

用紫外-可见吸收光谱研究微过氧化物酶-8与 La^{3+} 相互作用机理陈婷婷¹ 黄晓华¹ 冯玉英¹ 杜江燕¹ 刘长鹏² 邢巍² 陆天虹^{*1,2}⁽¹⁾ 南京师范大学化学与环境科学学院, 南京 210097)⁽²⁾ 中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022)

首次用紫外-可见(UV-Vis)吸收光谱技术研究了微过氧化物酶-8(MP-8)与 La^{3+} 的相互作用的机理。发现 La^{3+} 优先与MP-8分子中血红素叶啉环上的两个丙酸基团的羧基氧发生键合作用, 使血红素叶啉环的非平面性增加, $\pi-\pi^*$ 跃迁所需要的能量减少, 但几率降低。 La^{3+} 与MP-8肽链上的羰基氧发生弱相互作用, 因此对叶啉环的结构基本上没有影响。

关键词: 微过氧化物酶-8 镧离子 紫外-可见吸收光谱

分类号: O614.33+1 O646

0 引言

稀土微肥在农业上的应用, 为我国科学家首创。目前我国农田施用稀土微肥面积每年达 $3.33 \times 10^6 \sim 4.67 \times 10^6 \text{ha}$, 为国家每年增产粮、棉、豆、油、糖等 $6 \times 10^8 \sim 8 \times 10^8 \text{kg}$, 而且作物的品质也得到了改善和提高, 直接经济效益为10~15亿元。但稀土微肥使农作物增产和品质得到改善的机理还不了解。

大量生物机理的研究表明, 稀土微肥在一定浓度范围内能增强植物细胞保护酶, 如过氧化物酶(POD)等的生物活性^[1,3,4], 但其化学机理尚不明白, 这方面的研究也较少^[1,2]。其主要原因是由于这些酶具有高化学活性、结构复杂性、构象易变性等特点, 使研究这些酶与稀土离子相互作用比较困难。因此, 在目前可选用一些与酶结构、性质、生物活性和功能相似的模型化合物来研究与稀土离子的相互作用, 为进一步研究酶与稀土离子的相互作用打下基础。

MP-8是细胞色素c水解的产物, 其结构保留了细胞色素c中14-21位的氨基酸残基及活性中心血红素, 其中Cys-14和Cys-17通过硫醚键与血红素基团相连, His-18的咪唑基团作为血红素基团中心Fe(III)的轴向第五配体与血红素相连, 而 H_2O 作为

Fe(III)的轴向第六配体。但MP-8在水溶液中易形成二聚体, 这是由于一个MP-8分子的N端Cys的 $-\text{NH}_2$ 可取代 H_2O 作为另一个MP-8分子中的血红素基团中心Fe(III)的轴向第六配体而形成的^[5,6]。图1为MP-8的结构示意图。

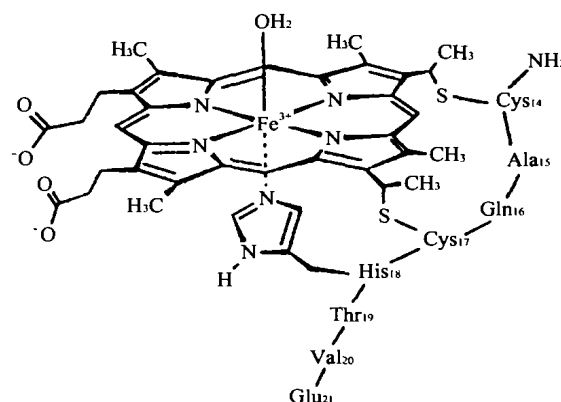


图1 MP-8的结构示意图

Fig. 1 Scheme of the MP-8 Structure

由于MP-8有POD相似的活性中心和生物活性^[5], 所以本文选择MP-8作为POD的模型化合物, 以 La^{3+} 为稀土离子的代表, 用UV-Vis吸收光谱为研究手段, 研究了MP-8与 La^{3+} 相互作用的机理。

收稿日期: 2003-04-28。收修改稿日期: 2003-06-13。

国家自然科学基金(No. 20243002)、国家计委稀土专项基金(GJX01100626)、江苏省科技厅高新技术基金(BG2001045)、江苏省教育厅高校自然科学基金(01KJB150006、2000LHZ00005J1、02KJB150006)和国家“211”工程重点学科建设资助项目。

* 通讯联系人。E-mail: tianhonglu@263.net

第一作者: 陈婷婷, 女, 23岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物电化学。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

MP-8 为美国 Sigma 公司产品, 分子量为 1506.5, 使用前未经进一步纯化, 纯度为 91%。其余试剂均为分析纯。无水 LaCl_3 根据文献^[7]制备: 称取一定量的 La_2O_3 (纯度大于 99.9%), 按比例加入 NH_4Cl , 用 1:1 的 HCl 溶解, 趁热过滤, 加热蒸发得的固体, 装入升华管, 抽真空并逐渐加热。在 100°C 左右抽 4h, 除去固体中剩余的水分, 然后逐步升温, 固体 NH_4Cl 全部升华到横管中, 8h 左右温度逐渐升到 430°C , 使氯化铵全部升华出来, 得到无水 LaCl_3 。所有的溶液都用三次蒸馏水配置。

UV-Vis 吸收光谱用德国 Perkin-Elmer 公司的 Lambda 17 型 UV-Vis 吸收光谱仪进行。

1.2 实验方法

UV-Vis 吸收光谱测量用的吸收池厚度为 0.5cm, 在测量 MP-8 的 UV-Vis 吸收光谱时, MP-8 的浓度为 $8.5\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。测量 MP-8 和 La^{3+} 混合溶液的 UV-Vis 吸收光谱时, 向 MP-8 的溶液中加入一定物质的量比的 La^{3+} , 混合均匀经 1h 平衡后进行测量。测量溶液的其它组分在文中标出。所有的测量均以不含 MP-8 的测量溶液作参比溶液。

2 结果与讨论

图 2, 曲线 a 为 MP-8 溶液的 UV-Vis 吸收光谱图。由图可见, 在 190nm 左右和 396nm 处有两个强吸收峰, 它们分别为 MP-8 分子中羰基吸收峰和血

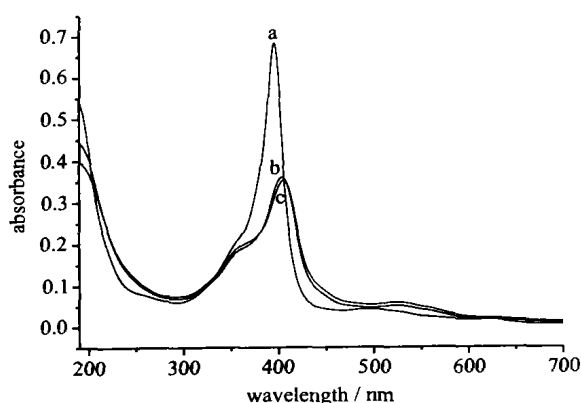


图 2 不同物质的量比的 La^{3+} 和 MP-8 的水溶液的 UV-Vis 吸收光谱

Fig. 2 UV-Vis absorption spectra of the MP-8 aqueous solutions with different molar ratios of La^{3+}

Molar ratio of La^{3+} and MP-8: (a) 0; (b) 3; (c) 17.

红素卟啉环上的 $\pi-\pi^*$ 电子跃迁的特征谱带—Soret 带^[8,9]。由于在 190nm 左右的吸收峰位于吸收光谱仪检测极限处, 因此, 其精确的峰位不能测得。

图 3 为溶液中 La^{3+} 和 MP-8 的物质的量比为 3 时, 溶液在 400nm 处的吸光度随加入 La^{3+} 的时间的变化曲线。由图可见, 在加 La^{3+} 后, 400nm 处的吸光度在开始时随时间迅速下降, 在 5min 后, 吸光度随时间缓慢下降, 在 1h 后, 吸光度基本不随时间变化, 表明 La^{3+} 和 MP-8 的反应已基本完成, 因此, 吸收光谱的测定均在 MP-8 溶液中加入 La^{3+} 的 1h 后进行。

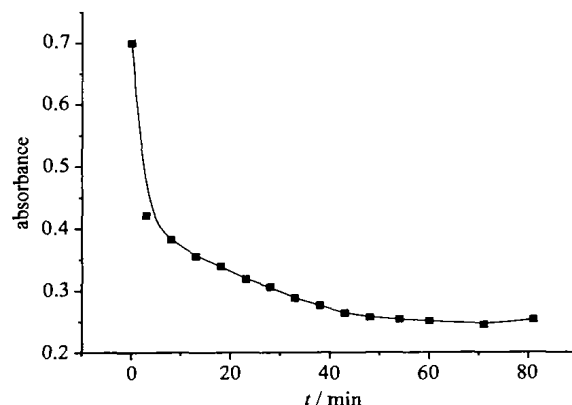


图 3 MP-8 溶液在 400nm 处的吸光度随加入 La^{3+} 的时间的关系曲线

Fig. 3 Relationship between the addition time of La^{3+} and absorbance at 400nm in the UV-Vis absorption spectra of MP-8

Molar ratio of La^{3+} and MP-8 = 3.

图 2, 曲线 b 为溶液中 La^{3+} 与 MP-8 的物质的量比为 3 时, MP-8 溶液的 UV-Vis 吸收光谱。与没有 La^{3+} 时的情况相比(图 2, 曲线 a), 首先, 在 190nm 处的吸收峰的吸光度比没有 La^{3+} 时下降了约 18%, 表明 La^{3+} 与 MP-8 分子的肽链或血红素卟啉环上丙酮基的羰基氧发生作用, 这是由于稀土离子易与 O 键合的缘故^[2,10]。其次, Soret 带的峰位由 396nm 红移至 404nm, 吸光度下降了约 47%, Soret 带峰位的红移表明血红素的非平面性增加, $\pi-\pi^*$ 跃迁所需要的能量减少^[11-13], 峰强的下降表明 $\pi-\pi^*$ 电子跃迁几率降低, 这表明 La^{3+} 优先与 MP-8 中血红素卟啉环上两个丙酮基中的羰基氧发生作用, 因为, 血红素上两个丙酮基中的羰基氧离卟啉环近, La^{3+} 与其键合能使血红素卟啉环结构发生一定变化。而 La^{3+} 与肽链上的羰基氧发生作用, 由于肽链离血红素较远, 不能对血红素的结构产生大的影响。当 La^{3+} 与

MP-8 的物质的量比为 17 时 (图 2, 曲线 c), Soret 带的峰位和吸光度与物质的量比为 3 时基本相同, 而在 190nm 处的吸收峰强度相比物质的量比为 3 时又下降了约 10%, 但下降的幅度比物质的量比为 3 时小, 这表明 La^{3+} 与 MP-8 中血红素上两个丙酸基中的羧基氧发生作用后, 过量的 La^{3+} 还会和肽链上羰基氧相互作用。

图 4 是 MP-8 溶液与不同物质的量比的 La^{3+} 和 MP-8 混合溶液在 400nm 处的吸光度差 ($A_{\text{MP-8}} - A$) 对 La^{3+} 和 MP-8 的物质的量比的关系曲线。其中, $A_{\text{MP-8}}$ 表示溶液中不含 La^{3+} 时在 400nm 处的吸光度, A 为溶液中含 La^{3+} 时在 400nm 处的吸光度。由图可见, $A_{\text{MP-8}} - A$ 值在开始时随物质的量比的增加而迅速增加。当 La^{3+} 与 MP-8 物质的量比为 3 时, 达到一个稳定值。当 La^{3+} 与 MP-8 物质的量比进一步增加时, $A_{\text{MP-8}} - A$ 值基本不变。

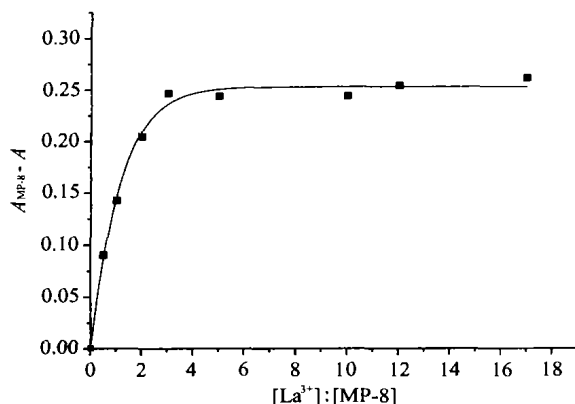


图 4 MP-8 溶液与不同物质的量比的 La^{3+} 和 MP-8 混合溶液在 400nm 处的吸光度差 ($A_{\text{MP-8}} - A$) 与 La^{3+} 和 MP-8 的物质的量比的关系曲线

Fig. 4 Relationship of the molar ratio of La^{3+} and MP-8 with $A_{\text{MP-8}} - A$ at 400nm in the UV-Vis absorption spectrum of MP-8

图 5 是 MP-8 溶液与不同物质的量比的 La^{3+} 和 MP-8 混合溶液在 190nm 处的吸光度差 ($A_{\text{MP-8}} - A$) 对 La^{3+} 和 MP-8 的物质的量比的关系曲线。由图可见, $A_{\text{MP-8}} - A$ 值在开始时也随物质的量比的增加而迅速增加。但当 La^{3+} 与 MP-8 物质的量比大于 3 时, $A_{\text{MP-8}} - A$ 值随物质的量比的增加还缓慢地增加。

上述的结果进一步证明, La^{3+} 首先与 MP-8 中血红素卟啉环上两个丙酸基中的羧基氧发生作用, 然后与肽链上的羰基氧相互作用。虽然血红素卟啉环上只有两个羧基氧, 但由于反应的平衡, 因此当

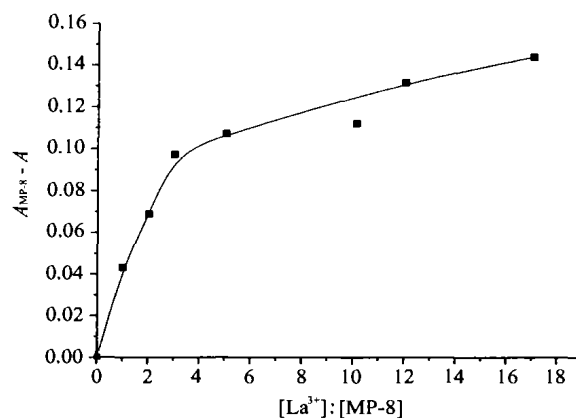


图 5 MP-8 溶液与不同物质的量比的 La^{3+} 和 MP-8 混合溶液在 190nm 处的吸光度差 ($A_{\text{MP-8}} - A$) 与 La^{3+} 和 MP-8 的物质的量比的关系曲线

Fig. 5 Relationship of the molar ratio of La^{3+} and MP-8 with $A_{\text{MP-8}} - A$ at 190nm in the UV-Vis absorption spectrum of MP-8

La^{3+} 与 MP-8 的物质的量比为 3 时, La^{3+} 与血红素卟啉环上两个丙酸基中的羧基氧才能反应完全。其次, 这可能也表明 La^{3+} 和 MP-8 中血红素上丙酸基中的羧基氧相互作用的性质与 La^{3+} 和肽链上羰基氧相互作用的性质不同。由于稀土离子与 O 易发生键合作用, 加上血红素上两个丙酸基中的羧基氧的暴露程度大及丙酸基带负电, 因此 La^{3+} 易与丙酸基接近, 并与其发生强的键合作用, 所以, 对 190nm 处的吸收带, 在物质的量比小于 3 时, $A_{\text{MP-8}} - A$ 值随物质的量比的增加而迅速增加。另一方面, 由于肽链中氢键的作用, 使得肽链上的羰基基团被包埋在 MP-8 分子的疏水基团中, 因此 La^{3+} 与肽链上的羰基氧只能发生弱的相互作用, 所以, 对 190nm 处的吸收峰, 在物质的量比大于 3 时, $A_{\text{MP-8}} - A$ 值随物质的量比的增加而缓慢增加。

3 结 论

首次用 UV-Vis 吸收光谱法研究了 MP-8 与 La^{3+} 的相互作用机理。发现由于血红素上的两个丙酸基团的羧基氧暴露程度大和带负电荷, La^{3+} 优先与 MP-8 分子中这两个羧基氧发生强的键合作用, 使血红素卟啉环的非平面性增加, $\pi-\pi^*$ 跃迁所需要的能量减少, 但 $\pi-\pi^*$ 电子跃迁几率降低。由于肽链中氢键的作用, 使肽链上的羰基基团被包埋在 MP-8 分子的疏水基团中, 暴露程度小, 所以, La^{3+} 与

MP-8 肽链中的羰基氧发生弱的相互作用, 加上肽链上的羰基离血红素卟啉环较远, 因此, 对卟啉环的结构基本上没有影响。

参 考 文 献

- [1] Zhou Q., Huang X. H., Cao Y. H. et al *J. Rare Earths*, **1999**, **17**, 303.
- [2] NI Jia-Zuan(倪嘉缙) *Biological Inorganic Chemistry of Rare Earth Elements* (稀土生物无机化学), Beijing: Science Press, **1995**.
- [3] Zhuang Q. K., Dai H. C., Gao X. X. et al *Bioelectrochem.*, **2000**, **52**, 37.
- [4] Zhuang Q. K., Dai H. C. *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, **499**, 24.
- [5] Melchionna S., Barteri M., Ciccotti G. *J. Phys. Chem.*, **1996**, **100**, 19241.
- [6] Aron J., Baldwin D. A., Marques H. M. et al *J. Inorg. Biochem.*, **1986**, **27**, 227.
- [7] Taylor M. D., Cater C. P. *Chem. Rev.*, **1962**, **62**, 503.
- [8] Harbury H. A., Loach P. A. *J. Biol. Chem.*, **1960**, **235**, 3640.
- [9] Dunford H. B., Stillman J. S. *Coord. Chem. Rev.*, **1976**, **19**, 187.
- [10] Limay S. N., Saxeua M. C. *Complexes Can. J. Chem.*, **1986**, **4**, 865.
- [11] Medforth C. J., Senge M. O., Smith K. M. et al *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, **114**, 9859.
- [12] Shelnutt J. A., Medforth C. J., Berber M. D. et al *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, **113**, 4077.
- [13] Sparks L. D., Medforth D. J., Park M. S. et al *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, **115**, 581.

Study on Mechanism of Interaction between Microperoxidase-8 and La^{3+} Using UV-Vis Absorption Spectroscopy

CHEN Ting-Ting¹ HUANG Xiao-Hua¹ FENG Yu-Ying¹

DU Jiang-Yan¹ LIU Chang-Peng² XING Wei² LU Tian-Hong^{*1,2}

(¹ College of Chemistry and Environment Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

(² Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

The mechanism of the interaction between microperoxidase-8 and La^{3+} was studied for the first time using UV-Vis absorption spectroscopic technique. It was found that La^{3+} bond firstly to carbonyl oxygen of the metacetonic acid group in the heme group of the MP-8 molecule. It results in the increase in the non-planarity of the porphyrin group in the heme group and the decrease in the energy for the $\pi-\pi^*$ transition. However, the probability of the $\pi-\pi^*$ transition is decreased. La^{3+} interact with carbonyl oxygen of the amido groups in the peptide of the MP-8 molecule based on the weak interaction. Therefore, it does not affect the structure of the prophyrin group.

Keywords: microperoxydase-8 La^{3+} UV-Vis absorption spectroscopy