

研究工作

棉酚对 DNA 酶某些性质的影响

李继珩 翁元凯*

(中国药科大学 生物化学教研室, 南京)

提 要

DNase 用棉酚处理后,经聚丙烯酰胺凝胶平板电泳与对照相比,电泳度无明显差异,均呈单一区带,表明棉酚对 DNase 所带电荷及分子量无影响。棉酚可改变 DNase 在 225nm 和 280nm 波长处的吸收,对 DNase 的荧光有淬灭作用,表明棉酚破坏了 DNase 的空间构象。棉酚与 DNase 的浓度 (W/V) 为 1:1 以上时,酶活性受到显著影响,呈现出反竞争性抑制作用。

前报道了棉酚对 DNA 作用的可能机制^[1],现探讨棉酚对 DNase 的影响。棉酚对体内 LDH、人精子顶体酶^[2,3]及 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ ^[4]均有抑制作用,甚至对 RNA 及 DNA 的生物合成也有影响^[2,5]。本实验观察了棉酚对 DNase 的电泳度、吸收光谱、荧光光谱及活性的影响,试图说明它们之间相互作用的机制,并就其可能产生的生理药理效应进行探讨。

实验方法与结果

一、聚丙烯酰胺凝胶电泳

用生理盐水配制含棉酚和结晶 DNase 均为 10mg/ml 的溶液,并以含结晶 DNase 10mg/ml 的生理盐水溶液作对照,37℃ 保温 1 小时,各加固体蔗糖使其浓度达 20%。按 Drerr^[6]及翁元凯^[7]方法,加样 20 μl ,进行聚丙烯酰胺凝胶平板电泳。与棉酚作用的 DNase 溶液和对照溶液的电泳度完全相同,并呈单一区带,结果见图 1。由图 1 可知,棉酚未影响 DNase 的表面电荷量及其分子量。

二、棉酚对 DNase 紫外吸收光谱的影响

含棉酚 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和结晶 DNase 50 $\mu\text{g}/$

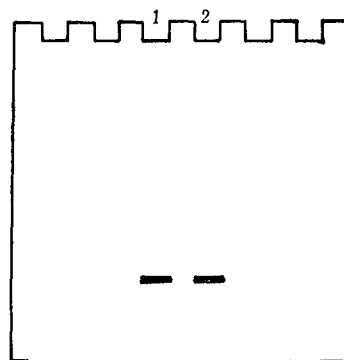


图 1 棉酚对 DNase 电泳度的影响

1 为 10mg/ml 棉酚与 10mg/ml DNase 作用物的电泳区带
2 为 10mg/ml DNase 的电泳区带

ml 的生理盐水溶液,37℃ 保温 15 分钟,冷却至室温,用岛津 UV-300 型分光光度计进行紫外区扫描。同时分别测定含棉酚 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及含结晶 DNase 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的生理盐水溶液的紫外吸收光谱图作对照,结果见图 2。由图 2 可见,在 225nm 波长处,棉酚与 DNase 相互作用

* 物理化学教研室

物的吸收值小于相同浓度的单纯棉酚与 DNase 分别测定的吸收值之和。在 280nm 波长处则大于分别测定的吸收值之和,表明棉酚对 DNase 的空间构象产生了影响。

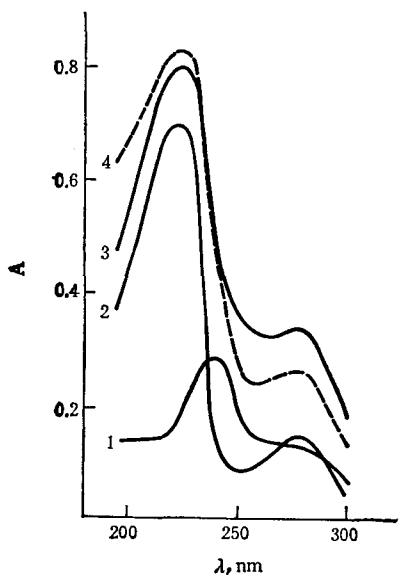


图 2 棉酚对 DNase 紫外吸收光谱的影响
 1 为 50μg/ml DNase 溶液的吸收曲线
 2 为 6.25μg/ml 棉酚溶液的吸收曲线
 3 为 50μg/ml DNase 和 6.25μg/ml 棉酚混合溶液的吸收曲线
 4 (虚线)为曲线 1 和曲线 2 的叠加

三、棉酚对 DNase 荧光的影响

配制含棉酚 5μg/ml 和结晶 DNase 5μg/ml 的生理盐水溶液,再配制含棉酚 2.5μg/ml 和结晶 DNase 5μg/ml 的生理盐水溶液。37℃ 保温 15 分钟,冷却至室温,用日立 MPF-4 型荧光分光光度计以 289nm 波长的光为激发光进行荧光扫描。再分别以含棉酚 5μg/ml 及含结晶 DNase 5μg/ml 的生理盐水溶液作空白实验,结果见图 3。

由图 3 可知, DNase 在 λ_{343} 有较强的发射,呈现出典型的色氨酸残基的发射光谱,棉酚对 DNase 有荧光淬灭作用,且与棉酚的浓度有相关性,表明棉酚与 DNase 中的芳香族氨基酸残基发生了相互作用。

四、棉酚对 DNase 活性的影响

(一) 试剂 用 pH5.8、0.2mol/L 醋酸缓冲液将 DNase 配成 5μg/ml 的溶液;底物小

牛胸腺 DNA 用 0.05mol/L MgSO₄ 配成 4mg/ml 的溶液。

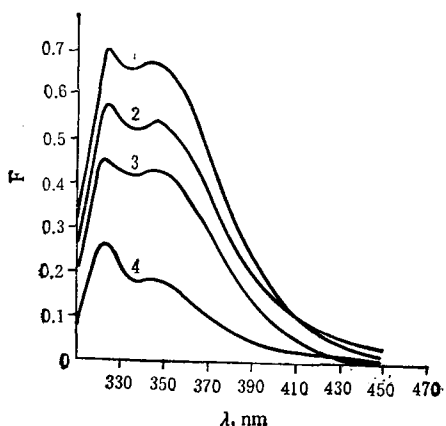


图 3 棉酚对 DNase 荧光光谱的影响
 1 为 5μg/ml DNase 溶液的荧光光谱
 2 为 5μg/ml DNase 和 2.5μg/ml 棉酚混合溶液的荧光光谱
 3 为 5μg/ml DNase 和 5μg/ml 棉酚混合溶液的荧光光谱
 4 为 5μg/ml 棉酚溶液的荧光光谱

(二) 酶活性测定^[8,9] 在 8 支试管中分别盛 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 及 1.5ml 底物溶液,再用含 0.05mol/L MgSO₄ 的 pH5.8、0.2mol/L 醋酸缓冲液补充至每管体积为 2.0ml, 37℃ 保温 5 分钟,然后分别向各管加入同时保温的 DNase 溶液 1.0ml, 准确反应 15 分钟,各管均加入 50% 三氯醋酸溶液 1.0ml,冰浴降温 15 分钟,离心除沉淀。分别取各管上清液 2.0ml, 各加 1% 二苯胺醋酸溶液 4.0ml, 60℃ 保温显色 1 小时,冷却至室温。测定 λ_{595} 的吸收度,以表示不同底物浓度时酶促反应的产物

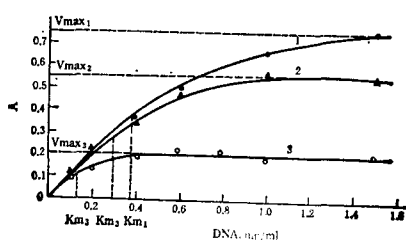


图 4 棉酚对 DNase 活性的影响
 曲线 1 为 5μg DNase 的酶促反应曲线, 2 为 5μg DNase 加 5μg 棉酚后酶促反应曲线, 3 为 5μg DNase 加 10μg 棉酚后的酶促反应曲线。

量或反应速度。以吸收值为纵坐标、DNA 浓度为横坐标,作酶促反应曲线。再分别做含棉酚 5 μ g 及 10 μ g 的酶促反应曲线,结果见图 4。

由图 4 可知,加入棉酚后,米氏常数 (K_m) 及最大反应速度 (V_{max}) 均减小,表明棉酚对 DNase 呈现出反竞争性抑制作用。

讨 论

实验表明棉酚不影响 DNase 分子的表面电荷量及其分子量。部分棉酚分子可能进入 DNase 分子内部疏水区域与色氨酸等芳香族氨基酸残基接近并发生相互作用,引起能量重新分布,从而导致 DNase 紫外吸收光谱的变化及产生荧光淬灭作用。

DNase 动力学实验表明棉酚对 DNase 呈现出反竞争性抑制作用,说明棉酚也可与酶-底物复合物结合,改变酶的空间构象,使酶活性下降。这与棉酚对 DNase 的吸收光谱及荧光光谱的影响相一致。

总之,棉酚能影响 DNase 分子的空间构象及抑制其活性。在体内, DNase 具有修补损

伤的 DNA 的作用。DNase 的活性受到抑制后,会影响 DNA 的正常代谢。所以服用棉酚后,除明显抑制睾丸精子形成及杀灭精子外,还会引起机体各器官细胞中 DNA 的代谢异常,产生广泛的毒副作用^[2] 有一定相关性。因此,棉酚难于成为良好的男性口服节育药物。至于棉酚对 DNase 的作用所产生的特殊生理药理效应尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 翁元凯,李继珩:《生物物理学报》,1987,3(2),126。
- [2] 雷海鹏:《药学报》,1982,17(1),1。
- [3] 童建孙等:《生物化学与生物物理进展》,1986,(5),41。
- [4] 毕晓峰等:《中国药理学报》,1984,5(2),115。
- [5] 周兰芳等:《药学报》,1984,19(3),220。
- [6] Drerr, P. et al.: *Anal. Biochem.*, 1971, 42, 96。
- [7] 翁元凯,李继珩:《药学报》,1986,21(1),65。
- [8] McDonald, MR.: *Methods in Enzymology*, 1955, 2, 437。
- [9] 张龙翔等:《生化实验方法和技术》,人民教育出版社,1981,219 页。

[本文于 1987 年 8 月 3 日收到]

(上接第 274 页)

- 7, 1366。
- [2] Brew, K. et al.: *Protein of iron metabolism*, Acad. Press, London, 1977, 133—141。
- [3] Anderson, B. F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 1769。
- [4] Jeltsch, J. M. and Chambon, P.: *Eur. J. Biochem.*, 1982, 122, 291。
- [5] Brock, J. H.: *Metalloproteins*, Part 2, Macmillan Press, London, 1985, 183—262。
- [6] Huebers, H. A. and Finch, C. A.: *Physiological Reviews*, 1987, 67, 520。
- [7] Brock, J. H. et al.: *Biochem. J.*, 1978, 171, 73。
- [8] Бугланов, А. А. и Салихов, Т. А.: *Химия Природных Соединений* 1983, 6, 768。
- [9] Legrand, D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 787, 90。
- [10] Williams, J.: *Biochem. J.*, 1974, 141, 745。

- [11] Williams, J.: *Biochem. J.*, 1975, 149, 237。
- [12] Esparza, I. and Brock, J. K.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1980, 624, 479。
- [13] Brown-Mason, A. and Woodworth, R. C.: *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 1866。
- [14] Esparza, I. and Brock, J. H.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 622, 279。
- [15] Line, W. F. et al.: *Int. J. Biochem.*, 1976, 7, 203。
- [16] Park, I. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 3149。
- [17] Enns, C. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 3241。
- [18] Martin, A. W. et al.: *Blood*, 1984, 64, 1047。
- [19] Funmei, Y. et al.: *Protides of the Biological Fluids*, Pergamon Ltd. Press, England, 1985, 33, 31—34。

[本文于 1987 年 7 月 21 日收到]