

苯丙氨酸镁配合物对磷酸酯键的水解作用

汪东风 耿娟 孙继鹏 张宾 张莉 徐杰 薛长湖

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003. E-mail: wangdf@ouc.edu.cn)

摘要 合成了苯丙氨酸镁配合物, 并就该配合物对磷酸酯键的水解作用进行了研究. 结果表明该配合物对磷酸对硝基苯酯的表现水解速率常数达 $7.45 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$; 能将质粒DNA水解成不同分子量的片段; 对某些有机磷农药也有很好的水解效果, 在 48 h内对氧乐果的水解率可达 100%, 甲胺磷、敌敌畏和乐果的水解率分别为 71.11%, 55.34%和 49.05%. 因此, 苯丙氨酸镁配合物在农业上的应用不仅有利于提高产量, 还将有助于减少有机磷农药的残留.

关键词 苯丙氨酸 镁 磷酸酯键 水解 残留

我国地少人多, 如何保障食物数量及质量是长期而艰巨的任务. 为此, 我国农业生产中采取了多种有效措施, 如高级稻的选育、氨基酸微量元素配合物微肥^[1]的应用等. 氨基酸微量元素配合物微肥在农业生产中的应用表明, 该微肥对农作物具有增加产量、提高品质和防病等作用, 已成为多种作物增产提质的有效措施之一.

有机磷农药的使用已有 70 多年的历史, 仍被广泛使用. 我国有机磷农药的产量约占全世界总量的 1/3, 占全国农药总量的 77.76%^[2]. 就农作物来说, 它们的生长旺季也多是病虫害发生旺季, 现阶段为提高农作物的产量和质量, 农业生产还需要用有机磷农药防治病虫害. 据报道使用农药每年减少直接经济损失约 300 亿元^[3]. 有机磷农药大多为磷酸三酯类或硫代磷酸三酯类, 在食物中不易降解, 长期大规模生产和使用有机磷农药, 不仅对环境造成严重污染, 在食物及饲料中残留对人及养殖动物也构成安全隐患. 目前可促进有机磷农药降解的主要方式有化学降解、光化学降解、生物降解等^[4], 但这些方式目前还难于在农业上推广应用. 因此, 研制既能促进作物增产, 又能降解有机磷农药的应用技术是十分必要的.

本文以农作物必需的镁元素和苯丙氨酸为原料, 制备出了苯丙氨酸镁配合物(Phe-Mg), 分别以磷酸对硝基苯酯(*p*-nitrophenylphosphate, PNPP)作为磷酸单酯键、质粒 DNA 及 5'-AMP 作为磷酸二酯键和有机磷农药作为磷酸三酯键的目标物, 研究了 Phe-Mg 对

上述目标物的水解作用. 结果发现 Phe-Mg 对磷酸酯键有很好的水解作用. 这一结果提示氨基酸微量元素配合物微肥在农业上应用不仅有利于提高产量, 还将有助于减少有机磷农药的残留, 为保障食物生产过程中的数量质量和质量安全提供新技术, 同时也为我国丰富的含蛋白质资源废弃物的开发利用提供新途径.

1 材料与方法

() 试剂和仪器. 磷酸对硝基苯酯(*p*-nitrophenylphosphate, PNPP), 购自北京拜尔迪公司(进口分装); 250 mg/mL pBR322DNA 为宝生物工程(大连)有限公司生产; 5'-腺嘌呤核苷酸(5'-AMP)为美国 sigma 产品; 其他试剂均为分析纯. HP6890 气相色谱仪及 Agilent1100 高效液相色谱为美国 Agilent 公司生产.

() 苯丙氨酸镁配合物(Phe-Mg)的合成. 在重蒸水中加入苯丙氨酸和碱式碳酸镁(Phe : Mg²⁺ = 1 : 0.35), 90 °C 磁力搅拌 8 h, 整个反应在氮气保护下进行. 产物离心取上清液, 旋转蒸发至有颗粒晶体出现, 放置过夜待晶体慢慢析出. 析出完全后过滤, 用乙醇和丙酮(1 : 2)的混合液洗涤 3 次, 真空干燥, 放置到干燥器中保存备用^[5,6].

用质谱仪(Water Q-TOF), 以 3.0 kV 的 ESI 为电离源, 流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 对刚制备的 Phe-Mg 配合物进行正离子模式下的质谱(FTICR-MS)测定, 结果表明, 1 个 Mg 可与 3~6 个 Phe 形成配合物.

() Phe-Mg对含磷酸单酯键的PNPP的水解作

用. PNPP在生物化学中是酸性或碱性磷酸酯酶分析的色原基质, 其水解而释放出的对硝基苯酚为黄色产物, 在 405 nm处有强吸收, 可用分光光度法定量^[7]. 因此通过测定其吸光值的大小可反映Phe-Mg对PNPP的水解能力. Phe-Mg对PNPP的水解: 3 mL 5 mmol/L PNPP加入 1.0 mL 1.6 g/L的Phe-Mg, 恒温 25 反应 4 h, 每 24 min测定一次吸光值(3 次重复).

() Phe-Mg对含磷酸二酯键的质粒DNA的裂解作用. (1) 不同浓度的Phe-Mg对质粒DNA的裂解: pBR322 DNA, 1 μL; pH 8.0, 10 mmol/L Tris-HCl配制成的 5 g/L Phe-Mg, 分别加入 0, 0.6, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 12 和 16 μL; 用Tris-HCl补至 20 μL. 放置厌氧培养箱中, 恒温 37 反应 4 h^[8]. 用琼脂糖凝胶(Agrose- gel)电泳分析质粒 DNA的裂解情况. (2) Phe-Mg对 5'-腺嘌呤脱氧核苷酸(5'-AMP)的水解切断作用: 在pH 7.2, 0.05 mol/L 的 Tris- 盐酸缓冲溶液 25.0 mL 中, Phe-Mg(3.54 g/L)和 5'-AMP(0.2 mmol/L)50 下反应 10 h, 同条件不加Phe-Mg为对照^[9]. 用HPLC测定Phe-Mg对 5'-AMP的水解作用.

() Phe-Mg对含磷酸三酯键的有机磷农药的水解作用. 配制混合有机磷农药的水溶液(敌敌畏、乐果、氧乐果、对硫磷、甲胺磷、毒死蜱), 每种农药的浓度为 1 mg/kg, 取 60 mL, 加入 0.02 g Phe-Mg. 反应 48 h后, 取 20 mL用GC测定, 不加Phe-Mg的农药溶液为空白对照(3 次重复). 反应液中各种有机磷农药含量的测定同前文报道的方法^[10].

2 结果

2.1 Phe-Mg 对磷酸单酯键化合物 PNPP 的水解效果

从 Phe-Mg 及镁离子对 PNPP 的催化水解, 以及 PNPP 自发水解的比较可以看出(图 1), Phe-Mg 对 PNPP 有明显的催化水解作用.

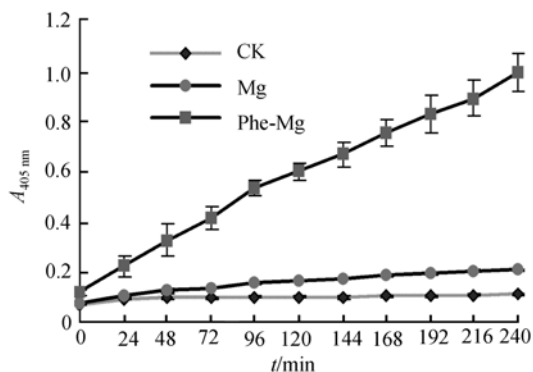


图 1 PNPP 水解的 A-t 曲线

以图 1 结果为基础, 根据公式 $\ln[(A_{\infty}-A_t)/(A_{\infty}-A_0)] = -K_{\text{obsd}}t$ 线性拟合得表观速率常数 K_{obsd} . PNPP 自发水解、 Mg^{2+} 催化 PNPP 水解以及 Phe-Mg 催化 PNPP 水解的表观速率常数分别为: $K(\text{PNPP})_{\text{obsd}}=1.03 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, $K(\text{Mg}^{2+})_{\text{obsd}}=3.57 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, $K(\text{Phe-Mg})_{\text{obsd}}=7.45 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. 从表观速率常数结果看, Phe-Mg 对 PNPP 的催化水解, 比 PNPP 自发水解速率提高了两个数量级. Mg^{2+} 对 PNPP 也有一点催化水解作用, 但是相对于 Phe-Mg 来说少了 20 多倍, 说明当 Phe 与 Mg 形成配合物后对磷酸一酯键有很好的水解作用.

2.2 Phe-Mg 对含磷酸二酯键的生物大分子质粒 DNA 的裂解效果

由图 2 可知, 当Phe-Mg的浓度大于 1 μg/μL时(7~9泳道), 出现典型的 3 条水解带. Phe-Mg使超螺旋型(CCC)DNA裂解至缺口开环型(OC), 进而产生线型(Linear)^[11]. 当浓度>2.000 μg/μL时(10~12泳道), DNA水解断裂效果变得更为显著. 说明该配合物对DNA有很强的裂解作用. 但在相同的实验条件下, 除 $\text{Mg}^{2+} + \text{Phe}$ 的混合物对质粒DNA有非常弱的裂解作用(4泳道)外, 单独的Phe和 Mg^{2+} 基本上无此作用(2, 3泳道). 由此可见, 在该实验条件下, Phe-Mg对磷酸二酯键也有很好的裂解作用.

2.3 Phe-Mg 对 5'-AMP 的水解切断效果

为了进一步了解 Phe-Mg 对磷酸二酯键的裂解作用, 以 5'-AMP 为底物测定了 Phe-Mg 对其水解作用. 结果表明(图 3), Phe-Mg 对 5'-AMP 也有很好的水解作用, 其水解产物仅为 Ad(5'-腺嘌呤核糖核苷), 没有破坏核酸的戊糖环结构, 提示反应过程只断裂磷酸酯键. Phe-Mg 50 下水解 5'-AMP 10 h 的水解率为 43.2%.

2.4 Phe-Mg 对磷酸三酯键化合物有机磷农药的水解效果

有机磷农药大多为磷酸三酯类或硫代磷酸三酯类, 如常见有机磷农药敌敌畏[O-(2,2-二氯乙烯基)O,O-二甲基磷酸酯]具有典型磷酸酯键结构, 氧乐果[O,O-二甲基-s-(N-甲基氨基甲酰甲基)硫代磷酸酯]和甲胺磷[O-甲基-S-甲基-硫代磷酸酰胺]具有硫(醇)代磷酸酯键结构, 对硫磷[O,O-二乙基-O-(4-硝基苯基)硫代磷酸酯]和毒死蜱[O,O-二乙基-O-(3,5,6-三氯-2-吡啶基)硫代磷酸酯]具有硫(酮)代磷酸酯键结构, 乐果[O,O-二甲基-S-(N-甲基氨基甲酰甲基)二硫代磷酸酯]具有二硫(酮、醇)代磷酸酯键结构等^[12].

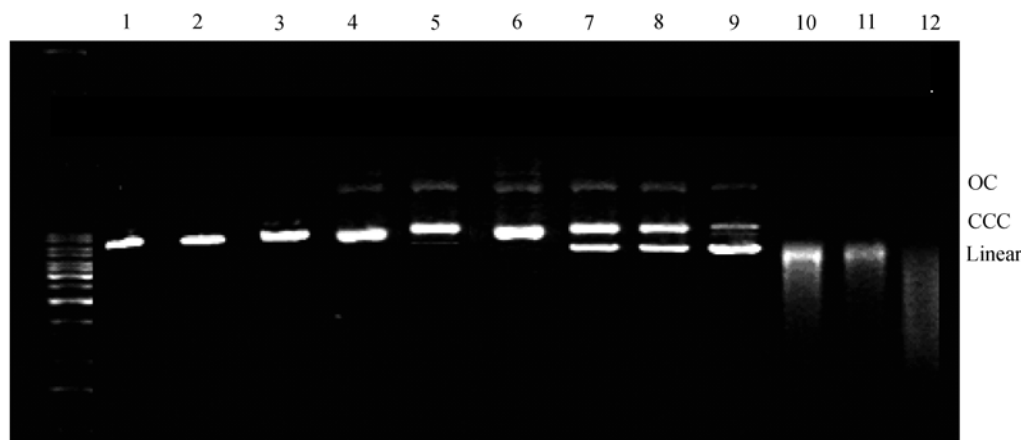


图2 不同浓度的Phe-Mg裂解pBR322 DNA的琼脂糖电泳图

1, pBR322 DNA; 2, pBR322DNA + 2.000 μg/μL Phe; 3, pBR322DNA+2.000 μg/μL Mg; 4, pBR322DNA+2.000 μg/μL Phe + 2.000 μg/μL Mg; 5-12, pBR322 DNA+Phe-Mg, Phe-Mg的浓度分别为: 0, 0.150, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000和4.000 μg/μL

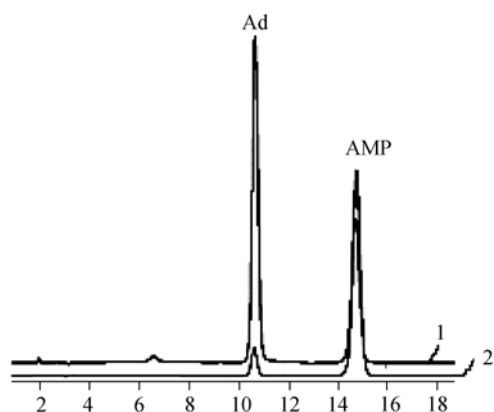


图3 5'-AMP水解后的HPLC图

1, Phe-Mg水解切断5'-AMP的HPLC图; 2, 5'-AMP自动水解的HPLC图

有机磷农药常被用作农作物的杀虫剂，虽然它比有机氯农药较易降解，残留期较短，但有机磷农药毒性也较高，如果残留在水果、蔬菜等作物上的农药或进入环境的农药进入生命体，大部分对生物体内胆碱酯酶有失活作用。但一旦有机磷农药中的磷酸酯键被水解，其毒性将大大降低，如对硫磷，当磷酸酯键被水解后其毒性降低为原来的百分之一^[12]。

考虑到有机磷农药在水溶液中会发生水解，本试验以农药在水溶液中的自水解为空白对照，检测了Phe-Mg对有机磷农药的催化水解作用(图4)。从图4可知Phe-Mg对有机磷农药水解效果最好的是含硫(醇)代磷酸三酯键的氧化乐果和甲胺磷，48 h水解率分别是100%和71.11%，其次对含磷酸三酯键的敌敌畏和含二硫(醇、酮)代磷酸三酯键的乐果，分别达到55.34%，49.05%；而对含硫(酮)代磷酸三酯键的毒死

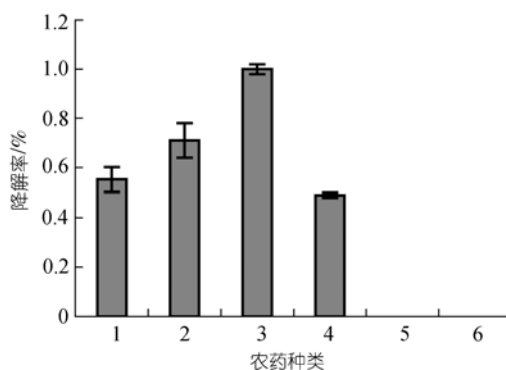


图4 Phe-Mg对6种农药的催化降解

1, 敌敌畏; 2, 甲胺磷; 3, 氧化乐果; 4, 乐果; 5, 毒死蜱; 6, 对硫磷。毒死蜱和对硫磷在48 h之内基本没有水解作用，提示Phe-Mg对有机磷农药水解有一定的选择性。

3 讨论

自20世纪90年代以来，人们发现镧系离子及其配合物具有催化核酸水解的作用，尤其是Ce⁴⁺及其配合物是目前发现的人工模拟酶中水解磷酸酯键速率最高的物质^[13-15]，但由于镧系金属离子不是生命体的必需元素，如果用于生命体内，超过一定的限量会对细胞产生潜在的危害。

镁和苯丙氨酸都是生命体必需的成分，但单独的镁和苯丙氨酸，或将2.000 μg/μL的镁和苯丙氨酸同时与质粒DNA反应，对质粒DNA基本上都无裂解作用，然而将镁和苯丙氨酸在90 °C下反应8 h后，所制得的Phe-Mg配合物对磷脂键则有较强的裂解作用。用KBr压片法测定了苯丙氨酸及Phe-Mg配合物在400~4000 cm⁻¹的光谱图，结果表明，苯丙氨酸和镁

离子形成配合物后, 苯丙氨酸的一些主要吸收峰与 Phe-Mg 配合物相比, 发生了明显的位移, 证实镁离子与苯丙氨酸发生了配位作用. 根据 Phe-Mg 配合物的质谱(FTICR-MS)测定结果表明, 以 ESI 为电离源, 用刚制备的 Phe-Mg 配合物, 在正离子模式下测得的 Phe-Mg 配合物是 3, 4, 5 或 6 个苯丙氨酸与一个镁形成配合物的混合物.

在较低浓度染色剂 EB(溴化乙锭)(如, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 情况下, 一般超螺旋型移动最快, 线型其次, 缺口最慢. 但较高浓度 EB 会影响 3 种形式 DNA 的顺序^[16]. 为得到较好的染色效果, 本次 EB 浓度为 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 结果线型最快. 在相同的实验条件下用 *EcoR* (限制性内切酶, 只将质粒 DNA 水解断裂成线型) 作用该 DNA, 证实了这种现象.

参 考 文 献

- 1 许立和. 以鸡羽毛为原料制取氨基酸微肥. 科研与开发, 2002, 24—25
- 2 伍宁丰, 梁果义, 邓敏捷, 等. 有机磷农药降解酶及其基因工程研究进展. 生物技术通报, 2003, (5): 9—12
- 3 中国统计年鉴 2001. 北京: 中国统计出版社, 2002. 478
- 4 邓敏捷, 伍宁丰, 梁果义, 等. 一种新的有机磷降解酶基因 *ophc2* 的克隆与表达. 科学通报, 2004, 49(11): 1068—1072
- 5 钟国清. 甘氨酸锌螯合物的合成与结构表征. 精细化工, 2001, 18(7): 391—397
- 6 Yang P, Ren R, Guo M, et al. Double-strand hydrolysis of DNA by a magnesium () complex with diethylenetriamine. J Biol Inorg Chem, 2004, 9: 495—506[DOI]
- 7 焦奎, 孙伟, 王海玉. 以对硝基磷酸苯酯为底物电化学分析法检测碱性磷酸酯酶. 分析化学, 2001, 10(29): 1174—1177
- 8 Ren Rui, Yang Pin, Zheng W, et al. A simple copper ()-L-histidine system for efficient hydrolytic cleavage of DNA. Inorg Chem, 2000, 39: 5454—5463[DOI]
- 9 康玉专, 沈鹤柏, 胡岗, 等. 稀土金属离子对 5'-AMP 和 3', 5'-cAMP 的水解切断作用. 稀土, 2000, 21(6): 10—13
- 10 杜德红, 汪东风, 孙继鹏, 等. 茶叶多糖及其铜配合物对质粒 DNA 及有机磷农药的降解作用. 中国稀土学报, 2005, 23(1): 118—121
- 11 余四旺, 刘长林, 李东风. 双锌配合物 $\text{Zn}_2(\text{DTPB})\text{Cl}_4$ 水解 DNA. 无机化学学报, 2002, 18(11): 1113—1117
- 12 伍宁丰, 梁果义, 邓敏捷, 等. 有机磷农药降解酶及其基因工程研究进展. 生物技术通报, 2003, (5): 9—12
- 13 高飞, 阴彩霞, 杨频. 核酸酶催化磷酸二酯键水解断裂作用的配位化学模拟. 科学通报, 2004, 15(49): 1471—1481
- 14 Rammo J, Hettich R, Roigk A, et al. Catalysis of DNA cleavage by Lanthanide complexes with nucleophilic or intercalating ligands and their kinetic characterization. Chem Commun, 1996, 105—107
- 15 沈鹤柏, 夏静芬, 杨海峰, 等. Ce 离子水解断裂 Oligomers DNA 中磷酸二酯键. 中国科学 B 辑: 化学, 2001, 31(2): 178—184
- 16 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法, 等. 生物化学. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2002. 516