

稀水溶液中氧化还原酶辐射失活和 后失活及保护效应的研究 I.

稀水溶液中过氧化氢酶辐射失活及保护效应

陈毅菁 哈鸿飞

(北京大学, 北京 100871)

摘要 研究了稀水溶液中过氧化氢酶的辐射失活, 给出了过氧化氢酶生物活性与吸收剂量的关系以及辐射气氛、温度和溶液中酶的初始浓度对酶活性的影响。结果表明, 低温、较高的酶初始浓度和体系中的氧对过氧化氢酶的辐射失活有不同程度的抑制作用。发现添加剂 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 、 HCOONa 和 EDTA 对稀水溶液中过氧化氢酶的辐射失活有明显的保护作用。同时讨论了失活机理和添加剂保护机理。

关键词 辐射失活, 过氧化氢酶, 保护效应, 乙醇, 甲酸钠, 乙二胺四乙酸(EDTA)

电离辐射对稀水溶液中多数酶的生物活性有不同程度的损伤。虽然酶的这种辐射失活可以作为研究酶分子大小、结构和功能的一种方法, 但在绝大多数情况下这种现象是带破坏性的。对各种酶在水溶液中的辐射失活和保护效应早有研究^[1-3], 且至今为人们所关心^[4,5]。

酶的固定化使酶的应用进入了一个新阶段。辐射技术在酶的固定化, 特别是低温物理包埋研究中已有较大进展^[6]。在物理包埋过程中, 酶和单体一起被辐照, 酶会遭受一定程度的辐射损伤。因此, 研究稀水溶液中酶的辐射失活和保护效应很必要。

过氧化氢酶是一种氧化还原酶, 是含有 4 个相同亚基的寡聚酶(oligomeric enzymes)。每个酶分子含 4 个铁卟啉辅基, 总分子量为 2.4×10^5 。它具有多种生物功能, 如可附在细胞壁上作为 H_2O_2 含量的调节器。本实验室曾用辐射技术研究了过氧化氢酶的固定化^[7], 文献中尚未见有过氧化氢酶辐射失活的系统报道。本工作对稀水溶液中过氧化氢酶的辐射失活和多种因素的影响进行了研究, 包括研究了三种添加剂的保护效应。

1 实验部分

1.1 酶与化学试剂

1.1.1. 过氧化氢酶(牛肝) 美国 Sigma 公司产品, 活力为 14100 u/mg, 用前用 pH 接近 7 的磷酸缓冲液配制。

1.1.2. 硫酸钾 北京化工厂产品, AR 级; 草酸钾(同上); 过氧化氢(含量 30%)和磷酸盐等皆 CP

国际原子能机构资助项目
收稿日期: 1991-00-23

级。所有溶液皆用三级蒸馏水配制。

1.2 酶活力测定

用硫酸铈溶液滴定法来测定 H_2O_2 浓度的变化,而这种变化是由不同情况下酶促反应引起的。在酶促反应动力学曲线中直线部分表征其活性。实验中酶的活力采用相对活力,即在一定剂量下辐照过的酶的活力相对于未辐照而其余条件皆相同的酶的活力,用百分数表示。取 2.0 ml 0.0739 mol/L 过氧化氢溶液为底物,电磁搅拌下加入 1.0 ml 适当浓度(20—40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的酶液,反应一段时间后,立即用 2.0 ml 2.0 mol/L H_2SO_4 终止反应。反应前后 H_2O_2 浓度用 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 溶液滴定。 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 浓度是用草酸钾溶液标定的。得到的酶反应动力学曲线见图 1。

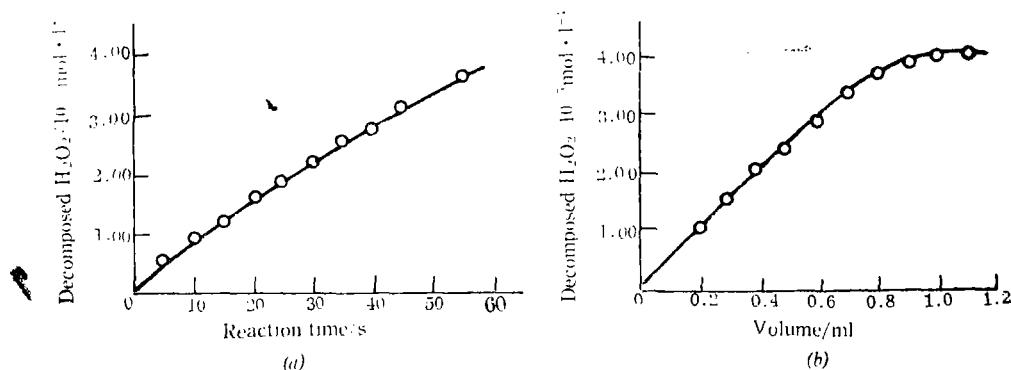


Fig 1. Kinetic curves of enzyme catalytic reaction

(a) Relation between activity and reaction time, Enzyme content: 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$

(b) Relation between activity and content of enzyme, Enzyme concentration: 44 $\mu\text{g}/\text{mL}$

从图 1 可以看出,反应时间 30 s 和反应体系中酶含量 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时最能反映酶的活力。

1.3 辐照

所有样品的辐照都在北京大学钴源装置中室温下进行的。酶溶液封管辐照,辐照后立即开管进行活力测定。

2 结果与讨论

2.1 不同辐照气氛对稀水溶液中过氧化氢酶失活的影响

室温、有氧条件下稀水溶液中过氧化氢酶的辐射稳定性较差,其相对活力(Relative activity)随吸收剂量指数下降。 N_2 和 N_2O 饱和体系中酶的辐射失活不同程度地被敏化,加快了酶辐射失活的速率(见图 2)。

在稀水溶液中,酶的辐射失活是由水辐解产物引起的,起主要作用的是 $\text{OH}^\cdot$ 基,其次还有 $\text{H}^\cdot$ 和 e_{aq}^- 等短寿命活性粒子^[8]。

N_2O 对酶失活的敏化作用通过如下过程



从而产生了多余的 $\text{OH}^\cdot$ 基。相反,氧的保护作用是由于它消除了 e_{aq}^- 和 $\text{H}^\cdot$ 的影响,



而 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\text{HO}_2^\cdot$ 对酶的失活作用较小^[9]。所以,对于过氧化氢酶来说其 OER 值(Oxygen Enhancement Ratio)大于 1。

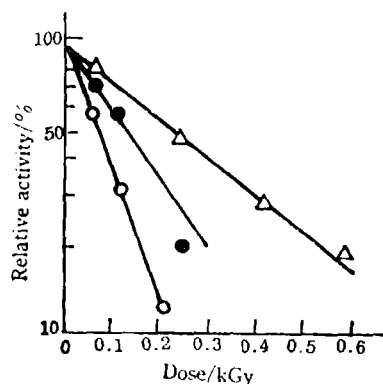


Fig 2. Relative activity as a function of dose for the samples of catalase bubbled with different gases dose rate: 60 Gy/min
(△) Air (●) N₂ (○) N₂O

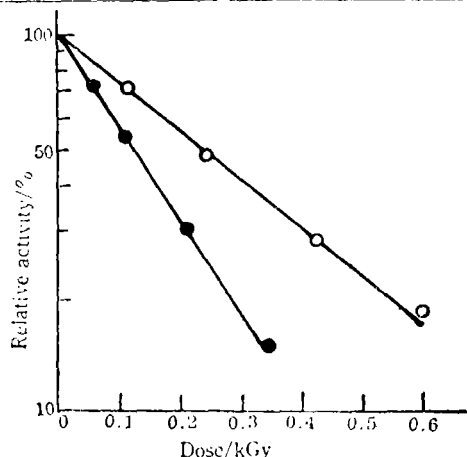


Fig 3. Relative activity of catalase as a function of dose in air [Catalase] 1.8×10^{-7} mol/L
(○) 80.5 Gy/min (●) 51.6 Gy/min

2.2 剂量率对过氧化氢酶辐射失活的影响

剂量率对过氧化氢酶辐射失活也有明显的影响。从图 3 可以看出, 剂量率较低时辐射失活速率更快些。这可以用辐射后失活效应(即样品取出辐射场后其活力继续下降的效应)加以解释。剂量率较低时, 接受相同剂量所需的时间就越长, 由后效应引起的失活也就越多, 所以总失活速率就更快。

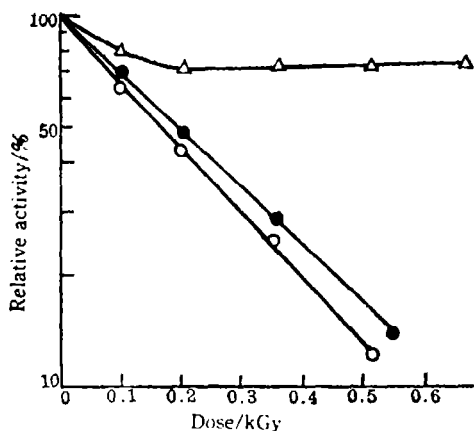


Fig 4. Effect of irradiation temperature on Relative activity of catalase in dilute aqueous solution Dose rate: 52 Gy/min. [catalase] 44 μ g/mL
(△) -78°C (●) 0°C (○) 20°C

2.3 温度对酶辐射失活的影响

辐照温度对稀水溶液中过氧化氢酶辐射失活的影响相当明显(见图 4)。

从图 4 可以看出, 在 0 °C 时, 酶的失活速率比室温下略有减缓, 但在干冰温度下, 只是在辐照初始有较小的失活(~20%), 以后剂量增加对酶的活力就不产生影响。这是由于在 -78 °C 时, 样品溶液已呈固态, 辐解生成的自由基的扩散速度明显减缓, 被限制在很小的活动范围, 难以与酶分子互相作用而引致失活。

2.4 酶的初始浓度对辐射失活的影响

稀水溶液中酶初始浓度对其辐射失活有一定影响。从图 5 可以看出初始浓度越低, 失活速率越快, 它们相对活力的对数值与剂量之间仍有线形关系。

因此, 过氧化氢酶的辐射失活亦服从下列关系式 $^{[10]} E = E_0 e^{-D/D_{37}}$, 式中, E_0 、 E 分别代表辐照前后活性酶浓度(实验中以活力代替), D 是吸收剂量, D_{37} 是将酶活力降至起始活力的 37% 时所需的剂量。 D_{37} 与酶初始浓度、溶液中杂质和保护剂等因素有关。用图 5 可求出不同初始浓度的

D_{37} , 并用 D_{37} 与相应的初始浓度作图, 得图 6。从图 6 可以看出, 它们之间自然也存在线性关系。

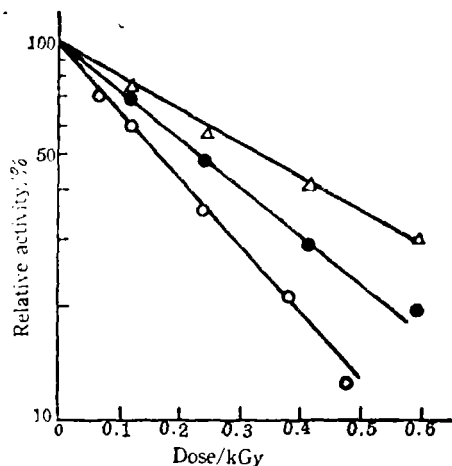


Fig 5. Effect of catalase concentration on relative activity dose rate: 60 Gy/min
[catalase]/ $\times 10^{-7}$ mol/L
(Δ) 37 ($\bullet$) 1.8 ($\circ$) 0.09

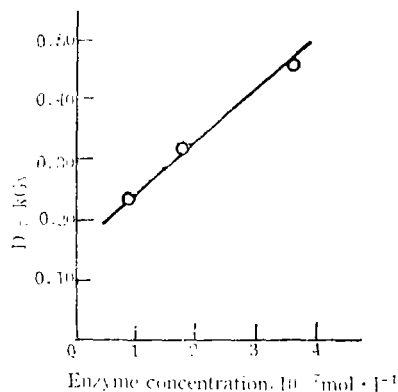


Fig 6. D_{37} as a function of enzyme concentration

2.5 添加剂对酶失活的保护效应

乙醇对稀水溶液中过氧化氢酶的辐射失活有一定的保护作用。随乙醇浓度的增加, 对酶的辐射保护效应就越明显(见图 7 和 8)。如前所述, 稀水溶液中酶的辐射失活主要是水辐解产物中 OH 基的影响。因此, OH 基的俘获剂应该就是过氧化氢酶失活的保护剂。

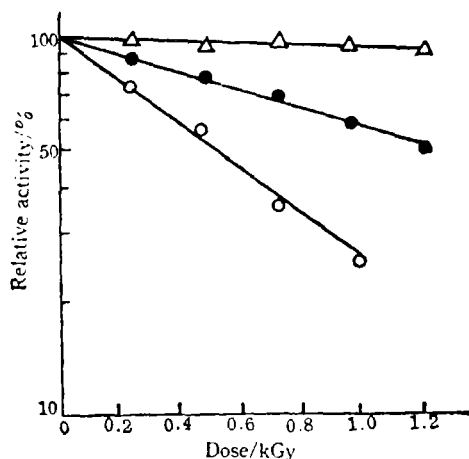


Fig 7. Radiation deactivation of catalase as a function of dose in the presence of alcohol alcohol: $\times 10^{-3}$ mol/mL
(Δ) 5.0 ($\bullet$) 1.0 ($\circ$) 0.2 dose rate: 58 Gy/min [catalase]: 1.8×10^{-7} mol/L total dose: 0.71 kGy

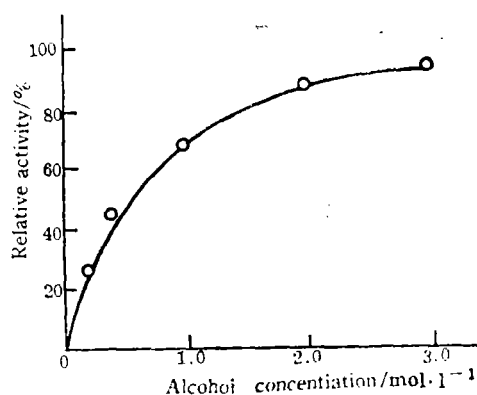
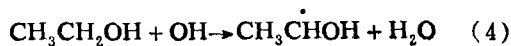


Fig 8. Protective effect as a function of alcohol concentration
dose rate: 58 Gy/min,
total dose: 0.71 kGy
[catalase]: 1.8×10^{-7} mol/L

Tab 1. D_{37} value in radiation system with different additives

System	No additive	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}/2 \times 10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{HCOONa} / \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{EDTA} / \times 10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
D_{37}/kGy	0.33	0.72	1.25	1.30

Dose rate 60 kGy/min, Room temperature

反应中 OH 基被转化为对酶失活影响很小的 $\text{CH}_3\dot{\text{C}}\text{HOH}$ 。同样, HCOONa 、 EDTA 也能有效地与 OH 基作用, 也是过氧化氢酶辐射失活的保护剂(见图 9 和 10)

用同样的初始酶浓度($1.8 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$)并保持其他条件相同情况下求出相应的 D_{37} 值(见表 1)。

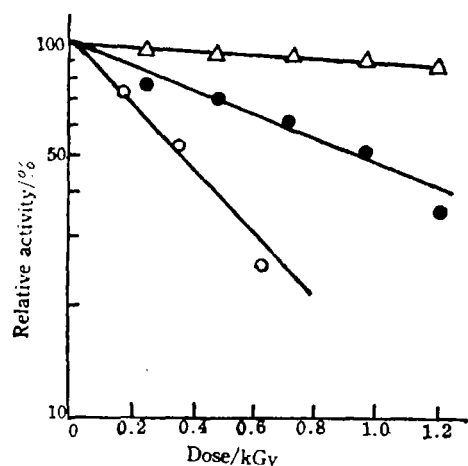


Fig 9. Relative activity of catalase as a function of dose in the presence of HCOONa [HCOONa] $\times 10^{-4} \text{ mol/L}$ (Δ) 8.2 ($\bullet$) 1.0 ($\circ$) 0.65 Dose rate: 58 Gy/min, [catalase]: $1.8 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$

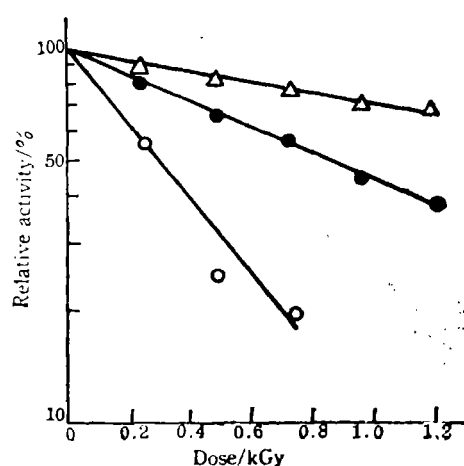


Fig 10. Relative activity of catalase as a function of dose in the presence of EDTA [EDTA] $\times 10^{-4} \text{ mol/L}$ (Δ) 8, ($\bullet$) 1.0, ($\circ$) 0.1 Dose rate: 58 Gy/min, [catalase]: $1.8 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$

从表 1 可以看出, HCOONa 和 EDTA 是比乙醇更有效的 OH 基清除剂, 因此也是更为理想的稀水溶液中过氧化氢酶辐射失活的保护剂。

3 小 结

3.1 研究了 γ 辐照稀水溶液中过氧化氢酶生物活性与吸收剂量的关系以及辐照气氛、温度和溶液中酶初始浓度对酶辐射失活的影响。

3.2 研究了某些添加剂对稀水溶液中过氧化氢酶辐射失活的保护效应, 发现 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 、 HCOONa 和 EDTA 对过氧化氢酶辐射失活都有较好的保护作用。

3.3 讨论了酶辐射失活及添加剂保护作用的机理, 认为水辐解产物 OH· 自由基与酶分子作用是水溶液中酶失活的主要原因; 在有添加剂存在的体系中, 添加剂与 OH 基作用占优势, 从而不同程度地保护了酶的活性。

参 考 文 献

- 1 Adams G E et al. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1969, 16(4): 333
- 2 Sanner T, Pihl A. *European J. Biochem.*, 1967, 1: 33
- 3 Adams G E, Posener M L. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1979, 35 (6): 479
- 4 Quintilioni M. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1986, 50(4): 573
- 5 Kumakura M, Kaetsu I. *Stud. Biophys.*, 1985, 108: 91
- 6 Kaetsu I. *Radiat. Phys. Chem.*, 1981, 18(1-2): 343
- 7 Wang Ganghui, Ha Hongfei, Wu Jilan. *Radiat. Phys. Chem.*, 1988, 31(4-6): 705
- 8 Singh B B, Kabi A. *Proc. Nat. Inst. Sci. India Part B*, 1969, 35: 291
- 9 Shuessler H, Herget A. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1980, 37: 71
- 10 Sanner T, Pihl A. *Radiat. Res.*, 1963, 19: 12

**STUDY ON RADIATION-INDUCED DEACTIVATION
AND POST-DEACTIVATION OF SOME OXIDO-
REDUCTASES IN DILUTE AQUEOUS SOLUTION
AND PROTECTIVE EFFECT I. RADIATION-
INDUCED DEACTIVATION OF CATALASE
IN DILUTE AQUEOUS SOLUTION AND
PROTECTIVE EFFECT**

Chen Yiqing Ha Hongfei
(Peking University, Beijing 100871)

ABSTRACT In this work the radiation-induced deactivation of catalase in dilute aqueous solution was reported. The effects of irradiation atmosphere, temperature and original concentration of catalase, in dilute aqueous solutions on the deactivation of catalase were investigated. The protective effect by some additives ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, HCOONa and EDTA) to radiation deactivation in dilute aqueous solutions was also studied. Remarkable protective effect by those additives was observed. The mechanism of radiation deactivation and protective effect have been discussed.

KEYWORDS Radiation-induced deactivation, Catalase, Protective effect, Alcohol, HCOONa , EDTA