临界值之前(尿素浓度为 5.5 mol · L⁻¹, DMSO 浓度为 7 mol · L⁻¹), MCF-NH₂ 固定化能够有效提高 DhaA 的稳定性; 而变性剂浓度过高时, 固定化 DhaA 迅速失活。可能是由于变性剂分子大量存在的情况下, 影响了 DhaA 在 MCF-NH₂ 中的固定化, 导致 MCF-NH₂ 无法继续稳定化 DhaA。

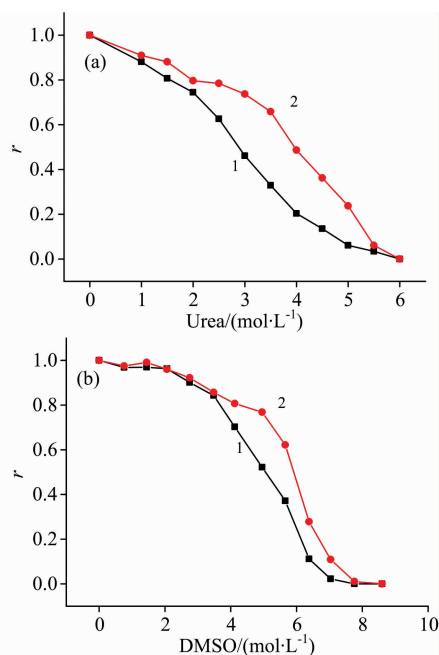


图 1 不同浓度 (a) 尿素和 (b) DMSO 诱导变性条件下 DhaA 活性残留率

1: 游离态 DhaA; 2: DhaA@MCF-NH₂

Fig. 1 Residual activity ratio of DhaA at different concentrations of (a) urea and (b) DMSO in denaturation condition

1: Free DhaA; 2: DhaA@MCF-NH₂

2.2 DhaA 荧光光谱和荧光相图

图 2(a) 和 (b) 分别是游离态 DhaA 和 DhaA@MCF-NH₂ 在不同浓度尿素中的荧光光谱图。两种状态下 DhaA 的荧光强度均随尿素浓度的增加而逐渐降低, 最大发射波长位于 332 nm 左右, 在变性过程中没有出现明显位移。DhaA@MCF-NH₂ 荧光强度的衰减幅度明显低于游离态 DhaA, 说明 MCF-NH₂ 固定化能够减小尿素对 DhaA 的影响。在尿素诱导变性的荧光相图[图 2(a) 和 (b) 插图]中, 游离态 DhaA

和 DhaA@MCF-NH₂ 的 I_{365}/I_{320} 均保持线性变化, 说明 DhaA 在尿素诱导变性过程中不存在中间态, 变性过程符合 Lumry-Eyring 二态模型。

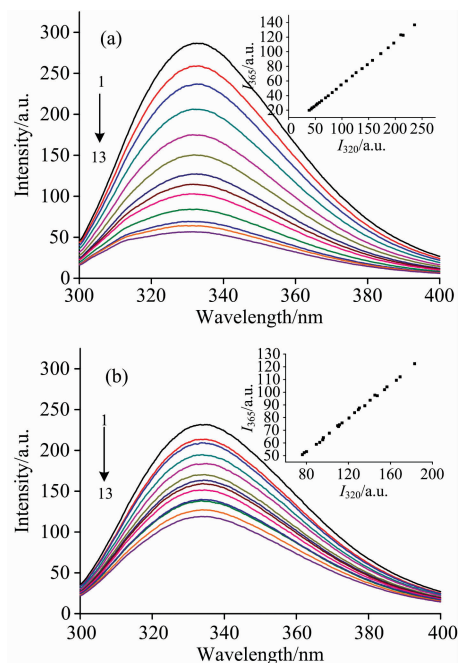


图 2 尿素诱导 (a) 游离态 DhaA 和 (b) DhaA@MCF-NH₂ 变性的荧光光谱 (插图: 尿素诱导 DhaA 荧光相图)

1—13: 体系中尿素浓度分别为 0~6 mol · L⁻¹, 间隔 0.5 mol · L⁻¹

Fig. 2 Fluorescence emission spectra representing the denaturation of (a) free DhaA and (b) DhaA@MCF-NH₂ induced by urea (Insert: Phase diagram of fluorescence representing the denaturation of DhaA induced by urea)

1—13: The concentration of urea at 0~6 mol · L⁻¹, interval concentration is 0.5 mol · L⁻¹

DMSO 诱导 DhaA 变性的荧光光谱如图 3 所示。游离态 DhaA 的荧光强度随着 DMSO 浓度的增加而显著降低[图 3(a) 中 1—5], 并且在 DMSO 浓度达到 5.6 mol · L⁻¹ 时, 荧光光谱开始发生红移, 说明此时 DhaA 构象开始发生改变[图 3(a) 中 6—8]。由于 MCF-NH₂ 固定化的影响, DhaA@MCF-NH₂ 荧光光谱的变化有所区别: DMSO 浓度从 0 增大到 1.4 mol · L⁻¹ 时, DhaA@MCF-NH₂ 荧光强度降低[图 3(b) 中 1—2]; DMSO 浓度在 1.4 mol · L⁻¹ 增大到 5.6 mol · L⁻¹ 的过程中, DhaA@MCF-NH₂ 荧光强度增大[图 3(b) 中 3—5]; 而 DMSO 浓度超过 5.6 mol · L⁻¹ 时, DhaA@MCF-NH₂ 的荧光光谱开始发生红移[图 3(b) 中 6—9]。游离 DhaA 和 DhaA@MCF-NH₂ 的荧光相图均呈两条直线[图 3(a) 和 (b) 插图], 证明 DhaA 在 DMSO 诱导变性过程中存在一个中间态, 两直线交点对应 DMSO 浓度 5.6 mol · L⁻¹, 与荧光光谱结果一致。也就是说 DMSO 对 DhaA 的诱导变性分两个阶段: 当浓度从 0 增加到 5.6 mol · L⁻¹ 时, DhaA 从折叠态(F) 向中间态(I) 转化; 当 DMSO 浓度继续增加时, DMSO 诱导 DhaA 分子构象发生改变, DhaA 从中间态(I) 向去折叠态

(U)转变, 变性过程符合三态模型。

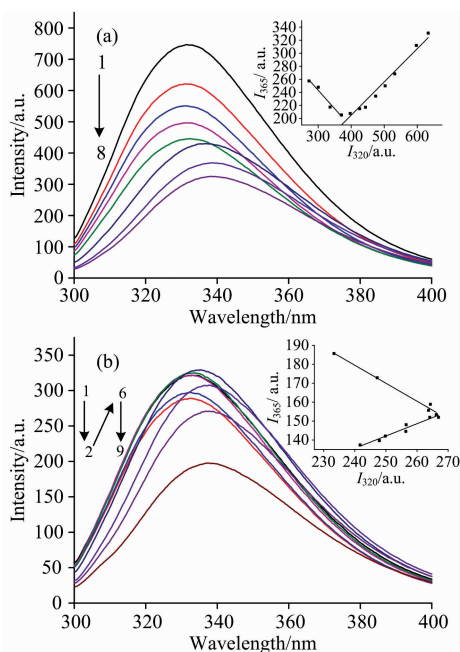


图 3 DMSO 诱导 (a) 游离态 DhaA 和 (b) DhaA@MCF-NH₂ 变性的荧光光谱 (插图: DMSO 诱导 DhaA 荧光相图) 1—9: 体系中 DMSO 浓度分别为 0~11.2 mol·L⁻¹, 间隔 1.4 mol·L⁻¹

Fig. 3 Fluorescence emission spectra representing the denaturation of (a) free DhaA and (b) DhaA@MCF-NH₂ induced by DMSO (Insert: Phase diagram of fluorescence representing the denaturation of DhaA induced by DMSO

1—9: The concentration of DMSO at 0~11.2 mol·L⁻¹, interval concentration is 1.4 mol·L⁻¹

表 1 游离态 DhaA 和 DhaA@MCF-NH₂ 的热力学参数

Table 1 The thermodynamic parameters of free DhaA and the DhaA@MCF-NH₂

变性剂	变性阶段	游离 DhaA		DhaA@MCF-NH ₂	
		$\Delta G(\text{H}_2\text{O})/$ (kcal·mol ⁻¹)	$m/$ [kcal·(mol·mol·L ⁻¹) ⁻¹]	$\Delta G(\text{H}_2\text{O})/$ (kcal·mol ⁻¹)	$m/$ [kcal·(mol·mol·L ⁻¹) ⁻¹]
尿素	F→U	8.51	3.69	9.55	4.00
DMSO	F→I	12.12	3.39	12.11	2.30
	I→U	19.81	4.94	22.50	4.40

由此可见, 在 DhaA 变性过程中, MCF-NH₂ 固定化技术能够改变 DhaA 的热力学参数。在尿素诱导下, MCF-NH₂ 固定化能够提高 DhaA 的初始吉布斯自由能变 $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$; 而 DMSO 诱导下, MCF-NH₂ 固定化能够有效减小 DhaA 的溶液可及面积 m , 两种变性条件下稳定化机理有所区别。

3 结论

应用荧光光谱法对 DhaA 在尿素和 DMSO 两种变性剂诱导下的变性过程进行了研究, 进而就 MCF-NH₂ 固定化对

2.3 MCF-NH₂ 对 DhaA 的稳定化机理

在两种变性剂诱导条件下, 分别采用式(2)、式(4)和式(5)拟合计算得到的 DhaA 热力学参数如表 1 所示。可以看到, 在尿素诱导变性情况下, 游离态 DhaA 的初始吉布斯自由能变 $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ 为 8.51 kcal·mol⁻¹, 单位浓度变性剂引发的自由能变 m 为 3.69 kcal·(mol·mol·L⁻¹)⁻¹; DhaA@MCF-NH₂ 的 $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ 为 9.55 kcal·mol⁻¹, 比游离态 DhaA 提高 12.22%, m 也提高到 4.00 kcal·(mol·mol·L⁻¹)⁻¹。固定化后 m 值升高, 证明 DhaA 的溶液可及面积有所增加, 即尿素分子更容易接近 DhaA。这是由于 pH 6.5 条件下, 尿素分子的氨基容易质子化, 而 MCF-NH₂ 孔道内表面残留羟基带负电荷, 尿素分子可以通过静电作用进入孔道, 引起 m 值的增加。固定化后 $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ 增加, 这是因为 MCF-NH₂ 孔道内的氨基、羟基能够通过氢键作用有效增强了 DhaA 的刚性。比较 DhaA 的活性残留率, 可以发现 MCF-NH₂ 固定化带来 DhaA 刚性的增强有效降低了尿素可及面积增加带来的影响, 提高了 DhaA 的稳定性。

DhaA 在 DMSO 诱导变性过程中符合三态模型, 当 DhaA 从 F 态向 I 态转化时, 游离态 DhaA 和 DhaA@MCF-NH₂ 的 $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ 基本一致, 但 MCF-NH₂ 固定化使得 m 从 3.39 kcal·(mol·mol·L⁻¹)⁻¹ 降低为 2.30 kcal·(mol·mol·L⁻¹)⁻¹, 下降率 32.15%。这是因为 DMSO 侧链为非极性甲基, MCF-NH₂ 孔道内的极性基团有效阻碍了 DMSO 分子的进入, 减小了孔道中 DhaA 的溶液可及面积。当 DMSO 浓度超过 5.6 mol·L⁻¹, DhaA 从 I 态向 U 态转化时, DhaA 开始出现构象变化, 内部疏水基团的暴露导致 m 增加, 但由于 MCF-NH₂ 孔道内极性基团的阻碍作用, 使 DhaA@MCF-NH₂ 的 m 值 [4.40 kcal·(mol·mol·L⁻¹)⁻¹] 仍然低于游离态 DhaA [4.94 kcal·(mol·mol·L⁻¹)⁻¹]。

DhaA 的稳定化机理进行了分析。通过研究发现, DhaA 在尿素和 DMSO 诱导下的变性过程分别符合“二态模型”和“三态模型”, MCF-NH₂ 固定化不改变 DhaA 的变性过程, 但能够通过改变 DhaA 的热力学参数, 提高 DhaA 的稳定性。其中, MCF-NH₂ 固定化提高了 DhaA 在尿素中的初始吉布斯自由能变 $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$, 而在 DMSO 中减小了 DhaA 的溶液可及面积 m 。利用荧光光谱法考察变性过程中生物酶的构象变化, 能够从热力学稳定性角度对固定化效果进行评价和分析, 但生物酶稳定化机理的深入解析, 还需要结合变性过程的动力学分析进行系统研究。

References

- [1] Nagata Y, Ohtsubo Y, Tsuda M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99: 9865.
- [2] Pavlova M, Klvana M, Prokop Z, et al. *Nat. Chem. Biol.*, 2009, 5: 727.
- [3] Koudelakova T, Chaloupkova R, Brezovsky J, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52: 1959.
- [4] GUO Nan, DONG Liang, LIU Jing-quan, et al(郭楠, 董亮, 刘景全, 等). *Environ. Chem. (环境化学)*, 2015, 34(7): 1363.
- [5] ZHAO Yuan-zhong, ZHONG Jin-yi, GUO Nan, et al(赵渊中, 钟近艺, 郭楠, 等). *Chin. J. Appl. Environ. Biol. (应用与环境生物学报)*, 2017, 23(4): 714.
- [6] Zhao Yuanzhong, Yu Weili, Zheng He, et al. *J. Biotechnol.*, 2017, 254: 25.
- [7] Stepankova V, Damborsky J, Chaloupkova R. *Biotechnol. J.*, 2013, 8: 633.
- [8] Stepankova V, Bidmanova S, Koudelakova T, et al. *ACS Catal.*, 2013, 3: 2823.
- [9] Zhang Yifei, Ge Jun, Liu Zheng. *ACS Catal.*, 2015, 5: 4503.
- [10] Li Jun, Yin Guangfu, Ding Yi, et al. *J. Biosci. Bioengin.*, 2013, 116: 555.
- [11] Karimi M, Chaudhury I, Cheng H, et al. *J. Mole. Catal. B: Enzym.*, 2014, 104: 48.
- [12] Dreifke M, Fried D I, Brieler F J, et al. *J. Mole. Catal. B: Enzymatic*, 2016, 132: 5.
- [13] Ota C, Ikeguchi M, Tanaka A, et al. *Biochimica. ET Biophysica. Acta*, 2016, 1864: 1464.
- [14] HU Sheng, HUANG Jun, KE Pi-yu, et al(胡升, 黄俊, 柯丕余, 等). *J. Chem. Engin. Chin. Univer. (高校化学工程学报)*, 2016, 30(3): 648.
- [15] Meng Wei, Guo Xinlu, Qin Meng, et al. *Langmuir*, 2012, 28: 16133.
- [16] Srimathi S, Jayaraman G. *Protein J.*, 2005, 24: 79.
- [17] Foord R L, Leatherbarrow R J. *Biochemistry*, 1998, 37: 2969.
- [18] ZHANG Tan, BIAN Liu-jiao(张潭, 边六交). *Chem. J. Chinese Univer. (高等学校化学学报)*, 2011, 32(7): 1497.

Stabilization Mechanism of Amino-Modified-Mesocellular Foam to DhaA by Fluorescence Spectroscopic Method

ZHENG He, ZHONG Jin-yi*, CUI Yan, ZHAO Chong-lin, GUO Xuan, WU Qiong, ZHAO Yuan-zhong, LOU Lei
Academy of Military Science, Research Institute of Chemical Defense, State Key Laboratory of NBC Protection for Civilian,
Beijing 102205, China

Abstract The fluorescence spectroscopic characteristics of DhaA immobilized by amino-modified-mesocellular foam (MCF-NH₂) were investigated during denaturation procedures with urea and DMSO as denaturant by using F-4600 fluorescence spectrometer. The unfolding process of DhaA in denaturants was analyzed by phase diagram of fluorescence, and thermodynamic parameters were calculated with residual activity ratio of DhaA. The difference between the non-immobilized and immobilized DhaA in aspect of unfolding process and thermodynamic parameters were compared. The results showed that the catalytic activity of DhaA declined with the increasing concentration of denaturants, and the catalytic activity of immobilized DhaA could be maintained better than that of free DhaA at the same concentration of denaturant. The stabilization effect of MCF-NH₂ to DhaA was obvious before the denaturants concentration reached a critical concentration (5.5 mol · L⁻¹ for urea, 7 mol · L⁻¹ for DMSO). The unfolding procedure of DhaA induced by urea conformed to typical “two-state” model. The unfolding procedure of DhaA induced by DMSO conformed to “three-state” model, and the intermediate state of DhaA appeared at the DMSO concentration of 5.6 mol · L⁻¹. Immobilization by MCF-NH₂ didn't change the degeneration process of DhaA, but could raise the thermodynamic parameters during the unfolding process of DhaA. When induced by urea, the $\Delta G(H_2O)$ was 8.51 kcal · mol⁻¹ for free DhaA and was increased to 9.55 kcal · mol⁻¹ for the immobilized one. However, the solvent-accessible surface area (*m*) increased from 3.69 to 4.00 kcal · (mol · mol · L⁻¹)⁻¹ after immobilization, which might be caused by the convenient moving of urea molecules into MCF-NH₂ with electrostatic attraction. The amino and hydroxyl groups in the channel of MCF-NH₂ could enhance DhaA rigidity through hydrogen bonding effectively reduced the effect of increasing of urea-accessible surface area, and improved the urea tolerance of DhaA. When DhaA was induced by DMSO, the $\Delta G(H_2O)$ values of process from fold state to intermediate state were always 12.12 kcal · mol⁻¹ in the before and after immobilization. The solvent-accessible surface area of DhaA dropped from 3.39 to 2.30 kcal · (mol · mol · L⁻¹)⁻¹ after immobilization, which might be caused by the block effect of amino and hydroxyl groups

in MCF-NH₂ which effectively inhibiting the entry of non-polar DMSO molecules. From intermediate state to unfold state, the exposure of hydrophobic amino acids in DhaA led to an increase of m value, but the m value of immobilized DhaA [4.40 kcal · (mol · mol · L⁻¹)⁻¹] was still lower than the free DhaA [4.94 kcal · (mol · mol · L⁻¹)⁻¹] due to the polar microenvironment in the channel. Studying the unfolding process and thermodynamic parameters by fluorescence spectrometer is an effective technological mean for the research on DhaA stability, which can also offer a methodological guidance for stabilization mechanism study for other enzymes.

Keywords DhaA; Fluorescence spectroscopy; Stabilization mechanism; Urea; DMSO

(Received May 17, 2018; accepted Oct. 29, 2018)

* Corresponding author