

研究工作

光敏反应对过氧化氢酶的影响

林 植 芳

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

提 要

光氧化反应中, 纯过氧化氢酶活性受光敏化剂血卟啉 IV 和核黄素的抑制。随光敏化剂浓度增高及光照时间延长, 抑制程度加大。酶与光敏化剂反应后吸收光谱位移, 峰形改变。紫外差示吸收光谱出现 229nm 负峰(血卟啉)和 236—240nm 峰(核黄素)。结果表明酶活的抑制与其蛋白构象的变化相关。

关键词 过氧化氢酶, 光敏反应, 核黄素, 血卟啉, 紫外差光谱

有氧下通过光敏化剂的光动力学处理可以消除某些植物病毒感染力, 损伤或杀死植物的根茎叶等组织^[1], 甚至可能杀死致人类于非命的癌细胞^[2]。光氧化可导致酶失去催化活性^[3]。含有过渡金属离子作辅基的酶, 对光氧化作用尤为敏感。

过氧化氢酶是含 Fe(III)-原卟啉的酶, 其活性与器官组织的活力密切相关。过氧化氢酶在细胞中起着清除 H_2O_2 毒性的保护酶作用, 对动植物的生长发育和代谢活动具有重要的意义。本文利用光敏化剂血卟啉(IV)和核黄素, 研究光照射下过氧化氢酶的失活和构象的变化, 试图阐明光敏化氧化反应对酶损伤的可能机理。

材 料 和 方 法

试验材料与处理方法 牛肝过氧化氢酶(CAT)购自 Sigma 公司, 血卟啉购自 Aldrich 公司, 核黄素为上海试剂厂产品。将总体积 2ml 含有 CAT 蛋白 25—50 μg 和不同浓度光敏化剂的 50mmol/L 磷酸缓冲液 (pH6.8) 放入玻璃比色皿中, 25℃ 下照光 (850 $\mu mol E m^{-2}s^{-1}$), 一定时间分别测定 CAT 活性及吸收

光谱的变化。

CAT 活性参照周群和毛良的方法^[4], 以氧电极 (Clack 型, Yellow Springs Co.) 系统于 25℃ 测定, 加入 CAT 开始反应。酶活以 $\mu mol O_2 mg^{-1} min^{-1}$ (每毫克酶蛋白每分钟产生氧微克分子数) 表示。

紫外差示吸收光谱按 Wetlaufer 法^[5], 以双杯系统测定。参比光路的第一杯为含光敏化剂的磷酸缓冲液, 第二杯为酶蛋白的缓冲液。样品光路的第一杯为酶蛋白及光敏化剂的反应物, 第二杯为磷酸缓冲液。吸收光谱与差示光谱用 Beckman DU-7HS 紫外分光光度计测定。

实 验 结 果

1. 血卟啉对 CAT 活性及其光谱特性的影响

血卟啉在有氧下光敏化产生单线态氧 1O_2 和羟自由基 $OH^{\cdot}$ ^[5,6], 对 CAT 活性有抑制效应。随光照时间延长, 抑制作用增大 (图 1)。高浓度的血卟啉 (100 $\mu mol/L$) 比低浓度 (50 $\mu mol/L$) 对 CAT 活性的抑制大。可见, 有氧下血卟啉光敏化过程形成的活性氧可能导致

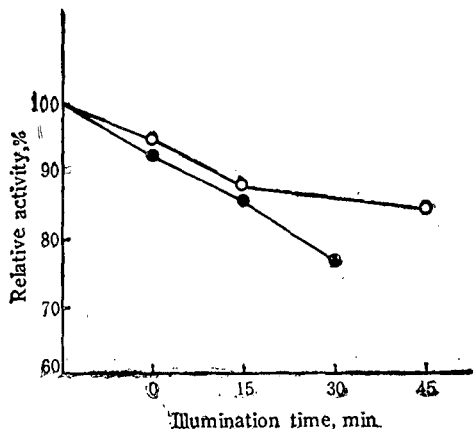


图1 血卟啉光敏化作用对过氧化氢酶活性的影响
Fig. 1 The photosensitive effect of hematoporphyrin on the activity of catalase

○—○ 50 μmol/L; ●—● 100 μmol/L

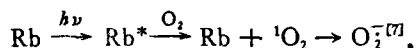
CAT 的氧化损伤而部分丧失活性。

血卟啉的吸收光谱 (200—450nm) 显示一个 369nm 的强吸收峰, 峰高与血卟啉浓度相关 (图 2a)。照光下血卟啉与 CAT 反应后的吸收光谱有 273nm 及 375.5nm 两个峰。前一个峰比酮蛋白通常的 280nm 峰红移了 7nm, 且其峰高值随血卟啉浓度增大而增高, 意味着反应后双键数可能增多。后一个峰比血卟啉本身的吸收峰也红移了 6nm (图 2b)。

CAT 与照光血卟啉的反应物对处于分隔双杯中未反应的 CAT 和血卟啉的紫外差示吸收光谱 (200—300nm) 显示一个 229nm 的负峰 (图 3)。当血卟啉浓度增高到 375 μmol/L 时, 此峰蓝移 4nm, 峰形显著变宽。这意味着血卟啉光敏化作用影响了 CAT 的构象, 高浓度的光敏化剂引起酶蛋白构象更明显的变化, 与图 1 对酶活的抑制相对应。

2. 核黄素对 CAT 活性及酶蛋白溶液光谱特性的影响

核黄素照光时产生单线态氧 1O_2 和超氧阴离子自由基 O_2^- , 其反应过程是



核黄素 50 μmol/L 和 150 μmol/L 与 CAT 25 μg 照光 15min, 使 CAT 的残余活性分别为未处理酶活的 83% 及 77%。照光 25min, CAT

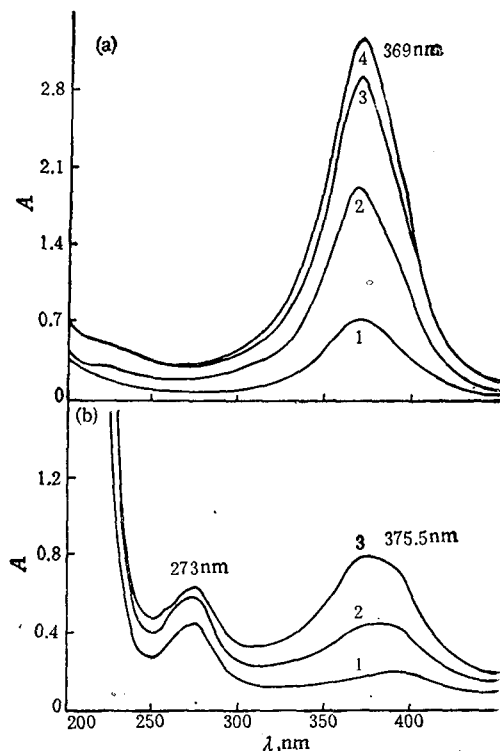


图2 血卟啉与过氧化氢酶光敏反应的吸收光谱

Fig. 2 The absorption spectra of photo-sensitive reaction by hematoporphyrin and catalase

CAT 50 μg, 照光 20min, 血卟啉浓度为: 1—37.5 μmol/L; 2—75 μmol/L; 3—150 μmol/L; 4—375 μmol/L

Illumination for 20min, catalase 50 μg. The concentrations of hematoporphyrin were 1—37.5 μmol/L, 2—75 μmol/L, 3—150 μmol/L and 4—375 μmol/L

(a) 血卟啉 (HPD); (b) HPD + CAT

残余活性降低到 74% 和 65% (图 4)。可见, 核黄素的光敏化作用导致了对 CAT 的抑制反应。

核黄素在紫外区有二个近乎等高的吸收峰 222nm 和 268nm, 在近紫外区有 375nm 吸收峰。CAT 与光敏化核黄素反应, 使核黄素的吸收光谱发生变化, 紫外区的二个峰漂移到 217—220nm 和 260nm 处, 峰距缩小, 峰值增高, 且两个峰之间的比例改变, 220nm 的吸收明显大于 260nm 的吸收 (图 5)。

紫外吸收差示光谱发现, 照光下 CAT 与核黄素反应的差示峰为 206nm 及 236—240nm。

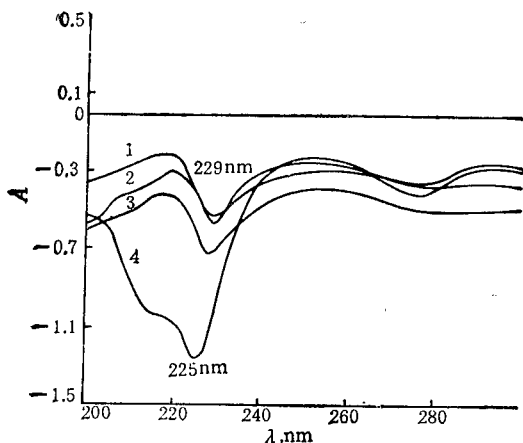


图3 CAT与光敏化血卟啉反应的紫外差示光谱

Fig. 3 Ultraviolet absorption difference spectra of CAT-photosensitive hematoporphyrin

反应条件及浓度同图2

The reaction conditions and concentration as Fig. 2

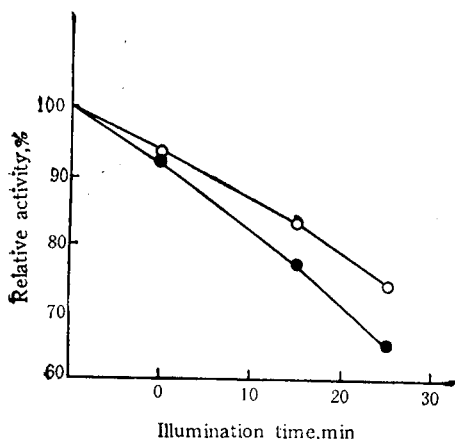


图4 核黄素光敏化作用对过氧化氢酶活性的影响

Fig. 4 The photosensitive effect of riboflavin on the activity of catalase

○—○ 50 $\mu\text{mol/L}$; ●—● 150 $\mu\text{mol/L}$

峰高随核黄素浓度增高而变大, 且后一个峰逐步红移。250 $\mu\text{mol/L}$ 的核黄素对 CAT 的光敏化作用还出现 276nm 负差示峰。说明酶蛋白构象发生了变化。

讨 论

二种光敏化剂血卟啉及核黄素皆降低CAT的催化活性, 并出现紫外差光谱的 229nm (血卟啉) 或 236—240nm (核黄素) 峰, 反映了酶

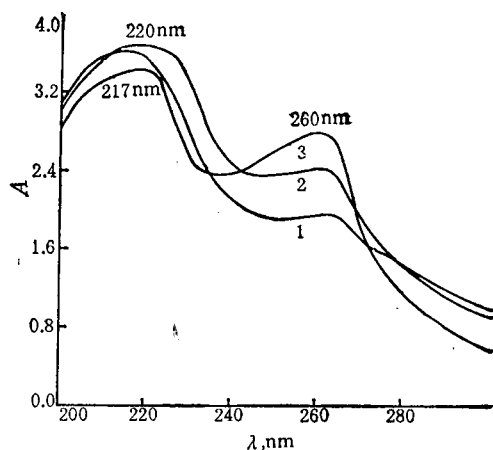


图5 CAT与核黄素光敏化反应的吸收光谱

Fig. 5 Absorption spectra of photosensitive reaction by riboflavin and catalase

1—3, 核黄素浓度分别为 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$

1—3, The concentrations of riboflavin were 25, 50, and 100 $\mu\text{mol/L}$, respectively

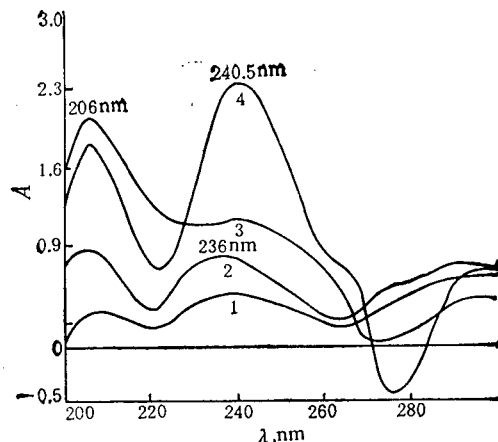


图6 CAT与光敏化核黄素反应的紫外差示吸收光谱

Fig. 6 Ultraviolet absorption difference spectra of catalase-photosensitive riboflavin

1—4, 核黄素分别为 25, 50, 100 和 250 $\mu\text{mol/L}$, 照光 20 min

1—4, Riboflavin concentrations were 25, 50, 100 and 250 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

20 min illumination

活性受抑与构象改变之间的对应关系。近紫外区的差光谱是蛋白质构象变化的指标。蛋白质的变性往往导致 230nm 左右出现吸收峰^[4]。五种氨基酸残基, 即半胱氨酸、组氨酸、蛋氨酸、色氨酸和酪氨酸可受光敏化氧化^[1], 而这些氨基

酸残基是许多种酶的活性部位的必需基团。Uchida 等报道牛血清蛋白受抗坏血酸- Cu^{2+} 系统产生的 O_2^- 氧化可失去组氨酸残基的 60% 和色氨酸残基的 45%^[8]。CAT 与低浓度的抗坏血酸一起保温, 也发现紫外吸收光谱的变化^[9]。因此, 本文中 CAT 受二种光敏化剂作用后在 230nm 左右差示吸收增大与催化活性下降, 可用其活性中心必需氨基酸残基受活性氧作用, 产生一定程度的氧化变性, 改变了酶的构象而加以解释。此外, 核黄素对 CAT 的光氧化反应后差光谱中 206nm 峰的出现, 则可能与肽链的变化有关。因为当蛋白质的 α -螺旋变为无规律的卷曲时, 紫外 190—220nm 的吸收往往显著增大^[10]。

Cheng 等发现纯化的 CAT 在有氧下由其亚铁原卟啉基吸收蓝光而失活^[11], Volk 等指出完整的裸麦叶片经强光与 0℃ 处理, CAT 的光失活包括单一的光化学或自由基反应^[12]。据此, 我们推测光照射下血卟啉和核黄素对 CAT 的影响可能还包括了 CAT 亚铁原卟啉基的自

身光失活, 而外源光敏化剂或 CAT 自身产生的光失活, 其机理都与活性氧自由基对酶的光动力学损伤有关。

参 考 文 献

- 1 Smith K C 著, 沈恂等译. 光生物学. 北京: 科学出版社, 1984; 第 4 章
- 2 马立伟等. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16(6): 430
- 3 周群等. 生物化学与生物物理进展, 1988; 15(1): 42
- 4 Wetlaufer D B. *Adv Protein Chem*, 1962; 17:304
- 5 张维德等. 生物化学与生物物理学报, 1988; 20(6): 568
- 6 赵保路等. 科学通报, 1985; 22: 1743
- 7 方允中等编. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1989: 44—69
- 8 Uchida K *et al. Agric Biol Chem*, 1988; 52(6): 1529
- 9 Orr C W M. *Biochemistry*, 1967; 6: 3000
- 10 陶慰孙等. 蛋白质分子基础. 北京: 人民教育出版社, 1981: 225—251
- 11 Cheng L *et al. Photochem Photobiol*, 1981; 34:125
- 12 Volk S *et al. Plant Cell Environ*, 1989; 12(7): 701

[本文于 1990 年 9 月 20 日收到,
1991 年 1 月 11 日修回]

EFFECT OF PHOTSENSITIVE REACTION ON CATALASE

LIN Zhifang

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

ABSTRACT

Pure catalase from bovine liver was used to study the photosensitive effect by two photosensitizers hematoporphyrin and riboflavin. The change of enzyme protein conformation in solution was determined by ultraviolet absorption difference spectra. The activity of catalase was measured by oxygen electrode.

Catalase activity was inhibited in the presence of light and photosensitizer. The inhibition increased with the increasing concentration of photosensitizer and illumination time. Absorption spectra were shifted and the shape of absorption peak was modified in the catalase-photosensitizer reaction. A negative peak of 229 nm and a 236—240 nm peak in UV difference spectra were observed by the action of hematoporphyrin and riboflavin, respectively.

The results indicate that the activity inhibition of catalase induced by photosensitive oxidation was related to the change of enzyme protein conformation. It is suggested that the photosensitive inactivation of catalase may be due to the photodynamic injury caused by the active oxygen produced from photosensitive reaction.

Key words Catalase, photosensitive reaction, riboflavin, hematoporphyrin, ultraviolet absorption difference spectra