

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 II

稀水溶液中过氧化氢酶辐射后失活及保护效应

哈鸿飞 陈毅菁

(北京大学技术物理系, 北京 100871)

摘要 报道了稀水溶液中过氧化氢酶在辐射后的放置期间, 其生物活性仍随放置时间不断下降的后失活作用。研究了剂量、初始酶浓度、辐照气氛、温度对过氧化氢酶辐射后失活的影响以及添加剂对酶辐射后失活的抑制作用, 发现乙醇、甲酸钠和络合剂 EDTA 均可有效地抑制酶的辐射后失活。样品在辐照和辐照后放置过程中氧的存在与否是辐射后失活现象的关键, 而水辐解的分子产物 H_2O_2 对诱发这一后失活现象起有重要作用。

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

在研究过氧化氢酶辐射固定化和辐射失活过程中, 发现在稀水溶液中过氧化氢酶 γ 辐照后, 在存放时间内其生物活性仍不断下降, 本文称之为辐射后失活现象。已有结果表明, 某些酶辐照后能够缓慢地、部分地恢复其活力, 这种活性分子的修复与酶的初始浓度有关。在较高浓度下, 酶的活力在 72 h 内能修复 20%^[1,2]。但稀水溶液中酶辐射后失活现象却未见报道。

稀水溶液中酶的辐射失活是由水辐解产物引起的, 其中以短寿命中间活性产物 OH 基的作用为主^[3]。然而在辐射后失活中过氧化氢酶的活力能在几十分钟内不断下降, 可是这时水辐解的短寿命活性粒子早已衰变光了, 不可能有如此的长效作用, 水辐解的分子产物 H_2O_2 则可能对这一后失活现象起有重要作用。辐照和存放过程中氧对后失活的影响, 是重要的。应用辐射技术, 特别是低温辐射包埋技术可以有效地进行酶、抗体、药物的固定化^[4]。在这一过程中通常要控制两个因素: 辐射损伤和泄漏。酶辐射后失活的结果表明这一现象在固定化技术中也应是一个需要重视的因素。

1 实验部分

1.1 材料

酶与其他化学试剂的来源、样品溶液的配制, 酶活力的测定方法及辐照条件等均参见上文^[5]。

1.2 H_2O_2 浓度的测定

用 KI 法测定辐解水中 H_2O_2 含量: 取 1.0 ml 碱性 KI 溶液(500 ml 蒸馏水中含 1.0 g NaOH, 33 g KI 和 0.1 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$) 和 1.0 ml 邻苯二甲酸氢钾(10.0 g 邻苯二甲酸氢钾溶于 500 ml 蒸馏水中), 加入 3.0 ml 待测样品溶液, 于室温下, 350 nm 处测定其光密度(用国产 751

国际原子能机构资助项目的部分成果

收稿日期: 1991-09-23

型分光光度计)。从标准曲线中求出待测样品中 H_2O_2 含量。

2 结果与讨论

2.1 稀水溶液中过氧化氢酶的辐射后失活

接受一定量辐射能后, 稀水溶液中过氧化氢酶的活性不仅在辐照过程中一定程度受损失, 而且在停止辐照后存放过程中, 活性也不断下降。不同初始浓度的酶样品有类似的失活现象(见图 1), 且剂量越大, 后失活现象越严重(见图 2)。

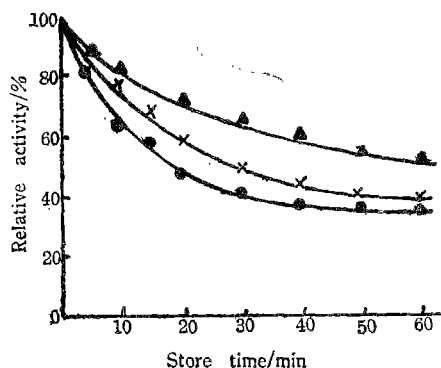


Fig 1. Relative activity of irradiated catalase in dilute aqueous solution as a function of store time Dose rate 58Gy/min, Total dose 144 Gy, Enzyme concentration $\times 10^{-7}$ mol/L; (\blacktriangle)3.7 (\times)1.8 (\bullet)0.92

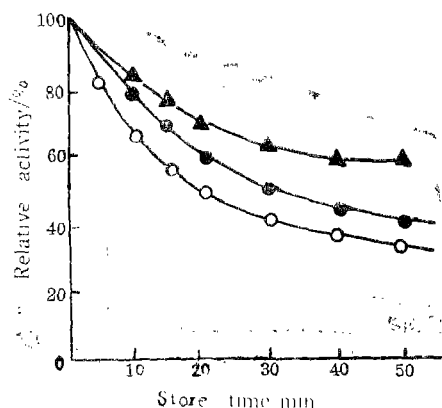


Fig 2. Effect of dose on relative activity of irradiated catalase Dose rate, 58 Gy/min, Enzyme concentration 1.8×10^{-7} mol/L Total dose(Gy) (\blacktriangle)58 (\bullet)147 (\circ)232

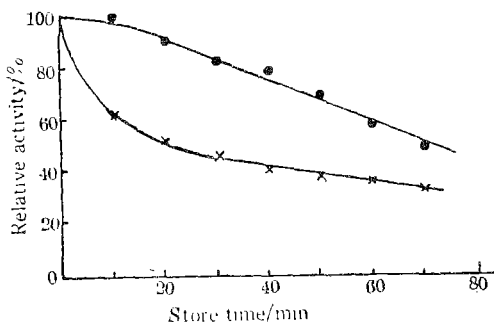


Fig 3. Effect of temperature on post-deactivation of catalase Total dose 145 Gy, Temperature (\bullet)0°C (\times)20°C

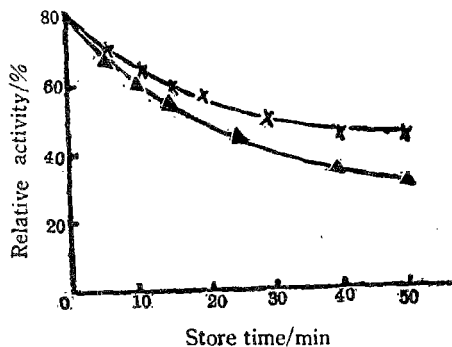


Fig 4. Effect of irradiated water on activity of unirradiated catalase (\times) in pure water (\blacktriangle) in phosphate buffer

辐照和辐照后保存温度对后失活也有一定影响(见图 3)。在接近零度时, 其后失活速率明显地减缓下来, 但不能完全抑制后失活现象。

2.2 H_2O_2 对酶辐射后失活的影响

将纯水(三级蒸馏水)和用三级水配制的磷酸缓冲液($pH = 6.7$)分别在空气中室温下辐照 5 min(总剂量 280 Gy), 然后加入等体积未辐照过的酶溶液(1.8×10^{-7} mol/L), 观察其活力的变化。

从图4可以看出,未辐照酶的活性也有随存放时间而下降的趋势,在辐照的磷酸缓冲液中更为严重。在这一实验中酶溶液并未直接接受辐射能,而被辐照的水在停止辐照后水辐解的短寿命活性粒子早已衰变光,只有 H_2O_2 等分子产物有可能起作用。

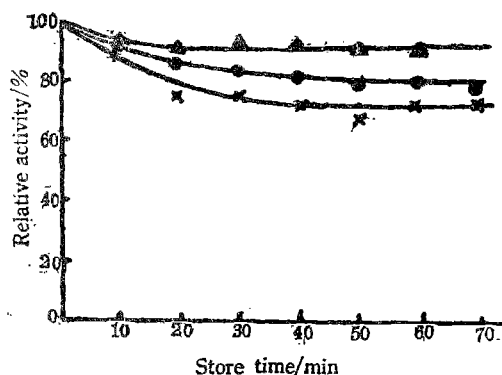


Fig 5. Effects of added H_2O_2 on relative activity of unirradiated catalase
 H_2O_2 concentration (mol/L):
 (▲) 1.6×10^{-5} (●) 1.5×10^{-4}
 (×) 1.8×10^{-3}

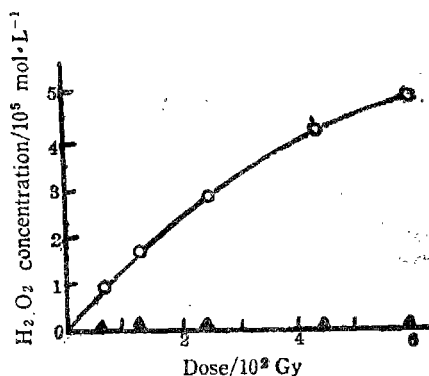


Fig 6. Content of H_2O_2 produced in irradiated samples as a function of dose in air (○) Pure water without enzyme (▲) Dilute aqueous solution of catalase (1.8×10^{-7} mol/L)

曾有报道认为 H_2O_2 浓度达到 0.1 mol/L 时会导致过氧化氢酶迅速失活^[6]、然而水辐解产生的 H_2O_2 浓度远低于此,向未辐照的酶溶液($1.8 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$)中加入微量 H_2O_2 ,观察它们对酶活力的影响(见图5)。从图5可以看出, H_2O_2 在浓度为 10^{-5} — 10^{-3} mol/L 范围内也会引起酶活力轻微的、缓慢的下降,说明 H_2O_2 对酶辐射后失活有一定影响,但可能不是主要的。

为进一步验证 H_2O_2 的影响测定了纯水和酶水溶液中辐射生成的 H_2O_2 。图6表明,纯水中辐解生成的 H_2O_2 浓度随剂量增加而增加,但在酶溶液中,同样剂量范围中却测不出 H_2O_2 。这可能是由于生成的过氧化氢消耗在与酶分子的互相作用上。

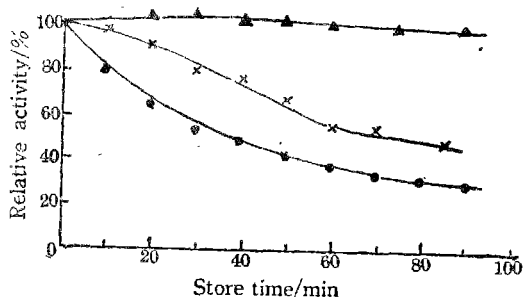


Fig 7. Effect of oxygen in system on post-deactivation of catalase
 Total dose 145 Gy
 (▲) Samples without O_2 during irradiation and stored
 (×) Samples irradiated in the absence of O_2 but stored in contact with air
 (●) Samples irradiated and stored in contact with air

2.3 氧对酶辐射后失活的影响

前文已经讨论过^[5],过氧化氢酶是一个OER值大于1的酶,氧对其辐射失活有一定影响。为了观察氧对酶辐射后失活的影响,在酶样品辐照前分别通入 N_2 气除氧后封管;其中一个样品辐照后开管,在与空气接触下不断测其活力变化;另一批样品辐照后仍维持 N_2 气氛,只是在测定样品活力时才逐个开管,结果见图7。

从图7可以看出,无氧辐照有氧保存的样品比含氧辐照并保存的样品后失活速率受到一定抑制,但无氧辐照并无氧保存的样品却完全排除了酶的辐射后失活,说明氧对过氧化氢酶辐射后失活是必不可少的。

从以上的实验结果似乎可以认为在有氧时

在辐解生成的 H_2O_2 催化下, 体系中酶作为生物大分子会生成比较稳定的过氧自由基, 它们将进一步导致过氧化氢酶分子中的断键或分子构象的变化, 从而使酶分子缓慢失活。

2.4 某些羟基清除剂在酶后失活中的保护作用

前文曾分别用微量 CH_3CH_2OH 、 $HCOONa$ 或 $EDTA$ 在一定剂量范围内有效地抑制了稀水溶液中过氧化氢酶的辐射失活, 辐照前在酶液中加入一定量的上述三种 OH 基清除剂, 空气中室温下观察它们对酶辐射后失活的影响(见图 8—10)。

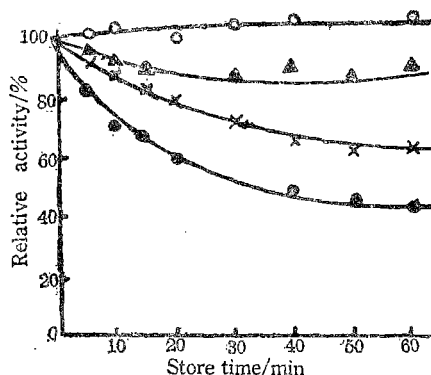


Fig 8. Effect of alcohol with various concentrations on post-deactivation of catalase Dose rate 58 Gy/min, Total dose 520 Gy, Alcohol concentration (10^{-3} mol/L) (\circ)5.0 (\blacktriangle)1.0 (\times)0.2 (\bullet)0.1

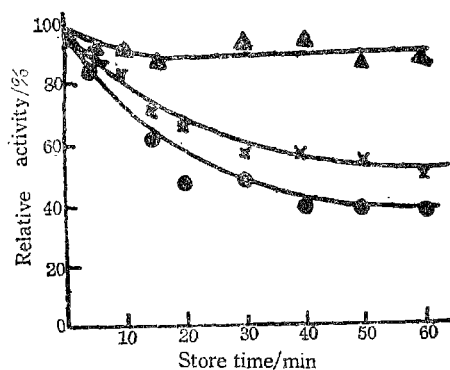


Fig 10. Effect of EDTA with various concentration on post-deactivation of catalase EDTA concentration 10^{-4} mol/L: (\blacktriangle)1.0 (\times)0.4 (\bullet)0.1

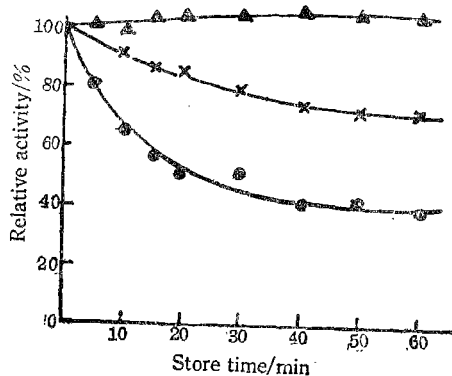


Fig 9. Effect of $HCOONa$ with various concentrations on post-deactivation of catalase Total dose 800 Gy $HCOONa$ concentration (10^{-4} mol/L) (\blacktriangle)2.0 (\times)1.0 (\bullet)0.5

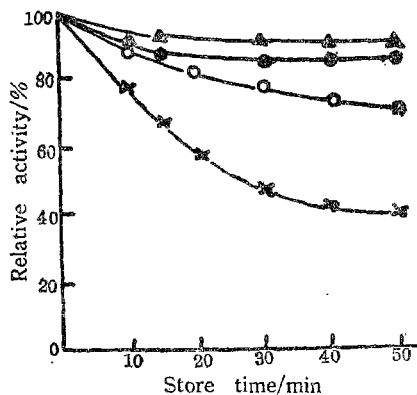


Fig 11. Effect of additives which added after irradiation on R. A. of catalase, Total dose 522 Gy (\times) without additives (145 Gy) (\circ) with 4×10^{-4} mol/L alcohol (\bullet) with 1×10^{-4} mol/L $HCOONa$ (\blacktriangle) with 1×10^{-4} mol/L $EDTA$

从这些结果中可以看出, CH_3CH_2OH 、 $HCOONa$ 和 $EDTA$ 的浓度分别为 5×10^{-3} 、 2×10^{-4} 和 1×10^{-4} mol/L 时过氧化氢酶的辐射后失活就能得到有效的控制。

如果在辐照后立即加入以上三种添加剂也可以观察到类似的结果(见图 11)。

以上结果表明, CH_3CH_2OH 、 $HCOONa$ 和 $EDTA$ 不仅可以清除酶水溶液中辐解产生的 OH 基,

而且还可以俘获诱发过氧化氢酶辐射后失活的活性粒子(如可能存在的酶的大分子过氧自由基等),有效地控制酶的辐射后失活现象。

3 小 结

3.1 观察到稀水溶液中过氧化氢酶辐照后明显的后失活现象,后失活速率与辐照温度、剂量、酶初始浓度有关。

3.2 水辐解生成的分子产物 H_2O_2 可能以某种方式参与了酶的辐射后失活过程。

3.3 氧对过氧化氢酶辐射后失活是必不可少的。无氧下辐照并保存的样品可以完全排除过氧化氢酶的辐射后失活现象。

3.4 浓度在 $1 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-3}$ mol/L 的 CH_3CH_2OH , $HCOONa$ 和 $EDTA$ 可以有效地抑制过氧化氢酶的辐射后失活现象。

参 考 文 献

- 1 Symonyan M. A, Nalbanyan R M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, 90: 1207
- 2 Petkau A et al. *Life Sci.*, 1978, 22: 867
- 3 Quintiliani M. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1986, 50: 573
- 4 Kaetsu I. *Radiat. Phys. Chem.*, 1985, 25(4-6): 715
- 5 陈毅菁, 哈鸿飞. *辐射研究与辐射工艺学报*, 1993, 11(1): 18
- 6 Aebi H E. *Methods of enzymatic analysis*. 3 rd. Vol III, Verlag Chemie, Weinheim. 1983: 273-286

STUDY ON RADIATION-INDUCED DEACTIVATION AND POST-DEACTIVATION OF SOME OXIDO-REDUCTASES IN DILUTE AQUEOUS SOLUTIONS AND PROTECTIVE EFFECTS II. RADIATION-INDUCED POST-DEACTIVATION OF CATALASE IN DILUTE AQUEOUS SOLUTIONS AND PROTECTIVE EFFECTS

Ha Hongfei Chen Yiqing

(Department of Technical Physics, Peking University, Beijing 100871)

ABSTRACT In this work, the post-deactivation of irradiated catalase in dilute aqueous solution was found and investigated. Post-deactivation of irradiated catalase means that the catalase in dilute aqueous solution could not only be deactivated during γ -irradiation, but it has also been deactivated continuously for some time after the irradiated samples were taken out of the radiation field. No reports about this phenomenon in literatures were searched up to now. The effects of absorbed dose, initial catalase concentration in solutions, atmosphere, temperature and additive on post-deactivation of catalase were investigated. H_2O_2 produced by water radiolysis may attend the post-deactivation reaction in some way. Oxygen in enzyme samples is necessitous for the post-deactivation. 1×10^{-4} to 5×10^{-3} mol/L of CH_3CH_2OH , $HCOONa$ and $EDTA$ could control the post-deactivation efficiently.

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

This subject is supported partly by IAEA