

Cu²⁺、Cd²⁺对过氧化氢酶活性的影响及其荧光光谱研究

赵艳红¹, 袁小英², 郭栋生¹

(1. 山西大学环境与资源学院, 山西 太原 030006; 2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006)

摘要:分别采用碘量法和荧光光谱法研究了水溶液体系中重金属 Cu²⁺、Cd²⁺对过氧化氢酶活性的影响。碘量法结果表明, Cu²⁺、Cd²⁺对过氧化氢酶既有激活作用也有抑制作用, 这种作用与离子的浓度有关, 而且在相同的浓度下, Cu²⁺对过氧化氢酶的作用较 Cd²⁺强。荧光光谱法研究结果表明, Cu²⁺对过氧化氢酶的荧光有较强的猝灭作用, 而 Cd²⁺作用较弱, 反映了2种离子对过氧化氢酶活性影响的机理可能不同。从荧光猝灭结果求出 Cu²⁺和过氧化氢酶的结合常数 K 及结合位点数 n , 分别为 $K = 18.42 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $n = 0.5$ 。

关键词: Cu²⁺; Cd²⁺; 过氧化氢酶; 碘量法; 荧光光谱法

中图分类号: X131 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 - 2043(2004)06 - 1086 - 03

Effect of Cu²⁺ and Cd²⁺ on Activity and Fluorescence Spectrum of Catalase

ZHAO Yan-hong¹, YUAN Xiao-ying², GUO Dong-sheng¹

(1. School of Environment and Resources, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The influence of Cu²⁺ and Cd²⁺ on the activity of catalase was studied by using the method of iodimetry. The relative activity and inhibition rate of Cu²⁺ and Cd²⁺ on catalase were calculated. Both Cu²⁺ and Cd²⁺ had the action of activation and inhibition on catalase, which depended on the concentration of Cu²⁺ and Cd²⁺. Moreover, Cu²⁺ had a stronger effect on catalase than Cd²⁺ in the same concentration. The effective mechanism was researched using fluorescence spectrum by scanning fluorescence spectrum and determining absorbance. The mechanisms of Cu²⁺ and Cd²⁺ affected catalase activity were different. Cu²⁺ might change the space structure of catalase, but Cd²⁺ had effect on the catalytic and binding radical. Based on the fluorescence quenching results, the binding constant (K) was $18.42 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ and the number of binding site (n) of catalase with Cu²⁺ was 0.5.

Keywords: Cu²⁺; Cd²⁺; catalase; iodometric method; fluorescence spectrum

过氧化氢酶(CAT)广泛存在于植物体内,其生物功能是能促进体内过氧化氢的分解,使其不会产生毒性很大的氢氧自由基,具有保护酶的作用,因而对植物的生长发育和代谢活动具有重要意义^[1]。重金属是当前最严重的土壤污染因子之一,而且植物对重金属的积累也非常普遍^[2、3],本文分别运用碘量法和荧光光谱法,在较宽的浓度范围内研究了重金属离子 Cu²⁺、Cd²⁺对过氧化氢酶活性的影响,并在相应的浓度条件下,采用荧光光谱法探讨了这两种离子对过氧化氢酶活性影响的可能机理。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

(1) 0.5 mol · L⁻¹ H₂SO₄; (2) 10% KI; (3) 0.005 mol · L⁻¹ Na₂S₂O₃; (4) H₂O₂ 磷酸缓冲溶液; (5) 淀粉指示剂; (6) 1% 钼酸铵; (7) 0.25 mol · L⁻¹ 蔗糖溶液; (8) CdCl₂ 溶液(系列浓度); (9) CuCl₂ 溶液(系列浓度); (10) 0.01 mol · L⁻¹ 的 Tris 缓冲溶液; (11) 过氧化氢酶(购自上海丽珠东风生物技术有限公司); (12) 岛津 RF - 540 型荧光分光光度仪。

1.2 步骤与测定方法

1.2.1 Cu²⁺、Cd²⁺对过氧化氢酶活性影响的测定

过氧化氢酶活力的测定采用碘量法^[4]。移取 5 mL H₂O₂ 磷酸缓冲溶液于 100 mL 碘量瓶中,于 25 °C 水浴中恒温 1 min 后,依次加入重金属离子溶液和过

收稿日期: 2004 - 05 - 12

基金项目: 山西省自然科学基金资助项目(20031016)

作者简介: 赵艳红(1977—),女,硕士研究生,

E-mail: zhao1128@sina.com

联系人: 郭栋生,电话: (0351)7011932

氧化氢酶溶液,混匀后于 25 ℃ 水浴中恒温 3 min,然后依次加入 0.5 mol · L⁻¹ H₂SO₄ 2 mL, 10% KI 0.5 mL, 1% 钼酸铵一滴,混匀后放置 3 min,用 0.005 mol · L⁻¹ Na₂S₂O₃ 滴定,达浅黄色时,加淀粉指示剂 2~3 滴,滴定至蓝色消失。同时做空白试验,且过氧化氢酶溶液和 H₂SO₄ 的加入顺序互换。

1.2.2 荧光光谱的测定

重金属离子和酶均用 0.01 mol · L⁻¹ 的 Tris 缓冲溶液配制成溶液,在比色管中依次加入不同浓度的重金属离子溶液、过氧化氢酶溶液,用 0.01 mol · L⁻¹ 的 Tris 缓冲溶液稀释至 5 mL,混匀后测定相应的吸光值。荧光发射与激发狭缝宽度为 10 nm。选择激发波长 290 nm,室温下测定 310~400 nm 的发射光谱;选择发射波长 350 nm,室温下测定 250~310 nm 的激发光谱,并扫描光谱图。

2 结果与讨论

2.1 Cu²⁺、Cd²⁺对 CAT 活性的影响

表 1 Cu²⁺对过氧化氢酶活性的影响

Table 1 Effect of Cu²⁺ on the activity of catalase

项目	对照组	1	2	3	4	5	6	7
Cu ²⁺ 浓度/mol · L ⁻¹	0	6.25 × 10 ⁻⁵	1.25 × 10 ⁻⁴	6.25 × 10 ⁻⁴	1.25 × 10 ⁻³	1.25 × 10 ⁻²	2.5 × 10 ⁻²	1.25 × 10 ⁻¹
酶活力 10 ³ mg · min ⁻¹	433.33	633.33	699.99	549.99	566.66	600.00	200.00	33.33
相对活力/%	100	146.15	161.54	126.92	130.77	138.46	46.15	7.69
抑制率/%	0	-46.15	-61.54	-26.92	-30.77	-38.46	53.85	92.31

表 2 Cd²⁺对过氧化氢酶活性的影响

Table 2 Effect of Cd²⁺ on the activity of catalase

项目	对照组	1	2	3	4	5	6	7
Cd ²⁺ 浓度/mol · L ⁻¹	0	5 × 10 ⁻⁴	2.5 × 10 ⁻³	5 × 10 ⁻³	2.5 × 10 ⁻²	5 × 10 ⁻²	2.5 × 10 ⁻¹	5 × 10 ⁻¹
酶活力 10 ³ mg · min ⁻¹	400	566.66	566.66	533.33	466.66	333.33	200.00	166.67
相对活力/%	100	141.67	141.67	133.33	116.67	83.33	50.00	41.67
抑制率/%	0	-41.67	-41.67	-33.33	-16.67	16.67	50.00	58.33

结构,降低了底物间的配位结合^[8]。对 2 种离子作用的比较表明,在相同浓度条件下,Cu²⁺对 CAT 活性的影响更为显著。

2.2 Cu²⁺、Cd²⁺对 CAT 荧光光谱的影响

过氧化氢酶中色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的存在,使其有内源荧光。图 1、图 2 分别为酶浓度固定时 Cu²⁺、Cd²⁺对 CAT 的荧光光谱猝灭图。在 290 nm 激发波长下,CAT 的最大发射波长为 350 nm;对于此激发波长,在 310~400 nm 的波长范围内 Cu²⁺、Cd²⁺均不产生发射荧光。在 350 nm 发射波长下,CAT 的最大激发波长为 290 nm。因此,在混合溶液中,荧光仅由 CAT 发出。如图 1 所示,随着 Cu²⁺浓度的不断增加,

过氧化氢酶活力计算公式为:

$$\text{酶活力} = \frac{(B-A) \cdot f \cdot M \times 1000}{3}$$

式中:酶活力以单位时间酶促分解 H₂O₂ 的微摩尔数表示;A 为试验组消耗的 Na₂S₂O₃ 毫升数;B 为对照组消耗的 Na₂S₂O₃ 毫升数;f 为酶的稀释倍数;M 为 Na₂S₂O₃ 的浓度;3 为反应时间 3 min;1000 为单位放大倍数。

抑制率计算公式为:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组酶活动} - \text{试验组酶活力}}{\text{对照组酶活力}} \times 100\%$$

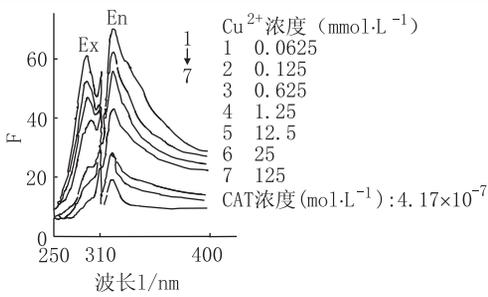
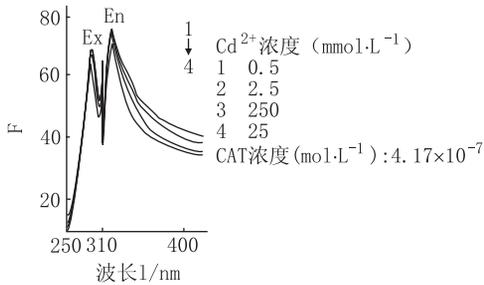
采用碘量法测定 Cu²⁺ 和 Cd²⁺ 对 CAT 活性影响的结果见表 1、表 2。

从以上数据可知,重金属离子 Cu²⁺、Cd²⁺对过氧化氢酶的活力均有显著的影响,且都是在高浓度范围内表现为抑制作用,低浓度范围内为激活作用。低浓度范围内的激活作用,可能与 Cu²⁺促进了酶的活性中心与底物间的配位结合有关。而高浓度范围内的抑制作用可能是由于较高浓度的 Cu²⁺影响到酶的空间

Cu²⁺ - CAT 体系中的 CAT 发射荧光均被有规律地猝灭,这可能是二者发生了结合作用引起了 CAT 构象的改变。而 Cd²⁺ - CAT 体系中的 CAT 荧光猝灭不明显,这表明,尽管 Cu²⁺ 和 Cd²⁺ 都可以在一定的浓度范围内对 CAT 的活性产生明显的影响,但可能涉及到不同的作用机理,Cu²⁺ 能使 CAT 的空间结构产生明显的改变,而 Cd²⁺ 可能只影响到 CAT 的催化基团或结合基团,因而在相同的浓度范围内 Cu²⁺ 对 CAT 表现出更强的作用。Cd²⁺ 对 CAT 荧光强度的影响见表 3 所示。

2.3 Cu²⁺与 CAT 的结合常数

当 CAT 体系中加入 Cu²⁺ 时,其激发波长(吸收波

图1 Cu²⁺对CAT荧光光谱的影响Figure 1 Effect of Cu²⁺ on fluorescence spectrum of CAT图2 Cd²⁺对CAT荧光光谱的影响Figure 2 Effect of Cd²⁺ on fluorescence spectrum of CAT

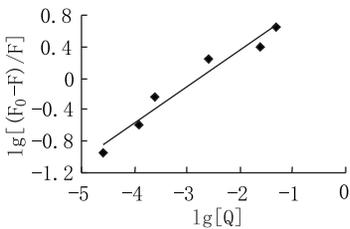
长)也发生了显著的变化,这表明二者作用引起的荧光猝灭为静态猝灭。在静态猝灭作用中,荧光强度与猝灭剂的关系可由荧光—猝灭分子间的结合常数表

表3 Cd²⁺与CAT作用的吸光值Table 3 Absorbance of Cd²⁺ on the catalase

项目	对照组	1	2	3	4	5	6	7
Cd ²⁺ 的浓度/mol·L ⁻¹	0	5 × 10 ⁻⁴	2.5 × 10 ⁻³	5 × 10 ⁻³	2.5 × 10 ⁻²	5 × 10 ⁻²	2.5 × 10 ⁻¹	5 × 10 ⁻¹
吸光值 F	60	61	65	64	68	63	66	65

表4 Cu²⁺与CAT作用的结合常数和结合位点数Table 4 The binding constant and binding site number of CAT with Cu²⁺

金属离子	拟合方程	相关系数	K/(L·mol ⁻¹)	n
Cu ²⁺	lg[(F ₀ - F)/F] = 1.265 4 + 0.5lg[Q]	0.977 9	18.42	0.5

图3 lg[(F₀ - F)/F]与lg[Q]的回归分析Figure 3 Regression analysis of lg[(F₀ - F)/F] versus lg[Q]

值的变化却呈线性规律,这表明Cu²⁺对CAT的作用,可能除了使其构象改变,还影响到其催化基团或结合基团等;且在2种研究方法中,Cd²⁺对CAT活性的影响均不呈线性变化。推测Cu²⁺、Cd²⁺对CAT活性的影响可能具有不同的机理。

达式导出^[5-7],设过氧化氢酶有n个相同且独立的结合位置,则有:

$$nQ + B = Q_n B \quad (1)$$

式中: B为荧光体过氧化氢酶; Q为猝灭剂Cu²⁺; Q_nB为生成物。其结合常数K为:

$$K = [Q_n B] / [Q]^n [B] \quad (2)$$

若荧光体系总浓度为[B₀],且[B₀] = [Q_nB] + [B], [B]为荧光体游离浓度,则有[Q_nB] = [B₀] - [B],在静态猝灭中,荧光体的荧光强度与其游离浓度成正比:[B]/[B₀] = F/F₀,则有:

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K + n \lg[Q] \quad (3)$$

利用试验获得的lg[(F₀ - F)/F]对lg[Q]作图(F为Ex = 290 nm, Em = 350 nm时所测吸光值)结果见图3。

根据图3结果所得出的斜率和截距,可求得Cu²⁺与CAT作用的结合常数K和结合位点数n,结果如表4所示。

2.4 Cu²⁺、Cd²⁺对CAT活性影响机理的差别

碘量法测定结果表明,相同浓度下,Cu²⁺对CAT的作用较Cd²⁺强。在一定的浓度范围内,Cu²⁺对CAT活性的影响并不呈线性变化,而荧光光谱法所测吸光

参考文献:

- [1] Banerjee B D, Seth V, Bhattacharya A. Biochemical effects of some pesticides on liquid peroxidation and free - radical scavengers[J]. *Toxicology Letters*, 1999, 107: 33 - 47.
- [2] 任虹,杨洪,等. 重金属对扁玉螺过氧化氢酶活性的影响研究[J]. *海洋科学*, 2000, 24(2): 54 - 56.
- [3] 杨清伟,束文圣,等. 铅锌矿废水重金属对土壤—水稻的复合污染及生态影响评价[J]. *农业环境科学学报*, 2003, 22(4): 385 - 390.
- [4] 徐镜波,郎佩珍. 过氧化氢酶活性及活性抑制的测定[J]. *环境化学*, 1994, 13(3).
- [5] 杨椿春,等. 荧光光谱法研究莠去津与过氧化氢酶的相互作用[J]. *浙江大学学报(理学版)*, 2002, 29(5): 542 - 546.
- [6] 冯喜增,金瑞祥,等. 各种离子对血卟啉与牛血清蛋白相互结合反应的影响研究[J]. 1996, 17(6): 866 - 869.
- [7] 易平贵,商志才,俞庆森. 荧光光谱法研究喹诺酮抗菌素与过氧化氢酶的相互作用[J]. *分析化学*, 2001, 29(6): 646 - 648.
- [8] 史长青. 重金属污染对水稻土酶活性的影响[J]. *土壤通报*, 1996, 26(1): 34 - 35.