天然低共熔溶剂对绿色荧光蛋白的保护作用

李菲，王永华，蓝东明

（华南理工大学食品科学与工程学院，广东广州 510640）

摘要：天然低共熔溶剂（natural deep eutectic solvent，NADES）是一种新型的绿色环保溶剂，可应用于天然活性物质的提取及生物催化。本研究以绿色荧光蛋白（green flurescent protein，GFP）为模式蛋白，探究了不同 NADES 对 GFP 在 70 ℃下的稳定性的影响，发现氯化胆碱-山梨醇（Choline chloride sorbital，CS）对 GFP 在 70 ℃的热处理下荧光保留率最好；并探究了不同含水量的 CS 天然低共熔溶剂对 GFP 稳定性的影响，发现在含水量为 40%的 CS 天然低共熔溶剂中 GFP 的稳定性最佳；同时发现在含水量为 40%的 CS 天然低共熔溶剂体系下的 GFP 可以提高对 SDS 的耐受性，但对 H_2O_2 的耐受性的提高不明显；CS 天然低共熔溶剂也有利于提高脂肪酶 AOL 在 45 ℃下的的热稳定性。综上 CS 天然低共熔溶剂对蛋白质有良好的保护作用，在食品加工及生物催化领域具有潜在的应用前景。

关键词：低共熔溶剂；绿色荧光蛋白；蛋白质稳定性

文章篇号：1673-9078(2018)10-44-48 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.007

Protective Effect of Natural Deep Eutectic Solvent on Green Fluorescent Protein

LI Fei, WANG Yong-hua, LAN Dong-ming

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Natural deep eutectic solvent (NADES) is a new kind of “green” solvent, which can be applied to the extraction and biocatalysis of natural bioactive substances. In this study, green fluorescent protein (GFP) was used as a model protein for investigations on the protective effects of different NADESs on the stability of GFP at 70 ℃. It was found that the hightest fluorescence retention rate of GFP was in choline chloride sorbital (CS) under heat treatment at 70 ℃. The effect of the water content in CS NADES on the stability of GFP was examined, and CS NADES with a water content of 40% had the highest stability. CS NADES with 40% water content also enhanced the tolerance of GFP against SDS, but didn’t improve significantly the tolerance of GFP. CS NADES also contributed to the improvement of the thermal stability of lipase AOL at 45 ℃. In summary, CS NADESs provided a good protective effect on proteins and have application prospects in the fields of food processing and biocatalysis.

Key words: natural deep eutectic solvent; green fluorescent protein; protein stability

传统的有毒有害的有机溶剂不符合绿色环保的理念，而溶剂在食品以及生物催化领域具有非常重要的作用，所以人们对于新型的绿色溶剂的需求日益迫切。离子液体（ILs）是近年发展起来应用于生物催化的“绿色”溶剂[1]。离子液体（ILs）具有独特的性质，包括不可挥发性、良好的稳定性以及不可燃性等。但目前由季铵盐（如氯化胆碱和甜菜碱）和氢键供体（hydrogen bond donor，HBD）（如糖、多元醇和有机酸）形成的混合物即低共熔溶剂 DES（deep eutectic solvent，DES）有望代替“离子液体”[2]。因为 DES 不仅具有离子液体的优点，同时还兼具成本低、易制备、高度生物降解性以及生物相容性等特点，更符合“绿色化学”的理念[3,4]。DES 一个显著的特点是，其熔点通常低于组成 DES 的任何单一组分的熔点，这与 DES 体系中季铵盐的阴离子和氢键供体之间形成的氢键作用有关[5,6]。

天然低共熔溶剂（natural deep eutectic solvent，NADES）是指由生物体内的有机小分子如胆碱衍生物、醇类、糖类以及尿素等物质所形成的溶剂，这些小分子在微生物和动植物细胞中大量存在[7]。NADES 因其环保、无毒及生物相容性好的特性，广泛应用于天然活性成分的分离萃取。Dai 等[8]人发现红花中的酚类物质在天然低共熔溶剂中具有良好的萃取效果，萃取率在 75%~97%。Huang 等[9]人研究发现以氯化胆碱

收稿日期：2018-04-28

基金项目：国家自然科学基金项目（21406076）

作者简介：李菲（1992-），女，硕士研究生，研究方向：食品酶工程

通讯作者：蓝东明（1980-），男，博士，副研究员，研究方向：食品酶工程

为氢键供体合成的天然低共熔溶剂和皂苷协同作用可以高效去除水稻中的镉，镉在人体内累积会损害肾脏。另外，生物催化剂在低共熔溶剂中具有高效的催化表现。Xu 等[10]人利用 Novozyme 435 在天然低共熔溶剂中催化合成富含 n-3 PUFA 的甘油三酯的产率是无溶剂体系下的 1.2 倍，认为以低共熔溶剂作为溶剂是提高合成富含 n-3 PUFA 的甘油三酯的有效途径。天然低共熔溶剂不仅能够提高酶的催化效率，还可以提高酶蛋白的稳定性，延长其使用寿命[11]。

目前报道的 NADES 类型繁多，但仍缺乏可高效筛选对生物大分子具有保护作用的低共熔体系的方法。绿色荧光蛋白（green flurescent protein，GFP），最初从水母体内发现，其荧光活性与结构的变化具有相关性，可以作为筛选蛋白保护剂有效的探针蛋白。本文以 GFP 作为模式蛋白，通过研究 GFP 在不同类型的 NADES 中稳定性，筛选其中能够稳定蛋白质构象的 NADES，为天然活性物质的提取和生物催化应用提供合适的溶剂。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 BL21 用作绿色荧光蛋白（GFP）的表达宿主菌。甜菜碱，氯化胆碱，尿素，甘油，山梨醇和木糖醇购自阿拉丁化学有限公司（中国上海）。所有其他试剂均为分析级。

1.2 主要仪器

Cytation™ 5 酶标仪，美国 BioTek 公司；R-3 旋转蒸发仪，瑞士步琦有限公司；超纯水使用 Milli-Q 过滤系统（UNIQUE-R20）获得。

1.3 方法

1.3.1 GFP 的表达与纯化

将重组质粒 pET23a-CBD-GFP 分别转化到表达菌株 BL21（DE3），涂布 Amp 抗性的 LB 平板，过夜长出单克隆。每次从平板挑取单克隆于 5 mL LB 培养基过夜培养 12 h，接种于 400 mL LB 培养基，接种量为 1%。待菌液 OD_{600} 为 0.8 左右，降温至 20 ℃加终浓度为 0.1 mM 的 IPTG 诱导，诱导时间为 20 h。经过诱导表达后，用冷冻离心机离心（10000 r/min，15 min）发酵液收集菌体，用 PBS 缓冲液（20 mM，pH 7.4）重悬菌体，超声破碎后离心（10000 r/min，25 min）收集上清液，加入磷酸处理过的纤维素吸附 CBD-GFP 融合蛋白。再用 3C 蛋白酶消化处理 CBD-GFP 融合蛋白后，离心（10000 r/min，25 min）分离出 GFP 蛋白。通过 SDS-PAGE 电泳检测 GFP 的纯度，并利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒（上海生物生工公司）测定蛋白质浓度。

1.3.2 低共熔溶剂的制备

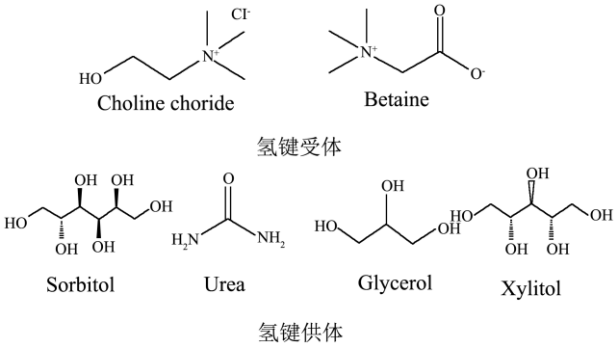


图 1 天然低共熔溶剂组分的结构

Fig.1 Structure of NADES component

按照一定摩尔比例称取氯化胆碱、甜菜碱和氢键供体（甘油、尿素、木糖醇和山梨醇）制备天然低共熔溶剂，如表 1 和图 1 所示。两种固体混合物置于旋转蒸发仪在 80 ℃溶解 0.5~4 h，直至变成透明的液体。制备好的 NADES 在室温冷却后保存在密封容器，存放在干燥器中。

表 1 实验所用的天然低共熔溶剂

Table 1 Natural deep eutectic solvent used in the experiment

编号	氢键受体	氢键供体	摩尔比
1	Choline chloride	Urea	1:2
2		Glycerol	1:2
3		Xylitol	1:1
4		Sorbital	1:1
5	Betaine	Urea	1:2:1（H_2O）
6		Glycerol	1:2
7		Xylitol	1:2
8		Sorbital	1:1:2（H_2O）

1.3.3 荧光检测

利用酶标仪测定 GFP 的荧光发射光谱（激发波长设定在 474 nm）。GFP 在不同 NADES 中于 70 ℃孵育 10 min，每隔 2.5 min 取样（200 μL）。为了监测热失活 GFP 的重折叠，将孵育后取的样品在室温下放置 15 min，每 10 s 检测样品中 GFP 荧光变化。以初始的荧光强度为 100%。

1.3.4 差示扫描量热法（DSC）分析

DSC 分析采用差示扫描量热仪（NETZSCH DSC 204 F1，德国）。将 34 mM 的 GFP 分别溶解于纯水、氯化胆碱溶液、山梨醇溶液以及氯化胆碱-山梨醇天然低共熔溶剂后置于铝盘，放入差示扫描量热仪中，以

10 ℃/min 的速率从 30 ℃升温到 90 ℃，确定 GFP 在不同溶剂中的熔点 Tm。

1.3.5 脂肪酶活力检测

将实验室自制的脂肪酶 AOL 酶粉溶解于含水量为 40%的 CS 天然低共熔溶剂中置于 45 ℃条件孵育 2 h，每隔 30 min 取样，在 35 ℃和磷酸盐（20 mM，pH 7）作为缓冲液条件下，以对硝基苯酚辛酸酯为底物，测定脂肪酶 AOL 的残留活力。

1.3.6 数据统计分析

用 Origin 8.5 软件作图并用 SPSS 9.0 进行统计学分析。

2 结果与讨论

2.1 不同 NADES 对 GFP 热稳定性的影响

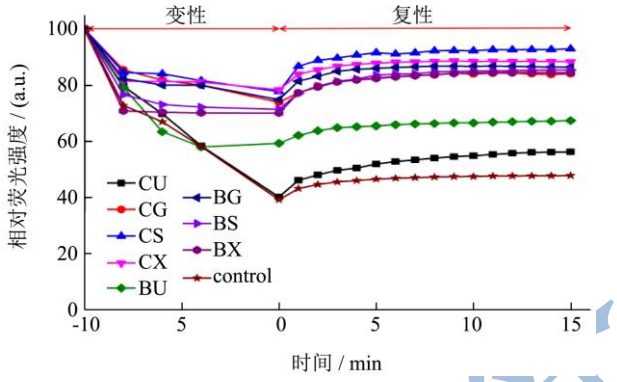


图 2 GFP 在不同天然低共熔溶剂中的热变性和复性

Fig.2 Thermal denaturation and renaturation of GFP in various NADES

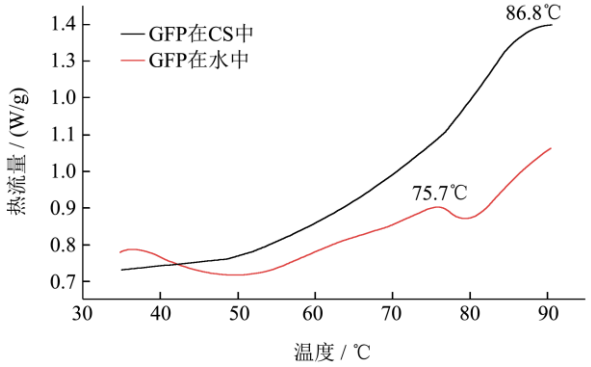


图 3 GFP 在水中和在 CS 天然低共熔溶剂中的 DSC 图谱

Fig.3 DSC spectra of GFP in water and CS NADES

胆碱类如甜菜碱，糖类如海藻糖，以及醇类如山梨醇、甘油和木糖醇都是常见的冻干保护剂，已经被证明对生物体内的蛋白质具有较好的稳定作用，所以被选择作为天然低共熔溶剂的组分[12]。GFP 的荧光与其结构折叠存在相关性，通过检测 GFP 在不同 NADES 中的荧光强度来反映其构象的变化，揭示不同 NADES 对 GFP 热稳定性的影响规律。结果如图 2 所示，不含 NADES 的 GFP 经过 70 ℃孵育后残留的相对荧光强度为 47%。氯化胆碱-甘油（CG）、氯化胆碱-木糖醇（CX）、甜菜碱-甘油（BG）、甜菜碱-山梨醇（BS）和甜菜碱-木糖醇（BX）这五种低共熔溶剂下的 GFP 残留的相对荧光强度为 84%~88%。氯化胆碱-山梨醇（CS）对 GFP 的保护作用最好，GFP 残留的相对荧光强度为 93%。含尿素的 NADES 对 GFP 的保护作用相对较差，GFP 的残留的相对荧光强度为 60%。推测是在高温环境下，DES 中的尿素分子游离出 NADES 的氢键网络，进而夺取 GPF 结构中的水分子，影响 GFP 结构导致其荧光强度减弱。Wu 等人研究了辣根过氧化物酶分别在 24 种低共熔溶剂中的酶活变化，发现辣根过氧化物酶都能较好的保持其活力[13]。

将经过高温孵育后的样品放置在室温，继续检测 GFP 的荧光强度变化，研究 GFP 结构在缓冲液和 NADES 中的重折叠现象。由图 2 中的复性过程可知，GFP 的结构在 NADES 和缓冲液中均可发生一定程度的重折叠过程，但是两者的效率没有明显的差异。

DSC 通常用作研究蛋白质大分子热力学性质。为了进一步证明 CS 是否可以增强 GFP 的耐热性，利用 DSC 方法分别测定 GFP 在 CS 天然低共熔溶剂和水中的 Tm 值。Tm 值反映了蛋白质发生聚集时的温度，此时蛋白质的结构会发生转变，所以蛋白质的热稳定性的提高与 Tm 的增加是密切相关的[14]。结果如图 3 所示，GFP 在 CS 天然低共熔溶剂中的 Tm 比在水中的 Tm 高 11 ℃，证实了 CS 天然低共熔溶剂有利于提高蛋白质热稳定性。Xin 等人发现溶菌酶在含水量为 50%的氯化胆碱-海藻糖天然低共熔溶剂中的 Tm 比水中提高了 10.4 ℃[15]。

2.2 NADES 含水量对 GFP 稳定性的影响

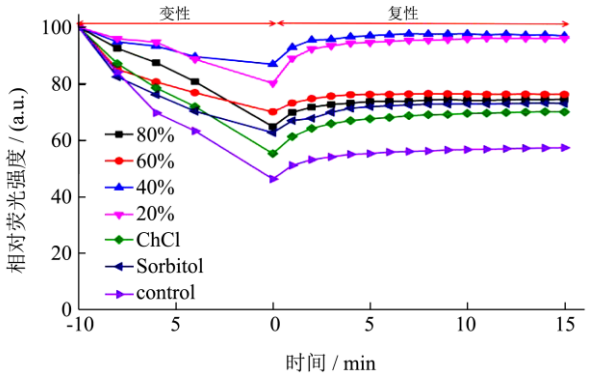


图 4 不同含水量的 CS 天然低共熔溶剂以及其单组份对 GFP 热稳定性的影响

Fig.4 Effect of CS NADES with various water content and single NADES components on GFP thermal stability

水分对 NADES 中的氢键的有一定的影响，因为水分子会削弱 DES 组分之间的相互作用从而破坏 NADES 的氢键网络[15,16]。考察 GFP 在含水量为 0%、20%、40%、60%、80%的 CS 低共熔溶剂以及单组份 ChCl 和 Sorbitol 中的热稳定性。如图 4 所示，GFP 在含水量为 20%和 40%的 CS 天然低共熔溶剂中，70 ℃孵育 10 min 后的残留的相对荧光强度都在 90%左右，而在含水量为 60%和 80%的相同处理条件下残留的相对荧光强度为 64%和 70%。

进一步探究低共熔溶剂单组份是否对蛋白质稳定性具有类似的保护作用的影响，研究了 GFP 在与 40%含水量的 CS 低共熔溶剂相同浓度的单组份氯化胆碱和山梨醇溶液中的热失活现象。由图 4 可知，在 70 ℃孵育 10 min 后，GFP 在单组份氯化胆碱和山梨醇溶液中的残留相对荧光强度分别为 55%和 62%，高于对照组即在缓冲液中的残留相对荧光强度，同时低于在含水量为 40%的 CS 天然低共熔溶剂中的残留相对荧光强度。

2.3 NADES 对 GFP 耐受 SDS 和 H_2O_2 的影响

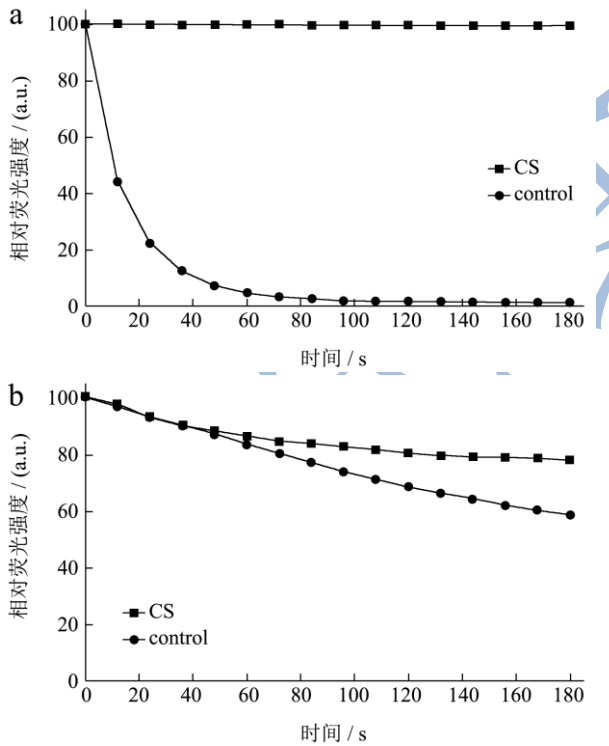


图 5 SDS（a）和 H_2O_2（b）对于 CS 天然低共熔溶剂中的 GFP 稳定性的影响

Fig.5 Effects of SDS(a) and H_2O_2(b) on the GFP stabilization in presence of CS NADES

除了温度，化学试剂如金属离子、有机溶剂、氧化物以及表面活性剂对于蛋白质稳定性有也影响。为了探究 CS 低共熔溶剂是否对蛋白质耐受化学物质的能力有影响，测定了再加入 SDS 和 H_2O_2 后，在含水量为 40%的 CS 低共熔溶剂中的 GFP 的荧光变化，对照组为在不加 NADES 的缓冲液中的 GFP。图 5（a）和（b）所示，在 1%的 SDS 中孵育 3 min 后，GFP 的荧光强度没有发生降低，而对照组中的 GFP 的荧光强度在 2 min 内完全丧失，表明 CS 天然低共熔溶剂具有增强 GFP 耐受 SDS 的能力。加入浓度为 0.97 M 的 H_2O_2 的 3 min 后，在 CS 低共熔溶剂的 GFP 残留原始荧光强度的 80%，对照组残留原始荧光强度的 60%，表明在 CS 天然低共熔溶剂中的 GFP 耐受 H_2O_2 的能力没有很明显的提升。

2.4 NADES 对脂肪酶 AOL 热稳定性的影响

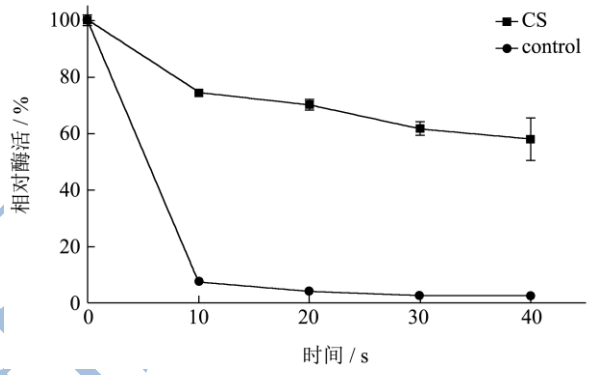


图 6 在 CS 天然低共熔溶剂中的脂肪酶 AOL 在 45 ℃下的热稳定性

Fig.6 Incubation of AOL at 45 ℃ in the presence of CS NADES

CS 天然低共熔溶剂对 GFP 具有保护作用，但对于其他蛋白质特别是酶蛋白是否具有相同的保护效果值得深入探究。脂肪酶是工业生物技术领域应用最为广泛的酶制剂，因此选择来源于米曲霉的脂肪酶 AOL 作为模式酶，探究其在 CS 天然低共熔溶剂热稳定性情况。结果如图 6 所示，在 45 ℃孵育 40 min 后，CS 天然低共熔溶剂中的脂肪酶 AOL 残留活力为 60%，而不加低共熔溶剂的脂肪酶 AOL 的活力在 10 min 内丧失 90%，所以 CS 天然低共熔溶剂同样对脂肪酶具有保护作用，能够提高脂肪酶的热稳定性，有利于脂肪酶 AOL 应用于生物催化反应。

3 结论

本文以 GFP 为模式蛋白，研究了其在不同 NADES 中的热稳定性，发现了 CS 天然低共熔溶剂对 GFP 具有良好的保护作用，且 CS 天然低共熔溶剂的含水量会对 GFP 热稳定性的影响，含水量为 40%的 CS 天然低共熔溶剂稳定蛋白质的效果最好。同时 CS 天然低共熔溶剂可以提高 GFP 对 SDS 的耐受性，对 H_2O_2 的耐受性影响不大，同时对脂肪酶 AOL 具有稳

定作用。所以 CS 天然低共熔溶剂不仅对蛋白质具有保护作用，同时对于细胞系的生长没有明显毒副作用，在食品加工及生物催化领域将有广泛的应用前景。

参考文献

[1] 陈小芬,彭延庆.低共熔溶剂在绿色合成和组合化学中的应用[J].上海化工,2008,33(10):10-13
CHEN Xiao-fen, PENG Yan-qing. Application of deep eutectic solvents in green synthesis and combinatorial chemistry [J]. Shanghai Chemical, 2008, 33(10): 10-13

[2] Abbott A P, Boothby D, Capper G, et al. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids [J]. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(29): 9142-9147

[3] Mbous Y P, Hayyan M, Hayyan A, et al. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering-promises and challenges [J]. Biotechnology Advances, 2016, 35(2): 105-134

[4] Juneidi I, Hayyan M, Hashim M A. Evaluation of toxicity and biodegradability of cholinium-based deep eutectic solvents [J]. Rsc Advances, 2015, 5(102): 83636-83647

[5] Clouthier C M, Pelletier J N. Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis [J]. Chemical Society Reviews, 2012, 41(4): 1585-1605

[6] Zhang Q, De OVK, Royer S, et al. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications [J]. Chemical Society Reviews, 2012, 41(21): 7108-7146

[7] Choi Y H, Spronsen J V, Dai Y, et al. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? [J]. Plant Physiology, 2011, 156(4): 1701-1705

[8] Dai Y, Witkamp G J, Verpoorte R, et al. Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *carthamus tinctorius* L [J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(13): 6272-6278

[9] Huang Y, Feng F, Chen Z G, et al. Green and efficient removal of cadmium from rice flour using natural deep eutectic solvents [J]. Food Chemistry, 2018, 244: 260-265

[10] Xu L, Zhang L, Li D, et al. Deep eutectic solvents enable the enhanced production of n-3 PUFA-enriched triacylglycerols [J]. European Journal of Lipid Science & Technology, 2017, 119(12): 1700062

[11] Sanchezfernandez A, Edler K J, Arnold T, et al. Protein conformation in pure and hydrated deep eutectic solvents [J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2017, 19(13): 8667-8670

[12] Dai Y, Van S J, Witkamp G J, et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology [J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 766(5): 61-68

[13] Wu B P, Wen Q, Xu H, et al. Insights into the impact of deep eutectic solvents on horseradish peroxidase: activity, stability and structure [J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2014, 101(5): 101-107

[14] Fujita K, Macfarlane D R, Forsyth M. Protein solubilising and stabilising ionic liquids [J]. Chemical Communications, 2005, 38(38): 4804

[15] Xin R, Qi S, Zeng C, et al. A functional natural deep eutectic solvent based on trehalose: Structural and physicochemical properties [J]. Food Chemistry, 2017, 217: 560-567

[16] Zeng C X, Qi S J, Xin R P, et al. Synergistic behavior of betaine-urea mixture: formation of deep eutectic solvent [J]. Journal of Molecular Liquids, 2016, 219: 74-78