

采用 SDS 研究泥蚶血红蛋白(Tg-Hb II)具有过氧化物酶及抗菌活性的结构基础

濮丽丽¹, 王诗怡², 林志华^{2,3}, 王素芳^{2,3}, 包永波^{2,3}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 2. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315100; 3. 浙江万里学院宁海海洋生物种业研究院, 浙江 宁海 315604)

摘要: 泥蚶血红蛋白(Tg-Hb II)除了具有携氧功能外, 还具有过氧化物酶活性和抗菌活性。本文采用分光光度法、光谱法和分子对接等技术研究了十二烷基硫酸钠(SDS)对 Tg-Hb II 的结构、过氧化物酶活性及抗菌活性的影响, 以探讨 Tg-Hb II 具有过氧化物酶活性及抗菌活性的结构基础。研究结果显示, SDS 的疏水烷基长链可嵌入到 Tg-Hb II 血红素口袋内部, 与近端 His104 形成氢键, 断裂血红素铁与 His104 的配位键, 使 Tg-Hb II 的 Soret 带吸收峰降低并发生位移; 此外, SDS 还可与血红素口袋中的氨基酸形成疏水相互作用, 改变血红素口袋原有结构, 使得部分疏水氨基酸暴露, 导致外源荧光强度增强, 最大发射波长红移。SDS 可以抑制 Tg-Hb II 的过氧化物酶活性, 当 SDS 浓度为 2 mmol·L⁻¹ 时, Tg-Hb II 的酶活性仅为原来的 20%, 在琼脂扩散实验中失去对枯草芽孢杆菌的抗菌活性。以上结果表明, SDS 通过破坏血红素口袋的内部结构抑制 Tg-Hb II 的过氧化物酶活性, 使其失去抗菌活性, 血红素疏水口袋是 Tg-Hb II 具有过氧化物酶活性和抗菌活性的关键结构。本研究为进一步研究 Tg-Hb II 的抗菌机理奠定基础。

关键词: 泥蚶血红蛋白; 十二烷基硫酸钠; 过氧化物酶活性; 抗菌活性; 血红素口袋

中图分类号: Q816 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2024)2-0024-08

DOI: 10.11759/hyxx20220924001

血红蛋白(hemoglobin, Hb)是自然界分布最广的一类血红素蛋白, 存在于脊椎动物和部分无脊椎动物中^[1-2], 并发挥多种生物学功能, 如运输氧气和二氧化碳、运输硫化物、调节酸碱平衡、维持渗透压、过氧化物酶活性、抗菌作用等^[3-7]。目前已发现, 牛^[8]、人^[9]、鳄鱼(*Alligator*)^[10]、马^[10]、蛇^[10]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[11]、毛蚶(*Scapharca kagoshimensis*)^[12]和泥蚶(*Te-gillarca granosa*)^[13]等多个物种的 Hb 均有抗菌作用, 对革兰氏阴性的大肠杆菌(*Escherichia coli*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)和革兰氏阳性的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*), 以及真菌白色念珠菌(*Candida albicans*)表现出抗菌活性。从 1958 年科学家就陆续发现脊椎动物 Hb 的抗菌活性, 由于脊椎动物具有完善的免疫系统, 在当时及后来很长的一段时间内 Hb 的抗菌作用并没有引起人们的重视。无脊椎动物 Hb 的抗菌活性起步较晚, 虽然日益受到重视, 但是对于抗菌机理的研究还不够深入。

2002 年, Kawano 等^[14]发现人 Hb 能够催化一元胺的氧化, 首次提出人 Hb 具有类似过氧化物酶的催化活性。随后, 细菌 Hb^[15]、泥蚶血红蛋白(*T. granosa*

hemoglobin, Tg-Hb)^[16]的过氧化物酶活性被陆续报道。Jiang 等^[17-18]检测到人 Hb 具有过氧化物酶活性且能产生超氧阴离子 O₂⁻后, 推测人 Hb 可利用其过氧化物酶活性催化产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)发挥抗菌作用。Qin 等^[11]、Du 等^[19]研究发现微生物毒力因子(微生物胞外蛋白酶和病原体相关分子模式)能激活 Hb 的过氧化物酶活性, 促进 O₂⁻的生成。Wang 等^[20]研究发现, Cu²⁺抑制泥蚶同源二聚体 Hb (Tg-Hb I)的过氧化物酶活性时, 能使其失去抗

收稿日期: 2022-09-24; 修回日期: 2023-03-06

基金项目: 浙江省重点自然科学基金项目(LZ20C190001); 浙江省科技重大专项(2021C02069-7); 宁波市公益研究重点项目(2021S014); 浙江省生物工程重中之重学科项目(CX2021001)和浙江省高校基本科研业务费项目

[Foundation: Key Natural Science Foundation of Zhejiang Province, No. LZ20C190001; Major Science and Technology Projects of Zhejiang Province, No. 2021C02069-7; Ningbo Public Benefit Research Key Project, No. 2021S014; Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Biological Engineering, No. CX2021001, and Basic Scientific Research Operating Expense Project of Zhejiang Provincial Universities]

作者简介: 濮丽丽(1997—), 女, 浙江嘉兴人, 硕士研究生, 主要从事水产免疫学研究, E-mail: leeyapo@163.com; 王素芳(1977—), 通信作者, 女, 山东单县人, 教授, E-mail: wangsuofang@zvu.edu.cn; 包永波(1980—), 通信作者, 男, 浙江宁波人, 研究员, E-mail: bobbao2001@gmail.com

菌活性。这些研究结果提示, Hb 的抗菌活性可能与其过氧化物酶活性有关。

贝类不具有特异性免疫, 血细胞在贝类免疫中发挥着至关重要的作用, 是贝类体内抵御外来病原微生物侵袭的主要“屏障”^[21]。泥蚶是一类比较特殊的血液中含 Hb 的蚶科贝类, 红细胞约占泥蚶血液总细胞数的 90% 以上, 而 Tg-Hb 占泥蚶血细胞可溶性蛋白的 92.4%, 作者推测 Tg-Hb 可能在泥蚶的非特异性免疫中发挥着重要作用。泥蚶含有同源四聚体(Tg-Hb I)和异源四聚体(Tg-Hb II)两种 Hb, Tg-Hb II 约占 Tg-Hb 总量的 60%, 是 Tg-Hb 的主要成分^[22]。本文以 Tg-Hb II 为研究对象, 采用十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)研究 Tg-Hb II 具有过氧化物酶活性和抗菌活性的结构基础, 为进一步研究 Tg-Hb II 的抗菌机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

泥蚶取自宁海海洋与渔业科技创新养殖基地, 参照文献^[22-23]报道的方法分离得到电泳纯 Tg-Hb II。枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) ATCC 6633 由浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室保存。

1.2 SDS 对 Tg-Hb II 过氧化物酶活性的影响

采用连续分光光度法测定过氧化物酶活性^[24]。以含 4 mmol·L⁻¹ 愈创木酚(Sigma-Aldrich, 美国)与 2 mmol·L⁻¹ 过氧化氢(Aladdin, 中国上海)的 0.01 mol·L⁻¹ PBS 缓冲液(pH7.2)为底物溶液, 控温 25 °C。用 PBS 缓冲液配制不同浓度的 SDS (Solarbio, 中国北京)溶液, 分别与 Tg-Hb II 等体积混合, 使得 SDS 的终物质的量浓度分别为 0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 mmol·L⁻¹, 混匀置于 25 °C 水浴孵育 2 h。向比色皿中加入 1 mL 预热好的底物溶液和 10 μL 孵育混合物, 立即混匀。利用 Cary 100 型紫外分光光度计(Agilent, 美国)在 25 °C、470 nm 处使用动力学模式连续监测 60 s 内的吸光度变化。以每分钟 A_{470nm} 变化 0.001 所需要的酶量定义为一个酶活力单位。重复测定 3 次, 取平均值。未经 SDS 处理的 Tg-Hb II 的酶活为 100%, 计算各实验组的相对酶活, 以 Tg-Hb II 的相对过氧化物酶活性对 SDS 浓度作图。

1.3 SDS 对 Tg-Hb II 抗菌活性的影响

采用琼脂扩散法测定 SDS 对 Tg-Hb II 抗菌活性的影响^[25]。将 SDS 与 Tg-Hb II 等体积混合, 使得 SDS 的终浓度为 2 mmol·L⁻¹, 同时将 2 mmol·L⁻¹ 的 SDS 溶液作

为阴性对照, 另取 PBS 缓冲液和 Tg-Hb II 的等体积混合液作为阳性对照, 分别置于 25 °C 下孵育 2 h。吸取枯草芽孢杆菌菌悬液(10⁶ cfu·mL⁻¹)100 μL 滴加至 LB 固体琼脂平板上, 用涂布棒均匀涂布, 作为菌层。在每个平板中以等距离垂直放置 3 个牛津杯, 分别加入 100 μL 上述孵育混合物于相应的牛津杯中, 做好标记, 在 37 °C 恒温培养箱(Yilin, 中国上海)中培养 18 h 后, 取出观察牛津杯周围的抑菌圈并拍照, 每组重复 3 次。

1.4 SDS 对 Tg-Hb II 内源荧光光谱的影响

将不同浓度 SDS 溶液与 Tg-Hb II 等体积混合, 使 SDS 的终物质的量浓度分别为 0、0.5、1.0、2.0、3.0 和 4.0 mmol·L⁻¹, 置于 25 °C 水浴 2 h。吸取上述混合液 1 mL 于石英比色皿中, 使用 F-4500 型荧光分光光度计(Hitachi, 日本)进行扫描, 设置激发波长为 280 nm, 激发和发射狭缝宽度均为 10 nm, 扫描速率为 1 200 nm/min, 用不含 Tg-Hb II 的 PBS 缓冲液进行基线校正后在 300~400 nm 进行内源荧光光谱扫描。每个样品重复测定 3 次, 取平均值。

1.5 SDS 对 Tg-Hb II 外源荧光光谱的影响

以 8-苯氨基-1-萘磺酸(ANS)为荧光探针检测 SDS 对 Tg-Hb II 表面疏水性的影响。将不同浓度的 SDS 溶液与 Tg-Hb II 等体积混合, 使 SDS 的终物质的量浓度分别为 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 mmol·L⁻¹, 置于 25 °C 水浴孵育 1.5 h 后, 分别取上述混合液 1 mL, 在避光条件下加入 3 μL 40 μmol·L⁻¹ 的 ANS (Sigma-Aldrich, 美国)溶液, 避光孵育 30 min。利用 F-4500 型荧光分光光度计以波长扫描方式测定外源荧光发射光谱, 设置激发波长为 390 nm, 发射波长扫描范围为 300~400 nm, 激发和发射狭缝宽度均为 10 nm, 扫描速率为 1 200 nm/min。实验重复 3 次, 取平均值。

1.6 SDS 对紫外-可见吸收光谱的影响

将不同浓度的 SDS 溶液与 Tg-Hb II 等体积混合, 使得 SDS 的终物质的量浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mmol·L⁻¹, 置于 25 °C 水浴孵育 2 h 后, 利用 Cary 100 型紫外分光光度计记录 250~600 nm 波长范围内的紫外-可见吸收光谱。以不含 Tg-Hb II 的溶液作为参比溶液。每组重复测定 3 次, 取平均值。

1.7 分子对接

分子对接技术能从分子层面上明确 SDS 与 Tg-Hb II 之间的作用模式。以不等壳毛蚶(*Scapharca inaequivalvis*)Hb II 的 X 射线晶体结构(PBD ID: 4hrr)为模板,

运用 Swiss-Model 在线软件(<http://swissmodel.expasy.org/>)对 Tg-Hb II 进行同源建模, 预测其三级结构。从蛋白质结构数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) SDS(PDB)获取 SDS 的三级结构(PDB ID: 4ib8)。运用 AutoDock 4.2 软件对 Tg-Hb II 与 SDS 进行分子对接^[26]。根据化合物稳定结构能量最低的原则, 从对接结果中选择最佳对接模型。运用 PyMOL 2.5 软件对 Tg-Hb II 和 SDS 对接结果的最优构象进行可视化分析, 利用 LigPlot 软件展示 Tg-Hb II 与 SDS 相互作用的二维图像。

2 结果

2.1 SDS 对 Tg-Hb II 过氧化物酶和抗菌活性的影响

低浓度的 SDS 能抑制 Tg-Hb II 的过氧化物酶活性, 且随着 SDS 浓度的增大, Tg-Hb II 的相对过氧化物酶活性逐渐降低。当 SDS 物质的量浓度为 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其相对酶活性仅为原酶活性的 20%; 当 SDS 物质的量浓度大于 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, Tg-Hb II 的过氧化物酶活性缓慢下降, 直至失去活性(图 1)。Tg-Hb II 对枯草芽孢杆菌有抗菌活性, 在牛津杯的周围形成透明的抑菌圈; 用 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS 处理 Tg-Hb II 后, 失去抗菌能力, 抑菌圈消失(图 2)。可见, $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS 对 Tg-Hb II 的抗菌活性具有抑制作用, 可能是因为它可以抑制 80% 的过氧化物酶活性。

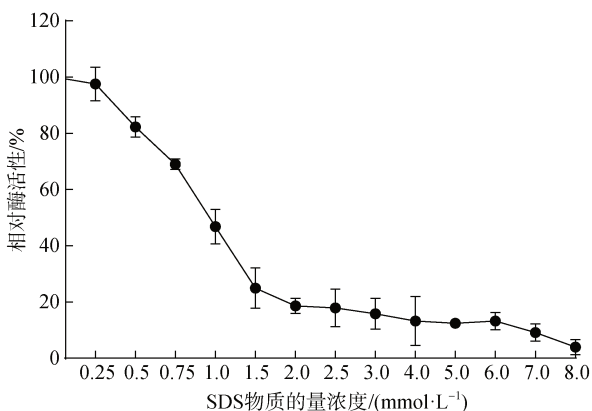


图 1 十二烷基硫酸钠 (SDS) 对 Tg-Hb II 过氧化物酶活性的影响

Fig. 1 Effects of SDS on the peroxidase activity of Tg-Hb II

2.2 SDS 对 Tg-Hb II 荧光光谱的影响

Tg-Hb II 的内源荧光主要来源于色氨酸(Trp)残基。随着 SDS 浓度的增加, Tg-Hb II 的内源荧光强度逐渐增强, 同时最大发射波长从 331 nm 蓝移至 323 nm (图 3), 说明 SDS 与 Tg-Hb II 结合使 Trp 残基所处微环境的极性

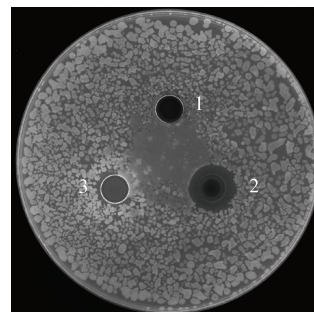
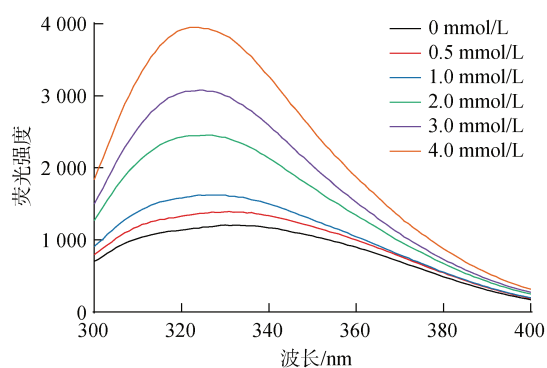
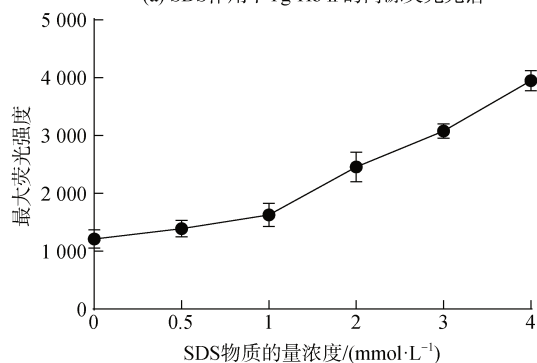


图 2 SDS 对 Tg-Hb II 抗菌活性的影响

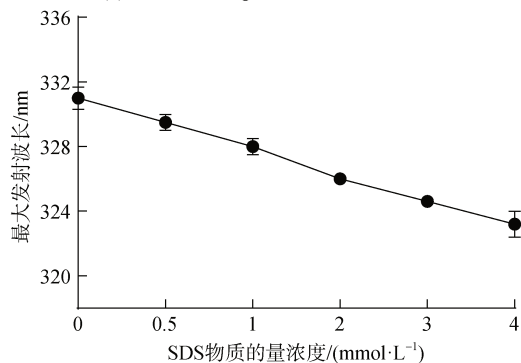
Fig. 2 Effects of SDS on the antibacterial activity of Tg-Hb II
注: 1. $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS; 2. Tg-Hb II; 3. Tg-Hb II 和 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS 的混合溶液



(a) SDS 作用下 Tg-Hb II 的内源荧光光谱



(b) SDS 作用下 Tg-Hb II 的最大内源荧光强度

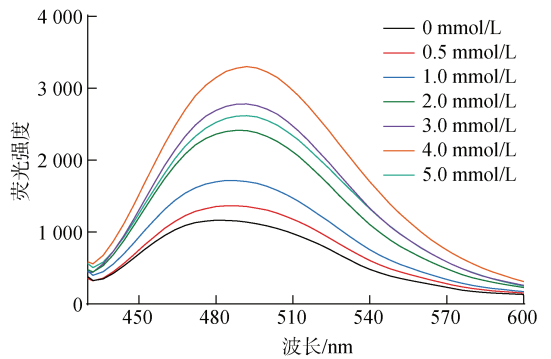


(c) SDS 作用下 Tg-Hb II 的最大发射波长

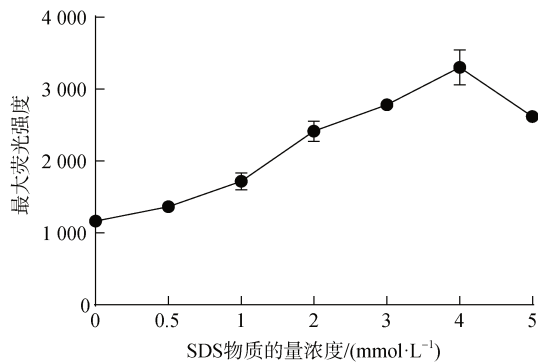
图 3 SDS 对 Tg-Hb II 内源荧光光谱的影响

Fig. 3 Effects of SDS on the intrinsic fluorescence spectra of Tg-Hb II

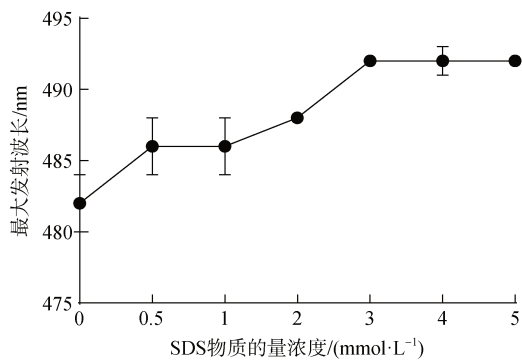
减弱。ANS 是用于检测蛋白表面疏水性的阴离子型疏水荧光探针，当其结合到疏水区域时荧光增强。外源荧光结果显示，随着 SDS 物质的量浓度的增加，最大发射波长从 482 nm 红移至 492 nm，当 SDS 物质的量浓度为 4 mmol·L⁻¹ 时，ANS 的荧光发射强度达到最大值，进一步增加 SDS 浓度至物质的量 5 mmol·L⁻¹ 时，ANS 荧光强度略有下降(图 4)。



(a) SDS作用下Tg-Hb II的外源荧光光谱



(b) SDS作用下Tg-Hb II的最大外源荧光强度



(c) SDS作用下Tg-Hb II的最大发射波长

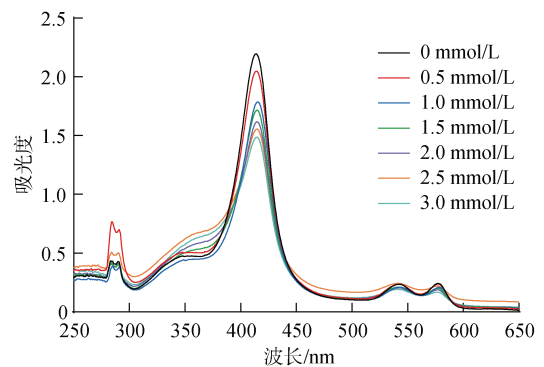
图 4 SDS 对 Tg-Hb II 外源荧光光谱的影响

Fig. 4 Effects of SDS on the extrinsic fluorescence spectra of Tg-Hb II

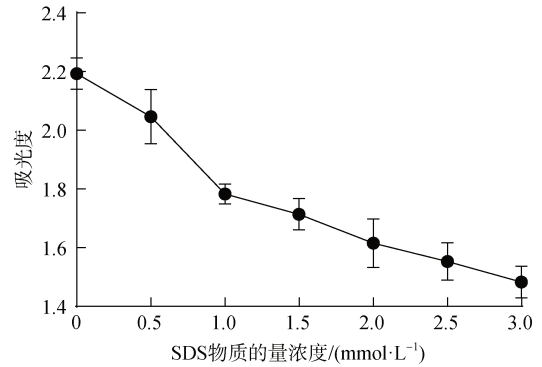
2.3 SDS 对 Tg-Hb II 紫外-可见吸收光谱的影响

Tg-Hb II 在 250~650 nm 范围内有 3 个特征吸收峰，

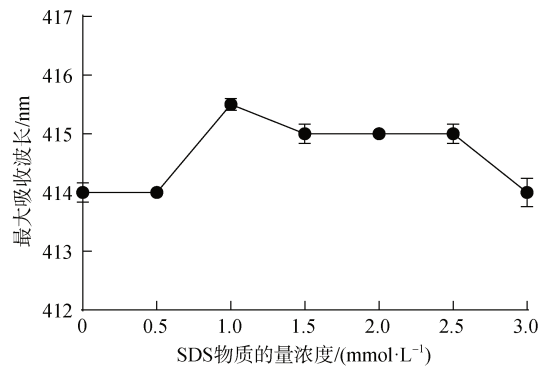
其中位于 414 nm 处的 Soret 吸收带是由血红素与组氨酸 (His) 配位形成的，通常用于表征卟啉环与蛋白质构象的变化，在 500~600 nm 的 Q 带与 Tg-Hb II 血红素辅基周围微环境的变化相关。随着 SDS 浓度的增大，Soret 带吸收峰的强度逐渐降低，最大吸收峰在 1 mmol·L⁻¹ SDS 的存在下红移至 416 nm，当 SDS 物质的量浓度增加至 3 mmol·L⁻¹ 时，最大吸收峰从 416 nm 蓝移至 414 nm 处(图 5)。此外，Q 带的吸收强度随 SDS 浓度的增加而减弱并且峰形发生变化。可见，SDS 分子渗透到 Tg-Hb II 疏水口袋附近的卟啉配合物，直接作用于血红素辅基，但未能使血红素未从 Tg-Hb II 肽链上解离。



(a) SDS作用下Tg-Hb II的紫外-可见吸收光谱



(b) SDS作用下Tg-Hb II的最大吸光度



(c) SDS作用下Tg-Hb II的最大吸收波长

图 5 SDS 对 Tg-Hb II 紫外-可见吸收光谱的影响

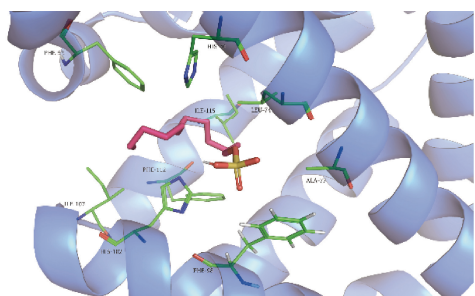
Fig. 5 Effects of SDS on the UV-Vis absorption spectra of Tg-Hb II

2.4 分子对接模拟

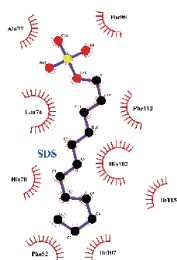
通过分子对接模拟预测了 SDS 与 Tg-Hb II α 、Tg-Hb II β 之间结合的最优能量构象, 最低结合能分别为 -2.12 kcal/mol、 -2.17 kcal/mol。从分子对接结果可知, SDS 能稳定结合于 Tg-Hb II α 的血色素疏水腔, 其疏水性十二烷基长链与疏水腔周围的 Phe52、His70、Leu74、Ala77、Phe98、His102、Ile107、Phe112 和 Ile115 形成疏水相互作用(图 6)。Tg-Hb II β 中有 8 个氨基酸参与和 SDS 的相互作用, 其中以疏水作用力结合的残基包括 Phe54、His72、Leu76、Arg107、Ile109、Phe114 和 Ile117, 近端 His104 则与 SDS 的磺酸头基形成一个键长为 2.70 Å 的氢键(图 7), 加强了 SDS 与 Tg-Hb II β 间的结合能力。可见, SDS 能破坏 Tg-Hb II 的疏水相互作用, 断裂血红素与近端 His 之间的配位键。

3 讨论

Tg-Hb II 是由两个 α 亚基和两个 β 亚基构成的异源四聚体, 其亲水性氨基酸常位于分子表面, 而疏水性氨基酸残基埋藏在分子内部形成疏水性口袋, 血红素位于口袋里。已有研究表明, Tg-Hb 的血红素口袋与天然过氧化物酶(辣根过氧化物酶、髓过氧化物酶)的活性位点具有高度相似性, 包括 b 型血红素、近端 His、远端 His 和精氨酸(Arg)^[16, 27]。

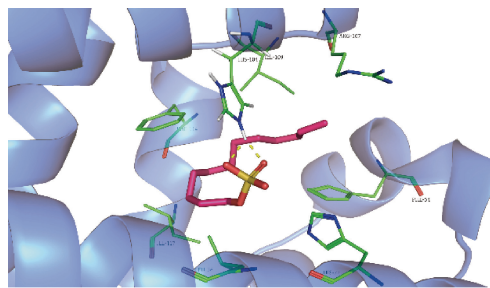


(a) SDS与Tg-Hb II α 的三维分子对接图像

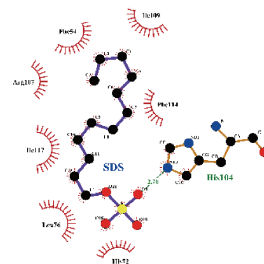


(b) SDS与Tg-Hb II α 周围残基相互作用的二维示意图

图 6 SDS 与 Tg-Hb II α 的分子对接
Fig. 6 Molecular docking of SDS and Tg-Hb II α



(a) SDS与Tg-Hb II β 的三维分子对接图像



(b) SDS与Tg-Hb II β 周围残基相互作用的二维示意图

图 7 SDS 与 Tg-Hb II β 的分子对接
Fig. 7 Molecular docking of SDS and Tg-Hb II β

SDS 是一类含有疏水烷基长链和亲水性磺酸头基的阴离子表面活性剂, 是研究蛋白质结构与功能关系的常用试剂^[28-29]。本研究利用光谱法和分子对接技术检测到 SDS 优先作用于 Tg-Hb II 的血红素疏水口袋。一方面, SDS 的十二烷基长链插入 Tg-Hb II 的疏水空腔并通过疏水相互作用与内部氨基酸侧链结合, 导致疏水作用被破坏和疏水性氨基酸外露, 使表面疏水性增加, ANS 结合增多, 因此 SDS ($0.5\sim 4$ mmol·L⁻¹) 的加入增强了 ANS 荧光强度并使最大发射波长红移。SDS 浓度增至 5 mmol·L⁻¹ 时反而使 ANS 荧光强度减弱, 可能是高浓度的 SDS 除了结合血红素口袋外, 还结合了 Tg-Hb II 表面的疏水氨基酸, 导致结合的 ANS 数量减少。这与文献报道的 SDS 可与 ANS 竞争与蛋白表面结合从而使部分 ANS 被释放到极性环境中导致 ANS 结合减弱的结果相一致^[30-31]。另一方面, SDS 的磺酸头基与近端 His104 以氢键结合, 引起血红素与近端 His 之间配位键的断裂, 因此, 在紫外光谱中观察到 Soret 带吸收强度减弱且吸收峰位移。近端 His ($\alpha 102$ -His、 $\beta 104$ -His) 和远端 His ($\alpha 70$ -His、 $\beta 72$ -His) 是已知的位于 Tg-Hb II 活性口袋中参与催化反应的氨基酸残基^[16], 这 4 个 His 均参与了与 SDS 的相互作用, 其中有 3 个 His 与 SDS 形成疏水相互作用。酶促反应通常在有利于酶与底物相互作用疏水环境中进行^[32]。据此可以推断, SDS 主要作用于 Tg-Hb II 的血红素口袋结构而改变过氧

化物酶催化反应的疏水微环境,使过氧化物酶活性降低或丧失。这与已有研究证明的细胞色素 C 的过氧化物酶活性变化与蛋白展开过程中血红素部分的暴露有关一致^[33]。另有报道,脯氨酸(Pro)通过保护 Tg-Hb II 的血红素口袋结构免受 Cu²⁺的影响,从而使其维持一定的过氧化物酶活性和抗菌活性^[34]。可见,血红素口袋可能是维持 Tg-Hb II 的过氧化物酶活性所需的关键结构。

研究发现,具有过氧化物酶活性的 Hb 能催化产生 ROS 起到灭菌作用^[35-36]。当 SDS 浓度为 2 mmol·L⁻¹ 时, Tg-Hb II 的血红素疏水口袋结构因被破坏而失去其过氧化物酶活性,此时 Tg-Hb II 丧失了对枯草芽孢杆菌的抗菌活性(图 2),说明 Tg-Hb II 的抗菌活性与其过氧化物酶活性有关。这与毛蚶血红蛋白(*Scapharca subcrenata* hemoglobin, Ss-Hb)发挥抗菌作用的机制可能与其过氧化物酶活性催化产生 ROS 有关基本一致^[25]。因此,本研究结果进一步证实了 Tg-Hb II 是利用其过氧化物酶活性发挥抗菌作用。

4 结论

综上所述, SDS 的疏水长链和极性头基与 Tg-Hb II 血红素疏水腔内的氨基酸残基相互作用,改变血红素活性中心必需氨基酸所处的微环境,破坏了维持蛋白分子构象的疏水作用,导致 Tg-Hb II 的空间构象发生变化,进而使 Tg-Hb II 失去过氧化物酶活性及抗菌活性。因此, Tg-Hb II 的血红素疏水口袋对维持其构象和活性至关重要,是 Tg-Hb II 发挥过氧化物酶活性和抗菌活性的结构基础。本研究结果为阐明 Tg-Hb II 通过其过氧化物酶活性发挥抗菌作用提供了可信依据,为深入研究 Tg-Hb II 的抗菌机理奠定基础。

参考文献:

[1] HARDISON R C. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(12): 5675-5679.

[2] WEBER R E, VINOGRADOV S N. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations[J]. Physiological Reviews, 2001, 81(2): 569-628.

[3] COOPER C E, SILAGHI-DUMITRESCU R, RUKENGWA M, et al. Peroxidase activity of hemoglobin towards ascorbate and urate: a synergistic protective strategy against toxicity of hemoglobin-based oxygen carriers (HBOC)[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2008, 1784(10): 1415-1420.

[4] COATES C J, DECKER H. Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2017, 74(2): 293-317.

[5] ANDERSON H L, BRODSKY I E, MANGALMURTI N S. The evolving erythrocyte: red blood cells as modulators of innate immunity[J]. The Journal of Immunology, 2018, 201(5): 1343-1351.

[6] 樊廷俊, 徐彬, 荆昭, 等. 动物血红蛋白结构与功能的研究进展[J]. 山东大学学报(理学版), 2011, 46(7): 1-6.

FAN Tingjun, XU Bin, JING Zhao, et al. Research advances on structure and function of animal hemoglobin[J]. Journal of Shandong University (Natural Science), 2011, 46(7): 1-6.

[7] 汪青, 项荣花, 包永波, 等. 动物血红蛋白研究进展[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2011, 24(2): 20-24.

WANG Qing, XIANG Ronghua, BAO Yongbo, et al. Research progress in animal hemoglobin[J]. Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition), 2011, 24(2): 20-24.

[8] HOBSON D, HIRSCH J G. The antibacterial activity of hemoglobin[J]. The Journal of Experimental Medicine, 1958, 107(2): 167-172.

[9] 周新娥, 欧阳运薇, 潘小玲, 等. 人血红蛋白及其片段体外抗菌活性研究[J]. 四川大学学报: 医学版, 2008, 39(3): 355-359.

ZHOU Xine, OUYANG Yunwei, PAN Xiaoling, et al. Study on antimicrobial activity of human hemoglobin and its fragments both in vitro and in vivo[J]. Journal of Sichuan University (Medical Science Edition), 2008, 39(3): 355-359.

[10] PARISH C A, JIANG H, TOKIWA Y, et al. Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2001, 9(2): 377-382.

[11] QIN Z D, BABU V S, LIN H Z, et al. Antibacterial activity of erythrocyte from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is associated with phagocytosis and reactive oxygen species generation[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 92: 331-340.

[12] XU B, ZHAO J, JING Z, et al. Role of hemoglobin from blood clam *Scapharca kagoshimensis* beyond oxygen transport[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 44(1): 248-256.

[13] BAO Y B, WANG Q, LIN Z H. Hemoglobin of the bloody clam *Tegillarca granosa* (Tg-HbI) is involved in the immune response against bacterial infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(4): 517-523.

[14] KAWANO T, PINONTOAN R, HOSOYA H, et al. Monoamine-dependent production of reactive oxygen species catalyzed by pseudoperoxidase activity of human hemoglobin[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2002, 66(6): 1224-1232.

- [15] KVIST M, RYABOVA E S, NORDLANDER E, et al. An investigation of the peroxidase activity of *Vitreoscilla* hemoglobin[J]. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2007, 12(3): 324-334.
- [16] WANG S F, YU X P, LIN Z H, et al. Hemoglobins likely function as peroxidase in blood clam *Tegillarca granosa* hemocytes[J]. Journal of Immunology Research, 2017, 2017(8): 1-10.
- [17] JIANG N X, TAN N S, HO B, et al. Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy[J]. Nature Immunology, 2007, 8(10): 1114-1122.
- [18] JIANG N X. The role of respiratory proteins in innate immunity[D]. Beijing: Tsinghua University, 2008.
- [19] DU R J, HO B, DING J L. Rapid reprogramming of haemoglobin structure-function exposes multiple dual-antimicrobial potencies[J]. The EMBO Journal, 2010, 29(3): 632-642.
- [20] WANG S F, YU X P, ZHANG S Q, et al. Cu²⁺ inhibits the peroxidase and antibacterial activity of homodimer hemoglobin from blood clam *Tegillarca granosa* by destroying its heme pocket structure[J]. Frontiers in Marine Science, 2021, 8: 635210.
- [21] 周永灿, 潘金培. 贝类细胞和体液的防御机制研究进展[J]. 水产学报, 1997, 21(4): 449-454.
ZHOU Yongcan, PAN Jinpei. Progress on researches of cellular and humoral defense mechanisms in molluscs[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(4): 449-454.
- [22] 王素芳, 包永波, 施淼江, 等. 泥蚶血红蛋白的制备及其抗菌活性研究[J]. 海洋学报, 2014, 36(12): 67-73.
WANG Sufang, BAO Yongbo, SHI Miaojiang, et al. Purification and antibacterial activity of hemoglobin from *Tegillarca granosa*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2014, 36(12): 67-73.
- [23] BAO Y, WANG J, LI C, et al. A preliminary study on the antibacterial mechanism of *Tegillarca granosa* hemoglobin by derived peptides and peroxidase activity[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 51: 9-16.
- [24] 郑丹妮, 缪林彬, 刘建锋, 等. 连续监测法测定泥蚶血红蛋白过氧化物酶活性的研究[J]. 药物生物技术, 2015, 22(2): 137-141.
ZHENG Danni, MIAO Linbin, LIU Jianfeng, et al. A consecutive monitoring method for determining peroxidase activity of hemoglobin from *Tegillarca Granosa*[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Biotechnology, 2015, 22(2): 137-141.
- [25] WANG S F, HUANG Y Y, LIU S, et al. Hemoglobins from *Scapharca subcrenata* (Bivalvia: Arcidae) likely play an bactericidal role through their peroxidase activity[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2021, 253: 110545.
- [26] MORRIS G M, HUEY R, OLSON A J. Using autodock for ligand-receptor docking[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2008, 24(1): 8-14.
- [27] VLASOVA I I. Peroxidase activity of human hemoproteins: keeping the fire under control[J]. Molecules, 2018, 23(10): 2561.
- [28] KHAN J M, MALIK A, AHMED A, et al. SDS induces cross beta-sheet amyloid as well as alpha-helical structure in concanavalin A[J]. Journal of Molecular Liquids, 2020, 319: 114154.
- [29] HOU H, HE H W, WANG Y J. Effects of SDS on the activity and conformation of protein tyrosine phosphatase from *thermus thermophilus* HB27[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1-8.
- [30] 余晶梅, 林东强, 童红飞, 等. 荧光探针法研究牛血清白蛋白和免疫球蛋白的表面疏水特性[J]. 高校化学工程学报, 2014, 28(4): 771-776.
XU Jingmei, LIN Dongqiang, TONG Hongfei, et al. Studies on surface hydrophobicity of bovine serum albumin and immunoglobulin by a fluorescence probe method[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2014, 28(4): 771-776.
- [31] PAUL S, KUNDU M, DAS K P, et al. Unfolding studies of *Escherichia coli* maltodextrin glucosidase monitored by fluorescence spectroscopy[J]. Journal of Biological Physics, 2008, 34(6): 539-550.
- [32] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学 (第3版 上册) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 394.
WANG Jingyan, ZHU Shenggen, XU Changfa. Biochemistry (Volume I of the Third Edition) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 394.
- [33] SHARMA R D, KANWAL R, LYNN A M, et al. High temperature unfolding of a truncated hemoglobin by molecular dynamics simulation[J]. Journal of Molecular Modeling, 2013, 19(9): 3993-4002.
- [34] 张顺琴, 王素芳, 陈梦玫, 等. Cu²⁺ 对泥蚶血红蛋白 (Tg-Hb II) 的过氧化物酶活性与结构的影响[J]. 海洋学报, 2018, 40(1): 106-114.
ZHANG Shunqin, WANG Sufang, CHEN Mengmei, et al. Effects of Cu²⁺ on structure and peroxidase activity of *Tegillarca granosa* hemoglobin (Tg-Hb II)[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2018, 40(1): 106-114.
- [35] BOGDAN C. Oxidative burst without phagocytes: the role of respiratory proteins[J]. Nature Immunology, 2007, 8(10): 1029-1031.
- [36] CHENG T M, MAO S J T, LAI S T, et al. Haemoglobin-induced oxidative stress is associated with both endogenous peroxidase activity and H₂O₂ generation from polyunsaturated fatty acids[J]. Free Radical Research, 2011, 45(3): 303-316.

Investigation of the structural basis for peroxidase and antibacterial activity of hemoglobin from blood clam *Tegillarca granosa* (Tg-Hb II) using sodium dodecyl sulfate

PU Lili¹, WANG Shiyi², LIN Zhihua^{2, 3}, WANG Sufang^{2, 3}, BAO Yongbo^{2, 3}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources of Zhejiang, College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China; 3. Ninghai Marine Biological Seed Industry Research Institute, Zhejiang Wanli University, Ninghai 315604, China)

Received: Sep. 24, 2022

Key words: *Tegillarca granosa* hemoglobin; sodium dodecyl sulfate; peroxidase activity; antibacterial activity; heme pocket

Abstract: Hemoglobin II from *Tegillarca granosa* (Tg-Hb II) possesses oxygen-carrying capabilities as well as peroxidase and antibacterial activities. In this study, we examined the effects of sodium dodecyl sulfate (SDS) on the structure, peroxidase activity, and antibacterial activity of Tg-Hb II using spectrophotometric, spectroscopic, and molecular docking techniques. Moreover, we explored the structural basis of the peroxidase activity of Tg-Hb II and its antibacterial activities. The results revealed that the hydrophobic alkyl long chains of SDS could integrate into the heme pocket of Tg-HbII, forming hydrogen bonds with the proximal His104. This interaction resulted in the breaking of the coordination bond between heme iron and His104, leading to a decrease and shift in the Soret band absorption peak of Tg-Hb II. Additionally, SDS could form hydrophobic interactions with the amino acids in the heme pocket, inducing alterations in the original structure and exposing some hydrophobic amino acids. This resulted in an enhanced exogenous fluorescence intensity and a redshift of the maximum emission wavelength. SDS demonstrated an inhibitory effect on the peroxidase activity of Tg-Hb II. At 2 mmol·L⁻¹ of SDS concentration, the enzymatic activity of Tg-Hb II was only 20% of that of the original, and the antibacterial activity against *Bacillus subtilis* was lost in agar diffusion experiments. These results indicated that SDS inhibited the peroxidase activity of Tg-Hb II by disrupting the internal structure of the heme pocket, consequently leading to the loss of its antibacterial activity. The heme hydrophobic pocket emerged as a key structure for the peroxidase and antibacterial activities of Tg-Hb II. This study lays the foundation for future studies on the antibacterial mechanism of Tg-Hb II.

(本文编辑: 杨 悦)