

# 溶液pH值、配体及重金属离子 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 对细胞色素c电化学活性的影响<sup>①</sup>

罗瑾\* 吴玲玲 吴金添 黄少华 林仲华

(厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室, 化学系, 厦门 361005)

**摘要** 本文研究了溶液pH值、配体及某些重金属离子对细胞色素c电化学活性的影响. 实验发现: 在pH=2.0和pH=10.0的磷酸盐缓冲溶液中, 细胞色素c失活; 用强的配体 $\text{CN}^-$ 与铁卟啉发生配位取代反应虽使溶液相中的细胞色素c失活, 但不影响吸附态的细胞色素c的活性; 重金属离子 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 对细胞色素c电化学活性影响的程度不同, 影响大小的顺序为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ . 并对可能的机理进行了讨论.

**关键词** 细胞色素c, 溶液pH值, 配体反应, 重金属离子

近年来, 为了了解生物体内呼吸链过程的电子传递机理, 细胞色素c的电化学研究已被广泛地进行<sup>[1~3]</sup>. 生物体内酸度变化和某些金属离子会对呼吸链的功能产生影响, 起阻碍作用, 本文研究了溶液pH值、配体及某些重金属离子对细胞色素c电化学活性的影响.

## 1 实验部分

细胞色素c为美国Sigma公司产品, 红色片状晶片, 呈氧化态, 分子量12 384, 试剂在干燥、避光、低温下保存. 其余试剂均为分析纯.

研究电极为Au电极, 纯度不低于99.9%, 直径6 mm, 面积0.28 cm<sup>2</sup>. 嵌入聚四氟乙烯中. 电极的预处理同文献<sup>[4]</sup>. 辅助电极和参比电极分别为Pt环和饱和甘汞电极. 文中所标电位均相对饱和甘汞电极.

所用仪器为美国EG&G PARC M370电化学系统和日本Shimadzu UV-240紫外可见光谱仪等.

## 2 结果和讨论

### 2.1 细胞色素c在金电极上的电活性

在合适的预处理条件下, 细胞色素c能够在裸金电极上发生不可逆的吸附, 并且溶液中的细胞色素c能够在吸附有细胞色素c的金电极上进行准可逆的电子传递反应<sup>[4]</sup>. 图1为Au电极在含有5 mg/mL(388 μmol/L)细胞色素c的磷酸盐缓冲溶液(pH=7.0, 支持电解质为0.1 mol/L  $\text{NaClO}_4$ )和空白溶液(即不含细胞色素c的基底溶液)中的循环伏安图. 图1a的氧化还原峰对应

<sup>①</sup> 本文1995-07-29收到, 1995-09-29收到修改稿; 国家自然科学基金资助课题

于细胞色素c 的氧化还原.

### 2.2 溶液pH 值对细胞色素c 电活性的影响

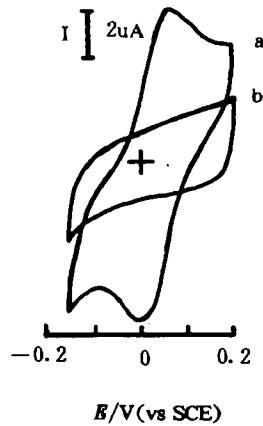


图1 预处理后的金电极在磷酸盐缓冲溶液 (pH7.0) 中的循环伏安图(扫描速度:100 mV/s)  
a: 含 5 mg/mL 细胞色素c; b: 不含细胞色素c

Fig. 1 Voltammograms of the gold electrode with suitable pretreatment in the phosphate buffer solutions(pH7.0)

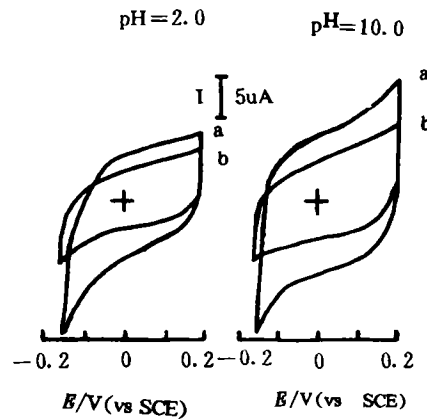
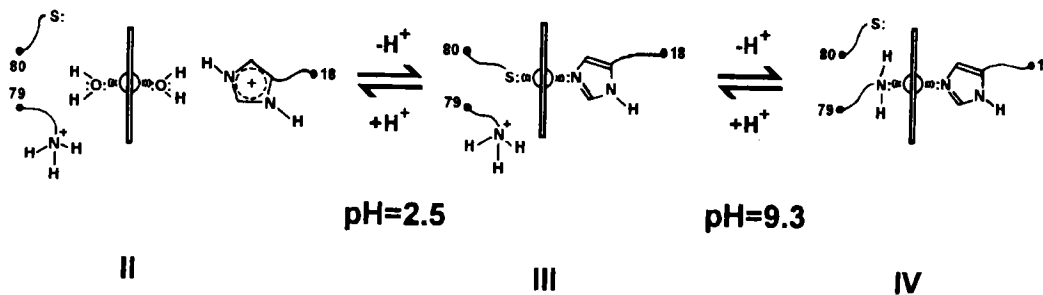


图2 预处理后的金电极在磷酸盐缓冲溶液 (pH2.0 和 pH10.0) 中的循环伏安图(扫描速度:100 mV/s)  
a: 含 5 mg/mL 细胞色素c; b: 不含细胞色素c

Fig. 2 Voltammograms of the gold electrode with suitable pretreatment in the phosphate buffer solutions(pH2.0 and pH10.0)

配制 pH=2.0 和 pH=10.0 细胞色素c 的磷酸盐缓冲溶液, 浓度为 5 mg/mL, 0.1 mol/L NaCl 为支持电解质, 在冰箱中放置过夜. 循环伏安结果示于图2, 经过长时间扫描, 细胞色素c 的氧化还原峰始终不出现. 电极在不同溶液中的背景电流不同, 可能与细胞色素c 在电极上的吸附过程有关.

溶液 pH 值对细胞色素c 活性的影响, 与 pH 值引起细胞色素c 分子构象发生变化有关, 示意如下<sup>[5]</sup>:



生物体内细胞色素c作用的微环境是中性的,它以构象态Ⅲ存在,表现出非常高的传递电子活性;碱性溶液中( $pH > 9$ )铁卟啉轴向第六配体蛋氨酸被赖氨酸所取代,分子的构象发生了变化,构象态Ⅳ没有活性,不能传递电子;酸性介质中( $pH < 2.5$ ),细胞色素c分子以构象态Ⅰ存在,铁卟啉的两个轴向配体均被水替代,细胞色素c同样失活. 电化学研究结果表明电化学模拟与生物体内的情况一致.

### 2.3 配体取代反应

从溶液pH值对细胞色素c电活性影响的研究结果可知,血红素中铁卟啉轴向第六配体的变化对细胞色素c的活性影响很大,为此,我们考虑用强的配体 $CN^-$ 与铁卟啉发生配位取代反应并观察其影响. 配制含有 $CN^-$ 的细胞色素c溶液,两者浓度均为 $388 \mu\text{mol/L}$ ,支持电解质仍为 $0.1 \text{ mol/L NaClO}_4$ ,仍用中性磷酸盐缓冲体系. $CN^-$ 是强配体,会取代卟啉轴向第六配体蛋氨酸,但反应速度较慢,因此将溶液放置于冰箱24 h以上再进行循环伏安测试,结果如图3a,表明细胞色素c已失活. 为了考察是否由于配体变化影响吸附而导致失活,用吸附着有活性的细胞色素c的金电极(制备方法见文献<sup>[4]</sup>)在上述溶液中进行伏安扫描,如图3c,发现吸附物种的活性依然存在而且稳定,而体相中的自由扩散分子却不能发生氧化还原反应,这就排除了由于配体变化影响吸附而导致失活这种可能性,也说明吸附态细胞色素c并不发生配体取代反应.

用电子光谱研究配体取代反应对细胞色素c的结构影响,图4给出了氧化态的细胞色素c及加入 $CN^-$ 后的细胞色素c的吸收光谱. 图中,410 nm处的吸收谱带通常称为 $\gamma$ 谱带(Soret带),它是金属卟啉配合物吸收最强的特征谱带. 如图可见配体取代反应对细胞色素c分子血红素的电子结构没有影响(两条谱线形状类似),生物化学研究也表明<sup>[5]</sup> $CN^-$ 配体取代氨基酸Met-80且影响74至82肽链段的位置和构象,可见,体相分子的电子传递的活性与肽链密切相关.

### 2.4 重金属离子效应

某些金属离子会与生物大分子相互作用,导致生物体中毒,这方面的研究多数针对血液中的各种蛋白,而对于细胞色素c这样的电子递体,对重金属离子效应的研究目前还不多.

由于重金属离子的磷酸盐不溶于水,这里不再使用磷酸盐缓冲体系,而是直接将细胞色素c溶解在含有 $0.1 \text{ mol/L NaClO}_4$ 的 $HgCl_2$ 、 $CdCl_2$ 、 $Pb(NO_3)_2$ 溶液中,细胞色素c的浓度为

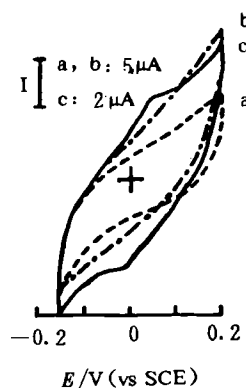


图3 a: 预处理后的金电极在含有 $388 \mu\text{mol/mL}$ 细胞色素c和 $388 \mu\text{mol/mL CN}^-$ 的磷酸盐缓冲溶液中的循环伏安图; b: 预处理后的金电极在含有 $388 \mu\text{mol/mL CN}^-$ 的磷酸盐缓冲溶液中的循环伏安图; c: 吸附有活性细胞色素c的金电极在含有 $388 \mu\text{mol/mL}$ 细胞色素c和 $388 \mu\text{mol/mL CN}^-$ 的磷酸盐缓冲溶液中的循环伏安图; 扫描速度:  $100 \text{ mV/s}$  电极表面积:  $0.28 \text{ cm}^2$

Fig. 3 a: Voltammogram of the gold electrode with suitable pretreatment in the phosphate buffer solution containing  $388 \mu\text{mol/mL}$  cytochrome c and  $388 \mu\text{mol/mL CN}^-$ ; b: Voltammogram of the gold electrode with suitable pretreatment in the phosphate buffer solution containing  $388 \mu\text{mol/mL CN}^-$  (blank); c: Voltammogram of the gold electrode with adsorbed cytochrome c in the phosphate buffer solution containing  $388 \mu\text{mol/mL}$  cytochrome c and  $388 \mu\text{mol/mL CN}^-$

5 ml/mL,  $Hg^{2+}$  或  $Cd^{2+}$  或  $Pb^{2+}$  的浓度均为 0.1 mol/L, 在冰箱中放置. 第二天可观察到如下现象  $Hg^{2+}$  存在的溶液有暗红色沉淀析出, 溶液由原来的红色变为无色, 循环伏安结果示于图 5a, 图中表征细胞色素 c 的氧化还原峰消失, 并发现 Hg 在金电极表面析出; 含  $Cd^{2+}$  的溶液微浑, 但仍呈红色 ( $CdCl_2$  溶液也是红色的), 循环伏安 (图 5b) 表明细胞色素 c 同样失活,  $Pb^{2+}$  存在的溶液观察不出有何变化, 但从循环伏安图上 (图 5c) 可以看出峰电流明显减小, 活性降低.

重金属离子的影响可以用重金属离子与生物大分子的络合能力来解释. 细胞色素 c 分子含有许多基团, 如  $-NH_2$ 、 $-SH$  等, 这些基团会与重金属离子发生很强的配位反应, 其稳定常数见表 1<sup>[5]</sup>. 由于配位反应使细胞色素 c 分子凝结, 破坏了分子的结构, 从而使其活性完全消失或减低. 相比之下,  $Hg^{2+}$  的络合能力最强,  $Pb^{2+}$  的络合能力最弱, 因此, 含  $Hg^{2+}$  溶液中的细胞色素 c 完全失活, 含  $Pb^{2+}$  溶液中的细胞色素 c 仍有部分活性.

表 1 不同配位基团的近似稳定常数 (lgK)  
Tab. 1 Stability constant (lgK) of different ligands

配体	$Hg^{2+}$	$Cd^{2+}$	$Pb^{2+}$
$-NH_2$	8.5	2.8	2.0
$-SH$	12.6	8.0	7.3

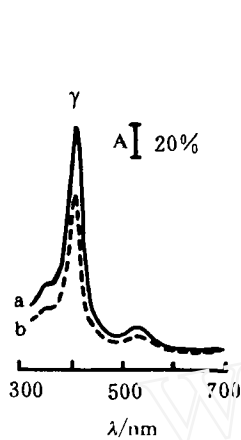


图 4 含有氧化态细胞色素 c 的溶液的紫外可见吸收光谱  
a: 溶液含 8 μmol/L 细胞色素 c  
b: 溶液含 5 μmol/L 细胞色素 c 和 5 μmol/L  $CN^-$

Fig. 4 UV/Vis absorption spectra of the solutions containing cytochrome c in a state of oxidized

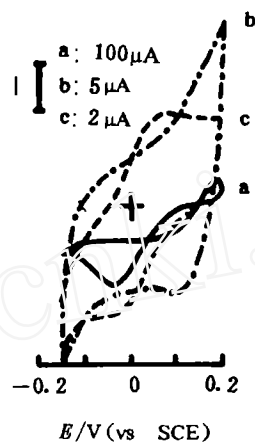


图 5 预处理后的金电极在不同溶液的循环伏安图  
a: 溶液中含有 5 mg/mL 细胞色素 c 和 0.1 mol/L  $Hg^{2+}$   
b: 溶液中含有 5 mg/mL 细胞色素 c 和 0.1 mol/L  $Cd^{2+}$   
c: 溶液中含有 5 mg/mL 细胞色素 c 和 0.1 mol/L  $Pb^{2+}$

扫描速度: 100 mV/s 电极表面积: 0.28  $cm^2$

Fig. 5 Voltammograms of the gold electrode with suitable pretreatment in the solutions

## Effects of pH, Ligand $\text{CN}^-$ , Metallic Ions $\text{Hg}^{+2}$ , $\text{Cd}^{+2}$ and $\text{Pb}^{2+}$ on Electroactivity of Cytochrome C

Luo Jin Wu Lingling Wu Jintain Huang Shaohua Lin Zhonghua

(State Key Lab. for Phys. Chem. of the Solid Surf., Dept. of Chem., Xiamen Univ., Xiamen 361005)

**Abstract** The effects of pH, ligand  $\text{CN}^-$ , metallic ions  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  on electroactivity of cytochrome c have been studied with cyclic voltammetry and UV/Vis spectroscopy. In the phosphate buffer solution containing 5 mg/mL cytochrome c, cytochrome c is electroactive at a gold electrode with suitable pretreatment if the pH value is equal to 7.0, but it is electroinactive at the gold electrode if the pH value is equal to 2.0 or 10.0. The existence of  $\text{CN}^-$  ions in the solution would cause deactivation of cytochrome c in the bulk solution, and would not affect the electroactivity of cytochrome c adsorbed on the gold electrode. The sequence for effects of metallic ions on electroactivity of cytochrome c is  $\text{Hg}^{+2} > \text{Cd}^{+2} > \text{Pb}^{2+}$ . The possible mechanisms were proposed.

**Key words** Cytochrome c, pH, Ligand, Metallic ions

### References

- 1 Sagara T, Murakami H, Lgarashi S, Sato H, Niki K. Spectroelectrochemical Study of the Redox Reaction Mechanism of Cytochrome c at a Gold Electrode in a Neutral Solution in the Presence of 4,4'-Bipyridyl as a Surface Modifier. *Langmuir*, 1991, 7: 3190~3196
- 2 Szucs A, Hitchens G D, Bockris J. O'M. Ellipsometry of Cytochrome c on Gold Surfaces; Effect of 4,4'-Dipyridyl Disulfide. *Electrochim. Acta*, 1992, 37: 403~412
- 3 Taniguchi I, Kurihara H, Yeshica K, Tomnaga M, Hawkrige F M. Electrochemistry of Cytochrome c Components at Indium Oxide and Promoter Modified Electrodes. *Denki Kagaku*, 1992, 60: 1043
- 4 Luo, J, Lin Z H, Huang S H, Wu J T. In Situ FTIR and UV/Vis Study of the Adsorption of Cytochrome c on Gold Electrode. *Chinese Chem. Lett.*, 1994, 5: 971~974
- 5 王夔等编著. 生物无机化学. 北京:清华大学出版社, 1988