

有机汞化合物对木瓜蛋白酶的失活机理研究

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2019.04.005

刘学英^{1,2} 王帆¹
何东生¹ 李敏¹
陈银燕¹ 邓燕^{1,2}
马靓^{1,2}

1. 湖南工业大学

生命科学与化学学院
湖南 株洲 412007

2. 湖南工业大学

生物医用纳米材料与器件
湖南省重点实验室
湖南 株洲 412007

摘要: 复合食品包装材料残存的痕量重金属结合物严重威胁消费者健康。为了探明重金属结合物对生物大分子的影响及作用机理,研究了一定浓度的有机汞化合物(对氯汞苯甲酸,CMBA)使木瓜蛋白酶失活前后,该木瓜蛋白酶的结构变化。结果表明,经浓度为 1×10^{-4} mol/L的CMBA处理后,木瓜蛋白酶的二级结构变化明显,其 α -螺旋结构质量分数从43.4%急剧减少至4.2%, β -折叠、 β -转角和无规卷曲质量分数从12.7%、16.0%和27.2%分别提高至40.0%、19.6%和36.2%,该酶二级结构成分由 $\alpha+\beta$ 型绝大部分转变为全 β 型。CMBA分子诱导木瓜蛋白酶L-链的 α -螺旋结构趋向离散,构象松散,致使其天然构象遭到破坏,木瓜蛋白酶失活。经CMBA处理后的木瓜蛋白酶,其荧光光谱最大吸收峰红移7 nm,荧光强度降低显著,这是由色氨酸(Trp)残基被包埋在极性亲水环境下引起的。分子对接结果表明CMBA结合到木瓜蛋白酶的疏水活性口袋内,可与其中的甘氨酸(Gly)66形成氢键,与Trp26形成疏水键,该结果与光谱分析结果相一致。

关键词: 有机汞化合物;木瓜蛋白酶;失活机理

中图分类号: Q518.4

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2019)04-0032-07

引文格式: 刘学英,王帆,何东生,等.有机汞化合物对木瓜蛋白酶的失活机理研究[J].包装学报,2019,11(4):32-38.

1 研究背景

目前,纸塑铝复合食品包装材料是以食品专用纸板为基料,由聚乙烯、纸、铝箔等复合而成的纸质包装材料。因其包装的便利性,纸塑铝复合食品包装材料被广泛应用于液态乳制品、植物蛋白饮料、果汁饮料、酒类产品以及饮用水等领域,但原材料中的塑料以及印刷油墨、胶黏剂含有的重金属残留物通常会

迁移到包装产品中,对产品造成污染并损害消费者健康^[1]。此外,我国已经研发了多种以动植物为原料的可食性包装材料,并广泛应用于各类食品包装。但环境污染致使动植物体内积蓄铅、砷、镉和汞等重金属,这也给可食性包装材料的应用带来了安全隐患^[2]。因此,研究重金属与生物大分子间的相互作用机理及重金属毒理分析,对拓展食品包装材料的应用领域至关重要^[3]。

收稿日期: 2019-05-12

基金项目: 国家自然科学基金资助面上项目(61871180),湖南省自然科学基金资助面上项目(2017JJ2069)及青年基金资助项目(2016JJ3053),湖南省教育厅一般资助项目(YB2016B034,16C0470,18C0498)

作者简介: 刘学英(1981-),女,山东泰安人,湖南工业大学讲师,博士,主要从事生物酶催化反应作用机理方面的研究,
E-mail: liuxueying@hut.edu.cn

通信作者: 马靓(1982-),女,湖南株洲人,湖南工业大学讲师,博士,主要从事纳米材料的绿色合成方面的研究,
E-mail: maliangcc@126.com

汞与生物体内酶或蛋白质中许多带负电的基团如巯基等结合,使细胞内许多代谢途径,如能量的生成、蛋白质和核酸的合成受到影响,进而影响了细胞的功能和生长。汞化合物引起的细胞效应是多样化的,细胞损伤可能是巯基等活性基团的功能受到抑制,甚至失活,或发生不可逆的抑制含硒酶诱导细胞死亡的叠加或协同效应^[4-6]。无机汞和有机汞都具有致畸作用并可引起生物体染色体异常。有机汞化合物具有较强的脂溶性,能更好地吸附在皮肤和黏液膜上,它进入人体后可形成谷胱甘肽-Hg²⁺-血红蛋白三元复合配体,也可进一步脱甲基转化为无机汞离子,使人表现出急、慢性汞中毒,因而有机汞化合物毒性更大^[7-8]。有机汞化合物可被动植物吸收,并通过食物链富集放大,最终被人体吸收,并对人体造成极大的健康危害^[9],如日本的水俣病。

前期研究发现,木瓜蛋白酶对痕量Hg²⁺等重金属非常敏感,且其酶活力随接触到的重金属浓度发生改变^[10-11]。无机汞化合物与木瓜蛋白酶的相互作用机理已有研究^[12-13],而以有机汞化合物与木瓜蛋白酶的结合位点和作用模式为切入点,研究两者间的相互作用还鲜见报道。与Hg²⁺类似^[10-13],当有机汞化合物——对氯汞苯甲酸(chlormercuric benzoic acid, CMBA)的浓度不高于 1×10^{-4} mol/L时,CMBA可使木瓜蛋白酶失活,因此木瓜蛋白酶对CMBA的最低检出浓度为 1×10^{-4} mol/L。

本课题组运用光谱学方法和分子对接模拟方法研究了CMBA浓度为 1×10^{-4} mol/L时,CMBA与木瓜蛋白酶的相互作用机理,预测了两者的结合模式;并从分子水平上研究了CMBA与木瓜蛋白酶间的相互作用,分析了有机汞化合物对木瓜蛋白酶的抑制机理,以期探索食品包装材料中微量的铅、砷、镉、汞等重金属所带来的健康隐患提供一定的参考。

2 实验部分

2.1 实验试剂及仪器设备

1) 主要试剂

木瓜蛋白酶[EC 3.4.22.2](生物试剂)、对氯汞苯甲酸(化学纯),美国Sigma公司;酪蛋白,生物试剂,上海伯乐奥生物科技有限公司;三氯乙酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠,化学纯,上海国药集团化学试剂有限公司;去离子水,实验室自制。

2) 主要仪器与设备

集热式恒温加热磁力搅拌器,DF-101S型,河南巩义市予华仪器有限责任公司;电热恒温鼓风干燥箱,GZX-9246MBE型,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;电子分析天平,AL204型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;同步辐射紫外真空圆二色(synchrotron radiation circular dichroism, SRCD)光谱仪、同步辐射装置(Beijing synchrotron radiation facility, BSRF)、4B8真空紫外线站(vacuum ultraviolet, VUV),中国科学院高能物理研究所;荧光光谱仪,LS-55型,美国珀金埃尔默公司;Materials Studio材料模拟计算平台,北京创腾科技有限公司。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液的配制

木瓜蛋白酶和对氯汞苯甲酸用pH=7.0的磷酸盐(phosphate buffered saline, PBS)缓冲液分别配成质量浓度为1 mg/mL木瓜蛋白酶溶液和浓度为 1×10^{-4} mol/L的CMBA溶液。

将1 mL的木瓜蛋白酶溶液与1 mL CMBA溶液混合,放入40 °C集热式恒温加热磁力搅拌器中,调节转速为150 r/min,搅拌4 h,以形成均匀的混合物,用于SRCD及荧光光谱测定。

2.2.2 SRCD分析

测定参数设置如下:环境温度25 °C,光径0.1 mm,储存环的电子能量1.5 GeV,束流强度450 mA,分辨率1.0 nm,扫描范围172~260 nm,停留时间1 min。每组样品测定5次,取平均值,记录数据。

2.2.3 荧光光谱分析

测定参数设置如下:环境温度25 °C,激发波长280 nm,激发与发射的狭缝宽度均为5 nm,扫描速度500 nm/min,扫描范围310~400 nm。每组样品测定5次,取平均值,记录数据。所得数据通过CDTool软件处理,并用CDPRO分析软件计算蛋白质的二级结构,CD信号范围为 -1.8×10^{-2} ~ 1.8×10^{-2} deg·cm²·dmol⁻¹,蛋白质的相对分子质量为110 Da。

2.3 分子模拟

CMBA与木瓜蛋白酶(papain, PaP)分子对接操作流程按文献[14]进行。木瓜蛋白酶晶体结构来自Brookhaven蛋白质数据库(protein data bank编号:1CVZ),利用PyMOL软件除去木瓜蛋白酶晶体结构中受体结合的原配体分子C48和水分子,

并对受体蛋白进行加氢加电荷处理。利用 Materials Studio 的功能模块 Discovery 优化对氯苯甲酸 (4-chlorobenzoic acid, PCBA) 和 CMBA 的空间三维结构。利用 AutoDock 4.2 中 AutoGrid 和 AutoDock 两个程序对 PCBA、CMBA 与木瓜蛋白酶分子间的相互作用进行模拟, 并对其柔性受体与刚性配体间的对接进行计算。对接时, 受体大分子的格点盒子大小为 60 nm × 60 nm × 60 nm, 格点间距为 0.375 nm, 盒子中心位于半胱氨酸 (cysteine, Cys) 25 的巯基 (-SH) 上。运用 Lamarckian 遗传算法与局部能量搜索相结合, 利用预配置对刚性配体分子进行精确对接, 循环次数默认为 10 次。每次循环运算设定为 100 次独立对接实验, 且用半经验势函数作为能量打分函数, 通过计算确定配体分子在受体活性口袋中可能的结合位置, 并将对接结果进行成簇聚类分析, 其均方根 (root mean square, RMS) 在 2.0 Å 内的对接结果归为一簇。最终依据最低对接结合能和成簇分析确定合理的木瓜蛋白酶与 CMBA 的结合模式, 获得配体与受体蛋白的结合能量和对接作用模式图, 计算氢键距离。

3 结果与讨论

3.1 SRCD 分析

木瓜蛋白酶是一种重要的巯基蛋白, 是由 212 个氨基酸残基组成的含 3 对二硫键的单链蛋白分子, 其一级结构中含 7 个 Cys 残基, 其中 6 个形成 3 对链内的二硫键, 另一个 Cys25 则作为活性位点的巯基^[15]。木瓜蛋白酶具有典型的 $\alpha+\beta$ 折叠结构, 由大小相当的左右 2 个结构域构成, 2 个结构域构成的裂隙为催化活性中心, 含有如下保守氨基酸残基组成的催化三联体: Cys25- 组氨酸 (histidine, His) 159- 天冬酰胺 (asparagine, Asn) 175。其中, 左结构域 (L-域) 由 10~111 和 208~212 氨基酸残基组成, 主要是 α -螺旋结构, 而右结构域 (R-域) 由 1~9 和 112~207 氨基酸残基组成, 基本是 β -折叠结构^[16]。SRCD 光谱在光强度、偏振性和准直性方面均优于常规的圆二色谱, 尤其在 190 nm 以下短波长区域, 能观察到更多细致的蛋白质二级结构^[17]。通过 CDPRO 中 SELCON3, CDSSTR 和 CONTINLL 三个软件进行重复拟合, 确定最佳分析拟合软件程序为 SELCON3。SELCON3 软件中选用的 IBasis6 算法可使实验值与计算值的均方根差和标准均方根方差皆小于 0.1, 适

用于木瓜蛋白酶二级结构模拟拟合^[18-19]。

远紫外区 (178~250 nm) 是肽键的吸收峰, 此区域反映了主链的构象。具有不同二级结构的蛋白质或多肽所产生 SRCD 谱带的位置、吸收峰的强弱各不相同, 可根据 SRCD 数据计算出溶液中蛋白质的二级结构。CMBA (浓度为 1×10^{-4} mol/L) 处理前后的木瓜蛋白酶样品的 SRCD 表征图谱和 CDPRO 软件拟合木瓜蛋白酶二级结构含量变化分别见图 1 和表 1。

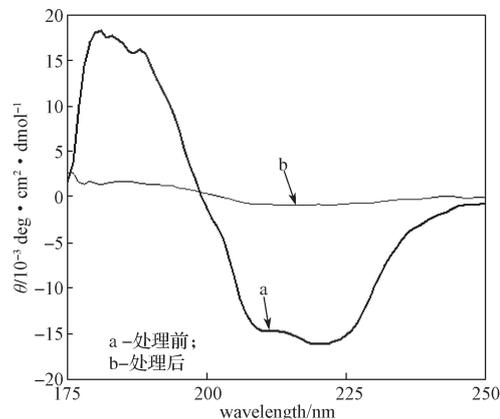


图 1 CMBA 处理前后木瓜蛋白酶的 SRCD 光谱图
Fig. 1 The SRCD spectra of papain before and after CMBA treatment

表 1 CMBA 处理前后木瓜蛋白酶的二级结构含量
Table 1 Secondary structure contents of the papain before and after CMBA treatment %

木瓜蛋白酶	二级结构质量分数							
	H(r)	H(d)	α -螺旋	S(r)	S(d)	β -折叠	β -转角	无规卷曲
处理前	28.2	15.2	43.4	5.3	7.4	12.7	16.0	27.2
处理后	1.8	2.4	4.2	27.8	12.2	40.0	19.6	36.2

注: H(r) 为常规 α -螺旋; H(d) 为扭曲 α -螺旋; S(r) 为常规 β -折叠; S(d) 为扭曲 β -折叠。

从图 1 可以看出, 与曲线 a 相比, 经 CMBA 处理后的木瓜蛋白酶的 SRCD 二级结构变化十分明显, 肽键的吸收峰强度下降, 由此说明木瓜蛋白酶与 CMBA 发生强烈的相互作用, 主链构象完全遭到破坏。由表 1 可知, 经 CMBA 处理后的木瓜蛋白酶的 α -螺旋结构的质量分数从 43.4% 急剧减少至 4.2%, 由此表明 L-链受 CMBA 影响较大, 受到严重破坏; β -折叠结构的质量分数由 12.7% 大幅度提高至 40.0%, 无规卷曲结构的质量分数由 27.2% 增至 36.2%。这些结果表明, 蛋白质结构从木瓜蛋白酶的 $\alpha+\beta$ 型蛋白绝大部分转变为全 β 型蛋白, CMBA 分子诱导木瓜蛋白酶 L-链的 α -螺旋结构趋于伸展, 结构趋向离散, 构象松散, 木瓜蛋白酶的天然构象遭到破坏, 致使木

瓜蛋白酶失活。

3.2 荧光光谱分析

当激发波长大于 290 nm 时, 可认为荧光仅来自于色氨酸 (tryptophan, Trp) 残基, Trp 残基的天然荧光变化可直接反映蛋白质中 Trp 残基量的变化。木瓜蛋白酶含有 5 个 Trp 残基^[15], 具有较强的内源荧光, 图 2 为经浓度为 1×10^{-4} mol/L 的 CMBA 处理前后木瓜蛋白酶的荧光光谱变化情况。

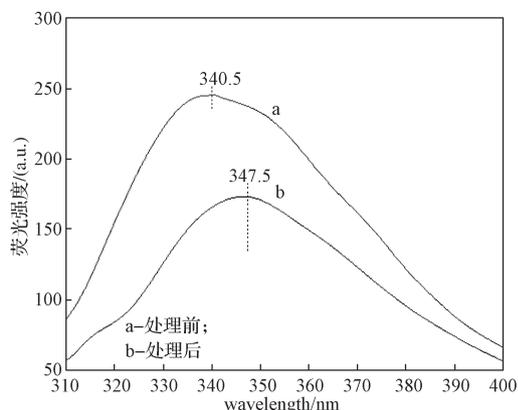


图 2 CMBA 处理前后木瓜蛋白酶的荧光发射光谱
Fig. 2 Fluorescence emission spectra of the papain before and after CMBA treatment

由图 2 可知, 未处理前木瓜蛋白酶在 340.5 nm 处出现最大荧光发射峰, CMBA 处理后木瓜蛋白酶的最大荧光发射峰的位置红移了 7 nm, 荧光强度降低明显, 出现一定程度的荧光猝灭现象。这是由于木瓜蛋白酶中 3 个 Trp 残基位于蛋白表面, 其余 2 个 Trp 残基包埋于蛋白质内部疏水环境中, 这 2 个荧光生色团与 CMBA 相互作用, 使木瓜蛋白酶原本有序的折叠结构 (α -螺旋) 被破坏, 亚基肽链结构趋于松散, 致使于疏水环境中 Trp 暴露在极性溶剂中, 荧光减弱, 峰位红移, 该结果与 SRCD 表征结果一致。

3.3 分子对接研究

分子对接是从已知结构的受体和配体出发, 经化学计量学方法模拟、识别分子间相互作用并预测受体-配体复合物的结构和结合位点, 在小分子化合物与生物大分子间的相互作用机理研究中具有十分重要的意义^[20]。但采用分子对接技术进行含金属的小分子与酶的相互作用研究还少有报道。

3.3.1 分子叠合

由于缺乏合理的参数, 目前有关含金属的蛋白对接结果往往不尽人意, 以致蛋白中的金属离子大多被忽略。为了确认分子对接程序 AutoDock 对 CMBA

的适用性, 本课题组选取 CMBA 及其结构类似的 PCBA 为研究对象, 分别与木瓜蛋白酶进行对接, 所形成的复合物 PaP-PCBA 和 PaP-CMBA 的对接结果如图 3 所示。

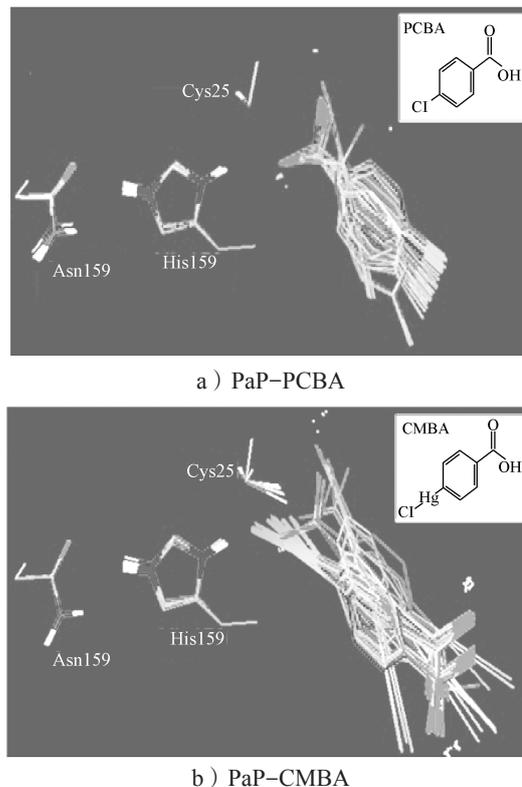


图 3 木瓜蛋白酶与 PCBA 和 CMBA 对接活性位点叠合图

Fig. 3 Superimposed map of the active sites of docked PCBA and CMBA with papain

由图 3 可知, 将 PCBA 和 CMBA 分子分别对接至木瓜蛋白酶的活性口袋, 与活性口袋中的三联体 Cys25-His159-Asn175 叠加, 其均方根偏差 (root mean squared deviation, RMSD) 均小于 0.6 Å, 100 次计算对接构象中配体的走向十分相似, 只是在位置上稍有差异, 由此表明两者与木瓜蛋白酶拟合的构象叠合程度大, 准确度较高。因此, 本研究建立的分子柔性对接方案对木瓜蛋白酶与 PCBA 的复合物 (PaP-PCBA) 和木瓜蛋白酶与 CMBA 复合物 (PaP-CMBA) 体系是适用的, 能够反映 PCBA 和 CMBA 与木瓜蛋白酶的真实结合方式。特别是叠加后, PaP-PCBA 和 PaP-CMBA 复合物体系中木瓜蛋白酶的结构构象有明显差异, 并且相互作用位点也不相同, PCBA 苯环上的 -COOH 作用于活性口袋的 Cys25 (见图 3a), 而含 Hg 的 CMBA 分子苯

环上的一HgCl与活性口袋的Cys25直接作用(见图3b),由此表明Hg对对接构型有重要的影响。

木瓜蛋白酶为巯基蛋白,可通过巯基试剂CMBA对其特异性的不可逆抑制来鉴定其活性位点,故可推断AutoDock适合预测CMBA与木瓜蛋白酶分子间的相互作用,对接结果具有较高的可信度。

3.3.2 CMBA与木瓜蛋白酶的分子对接

采用AutoDock4.2精细位置约束对接,研究CMBA与木瓜蛋白酶的活性三联体结合模式。对100次独立计算结果进行综合,并将其分成簇聚类,与CMBA相互作用的氨基酸残基主要包括Cys25、Trp26、甘氨酸(glycine, Gly)66、脯氨酸(proline, Pro)68、Asp158、His159、丙氨酸(alanine, Ala)160、Asn175、丝氨酸(serine, Ser)205、酪氨酸(tyrosine, Tyr)67、缬氨酸(valine, Val)133等,对接结果见表2。

表2 CMBA与木瓜蛋白酶对接结果的成簇聚类分析

Table 2 Cluster analysis results of docking runs for

CMBA with papain

簇	<i>N</i>	对接复合物序号	$E_{\text{ibe}}/(\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1})$	$E_{\text{mbe}}/(\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1})$	各成簇分析结果中相互作用的氨基酸残基
1	9	45	-4.24	-3.94	Cys25、Trp26、Gly66、Pro68、Asp158、His159、Ala160、Asn175、Ser205
2	87	66	-3.93	-3.77	Cys25、Trp26、Gly66、Tyr67、Pro68、Val133、Asp158、His159、Ala160、Asn175
3	4	68	-3.75	-3.71	Ser24、Cys25、Trp26、Gly65、Gly66、Val133、Val157、His159、Ala160、Asn175

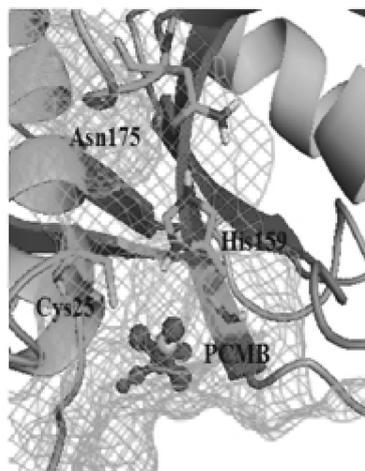
注:*N*为对接所得100个复合物的成簇分析结果数; E_{ibe} 为最低结合能; E_{mbe} 为平均结合能。

由表2可知,对接结果的成簇分析中将100个构象分成3簇,第2簇包括其中的87个构象,其RMSD为0.45 Å,各对接结果在活性位点的CMBA构象具有非常强的相似性,故选取第2簇为最佳作用模式。结合配体与受体蛋白复合物对接结合能最低和成簇分析中簇包含的对接复合物数量最多的原则,确定第66号CMBA和木瓜蛋白酶结合复合物为最佳结合模式,并用于下一步对接相互作用模式分析对象。

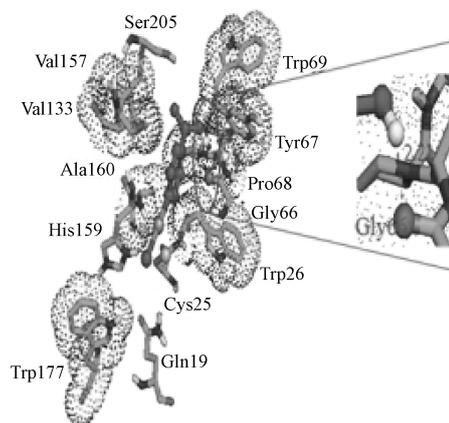
3.3.3 CMBA与木瓜蛋白酶的相互作用

一般认为,小分子配体与受体蛋白相结合,起主要作用的是抑制剂周围一定距离范围内的氨基酸

残基。按最佳能量原理以CMBA为活性位点中心进行计算分析,探明CMBA与木瓜蛋白酶分子之间具体结合方式,进一步明确其相互作用关系。计算得到CMBA与木瓜蛋白酶相互作用的对接模型,结果见图4。



a) CMBA分子与木瓜蛋白酶活性口袋的作用模式图



b) CMBA分子周围5 Å范围内的氨基酸残基对接作用模式图

图4 CMBA与木瓜蛋白酶作用模式

Fig. 4 Binding mode predictions of CMBA with papain

从图4a可以看出,CMBA分子(球棍模型)较好嵌入到了木瓜蛋白酶分子晶体的活性口袋内(网状线)。图4b为CMBA周围5 Å范围内的氨基酸残基对接作用模式图,周围棍状模型是受体木瓜蛋白酶活性位点氨基酸残基,中间红色球棍模型为配体CMBA,图中小点构成的立体口袋代表Trp26、Val133等组成的疏水口袋,配体-受体中的氢键见图4b右放大图。CMBA位于木瓜蛋白酶活性口袋内由谷氨酰胺(glutamine, Gln)19、Cys25、Trp26、Gly66、Tyr67、Pro68、Trp69、Val133、Val157、

Asp158、His159、Trp177、Ser205 等氨基酸残基构成的疏水腔内(见图 4b 中点状模型), 由此表明 CMBA 与木瓜蛋白酶结合存在疏水作用。CMBA 分子中的一OH 与木瓜蛋白酶 Gly66 的羰基间形成氢键, 键长为 2.21 Å, 氢键作用力较强。Gly66 位于木瓜蛋白酶分子 L- 域中, 正是由于该氢键的存在; CMBA 通过疏水作用力及氢键与 L- 域的 α - 螺旋氨基酸残基相互作用, 致使 α - 螺旋解旋, 木瓜蛋白酶中 α - 螺旋结构含量急剧减少, L- 域遭到破坏, 木瓜蛋白酶失活。另一方面, 木瓜蛋白酶内部疏水环境 L- 域中的 1 个 Trp 残基(Trp26) 与 CMBA 的距离很近, 说明 CMBA 与 L- 域中的 Trp 有相互作用(疏水作用), 使其荧光猝灭, 同时也影响了 L- 域 α - 螺旋结构。这些结果与 SRCD、荧光光谱的研究结果一致。

4 结语

本课题组利用 SRCD 和荧光光谱分析方法, 结合分子模拟技术研究了模拟生理条件下浓度为 1×10^{-4} mol/L 的 CMBA 对木瓜蛋白酶的作用机理。SRCD 和 Trp 荧光光谱分析结果表明, 经 CMBA 处理前后木瓜蛋白酶的构象和二级结构成分发生变化, 一定程度上揭示了 CMBA 作用下木瓜蛋白酶蛋白构象转变的机理。利用分子模拟研究 CMBA 和木瓜蛋白酶所形成复合物的形态, 利用成簇聚类分析判定两者间的最佳作用模式, 进一步分析对接结果揭示了 CMBA 与木瓜蛋白酶发生的相互作用, CMBA 与木瓜蛋白酶活性中心 L- 域的 Gly66 和 Trp26 残基间存在的氢键和疏水作用, 使 L- 域遭到破坏, 导致 α - 螺旋结构含量急剧降低, β - 结构含量增加, 最终酶结构趋向离散, 天然构象遭到破坏, 荧光猝灭, 木瓜蛋白酶失活。光谱表征分析和分子对接理论研究结果一致, 两者相互补充, 能够从实验和理论两方面协同研究 CMBA 分子与木瓜蛋白酶之间的相互作用, 为今后进一步开展重金属与生物大分子间的相互作用机理提供一定的理论依据和参考。

参考文献:

- [1] SINGH P, WANI A A, LANGOWSKI H C. Food Packaging Materials: Testing & Quality Assurance [M]. Boca Raton: CRC Press, 2017: 1-9.
- [2] ZHANG S, GU W C, CHENG Z Y, et al. Development of Edible Packaging Materials[J]. Advanced Materials Research, 2014, 904: 189-191.
- [3] ZARCO-FERNÁNDEZ S, MANCHEÑO M J, MUÑOZ-OLIVAS R, et al. A New Specific Polymeric Material for Mercury Speciation: Application to Environmental and Food Samples[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 897: 109-115.
- [4] CLARKSON T W, VYAS J B, BALLATORI N. Mechanisms of Mercury Disposition in the Body[J]. American Journal of Industrial Medicine, 2007, 50(10): 757-764.
- [5] OU L B, CHEN C, CHEN L, et al. Low-Level Prenatal Mercury Exposure in North China: An Exploratory Study of Anthropometric Effects[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(11): 6899-6908.
- [6] BRANCO V, CANÁRIO J, LU J, et al. Mercury and Selenium Interaction in Vivo: Effects on Thioredoxin Reductase and Glutathione Peroxidase[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2012, 52(4): 781-793.
- [7] RAFATI-RAHIMZADEH M, RAFATI-RAHIMZADEH M, KAZEMI S, et al. Current Approaches of the Management of Mercury Poisoning: Need of the Hour[J]. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 22(1): 46.
- [8] BRANCO V, CAITO S, FARINA M, et al. Biomarkers of Mercury Toxicity: Past, Present, and Future Trends[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health: Part B, 2017, 20(3): 119-154.
- [9] VIEIRA J C S, BRAGA C P, DE OLIVEIRA G, et al. Mercury Exposure: Protein Biomarkers of Mercury Exposure in Jaraqui Fish from the Amazon Region[J]. Biological Trace Element Research, 2018, 183(1): 164-171.
- [10] 蔡西玲, 曾虹燕, 蔡联辉, 等. Hg^{2+} 对木瓜蛋白酶的修饰作用及其动力学[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2013, 44(10): 3991-3997.
CAI Xiling, ZENG Hongyan, CAI Lianhui, et al. Modification Effect of Hg^{2+} on Papain and Its Kinetics[J]. Journal of Central South University (Science and Technology), 2013, 44(10): 3991-3997.
- [11] 张存滢, 曾虹燕, 熊龙斌, 等. 双金属 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 对木瓜蛋白酶活性与构象的影响[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2013, 44(6): 2207-2213.
ZHANG C Y, ZENG H Y, XIONG L B, et al. Effect of Bimetal Hg^{2+} and Cu^{2+} on Activity and Conformation of Papain[J]. Journal of Central South University(Science and Technology), 2013, 44(6): 2207-2213.
- [12] LIU X Y, ZENG H Y, LIAO M C, et al. Determination

- of the Kinetics and Influence of the Mercury Ion on Papain Catalytic Activity[J]. RSC Advances, 2015, 5(84): 68906–68913.
- [13] LIU X Y, ZENG H Y, LIAO M C, et al. Interaction of Mercury and Copper on Papain and Their Combined Inhibitive Determination[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 97: 125–131.
- [14] RIZVI S M D, SHAKIL S, HANEEF M. A Simple Click by Click Protocol to Perform Docking: AutoDock 4.2 Made Easy for Non-Bioinformaticians[J]. Excli Journal, 2013, 12: 831–857.
- [15] DRENTH J, JANSONIUDS J N, KOEKOEK R, et al. Structure of Papain[J]. Nature, 1968, 218(5145): 929–932.
- [16] MAMBOYA E A F. Papain, a Plant Enzyme of Biological Importance: A Review[J]. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2012, 8(2): 99–104.
- [17] KUMAGAI P S, ARAUJO A P U, LOPES J L S. Going Deep into Protein Secondary Structure with Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy[J]. Biophysical Reviews, 2017, 9(5): 517–527.
- [18] SREERAMA N, WOODY R W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set[J]. Analytical Biochemistry, 2000, 287(2): 252–260.
- [19] WAL S V D, CAPICCIOTTI C J, RONTOGIANNI S, et al. Synthesis and Evaluation of Linear CuAAC-Oligomerized Antifreeze Neo-Glycopeptides[J]. Medicinal Chemistry Communication, 2014, 5(8): 1159–1165.
- [20] FORLI S, HUEY R, PIQUE M E, et al. Computational Protein-Ligand Docking and Virtual Drug Screening with the AutoDock Suite[J]. Nature Protocols, 2016, 11(5): 905–919.

(责任编辑: 李玉华)

Study of the Inactivation Mechanism of Organomercury Compound on Papain

LIU Xueying^{1,2}, WANG Fan¹, HE Dongsheng¹, LI Min¹, CHEN Yinyan¹, DENG Yan^{1,2}, MA Liang^{1,2}

(1. College of Life Sciences and Chemistry, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China; 2. Hunan Key Laboratory of Biomedical Nanomaterials and Devices, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract: Trace amounts of heavy metal bindings in composite food packaging materials pose a serious threat to the health of consumers. In order to elucidate the effect and mechanism of heavy metal bindings on biological macromolecules, the structural changes of papain were investigated when its activity was almost inactivated as treated by chlormercuric benzoic acid (CMBA) of certain concentration. The secondary structure of the papain treated by 10^{-4} mol/L CMBA presented obvious changes. The content of α -helix of the treated papain decreased sharply from 43.4% to 4.2%, the content of β -sheet, β -turn and random coil increased from 12.7%, 16.0% and 27.2% to 40.0%, 19.6% and 36.2% respectively. The secondary structural components of the treated papain were almost transformed from $\alpha+\beta$ type to full β -type. The CMBA molecule induced the stretching of α -helix and structural dispersion together with conformation loosening, these all led to the destruction of the papain natural conformation and resulted in nearly complete inactivation of papain. The maximum fluorescence spectrum absorption peak of the treated papain showed a red shift of 7 nm and the intensity was reduced almost by a half, which might be caused by the embedding of tryptophan residues in the polar hydrophilic environment. The molecular modeling indicated that CMBA could bind with papain in the hydrophobic pocket and there was a hydrogen bond formed between CMBA and glycine (Gly) 66, while a hydrophobic bond formed between CMBA and tryptophan (Trp) 26 in the ligand-binding pocket, which was consistent with the results of spectral analysis results.

Keywords: organomercury compound; papain; inactivation mechanism