

稀水溶液中辣根过氧化物酶和葡萄糖氧化酶辐射失活、后失活及保护效应研究

伊 敏 钟 群 陈毅菁 哈鸿飞

(北京大学技术物理系, 北京 100871)

摘要 报道了在稀水溶液中辣根过氧化物酶的辐射失活, 并发现有辐射后失活现象。氧是后失活的必要条件; 水辐解的分子产物 H_2O_2 对诱发这一后失活现象起一定作用。微量络合剂 EDTA、GDTA 等对辣根过氧化物酶的辐射失活与后失活有不同程度的保护作用。在稀水溶液中葡萄糖氧化酶的辐射失活亦很严重, 但却未发现后有失活现象。

关键词 辣根过氧化物酶, 葡萄糖氧化酶, 络合剂, 辐射, 失活

在研究过氧化物酶辐射失活和辐射固定化过程中发现了一个较新的现象——酶的辐射后失活^[1]。为探索这一现象的普遍性, 本文研究了生物功能与过氧化氢酶相似的辣根过氧化物酶以及文献中常用的氧化还原酶——葡萄糖氧化酶在稀水溶液中的辐射失活与后失活。

1 实 验 部 分

1.1 酶与化学试剂

1.1.1 辣根过氧化物酶(HRP) $\text{RZ} = 3.0$, 葡萄糖氧化酶(GOD) 23800 u/mg, 固体, 皆美国 Sigma 化学公司产品, 华美生物工程公司分装。酶的辐照液样品在实验前依所需浓度用三级蒸馏水配制。

1.1.2 结晶酚 蒸馏法提纯, 空气(冷凝收集 182—184℃ 馏分)的重结晶酚(白色晶体)。

1.1.3 其他试剂 邻苯二胺、 β -D 葡萄糖、3,5-二硝基水杨酸、 H_2O_2 、EDTA 等三种络合剂皆国内产品, AR 级, 未经纯化处理。

1.2 酶活性测定

1.2.1 辣根过氧化物酶(HRP) HRP 可催化以下反应, 氢供体 (DH_2) + $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{HRP}} 2 \text{H}_2\text{O} + \text{氢供体氧化型产物(D)}$, 选用邻苯二胺为氢供体, 形成的氧化型产物在 493 nm 处有特征吸收峰(用国产 721 型分光光度计测定)。以酶反应动力学曲线确定反应时间为 15 s, 体系中 HRP 浓度为 20 mg/l ($5 \times 10^{-7} \text{mol/l}$)。酶辐照液的配制和测定方法见文献[2]。

1.2.2 葡萄糖氧化酶(GOD) GOD 可催化如下反应, $\beta\text{-D 葡萄糖} + \frac{1}{2} \text{O}_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{葡萄糖酸} + \text{H}_2\text{O}_2$, 一般采用比色法测定催化反应生成的 H_2O_2 量, 但在本体系中, 水辐解也生成一定量的 H_2O_2 , 干扰以上测定。所以以测定 $\beta\text{-D 葡萄糖}$ 分解量来确定 GOD 活力, 采用 3,5-二硝基水杨酸比色法^[3],

受国际原子能机构(IAEA)资助, 是 IAEA 组织的国际协作研究课题 合同号 5230/R 2/RB 中的部分成果
收稿日期: 初稿 1992-06-30, 修改稿 1992-10-08

β -D 葡萄糖分析液总体积为 3.0ml, 其中葡萄糖溶液 1.0 ml (浓度为 1.2 mg/ml), GOD 1.5 ml (0.5 mg/ml), 乙酸缓冲液 0.25 ml (0.6 mol/l, pH = 5.1) 及蒸馏水 0.25 ml, 35℃ 恒温下反应 2.5 min, 立即用 0.5 ml 1.1 mol/l NaOH 溶液终止反应, 最后用 3,5-二硝基水杨酸比色测定 GOD 活力。

1.2.3 辐照 所有样品的辐照均在本校钴源装置 (6.7×10^{10} Bq) 中进行, 吸收剂量用亚铁剂量法测定, 取 $G_{Fe^{3+}} = 15.5$, 酶溶液在不同气氛下封管辐照。样品辐照后立即开管进行活力测定。

2 结果与讨论

2.1 HRP 的辐照失活

2.1.1 剂量、剂量率及初始酶浓度对 HRP 辐照失活的影响 室温、有氧条件下稀水溶液中 HRP 辐照稳定性较差, 相对活性随吸收剂量呈指数下降 (见图 1)。即开始辐照时酶活性下降较快, 随着活性不断损失, 活性下降速率随剂量增加而逐渐减缓。这是由于失活的酶分子仍与活性酶分子竞争水辐解的活性粒子 (主要是 OH 自由基), 两者竞争反应的速率常数是相等的^[4]。因此, 失活酶分子越多, 活性酶失活的几率就越小。

剂量率与酶初始浓度对 HRP 辐照失活亦有影响。图 1 曲线 1、2、3 对比可以看出, 剂量率越低, 体系中初始酶浓度越低, 酶失活速率越快。这与过氧化氢酶在稀水溶液中失活的规律相似。

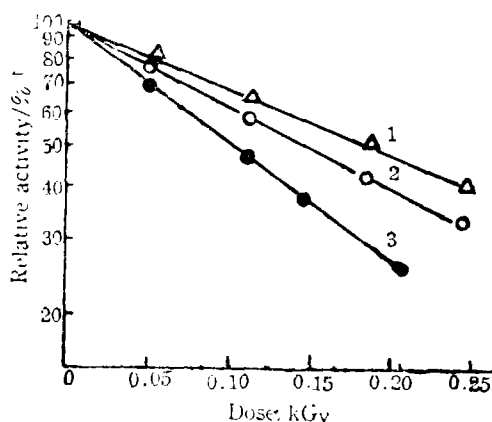


Fig 1. Relative activity of HRP as a function of dose in air at room temperature
Dose rate and concentration of HRP;
(1) 72.0 Gy/min, 9×10^{-7} mol/l (2) 24.7 Gy/min, 9×10^{-7} mol/l (3) 24.7 Gy/min, 4.5×10^{-7} mol/l

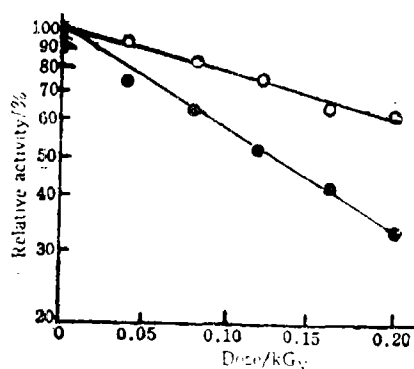


Fig 2. Effect of irradiation temperature on relative activity of HRP in air
[HRP] = 9×10^{-7} mol/l dose rate 24.7 Gy/min
(○) 0°C (●) 20°C

2.1.2 辐照温度与气氛对 HRP 失活的影响 温度对其辐照失活有一定的影响 (见图 2)。关于辐照气氛的影响 (见图 3) 与过氧化氢酶稍有不同。 N_2O 对 HRP 辐照失活的敏感作用是由于它们将水化电子转化为对酶失活起重要作用的 OH 自由基, 但 O_2 的通入却比通 N_2 体系失活速率更快一些。看来 OER 值 (Oxygen Enhancement Ratio) 应该小于 1。

2.2 HRP 的辐照后失活

2.2.1 HRP 的辐照后失活及温度影响 一定剂量辐照后, 将 HRP 样品取出辐射场, 在一段

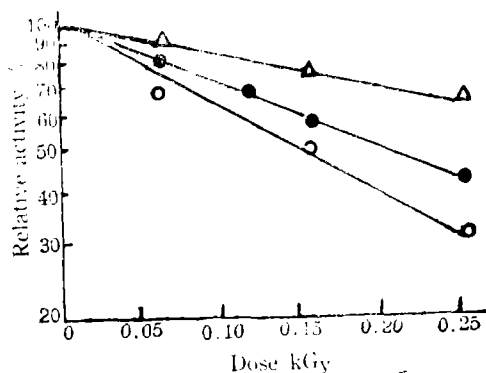


Fig 3. Relative activity as a function of dose for the samples of HRP which were bubbled with different gases
[HRP] = 9×10^{-7} mol/l
(▲) N₂ (●) air (○) N₂O

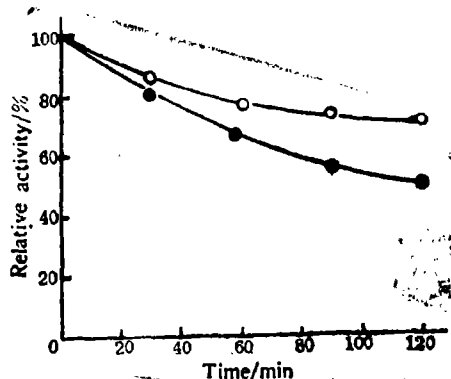


Fig 4. Effect of temperature on post deactivation of HRP in air
Total dose 280 Gy, dose rate 24.7 Gy/min
[HRP] = 9×10^{-7} mol/l
(○) 0°C (●) 20°C

时间内可以观察到其活力随时间缓慢下降的趋势(见图4), 即对稀水溶液中 HRP 来说也存在辐射后失活现象。从图4还可以看出, 在接近零度的冰盐溶液中辐照并保存的 HRP 样品其辐射失活的速率得到一定程度的保护。

2.2.2 水辐解产物 H₂O₂ 对 HRP 辐射后失活的影响 引起 HRP 辐射后失活的原因不可能是水辐解种生成的短寿命活性中间粒子(OH·、H·、e_{aq}⁻等), 只有水辐解的稳定分子产物 H₂O₂ 才有可能以某方式参与这种后失活过程。为此, 首先讨论微量 H₂O₂ 及辐照过的水对未辐照的 HRP 样品活性的影响(见图5、6)。从图5可以看出, 未辐照过的 HRP 样品在辐照过的水中(等体积混合)其活力也有轻微但却明显的下降趋势。此时水辐解生成的短寿命活性粒子早已衰变光了, 只有 H₂O₂ 有可能以某种方式参与酶的后失活过程。

图6表明未辐照 HRP 样品中加入微量 H₂O₂ 在浓度低于 10^{-4} mol/l 前对酶失活的影响是微不足道的, 而在 H₂O₂ 浓度高达 10^{-3} mol/l 时, 活力随时间的下降比较明显。然而水辐解生成的

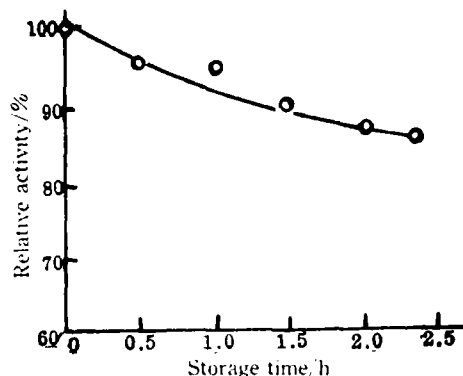


Fig 5. Effect of irradiated water on relative activity of HRP in air at room temperature Total dose 130 Gy dose rate 72×10 Gy/min [HRP] = 4.5×10^{-7} mol/l

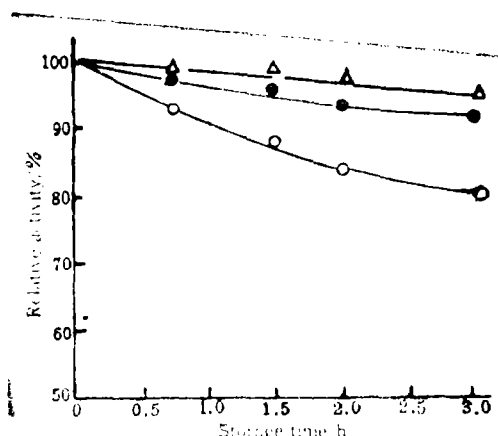


Fig 6. Effect of added H₂O₂ on relative activity of unirradiated HRP in air at room temperature [H₂O₂] (mol/l)
(▲) 9×10^{-6} (●) 9×10^{-4} (○) 9×10^{-3}

H_2O_2 , 其浓度也就在 $10^{-5}mol/l$ 数量级。因此可认为 H_2O_2 本身对酶后失活不是直接影响因素。

2.2.3 氧对 HRP 辐射后失活的影响 氧对稀水溶液中 HRP 辐射后失活是不可缺少的。结果见图 7。可见无氧辐照且无氧保存的 HRP 样品完全排除了 HRP 的辐射后失活。

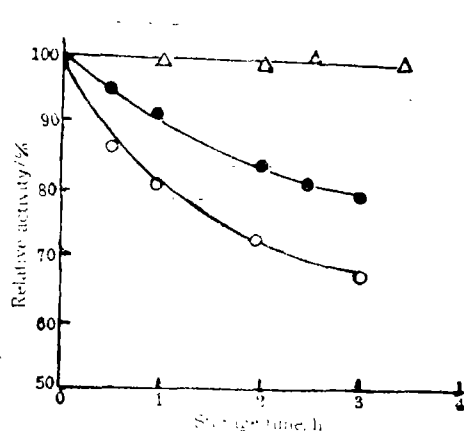


Fig 7. Effect of oxygen on post deactivation of HRP
Total dose 280 Gy dose rate 72.0 Gy/min
In air at room temperature, $[HRP] = 9 \times 10^{-7}mol/l$
(Δ) Samples without O_2 during irradiation and storage
($\bullet$) Samples irradiated in the absence of O_2 but stored in contact with air
($\circ$) Samples irradiated and stored in contact with air

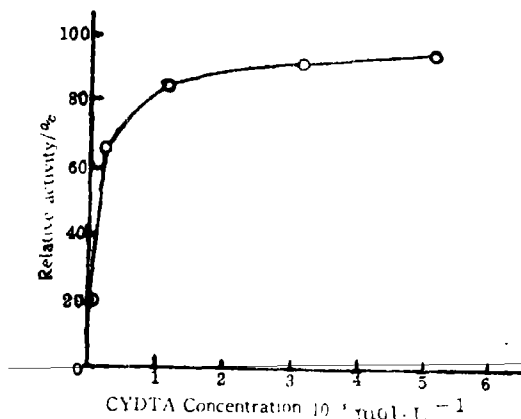


Fig 8. Protective effect as a function of CDTA concentration
Total dose 247 Gy dose rate 24.7 Gy/min in air at room temperature
 $[HRP] = 9 \times 10^{-7}mol/l$

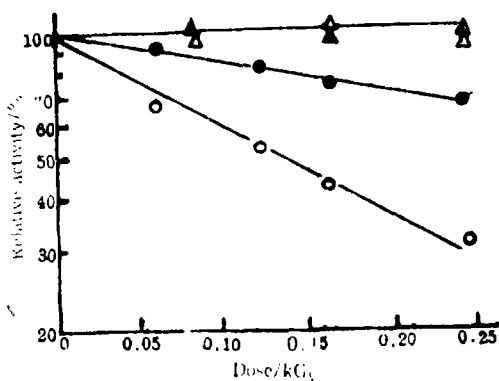


Fig 9. Relative activity of HRP as a function of additives in air at room temperature
dose rate 24.7 Gy/min
($\blacktriangle$) D ($\triangle$) CDTA ($\bullet$) EDTA
($\circ$) non-additives

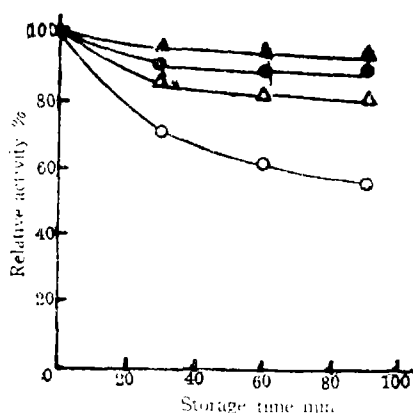


Fig 10. Effects of additives on post deactivation of HRP in air at room temperature
Total dose 247 Gy dose rate 24.7 Gy/min $[HRP] = 9 \times 10^{-7}mol/l$
($\blacktriangle$) D ($\bullet$) CDTA ($\triangle$) EDTA
($\circ$) non-additives

2.3 3种络合剂对 HRP 辐射失活与后失活的影响

采用3种络合剂(乙二胺四乙酸, EDTA; 反式-1,2环己二胺四乙酸, CDTA; 和二乙三胺五乙酸钠, D)作为添加剂, 观察了它们在稀水溶液中 HRP 辐射失活的影响(见图8、9)。由图8可以看出, 对 $9 \times 10^{-7} \text{mol/l}$ 的 HRP 稀水溶液, 接受约 0.25 kGy 辐射, $1 \times 10^{-3} \text{mol/l}$ 的 CDTA 就可以有效的抑制 HRP 的辐射失活。图9表明, 相近浓度($\sim 1 \times 10^{-3} \text{mol/l}$)的二乙三胺五乙酸钠亦有与 CDTA 相同的效果, 但 EDTA 的抑制能力比前两者差一些。上述三种络合剂都是 OH 基的俘获体, 由于浓度上的优势, 在相近反应速率常数时, 它们可以优先清除水辐解生成的 OH 自由基, 从而保护了酶的失活。

向体系中分别加入 $5 \times 10^{-3} \text{mol/l}$ 的上述三种络合剂, 247 Gy 辐照后观察其后失活现象(见图10), 从图10可以看出三种络合剂对 HRP 的辐射后失活都有明显的抑制作用。

2.4 葡萄糖氧化酶辐照效应

稀水溶液中葡萄糖氧化酶的辐照效应见图11、12。

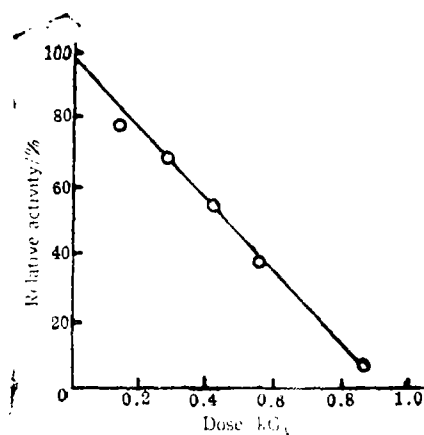


Fig 11. Relative activity of GOD as a function of dose dose rate 56.1Gy/min [GOD] = 0.5 mg/ml

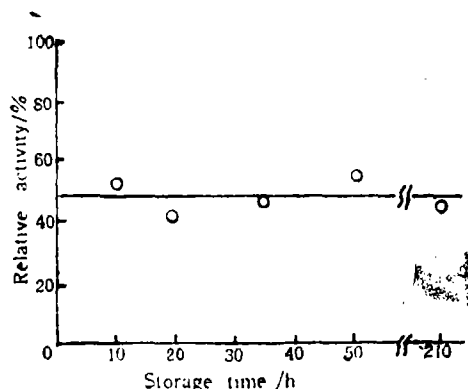


Fig 12. Relative activity of irradiated GOD as a function of storage time Total dose 420 Gy dose rate 56.1 Gy/min [GOD] = 0.5 mg/ml

由图11可以看出, 稀水溶液中葡萄糖氧化酶的辐射稳定性很差, 其相对活性随吸收剂量线性下降, 在 800 Gy 左右其活性几乎完全被破坏。同样浓度(0.5 mg/ml)的葡萄糖氧化酶溶液经 420 Gy 辐照后, 其相对活力稳定在 50% 左右, 将近 4 h 无明显变化。这说明 GOD 辐照后并没有后失活现象。因此不能把酶的辐射后失活现象看成是带普遍性的, 而只能在测定后方可确定。这一现象在研究辐射包埋固定化酶时, 应先确定该酶是否有辐射后失活效应, 以免和酶正常的泄漏现象相混淆。

参 考 文 献

- 1 哈鸿飞, 陈毅善. 辐射研究与辐射工艺学报, 1993, 11(2): 70
- 2 哈鸿飞, 高金辉, 吴季兰. 辐射研究与辐射工艺学报, 1990, 8(2): 75
- 3 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编. 生化实验方法和技术. 人民教育出版社, 1983: 9
- 4 Sanner T et al. Biochem. Biophys. Acta, 1967, 146: 298

RADIATION INDUCED DEACTIVATION, POST DEACTIVATION OF HORSE RADISH PEROXIDASE, GLUCOSE OXIDASE AND THE PROTECTIVE EFFECT

Yi Min Zhong Qun Chen Yiqing Ha Hongfei

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

ABSTRACT In order to check the fact if the radiation induced post deactivation are possessed by all the enzymes, in this work the radiation effects of horse radish peroxidase (HRP) and glucose oxidase (GOD) were investigated. It was found that in dilute aqueous solution the irradiated HRP has the post deactivation also. The effects of absorbed dose, initial HRP concentration in solution, atmosphere, temperature and additives (three kinds of complex agents: EDTA, CDTA and D) on the post deactivation of HRP were investigated. The regularity of post deactivation of HRP is similar with the catalase. Oxygen in enzyme samples is necessary for the post deactivation. $5 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ of the three additives could control the phenomenon efficiently. Of course, the radiation deactivation of HRP was given as well. In the case of GOD the post deactivation was not found, although its radiation deactivation is also serious. It means that the radiation induced post deactivation is not common phenomenon for all enzymes.

KEYWORDS Glucose oxidase, Complex agent, Horse radish peroxidase, Radiation deactivation