

Pb²⁺、Cd²⁺ 和 Ce³⁺ 对猪胰 α-淀粉酶活性的影响*

洪法水** 王雪峰 沈颂东 苏国兴 潘新法

(苏州大学生物科学系, 苏州 215006)

摘要 分别研究了 Pb²⁺、Cd²⁺ 和 Ce³⁺ 对 Ca (II) α-淀粉酶活性影响及对其 Ca²⁺ 的竞争作用. 结果表明三种金属离子低浓度情况下 (0.5~5 mmol/L) 对 α-淀粉酶具有激活现象, 而较高浓度则抑制酶活力. Pb²⁺、Cd²⁺ 和 Ce³⁺ 竞争置换 α-淀粉酶中 Ca²⁺ 能力的大小是: Pb²⁺ > Cd²⁺ > Ce³⁺, 其抑制酶活作用大小: Pb²⁺ > Cd²⁺ > Ce³⁺.

关键词 α-淀粉酶, 重金属离子, 抑制常数, 竞争结合

学科分类号 Q599

随着环境污染的日益加剧, 重金属离子对生物体的毒害作用越来越受到人们的关注. 究其机理主要表现为破坏生物膜的完整性, 影响细胞超微结构^[1]和各种酶的活性^[2,3], 从而降低其生物学功能, 严重影响生物体新陈代谢和生长发育. 亦有研究表明, 低浓度的重金属离子可保持或促进生物学活性, 但高浓度则表现为抑制^[4~7]. α-淀粉酶 (EC 3.2.1.1) 是一种 Ca²⁺ 依赖性蛋白酶, 二聚体相对分子质量为 48 000, 含有 4~5 个 Ca²⁺. 它催化糖原或淀粉生成糊糖和还原糖, 在生物体内参与糖类物质的利用和能量代谢, 是一种极其重要的酶^[8]. 有研究工作表明, 重金属离子明显降低萌发大豆、玉米和小麦的 α-淀粉酶活性^[9,10], 但低浓度的稀土离子能激活萌发水稻种子的 α-淀粉酶活性^[5,6]. George 等^[11]发现低浓度稀土金属离子对 Ca (II) α-淀粉酶有激活作用, 高浓度时, 对脱钙 α-淀粉酶有抑制作用. 为进一步揭示重金属及稀土金属离子对 α-淀粉酶活性影响的作用, 本文报道 Pb²⁺、Cd²⁺ 和 Ce³⁺ 研究对 Ca (II) α-淀粉酶的活性影响及对 Ca²⁺ 的竞争结合作用.

1 材料与方法

1.1 材料

猪胰 α-淀粉酶 (900 U/mg) 为 Sigma 公司产品, CaCl₂、Pb (CH₃COO)₂、CdCl₂、CeCl₃、麦芽糖、3, 5-二硝基水杨酸和 EDTA 等均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 金属离子溶液的配制: 用双蒸去离子水配制 0~60 mmol/L 的 CaCl₂、CeCl₃、CdCl₂、Pb (AC)₂, 并用 HCl 和 NaOH 调节以上溶液, 使其 pH 均为 6.

1.2.2 天然 α-淀粉酶和脱钙 α-淀粉酶溶液制备: 将已纯化的猪胰 α-淀粉酶溶液溶于 pH 6.9 的 Tris-HCl 缓冲液中, 使其浓度为 5 μmol/L. 将 20 ml, 5 μmol/L 的 α-淀粉酶对 0.02 mol/L Tris-HCl pH 6.9 (内含 5 mmol/L EDTA) 的溶液透析 48 h, 再用双蒸去离子水透析 48 h.

1.2.3 金属离子对 α-淀粉酶和脱钙 α-淀粉酶激活反应: 在 3 ml, 1 μmol/L 的 α-淀粉酶和脱钙 α-淀粉酶溶液中分别加入 5 μl 0~60 μmol/L 的 Ca²⁺、Ce³⁺、Cd²⁺ 和 Pb²⁺, 置于冰箱中作用 24 h 后, 用 3, 5-二硝基水杨酸法测定酶活性^[12].

1.2.4 Pb²⁺、Cd²⁺、Ce³⁺ 与 Ca²⁺ 的竞争结合: 在含有 0.05~1 mmol/L Ca²⁺ 的 α-淀粉酶溶液中分别加入 50 μmol/L 和 60 μmol/L 的 Pb²⁺、Cd²⁺、Ce³⁺, 置于 4℃冰箱中作用 24 h, 酶液一部分用于酶活性测定 (方法同上), 一部分对 0.002 mol/L Tris-HCl pH 6.9 缓冲液透析 48 h 后, 用 ICP-96B 型高频等离子体发生器 (ICP-AES, 美国产) 检测酶液和缓冲液中钙离子含量.

2 结果与分析

2.1 Pb²⁺、Cd²⁺、Ce³⁺ 与 Ca²⁺ 对 α-淀粉酶活性影响

反应介质中, 以不加重金属离子和 Ca²⁺ 作为对照, 分别测定了 Pb²⁺、Cd²⁺、Ce³⁺ 与 Ca²⁺ 对 α-淀粉酶及对脱钙 α-淀粉酶的激活和抑制作用. 对天然 α-淀粉酶, Pb²⁺、Cd²⁺ 和 Ce³⁺ 在 0.5~4 μmol/L 浓度范围内能显著提高酶的活性, 提高幅

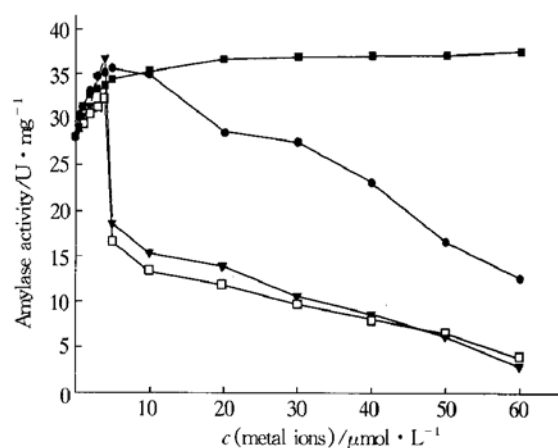
* 苏州大学“211工程”科研基金资助项目 (XQ316011).

** 通讯联系人.

Tel: 0512-5224742, E-mail: hong fsh_cn@sina.com

收稿日期: 2001-04-09, 接受日期: 2001-05-23

度为 2.7%~30.8%。三种金属离子作用程度大小是: $\text{Pb}^{2+} > \text{Ce}^{3+} > \text{Cd}^{2+}$ 。但当浓度超过 4 $\mu\text{mol/L}$ 或 5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 酶活性急剧下降, 表现为明显的抑制作用, 其中 Ce^{3+} 处理的酶活性下降相对比较平缓 (图 1)。三种离子对酶活性抑制程度大小是: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ce}^{3+}$ 。三种金属离子对脱钙 α 淀粉酶的激活与抑制作用所表现的趋势基本一致 (图 2)。 Ce^{3+} 在 0.5~10 $\mu\text{mol/L}$ 范围内可显著恢复酶的活性, 恢复程度几乎 100%, 故在低浓度下, Ce^{3+} 可作为一种超级钙对脱钙 α 淀粉酶起激活作用。 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 在 0.5~4 $\mu\text{mol/L}$ 或 5 $\mu\text{mol/L}$ 范围内亦能部分恢复酶活性, 恢复程度分别为 60.7%、53.6%。三种离子作用程度大小是: $\text{Ce}^{3+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ 。而 Ca^{2+} 在 0~60 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 随浓度增加, 酶活性逐渐提高, 未发现抑制现象。

Fig. 1 Effect of metal ions on α -amylase

■—■: Ca^{2+} ; ●—●: Ce^{3+} ; ▼—▼: Cd^{2+} ; □—□: Pb^{2+} .

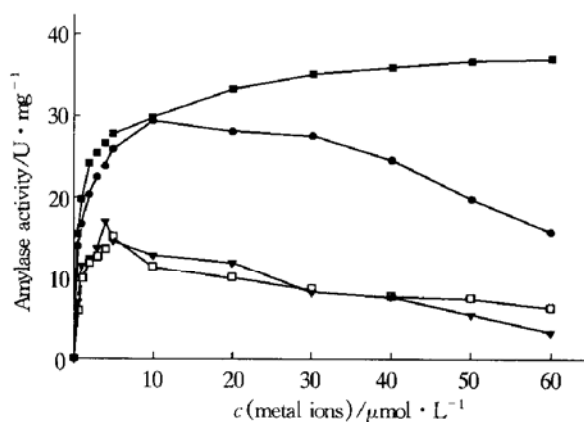


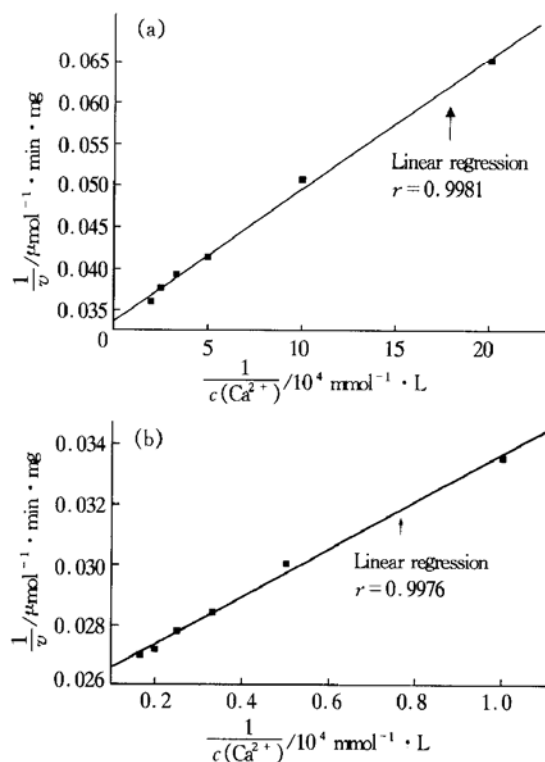
Fig. 2 Effect of metal ions on apoamylase activity

■—■: Ca^{2+} ; ●—●: Ce^{3+} ; ▼—▼: Cd^{2+} ; □—□: Pb^{2+} .

2.2 Ca^{2+} 对脱钙 α -淀粉酶的酶促反应动力学作用

研究了 Ca^{2+} 与脱钙 α -淀粉酶结合及恢复酶活的

动力学。对脱钙 α -淀粉酶激活作用见 Lineweaver-Burk 图 (图 3)。 Ca^{2+} 浓度在 5~100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内与脱钙 α -淀粉酶的结合表现为零级反应, K_d 值为 $1.07 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $V_{\max}$ 为 27.79 $\mu\text{mol/min} \cdot \text{mg}$ 。浓度在 100~500 $\mu\text{mol/L}$ 范围内为一级结合反应, K_d 值为 $6.73 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $V_{\max}$ 为 37.74 $\mu\text{mol/min} \cdot \text{mg}$ 。随着 Ca^{2+} 浓度增大, 酶活迅速恢复渐趋于最大值, 这与前述结果一致。在 Ca^{2+} 浓度较低范围内与脱钙 α -淀粉酶表现出较高亲和力 ($K_d = 1.07 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$), 酶活上升趋势较快; 浓度较高时, 亲和力有所下降 ($6.73 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$), 酶活上升趋势缓慢。该现象可能因 α -淀粉酶上存在 4~5 个结合位点, 当有 Ca^{2+} 与其结合后引起构象变化, 导致其他 Ca^{2+} 到达特定部位与其结合较为困难。

Fig. 3 The lineweaver-Burk figure of Ca^{2+} on amylase

(a) $c(\text{Ca}^{2+})$: 5~100 $\mu\text{mol/L}$. $V_{\max} = 27.79 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$; $K_d = 1.07 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; (b) $c(\text{Ca}^{2+})$: 100~500 $\mu\text{mol/L}$. $V_{\max} = 37.74 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$; $K_d = 6.73 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

2.3 Ce^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 对 Ca^{2+} 的竞争作用

Ce^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 具有对 α -淀粉酶活性显著抑制作用, 见 Lineweaver-Burk 图 (图 4)。三种金属离子抑制常数随浓度增大而增大, 相同浓度情况下: $\text{Ce}^{3+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ 。表明三种金属离子对 α -淀粉酶中的 Ca^{2+} 竞争结合能力大小为: $\text{Pb}^{2+} >$

$\text{Cd}^{2+} > \text{Ce}^{3+}$. 这就揭示了前述三种金属离子对酶活性抑制程度大小是: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ce}^{3+}$ 的原因. 实验中重金属离子与 α 淀粉酶作用后, 测得 Ca^{2+} 含量几乎接近于 0 (表 1), 表明重金属离子能完全置换 α 淀粉酶中的 Ca^{2+} .

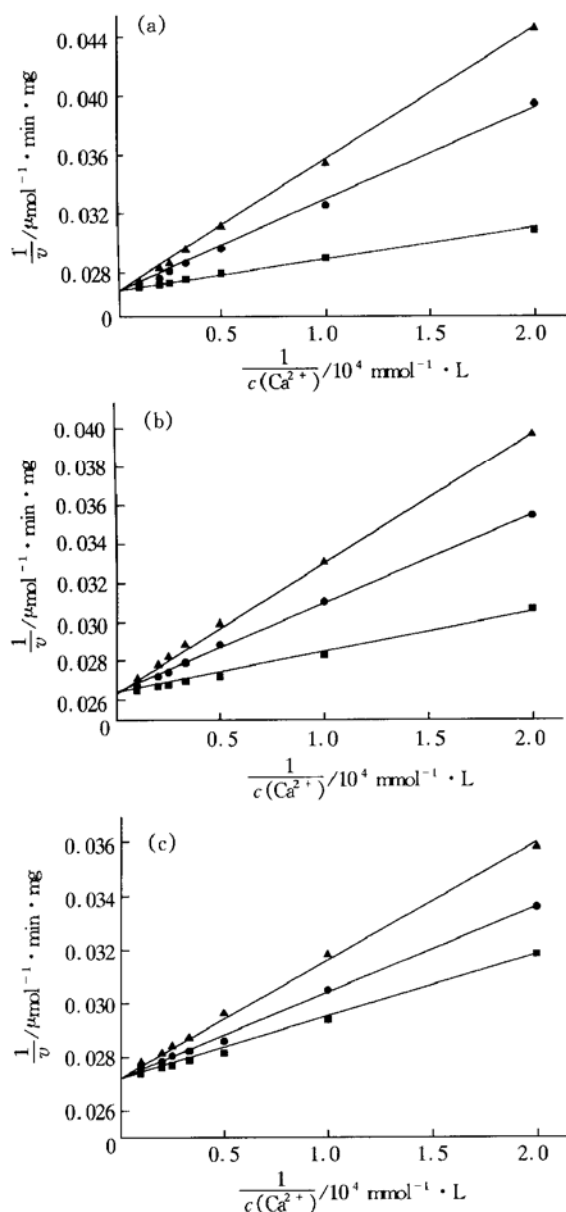


Fig. 4 The Lineweaver-Burk figure about the inhibition of Ce^{3+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} to Ca^{2+}

- (a) Inhibition of Ce^{3+} to Ca^{2+} . $V_{\max} = 36.76 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$; $K_0 = 1.13 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; $K_{50} = 3.78 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; $K_{60} = 5.67 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$;
 (b) Inhibition of Cd^{2+} to Ca^{2+} . $V_{\max} = 37.61 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$; $K_0 = 1.29 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; $K_{50} = 2.82 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; $K_{60} = 4.37 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$;
 (c) Inhibition of Pb^{2+} to Ca^{2+} . $V_{\max} = 36.61 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$; $K_0 = 9.71 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$; $K_{50} = 1.43 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; $K_{60} = 2.06 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$. Δ — Δ : $60 \mu\text{mol/L}$; $\bullet$ — $\bullet$: $50 \mu\text{mol/L}$; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: $0 \mu\text{mol/L}$.

Table 1 Ca^{2+} contents after interaction of heavy ions with α -amylase

$c(\text{heavy ions}) / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		$c(\text{Ca}^{2+}) / c(\alpha\text{-amylase})$
control		4.85
Ce^{3+}	50	0.03
	60	0.02
Cd^{2+}	50	0.05
	60	0.04
Pb^{2+}	50	0.06
	60	0.04

3 讨 论

金属酶蛋白须依赖于金属离子与其特定氨基酸残基结合, 使构象发生变化, 暴露活性部位 (疏水区), 以便和底物结合发生催化作用. Ce^{3+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 在低浓度下能提高或激活 α 淀粉酶, 可能是由于其进入酶中 Ca^{2+} 的结合区域维持了酶活性中心构象; 而在高浓度下抑制酶活性是因其与酶蛋白具有较高的亲和力, 可同时在钙离子结合位点以外的氨基酸残基上结合, 使酶在构象上紧缩, 封闭了疏水的活性部位所致. 三种金属离子与酶的亲和能力大小是: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ce}^{3+}$, 故而对酶抑制作用是: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ce}^{3+}$.

构成蛋白质的 20 种氨基酸的金属配合物稳定常数存在着差异. 在重金属离子浓度较高环境下, 某些生物体仍然保持良好的生长发育, 部分原因可能与其体内酶蛋白一级结构上氨基酸残基种类发生变化从而降低其与重金属离子亲和性, 保持酶活性必需构象有关. 探讨重金属离子对酶活性的影响, 以此为基础对于研究该环境下的酶结构和利用基因工程的手段对一些重要的酶进行改造以适应极端环境具有重要意义.

参 考 文 献

- 李大辉, 施国兴. Cd^{2+} 或 Hg^{2+} 水污染对菱体细胞的细胞核及叶绿体超微结构影响. 植物资源与环境, 1999, 8 (2): 43~48
- Li D H, Shi G X. Plant Resources and Environment, 1999, 8 (2): 43~48
- 栗淑媛, 赵升皓. 重金属离子对猪红细胞 Ca^{2+} -ATP 酶的影响. 生物化学杂志, 1988, 4 (3): 210~216
- Li S Y, Zhao S H. J Chin Biochem, 1988, 4 (3): 210~216
- 李新民, 倪嘉缙, 王平原, 等. 稀土对肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶活性的影响. 生物化学杂志, 1995, 11 (3): 281~285

- Li X M, Ni J Z, Wang P Y, *et al.* J Chin Biochem, 1995, **11** (3): 281~ 285
- 4 杨顶田, 施国兴. Cr^{6+} 对水的叶绿素含量和几种酶活性的影响. 南京师范大学学报, 1999, **22** (2): 92~ 96
Yang D T, Shi G X. J Nangjing Normal University, 1999, **22** (2): 92~ 96
 - 5 洪法水, 方能虎, 赵贵文, 等. 锌元素对萌发水稻种子代谢酶活性的影响. 稀土, 1999, **20** (3): 45~ 47
Hong F S, Fang N H, Zhao G W, *et al.* Chinese Rare Earths, 1999, **20** (3): 45~ 47
 - 6 洪法水, 方能虎, 赵贵文, 等. 铜提高水稻种子活力的生理生化基础研究. 西北植物学报, 1999, **19** (4): 585~ 591
Hong F S, Fang N H, Zhou G W, *et al.* Acta Bot Boreal-Occident Sin, 1999, **19** (4): 585~ 591
 - 7 陈莹, 曹心德. 铜及其配合物对鱼体肝脏中酶活性的影响. 环境化学, 2000, **19** (1): 37~ 41
Cheng Y, Cao X D. Environment Chemistry, 2000, **19** (1): 37~ 41
 - 8 倪嘉缙. 稀土生物无机化学. 北京: 科学出版社, 1995. 197~ 212
 - Li J Z. Rare Earth Bioinorganic Chemistry. Beijing: Science Press, 1995. 197~ 212
 - 9 马成仓, 洪法水, 李清芳, 等. Hg 浸种对玉米种子萌发过程中几种酶活性的影响. 应用生态学报, 1997, **8** (1): 110~ 112
Ma C C, Hong F S, Li Q F, *et al.* Chin J Applied Ecology, 1997, **8** (1): 110~ 112
 - 10 马成仓, 洪法水. 汞对小麦种子萌发和幼苗生长作用机制初探. 植物生态学报, 1998, **22** (4): 373~ 378
Ma C C, Hong F S. Acta Phytocologica Sinica, 1998, **22** (4): 373~ 378
 - 11 George E, Edward R B, Dennis W D. Rare earth metal ions as substitutes for the calcium ion in bacillus subtilis α -amylase. Biochemistry, 1971, **10** (24): 4556~ 4561
 - 12 北京师范大学生物系生物化学教研室. 基础生物化学实验. 北京: 高等教育出版社. 1987. 162~ 165
Biochemistry Teaching and Research Group of Biology Department in Beijing Normal University. Experiment of Basic Biochemistry. Beijing: High Education Press. 1987. 162~ 165

Effects of Metal Ions Ce^{3+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} on The Activity of α -Amylase from Porcine Pancreas^{*}

HONG Fa-Shui^{**}, WANG Xue-Feng, SHEN Song-Dong, SU Guo-Xing, PAN Xin-Fa

(Department of Biology Science, Suzhou University, Suzhou 215006, China)

Abstract Ce^{3+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} could influence the activity of amylase from porcine pancreas and competitively replace Ca^{2+} from amylase. The results showed that the activity of amylase was enhanced under the treatment of Ce^{3+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} respectively at low concentration, but inhibited at the high concentration. Both replacement and inhibition showed that the action was in the order: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ce}^{3+}$.

Key words α -amylase, heavy metal ions, inhibition constant, competitively combine

^{*} This work was supported by grants from the Research Foundation of Suzhou University "211 Project" (XQ316011).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-512-5224742, E-mail: hong_fsh_cn@sina.com

Received: April 9, 2001 Accepted: May 23, 2001