

文章编号: 1007-4627(2016)01-0088-06

高能电子束对模式蛋白辣根过氧化物酶的损伤机制研究

麻姗姗¹, 柯志刚¹, 黄青^{1,2}

(1. 中国科学院合肥物质科学研究院, 合肥 230031;

2. 中国科学技术大学, 合肥 230026)

摘要: 作为一种载能粒子, 高能电子束具有能量利用率高、贯穿深度大、方便实用等优点, 可以用来杀灭细菌和抑制病原体生长, 因而被广泛应用于食品保质储藏和医疗卫生等方面。但是, 对于高能电子如何与生物及其生物分子发生作用, 以及作用的过程、方式、效果和机理等方面, 人们还缺乏深入、细致的了解。本研究利用高能电子束辐照模式蛋白酶辣根过氧化物酶(HRP: horseradish peroxidase), 研究了电子束对它的损伤作用和机理。研究发现, 电子束损伤HRP的方式主要通过羟基自由基破坏蛋白质肽链, 同时, 辐照产生的活性氧物质也会作用于HRP分子活性中心引起其辅基血红素的损伤。这与我们以前研究的等离子体放电辐照HRP其损伤主要通过 H_2O_2 作用于变性蛋白血红素引起酶失活有所不同。进一步, 通过利用活性氧和自由基清除剂的方法, 具体分析和阐明了电子束辐射条件下不同活性氧和自由基在损伤HRP过程中所起的破坏作用。

关键词: 辣根过氧化物酶; 高能电子束; 低温常压等离子体; 光谱

中图分类号: Q691, Q331 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.33.01.088

1 引言

高能电子束是通过加速器装置加速而得到的具有高能电子束流, 其能量可达到10 MeV, 穿透厚度约5~10 cm^[1]。利用高能电子束可以杀灭细菌、抑制病原体的生长等, 并且电子束具有成本低、贯穿强、作用时间短和效果好等特点, 因而在食品的储藏和保质^[2]、疾病诊断和治疗等方面^[3-4]有广泛的应用。

但是, 目前人们对于载能粒子(包括高能电子束)与生物体及其生物分子的作用机理方面研究不多, 总体上还缺乏深刻的认识, 这影响了载能粒子生物技术的应用推广。一般说来, 核技术所指的“辐射”可以分为电磁辐射和粒子辐射两种辐射方式, 当辐射能量超过物质电离能则称为电离辐射。高能电子束是一种粒子辐射和电离辐射, 而作为一种带有电荷和能量的荷能粒子束流, 高能电子束作用于生物体也会像其它电离辐射一样诱导丰富的生物学效应^[5-7], 而这些效应通常可以看成是直接作用和间接作用的结果。所谓直接作用是指辐射的能量直接沉积在生物分子(如: 蛋白质和DNA分子)上而引起的作用和反应; 间接作用则是指辐射首先作用

于生物分子周围的水分子, 从而形成大量的羟基自由基HO·、氢自由基H·等一级自由基以及由这些相关自由基反应形成的 H_2O_2 等二级自由基, 它们再与生物分子反应而引起生物体发生各种变化和效应。在辐射诱导生物学效应中, 因为生物体含有大量水分, 间接作用往往起主要作用^[8]。但是, 无论直接作用还是间接作用, 它们都是通过改变对应的靶分子而起作用的, 其中最重要的生物靶分子包括作为遗传物质的DNA分子和作为生物功能执行体的蛋白质分子。因为DNA直接与生物的遗传变异有关, 所以人们一直对DNA的辐射作用机理和效应研究较多; 相对而言, 对蛋白质的辐射作用机理研究较少。但是, 丰富的生命现象其实是大量和多种蛋白质参与的结果, 要深刻了解辐射生物学效应, 对于生物学效应终点之前初期或早期过程中辐射对蛋白质作用、特别是间接作用研究是十分必要的。所以, 近年来这方面的研究日渐得到重视^[9]。例如, Du等^[10]研究发现蛋白质在脂质过氧化、DNA损伤之前形成蛋白过氧化物从而可以降低生物辐射损伤; Gebicki等^[11]发现细胞在自由基作用下蛋白质的损伤速率远大于脂质; 另外, 人们还研究了辐照引起蛋白质的结构变化^[12]和氧

收稿日期: 2015-04-08; 修改日期: 2015-04-13

基金项目: 中国科学院百人计划项目(Y09BR12241); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KJXC2-YW-N34); 国家自然科学基金资助项目(11175204, 11475217); 中国科学院战略先导项目(XDA08040107)

作者简介: 麻姗姗(1990-), 女, 安徽萧县人, 硕士生, 从事核技术和生物光谱应用方面研究, E-mail: shanshanma163@163.com

通信作者: 黄青, E-mail: huangq@ipp.ac.cn。

化损伤^[13]、以及物理化学性质改变, 如粘度^[14]、酶活等^[15-17]。

为了较深入地探讨粒子辐射对蛋白质的作用和影响, 本文选取一种在结构-功能方面研究比较透彻的模式蛋白-辣根过氧化物酶(HRP: horseradish peroxidase)作为研究对象, 辐照方式则采用高能电子束。HRP是一种含有辅基血红素的氧化还原酶, 其分子量约为40000~45000, 分子结构中有308个氨基酸残基、一个高铁血红素基团及天冬酰胺残基处的8个中性碳水化合物侧链, 其活性中心是与His42、Arg38、His170^[18-19]配位作用连接的高铁血红素(一种Fe(III)-卟啉IX化合物), 它与两个钙离子共同维持着蛋白质的结构和功能完整性^[18]。电子束辐照引起蛋白酶功能-结构改变, 为了能够方便、准确地对作用结果进行定性和定量分析, 本文研究中我们采用了一些对HRP分析行之有效的光谱学方法^[15,20-22]。测量电子束引起HRP酶活改变、血红素的损伤、蛋白质肽链断裂、蛋白质聚合等, 探讨相关活性氧和自由基损伤蛋白质的原因和机制, 并且利用活性氧和自由基清除剂的方法区分这些因素在其中的影响和作用大小, 最后与等离子体辐照损伤HRP机制进行比较。

2 材料与方法

2.1 实验材料与试剂

辣根过氧化物酶(HRP, $R_z > 3.0$)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS)(二胺盐, > 98%), 香豆素-3-羧酸(Coumarin-3-carboxylic acid, 3-CCA)购自Sigma-Aldrich(中国)。5x蛋白质上样缓冲液、氯化硝基四氮唑蓝(nitroblue tetrazolium chloride, NBT)、甘氨酸、十二烷基硫酸钠SDS、Tris等购自生工生物工程(上海)有限公司。其他试剂包括考马斯亮蓝R250、硫酸钛Ti(SO₄)₂、甲醇、冰醋酸、H₂O₂(30%溶液)、磷酸氢二钠(十二水)、磷酸二氢钠(二水)等缓冲体系物质(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司。

2.2 实验方法

2.2.1 样品准备

(1) 称取适量HRP粉末溶于磷酸盐缓冲液(PBS, 10 mmol/L, pH7.2), 配制浓度为1 mg/mL的蛋白质溶液。分别称取适量抗坏血酸、硝酸钠加入超纯水溶解、稀释, 配制浓度为0.1, 10⁻², 10⁻³ mol/L的抗坏血酸(Vc)、硝酸钠(NaNO₃)溶液。

(2) 取适量新鲜配制HRP溶液与抗坏血酸溶液或

硝酸钠溶液混合, 混合液中HRP终浓度为0.9 mg/mL, 抗坏血酸或硝酸钠浓度分别为0, 1 × 10⁻⁴, 5 × 10⁻⁴, 1 × 10⁻³, 5 × 10⁻³, 1 × 10⁻² mol/L。

2.2.2 电子束辐照处理

电子束辐照装置(IHI10, IHI Co., Japan)额定功率为10 MeV, 功率为10 kW。电子加速器的辐照剂量分别为0.5, 1.0, 1.5, 2.0 kGy, 未经辐照处理的样品为参照组。

取1 mL HRP溶液(0.9 mg/mL于2 mL离心管中(共四组)并对样品进行不同剂量的电子束辐照处理(0.5, 1, 1.5, 2 kGy)。在另一组实验中, 取1 mL HRP与抗坏血酸或硝酸钠混合溶液并对其进行剂量为2 kGy的电子束辐照处理。

2.3 样品分析

对电子束辐照处理后的样品分别进行酶活、紫外可见吸收光谱(SHIMADZH UV-2550)、荧光光谱(VARIAN Cary Eclipse)的检测。

2.3.1 酶活的检测

称取适量ABTS粉末溶于0.1 mol/L PBS缓冲液(pH 5.5), 配制浓度为9.1 mmol/L ABTS溶液作为HRP酶活测定的底物。ABTS溶液在实验前现配现用。取2.7 mL上述ABTS溶液与0.3 mL H₂O₂(100 mmol/L)充分混合, 快速向其中加入10 μL的HRP溶液(10000倍稀释)。利用紫外可见吸收光谱仪(SHIMADZH UV-2550)检测反应混合液在414 nm处吸收光谱随时间变化可推测其酶催化反应动力学^[23], 检测时间为90 s。

2.3.2 紫外可见吸收光谱及荧光光谱测定

取电子束辐照前后的HRP或HRP-Vc混合溶液置于光径为1 mm的石英比色皿中并进行紫外-可见吸收光谱(SHIMADZH UV-2550)及荧光光谱检测(VARIAN Cary Eclipse)。荧光光谱测定中激发波长设置为310 nm, 激发狭缝和发射狭缝均为10 nm。

2.4 电子束辐照条件下活性氧的检测

羟基自由基和超氧阴离子检测: 分别取适量的3-CCA粉末与NBT粉末溶于10 mmol/L PBS (pH 7.2)中, 分别配制2 mmol/L的3-CCA溶液及0.2 mmol/L NBT溶液。取25 mL配制好的3-CCA溶液并向其中加入100 μL 1g/L的过氧化氢酶溶液(溶于10 mmol/L pH 7.2 PBS), 另取25 mL配制好的NBT溶液分别进行辐照处理。

过氧化氢检测: 在0.3 mL 3 mol/L H₂SO₄和0.3

mL 3 mmol/L硫酸钛混合溶液中溶液加入适量辐照处理不同时间的10 mmol/L PBS(pH 7.2)样品, 用去离子水滴加至3 mL。测定样品在407 nm 处的吸光度。

2.5 电泳实验

取 40 μL 样品与还原性 5x 蛋白质上样缓冲液混合均匀, 于沸水浴中加热煮沸 5 min, 冷却至室温后, 取10 μL 上样至 SDS-PAGE 加样孔中。电泳电压为 60 V, 时间为 2.5 h。考马斯亮蓝染色液 R250 对胶板染色 2~3 h 后, 使用考马斯亮蓝脱色液进行脱色。SDS-PAGE 分离胶和浓缩胶浓度分别为 10%、4%^[24]。

3 实验结果

3.1 电子束辐照引起HRP活性损失

电子束辐照处理对 HRP 酶活的影响见图 1 所示。由图可知, 在 0~1.5 kGy 辐照剂量范围内, 随着辐照剂量的增加, HRP 酶活呈线性减小。随着剂量的进一步增大, 酶活变化趋于平缓。当剂量达到 1.5 kGy 时, HRP 酶活仅为对照组的 10%。

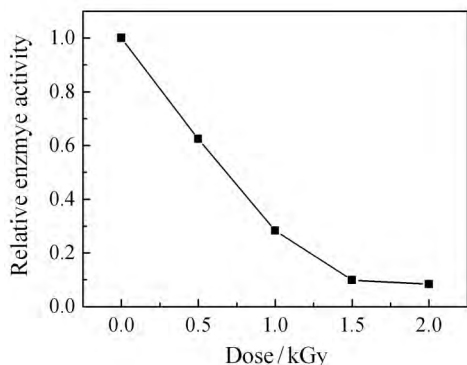


图 1 HRP酶活随电子束辐照剂量变化

3.2 电子束辐照引起的HRP辅基血红素损伤

血红素分子是一种高铁卟啉结构, 其中铁原子氧化-还原状态的变化是 HRP 发挥催化功能的机制。为了验证血红素损伤是否是电子束辐照引起的 HRP 酶活损失的重要原因, 我们利用卟啉分子 $\pi-\pi^*$ 跃迁产生的 400 nm 处 Soret 特征吸收峰分析电子辐射条件下血红素状态或含量的变化, 结果如图 2 所示。实验结果表明, 血红素损伤趋势与酶活损伤趋势相同。在 0~1.5 kGy 辐照剂量范围内, Soret 特征吸收峰强度随着辐照剂量的增加呈线性减小。随着辐照剂量的进一步增加, 其变化趋势趋于平缓。但是, 当辐照剂量为 1.5 kGy 时, 由 Soret 特征吸收峰强度得到的血红素含量仅减小约 25%, 远小于相同剂量下酶活的损失(减小约 90%)(图 3)。该结果表明电子束辐照下, 除了辅基血

红素损伤, 还有分子中其他部位的损伤导致了 HRP 酶活的损伤。

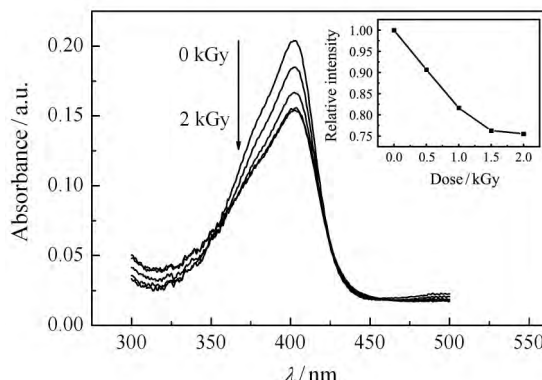


图 2 不同电子束辐照剂量下HRP的紫外可见吸收光谱图和 在403 nm处紫外可见吸收值随辐照剂量的变化

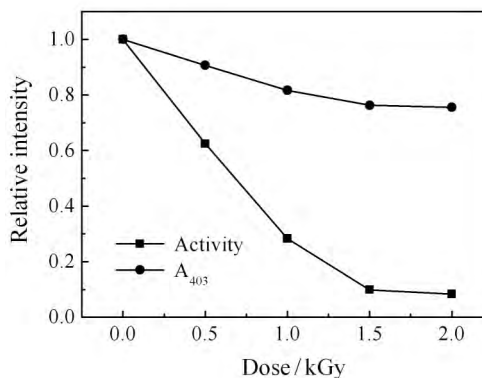


图 3 电子束辐照条件下 HRP 酶活损失与血红素含量变化 (A₄₀₃) 的比较

3.3 电子束辐照引起的HRP肽链损伤

为探究电子束辐照对蛋白质肽链的影响, 对不同剂量电子束辐照处理的 HRP 样品进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 结果如图 4 所示。随着辐照剂量的增加, HRP 肽链含量减少。当辐照剂量达到 1.5 及 2 kGy 时, HRP 原有肽链 (40000~45000) 基本

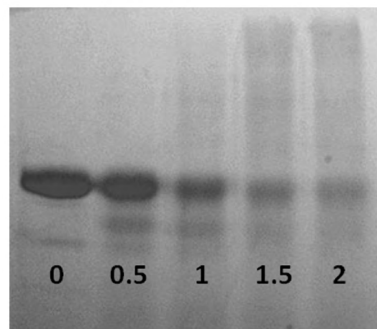


图 4 不同剂量电子束辐照处理的HRP样品的SDS-PAGE 分离图

从左向右辐照剂量依次为0, 0.5, 1, 1.5, 2 kGy。

消失, 并伴有低分子量及高分子量肽链的生成。电子束辐照处理不仅引起了蛋白质肽链的断裂, 还有肽链聚合的发生。

4 讨论

一般说来, 活性氧和自由基作用于蛋白质分子, 可以引起蛋白质分子中组分氨基酸的变化、肽链断裂和蛋白质聚合等^[25]。所以, 我们下面重点讨论电子束辐照 HRP 溶液系统通过活性氧和自由基间接作用引起的蛋白酶损伤。

4.1 电子束辐照条件下活性氧的检测

氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 是一种应用广泛的超氧阴离子探针, 可被超氧阴离子还原生成不溶性物质甲腈, 且不与 $\text{HO}_2\cdot$ 、 H_2O_2 等反应^[26-27], 因此是一种超氧阴离子特异性探针。由于生成的甲腈难溶于水, 因此难以据此对体系中生成的超氧阴离子含量进行定量分析。NBT 与超氧阴离子反应不仅会生成蓝色不溶性甲腈, 还会导致 NBT 在 258 nm 处特征光吸收减小。因此, 根据 NBT 在 258 nm 处吸光度的变化可定量分析体系中生成的超氧阴离子含量。测量结果表明, 随着电子束辐照剂量的增加, NBT 在 258 nm 处吸收峰强度减弱。电子束辐照剂量为 1, 10 kGy 时, 在 258 nm 处吸光值分别降低 0.643, 1.08 (表 1)。

表 1 等离子体放电和电子辐射条件下溶液中生成的几种活性基团测定数据

电子辐射剂量 /kGy	放电时间 /min	I450 (CCA)	A258 (NBT)	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ /(mmol/L)
-	4	18.2	0.0528	2.46
-	10	44.0	0.216	6.48
1	-	109	0.643	0.118
10	-	154	1.08	0.212

香豆素及其非羟基化衍生物在生理条件下无荧光, 经羟基化后会在 450 nm 处出现荧光峰, 依此可以探测体系中的羟基自由基的含量^[28]。在 395 nm 激发下, 未经处理的 3-CCA 样品不表现出荧光特性。电子束辐照处理后的样品在 450 nm 处表现出一荧光发射峰。随着辐照剂量的增加, 450 nm 处荧光强度增加, 说明羟基自由基随着辐照剂量增加而增加。测量表明, 电子束辐照剂量由 1 kGy 增加至 10 kGy 时, 450 nm 处荧光强度由 109 上升为 154 (表 1)。

在酸性条件下过氧化氢和 Ti^{4+} 会生成橙色的络合物, 因此可根据硫酸钛比色法测定辐射处理条件下 PBS 体系中产生的 H_2O_2 含量^[29]。测量表明, 电子束辐照剂量为 10 kGy 时, 体系内产生的 H_2O_2 含量为 0.212

mmol/L (表 1)。

4.2 活性氧和自由基作用鉴别

为了进一步验证羟基自由基等活性氧 (ROS) 基团在电子束辐照引起 HRP 失活中的重要作用, 我们用它们各自对应的抑制剂进行实验比较。选择抗坏血酸 (Vc) 作为羟基自由基清除剂, 抗坏血酸的添加显著抑制电子束辐照引起的 HRP 酶活的损失及辅基血红素的损伤 (图 5)。当其浓度达到 1×10^{-2} mol/L, 在 2 kGy 电子束辐照处理后, HRP 酶活及血红素与未经辐照处理的对照组基本相同。而不添加有抗坏血酸的 HRP 样品经同等剂量电子束辐照处理后, 酶活损失约 90%, 由 A_{403} 吸光度得到的血红素含量减少约 40%。上述结果证实了电子束辐照生成的 ROS 基团是引起 HRP 失活及辅基血红素损伤的主要原因。

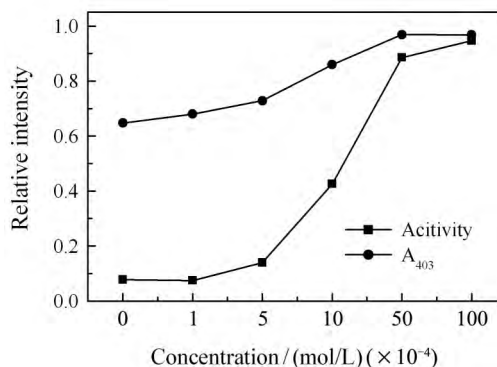


图 5 抗坏血酸(Vc)对电子束辐照处理下HRP酶活和和辅基血红素的保护作用

横坐标为添加的Vc浓度, 辐照剂量为2 kGy。

另外, 上述添加有抗坏血酸的 HRP 样品经 2 kGy 电子束辐照处理也进行了 SDS-PAGE 分离, 结果如图 6 所示。结果表明, 抗坏血酸显著抑制了电子束辐照

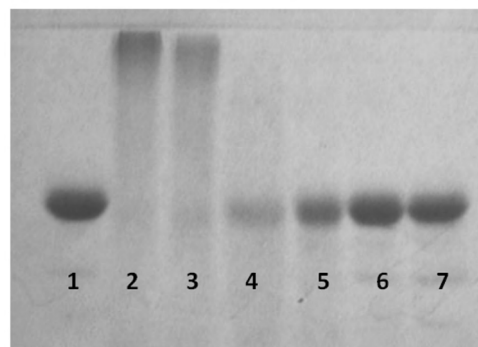


图 6 抗坏血酸(Vc)对电子束辐照处理下HRP肽链的保护作用

辐照剂量为 2 kGy, 1 为对照组, 即为未添加 Vc、未经过辐照处理的 HRP, 2-7 中加入 Vc 的浓度依次为 0 , 1×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1×10^{-3} , 5×10^{-3} , 1×10^{-2} mol/L。

引起的 HRP 肽链的损伤。这就进一步证实了羟基自由基是电子束损伤蛋白质的一个主要因素。

除了上述起氧化作用的羟基自由基，水合电子也是一种在电子束辐照条件下生成的还原性自由基。为了探究电子束辐照下生成的水和电子对 HRP 酶活的影响，我们选择硝酸根作为水和电子的清除剂^[30]。即使当硝酸根浓度达到 1×10^{-2} mol/L 时，它对电子束辐照 (2 kGy) 引起的 HRP 酶活损失及血红素损伤都无明显的抑制作用 (图 7)。实验结果说明了电子束辐照下生成水合电子不是引起 HRP 失活的主要因素。

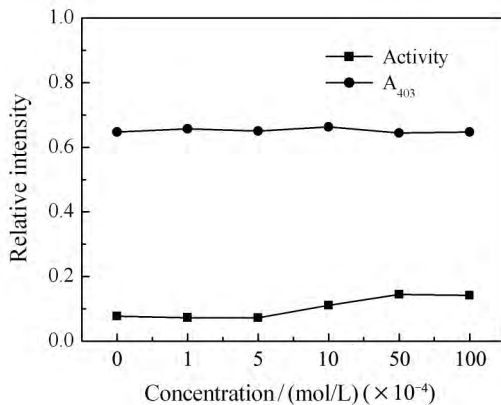


图 7 硝酸钠 (NaNO_3) 对 HRP 酶活和紫外-可见吸收的影响
横坐标为添加的 NaNO_3 浓度，剂量为 2 kGy。

4.3 电子束与等离子体放电对 HRP 作用效果的比较

上述实验结果表明，电子束辐照引起的 HRP 酶活损失远大于辅基血红素本身的损伤，而在等离子体放电引起的 HRP 酶活损失与血红素损伤趋势基本相同^[15]，这表明两种辐射对 HRP 的损伤机制有所不同。以往的研究表明，载能粒子辐射生成的各种自由基及活性基团是引起溶质分子损伤的重要原因^[25]。我们利用辐射条件下溶液中生成的几种主要自由基的探针 (如检测羟基自由基的 CCA、检测超氧阴离子的 NBT 等) 对两种辐照处理下溶液中生成的自由基及活性基团含量进行了相对定量分析与比较。

上述 3 种活性基团在电子束辐照及针尖-液面等离子体放电条件下生成量的比较见表 1。

由表 1 可知，与针尖-液面等离子体放电相比，电子束辐照条件下溶液中生成的羟基自由基与过氧化氢含量之比约是前者的 98 ~ 125 倍，超氧阴离子与过氧化氢含量之比约是前者的 250 倍。上述关于电子束辐照与针尖-液面等离子体放电条件下溶液中生成的化学活性基团含量的检测也很好解释了两种辐照方式对 HRP 影响的差别。在针尖-液面等离子体放电条件下，羟基自

由基产生较少而过氧化氢产量较高，这样蛋白质肽链受到损伤较小而 HRP 分子中辅基血红素在蛋白质结构发生变化的情况下在 H_2O_2 较长时间持续作用下导致血红素降解和酶的失活^[15]。在电子束辐照条件下，由于高能电子的高穿透能力，可以即时生成大量羟基自由基，而羟基自由基寿命很短，一般只能作用于蛋白质分子的亲水区域，即亲水肽链部分，它攻击 HRP 分子蛋白质肽链骨架，可以直接导致肽链断裂蛋白质变性聚集等结构改变更为严重的损伤 (图 6)。相反，这时候疏水的辅基如 HRP 中血红素相对来说得到肽链的保护作用，损伤反而较小 (图 3)。

5 结论

随着载能粒子技术运用和推广，关于粒子辐射对生物作用机理研究日益得到重视，其中一个关键问题是要深入了解辐射作用初期或早期的物理化学过程，这就需要开展辐射对生物分子作用机理研究。为此，本研究利用高能电子束辐照模式蛋白 HRP，并对其作用机理进行研究。通过实验探测了电子束辐照体系中羟基自由基、 H_2O_2 等活性氧成分和含量、蛋白酶活、血红素含量、蛋白质结构等各种变化，分析了其中 ROS 作用及其贡献，并与以前等离子体作用结果相比较。研究表明，电子束可以产生大量羟基自由基，它除了可以引起蛋白酶失活、血红素损伤外，更重要的是蛋白质骨架部分造成很大损伤，引起肽链断裂等更严重的破坏。在实验手段和分析方法上，采用了低成本易操作的电子束辐照技术和光谱测量技术。之前，我们虽然研究过等离子体辐照对这种模式蛋白质的作用机理，但是等离子体放电产生的载能粒子 (包括离子和电子) 能量较低，其主要作用区域在蛋白质溶液表面。与等离子体辐照相比，高能电子束穿透能力强，可以研究溶液内部对生物分子的损伤，两者作用方式和表现结果是不一样的。这样，两者研究结果正好可以互为补充。总之，这项工作对加强蛋白质辐射损伤机理认识、推进载能粒子对生物作用早期过程和作用机制的研究提供了一定的参考依据。

参考文献:

- [1] LEWIS S J, VELASQUEZ A, CUPPETT S L. Poultry science, 2002, **81**(6): 896.
- [2] LUNG H M, CHENG Y C, CHANG Y H, *et al.* Trends in Food Science & Technology, 2015.
- [3] TEIGEN C L, MAUS T P, SHEEDY I P F, *et al.* Radiology, 1995, **194**(2): 313.
- [4] MARTÍNEZ-MONGE R, NAG S, MARTIN E W. Cancer, 1999, **86**(2): 236.

- [5] WARD J F. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 1988, **35**: 95.
- [6] RUSSELL J S, BURGAN W, OSWALD K A, *et al.* Clinical Cancer Research, 2003, **9**(10): 3749.
- [7] VILE G F, TYRRELL R M. Free Radical Biology and Medicine, 1995, **18**(4): 721.
- [8] SONNTAG C. The Chemical Basis of Radiation Biology[M]. London: Taylor & Francis, 1987.
- [9] DALY M J. DNA repair, 2012, **11**(1): 12.
- [10] DU J, GEBICKI J M. The International Journal of Biochemistry & Cell biology, 2004, **36**(11): 2334.
- [11] GEBICKI J M, COLLINS J, GAY C, *et al.* Redox Report, 2000, **5**(1): 55.
- [12] CHAPELIER A, DESMADRIL M, HOUÉE-LEVIN C. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2001, **79**(2): 154.
- [13] LASER H. Nature, 1955, **176**, 361.
- [14] CIEȚĂ K, SALMIERI S, LACROIX M, *et al.* Radiation Physics and Chemistry, 2004, **71**(1): 95.
- [15] KE Z, HUANG Q. Plasma Processes and Polymers, 2013, **10**(8): 731.
- [16] CONSTANTINOVICI M, OANCEA D, ZAHARESCU T. Radiation Physics and Chemistry, 2009, **78**(1): 33.
- [17] SURUGA K, NAGASAWA N, YAMADA S, *et al.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, **51**(23): 6835.
- [18] VEITCH N C. Phytochemistry, 2004, **65**(3): 249.
- [19] WELINDER K G. FEBS Letters, 1976, **72**(1): 19.
- [20] HUANG Q, HUANG Q, PINTO R A, *et al.* Journal of the American Chemical Society, 2005, **127**(5): 1431.
- [21] HUANG Q, AL-AZZAM W, GRIEBENOW K, *et al.* Biophysical journal, 2003, **84**(5): 3285.
- [22] HUANG Q, SZIGETI K, FIDY J, *et al.* Journal of Physical Chemistry B, 2003, **107**(12): 2822.
- [23] PUTTER J, BECKER R. Methods of Enzymatic Analysis[M]. New York: Academic presses, 1983:286.
- [24] SCHÄGGER H. Nature Protocols, 2006, **1**: 16
- [25] GARRISON W M. Chemical Reviews, 1987, **87**(2): 381.
- [26] BIELSKI B H J, SHIUE G G, BAJUK S. The Journal of Physical Chemistry, 1980, **84**(8): 830.
- [27] SAHNI M, LOCKE B R. Plasma Processes and Polymers, 2006, **3**(4/5): 342.
- [28] MANEVICH Y, HELD K D, BIAGLOW J E. Radiation research, 1997, **148**(6): 580.
- [29] EISENBERG G. Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition, 1943, **15**(5): 327.
- [30] PILENI M P, BROCHETTE P, HICKEL B, *et al.* Journal of Colloid and Interface Science, 1984, **98**(2): 549.

Study of the High-energy Electron-beam Irradiation Induced Damage on the Model Protein Horseradish Peroxidase

MA Shanshan¹, KE Zhigang¹, HUANG Qing^{1, 2}

(1. Key Laboratory of Ion-beam Bio-engineering, Institute of Biotechnology and Agriculture Engineering, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;
2. The University of Science and Technology, Hefei 230026, China)

Abstract: As one kind of charged energetic particles, high-energy electron-beam (e-beam) can kill bacteria effectively; and because of its advantages of low-cost and high-efficiency, e-beam has been widely applied in food sterilization and storage industry as well as biomedical areas. However, currently we still lack the in-depth understanding of the mechanism of the interactions between high-energy particles and biological systems. To this end, we thus initiated the study of e-beam induced damage of horseradish peroxidase (HRP: horseradish peroxidase). Our results revealed that the e-beam induced damage of HRP was mainly through the hydroxyl radical attack on the polypeptide chains, and at the same time, the heme active site of HRP was also injured by the reactive oxygen species (ROS) produced by the electron-beam. This hydroxyl radical damage mechanism is different from the hydrogen peroxide damage mechanism that plays the dominant role in non-thermal plasma treatment as we reported previously. Moreover, by using the ROS and free radical scavengers, we analyzed and identified the major factors that contributed to the HRP damages.

Key words: horseradish peroxidase; high-energy electron-beam; non-thermal atmospheric plasma; spectroscopy

Received date: 8 Apr. 2015; **Revised date:** 13 Apr. 2015

Foundation item: Hundred Talents Program of Chinese Academy of Sciences(Y09BR12241); Key Knowledge Innovative Project of Chinese Academy of Sciences (KJCX2-YW-N34); National Natural Science Foundation of China (11175204, 11475217); Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDA08040107)

Corresponding author: HUANG Qing, E-mail: huangq@ipp.ac.cn.