

应用红外光谱研究电场对超氧化物歧化酶二级结构的影响

邓一兵¹, 杨体强²

1. 浙江海洋学院海洋科学学院, 浙江 舟山 316004
2. 内蒙古大学理工学院, 内蒙古 呼和浩特 010021

摘要 超氧化物歧化酶经不同强度的电场处理, 利用红外光谱法研究电场对超氧化物歧化酶二级结构的影响。结果表明, 经不同电场强度处理的超氧化物歧化酶(SOD), 其二级结构单元百分含量有不同程度的变化。 α -螺旋和 β -折叠结构单元在电场处理后, 均为减少; β 转角结构单元均为增加; 无规卷曲结构单元除 $4.0 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电场处理条件减少外, 其余电场处理条件均为增加。电场处理具有使超氧化物歧化酶的 α -螺旋、 β -折叠向 β 转角和无规卷曲结构转化的作用, 且不同电场条件下其转化情况不同。研究结果还表明, 电场的作​​用使 SOD 活性发生改变, SOD 活性变化与 β -折叠含量变化相关。

关键词 电场; 超氧化物歧化酶; 红外光谱; 二级结构

中图分类号: O657.3, Q683 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)07-1312-04

引言

酶在生命活动过程中, 扮演着极其重要的角色。理论研究表明, 酶蛋白的空间结构对酶的功能至关重要, 即使极其细微的扰乱, 也能够极大地影响酶的活性, 而且酶蛋白质不是刚性分子, 它的功能依赖于结构的这种运动性^[1]。已有研究表明, 电场处理可使酶的活性发生改变, 并提出酶活发生变化的机制可能是电场处理导致酶的静电性质和构象发生改变^[2]。傅里叶变换红外光谱(Infrared spectroscopy)是检测多肽及蛋白质构象的一种实用而灵敏的工具^[3-5]。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase 缩写为 SOD)是一种广泛存在于自然界生物体内具有特定生物催化功能的蛋白质。本文将纯化 SOD 酶置于电场中处理后, 确定电场处理对酶蛋白分子构象的影响, 并与其酶活性的变化进行对比分析。旨在探索电场处理植物种子的宏观生物效应作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

超氧化物歧化酶(SOD)(购自于河北保定生化营养开发中心, 比活力为 $8000 \text{ u} \cdot \text{mg}^{-1}$, u 为酶活力单位)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的电场处理

取适量样品放入电场中。电场由平板电极形成, 极板电

压波形为 50 Hz 半波整流。所用电场强度为: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 和 6.0 $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。对照组记为 $E_0 = 0.0 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。电场处理时间 5 min。

1.2.2 傅里叶变换红外光谱测定

经不同电场强度处理后的 SOD, 干燥保存 12 小时后, 取定量 SOD 与 KBr 按 1:100 均匀混合压片进行测定。红外光谱仪为 Nexus™670 傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet 公司生产)。仪器由干燥净化空气吹扫。波谱范围为 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$, 分辨率 4 cm^{-1} , 经 32 次扫描获得红外图谱。

1.2.3 光谱处理

所测定原始光谱用仪器自带的 OMNIC E. S. P 软件包对酰胺 I 带区($1610 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$)进行基线校正, 二阶导数, 去卷积处理。由二阶导数谱和去卷积谱得到的子峰峰位, 进行二级结构构象指认。根据各子峰的峰位, 利用 Microsoft origin 数学软件对谱图进行高斯曲线拟合。Band width: 16. Enhancement: 2.2。由各子峰面积计算出各构象组分的百分含量。已有研究表明^[6], 对去卷积谱图进行拟合能够更精确地反映其二级结构的含量。本文所给结果为去卷积谱图进行拟合的结果。

1.2.4 SOD 酶活性测定方法

SOD 活性的测定按 Beauchamp^[7]的方法进行。

收稿日期: 2007-02-02, 修订日期: 2007-04-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30260028)资助

作者简介: 邓一兵, 1957 年生, 浙江海洋学院海洋科学学院副教授

e-mail: dyb658@126.com

2 实验结果

2.1 电场对超氧化物歧化酶二级结构的影响

图1(a)为SOD酶酰胺I带的原谱,图1(b~h)为去卷积谱。根据文献报道^[8-11],SOD的酰胺I带的各子峰归属为:

(1 655±4) cm⁻¹峰为 α -螺旋结构;(1 639±2), (1 629±2),

(1 620±2)和(1 691±3) cm⁻¹峰为 β -折叠结构;(1 672±2), (1 667±2), (1 682±2) cm⁻¹峰为 β -转角结构;(1 647±1) cm⁻¹峰为无规卷曲结构。图1(b~h)为SOD酶酰胺I带1 610~1 700 cm⁻¹去卷积谱及其曲线拟合曲线。

根据子峰归属,表1给出不同电场强度处理后的SOD二级结构含量及其活性。

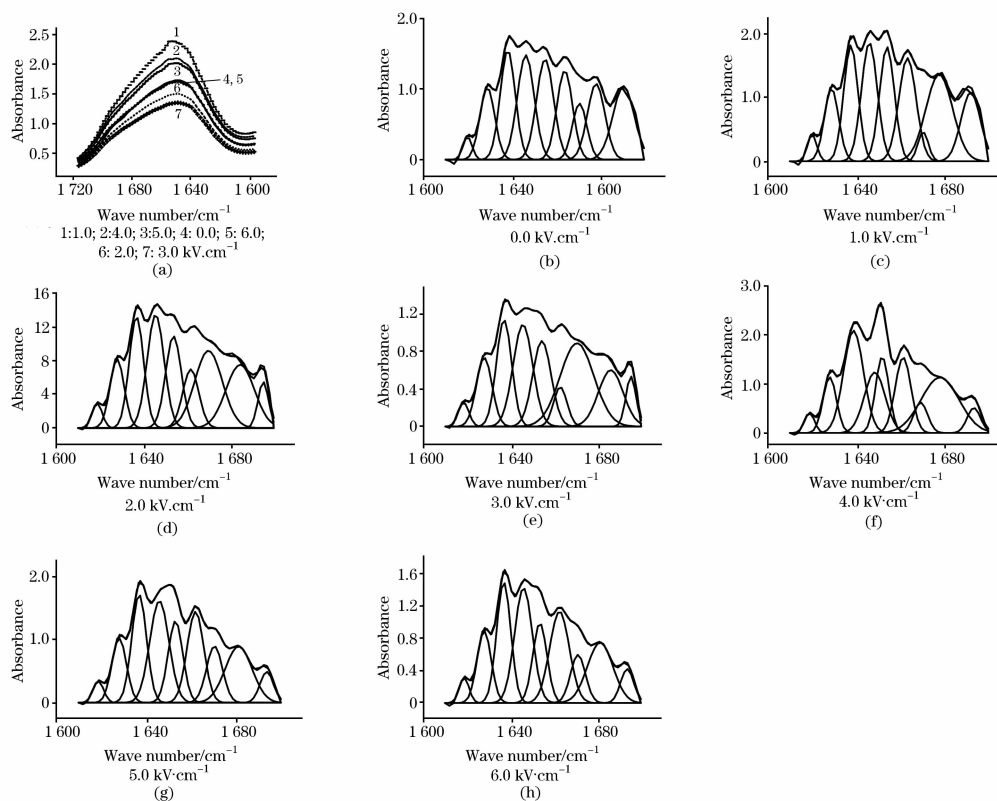


Fig. 1 Original and deconvoluted spectra in the amide I region of SOD

(a): Native spectrum; (b~h): deconvoluted spectra

Table 1 The secondary structure contents and enzymes activity of SOD treated with different intensities of electric field

Electric field /(kV·cm ⁻¹)	Secondary structure relative contents								Enzymes activity	
	α -helix		β -sheet		β -turn		Random coil			
0	15%	%	39%	%	31%	%	15%	%	2 203.1	%
1	14%	-6.6	35%	-10.3	36%	16.1	15%	0.0	2 192.8	-0.5
2	13%	-13.3	29%	-25.6	42%	35.5	17%	13.3	1 442.1	-34.5
3	13%	-13.3	29%	-25.6	40%	29.0	17%	13.3	1 735.7	-21.2
4	11%	-26.6	36%	-7.7	40%	29.0	14%	-6.7	2 006.2	-8.9
5	12%	-20.0	31%	-20.5	38%	22.6	19%	26.7	3 45.0	-84.3
6	11%	-26.6	32%	-17.9	38%	22.6	19%	26.7	767.1	767.14

从表1可知,SOD是折叠含量较多的蛋白,这与已有报道一致^[11,12]。结果表明,经不同电场强度处理SOD酶,其二级结构单元百分含量有不同程度的变化。(1) α -螺旋和 β -折叠结构单元在电场处理后,均为减少;(2) β -转角结构单元均为增加;(3)无规卷曲含量除4.0 kV·cm⁻¹电场处理条件减少外,其余条件均为增加。(4)电场处理具有使超氧化物歧化酶的 α -螺旋、 β -折叠向 β -转角和无轨卷曲结构转化的作用,

并且不同电场条件下其转化情况不同。

2.2 超氧化物歧化酶二级结构与活性变化关系

从表1为看出,不同强度电场处理后SOD的活性发生同强度电场处理后,其活性均有不同程度的降低。

如果说SOD活性与 β -折叠含量相关^[11,12],那么将SOD活性与 β -折叠含量比较,由图2我们可以看出,电场处理使

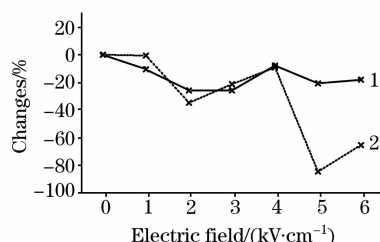


Fig. 2 The relative change of SOD activity treated with different intensities of electric field

1: Sheet; 2: Relative activity

变化。SOD 经不 SOD 活性降低, 与电场处理导致 SOD 二级结构中 β -折叠含量减少呈正相关。

3 讨论

生物体内多种荷电物质的分布和运动, 对生命过程具有重要意义。在地球环境(电磁场、引力场)中, 生物体具有固有态势。当外界环境发生变化时, 势必引起生物体生物态势

的变化, 从而达到新的生物态势, 影响生命过程。蛋白质中氧氢键(O—H)与碳氧键(C=O)均为极性键。我们认为, 在电场作用下, 蛋白质分子内部的电荷重新分布, 分子或分子基团的偶极矩将发生变化, 从而达到一个新的状态。尽管处理酶所用电场能量不足以改变酶蛋白氨基酸序列, 但可以改变酶蛋白的构象^[13]。

电场使 SOD 活性发生改变, 与其空间结构的变化是密不可分的。SOD 是一种金属酶, 它由两个亚基组成, 每个亚基含一个 Cu^{2+} 和一个 Zn^{2+} 。在 SOD 中, 其每个亚基的活性中心均是 β -折叠相互环绕而形成的一个长而深的活性通道, 铜和锌位于其中, 锌起稳定结构的作用, 而铜则主要起催化作用。电场处理使 SOD 二级结构中 α -螺旋含量增加, β -折叠含量减少, SOD 的活性随 β -结构含量的减少而降低, 这可能是由于 β -折叠结构的减少, 改变了活性中心的结构, 尤其是 Cu^{2+} 周围固有的配位环境, 因而使酶活性降低。

本文研究结果, 为电场影响酶活性的理论提供了支持, 也为电场处理植物种子的宏观生物效应作用机理提供了重要的理论依据。

参 考 文 献

- [1] HAO Bo-lin, LIU Ji-xing(郝柏林, 刘寄星). Theoretical Physics and Life Sciences(理论物理与生命科学). Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Education Press(上海: 上海科学技术出版社), 1997. 3.
- [2] ZENG Xin-an, GAO Da-wei, LI Guo-ji, et al(曾新安, 高大维, 李国基, 等). Food Science(食品科学), 1997, 18(6): 3.
- [3] LU Wei, XU Chun-he, LI Rong, et al(陆卫, 徐春和, 李荣, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(5): 749.
- [4] DENG Hua, SONG Zhan-jun, WANG De-wen, et al(邓桦, 宋占军, 王德文, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(8): 1437.
- [5] Dong A, Huang P, Caughey W S. Arch. Biochem. Biophys., 1995, 320: 59.
- [6] GE Yu, LIU Ling, GAO Jian-ying, et al(葛宇, 刘玲, 高剑英, 等). Journal of East China University of Science and Technology(华东理工大学学报), 2003, 29(2): 156.
- [7] Beauchamp C, Fridovich I. Anal. Biochem., 1971, 44(1): 276.
- [8] Byler D M, Brouille J N, Susi H. Spectroscopy, 1986, 1(3): 29.
- [9] Hollosi M, Majer Z, Ronai A Z, et al. Biopolymers, 1994, 34: 1770.
- [10] Jackson M, Haris P I, Chapman D. Biochem., 1991, 30: 9681.
- [11] Bhattacharjee C, Saha S, Biswas A, et al. Protein Journal, 2005, 24(1): 27.
- [12] TANG Yin-yan, WANG Zhi-lin, YU Qing, et al(汤银燕, 王志林, 郁清, 等). Chinese Journal of Inorganic Chemistry(无机化学学报), 2001, 17(2): 263.
- [13] GUO Wei-sheng, YANG Xing-yu, YANG Ti-qiang, et al(郭维生, 杨性愉, 杨体强, 等). Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Naimongol(内蒙古大学学报·自然科学版), 2001, 32(3): 349.

Study on the Effect of Electric Field on the Secondary Structure of SOD by FTIR Spectroscopy

DENG Yi-bing¹, YANG Ti-qiang²

1. Marine Science College of Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China

2. College of Science and Technology, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China

Abstract After the SOD (superoxide dismutase) was treated with different strength of electric field, the effect of electric field on the secondary structure of SOD was studied by FTIR (Fourier-transformation infrared spectroscopy). The results have shown

that different electric field strength has different effects on the secondary structure contents of the SOD. As compared with the contrast, the relative contents of α -helix and β -sheet were decreased, while β -turn content increased. The random coil contents were increased except for the $1.0 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$. The electric treatment tends to transform the α -helix and β -sheet into β -turn and random coil, and different strength of electric field has a different effect on the transformation. The changes in SOD activity have a direct relationship to the contents of β -sheet.

Keywords Electric field; SOD; FTIR; Secondary structure

(Received Feb. 2, 2007; accepted Apr. 26, 2007)

《光谱学与光谱分析》2007 年征订启事

欢迎投稿 欢迎订阅

《光谱学与光谱分析》1981 年创刊，国内统一刊号：CN 11-2200/O4，国际标准刊号：ISSN 1000-0593，CODEN 码：GYGFED，国内外公开发售，大 16 开本，208 页，月刊；是中国科协主管，中国光学学会主办，钢铁研究总院、中国科学院物理研究所、北京大学、清华大学共同承办的学术性刊物。北京大学出版社出版，每期售价 30.00 元，全年 360 元；国内邮发代码 82-68，国外发行代码 M905。刊登主要内容：激光光谱测量、红外、拉曼、紫外、可见光谱、发射光谱、吸收光谱、X 射线荧光光谱、激光显微光谱、光谱化学分析、国内外光谱化学分析领域内的最新研究成果、开创性研究论文、学科发展前沿和最新进展、综合评述、研究简报、问题讨论、书刊评述。

《光谱学与光谱分析》适用于冶金、地质、机械、环境保护、国防、天文、医药、农林、化学化工、商检等各个领域的科学研究单位、高等院校、制造厂家、从事光谱学与光谱分析的研究人员、高校有关专业的师生、管理干部。

《光谱学与光谱分析》为我国首批自然科学核心期刊，中国科协优秀科技期刊，中国科协择优支持基础性、高科技学术期刊，中国科技论文统计源刊，“中国科学引文数据库”，“中国物理文摘”，“中国学术期刊文摘”，同时被国内外的 CSCI, SCI, AA, CA, EI, PKJ, MEDLINE 等文献机构收录。根据国家科技部信息研究所发布信息，中国科技期刊物理类影响因子及引文量《光谱学与光谱分析》都居前几位。欢迎国内外厂商在《光谱学与光谱分析》发布广告（广告经营许可证：京海工商广字第 8094 号）。

《光谱学与光谱分析》的主编为黄本立院士。

欢迎新老客户到全国各地邮局订阅，若有漏订者可直接与光谱学与光谱分析期刊社联系。

联系地址：北京市海淀区学院南路 76 号，光谱学与光谱分析期刊社

邮政编码：100081

联系电话：010-62181070, 62182998

电子信箱：chnghpxygpfx@vip.sina.com；修改稿专用邮箱：mengzh1018@vip.sina.com

网 址：<http://www.gpxygpfx.com>