

半乳糖氧化酶的生物电化学特性

贾能勤, 朱燕, 江丽萍, 吴霞琴, 章宗穰

(上海师范大学生命与环境学院, 上海 200234)

摘要: 采用循环伏安法对半乳糖氧化酶(GAO)进行了生物电化学特性的研究. 实验结果表明, 由于半乳糖氧化酶的酶活性中心深埋在酶内部, 所以该酶在铂电极上的直接电化学行为较难观察到, 而二茂铁甲醇作为介体能明显地改善酶活性中心的电子传递, 加快电子传递速率. 且测定了半乳糖氧化酶与二茂铁甲醇之间的反应速度常数 K_s 为 $1.2 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

关键词: 半乳糖氧化酶; 二茂铁甲醇; 循环伏安法

中图分类号: O646 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2002)04-0038-04

0 引言

测定半乳糖含量在发酵工业、食品工业和医疗诊断等方面具有重要意义. 尤其血液中的半乳糖的测定, 对于新生儿半乳糖血症的早期诊断具有重要作用^[1,2]. 半乳糖氧化酶(EC1.3.3.9, 分子量为68KD)是由一条含639个氨基酸基团的单聚肽链组成、以铜原子为活性中心的酶. 目前大多采用半乳糖氧化酶催化氧化半乳糖来测定样品中半乳糖的含量, 但所用方法较复杂且成本较高. 所以有必要对半乳糖氧化酶的特性进行研究, 以期开发出测试简便、快速的半乳糖生物传感器.

有报道已采用电子顺磁共振(EPR), X-射线吸收光谱(XAS), 圆二色谱(CD)等^[3,4]方法对半乳糖氧化酶生化特性(如氧化还原机理)进行了研究, 但对其生物电化学特性表征还少有报道. 本文利用电化学方法考察了半乳糖氧化酶的直接电化学特性及加入介体后对其活性中心的电子传递的促进作用.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

PARC273型 Potentiostat/Galvanostat 电化学测量系统(EG&G 公司), 1mm 的微铂盘工作电极(中科院上海冶金所), $5 \times 6 \text{ mm}^2$ 铂片为对电极, 饱和甘汞电极(SCE)为参比电极(上海电光器材厂).

收稿日期: 2001-10-20

基金项目: 上海市教委发展基金(CL9709)和上海师范大学科研基金资助项目(DQ08)

作者简介: 贾能勤(1970-), 男, 上海师范大学生命与环境科学学院讲师

半乳糖氧化酶(Sigma公司,16,000U/g),二茂铁甲醇(分析纯,Aldrich Chem Co).其他试剂均为分析纯.所用支持电解质为磷酸缓冲溶液,用二次蒸馏水配制.

1.2 实验方法

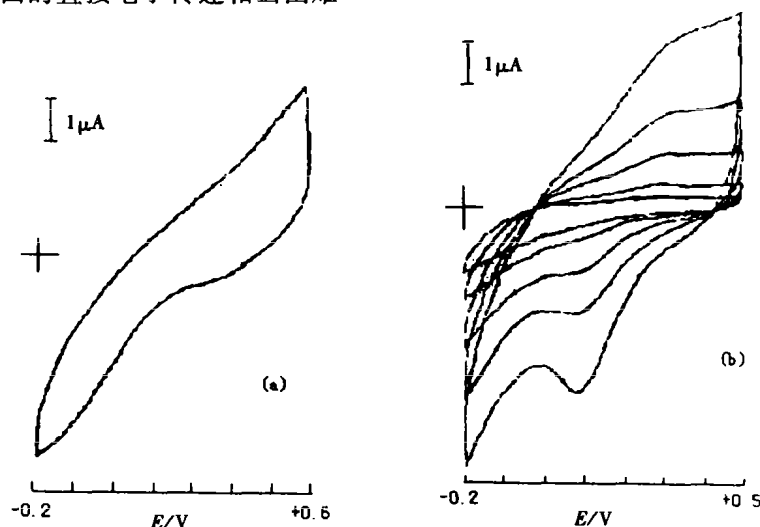
将微铂盘工作电极实验前先用丙酮及二次水清洗,再在0.3mol/L HNO₃溶液中以100mV/s的速度在-0.2~+1.4V范围内循环扫描,使电极活化,直至循环扫描曲线重合.

称取适量的半乳糖氧化酶溶于5mL磷酸缓冲液中配制成1mg/mL的酶溶液.在恒温25℃下,采用三电极体系,在-0.2~+0.5V(vs SCE)范围内进行循环伏安扫描,测定其循环伏安行为.

2 结果与讨论

2.1 半乳糖氧化酶的直接电化学行为

图1是用微铂盘电极在1mg/mL半乳糖氧化酶的磷酸溶液中测得的循环伏安图.从图1a上可看出,电极未进行阴极化处理,则观察不到氧化还原峰.而电极阴极化后再进行循环伏安扫描,可以看到随着扫描速度的增加,氧化峰、还原峰出现且峰电流增大,如图1b所示.这是由于阴极极化活化了电极及反应物.但氧化还原峰电位差大于150mV,仍属于不可逆电化学反应.由此可见,由于半乳糖氧化酶的分子结构复杂,酶活性中心铜离子和吡咯并喹啉苯醌(PQQ)络合物^[5]深埋在酶里面,使其在电极表面的直接电子传递相当困难.

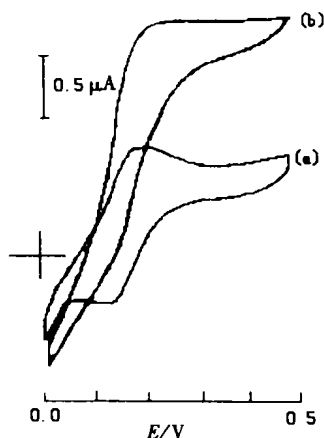


(a) 无阴极化,扫描速度100mV/s; (b) 阴极化,扫描速度从内到外依次为5,10,20,50,100mV/s.

图1 微铂盘电极在1mg/mL半乳糖氧化酶磷酸溶液中测定的循环伏安图.

2.2 二茂铁甲醇作为介体的半乳糖氧化酶的生物电化学行为

半乳糖氧化酶的氧化还原电子传递中心不在酶分子表面,因而直接电子传递相当困难.以二茂铁及其衍生物作为介体来参与电子传递的研究已有许多,但二茂铁衍生物作为介体用于半乳糖氧化酶电子传递的研究少有报道.图2是微铂盘电极在0.1mol/L半乳糖磷酸溶液中测定的二茂铁甲醇的循环伏安图,从图2中可看出,把二茂铁甲醇加入到半乳糖磷酸缓冲液中得到一可逆的二茂铁峰形.而当再半乳糖氧化酶加入到溶液中得到一明显的催化氧化峰.表明当把半乳糖氧化酶加入到该溶液中改变了二茂铁甲醇在微铂盘电极上可逆的能斯特行为.酶催化作用下引起了氧化电流的增加和还原电流的降低.这一现象表明在氧化电位下产生的二茂铁离子与酶发生了催化氧化还原反应.即二茂铁甲醇参与了半乳糖氧化酶的电子传递.



(a)未加入半乳糖氧化酶;
(b)加入0.05mg/mL半乳糖氧化酶;
扫描速度:10mV/s.
图2 微铂盘电极在0.1mol/L半乳糖磷酸溶液中测定的二茂铁甲醇循环伏安图

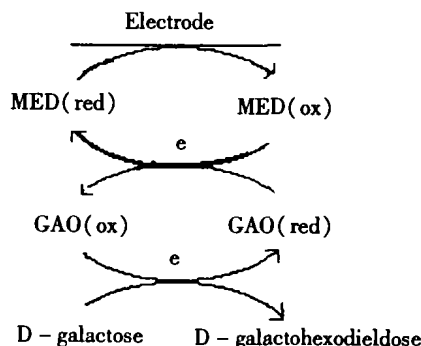
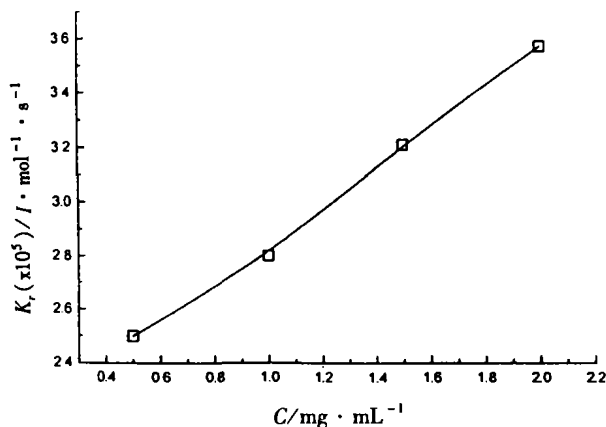


图3 半乳糖氧化酶与二茂铁甲醇的作用机理

2.3 酶与介体作用机理及反应常数的测定

这一催化反应可用静态电极伏安理论来得以解释^[6].半乳糖氧化酶与二茂铁甲醇的作用机理如图3所示.

反应模型为: $M(\text{red}) - e \rightleftharpoons M(\text{ox}), \text{GAO} + M(\text{ox}) \xrightarrow{k_f} M(\text{red})$. $M(\text{red})$ 和 $M(\text{ox})$ 分别是还原性介体和氧化型介体,GAO指还原性半乳糖氧化酶. $k_f (=k[\text{GAO}])$ 是假想一级反应速度常数.如果实验得到的参数 $I_k/I_0 = (k_f/a)^{1/2}$,其中 I_k 为酶存在下的动力学控制电流, I_0 为酶不存在下的扩散控制电流.那么就可得到每一酶浓度下的 k_f/a 值($a = nFv/RT$, v 是扫描速度 $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$).在酶浓度一定的情况下, k_f/a 对 $1/v$ 是一条直线,斜率为 RTk_f/nF . k_f 与酶浓度之间的关系也是一直线,斜率为二茂铁甲醇与酶之间二级均相速度常数 k_s .在本实验中作者就是采用上述方法来求得半乳糖氧化酶与二茂铁甲醇的反应速度常数.



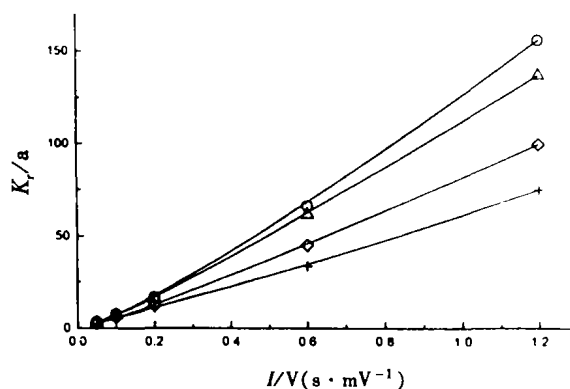
扫描速度:20mV/s

图4 速率常数 k_f 与半乳糖氧化酶浓度 C 的关系.

由图4所示,二茂铁甲醇和半乳糖氧化酶之间的准一级速度常数 k_f 与半乳糖氧化酶浓度之间呈直线关系.从图5上看出,在一系列半乳糖氧化酶浓度下动力学参数 k_f/a 与扫描速度 $1/v$ 呈线性

关系.

由上实验结果中,可以计算得到半乳糖氧化酶与二茂铁甲醇之间的反应速度常数 K_s 为 $1.2 \times 10^5 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,与文献值相近^[6].该反应速度常数表明二茂铁甲醇与酶之间催化反应速度快,可作为半乳糖氧化酶反应相匹配的介质.因此可应用于半乳糖生物传感器研制,且进行半乳糖含量的测定.



(○)0.55mg/mL; (◇)0.35mg/mL; (□)0.15mg/mL; (+)0.05 mg/mL

图5在不同酶浓度下动力学参数 k_t/a 与扫描速度的倒数 $1/v$ 的关系.

参考文献:

- [1] ERNEST BEUTLER. Galactosemia; Screening and Giagnosis[J]. Clin. Biochem, 1991, 24: 293.
- [2] 陈瑞冠,陈蕙英,石村中,等. 新生儿三种代谢病筛查[J]. 上海医学, 1988, 6(6): 344.
- [3] WHITTAKER MEI M, WHITTAKER JAMES W. The active site of galactose oxidase[J]. J Biol Chem, 1988, 263(13): 6074.
- [4] NOBUTOSYHI ITO, PHILLIPS SIMON E V, CONRAD STEVENS, et al. Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase[J]. Nature, 1991, 350: 87.
- [5] VAN DER MEER R A, JONGEJAN J A, DUINE J A. Pyrroloquinoline quinone as cofactor in galactose oxidase[J]. J Biol Chem, 1989, 264: 7792.
- [6] JONATHAN M DICKS, WILLIAM J ASTON, GRAHAM DAVIS, et al. Mediated amperometric biosensors for D-galactose, glycolate, and L-amino acids based on a ferrocene-modified carbon paste electrode[J]. Anal chim acta, 1986, 182: 103.

Bioelectrochemical Characterization of Galactose Oxidase(GAO)

JIA Neng-qin, ZHU Yan, JIANG Li-ping, WU Xia-qin, ZHANG Zong-rang
(College of Life and Environment Science, Shanghai Teachers University, Shanghai, 200234, China)

Abstract: The bioelectrochemical characterization of Galactose oxidase was studied by cyclic voltammetry. Direct cyclic voltammgram of GAO showed the irreversible behavior on the electrode, which meanted electron transfer was very slow due to the activation center deeping into GAO enzyme. Ferrocene methanol, as a mediator, could speed up the electron transfer from activation center of enzyme to the surface of the electrode. Furthermore, reaction rate constant ($K_s = 1.2 \times 10^5 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) was determined between GAO and Ferrocene methanol.

Key words: Galactose oxidase; Ferrocene methanol; Cyclic voltammetry