

紫色酸性磷酸酯酶模型化合物水解 ATP 的研究

望天志 吴鼎泉 黄在银 屈松生 李东风 廖展如 万洪文

(武汉大学化学系, 武汉 430072)

(华中师范大学化学系, 武汉 430070)

关键词: 微量热法, ATP, 水解反应, 热动力学

紫色酸性磷酸酯酶 (PAPs) 是含铁的糖蛋白, 能够从植物和动物体内分离出来, 在微酸性条件下, 能催化水解磷酸酯^[1], 该类酶具双核铁中心活性部位, 每个蛋白有两个铁原子, 两个铁原子以 $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ 形式存在时, 具有催化活性.

近年来, 人们对研究磷酸酯水解酶感兴趣, 是因为这个课题与酶水解 DNA 和 RNA 有关^[2], 而研究水解断裂核苷酸间的磷酸酯键对化学家是一项有意义的工作^[3]. 研究核苷酸酶催化机理已经导致人们对核苷酸酶模型化合物的研究. 其模型化合物作为一种“分子剪刀”, 特异识别和切割 DNA 和 RNA, 达到高度特异识别, 并导致 DNA 和 RNA 单一部位断裂, 它可以克服限制性内切酶识别序列短及天然专一性限制, 无疑将满足人们对核酸酶日益增长的需要, 大大促进基因工程技术向前发展^[4]. 因此该类模型化合物以其独特的生理功能和潜在的医学应用价值引起人们重视. 本工作是华中师范大学生物无机组首次合成的 $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\mu\text{-O})(\mu\text{-OAC})_2(\text{IDA})_2]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 模型化合物的基础上采用微量热法测定其催化水解 ATP 的动力学参数.

1 理论部分

对于单底物的酶促反应, 若反应按米氏机理进行, 则有



式中, S 表示底物, E 表示酶, P 表示反应产物, 式 (1) 的反应速率用米氏方程表示

$$v = d[\text{S}]/dt = v_{\text{max}}[\text{S}]/(K_m + [\text{S}]) \quad (2)$$

式 (2) 时间由 0 到 t , 底物浓度由 $[\text{S}_0]$ 到 $[\text{S}_t]$ 积分, 可以证明

$$([\text{S}_0] - [\text{S}_t])/t = v_{\text{max}} - (K_m/t)\ln([\text{S}_0]/[\text{S}_t]) \quad (3)$$

时间 t 和 t_∞ 时的反应进度为

$$x = P = [\text{S}_0] - [\text{S}_t] \quad (4)$$

1996-11-12 收到初稿, 1997-02-04 收到修改稿. 联系人: 屈松生.

$$x_{\infty} = P_{\infty} = [S_0] \quad (5)$$

式(3)结合(4)和(5)式可得到

$$(x/x_{\infty})/t = v_{\max}/[S_0] + (K_m/[S_0])\ln[(x_{\infty} - x)/x_{\infty}]/t \quad (6)$$

定义对比进度 Φ 为^[5,6].

$$\Phi = x/x_{\infty} = Q/Q_{\infty} \quad (7)$$

则(6)式可变为

$$\Phi - (K_m/[S_0])\ln(1 - \Phi) = v_{\max}/[S_0] \cdot t \quad (8)$$

(8)式可变为

$$-\ln(1 - \Phi)/t = -(\Phi/t) \cdot [S_0]/K_m + v_{\max}/K_m \quad (9)$$

利用(9)式,可以从一次实验中直接读出 Q , Q_{∞} 和 t , 将 Φ/t 对 $-\ln(1-\Phi)/t$ 作图, 可求出米氏常数和最大反应速率.

对于单底物的酶促反应,

$$k_2 = v_{\max}/[E_0] \quad (10)$$

因此, 利用(10)式求出反应速率常数 k_2 .

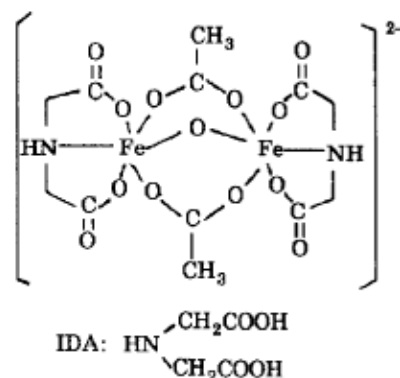


图 1 模型化合物的结构式

Fig.1 Structure of model compound

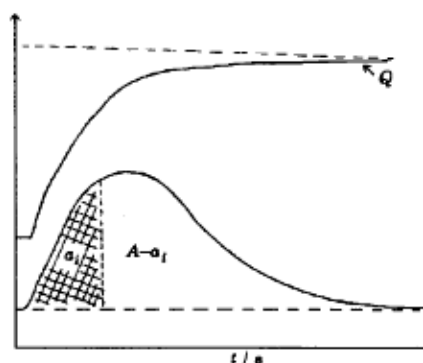


图 2 酶促反应的热谱图

Fig.2 Thermogram of enzyme-catalyzed reaction

2 实验与结果

2.1 材料与仪器

醋酸 - 醋酸钠缓冲溶液, pH=6.0.

ATP 为 5'-腺苷三磷酸二钠盐 (5'-ATP·Na₂), 生化试剂, 含量 >90%(质量分数), 上海伯奥生物科技有限公司进口分装.

紫色酸性磷酸酯酶模型化合物由华中师范大学生物无机组首次合成 (Na₂[Fe₂(μ-O)(μ-OAC)₂(IDA)₂·5H₂O). 通过紫外光谱、红外光谱、拉曼光谱、摩尔电导法、元素分析等方法, 证明其可能的结构如图 1 所示.

微量热计采用 2107 Batch 微量热系统, 记录仪采用 LKB-2210 型双笔积分记录仪, 可同时记录热谱图的峰面积 (A) 和放热量 Q . 如图 2 所示, 有关仪器的结构、原理和操作方法见文献 [7].

2.2 结果及处理

在 37 °C, pH=6.0 的 NaAc-HAc 缓冲溶液中, 紫色酸性磷酸酯酶模型化合物水解 ATP 的热谱图数据如表 1 所示:

取模型化合物 ($\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\mu\text{-O})(\mu\text{-OAC})_2(\text{IDA})_2]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 的溶液 ($[\text{E}_0]=4.9\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 底物 ATP 溶液的浓度 ($[\text{S}_0]=2.954\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ATP 溶液的初始浓度根据文献 [8], 利用荧光法测定, 并且在每次实验前配制. $[\text{E}_0]$ 和 $[\text{S}_0]$ 均代表初始浓度.

利用 (9) 式, 将 $-\ln(1-\Phi)/t$ 对 Φ/t 用计算机进行线性拟合, 可得到截距为 $v_{\max}/K_m=7.564\times 10^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$.

表 1 模型化合物酶促水解 ATP 的有关数据

Table 1 Data related to model compound of purple acid phosphatases hydrolysis of ATP

t/s	Q_t/cm	$(\Phi/t)\times 10^3/\text{s}^{-1}$	$[-\ln(1-\Phi)/t]\times 10^3/\text{s}^{-1}$
48	1.99	3.540	3.880
78	3.11	3.405	4.031
108	4.21	3.329	4.125
138	5.21	3.224	4.265
168	6.12	3.111	4.402
198	6.92	2.985	4.500
228	7.60	2.847	4.592
258	8.25	2.731	4.723

斜率 $[\text{S}_0]/K_m=-1.033$, 相关系数 $\gamma=0.9946$, 代入底物的初始浓度 $[\text{S}_0]=2.954\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 可求出米氏常数为 $K_m=2.860\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 最大反应速率 $v_{\max}=2.163\times 10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 由 (10) 式及 $[\text{E}_0]=4.9\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 可求出 $k_2=4.415\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$. 在整个计算过程中, Q 的值用高度表示, 是因为采用对比进度, 故只须用其相对值表示即可. 表 2 给出了 3 次实验的 k_2 和 K_m 的值. $[\text{E}_0]$ 的浓度保持不变.

表 2 模型化合物酶促水解 ATP 的 K_m 和 k_2 (37 °C, pH=6.0)

Table 2 The values of K_m of model compound of Purple acid phosphatases hydrolysis of ATP

$[\text{S}_0]\times 10^4/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$v_{\max}\times 10^6/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$k_2\times 10^3/\text{s}^{-1}$	$K_m\times 10^4/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
2.954	2.163	4.415	2.860
4.430	2.219	4.529	2.852
6.624	2.404	4.907	3.282

mean value of k_2 and K_m : $k_2=(4.617\pm 0.193)\times 10^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$, $K_m=(2.898\pm 0.195)\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

3 讨论

本文用微量热法, 在 pH=6.0 和 37 °C 近生理的条件下, 首次测定了紫色酸性磷酸酯酶模型化合物 ($\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\mu\text{-O})(\mu\text{-OAC})_2(\text{IDA})_2]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 水解 ATP 的动力学参数, 说明此模型化合物具有

水解单磷酸酯的活性, 可以为该类模型化合物的合成提供理论指导. 从所测定的数据精度来看, 该反应符合米氏机理. 文献^[1]指出, 对于不同来源 PAPs, 其 K_m 和 k_2 的值不同. 在 pH=6.0 和 22 °C 的条件下, 牛脾紫色酸性磷酸酯酶水解对硝基苯磷酸酯的 K_m 和 k_2 分别为 $2.0\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 580s^{-1} , 这说明模拟酶的效率较低. 我们还可以进一步研究该类模型化合物催化水解二核苷酸和三核苷酸, DNA 和 RNA 的反应. 进一步研究该类模型化合物结构与催化性能之间的关系.

参 考 文 献

- 1 Relph G W. *Chem. Soc. Rev.* 1992, 21:171
- 2 Tsubouchi A, Bruice T C. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117:7399
- 3 Westheimer F. *Science*, 1987, 235:11173
- 4 刘长林, 徐辉碧, 周井炎. *化学通报*, 1995, 8:26
- 5 刘劲松, 曾宪斌, 邓郁. *高等学校化学学报*, 1992, 13(11): 1466
- 6 刘劲松, 曾宪斌, 邓郁等. *高等学校化学学报*, 1993, 14(6): 853
- 7 Wu Dingquan, Mei Fuming, Qu Songsheng. *Thermochimica Acta*, 1990, 169:203
- 8 Jingshe Yang, Guangjun Zhou, Nianqian Jie, et al. *Analytical Letters*, 1994, 27(11): 2181

Studies on Model Compound of Purple Acid Phosphatases Hydrolysis of ATP

Wang Tianzhi Wu Dingquan Huang Zaiyin Qu Songsheng
(Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072)

Li Dongfeng Liao Zhanru Wang Hongwen
(Department of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430070)

Abstract Studies on the thermokinetic properties of model compound of Purple acid phosphatases ($\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\mu\text{-O})(\mu\text{-OAC})_2(\text{IDA})_2]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) hydrolysis of ATP, at 37 °C, pH=6.0 by using LKB-2107 Batch microcalorimetry system. The Michaelis constant $K_m=(2.898 \pm 0.195)\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and rate constant $k_2=(4.617\pm 0.193)\times 10^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ have been determined. The result has been discussed.

Keywords: Thermokinetic, Microcalorimetry, ATP, Hydrolysis