

无机阴离子对酪氨酸酶的抑制作用

郭德威 郭成明 李志达

(南开大学化学系, 天津)

酪氨酸酶 (EC 1.14.18.1) 是一个以铜离子为辅基的金属酶。其辅基铜离子为该酶活性所必需^[1]。小分子有机配位体如苯基硫脲、二乙基二硫代氨基甲酸等对酪氨酸酶活性的抑制已有过一些报道。本文旨在研究某些无机阴离子对其活性的影响。

一、材料和方法

1. 材料

(1) 磷酸盐缓冲溶液: 0.1mol/L , $\text{pH} = 6.8$ 。

(2) 酪氨酸酶: 将冷冻的马铃薯去皮和匀浆后, 以磷酸盐缓冲溶液 ($\text{pH} = 6.8$) 提取。经离心后, 将澄清的提取液置冰箱内于 $274-275\text{K}$ 下保存, 并在 $1-1.5$ 小时内用毕。在这期间内, 酶的活性无明显的下降。

(3) DL-3,4-二羟基苯丙氨酸 (Dopa): 生化试剂, 以 $\text{pH} = 6.8$ 的磷酸盐缓冲溶液配制成 0.02mol/L 的溶液。

(4) 无机阴离子溶液: 将分析纯的 NaF 、 NaCl 、 NaBr 、 NaI 、 NaCNS 、 NaHCO_3 和 Na_2SO_4 配成溶液, 以常规方法标定后, 移取一定体积, 用 $\text{pH} = 6.8$ 的磷酸盐缓冲溶液稀释至所需浓度。

(5) 苯基硫脲的乙醇饱和溶液: 用于终止酶促反应。

2. 方法

(1) 移取固定体积的 DL-3,4-二羟基苯丙氨酸溶液、无机阴离子溶液和磷酸盐缓冲溶液于 10ml 烧杯中, 置恒温槽内, 在 $310.15 \pm$

0.1K 下恒温 $8-10$ 分钟。取出, 倾在盛有 0.20ml 的酪氨酸酶提取液的容器中, 立即计时, 旋即将其放入恒温槽中, 迅速搅拌均匀, 使其生成 Dopa 红。待体系反应 1 分钟, 滴入 $1-2$ 滴苯基硫脲的乙醇饱和溶液终止反应。用 721 型分光光度计, 在波长为 475nm 处以蒸馏水为参比溶液, 用 1cm 比色池测量体系的消光值。

用酶的同一提取液, 在相同的条件下, 以相同的方法测定无抑制剂存在时体系的消光值。

两种体系的总体积均为 3.00ml 。无抑制剂的体系所缺的体积则用磷酸盐缓冲溶液补足。

用 Dopa 红的摩尔消光系数 3.7×10^3 ^[2] 求出各体系的反应速度 ($\text{mol/L} \cdot \text{min}$), 把无抑制剂存在时的速度定为 100% , 求出有抑制剂存在下酶的相对活性。

(2) 抑制作用的可逆与否, 用动力学方法判断^[3]。为此, 用如上的方法, 在相同的条件及相同底物浓度下分别做 A、B 两组实验, A 组含有相同浓度的抑制剂, B 组则不含抑制剂, 改变酶提取液的加入量, 测定其反应速度 v 。以 v 对酶加入量作图, 得 A、B 两直线。若直线 A 原点向右移而与直线 B 平行, 即为不可逆抑制; 如果直线 A 通过原点, 但斜率小于直线 B, 则为可逆抑制。

二、结果与讨论

实验结果表明, F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 CNS^- 、 HCO_3^- 和 SO_4^{2-} 等无机阴离子对酪氨酸酶促反应的抑制皆为可逆性的。图 1 示出了其中的一个典型的例子。

表 1 无机阴离子对酪氨酸酶活性的抑制

抑制剂浓度* (mol/L)	0.00	1.00×10^{-5}	1.00×10^{-4}	1.00×10^{-3}	1.00×10^{-2}	1.00×10^{-1}
抑制剂	相对活性 (%)	相对活性 (%)	相对活性 (%)	相对活性 (%)	相对活性 (%)	相对活性 (%)
F ⁻	100	98	96	93	87	53
Cl ⁻	100	96	95	93	91	90
Br ⁻	100	97	94	93	91	85
I ⁻	100	98	96	94	91	81
CNS ⁻	100	97	91	69	29	22
HCO ₃ ⁻	100	99	97	96	94	91
SO ₄ ²⁻	100	**	100	**	**	99

* 为体系中的浓度； ** 未做。

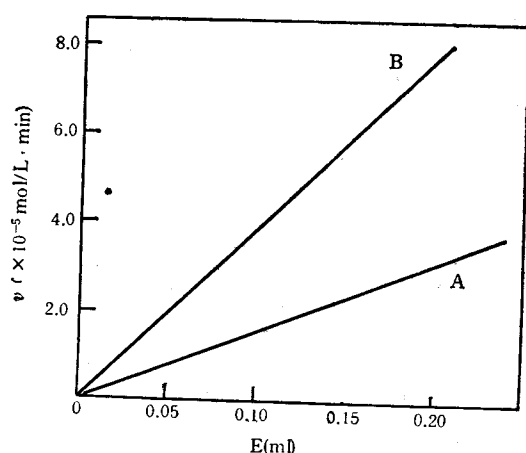


图 1 CNS⁻ 离子对酪氨酸酶促反应的可逆性抑制
(A: 含 CNS⁻; B: 不含 CNS⁻)

从表 1 可以看到, 无机阴离子 F⁻、Cl⁻、Br⁻、I⁻、HCO₃⁻ 在体系中的浓度为 1.00×10^{-5} — 1.00×10^{-3} mol/L 时, 对酪氨酸酶的活性即有抑制作用, 但抑制作用不大; 当它们的浓度增至 1.00×10^{-2} — 1.00×10^{-1} mol/L 时, 才有较显著的抑制作用。SO₄²⁻ 离子即使浓度高达 1.00×10^{-1} mol/L 时, 抑制作用也不明显。

而 CNS⁻ 离子在浓度大于 1.00×10^{-4} mol/L 时, 对酪氨酸酶的活性便产生强烈的抑制。因此, 当 CNS⁻ 离子进入人体后, 即使浓度较低, 对酪氨酸酶的活性也会产生抑制作用, 从而可能会影响酪氨酸在体内的正常代谢。

上述的抑制状况表明, 无机阴离子对酪氨酸酶活性的抑制程度, 与该阴离子对铜离子的配位能力有关, 和铜离子配位能力愈强的无机阴离子, 对酪氨酸酶活性的抑制作用也就愈大。

本文的结果进一步说明了作为酪氨酸酶的辅基的铜离子, 是组成该酶活性中心的结合基团和催化基团。当铜离子遭到配位体封阻时, 酪氨酸酶的活性便将受到不同程度的抑制。

参 考 文 献

- [1] Ochiai Ei-ichiro: *Bioinorganic Chemistry*, Allyn and Bacon, Inc., Boston, 218, 1977.
- [2] Bayse, G. S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **244**, 77, 1971.
- [3] 沈仁权等: 《基础生物化学》, 上海科学技术出版社, 180, 1980.

[本文于 1986 年 11 月 10 日收到]