

# Ag<sup>+</sup> 离子对漆树漆酶催化活性的抑制作用\*

## Inhibition of the Oxidoreductase Activity of *Rhus vernicifera* Laccase by Ag<sup>+</sup> Ion

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 &amp; Chemical Engineering,

Guangxi Normal Univ., 3 Yucailu, Guilin, Guangxi, 541004)

**摘要** 以5,6-二溴-2,3-二氰基氢醌(DDBQH)为底物,在pH值4.4和30±0.2℃条件下,用分光光度法考察了Ag<sup>+</sup>离子对漆树漆酶催化活性的影响。结果表明,Ag<sup>+</sup>离子对DDBQH的漆酶催化氧化反应有明显的抑制作用,这种作用具有罕见的反竞争性特征,抑制剂常数 $K_i = (2.1 \pm 0.5) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ 。

**关键词** 漆树漆酶 Ag<sup>+</sup>离子 反竞争性抑制作用

中图法分类号 Q 554.0 614.122

**Abstract** Kinetic experiments were designed to examine the effects of Ag<sup>+</sup> ion on the oxidation of DDBQH (5, 6-dibromo-2, 3-dicyanohydroquinone) catalyzed by *Rhus vernicifera* laccase. The result was that Ag<sup>+</sup> ion could uncompetitively inhibit the catalytic activity of laccase at pH 4.4 and 30±0.2℃, the inhibition constant  $K_i = (2.1 \pm 0.5) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ .

**Key words** *Rhus vernicifera* laccase, Ag<sup>+</sup> ion, uncompetitive inhibition

漆树漆酶 (*Rhus vernicifera* laccase, E. C. 1.10.3.2)是含4个紧密结合Cu(II)的多铜氧化酶,它催化氧分子对二酚类底物(一级离解种)的氧化反应,最终生成水和醌类物质<sup>[1,2]</sup>。由于大多数二酚类底物的一级离解都发生在pH值大于8.0的环境中,而在此环境中,大多数金属离子都会发生水解,因此很少见到有关金属离子对漆酶催化活性影响的报道。在研究漆酶催化反应的过程中,王光辉等<sup>[3,4]</sup>发现5,6-二溴-2,3-二氰基氢醌(DDBQH)底物的一级离解( $\lambda_{\text{max}} = 389 \text{ nm}$ )发生在pH值4.0左右,并能很方便地用吸收光谱追踪它的漆酶催化氧化反应。这个发现,为在酸性环境中考察金属离子对漆酶催化活性的影响创造了良好条件<sup>[4]</sup>。本文以DDBQH为底物,用分光光度法考察了Ag<sup>+</sup>离子对漆酶催化氧化反应的影响,并就作用特征和作用方式进行了探讨。

### 1 实验

漆酶的分离纯化和底物的合成按文献[3]进行。AgNO<sub>3</sub>, HOAc和NaOAc均为分析纯试剂。底物溶

液用无水乙醇配制,其余溶液均用去离子水配制。AgNO<sub>3</sub>溶液的浓度用NH<sub>4</sub>SCN滴定,用前新鲜配制。

实验在0.1 mol·dm<sup>-3</sup> HOAc-NaOAc缓冲液(pH值4.4)中和30±0.2℃条件下进行。取一定体积的缓冲液于1 cm比色皿中,加入一定量的底物和Ag<sup>+</sup>离子溶液,预热达热平衡后,加入一定量的漆酶液(此时比色皿中的溶液总体积为3.00±0.02 mL)启动反应。定时追踪反应开始后3 min内底物特征吸收处(389 nm)吸光度值随时间的变化,求出反应初速度 $v_0$ 。

实验用的光谱仪为岛津UV-24型。

### 2 结果与讨论

#### 2.1 Ag<sup>+</sup>离子对漆酶催化活性的影响

由于Ag<sup>+</sup>离子具有一定的氧化性,首先在实验条件下观察了AgNO<sub>3</sub>对DDBQH的氧化情况。发现在[DDBQH]为 $1. \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 时,当 $[\text{Ag}^+] > 2.27 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 时,开始对DDBQH表现出可以观察到的氧化作用。因此在本文的实验中,严格控制[DDBQH]: $[\text{Ag}^+] > 5:1$ 。

图1a为未加Ag<sup>+</sup>离子时DDBQH的漆酶催化氧化反应的吸收光谱变化,389 nm处为底物特征吸收

1998-05-19收稿,1998-10-29修回

\* 广西自然科学基金资助项目。

\*\* 联系人 Person to contact.

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



70.6) 则比 V 糖上的 3 位和 4 位碳 (C-2':  $\delta$ : 75.3; C-4':  $\delta$ : 72.2) 处于高场, 表明 VI 中咖啡酰基连在糖 3 位碳的氧上<sup>[8]</sup>。<sup>1</sup>H NMR 数据显示 VI 糖的 3 位碳上氢的信号明显处于低场 ( $3\text{-H}$   $\delta$ : 5.01), 也支持了以上推论。故 VI 的化学结构鉴定为 3'-O-咖啡酰当药甙

致谢

本研究得到大阪大学药学部北川 教授、小林资正教授、堀一之博士的指导, 在此表示衷心感谢

### 参考文献

- 1 Banerji N, Dutta N L. Structure of a new saponin from stem bark of *Anthocephalus cadamba* Mig. Indian J Chem Sect B, 1976, 14B: 614.
- 2 Uji T, Wiriadinata H, Kitagawa I et al. . Prosiding seminar dan lokakarya nasional etnobotani. Cisarua-Bogor, 1992, 60.
- 3 Handa S S, Borris R P, Cordell G A. NMR spectral anal-

ysis of cadambine from *Anthocephalus chinensis*. J Nat Prod, 1983, 46: 325.

- 4 Mpondo E M, Garcia J. Iridoids from *Gentiana verna*. Phytochemistry, 1989, 28: 2503.
- 5 El-Nagger L J, Beal J L. Iridoids: A review. J Nat Prod, 1980, 43: 649.
- 6 Garcia J, Lavaitte S, Gey C. 8-epikingiside and its vanillate ester, isolated from *Gentiana pyrenaica*. Phytochemistry, 1989, 28: 2199.
- 7 Van der Sluis W G, Labadie R P. Secoiridoids and xanthones in the genus *Centaurium*. part II: secoiridoid glucosides in *Centaurium spicatum*. Planta Med, 1981, 41: 221.
- 8 Yoshimoto K, Itatani Y, Tsuda Y. <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of O-acylglucoses additivity of shift parameters and its application to structure elucidations. Chem Pharm Bull, 1980, 28: 2065.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 110 页 Continue from page 110)

因此可以推断, Ag<sup>+</sup> 离子对漆酶的抑制作用可能是由于结合底物后, 漆酶的构象发生了变化, 显露出抑制剂的结合部位<sup>[5]</sup>。部位中可能含有氮或硫等配位原子, 对 Ag<sup>+</sup> 离子有较强的吸引力<sup>[6]</sup>, 因而表现为 ESI 复合物的解离常数较小。至于具体的结合情况, 尚有待于进一步的研究。

已有许多文献报道阴离子可以竞争性地抑制漆酶的催化活性<sup>[2, 7, 8]</sup>, 我们曾报道稀土金属离子对漆酶的催化活性表现出强烈的竞争性抑制作用<sup>[4]</sup>。本文首次报道了 Ag<sup>+</sup> 离子对漆酶的催化活性表现出反竞争性抑制的特点, 这对于深入理解漆酶催化氧化反应的机理是很有意义的。银的杀菌能力是众所周知的, 但它也属于对生物体具有潜在危害性的重金属元素之一<sup>[9]</sup>, 因此本文的研究结果也可以为进一步从分子水平上阐明银的毒理提供一些新的信息。

### 参考文献

- 1 王光辉, 江涛. 漆树漆酶的催化氧化作用 VI: 漆酶的催

化氧化反应机理研究. 武汉大学学报(自然科学版), 1994, 1: 59.

- 2 Holwerda R A, Gray H B. Mechanistic studies of the reduction of *Rhus vernicifera* laccase by hydroquinone. J Amer Chem Soc, 1974, 96: 6008.
- 3 王光辉, 江涛, 张昌军等. 漆树漆酶的催化氧化作用 V: 漆酶 /O<sub>2</sub> 体系获取半醌自由基的研究. 武汉大学学报(自然科学版), 1992, 4: 88.
- 4 王光辉, 黄厚评, 蔡汝秀. 漆树漆酶的催化氧化作用 VII: 稀土金属离子对漆酶催化活性的抑制作用. 武汉大学学报(自然科学版), 1994, 3: 66.
- 5 颜思旭, 蔡红玉. 酶催化动力学原理与方法. 厦门: 厦门大学出版社, 1987: 66.
- 6 Greenwood N N, Earnshaw A. 元素化学. 下册. 王曾隽, 张庆芳, 林蕴和等译. 北京: 高等教育出版社, 1996: 435.
- 7 周易勇. 漆酶的抑制剂. 中国生漆, 1992, 11: 19.
- 8 涂楚桥, 梁宏, 王光辉. Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 离子对漆酶催化活性的抑制作用. 广西科学, 1998, 5(4): 285-287.
- 9 王夔, 韩万书. 中国生物无机化学十年进展. 北京: 高等教育出版社, 1997: 214.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)