

示差脉冲伏安法测定乳酸脱氢酶活性及纳米微粒 生物毒性检测新方法研究

姚开安 王 娜 赵 斌 程炯佳 倪海燕 杨正标 孙 成 毕树平*

(南京大学污染控制与资源化国家重点实验室,
生命分析化学教育部重点实验室, 化学化工学院, 南京 210093)

摘要: 采用示差脉冲伏安法, 在乳酸脱氢酶(LDH)酶促体系“丙酮酸盐 + NADH + H⁺ $\xrightleftharpoons{\text{LDH}}$ 乳酸盐 + NAD⁺”中, 通过检测 NAD⁺ 还原峰电流的变化, 测定了不同条件下(不同酶用量、缓冲液 pH 值以及温度)LDH 的活性、酶促体系的米氏常数 K_m^{NADH} 以及最大反应速率 v_{max} 。并且在最佳实验条件下, 通过检测 LDH 活性的改变, 实验考察了 3 种纳米物质(ZnS, TiO₂(R)和 TiO₂(A))对乳酸脱氢酶酶促体系的影响。

关键词: 示差脉冲伏安法; 乳酸脱氢酶; 酶活性; 纳米微粒

中图分类号: O614.24⁺1; O614.41⁺1; Q555⁺.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2007)06-0981-06

Differential Pulse Voltammetric Studies on Lactate Dehydrogenase Activity and Method for Detection of Toxicity of Nanoparticles

YAO Kai-An WANG Na ZHAO Bin CHENG Jiong-Jia NI Hai-Yan

YANG Zheng-Biao SUN Cheng BI Shu-Ping*

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, MOE Key Laboratory for Life Science,
School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract: The differential-pulse voltammetry (DPV) was used to study the lactate dehydrogenase (LDH) activity, K_m^{NADH} and v_{max} in the enzyme promoted catalytic reaction of “pyruvate + NADH + H⁺ $\xrightleftharpoons{\text{LDH}}$ lactate + NAD⁺” obtained by monitoring DPV reduction current of NAD⁺. The effects of concentration of LDH, pH values and temperature on the LDH reaction system were investigated. Under the optimum experimental conditions, the influences of nanoparticles (ZnS, TiO₂(R) and TiO₂(A)) on the LDH activity as well as the whole enzyme promoted reaction system were studied.

Key words: differential-pulse voltammetry; lactate dehydrogenase; activity of enzyme; nanoparticles

0 引 言

利用酶活性的改变作为分子生物标志物来评价环境样品的毒性是一种日益受到关注的新方法。它的优势在于能够准确、敏感地评价早期、低水平

的污染物暴露及其毒性损害, 因而可以广泛地应用于各类生物以及生态体系的监测和评价中^[1-6]。但在过去关于纳米物质的生物毒性研究中较少涉及其对酶活性的影响。本研究选用乳酸脱氢酶活性作为影响对象, 因为乳酸脱氢酶活性的测定可作为多种

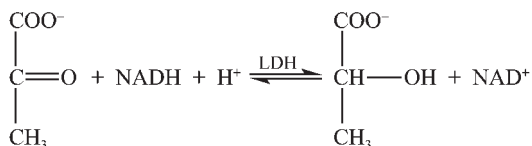
收稿日期: 2006-12-30。收修改稿日期: 2007-04-30。

国家自然科学基金资助项目(No.20575025), 江苏省自然科学基金(No.BK2005209)和教育部博士点基金(No.20050284030)。

*通讯联系人。E-mail: bisp@nju.edu.cn

第一作者: 姚开安, 女, 30 岁, 博士研究生; 研究方向: 环境分析化学。

恶性疾病的诊断指标,以及在环境污染物暴露对生物体损害的指示物^[2,3]。乳酸脱氢酶在辅酶 NADH 存在下,可以催化丙酮酸盐和乳酸盐间的转化反应:



本研究中用反应的初速率 v_0 表示酶的活性。环境的性质和条件对酶促反应的动力学性能也有举足轻重的影响,特别是 pH 值和温度,所以选择时应同时兼顾,必须实验考察它们的影响^[7]。

纳米物质因其特殊的结构,使其产生出小尺寸效应、量子效应和表面效应等,从而在机械性能、磁、光、电、热等方面与宏观物质有很大不同^[8]。同时纳米物质对机体所产生的生物效应的性质和作用强度可能发生本质上的改变^[9-13]。所以人们在陶醉于纳米物质优良性能的同时也应高度关注它们对环境和人体的潜在危害。

使用电化学方法测定酶的活性已有较多报道^[14,15],但通过其测定酶的活性的变化来评价纳米物质对生物体的影响还少见报道。本文采用示差脉冲伏安法研究了酶用量、pH 值和温度对 LDH 酶促反应体系的影响,进而在最佳条件下测定了不同浓度的纳米 ZnS 和两种纳米 TiO₂ 对 LDH 酶促反应体系的影响。研究结果为进一步了解和评价纳米物质对生物体的影响提供了更多的参考和帮助。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂

丙酮酸(生化试剂),纯度>98.5%,三(羟甲基)氨基甲烷(Tris),中国医药(集团)上海化学试剂公司。 β -还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸二钠盐(β -NADH), β -尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(β -NAD⁺)(生化试剂),纯度>90.0%,均为上海伯奥生物科技有限公司产品。牛心乳酸脱氢酶(LDH)(10 mg·mL⁻¹)为 Sigma 公司产品,用时稀释 100 倍。纳米 ZnS 由南京大学配位化学重点实验室陈慧兰教授课题组提供,纳米 TiO₂ (A.R.)由中科院泰兴纳米厂提供。0.10 mol·L⁻¹(共轭酸碱的总浓度)各 pH 值的 Tris-HCl 缓冲溶液按分析化学手册配制。支持电解液为 0.15 mol·L⁻¹ KCl。所用化学试剂除特别说明外均为分析纯。实验器皿

使用前在 1:10 硝酸中浸泡 24 h 后再用自来水、蒸馏水和二次蒸馏水依次洗净。实验用水均为二次蒸馏水。实验均在 N₂ 气氛保护、LDH 酶促反应体系在恒温(15、25、37±1 °C)条件下进行。

1.1.2 仪器

三电极系统:悬汞电极为工作电极,铂片电极为对电极,饱和甘汞电极为参比电极。分析测定在上海辰华公司的 CHI610C 电分析仪上进行。示差脉冲伏安(DPV)参数为:扫速 20 mV·s⁻¹,脉冲幅度 50 mV,脉冲宽度 50 ms。79-1 型磁力加热搅拌器(国华仪器厂)。雷磁 PHS-2F 数字酸度计(上海精密科学仪器有限公司)。501 型超级恒温器(上海实验仪器厂)。KQ100DB 型超声清洗仪(昆山舒美超声仪器有限公司)。UV-3100 型紫外可见光谱仪(岛津公司)。JEM-100CX 型透射电子显微镜(日本电子)。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸脱氢酶酶促体系的示差脉冲伏安电化学检测

25 mL 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲溶液(加入纳米物质后超声处理 10 min)置于三电极系统,恒温、通氮除氧 10 min,并维持氮气氛围后,注入稀释 100 倍酶液,搅拌反应 5 min。后加入一定量的丙酮酸(0.8 mmol·L⁻¹)、NADH (0.2 mmol·L⁻¹),每隔一定的时间记录 NAD⁺示差脉冲伏安还原峰电流 i_p 。

1.2.2 米氏常数及最大反应速率的测定

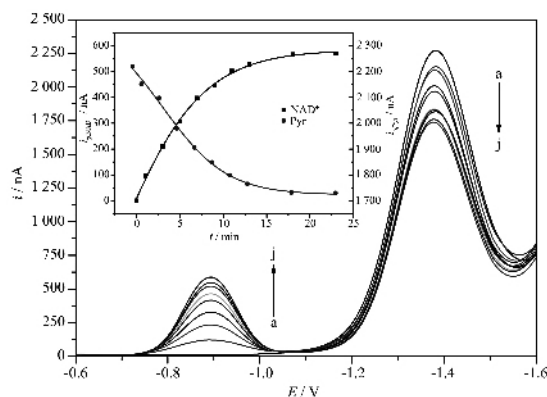
25 mL 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲溶液(加入纳米物质后超声处理 10 min)置于三电极系统,恒温、通氮除氧 10 min,并维持氮气氛围后,注入稀释 100 倍酶液,搅拌反应 5 min。加入固定量的丙酮酸(0.8 mmol·L⁻¹)、不同浓度的 NADH,然后记录示差脉冲伏安还原峰电流。根据公式: $\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{\max} \times c_{\text{NADH}}} + \frac{1}{v_{\max}}$ (v_0 :反应初速率; K_m :米氏常数; $v_{\max}$:最大反应速率; c_{NADH} :加入的 NADH 浓度),以 v_0^{-1} 对 c_{NADH}^{-1} 按 Lineweaver-Burk 法作图,由图求得 LDH 催化体系的动力学参数 K_m 和 $v_{\max}$ 。

2 结果与讨论

2.1 LDH 酶促体系的 DPV 响应

在乳酸脱氢酶酶促反应体系中,汞电极上有电化学响应的物质是丙酮酸和氧化型辅酶 I NAD⁺。酶促反应开始前,只有底物丙酮酸在-1.38 V 的位置上有一个还原峰(pH=7.5)。反应开始后,随着反应

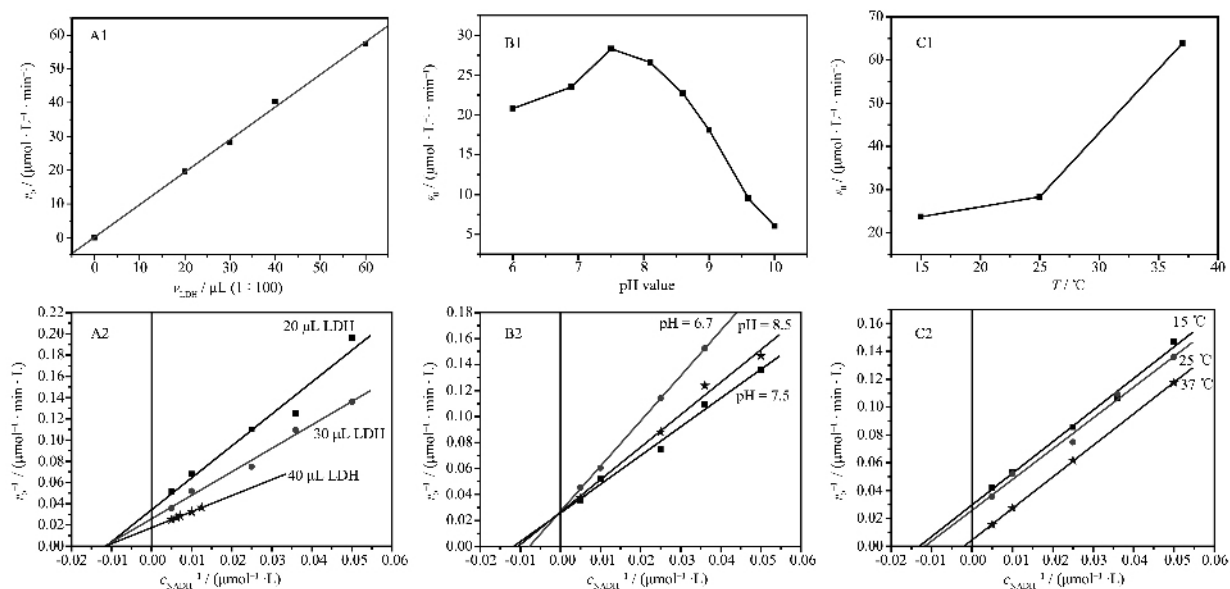
时间的延长,位于 -0.89 V 的 NAD^+ 的还原峰逐渐增大($\text{pH}=7.5$),而丙酮酸的还原峰逐渐减小(图1)。反应结束后, NAD^+ 的还原峰不再增大。在最初反应的3 min内, NAD^+ 的还原峰电流 i_p 随反应时间的延长而线性增加,因此可由 i_{p,NAD^+} 计算得到反应的初速率



$0.10\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl buffer solution ($\text{pH}=7.5$) + $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $8.0\times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pyr, $2.0\times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADH and $30\text{ }\mu\text{L}$ LDH, a $\rightarrow$ j: $t=0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 18, 23\text{ min}$, $T=25\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

图1 乳酸脱氢酶酶促反应体系的DPV响应

Fig.1 DPV responses of LDH reaction system with time



(A1) effect of concentration of LDH on the reaction rates of LDH reaction system

(B1) effect of pH values on the reaction rates of LDH reaction system

(C1) effect of temperature on the reaction rates of LDH reaction system

(A2) Double-reciprocal plot of v_0^{-1} vs c_{NADH}^{-1} , 20, 30, 40 μL LDH (1:100)

(B2) Double-reciprocal plot of v_0^{-1} vs c_{NADH}^{-1} , $\text{pH}=6.7, 7.5, 8.5$

(C2) Double-reciprocal plot of v_0^{-1} vs c_{NADH}^{-1} , $T=15, 25, 37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

Others experimental conditions are the same as in Fig.1

图2 不同酶用量、pH值及温度对乳酸脱氢酶酶促体系 v_0 、 v_{max} 和 K_m 的影响

Fig.2 Effects of different concentration of LDH, pH values and temperature on v_0 , v_{max} and K_m of LDH system

v_0 ,进而表示酶活性。

2.2 不同酶用量、pH值及温度对乳酸脱氢酶酶促体系DPV响应的影响

在酶促反应中,加入不同的酶量(20、30、40、60 μL LDH),结果显示各反应的初速率 v_0 与所加的酶量有良好的线性关系(图2A1)。体系的特征常数 K_m^{NADH} 不随酶量的增加而改变,而 v_{max} 随酶量的增加而增大(图2A2,表1)。

在不同pH值缓冲液中, $\text{pH}=7.5$ 时 v_0 最大,即酶的活性最高(图2B1)。 pH 值对 K_m^{NADH} 影响呈U形曲线形式,在实验条件范围内 pH 值对 v_{max} 影响较小^[6]。最低点在 $\text{pH}=7.5$ 处,表明该 pH 值下底物和酶结合最紧密。 v_{max} 变化趋势和 v_0 变化趋势相同,最大处同样在 $\text{pH}=7.5$ 处。因此 $\text{pH}=7.5$ 是酶反应的最佳pH值(图2B2,表1)。

15、25和37 $^{\circ}\text{C}$ 时 v_0 、 K_m^{NADH} 和 v_{max} 值均随温度上升而增加(图2C,表1)。37 $^{\circ}\text{C}$ 时 K_m^{NADH} 值比15、25 $^{\circ}\text{C}$ 时大很多。这表明温度升高虽然加快了酶的反应速率,但同样增大了对酶稳定性的影响,导致其和底物结合能力变差。

表 1 不同酶用量(A)、pH 值(B)及温度(C)对乳酸脱氢酶酶促体系 $v_{\max}$ 、 K_m 的影响
Table 1 Effects of different concentrations of LDH (A), pH values (B), temperature (C) on K_m and $v_{\max}$ of LDH

			$v_{\max} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	$K_m / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
(A)	LDH amount / μL	20	29.2	87.7
		30	38.8	85.7
		40	57.5	86.8
(B)	pH value	6.7	37.0	129
		7.5	38.8	85.7
		8.5	37.7	94.3
(C)	Temperature / $^{\circ}\text{C}$	15	33.8	75.6
		25	38.8	85.7
		37	221	500

综上所述,选择反应温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,体系 pH 值为 7.5,加入 30 μL LDH 为较适合的测定条件。

2.3 被研究的纳米物质的性质

从图 3 中可以看到 3 种纳米物质均为球形纳

米微粒,纳米 ZnS 粒径在 6~8 nm,2 种纳米 TiO_2 粒径在 25~30 nm 间。3 种纳米物质在水溶液中的分散能力均很好,在 0.5~1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内都能被分散为稳定均一的不同浓度的胶体溶液。

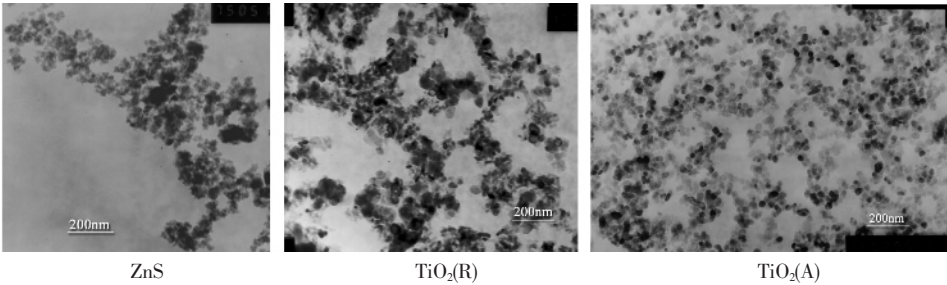


图 3 各纳米物质的 TEM 照片
Fig.3 TEM of nanoparticles

2.4 纳米物质对乳酸脱氢酶酶促体系的影响

实验中将 LDH 酶促体系应用于纳米物质对酶活性影响的研究。如图 4 所示,纳米 ZnS 和纳米 TiO_2 对 LDH 酶活性均有抑制作用,并且抑制随浓度增加而增大。3 种纳米物质对酶的抑制程度为:纳

米 ZnS >纳米 TiO_2 (锐钛矿型)>纳米 TiO_2 (金红石型)。过去对纳米 TiO_2 的生物毒性研究显示,纳米 TiO_2 的光催化氧化性能是产生生物毒性的一个重要的原因^[17]。其中锐钛矿型纳米 TiO_2 比金红石型纳米 TiO_2 光活性高。本实验虽未用紫外灯照射纳米 TiO_2 ,但纳米 TiO_2 对 LDH 酶活性仍有抑制作用,并且纳米 TiO_2 (锐钛矿型)>纳米 TiO_2 (金红石型)。这可

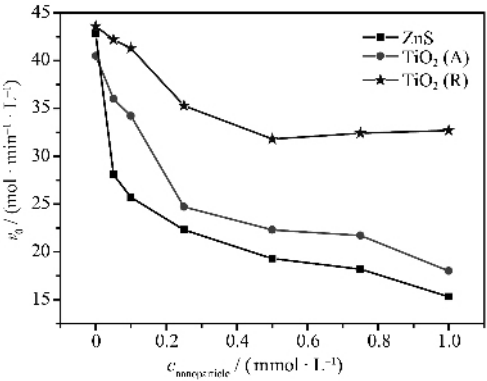


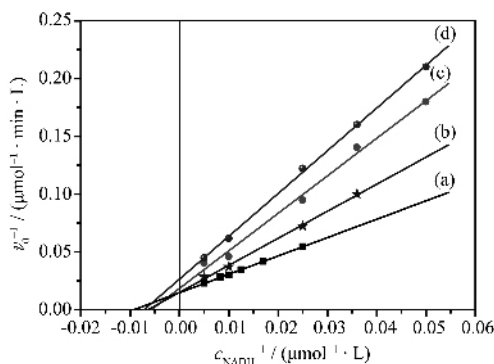
图 4 3 种纳米物质的浓度变化对乳酸脱氢酶酶促体系 v_0 的影响
Fig.4 Effect of nanoparticles on the reaction rates of LDH reaction system

表 2 3 种纳米物质对乳酸脱氢酶酶促体系 $v_{\max}$ 、 K_m 的影响
Table 2 Effect of nanoparticles on $v_{\max}$ and K_m of LDH

	$K_m / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$v_{\max} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$
$c_{\text{nanoparticles}}=0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	108	68.0
$c_{\text{TiO}_2(\text{A})}=0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	177	55.2
$c_{\text{TiO}_2(\text{R})}=0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	156	66.7
$c_{\text{ZnS}}=0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	140	37.7

能仍是与纳米 TiO_2 的光催化氧化性能有关。而纳米 ZnS 的稳定性要低于氧化物,这可能是造成其抑制的原因。

米氏常数 K_m 及反应最大速率 $v_{\max}$ 的测定结果(图5,表2)显示 $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时3种纳米物质对LDH体系的抑制机理均为竞争-非竞争的混合型抑制^[18]。



(a) without any nanoparticles
(b) in the presence of $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nano- TiO_2 (R)
(c) in the presence of $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nano- TiO_2 (A)
(d) in the presence of $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nano- ZnS
Other experimental conditions are the same as in Fig.1

图5 3种纳米物质的双倒数曲线(v_0^{-1} vs c_{NADH}^{-1})

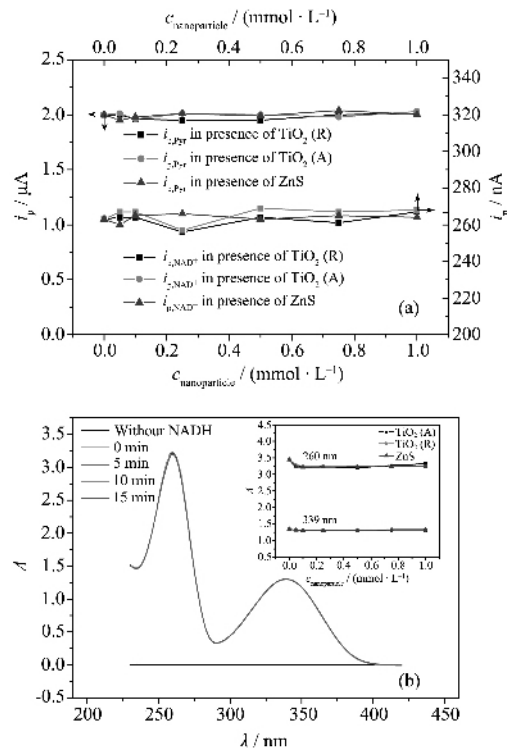
Fig.5 Double-reciprocal plot (v_0^{-1} vs c_{NADH}^{-1}) of nanoparticles

2.5 吸附影响的讨论

为了了解由于纳米物质对 NAD^+ 、丙酮酸和 NADH 的吸附和相互作用而对体系测量造成的影响,使用电化学方法测定了3种纳米物质在6种浓度下 NAD^+ 、丙酮酸 DPV 响应(图6a)。使用紫外可见光谱测定了3种纳米物质在6种浓度下的 NADH 吸收光谱(图6b),并同不加纳米物质时加以对照。结果显示峰电流和吸光度均变化较小,说明在15 min内纳米物质对以上3种物质的吸附和相互作用相对较弱,对DPV电化学测定LDH酶活性的影响并不大。

同时为了了解由于悬汞电极对酶促体系各组分吸附而产生的影响,试验考察了酶在悬汞电极上吸附的影响。将悬汞电极分别浸置在 NAD^+ 和 LDH 溶液中预吸附1 min后测定 NAD^+ 的峰电流(循环伏安法 CV),并同无预吸附时 CV 图加以对照。实验结果表明预吸附 NAD^+ 后 NAD^+ 的还原峰电流只下降了1%,预吸附 LDH 后 NAD^+ 的还原峰电流只下降了6%(图7)。这表明酶在悬汞电极上的吸附影响同样较小,与过去使用汞电极测定 LDH 活性的研究结

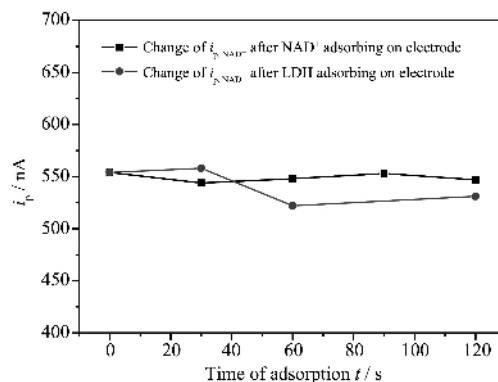
果也相符合,即在较短的作用时间范围内,吸附影响不大^[19]。



0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, $10 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ nanoparticle, $8.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Pyr, $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADH , $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAD^+ ; Other experimental conditions are the same as in Fig.1

图6 不同浓度的3种纳米物质对 NAD^+ 、丙酮酸峰电流及 NADH 吸光度的影响

Fig.6 Effect of nanoparticles on the i_p , NAD^+ , i_{ppyr} and A_{NADH}



$1.6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAD^+ , others experimental conditions are the same as in Fig.1

图7 NAD^+ 及 LDH 在汞电极上预吸附对 NAD^+ 峰电流的影响

Fig.7 Effect of the NAD^+ and LDH 's pre-absorption on the i_{p,NAD^+}

3 结论

采用示差脉冲伏安法研究了酶用量、pH 值和

温度对 LDH 酶促反应体系的影响,并在最佳条件下测定了不同浓度的纳米 ZnS 和两种纳米 TiO₂ 对 LDH 酶促反应体系的影响。同时电化学和紫外光谱实验结果均表明体系中纳米物质的吸附和酶在汞电极上的吸附问题对体系的测量影响均不大。这一结果为纳米物质对生物体的影响提供了更多的实验证据,为纳米物质生物兼容性测试提供了更多可利用的指标。

参考文献:

- [1] Manduzio H, Monsinjon T, Galap C, et al. *Aquat. Toxicol.*, **2004**,**70**(1):83~93
- [2] Monteiro M, Quintaneiro C, Pastorinho M, et al. *Chemosphere*, **2006**,**62**(8):1333~1339
- [3] Almeida J A, Diniz Y S, Marques S F G, et al. *Environ. Int.*, **2002**,**27**(8):673~679
- [4] Barata C, Lekumbarri I, Vila-Escale M, et al. *Aquat. Toxicol.*, **2005**,**74**(1):3~19
- [5] Devier M H, Augagneur S, Budzinski H, et al. *Environ. Toxicol. Chem.*, **2003**,**22**(11):2679~2687
- [6] Arlt V M, Hewer A, Sorg B L, et al. *Chem. Res. Toxicol.*, **2004**,**17**(8):1092~1101
- [7] LI Yuan-Zhong(李元宗), CHANG Wen-Bao(常文保). *Biochemical Analysis* (生化分析). Beijing: Higher Education Press, **2003**.6~14
- [8] ZHU Jun-Jie(朱俊杰). *Huaxue Chuanganqi (Chemical Sensors)*, **2005**,**25**(2):25~25
- [9] Hoshino A, Fujioka K, Oku T, et al. *Nano Lett.*, **2004**,**4**(11):2163~2169
- [10] Hsieh S C, Wang F F, Lin C S, et al. *Biomaterials*, **2006**,**27**(8):1656~1664
- [11] Menzel F, Reinert T, Vogt J, et al. *Nucl. Instrum. Meth. B*, **2004**,**219**~**220**:82~86
- [12] Dunford R, Salinar A, Cai L, et al. *Febs Lett.*, **1997**,**418**:87~90
- [13] Amezcaga-Madrid P, Silveyra-Morales R, Cordoba-Fierro L, et al. *J. Photoch. Photobio. B*, **2003**,**70**:45~50
- [14] Gao N, Zhao M, Zhang X, Jin W. *Anal. Chem.*, **2006**,**78**(1):231~238
- [15] Valincius G, Ignatjev I, Niaura G, et al. *Anal. Chem.*, **2005**, **77**(8):2632~2636
- [16] Doughty M J. *Exp. Eye Res.*, **1998**,**66**(2):231~239
- [17] Wamer W G, Yin J J, Wei R R. *Free Radical. Bio. Med.*, **1997**,**23**(6):851~858
- [18] YUAN Qin-Sheng(袁勤生). *Modern Enzymology(现代酶学)*. Shanghai: East China University of Science and Technology Press, **2001**.31~44
- [19] GAO Xiao-Xia(高小霞), WANG Xun-Qing(汪勋清). *Fenxi Huaxue(Chinese J. Anal. Chem.)*, **1998**,**26**(6):757~761