**浙江万里学院**

硕士专业学位论文

**中文论文题目 ：**金属离子对南极磷虾精氨酸激酶作用研究**英文论文题目 ： Research on *euphausia superba* arginine**

**kinase by metal ions**

申请人姓名： 靳 庆 鑫 校内导师： 朴 龙 斗 校外导师： 王 玉 龙

专业学位类别： 工程专业学位专 业 学 位 领 域 ： 生 物 工 程所在学院： 生物与环境学院

**论文提交日期**  **2014 年 3 月 31 日**

**金属离子对南极磷虾精氨酸激酶作用研究**

**院** 系：生物与环境学院 **工程领域**：生物工程

**校内导师**：朴龙斗 教授

**校外导师**：王玉龙 副研究员

**工程硕士**：靳庆鑫

**学** **号**：2012881014

**浙江万里学院**

**2014 年 03 月 31 日**

**RESEARCH ON *EUPHAUSIA SUPERBA***

**ARGININE KINASE BY METAL IONS**

**M.D. Candidate**： Jin Qing-xin **Supervisor（I）**：Park Yong-Doo **Supervisor（II）**：Wang Yu-long **Speciality**：Biological Engineering

Zhejiang Wanli University Ningbo,P.R.China

May, 2014

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 中图分类号： |  | 单位代码： | 10876 |
| 学号： | 2012881014 | 密级： | 公开 |

**浙江万里学院**

硕士专业学位论文



**中文论文题目：金属离子对南极磷虾精氨酸激酶作用研究**

**英文论文题目： Research on *euphausia superba* arginine kinase**

**By metal ions**

申请人姓名： 靳 庆 鑫 校内教师： 朴 龙 斗 校外导师： 王玉 龙

专业学位类别： 工程专业学位专业学位领域： 生 物 工 程所在学院： 生物与环境学院

**论文提交日期**  **2014 年 3 月 31 日**

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 **浙江万里学院** 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：签字日期：年 月 日

本学位论文作者完全了解浙江万里学院有关保留、使用学位论文的规定，同意**浙江万里学院**保留并向国家有关部门或机构送交论文的

复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权**浙江万里学院**可

以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

**保密**□**在**  年解密后适用本授权书。

本学位论文属于

**不保密**□。

（请在以上方框内打“**√**”）

学位论文作者签名：指导教师签名：

金属离子对南极磷虾精氨酸激酶作用研究**摘 要**

南极磷虾（*Euphausia superba*）是目前发现的世界上蕴藏量最大的动物蛋白

库，且虾肉营养丰富，蛋白含量高，医用价值大，具有巨大的商业开发价值。但其体积小，虾壳和头部含氟，捕捞后存活期短，因此要求捕捞、去壳、冷冻的设备和技术难度极高，束缚了其开发利用。

精氨酸激酶是无脊椎动物包括节肢动物甲壳类体内参与能量代谢的重要酶类，其活性与功能的调节机制对南极磷虾（*Euphausia superba*）适应低温海域环境和拥有高能量代谢率、高生长速率的生长模式具有潜在的影响。本论文研究了几种金属离子（包括重金属）对其结构和功能的影响机制；同时探讨了渗透剂缓解金属离子作用的机制，以期对南极磷虾肌肉中的精氨酸激酶进行结构和功能的系统性研究，为南极磷虾在极端低温环境的能量供应和运动机制提供研究基础，以期有助于南极磷虾的捕捞、保存和开发。

本文测定了Pb2+、Cu2+、Mn2+、Sr2+、Al3+、Fe3+、Co2+、Fe2+、Mg2+、Zn2+、

Cr3+等几种常见的金属离子对南极磷虾精氨酸激酶（ESAK）活力的影响，发现多数金属离子对ESAK都有不同程度的抑制作用，且随着离子浓度的增加抑制程度加重；而微量Mg2+、Mn2+对ESAK有促进作用，可能与ESAK的催化和调控有关。

采用酶活力测定、动力学分析、内源荧光、ANS荧光、CD光谱和聚沉等分析手段深入研究了抑制效果好并有代表性的Pb2+和Zn2+对ESAK结构和功能的改变。结果表明Pb2+对ESAK属于不可逆抑制，其抑制作用不能通过简单的物理渗透和加入常见螯合剂来解除；Pb2+变性后的ESAK内源荧光发生明显的红移，并且伴随淬灭；三级结构中没有疏水面暴露，但内部极性增强，非极性减弱；聚沉分析发现随着Pb2+浓度的增大，聚沉速度加快，可观测到的聚沉量增大且聚合物不溶于乙醇等有机溶剂。

Zn2+对ESAK的研究表明，随着Zn2+浓度的升高，酶失活程度加大，失活速率加快；Zn2+对ESAK属于非竞争性抑制，测得的抑制动力学参数*IC*50=0.027 mM，*K*i, arginine=0.0279 mM，*K*i, ATP=0.0208 mM，比较发现Zn2+对ATP抑制作用较

I

强；随Zn2+浓度的增大，内源强度减小，发射峰轻微红移，ANS结合荧光强度增大；二级结构中α-螺旋量增多，β-折叠量减少，水化膜被破坏，疏水基团外露导致聚沉；聚沉分析发现随Zn2+浓度增大，聚沉速率增大，聚沉量增大，聚合物可以被乙醇溶解。

ESAK与Pb2+和Zn2+两种离子作用后，加入渗透物后恢复效果也不相同。选取甘氨酸、脯氨酸和肝素等几种常见的渗透物与Pb2+和Zn2+变性后ESAK共同作用，实验结果显示，对于低浓度Zn2+引起的ESAK变性，甘氨酸和脯氨酸可以帮助其很大程度上恢复活力和构象，对于高浓度Zn2+引发的ESAK聚沉，甘氨酸和脯氨酸都可以起到很好的抑制作用；对于Pb2+诱导的ESAK变性和聚沉，这几种渗透物都没有明显作用，进一步证实了Pb2+和Zn2+两种金属离子对ESAK作用机理是不同的。

**关键词：**精氨酸激酶； 金属离子； 非竞争性抑制； 不可逆抑制； 聚沉； 渗透物

II

**RESEARCH ON *EUPHAUSIA SUPERBA***

**ARGININE KINASE BY METAL IONS** **ABSTRACT**

*Euphausia superba* is in largest abundant in animal-protein reverse ever found in the word, and it's rich in high protein, nutritious, medical value and commercial value. *euphausia superba* is small, rich in fluoride in its shell and has short survival time after being fished. Therefore it is hrad to fish and exploit *euphausia superba* because of the precision equipment and superb technology.

Arginine kinase is important in energy metabolism in invertebrates, and regulation of arginine kinase activity and function has potential effect on low temperature sea environment, high energy metabolic rate and high growth rate of *euphausia superba*. We investigate several metal ions influence in function and structure of *euphausia superb* arginine kinase (ESAK) in this paper, and then study the metabolism of osmolytes on denaturation ESAK induced by metal ions to aquire the systemic research on function of structure of ESAK in muscle, so as to provide foundation of energy supply and movement metabolism study of *euphausia superba* in extremely low temperature environment to exploit *euphausia superb.*

The common metal ions including Pb2+, Cu2+, Mn2+, Sr2+, Al3+, Fe2+, Fe3+, Co2+,

Mg2+, Zn2+, Cr3+ were used to investigate the influence of metal ions in ESAK activity. The results showed that, many metal ions have inhibition on ESAK in different degrees in doze dependent, while Mn2+ and Mg2+ have positive effect.

The determination of enzyme activity, kinetic analysis, fluorescence, ANS-bing fluorescence, CD spectra and aggregation analysis were used to study the effect of Pb2+ and Zn2+ on ESAK function and conformation. The result showed that, Pb2+ inhibitate ESAK irreversibly, and the inhibition effect cannot be lifted by simply physical methods. Pb2+ induced ESAK intrinsic fluorescence red-shift from 331 nm to 338 nm. There was no hydrophobic surface exposure but polarity enhancement in internal. In aggregation study, aggregation rate induced by Pb2+ increased along with the rise of Pb2+, aggregation substrance cannot be dissolved in organic solvent.

III

The results of Zn2+ on ESAK showed that, Zn2+ inhibate ESAK in non-competive reversible inhibition with the inhibition constant IC50=0.027 mM, Ki, arginine=0.0279 mM, Ki, ATP=0.0208 mM. Zn2+ induced ESAK intrinsic fluorescence decreasing and hydrophobic surface exposure. In aggregation study, ESAK

Aggregation rate induced by Zn2+ increased along with rise of Zn2+, and the aggregation substance can be dissolved in organic solvent.

At last, osmolytes were added, to protect and recover the structure and function of denaturation ESAK induced by Pb2+ and Zn2+. The results showed that, glycine, proline, and liquaemin can recover the conformation of ESAK and prevent ESAK

Aggregation induced by Zn2+, but there was no obvious effect for Pb2+, and this confirmed that the function metabolism of Pb2+ and Zn2+ were different furtherly.

**KEY WORDS**: arginine kinase; Metal ions; Non-competitive inhibition; Aggregation; Irreversible inhibition; Osmolytes

IV

目 录

[目录](#_Toc686961631) 6

[英文缩略词](#_Toc686961632) 8

[第1章 引言](#_Toc686961633) 9

**[1.1](#_Toc686961634)** [南极磷虾的研究意义](#_Toc686961634) 9

**[1.1.1](#_Toc686961635)** [南极磷虾简介](#_Toc686961635) 9

**[1.1.2](#_Toc686961636)** [南极磷虾营养价值](#_Toc686961636) 9

**[1.1.3](#_Toc686961637)** [南极磷虾开发研究现状](#_Toc686961637) 10

**[1.2](#_Toc686961638)** [精氨酸激酶的研究意义](#_Toc686961638) 10

**[1.2.1](#_Toc686961639)** [精氨酸激酶简介](#_Toc686961639) 10

**[1.2.2](#_Toc686961640)** [精氨酸激酶结构与功能研究](#_Toc686961640) 10

**[1.2.3](#_Toc686961641)** [金属离子对精氨酸激酶的作用研究](#_Toc686961641) 10

**[1.2.4](#_Toc686961642)** [精氨酸激酶研究对南极磷虾开发的意义](#_Toc686961642) 10

**[1.3](#_Toc686961643)** [蛋白质变性与聚沉](#_Toc686961643) 11

**[1.3.1](#_Toc686961644)** [蛋白质聚沉研究意义](#_Toc686961644) 11

**[1.3.2](#_Toc686961645)** [蛋白质聚沉机理研究](#_Toc686961645) 11

**[1.3.3](#_Toc686961646)** [金属离子在蛋白质聚沉中的作用研究进展](#_Toc686961646) 12

**[1.4](#_Toc686961647)** [本论文主要研究工作和意义](#_Toc686961647) 12

[第](#_Toc686961648)**[2](#_Toc686961648)**[章](#_Toc686961648) **[ESAK](#_Toc686961648)**[的分离纯化](#_Toc686961648) 13

**[2.1](#_Toc686961649)** [实验材料与仪器](#_Toc686961649) 13

**[2.1.1](#_Toc686961650)** [材料和试剂](#_Toc686961650) 13

**[2.1.2](#_Toc686961651)** [溶液的配制](#_Toc686961651) 13

**[2.1.3](#_Toc686961652)** [实验仪器设备](#_Toc686961652) 16

**[2.2](#_Toc686961653)** [实验方法](#_Toc686961653) 17

**[2.2.1](#_Toc686961654)****[ESAK](#_Toc686961654)**[的分离纯化](#_Toc686961654) 17

**[2.2.2](#_Toc686961655)****[ESAK](#_Toc686961655)**[的活力和纯度测定](#_Toc686961655) 18

**[2.3](#_Toc686961656)** [实验结果](#_Toc686961656) 18

**[2.3.1](#_Toc686961657)****[ESAK](#_Toc686961657)**[纯度检测](#_Toc686961657) 18

**[2.3.2](#_Toc686961658)****[ESAK](#_Toc686961658)**[活力检测](#_Toc686961658) 18

**[2.4](#_Toc686961659)** [讨论](#_Toc686961659) 19

**[2.4.1](#_Toc686961660)** [温度对](#_Toc686961660)**[ESAK](#_Toc686961660)**[分离纯化的影响](#_Toc686961660) 19

**[2.4.2](#_Toc686961661)** [盐度对](#_Toc686961661)**[ESAK](#_Toc686961661)**[酶活影响](#_Toc686961661) 19

[3.1 引言](#_Toc686961662) 21

**[3.2](#_Toc686961663)** [实验材料和方法](#_Toc686961663) 21

**[3.2.1](#_Toc686961664)** [实验材料](#_Toc686961664) 21

**[3.2.2](#_Toc686961665)** [不同金属离子对](#_Toc686961665)**[ESAK](#_Toc686961665)**[酶活影响测定](#_Toc686961665) 21

**[3.2.3](#_Toc686961666)****[Pb2+](#_Toc686961666)**[变性的](#_Toc686961666)**[ESAK](#_Toc686961666)**[的内源荧光和](#_Toc686961666)**[ANS](#_Toc686961666)**[结合荧光分析](#_Toc686961666) 22

**[3.2.4](#_Toc686961667)****[Pb2+](#_Toc686961667)**[介导的](#_Toc686961667)**[ESAK](#_Toc686961667)**[聚沉实验](#_Toc686961667) 22

**[3.3](#_Toc686961668)** [实验结果](#_Toc686961668) 22

**[3.3.1](#_Toc686961669)** [不同金属离子对](#_Toc686961669)**[ESAK](#_Toc686961669)**[酶活影响](#_Toc686961669) 22

**[3.3.2](#_Toc686961670)****[Pb2+](#_Toc686961670)**[对](#_Toc686961670)**[ESAK](#_Toc686961670)**[抑制类型分析](#_Toc686961670) 24

**[3.3.3](#_Toc686961671)****[Pb2+](#_Toc686961671)**[变性的](#_Toc686961671)**[ESAK](#_Toc686961671)**[的内源荧光光谱](#_Toc686961671) 24

**[3.3.4](#_Toc686961672)****[Pb2+](#_Toc686961672)**[变性的](#_Toc686961672)**[ESAK](#_Toc686961672)**[的](#_Toc686961672)**[ANS](#_Toc686961672)**[结合荧光光谱](#_Toc686961672) 25

**[3.3.5](#_Toc686961673)****[Pb2+](#_Toc686961673)**[介导的](#_Toc686961673)**[ESAK](#_Toc686961673)**[聚沉](#_Toc686961673) 25

**[3.4](#_Toc686961674)** [讨论](#_Toc686961674) 25

**[4.1](#_Toc686961675)** [引言](#_Toc686961675) 26

**[4.2](#_Toc686961676)** [实验材料与方法](#_Toc686961676) 27

**[4.2.1](#_Toc686961677)** [实验材料](#_Toc686961677) 27

**[4.2.2](#_Toc686961678)****[Zn2+](#_Toc686961678)**[对](#_Toc686961678)**[ESAK](#_Toc686961678)**[酶活影响的测定](#_Toc686961678) 27

**[4.2.3](#_Toc686961679)****[Zn2+](#_Toc686961679)**[对](#_Toc686961679)**[ESAK](#_Toc686961679)**[抑制动力学分析](#_Toc686961679) 28

**[4.2.4](#_Toc686961680)****[Zn2+](#_Toc686961680)**[变性的](#_Toc686961680)**[ESAK](#_Toc686961680)**[的荧光光谱分析](#_Toc686961680) 28

**[4.2.5](#_Toc686961681)****[Zn2+](#_Toc686961681)**[变性的](#_Toc686961681)**[ESAK](#_Toc686961681)**[的圆二色光谱](#_Toc686961681) 28

**[4.2.6](#_Toc686961682)****[Zn2+](#_Toc686961682)**[介导的](#_Toc686961682)**[ESAK](#_Toc686961682)**[的聚沉实验](#_Toc686961682) 28

**[4.3](#_Toc686961683)** [实验结果](#_Toc686961683) 28

**[4.3.1](#_Toc686961684)****[Zn2+](#_Toc686961684)**[对](#_Toc686961684)**[ESAK](#_Toc686961684)**[活性的影响](#_Toc686961684) 28

**[4.3.2](#_Toc686961685)****[Zn2+](#_Toc686961685)**[对](#_Toc686961685)**[ESAK](#_Toc686961685)**[的抑制动力学分析](#_Toc686961685) 30

**[4.3.3](#_Toc686961686)****[Zn2+](#_Toc686961686)**[变性的](#_Toc686961686)**[ESAK](#_Toc686961686)**[的内源荧光分析](#_Toc686961686) 31

**[4.3.4](#_Toc686961687)****[Zn2+](#_Toc686961687)**[变性的](#_Toc686961687)**[ESAK](#_Toc686961687)**[的](#_Toc686961687)**[ANS](#_Toc686961687)**[结合荧光分析](#_Toc686961687) 31

**[4.3.5](#_Toc686961688)****[Zn2+](#_Toc686961688)**[变性的](#_Toc686961688)**[ESAK](#_Toc686961688)**[的圆二色光谱分析](#_Toc686961688) 31

**[4.3.6](#_Toc686961689)****[Zn2+](#_Toc686961689)**[介导的](#_Toc686961689)**[ESAK](#_Toc686961689)**[聚沉分析](#_Toc686961689) 32

**[4.4](#_Toc686961690)** [讨论](#_Toc686961690) 33

**[4.4.1](#_Toc686961691)****[Zn2+](#_Toc686961691)**[对](#_Toc686961691)**[ESAK](#_Toc686961691)**[活力的影响](#_Toc686961691) 34

**[4.4.2](#_Toc686961692)****[Zn2+](#_Toc686961692)**[对](#_Toc686961692)**[ESAK](#_Toc686961692)**[结构的影响](#_Toc686961692) 34

[第](#_Toc686961693)**[5](#_Toc686961693)**[章 渗透物对](#_Toc686961693)**[ESAK](#_Toc686961693)**[的恢复作用](#_Toc686961693) 34

**[5.1](#_Toc686961694)** [引言](#_Toc686961694) 34

**[5.2](#_Toc686961695)** [实验材料和方法](#_Toc686961695) 35

**[5.2.1](#_Toc686961696)** [实验材料](#_Toc686961696) 35

**[5.2.2](#_Toc686961697)** [渗透物对金属离子诱导的](#_Toc686961697)**[ESAK](#_Toc686961697)**[失活影响实验](#_Toc686961697) 35

**[5.2.3](#_Toc686961698)** [渗透物对金属离子变性的](#_Toc686961698)**[ESAK](#_Toc686961698)**[结构影响实验](#_Toc686961698) 35

**[5.2.4](#_Toc686961699)** [渗透物对](#_Toc686961699)**[Zn2+](#_Toc686961699)**[诱导的](#_Toc686961699)**[ESAK](#_Toc686961699)**[聚沉影响实验](#_Toc686961699) 35

**[5.3](#_Toc686961700)** [渗透物对](#_Toc686961700)**[Zn2+](#_Toc686961700)**[介导的](#_Toc686961700)**[ESAK](#_Toc686961700)**[失活和聚沉的影响](#_Toc686961700) 35

**[5.3.1](#_Toc686961701)** [渗透物对](#_Toc686961701)**[Zn2+](#_Toc686961701)**[诱导的](#_Toc686961701)**[ESAK](#_Toc686961701)**[失活的影响](#_Toc686961701) 35

**[5.3.2](#_Toc686961702)** [甘氨酸和脯氨酸对](#_Toc686961702)**[Zn2+](#_Toc686961702)**[变性的](#_Toc686961702)**[ESAK](#_Toc686961702)**[结构的作用](#_Toc686961702) 36

**[5.3.3](#_Toc686961703)** [甘氨酸和脯氨酸对](#_Toc686961703)**[Zn2+](#_Toc686961703)**[引起的](#_Toc686961703)**[ESAK](#_Toc686961703)**[聚沉的作用](#_Toc686961703) 37

**[5.4](#_Toc686961704)** [渗透剂对](#_Toc686961704)**[Pb2+](#_Toc686961704)**[介导的](#_Toc686961704)**[ESAK](#_Toc686961704)**[失活和聚沉的影响](#_Toc686961704) 37

**[5.4.1](#_Toc686961705)** [渗透剂对](#_Toc686961705)**[Pb2+](#_Toc686961705)**[诱导的](#_Toc686961705)**[ESAK](#_Toc686961705)**[失活的影响](#_Toc686961705) 37

**[5.4.2](#_Toc686961706)** [渗透剂对](#_Toc686961706)**[Pb2+](#_Toc686961706)**[介导的](#_Toc686961706)**[ESAK](#_Toc686961706)**[聚沉的影响](#_Toc686961706) 38

**[5.5](#_Toc686961707)** [讨论](#_Toc686961707) 38

[第](#_Toc686961708)**[6](#_Toc686961708)**[章 总结](#_Toc686961708) 39

**[6.1](#_Toc686961709)** [总结](#_Toc686961709) 39

**[6.2](#_Toc686961710)** [本文不足及愿望](#_Toc686961710) 39

[参考文献](#_Toc686961711) 39

[攻读硕士学位期间发表的学术成果](#_Toc686961712) 44

VII

# 英文缩略词

**ATP** **Adenosine diphosphate** **三磷酸腺苷**

**ADP** Adenosine **triphosphate** **二磷酸腺苷**

**ESAK** ***Euphausia superba* arginine kinase** **南极磷虾精氨酸激酶**

**DMSO** **Dimethyl sulfoxide** **二甲基亚砜**

**PAGE** **Polyacrylamide gel electrophoresis** **聚丙烯酰胺凝胶电泳**

**PMSF** **Phenylmethanesulfonyl fluoride** **苯甲基磺酰氟**

**SDS** Sodium **dodecyl sulfate** **十二烷基磺酸钠 *IC*50** **half maximal inhibitory concentration** of **a substance** **半数抑制浓度常数 *K*m** **Michaelis constant** **米氏常数**

***K*i** **inhibition constant** **抑制常数**

***V*max** Maximum **velocity** **最大反应速度**

**EDTA** **Disodium ethylenediaminetetracetate** **乙二胺四乙酸**

VIII

# 第1章 引言

## **1.1** 南极磷虾的研究意义

### **1.1.1** 南极磷虾简介

南极磷虾（*Euphausia superba*）是地球上多细胞生物中生物量最大、繁衍最成功的物种之一，是南大洋生态系统中能量和物质流动的关键环节，由于其巨大的蕴藏量，也是一种非常重要的渔业资源[1]。

南极磷虾在外型上与我们熟悉的对虾等甲壳动物相似，但个体比较小，体长一般为3~5 cm，体重2 g左右，属于浮游动物。南极磷虾由头胸部和腹部构成，头胸部外有头胸甲，有一对触角和六对胸足，腹部七节，五对腹足。外表金黄色，鳃外露，体内有微型的球状发光器，夜里可发出蓝绿色磷光，黑色复眼大而突出，消化道呈现草绿色[2]。南极磷虾蕴藏量巨大，现有蕴藏量4~6亿吨且繁殖力极强，是一种重要的渔业资源。

南极磷虾在南大洋生态系统的能量和物质流动中有重要作用，南大洋生态系统中的企鹅、海豹、鲸鱼、以及鱼类和乌贼等许多生物都直接或间接地食用南极磷虾，如果南极磷虾资源遭到破坏，南大洋生态系统的能量和物质流动将难以为继。

南极磷虾对南大洋的恶劣环境适应性很强。南极的冬季黑暗、漫长、寒冷，浮游植物难以生长，南极磷虾在漫长的冬季难以获得必需的饵料，而南极磷虾体内的脂类含量又非常少，这种情况下南极磷虾可以依靠消耗体内特定的蛋白质生存下来，生殖系统等一些较次要的器官会被消耗掉，身体出现负生长[3]。

### **1.1.2** 南极磷虾营养价值

南极磷虾具有很高的营养价值和经济价值，不仅蕴藏量巨大，而且用途广泛，包括鱼类饵料、人类食品、南极磷虾油和治疗心脏病的药物等。

南极磷虾是加工饲料的优质原料，目前大部分捕捞的南极磷虾用于鱼类的饵料。除具有较高的食用价值之外，还可提取虾油，南极磷虾油含有极为丰富的人类所必需的不饱和脂肪酸Omega-3，能提高人类免疫力、增强骨质、减低心血管疾病的发病率，是人类脑部健全发育的必须物质[3]。南极磷虾还含有有高抗氧化性的虾红素[2]。而且南极海域远离大陆，南极磷虾污染相对较少，是一种纯天然

1

的绿色食品库。

南极磷虾矿物质含量丰富，特别是微量元素硒的含量极高，对人体具有保健作用。南极磷虾中的蛋白酶，能够加快伤口的愈合，具有潜在的医学价值[4]。南极磷虾体内天然的紫外屏障物质还可以用于防晒化妆品，具有广阔的市场。

### **1.1.3** 南极磷虾开发研究现状

由于南极磷虾在南极生态圈中的关键地位，及其丰富的营养价值和巨大的经济价值，因此南极磷虾既有理论研究意义又有商业开发价值，目前已有20多个国家正在加紧研究磷虾食品[5]。

在南极磷虾商业开发过程中，由于磷虾体内含有大量的活性酶，打捞上来不到两个小时的时间内就会肉质变软，甲壳发黑[4]，影响开发价值，因此一般都要就地加工成稳定的食品再运到大陆，这样对南极磷虾进行商业开发就需要较高的技术要求和资金成本。

由于南极磷虾个体较小，含水量高，脱壳困难且外壳中氟含量是海水中的

5000倍以上，在南极磷虾被捕捞后如果不能快速脱壳其外壳中的氟会快速渗透到肌肉等其他部位，影响南极磷虾的营养价值和经济价值[6]。

由于复杂的工艺、技术和资金要求，目前南极磷虾的捕捞加工主要集中在挪威、日本、韩国和俄罗斯等少数几个国家[3]，日本、俄罗斯和波兰等国家都在积极努力的开展船上保鲜和加工方法的研究并取得了一些进展。我国的南极磷虾开发利用尚处于起步阶段，主要原因在于没有掌握完善的大批量南极磷虾快速冷冻脱壳技术。

现价段对南极磷虾的研究主要集中于对南极磷虾体内自溶酶的研究[4]和对南极磷虾体内多不饱和脂肪酸的研究[7, 8]等，但是对南极磷虾体内能量代谢和贮存的研究并不多见，对南极磷虾体内的能量代谢和贮存的研究有助于深入了解南极磷虾适应寒冷环境的机理，具有重要意义。

另外，研究如何有效抑制南极磷虾体内大量的活性酶，延长磷虾的保鲜时间，从而降低技术要求和生产成本，对于南极磷虾的广泛开发利用具有重要意义。

## **1.2** 精氨酸激酶的研究意义

### **1.2.1** 精氨酸激酶简介

精氨酸激酶（Arginine kinase, AK, EC 2.7.3.3）是一种磷酸原激酶，是调节

2

无脊椎动物能量代谢的重要酶，对无脊椎动物体内能量代谢、贮存和利用起到重要作用，广泛存在于多种无脊椎动物体内。AK的作用是催化下列可逆反应：



即将ATP上的高能磷酸基团转移到精氨酸形成具有高能磷酸键的磷酸精氨酸贮存起来，或者将磷酸精氨酸中储存的高能磷酸键转移给ADP生成ATP供生物体直接利用。

无脊椎动物体内的精氨酸激酶基本功能相同，都能催化同样的高能磷酸键转移反应，但是酶的结构和分子量大小存在着较大差异。AK按照其亚基数目和分子量大小分为：单亚基AK—有360~380个左右的氨基酸残基组成，分子量大约在40 KDa左右[9, 10]；双亚基AK—与脊椎动物的肌酸激酶结构类似，有两个亚基组成，其分子量大约在80 KDa左右[11, 12]；四亚基AK—主要在环节动物体内发现的AK，有四个亚基组成，是分子量在150-160 KDa[13]。其中，水产生物中存在较多的是单亚基AK，例如目前养殖规模和效益较大的的滨蟹、青蟹[14, 15]、中华绒螯蟹[16]、龙虾、斑节对虾[17, 18]、中国明对虾以及凡纳滨对虾[19]等物种的精氨酸激酶都是单亚基的，并且本实验已得到南极磷虾精氨酸激酶（ESAK）的

cDNA序列，初步证实南极磷虾体内也是单亚基AK。

### **1.2.2** 精氨酸激酶结构与功能研究

1998年，zhou等人利用来自于马蹄蟹*Limulus*的单亚基AK解析出结合有底物类似物的过渡态AK晶体结构（分辨率1.86Å）。结果显示，单亚基AK由两个结构域组成：一个小的α-螺旋组成的N端结构域（约含100个氨基酸残基）和一个大的C端结构域（约含250个氨基酸残基），底物类似物结合在C端结构域内部，即AK的活性部位是在C端，且C端有两个小区域，底物ATP和精氨酸就结合在这两个小区域之间[20]。单亚基AK由8股反向平行的β-折叠构成疏水区域，几个α-螺旋在外侧行成亲水区域。

AK分子处于开放状态时，没有与底物分子结合，活性部位是张开的，存在一个很强的正电荷区域，容易与带负电荷的ATP磷酸基团结合[20]，ATP与AK结合后会改变AK活性部位的构象和电荷分布，使AK容易与底物精氨酸结合从而催化反应，这种现象非常符合诱导契合学说。

在对AK的催化活性研究过程中，人们很早就注意到活性部位中的Cys的活性巯基是精氨酸激酶的必须基团，通过化学修饰法和酸碱滴定法得到的结果都表明Cys是活力必需的氨基酸残基。Gattis等用定点突变的方法对螃蟹精氨酸激酶

3

中的Cys271进行了研究，认为Cys的活性巯基对提高酶催化效率的作用主要通过稳定催化过程中的过渡态中间物[21]。

精氨酸激酶在无脊椎动物的能量代谢、贮存和利用中具有重要作用，肌肉组织中存在着丰富的磷酸精氨酸和精氨酸激酶。Wallimann等概括了磷酸原及磷酸原激酶的生物功能：具有能量暂时缓冲作用；具有空间能量缓冲作用；可提高氧化磷酸化效率[22]。当生物体消耗的ATP少于线粒体生成的ATP量时，精氨酸激酶将能量存储在磷酸精氨酸的高能磷酸键中，而当生物体消耗的ATP量超过线粒体产生的ATP量时，由精氨酸激酶催化磷酸精氨酸形成ATP，补偿能量消耗缓冲ATP浓度的剧烈变化；能量的空间缓冲是指心肌细胞等的线粒体精氨酸激酶可将ATP转化成磷酸精氨酸，运送到细胞质后，在精氨酸激酶的催化下，重新形成ATP[23]；研究结果还显示，线粒体精氨酸激酶可以通过保持较低ATP浓度以提高氧化磷酸化效率。另外，精氨酸激酶还参与糖原的分解调节。

无脊椎动物体内，精氨酸激酶在高耗能的组织如脑、神经和肾脏中也有大量的表达，主要用于离子运输、突触传递等。此外，生殖细胞精子的运动、消化道内上皮细胞绒毛小突的收缩，同样受精氨酸激酶的调控[24]。细胞分裂后期的微管蛋白驱使纺锤体移动所需的ATP也与精氨酸激酶相关。

Schneider等1989年证明精氨酸激酶和磷酸精氨酸在蝗虫腿肌中起暂时能量缓冲库的中作用，有些精氨酸激酶与肌动蛋白结合，与动物运动有密切关系[24]。

Wang等研究了蝗虫胚胎发育过程中精氨酸激酶的表达与分布，提出精氨酸激酶与肌动蛋白参与的运动有密切关系[25]。

由上述可见，精氨酸激酶作为无脊椎动物体内的能量代谢关键酶，对生物能代谢、贮存和利用发挥至关重要的作用，更与无脊椎动物的生长、发育、运动和繁殖等各项生命活动息息相关。

### **1.2.3** 金属离子对精氨酸激酶的作用研究

大量研究表明，溶液中各种无机离子对AK影响不同，尤其是金属离子。二价镁离子是催化反应所不可或缺的，有报道Mg2+对于使AK保持一定的构象是必须的[26]。重金属离子对AK活性有着不同程度的抑制，Du等[27]在2003年通过实验证明Zn2+的存在时精氨酸激酶和其中间过渡态失活，另外有关Ag+、Cu2+等离子对AK的抑制分析都有过报道[28, 29]。Wright等也报道过金属离子Mn2+、

Mg2+、Co2+、Ca2+、Sn2+、Fe2+存在时，龙虾*H. vulgarus AK*的催化反应活力依次降低[30]。

4

### **1.2.4** 精氨酸激酶研究对南极磷虾开发的意义

生物体内物质代谢的过程中常常伴随着能量获得和贮存，在形式上就表现为

ATP的生成或者ATP的消耗。在生物体内蛋白质的代谢中有两种较为普遍的机制，一种是溶酶体机制，它对蛋白质的降解是没有特异性的降解的过程也不需要耗能，还有一种是具有特异性的，例如泛素—蛋白酶体，南极磷虾体内的活性酶可以在饵料不足的时候降解消化体内特定的组织例如生殖器官等为机体提供生存必需能量[1]。南极磷虾被捕捞后体内大量活性酶催化反应过程中极可能也需要

ATP的参与，而此时南极磷虾体内代谢停止，没有办法通过生物氧化获得大量的

ATP，磷酸精氨酸作为无脊椎动物体内贮存的磷酸原就显得尤为重要[9]。对催化磷酸精氨酸转移磷酸基给ADP生成ATP的精氨酸激酶进行研究有助于找到抑制南极磷虾体内活性酶的方法，有助于磷虾的捕捞和保鲜，对南极磷虾的商业开发具有积极意义。

## **1.3** 蛋白质变性与聚沉

### **1.3.1** 蛋白质聚沉研究意义

蛋白质是一切生命活动存在的物质基础和形式，同时也是诊断疾病、治疗疾病的物质基础[31]，而且由于蛋白质的可变性和多样性导致了蛋白质研究技术远比核酸技术要复杂和困难的多，蛋白质构成了后基因组时代最重要的研究内容，具有无限广阔的前景。

目前酶可以从生物体内提取，如从菠萝皮中可提取菠萝蛋白酶[32]，但由于酶在生物体内的含量很低，它不能适应工业生产和医药上的需要。工业上大量应用的酶是采用微生物发酵来制取的[33, 34]。在适宜的条件下，通过基因工程获得所需的菌种，对其进行培养表达，然后分离纯化获得大量的酶制剂[35]。

在微生物和细胞的培养过程中，可能存在多种沉淀：表达过程中大量蛋白质超表达导致的细胞内沉淀；帮助蛋白质正确折叠的分子伴侣的缺失或对新生肽的低效识别引起的的包涵体沉淀[36]；培养基环境条件（pH、温度、离子浓度、生长基质养分等）诱导目标蛋白质而引发的沉淀等[37]。因此了解蛋白质聚沉机理，选择合适的表达体系和培养条件对于减少聚沉、提高酶制剂产量和纯度、降低生产成本、增大经济效益有重要作用[38]。

蛋白质二硫键的形成是在细胞内质网上进行的[39]，正确二硫键的形成，对折叠为蛋白质的天然结构很关键，而往往二硫键的形成需要氧化环境。如果生长

5

基质成分选择不适当，使得培养过程缺少氧化环境，半胱氨酸上的自由巯基也许保留非配对，导致不正确的折叠，影响蛋白质折叠到天然结构的能力，并且自由巯基的存在也许还会影响蛋白质的长期稳定性[40]。

目标蛋白质从培养体系中表达出以后，必须及时将其深入纯化，去除相关杂质和杂蛋白，得到更高纯度的蛋白。纯化技术主要针对目的蛋白质与杂质之间的亲和性、带电性、大小和其他特性的区别来提高纯度[41, 42]。

蛋白质纯化过程中的条件包括pH、离子强度和蛋白质浓度等。而这些条件都可能会引起蛋白质的聚沉，影响目标蛋白质的活性与功能[43, 44, 45]。因此深入研究蛋白质聚沉机理，研究pH、离子强度等对蛋白质聚沉的影响，有助于选择合适的纯化技术和纯化条件以减少聚沉、提高纯化效果、增加产量[46]。

蛋白质聚沉和淀粉样中间体的形成与包括几种精神退化疾病在内的很多疾病相关，某些特定疾病就是由于形成了不溶的蛋白质聚合体的缘故[47]。蛋白质聚沉是蛋白质错误折叠、组装和转运的结果，是由细胞环境变化和蛋白质突变引起的。例如，在镰刀细胞疾病患者体内，微血管的去氧环境使镰刀状血红蛋白多聚化形成纤维状，导致红细胞镰刀状[48]；在老年痴呆症中，中枢神经系统的β-淀粉样斑包含血小板是与神经退化和贫血相关的[49, 50]；朊蛋白疾病与牛海绵状脑病是与朊病毒蛋白（PrP）的淀粉样沉淀有关[51, 52]；多聚谷氨酰胺（polyQ）疾病（如Huntington疾病）同样与神经细胞液和核内的包涵体有关[52]。

淀粉样斑（amyloid）首先由Virchow于1853年提出的，用于解释蜡状的、嗜酸性的组织沉淀[53, 54]，Friedrich和Kekule确立它是由蛋白质构成的[55]。1959年，由EM实验表明，它是纤维状沉淀而成[56]。1970年，Glenner和同事纯化了淀粉样斑纤维[57]，确定淀粉样变性是由不溶性的淀粉样蛋白沉积在组织器官引起的，而淀粉样蛋白石正常细胞的代谢产物，是由淀粉样蛋白前体突变产生的[58]，淀粉样斑纤维含有β-折叠结构[59]。淀粉样斑不是仅有单个疾病引起的，许多疾病都会产生β-折叠蛋白质沉淀。

体外实验显示，淀粉样斑态是多数蛋白质的一个非常稳定的构象态，在热力学上比天然态更稳定。虽然淀粉样斑的各种蛋白质并保守的的氨基酸序列，也没有相同的三级结构特征，但所有的淀粉样斑纤维中都有相同的交叉β-折叠构象

[60]. 体外实验显示，暴露在对应的部分变性条件下，多数蛋白质都会转为淀粉

样斑态[61, 62]。甚至全由α-螺旋组成的蛋白如脱辅基肌红蛋白在pH 9.0和65℃的条件下都以可形成淀粉样纤维[63]。

6

在生物体内这种非常稳定的无功能构象态是要避免出现的，Dobson和其他科学家已经解释，进化过程已经选择了那些能抵抗形成淀粉样斑的氨基酸残基和序列，许多蛋白质序列已经进化，拥有非常高的动力学能垒，达到抑制形成淀粉样斑的势能[64, 65]。在正常细胞中，在天然态和淀粉样斑变性中间态之间的能垒可能非常高，可以有效防止淀粉样斑的形成。

了解聚沉增加和淀粉样蛋白纤维形成的条件，对于治疗淀粉样斑类疾病具有积极意义。在病理条件下，淀粉样蛋白聚沉和纤维化受温度、pH、离子强度、蛋白质浓度的调节。这些条件影响蛋白质去折叠和在体内淀粉样斑形成的分子构象变化。细胞环境（如疏水性、pH、离子、蛋白质浓度、带正电荷的金属离子、氧化环境等）的变化决定了包括可溶蛋白质形成纤维聚合和聚沉的结构构象的变化[52]。解释淀粉样斑的聚合和聚沉机理，对于了解神经衰退疾病，研究这类疾病病理具有重要作用。

体内抑制蛋白质聚沉的物质主要包括包括细胞液因子（如热激蛋白、载脂蛋

E、1-抗凝乳蛋白酶、尼古丁等）、外源因子（如四环素）、配体和抗生素（如突变肽、突变蛋白质）等。

在体外，Muchowski等发现，Hsp 70和Hsp 40抑制亨丁顿蛋白(Huntingtin)的装配[66]。Tjernberg等报道，在AβP中加入AβP配体，可以减少聚沉。两个单抗AMY-33和6F/3D，可以抑制AβP的聚沉[67]。除了分子伴侣，还有其它的聚沉抑制试剂，如化学伴侣[68]，合成或重组的多肽[69, 70]，胞内抗体[71, 72]和某些化合物[73]。

蛋白质折叠的研究可以追溯到十九世纪二十年代，1961年，Anfinsen提出

“蛋白质折叠的信息包含在氨基酸顺序中”，即蛋白质的一级结构决定高级结构著名的假说[74]。蛋白质聚沉是蛋白质错误折叠，组装和转运的结果，是细胞环境变化和蛋白质突变引起的。带正电荷的金属离子可以诱导蛋白质空间构象的改变，破坏疏水作用力，改变蛋白质的微环境，使蛋白质的三级结构的紧密性丧失，引起蛋白质生物活性的丧失以致产生错误的折叠致使蛋白质聚沉。

近年来的研究发现，许多疾病是由蛋白质错误折叠引起的。1997年诺贝尔奖获得者Prusiner提出Prion在一级结构不改变的情况下出现不同的折叠方式而引起有关疾病[75]，初步解释了诸如疯牛病、老年痴呆症等一系列神经性疾病的原因。细胞可以通过降解机制来调节这些错误折叠的和非正常功能的具有聚沉倾向的蛋白质。然而在这个过程中，一些具有聚沉倾向的蛋白质中间体能够通过变

7

化的负电荷细胞膜通道，聚合并形成β-折叠，变化的金属离子在这种非内在通道的形成和功能中起重要的作用。已有报道环境条件的变化如金属离子浓度的改变能促进几个淀粉样斑的自组装（铁、铜和锌等），因此对蛋白质聚沉进行抑制研究，了解其抑制机理，寻找可以抑制这些倾向性聚沉的保护剂在医学上具有重大的理论和应用意义。

### **1.3.2** 蛋白质聚沉机理研究

作为具有生物学功能的大分子物质，特定的氨基酸序列以及特定的空间构象是蛋白质发挥生物学功能的基础。目前的科研水平可以很容易的测定出蛋白质的一级结构（氨基酸残基的排列顺序），但对于这些氨基酸序列是如何形成特定的空间构象还没有很好的解释。蛋白质折叠的主要问题就是氨基酸序列与空间构象

（高级结构）的关系。

蛋白质聚沉[76, 77]是指由于金属离子、温度、蛋白质浓度等因素使得蛋白质空间结构发生改变，内层的疏水基团外露，改变分子表面的极性从而使蛋白质间由于疏水作用而相互聚集在一起．分子量增大产生聚沉物的现象，蛋白质聚沉是蛋白质错误折叠，组装和转运的结果，是由细胞环境变化和蛋白质突变引起的[78,

79]。

蛋白质聚沉可能有几种不同的机制，也有不同的分类标准，例如可分为共价和非共价聚沉、可逆和不可逆聚沉、可溶和不溶聚沉以及天然和变性聚沉。过去通常认为，变性是蛋白质聚沉的先决条件，在变性下，疏水表面的暴露导致水化膜的破坏，水溶液中蛋白质的疏水区域相互聚合，这种相互作用在许多蛋白质中导致聚合物形成，引起严重的沉淀。然而，天然蛋白质自身相互结合作用最近越来越受到关注，蛋白质结构的微扰也能暴露疏水表面，引起聚沉[80, 81]。

除许多种相互作用可导致蛋白质聚沉外，许多环境因素也会导致聚沉[82]：溶液条件（温度、蛋白质浓度、pH和离子强度等）也会影响观察到的聚合物的量；特定配体的存在（包括特定的离子），也许能增强聚合[33]；蛋白质的外在压力也可能会导致表面变性，引起聚沉；机械压力也会导致蛋白质聚沉。在蛋白质生产合成过程中，蛋白质暴露在许多环境因素下，这些因素都可能造成蛋白质的聚沉。

大分子蛋白质在折叠过程中可能会出现一个或者一系列的折叠中间体状态，这些中间体状态是部分折叠的一种状态，富含二级结构、部分疏水表面暴露、侧链呈相对松散状态[79]。研究表明，折叠中间体可能有助于引导蛋白质折叠的正确途径，对蛋白质折叠中间体的捕捉和鉴定也成为蛋白质折叠和去折叠研究中的

8

一种重要手段。

在大分子蛋白质的折叠过程中存在部分折叠中间态，这些折叠中间态也许是必须的，折叠蛋白质必须通过这些构象达到天然态。然而，当这些构象中间体浓度很高时，中间体相互作用就容易形成聚合体，这表示，大分子蛋白质在达到天然态之前可能存在着动力学上的障碍[83]。许多150个氨基酸以上的蛋白质从变性的聚合体再折叠为天然态比较困难，说明对大分子蛋白质而言，从折叠中间体达到聚合体的过程不是完全可逆的。

聚合体形成模型的早期证据来自Michel Goldberg等的实验。蛋白质用8M尿素变性后，用缓冲液稀释，再折叠的天然态有功能蛋白质及变性的无活性聚合体都形成了[62]。Rainer Jaenicke等对猪四聚体乳糖脱氢酶进行再折叠和聚沉研究，揭示了相似的蛋白质浓度依赖的聚沉行为[84]。使用远紫外CD光谱检测表明，聚合体与天然蛋白质的α-螺旋和β-折叠含量相似，表现出显著的天然态类似的二级结构，表明单体的折叠中间态可能引起聚合[84]。

磷酸甘油激酶（PGK）和牛生长因子（bGH）的体外再折叠研究，为结构介导聚沉提供了重要的信息，体外的酰基磷酸酶折叠研究也表明，蛋白质的不同结构区域决定了折叠成天然态还是折叠为变性的中间体[85]。在bGH的再折叠过程中，一些聚合的中间体拥有天然态的二级结构，但缺失天然态所必需的三级结构[86]。加入bGH的特定的氨基片断（氨基酸96-133）就能阻止聚沉，可能是由于该片段可以与bGH的中间折叠体的疏水表面结合，阻止了中间折叠体间的相互聚合，从而阻止了聚沉。

在磷酸甘油激酶（PGK）的体外再折叠实验中，聚沉有一个快相和一个浓度依赖的慢相。这个快相可能对应于中间折叠体的形成，而慢相能在低温下被抑制

[87]. PGK聚合体缺少天然单体PGK表面的大量α-螺旋并暴露出疏水的β-折叠，因此推测，中间折叠体的疏水区域β-折叠相互作用可能是形成聚合PGK的主要作用力[88]。

150个氨基酸以内的部分蛋白质聚合基本可逆，能够从变性状经稀释有效再折叠为天然状，表现为两相动力学，在去折叠和天然态间转变通常只需几秒或更少的时间，因为时间不长，虽然在某些位点有多种选择但是去折叠的蛋白质更倾向于转化为天然态[89]。在蛋白质的折叠过程中，既可以先快速形成二级结构然后再形成三级结构也可以二级结构形成的同时进行三级折叠形成疏水区等活性中心。David Baker等人研究发现，连续的氨基酸序列在三维折叠过程中比那些

9

形成区间结构、相隔较远的序列速度更快[90]。

150个以上的氨基酸残基组成的大分子蛋白质的折叠过程比较复杂，在折叠过程中可能由天然态折叠中间体形成变性的淀粉样中间体，继而变性中间体发生聚合形成纤维状蛋白，这样的聚沉过程就不完全可逆，聚合物不能完全恢复成天然单体。King等创建了温度敏感折叠突变体，发现在蛋白折叠过程中温度可能引发非天然中间体的产生，引发聚沉[91]。在高温下，新合成的尾次蛋白起初可溶，但是他们随即组合，形成特定的包涵体；在允许的低温下，新合成的尾刺蛋白仍保持可溶，装配成天然有功能三聚体；高温下的包涵体缓慢降低温度后也可以装配形成天然三聚体；但由温度敏感折叠突变体组成的包涵体低温下不能恢复为可溶的成分，也不能成为天然的三聚体[92]。尾次蛋白的晶体结构显示，由温度引导的淀粉样中间体，与天然折叠中间体构象同时出现[92]。

David Eisenberg等通过比较白喉毒素的天然单体和酸性诱导的双体的晶体结构，也有重要的聚合过程的启示[93]。白喉毒素的天然单体的三个结构域之一的受体结合区重新排列，受体结合区与其它两个结构区的非共价结合被打断。

与包涵体形成沉淀一样，非天然单体中间体的形成在聚沉形成中可能起关键作用[94]。非天然单体中间体（淀粉样斑）有聚合形成形成蛋白质纤维的趋势，而晶核的形成是一些淀粉样斑转化成蛋白纤维的关键步骤。晶核的形成是热力学控制的，一旦晶核形成，淀粉样斑中间体能迅速多聚化形成纤维。Lundberg等用电子显微镜和电子旋转共振显示三种相关的物质：单体肽、淀粉样斑和变形聚合体。他们提出一个模型，变形聚合体释放单体，提供淀粉样斑纤维形成的起点，聚沉起始于晶核的形成[95]。

### **1.3.3** 金属离子在蛋白质聚沉中的作用研究进展

金属离子改变蛋白质构象、介导蛋白质聚沉在酶的生物学功能上首先表征为对酶活性的抑制作用，林建成等对南美白对虾N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的研究指出，钠、钾等细胞内常见的正一价金属离子对NAGase没有显著影响；镁、钙、钡等有微弱的激活作用；重金属离子对酶一般都有较明显的抑制作用，它们能使酶变性失活，空间结构改变，产生可见的聚沉[96]。

锌离子通过诱导构象变化来诱使特定蛋白聚合。Huang等发现，在体外病理锌离子的浓度下，AβP（β-Amylord protein）快速聚沉[97]。锌离子诱导的AβP（1-40）聚沉是肽双体介导的，它促进α-螺旋生成和β-折叠减少，会引起聚沉。由锌离子诱导的聚沉可以被螯合剂逆转，这暗示在锌介导中，肽的构象可能被维持[97]。

10

Brown等研究表明锌离子的作用也许是选择性的，脑脊髓液体中锌离子选择性诱导可溶的APP和内源AβP的聚沉[98]。

钙离子也可以增加某些特定蛋白的聚合。Billestrup等使用电镜和免疫电泳等技术，发现钙离子可以增加血清内特定蛋白的聚合，而这种增加可以被肝素和肝素硫酸盐等配体所抑制[99]。

除了锌离子和钙离子外，三价的铝离子也证实可以改变特定蛋白的结构，增加聚沉。在体内外实验中，Shin等研究了三价的铝离子对AD的蛋白质修饰[100]。

Exley等揭示了铝离子也诱导AβP（25-35）肽的聚沉[101]。

## **1.4** 本论文主要研究工作和意义

1. 南极磷虾精氨酸激酶（ESAK）的分离纯化：应用硫酸铵分级沉淀、分子筛凝胶过滤、亲和层析等生物化学的方法，从南极磷虾肌肉组织中分离纯化精氨酸激酶，并对酶纯化结果进行检验，为金属离子对ESAK作用提供原料。

2. Pb2+对ESAK的聚沉和抑制分析：分析测定常见的二价金属离子对ESAK功能影响，并用酶活测定、时间动力学分析、内源荧光、ANS结合荧光和可见光浊度扫描等方法研究Pb2+对ESAK的聚沉和抑制，研究分析Pb2+对ESAK的具体作用机理，以期寻找生物体Pb2+中毒的解救方法。

3. Zn2+对ESAK的聚沉和抑制分析：用酶活检测、时间动力学分析、内源荧光、ANS结合荧光、圆二色光谱和可见光浊度扫描等手段对ESAK在不同浓度的Zn2+条件下的聚沉和变性情况，研究Zn2+对ESAK空间结构的影响和抑制机理。

4. 研究渗透剂对两种金属离子介导的ESAK聚沉和抑制的保护作用：用酶活检测、内源荧光、ANS结合荧光和可见光浊度扫描等方法研究渗透剂对ESAK聚沉和抑制的恢复作用，研究小分子渗透剂在ESAK结构稳定和蛋白质聚沉中的作用。

11

# **第2章** **ESAK**的分离纯化

本论文实验中所用的ESAK都是直接从南极磷虾肌肉中提取的，所得ESAK酶已经过SDS-PAGE和质谱检测，纯度较高，符合光谱要求。ESAK的提取方法参照France等人[102]的工作，并进行部分改进，通过硫酸铵分级沉淀、分子筛凝胶层析、亲和层析等方法步骤，从南极磷虾肌肉中成功分离纯化ESAK，应用SDS-PAGE检测纯度，并计算提取过程得率。

## **2.1** 实验材料与仪器

### **2.1.1** 材料和试剂

南极磷虾（*Euphausia Superba*）从市场常用钓鱼饵料和养殖饲料采购，保存于-40℃，每次提取前用冰水混合物化冰，剥去外壳，除去头部和尾部，留腹部肌肉待用。

Tris，PMSF，ATP，ANS，考马斯亮蓝R-250购自Sigma, 其他试剂均为国产分析纯。层析柱用的填料SuperdexTM 75 prep grade和Blue sepharoseTM 6 Fast

Flow购自GE Healthcare。

### **2.1.2** 溶液的配制

（1）ESAK测活底物配制

**表 2.1** **测活底物的配方(20 ml)**

Table 2.1 Composition of substrates for ESAK (20 ml)

| 成分 | 含量 |
| --- | --- |
| 57 mM 精氨酸溶液 | 2ml |
| 66 mM 乙酸镁溶液 | 2ml |
| 0.15%百里香酚蓝+0.025%甲酚红 | 2ml |
| ATP | 55.1 mg |
| dH2O | 14ml |

（2）ESAK分离纯化中用到的Buffer配制

12

**表 2.2** **缓冲液配方**

Table 2.2 Composition of Buffer

| Buffer 名称 | 成分 | 浓度 |
| --- | --- | --- |
| Buffer A (pH 8.0) | Tris-HAc | 0.05 M |
|  | EDTA | 0.1 mM |
|  | PMSF | 0.25 mM |
| Buffer A' (pH 8.0) | Tris-HAc | 0.05 M |
|  | PMSF | 0.25 mM |
| Buffer B (pH 8.0) | Tris-HAc | 0.05 M |
|  | KCl | 1.5 M |
|  | PMSF | 0.25 mM |
| 透析 Buffer C (pH 8.0) | Tris-HAc | 0.05 M |
|  | PMSF | 0.25 mM |
| 透析 Buffer C' (pH 7.0) | Tris-HAc | 0.05 M |
|  | PMSF | 0.25 mM |
| 分离胶缓冲液 (pH 8.8) | Tris-HCl | 1.5 M |
| 浓缩胶缓冲液 (pH 6.8) | Tris-HCl | 0.5 M |
| 电泳缓冲液 (5×) | Tris | 9 g/600 ml |
|  | SDS | 30 g/600 ml |
|  | 甘氨酸 | 43.2 g/600 ml |
| 上样缓冲液 (5×) | 1 M Tris-HCl (pH 8.8) | 0.6 ml/10 ml |
|  | 10% SDS | 2 ml/10 ml |
|  | 50%甘油 | 5 ml/10 ml |
|  | Β-巯基乙醇 | 0.5 ml/10 ml |
|  | 1%溴酚蓝 | 1 ml/10ml |

（3）SDS-PAGE凝胶相关溶液配制

13

**表 2.3** **SDS-PAGE凝胶配方**

Table 2.3 Composition of SDS-PAGE

| 溶液 | 12%分离胶 (10 ml) | 5%浓缩胶 (5 ml) |
| --- | --- | --- |
| 分离胶缓冲液 | 4.0 ml | 0 ml |
| 浓缩胶缓冲液 | 0 ml | 0.63 ml |
| 30%丙烯酰胺溶液 | 2.5 ml | 0.83 ml |
| 10%过硫酸铵溶液 | 0.1 ml | 0.1 ml |
| 10%SDS 溶液 | 0.1 ml | 0.1 ml |
| dH2O | 3.3 ml | 3.4 ml |
| TEMED | 6 μl | 5 μl |

染色液：50% (v/v)乙醇，7.5% (v/v)冰乙酸，0.4%考马斯亮蓝。脱色液：5% (v/v) 乙醇，7.5% (v/v) 冰乙酸。

### **2.1.3** 实验仪器设备

**表2.4** **实验仪器设备**

Table 2.4 Experimental instruments and equipment

| 仪器名称 | 生产厂家 | 型号 |
| --- | --- | --- |
| 高速组织捣碎机 | 上海标本模型厂 | DS-1 |
| 高速冷冻离心机 | 上海卢湘仪离心机仪器有限公司 | GL-25M |
| 蛋白质纯化系统 | GE Healthcare | AKTAprime |
| 电热恒温鼓风干燥箱 | 上海贺德实验设备有限公司 | DHG-9140A |
| 电泳仪 | 北京百晶生物技术有限公司 | BG-POWER 300 |
| 电子天平 | 赛多利斯科学仪器有限公司 | BSD224S-CW |
| 数显恒温水浴锅 | 金坛市华龙实验仪器厂 | DK-8D |
| 分光光度计 | Shimadzu | UV-1800 |
| 荧光分光光度计 | Hitachi | F-4600 |
| 制冷加热循环仪 | 北京莱伯泰科仪器有限公司 | RH25-6A |
| 层析柜 | 北京德天佑科技 | YC-1 |

14

## **2.2** 实验方法

### **2.2.1** **ESAK**的分离纯化

（1）从-40℃取出南极磷虾，放入冰水中化冻，剥去外壳，去除头部和尾部，留腹部的肌肉，取腹肌10 g，加入20~30 ml预冷的Buffer A，多次高速匀浆，破碎细胞膜，使ESAK从细胞内释放到缓冲液中；4℃, 10000 rpm高速冷冻离心15

min, 取上清液弃沉淀，测酶活。

（2）上步离心所得上清液中加入(NH4) 2SO4至30%饱和，冰浴中均匀搅拌30 min, 然后4℃, 12000 rpm离心15 min, 取上清液，测酶活；继续向上清液中缓慢加入(NH4) 2SO4至55%饱和，冰浴中搅拌30 min, 放入高速冷冻离心机中-2℃, 12000 rpm高速离心15min，轻轻取出漂浮于液面的沉淀。用5~10 ml Buffer A'溶解沉淀，搅拌30 min然后再次4℃, 12000 rpm离心，取上清液，测酶活。

（3）将上步所得所得酶液用SuperdexTM 75 prep grade层析柱进行层析分离，用Buffer A'进行洗脱，洗脱速度为0.5 ml/min. 洗脱结束后，选择有紫外吸收峰的试管测量酶活，并用SDS-PAGE检测蛋白质的纯度。

（4）选取酶活较高的酶液合并，用Blue SepharoseTM 6 FF亲和柱分离。用Buffer B进行洗脱，洗脱速度为2 ml/min, 收集紫外吸收高的试管，测量酶活，SDS-PAGE电泳检测纯度。

（5）将纯度和活度较高的组分用透析Buffer C透析过夜用于酶活力测定和荧光分析实验，用Buffer C'透析过夜用于聚沉实验，透析后分装成1 ml小管于

-20℃冷冻保存。

### **2.2.2** **ESAK**的活力和纯度测定

ESAK酶活力测定按照Yu等[103]人提出的方法。配制测活底物，20℃保温，测活时取1 ml底物于塑料比色杯中，加入10μl酶液，迅速混合，测定一分钟内575 nm处OD减少值，再从[H+] -ΔA575标准曲线中求出反应生成的[H+]量就可以计算出ESAK的活性。测定是在温度20℃条件下进行的，因为在OD值1.2~2.0范围内，[H+]与OD基本为线性关系，可以近似用ΔOD表征酶活大小。

在ESAK分离纯化过程中，每经过一个流程，都要用SDS-PAGE及时检验洗脱成分的纯度。按照配方配制分离胶和浓缩胶，然后把胶板放在制胶架上，先加入分离胶，水封，等待30 min分离胶凝固后吸出胶封面的水后加入浓缩胶，插上梳子，等浓缩胶凝固后即制胶完成。蛋白上样前要先加热破坏掉蛋白的空间

15

结构，将酶与上样缓冲液按比例混合，放入100℃沸水中煮沸5 min, 将混合液滴入上样孔内，倒入电泳缓冲液，先用较低电压80~100 V电泳30 min，等样品泳完浓缩胶可用较大电压100~150 V电泳至显色剂到胶板的底部。把分离胶割出，放入染色液中染色1 h，用脱色液脱色过夜即可观察条带的亮度和集中度。

## **2.3** 实验结果

### **2.3.1** **ESAK**纯度检测

对ESAK纯化过程取得样品进行SDS-PAGE电泳，结果如图2.1所示，1为硫酸铵分级沉淀后的样品，2为Superdex凝胶层析后样品，3为Blue亲和层析后样品。从图中可以看出。ESAK的纯化效果较理想，但是由于南极磷虾生存环境和体内自溶酶的存在或者某些其他的原因，最后纯化得到两条很相近的带，分子量大约在37-38 KDa左右。推测可能是ESAK在不同组织中存在不同的亚型，或者由于纯化过程中ESAK某些基团被水解所致。



**图2.1** **ESAK分离各阶段SDS-PAGE电泳图**

**Fig.** **2.1** **SDS-PAGE of ESAK purification**

### **2.3.2** **ESAK**活力检测

匀浆离心后上清液体积为38 ml，测活斜率为3.452; 30%饱和硫酸铵沉淀后上清液体积为38.5 ml，测活斜率为3.163; 55%饱和硫酸铵沉淀溶解后上清液体积为8.8 ml，测活斜率为11.2；Superdex 75凝胶层析后收集酶液体积为35

ml，测活斜率为2.461；Blue Sepharose 6亲和层析后收集酶液体积为25 ml，测

16

活斜率为1.832.

**表2.5** **ESAK的提取得率**

**Table** **2.5** **The extraction yield of ESAK**

|  | 体积 (ml) | 表征活力 （ΔOD 斜率） | 总表征活力 |
| --- | --- | --- | --- |
| 匀浆上清 | 38 | 3.452 | 131.176 |
| 30%饱和 | 38.5 | 3.163 | 121.7755 |
| 55%饱和 | 8.8 | 11.2 | 98.56 |
| 凝胶层析 | 35 | 2.461 | 86.135 |
| 亲和层析 | 25 | 1.832 | 45.8 |

从上表中可以很清楚的看出，酶活主要损失在亲和层析过程中，一方面是因为上样时没有完全吸附或者吸附饱和致使一部分酶损失，另一部分是吸附特异性不够，洗脱的时候洗脱峰不够集中，一部分洗脱液活力太小无法使用。

## **2.4** 讨论

### **2.4.1** 温度对**ESAK**分离纯化的影响

因为南极磷虾生存在南极极端环境中，其体内的酶都与低温环境想适合，对温度极为敏感，且南极磷虾体内含有丰富的消解酶，可在南极磷虾死亡后的极短时间内将南极磷虾消解，而据多篇报道这种消解酶最适温度为40~45℃，在15℃以上就有较大活性，因此除了添加PMSF抑制蛋白酶活性外，分离纯化过程中的低温也尤为重要。

对多次分离纯化的结果进行比较发现，夏天温度较高的时候，即便非常注意低温，实验所用的试剂和器皿都进行低温预冷后，提取后的酶活仍然非常不理想，甚至于出现酶活基本丧失的情况。而在冬季等温度较低时候则较为理想，分离纯化较为容易且结果较为理想。

### **2.4.2** 盐度对**ESAK**酶活影响

在分离纯化过程中，两次使用高盐度—55%饱和硫酸铵沉淀和用1.5 M KCl洗脱。55%饱和硫酸铵沉淀后用Buffer A'溶解后，活力基本完全恢复；用1.5 M KCl洗脱所得洗脱液透析过夜去除盐度后酶活也基本没有变化，说明一定的盐度不能改变ESAK的酶活，即便是高盐度导致沉淀仍然没有改变ESAK的活性结构，而低一些的盐度对ESAK酶活影响更小。对比电泳图发现，没有添加硫酸铵时、

17

30%饱和硫酸铵时和55%饱和硫酸铵时条带数量和集中度相差均不大，分析可能是因为南极磷虾体内蛋白含量丰富，且大部分蛋白在30%~55%范围内不能被分离出。

18

## 3.1 引言

**第3章Pb2+对ESAK的作用**

Pb2+是所有已知的毒性物质中记载最多的一种，Pb2+是重金属的一种，且无法降解，对许多生命组织有较强的潜在毒性。在很低的浓度下，Pb2+可长期影响大脑和神经系统。蛋白质是生命体的重要物质，研究Pb2+与蛋白质的相互作用具有非常重要的意义。有研究报道，Pb2+能使牛血清蛋白（BCA）中的羟基位置产生红移现象，蛋白质中氨基酸的羟基易和铅结合，产生大分子化合物和络合物。

Pb2+对蛋白质有荧光淬灭作用，能与蛋白质中的氮配位生成2: 1的络合物使蛋白质变性失去生理功能且难以除去[105]。

现在环境污染越来越严重，随着工业发展，各种金属离子的排放量越来越大，研究金属离子对生命活动的承载者—蛋白质的影响就变的更有实际意义。本文以

ESAK为模式蛋白，研究几种常见金属离子对ESAK酶生物学功能的影响，并选取重金属中较常见且毒性较强的Pb2+离子作为典型离子研究其对ESAK酶活性和结构的影响。

## **3.2** 实验材料和方法

### **3.2.1** 实验材料

ESAK来源于南极磷虾(*Euphausia superba*)肌肉，按照第二章所述方法进行提取、纯化，所得酶产物经SDS-PAGE电泳检测符合要求。ATP、ANS购自Sigma公司，硫酸铜、硝酸铅、氯化铬、氯化铝、氯化铁、氯化亚铁、氯化钴、氯化锰、乙酸镁、氯化锶等其他主要所用试剂为国产分析纯。

**表3.1** **实验仪器设备**

Table 3.1 Experimental instruments and equipment

| 仪器名称 | 生产厂家 | 型号 |
| --- | --- | --- |
| 电子天平 | 赛多利斯科学仪器有限公司 | BSD224S-CW |
| 数显恒温水浴锅 | 金坛市华龙实验仪器厂 | DK-8D |
| 分光光度计 | Shimadzu | UV-1800 |
| 荧光分光光度计 | Hitachi | F-4600 |
| 制冷加热循环仪 | 北京莱伯泰科仪器有限公司 | RH25-6A |

19

### **3.2.2** 不同金属离子对**ESAK**酶活影响测定

ESAK活力的测定，使用第二章所述的pH-比色法进行，首先配制底物溶液，含有6.6 mM乙酸镁、5.7 mM精氨酸、混合酸碱指示剂（含0.015%百里香酚蓝和0.0025%甲酚红）和5 mM ATP，然后用1M NaOH调pH到8.0。以一分钟内575 nm处吸光值变化的斜率来表征酶活力大小，底物和测定温度均为20℃，

ESAK终浓度为2μM，所用仪器为Shimadzu（Japan）的UV-1800紫外/可见分光光度计，比色杯为1 cm光程的塑料比色杯。测定时以没有金属离子的ESAK酶液为对照组，将不同种类和浓度的金属离子与ESAK在20℃共同作用2个小时然后测定混合酶液活性。

### **3.2.3** **Pb2+**变性的**ESAK**的内源荧光和**ANS**结合荧光分析

天然态ESAK在不同浓度Pb2+的溶液中变性两个小时，用荧光分光光度计测定其内源荧光和ANS结合荧光。ESAK的内源荧光激发波长为280 nm，发射光谱范围为300 nm-400 nm。测定ANS结合荧光时，先将ESAK在Pb2+溶液中变性两个小时，然后加入50倍浓度的ANS，遮光作用30 min (ANS易见光分解)，

ANS荧光的激发波长为380 nm，发射光谱范围为400 nm-600 nm。所有荧光实验温度均为20℃，ESAK终浓度为2μM。

### **3.2.4** **Pb2+**介导的**ESAK**聚沉实验

高浓度的Pb2+可以引起ESAK聚沉。选择不同的Pb2+浓度，对ESAK在Pb2+溶液中的聚沉情况进行测定。聚沉程度是通过测定样品在400 nm处的吸光值即浊度来表征的。聚沉实验温度为20℃，ESAK终浓度为4μM，实验在Shimadzu的UV-1800紫外/可见分光光度计上进行。

## **3.3** 实验结果

### **3.3.1** 不同金属离子对**ESAK**酶活影响

从Pb2+、Cu2+、Mn2+、Sr2+、Al3+、Fe3+、Co2+、Fe2+、Mg2+等9种金属离子对ESAK酶活的影响中发现，较低浓度的金属离子对ESAK酶活影响不完全相同，其中Al3+、Cu2+、Pb2+对ESAK抑制作用较为明显，而Mn2+、Sr2+、Mg2+、

Co2+等在较低浓度对ESAK有轻微的促进作用，但随着金属离子浓度的升高，

ESAK活性普遍受到抑制。

20

**表3.2** **不同金属离子对ESAK酶活影响**

Table 3.2 Effect on ESAK by metal ions

| 1mM 金属离子 | | | 5mM 金属离子 | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 平均百分比 | 标准差 | 平均百分比 | 标准差 |
| 铅(Pb2+) | 2.64% | 0.29% | 2.00% | 0.84% |
| 铜(Cu2+) | 3.65% | 0.44% | 3.50% | 0.81% |
| 锰(Mn2+) | 29.17% | 3.42% | 2.00% | 1.29% |
| 锶(Sr2+) | 107.86% | 6.68% | 40.70% | 6.92% |
| 铝(Al3+) | 1.53% | 0.45% | 1.02% | 1.53% |
| 三价铁(Fe3+) | 5.23% | 3.50% | 5.39% | 3.09% |
| 钴(Co2+) | 32.85% | 3.85% | 1.91% | 1.46% |
| 二价铁(Fe2+) | 15.36% | 4.75% | 79.41% | 6.48% |
| 镁(Mg2+) | 85.93% | 2.43% | 51.20% | 9.11% |
| 对照（无金属离子） | 100.00% | 0.00% | 100.00% | 0.00% |

选取不同浓度的Pb2+、Cu2+、Cr3+测试其对ESAK的抑制程度，得到图4.1。其中ESAK酶浓度为2μM。发现一定范围内Cr3+对ESAK酶活基本没有明显影响，而随着Cu2+和Pb2+浓度的增大，ESAK受抑制程度加剧。图中ESAK酶终浓度为2.0μM，实验温度20℃。计算出Cu2+对ESAK的IC*50*约为0.018 mM左右，Pb2+对ESAK的IC*50*约为0.056 mM。在底物浓度相同的情况下，Cu2+对ESAK

的抑制作用远远大于Pb2+。

A



21

B



C



**图3.1** **不同浓度金属离子对ESAK酶活作用**

**Fig.** **3.1** **Effect on ESAK by Pb2+, Cu2+, Cr3+ in different concentrations**

### **3.3.2** **Pb2+**对**ESAK**抑制类型分析

选取Pb2+浓度0、0.0375、0.05、0.0625、0.075 mM五个浓度，每个Pb2+浓度改变ESAK酶浓度为1.5、2、2.25、3μM，实验温度20℃，将Pb2+与ESAK酶作用2个小时测定ESAK剩余酶活，得到一组几近于平行的直线，推测Pb2+对ESAK的抑制为不可逆抑制。

为证实实验结果，将Pb2+（终浓度0.1 mM）与ESAK酶（终浓度3μM）混合放入透析袋中，以没有Pb2+和酶的缓冲液为透析液，4℃透析，3 h后进行测活，发现ESAK活力并没有恢复，即不能通过透析的方法对已失活的ESAK酶复性；在已被Pb2+变性失活的ESAK酶液中加入甘氨酸、脯氨酸等常见渗透物和二巯基丙醇等也都不能使ESAK解除抑制，进一步证实了Pb2+对ESAK的抑制为不可以抑制。

22



**图3.2** **铅离子对ESAK抑制类型的分析**

**Fig.** **3.2** **Inhibition type of Pb2+ on ESAK**

### **3.3.3** **Pb2+**变性的**ESAK**的内源荧光光谱

利用ESAK中的色氨酸残基，可探测不同Pb2+浓度介导的ESAK构象变化。

ESAK与Pb2+在20℃作用2个小时后，检测其内源荧光光谱，激发波长280 nm，收集发射波长范围300-400 nm，酶的终浓度2.0μM，Pb2+终浓度分别为0、0.5、

1.0、1.5、2.0、3.0 mM。从图3.3可以看出天然ESAK的内源荧光最大峰位在

331-332 nm，随着Pb2+浓度的升高，ESAK的最大荧光强度峰位发生红移到达338

nm处，内源荧光强度减小，并且发生淬灭。推测Pb2+可能和色氨酸残基发生结合，并且使ESAK二级结构发生较大程度的改变。



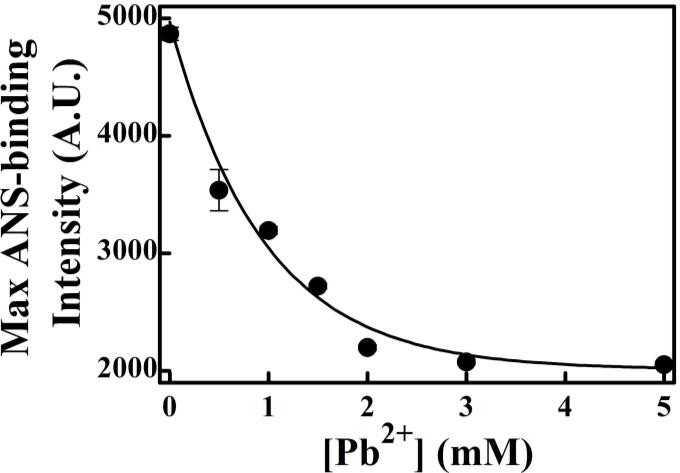
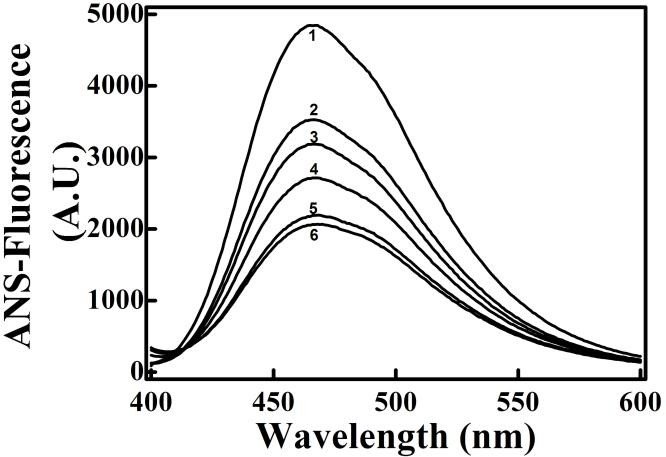
23



**图3.3** **Pb2+变性的ESAK内源荧光光谱**

**Fig.** **3.3** **Fluorescence of ESAK induced by Pb2+**

### **3.3.4** **Pb2+**变性的**ESAK**的**ANS**结合荧光光谱



**图3.4** **Pb2+变性的ESAK的ANS结合荧光光谱**

**Fig.** **3.4** **ANS-Fluoresence of ESAK induced by Pb2+**

ANS结合荧光可以检测ESAK疏水面的暴露情况。ESAK与不同浓度的Pb2+

在20℃作用2个小时后，加入50倍对应浓度的ANS，遮光作用30分钟，检测

24

ANS结合荧光，激发波长380 nm，发射波长范围400-600 nm，，酶的终浓度2.0μM，

Pb2+终浓度为0、0.5、1、1.5、2、3 mM。从图3.4可以看出，随着Pb2+浓度的升高，ANS结合荧光强度减小，推测Pb2+并没有引起ESAK内部的疏水区域暴露，反而使ESAK内部极性增加，非极性减弱。

### **3.3.5** **Pb2+**介导的**ESAK**聚沉

固定缓冲液为50 mM Tris-HAc (pH 7.0), ESAK的终浓度为4μM，温度20℃将酶与不同浓度的Pb2+混合，在400 nm波长下测定吸收值变化，每5 s记录一个数据，共记录7000 s时间，图中1-5 Pb2+终浓度分别为0.4、0.5、0.75、1、1.5

mM。从图3.5中可以看出，在0~1.5 mM Pb2+范围内，随着Pb2+浓度的升高，ESAK

聚沉速率变大，且可观测到的聚沉量增大。



**图3.5** **不同Pb2+浓度诱导ESAK聚沉**

**Fig.** **3.5** **ESAK aggregation induced by Pb2+ in different concentrations**

## **3.4** 讨论

通过对几种常见重金属离子对ESAK酶活影响的分析发现，多数重金属离子对ESAK都有不同程度的抑制作用而少量Mn2+、Mg2+对ESAK有促进作用，可能与ESAK的催化和调控有关；再选取抑制程度较大的的Cu2+和Pb2+，研究发现随着离子浓度的增加，抑制程度加重。

对Pb2+诱导ESAK结构和功能改变进行具体分析，发现Pb2+对ESAK属于不可逆抑制，其抑制作用不能通过简单的物理渗透和加入常见螯合剂来解除；对

Pb2+诱导后的ESAK进行荧光分析，Pb2+使ESAK内源荧光发生明显的红移，并且伴随淬灭，而三级结构中表面没有疏水面暴露，但内部极性增强，非极性减弱。

25

这些都说明很Pb2+可能与ESAK必需基团中的色氨酸等发生共价交联致使酶内部疏水的活性中心构象发生改变，极性增加。聚沉分析的结论是随着Pb2+浓度的增大，聚沉速度加快，可观测到的聚沉物大小远远大于一般聚沉物，并且聚沉物无法被DMSO等非极性溶剂所溶解，说明高浓度的Pb2+不仅可以加快ESAK结构改变而且可以加大其结构改变程度。

由于没有观察到疏水区域暴露的现象，我们推测Pb2+介导的ESAK聚沉可能是由于不同Pb2+与不同的ESAK单体互相共价络合而形成的庞大复杂的络合物，而不仅仅是一般聚沉中单体间以疏水面相互作用为主要作用力形成的聚合，这样就可以很好的解释为什么在聚沉过程中Pb2+介导的聚沉物远远大于一般形成聚沉物并且这种聚沉物不能被非极性溶剂所溶解（图未给出）。

26

## **4.1** 引言

**第4章Zn2+对ESAK的作用**

Zn2+存在于许多生物体内，是机体必须的微量元素之一，具有重要的生理功能，但也有报道病理Zn2+浓度可以引起许多蛋白质的疏水暴露，并致使蛋白质聚沉。Huang等发现在β-Amylord protein聚沉中一定浓度的Zn2+可以诱导α-螺旋量增多、β-折叠量减少，从而引发聚沉[104]。由Zn2+介导的这种聚沉可以被螯合剂所缓解和抑制，这表明Zn2+对蛋白的这种变性作用可能是非共价可逆的。

我们以南极磷虾精氨酸激酶为模式分子，研究了Zn2+对天然态精氨酸激酶结构和功能的影响。结果表明，低浓度的Zn2+可以抑制ESAK酶的活力，引起ESAK的二级结构改变，致使疏水区域暴露；高浓度的Zn2+可以引起ESAK的错误折叠致使聚沉，且活性的变化明显先于构象的变化，符合邹承鲁教授的“活性中心柔性假说”。

## **4.2** 实验材料与方法

### **4.2.1** 实验材料

ESAK来源于南极磷虾(*Euphausia superba*)肌肉，按照第二章所述方法进行提取、纯化，所得酶产物经SDS-PAGE电泳检测符合要求。ATP、ANS购自Sigma公司，乙酸锌等其他主要所用试剂为国产分析纯。

**表4.1** **实验仪器设备**

Table 4.1 Experimental instruments and equipment

| 仪器名称 | 生产厂家 | 型号 |
| --- | --- | --- |
| 电热恒温鼓风干燥箱 | 上海贺德实验设备有限公司 | DHG-9140A |
| 圆二色光谱仪 | Jasco (Japan) | J-815 |
| 电子天平 | 赛多利斯科学仪器有限公司 | BSD224S-CW |
| 数显恒温水浴锅 | 金坛市华龙实验仪器厂 | DK-8D |
| 分光光度计 | Shimadzu | UV-1800 |
| 荧光分光光度计 | Hitachi | F-4600 |
| 制冷加热循环仪 | 北京莱伯泰科仪器有限公司 | RH25-6A |

27

### **4.2.2** **Zn2+**对**ESAK**酶活影响的测定

ESAK活力的测定，使用第二章所述的pH-比色法进行，首先配制底物溶液，含有6.6 mM乙酸镁、5.7 mM精氨酸、混合酸碱指示剂（含0.015%百里香酚蓝和0.0025%甲酚红）和5 mM ATP，然后用1M NaOH调pH到8.0。以一分钟内575 nm处吸光值变化的斜率来表征酶活力大小，底物和测定温度均为20℃，

ESAK终浓度为2μM，所用仪器为Shimadzu（Japan）的UV-1800紫外/可见分光光度计，比色杯为1 cm光程的塑料比色杯。测定时以没有Zn2+的ESAK酶液为对照组，将不同浓度的Zn2+与ESAK在20℃共同作用2个小时然后测定混合酶液活性。

### **4.2.3** **Zn2+**对**ESAK**抑制动力学分析

抑制剂可以与游离的酶结合，也可以与酶-底物复合物结合，使酶的催化活性降低，称为非竞争性抑制。非竞争性抑制的特点是：底物和抑制剂分别独立地与酶的不同部位相结合；抑制剂对酶与底物的结合无影响，故底物浓度的改变对抑制程度无影响；*K*m值不变，*V*max值降低。

对于非竞争性抑制，可以把Lineweaver-Burk方程改写成如下形式：

1  *Km* 1 [*I* ]  1 







11[*I*] 

*V* V max 

*Ki* [*S*]

*V* max*Ki* 

以表观1/*V*max vs [I]或者以斜率(*K*m/*V*max) vs [I]进行二次作图，在单一抑制位点或者单一类型抑制位点情况下线性拟合。





*Y*截距

11

*V app* *V*

[*I* ]

*V* K

max

max

max *i*

### **4.2.4** **Zn2+**变性的**ESAK**的荧光光谱分析

内源荧光是由于肽链中存在芳香族氨基酸，可以吸收270-300 nm波长范围的光而发生能级跃迁，在回到基态时可以发射出300-400 nm波长范围的光谱。这些芳香族氨基酸包括Phe、Try和Tyr，其中Trp荧光峰位于325-350 nm范围内，且吸收强度大易观测，常被用作内源荧光探针来检测其周边构象的改变。

8-苯胺基-1-奈磺酸(ANS)是常用的极性探针之一，ANS主要与疏水残基相结合，结合量越多，发射荧光强度越大，另外ANS所处环境非极性越大荧光强度越大，在极性水溶液中基本观测不到。

28

天然态ESAK在不同浓度的Zn2+溶液中变性两个小时，用荧光分光光度计上测定内源荧光光谱。内源荧光激发波长为280 nm，发射光谱范围为300 nm-400

nm。测定ANS结合荧光时，先将ESAK在Zn2+溶液中变性两个小时，然后加入

50倍浓度的ANS，遮光作用30 min (ANS见光易分解)，ANS荧光激发波长为

380 nm，发射光谱范围为400 nm-600 nm，所有荧光实验温度均为20℃，ESAK

终浓度为2μM。

### **4.2.5** **Zn2+**变性的**ESAK**的圆二色光谱

圆二色性是指由于对圆偏振光的吸收不相同，造成了偏振光产生矢量偏振差，使圆偏振光变成椭圆偏振光。圆二色光谱（CD）是研究稀溶液中蛋白质构象的一种简单、快速、准确的方法。远紫外CD光谱可以反应出肽键的圆二色性，在蛋白质的规则二级结构中，肽键的排列是高度规律的，不同二级结构的CD谱带的位置和强弱都不相同，蛋白质的远紫外CD光谱能反应出蛋白质的二级结构的相关信息。

将ESAK与Zn2+在20℃共同作用2个小时，然后稀释到允许浓度，立即进行其在190-250 nm处的远紫外光谱，比色皿光程为1 cm, ESAK终浓度为2μM。

### **4.2.6** **Zn2+**介导的**ESAK**的聚沉实验

高浓度的Zn2+可以引起ESAK聚沉。选择不同的Zn2+浓度，对ESAK在Zn2+溶液中的聚沉情况进行测定。聚沉程度是通过测定样品在400 nm处的吸光值即浊度来表征的。聚沉实验温度为20℃，ESAK终浓度为8μM，实验在Shimadzu的UV-1800紫外/可见分光光度计上进行。

## **4.3** 实验结果

### **4.3.1** **Zn2+**对**ESAK**活性的影响

不同浓度的Zn2+与ESAK在20℃水浴2小时，测定其剩余酶活，结果发现：当ESAK终浓度为2.0μM，Zn2+终浓度为0~0.20 mM之间时，随着Zn2+浓度的增加，酶失活程度增大。Zn2+终浓度达到0.20 mM时，已基本完全失活（图4.1B）。但当底物中没有Zn2+时，在Zn2+浓度0.10 mM时仍然具有一定的酶活（图4.1A）。底物中有Zn2+时的*IC*50约为0.027 mM (*n*=3;平均值)，没有锌离子时的*IC*50约为

0.082 mM (*n*=3;平均值)。图中Zn2+终浓度分别为0、0.01、0.02、0.03、0.04、

0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.125、0.15、0.2 mM, ESAK终浓度为2.0μM。

29

A



B



**图4.1** **不同浓度Zn2+对ESAK活力的影响**

**Fig.** **4.1** **Effect on ESAK activity of Zn2+ in different concentrations**

将ESAK与特定浓度的Zn2+混合，在不同的时间点取样测活，可以测定不同浓度Zn2+的失活速率常数，见图4.2。

**表4.2** **Zn2+存在下ESAK的失活速率常数**

Table 4.2 Inactivation rate constants of ESAK induced by Zn2+

| Inactivation rate constants (x10-3s-1) | | | | Transition free-energy change  (kJ/mol·s -1) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Zn2+ (mM) | k1 | k2 | A |
| 0 | — | — | 0.337 | 19.47 |
| 0.06 | — | — | 0.351 | 19.38 |
| 0.08 | 1.44 | 0.252 | — | 15.94 |
| 0.09 | 1.74 | 0.214 | — | 15.48 |
| 0.1 | 2.06 | 0.374 | — | 15.07 |
| 0.4 | 2.59 | 0.069 | — | 14.51 |

Zn2+终浓度分别为0、0.06、0.08、0.09、0.1、0.4 mM, ESAK终浓度为2.0μM。

30

将计算得到的失活速率常数汇总成表4.2。结果表明，随着Zn2+浓度的增大，失活速率常数增大，转化自由能的变化减少，进行失活所需转化自由能减少，酶失活速度加快。



**图4.2** **Zn2+对ESAK抑制的时间过程**

**Fig.** **4.2** **Time process of ESAK inactivation induced by Zn2+**

### **4.3.2** **Zn2+**对**ESAK**的抑制动力学分析

改变底物中的精氨酸浓度或者ATP浓度，Lineweaver-Burk作图分析，判断抑制类型，结果见图4.3 (A和C)，图4.3A中精氨酸浓度选取2、3、4、5、6 mM，

Zn2+浓度0、0.01、0.02、0.03、0.04 mM；图4.3C中ATP浓度1.66、2.5、3.33、

5、7.5 mM，Zn2+浓度0、0.01、0.02、0.03、0.04 mM, ESAK终浓度均为2.0μM。结果如图所示，交点在X轴上，Zn2+对ESAK的抑制属于非竞争性抑制。以1/*V*max对Zn2+浓度二次作图，得到图4.3 (B和D)所示的线性关系，计算得到Zn2+对

精氨酸和ATP的抑制常数分别为0.028 mM和0.021 mM。

A B





31

C D





**图4.3** **Lineweaver-Burk作图**

**Fig.** **4.3** **Lineweaver-Burk of ESAK induced by Zn2+**

### **4.3.3** **Zn2+**变性的**ESAK**的内源荧光分析

ESAK与Zn2+在20℃水浴作用两个小时后，扫描内源荧光光谱。ESAK终浓度为2μM，缓冲液为50 mM Tris-HAc (pH 8.0), 1-6分别表示Zn2+浓度为0、0.025、

0.0625、0.125、0.25、0.5 mM。从图4.4可以看出天然ESAK的内源荧光最大峰位在331-332 nm，随着Zn2+浓度的升高，ESAK的内源荧光强度减小，最大荧光强度峰位发生轻微红移，推测随着Zn2+浓度增大，ESAK色氨酸残基附近极性增强，二级结构有轻微改变。





**图4.4** **Zn2+变性的ESAK的内源荧光光谱**

**Fig.** **4.4** **Fluorescence of ESAK induced by Zn2+**

### **4.3.4** **Zn2+**变性的**ESAK**的**ANS**结合荧光分析

ESAK与不同浓度的Zn2+在20℃作用2个小时后，加入50倍浓度的ANS，遮光作用30分钟，进行ANS结合荧光扫描，激发波长380 nm，收集发射波长范围400-600 nm. ESAK终浓度为2μM, ANS浓度为100μM，缓冲液为50 mM Tris-HAc (pH 8.0).1-7分别表示Zn2+浓度为0、0.025、0.0625、0.125、0.25、0.5、1 mM。从图4.5可以看出，随着Zn2+浓度的升高，ANS结合荧光强度显著增大，

32

1.0 mM锌离子时强度约为天然态ESAK的3.5倍。说明Zn2+可以诱导ESAK疏水区域较大程度的暴露。





**图4.5** **Zn2+变性的ESAK的ANS结合荧光光谱**

**Fig.** **4.5** **ANS-Fluorescence of ESAK induced by Zn2+**

### **4.3.5** **Zn2+**变性的**ESAK**的圆二色光谱分析

将ESAK与不同浓度的Zn2+在20℃共同保温2 h，用J-815圆二色光谱仪测定，扫描范围为250-200 nm，酶的终浓度为2μM，选取的Zn2+终浓度为0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 mM，光谱测定时酶蛋白浓度为3.3x10-3 mg/ml。

[]*M RW*

10*C* *L*

θλ 为实验中某一波长所观察到的椭圆值，单位为度，MRW 为平均残基分子量，

ESAK的分子量约为39.4 KDa，氨基酸残基数为391，因此MRW按照118.7计算，

C是测定样品的蛋白浓度为3.3x10-3 mg/ml, L是比色皿光程为10mm，10为系数。

利用222 nm处的摩尔椭圆率估算ESAK中α-螺旋的分量：

螺旋度2224000/ 29000

根据计算天然态ESAK中α-螺旋约占31~32%。图4.6中，可以清楚观察到，随着Zn2+浓度的增加，ESAK的圆二色光谱形状发生变化，其中α-螺旋分量增大，β-折叠分量减小。通过计算得出，0.4mM Zn2+时α-螺旋分量约达到为44%，这也与内源荧光分析结果相符，极性的α-螺旋分量增大，非极性的β-折叠分量减小，活性部位内部极性增强。

33



**图4.6** **Zn2+作用后的ESAK远紫外CD光谱**

**Fig.** **4.6** **CD specta of ESAK induced by Zn2+**

### **4.3.6** **Zn2+**介导的**ESAK**聚沉分析

固定缓冲液为50 mM Tris-HAc (pH 7.0), ESAK的终浓度为8μM，温度20℃，1-6分别表示Zn2+浓度为0.4、0.43、0.45、0.5、1、1.5 mM。从图4.7中可以看出，在0~1.5 mM Zn2+范围内，随着Zn2+浓度的升高，ESAK聚沉速率增大并且可观测到的聚沉物量增大。

对图4.7中的数据进行动力学分析，计算出不同Zn2+浓度下的聚沉速率汇总成表4.3，随着Zn2+浓度的增大，聚沉速率常数变大，聚沉所要跨过的能垒降低，即较大的Zn2+浓度更容易发生聚沉。

分析方法采用CK聚沉的动力学分析法：

Δ*AG*=*AG*∞－*AG*t

其中*AG*∞是聚沉反应终态达到的吸收值，*AG*t是t时刻的吸收值。实验数据符合以下方程：

Δ*AG* = exp(−*kAG*/*t*)

Δ*AG* = *P1*exp(−*kAG1*/*t*) + *P2*exp(−*kAG2*/*t*) + *P3*exp(−*kAG3*/*t*)

方程中*kAG*程是单相反应速率常数，对于一个三相反应来说，*P1*、*P2*、*P3*分别代表与速率常数*kAG1*、*kAG2*、*kAG3*相应的反应分率。在添加剂存在下的聚沉，其转化自由能的变化可以描述为：

ΔΔ*GAG* = *RT*ln (*kAG, none*/*kAG, additive*)

**表4.3** **不同浓度Zn2+存在时ESAK的聚沉速率常数**

**Table** **4.3** **Aggregation rate constants of ESAK induced by Zn2+**

34

|  | | | | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Aggregation rate constants (×10 -3s-1) | | | | | Transition free-energy  Change (kJ/mol·s -1) |
| Zn2+ (mM) | k1 | k2 | k3 | A |
| 0.4 | — | — | — | 0.079 | 23.01 |
| 0.43 | — | — | — | 0.138 | 21.65 |
| 0.45 | — | — | — | 0.148 | 21.48 |
| 0.5 | — | 0.863 | 0.164 | — | 17.19 |
| 1 | 3.41 | 0.729 | 0.179 | — | 13.84 |
| 1.5 | 13.27 | 0.886 | 0.183 | — | 10.53 |



## **4.4** 讨论

**图4.7** **Zn2+介导的ESAK聚沉**

**Fig.** **4.7** **ESAK aggregation induced by Zn2+**

作为一种大分子生物物质，酶的活性在很大程度上依赖于其三级结构的紧密性和完整性，Zn2+可诱导ESAK的活力和构象发生变化致使ESAK失活和聚沉。

### **4.4.1** **Zn2+**对**ESAK**活力的影响

在0~0.20 mM浓度之间，随着Zn2+浓度的升高，酶失活程度加大，失活速率加快。当Zn2+浓度达到0.10 mM时，酶基本完全失活。特定Zn2+浓度下ESAK的失活可以拟合成两相反应—快相反应和慢相反应，随着Zn2+浓度升高，慢相反应速率变大，转化自由能的变化减小，ESAK失活变的越来越容易。用动力学方法分析Zn2+对ESAK作用，得出结论，Zn2+对ESAK属于非竞争性抑制，测得的抑制动力学参数*IC*50=0.027 mM，*K*i, arginine=0.0279 mM，*K*i, ATP=0.0208 mM，比

35

较发现Zn2+对两种底物抑制情况并不完全相同，对ATP抑制作用较强。推测可能在Zn2+-酶-底物复合物中，ATP比精氨酸更稳定更难解离。

### **4.4.2** **Zn2+**对**ESAK**结构的影响

天然ESAK的内源荧光最大发射峰位在331-332 nm，随着Zn2+浓度的增大，ESAK内源强度减小，发射峰轻微红移，说明Zn2+诱导ESAK内部二级结构改变，极性的α-螺旋量增大，非极性的β-折叠减少；ESAK的ANS结合荧光强度增大，说明疏水区域发生暴露。

我们推测在一定Zn2+浓度下，ESAK分子水化膜受到破坏且氨基酸残基周围环境中的极性改变，致使较具极性的α-螺旋量增多，与活性中心结构相关的非极性β-折叠区域减少并暴露，而水化膜的破坏和非极性疏水区域的暴露都致使

ESAK聚合成大的聚沉物，疏水区域相互作用可能是Zn2+介导ESAK聚沉的主要作用力。

根据推测，Zn2+并没有与ESAK共价交联，因此在Zn2+聚沉的ESAK中加入螯合剂解除Zn2+后能使聚沉物复溶，并且在没有Zn2+的情况下变性的ESAK可再折叠形成天然态ESAK，我们已证实聚沉后的ESAK确实可以在Zn2+被螯合后被重新溶解，并在24 h后恢复一定的酶活，可能由于再折叠所需时间太长、或者其他实验原因ESAK酶活没有得到完全恢复。

36

# **第5**章 渗透物对**ESAK**的恢复作用

## **5.1** 引言

以金属离子(Zn2+和Pb2+)介导的ESAK聚沉为模式聚沉，寻找其聚沉抑制剂和研究抑制机理。CK与AK同源性较高且单体结构相似度很高，已有学者报道渗透物可以阻遏甚至完全抑制Zn2+介导的CK聚沉。因此本文选取甘氨酸、脯氨酸、肝素钠、蔗糖、DMSO和甘油等六种常见的渗透物分析研究他们对由Zn2+和Pb2+介导的ESAK失活和聚沉的影响及其作用机制。

## **5.2** 实验材料和方法

### **5.2.1** 实验材料

ESAK来源于南极磷虾(*Euphausia superba*)肌肉，按照第二章所述方法进行提取、纯化，所得酶产物经SDS-PAGE电泳检测符合要求。甘氨酸、脯氨酸、DMSO、ATP、ANS购自Sigma公司，甘油、蔗糖、肝素钠、乙酸锌、硝酸铅等其他主要所用试剂为国产分析纯试剂。

**表5.1** **实验仪器设备**

Table 5.1 Experimental instruments and equipment

| 仪器名称 | 生产厂家 | 型号 |
| --- | --- | --- |
| 电热恒温鼓风干燥箱 | 上海贺德实验设备有限公司 | DHG-9140A |
| 电子天平 | 赛多利斯科学仪器有限公司 | BSD224S-CW |
| 数显恒温水浴锅 | 金坛市华龙实验仪器厂 | DK-8D |
| 分光光度计 | Shimadzu | UV-1800 |
| 荧光分光光度计 | Hitachi | F-4600 |
| 制冷加热循环仪 | 北京莱伯泰科仪器有限公司 | RH25-6A |

### **5.2.2** 渗透物对金属离子诱导的**ESAK**失活影响实验

先在ESAK中先统一添加金属离子作用（终浓度为0.1 mM），然后加入不同终浓度的渗透剂作用两个小时，用pH-比色法测定酶活，以对照组ESAK（不添加金属离子）的活力为100%作图，ESAK的终浓度2μM，对照组ESAK不添加渗透剂添加对应体积的dH2O，整个实验过程温度20℃。

37

### **5.2.3** 渗透物对金属离子变性的**ESAK**结构影响实验

在ESAK中先统一添加金属离子离子变性（终浓度为1 mM），然后加入不同终浓度的渗透剂（甘氨酸、脯氨酸和肝素钠）作用两个小时，然后加入50倍的ANS，遮光作用30 min，测定ANS结合荧光。激发波长380 nm，发射波长收集范围400-600 nm。实验中ESAK酶的终浓度2μM，整个实验过程温度20℃，对照组不添加ESAK而添加对应体积的dH2O。

### **5.2.4** 渗透物对**Zn2+**诱导的**ESAK**聚沉影响实验

ESAK终浓度为4.0μM，温度为20℃，Zn2+浓度为1.5 mM，缓冲液为50 mM Tris-HAc (pH=7.0)。通过检测波长400 nm处的可见光浊度变化来研究甘氨酸和脯氨酸对ESAK聚沉的影响。

## **5.3** 渗透物对**Zn2+**介导的**ESAK**失活和聚沉的影响

### **5.3.1** 渗透物对**Zn2+**诱导的**ESAK**失活的影响

六种渗透剂的浓度分别为：甘氨酸（0~400 mM）、脯氨酸(0~1.5 M)、肝素钠(0~20 mg/ml)、甘油(0~800 mM)、DMSO (0~500 mM)和蔗糖(0~20 mg/ml). A图中甘氨酸终浓度为0、25、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400 mM；B图中脯氨酸终浓度为0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、

1、1.25、1.5 M；C图中肝素钠终浓度分别为0、1、2、3、4、5、7.5、10、15、20 mg/ml。

结果表明，加入甘油、DMSO和蔗糖对Zn2+诱导失活的ESAK基本没有恢复作用，200 mM的甘氨酸基本可以完全恢复失活的ESAK酶活，800 mM以上的脯氨酸可以将ESAK酶活恢复至80%以上，相比而言，肝素钠效果较差，5 mg/ml时达到最大恢复程度，仅仅能恢复到50%。



A

38

B



C



**图5.1** **渗透物对Zn2+变性的ESAK失活的影响**

**Fig.** **5.1** **Effect of osmolytes on ESAK activity induced by Zn2+**

### **5.3.2** 甘氨酸和脯氨酸对**Zn2+**变性的**ESAK**结构的作用

在六种渗透剂中，甘氨酸、脯氨酸和肝素钠对Zn2+诱导失活的ESAK有明显的恢复，继续检测它们对Zn2+变性的ESAK结构的作用。甘氨酸浓度分别为0、

10、20、40、160、240 mM；脯氨酸浓度分别为0、10、20、40、120、240 mM。对照组不添加ESAK而添加对应体积的dH2O。结果发现不论是内源荧光还是

ANS结合荧光，甘氨酸和脯氨酸对Zn2+介导的ESAK结构改变都具有较强的规律性，而肝素钠作用规律不明显。

39





**图5.2** **甘氨酸和脯氨酸对Zn2+介导的ESAK的ANS结合荧光光谱**

**Fig.** **5.2** **ANS-Fluoresence of glycine and proline on ESAK induced by Zn2+**

### **5.3.3** 甘氨酸和脯氨酸对**Zn2+**引起的**ESAK**聚沉的作用

甘氨酸终浓度选取0、10、20、30、35、40、50、100 mM，脯氨酸终浓度选取0、50、75、100、125、150、300 mM。结果如图5.3，随着甘氨酸和脯氨酸浓度的增加，ESAK的聚沉得到抑制，当甘氨酸浓度达到100 mM或者脯氨酸浓度达到300 mM时ESAK聚沉几乎被完全抑制。



40



**图5.3** **甘氨酸和脯氨酸对Zn2+引起的ESAK聚沉的抑制作用**

**Fig.** **5.3** **Effect on ESAK aggregation induced by Zn2+**

## **5.4** 渗透剂对**Pb2+**介导的**ESAK**失活和聚沉的影响

### **5.4.1** 渗透剂对**Pb2+**诱导的**ESAK**失活的影响

六种渗透剂的浓度分别为：甘氨酸（0~500 mM）、脯氨酸(0~500 mM)、肝素钠(0~15 mg/ml)、甘油(0~500 mM)、DMSO(0~500 mM)和蔗糖(0~15 mg/ml)。结果发现，这六种渗透剂对Pb2+变性的ESAK都没有明显作用。



41



**图5.4** **渗透剂对Pb2+诱导失活的ESAK的作用**

**Fig.** **5.4** **Effect of osmolytes on ESAK activity induced by Pb2+**

### **5.4.2** 渗透剂对**Pb2+**介导的**ESAK**聚沉的影响

采用ESAK终浓度为4.0μM，温度为20℃，Pb2+浓度为1 mM，缓冲液为50 mM Tris-HAc (pH=7.0)。通过检测波长400 nm处的可见光浊度变化来研究渗透剂对ESAK聚沉的影响。结果表明，六种渗透剂对Pb2+诱导的ESAK聚沉均没有明显的抑制作用（图未给出）。

## **5.5** 讨论

有文献表明，甘油、DMSO、蔗糖等能防止能防止蛋白质的聚沉，也有关于甘氨酸和脯氨酸能恢复Zn2+诱导的CK失活和聚沉的报道，因此本文中采用甘氨酸、脯氨酸、肝素钠、甘油、DMSO和蔗糖等已见报道的渗透物研究它们对金属离子(Zn2+和Pb2+)诱导的ESAK的失活和聚沉的影响。

实验结果显示，对于低浓度Zn2+引起的ESAK变性，甘氨酸和脯氨酸可以帮助其很大程度上恢复活力和构象，对于高浓度Zn2+引发的ESAK聚沉，甘氨酸和脯氨酸都可以起到很好的抑制作用，然而甘油、DMSO和蔗糖等没有明显作用。对于Pb2+诱导的ESAK变性和聚沉，这几种渗透物都没有明显作用。

有文献报道，甘氨酸可以螯合Zn2+，较高浓度的脯氨酸可以作为渗透调节物质，具有稳定酶空间结构的作用，这些与本文中实验结果相符，可以用来解释甘氨酸和脯氨酸对Zn2+变性ESAK的抑制和保护作用。甘氨酸螯合Zn2+使环境的极性降低，疏水作用力减弱，水化膜也得到恢复，ESAK发生再折叠，所以聚沉被抑制，并且ANS荧光强度减小。高浓度的脯氨酸可以稳定酶的空间结构，但是并没有去除Zn2+只是可能与酶暴露出来的疏水区域结合在，阻断了ESAK之间疏水区域的相互作用，因此也可以抑制聚沉，但是其疏水区域的暴露并没有接

42

触，因此ANS荧光强度并没有减小。

Pb2+诱导ESAK聚沉可能是由于不同Pb2+与不同的ESAK单体互相共价络合而形成的庞大复杂的络合物，而不仅仅是一般聚沉中单体间以疏水面相互作用为主要作用力的聚合，这样就可以很好的解释Pb2+诱导的聚沉物不能被非极性溶剂所溶解。

43

# **第6**章 总结

## **6.1** 总结

南极磷虾营养丰富，蛋白含量高，但捕捞后存活期短，束缚其开发利用，精氨酸激酶的活性与功能调节机制对其适应低温海域环境等具有潜在影响。本文针对Pb2+、Cu2+、Mn2+、Sr2+、Al3+、Fe3+、Mg2+、Zn2+等常见金属离子对南极磷虾精氨酸激酶作用机制进行研究，发现微量Mg2+、Mn2+对该酶具有促进作用；利用酶活力测定、动力学分析等手段得出Pb2+对ESAK属于不可逆抑制，Zn2+对

ESAK属于非竞争性抑制；并通过渗透剂进一步证实了Pb2+、Zn2+对ESAK的作用机理不同，为南极磷虾在极端低温环境下的能量供应和运动机制提供了研究基础。

锌离子可以通过诱导ESAK构象变化诱使ESAK失活，它能促进α-螺旋生成和β-折叠减少，当达到一定浓度的锌离子时就会引起聚沉，而这种聚沉可以被螯合剂可逆地抑制，这表示锌离子并没有导致ESAK一级结构的改变。相对而言，铅离子与ESAK作用后，无论内源荧光、ANS荧光还是CD光谱均显示其二级结构遭到较大损坏，并且加入螯合剂基本没有回复作用，用二巯丙醇也不能明显恢复活性，推测是由于铅离子与ESAK发生共价交联形成了庞大复杂的络合物。而甘氨酸、脯氨酸等小分子物质可以对锌离子诱导的ESAK聚沉有较明显作用，可能有助于某些与蛋白聚沉相关疾病的预防与防治。

## **6.2** 本文不足及愿望

由于时间限制和自身相关能力不足，虽然得出一些推论，但仍没有直接具体的证据可以说明锌离子是如何改变ESAK的空间构象和铅离子与ESAK是如何进行共价交联及其如何抑制较为有效，另外锌离子诱导的ESAK聚沉和铅离子诱导的ESAK聚沉表观上有明显的不同，都有待于进一步研究。

44

参考文献

[1] 孙松，刘永芹．南极磷虾与南大洋生态系统[J]．自然杂志，2009, 31(2)：88-90．

[2]孙雷，周德庆，盛晓风．南极磷虾营养评价与安全性研究[J]．海洋水产研究，2008, 29（2）．

[3] Ponnampalam E N, Mann N J, Sinclair A J. Effect of feeding systems on omega-3 fatty acids, conjugated linoleic acid and trans fatty acids in Australian beef cuts: potential impact on human health [J]. Asia Pacific journal of clinical nutrition, 2006, 15(1): 21-29.

[4]孙松，严小军．南极大磷虾的生物活性物质及其用途研究进展[J]．极地研究，2001, 13（3）．

[5] Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, etc. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the'phosphocreatine circuit'for cellular energy homeostasis [J]. Biochemical Journal, 1992, 281(Pt

1): 21.

[6]刘丽，刘承初，赵勇，等．南极磷虾的营养保健功效以及食用安全性评价[J]．食品科学，2010 (17)：443-447．

[7]楼乔明，王玉明，刘小芳，等．南极磷虾脂肪酸组成及多不饱和脂肪酸质谱特征分析[J]．中 国水产科学，2011, 18(4)：929-935．

[8]杭虞杰，李学英，杨宪时，等．南极磷虾自溶酶性质的初步研究[J]．食品科学，2011, 32（13）：

198-200．

[9] Pereira C A, Alonso G D, Paveto M C, etc. Trypanosoma cruzi Arginine Kinase Characterization and Cloning A NOVEL ENERGETIC PATHWAY IN PROTOZOAN PARASITES [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(2): 1495-1501.

[10] Binder M, Mahler V, Hayek B, etc. Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indianmeal moth, Plodia interpunctella, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen [J]. The Journal of Immunology, 2001, 167(9): 5470-5477.

[11] Suzuki T, Tomoyuki T, Uda K. Kinetic properties and structural characteristics of an unusual two-domain arginine kinase of the clam *Corbicula japonica* [J]. FEBS letters, 2003, 533: 95-98.

[12] Perović-Ottstadt S, Wiens M, Schröder H C, etc. Arginine kinase in the demosponge Suberites domuncula: regulation of its expression and catalytic activity by silicic acid [J]. Journal of experimental biology, 2005, 208(4): 637-646.

[13] RATTO A, SHAPIRO B M, CHRISTEN R. Phosphagen kinase evolution [J]. European Journal of Biochemistry, 1989, 186(1-2): 195-203.

[14] Kotlyar S, Weihrauch D, Paulsen R S, etc. Expression of arginine kinase enzymatic activity and mRNA in gills of the euryhaline crabs Carcinus maenas and Callinectes sapidus [J]. Journal of Experimental Biology, 2000, 203(16): 2395-2404.

45

[15] Chung J S, Webster S G. Moult cycle-related changes in biological activity of moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, Carcinus maenas [J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(15): 3280-3288.

[16] Shen Y, Cao M J, Cai Q F, etc. Purification, cloning, expression and immunological analysis of Scylla serrata arginine kinase, the crab allergen [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(7): 1326-1335.

[17] Binder M, Mahler V, Hayek B, etc. Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indianmeal moth, Plodia interpunctella, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen [J]. The Journal of Immunology, 2001, 167(9): 5470-5477.

[18] Yao C L, Wu C G, Xiang J H, etc. Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Fish & shellfish immunology, 2005, 19(4): 317-329.

[19] Yao C L, Ji P F, Kong P, etc. Arginine kinase from" | Litopenaeus vannamei": Cloning, expression and catalytic properties [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(3): 553-558.

[20] Zhou G, Somasundaram T, Blanc E, etc. Transition state structure of arginine kinase: implications for catalysis of bimolecular reactions [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(15): 8449-8454.

[21] Yousef M S, Fabiola F, Gattis J L, etc. Refinement of the arginine kinase transition-state analogue complex at 1.2 A resolution: mechanistic insights [J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2002, 58(12): 2009-2017.

[22] Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, etc. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the'phosphocreatine circuit'for cellular energy homeostasis [J]. Biochemical Journal, 1992, 281(Pt 1): 21.

[23] Fritz-Wolf K, Schnyder T, Wallimann T, etc. Structure of mitochondrial creatine kinase [J]. Nature, 1996, 381(6580): 341-345.

[24] Schneider A, Wiesner R J, Grieshaber M K. On the role of arginine kinase in insect flight muscle [J]. Insect biochemistry, 1989, 19(5): 471-480.

[25] Yu-mei E W, Esbensen P, Bentley D. Arginine kinase expression and localization in growth cone migration [J]. The Journal of neuroscience, 1998, 18(3): 987-998.

[26] Rao B D, Cohn M. 31P nuclear magnetic resonance of bound substrates of arginine kinase reaction: chemical shifts in binary, ternary, quaternary, and transition state analog complexes [J]. Journal of Biological Chemistry, 1977, 252(10): 3344-3350.

[27] Spahl D U, Berendji-Grün D, Suschek C V, etc. Regulation of zinc homeostasis by inducible NO

46

Synthase-derived NO: nuclear metallothionein translocation and intranuclear Zn2+ release [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(24): 13952-13957.

[28] Sheng Q, LüZ R, Mu H, etc. The Effect of Ag+ on Arginine Kinase: Inhibition Kinetics [J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2009, 27(1): 59-64.

[29] Li M, Wang X Y, Bai J G. Purification and characterization of arginine kinase from locust [J]. Protein and Peptide Letters, 2006, 13(4): 405-410.

[30] Wright-Weber B. Physical, kinetic, and immunological studies of monomeric (Periplaneta americana) and dimeric (Isostychopus badonotus) arginine kinases [M]. ProQuest, 2007.

[31]刘朝宗．生命的物质基础—蛋白质[J]．烹调知识，1999(3)：36-37．

[32]叶盛权，吴晖，郭祀远．菠萝皮干燥工艺研究[J]．现代食品科技，2007, 23(11)：28-29．

[33]谷军．α-淀粉酶的生产与应用[J]．生物技术，1994, 4(3)：1-5．

[34]江正强．微生物木聚糖酶的生产及其在食品工业中应用的研究进展[J]．中国食品学报，2005，

5(1): 1-9．

[35]肖怀秋，林亲录，李玉珍，等．微生物碱性蛋白酶研究进展[J]．中国食品添加剂，2005，

5(5): 60-64.．

[36] Zhang Y B, Howitt J, McCorkle S, etc. Protein aggregation during over-expression limited by peptide extensions with large net negative charge [J]. Protein expression and purification, 2004, 36(2): 207-216.

[37]高永贵，关怡新，姚善泾．包涵体蛋白的变复性研究[J]．科技通报，2003, 19（1）．

[38]王岚，李玉英，蔡桂红，等．重组苦荞麦过敏蛋白TBa的原核表达及其免疫活性鉴定[J]．中国生物化学与分子生物学报，2006, 22(4)：308-312．

[39]李载权，周爱儒，唐朝枢．内质网应激反应分子机理研究进展[J]．中国生物化学与分子生物学报，2004, 20(3)：283-288．

[40]黄更生．大肠杆菌表达重组hbFGF结构和功能优化[D]．暨南大学，2003．

[41]侯越，罗奋华，吴应积．抗体分离纯化技术的研究进展[J]．生物技术通报，2008（3）．

[42]赵锐，顾谦群，管华诗．多肽物质分离与分析方法研究进展[J]．中国海洋药物，2000, 19（3）：

48-48．

[43]王雪，宋长征．蛋白质复性的条件及影响因素[J]．国外医学分子生物学分册，2003, 25（6）：

358-360．

[44]向文斌，罗发兴，邵亚明．分离纯化对蛋白质活性的影响[J]．生命的化学，2003, 23（3）：

238-240．

[45]纪剑飞，张成刚．包涵体重组蛋白的纯化及复性[J]．沈阳药科大学学报，1998, 15(4)：303-307．

[46]蛋白质纯化技术及应用[M]．化学工业出版社，2005.

[47]张蕾，王丽娜，樊东升，等．阿尔茨海默病与脑老化因素[J]．神经疾病与精神卫生，2008：

47

8(2): 83-87．

[48] WANG Y, ZENG L, LV H. Ten-year advance in the study on causes and pathologic mechanism of ischemic stroke [J]. Chinese Journal of Contemporary Neurology and Neurosurgery, 2010, 10(1): 2-27.

[49]涂荣波，董军．β-淀粉样蛋白在老年痴呆症发生发展中的作用及其机制[J]．第四军医大学

学报，2007, 28(1)：91-93．

[50]肖增平，吉爱国．老年痴呆的发病机制及治疗的研究进展[J]．中国老年学杂志，2008, 28（1）：

95-97．

[51]郭相博．朊病毒和朊病毒的研究进展[J]．河北医药，2008, 30(11)：1782-1784．

[52]宋有涛，霍雅鹏，宫雅楠．淀粉样蛋白沉积疾病研究进展[J]．2008．

[53]胡可胜，孙续国．转甲状腺素相关淀粉样变的研究进展[J]．中国老年学杂志，2011, 31（21）：

4272-4274．

[54] Westermark P, Benson M D, Buxbaum J N, etc. Amyloid: Toward terminology clarification report from the nomenclature committee of the international society of amyloidosis [J]. Amyloid, 2005, 12(1): 1-4.

[55]周筠梅．蛋白质的错误折叠与疾病[J]．生物化学与生物物理进展，2000, 27(6)：579．

[56]王莉衡，钦传光，尚晓娅，等．蛋白质折叠与淀粉样沉积的产生[J]．化学与生物工程，2009，

26(6): 11-14．

[57]何剑为，陈应广，王禹，等．淀粉样蛋白纯化方法的研究进展[J]．生物技术通报，2012 (10)：69-74．

[58]康尔恂，郑家润．淀粉样变性的研究现状[J]．国外医学：皮肤性病学分册，2005, 31（6）：

373-375．

[59] Fu J, Zhao L, Wang J. Conformation Transformation of Aβ42 Protein under Different Temperature by Molecular Dynamics Simulations [J]. 2013.

[60]尹文，张久聪，宋涛．朊病毒蛋白的研究进展[J]．细胞与分子免疫学杂志，2005, 21(B03)：

122-124．

[61] Bartolini M, Bertucci C, Cavrini V, etc. β-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies [J]. Biochemical pharmacology, 2003, 65(3): 407-416.

[62] Alvarez A, Muñoz J P, Maccioni R B. A cdk5–p35 stable complex is involved in theβ-amyloid-induced deregulation of cdk5 activity in hippocampal neurons [J]. Experimental cell research, 2001, 264(2): 266-274.

[63] Alvarez A, Alarcón R, Opazo C, etc. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-βpeptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils [J]. The Journal of neuroscience, 1998, 18(9): 3213-3223.

48

[64] Huang T H, Yang D S, Plaskos N P, etc. Structural studies of soluble oligomers of the Alzheimerβ-amyloid peptide [J]. Journal of molecular biology, 2000, 297(1): 73-87.

[65] Yang D S, Yip C M, Huang T H J, etc. Manipulating the amyloid-βaggregation pathway with chemical chaperones [J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(46): 32970-32974.

[66] Willingham S, Outeiro T F, DeVit M J, etc. Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment orα-synuclein [J]. Science, 2003, 302(5651): 1769-1772.

[67] Tjernberg L O, Pramanik A, Björling S, etc. Amyloidβ-peptide polymerization studied using fluorescence correlation spectroscopy [J]. Chemistry & biology, 1999, 6(1): 53-62.

[68] Yoshida H, Yoshizawa T, Shibasaki F, etc. Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado–Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch [J]. Neurobiology of disease, 2002, 10(2): 88-99.

[69] Nagai Y, Tucker T, Ren H, etc. Inhibition of polyglutamine protein aggregation and cell death by novel peptides identified by phage display screening [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(14): 10437-10442.

[70] Ren H, Nagai Y, Tucker T, etc. Amino acid sequence requirements of peptides that inhibit polyglutamine-protein aggregation and cell death [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2001, 288(3): 703-710.

[71] Khoshnan A, Ko J, Patterson P H. Effects of intracellular expression of anti-huntingtin antibodies of various specificities on mutant huntingtin aggregation and toxicity [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(2): 1002-1007.

[72] Lecerf J M, Shirley T L, Zhu Q, etc. Human single-chain Fv intrabodies counteract in situ huntingtin aggregation in cellular models of Huntington's disease [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(8): 4764-4769.

[73] Heiser V, Scherzinger E, Boeddrich A, etc. Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: implications for Huntington's disease therapy [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(12): 6739-6744.

[74] Anfinsen C B, Haber E, Sela M, etc. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1961, 47(9): 1309.

[75] Prusiner S B. Prion diseases and the BSE crisis [J]. Science, 1997, 278(5336): 245-251.

[76]周亚凤．张先恩，Cass AEG．分子酶工程学研究进展[J].生物工程学报，2002, 18(4)：401-406．

[77]唐建国．茹炳根．蛋白质工程的研究[J].北京大学学报：自然科学版，1998, 34(2)：342-349．

[78]邹和昌．肌酸激酶的折叠及聚沉机理研究[D]．清华大学，2008．

[79]盛清．对磷酸原激酶家族中精氨酸激酶与肌酸激酶抑制作用的研究[D]．浙江大学，2009．

49

[80] Liu J, Nguyen M D H, Andya J D, etc. Reversible self-association increases the viscosity of a concentrated monoclonal antibody in aqueous solution [J]. Journal of pharmaceutical sciences, 2005, 94(9): 1928-1940.

[81] Fernández A. What factor drives the fibrillogenic association ofβ-sheets[J]. FEBSletters, 2005, 579(29): 6635-6640.

[82] Chi E Y, Krishnan S, Randolph T W, etc. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation [J]. Pharmaceutical research, 2003, 20(9): 1325-1336.

[83] Brems D N. Solubility of different folding conformers of bovine growth hormone [J]. Biochemistry, 1988, 27(12): 4541-4546.

[84] Zettlmeissl G, Rudolph R, Jaenicke R. Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. 1. Physical properties and kinetics of aggregation [J]. Biochemistry, 1979, 18(25): 5567-5571.

[85] Aksenov M Y, Aksenova M V, Butterfield D A, etc. Glutamine Synthetase-Induced Enhancement ofβ-Amyloid Peptide Aβ(1–40) Neurotoxicity Accompanied by Abrogation of Fibril Formation and AβFragmentation [J]. Journal of neurochemistry, 1996, 66(5): 2050-2056.

[86] Brems D N. Solubility of different folding conformers of bovine growth hormone [J]. Biochemistry, 1988, 27(12): 4541-4546.

[87] MITRAKI A, BETTON J M, DESMADRIL M, etc. Quasi-irreversibility in the unfolding-refolding transition of phosphoglycerate kinase induced by guanidine hydrochloride [J]. European Journal of Biochemistry, 1987, 163(1): 29-34.

[88] McLaurin J A, Fraser P E. Effect of amino-acid substitutions on Alzheimer's amyloid-βpeptide–glycosaminoglycan interactions [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(21): 6353-6361.

[89] Fersht A R. Characterizing transition states in protein folding: an essential step in the puzzle [J]. Current opinion in structural biology, 1995, 5(1): 79-84.

[90] Baker D. A surprising simplicity to protein folding [J]. Nature, 2000, 405(6782): 39-42.

[91] Haase-Pettingell C A, King J. Formation of aggregates from a thermolabile in vivo folding intermediate in P22 tailspike maturation. A model for inclusion body formation [J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(10): 4977-4983.

[92] Steinbacher S, Seckler R, Miller S, etc. Crystal structure of P22 tailspike protein: interdigitated subunits in a thermostable trimer [J]. Science, 1994, 265(5170): 383-386.

[93] Bennett M J, Choe S, Eisenberg D. Domain swapping: entangling alliances between proteins [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(8): 3127-3131.

50

[94]付娜，王捷，蛋白质聚集的形成与调控机制[J]．生命的化学，2007, 27(5)：436-439．

[95] Lundberg K M, Stenland C J, Cohen F E, etc. Kinetics and mechanism of amyloid formation by the prion protein H1 peptide as determined by time-dependent ESR [J]. Chemistry & biology, 1997, 4(5): 345-355.

[96]林建城，王悦，谢晓兰，等．金属离子对凡纳对虾N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响

[J]．2005．

[97] Sengupta P, Garai K, Sahoo B, etc. The amyloidβpeptide (Aβ1-40) is thermodynamically soluble at physiological concentrations [J]. Biochemistry, 2003, 42(35): 10506-10513.

[98] Brown A M, Tummolo D M, Rhodes K J, etc. Selective Aggregation of Endogenousβ-Amyloid Peptide and Soluble Amyloid Precursor Protein in Cerebrospinal Fluid by Zinc [J]. Journal of neurochemistry, 1997, 69(3): 1204-1212.

[99] Billestrup N, Bouchelouche P, Allevato G, etc. Growth hormone receptor C-terminal domains required for growth hormone-induced intracellular free Ca2+ oscillations and gene transcription [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995, 92(7): 2725-2729.

[100] Shin R W, Lee V M, Trojanowski J Q. Aluminum modifies the properties of Alz. heimer's disease PHF tau proteins in vivo and in vitro [J]. The Journal of neuroscience, 1994, 14(11): 7221-7233.

[101] Exley C, Schley L, Murray S, etc. Aluminium, β-amyloid and non-enzymatic glycosylation [J]. FEBS letters, 1995, 364(2): 182-184.

[102] France R M, Sellers D S, Grossman S H. Purification, Characterization, and Hydrodynamic Properties of Arginine Kinase from Gulf Shrimp (*Penaeus aztecus*) [J]. Archives of biochemistry and biophysics, 1997, 345(1): 73-78.

[103] Yu Z, Pan J, Zhou H M. A direct continuous pH-spectrophotometric assay for arginine kinase activity [J]. Protein and peptide letters, 2002, 9(6): 545-552.

[104] Ryu J, Girigoswami K, Ha C, etc. Influence of Multiple Metal Ions onβ-Amyloid Aggregation and Dissociation on a Solid Surface [J]. Biochemistry, 2008, 47(19): 5328-5335.

[105]蔡青青．铅与蛋白质相互作用及除铅方法研究[D]．洛阳：河南科技大学，2010．

51

致**谢**

研究生学习生涯即将结束，回首过去的两年历程，心里感慨万千。……。在论文即将结束之际，特向所有关心和帮助过我的老师、同学、同事、朋友和亲人们致以诚挚的谢意。

首先，衷心感谢朴龙斗教授和尹尚军教授在工作研究和生活中的关心帮助。其次，要感谢斯越秀副教授和王伟博士在实验进行和论文写作中的指导帮

助。

再次，在论文研究期间，我得到了多位学校老师及研究生同学的帮助，在此我向他们表示衷心的感谢。

最后，我要感谢父母家人，正是他们的爱不断地激励和鼓舞我前进。

52

# 攻读硕士学位期间发表的学术成果

[1] Jin Q X, Yin S J, Wang W, et al. The effect of Zn2+ on *Euphausia superba* arginine kinase: Unfolding and aggregation studies[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(5): 821-829. (SCI2.650)

[2] Wang W, Lee J, Jin Q X, et al. Effects of osmolytes on *Pelodiscus sinensis* creatinekinase: A study on thermal denaturation and aggregation[J]. International journal of biological macromolecules, 2013, 60: 277-287. (SCI2.661)

53