

漆酶、铜蓝蛋白的脉冲激光光声法测定¹⁾阎宏涛²⁾ 邓延倬 曾云鄂

(武汉大学化学系、分析测试中心)

提 要

本文采用脉冲激光光声分析法,进行了漆酶和铜蓝蛋白的测定。探讨了入射激光能量、照射时间、温度等因素对漆酶、铜蓝蛋白光声信号强度的影响以及 18 种金属离子与铜蓝蛋白的作用情况。

酶和铜蓝蛋白在生物体内有着重要的作用。生物体中酶和蛋白质的测定,对于了解酶的功能等具有一定的意义。

我们首次采用脉冲激光光声法进行了漆酶和铜蓝蛋白的测定。试验了入射激光能量、激光照射时间和温度变化等因素对漆酶活性的影响以及各种金属离子与铜蓝蛋白的作用;建立了测定漆酶和铜蓝蛋白的光声分析方法,检测限分别为 $3\mu\text{g}$ 和 $5\mu\text{g}$ 。结果表明,高灵敏度的激光光声光谱分析在生物样品的研究中是一种十分有用的方法。

实 验 方 法

(1) 装置和方法

实验装置同前文报导^[1]。以 Nd:YAG 激光泵浦的染料激光器为光源。 R_{640} 染料,波长调谐范围为 $595\text{nm}\sim 615\text{nm}$ 。激光脉宽约 8ns ,重复率 10Hz 。入射于样品池的脉冲激光能量随具体实验内容而定。

(2) 漆酶和铜蓝蛋白

电泳纯。本校“资源开发和应用技术研究所”提供。

结 果 与 讨 论

(一) 漆酶和铜蓝蛋白含量测定

漆酶是含有四个铜原子的含铜酶。四个

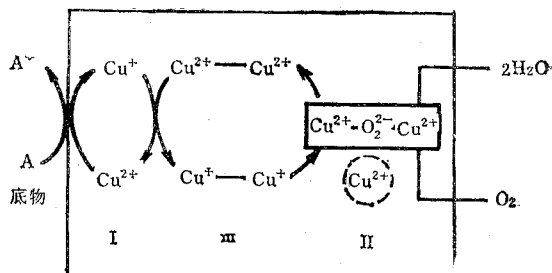


图 1 漆酶电子传递示意图

I: 蓝铜; II、III: 非蓝铜

$\text{Cu}(\text{II})$ 具有三种不同的物理化学性质,分别称为 I、II、III 型 $\text{Cu}(\text{II})$ (见图 1 示)。I 型 $\text{Cu}(\text{II})$ 是含有 1 个 $\text{Cu}(\text{II})$ 的蓝铜,在可见区 600nm 左右有一中等强度吸收峰 ($\epsilon_{600\text{nm}} = 4000\sim 6000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); II、III 型 $\text{Cu}(\text{II})$ 分别含有 1 个、2 个 $\text{Cu}(\text{II})$,它们都是在可见区无吸收的非蓝铜^[2,3]。

酶的含量通常是以酶催化某一特定反应的能力,即酶的活性来表示。研究报道^[2], I 型 $\text{Cu}(\text{II})$ 与底物反应,处于与底物直接结合的位置,为 1 电子反应。反应速度与在全过程中的反应速度相同。所以,测定 I 型 $\text{Cu}(\text{II})$ 的含量便可检测到漆酶的活性。

铜蓝蛋白与铁蛋白一样都是电子传递的媒

1) 国家自然科学基金资助课题。

2) 通讯联系人,现工作单位,中科院西安光机所二分箱。

介，每分子中含有一个铜原子。在可见区 605 nm 附近有特征吸收 ($\varepsilon \approx 4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)，吸收系数比低分子量的 Cu(II) 配合物约大 2 个数量级。

实验中采用光度法测量漆酶和铜蓝蛋白的吸收光谱，如图 2 示。由图可见，漆酶和铜蓝蛋白在 540—660 nm 波长范围均有一特征吸收峰，峰值分别在 607nm 和 605nm。

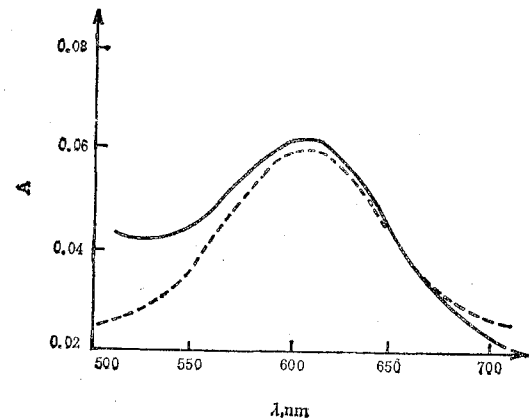


图 2 漆酶和铜蓝蛋白吸收光谱
实线：漆酶；虚线：铜蓝蛋白

在 600nm，波长，1cm 池长，入射脉冲激光能量 1 mJ，采用光声分析法直接测定漆酶和铜蓝蛋白含量，结果如图3、表 1 所示。线性范围分

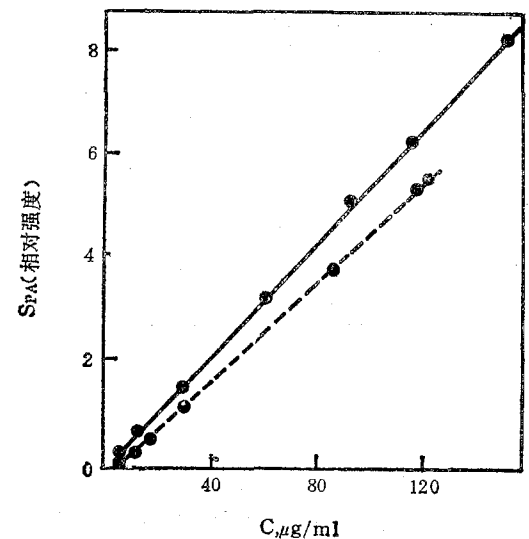


图 3 光声分析法测定曲线
实线：铜蓝蛋白；虚线：漆酶

表 1 漆酶、铜蓝蛋白测定结果 ($T = 20^\circ\text{C}$)

样品	实际含量 (μg)	测定结果 (μg)	平均 (μg)	相对标准偏差
漆酶	15.0	15.2, 15.0, 15.1, 14.9, 14.7, 15.4	15.05	1.6%
铜蓝蛋白	31.6	32.0, 31.2, 32.2, 31.4, 31.8, 31.1	31.62	1.4%

别为 $3 \mu\text{g/ml} \sim 120 \mu\text{g/ml}$; $5 \mu\text{g/ml} \sim 160 \mu\text{g/ml}$ 。同一测定条件下，与吸收光度法比较，灵敏度提高了三个数量级。结果表明，激光光声光谱分析技术可以有效地用于低含量酶和蛋白质的检测，在生物医学研究中具有十分广泛的应用前景。

(二) 入射激光能量对漆酶活性和铜蓝蛋白的影响

光声效应是一种光热效应。光声信号强度与入射激光能量大小、漆酶和铜蓝蛋白分子的结构及其状态密切相关。

蛋白质分子是由氨基酸首尾相接而成的共价多肽链组成，形成一定构象的高聚体。在入射激光作用下，漆酶和铜蓝蛋白吸收光辐射，产生热弹性波。图 4 所示为不同能量入射激光作用下，漆酶、铜蓝蛋白的光声信号强度变化曲线。明显看出，漆酶和铜蓝蛋白在不同能量激光作用下的差异。铜蓝蛋白，在入射激光能量 0.1—9.6 mJ/脉冲范围内，光声信号强度随入射光强增大线性增加；而漆酶，在 0.1—5.6 mJ/

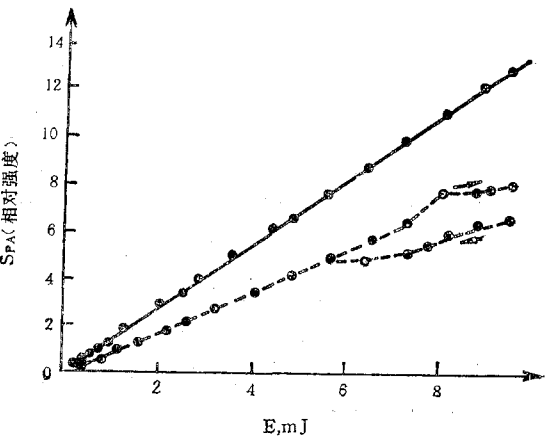


图 4 入射激光能量与光声信号强度的关系
实线：铜蓝蛋白；虚线：漆酶

脉冲入射激光能量范围, 光声信号随入射激光能量增加。超过这一能量范围, 便出现非线性。这种现象是漆酶和铜蓝蛋白本身结构特征的反映。

维持蛋白质分子构象的多种化学键, 如氢键、疏水键、离子键、二硫键、配位键等, 产生一种足以维持蛋白质空间结构的强大作用力。在一定能量激光作用下, 光声效应产生的弹性波使得这些次级键局部发生微扰, 但并未发生肽键的断裂变化。表现在图 4 曲线上随着入射激光能量增加, 光声信号强度增大。

在 600 nm 附近, 铜蓝蛋白的特征吸收是由于与 Cu 配位的胱氨酸和甲硫氨酸的 S 原子 $S \rightarrow Cu(II)$ 电荷转移的缘故。Cu(II) 由平面四配位成为变形四面体配位。而对于漆酶, 它是一种含有多个铜原子的有生物催化特性的特殊蛋白质。三种不同类型的铜原子相辅相成。当入射激光能量增大到一定值时, 引起次级键的变化, 可能导致空间构象的弛豫变化。因而, 在入射激光反复作用下 ($0.1 \text{ mJ} \rightleftharpoons 9.6 \text{ mJ}$), 高能曲线出现了明显的差别。

(三) 激光照射时间的影响

脉冲激光功率密度高。当高功率激光与物质相互作用时, 往往产生许多强光效应, 如光电离、光击穿等。生物酶一般要求比较温和的条件, 强酸碱、高温、光照等会使酶受到破坏而部分或完全失去活力。实验中采用脉冲激光(600 nm、10 Hz、1 mJ/脉冲能量)连续照射漆酶(浓度 $84 \mu\text{g/ml}$ 、pH 7.2) 4 小时, 监测漆酶活力变化。并用分光光度计(岛津 UV-240, UV/VIS 分光光度计)在 200—700 nm 波长范围扫描。结果表明在 1m 入射激光能量作用下, 漆酶的活力基本不变。如图 5 所示。证明在实验测定条件下, 采用 1 mJ 激光脉冲能量并不导致酶的活性中心特定结构变化。

(四) 铜蓝蛋白光声信号强度与温度的关系

温度升高, 蛋白质会发生热变性。实验中对铜蓝蛋白的光声温度效应进行了研究, 结果如图 6。由图可见, 铜蓝蛋白在 10—50℃ 温度范围内, 光声信号强度随温度升高而增加。在

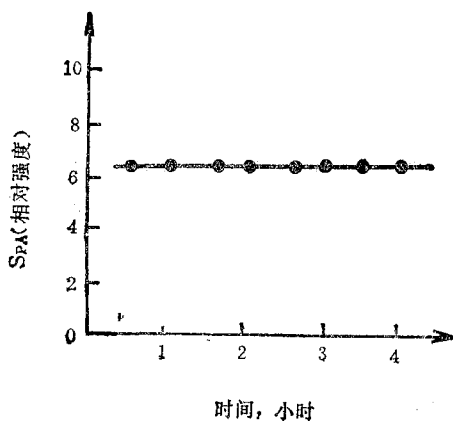


图 5 激光照射时间的影响

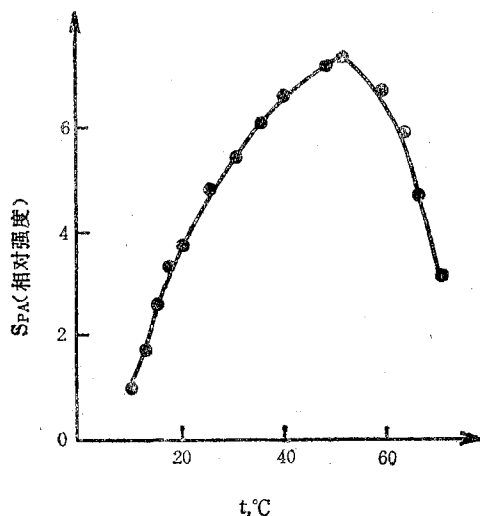


图 6 铜蓝蛋白温度效应曲线

50℃ 左右出现一明显的峰, 而后温度升高, 光声信号强度减小。

光声信号强度不仅依赖于样品的热学性质, 而且也取决于样品的结构特征。对铜蓝蛋白这样的生物大分子, 其肽键具有特定的空间排布。温度效应除了与样品溶液的热特性有关外, 主要是由其结构特征所决定。温度升高, 铜蓝蛋白的构象逐渐发生变化, 由紧密有序的构象变成松散无规则的构象。表现在图 6 曲线上, 温度上升, 光声信号强度增加; 温度继续升高, 到达 50℃ 后, 由于热变性使得蛋白质发生凝聚沉淀, 光声信号强度下降。

实验中并测定了不同温度下铜蓝蛋白的吸

光度变化,如表 2 所示。在 20—70℃,铜蓝蛋白吸光度缓慢减小,所以温度曲线中的光声效应特征峰并不是因吸光系数的变化所致。为保持测试温度恒定,实验中温度波动控制在 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

表 2 不同温度铜蓝蛋白吸光度变化

温度($^{\circ}\text{C}$)	吸光度(A)	温度($^{\circ}\text{C}$)	吸光度(A)
20	0.266	50	0.249
30	0.267	52	0.247
31	0.265	54	0.245
33	0.263	58	0.247
35	0.260	60	0.247
36	0.259	62	0.244
38	0.255	64	0.242
40	0.253	66	0.240
42	0.250	68	0.239
44	0.249	70	0.239
46	0.250	71	0.238
48	0.249		

(五) 金属离子与铜蓝蛋白作用

存在于生物体内的重金属中,铜的含量较高。研究各种金属离子与铜蓝蛋白作用,对于探索微量元素在植物体内的作用机理有十分重要的意义。实验中对 18 种金属离子与铜蓝蛋白的作用进行了研究,结果大致可分为三种类型:第一类,与铜蓝蛋白作用较弱,对光声信号影响小,如 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 等;第二类,与铜蓝蛋白作用较强,对光声信号强度影响较大,如 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Mo^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Hg^{2+} 等;第三类,低浓度基本无影响。超过一定浓度,作用非常强,光声信号急剧下降,如 Sn^{2+} 等。

图 7 所示为各类离子的典型作用情况。实际上,这种分类是不严格的。即使同一类金属离子,与铜蓝蛋白作用也有差别。这种作用强弱次序似乎与土壤中的元素含量有一定的关系。在土壤中含有量高的元素对铜蓝蛋白影响小;反之,则大。如 Ca^{2+} 和 Co^{2+} ,土壤中含量分别为 13700 ppm 干量和 8 ppm 干量^[2]。在 3 ml 63 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 铜蓝蛋白中分别加入 500 μg Ca^{2+} 和 Co^{2+} 时,两种离子的影响有明显的差别。

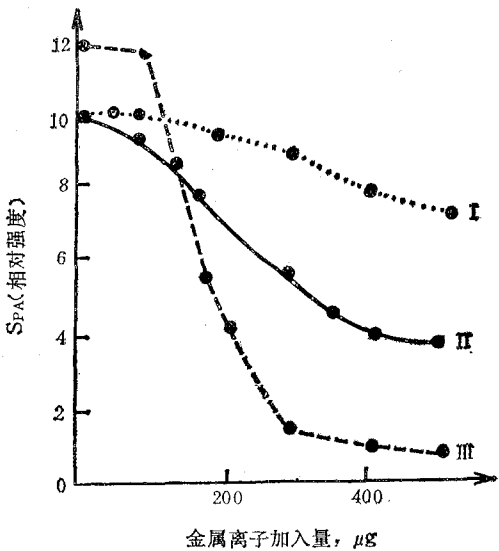


图 7 铜蓝蛋白与金属离子作用情况

I、II、III 分别为加入 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 和 Sn^{2+} 的情况

对于 Ca^{2+} ,光声信号强度减小 10%,而 Co^{2+} 却减少 60%。有一些金属离子,如 Sn^{2+} 、 Ba^{2+} 等,在一定浓度范围光声信号强度基本不变;而超过此范围,光声信号强度迅速减小。而且各种离子所引起光声信号强度减弱程度不等。表明金属离子与铜蓝蛋白的作用是复杂的。一定量的金属元素在生物体内发挥着重要作用,但当这一平衡含量被破坏时,即可引起缺乏或毒化现象。加入一定量的各种金属离子后,铜蓝蛋白的光声信号不同程度的减弱,其原因可能是金属离子与铜蓝蛋白生成了不溶性盐或络盐或者是铜蓝蛋白中的铜原子与金属离子间发生了相互作用、交换,破坏了铜蓝蛋白的构象^[4,5]。这方面的机理尚待研究。

参 考 文 献

- [1] 阎宏涛、邓延俦、曾云鹏:《高等学校化学学报》,1988,9(6),556。
- [2] 不破敬一郎编著,王子亮等译:《生物体与重金属》,中国环境科学出版社,北京,1985,17,64—165。
- [3] Henry, Y., and Peisach, J.: *Journal of Inorganic Biological Chemistry*, 1978, 21, 7751.
- [4] 陶慰孙等编:《蛋白质分子基础》,人民教育出版社,1982,178—395。
- [5] 阿伯特·莱特著,张维钦译:《蛋白质的结构与功能》,高等教育出版社,北京,1984。

【本文于 1988 年 6 月 15 日收到】