

除草剂莠去津对过氧化氢酶中酪氨酸微区的影响

刘维屏, 杨炜春, 刘惠君, 陈学萍(浙江大学环境科学研究所, 杭州 310027, E-mail: wpliu@mail.hz.zj.cn)

摘要:应用紫外差光谱和荧光光谱研究了除草剂莠去津对过氧化氢酶中酪氨酸微区的影响. 通过紫外差光谱发现, 当 $9.1 < \text{pH} < 9.9$ 之间变化时, 差光谱吸收 $\Delta A_{260\text{nm}}$ 急剧变化, 酪氨酸酚羟基的表观离解常数 $pK_{\text{侧链}} = 9.5$. 莠去津与过氧化氢酶作用后, 可能是由于氢键的作用, 紫外差光谱和荧光光谱都有一定的红移现象产生, 但其表观离解常数未发生改变. SDS 对其荧光性质有较大的影响; 过氧化氢酶的荧光能被 KI 碰撞猝灭. 研究表明, 酪氨酸残基可能是处于过氧化氢酶的亲水内核, 莠去津可能与过氧化氢酶形成氢键, 但对酪氨酸微区影响不大.

关键词: 莠去津; 酪氨酸微区; 过氧化氢酶; 紫外差光谱; 荧光光谱

中图分类号: X132 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2002)06-05-0086

Influence of Atrazine on the Tyrosine Environment of Catalase

Liu Weiping, Yang Weichun, Liu Huijun, Chen Xueping(Institute of Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China E-mail: wpliu@mail.hz.zj.cn)

Abstract: By the UV difference spectrum and fluorescence spectrum technique, the influence of atrazine on tyrosine environment of catalase was studied. According to the results of the UV difference spectrum curve, the UV difference absorption $\Delta A_{260\text{nm}}$ showed changing rapidly when pH ranging from 9.1 to 9.9. UV difference spectrum and fluorescence spectrum of atrazine-catalase were red shift that maybe caused by effect of hydrogen bonding. The fluorescence spectrum was sensitive to SDS and quenchable by KI. The results indicated that the tyrosine residues of catalase reside in hydrophilic core, and there is hydrogen bonding between atrazine and catalase probably. Atrazine has little effect on tyrosine environment of catalase.

Keywords: atrazine; tyrosine environment; catalase; UV difference spectrum; fluorescence spectrum

过氧化氢酶(EC 1.11.1.6)广泛存在于土壤和生物体内, 它的生物功能是在细胞中能促进过氧化氢的分解, 使其不进一步产生毒性很大的氢氧自由基, 具有保护酶的作用, 对动植物的生长发育和代谢活动具有重要意义^[1,2]. 土壤中过氧化氢酶活性还与土壤呼吸作用和土壤微生物活动息息相关, 是表征土壤生物学特性的重要酶^[3].

溶液构象的研究是从宏观上了解酶的整体结构和酶在生理状态下催化活性作用时结构状态的关键. 过氧化氢酶的溶液三级结构的一个重要内容就是其氨基酸残基的微区结构. 因为蛋白质的活性部位往往就在这些微区上^[4]. 芳香氨基酸因常在酶的催化功能方面表现较重要的作用且便于研究, 在氨基酸微区的研究中占

有重要地位. 紫外差光谱和荧光光谱可以利用蛋白质中芳香氨基酸的紫外吸收和荧光特性来推测蛋白质等生物大分子的溶液构象, 生物高分子结构和功能的关系及生色基团所处微观环境等信息^[5]. 目前, 应用荧光法或荧光探针法对蛋白质等大分子的研究, 已经引起了广泛的重视^[6~8]. 紫外差光谱和荧光光谱对溶液条件变化有很高的灵敏度, 可以很方便地研究过氧化氢酶构象的变化. 研究这种构象变化对于过氧化氢酶结构与功能的关系具有重要意义^[4].

本文使用紫外差光谱和荧光光谱研究了国

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39670420)

作者简介: 刘维屏(1958~), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为有机污染物的环境污染化学与污染控制化学.

收稿日期: 2001-10-03; 修订日期: 2001-11-23

内外广泛使用的除草剂莠去津^[9]对过氧化氢酶中酪氨酸微区的影响,探讨了莠去津对过氧化氢酶构象影响的可能机理,以便为在农业上正确使用莠去津提供理论依据.

1 材料与与方法

1.1 仪器和试剂

莠去津由美国 Chemical Service 公司提供,纯度为 99%; $2.6 \times 10^8 \text{ Unit} \cdot \text{L}^{-1}$ 过氧化氢酶标准溶液(德国 GmbH 公司);使用时逐级稀释.酪氨酸为生化试剂,其他试剂均为分析纯,水为二次亚沸蒸馏水. pHS-9V 型酸度计(杭州华光无线电厂).

1.2 紫外差光谱的测定

所有紫外差光谱在岛津 UV-2401 PC 型紫外可见分光光度仪上测定,双光束,狭缝宽度 1.0 nm,石英吸收池光径 10 mm.测定时实验室温度为 25 °C.

将过氧化氢酶分别用水、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸或 NaOH 配制成浓度为 $52000 \text{ Unit} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,测定时用蒸馏水为参比.

紫外 pH 差光谱测定采用一套不同 pH 值

的 Atkins-Pantin 缓冲溶液^[10],而其它条件完全相同的过氧化氢酶溶液($260000 \text{ Unit} \cdot \text{L}^{-1}$).以过氧化氢酶水溶液作为参照调节基线到 0,取出测量光路中的比色池,倾出溶液洗净吹干,重新注入不同 pH 值的酶溶液,扫描差光谱^[5].

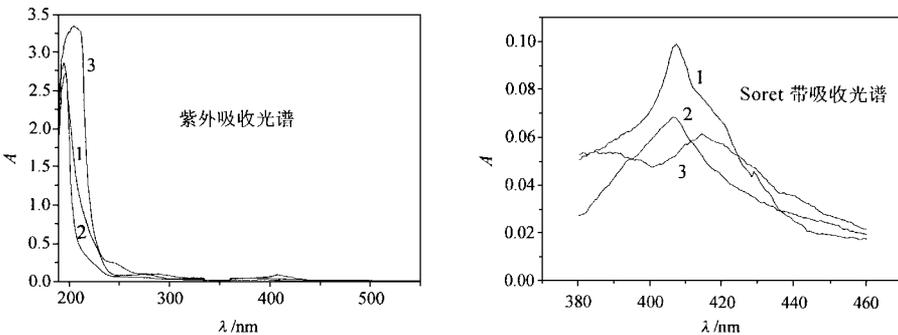
1.3 荧光光谱的测定

所有荧光实验均在岛津 RF-5401 型荧光分光光度仪上进行,发射光谱测定时,激发和发射狭缝宽度为 10 nm,氙灯光源,测定时实验室温度为 25 °C.荧光测定激发波长 280 nm,激发与发射光狭缝宽度均为 10 nm,扫描速度 $60 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$,扫描范围 250 ~ 400 nm.

2 结果与讨论

2.1 过氧化氢酶紫外吸收光谱

过氧化氢酶在各溶液状态下的紫外可见吸收光谱见图 1.从图 1 可见,过氧化氢酶在酸中的吸收光谱与在蒸馏水中的吸收光谱基本一致,只是在 Soret 带最大吸收值有所降低.在碱中光谱则发生红移(从 196 nm 移动到 206 nm 处),相应的吸收峰强度也明显提高.而 Soret 带的吸收峰不仅强度降低,而且在 385 nm 左右出现一肩峰.



1. H₂O 2. HCl 0.1 mol·L⁻¹ 3. NaOH 0.1 mol·L⁻¹

图 1 过氧化氢酶的紫外吸收光谱和 Soret 带吸收光谱

Fig.1 UV spectrum of catalase and its Soret spectrum

酶的紫外吸收性质是由芳香族氨基酸含量所决定.在约 200 nm 处的强吸收带是肽骨架本身的电子位移的跃迁,苯丙氨酸最长的波长吸收带在 257 nm,酪氨酸为 275 nm,色氨酸为 280 nm^[11].在酸和水中,对酶的肽骨架几乎没有影响,酶的结构未发生很大改变,所以两者

的紫外吸收图谱大致相似;而在强碱中,酶分子内极性基团带电情况发生改变,盐键可能被破坏,使某些基团从分子内部转移到分子表面^[12],肽骨架上电子的激发能降低,使 $\pi-\pi^*$ 跃迁更易发生,所以 λ_{max} 由 196 nm 向长波长红移到 206 nm,吸光系数也明显增加.在碱中 Soret

带吸收光谱的变化也说明酶的构象发生了一定的变化。

2.2 过氧化氢酶的紫外 pH 差光谱

为了研究过氧化氢酶分子中酪氨酸残基所处的微环境,对过氧化氢酶的紫外 pH 差光谱进行了测定.随着 pH 值的变大,酪氨酸逐渐离解,使吸收光谱发生红移.结果发现,在相对较低 pH(小于 9.1)和相对较高 pH(大于 10.2)的条件下,过氧化氢酶的紫外差光谱吸收与 pH 变化的相关性都不明显.而在 $9.1 < \text{pH} < 9.9$ 之间变化时,差光谱吸收 $\Delta A_{260\text{nm}}$ 急剧变化(图 2).为了更清楚地描述这种变化规律,取 260nm 处的差吸收值对 pH 作图,绘制酪氨酸 pH 差光谱曲线(图 3),酪氨酸差光谱曲线的中点即为过氧化氢酶中酪氨酸侧链酚羟基的表观离解常数 $pK_{\text{侧链}} = 9.5$. $\Delta A_{260\text{nm}}$ 是由酪氨酸离解引起的.酪氨酸 pH 差光谱曲线反映了过氧化氢酶在碱中酪氨酸酚羟基的离解状态.在游离状态

原因可能为氨基酸残基在形成蛋白质后本身的变异.

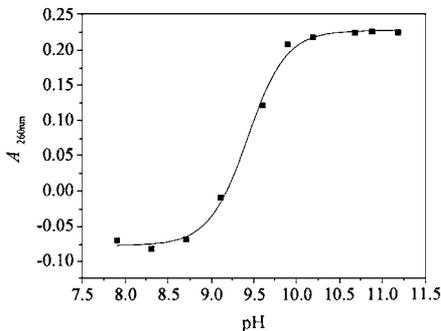


图 3 过氧化氢酶酪氨酸 pH 差光谱曲线

Fig.3 pH difference spectrum curve of tyrosine

莠去津与过氧化氢酶作用后紫外 pH 差光谱如图 4 所示.从图 4 可以看出,差光谱的红移现象更为明显,且 $\Delta A_{260\text{nm}}$ 比原来也有所增加.但是酪氨酸 pH 差光谱曲线(图 5)却没有很大的变化,其原因可能是莠去津与酪氨酸残基之间有氢键产生,从芳环到羧基的电荷转移作用增强,从而导致紫外吸收光谱向长波方向移动,莠去津并未改变酪氨酸残基的亲水微环境,所以酪氨酸侧链表观离解常数 $pK_{\text{侧链}}$ 未发生改变.

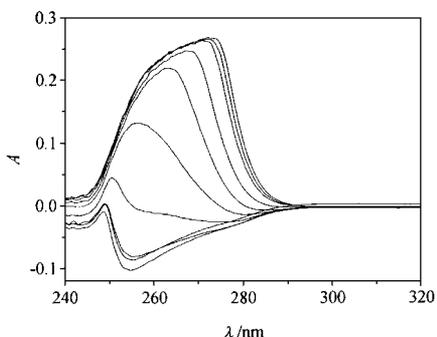


图 2 过氧化氢酶的紫外 pH 差光谱

(曲线从下到上 pH 依次为: 7.9, 8.3, 8.7, 9.1, 9.6, 9.9, 10.2, 10.7, 10.9, 11.2)

Fig.2 UV difference spectrum of catalase

下,酪氨酸侧链酚羟基表观离解常数 $pK_{\text{侧链}} = 10.1$,这说明过氧化氢酶中的酪氨酸可能是处于亲水微区.处于亲水微区的酪氨酸残基较易受 OH^- 离子的作用而离解,当 pH 大于 8.9 时,过氧化氢酶中酪氨酸的酚羟基侧链开始离解,其结构发生变化,反映在差光谱曲线上表现为差光谱明显增加,而当 $\text{pH} > 9.9$ 时,如果再提高 OH^- 的浓度,酪氨酸酚羟基已完全离解,差光谱不再增加.造成表观离解常数有所降低的

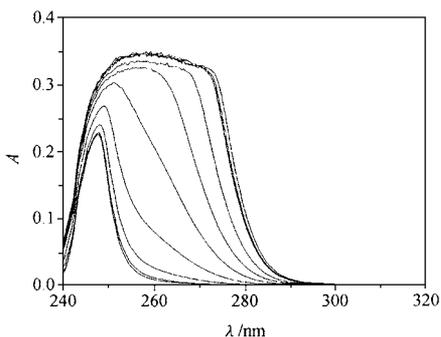


图 4 莠去津-过氧化氢酶的紫外 pH 差光谱

(曲线从下到上 pH 依次为: 7.9, 8.3, 8.7, 9.1, 9.6, 9.9, 10.2, 10.7, 10.9, 11.2)

Fig.4 UV difference spectrum of Atrazine-catalase

2.3 过氧化氢酶的荧光光谱

在荧光光谱中,化合物在 λ_{ex} 和 λ_{em} 处的荧光强度与其浓度和结构等有关.其构型如果发生变化,在荧光光谱中表现为 λ_{ex} 和 λ_{em} 的移动

和荧光强度的改变^[13]. 过氧化氢酶的水溶液和与莠去津作用后的激发光谱及发射光谱如图 6 所示. 从图 6 可以看出, CAT 与莠去津作用后激发光谱和发射光谱强度均有所降低, 而且 λ_{ex} 和 λ_{em} 分别红移了 2nm 和 3nm. 其原因可能是由于氢键效应, 从芳环到吸电子取代基(羧基)的电荷转移作用增强, 从而导致荧光光谱向长波方向移动^[14], 这与紫外光谱得到的推测是一致的.

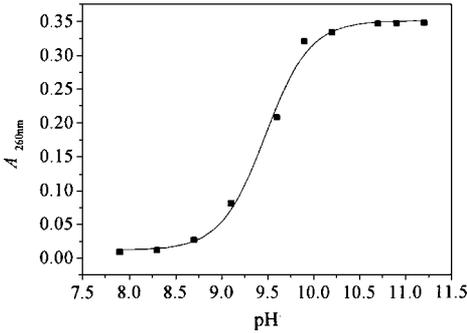
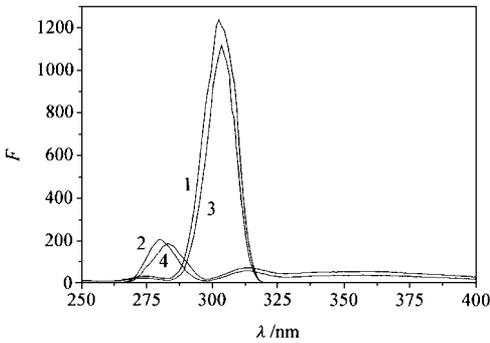


图 5 莠去津-酪氨酸 pH 差光谱曲线

Fig. 5 pH difference spectrum curve of Atrazine-tyrosine



1. CAT 的激发光谱 2. CAT 的发射光谱
3. 莠去津-CAT 的激发光谱 4. 莠去津-CAT 的发射光谱

图 6 过氧化氢酶(CAT) 莠去津-过氧化氢酶的激发和发射光谱

Fig. 6 Excitation and emission fluorescence spectrum of catalase and Atrazine-catalase

2.4 SDS 对荧光强度的影响

为研究过氧化氢酶的三、四级构象变化与荧光光谱的关系, 测定了不同浓度的 SDS 对荧光光谱的影响(见图 7). SDS 能使肽链伸展, 氨基酸外露, 一般加入少量 SDS 能使蛋白质荧光

增强. 随着 SDS 浓度增大, 它可能破坏了酶分子的高级结构和酪氨酸的天然环境, 也可能阻断了分子内能量的转移和传递, 表现为荧光强度下降^[4, 15]. 从图 7 中可以看出, 当 SDS 浓度低于 0.05% 左右时, 随着 SDS 浓度的增加, 由于肽链伸展, 使得荧光强度加强, 这说明酪氨酸残基可能是处于酶的内核结构.

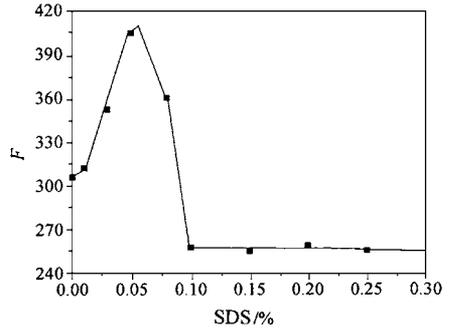


图 7 不同浓度的 SDS 对过氧化氢酶荧光强度的影响

Fig. 7 Fluorescence intensity of CAT at various concentration of SDS

2.5 荧光猝灭

I^- 是酪氨酸的碰撞猝灭剂, 通过其猝灭研究可以推测分子中酪氨酸残基周围的微观环境. 实验结果见图 8. 从图 8 可看出, KI 对过氧化氢酶的荧光猝灭基本符合 Stern-Volmer 规律, 酪氨酸残基的微区能允许象 I^- 这样带有电荷的大负离子进入, 说明微区是亲水环境的. 但是由于猝灭效率并不是很高, 说明酪氨酸残基并不是处于酶分子表面, 而是处于亲水环境的内核中. 这与紫外差光谱和荧光光谱得到的结论是吻合的.

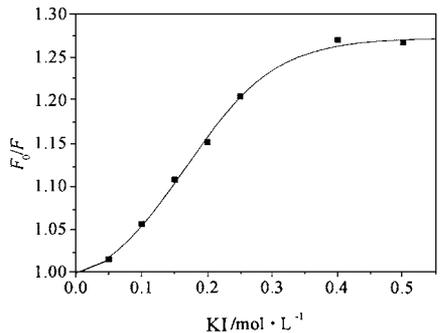


图 8 KI 对过氧化氢酶的荧光猝灭

Fig. 8 Fluorescence quenching of catalase by KI

3 结 论

(1) 通过紫外差光谱发现,当 $9.1 < \text{pH} < 9.9$ 之间变化时,差光谱吸收 $\Delta A_{260\text{nm}}$ 急剧变化,酪氨酸表观离解常数 $pK_{\text{侧链}} = 9.5$. 过氧化氢酶中酪氨酸残基可能是处于亲水微区.

(2) 莠去津与过氧化氢酶作用后,可能是由于氢键的作用,紫外差光谱和荧光光谱都有一定的红移现象产生,但其表观离解常数未发生改变.

(3) SDS 对 CAT 荧光性质有较大的影响,酪氨酸残基可能是处于酶的内核结构. 过氧化氢酶的荧光能被 KI 碰撞猝灭.

(4) 研究表明,酪氨酸残基可能是处于过氧化氢酶的亲水内核,莠去津可能与过氧化氢酶形成氢键,但对酪氨酸微区影响不大.

参考文献:

- 1 方允中,李文杰编. 自由基与酶——基础理论及其在生物学和医学中的应用. 北京:科学出版社,1989. 129~133.
- 2 Banerjee B D, Seth V, Bhattacharya A, Pasha S T, Chakraborty A K. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. *Toxicology Letters*, 1999, **107**:33~47.
- 3 郑巍,刘惠君,刘维屏. 吡虫啉农药及代谢产物对土壤过氧化氢酶活性的影响. *中国环境科学*, 2000, **20**(6):524~527.
- 4 冯永君,李德舜,孙丽,张长铠,蔺存国. 火茹素酪氨酸微区的研究. *化学学报*, 2000, **58**(8):1037~1042.
- 5 张树政,孟广震,何忠效. 酶学研究技术(上). 北京:科学出版社,1987. 338~369.
- 6 Caiola V R, Gill D, Parola A H. Probing the active site of adenosine deaminase by a pH responsive fluorescent competitive inhibitor. *Biophys. Chem.*, 1998, **70**(1):41~56.
- 7 Qu B, Li QT, Wong KP, Tan TMC, Halliwell B. Mechanism of clofibrate hepatotoxicity: Mitochondrial damage and oxidative stress in hepatocytes. *Free radical Biology and Medicine*, 2001, **31**(5):659~669.
- 8 Zhao G H, Bour Abdallah F, Yang X K, Arosio P, Chasteen N D. Is hydrogen peroxide produced during iron(II) oxidation in mammalian apoferritins? *Biochemistry*, 2001, **40**(36):10832~10838.
- 9 杨炜春,王琪全,刘维屏. 除草剂莠去津在土壤-水环境中的吸附及其机理. *环境科学*, 2000, **21**(4):94~97.
- 10 杭州大学化学系分析化学教研室编. 分析化学手册(第二版)——化学分析分册. 北京:化学工业出版社,1997. 343~344.
- 11 程传焯编. 生物物理化学. 北京:科学技术文献出版社,1998. 279~281.
- 12 陈惠黎主编. 生物大分子的结构和功能. 上海:上海医科大学出版社,1999. 37~40.
- 13 卢奎,吴养洁,李永红,石雅琳,周稚仙. 环[4]芳烃硼酸与氨基酸配位作用的荧光光谱研究. *高等学校化学学报*, 2001, **22**(4):581~583.
- 14 陈国珍,黄贤智,许金钩等编. 荧光分析法(第二版). 北京:科学出版社,1990. 88~92.
- 15 黄婉治,王淳,赵建民. 尖吻蝮蛇毒出血毒素 I 的荧光光谱、荧光猝灭以及和出血活性的关系. *生物化学和生物物理学报*, 1984, **16**(3):256~263.