La³⁺对过氧化氢酶电化学和生物电催化活性的影响

周 慧¹ 丁晓岚² 陆天虹¹ 黄晓华^{*,1} (¹南京师范大学化学与环境科学学院,南京 210097)

(²清华大学生物科学与技术系,北京 100084)

摘要:本文研究了 La³⁺对过氧化氢酶(CAT)的直接电化学反应活性和对 H₂O₂ 还原的生物电催化活性的影响。发现当 La³⁺浓度低 时, La³⁺能提高 CAT 的直接电化学反应活性和对 H₂O₂ 还原的电催化活性。当 La³⁺浓度高时, La³⁺会降低 CAT 的直接电化学反应 活性和对 H₂O₂ 还原的电催化活性。这是由于 La³⁺能与 CAT 的肽链上的氨基酸残基发生作用而使肽链构象发生变化,导致血红 素结构发生变化。当 La³⁺浓度低时, La³⁺能使血红素的非平面性增加,活性中心 Fe(III)的暴露程度增加,因此,低浓度的 La³⁺能增加 CAT 的电化学和生物电催化活性,而高浓度的 La³⁺却会使血红素的非平面性降低,活性中心 Fe(III)的暴露程度降低,因此,降低 了 CAT 的电化学和生物电催化活性。

关键词: 镧离子; 过氧化氢酶; 电化学反应; 生物电催化活性 中图分类号: O614.33⁺¹ 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2008)03-0388-05

Effect of La³⁺ on Electrochemical and Bioelectrocatalytic Activity of Catalase

ZHOU Hui¹ DING Xiao-Lan² LU Tian-Hong¹ HUANG Xiao-Hua^{*,1} ('College of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097) (2Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract: The effect of La³⁺ on the electrochemical activity and the bioelectrocatalytic activity of catalase (CAT) for the H_2O_2 reduction was investigated. It is found that when the La³⁺ concentration is low La³⁺ can increase the electrochemical and bioelectrocatalytic activity of CAT. When the La³⁺ concentration is high La³⁺ can decrease the electrochemical and bioelectrocatalytic activity of CAT. This is due to that La³⁺ can interact with amino acid residues in the peptide of CAT. The interaction would lead to the change in the conformation of the peptide and then the change in the structure of the heme group. When the La³⁺ concentration is low, La³⁺ can increase the non-planarity of the heme group, leading to the increase in the exposure extent of the heme active center, Fe(III). Thus, La³⁺ at the low concentration can increase the electrochemical and the bioelectrocatalytic activity of CAT. When the La³⁺ concentration can increase the electrochemical and the bioelectrocatalytic activity of CAT. When the La³⁺ concentration is high, La³⁺ can increase the electrochemical and the bioelectrocatalytic activity of CAT. When the La³⁺ concentration is high, La³⁺ can decrease the non-planarity of the heme group, leading to the increase the non-planarity of the heme group, leading to the increase the non-planarity of the heme group, leading to the increase the non-planarity of the heme group, leading to the activity of CAT. When the La³⁺ concentration is high, La³⁺ can decrease the non-planarity of the heme group, leading to the decrease in the exposure extent of Fe(III). Thus, La³⁺ at the high concentration can decrease the electrochemical and bioelectrocatalytic activity of CAT.

Key words: lanthanum ion; catalase; electrochemical reaction; bioelectrocatalytic activity

稀土离子因其特殊的电子结构、物理和化学性 质而被广泛应用于各种行业,稀土农用为中国科学 家首创^[1,2]。在农业上,La³⁺作为肥料调节剂用于促进 作物生长,并与杂交水稻一并出口国外。La³⁺可直接 或通过食物链传递间接进入生物体,显著影响诸如 过氧化氢酶、超氧化物歧化酶等酶系统^[34]。研究表

收稿日期: 2007-10-15。收修改稿日期: 2007-12-22。

国家自然科学基金(No.20471030)和国家发展和改革委员会稀土专项基金(No.IFZ2051210, GFZ20612108)。

^{*}通讯联系人。E-mail: wxxhhuang@yahoo.com

第一作者:周 慧,女,24岁,硕士研究生;研究方向:稀土与酶的相互作用。

明,适当浓度的 La³⁺会促进酶系统反应活性,高浓度 的 La³⁺则抑制酶系统反应活性,但对 La³⁺调控酶的 化学机理,尚不十分清楚^[6]。

CAT 是一类广泛存在于动物、植物和微生物中 的氧化酶,其功能是催化细胞内过氧化氢分解,防 止膜脂发生过氧化。不同生物体内的 CAT 结构虽有 不同,但大多是由4个亚基组成,每个亚基都含有 一个 Fe(III)-原卟啉活性中心。通过对牛肝 CAT 结构 的分析发现,每一个亚基都是由506 个氨基酸残基 组成,包含有13 个螺旋和9个折叠。血红素部分被 埋在分子表面下2 nm 处,距分子中心 2.3 nm⁶。

我们课题组用紫外可见吸收光谱、同步荧光及 X射线光电子能谱方法,研究了生理条件下 La³⁺对 CAT 活性的影响, 初步探讨了 La³⁺调控 CAT 的化学 过程¹⁷。由于 CAT 疏水残基在四聚体内部形成一个 疏水环境^间,导致 CAT 直接电化学较难实现。换言 之,因为缺少 La³⁺对 CAT 电子传递影响的实验事 实, 无法正确地阐释 La³⁺与 CAT 相互作用的酶化学 机理。近几年来,碳纳米管因其独特的几何尺寸、优 良的电子传导特性以及在生物传感和催化方面表 现出的优良性质而受到广泛关注18。因此,本文探讨 了在玻碳 (GC) 电极表面修饰多壁碳纳米管 (MWCNTs) 的方法,发现固定在 MWCNTs 表面的 CAT 能发生准可逆的直接电化学反应, 低和高浓度 的 La³+能对 CAT 的电化学活性和生物电催化活性 发生促进和抑制作用,这可为稀土离子与 CAT 相互 作用的酶化学机理研究提供参考。

1 实验部分

1.1 试 剂

牛肝 CAT 为美国 Sgma 公司产品(c-40, 相对摩 尔质量 240 000 Da, 活性>10 000 U·mg⁻¹), 使用前未 经进一步纯化, 其浓度以 405 nm 处、吸光系数 325 mmol⁻¹·L·cm⁻¹ 的吸光度定量测定^[9]。实验中 CAT 浓 度为 1 μmol·L⁻¹。LaCl₃ 根据文献^[10]制备, MWCNTs 管购于上海试剂公司, 缓冲溶液是 0.1 mol·L⁻¹ 的三 羟甲基胺基甲烷(Tris)-HCl(pH=7.0)。其余试剂均为 分析纯试剂。实验用水为三次蒸馏水。

1.2 仪 器

圆二色光谱(CD)在 Jasco500c 型(日本)CD 光谱 仪上进行测定,光程为 5 mm,数据采集间隔 0.5 nm,检测波长 200~250 nm,采用 3 次测量求平均值 法消除仪器噪音。使用程序 Selcon 3 拟合 CD 谱数 据来计算 CAT 二级结构含量。循环伏安测量采用美 国 EG&G PAR 公司的 Model 273A 恒电位仪及常 规的三电极体系电化学池,参比电极为饱和甘汞电 极 (SCE),辅助电极为铂丝,工作电极为 CAT 及 MWCNTs 修饰的玻碳电极,电解液为 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCI (pH=7.0)缓冲溶液,电化学测试前通高纯 氮气 30 min 以除去溶液中的氧。实验过程保持在氮 气气氛中。

1.3 CAT/MWCNTs/GC 电极的制备

GC 电极(直径为 3 mm)在修饰之前,分别用 6 号砂纸、0.3 和 0.05 µm Al₂O₃ 抛光粉抛光至镜面, 然后分别在无水乙醇和二次蒸馏水中超声清洗各 5 min。

MWCNTs 在使用前经以下步骤纯化处理: 在 3 mol·L⁻¹ HNO₃ 溶液中回流 5 h, 然后用二次蒸馏水 冲洗, 接着用超声分散的方法将它分散在 N, N-二 甲基甲酰胺中, 形成 0.2 mg·mL⁻¹ MWCNTs 的均匀 的黑色悬浊液。用微量加样器将 2 μL处理好的 MWCNTs 滴加到玻碳电极表面, 在室温下, 待溶剂 挥发后, 得到 MWCNTs/GC 电极, 再将 8 μL 的 1 μmol·L⁻¹的 CAT 溶液滴加到 MWCNTs/GC 电极表 面, 在室温下, 待溶剂挥发后, 得到 CAT/MWCNTs/ GC 电极, 即可以进行各种电化学实验。电极不使用 时在 4 下保存。

2 结果与讨论

图 1 为 GC, MWCNTs/GC 和 CAT/MWCNTs/GC 电极在 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl 溶液中的循环伏安曲 线。由图可见, 在曲线 a 和 b 中, 没有观察到一对氧 化还原峰, 而在曲线 c 中, 可观察到一对氧化还原 峰, 很明显, 这是 CAT 发生直接电化学反应所产生 的循环伏安峰, 对应于 CAT-Fe(II)和 CAT-Fe(II)之间 的转换^[11]。它们的峰电位分别为- 0.426 和- 0.486 V, 峰电位差为 60 mV, 它们的峰电流基本相等, 表明 固定在 MWCNTs 上的 CAT 的直接电化学反应是准 可逆的, 其式量电位 E^{\odot} 为- 0.456 V。

图 2 是 CAT/MWCNTs/GC 电极在含不同浓度 La³⁺的 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCI 溶液中的循环伏安曲 线。当溶液中含 0.5 µmol·L⁻¹ La³⁺时(曲线 b), 峰电位 与没有 La³⁺时相同, 但峰电流增加了 2 倍多。当 La³⁺ 的浓度为 5 µmol·L⁻¹时 (曲线 c), 峰电位也没有变 化, 但氧化还原峰电流分别减少 44.4%和 33.3%, 表 明低浓度的 La³⁺能够增加 CAT 的电化学活性, 而高 浓度的 La³·则相反。这与适当浓度的稀土离子能够 使植物体内的酶的活性提高的现象一致。



- 图 1 不同电极在 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl(pH=7.0)中的 循环伏安曲线
- Fig.1 Cyclic voltammograms of (a) the GC, (b) MWCNTs/ GC and (c) CAT/MWCNTs/GC electrodes in 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl buffer solution (pH =7.0)



- 图 2 CAT/MWCNTs/GC 电极在含不同浓度 La³¹的 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl 溶液中的循环伏安曲线
- Fig.2 Cyclic voltammograms of the CAT-MWCNT/GC electrode in 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl solution with
 (a) 0, (b) 0.5 μmol·L⁻¹ La³⁺ and (c) 5 μmol·L⁻¹ La³⁺

图 3 为 CAT/MWCNTs/GC 电极在含不同浓度 La³⁺及含和不含 6 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 的 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCI 溶液中的循环伏安曲线。当溶液中不含 La³⁺和 H₂O₂ 时,只观察到 CAT 的氧化还原峰(曲线 a)。当溶 液中加入 6 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 后,可观察到在-0.5 V 处 的 H₂O₂ 还原峰(曲线 b),说明 CAT 能催化 H₂O₂ 电 化学还原反应。如再加入 0.5 µmol·L⁻¹La³⁺, H₂O₂ 还 原峰峰电位基本不变,但峰电流比没有 La³⁺时增加 了 60%(曲线 c)。当加入 La³⁺的浓度为 5 µmol·L⁻¹ 时, H₂O₂峰电流比没有 La³⁺时降低了 50%(曲线 d)。



Scan rate: 50 mV ·s 1, H2O2 concentration: 6 mmol·L 1

- 图 3 CAT/MWCNTs/GC 电极在含有不同浓度 La³⁺及含 和不含 6 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 的 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl 溶液中的循环伏安曲线
 - Fig.3 Cyclic voltammograms of 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl solution (a) without II_2O_2 and La^{3+} , (b) with II_2O_2 and without La^{3+} , (c) with H_2O_2 and 0.5 μ mol·L⁻¹ La^{3+} and (d) with H_2O_2 and 5 μ mol·L⁻¹ La^{3+} at the CAT/MWCNTs/GC electrode

图 4 与图 3 相似,只是 H₂O₂ 的浓度增加到 10 mmol·L⁻¹,结果也基本相同。当 La³⁺的浓度为 0.5 µmol·L⁻¹时(曲线 c),0.01 mol·L⁻¹ H₂O₂ 的还原峰电 流比没有 La³⁺时增加了 55%。当 La³⁺的浓度为 5 µmol·L⁻¹时,H₂O₂ 的还原峰电流降低了 43%(曲线 d)。图 3 和图 4 的结果都说明低浓度的 La³⁺会促进



Scan rate: 50 mV · s⁻¹, H₂O₂ concentration: 10 mmol · L⁻¹

- 图 4 CAT/MWCNTs/GC 电极在含有不同浓度 La³⁺及含 和不含 10 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 的 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl 溶液中的循环伏安曲线
 - Fig.4 Cyclic voltammograms of 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl solution (a) without H_2O_2 and La^{3+} , (b) with H_2O_2 and without La^{3+} , (c) with H_2O_2 and 0.5 μ mol·L⁻¹ La^{3+} and (d) with H_2O_2 and 5 μ mol·L⁻¹ La^{3+} at the CAT/MWCNTs/GC electrode

CAT 的生物电催化活性, 而高浓度的 La³⁺则抑制了 CAT 的生物电催化活性。这结果与前面的循环伏安 研究的结果一致。

生命科学研究报道, 酶和蛋白质的天然构象的 保持, 是生物活性的实质^[12]。我们以前的研究^[13]表 明, La²⁺能与酶的肽链上的氨基酸残基发生作用, 使 酶的肽链的构象发生变化。而肽链构象的变化能导 致血红素结构的变化。当 La³⁺浓度低时, 血红素的非 平面性增加, 活性中心 Fe(III)的暴露程度增加, 因此, 电化学反应活性和电催化活性增加。但当 La³⁺浓度 高时, 血红素的非平面性降低, 活性中心 Fe(III)的暴 露程度降低, 因此, 电化学反应活性和电催化活性 也降低。这就是上述的低浓度的 La³⁺能够增加 CAT 的电化学活性和对 H₂O₂ 还原的电催化活性, 而高 浓度的 La³⁺却会降低 CAT 的电化学活性和对 H₂O₂ 还原的电催化活性的原因。

远紫外 CD 光谱的实验证明, La³⁺也能与 CAT 发生作用, 并改变 CAT 的构象。在图 5 曲线 a 中, 可 观察到在 208 和 222 nm 处 2 个负峰, 它们分别对 应于酰氨带 - * 跃迁的和 n- * 跃迁, 主要反映的 是分子中的 -螺旋结构^[14,15],但在加入高浓度(5 μmol ·L⁻¹)La³⁺后, 在 208 和 222 nm 处的负峰的强度降低





图 5 含与不含 La³⁺的 CAT 溶液在远紫外区的 CD 光谱 Fig.5 Far-UV CD spectra of 1.0 μmol·L⁻¹ CAT solution with (a) 0 and (b) 5 μmol·L⁻¹ La³⁺

从远紫外 CD 光谱计算得到 La³⁺与 CAT 相互作 用后的二级结构数据列于表 1 中。从表 1 可清楚地 看到, 当高浓度 La³⁺与 CAT 相互作用后,与不含 La³⁺ 的 CAT 溶液相比, CAT 分子的 -螺旋, -折叠的含 量减少, 而 -转角和无规卷曲含量增加, 即 CAT 有 序的二级结构大幅度减少了。上述结果证明, La³⁺的 确与 CAT 发生了作用, 改变了 CAT 分子肽链的二 级构象。

表 1 由图 5 计算得的 CAT 结构数据 Table 1 Structure data of CAT calculated from Fig 5

Condition	-helix/%	-sheet / %	-turn / %	Random coil / %
$C_{La^{3+}}C_{CAT}=0$	40.3	12.8	0.0	46.9
$C_{La^{3+}}C_{CAT}=5$	31.5	10.4	8.3	49.8

Scan rate:100 mV · s⁻¹.

图 6 为含和不含 La³⁺的 CAT 溶液的 Soret 带区 域的 CD 光谱。由图可见, 在没有 La³⁺时, CAT 的



图 6 含与不含 La³⁴的 CAT 溶液在 Soret 带区的 CD 光谱 Fig.6 CD spectra at Soret region of 1.0 µmol·L⁻¹ CAT solution with (a) 0 and (b) 5 µmol·L⁻¹ La³⁴

Soret 带位于 409 nm 处(曲线 a)。当 La³⁺与 CAT 相互 作用后, Soret 带从 409 nm 蓝移到 402 nm 处 (曲线 b)。且其摩尔椭圆度增加了 32.2%。这说明 La³⁺改变 了 CAT 分子血红素的结构, 导致 CAT 分子中血红 素中心 Fe(III)的非平面性降低,因此,降低了 CAT 分 子 Fe(III)的暴露程度^[17]。

3 结 论

由上述的结果可得到以下结论:由于 La³⁺能与 CAT 的肽链上的氨基酸残基发生作用,使酶的肽链 的构象发生变化。而肽链构象的变化能导致血红素 结构的变化。当 La³⁺浓度低时, La³⁺能使血红素的非 平面性增加,活性中心 Fe(III)的暴露程度增加,因此, 低浓度的 La³⁺能增加 CAT 的电化学活性和对 H₂Q₂ 还原的电催化活性,而高浓度的 La³⁺却会使血红素 的非平面性降低,活性中心 Fem的暴露程度降低, 因此,降低了 CAT 的电化学活性和对 H₂O₂ 还原的 电催化活性。这说明不同浓度的 La³⁺对 CAT 的活性 影响不同,所以选择适当浓度的 La³⁺对植物的生长 具有促进作用。

参考文献:

- [1] GUO Bo-Sheng(郭伯生). Chinese Rare Earths(Xitu), 1999, 20:64~68
- [2] HUANG Xiao-Hua(黄晓华), ZHOU Qing(周 青). Chinese Nature Magazine(Ziran Zazhi), 2001,23:160~163
- [3] ZENG Qing(曾 青), ZHU Jian-Guo(朱建国), XIE Zhu-Bin (谢祖彬), et al. J. Chinese Rare Earth Society(Zhongguo Xitu Xuebao), 2003,21(3):313~315
- [4] JIN Jin(金 琎), YE Yaxin(叶亚新), WANG Min(王 敏). Ecology and Environment (Shengtai Huanjing), 2007,16(2): 313~316
- [5] NI Jia-Zan(倪嘉缵). Biochemistry of Rare Earths(稀土生物 无机化学). Beijing: Science Press, 1995.

- [6] Murthy M R N, Reid T J, Sicignano A, et al. J. Mol. Biol., 1981,152:465~499
- [7] JI Hong-Nian(吉红念), LU Tian-Hong(陆天虹), LI Cun(李邨), et al. Acta Chimica Sinica(Huaxue Xuebao), 2004,11: 1085~1088
- [8] CAI Chen-Xin(蔡称心), CHEN Jing(陈 静), BAO Jian-Chun(包建春), et al. Chinese J. Anal. Chem.(Fenxi Huaxue), 2004,32:381~387
- [9] Gebicka L. Int. J. Biol. Macromol., 1999,24:69~74
- [10]Taylar M D, Carter C P. J. Inorg. Nud. Chem., 1962,24:287 ~289
- [11]Zhang Z, Chouchane S, Magiliozzo R S, et al. Anal. Chem., 2002,74:163~170
- [12]Tams J W, Welinder K G. Biochem., 1996,33:7573~7579
- [13]Huang X H, Guo S F, Zhou Q, et al. J. Electroanal. Chem., 2007,600:227~235
- [14]Chattopadhyay K, Mazumdar S. Biochem., 2000,39:263~270
- [15]Huang W M, Zhang Z L, Han X J, et al. Biophys. Chem., 2001, 94:165~173
- [16]Chen Y, Mao H, Zhang X, et al. Int. J. Biol. Macromol., 1999, 26:129~134
- [17] Jiang H J, Huang X H, Wang X F, et al. J. Electroanal. Chem., 2003,545:83~88