

Cl⁻、NO₃⁻ 和 SO₄²⁻ 离子对漆酶催化活性的抑制作用*

The Inhibition of Cl⁻、NO₃⁻ and SO₄²⁻ Ions on Laccase-enzymatic Activity

涂楚桥 梁宏 王光辉*

Tu Chuqiao Liang Hong Wang Guanghui

(广西师范大学化学化工系 桂林市育才路 3号 541004)

(Dept. of Chemistry, Guangxi Normal University, 3 Yucailu, Guilin, Guangxi, 541004)

摘要 以 5, 6-二溴-2, 3-二氰基氢醌为底物, 在 pH 值 4.50 条件下, 用分光光度法考察了 Cl⁻、NO₃⁻ 和 SO₄²⁻ 离子对漆酶催化活性的影响。发现 Cl⁻、NO₃⁻ 和 SO₄²⁻ 离子对漆酶的催化活性均有不同程度的抑制作用, 其最大抑制率分别可达 73%、31.4% 和 17.1%。动力学研究表明, Cl⁻、NO₃⁻ 和 SO₄²⁻ 离子的抑制作用是瞬时完成的, 属于竞争性抑制过程, 是通过与底物分子竞争漆酶分子中的 II 型铜 (II) 部位实现的。经测定, Cl⁻ 和 NO₃⁻ 离子与漆酶所形成的复合物其解离常数分别为 $1.12 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 和 $1.78 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 。

关键词 漆酶 阴离子 竞争性抑制作用 分光光度法

中图分类号 Q 554

Abstract The influence of Cl⁻、NO₃⁻ and SO₄²⁻ ions on laccase-enzymatic activity was studied spectrophotometrically by 5, 6-dibromo-2, 3-dicyanohydroquinone (DDBQH) under condition of pH 4.50 and $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$. The results showed that Cl⁻、NO₃⁻ and SO₄²⁻ ions had obvious inhibition, and the inhibition ratio of theirs reached to 73%, 31.4% and 17.1%, respectively; The kinetic studies demonstrated that the inhibitory actions of Cl⁻、NO₃⁻ and SO₄²⁻ ions were time-independent competitive type, and the inhibited position was the type 2 Cu (II) site of laccase. The dissociation constants (K_i) of complexing reaction of Cl⁻ and NO₃⁻ ions with type 2 Cu (II) site of laccase are $1.12 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ and $1.78 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, respectively.

Key words *Rhus vernicifera* laccase, anions, competitive inhibition, spectrophotometry

漆酶 (laccase, EC 1.10.3.2) 是含有 4 个紧密结合铜 (II) 的氧化酶。漆酶分子中的四个铜分属于三种类型, 其吸收光谱性质是: I 型铜部位又称蓝铜部位, 在 610 nm 处有一强吸收 ($\epsilon \sim 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); II 型铜部位, 无特征吸收; III 型铜部位, 由双核铜构成, 在 330 nm 附近表现为肩 (吸收) 峰 ($\epsilon \sim 2800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。最近的研究认为 II 型铜部位和 III 型铜部位共同组成了一个三核铜簇^[1]。漆酶可以催化氧分子氧化二酚类底物生成水和醌类物质, 但不释放出 H₂O₂ 或 ·OH 等对生物体有潜在危害的中间体^[1-3]。利用外源性离子与漆酶分子的相互作用可以更好地理解漆酶

的催化氧化反应机理和阐明漆酶分子活性部位的结构与功能。Holwerda 等^[3]曾发现 N₃⁻、CN⁻ 和 F⁻ 等阴离子对漆酶的催化活性有抑制作用, 认为抑制作用是由于阴离子与底物竞争漆酶 II 型铜 (II) 部位实现的。Solomon 等^[4]发现 F⁻ 离子对 II 型铜 (II) 有强亲和力, 其结合常数大于 10⁴ 数量级; N₃⁻ 桥联了 II 型铜和 III 型铜。正是这一研究导致了三核铜簇这一新概念的提出。虽然有关阴离子与漆酶相互作用的研究较多, 但却鲜见有关 Cl⁻、NO₃⁻ 和 SO₄²⁻ 等阴离子作为外源性离子对漆酶催化活性影响的动力学研究的报道。为了更好地理解阴离子对漆酶催化活性的影响, 避免在研究中阴离子对漆酶催化反应可能产生的干扰, 我们以 5, 6-二溴-2, 3-二氰基氢醌 (简称为 DDBQH) 为底物, 用分光光度法考察了 Cl⁻、NO₃⁻ 和 SO₄²⁻ 离子对漆酶催化活性的影响, 并就其动力学特征和作用位点进行了

1998-06-25 收稿

* 广西自然科学基金资助课题

** 武汉大学化学学院, 武汉, 430072 (College of Chemistry, Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430072)

1 实验材料和方法

1.1 漆酶、试剂和仪器

漆酶的分、纯化和底物的合成按文献 [5] 进行。为了避免阳离子对酶反应的干扰, 选择 K^+ 或 Na^+ 离子为其共存阳离子。阴离子溶液均按标准方法配制, 其它试剂均为分析纯, 未进一步纯化。

所用仪器为 UV-240 型紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司)。

1.2 动力学实验方法

实验于 $30 \pm 0.1^\circ C$ 下进行, 于 3.0 mL , $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HAC-NaAC 缓冲液 (pH 值 4.50) (以下简称缓冲液) 中加入一定量的底物 (DDBQH₂) 和一定量的阴离子溶液, 预孵化一定时间后, 加入 $2 \mu\text{L}$ 漆酶液启动反应。定时追踪反应开始后 2 min 内底物特征吸收处 ($\lambda_{\text{max}} = 389 \text{ nm}$) 或酶反应产物半醌自由基阴离子特征吸收处 ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) 吸光度值随时间的变化。通过吸光度变化对时间作图, 可分别求得加入阴离子前后的反应初始速度 v_0 和 v_0' 以作用百分率 ($P\%$) 表示该阴离子对漆酶催化活性的影响:

$$P\% = \frac{v_0 - v_0'}{v_0} \times 100$$

“+”表示活化作用, “-”表示抑制作用。

1.3 阴离子抑制的时效性

于 3.0 mL 缓冲液中加入 $2 \mu\text{L}$ 漆酶液和一定量的阴离子溶液, 预孵化一定时间后, 加入一定量的底物启动反应。其余同 1.2。

1.4 阴离子对漆酶吸收光谱的影响

取 2.0 mL 漆酶液, 绘制 $800 \text{ nm} \sim 290 \text{ nm}$ 范围的吸收光谱图, 测定 614 nm 和 330 nm 处的吸光度值。再加入一定量的阴离子溶液, 追踪 614 nm 和 330 nm 处吸光度值随时间的变化, 并定时绘制漆酶的吸收光谱图。

2 结果与讨论

2.1 Cl^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 离子存在下 DDBQH₂ 的漆酶催化氧化反应

考察了 Cl^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 离子存在时底物的漆酶催化氧化反应的吸收光谱变化, 发现它们对酶促反应都有不同程度的抑制作用, 其中 Cl^- 离子的抑制作用尤为明显, 如图 1 所示。图 1 (a) 为未加阴离子时酶反应产物半醌自由基阴离子的特征吸收处 ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) 吸光度值随时间的变化, 它在一定时间内随

反应的进行而迅速上升。 Cl^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 离子的抑制作用表现在酶反应产物半醌自由基阴离子的形成速度和积累有不同程度的减少 [图 1 (b)、(c) 和 (d)]。

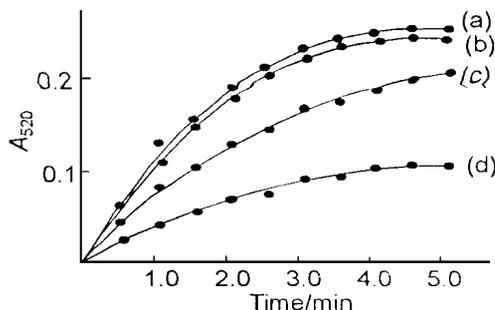


图 1 阴离子存在时 DDBQH₂ 的漆酶催化氧化反应的吸收光谱变化

Fig. 1 Absorption spectra of oxidation of DDBQH₂ catalyzed by laccase in the presence of anions

(a) 无阴离子; (b) SO_4^{2-} ; (c) NO_3^- ; (d) Cl^- 离子 (a) no anions; (b) SO_4^{2-} ; (c) NO_3^- ; (d) Cl^- ion.

2.2 Cl^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 离子的浓度与抑制效应的关系

图 2 为阴离子浓度对漆酶催化活性抑制程度的影响。结果表明, 它们均呈非线性关系, 显示饱和和动力学特性。在底物浓度为 $360 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 条件下, Cl^- 离子浓度为 $550 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时, 抑制率可达 75%; NO_3^- 离子浓度为 $769 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时, 抑制率为 31.4%; SO_4^{2-} 离子浓度为 $692 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时, 抑制率为 17.1%。

2.3 Cl^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 离子抑制的时效性

图 3 为阴离子与漆酶预孵化时间对抑制效应的影响。结果显示, 在相当时间内, 这三种阴离子的抑制效应与它们和漆酶的预孵化时间没有关系, 这表明三种阴离子与漆酶的结合都是瞬时完成的, 对漆酶催化活性的抑制作用也是瞬时完成的。

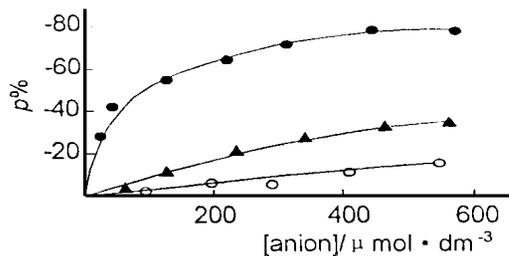


图 2 阴离子浓度对 DDBQH₂ 的漆酶催化氧化反应的影响

Fig. 2 Effects of anion concentrations on the oxidation of DDBQH₂ catalyzed by laccase

[DDBQH₂]: $360 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; ●: Cl^- ; ▲: NO_3^- ; ○: SO_4^{2-} 离子. [DDBQH₂]: $360 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; ●: Cl^- ; ▲: NO_3^- ; ○: SO_4^{2-} ion.

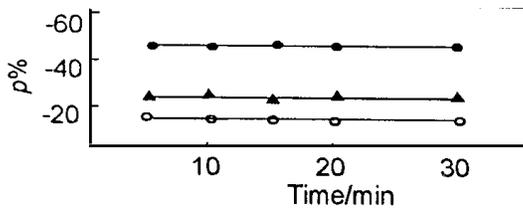


图 3 阴离子与漆酶混合时间对 DDBQH₂ 的漆酶催化氧化反应的影响

Fig. 3 Effects of anion-laccase mixed time on the oxidation of DDBQH₂ catalyzed by laccase

[DDBQH₂]: 360 μmol·dm⁻³; ● [Cl⁻]: 75 μmol·dm⁻³, ▲ [NO₃⁻]: 443 μmol·dm⁻³, ○ [SO₄²⁻]: 692 μmol·dm⁻³

2.4 抑制特征及阴离子-漆酶复合物的解离常数 (K_i 值)

由于 SO₄²⁻ 离子对漆酶催化活性的抑制率不大, 因此没有进行其抑制特征和解离常数的实验。Cl⁻ 离子和 NO₃⁻ 离子对漆酶催化活性的抑制特征可从 $v_m^{-1} \sim [DDBQH_2]^{-1}$ 图, 即 Lineweaver-Burk (LB) 图看出。Cl⁻ 离子和 NO₃⁻ 离子的抑制作用所引起的图像变化都是具有相同纵坐标截距向外扇形展开的一组直线, V_{max} 不变, 只改变表观米氏常数 K'_m, 且 K'_m 值随着阴离子浓度的增大而增大, 如图 4 所示 (由于篇幅所限, 略去了 NO₃⁻ 离子作用下的 LB 图)。这表明, Cl⁻ 离子和 NO₃⁻ 离子对漆酶催化活性的抑制均属于竞争性抑制作用。

通过 Dixon 图解法 (v_m^{-1} 对抑制剂浓度作图), 测得在实验条件下, Cl⁻ 离子或 NO₃⁻ 离子与漆酶形成复合物的解离常数分别为 $1.12 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 和 $1.78 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 。

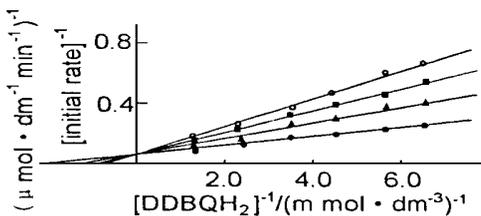


图 4 Cl⁻ 离子抑制 DDBQH₂ 的漆酶催化氧化反应的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 4 The Lineweaver-Burk plot of laccase enzymatic oxidation of DDBQH₂ inhibited by Cl⁻ ion

[Cl⁻]: ● 0, ▲ 15.2, ■ 37.6, ○ 75.8 μmol·dm⁻³.

2.5 Cl⁻ 离子对漆酶吸收光谱的影响

图 5 表明, 加入足量的 Cl⁻ 离子, 放置 24 h 后漆酶的吸收光谱也无实质性变化, 614 nm 和 330 nm 处的吸光度值几乎不变; 从外观看, 漆酶液的蓝色仍保持原样。说明 Cl⁻ 离子对漆酶 I 型铜部位和 III 型铜部位均无影响

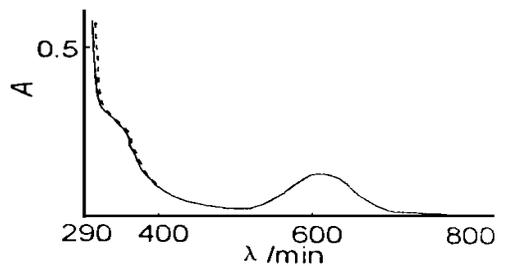


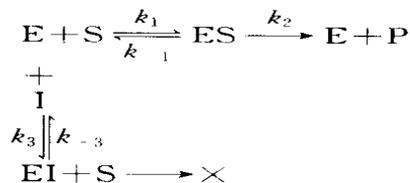
图 5 Cl⁻ 离子对漆酶吸收光谱的影响

Fig. 5 Effects Cl⁻ ion on the absorption spectrum of native laccase

[Cl⁻]: --- 0, ... 5. × 10⁻² mol·dm⁻³.

2.6 Cl⁻、NO₃⁻ 和 SO₄²⁻ 离子的抑制特征与动力学模型

Cl⁻ 离子和 NO₃⁻ 离子对漆酶催化活性的抑制具有竞争性特征, 而且是瞬时和可逆的, 同时其抑制效果取决于抑制剂浓度、底物浓度以及底物和抑制剂对酶的相对亲和力, 其动力学行为符合米氏方程。这些性质同单底物酶促反应中竞争性抑制的一般原理是一致的。由此可以推论, Cl⁻ 离子和 NO₃⁻ 离子是按下列动力学模型实现抑制过程的:



这里 E、S、P 和 I 分别表示酶、底物、产物和抑制剂, ES 和 EI 分别表示酶-底物复合物和酶-抑制剂复合物, 抑制剂常数 (亦称解离常数) K_i 可表示为:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{k_{-3}}{k_3}$$

从测定的 Cl⁻ 离子和 NO₃⁻ 离子的抑制剂常数看, 其值都较大, 特别是 NO₃⁻ 离子。这表明漆酶与这些阴离子生成的复合物 (EI) 是不稳定的。从 SO₄²⁻ 离子的抑制瞬时性和抑制率不大来看, 估计它也应属于竞争性抑制过程, 且抑制剂常数会更大。

2.7 阴离子的作用位点和作用方式

由于漆酶 II 型铜 (II) 只与 3 个咪唑基配体配位, 与正常铜 (II) 的四配位相比, 显然处于配位不饱和状态^[6,7]。因此, 该部位成为底物分子 (以阴离子形式) 的结合部位。Solomon 等^[4]发现的 F⁻ 离子对漆酶 II 型铜 (II) 具有强亲和力的事实表明, 阴离子的抑制作用是通过它与底物分子竞争这同一个位点来实现的。Cl⁻ 离子和 NO₃⁻ 离子漆酶催化活性的竞争性抑制作用以及 Cl⁻ 离子对漆酶的吸收光谱没有实质性影响的结果, 均表明 Cl⁻、NO₃⁻ 和 SO₄²⁻ 离子对漆酶催化活性的抑制可能也是由于它们与底物分子竞

(下转第 303 页 Continue on page 303)

east Asia Type, it becomes HbH ($-/\alpha$) disease with moderately hemolytic anemia. So it is quite important to do population screening and prenatal diagnosis. Our study develops a quite simple, low cost, rapid and reliable method. It is useful for large scale detection and prenatal diagnosis of the $-/\alpha^{3,7}$ and $-/\alpha^{4,2}$ deletions in the area where deletion α -thal-2 with high incidence.

References

- 1 Liebhaber SA. α -Thalassemia. Hemoglobin 1989, 13 685.
- 2 Higgs D R. α -Thalassemia. Bailliere's Clinical Haematology, 1993, 6 (1): 119- 120.
- 3 Huisman T, Carver M F H, Baysal E. A syllabus of Thalassemia Mutations. The Sickle Cell Anemia Foundation. Augusta, GA, USA, 1997 264- 270.
- 4 Embury SH, Miller J A, Dozy A M et al. Two different molecular organization account for the single α -globin gene of the α -thalassemia-2 genotype. Journal of Clin Investigation, 1980, 66 1319.
- 5 吴冠芸, 王申五. 基因诊断. 北京: 人民卫生出版社 1988. 132- 134.
- 6 Baysal E, Huisman T. Detection of Common deletion α -thalassemia-2 Determinants by PCR. Am J of Hematol, 1994, 46 208- 213.

- 7 Higgs D R, Hill AV S, Weatherall D J et al. Independent recombination events between the duplicated human α -globin genes implications for their concerted evolution. Nucleic Acids Res, 1984, 12 6965.
- 8 Dode C, Lamb J K R, Rochette J. Rapid analysis of $\alpha^{3,7}$ thalassemia and $\alpha\alpha\alpha^{ant3,7}$ triplication by Enzymatic amplification analysis. Br J Hematol, 1992, 82 105- 111.
- 9 Liu T-C, Chiou S-S, Liu S-F et al. Molecular basis and hematological characterization of HbH disease in Southeast Asia. Am J Hematol, 1994, 45 293- 297.
- 10 Lemuel JB, Poloru LR, Moolky N et al. Detection of α -thalassemia by multiplex Polymerase Chain Reaction. Clin Chem, 1994, 40 (12): 2260- 2266.
- 11 Dode C, Rochette J, Krispnamorthy R. Locus assignment of human α globin mutations by selective amplified and direct sequencing. Br J Hematol, 1990, 76 275- 281.
- 12 Pranee W, Fucharoen S, Kanokpongsakdi S et al. Detection of α -thal-1 (Southeast Asian type) and its application for prenatal diagnosis. Clin Chem, 1995, 47 319 ~ 320.
- 13 Fucharoen SP, Fucharoen G, Fukumaki Y. Simple non-radioactive method for detecting hemoglobin Constant Spring gene. The Lancet, 1990, 335 1527.
- 14 全国血红蛋白病调查协作组. 20个省市自治区 60万人血红蛋白病调查. 中华医学杂志, 1983, 63 (67): 382.

(责任编辑: 蒋汉明 黎贞崇)

(上接第 287页 Continue from page 287)

争漆酶II型铜(II)部位产生的结果。

由于漆酶分子的底物种类较广,专一性较差,可以认为漆酶分子中无专用“口袋”来包络底物,因此底物的氧化反应发生在漆酶分子的外围^[8]。这表明II型铜(II)部位可能位于漆酶分子的浅表层处,底物分子或阴离子通过酶分子表面的一道较浅可能也较窄的“裂缝”进入酶分子与II型铜(II)结合,因而结合有可能是瞬时完成的。同时,从Cl⁻、NO₃⁻和SO₄²⁻离子对漆酶催化活性的抑制率依其离子半径的增大而下降的事实看,阴离子对漆酶催化活性的抑制程度除了与它们和漆酶II型铜(II)的亲合力有关外,可能还与它们的离子半径和离子形状有关。

参考文献

- 1 Shin W, Sundaram U M, Solomon E I et al. Chemical and spectroscopic definition of the peroxide-level intermediate in the Multicopper oxidases relevance to the catalytic mechanism of dioxygen reduction to water. J Amer Chem Soc, 1996, 118 3202
- 2 Wang Guanghui, Jiang Tao. Catalyzed oxidation by *Rhus vernicifera* Laccase VI mechanistic studies of the catalyzed

oxidation by laccase. J Wuhan Univ Natural Sci Ed, 1994, 1: 59.

- 3 Holwerda R A, Gray H B. Mechanistic studies of the reduction of *Rhus vernicifera* laccase by hydroquinone. J Amer Chem Soc, 1974, 96 6008.
- 4 Spira Solomon D J, Allendorf M D, Solomon E I. Low-temperature magnetic circular dichroism studies of native laccase confirmation of a trinuclear copper active site. J Amer Chem Soc, 1986, 108 5318.
- 5 Wang Guanghui, Jiang Tao, Zhang Changjun et al. Catalyzed oxidation by *Rhus vernicifera* laccase V studies of obtaining semi-quinone radicals from the system of laccase/O₂. J Wuhan Univ Natural Sci Ed, 1992, 4 88.
- 6 Solomon E I, Sundaram U M, Machonkin T E. Multicopper oxidases and oxygenases. Chem Rev, 1996, 96 2563.
- 7 Kaim W, Rall J. Copper-A“ Modern” Bioelement. Angew Chem Int Ed Engl, 1996, 35 43.
- 8 Xu F. Oxidation of phenols, Anilines, and benzenethiols by fungal laccases Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. Biochemistry, 1996, 35 7608.

(责任编辑: 黎贞崇)