

研究简报

重金属对扁玉螺金属酶类的影响

EFFECTS OF HEAVY METALS ON CYTOCHROME OXIDASE AND CATALASE FROM *NEVERITA DIYMA*

宁黔冀 杨洪* 任虹

(烟台大学生物化学系, 264005)

(烟台大学应用化学系, 264005)*

NING Qian-Ji, YANG Hong*, REN Hong

(Department of Biochemistry, Yantai University, 264005)

(Department of Applied Chemistry, Yantai University, 264005)*

关键词 扁玉螺, 细胞色素氧化酶, 过氧化氢酶, 重金属

KEYWORDS *Neverita diyma*, cytochrome oxidase, catalase, heavy metal

中图分类号 Q58

海水中的重金属离子浓度虽然很低,但对海洋生物的影响却是深远的,有些重金属(必需金属)在生物代谢活动中扮演着不可缺少的角色,但超过一定的浓度,无论是必需金属还是非必需金属,都会对生物产生毒害作用。研究资料表明,进入体内的重金属主要通过积累达到解毒,排出则是次要的[雷恩鲍 1992]。细胞色素氧化酶(Cytochrome oxidase,简称CCO)及过氧化氢酶(Catalase,简称Cat)是生物体内含Fe卟啉环的金属酶类,在环境监测、生态毒理学等方面已成为重要指标[Trofimov 1975,徐炜虹等 1996]。有关重金属对海洋无脊椎动物CCO、Cat活性影响的报道很少。本文以扁玉螺为试验材料,研究了离体条件下,Fe、Cu、Zn等必需微量元素和非必需元素Pb对两种金属酶类的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

扁玉螺采自山东省烟台芝罘湾,螺体重为15~20克,采回后在海水中暂养12~14小时。

1.2 试剂

细胞色素 C 为山东莱阳生化制药厂产品,考马斯亮蓝 G-250 为 Fluka 产品,脱氧胆酸钠为 Sevra 产品,牛血清蛋白为中国医学科学院血酶所科技公司产品,组氨酸为第二军医大学政翔化学试剂研究室产品。其余化学试剂均为国产分析纯。

1.3 酶源制备

(1)CCO 的制备 取肝脏加 0.25mol/L 蔗糖溶液,匀浆,以 2000r/min 离心 10min,取上清液,在 4℃ 8000r/min 离心 15min,得到的沉淀即为线粒体。向线粒体沉淀中加入 TSH(Tris-HCl:0.25mol/L,pH 8.0+蔗糖:0.66mol/L+His:1mmol/L)制成悬浮液,使蛋白质浓度为 10.0mg/mL,向悬浮液中加入 10% (W/V)脱氧胆酸钠(0.3mg/mg 蛋白质)和固体 NaCl(7.2g/100mL),振荡 10min,以 15000r/min 离心 20min,弃去红色的上清液,绿色的沉淀即为细胞色素氧化酶粗制品。整个操作过程在 0~4℃ 进行(下同)。

(2)Cat 的制备 取肝脏,称重,加入约 4 倍体积的 0.067mol/L,pH 8.67 的磷酸盐缓冲液,匀浆,在 4000r/min 离心 10min,取上清液作为酶源备用。

1.4 酶活性的测定

(1)CCO 参照 Wharton 等的方法[Wharton 和 Tzayoloff 1967]。CCO 的活力用一级反应速率常数表示。

$$K = \ln \Delta A_{550} \text{min}^{-1} \quad \text{一个酶活力单位为 } 100K$$

(2)Cat 采用 KMnO_4 法[Bergmeyer 1963,石双群等 1995]。

1.5 重金属含量的测定

取扁玉螺肝脏,称重,湿法硝化,用 Shimadzu AA-670 原子吸收分光光度计测定样品中的 Fe、Cu、Zn 和 Pb。

1.6 蛋白质含量的测定

采用 Bradford 法[Bradford 1976]。

2 结果与分析

2.1 pH 对酶活力的影响

在温度 30℃,蛋白质含量 0.10mg 条件下,CCO 活力在 pH = 7.0 处最大,为 148.0U/mg 蛋白质。在室温 25℃,蛋白质含量 1.05mg 时,Cat 的最适 pH 高于 CCO,为 8.67 (见图 1)。

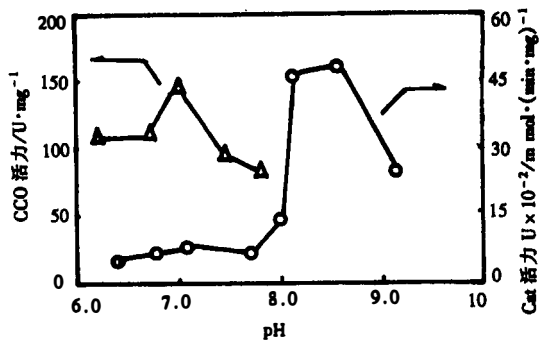


图1 pH 对 CCO 及 Cat 酶活力的影响

Fig. 1 Effect of pH on cytochrome oxidase and catalase activity

2.2 重金属离子对 CCO、Cat 活力的影响

原子吸收光谱分析结果表明,扁玉螺肝脏中 Fe 的含量最高,Cu 和 Zn 次之,Pb 的含量远低于上述离子,结果见表1。

表1 扁玉螺肝脏中重金属的含量

Tab.1 Concentration of heavy metals in hepatopancreas of *Neverita diyma*

金属	Fe	Cu	Zn	Pb
含量($\mu\text{g/g}$,干重)	349	108	121	4.94

2.2.1 Fe^{3+} 对酶活力的影响

FeCl_3 浓度在 $5.88 \times 10^{-5} \sim 2.94 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 范围内对 CCO 具有较明显的激活作用,且浓度在 $2.55 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 处激活作用最大,相对活性为 112.5; 大于 $2.94 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 对 CCO 具有抑制作用。对 Cat 也有类似的作用,但有效激活范围在 $1.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$, 且最大激活浓度在 5.0×10^{-3} 处,具体结果见图2。

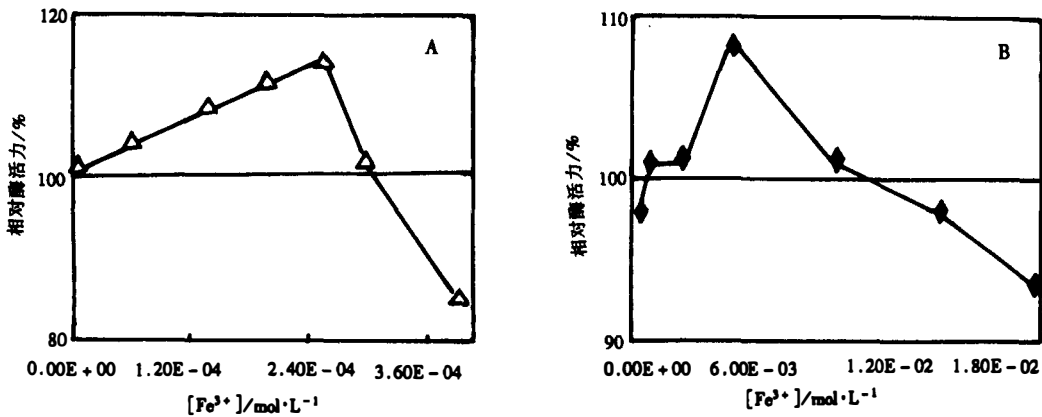


图2 $[\text{Fe}^{3+}]$ 对 CCO(A) 及 Cat(B) 酶活力的影响

Fig. 2 Effect of $[\text{Fe}^{3+}]$ on cytochrome oxidase(A) and catalase(B) activity

2.2.2 Cu^{2+} 对酶活力的影响

Cu^{2+} 浓度在 $9.80 \times 10^{-6} \sim 6.86 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内对 CCO 具有较大的激活作用,且浓度在 $1.96 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时 Cu^{2+} 激活作用最大,相对活性为 111.8; 大于 $7.84 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 对 CCO 具有抑制作用。 $[\text{Cu}^{2+}]$ 大于 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 对 Cat 的抑制作用显著,低于此浓度,则表现出微弱的激活作用(见图3)。

2.2.3 Zn^{2+} 对酶活力的影响

Zn^{2+} 对 CCO 具有显著抑制作用,即使在低浓度 ($1.96 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$) 下也是如此。而且抑制作用随浓度增大而显著增强。对于 Cat, Zn^{2+} 的作用与 Cu^{2+} 相似,只是有效激活浓度在 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 以下(见图4)。

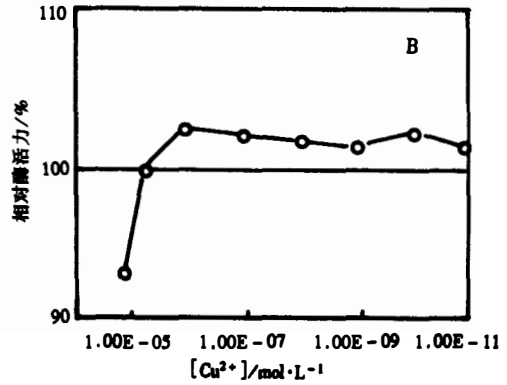
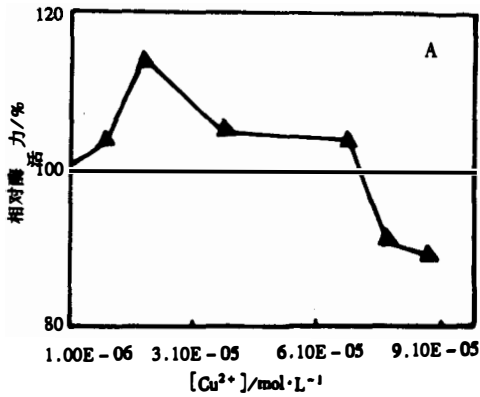


图3 [Cu²⁺]对 CCO(A)及 Cat(B)酶活力的影响

Fig. 3 Effect [Cu²⁺] on cytochrome oxidase(A) and catalase(B) activity

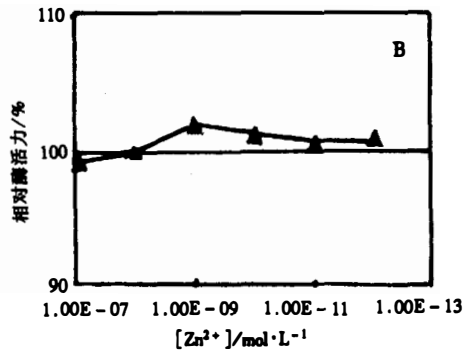
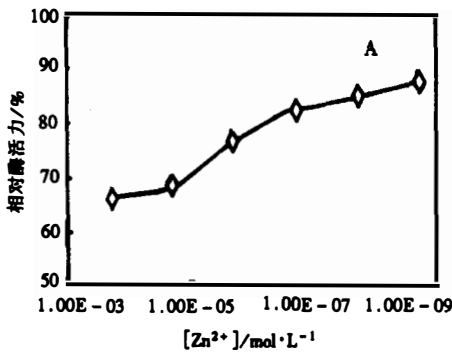


图4 [Zn²⁺]对 CCO(A)及 Cat(B)酶活力的影响

Fig. 4 Effect of [Zn²⁺] on cytochrome oxidase(A) and catalase(B) activity

2.2.4 Pb²⁺对 Cat 活力的影响

[Pb²⁺]在 $5.0 \times 10^{-10} \sim 5.0 \times 10^{-7}$ mol/L 之间对 Cat 有非常微弱的激活作用,在此浓度范围之外,则表现为抑制作用(见图5)。

3 结论

(1)扁玉螺对 Fe 有较强的积累能力,对其它重金属也有不同程度的积累。

(2)在离体条件下,低浓度的 Fe、Cu 对 CCO 及 Cat 具有激活作用,而在高浓度下则起抑制作用。即使在浓度很低的条件下,Zn 能显

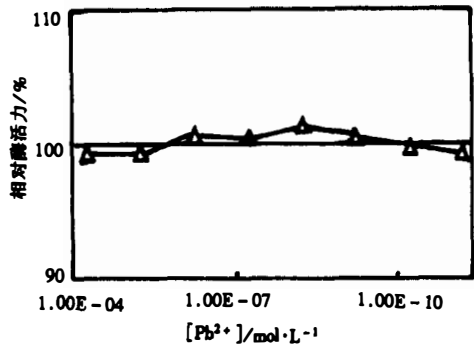


图5 [Pb²⁺]对 Cat 酶活力的影响

Fig. 5 Effect of [Pb²⁺] on catalase activity

著抑制 CCO; 在一定浓度范围内, Zn 和 Pb 对 Cat 有微弱的激活作用。

参 考 文 献

- 石双群, 陈惠兰, 宋秀芹等. 1995. 某些金属离子对过氧化氢稳定性和过氧化氢酶活性的影响. 河北师范大学学报, 19(3), 56~59
- 徐伟虹, 杨齐衡, 路英华等. 1996. 蚯蚓过氧化氢酶的纯化性质. 华东师范大学学报, 4: 95~101
- 雷恩鲍(Rainbow P S). 1992. 海洋生物对重金属的积累及意义. 海洋环境科学, 11(1): 44~52
- Bergmeyer H V. 1963. Methods of Enzymatic Analysis. New York: Academic Press. 273~286
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 74: 248~254
- Trofimov S B. 1975. Some unusual physiological characteristics of diapause in *Neodipriom sertifer*. Ekologiya, 5: 85~88
- Wharton D C, Tzayoloff A. 1967. Methods in Enzymology. Volume X. New York: Academic Press. 245~250

欢迎订阅《农村养殖技术》

由农业部科技教育司、农业部渔业局、全国畜牧兽医总站、中国农业科学院、中国畜牧兽医学会、中国水产学会、中国家禽业协会、中国饲料工业协会、中国动物保健品协会、中国养猪行业协会等主管农村养殖业的有关单位和协会联合组织编辑出版的全国唯一宣传普及先进实用综合养殖技术的科普性杂志。

主要栏目为家畜养殖、家禽养殖、特种养殖、养殖门诊、饲料技术、养殖机械、致富案例、市场商情。主要读者对象为广大农民、养殖专业户、养殖企业和养殖科技推广工作者。全国妇联、农业部“双学双比”活动、“千万农家女百项新技术推广培训计划”推荐的优秀科技专业读物。

国内统一刊号: CN11-1021/S; 国际标准刊号: ISSN1007-0869。标准16开本, 月刊, 52页, 彩色四封, 四页彩色插页; 定价: 每月2.50元, 全年30.00元; 邮发代号: 82-742, 各地邮电局(所)均可订阅。错过订期者可直接汇款到编辑部邮购, 每册加收0.5元邮资, 并注明订阅年份、期数、册数。

通讯地址: 北京农展馆南里11号农业部内《农村养殖技术》杂志社, 邮编: 100026; 联系电话(010) 64191695, 64191697。