

研究简报 ·

## La<sup>3+</sup> 离子对过氧化氢酶活性的影响

吉红念<sup>a</sup> 陆天虹<sup>b, c</sup> 李 邨<sup>c</sup> 虞学俊<sup>a</sup> 周 青<sup>d</sup> 黄晓华<sup>\*, a, c</sup>

(<sup>a</sup> 江南大学化学与材料工程学院 无锡 214036)

(<sup>b</sup> 中国科学院长春应用化学研究所 长春 130022)

(<sup>c</sup> 南京师范大学化学与环境科学学院 南京 210097)

(<sup>d</sup> 江南大学生物工程学院 无锡 214036)

**摘要** 利用紫外-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稀土离子 La<sup>3+</sup> 对过氧化氢酶 (CAT) 活性的影响, 并探讨了其化学过程. 结果表明, 生理条件下稀土离子 La<sup>3+</sup> 与 CAT 侧链氨基酸残基上的 O 或 N 原子结合, 改变了 O、N 和 S 原子的电子云密度及过氧化物酶蛋白分子的空间折叠态和卟啉活性中心的易变性, 从而影响了酶的活性.

**关键词** 稀土镧离子, 过氧化氢酶, 结合能, 同步荧光, X 射线光电子能谱, 酶活性

## Effect of La<sup>3+</sup> Ion on the Catalytic Activity of Catalase

JI, Hong-Nian<sup>a</sup> LU, Tian-Hong<sup>b, c</sup> LI, Cun<sup>c</sup> YU, Xue-Jun<sup>a</sup>

ZHOU, Qing<sup>d</sup> HUANG, Xiao-Hua<sup>\*, a, c</sup>

(<sup>a</sup> School of Chemical and Material Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

(<sup>b</sup> Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

(<sup>c</sup> Department of Chemistry, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

(<sup>d</sup> School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

**Abstract** Effect of La<sup>3+</sup> ion on the structure and activity of catalase, as well as the chemical process of catalase interacting with La<sup>3+</sup> ion were investigated for the first time by a combination of ultraviolet-visible, fluorescence, synchronous fluorescence, FT-infrared and X-ray photoelectron spectroscopic techniques. The results indicated that La<sup>3+</sup> ion could interact with O and/or N groups in polypeptide chain of catalase, leading to the change of electron density of S, O and N atoms in catalase, meanwhile, making the heme active center of catalase be towards high spin state and more flexible, and causing some extent of conformational change of catalase, altering the folding state of the whole molecule, thereby changing the catalytic activity of catalase protein.

**Keywords** lanthanum ion, catalase, binding energy, synchronous fluorescence spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, catalytic activity

稀土在各个领域, 尤其在农业上 (微肥) 的广泛应用<sup>[1,2]</sup>, 使其随着食物链进入了生命体系. 自 20 世纪初开始稀土生物活性研究以来, 获知稀土具有多种生物学效应, 尤其是对保护酶系统产生影响<sup>[3]</sup>. 但以往研究多集中于稀土与生物酶及遗传物质作用的生理及生化效应<sup>[4,5]</sup>, 且因生命体

系的复杂性及针对其研究方法学的局限性, 较少涉及稀土对生物物质作用的化学过程与机制的系统研究<sup>[3,6]</sup>.

过氧化氢酶 (EC1.11.1.6, CAT) 是生命体三大主要保护酶之一, 广泛存在于有氧呼吸的生命体中, 可通过使过氧化氢歧化分解为水和氧气, 清除氧化还原过程产生的氧自由

\* E-mail: wxhhuang@yahoo.com

Received September 15, 2003; revised November 18, 2003; accepted February 12, 2004.

国家自然科学基金 (No. 20243002), 国家计委稀土专项基金 (No. GX01100626), 教育部重点项目 (No. 02059), 江苏省高新技术项目 (No. BG2001045) 资助项目.

基<sup>[7]</sup>. 牛肝 CAT 的三维结构被证明是哑铃状四聚体(tetramer)分子, 每个亚基含 506 个氨基酸残基和一个卟啉辅基<sup>[8]</sup>.

迄今为止, 我们曾报道稀土离子对植物体内 CAT 活性的影响<sup>[4]</sup>, 但其相互作用的化学过程尚未见报道. 首先, 本文报道了生理条件下稀土元素镧离子( $\text{La}^{3+}$ )对过氧化氢酶(catalase, CAT)活性的影响; 其次, 在方法学上, 运用同步荧光光谱法(synchronous fluorescence, SF)和 X 射线光电子能谱法(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)研究了生理条件下  $\text{La}^{3+}$  对 CAT 的作用; 第三, 关注了  $\text{La}^{3+}$  对 CAT 活性影响的化学过程.

## 1 实验方法

### 1.1 材料与试剂

牛肝 CAT 为美国 Sigma 公司产品(c-40, 相对摩尔质量 240000 Da, 活性 > 10000 U/mg), 使用前未经进一步纯化, 其溶液以吸光系数  $325 \text{ mmol}^{-1} \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1}$  在 405 nm 处光谱法定量<sup>[9]</sup>. 无水三氯化镧根据文献<sup>[10]</sup>制备. 生理介质<sup>[11]</sup>含  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  磷酸缓冲液(pH 7.0), 20% (V/V) 甲醇,  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl, 其余试剂均为分析纯. 实验用水为三次蒸馏水.

### 1.2 仪器和测定方法

UV-Vis 吸收光谱在 Varian 公司的 Cary 50 Probe 型 UV-Vis 吸收光谱仪上进行, 向  $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  的 CAT 溶液中加入一定摩尔比的  $\text{La}^{3+}$ , 混合均匀 1 h 后测定. 稳态及同步荧光光谱以 Varian 公司的 Cary Eclipse 荧光光谱仪测定, 激发和发射狭缝皆为 5 nm, 扫描速度  $600 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ . 样品置于生物载玻片上真空干燥, 膜厚约 0.5 mm, 测量面积为  $0.8 \text{ mm}^2$ . 生物膜 XPS 采用英国 VG 公司的 ESCALab MK2 型光电子能谱仪测定, 光源为 Mg K 射线, 仪器操作功率为 225 W, 单元素扫描用 80 eV, 结合能以  $\text{Cl} 1s$  峰(284.6 eV)校准. 酶活性测定在 1 mL CAT 溶液中含或不含  $\text{La}^{3+}$  离子加入  $20 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液, 20 s 后通过监测一定时间内 240 nm 处的吸光度变化值, 计算 CAT 活性<sup>[12]</sup>.

## 2 结果和讨论

### 2.1 $\text{La}^{3+}$ 离子对 CAT 催化活性的影响

CAT 对低浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  的催化对于  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度可认为是以一级反应速率进行<sup>[13]</sup>. 生理条件下在 CAT 中分别加入不同含量  $\text{La}^{3+}$  离子, 其 CAT 的酶活性变化归于表 1.

结果表明,  $\text{La}^{3+}$  离子可以改变 CAT 的催化活性, 呈现“低促高抑”现象. 这与文献报道的生命体内的“低促高抑”的“Hormesis 效应”相一致<sup>[14]</sup>, 说明稀土  $\text{La}^{3+}$  离子对 CAT 的作用在体内外可能具有相似的规律. 因此通过相应的手段和方法, 揭示它们相互作用的化学过程具有一定的实际意义.

### 2.2 紫外-可见吸收光谱

紫外-可见吸收光谱(图 1)显示 CAT 溶液在 275 nm 和

405 nm 左右的 Soret 带处有吸收峰, 它们分别归属于肽链上的芳香氨基酸(酪氨酸 Tyr 和色氨酸 Trp)残基和血红素卟啉环的  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁<sup>[15]</sup>. 加入  $\text{La}^{3+}$  离子后, 峰位均未发生明显改变, Soret 带及 275 nm 处峰值稍下降, 而 638 nm 电荷迁移带的吸收增加了 43.3%, 表明  $\text{La}^{3+}$  离子不与卟啉活性中心直接产生作用, 只是对血红素周围的疏水环境产生微扰, 可能与肽链上氨基酸残基作用, 进而改变了卟啉铁的自旋状态<sup>[16]</sup>. 事实上, 卟啉基团深埋在分子表面下至少 2 nm, 距四聚体中心约 2.3 nm<sup>[8]</sup>,  $\text{La}^{3+}$  离子难以与活性中心直接键合, 而只可能与氨基酸残基发生相互作用.

表 1 不同含量  $\text{La}^{3+}$  离子对 CAT 催化活性的影响

Table 1 Effect of  $\text{La}^{3+}$  ion on the catalytic activity of CAT ( $[\text{CAT}]_0 = 2.66 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ )

$[\text{La}^{3+}]$ / $[\text{CAT}]$	Activity / ( $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ )
0	$1.38 \times 10^4$
0.5	$8.48 \times 10^4$
3	$4.83 \times 10^3$
90	$4.14 \times 10^3$
400	$2.76 \times 10^3$

$n = 6$ , error  $\pm 1\%$

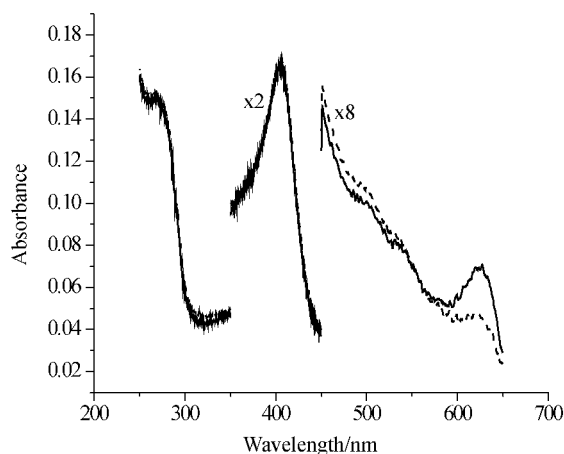


图 1 含(实线,  $\text{La}^{3+}$  CAT = 1.4)和不含  $\text{La}^{3+}$  离子(虚线)的 CAT 紫外-可见吸收光谱 ( $[\text{CAT}] = 2.66 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ )

Figure 1 UV-vis spectra of  $0.266 \mu\text{mol L}^{-1}$  CAT in the presence (solid line,  $\text{La}^{3+}$  CAT = 1.4) and absence (dash line) of  $\text{La}^{3+}$  ion

### 2.3 同步荧光光谱

荧光光谱是研究蛋白质与外源物质的相互作用以及生物大分子构象变化的最常用和有效的方法<sup>[17~19]</sup>. 与其它蛋白质类似, CAT 因分子中含有酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)和苯丙氨酸(Phe)残基而具有内源荧光. 氨基酸残基在普通荧光光谱上相互叠加, 难以同时测定, 在实验中给我们精确地研究蛋白质特性带来困难. 这一缺点可以应用同步荧光(SF)光谱方法加以克服<sup>[20]</sup>. 经实验获得, 选择波长差( $\Delta\lambda$ ) = 70 nm 时, 可同时分别考察  $\text{La}^{3+}$  离子对 Tyr 和 Trp 残基的影响.

图2为加入(a)和不加入La<sup>3+</sup>离子(b)的CAT溶液的SF光谱. 曲线b中232 nm和273 nm处的两个发射峰分别为Tyr和Trp残基的贡献. 当加入La<sup>3+</sup>离子后(曲线a), Tyr和Trp残基的荧光可同时被淬灭, Tyr残基峰强下降了4.9%, Trp残基强度则下降达8.5%. Tyr荧光强度的下降, 表明整个CAT大分子更趋向于折叠态<sup>[21]</sup>. X射线晶体分析结果证明Trp包埋在CAT分子内部<sup>[8]</sup>, 而此时Trp表现得对外来物更敏感, 其主要原因可能是由于La<sup>3+</sup>离子结合于CAT, 改变了蛋白质构象, 使Trp残基由疏水区向亲水区暴露, 明显地削弱了CAT中Tyr和Trp残基的刚性和平面性<sup>[22]</sup>.

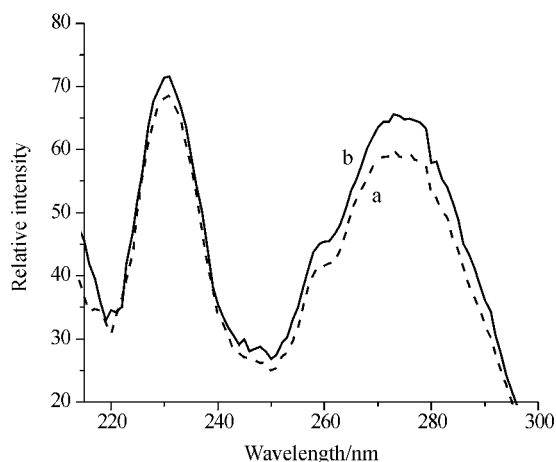


图2 CAT在生理介质中含(a)和不含(b)La<sup>3+</sup>离子的同步荧光光谱

**Figure 2** Synchronous fluorescent spectra of CAT in the presence (a, [La<sup>3+</sup>] [HRP] = 0.5) and absence (b) of La<sup>3+</sup> ion,  $\lambda_{\text{exc}} = 70$  nm

## 2.4 XPS 谱

XPS 可获得核内层电子结合能及其电子运动状态的信息<sup>[23]</sup>. 图3显示CAT在生理条件下含(a)和不含(b)La<sup>3+</sup>离子的XPS谱图, 其中C(1s), O(1s), N(1s), S(2p)和La(3d)的结合能列于表2.

**表2** CAT在生理介质中含(a)和不含(b)La<sup>3+</sup>离子时各元素的结合能

$r$ (La <sup>3+</sup> CAT)	C(1s)	O(1s)	N(1s)	S(2p)	La(3d)
0	284.60	530.95	399.70	168.15	—
400	284.60	531.55	399.95	163.95	835.95
LaCl <sub>3</sub>	284.60	—	—	—	841.25

从表中结果可知: 首先, 加入La<sup>3+</sup>离子后CAT中元素的结合能有变化, 表明La<sup>3+</sup>离子对核内层电子的运动状态有影响; 其次, La<sup>3+</sup>离子对各主要元素的结合能影响程度不同, O(1s), N(1s)结合能分别增加了0.60 eV和0.25 eV, 说明O(1s), N(1s)的电子云密度下降; 与此同时, S(2p)的结合能

却显著下降了4.30 eV, 此时其电子云密度增加<sup>[24]</sup>; 同时, La(3d)的结合能由841.25 eV下降至835.95 eV, 降幅达5.30 eV. 结果表明, La<sup>3+</sup>离子可能以O>N的顺序与CAT中氨基酸残基上的O和N原子结合, 使O, N的电子云流向吸电子的La<sup>3+</sup>离子, 并使卟啉活性中心的电子云密度重新分配, 导致S的电子云密度上升.

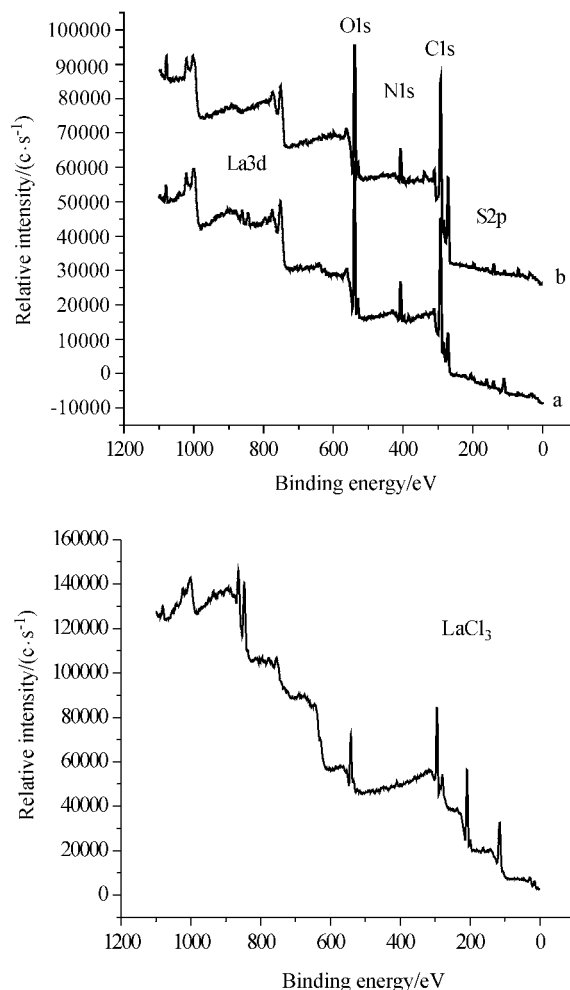


图3 含(a)和不含(b)La<sup>3+</sup>离子时CAT溶液的XPS谱, 下图为La<sup>3+</sup>离子的XPS谱图

**Figure 3** XPS spectra of 5.56  $\mu\text{mol L}^{-1}$  CAT in the presence (a) and absence (b) of La<sup>3+</sup> ion, bottom is the XPS for free La<sup>3+</sup> ion

## 3 结论

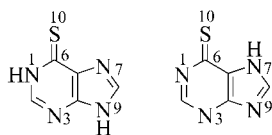
生理介质中稀土离子不能直接与CAT的活性中心发生作用, 而是与CAT侧链氨基酸残基上的O或N原子结合, 导致Tyr和Trp残基的刚性和平面性改变, 从而改变了分子的空间折叠态; 侧链骨架的变动必然对中心基团产生扰动, 使卟啉活性中心的电子云密度重新分配, 即活性区域的疏水口袋易变性增强, 最终改变了CAT活性部位的酶催化反应能力.

## References

- 1 Ni, J.-Z. *Biochemistry of Rare Earths*, Science Press, Beijing, **1995**, pp. 8~40 (in Chinese).  
(倪嘉缙, 稀土生物无机化学, 科学出版社, 北京, **1995**, pp. 8~40.)
- 2 Guo, B.-S. *Rare Earths* **1999**, 20, 64 (in Chinese).  
(郭伯生, 稀土, **1999**, 20, 64.)
- 3 Zheng, H.-L.; Zhao, Z.-Q.; Zhang, C.-G.; Fen, J.-C.; Su, M.-J. *Rare Earths* **2000**, 21, 55 (in Chinese).  
(郑海雷, 赵中秋, 张春光, 冯金朝, 苏明佳, 稀土, **2000**, 21, 55.)
- 4 Zhou, Q.; Huang, X.-H.; Cao, Y.-H. *J. Rare Earths* **1999**, 17(4), 301.
- 5 Huang, X.-H.; Zhou, Q.; Zhang, J.-H. *J. Rare Earths* **2000**, 18(3), 244.
- 6 Ji, H.-N.; Huang, X.-H.; Zhou, Q.; Lu, T.-H. *J. Rare Earths* **2002**, 20(5), 541.
- 7 Fridovich, I. *Science* **1978**, 201, 303.
- 8 Murthy, M. R. N.; Reid, T. J., III; Scignano, A.; Tanaka, N.; Rossmann, M. G. *J. Mol. Biol.* **1981**, 152, 465.
- 9 Gebicka, L. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, 24, 69.
- 10 Taylor, M. D.; Carter, C. P. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1962**, 24, 287.
- 11 Sebastian, M.; Hans-Dieter, R.; Wolfgang, S. *Anal. Biochem.* **1997**, 245, 55.
- 12 Gadermarzi, M.; Movahedi, A. A. M.; Ghadermarzi, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1431, 30.
- 13 Lardinois, O. M.; Mestdagh, M. M.; Rouxhet, P. G. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1296, 222.
- 14 Ni, J.-Z. *Biochemistry of Rare Earths*, 2nd ed., Science Press, Beijing, **2002**, pp. 245~248 (in Chinese).  
(倪嘉缙, 稀土生物无机化学, 第2版, 科学出版社, 北京, **2002**, pp. 245~248.)
- 15 Myer, Y. P. *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 2115.
- 16 Pahari, D.; Patel, A. B.; Behere, D. V. *J. Inorg. Biochem.* **1995**, 60, 245.
- 17 Anni, J. M.; Vanderkooi, K. A. S.; Yonetani, T.; Hopkins, S. C.; Herenyi, L.; Fidy, J. *Biochemistry* **1994**, 33, 3475.
- 18 Liu, Y.; Xie, M.-X.; Kang, J. *Acta Chim. Sinica* **2003**, 61(8), 1305 (in Chinese).  
(刘媛, 谢孟峡, 康娟, 化学学报, **2003**, 61(8), 1305.)
- 19 Li, L.-S.; Huang, W.-D.; Wang, R.-Q.; Yan, Y. *Acta Chim. Sinica* **1999**, 57(6), 572 (in Chinese).  
(李来生, 黄伟东, 王瑞琼, 鄢远, 化学学报, **1999**, 57(6), 572.)
- 20 Chou, J.; Qu, X.-G.; Lu, T.-H.; Dong, S.-J.; Wu, Y. *Microchem. J.* **1995**, 52, 159.
- 21 Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed., Plenum Publishers, New York, **1999**, pp. 673~685.
- 22 Du, X.-R.; Li, R.-C.; Wang, K. *Chin. Sci. Bull.* **2001**, 46(5), 394 (in Chinese).  
(杜秀莲, 李荣昌, 王夔, 科学通报, **2001**, 46(5), 394.)
- 23 Sabbatini, L.; Malitesta, C.; Giglio, E. D.; Losito, I.; Torsi, L.; Zamboni, P. G. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1999**, 100, 35.
- 24 Wang, J.-Q.; Wu, W.-H.; Feng, D.-M. *Introduction of Electroenergetic Spectroscopy*, National Defense Industry Press, Beijing, **1992**, pp. 52~58 (in Chinese).  
(王建祺, 吴文辉, 冯大明, 电子能谱学(XPS/XAES/UPS)引论, 国防工业出版社, 北京, **1992**, pp. 52~58.)

(A0309152 CHENG, B.; LING, J.)

### DFT Calculations on 6-Thiopurine Tautomers

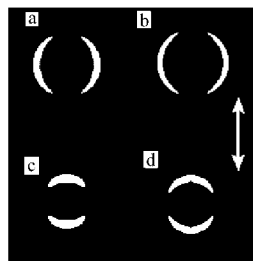


LI, Bao-Zong

*Acta Chimica Sinica* **2004**, 62(11), 1075

The B3LYP/6-311G\*\* calculation results show that 6-thiopurine existing as the thione forms is the predominant isomer in the gas and aqueous phases. The thione-N(7) (H) isomer is more stable than the thione-N(9) (H) isomer in the gas phase whereas the thione-N(9) (H) isomer is more stable than the thione-N(7) (H) isomer in the aqueous phase.

### Study on the Ion Velocity Mapping of the Photodissociation Dynamics of CCl<sub>3</sub>Br

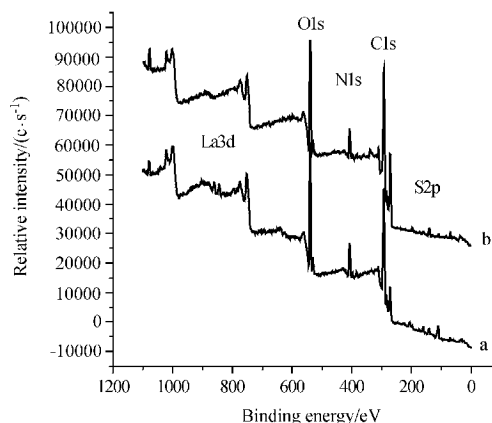


ZHU, Rong-Shu; ZHANG, Song; TANG, Ying; WANG, Yan-Mei; TANG, Bi-Feng; JI, Lei; ZHANG, Bing

*Acta Chimica Sinica* **2004**, 62(11), 1080

An accurate ion lens was simulated using a 3D ion trajectory simulation package (Simion 7.0) in this paper. The simulation got an effect that all particles with the same initial velocity vector were mapped onto the same point on the detector. A high-resolution apparatus of ion velocity mapping was built by using the simulating result. The photodissociation dynamics of the CCl<sub>3</sub>Br was studied at 267 nm. The three-dimensional velocity and angular distributions of Br (<sup>2</sup>P<sub>3/2</sub>) and Br\* (<sup>2</sup>P<sub>1/2</sub>) were determined. The values of anisotropy parameter were (Br) = -0.48 and (Br\*) = 1.44, respectively. A qualitative model of the photodissociation dynamics of CCl<sub>3</sub>Br was suggested.

### Effect of La<sup>3+</sup> Ion on the Catalytic Activity of Catalase



The changes in binding energy of CAT indicated that after adding La<sup>3+</sup> ion, the density of core-level electrons were altered, probably forming the complex of La<sup>3+</sup>-CAT. The extent of La<sup>3+</sup> ion affecting on CAT was different. The results showed that the electron density of O, N were decreased and that of S was increased. Moreover, for La 3d, the binding energy was decreased from 839.10 eV to 835.80 eV by

3.30 eV, it evidenced that electron attracting La<sup>3+</sup> ion would bond to O and/or S, N atoms of amide in amino acid residues, reducing the electron density of the ligand atoms, then altering the folding state of the whole molecule, thus redistributing the electron density of heme active center, leading to increment of electron density of S atoms of internal hydrophobic disulfide bonds in CAT, eventually changing the flexibility of heme active center.

JI, Hong-Nian; LU, Tian-Hong; LI, Cun; YU, Xue-Jun; ZHOU, Qing; HUANG, Xiao-Hua

*Acta Chimica Sinica* **2004**, 62(11), 1085